

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

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO
DE *Croton rhamnifolius* (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação de Mestrado

Francisca Karen Souza da Silva

Fortaleza-CE
2008

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

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO
DE *Croton rhamnifolius* (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação submetida à coordenação da Pós-Graduação em Química
Orgânica, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

ALUNA: Francisca Karen Souza da Silva
ORIENTADOR: Prof. Edilberto Rocha Silveira

Fortaleza – CE
2008

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará

“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade de concluir mais uma etapa.

Aos meus Pais, Fátima e Silva, com a certeza de dever cumprido, pela dedicação, pelo apoio, pela atenção, carinho e principalmente, por todos ensinamentos sempre coerentes e indispensáveis, fornecidos durante toda a minha vida.

Ao meu marido, Edson Mesquita, pelo seu carinho, companheirismo e atenção. Pela revisão final dos textos e por seu auxílio incondicional durante todo o período de elaboração desta dissertação.

A meu irmão, Wendley, pela motivação e apoio.

Ao meu orientador Prof. Edilberto Rocha Silveira, por toda atenção dispensada, pela amizade, dedicação e por todas as críticas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta dissertação.

A minha co-orientadora Prof^a. Mary Anne Souza Lima, pelo grande incentivo, colaboração e orientação, pelas críticas e sugestões, pela dedicação e amizade, e por todos os conhecimentos valiosos que transmitiu e que me ajudaram a continuar crescendo.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Aos meus colegas de bancada - LAFIPLAM I: Artur, Henrique, Patrícia, Priscila, Milena, Ricardo, Julieta, Renata, Flávio, João Vitor, Cristiane, Antônia, Duvilardo e Érika, pelo apoio constante, e convivência sempre alegre e divertida.

Aos meus colegas: Daniele, Michele, Eduardo, Cesiane, Tássio, Cícero, entre outros.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de massa e Infravermelho: Henrique, Renata, Daniel, Artur, Lana e Ricardo.

Aos funcionários do departamento, principalmente a Mundinha, Lana, Sr. Paulo e Célia.

Ao CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP e PRONEX pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	XX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	3
2.1. Considerações botânicas sobre a família Euphorbiaceae.....	3
2.2. Algumas considerações botânicas sobre o gênero <i>Croton</i>	5
2.3. Algumas considerações botânicas sobre a espécie <i>Croton rhamnifolius</i>	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE DITERPENÓIDES INDÓLICOS DE FONTES NATURAIS	7
3.1. Alcalóides.....	8
3.2. Alcalóides derivados do triptofano.....	9
4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS, TALOS E RAÍZES DE <i>C. rhamnifolius</i>.....	16
4.1. Análise quantitativa dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial das folhas, talos e raízes de <i>C. rhamnifolius</i> por CG/DIC.....	17
4.2. Espectros de massas dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas (OEFGR), talos (OETCR) e raízes (OERCR) de <i>C. rhamnifolius</i>	23
5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NÃO - VOLÁTEIS DO EXTRATO ETANÓLICO DA RAIZ DE <i>C. rhamnifolius</i> (CRRE).....	31

5. 1. Determinação estrutural de CR-1.....	31
5.2. Determinação estrutural de CR-2.....	50
5.3. Determinação estrutural de CR-3.....	63
5.4. Determinação estrutural de CR-4	73
5.5. Determinação estrutural de CR-5.....	79
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	91
6.1. Métodos cromatográficos.....	91
6.1.1. Cromatografia líquida em coluna aberta (CC).....	91
6.1.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	91
6.1.3. Cromatografia líquida em Coluna sob Pressão (CC Flash).....	91
6.2. Métodos espectroscópicos.....	92
6.2.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de prótioo (RMN ¹ H) e de Carbono-13 (RMN ¹³ C).....	92
6.2.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) e ao Detector por Ionização em Chamas (CG/DIC).....	93
6.2.3. Ponto de fusão (p.f).....	93
6.2.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	94
6.3. Estudo dos constituintes químicos voláteis das folhas e talos de <i>C. rhamnifolius</i>	94
6.3.1. Coleta do material vegetal.....	94
6.3.2. Obtenção do óleo essencial por hidrodestilação.....	94
6.3.3. Métodos de análise.....	95
6.4. Triagem fitoquímica preliminar das raízes, caules, talos e folhas de <i>C.</i> <i>rhamnifolius</i>	96

6.4.1. Material vegetal.....	96
6.4.2. Fracionamento cromatográfico de CRRE.....	97
6.4.3. Fracionamento cromatográfico de CRCE.....	98
6.4.4. Fracionamento cromatográfico de CRTE.....	98
6.4.5. Fracionamento cromatográfico de CRFE.....	99
6.4.6. Fracionamento cromatográfico de CRRH.....	100
6.4.7. Fracionamento cromatográfico de CRTH.....	100
6.4.8. Fracionamento cromatográfico de CRCH.....	101
6.4.9. Fracionamento cromatográfico de CRFH.....	101
6.5. Isolamento dos metabólitos secundários da raiz de <i>C. rhamnifolius</i>	102
6.5.1. Obtenção do extrato etanólico da raiz de <i>C. rhamnifolius</i>	102
6.5.2. Partição líquido-líquido do extrato etanólico da raiz de <i>C. rhamnifolius</i> – (CRRE).....	102
6.5.3. Obtenção de CR-1.....	103
6.5.4. Obtenção de CR-2.....	107
6.5.5. Obtenção de CR-3	111
6.5.6. Obtenção de CR-4.....	112
6.5.7. Obtenção de CR-5.....	114
7. CONCLUSÃO.....	118
8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>C. rhamnifolius</i>.....	120
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
BB	Broad-band
CRRE	Extrato etanólico da raiz de <i>Croton rhamnifolius</i>
CC	Cromatografia em coluna
CGL/EM	Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa
CGL/DIC	Cromatografia gás-líquido com detecção por ionização em chama
COSY	Correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarizator transfer
EM	Espectrometria de massa
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence
IE	Impacto eletrônico
IV	Infravermelho
OEFCR	Óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolius</i>
OETCR	Óleo essencial dos talos de <i>Croton rhamnifolius</i>
p.f.	Ponto de fusão
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de prótio-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias já isoladas de <i>C. rhamnifolius</i> (FILGUEIRAS, 1994).....	2
Figura 2: Fotografias das flores de <i>Euphorbia millii</i> e <i>Jatropha integerrima</i> ; fotografia das folhas de <i>Tragia volubilis</i> e Representação das folhas, inflorescências e frutos de <i>Croton eluteria</i> e <i>Manihot glaziovi</i>	4
Figura 3: Fotografia de um espécime de <i>C. rhamnifolius</i> , com detalhes para as flores e frutos.....	6
Figura 4: Diterpenóide indólico isolado da raiz de <i>C. rhamnifolius</i>	7
Figura 5: Aminoácidos precursores de alcalóides.....	8
Figura 6: Resumo da biossíntese de alcalóides harmina, ajmalicina, ácido lisérgico a partir do triptofano.....	9
Figura 7: Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. rhamnifolius</i> (OEFGR) obtido por CGL/EM.....	20
Figura 8: Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. rhamnifolius</i> (OEFGR) obtido por CG/DIC.....	20
Figura 9 : Cromatograma do óleo essencial dos talos de <i>C. rhamnifolius</i> (OETCR) obtido por CGL/EM.....	21
Figura 10: Cromatograma do óleo essencial dos talos de <i>C. rhamnifolius</i> (OETCR) obtido por CGL/DIC.....	21
Figura 11: Cromatograma do óleo essencial das raízes de <i>C. rhamnifolius</i> (OERCR) obtido por CGL/EM.....	22
Figura 12: Cromatograma do óleo essencial das raízes de <i>C. rhamnifolius</i> (OERCR) obtido por CGL/DIC.....	22

Figura 13: Espectro de massa do α -tujeno.....	23
Figura 14: Espectro de massa do α -pineno.....	23
Figura 15: Espectro de massa do canfeno.....	23
Figura 16: Espectro de massa do sabineno.....	23
Figura 17: Espectro de massa do β -pineno.....	24
Figura 18: Espectro de massa do mirceno.....	24
Figura 19: Espectro de massa do α -felandreno.....	24
Figura 20: Espectro de massa do <i>p</i> -cimeno.....	24
Figura 21: Espectro de massa do limoneno.....	25
Figura 22: Espectro de massa do eucaliptol.....	25
Figura 23: Espectro de massa do (<i>E</i>)- β -ocimeno.....	25
Figura 24: Espectro de massa do γ -terpineno.....	25
Figura 25: Espectro de massa do linalol.....	26
Figura 26: Espectro de massa do cânfora.....	26
Figura 27: Espectro de massa do borneol.....	26
Figura 28: Espectro de massa do terpinen-4-ol.....	26
Figura 29: Espectro de massa do α -terpinenol.....	27
Figura 30: Espectro de massa do acetato de bornila.....	27
Figura 31: Espectro de massa do β -maaleno.....	27
Figura 32: Espectro de massa do β -cariofileno.....	27
Figura 33: Espectro de massa do β -elemeno.....	28
Figura 34: Espectro de massa do isoledeno.....	28
Figura 35: Espectro de massa do α -humuleno.....	28
Figura 36: Espectro de massa do alloaromadendreno.....	28
Figura 37: Espectro de massa do germacreno-D.....	29

Figura 38: Espectro de massa do eremofileno.....	29
Figura 39: Espectro de massa do valenceno.....	29
Figura 40: Espectro de massa do biciclogermacreno-D.....	29
Figura 41: Espectro de massa do espatulenol.....	30
Figura 42: Espectro de massa do óxido de cariofileno.....	30
Figura 43: Espectro de massa do guaiol.....	30
Figura 44: Estrutura básica de um alcalóide do tipo indólico.....	32
Figura 45: Estrutura de: (a) CR-1 e, (b) 3 – isoajamalicina, detalhando a parte indólica dos compostos.....	33
Figura 46: Sub-estrutura I para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	35
Figura 47: Sub-estruturas II para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	36
Figura 48: Sub-estrutura III para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	36
Figura 49: Sub-estrutura IV para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	37
Figura 50: Sub-estrutura V e VI para CR-1, detalhando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	37
Figura 51: Sub-estrutura VII para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	38
Figura 52: Sub-estrutura VIII para CR-1, mostrando as correlações observadas no espectro NOESY.....	38
Figura 53: Estrutura de CR-1: Rhamnifolina.....	39
Figura 54: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de CR-1.....	41
Figura 55: Expansão (7,2 – 7,7 ppm) do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de	

CR-1.....	41
Figura 56: Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	42
Figura 57: Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	42
Figura 58: Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	43
Figura 59: Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	43
Figura 60: Expansão (11,4 – 11,6 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	44
Figura 61: Expansão (7,0 – 8,0 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	44
Figura 62: Expansão (2,5 – 4,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	45
Figura 63: Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	46
Figura 64: Expansão (1,8 – 3,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	47
Figura 65: Expansão (0,7 – 1,7 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	47
Figura 66: Expansão (3,0 – 4,5 ppm) do espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	48
Figura 67: Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	48
Figura 68: Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-1.....	49

Figura 69: Espectro de Infravermelho de CR-1 (pastilha de KBr).....	49
Figura 70: Estrutura básica de um esqueleto triterpênico do tipo oleanano.....	51
Figura 71 Sub-estruturas I e II para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	52
Figura 72: Sub-estruturas III e IV para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	53
Figura 73: Sub-estrutura V para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	53
Figura 74: Estrutura de CR-2: Ácido acetil aleuritólico.....	54
Figura 75: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	57
Figura 76: Expansão (0,75 – 2,30 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	57
Figura 77: Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de CR2.....	58
Figura 78: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	58
Figura 79: Espectro de RMN bidimensional de ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	59
Figura 80: Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional de ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	59
Figura 81: Espectro de RMN bidimensional de ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	60
Figura 82: Expansão (0,9 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional de ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2.....	61
Figura 83: Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-2.....	62
Corrigido ate aqui	
Figura 84: Estrutura básica de um diterpeno do tipo beiereno.....	64

Figura 85: Sub-estruturas I e II para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	65
Figura 86: Sub-estrutura III para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	65
Figura 87: Sub-estrutura IV e V para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	66
Figura 88: Estrutura de CR-3: Estachenona.....	66
Figura 89: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-3.....	69
Figura 90: Expansão (0,75 – 2,50 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-3.....	69
Figura 91: Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de CR-3.....	70
Figura 92: Espectro de RMN ^1H ^{13}C –HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-3.....	70
Figura 93: Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-3.....	71
Figura 94: Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-3.....	72
Figura 95: Espectro de Infravermelho de CR-3 (pastilha de KBr).....	72
Figura 96: Estrutura de CR-4: Lupeol.....	74
Figura 97: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-4.....	76
Figura 98: Expansão (0,6 – 2,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-4.....	76
Figura 99: Espectro RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CR-4.....	77
Figura 100: Expansão do espectro RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CR-4.....	77
Figura 101: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de CR-4.....	78
Figura 102: Estrutura básica de um diterpeno do tipo beiereno.....	79
Figura 103: Sub-estruturas I e II para CR-5, mostrando as correlações a mais de uma	

ligação observadas no espectro HMBC.....	81
Figura 104: Sub-estrutura III para CR-5, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC.....	82
Figura 105: Estrutura de CR-5: 12-oxo-estachenona.....	82
Figura 106: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	84
Figura 107: Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	84
Figura 108: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	85
Figura 109: Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	85
Figura 110: Expansão (0,8 - 1,9 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	86
Figura 111: Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	86
Figura 112: Expansão (0,7 - 3,2 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	87
Figura 113: Expansão (0,6 - 3,2 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	88
Figura 114: Expansão (0,9-2,7 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5.....	89
Figura 115: Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-5.....	90
Figura 116: Espectro de Infravermelho de CR-5 (KBr).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos diterpenóides indólicos descritos na literatura.....	10
Tabela 2: Constituintes voláteis das folhas (OEFGR), talos (OETCR) e raízes (OERCR) de <i>C. rhamnifolius</i> e comparação dos constituintes químicos voláteis das folhas (OEF) obtidos por Craveiro, 1981.....	19
Tabela 3: Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C do esqueleto diterpenoídico indólico de CR-1 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) com o de 3 - isoajamalicina (125 MHz, CDCl_3).....	33
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1 por padrão de hidrogenação.....	34
Tabela 5: Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1.....	40
Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (500MHz, CDCl_3) de CR-2 por padrão de hidrogenação.....	51
Tabela 7: Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CR-2.....	55
Tabela 8: Comparação dos dados de RMN ^{13}C de CR-2 com os descritos na literatura para o ácido acetil aleuritólico.....	56
Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de CR-3 por padrão de hidrogenação.....	64
Tabela 10: Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de CR-3.....	67
Tabela 11: Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C de CR-3 com estachenona.....	68
Tabela 12: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) de CR-4 por padrão de hidrogenação.....	74

Tabela 13: Comparação entre os dados de RMN ¹³ C-BB de CR-4 com os dados descritos na literatura para o Lupeol.....	75
Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de CR-5 por padrão de hidrogenação.....	80
Tabela 15: Correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C- HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, C ₅ D ₅ N) de CR-5 e análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C de CR-3 (125 MHz, CDCl ₃) com CR-5.....	83
Tabela 16: Rendimentos obtidos da extração hexânica de <i>C. rhamnifolius</i>	96
Tabela 17: Rendimentos obtidos da extração etanólica de <i>C. rhamnifolius</i>	97
Tabela 18: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRE.....	98
Tabela 19: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRCE.....	98
Tabela 20: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRTE.....	99
Tabela 21: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRFE.....	99
Tabela 22: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRH.....	100
Tabela 23: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRTH.....	100
Tabela 24: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRCH.....	101
Tabela 25: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRFH.....	101
Tabela 26: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRE.....	103
Tabela 27: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRE-C.....	103
Tabela 28: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRREC-A.....	104
Tabela 29: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECA-(35-89).....	105
Tabela 30: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECA - (35-89) - (3-20).....	106
Tabela 31: Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREC-C...	107

Tabela 32: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECCH.....	108
Tabela 33: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13).	109
Tabela 34: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32).....	109
Tabela 35: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32)-(1-3).....	110
Tabela 36: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(5).....	111
Tabela 37: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRE-H.....	112
Tabela 38: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRREH-C.....	113
Tabela 39: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRREHC- (31).....	115
Tabela 40: Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRREHC- (31)-(34-45).....	116

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Método de extração do óleo essencial das folhas, talos e raízes de <i>C. rhamnifolius</i>	95
Fluxograma 2: Metodologia de isolamento dos constituintes não-voláteis de <i>C. rhamnifolius</i>	117

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo dos constituintes químicos voláteis das folhas, talos e raízes de *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae), popularmente conhecida no nordeste do Brasil por “Quebra-faca”, como também os constituintes químicos não-voláteis das raízes. A análise por CGL/EM do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolius* (OEFGR) permitiu a identificação de 21 constituintes químicos, dos quais os componentes majoritários foram identificados como sendo o 1,8 – cineol (31,81%) e o α -felandreno (11,84 %). O óleo essencial dos talos (OETGR) apresentou 14 constituintes, todos identificados, onde o β -pineno (30,81%) e o β -cariofileno (12,86 %) foram os componentes principais. No óleo essencial das raízes (OERGR), foram identificados 8 constituintes químicos, sendo majoritários, o valenceno (25,97%), e o borneol (20,05%). A análise fitoquímica do extrato etanólico da raiz resultou no isolamento de um alcalóide indólico diterpenoídico de caráter inédito que foi denominado rhamnifolina (**1**), dois diterpenos do tipo beiereno, denominado de estachenona (**2**) e 12-oxo-estachenona (**3**), e de dois triterpenos pentacíclicos, um da série oleanano, o ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico (ácido acetil aleuritólico, AAA) (**4**) e o lupeol (**5**) da série lupano. A determinação estrutural dos constituintes não voláteis foi realizada através de métodos espectrométricos EM, IV e RMN ^1H e ^{13}C , inclusive técnicas uni e bidimensionais (HMBC e HSQC), enquanto a identificação da constituição volátil foi utilizada cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL/EM) e cromatografia gás-líquido com detecção por ionização em chama (CGL/DIC) e comparação com dados descritos na literatura.

ABSTRACT

The present work reports the study on the volatile chemical constitution of the leaves, twigs and roots of *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae), popularly known in the Northeast of Brazil as “quebra-faca” (Port. Lit. = knife breaker) as well as of the non-volatile constituents of the roots. GC-MS analysis of the essential oil from leaves of *C. rhamnifolius* (OEFGR) allowed the identification of 21 constituents from which 1,8-cineol (31,81%) and α - phelandrene (11,84%) were the major components. For the essential oil from twigs (OETGR) all 14 components were identified and β - pinene (30,81%) and β - caryophyllene (12,86%) were the major ones. For the essential oil from roots (OERGR) just 8 components were identified with valencene (25,97%) and borneol (20,05%) arising as the chief components. The phytochemical analysis of the ethanol extract from the roots led to the isolations and characterization of a diterpenoid incorporating an indol alkaloid moiety that has been named as rhamnifolin (**1**), two beierene diterpenes, stachenone (**2**) and 12-oxo-stachenone (**3**), and two pentacyclic triterpenes: one, the 3-acetyl-olean-14-ene-28-oic acid (aleuritolic acid, AAA) (**4**) belonging to the oleanane and the other, lupeol (**5**), belonging to the lupane series. The structure determination of all non-volatile constituents was performed by mean of spectroscopic techniques such as MS, IR, ^1H and ^{13}C NMR, including uni and bidimensional pulse sequences. The identification of the volatile constitution was performed by GC-MS for the qualitative analysis while GC-FID was used for the quantitative analysis. Comparison to data published in the literature was also used for identification wherever the case.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Croton é um dos gêneros mais abundantes da família Euphorbiaceae, com cerca de 1.900 espécies, distribuídas nas Antilhas, América do Sul e América do Norte (WEBSTER, 1994; GOVAERTS, 2000). Espécies deste gênero são frequentemente utilizadas na medicina popular como agentes para aliviar a dor e dentre as propriedades terapêuticas comprovadas podem ser citadas: antiinflamatória, antiulcerogênica, analgésica e antihipertensiva, além da expressiva relevância econômica, alicerçada em seu conteúdo de óleos essenciais e diversas substâncias ativas, tais como: alcalóides, flavonóides, e principalmente diterpenos de esqueletos clerodano, labdano, kaurano, trachilobano e pimarano. (HARTWELL, 1969; ABREU, 2001; MACIELL, 2000; RIBEIRO, 1993).

Croton rhamnifolius é uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil onde é conhecida como “quebra-faca” ou “catinga-branca”. O primeiro nome é uma alusão à rigidez de seu tronco, e o outro devido ao seu aroma e coloração do caule (RANDAU, 2001). É utilizada na medicina popular para dores de estômago, mal-estar gástrico, vômitos e diarreia, e banhos para atenuar a febre (RANDAU, 2001).

Na literatura, foram verificados apenas dois trabalhos sobre *C. rhamnifolius*. O primeiro relacionado ao estudo do extrato hexânico do caule, onde, proporcionou o isolamento de um triterpeno pentacíclico, o lupeol (**1**) e três diterpenos clerodânicos do tipo furânico: 17-Carboxi-hardwiickiato de metila (**2**) e 17-carbometoxi-3-hidroxi-3,4-di-hidro-hardwiickiato de metila (**3**) e o 7-oxo-20-acetoxi-anoneno (**4**) (Fig. 1, p.2) (FILGUEIRAS, 1994); o segundo, relacionado aos constituintes químicos voláteis da parte aérea da referida espécie (CRAVEIRO, 1981).

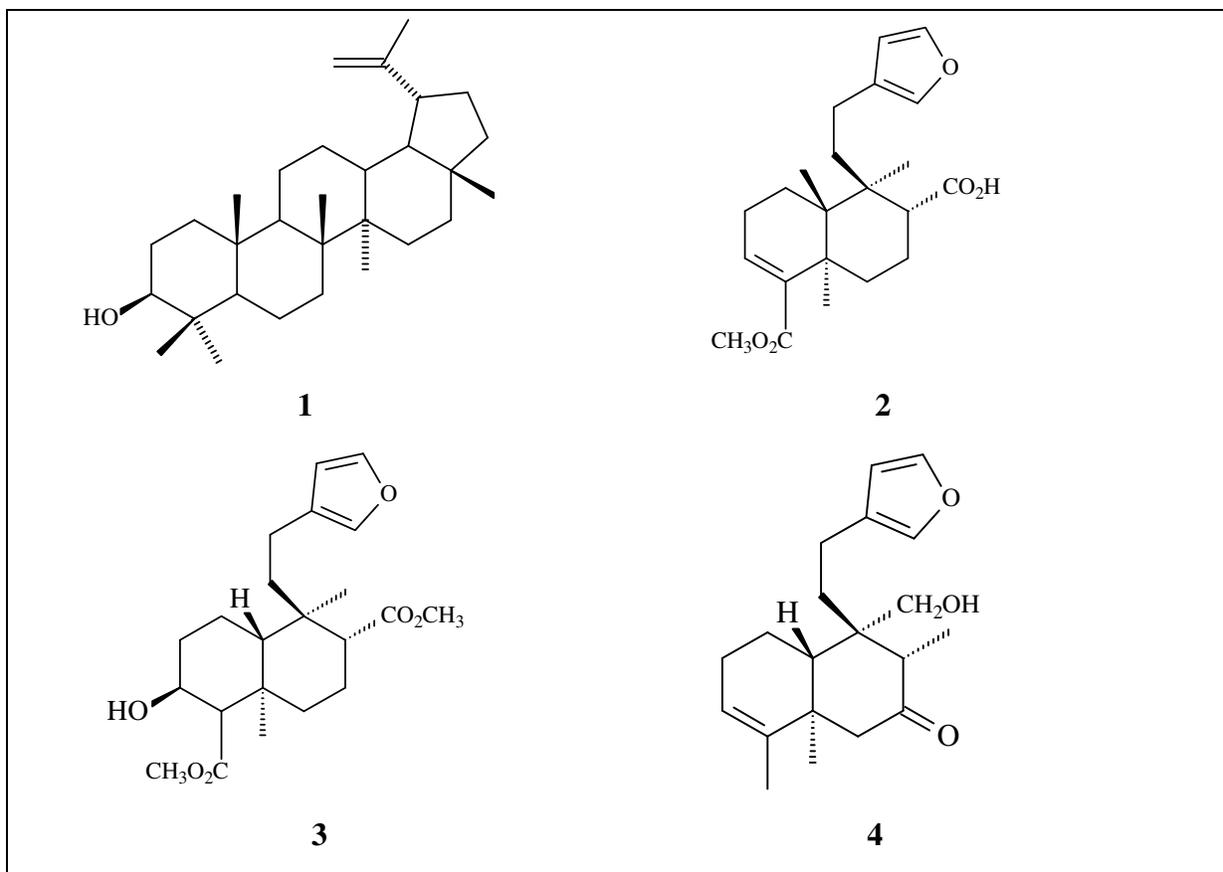


Figura 1 - Substâncias já isoladas de *C. rhamnifolius* (FILGUEIRAS, 1994)

Este trabalho está composto de oito capítulos, onde o primeiro é referente a introdução, o segundo, às considerações botânicas relacionadas à espécie estudada e a família a qual pertence, destacando suas respectivas descrições morfológicas, distribuição geográfica e características gerais. O terceiro capítulo é correspondente a uma revisão bibliográfica sobre diterpenóides indólicos. No quarto, encontra-se a identificação dos componentes químicos provenientes da fração volátil dos óleos essenciais das folhas, talos e raízes de *C. rhamnifolius*; no quinto, a determinação estrutural das substâncias dos constituintes fixos isolados do extrato etanólico da raiz da referida espécie; no sexto capítulo, temos os procedimentos experimentais realizados. O capítulo 7 contém as conclusões sobre o trabalho apresentado; o capítulo 8 apresenta as constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas de *C. rhamnifolius*. Por fim, encontram-se as referências bibliográficas utilizadas.

CONSIDERAÇÕES
BOTÂNICAS

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae é uma complexa e diversificada família com cerca de 300 gêneros (WEBSTER, 1994) e 8.000 espécies (WEBSTER, 1987) distribuídas especialmente na região dos trópicos. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e aproximadamente 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetações e habitats (BARROSO, 1991). Espécies desta família possuem hábito bastante variado, cujos espécimes vão desde ervas, trepadeiras e arbustos a árvores, apresentando-se frequentemente com folhas peninérveas ou palmatinérveas, alternas ou opostas, raramente verticiladas, com limbo inteiro ou lobado, simples ou compostas (SECCO, 2005). Barroso (1991) considera a disposição das flores nas inflorescências um caráter muito importante para a sistemática dos gêneros desta família. As inflorescências podem ser cimosas ou racemosas, às vezes reduzidas, formando uma estrutura semelhante a uma única flor, denominada de ciátio (SOUZA, 2005), e as flores são unissexuadas, monóicas ou dióicas, com ou sem vestígio de sexo atrofiado (BARROSO, 1991). O fruto geralmente é uma cápsula com deiscência elástica (tricoca), raramente baga, drupa ou sâmara; sementes frequentemente ariladas ou com uma carúncula (SOUZA, 2005) (Fig. 2, p.4).

Esta é uma família que inclui muitas plantas úteis ao homem. Na flora brasileira destacam-se a Mamona (*Ricinus*) rica em óleo (óleo de rícino) de reconhecido poder laxante; a seringueira da Amazônia (*Hevea*) e a Maniçoba (*Manihot*) do nordeste; Mandioca aipim e Macaxeira (*Manihot*) que fornecem amido e farinha, coroa-de-cristo (*Euphorbia*) utilizada como planta ornamental e o Quebra-pedras (*Phyllanthus*) de uso medicinal (Jolly, 1966). Outros exemplos comuns são o Marmeleiro (*Croton*) e o Pinhão (*Jatropha*) (BRAGA, 1960).

O gênero *Euphorbia* se destaca com aproximadamente 2400 espécies seguido dos gêneros *Croton* (1900 espécies), *manihot* (160 espécies), *jatropha* (150 espécies) e *Tragia* (140 espécies).

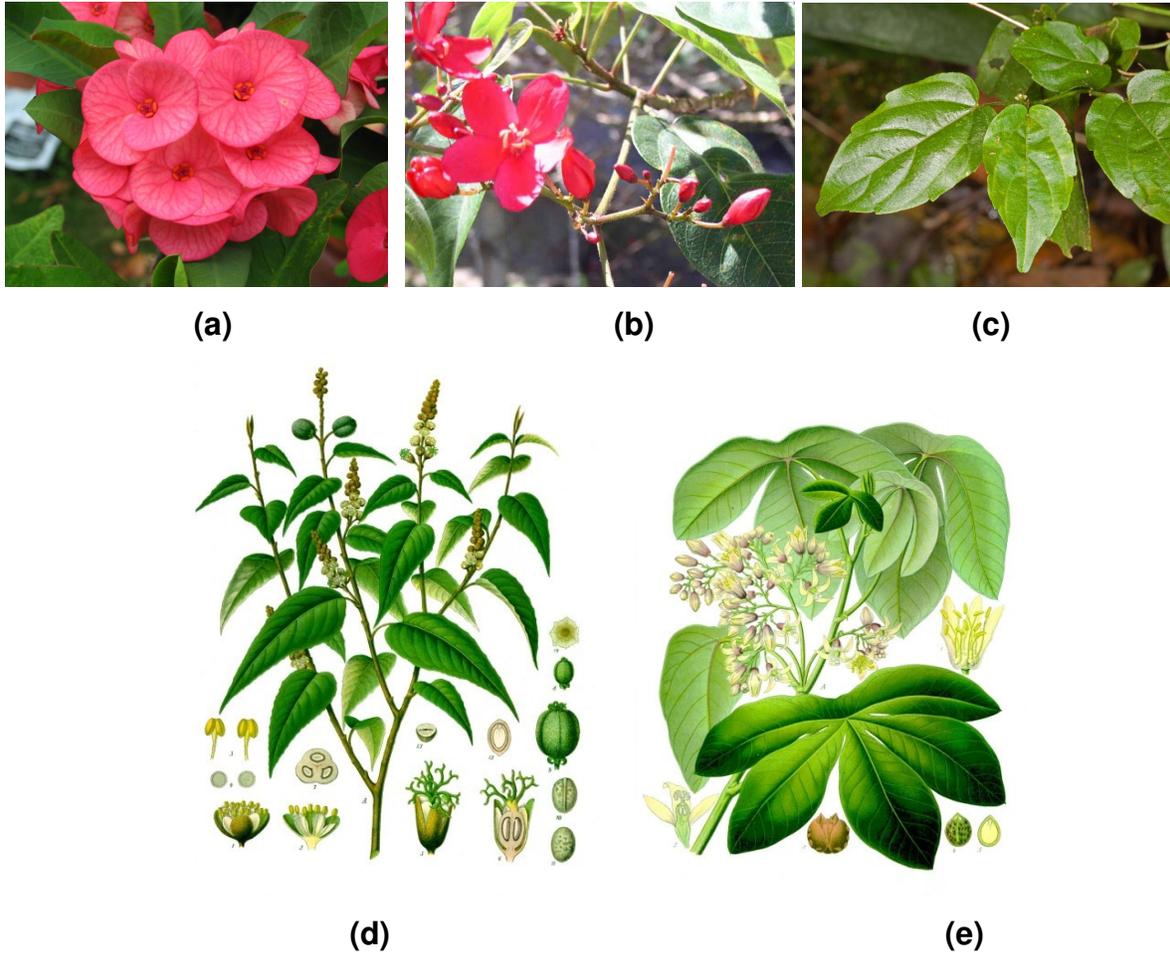


Figura 2 - Fotografias das flores de: (a) *Euphorbia millii* (b) *Jatropha integerrima*, (c) Fotografia das folhas de *Tragia volubilis*, (d) e (e) Representação das folhas, inflorescências e frutos de *Croton eluteria* e *Manihot glaziovi*, respectivamente.

2.2. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE O GÊNERO *Croton*

O gênero *Croton*, o segundo mais abundante da família Euphorbiaceae, é um dos mais importantes da flora nordestina ocorrendo em caatingas, cerrados, mata dos tabuleiros litorâneos e matas pluviais. São representadas por árvores, arbustos, ervas e lianas, geralmente monóicas, algumas vezes dióicas, com tricomas de formas variadas (estrelados, escamiformes, etc.). Em geral, as inflorescências apresentam as flores pistiladas na base e as estaminadas no ápice, os estames dobrados no botão floral e as pétalas das flores pistiladas reduzidas ou ausentes (Fig. 2d, p. 4). Desde o tratamento de Müller na *Flora Brasiliensis* (1873), as espécies brasileiras não foram revisadas e diversos táxons novos vêm sendo propostos, o que tornou confusa a taxonomia do gênero. Alguns tratamentos recentes sobre as espécies da América do Sul, como os de Secco (1992), Murilo (1999) e Webster et al. (1999) ainda são insuficientes para que se possam avaliar precisamente os limites específicos deste gênero.

2.3. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE *Croton rhamnifolius*

Segundo Martius (1873), *Croton rhamnifolius* apresenta folhas com limbo 3-6 vezes maior que o comprimento do pecíolo, peninérvio na base, sem ou com obsoletas glândulas, indumento estrelado em ambas as faces; racemos alongados; brácteas oval-lanceoladas diminutas; flores numerosas em ambos os sexos, as masculinas com pedicelo delgado; lacínias do cálice da flor feminina pequenas lanceoladas, base lanato-ciliato; receptáculo masculino viloso; filamentos pilosos na base, anteras um pouco mais compridas que largas; ovário com indumento áspero; estilo bipartido; cápsula aproximadamente elipsóide e semente lisas (Fig. 3, p. 6).



Figura 3 - Fotografia de um espécime de *Croton rhamnifolius*, com detalhes para as flores e frutos. (Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira)

REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE DITERPENÓIDES INDÓLICOS ISOLADOS DE FONTES NATURAIS

Este capítulo trata da revisão bibliográfica sobre diterpenóides indólicos isolados em diversos gêneros e espécies de plantas e fungos desde 1907 até os dias atuais, tendo em vista o isolamento de um diterpenóide indólico, denominado rhamnifolina (Fig. 4) em *Croton rhamnifolius*, e ausência de representatividade destes compostos no gênero *Croton*.

Os diterpenóides indólicos obtidos na revisão mostraram-se bastante diversificados estruturalmente, sendo predominantes em espécie do reino Fungi, o que fortalece a possibilidade da substância rhamnifolina não ter sido originado da raiz de *Croton rhamnifolius*, e sim de algum fungo endofítico presente na planta.

O levantamento bibliográfico realizado sobre diterpenóides indólicos no Chemical Abstract utilizando como palavra chave “indol diterpenoids” e refinado por “natural”, resultou em 64 referências, onde 51 foram obtidas, e apenas 42 foram utilizadas para a revisão bibliográfica. Através deste estudo foram registrados 53 compostos com seus respectivos dados de origem, referências, estruturas e denominações, que foram agrupados na Tabela 1 (p. 10) em ordem alfabética de espécie.

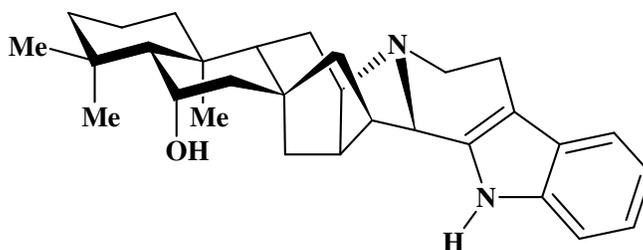


Figura 4 - Diterpenóide indólico isolado da raiz de *Croton rhamnifolius*

3.1 Alcalóides

A definição aceita para alcalóide deve-se a Pelletier (1983) que considera alcalóides as substâncias orgânicas cíclicas que contêm nitrogênio e que são metabólitos secundários obtidos de fontes naturais. Esta definição exclui as aminas simples e os derivados de amônias acíclicas e ainda os compostos nitro e nitrosos (uma vez que nos alcalóides o átomo de azoto tem de possuir estado de oxidação negativo). Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos que podem ocorrer tanto em microorganismos como em plantas superiores e inferiores e ainda em animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com menor frequência (SIMÕES, 1999).

A biossíntese dos alcalóides inclui sempre pelo menos um aminoácido. Também podem ser incorporadas outras unidades provenientes de piruvato, malonato ou mevalonato. Com precursores de origem biossintética tão distinta é fácil entender a complexidade e diversidade estrutural que se encontra nestes metabólitos, sendo hoje conhecidos mais de 5 000 alcalóides. De acordo com os precursores biogenéticos e função da estrutura do metabólito final, podemos sistematizar os alcalóides como derivados dos aminoácidos ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptofano e ácido artranílico (Fig. 5).

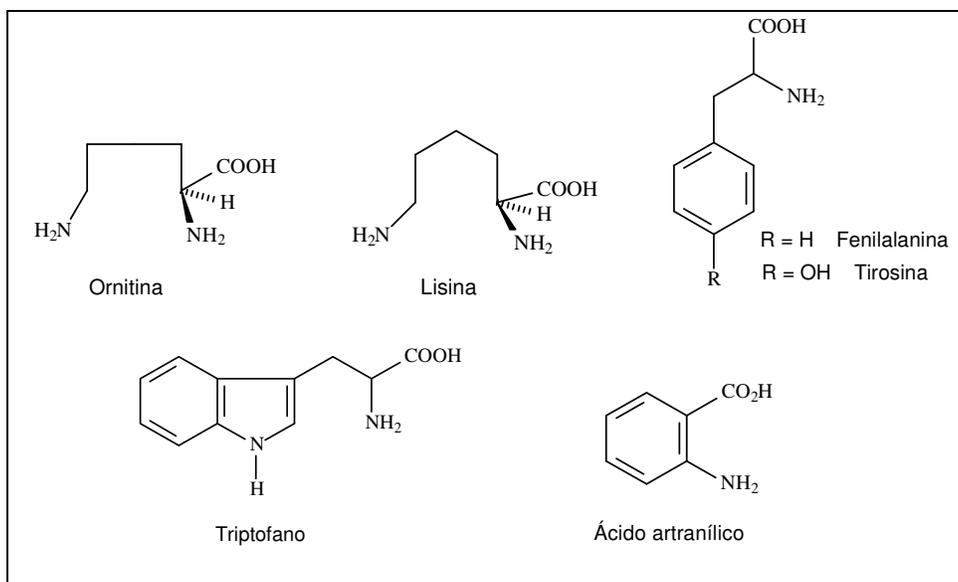


Figura 5 - Aminoácidos precursores de alcalóides

3.2 Alcalóides derivados de triptofano

Alcalóides indólicos são derivados do aminoácido triptofano como pode facilmente ser interpretado por comparação do seu núcleo contendo nitrogênio à estrutura química do triptofano. Os alcalóides que se formam possuem uma unidade estrutural de indol-C₂N proveniente do triptofano (aminoácido proveniente do ácido xiquímico) (CARBONEZI, 2004).

Podem considerar-se dois tipos estruturais:

a) alcalóides de estrutura semelhante ao triptofano ou ainda condensada com outra unidade C₂ proveniente de piruvato;

b) alcalóides derivados de biossíntese mista triptofano/mevalonato, onde os mais representativos são os alcalóides de vinca e os alcalóides de ergot. Destes metabólitos são exemplos: a) a harmina e b) ajmalicina e ácido lisérgico. Também de biossíntese triptofano/mevalonato são os alcalóides de estrutura complexa quinina e estriquinina (CARBONEZI, 2004) (Fig. 6).

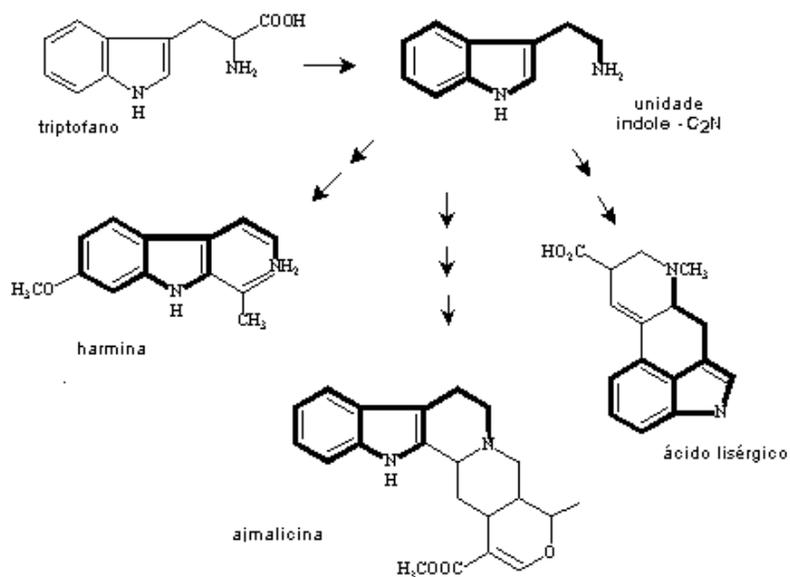


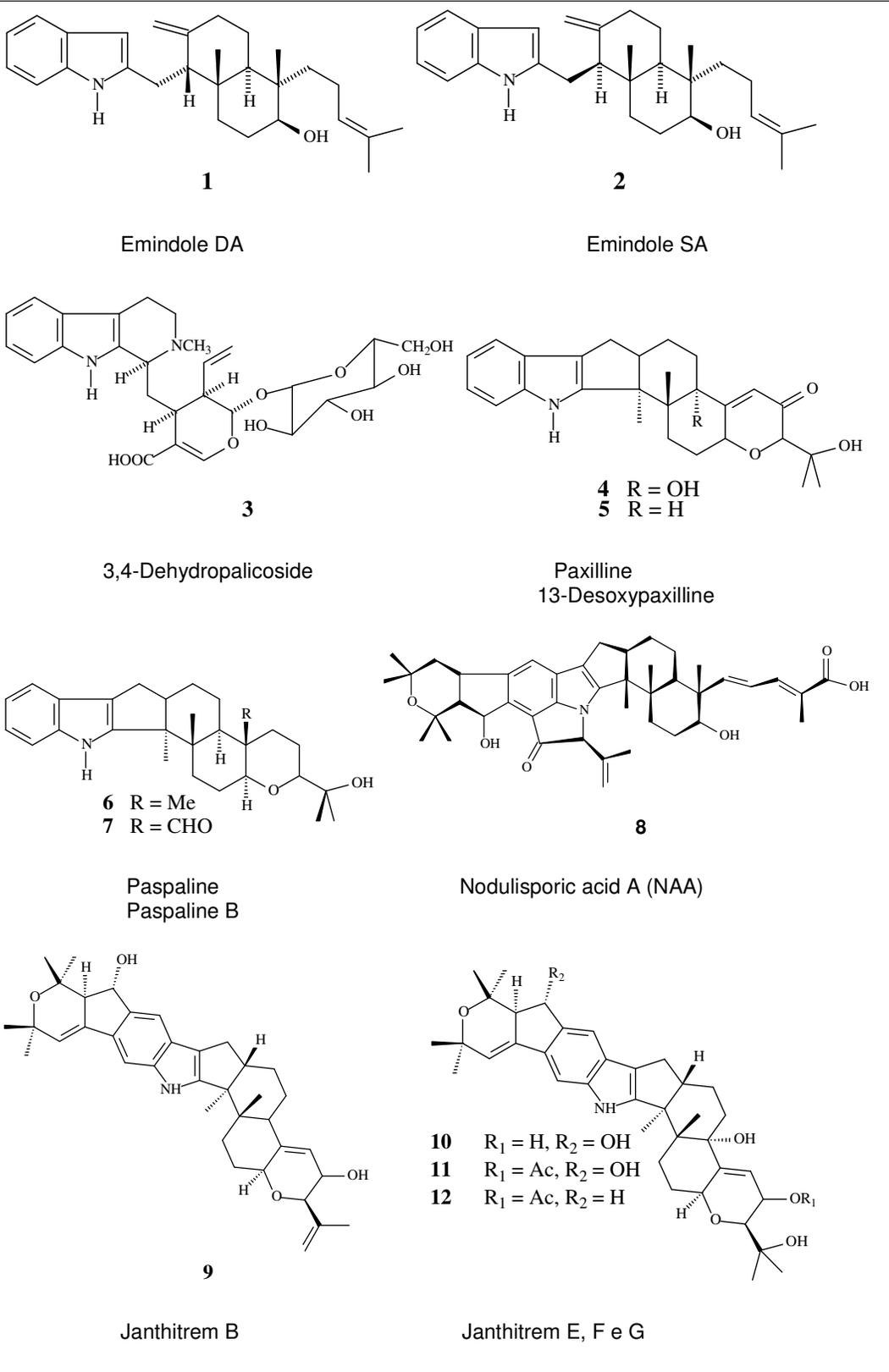
Figura 6- Resumo da biossíntese de alcalóides harmina, ajmalicina, ácido lisérgico a partir do triptofano

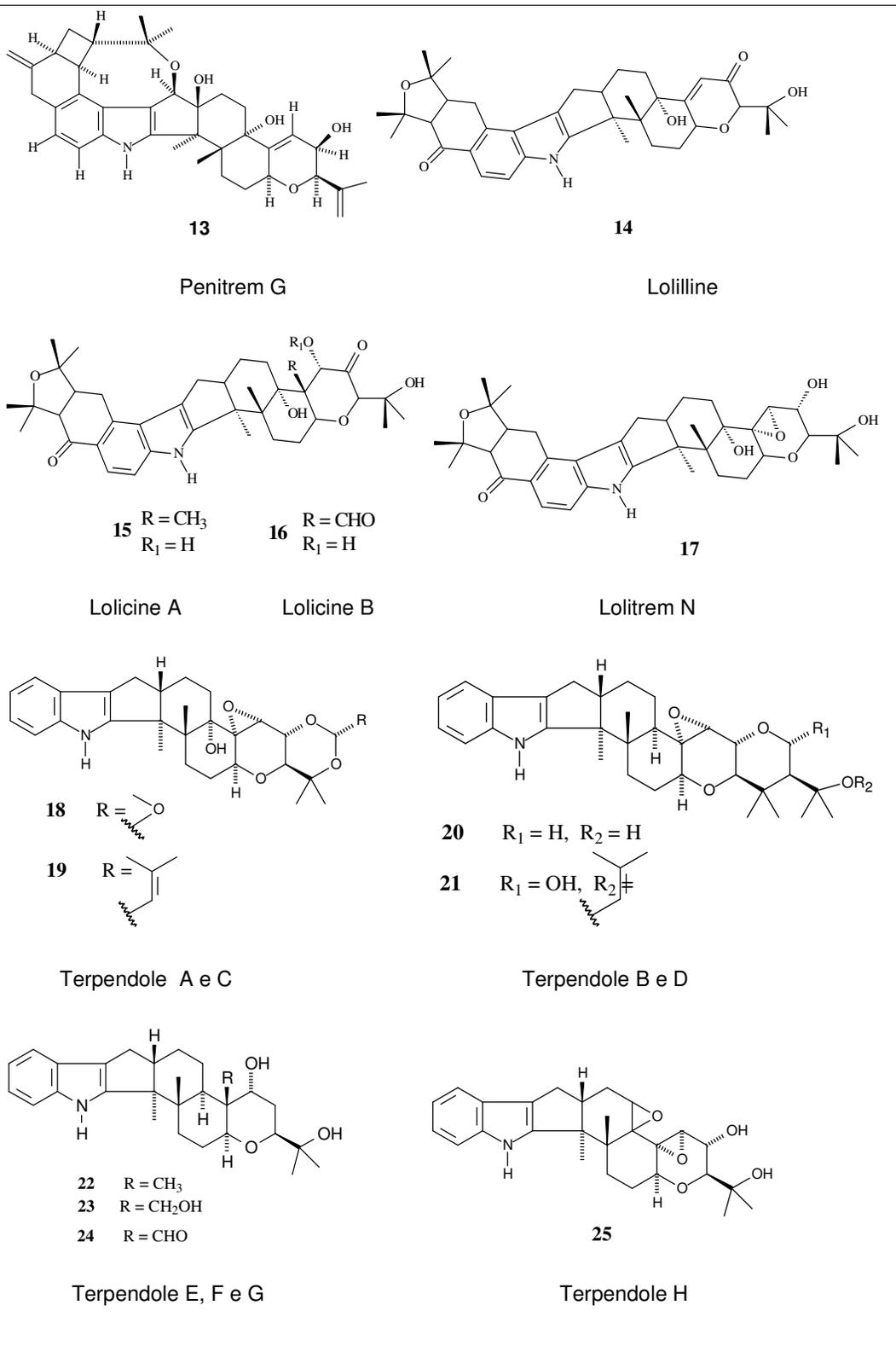
Fonte: <http://www.dq.fct.unl.pt/qoa/biossin/4i.html> acessado em 28 de janeiro de 2008

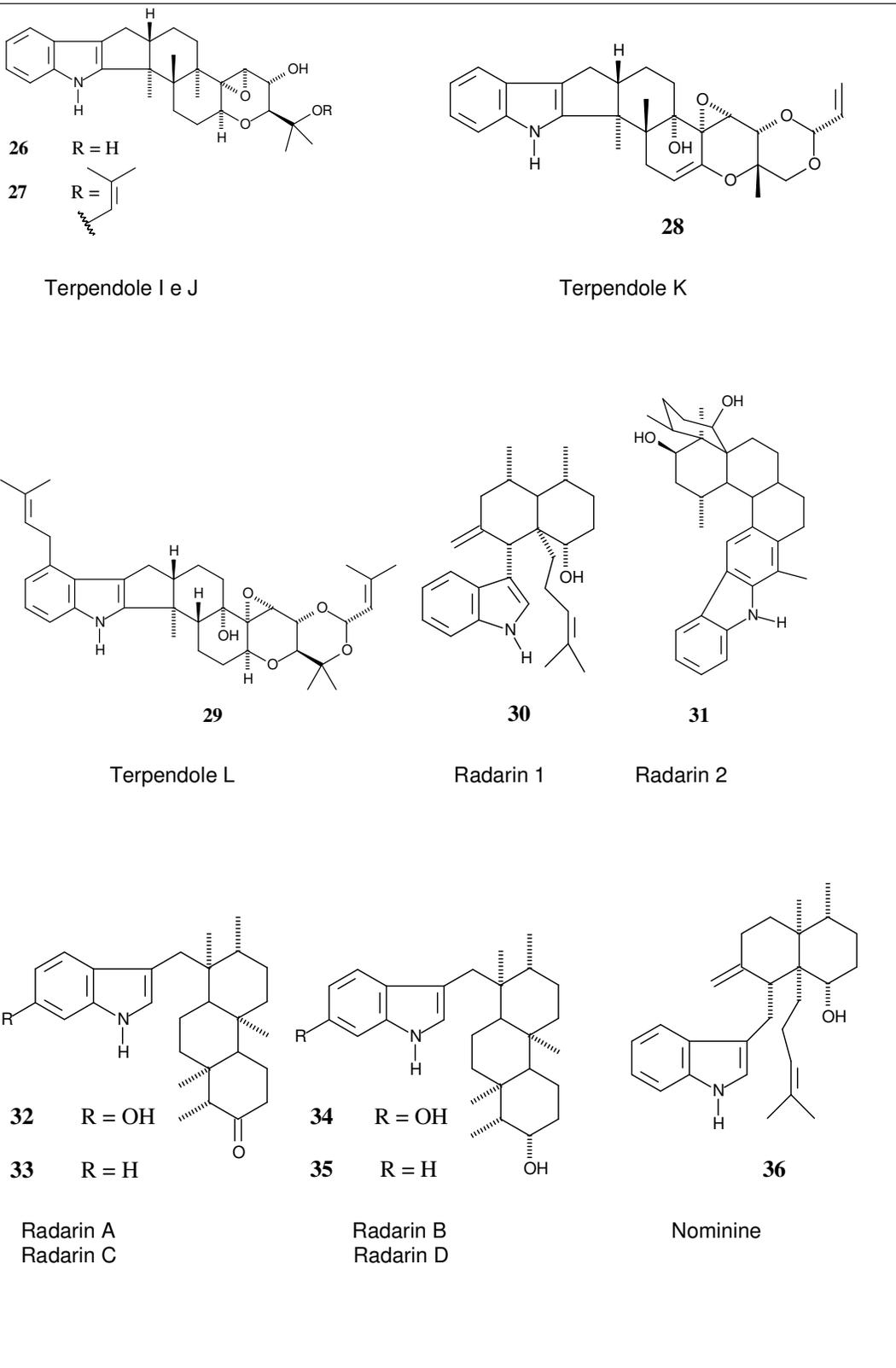
Tabela 1 - Relação dos diterpenóides indólicos descritos na literatura

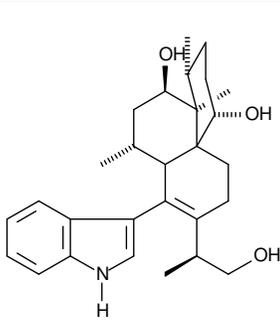
Espécie	Origem	Diterpenóide Indólico	Referências
<i>Acremonium lolii</i>	Fungo	14	MUNDAY, 1997
<i>Albophoma yamanashiensis</i>	Fungo	18 - 29	TOMODA, 1995
<i>Aspergillus flavus</i>	Fungo	37 - 42	TEPASKE, 1990
<i>Aspergillus nomius</i>	Fungo	36	LAAKSO, 1991
<i>Aspergillus sp</i>	Fungo	30 - 31	LAAKSO, 1991
<i>Aspergillus sulphureus</i>	Fungo	32 - 35	LAAKSO, 1991
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Fungo	43 - 44	SINGS, 2000
<i>Emericella desortorum</i>	Fungo	1	KOOHEI, 1987
<i>Emericella striata</i>	Fungo	2	KOOHEI, 1987
<i>Isolona cauliflora</i>	Planta	50 - 53	MAYUNGA H. 2005
<i>Neotyphodium lolii</i>	Fungo	15 - 17	MUNDAY, 1998
<i>Nodulisporium sp</i>	Fungo	8	BYRNE, 2001
<i>Penicillium crustosum</i>	Fungo	13	GONZALEZ, 2003
<i>Penicillium janthinellum</i>	Fungo	9 - 12	WILKINS, 1992
<i>Penicillium paxilli</i>	Fungo	4 - 7	MUNDAY, 1995
<i>Penicillium thiersii</i>	Fungo	45 - 47	CHEN LI, 2003
<i>Penicillium thiersii</i>	Fungo	48 - 49	CHEN LI, 2002
<i>Strychnos vanprukii</i>	Planta	3	THONGPHASUK, 2003

As estruturas químicas correspondentes aos diterpenóides indólicos listados na Tabela 1 se encontram agrupados em quadros nas páginas 11 a 15.



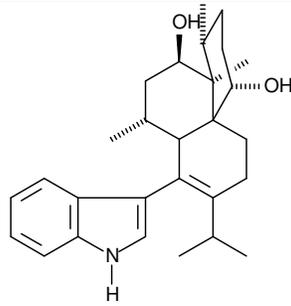






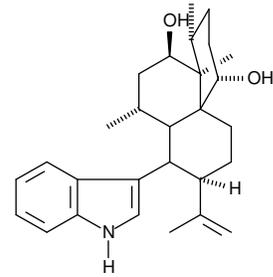
37

Aflavazole 1



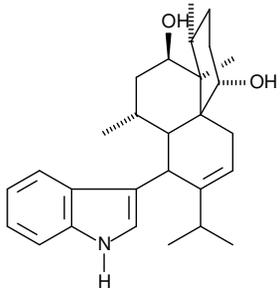
38

Aflavazole 2



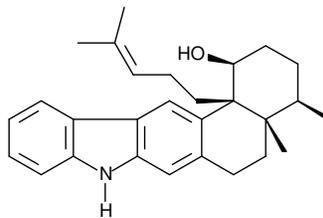
39

Aflavazole 3



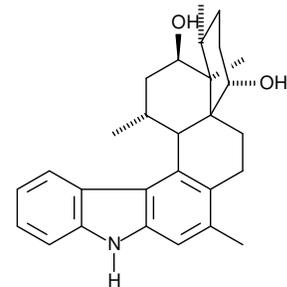
40

Aflavazole 4



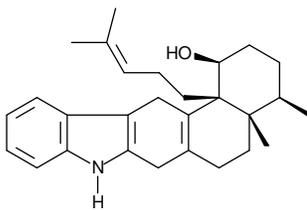
41

Aflavazole 5



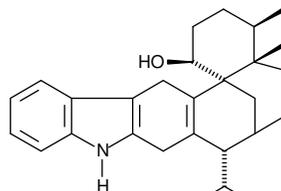
42

Aflavazole 6



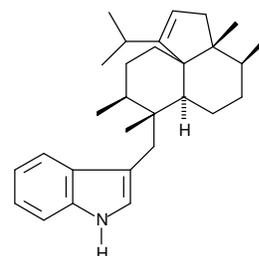
43

Dihyrotubingsin A



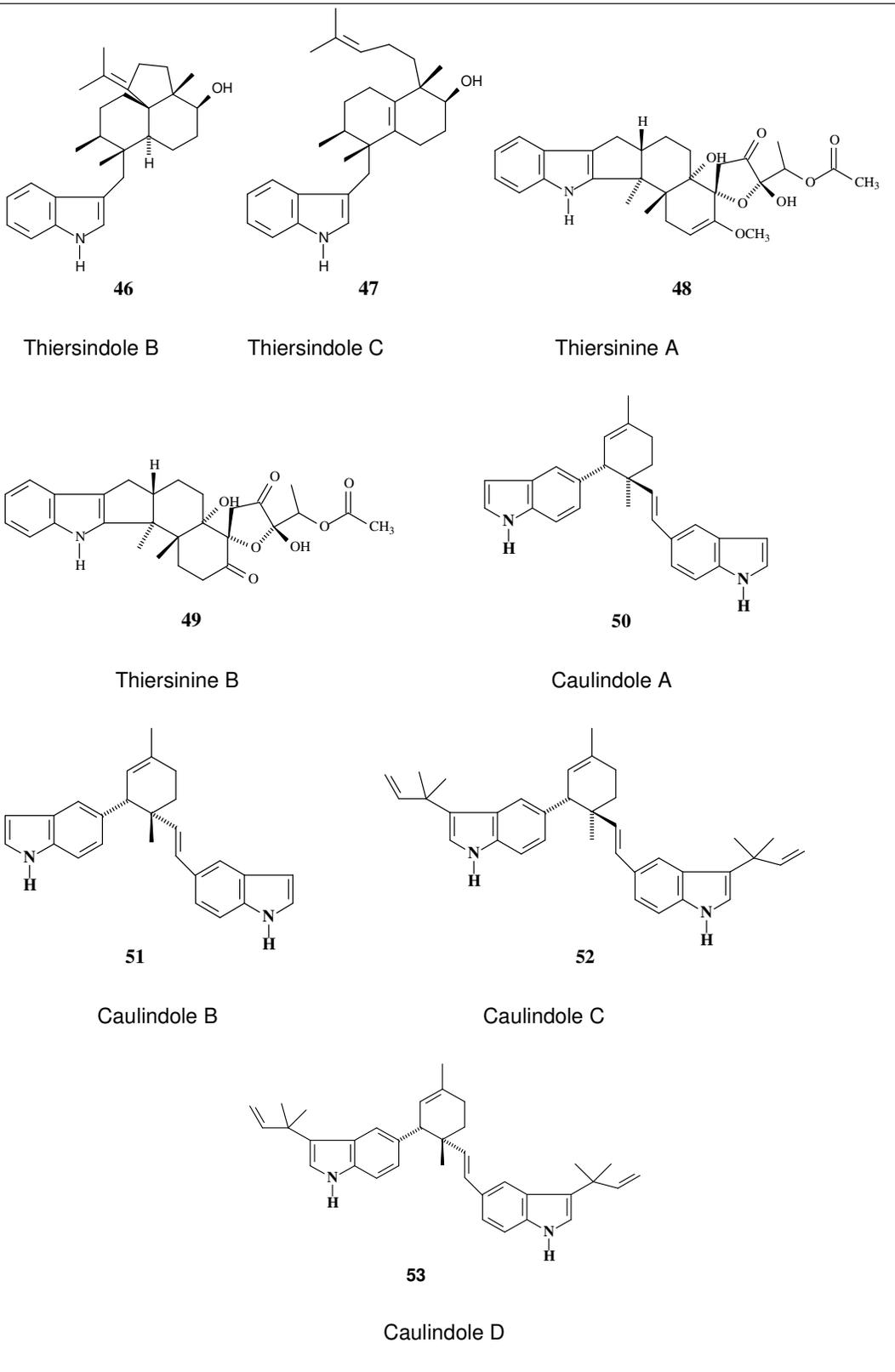
44

Dihyrotubingsin B



45

Thiersindole A



IDENTIFICAÇÃO
DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS
VOLÁTEIS

4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS, TALOS E RAÍZES DE *Croton rhamnifolius*

O estudo dos constituintes químicos voláteis de *Croton rhamnifolius* foi realizado a partir dos óleos essenciais obtidos das folhas, talos e raízes de espécimes coletados na cidade de Salgueiro-PE, em janeiro de 2006.

Os óleos essenciais foram extraídos através de hidrodestilação em aparelho doseador de óleo essencial do tipo Clevenger, modificado por Gottlieb (Gottlieb, 1960), foram analisados por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL/EM). A análise quantitativa foi realizada através de cromatografia gás-líquido com detecção por ionização em chama (CGL/DIC). Os óleos essenciais obtidos das folhas, talos e raízes de *Croton rhamnifolius* foram denominados de OEFCR, OETCR e OERCR, respectivamente.

1,10 Kg das folhas foram submetidas ao processo de hidrodestilação, levando à obtenção de 1,94 g (0,18% de rendimento) de um óleo de coloração amarelo claro e odor agradável denominado OEFCR.

1,38 Kg dos talos e 1,13 Kg das raízes foram submetidas ao mesmo procedimento anterior. Após tratamento da fase orgânica com sulfato de sódio anidro foram obtidos respectivamente, 3,0 g (0,22 % de rendimento) de um óleo com coloração verde clara, denominada OETCR e 2,28 g (0,20 % de rendimento) de óleo com coloração amarelo claro, denominado OERCR.

Análise por CG/EM de OEFCR revelou 22 picos, dos quais 21 constituintes químicos foram identificados. A análise de OETCR forneceu um cromatograma contendo 14 picos, onde todos os componentes químicos foram identificados, enquanto o cromatograma de OERCR forneceu 15 picos, onde apenas 8 constituintes foram identificados (Tab. 2, p. 19). Os cromatogramas dos óleos essenciais das folhas, talos e raízes são mostrados na fig. 7 a 12 (p. 20 - 22), e os espectros de massas dos constituintes identificados estão apresentados nas figuras 13 a 43 (p. 23 - 30).

A identificação dos componentes voláteis dos óleos foi realizada através do índices de Kovats e comparação com espectros de massa de substâncias presentes na literatura (ADAMS, 2001). A correção dos índices de Kovats foi efetuada através de regressão linear utilizando cinco picos obtidos no cromatograma de OEFCR, OETCR e OERCR, com tempo de retenção igual a 8,26; 8,72; 11,65; 14,16 e 27,71, relacionados ao α - pineno, eucaliptol, linalol, borneol e valenceno, respectivamente. A equação da reta da regressão obtida no procedimento foi $Y = 4,496x + 2,184$ e o fator de correção foi $R^2 = 0,874$.

4.1 Análise quantitativa dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial das folhas, talos e raízes de *C. rhamnifolius* por CGL/DIC

A análise quantitativa dos componentes químicos voláteis das folhas e talos de *C. rhamnifolius* foi realizada através do uso de um espectrômetro gás/líquido (CGL) acoplado ao detector de ionização por chama (CGL/DIC). Foram quantificados 21 constituintes químicos do óleo essencial das folhas (OEFCR) (Tab. 2, p. 19), correspondendo a 97,79% da constituição do óleo; 14 constituintes químicos do óleo essencial dos talos (OETCR) (Tab. 2, p. 19), correspondendo a 100% da constituição total; e 8 constituintes químicos do óleo essencial das raízes (Tab. 2, p. 19), representando 88,28% da composição química total do óleo.

Foram observadas semelhanças na composição química dos óleos das folhas e talos. Nestes houve a predominância de monoterpenos, tanto em relação à quantidade de componentes (18 ao todo), quanto ao teor destes, com 79,26% para óleo essencial das folhas (OEFCR) e 63,63% para óleo essencial dos talos (OETCR). Já o óleo essencial da raiz constituiu predominantemente de sesquiterpenos com teor de 56,45% da composição total do óleo, enquanto as folhas e talos apresentaram teor de 18,83% e 36,38%, respectivamente.

Os constituintes químicos majoritários do óleo essencial das folhas (OEFCR) foram identificados como o eucaliptol (31,81%), o α -felandreno (11,84%) e o sabineno (10,19%). Dentre os constituintes majoritários do óleo

essencial dos talos (OETCR), o β -pineno foi o componente principal (30,81%), seguido pelo β -cariofileno (12,86 %) e α -pineno (11,87%). Para o óleo essencial das raízes (OERCR), temos como constituintes químicos majoritários, o valenceno (25,97%), e o borneol (20,05% (Tab. 2, p. 19).

A literatura registra o artigo contendo o estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolius* (OEF) (CRAVEIRO, 1981), coletada na cidade de Pedra Branca – CE. Neste trabalho, Craveiro et al. identificou 15 constituintes químicos, onde os componentes majoritários foram *p* - cimeno (20,3%), eucaliptol (11,0%) e α – felandreno (9,9%). Houve predominância de monoterpenos, com teor de 53,80% para o óleo essencial das folhas, 22,80% foram referentes a sesquiterpenos e 23,4% da composição química do óleo não foi identificada (Tab. 2, p. 19).

Tabela 2 - Constituintes voláteis das folhas (OEF CR), talos (OETCR) e raízes (OERCR) de *C. rhamnifolius* e comparação dos constituintes químicos voláteis das folhas (OEF) obtidos por Craveiro, 1981.

COMPONENTES	T.R.	I.K.	OEF CR (%)	OEF (%) Craveiro, 1981	OETCR (%)	OERCR (%)
Monoterpenos hidrocarbonados						
α - Tujeno	8,03	930	1,31	-	0,19	-
α - Pineno	8,26	939	5,71	-	11,87	-
Canfeno	8,72	954	2,21	-	0,97	-
Car-3-eno			-	0,6	-	-
Sabineno	9,58	975	10,19	6,3	-	-
β - Pineno	9,74	979	-	-	30,81	-
Mirceno	10,19	991	1,29	-	1,43	-
α - Felandreno	10,67	1003	11,84	9,9	-	-
<i>p</i> - Cimeno	11,35	1025	5,84	20,3	-	-
Limoneno	11,55	1029	-	-	1,31	-
Eucaliptol	11,65	1031	31,81	11,0	2,70	-
Trans- β - ocimeno	12,27	1050	0,78	-	-	-
Total			39,85		-	39,85
Monoterpenos oxigenados						
Linalol	14,15	1097	1,38	2,8	4,55	-
Cânfora	15,72	1146	-	-	6,66	9,65
Borneol	16,62	1169	0,90	-	-	20,05
Terpinen – 4 - ol	17,04	1177	1,15	1,1	-	-
α - Terpinenol	17,53	1189	3,06	1,6	3,14	-
Acetato de Bornila	20,99	1289	0,81	-	-	-
Total			39,11		29,70	39,11
Sesquiterpenos						
β - Maalieno	24,93	1382	-	-	-	4,46
Trans- β - Cariofileno	25,74	1419	6,55	5,3	12,86	8,08
β - Elemeno	26,11	1391	-	-	-	9,61
Isoledeno	26,47	1376	-	-	6,75	-
α - Humuleno	26,84	1455	1,72	2,4	-	-
Alloaromadendreno	27,08	1460	1,26	-	-	-
Aromadendreno			-	3,3	-	-
γ -cadineno			-	6,3	-	-
α -copaeno			-	0,8	-	-
α -cubebeno			-	1,1	-	-
α -elemeno			-	3,6	-	-
Germacreno - D	27,71	1485	1,32	-	8,12	-
Eremofileno	27,77	1486	-	-	-	7,25
Valenceno	28,06	1496	-	-	-	25,97
Biclogermacreno	28,23	1500	6,32	-	-	-
Espatuleno	30,70	1578	1,66	-	-	-
Óxido de Cariofileno	30,80	1583	-	-	8,65	-
Guaiol	31,12	1601	-	-	-	1,08
Total			18,83	22,8	36,38	56,45
T.R. – Tempo de retenção; I.K. – Índice de Kovats corrigido						

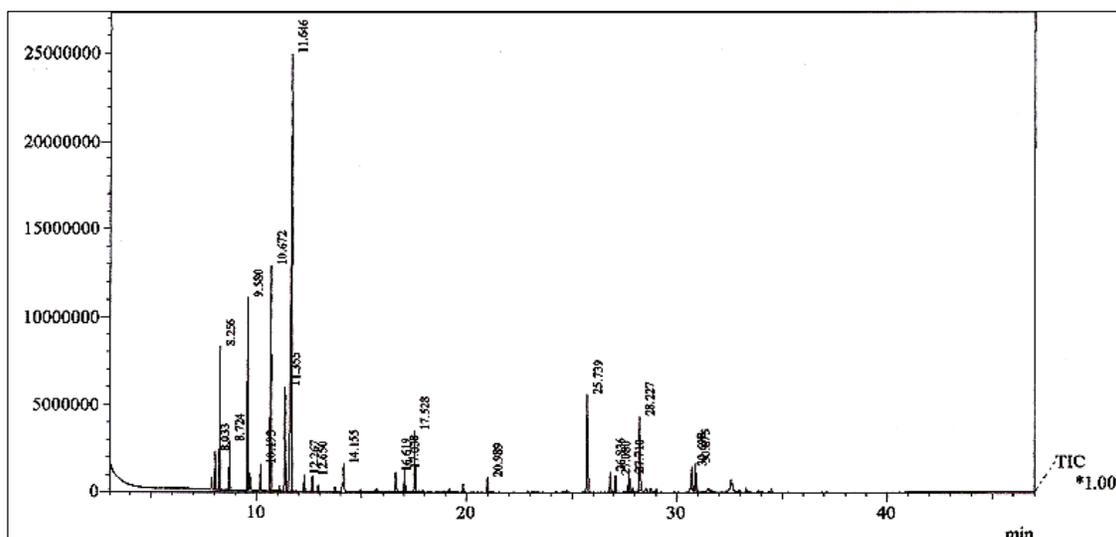


Figura 7 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolius* (OEFCE) obtido por CGL/EM

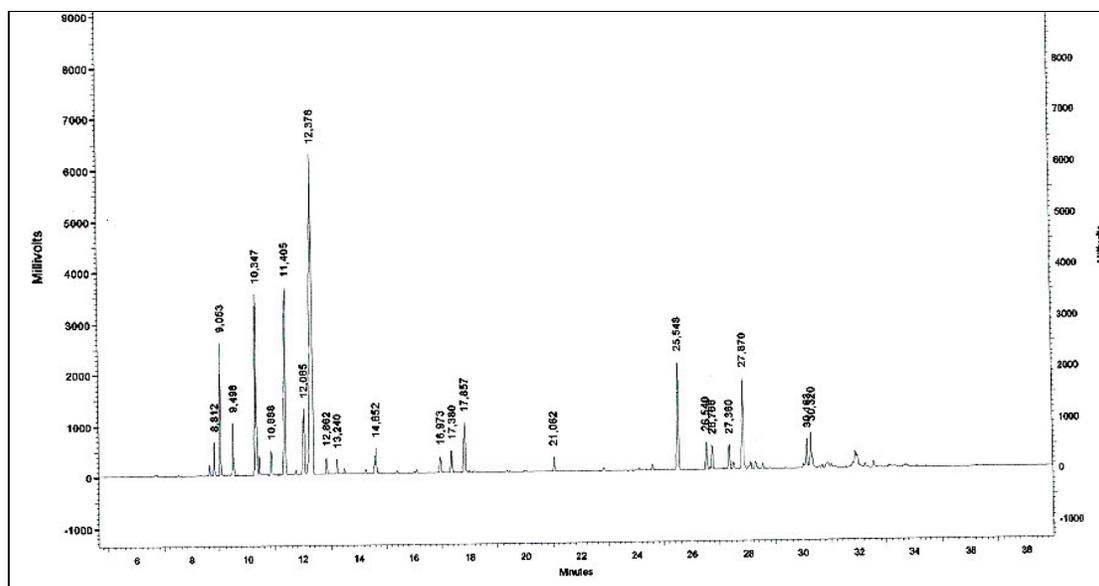


Figura 8 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolius* (OEFCE) obtido por CG/DIC

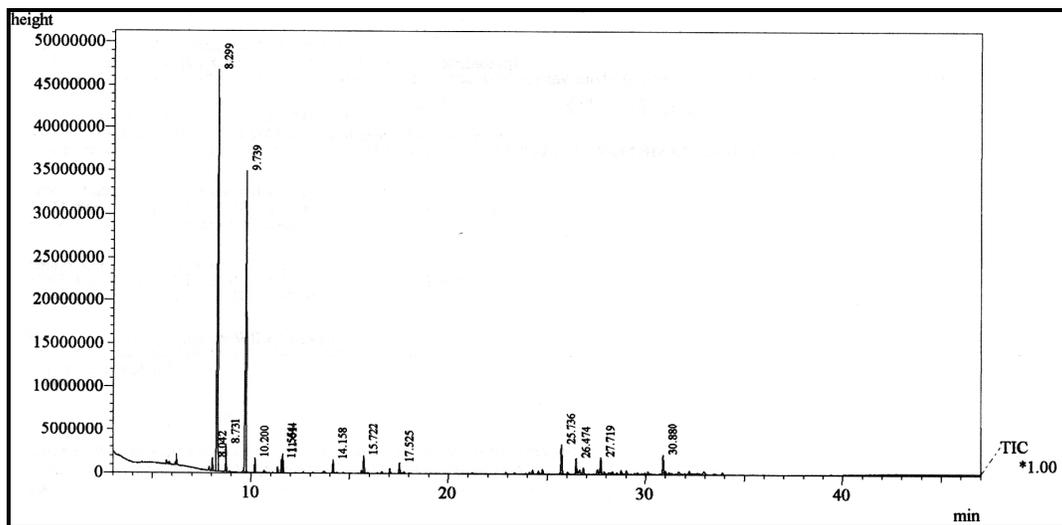


Figura 9 - Cromatograma do óleo essencial dos talos de *C. rhamnifolius* (OETCR) obtido por CGL/EM

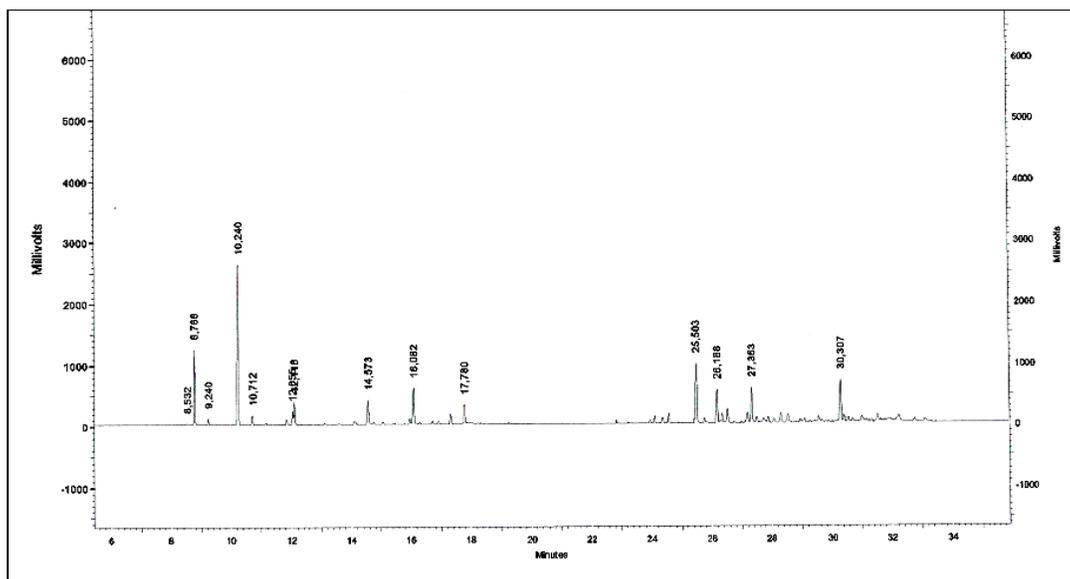


Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial dos talos de *C. rhamnifolius* (OETCR) obtido por CGL/DIC

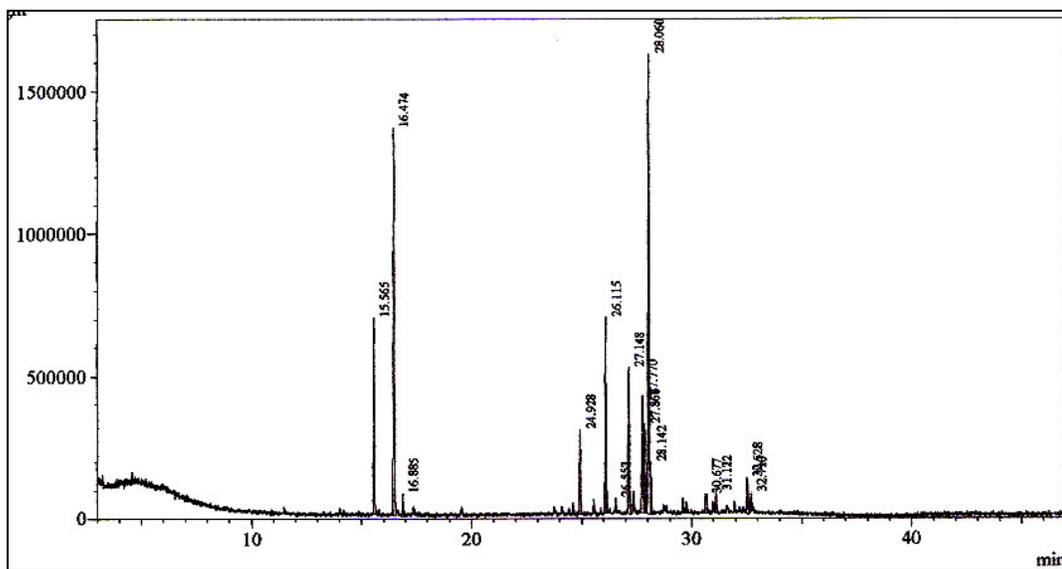


Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial das raízes de *C. rhamnifolius* (OERCR) obtido por CGL/EM

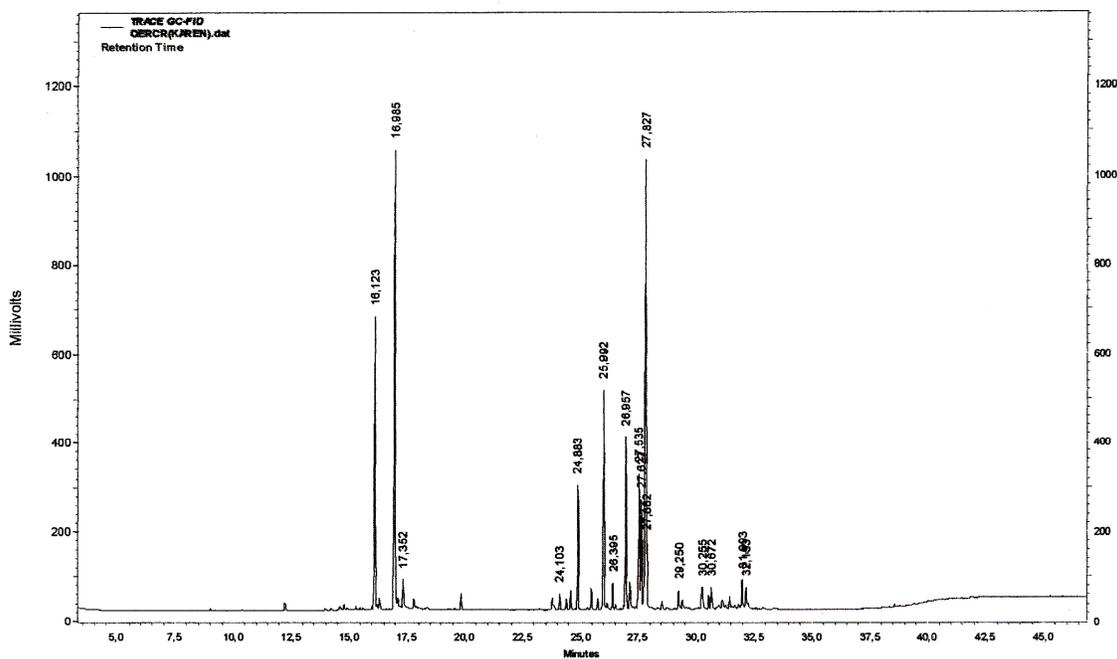


Figura 12 - Cromatograma do óleo essencial das raízes de *C. rhamnifolius* (OERCR) obtido por CGL/DIC

4.2 Espectros de massas dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas (OEFGR), talos (OETCR) e raízes (OERCRC) de *C. rhamnifolius* listados em ordem crescente de tempo de retenção.

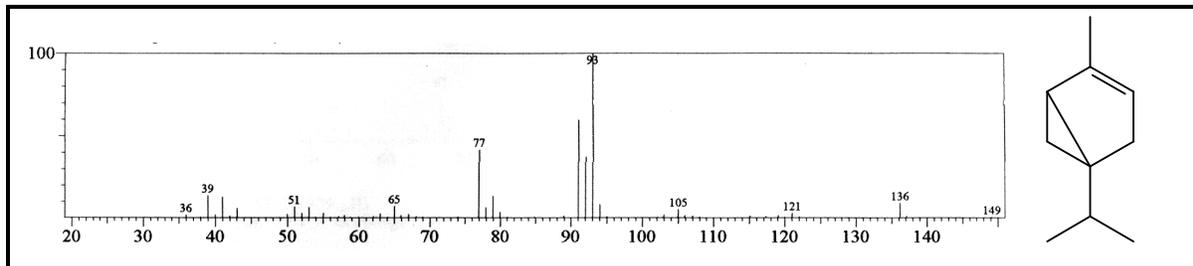


Figura 13 - Espectro de massa do α - Tujeno

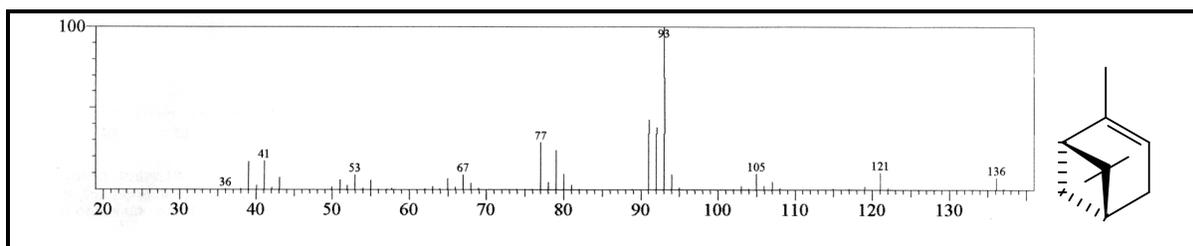


Figura 14 - Espectro de massa do α - Pineno

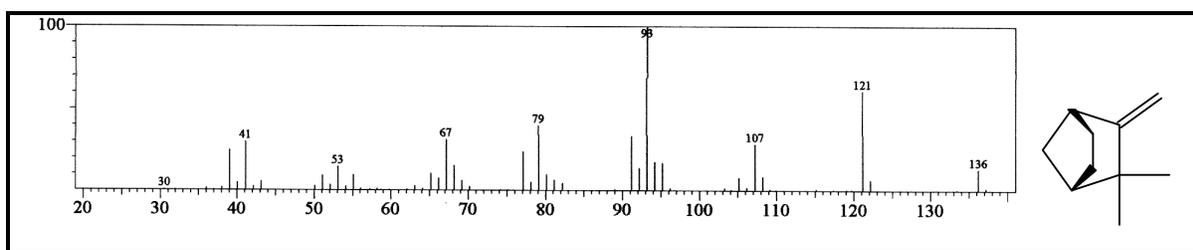


Figura 15 - Espectro de massa do Canfeno

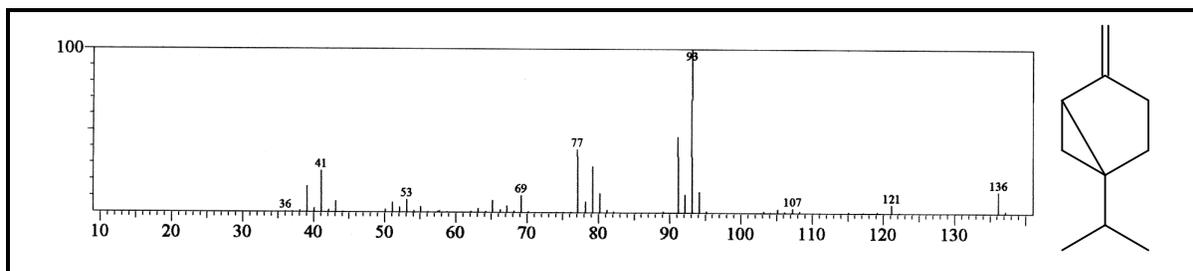


Figura 16 - Espectro de massa do Sabineno

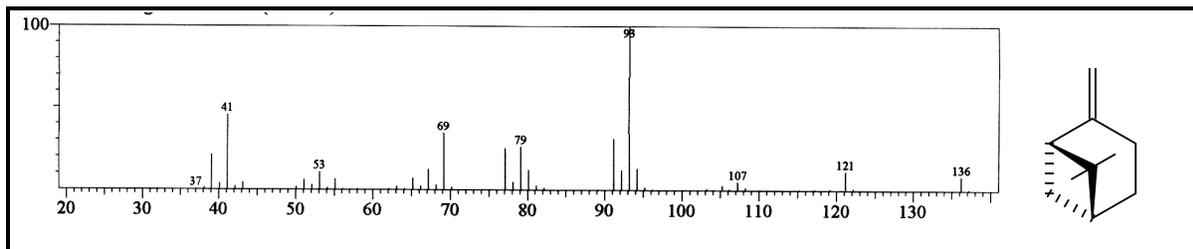


Figura 17 - Espectro de massa do β - Pineno

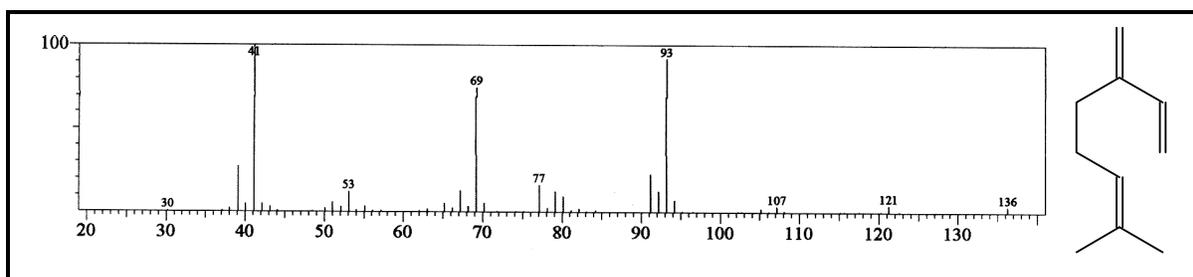


Figura 18 - Espectro de massa do Mirceno

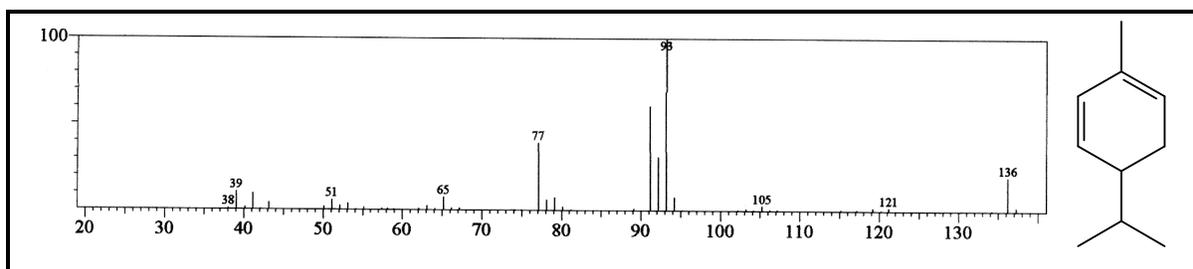


Figura 19 - Espectro de massa do α - Felandreno

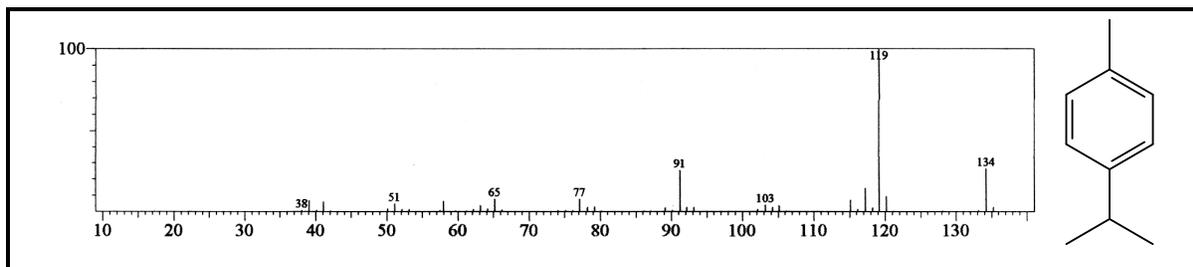


Figura 20 - Espectro de massa do *p* - Cimeno

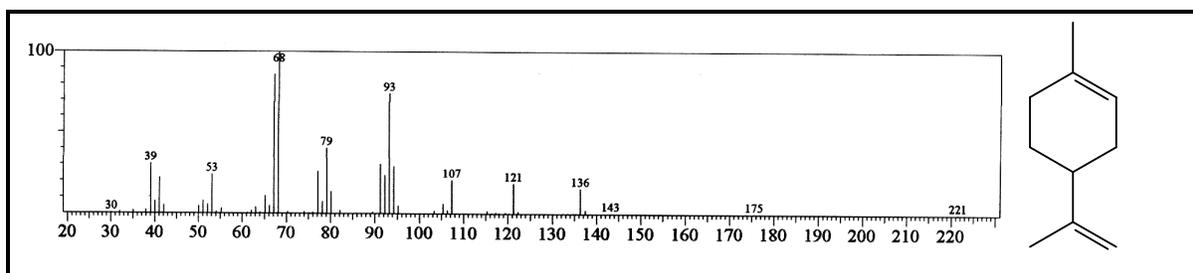


Figura 21 - Espectro de massa do Limoneno

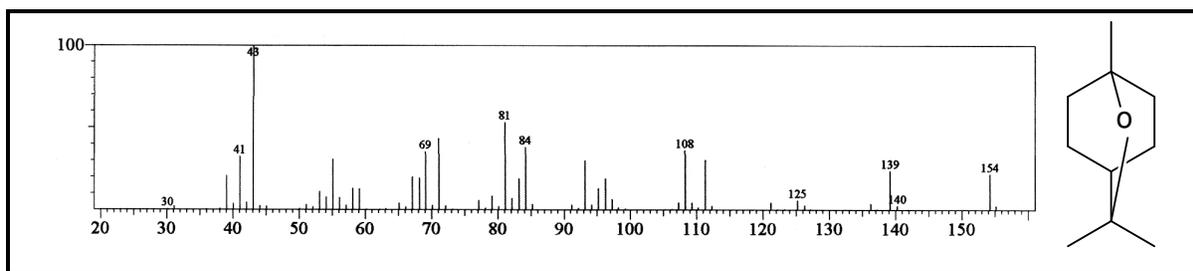


Figura 22 - Espectro de massa do Eucaliptol

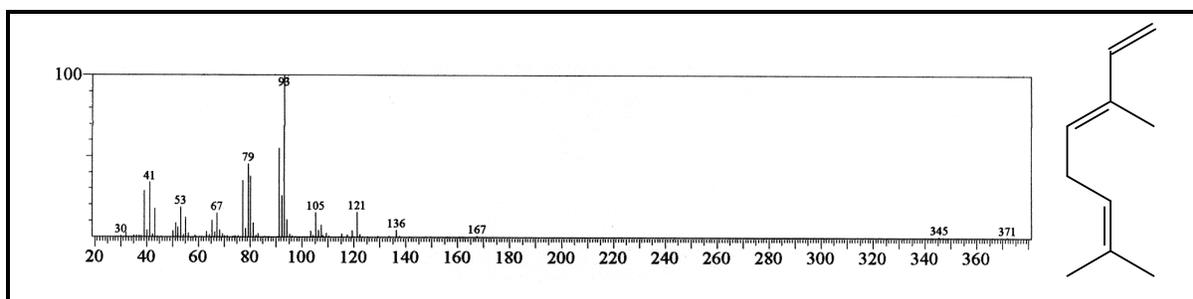


Figura 23 - Espectro de massa do Trans- β - Ocimeno

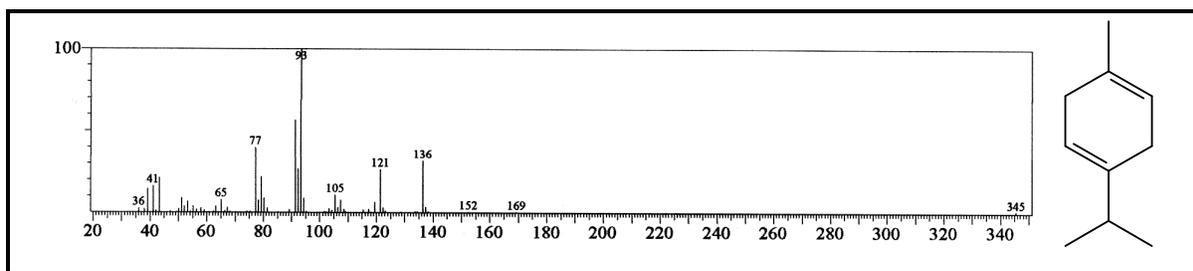


Figura 24 - Espectro de massa do γ - Terpineno

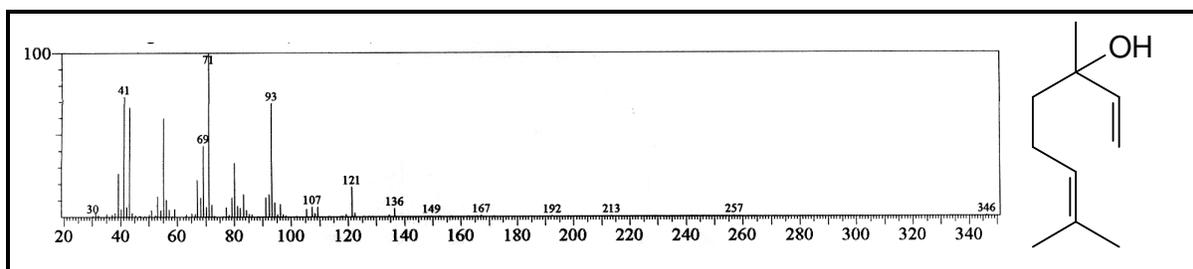


Figura 25 - Espectro de massa do Linalol

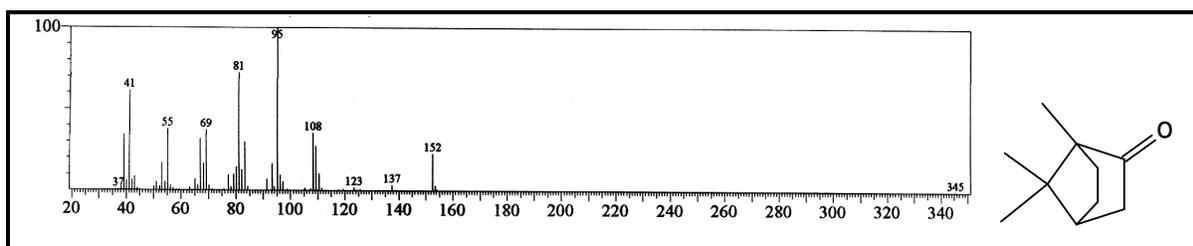


Figura 26 - Espectro de massa da Cânfora

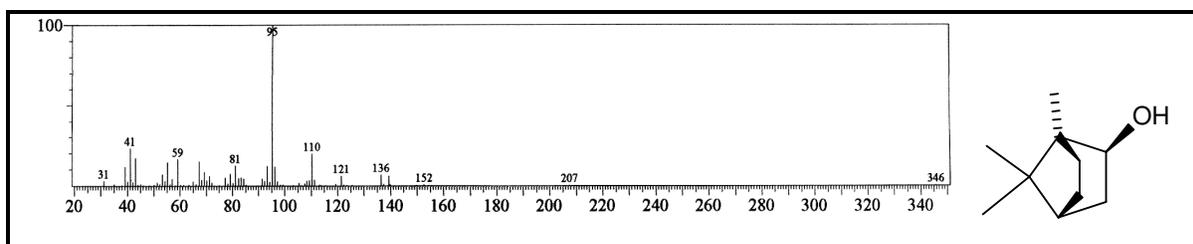


Figura 27 - Espectro de massa do Borneol

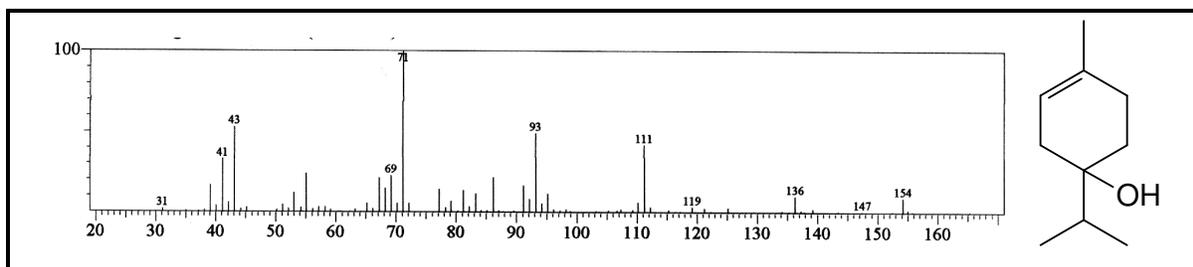


Figura 28 - Espectro de massa do Terpinen-4-ol

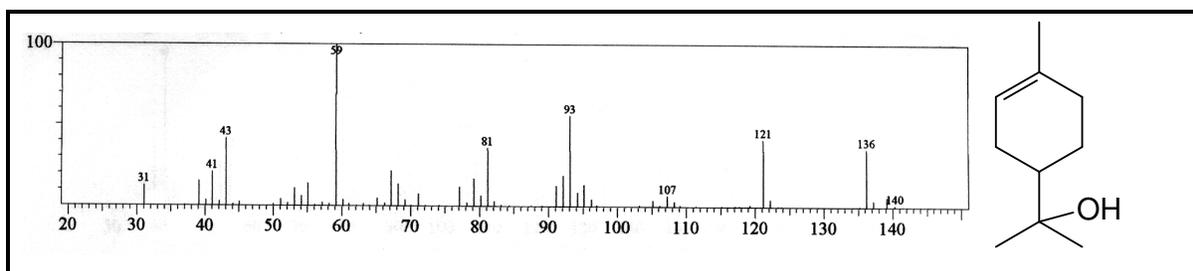


Figura 29 - Espectro de massa do α – Terpinenol

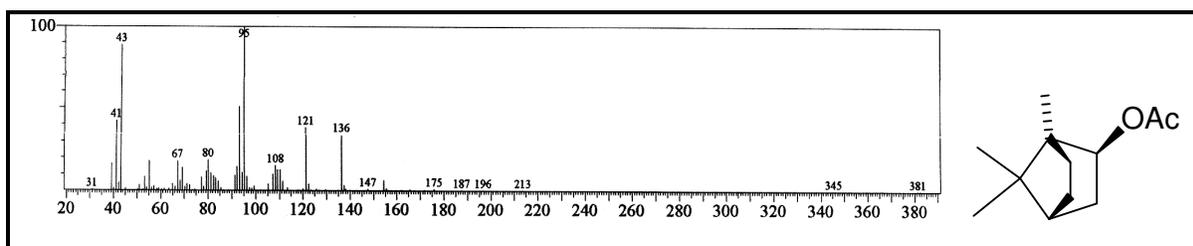


Figura 30 - Espectro de massa do acetato de Bornila

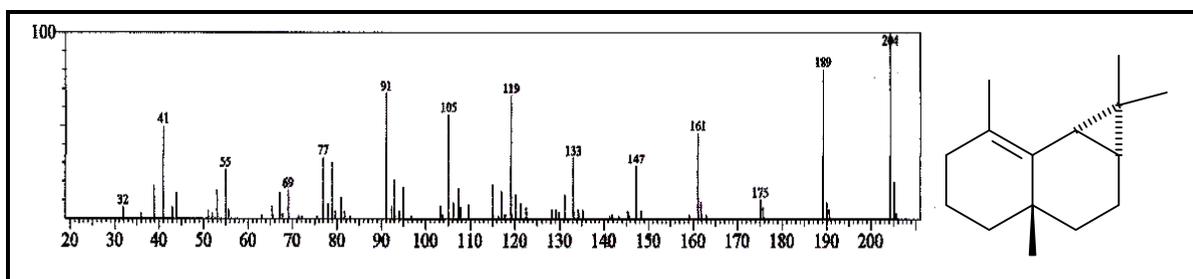


Figura 31 - Espectro de massa do β – Maalieno

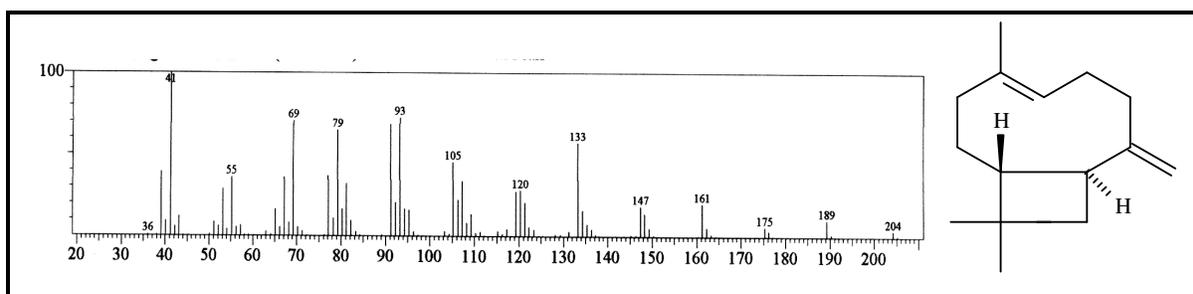


Figura 32 - Espectro de massa do β – Cariofileno

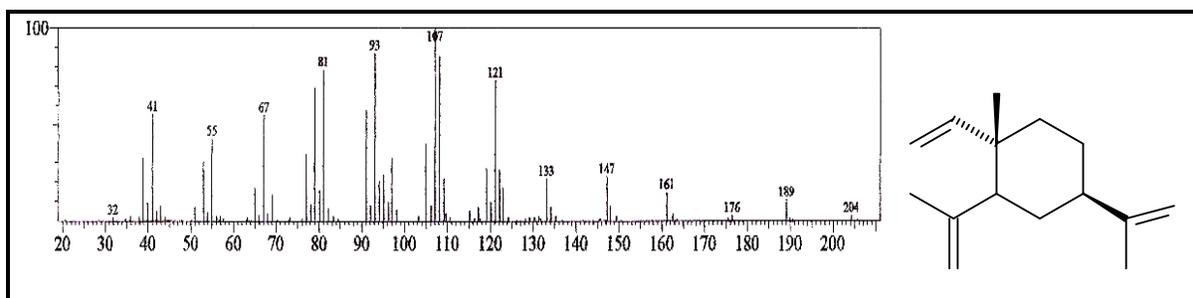


Figura 33 - Espectro de massa do β – Elemeno

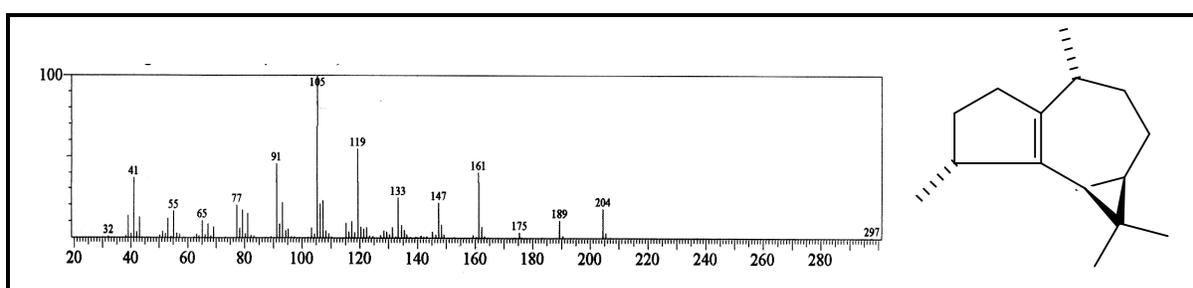


Figura 34 - Espectro de massa do Isoledeno

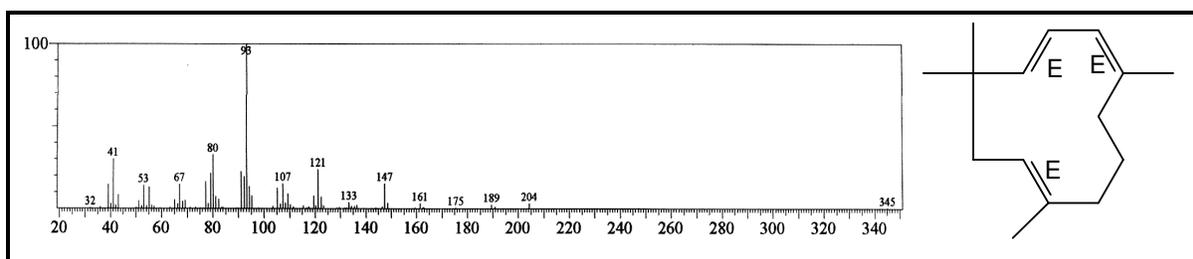


Figura 35 - Espectro de massa do α – Humuleno

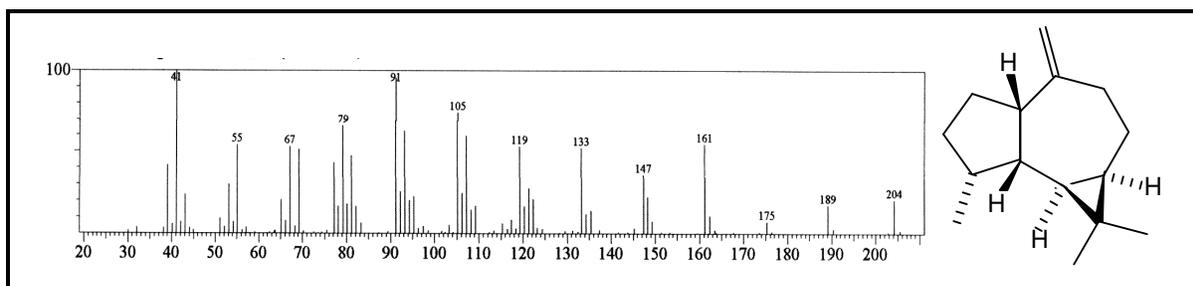


Figura 36 - Espectro de massa do Alloaromadendreno

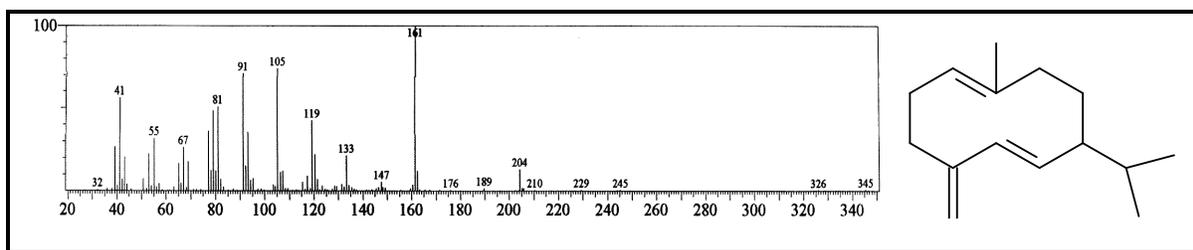


Figura 37 - Espectro de massa do Germacreno - D

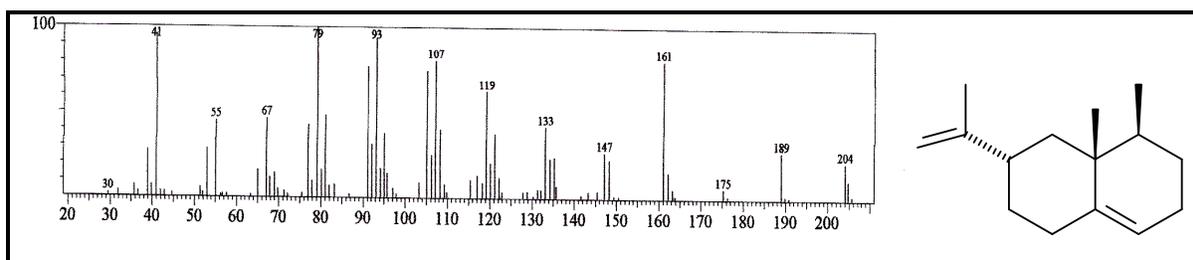


Figura 38 - Espectro de massa do Eremofileno

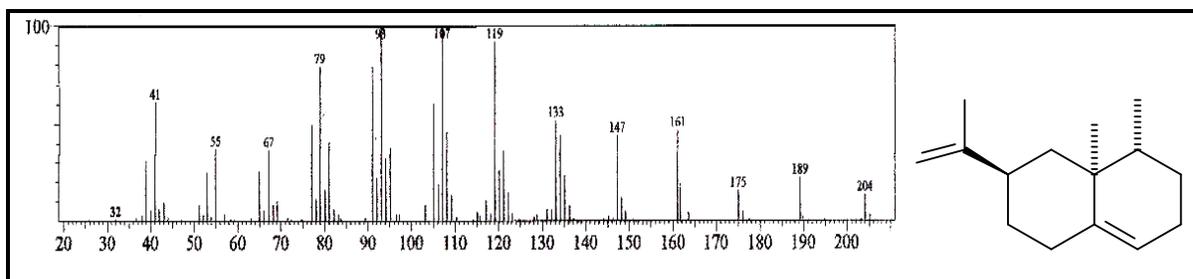


Figura 39 - Espectro de massa do Valenceno

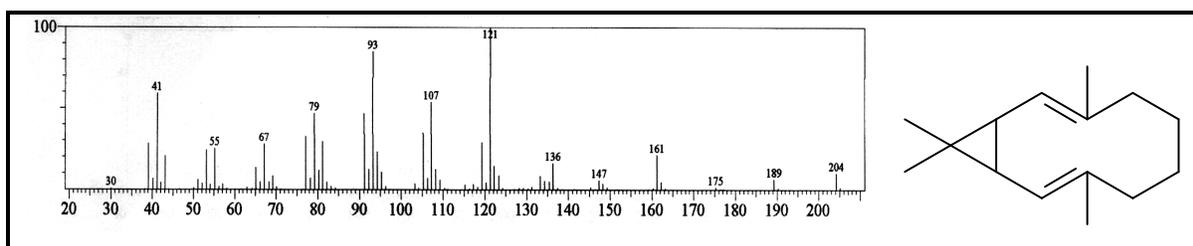


Figura 40 - Espectro de massa do Biclogermacreno

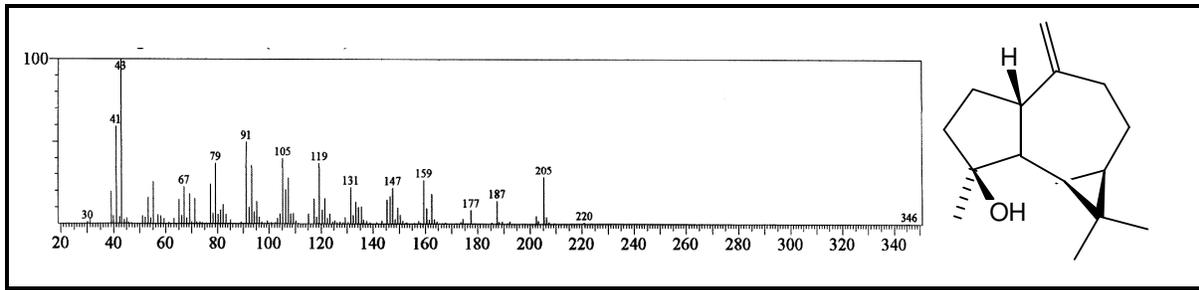


Figura 41 - Espectro de massa do Espatulenol

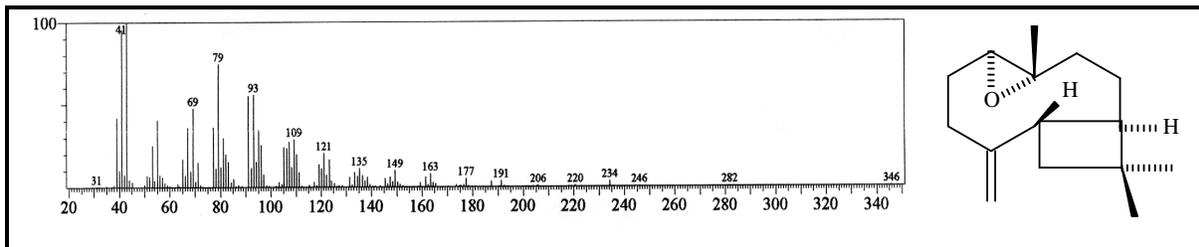


Figura 42 - Espectro de massa do óxido de Cariofileno

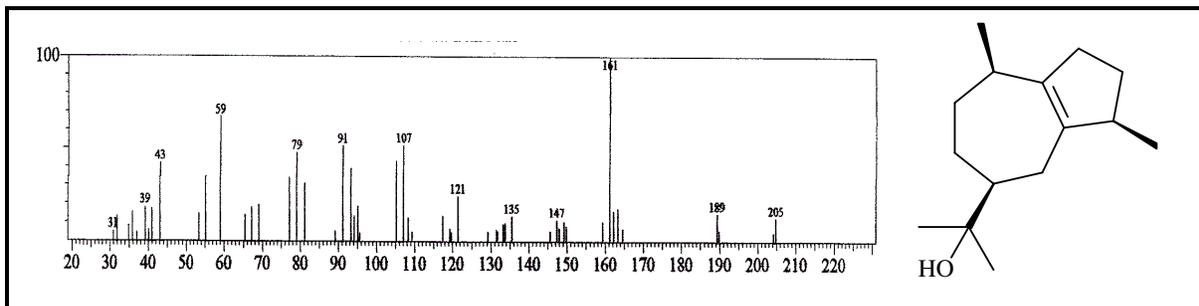


Figura 43 - Espectro de massa do Guaiol

DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL

5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NÃO-VOLÁTEIS DO EXTRATO ETANÓLICO DA RAIZ DE *Croton rhamnifolius* (CRRE)

Uma triagem fitoquímica com os extratos da raiz, caule, talos e folhas de *Croton rhamnifolius* foi realizada para verificar com qual parte da planta se iniciaria o estudo. Extratos hexânicos e etanólicos foram preparados para cada parte da planta e posteriormente concentrados. Cada material obtido foi submetido à cromatografia filtrante, originando quatro frações para cada fracionamento. As frações foram comparadas por cromatografia em camada delgada (CCD), e as raízes revelaram uma maior quantidade de substâncias com maior probabilidade de isolamento. A análise por espectroscopia de RMN ^1H das amostras do extrato etanólico da raiz mostrou a presença de compostos aromáticos e terpênicos que, associado ao rendimento considerável obtido no extrato, tornou-a sujeito de escolha para iniciar o trabalho fitoquímico.

5.1 Determinação estrutural de CR-1

A partição líquido-líquido do extrato etanólico da raiz de *Croton rhamnifolius* (CRRE) levou a obtenção de quatro frações. A fração clorofórmica (CRRE-C) foi submetida a uma cromatografia filtrante, tendo sido a fração acetato de etila sujeita a três cromatografias do tipo “flash” (p. 103), resultando no isolamento de um sólido de coloração amarelo claro, com faixa de fusão de 258,6-260,1 °C, denominado de CR-1.

A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1 (Fig. 54 a 56, p. 41-42) mostrou a presença de dois dupletos em δ 7,74 ($J= 7,1$ Hz; H-9') e δ 7,61 ($J= 7,3$ Hz; H-12'), além de dois tripletos, um em δ 7,27 ($J=$ H-10') e outro em δ 7,31 ($J=$ H-11'). Os deslocamentos químicos característicos e a multiplicidade dos sinais indicam a presença de um anel aromático 1,2 -disubstituído. Um singlete em δ 11,63 foi relacionado a hidrogênio ligado a nitrogênio. O espectro de CR-1 mostra

ainda três singletos intensos em δ 0,94 (H-20), 0,97 (H-19) e 1,23 (H-18) que correspondem a três grupamentos metilas ligados a carbonos quaternários.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Fig. 57, p. 42) foram observadas 30 linhas espectrais. Os seis sinais em δ 111,88 (C-12'), 118,73 (C-9'), 119,38 (C-10'), 121,60 (C-11'), 128,95 (C-8'), 137,63 (C-13') são relativos a carbonos aromáticos. O sinal em δ 108,90 (C-7') e em δ 138,07 (C-2') foram correlacionados a carbonos insaturados em uma dupla ligação tetrasubstituída. .

O espectro de massa de CR-1 (Fig. 68, p. 49) revelou o pico do íon molecular com razão massa/carga em 444 daltons. A massa par do composto possibilitou sugerir a presença de mais um átomo de nitrogênio, além do presente no sistema indol.

Pela análise dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -BB, acima descritos, foi possível sugerir a estrutura de um esqueleto de um alcalóide do tipo indólico para CR-1 (Fig. 44).

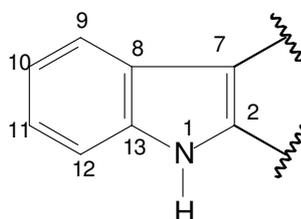


Figura 44 - Estrutura básica de um alcalóide do tipo indólico

No espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Fig. 57, p. 42) observou-se também três sinais em δ 45,09 (C-5'), 58,11 (C-12) e 63,88 (C-17) em região mais desprotegida, correspondentes a três carbonos metilênicos ligados possivelmente a átomo de nitrogênio, além do sinal em δ 67,70 (C-6) característico de carbono oxigenado do tipo sp^3 .

A comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C do esqueleto diterpenoídico indólico de CR-1 com o 3 – isoajamalicina encontram-se

registrados na Tabela 3 (p. 33) e os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de CR-1 por padrão de hidrogenação na tabela 4 (p. 34).

Tabela 3 - Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C do esqueleto diterpenoídico indólico de CR-1 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) com o de 3-isoajamalicina (125 MHz, CDCl_3) (CARBONEZI, 2004)

#C	δC (CR-1)	δC (3-isoajamalicina)
2'	138.07	132,5
5'	45.09	50,9
6'	16.98	16,8
7'	108.90	106,7
8'	128.95	127,7
9'	118.73	117,9
10'	119.38	119,3
11'	121.60	121,4
12'	111.88	111,2
13'	137.63	135,8

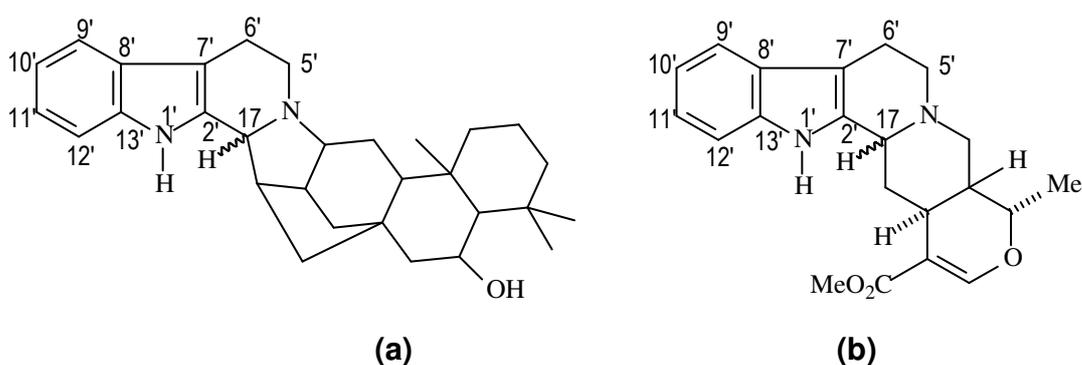


Figura 45 - Estrutura de: (a) CR-1 e, (b) 3 – isoajamalicina, detalhando a parte indólica dos compostos

Tabela 4 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
138,07	121,60	53,98	34,20	
137,63	119,38	45,09	23,10	
128,95	118,73	44,45	17,90	
108,90	111,88	43,15		
41,32	67,70	42,06		
37,11	63,88	39,74		
34,32	62,54	24,26		
	58,11	19,47		
	54,94	16,98		
	48,65			
	42,12			
C ₇	C ₁₁ H ₁₁	C ₉ H ₁₈	C ₃ H ₉	
1 x H (-N), 1 x H (-OH), 1 x O (-OH) e 2 x N				C ₃₀ H ₄₀ ON ₂

A partir dos dados obtidos pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{ON}_2$, em acordo com o sinal do íon molecular no espectro de massas em m/z 444 (Fig. 68, p. 49), com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 12. Como seis insaturações estão relacionadas ao grupo indólico, as seis lacunas restantes podem ser atribuídas a uma estrutura hexacíclica.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 69, p. 49) de CR-1 mostrou uma banda intensa e larga em $3259,3\text{ cm}^{-1}$ referente a hidroxila de álcool, além da banda em $3449,2\text{ cm}^{-1}$ de grupo $-\text{NH}$ de compostos indólicos. Foram observadas ainda absorções em $2927,2$ e $2855,0\text{ cm}^{-1}$ referentes a grupos de CH alifáticos, e uma banda fina e intensa em $748,9\text{ cm}^{-1}$ característico de anel aromático com deformação angular de 4H adjacentes (anéis orto-substituídos).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 58, p. 43) permitiu afirmar a presença de sete carbonos quaternários na molécula em δ 34,32 (C-4), 41,32 (C-8), 37,11 (C-10), 138,07 (C-2'), 108,9 (C-7'), 128,95 (C-8'), 137,63 (C-13'); como também, associar corretamente todos os sinais dos hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na Tabela 5 (p. 40).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C , com detecção no canal de hidrogênio (HMBC) (Fig. 60 a 66, p. 43 - 47) mostrou as correlações a mais de uma ligação de hidrogênios e carbonos ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

O acoplamento do hidrogênio do nitrogênio do núcleo indólico em δ 11,63 (NH-1') é evidenciado pela correlação com os carbonos em δ 108,9 (C-7'), 128,95 (C-8'), 137,63 (C-13') e 138,7 (C-2') como mostrado por setor na fig. 46, abaixo.

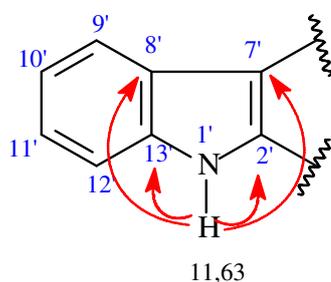


Figura 46 - Sub-estrutura I para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Já as correlações referentes aos hidrogênios aromáticos são verificadas nas

correlações dos hidrogênios em δ 7,27 (H-10'), 7,31 (H-11'), 7,61 (H-12') e 7,74 (H-9') com os carbonos em δ 111,88 (C-12'), 118,73 (C-9'), 119,38 (C-10') e 121,60 (C-11') respectivamente, como mostrado na figura 47, confirmando a parte indólica da molécula.

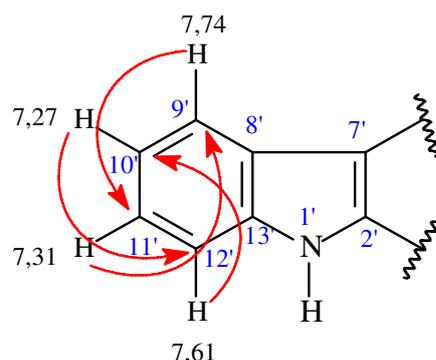


Figura 47 - Sub-estruturas II para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

A correlação dos hidrogênios metilênicos em δ 2,53 e 3,12 (2H-6') e δ 3,36 e 3,37 (2H-5') com um mesmo carbono em δ 108,9 definiu (C-7') (Fig. 49). Observa-se também, o acoplamento dos 2H-6' com o carbono em δ 138,07 (C-2') e o acoplamento do hidrogênio em δ 2,53 (H-6') com o carbono em δ 128,95 (C-8') (Fig. 49), que em conjunto com os dados anteriormente descritos confirmam a presença do esqueleto de alcalóide do tipo indólico (Tab. 3, p. 33).

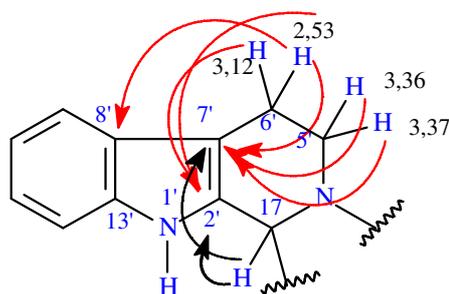


Figura 48 - Sub-estrutura III para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

A posição relativa do grupo metilênico (C-15) presente no anel de cinco

membros foi confirmada pelas correlações dos hidrogênios em δ 2,10 e 2,17 (2H-15) com os carbonos em δ 41,32 (C-8), 48,65 (C-16) e 63,68 (C-17) (Fig. 49).

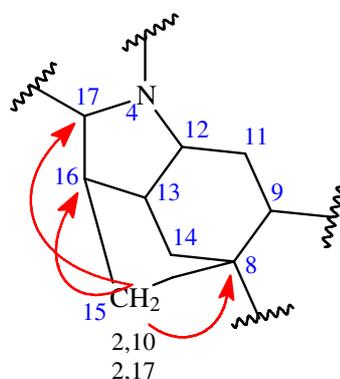


Figura 49 - Sub-estrutura IV para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Já o acoplamento do hidrogênio em δ 3,44 (H-12) com os carbonos em δ 42,12 (C-13), 54,94 (C-9) é verificado na figura 50.V. Observou-se ainda a correlação do hidrogênio em δ 1,98 (H-9) com os carbonos em δ 24,26 (C-11), 33,11 (C-10), 39,74 (C-14), 41,32 (C-8), 58,11 (C-12) e 62,54 (C-5) (Fig. 50.VI)

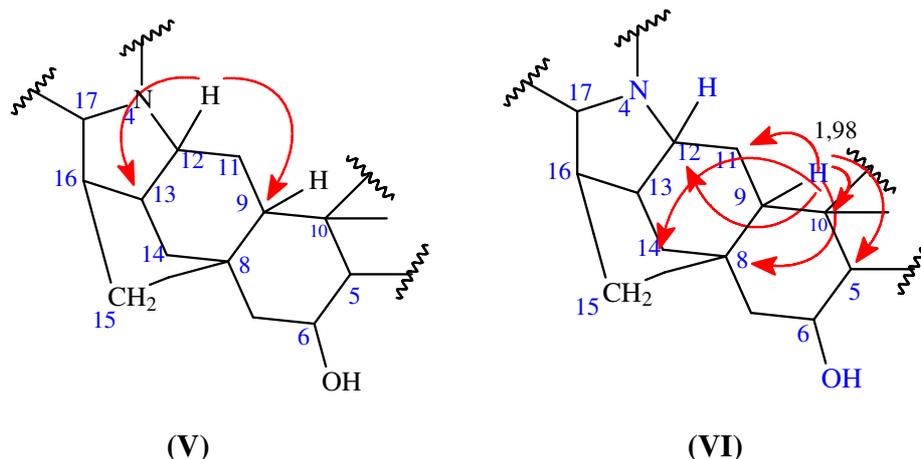


Figura 50 - Sub-estrutura V e VI para CR-1, detalhando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

A localização dos grupamentos metilas foi determinada através da

correlação dos hidrogênios em δ 1,23 (H-18) com o carbono em δ 19,47 (C-2), 23,10 (C-19), 34,32 (C-4), 43,15 (C-3) e 62,54 (C-5), além da correlação dos hidrogênios presentes em δ 0,97 (H-19) com o carbono em δ 34,20 (C-18), 34,32 (C-4), 43,15 (C-3), 62,54 (C-5), e os hidrogênios em δ 0,94 (H-20) com o carbono em δ 37,11 (C-10), 42,06 (C-1), 54,94 (C-9), 62,54 (C-5) (Fig. 51).

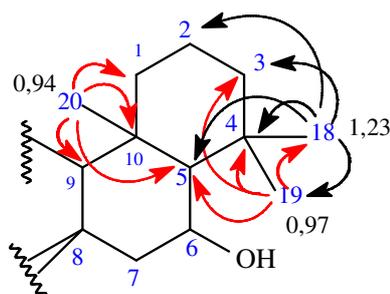


Figura 51 - Sub-estrutura VII para CR-1, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

O espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1 (Fig. 67 e 68, p. 48), revelou o acoplamento do hidrogênio em δ 4,17 (H-6) com os hidrogênios em δ 1,23 (3H-18) e 0,97 (3H-19) (Fig. 52). O acoplamento do hidrogênio em δ 1,98 (H-9) com os hidrogênios em δ 1,34 (H-5) e 2,10 (H-15b), que por sua vez acopla com o hidrogênio em δ 4,42 (H-17) (Fig. 52).

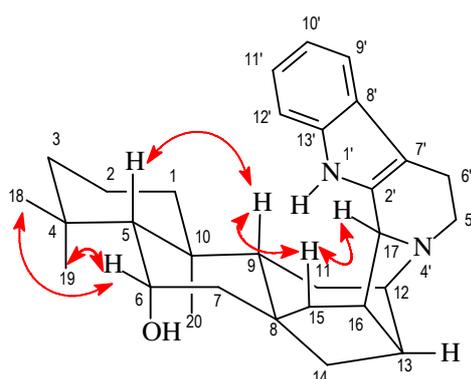


Figura 52 - Sub-estrutura VIII para CR-1, mostrando as correlações observadas no espectro NOESY

Tabela 5 - Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

#C	HSQC		HMBC	
	δC	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	42.06	1.56 (dt), 0.87 (dt, 12.5, 2.7)	—	3H-20
2	19.47	1.58, 1.39	H-1b; H-3b	—
3	43.15	1.39, 1.18	—	H-5; 3H-18; 3H-19; H-5'a
4	34.32	—	H-5; 3H-18; 3H-19	H-6
5	62.54	1.34 (d, 5.3)	H-6'	H-7b; H-9; 3H-18; 3H-19; 3H-20
6	67.70	4.17 (m)	H-5; H-7b	—
7	44.45	2.18, 1.59	—	H-14b; H-15a
8	41.32	—	H-7a; H-9; 2H-15	H-6; H-13
9	54.94	1.98 (dd, 12.0, 5.4)	2H-11	H-12; H-14b; 2H-15; 3H-20
10	37.11	—	H-1b; H-9; 3H-20	H-11b
11	24.26	1.59, 1.05 (dt, 12.5, 3.0)	H-9; H-12	H-13
12	58.11	3.44 (dl, 10.0)	H-11a	H-9; H-14b; H-16; H-17, 2H-5'
13	42.12	2.31 (m)	2H-14; H-16	H-11b; H-17
14	39.74	1.44 (d, 11.8), 1.01 (dd, 11.8, 3.5)	—	H-7a; H-9
15	53.98	2.17 (t, 12.1), 2.10 (dl, 12.1)	H-16	2H-7; H-9; H-13; H-14a; H-17
16	48.65	3.03 (m)	2H-15; H-17	2H-14
17	63.88	4.42 (sl)	—	2H-15
18	34.20	1.23 (s)	—	H-3b; H-5; 3H-19
19	23.10	0.97 (s)	—	H-3b; H-5; 3H-18
20	17.90	0.94 (s)	—	H-5; H-9
2'	138.07	—	HN-1'; H-17	2H-6'; H-16
5'	45.09	3.36, 3.17	H-6'b	H-12
6'	16.98	3.12; 2.53	2H-5'	—
7'	108.90	—	2H-6	H-17; HN-1'; 2H-5'; H-9'
8'	128.95	—	H-9'	HN-1'; H-6'b; H-10'; H-12'
9'	118.73	7.74 (dl, 7.1)	—	H-11'
10'	119.38	7.27 (tl)	—	H-12'
11'	121.60	7.31 (tl)	—	H-9'
12'	111.88	7.61 (dl, 7.3)	—	H-10'
13'	137.63	—	HN-1'; H-12'	H-9'; H-11'

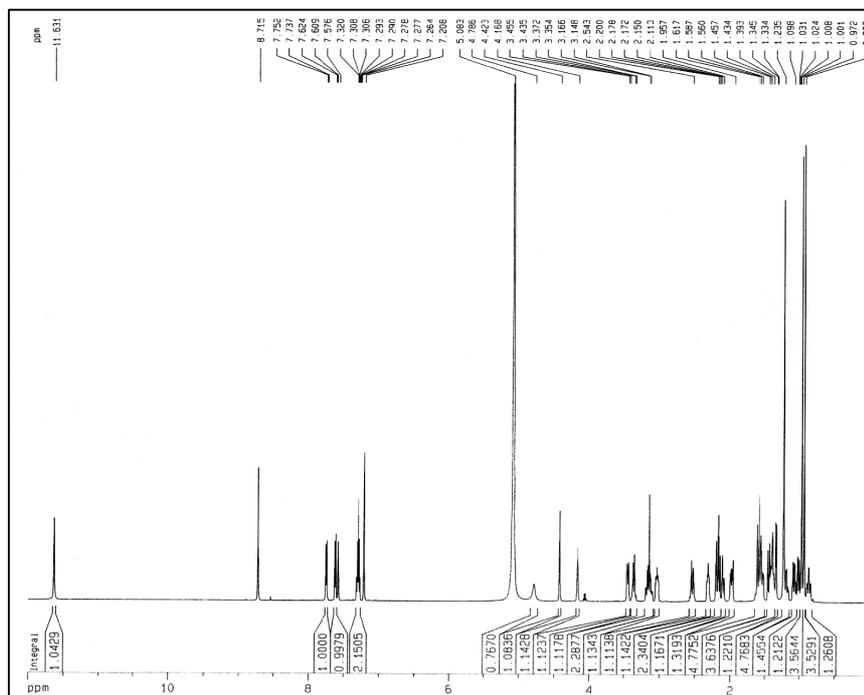


Figura 54 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de CR-1

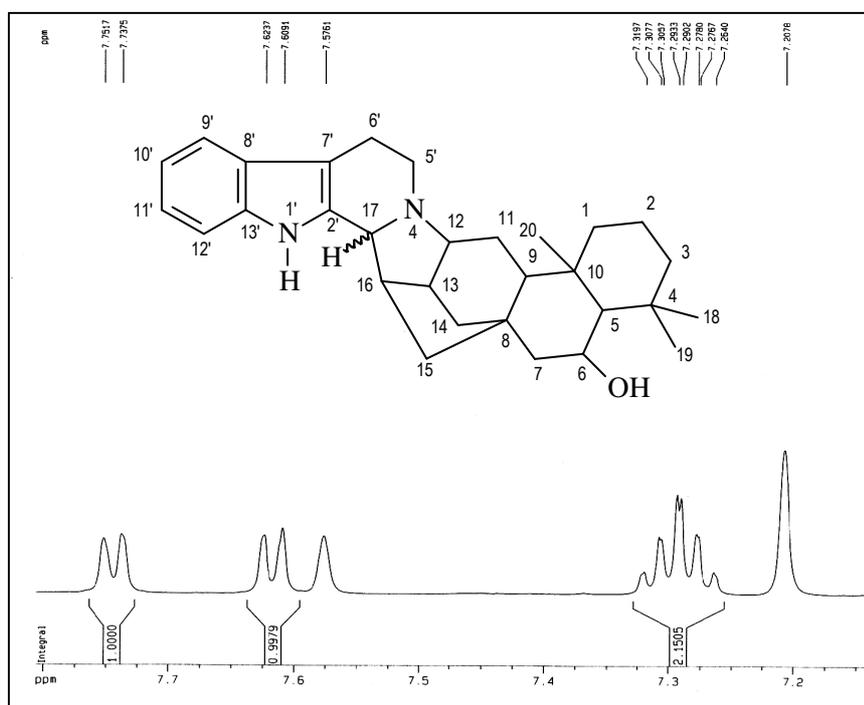


Figura 55 – Expansão (7,2 – 7,7 ppm) do espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de CR-1

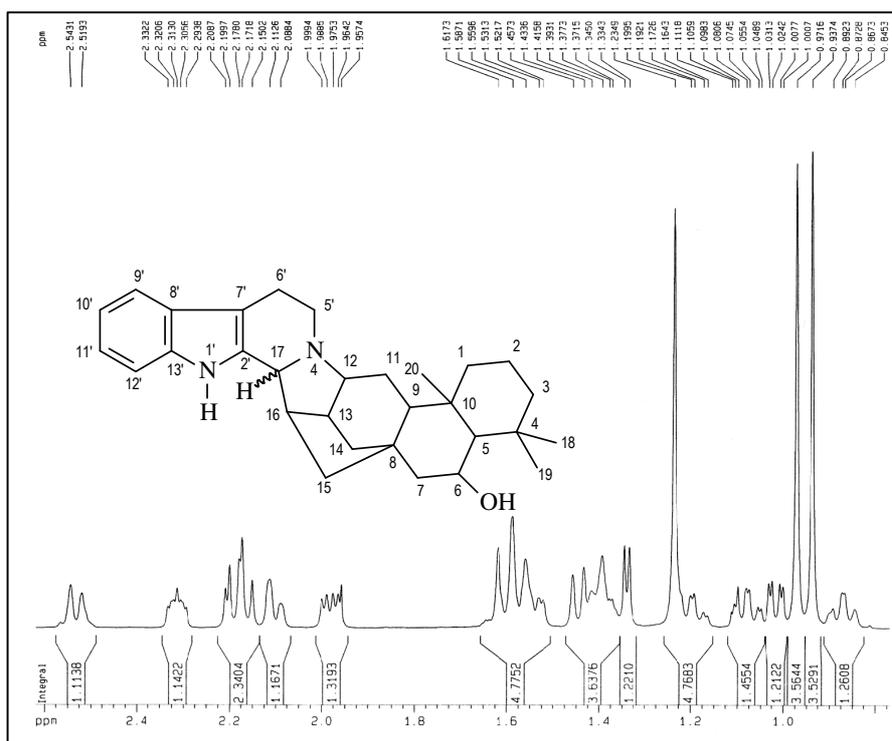


Figura 56 – Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de CR-1

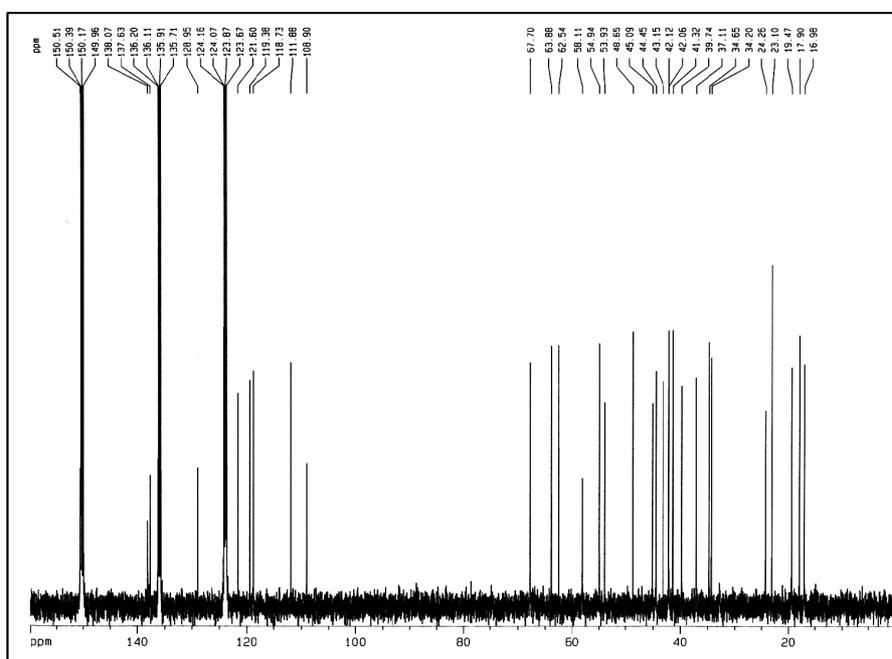


Figura 57 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, C₅D₅N) de CR-1

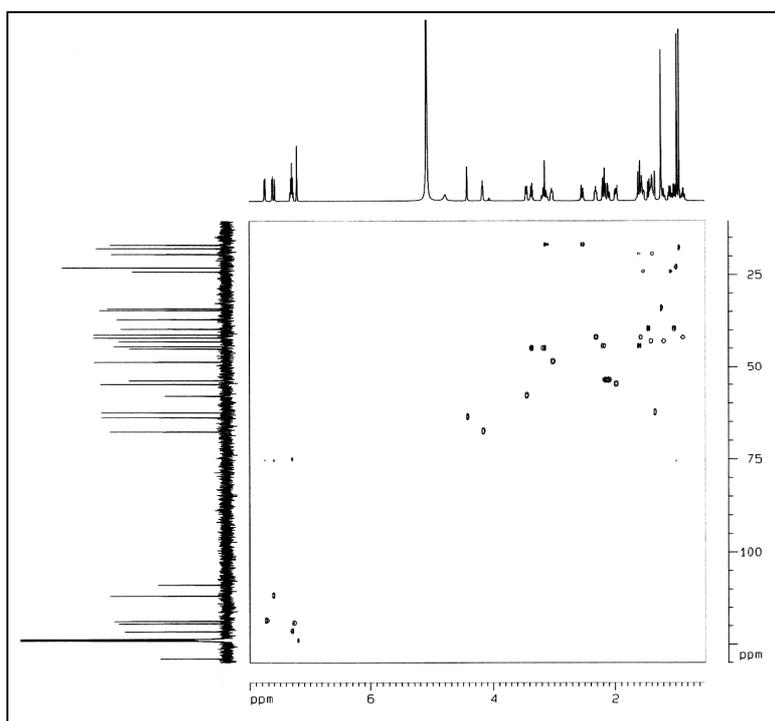


Figura 58 – Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

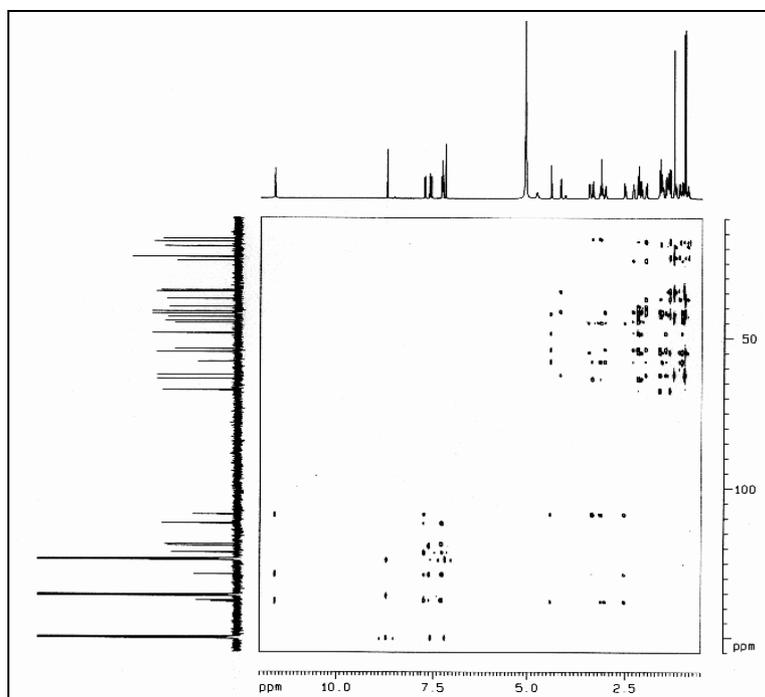


Figura 59 – Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

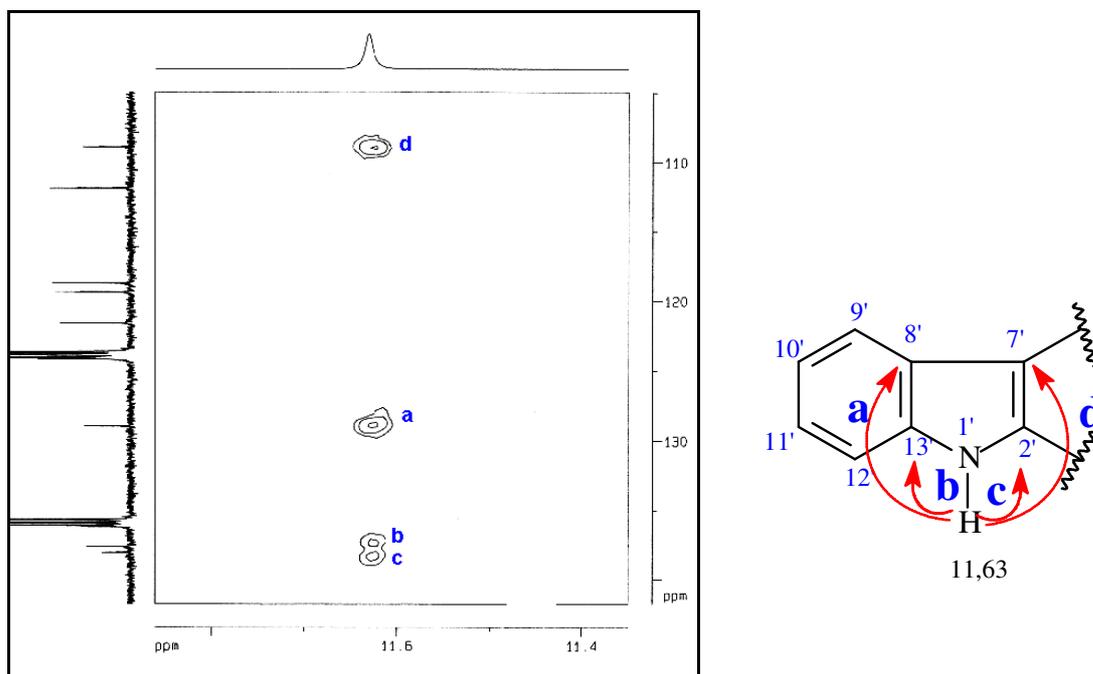


Figura 60 – Expansão (11,4 – 11,6 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

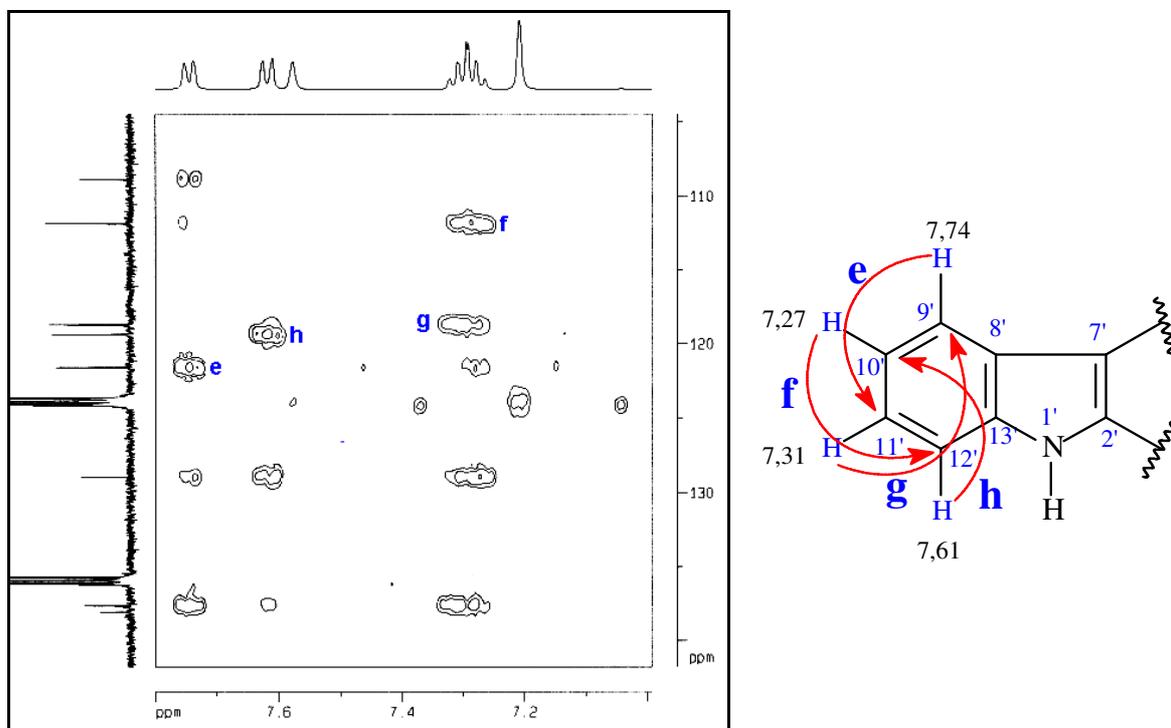


Figura 61 – Expansão (7,0 – 8,0 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

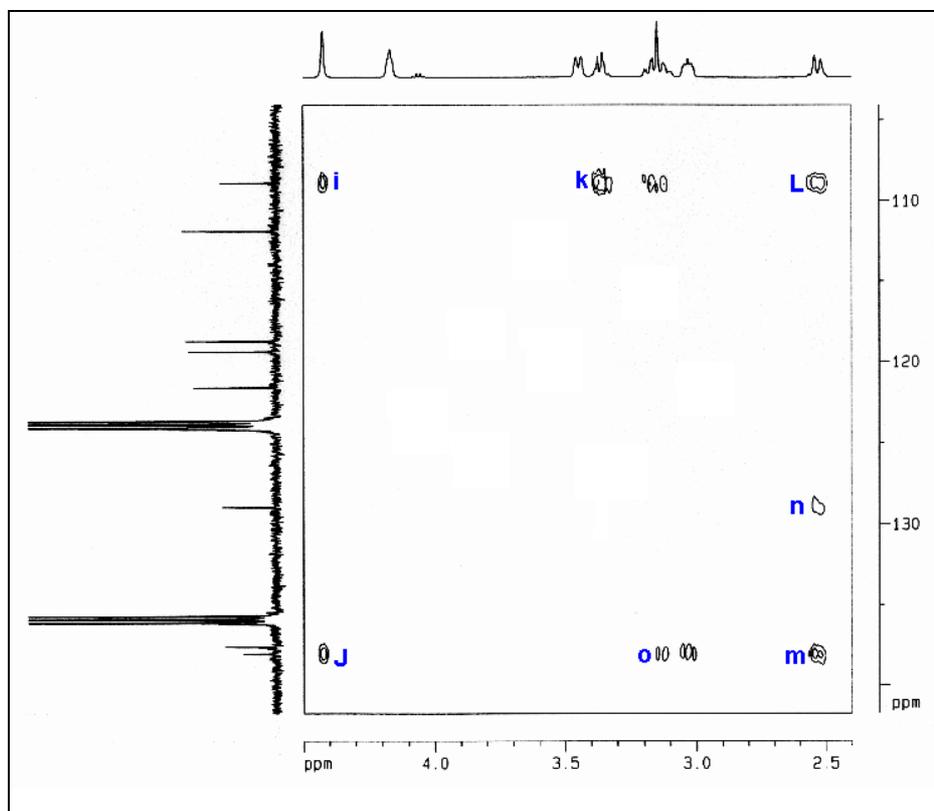
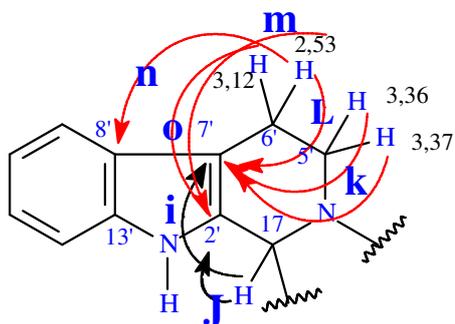


Figura 62 – Expansão (2,5 – 4,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1



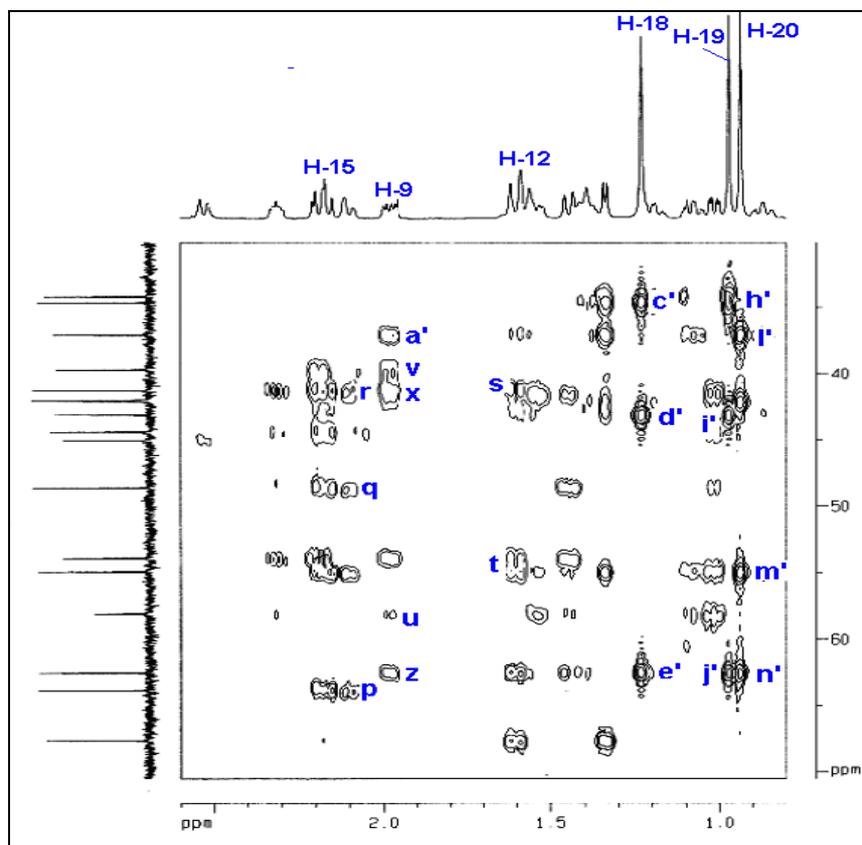
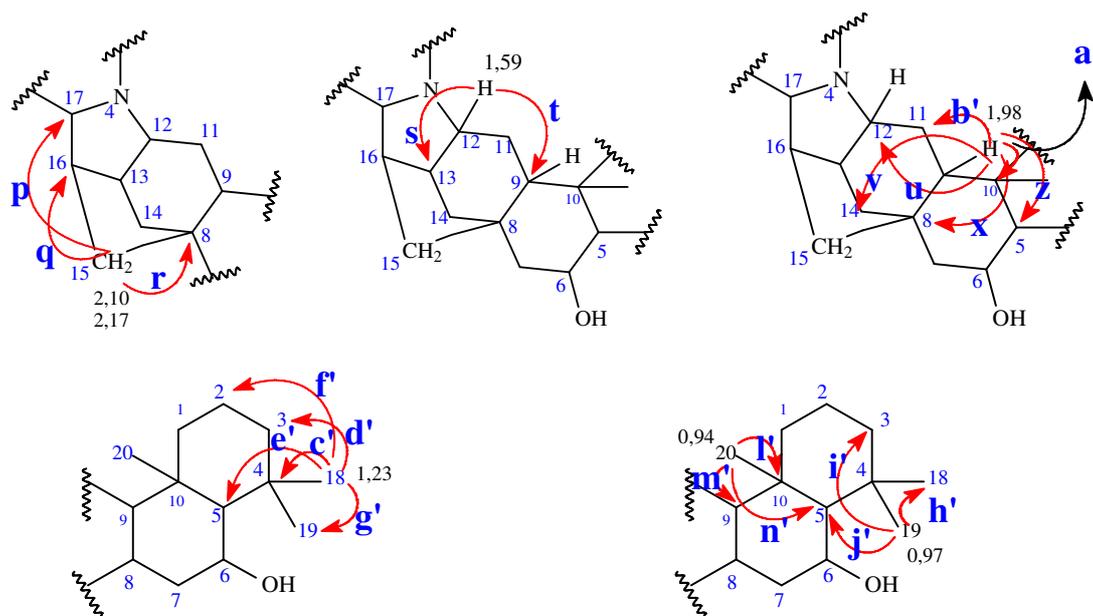


Figura 63 – Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1



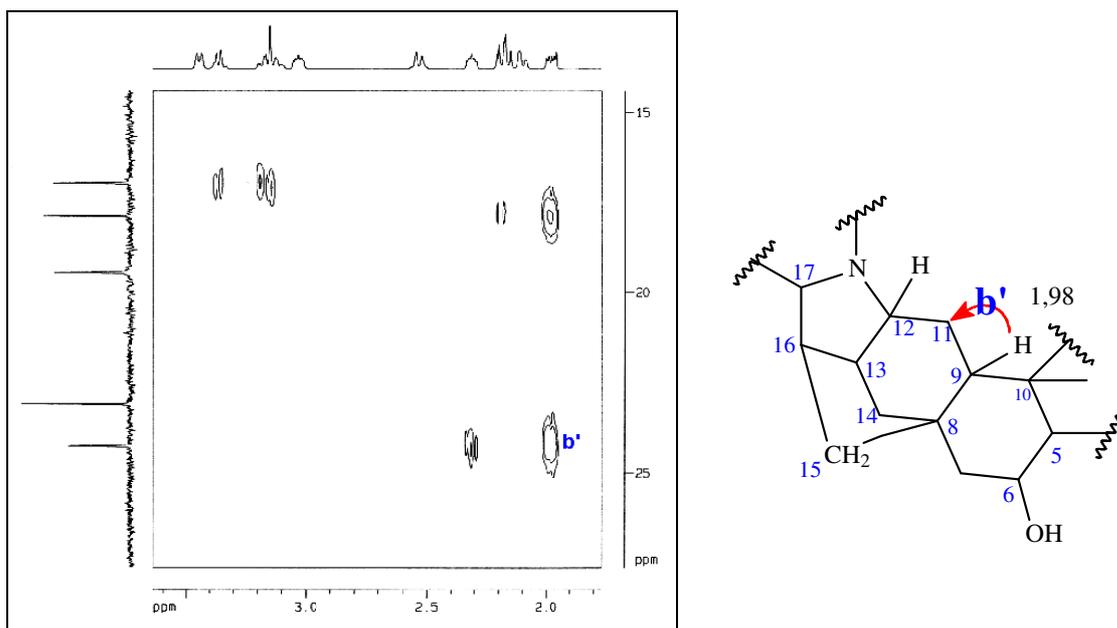


Figura 64 – Expansão (1,8 – 3,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H
 ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

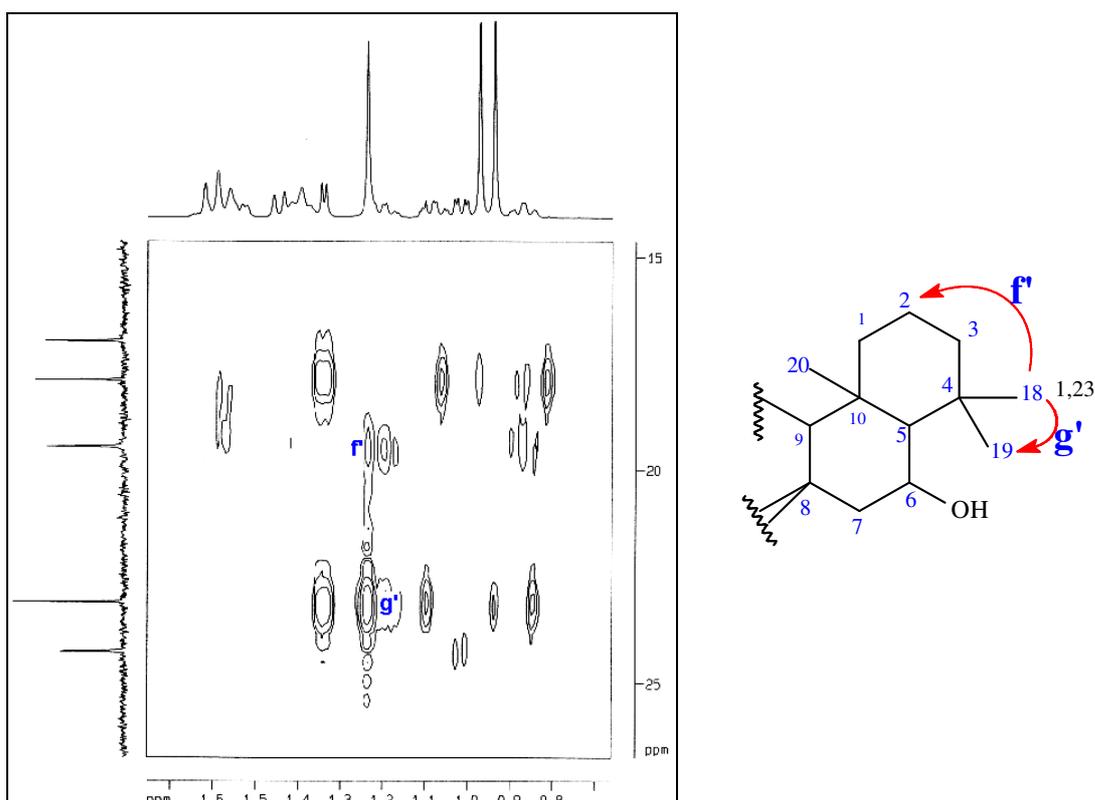


Figura 65 – Expansão (0,7 – 1,7 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H
 ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

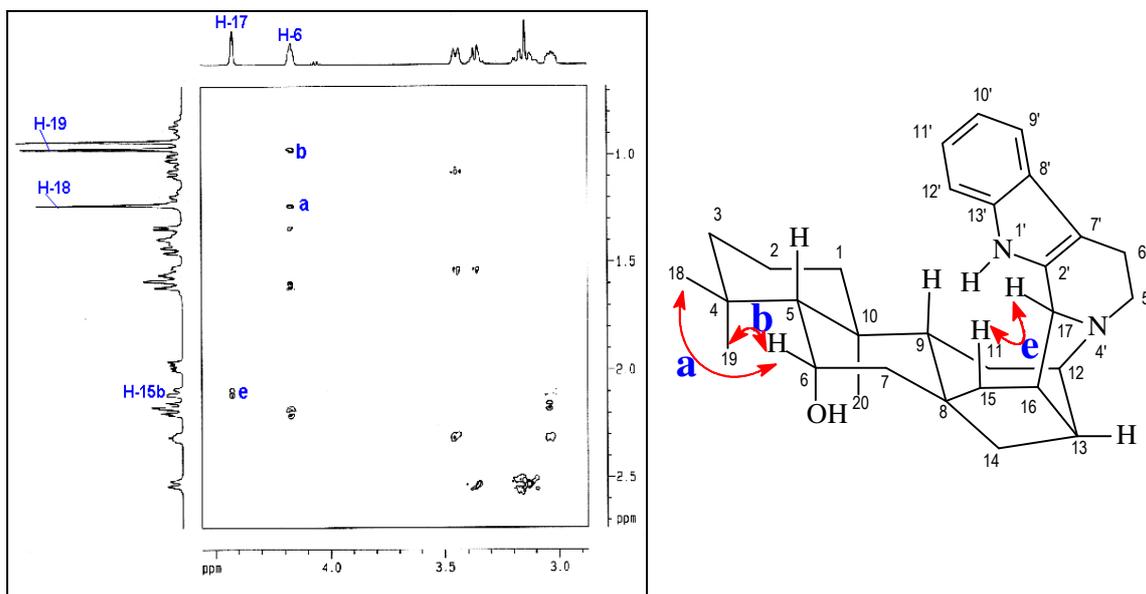


Figura 66 - Expansão (3,0 – 4,5 ppm) do espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

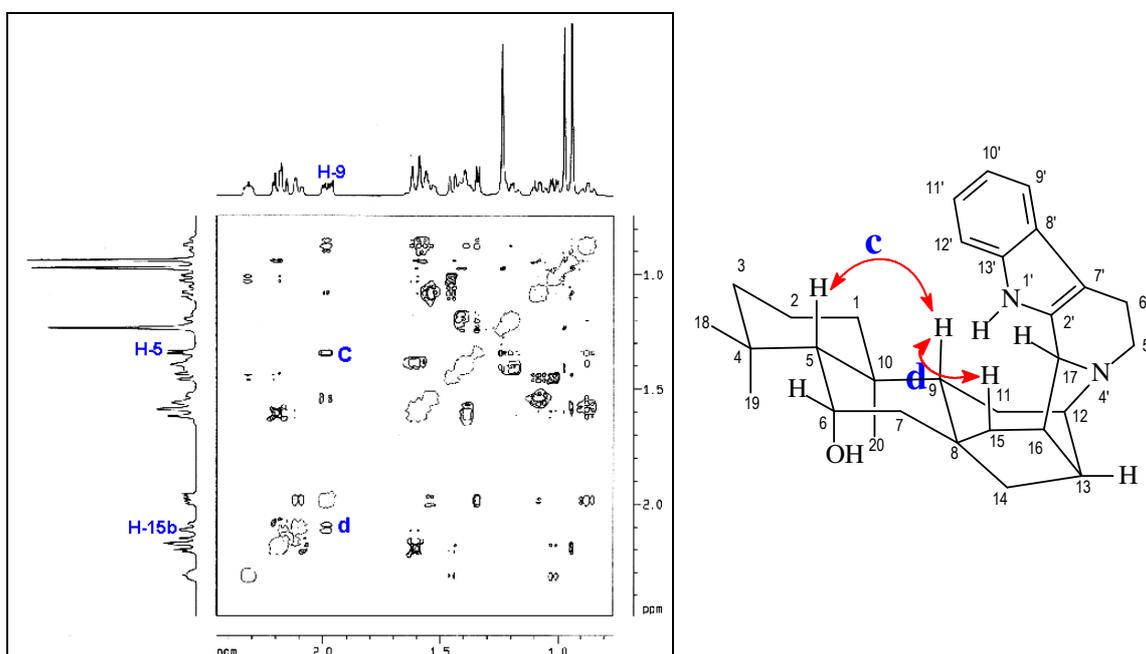


Figura 67 - Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-1

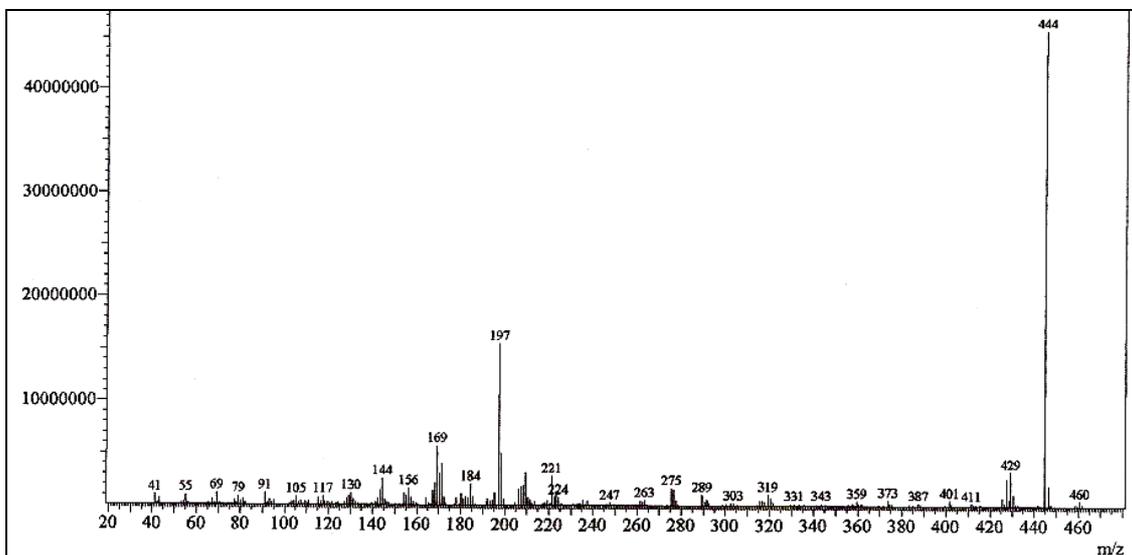


Figura 68 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-1

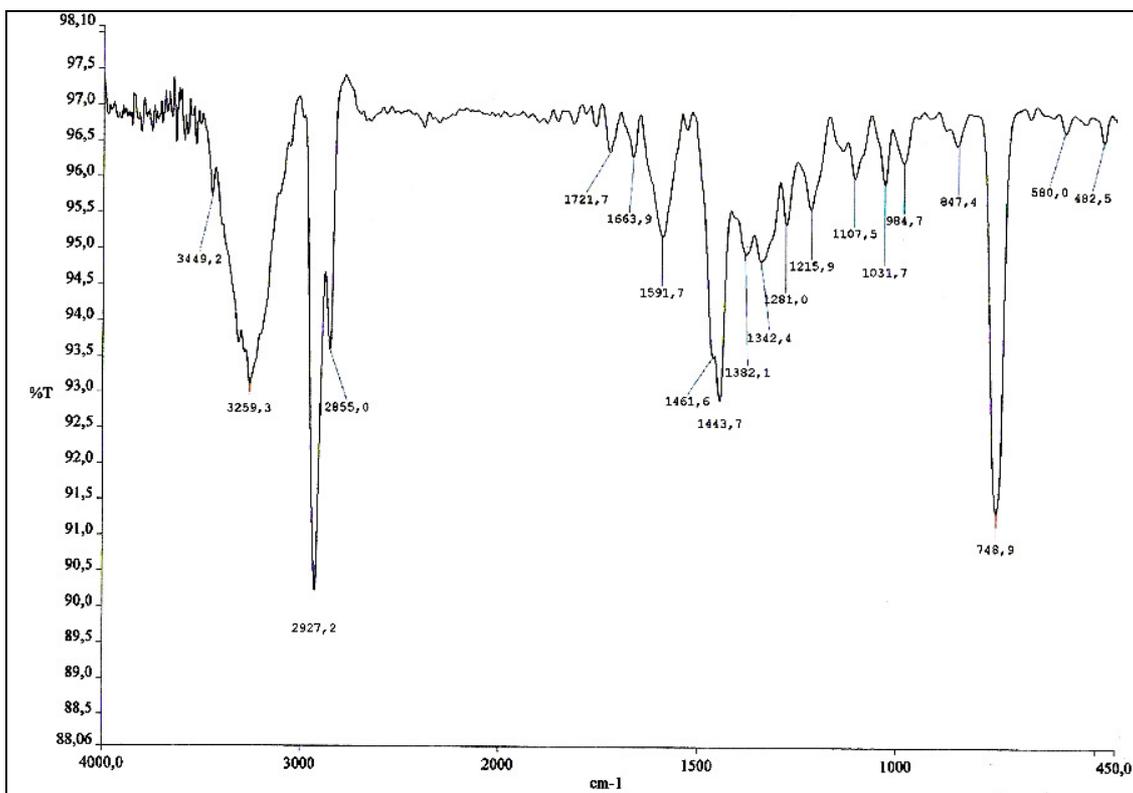


Figura 69 - Espectro de Infravermelho de CR-1 (pastilha de KBr)

5.2 Determinação estrutural de CR-2

Tratamento cromatográfico da fração clorofórmica (CRRE-C) (p. 107), obtida de partição líquido-líquido do extrato etanólico da raiz de *Croton rhamnifolius*, resultou no isolamento de CR-2, na forma de cristais aciculares brancos com ponto de fusão na faixa de 284,3 – 286,1 °C.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-2 (Fig. 75 e 76, p. 57) revelou seis sinais simples na faixa de δ 0,85 - 0,96 que foram relacionados a sete grupamentos metilas ligados a carbonos quartenários (s, δ 0,86 (H-23), 0,89 (H-24), 0,96 (H-25), 0,95 (H-26), 0,92 (H-27), 0,96 (H-29), 0,95 (H-30)), além de um outro em δ 2.0 (s, H-32) relativo a um grupamento acetila. Além disso, foram ainda visualizados sinais em região de desproteção correspondentes a um hidrogênio olefínico em δ 5,53 (dd, $J = 3,2; 7,8$ Hz, H-15) e um hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ 4,47 (dd, $J = 5,7; 10,6$ Hz, H-3).

O espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de CR-2 (Fig. 77, p. 58) apresentou 32 linhas espectrais, compatível com um esqueleto triterpênico acetilado. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT 135 (Fig. 79, p. 58) permitiu identificar a presença de 8 carbonos metílicos, 10 metilênicos e 5 metínicos e 9 carbonos não-hidrogenados, respectivamente. Observou-se ainda sinais referentes a dois grupamentos carbonilas em δ 184,0 e 171,2, dois carbonos insaturados, um não-hidrogenado e outro mono hidrogenado em δ 160,8 e 117,0, respectivamente, e um carbono oximetínico em δ 81,1.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de CR-2 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
184,01	117,05	41,03	32,12	
171,20	81,13	37,64	28,88	
160,81	55,85	35,59	28,19	
51,66	49,32	33,92	26,40	
39,27	41,69	33,56	22,67	
38,17		31,58	21,50	
37,92		30,97	16,81	
37,57		27,70	15,83	
29,52		18,96		
		17,54		
C ₉	C ₅ H ₅	C ₁₀ H ₂₀	C ₈ H ₂₄	
CH ₃ CO ₂ e -CO ₂ H				C ₃₂ H ₄₉ O ₄

A partir dos dados obtidos pôde-se propor a fórmula molecular C₃₂H₄₉O₄, com IDH igual a 8 em acordo com o sinal do íon molecular no espectro de massa em m/z 498 (Fig. 83, p. 62).

A análise comparativa dos dados acima descritos com dados da literatura relacionados a esqueletos triterpênicos (Tab. 8, p. 56), permitiu sugerir uma estrutura de triterpeno pentacíclico do tipo oleanano para CR-2.

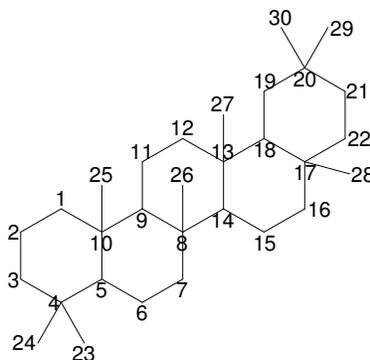


Figura 70 - Estrutura básica de um esqueleto triterpênico do tipo oleanano

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 79 e 80, p. 59) permitiu associar inequivocadamente todos os sinais dos hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na Tabela 7 (p. 55).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C , com detecção no canal de hidrogênio (HMBC) (Fig. 81 e 82, p. 60 - 61) mostrou os acoplamentos a longa distância entre os hidrogênios e carbonos ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$). A posição relativa do grupo funcional éster em C-3 foi confirmada através da correlação do sinal de hidrogênio em δ 4,47 (H-3) e 2,05 (H-32) com sinal do carbono carbonílico em δ 171,20 (fig. 71.I), além das correlações dos hidrogênios em δ 1,04 (H-1), do hidrogênio metínico em δ 0,89 (H-5) e dos dois grupamentos metilas em δ 0,86 e 0,89 (H-23 e H-24) com o carbono oxigenado em δ 81,13 (C-3) (fig. 71.II).

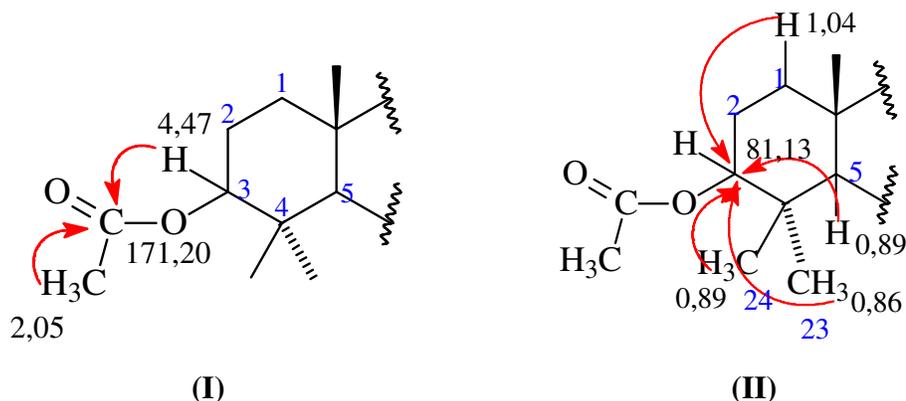


Figura 71 - Sub-estruturas I e II para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

As correlações dos hidrogênios em δ 1,71 e 1,47 (2H-22), 2,30 (H-18), 1,94 e 1,92 (2H-16) com a carbonila em δ 184,0 (C-28) (fig. 72.III), além das correlações observadas para os hidrogênios dos grupos metilas em δ 0,95 e 0,96 (H-30 e H-29) e dos hidrogênios metilênicos em δ 1,71 e 1,47 (2H-22) com o carbono em δ 29,52 (C-20), definitivamente estabeleceu a localização do grupo carboxílico em C-17 (fig. 73.IV).

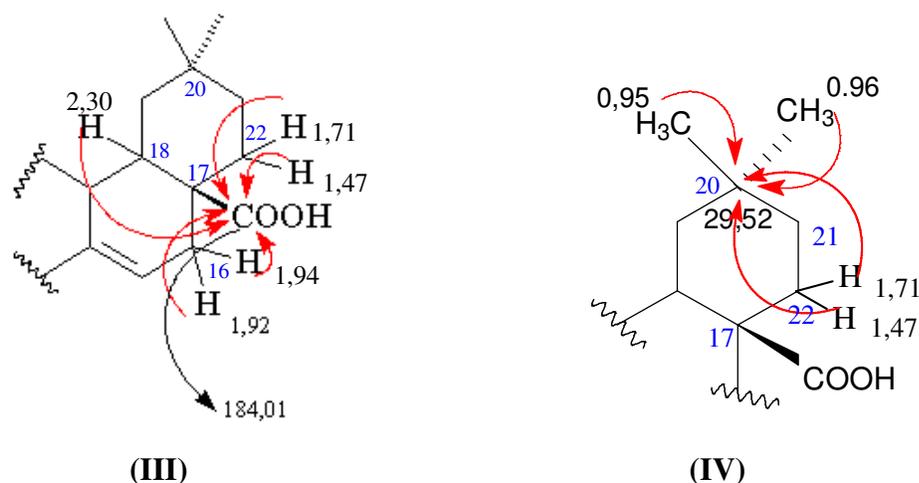


Figura 72 – Sub-estruturas III e IV para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Por fim, a posição da dupla ligação trissubstituída em C14–C15 foi confirmada pelas correlações do hidrogênio olefínico em δ 5,52 (H-15) com os carbonos em δ 39,27 (C-8), 38,17 (C-13), 31,58 (C-16) e 51,66 (C-17) (fig. 73).

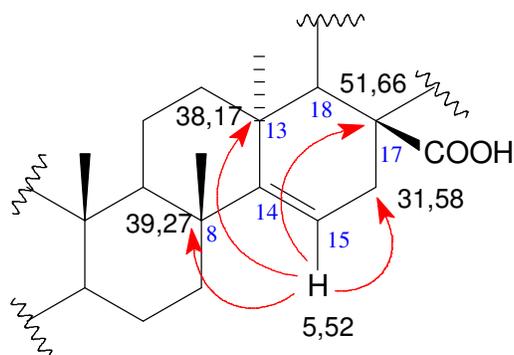


Figura 73 - Sub-estrutura V para CR-2, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

A detalhada análise de todos os dados espectroscópicos obtidos para CR-2, bem como a comparação com dados registrados na literatura para triterpenos de esqueleto oleanano (MCLEAN, 1987), aliado à comparação dos dados físicos como ponto de fusão (302 – 303 °C), permitiram determinar que CR-2 se tratava do ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico (ácido acetil aleuritólico, AAA) (Fig. 74). Apesar de conhecido na família Euphorbiaceae, em *Croton cajuçara* e *Croton urucurana* (SALATINO, 2007) *Jatropha macrorhiza* (TORRANCE, 1977) e em *Maprounea guianensis* (MCLEAN, 1987), ela se apresenta inédita para *Croton rhamnifolius*.

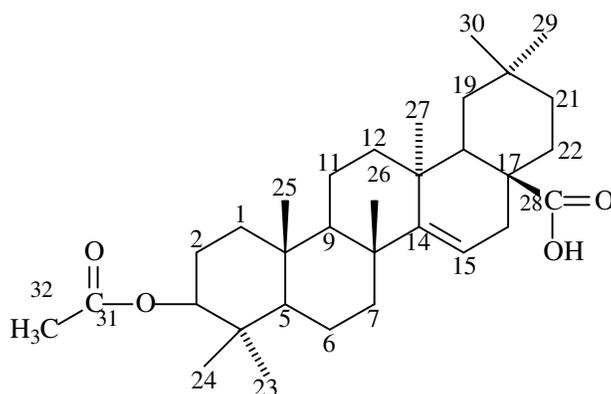


Figura 74 – Estrutura de CR-2: Ácido acetil aleuritólico

Dados da literatura revelam as atividades antifilarial (NYASSE, 2006), antiespasmódica (MACIEL, 2000), antitumoral (TORRANCE, 1977) e antimicrobiana (PERES, 1997) para o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA).

Tabela 7 – Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2

#C	^{13}C - BB δC	HSQC δH	HMBC	
			$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	37,64	1,04	1,65	0,89; 0,96; 1,45; 4,47
2	23,71	1,65	1,04	4,47
3	81,13	4,47 (dd)	1,65	0,86; 0,89; 1,04
4	37,57	-	0,86; 0,89; 4,47	1,49; 1,60; 1,65
5	55,85	0,89 (dd)	1,49; 1,60	0,86; 0,89; 0,96; 1,31; 2,00; 4,47
6	18,96	1,60; 1,52; 1,50	0,89; 1,31; 2,00	—
7	41,03	2,00; 1,31	1,49; 1,60	0,89
8	39,28	—	0,96; 1,31; 1,45; 2,00	1,49; 1,50; 1,60; 1,63
9	49,32	1,45	1,50; 1,63	0,89; 0,96; 1,04; 1,31; 1,63; 2,00
10	37,92	—	0,89; 0,96; 1,04; 1,45	—
11	17,55	1,63; 1,50	1,45; 1,63	—
12	33,57	1,63	1,50; 1,63	0,93; 1,45; 2,28
13	38,18	—	0,93; 1,63; 2,28	0,93; 1,12; 1,26; 5,53
14	160,81	—	5,53	0,93; 0,96; 1,31; 1,63; 2,00; 2,37
15	117,05	5,53 (dd)	2,37	—
16	31,59	1,94 (dd); 1,92 (dd)	5,53	1,47; 1,71; 2,28
17	51,66	—	1,47; 1,71; 2,28; 2,37	1,12; 1,19; 1,26; 5,53
18	41,69	2,30	1,12; 1,26	0,93; 1,47; 1,71; 2,37
19	35,59	1,26; 1,12	2,28	0,92; 0,95; 1,19
20	29,52	—	0,92; 0,95; 1,19	1,47; 1,71; 2,28
21	33,92	1,19	1,47; 1,71	0,92; 0,95
22	30,97	1,71; 1,47	1,19	2,28; 2,37
23	28,19	0,86 (s)	—	0,89; 4,47
24	16,81	0,89 (s)	—	0,86; 0,89; 4,47
25	15,83	0,96 (s); 0,95 (s); 0,89 (s)	—	0,89; 1,04; 1,45
26	26,40	0,96 (s); 0,95 (s); 0,92 (s)	—	1,31; 1,45; 2,00
27	22,67	0,92 (s)	—	1,63; 2,28
28	184,01	—	—	1,47; 1,71; 2,28; 2,37
29	32,12	0,96 (s)	—	0,92; 1,12; 1,19; 1,26
30	28,89	0,95 (s)	—	0,95; 1,12; 1,19; 1,26
31	171,20	—	2,05	4,47
32	21,50	2,05 (s)	—	—

Tabela 8 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C de CR-2 (125 MHz, CDCl_3) com os descritos na literatura para o ácido acetil aleuritólico (75 MHz, CDCl_3) (MCLEAN, 1987)

	CR-2	Ácido acetil aleuritólico (McLean, 1987)
#C	δC	δC
1	37,6	37,3
2	23,7	23,3
3	81,1	80,7
4	37,6	37,6
5	55,8	55,5
6	18,9	18,7
7	41,0	40,6
8	39,3	38,9
9	49,3	48,9
10	37,9	37,8
11	17,5	17,2
12	33,6	33,2
13	38,2	37,2
14	160,8	160,5
15	117,0	116,8
16	31,6	31,2
17	51,7	51,4
18	41,7	41,3
19	35,6	35,2
20	29,5	29,2
21	33,9	33,6
22	30,9	30,6
23	28,2	27,8
24	16,8	16,5
25	15,8	15,6
26	26,4	26,1
27	22,7	22,4
28	184,0	184,2
29	32,1	31,8
30	28,9	28,6
31 (OCOCH_3)	171,2	170,9
32 (OCOCH_3)	21,5	21,2

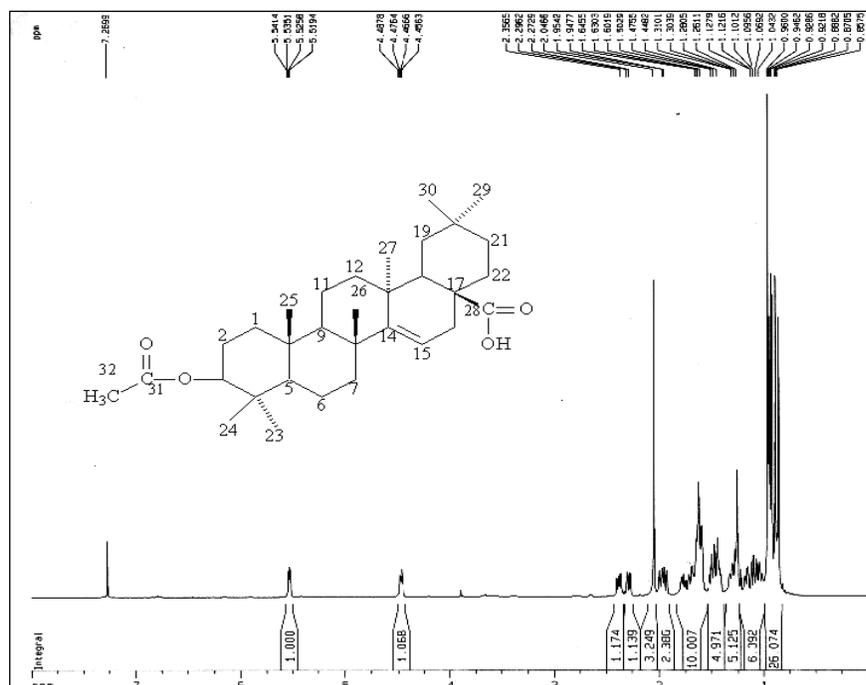


Figura 75 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CR-2

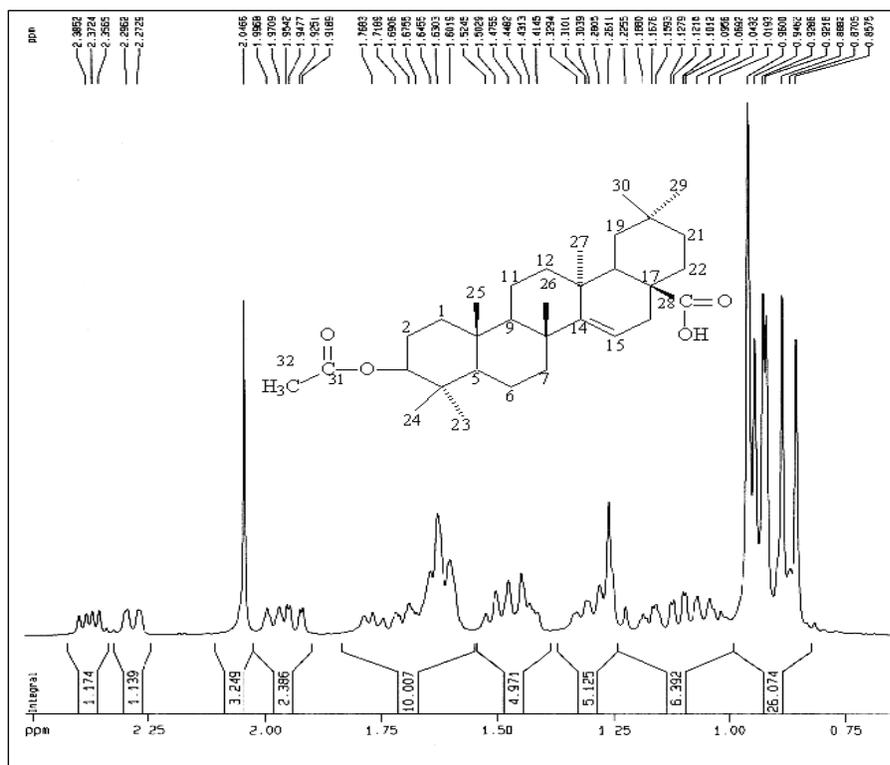


Figura 76 – Expansão (0,75 – 2,30 ppm) do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CR-2

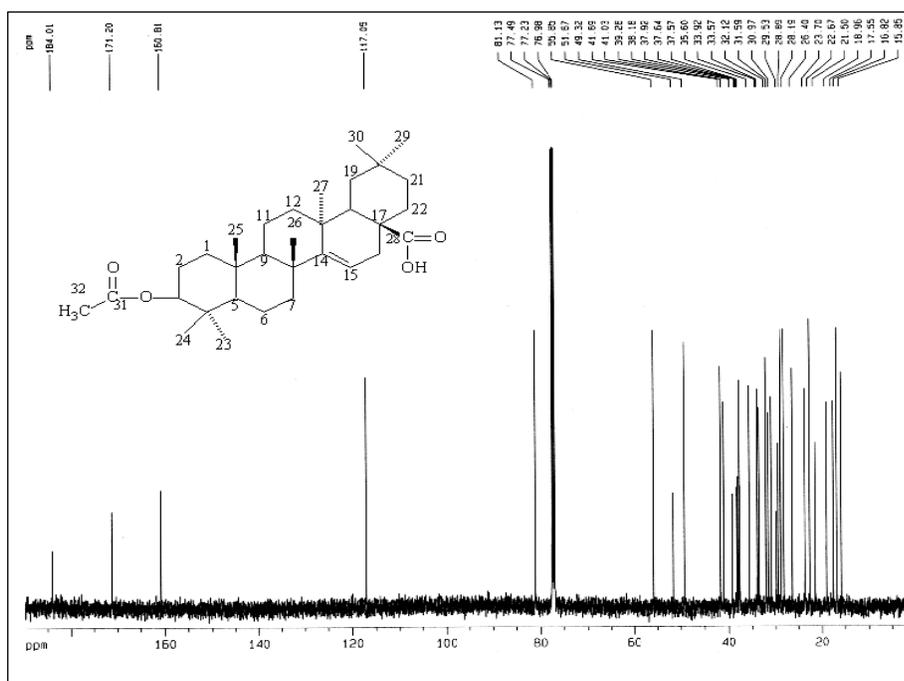


Figura 77 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de CR-2

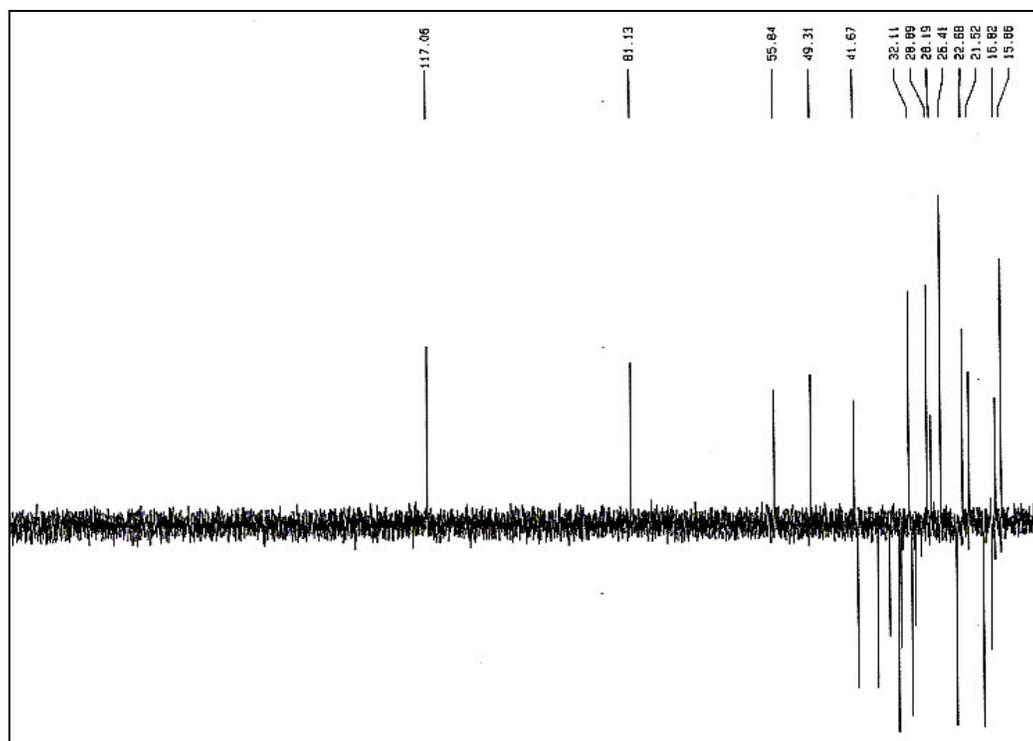


Figura 78 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de CR-2

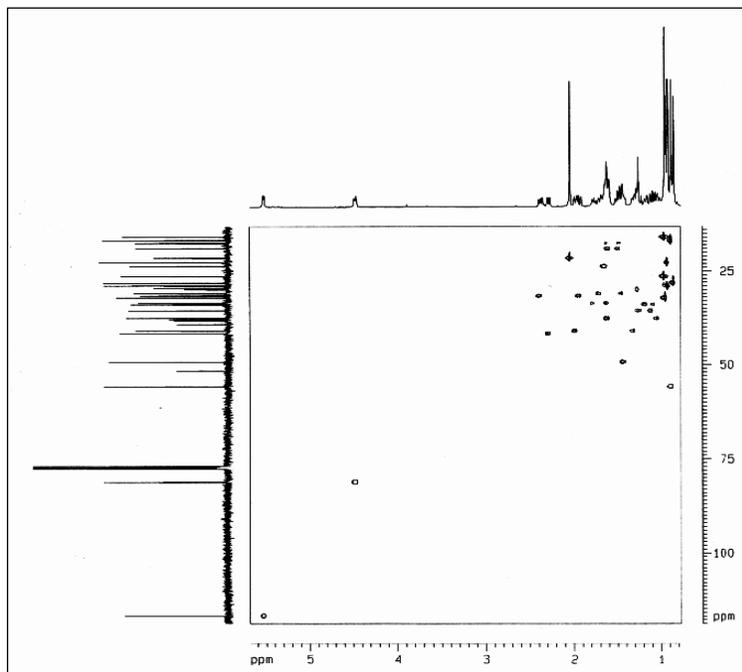


Figura 79 – Espectro de RMN bidimensional de $^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2

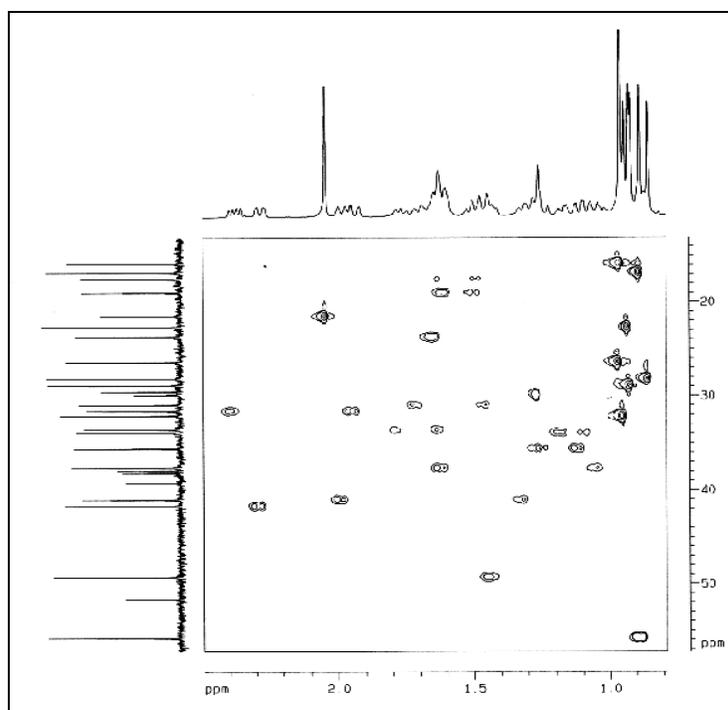


Figura 80 – Expansão (0,8 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional de $^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2

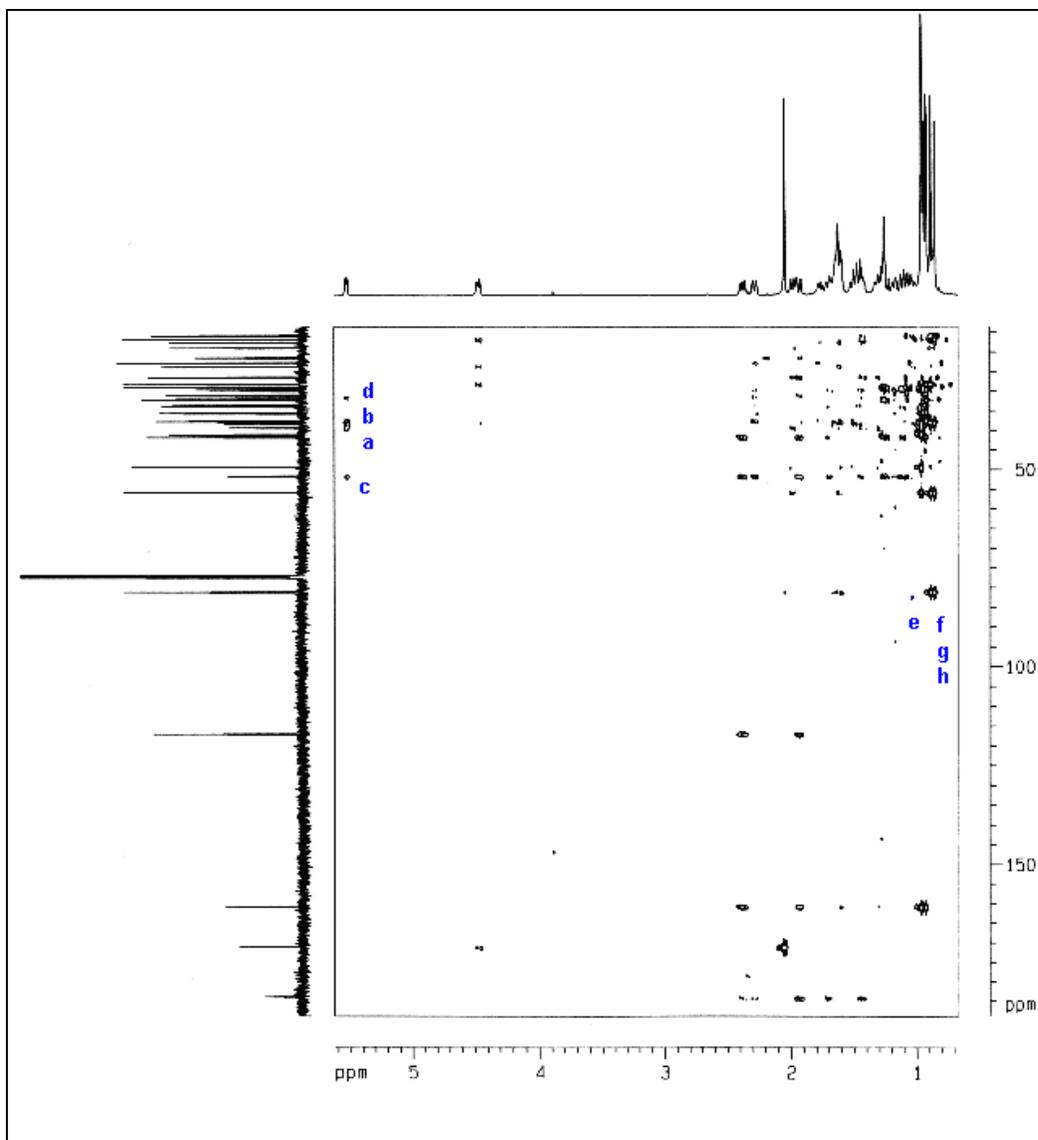
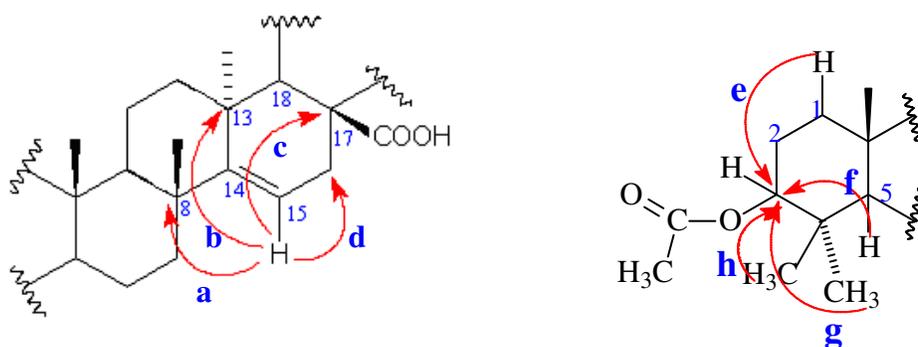


Figura 81 – Espectro de RMN bidimensional de ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2



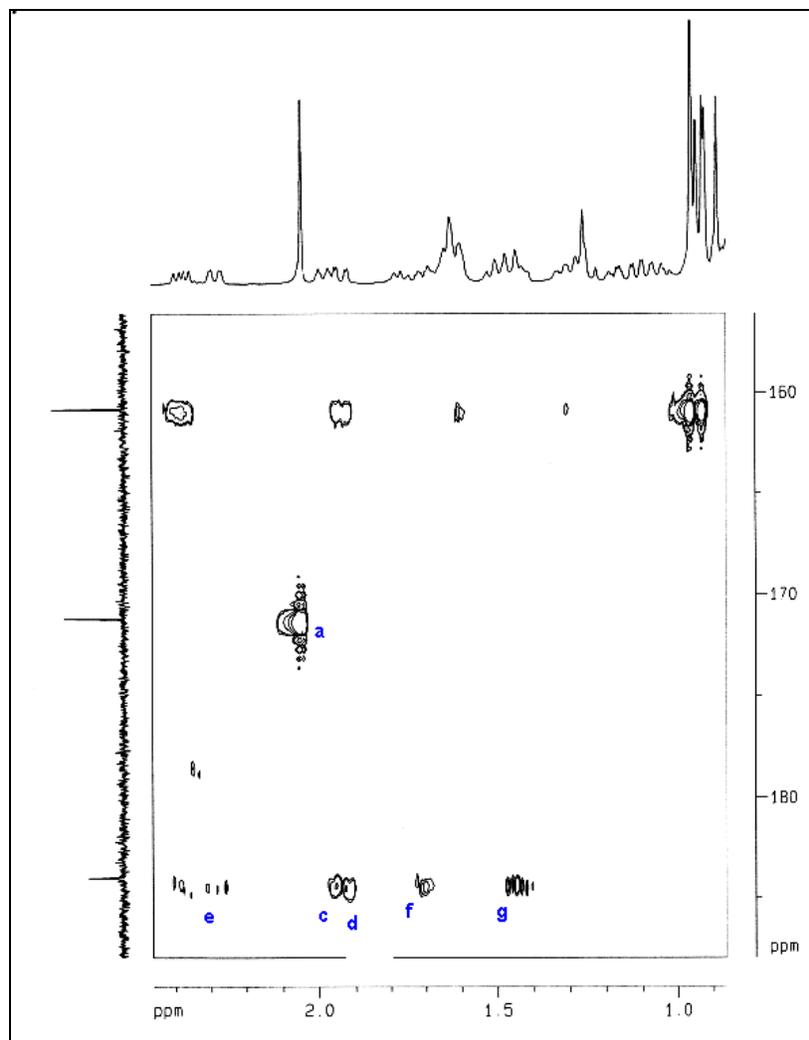
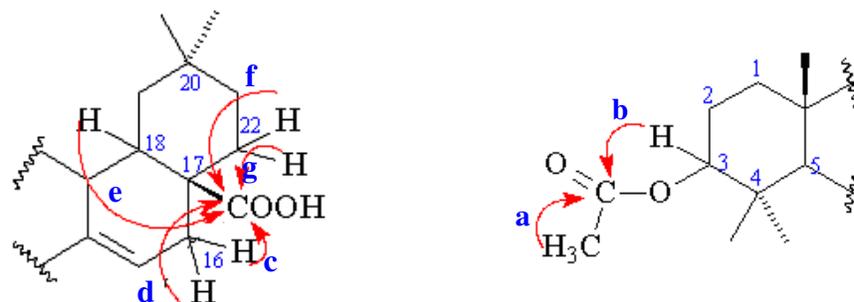


Figura 82 – Expansão (0,9 – 2,5 ppm) do espectro de RMN bidimensional de $^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-2



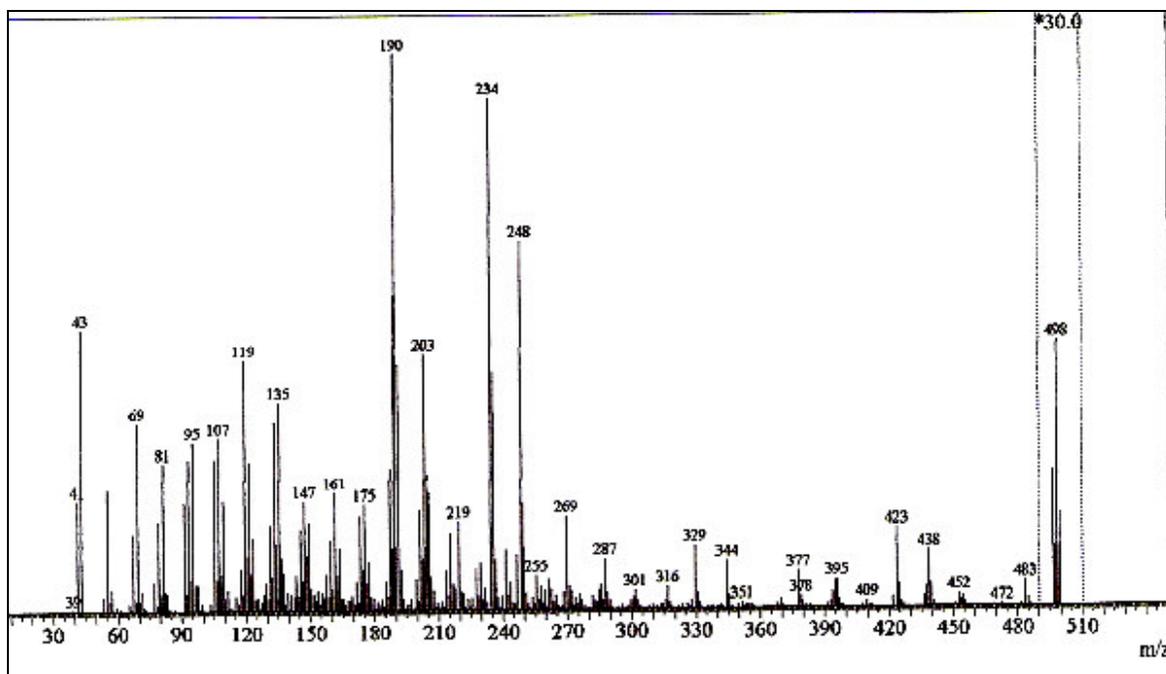


Figura 83 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-2

5.3 Determinação estrutural de CR-3

O fracionamento cromatográfico do tipo “flash” da fração hexânica CRRECCH seguida de cromatografia preparativa (p. 111) levou a obtenção de um óleo incolor denominado de CR-3.

A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-3 (Fig. 89 e 90, p. 69) mostrou claramente quatro singletos intensos em δ 0,93 (3H-20); 1,03 (3H-17); 1,06 (3H-19) e 1,09 (3H-18), que foram relacionados a grupos metilas ligados a carbonos quaternários. Dentre estes sinais, pôde-se concluir que os sinais em δ 1,09 (3H-18) e 1,06 (3H-19), estão relacionados a grupos metilas adjacentes a carbono oxigenado do tipo sp^2 . Foram observados ainda dois dubletos em δ 5,53 (d, $J = 5,7$ Hz, H-16) e 5,74 (d, $J = 5,7$ Hz, H-15), respectivamente, evidenciando a presença de dois hidrogênios olefínicos na estrutura.

Através da análise de espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 91, p. 70) foram observados 20 linhas espectrais, o que sugeriu uma estrutura diterpênica para CR-3. Dentre as absorções observadas, uma é referente a um carbono carbonílico em δ 217,7 (C-3) e, as outras em δ 134,7 (C-15) e 137,1 (C-16) foram correlacionadas a carbonos insaturados em uma dupla ligação dissustituída, em acordo com os valores observado no espectro de RMN ^1H .

O espectro de absorção no infravermelho (Fig. 95, p. 72) mostrou a presença de uma banda intensa em $1705,52\text{ cm}^{-1}$ referente a grupo carbonila. Verificou-se ainda bandas em $1450,63$ e $1384,67$ correspondentes a dupla ligação na molécula e várias bandas na região de 1200 a 950 cm^{-1} referentes a grupamentos metilênicos e metilas.

Tabela 9 – Deslocamentos químicos de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de CR-3 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH₂	CH₃	Total
217,7	137,2	61,1	26,4	
49,2	134,7	38,2	25,0	
47,8	56,1	37,0	22,1	
44,1	52,2	34,7	14,9	
37,0		33,2		
		21,3		
		20,7		
C ₅	C ₄ H ₄	C ₇ H ₁₄	C ₄ H ₁₂	
1 x O (Carbonila)				C ₂₀ H ₃₀ O

A partir dos dados obtidos pôde-se propor a fórmula molecular C₂₀H₃₀O, em acordo com o sinal do íon molecular no espectro de massa em m/z 286 (Fig. 95, p. 72). O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) com seis lacunas de insaturação, pode-se sugerir para CR-3, uma estrutura diterpênica tetracíclica com a presença de dois carbonos olefínicos na molécula e grupo carbonila.

Baseados nos valores dos deslocamentos químicos e multiplicidade dos grupamentos metilas e hidrogênio olefínicos no espectro de RMN ¹H, além de comparação com dados da literatura (Tab. 11, p. 68) foi possível sugerir a estrutura de um esqueleto diterpênico do tipo beiereno.

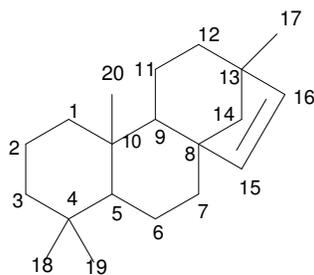


Figura 84– Estrutura básica de um diterpeno do tipo beiereno

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 92, p. 70) permitiu associar inequivocadamente os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na tabela 10 (p. 67).

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 93, p. 71), mostrou as correlações de ambos grupos metilas geminados em δ 1,09 (H-18) e 1,06 (H-19) com os carbonos em δ 47,84 (C-4) e 217,70 (C-3) (fig. 85.I), o que evidenciou a posição da função cetona em C-3. Tal sugestão foi confirmada pelos sinais relativos aos hidrogênios em δ 1,92 (H-1), 2,32 (H-2) e 2,57 (H-2) que também se correlacionam com o carbono carbonílico em δ 217,7 (C-3) (fig. 85.II).

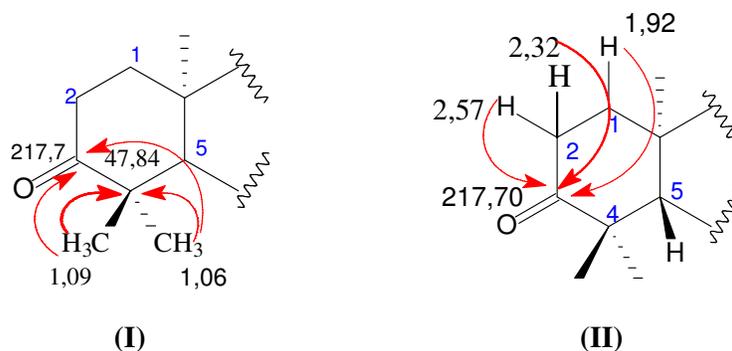


Figura 85 – Sub-estruturas I e II para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Em adição, foi observado também a correlação dos hidrogênios em δ 0,93 (H-17) e em δ 2,32 (H-2) com o carbono em δ 38,24 (C-10) (Fig. 86).

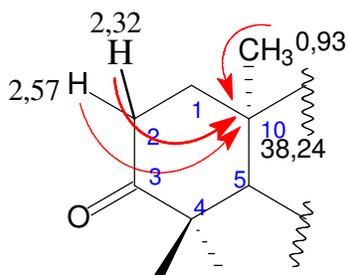


Figura 86 – Sub-estrutura III para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Ainda analisando este espectro pôde-se visualizar a correlação dos hidrogênios olefínicos em δ 5,74 (H-15) e 5,53 (H-16) com o carbono em δ 49,24 (C-8) (Fig. 87.IV) e com o carbono em δ 44,07 (C-13) (Fig. 87.V). O espectro apresenta ainda a correlação dos hidrogênios em δ 1,03 (H-17) com carbono em δ 44,07 (C-13) (Fig. 87.V).

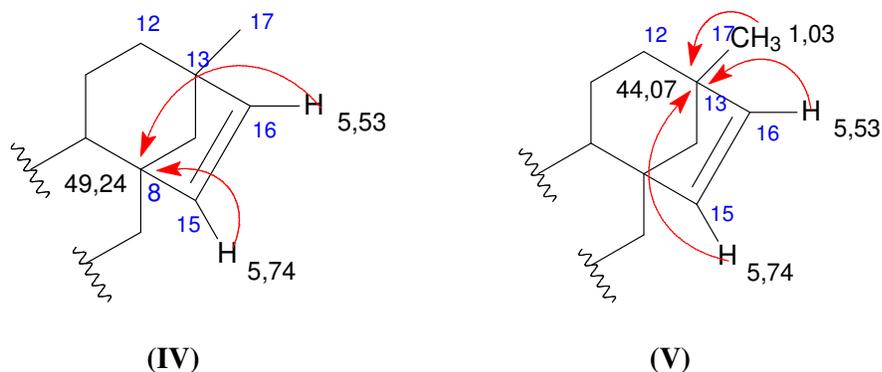


Figura 87 – Sub-estruturas IV e V para CR-3, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Diante de todos os dados espectroscópicos discutidos foi possível propor para CR-3 a estrutura de um diterpeno de esqueleto do tipo beiereno denominado Estachen-15-en-3-ona (Estachenona). Embora já isolado anteriormente em duas espécies do gênero *Excoecaria*, *E. agallocha* (KONISHI, 2000) e *E. parvifolia* (GRACE, 2007) da família *Euphorbiaceae*, este composto possui caráter inédito para o gênero *Croton*.

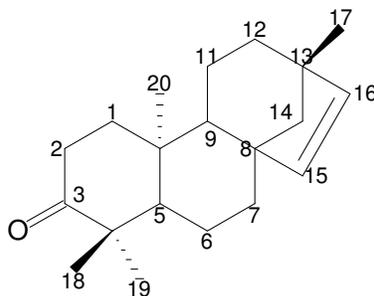


Figura 88 - Estrutura de CR-3: Estachenona

Tabela 10 – Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-3

# C	HSQC		HMBC		
	δC	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^4\text{J}_{\text{CH}}$
1	38,24	1,38 (t); 1,92	2,32; 2,57	—	—
2	34,69	2,32; 2,57	1,38	—	—
3	217,70	—	2,32; 2,57	1,92	—
4	47,84	—	1,06; 1,09	—	1,39; 1,38
5	56,10	1,34 (dd)	—	1,39; 1,70; 1,92	—
6	20,67	1,11	1,70	—	1,06; 1,09; 1,38; 1,92
7	37,01	1,39 (dd)	—	1,34	—
8	49,24	—	—	—	—
9	52,22	1,04 (t)	—	0,93	—
10	37,01	—	0,93	—	—
11	21,27	1,54 (dd)	1,04; 1,32	—	—
12	33,18	1,32 (dd)	1,54	1,03; 1,06; 5,53	—
13	44,07	—	1,03; 5,53	5,74	—
14	61,13	1,05 (s)	—	1,03; 1,04; 1,32; 5,53	—
15	134,74	5,74 (d)	5,53	1,04; 1,06; 1,39	—
16	137,17	5,53 (d)	5,74	1,03; 1,06; 1,32	—
17	25,04	1,03 (s)	—	1,06; 1,32; 5,53	—
18	26,42	1,09 (s)	—	1,06; 1,34	—
19	22,14	1,06 (s)	—	1,09; 1,34	—
20	14,95	0,93 (s)	—	1,04; 1,34; 1,38	—

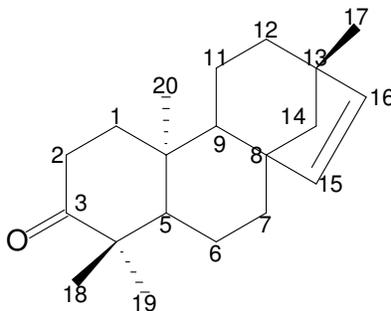
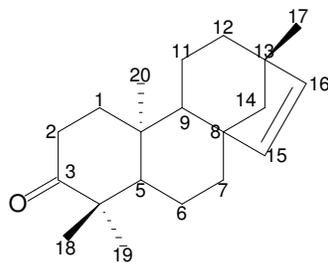


Tabela 11 - Análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C de CR-3 (125 MHz, CDCl_3) com a stachenona (125 MHz, CDCl_3) (GRACE, 2007)

# C	δ (CR-3)	δ (Stachenona)
1	38,24	38,1
2	34,69	34,6
3	217,70	217,9
4	47,84	47,9
5	56,10	56,0
6	20,67	20,6
7	37,01	36,9
8	49,24	48,9
9	52,22	52,1
10	38,24	37,0
11	21,27	21,2
12	33,18	33,1
13	44,07	43,9
14	61,13	61,1
15	134,74	134,7
16	137,17	137,1
17	25,04	25,0
18	26,42	26,3
19	22,14	22,1
20	14,95	14,7



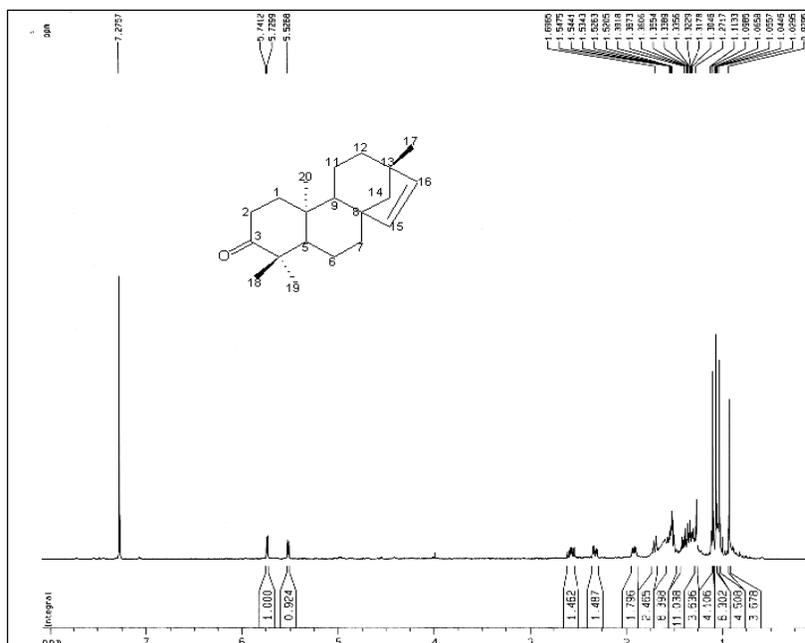


Figura 89 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-3

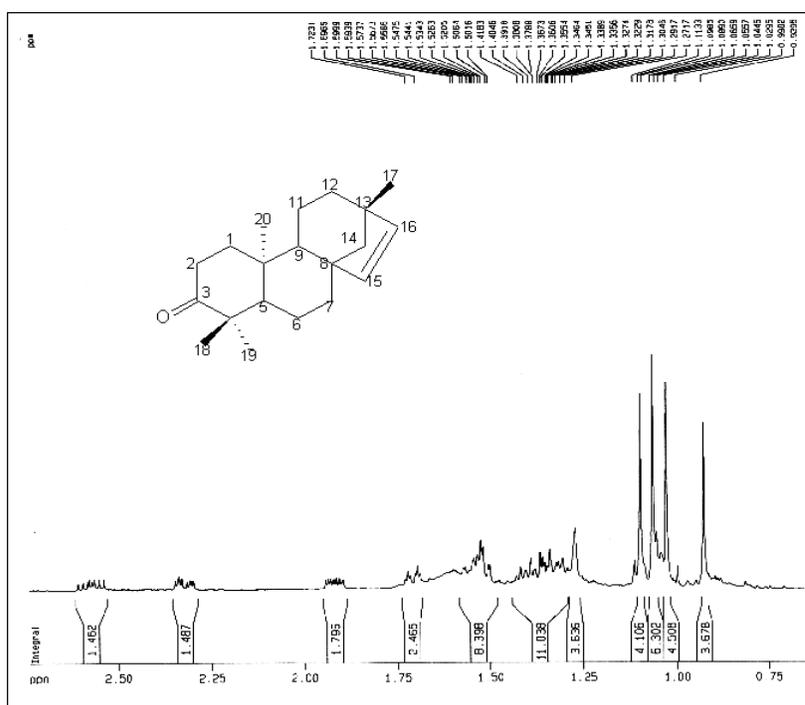


Figura 90 – Expansão (0,75 – 2,50 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CR-3

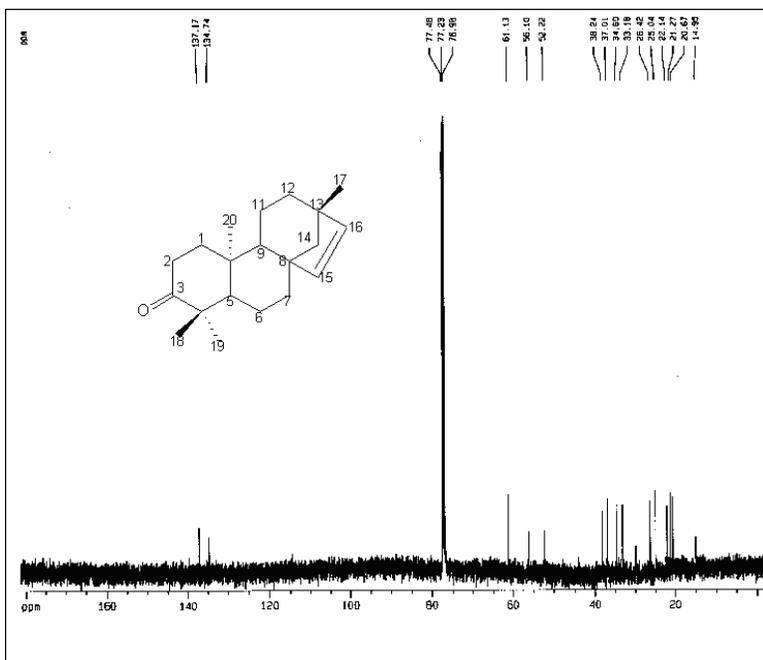


Figura 91 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, CDCl₃) de CR-3

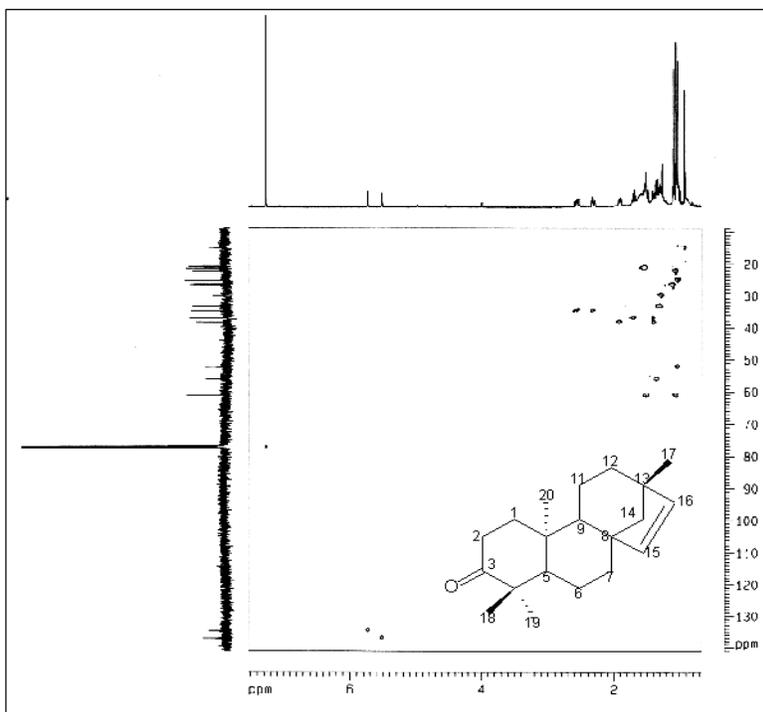


Figura 92 – Espectro de RMN ¹H ¹³C–HSQC (500 x 125 MHz, CDCl₃) de CR-3

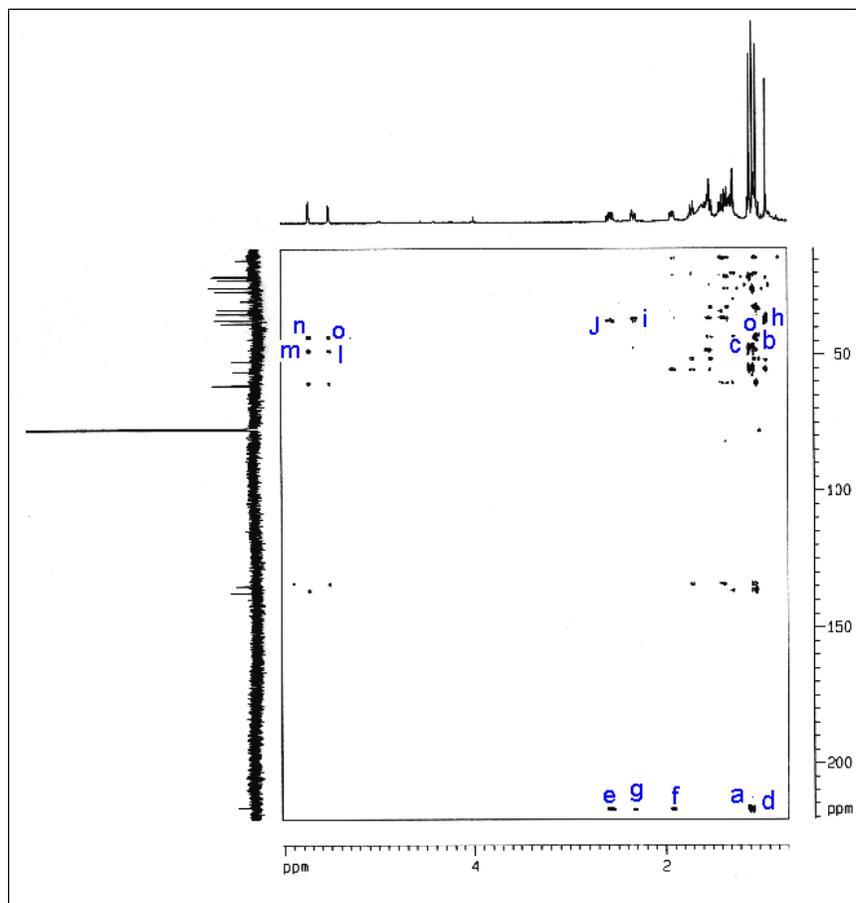
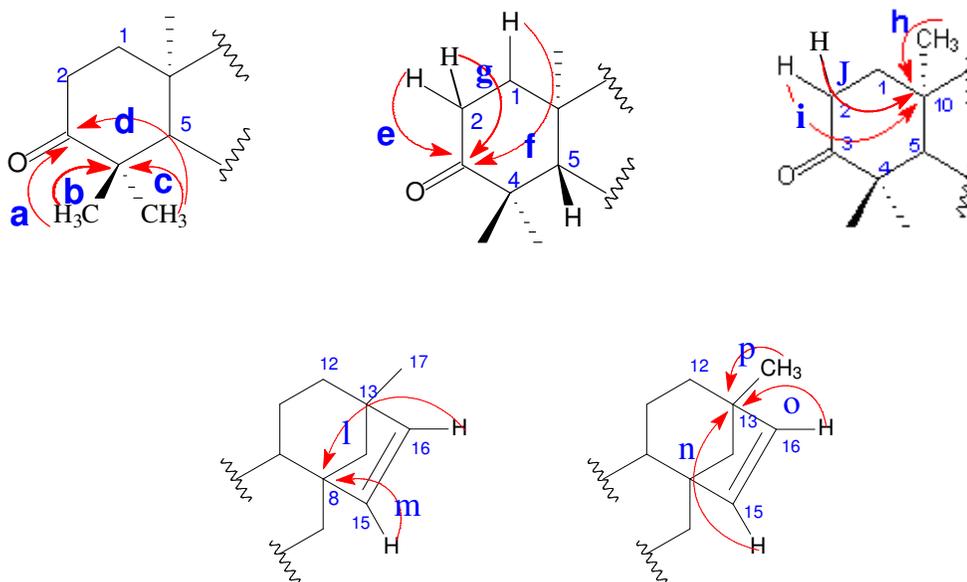


Figura 93 - Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CR-3



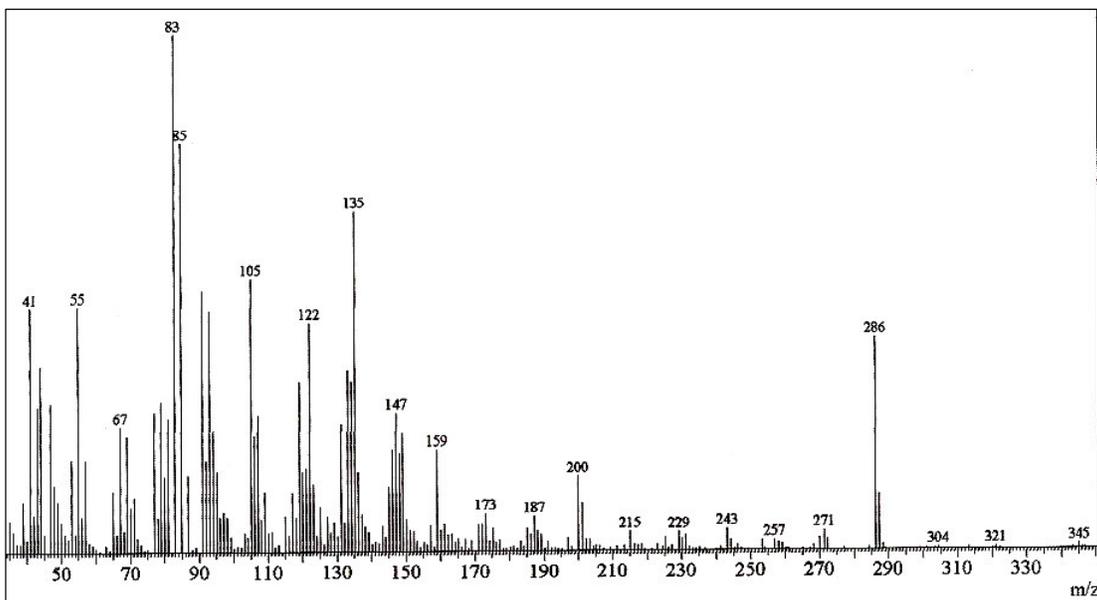


Figura 94 – Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-3

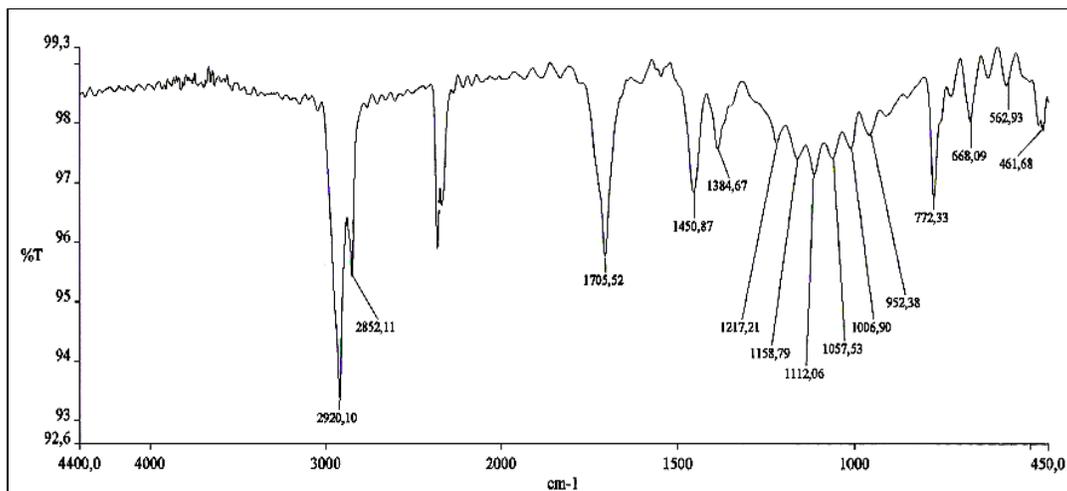


Figura 95 - Espectro de Infravermelho de CR-3 (pastilha de KBr)

5.4 Determinação estrutural de CR-4

A realização de dois fracionamentos cromatográficos em coluna do tipo “flash” da fração CRREH (p. 112), obtida a partir do extrato etanólico da raiz de *C. rhamnifolius*, permitiu o isolamento de um sólido em forma de agulhas, na faixa de fusão de 172,1 - 173,8 °C, que foi denominado de CR-4.

O espectro de RMN ^{13}C - BB (Fig. 99 e 100, p. 77) revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono, e indicou uma estrutura triterpênica para CR-4. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C - BB e RMN ^{13}C - DEPT 135°, (Fig. 99 e 101), possibilitou reconhecer sete carbonos metílicos (CH_3), onze metilênicos (CH_2), seis metínicos (CH), e seis carbonos não-hidrogenados (C). Baseado nestes dados, foi observado a presença de três sinais, um em δ 79,2 referente a um carbono metínico oxigenado, e dois sinais em δ 109,5 (CH_2) e 151,2 (C), referente a uma ligação dupla dissubstituída e terminal.

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de CR-4 por padrão de hidrogenação encontram-se listados na Tabela 12 (p. 74).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 97 e 98, p. 76), revelou seis singletos de metilas ligados a carbonos quaternários em δ 0,76 (CH_3 -24); 0,79 (CH_3 -28); 0,83 (CH_3 -25); 0,95 (CH_3 -27); 0,97 (CH_3 -23); 1,03 (CH_3 -26) e um singlete relativo a metila ligada a carbono insaturado em δ 1,68 (CH_3 -30). Pôde-se observar ainda neste espectro um sinal em δ 4,57 (dd, H-29, $J = 2,3$ Hz) e 4,69 (d, H-29, $J = 2,3$ Hz) caracterizando a ligação dupla terminal. Já o sinal de hidrogênio carbinólico em δ 3,20 (dd, H-3, $J = 5,03, 11,0$ Hz), definiu a substituição de C-3 por um grupo hidroxila, que foi disposto em β devido a magnitude das constantes de acoplamento do hidrogênio carbinólico H-3.

De acordo com os dados acima descritos e a posterior comparação com os dados descritos na literatura para triterpenos (Tab. 143, p. 75), foi possível sugerir para CR-4 a estrutura do triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano contendo uma insaturação entre os carbonos 20 e 29, denominado lupeol (Fig. 96, p. 74).

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de CR-4 por padrão de hidrogenação

C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
151,2	79,2	109,5	28,2	
43,2	55,5	40,2	19,5	
43,0	50,6	38,9	18,2	
41,0	48,5	35,8	16,3	
39,0	48,2	34,5	16,2	
37,4	38,3	30,0	15,5	
		27,6	14,7	
		27,6		
		25,3		
		21,1		
		18,5		
C ₆	C ₆ H ₆	C ₁₁ H ₂₂	C ₇ H ₂₁	
1 x OH				C ₃₀ H ₅₀ O

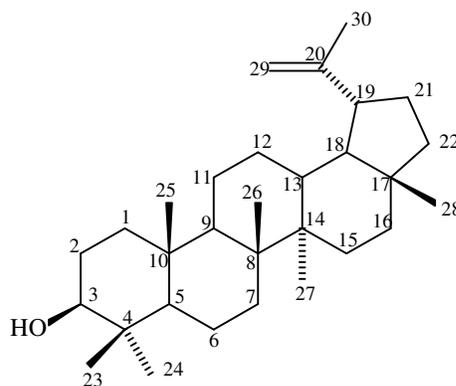


Figura 96 - Estrutura de CR-4: Lupeol

A literatura cita para o lupeol várias atividades antitumorais em células leucêmicas, em carcinomas broncopulmonares e células epiteliais, além das atividades nefrolítica, antiplasmodial e antiperoxidativa (TOLSTIKOVA, 2006).

Tabela 13 - Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -BB de CR-4 (125 MHz, CDCl_3) com os dados descritos na literatura para o Lupeol (125 MHz, CDCl_3 (MAHATO, 1994).

#C	δH (CR-4)	δC (CR-4)	δC (Lupeol)
1	1,64 (1H, m); 0,91 (1H, m)	38,9	38,7
2	1,60 (1H, m); 1,66 (1H, m)	27,6	27,4
3	3,20 (1H, dd, $J= 6,7 - 11,2$ Hz)	79,2	78,9
4	-	39,0	38,8
5	0,68 (1H, m)	55,5	55,5
6	1,39 (1H, m); 1,50 (1H, m)	18,5	18,3
7	1,34 (1H, m); 1,39 (1H, m)	34,5	34,3
8	-	41,0	40,8
9	1,29 (1H, m)	50,6	50,4
10	-	37,4	37,1
11	1,20 (1H, m); 1,37 (1H, m)	21,1	20,9
12	1,08 (1H, m); 1,66 (1H, m)	25,3	25,1
13	1,66 (1H, m)	38,3	38,0
14	-	43,0	42,8
15	0,97(1H, m); 1,66(1H, m)	27,6	27,4
16	1,37 (1H, m); 1,47 (1H, m)	35,8	35,5
17	-	43,2	43,0
18	1,37 (1H, m)	48,5	48,0
19	2,38 (1H, ddd, $J= 5,6-11,0-11,0$ Hz Hz)	48,2	47,9
20	-	151,2	150,9
21	1,37 (1H, m); 1,92 (1H, m)	30,0	29,8
22	1,37 (1H, m); 1,20 (1H, m)	40,2	40,0
23	0,97 (1H, m)	28,2	28,0
24	0,76 (3H, s)	15,5	15,4
25	0,83 (3H, s)	16,3	16,1
26	1,03 (3H, s)	16,2	15,9
27	0,95 (3H, s)	14,7	14,5
28	0,79 (3H, s)	18,2	18,0
29	4,57 (1H, s); 4,69 (1H, s)	109,5	109,3
30	1,68 (3H, s)	19,5	19,3

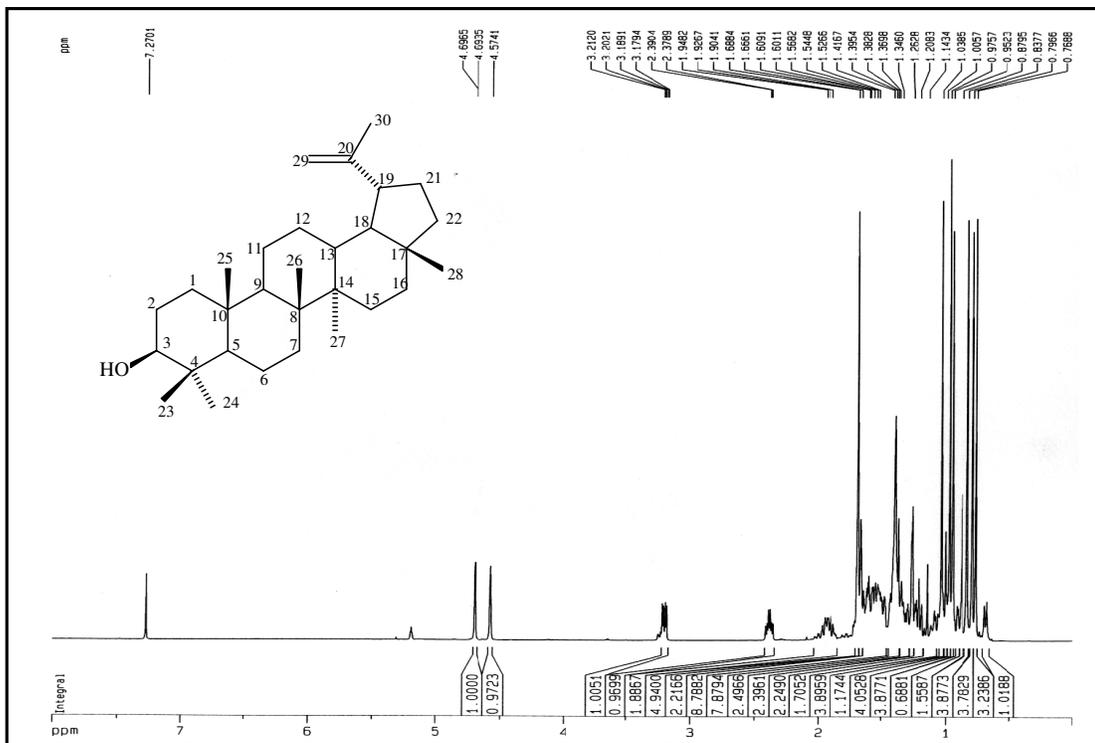


Figura 97 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CR- 4

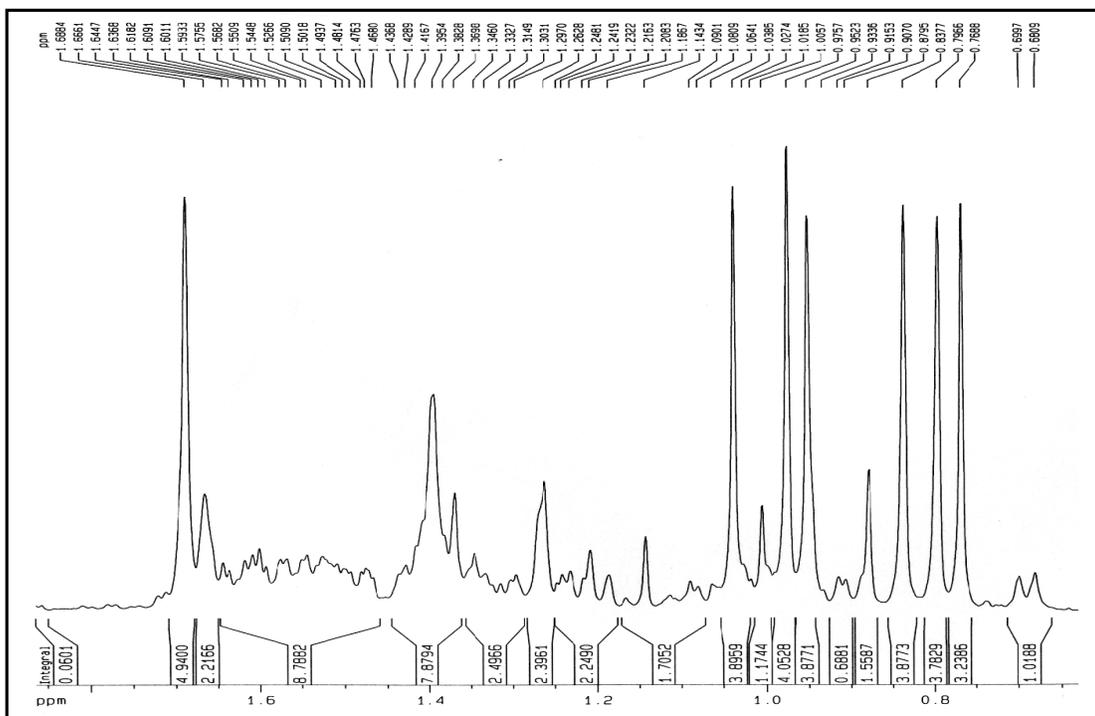


Figura 98 - Expansão (0,6 – 2,0 ppm) do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CR- 4

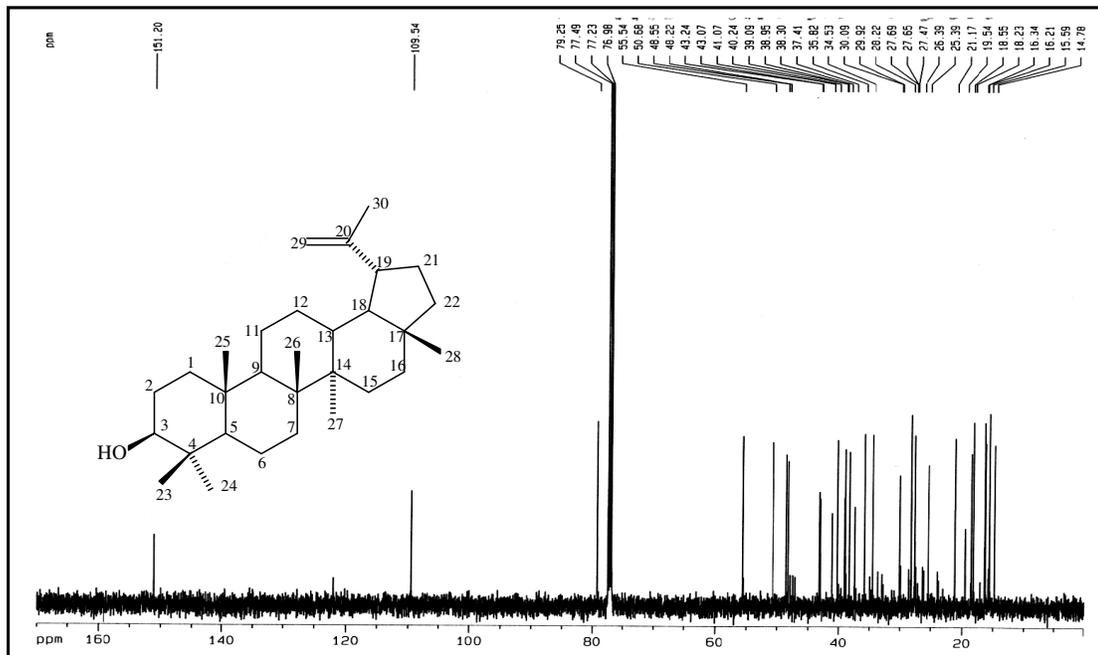


Figura 99 - Espectro RMN ¹³C-BB (125 MHz, CDCl₃) de CR- 4

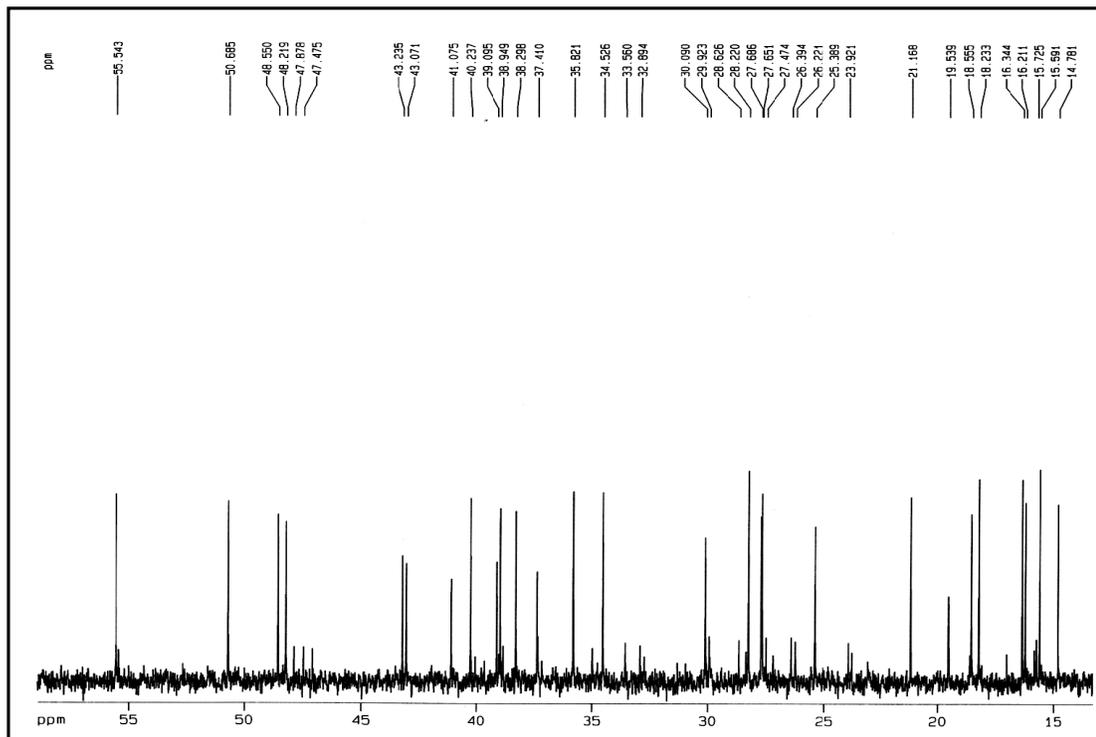


Figura 100 - Expansão do espectro RMN ¹³C-BB (125 MHz, CDCl₃) de CR- 4

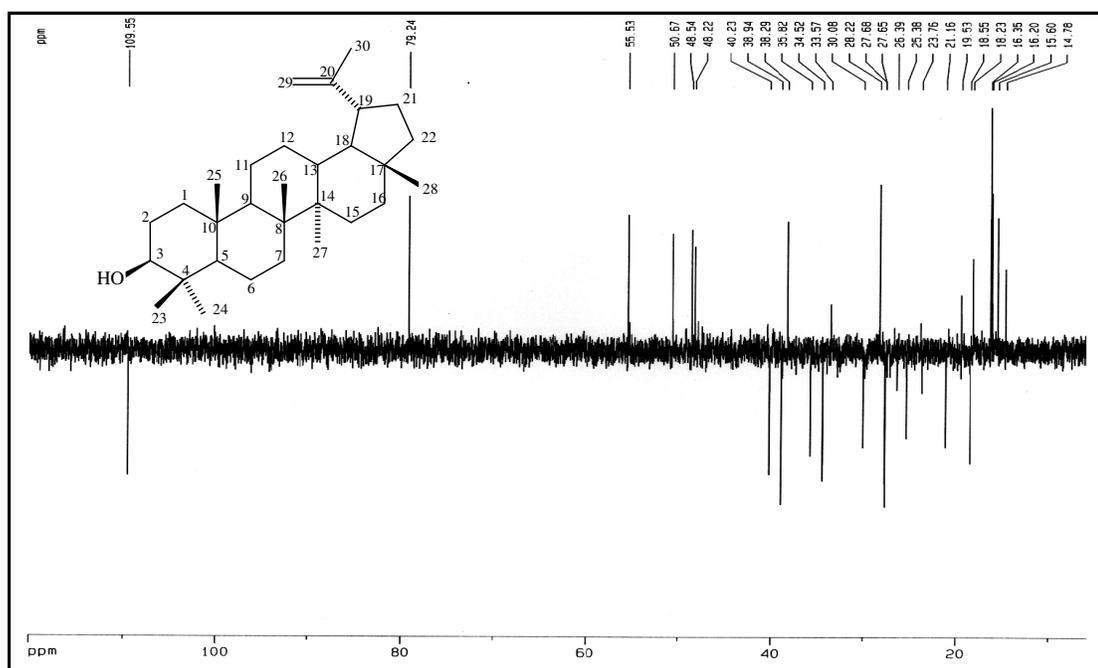


Figura 101 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de CR-4

5.5 Determinação estrutural de CR-5

O fracionamento cromatográfico do tipo “flash” da fração CRREHC originou 31 frações (p. 114). A fração CRREHC (31) foi recromatografada, obtendo-se a fração CRREHC (31)-(34-45) que foi submetida a uma nova cromatografia do tipo “flash”. A fração CRREHC (31)-(34-45)-(32-43) levou ao isolamento de CR-5 que se apresenta na forma de cristais brancos em forma de agulhas, que tem como faixa de fusão 88,1-90,6 °C.

A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5 (Fig. 106, p. 84) mostrou claramente quatro singletos intensos em δ 0,82 (3H-20); 1,01 (3H-18); 1,15 (3H-19) e 1,19 (3H-17), que foram relacionados a grupos metilas ligados a carbonos quartenários. Foram observados ainda dois dubletos em região de desproteção em δ 5,60 (d, $J = 5,5$ Hz, H-16) e 6,08 (d, $J = 5,5$ Hz, H-15), respectivamente, evidenciando a presença de dois hidrogênios olefínicos na estrutura. A comparação dos espectros de RMN ^1H de CR-3 e CR-5 baseados nos valores dos deslocamentos químicos e multiplicidades dos grupamentos metilas e hidrogênios olefínicos mostraram-se bastante semelhantes. Logo, a estrutura de um esqueleto diterpênico do tipo beiereno também foi proposta para CR-5 (Fig. 102).

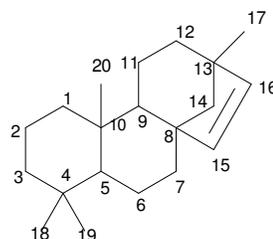


Figura 102 – Estrutura básica de um diterpeno do tipo beiereno

Através da análise de espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Fig. 107, p. 84) foram observados 20 linhas espectrais, o que confirmou a estrutura diterpênica para CR-5. Dentre as absorções observadas, duas são referentes a carbonos carbonílicos, uma em δ 210,52 (C-12) e outra em δ 215,50 (C-3). As absorções em δ 136,19 (C-16) e 139,79 (C-15) foram correlacionadas a

carbonos insaturados em uma dupla ligação dissustituída, em acordo com os valores observado no espectro de RMN ^1H .

O espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Fig. 108, p. 85) mostrou a presença de 4 grupos metilas, 6 grupos metilênicos e 4 grupos metínicos, que se encontram registrados na tabela 14.

Tabela 14 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
215,50	139,79	58,53	26,45	
210,52	136,19	37,39	22,06	
57,75	55,23	36,64	17,90	
49,66	54,42	36,23	13,68	
47,93		34,56		
36,64		21,36		
C ₆	C ₄ H ₄	C ₆ H ₁₂	C ₄ H ₁₂	
2 x O (Carbonila)				C ₂₀ H ₂₈ O ₂

A partir dos dados obtidos pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, em acordo com o sinal do íon molecular no espectro de massa em m/z 300 (Fig. 115, p. 90). O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) com sete lacunas de insaturação pode sugerir para CR-5, uma estrutura diterpênica tetracíclica com a presença de dois carbonos olefínicos na molécula e dois grupos carbonila.

O espectro de absorção no infravermelho (Fig. 116, p. 90) mostrou a presença de uma banda intensa em 1704,07 cm^{-1} referente a grupo carbonila. Verificou-se ainda bandas em 1458,63, 1380,77 e 1112,06 cm^{-1} correspondente a alcenos, e grupamentos metilênicos e metilas.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 109 e 110, p. 85 e 86) permitiu associar inequivocadamente os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na Tabela 15 (p. 83).

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Fig. 111 - 114, p. 86 - 89), mostrou as correlações de ambos grupos metilas geminados em δ 1,01 (H-18) e 1,15 (H-19) com os carbonos em δ 47,93 (C-4), 55,23 (C-5) e δ 215,50 (C-3) (fig. 103.I), o que evidenciou a posição da função cetona em C-3. A posição relativa do segundo grupo cetônico em δ 210,52 (C-12) foi confirmada através da correlação com o hidrogênio em δ 1,19 (H-17). Analisando o espectro pôde-se visualizar ainda a correlação dos hidrogênios olefínicos em δ 6,08 (H-15) e 5,60 (H-16) com o carbono em δ 58,53 (C-14), além do acoplamento do H-15 com o carbono em δ 5,60 (C-16) e do H-16 com os carbonos em δ 1,19 (C-17) e δ 6,08 (C-15) (Fig.103.II)

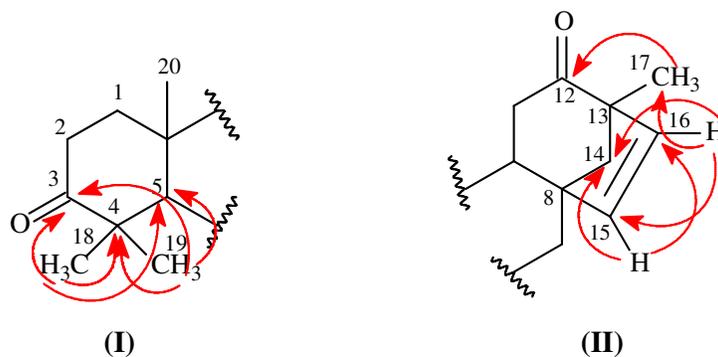


Figura 103 - Sub-estruturas I e II para CR-5, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Os acoplamentos referentes aos três hidrogênios em δ 0,82 (3H-20) com os carbonos em δ 37,39 (C-1); 55,23 (C-5); 54,42 (C-9) e confirmam o posicionamento do quarto grupo metila (Fig. 104)

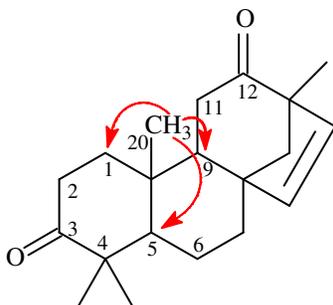


Figura 104 - Sub-estrutura III para CR-5, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro HMBC

Os dados de RMN ^{13}C obtidos para CR-5 mostram-se semelhantes quando comparados com o composto CR-3 (Tab. 15, p. 83), evidenciando o mesmo esqueleto beiereno, com a presença em CR-5 de um grupo carbonila no carbono 12.

A análise dos dados espectrométricos, aliados a comparação com dados obtidos na literatura possibilitou propor para CR-5, uma estrutura de um diterpeno beiereno, conhecido como 12-oxo-estachenona (Fig. 105). O levantamento bibliográfico realizado mostra que o composto apesar de já relatado na literatura, é inédito para *C. rhamnifolius*.

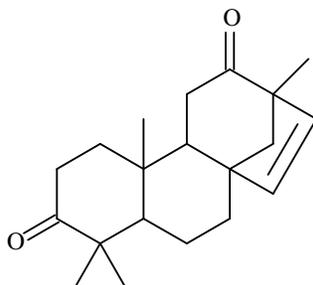


Figura 105 – Estrutura de CR-5: 12-oxo-estachenona

Tabela 15 – Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC e HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5 e análise comparativa dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C de CR-3 (125 MHz, CDCl_3) com CR-5.

# C	HSQC			HMBC		
	δC (CR-3)	δC (CR-5)	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^4\text{J}_{\text{CH}}$
1	38,24	37,39	1,6	2,33; 2,57	0,82; 1,28	—
2	34,69	34,56	2,57; 2,33	1,60	—	0,82; 1,28
3	217,70	215,50	—	2,57	—	1,01; 1,15
4	47,84	47,93	—	1,28; 1,15; 2,33	—	—
5	56,10	55,23	1,28	—	1,15; 1,01; 0,82	—
6	20,67	21,36	1,45	—	—	1,15
7	37,01	36,23	2,45; 2,58	—	1,28	—
8	49,24	49,66	—	1,78; 2,45	—	1,28
9	52,22	54,42	1,31	—	2,45; 1,78; 1,6; 0,82	—
10	38,24	36,64	—	—	—	—
11	21,27	36,64	1,26	—	—	0,82
12	33,18	210,52	—	—	1,19	—
13	44,07	57,75	1,31	1,78	—	—
14	61,13	58,53	1,78	—	6,08; 5,60	—
15	134,74	139,79	6,08	5,6	—	—
16	137,17	136,19	5,60	6,08	1,19	—
17	25,04	17,90	1,19	—	—	—
18	26,42	26,45	1,01	—	—	—
19	22,14	22,06	1,15	—	—	—
20	14,95	13,68	0,82	—	—	—

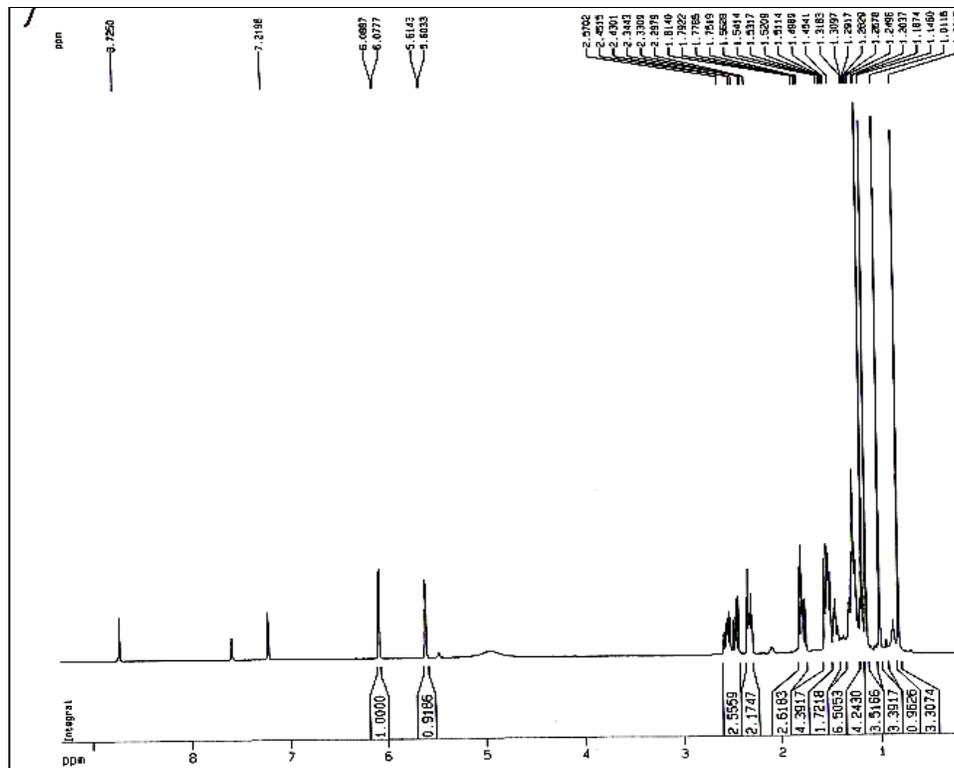


Figura 106 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de CR-5

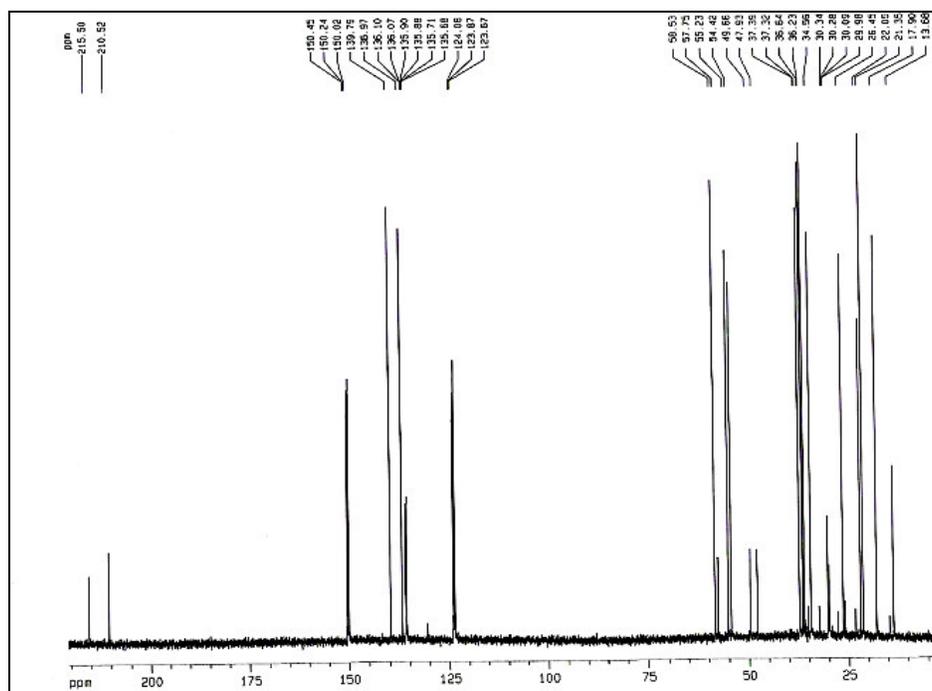


Figura 107 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, C₅D₅N) de CR-5

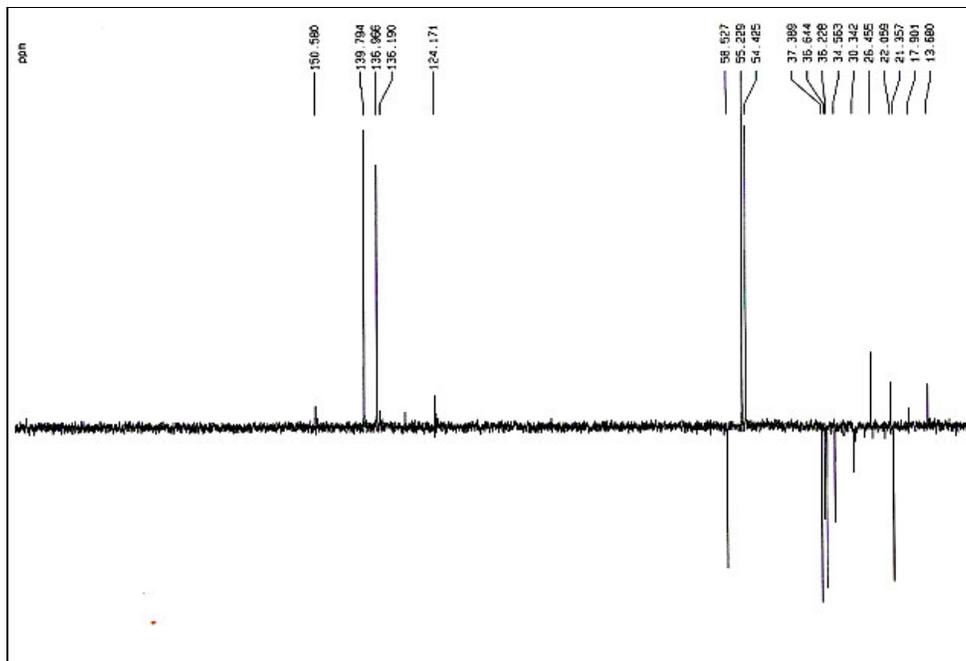


Figura 108 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5

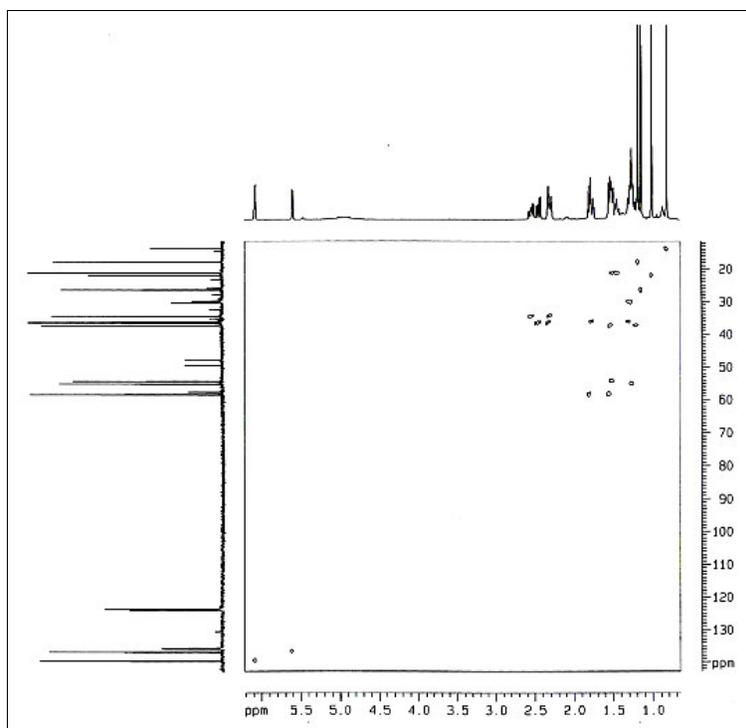


Figura 109 – Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5

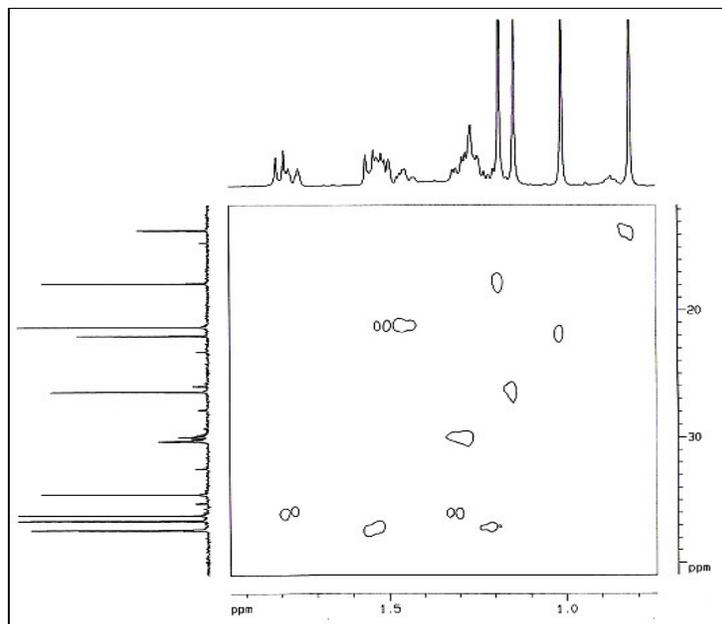


Figura 110 – Expansão (0,8 - 1,9 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5

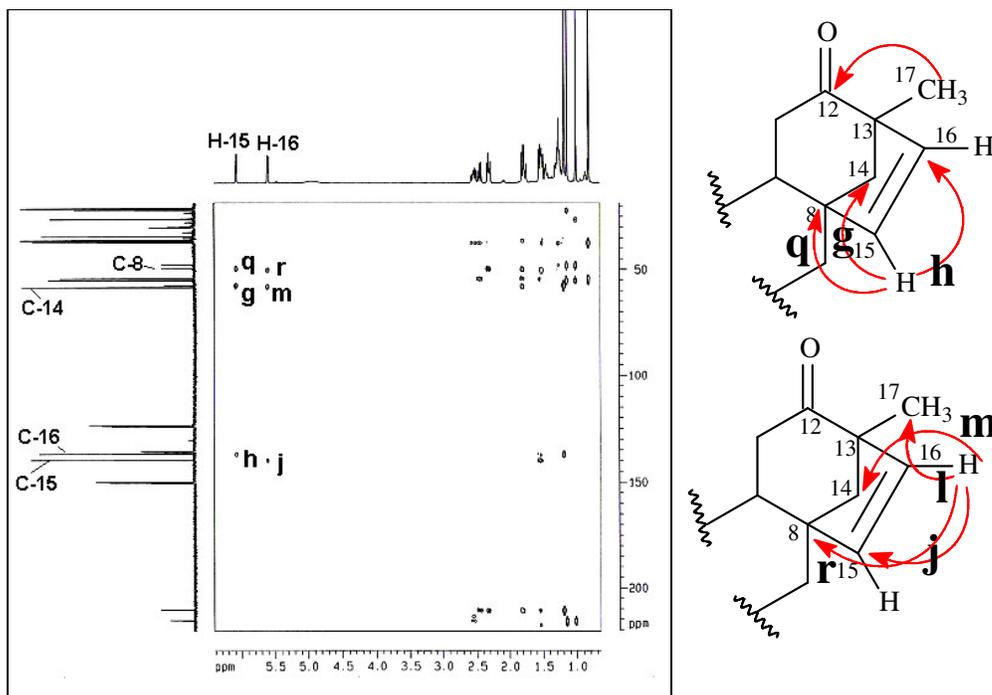


Figura 111 – Espectro de RMN bidimensional ^1H ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5

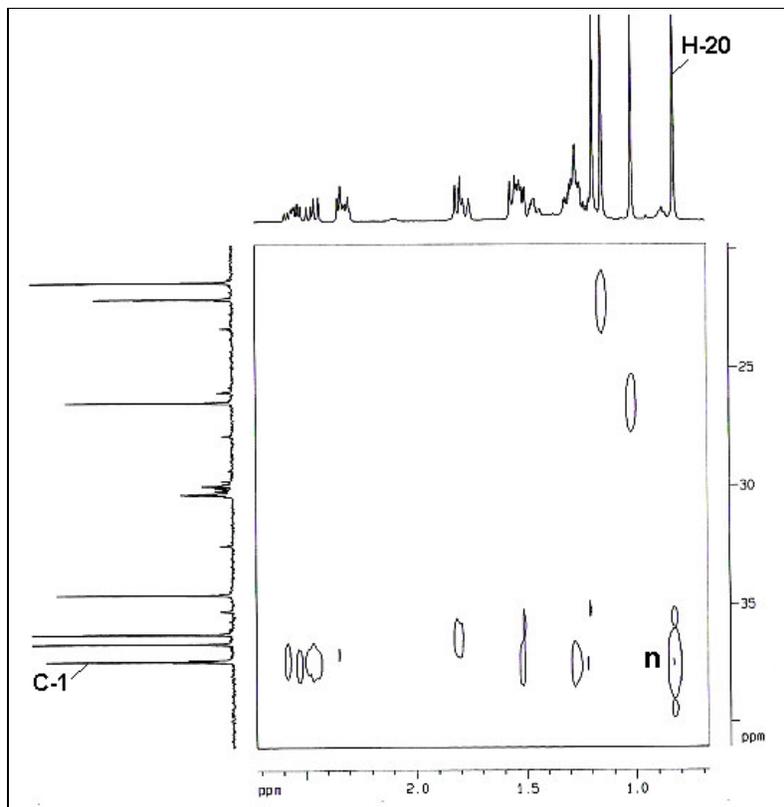
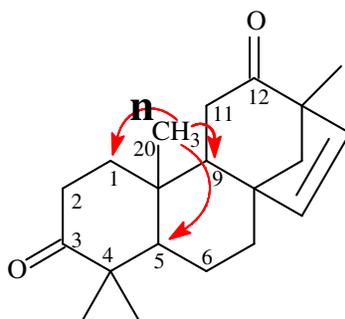


Figura 112 – Expansão (0,7 - 3,2 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5



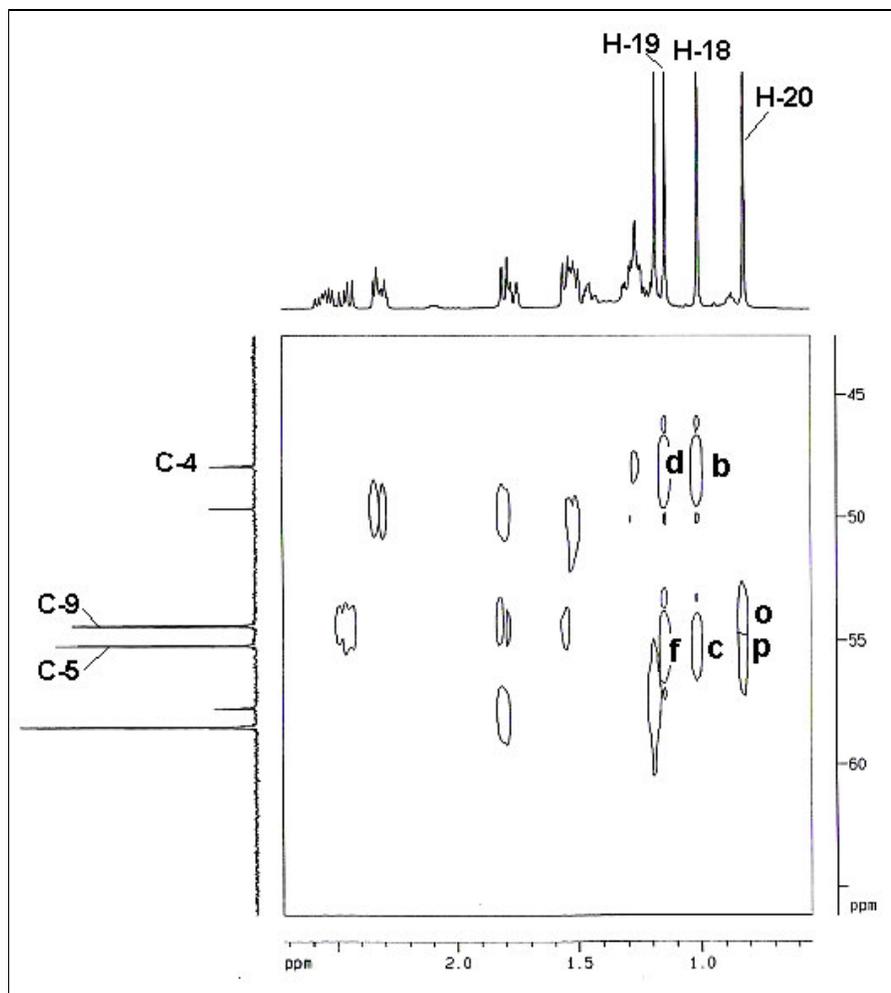
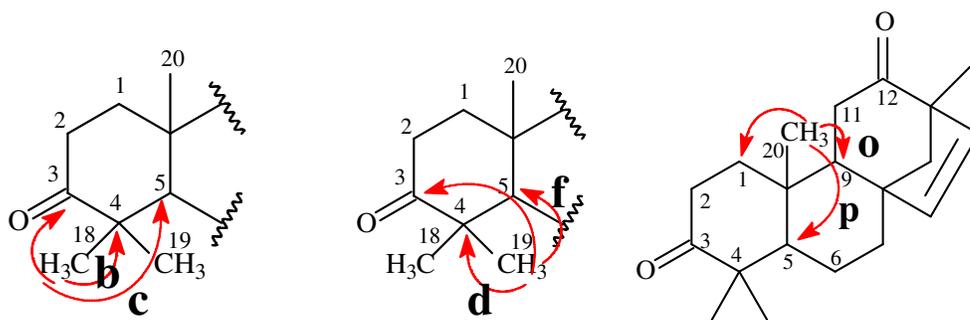


Figura 113 – Expansão (0,6 - 3,2 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5



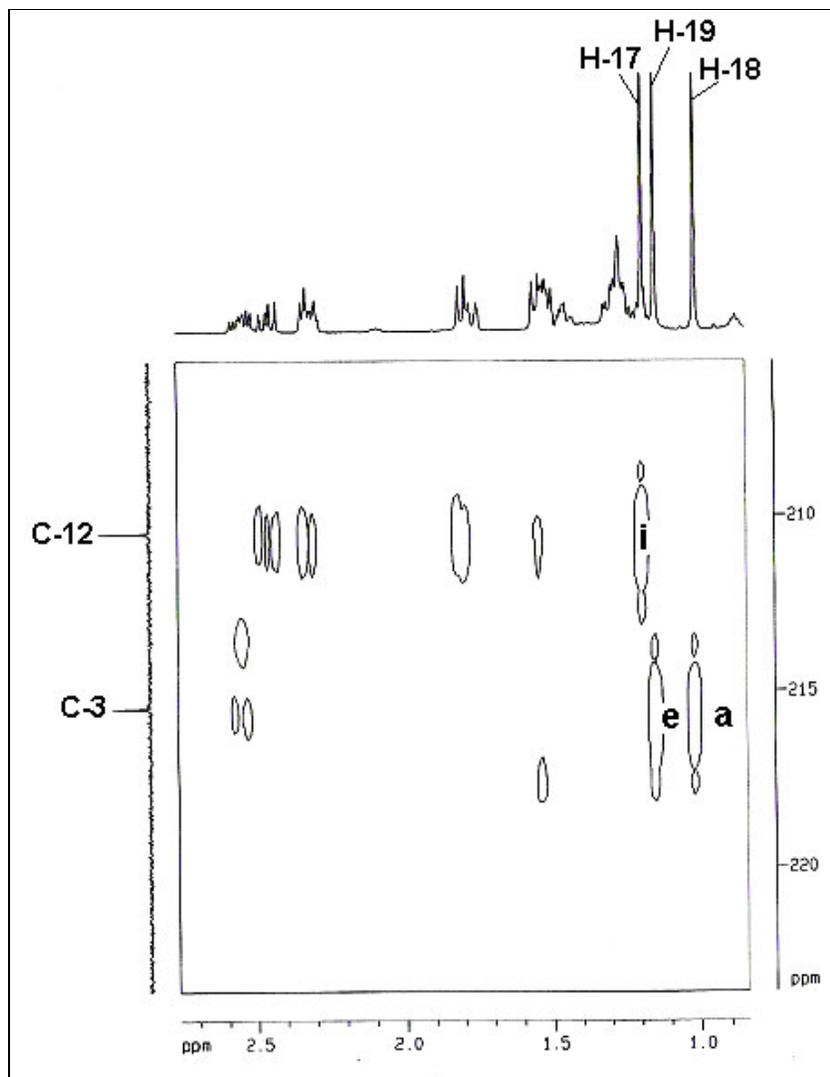
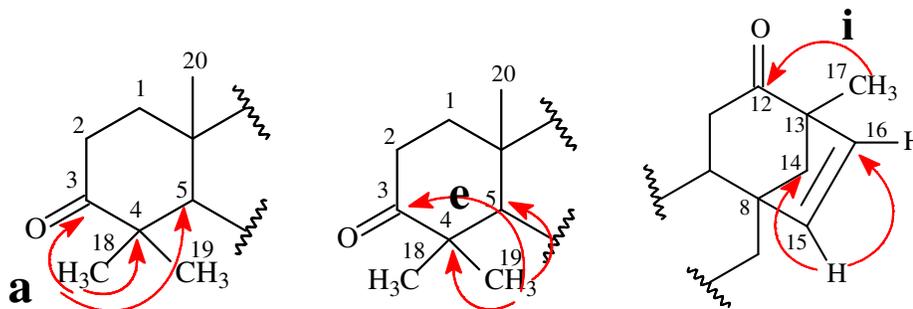


Figura 114 – Expansão (0,9-2,7 ppm) do espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CR-5



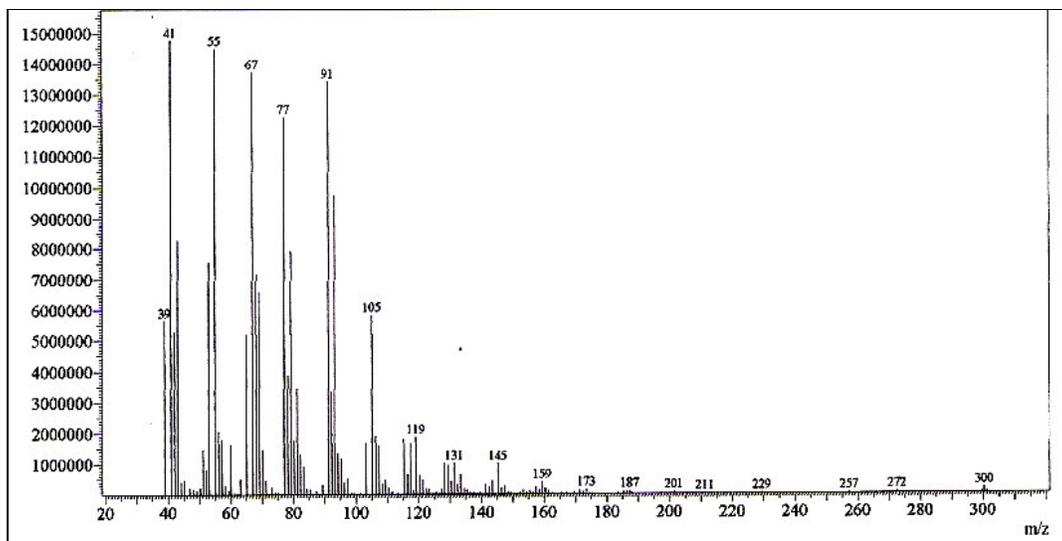


Figura 115 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de CR-5

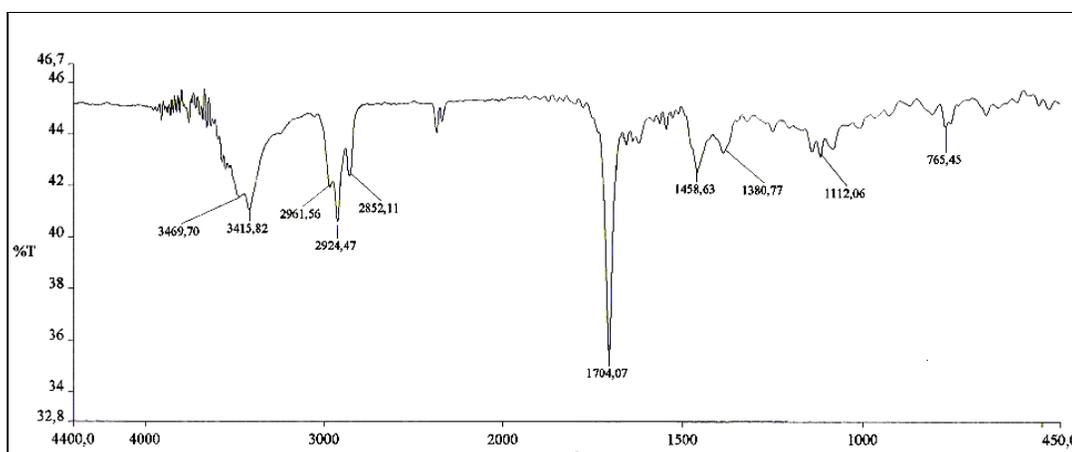


Figura 116 - Espectro de Infravermelho de CR-5 (KBr)

PARTE
EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

6.1.1. Cromatografia líquida em coluna aberta (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas utilizando sílica gel 60 (Φ μm 63 - 200) como fase estacionária. O diâmetro e o comprimento da coluna variaram de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia.

6.1.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 (Φ μm 2 - 25) sobre alumínio, da Merck (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). As placas preparativas foram preparadas no laboratório, utilizando-se placas de vidro de dimensões 20 x 20 cm com gel de sílica 60 (Φ μm 2 - 25).

A revelação das substâncias nas placas analíticas de sílica, foi realizada por exposição à irradiação na faixa do ultravioleta (UV) em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F com dois comprimentos de onda (254 nm e 366 nm), por contato de vapores de iodo (I_2), por pulverização com revelador Dragendorff, e por aspersão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) em ácido perclórico (HClO_4) e etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), seguida de aquecimento em chapa elétrica a 120°C por aproximadamente 3 minutos.

6.1.3. Cromatografia líquida em Coluna sob Pressão (“Flash”)

Para cromatografias de adsorção em coluna do tipo “flash” utilizou-se gel de sílica 60 (Φ μm 40-63), da Merck e da Vetec. O diâmetro e o comprimento da coluna variaram de acordo com as quantidades de adsorventes utilizadas. Utilizou-

se para realizar a eluição sob pressão, um sistema adaptado com uma bomba compressora de ar típica dos aparelhos hospitalares para aplicação de aerosol.

Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano (H), diclorometano (D), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M), puros ou combinados em proporções de modo a obter um gradiente crescente de polaridade. Os solventes utilizados possuíam um grau de qualidade PA. Os eluentes utilizados nos tratamentos por cromatografia de adsorção sobre pressão foram escolhidos após análise prévia das frações por CCD, a fim de permitir ao constituinte desejado (ou aquele de menor Rf) apresentar Rf próximo de 0,3.

6.2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

6.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótio (^1H) e de Carbono-13 (^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Ressonância Magnética de Carbono-13 (^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 ou modelo Avance DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e 500,13 MHz, e na frequência do carbono a 75,47 MHz a 125,75 MHz, respectivamente.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e piridina d_5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pela Norell, Merck e Aldrich. A multiplicidade das absorções foi indicada segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo dublete), t (triplete), ddd (duplo dublete dublete), hep (hepteto) e m (multiplete).

Os deslocamentos químicos foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27 ppm), metanol (δ 3,31 ppm), piridina (δ 7,22; 7,58; 8,74). Nos espectros de carbono-13 deuterados, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos - 13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,2 ppm), metanol (δ 49,1 ppm) e piridina (δ 123,8; 135,91; 150,35 ppm).

6.2.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) e com Detecção por Ionização em Chama (CG/DIC)

Os espectros de massa dos óleos essenciais e dos compostos isolados foram obtidos em um Espectrômetro de Massa Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50 através de impacto eletrônico a 70 eV (DQOI/UFC) A, acoplado a um cromatógrafo Gás-Líquido modelo HP A série II (CGL/EM), provido de coluna capilar DB-5 (5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano) com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,1 μm . A razão de aquecimento do injetor foi de 35-180 $^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e 180 $^{\circ}\text{C}/35^{\circ}\text{C}/\text{min}$, utilizando hélio como gás de arraste. A análise CGL/DIC foi efetuado em um cromatógrafo Shimadzu GC-17^a equipado com detector FID, usando coluna capilar DB-5 com 30,0 m x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm , utilizando razão de aquecimento do injetor de 35-180 $^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e 180-280 $^{\circ}\text{C}/17^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e hidrogênio como gás de arraste.

6.2.3. Ponto de fusão (p.f.)

Os pontos de fusão foram determinados em um equipamento de microdeterminação Meter, com placa aquecedora modelo FP 90, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas com gradiente de aquecimento de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

6.2.4. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC), utilizando pastilhas de KBR para análise das amostras.

6.3. ESTUDOS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS, TALOS E RAÍZES DE *C. rhamnifolius*

6.3.1. Coleta do material vegetal

As folhas e talos de *Croton rhamnifolius*, foram coletados na cidade de Salgueiro-PE em março de 2007, pelo professor Edilberto Rocha Silveira, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

6.3.2. Obtenção do óleo essencial por hidrodestilação

A obtenção dos óleos essenciais das folhas, talos e raízes de *Croton rhamnifolius* foi realizada através da técnica de hidrodestilação utilizando um aparelho doseador do tipo clevenger.

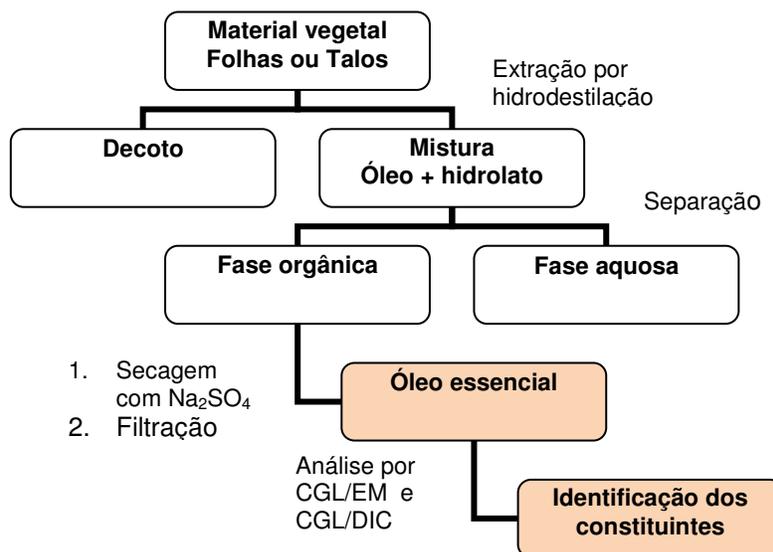
645,0 g de folhas de *Croton rhamnifolius* foram acondicionados em um balão de 5,0 L com adição de 1L de água destilada. Foram realizadas duas extrações, utilizando um total de 1,1 Kg de material de partida. Após 2,5 h de refluxo, a mistura óleo/água foi separada no doseador. Para cada extração os óleos essenciais foram secos com sulfato de sódio anidro e filtrados, resultando em um total de 1,94 g de um óleo amarelo claro denominado de OEFCR (rendimento de 0,18%). Seguindo o mesmo procedimento descrito para a extração do óleo essencial das folhas, 1,375 Kg dos talos moídos de *Croton rhamnifolius*

foram acondicionados em um balão de 5,0 L contendo 1,5 L de água destilada. Ao final de 2,5 h de refluxo, obteve-se 3,0 g de um óleo com coloração verde clara, denominado OETCR (Rendimento de 0,22%). 1,13 Kg das raízes foram submetidas ao mesmo procedimento anterior. Após tratamento da fase orgânica com sulfato de sódio anidro foi obtido 2,28 g (0,20 % de rendimento) de óleo com coloração amarelo claro, denominado OERCR.

6.3.3. Métodos de análise

Os óleos essenciais extraídos das folhas, talos e raízes de *C. rhamnifolius* foram analisados por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL/EM). A análise quantitativa foi realizada através de cromatografia gás-líquido acoplada a detector por ionização em chama (CGL/DIC). A identificação dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial foi efetuada através da determinação do índice de Kovats simulados, pesquisa em espectoteca e comparação com dados da literatura (ADAMS, 2001). Os resultados relativos à composição química do óleo essencial encontram-se disponíveis na tabela 2 (p. 19). O fluxograma abaixo mostra as etapas para extração de óleo essencial.

Fluxograma 1 – Método de extração do óleo essencial das folhas, talos e raízes de *C. rhamnifolius*



6.4. TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR DAS RAÍZES, CAULES, TALOS E FOLHAS DE *C. rhamnifolius*

6.4.1. MATERIAL VEGETAL

As raízes, caules, talos e folhas da espécie *Croton rhamnifolius* foram coletadas nas localidades de Salgueiro – PE em janeiro de 2006, pelo professor Edilberto Rocha Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica foi realizada pelo professor Edson de Paula Nunes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As exsicatas encontram-se armazenadas no Herbário Prisco Bezerra, no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

100,0 g de cada parte da planta triturados foram acondicionados separadamente em um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de hexano por 3 dias. Para cada parte da planta foram realizadas duas extrações. Após evaporação do solvente em rotovaporador rotativo sob pressão reduzida, obteve-se os extratos que se encontram listados na tabela 16.

Tabela 16 – Rendimentos obtidos da extração hexânica de *C. rhamnifolius*

Partes da planta	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Raiz	CRRH	Óleo marrom	0,69
Caule	CRCH	Óleo marrom claro	0,42
Talo	CRTH	Óleo marrom	0,70
Folhas	CRFH	Óleo esverdeado	1,35
Total			3,16

A partir dos resíduos obtidos após a extração com hexano, foram preparados os extratos etanólicos, adicionando cerca de 200 mL de etanol bruto para cada resíduo resultante. Para cada extrato também foram realizadas duas extrações seguidas destilação do solvente sob pressão reduzida, levando à obtenção dos resultados mostrados na tabela 17.

Tabela 17 – Rendimentos obtidos da extração etanólica de *C. rhamnifolius*

Partes da planta	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Raiz	CRRE	Óleo marrom	2,72
Caule	CRCE	Óleo marrom claro	2,47
Talos	CRTE	Óleo marrom	5,03
Folhas	CRFE	Óleo esverdeado	11
Total			21,22

Foram realizadas cromatografias em colunas filtrantes preliminares a partir das frações obtidas, a fim de verificar a parte da planta que apresentaria melhores resultados para iniciar seu estudo fitoquímico. Abaixo se encontra o fracionamento cromatográfico realizado durante a triagem fitoquímica da espécie em estudo.

6.4.2. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRRE

A fração CRRE (2,72 g) foi adsorvida em 3,71 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta 30 mm de diâmetro contendo 12g de sílica gel. A amostra foi eluída com 200 mL de hexano, 200 mL de clorofórmio, 300 mL de acetato de etila e 300 mL de metanol, respectivamente, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 18 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRE

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRRE-H	Óleo esverdeado	0,05
Clorofórmio	CRRE-C	Óleo marrom escuro viscoso	0,56
Acetato de etila	CRRE-A	Óleo marrom	0,41
Metanol	CRRE-M	II	1,41
Total			2,43

6.4.3. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRCE

A fração CRCE (2,47g) foi adsorvida em 3,55 g de sílica gel 60 e empacotada em uma coluna aberta de 30 mm de diâmetro contendo com 12 g de sílica gel. A amostra foi eluída com 200 mL de hexano, 200 mL de clorofórmio, 300mL de acetato de etila e 350mL de metanol, respectivamente, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 19 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRCE

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRCE-H	Óleo esverdeado	0,01
Clorofórmio	CRCE-C	Óleo marrom	0,51
Acetato de etila	CRCE-A	II	0,40
Metanol	CRCE-M	II	1,14
Total			2,06

6.4.4. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRTE

A fração CRTE (5,03 g) foi adsorvida em 6,73 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta de 35mm de diâmetro empacotada com 18g

de sílica gel. A amostra foi eluída com 150 mL de hexano, 250 mL de clorofórmio, 125 mL de acetato de etila e 150 mL de metanol, respectivamente, obtendo-se os resultados listados abaixo (Tab. 20).

Tabela 20 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRTE

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRTE-H	—	0
Clorofórmio	CRTE-C	Óleo marrom	0,38
Acetato de etila	CRTE-A	II	0,53
Metanol	CRTE-M	II	1,96
Total			2,87

6.4.5. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRFE

A fração CRFE (11,0 g) foi adsorvida em 14,43 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta de 40 mm de diâmetro empacotada com 31,0 g de sílica gel. Utilizou-se como eluente, 150 mL de hexano, 600 mL de clorofórmio, 350 mL de acetato de etila e 200 mL de metanol, obtendo-se as seguintes frações:

Tabela 21 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRFE

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRFE-H	Óleo esverdeado	0,02
Clorofórmio	CRFE-C	Óleo marrom	0,93
Acetato de etila	CRFE-A	II	0,42
Metanol	CRFE-M	II	7,46
Total			8,83

6.4.6. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRRH

A fração CRRH (690 mg) foi adsorvida em 0,854 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta de 20 mm de diâmetro empacotada com 13,0g de sílica gel. A amostra foi eluída com 250 mL de hexano, 300 mL de clorofórmio, 300 mL de acetato de etila e 200 mL de metanol, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 22 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRRH

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRRH-H	Óleo marrom claro	0,04
Clorofórmio	CRRH-C	Óleo marrom	0,42
Acetato de etila	CRRH-A	II	0,18
Metanol	CRRH-M	II	0,04
Total			0,68

6.4.7. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRTH

A fração CRTH (700 mg) foi adsorvida em 1,67 g de sílica gel 60 em grau de porcelana e posteriormente acondicionada em uma coluna aberta de 30 mm de diâmetro empacotada com 12g de sílica gel. A amostra foi eluída com 250 mL de hexano, 300 mL de clorofórmio, 300 mL de acetato de etila e 200 mL de metanol, respectivamente, obtendo-se os resultados listados na tabela abaixo.

Tabela 23 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRTH

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRTH-H	Óleo esverdeado	0,02
Clorofórmio	CRTH-C	Óleo marrom claro	0,41
Acetato de etila	CRTH-A	Óleo marrom	0,16
Metanol	CRTH-M	II	0,06
Total			0,65

6.4.8. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRCH

A fração CRCH (430 mg) foi adsorvida em 1,51 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta de 30 mm de diâmetro empacotada com 11,0 g de sílica gel. O eluente utilizado na cromatografia foi 350 mL de hexano, 250 mL de clorofórmio, 200 mL de acetato de etila e 150 mL de metanol, originando os seguintes resultados:

Tabela 24 – Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRCH

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRCH-H	Óleo esverdeado	0,07
Clorofórmio	CRCH-C	Óleo marrom	0,42
Acetato de etila	CRCH-A	II	0,12
Metanol	CRCH-M	II	0,03
Total			0,64

6.4.9. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE CRFH

A fração CRFH (1,3502g) foi adsorvida em 1,62 g de sílica gel 60 e acondicionada em uma coluna aberta de 30 mm de diâmetro empacotada com 10,4 g de sílica gel. A amostra foi eluída com 330 mL de hexano, 250 mL de clorofórmio, 200 mL de acetato de etila e 150 mL de metanol, respectivamente, obtendo-se as seguintes frações:

Tabela 25– Resultado final do fracionamento cromatográfico de CRFH

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRFH-H	Óleo esverdeado	0,17
Clorofórmio	CRFH-C	Óleo marrom	0,85
Acetato de etila	CRFH-A	II	0,14
Metanol	CRFH-M	II	0,1
Total			1,26

Após a realização das colunas filtrantes, as frações foram submetidas a análise por cromatografia por camada delgada (CCD) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). As amostras do extrato etanólico da raiz mostrou a presença de compostos aromáticos e terpênicos, que associado ao rendimento considerável obtido no extrato, tornou-a o sujeito de escolha para iniciar o trabalho fitoquímico.

6.5. ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NÃO-VOLÁTEIS DE *Croton rhamnifolius*

6.5.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DA RAIZ DE *Croton rhamnifolius*

3,74 kg da raiz de *Croton rhamnifolius*, depois de secas e trituradas, foram submetidas a extração exaustiva com 12 L de etanol bruto a frio durante 3 dias. A solução etanólica foi destilada em evaporador rotativo sob pressão reduzida. A torta resultante foi submetida a duas novas extrações exaustivas a frio em etanol por 72 horas cada, fornecendo ao final das três extrações 124,9 g de um extrato de coloração marrom escura denominado de CRRE.

6.5.2. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DA RAIZ DE *Croton rhamnifolius* – (CRRE)

60,0 g de CRRE foram solubilizadas em 110 mL de metanol e 50 mL de água destilada em um erlemeyer de 2,0 L. A solução foi transferida para um funil de decantação de 1,0 L de capacidade, onde foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, para a obtenção das quatro frações correspondentes (Tab. 26).

Tabela 26 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRE

Eluente	Volume total (mL)	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	100	CRRE-H	Óleo verde escuro	3,18
Clorofórmio	350	CRRE-C	Óleo marrom	32,27
Acetato de etila	200	CRRE-A	II	0,43
Água	100	CRRE-FA	II	6,54
Total				42,42

6.5.3. OBTENÇÃO DE CR-1**Fracionamento cromatográfico de CRRE-C**

O fracionamento cromatográfico preliminar em coluna filtrante de 15,0 g da fração CRRE-C, foi realizada com adsorção da amostra em 22,0 g de sílica gel 60 e em uma coluna aberta de 55 mm de diâmetro, contendo 18,0 g de sílica gel 60. A eluição se deu com uso dos solventes: 150 mL de hexano (H), 300 mL de clorofórmio (C), 350 mL de acetato de etila (A) e 350 mL de metanol (M), levando a obtenção das frações registradas na tabela abaixo.

Tabela 27 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRE-C

Eluente	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	CRREC-H	Oleoso, viscoso esverdeado	0,12
Clorofórmio	CRREC-C	Oleoso marrom	6,68
Acetato de etila	CRREC-A	II	3,62
Metanol	CRREC-M	II	2,28
Total			12,7

Fracionamento cromatográfico de CRREC-A

3,62 g de CRREC-A foi adsorvida em 5,18 g de sílica flash. A mistura foi acondicionada em uma coluna flash de 30 mm de diâmetro utilizando 39,0 g de sílica flash como fase estacionária. Para eluição foram utilizadas os solventes CHCl_3 , AcOEt e MeOH em misturas binárias seguindo uma ordem crescente de polaridade para obtenção de 138 frações. As frações foram submetidas a análise comparativa por CCD e reunidas conforme listado na tabela 28.

Frações (10mL)	Eluente	Volume total (mL)	Volume/frasco (mL)
1	C/A 30%	150	150
2 a 34	C/A 40%	400	12
35 a 54	C/A 50%	200	20
55 a 98	C/A 75%	350	10
99 a 120	A 100%	350	16
121 a 127	A/M 50%	100	16
128 a 138	M	100	10

Tabela 28 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREC-A

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1)	Sólido amarelo	68,9
(2-34)	Sólido branco	854,9
(35-89)	Óleo marrom claro	683,6
(90-116)	Óleo marrom claro	213
(117-121)	Óleo amarelo	70,1
(117-121) sólido	Sólido branco	3,5
(122-131)	Óleo marrom	33
Total		1927

Fracionamento cromatográfico de CRRECA-(35-89)

683,6 mg de CRRECA-(35-89) foram macerados em 1,8g de sílica flash. A mistura foi acondicionada em coluna flash de 30 mm de diâmetro utilizando 43,50 g de sílica flash como adsorvente. Os eluentes clorofórmio e acetato de etila foram utilizados como misturas binárias em ordem crescente de polaridade. As frações resultantes foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o grau de similaridade (Tab. 29).

Frações	Eluente	Volume total (mL)	Volume coletado (mL)
1	C/A 40%	100	100
2	C/A 50%	100	100
3 a 27	C/A 70%	200	8
27 a 33	C/A 90%	200	30
34 a 52	A	100	20
53 a 63	A/M 50%	100	10
64 a 70	M	50	8

Tabela 29 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECA-(35-89)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1-2)	Sólido amarelo	15,2
(3-20)	Oleoso marrom claro	4,2
(21-35)	Oleoso marrom	38,2
(27-35) sólido	Sólido amarelo	5,1
(36-60)	Oleoso marrom claro	95,0
(61-70)	Oleoso marrom claro	38,7
Total		196,4

Fracionamento cromatográfico de CRRECA - (35-89) - (3-20)

Recromatografia de 176,6 mg de CRRECA-(35-89)-(3-20) em coluna flash de 20 mm de diâmetro contendo 8 g de sílica flash, foi realizada utilizando 130 mL da mistura de eluentes clorofórmio/acetato de etila 1:1 de forma isocrática. As frações foram recolhidas em fracos de aproximadamente 12 mL e posteriormente comparadas em CCD forneceram os seguintes resultados:

Tabela 30 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECA - (35-89) - (3-20)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1)	Oleoso amarelo claro	12,3
(2-4)	Sólido branco	32,1
(5-7)	Oleoso amarelo	42,2
(8-11)	Sólido branco	11,4
(11-14)AM	Oleoso amarelo	10
(12)	II	4,3
(13-16)	II	8,1
(17-20)	II	3,6
(21-25)	II	4,6
Total		128,6

A fração (2-4) forneceu 32,1 mg de um sólido branco de ponto de fusão 258,6-260,1 °C e foi denominada de CR-1.

6.5.4. OBTENÇÃO DE CR-2

Fracionamento cromatográfico de CRREC-C

6,68 g de CRREC-C foram adicionadas em coluna aberta de 45 mm de diâmetro e contendo 9,77 g de sílica gel (Φ μ m 63-200). Para eluição foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol seguindo uma ordem crescente de polaridade, para a obtenção de quatro frações (Tab. 31).

Tabela 31 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREC-C

Eluente	Volume (mL)	Denominação	Aspecto	Peso (g)
Hexano	170	CRRECC-H	Óleo marrom claro	1,07
Clorofórmio	350	CRRECC-C	Óleo marrom escuro	4,53
Acetato de etila	150	CRRECC-A	II	0,72
Metanol	70	CRRECC-M	II	0,15
Total				6,47

Fracionamento cromatográfico de CRRECC-H

1,07 g de CRRECC-H foram acondicionadas sobre uma coluna flash de 20 mm de diâmetro juntamente com 11,6 g de sílica flash. A eluição foi realizada de forma isocrática utilizando clorofórmio como eluente. Foram coletadas 48 frações de 10 mL, que após a análise comparativa por CCD foram reunidas e agrupadas na tabela 32.

Tabela 32 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECC-H

Frações	Aspecto	Peso (mg)
(1)	Oleoso amarelo claro	0,02
(2-4)	Oleoso verde claro	182,1
(5)	II	137,9
(6-13)	Oleoso verde escuro	454,7
(14-15)	Oleoso amarelo	20,6
(16-26)	II	25,0
(27-46)	II	12,7
(47-48)	II	5,8
Total		838,82

Fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)

A recromatografia de 454,3 mg de CRRECC-H (6-13) foi realizada em uma coluna flash de 25 mm de diâmetro contendo 11,57 g de sílica flash como adsorvente. A eluição foi efetuada utilizando mistura de binárias dos solventes hexano, HCCl_3 , acetato de etila e metanol, em concentrações seguindo uma ordem crescente de polaridade. Após comparação por CCD, as frações foram reunidas, resultando em seis frações (Tab. 33).

Frações (10mL)	Eluente	Volume (mL)
1 a 28	H/C 50%	410
29 a 35	H/C 65%	100
36 a 38	C 100%	50
39 a 42	C/A 20%	50
43 a 46	C/A 80%	50
47 a 50	A/M 20%	50
51 a 53	M	50

Tabela 33 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)

Frações	Aspecto	Peso (mg)
(1-3)	Oleoso amarelo	25,9
(4-10)	Sólido amarelo claro	54,9
(11-19)	Sólido branco	66,7
(20-32)	Oleoso amarelo	184,4
(33-50)	II	53,6
(51-53)	II	1,2
Total		386,7

Fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32)

184,1 mg de CRRECCH-(6-13)-(20-32) foram adsorvidas em 210 mg de sílica flash (Φ μ m 40-63) e acondicionada em uma coluna flash de 20 mm de diâmetro contendo 13,26 g de sílica flash. A coluna foi realizada de forma isocrática, utilizando como eluente 510 mL de clorofórmio 100%. Foram coletadas 64 frações de aproximadamente 8 mL, que após comparação por CCD foram reunidas, obtendo-se 5 frações (Tab. 34).

Tabela 34 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1-3)	Sólido amarelo	50,8
(4-6)	II	7,9
(7-14)	Oleoso amarelo	35,1
(15-60)	Sólido amarelo	23,1
(61-64)	Oleoso amarelo	22,0
Total		138,9

Fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32)- (1-3)

50,8 mg de CRRECCH-(6-13)-(20-32)(1-3) foram adsorvidos em 96 mg de sílica flash em grau de porcelana e acondicionados em uma coluna flash (Φ μ m 40-63) de 20 mm de diâmetro contendo 12,43 g de sílica flash como adsorvente. A fase móvel utilizada foi a combinação binária de hexano/diclorometano em concentrações seguindo uma ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 124 frações, que foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o grau de similaridade (Tab. 35).

Frações (10mL)	Eluente	Volume (mL)	Volume/frasco (mL)
1 a 16	H/D 30%	230	14
17 a 75	H/D 60%	500	9
76 a 97	H/D 65%	300	12
98 a 109	H/D 80%	100	8
110 a 123	D 100%	150	10
124	M 100%	50	50

Tabela 35 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(6-13)-(20-32)-(1-3)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1-2)	Sólido branco	2,1
(3-21)	Sólido amarelo	1,7
(22-28)	Sólido branco	5,4
(29-31)	sólido branco	2,3
(32-59)	Oleoso amarelo	10,1
(60-94)	Sólido branco	5,8
(95-124)	Oleoso amarelo	24,9
Total		52,3

A fração (60-94) forneceu 5,8 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa entre 284,3-286,1⁰C e homogêneo em CCD, o qual foi denominado CR-2.

6.5.5. OBTENÇÃO DE CR-3

Fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(5)

137,9 mg de CRRECCH-(5) foi acondicionada sobre 24,5 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, em uma coluna de 20 mm de diâmetro. Os solventes utilizados foram misturas binárias de hexano e diclorometano seguindo uma ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram reunidas após comparação por CCD e se encontram expressas na tabela 36.

Frações	Eluente	Volume (mL)	Volume/frasco (mL)
1 a 32	H/D 1%	550	16
33 a 66	H/D 15%	300	10
67 a 72	H/D 25%	300	50
73 a 76	H/D 50%	200	50
77	M	60	60

Tabela 36 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRECCH-(5)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
1 -5	Óleo incolor	10,5
6 – 28	Óleo amarelo claro	31,4
29 – 51	II	5,7
52 – 66	Óleo incolor	7,8
67 - 76	Óleo marrom claro	23,0
77	Óleo marrom escuro	19,2
Total		97,6

Cromatografia (CCD) preparativa de CRRECCH-(5)-(52-66)

A fração CRRECCH-(5)-(52-66) (7,8 mg) foi solubilizada em 0,5 mL de metanol e submetida à cromatografia preparativa por eluição em uma placa analítica de 5cm de largura x 10 cm de altura. O eluente utilizado foi a mistura hexano/acetato de etila 10%. A sílica correspondente a faixa contendo a amostra foi transferida para um bécker e extraída com acetato de etila e, em seguida com metanol, para obtenção de um óleo incolor, de massa 5,2 mg, ao qual foi denominado de CR-3.

6.5.6. OBTENÇÃO DE CR-4 E CR-2

Fracionamento cromatográfico de CRRE-H

A fração CRRE-H (3,15g) foi adsorvida em 16,51 g de sílica gel 60 e empacotada em uma coluna aberta de 45 mm de diâmetro contendo com 19,47 g de sílica gel 60. Os eluentes utilizados foram hexano (H), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M) puros e combinados, sendo coletadas sete frações, como mostra a tabela abaixo.

Tabela 37 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRRE-H

Eluente	Volume (mL)	Denominação	Aspecto	Peso (mg)
H	200	CRREH-H	Óleo verde	147,7
H/C 50%	250	CRREH-H/C	II	489,6
C	250	CRREH-C	Óleo marrom claro	1865,3
C/A 50%	250	CRREH-C/A	II	357,0
A	200	CRREH-A	Óleo marrom escuro	68,2
A/M 50%	100	CRREH-A/M	II	85,0
M	100	CRREH-M	II	22,7
Total				3035,5

Fracionamento cromatográfico de CRREH-C

A fração CRREH-C (1,8653 g) foi recromatografada em uma coluna do tipo “flash”, de 35 mm de diâmetro contendo 34,68 g de sílica flash como fase estacionária. A amostra foi adsorvida em 3,01 g e posteriormente eluída em combinações binárias de hexano e diclorometano. Foram coletadas 31 frações com aproximadamente 30 mL cada. As frações obtidas foram submetidas a cromatografia CCD e posteriormente reunidas de acordo com o grau de semelhança (Tab. 38).

Frações	Eluente	Volume (mL)
1 – 8	H/D 30%	300
9 - 12	H/D 40%	150
13 - 19	H/D 50%	200
20 – 23	H/D 70%	100
24 - 31	D 100%	300
32	M 100%	80

Tabela 38 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREH-C

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
1 – 17	Óleo incolor	32,2
18	Sólido branco	8,1
19 – 24	Óleo amarelo	40,8
25	Sólido branco	7,0
26 – 28	Óleo amarelo	365,0
29 -31	Óleo incolor	230,3
32	Óleo marrom	120,4
Total		803,8

A fração (25) forneceu 7,0 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa entre 172,1-173,8 °C e homogêneo em CCD, o qual foi denominado CR-4. Na fração (18) foi obtido novamente, 8,1 mg de CR-2.

6.5.7. OBTENÇÃO DE CR-5

Fracionamento cromatográfico de CRREHC (31)

A fração CRREH-C (31) (551,4 mg) foi cromatografada em uma coluna do tipo “flash”, de 30 mm de diâmetro contendo 47,80 g de sílica flash como fase estacionária. A amostra foi adsorvida em 760 mg e posteriormente eluída em combinações binárias de hexano e acetato. Foram coletadas 114 frações que foram submetidas a cromatografia CCD e posteriormente reunidas de acordo com o grau de semelhança (Tab. 39, p. 115).

Fracões	Eluente	Volume total (mL)	Volume/frasco (mL)
1 a 22	H/A 40%	330	15
23 a 67	H/A 50%	440	10
68 a 104	H/A 60%	300	10
105 a 108	H/A 80%	150	40
109 a 113	H/A 90%	100	25
114	M	80	80

Tabela 39 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREHC (31)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1-33)	Óleo incolor	3,2
(34-45)	Óleo amarelo claro	7,3
(46-60)	II	37,6
(61-76)	II	18,4
(77-88)	II	12,2
(89-95)	II	22,4
(96-104)	Óleo amarelo escuro	24,5
(105-106)	II	22,3
(107-108)	II	26,1
(109-111)	II	55,1
(112-113)	II	91,7
(114)	II	100,5
Total		385,8

Fracionamento cromatográfico de CRREHC (31)-(34-45)

74,7 mg de CRREHC (31)-(34-45) foram acondicionadas sobre uma coluna flash de 20 mm de diâmetro juntamente com 12,40 g de sílica flash. A eluição foi realizada através de combinações binárias de hexano e acetato de etila. Foram coletadas 61 frações de 10 mL, que após a análise comparativa por CCD foram reunidas conforme listado na tabela 40, p. 116.

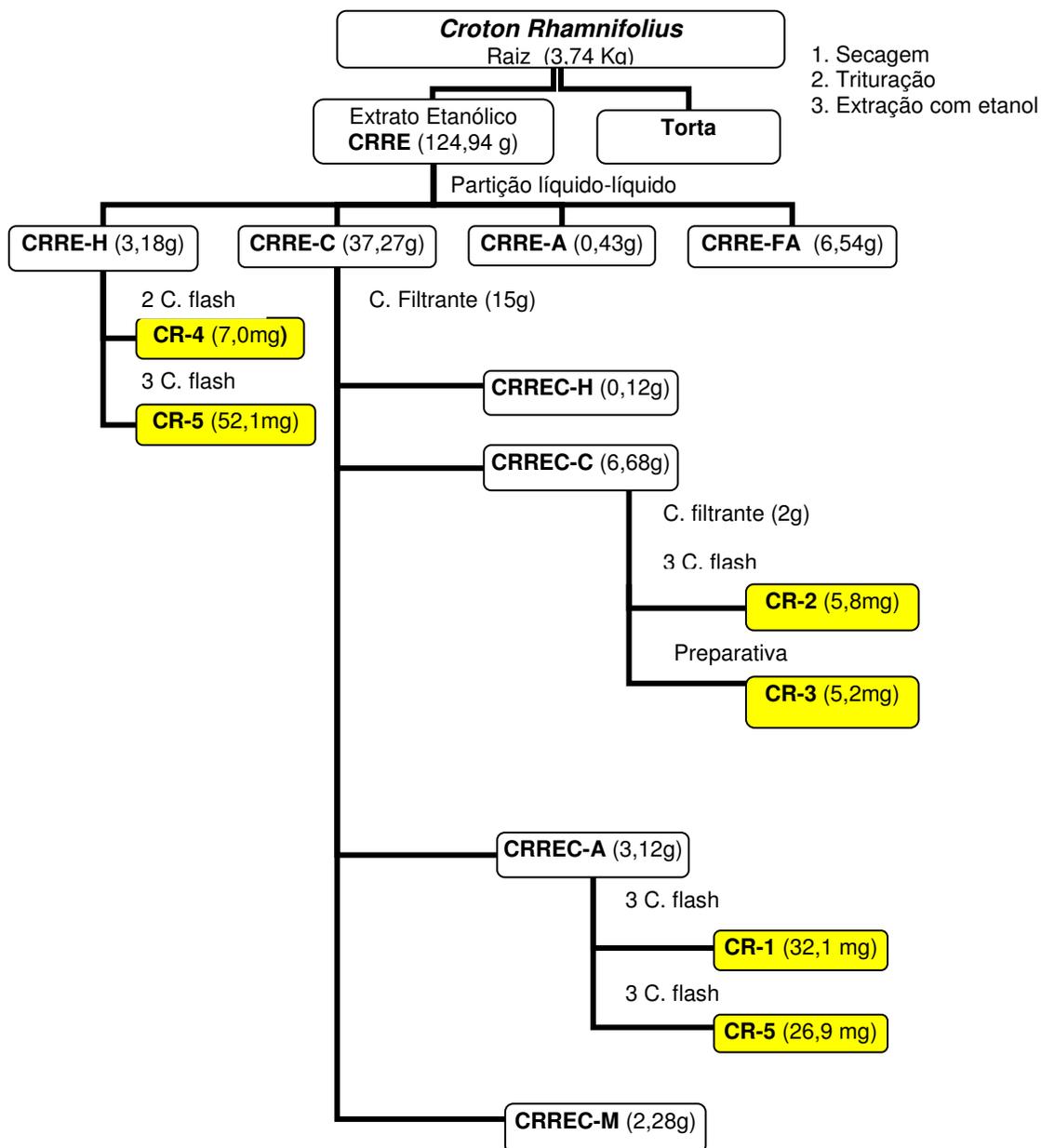
Fracões	Eluente	Volume total (mL)	Volume/frasco (mL)
1 a 26	H/A 5%	370	15
27 a 57	H/A 10%	250	10
58 a 60	H/A 15%	100	30
61	M 100%	70	70

Tabela 40 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de CRREHC (31)-(34-45)

Frações reunidas	Aspecto	Peso (mg)
(1-25)	Óleo amarelo claro	0,7
(26-31)	II	5,0
(32-43)	Sólido branco	52,1
(44-54)	Óleo amarelo	2,3
(55-59)	II	1,8
(60-61)	Óleo marrom claro	1,1
(62)	II	9,4
Total		72,4

A fração (32-43) forneceu 52,1 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa entre e homogêneo em CCD, o qual foi denominado CR-5.

Fluxuograma 2 - Isolamento dos constituintes não voláteis do extrato etanólico da raiz de *Croton rhamnifolius*



CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A análise da constituição química volátil das folhas, talos e raízes de *Croton rhamnifolius* por CGL/EM permitiu a identificação de um total de 21 constituintes químicos das folhas (OEFGR), 14 constituintes químicos dos talos (OETGR) e 8 constituintes no cromatograma das raízes (OERGR).

O eucaliptol e o α -felandreno foram os componentes majoritários nas folhas, enquanto que nos talos, o β -pineno foi o constituinte principal, seguido pelo β -cariofileno; já nas raízes prevaleceu o valenceno, seguido pelo borneol. A composição química dos óleos mostraram-se semelhantes, exceto pela presença das substâncias sabineno, α -felandreno, *p*-cimeno, borneol, terpinol-4, acetato de bornila, α -humuleno, alloaromadendreno, biciclogermacreno, espatulenol somente no OEFGR, e pela presença do β -pineno, limoneno, cânfora, isodieno, e óxido de cariofileno somente no OETGR e β -maalieno, β -elemeno, eremofileno, valenceno e guaiol somente nas raízes (OERGR).

O estudo químico do extrato etanólico da raiz de *Croton rhamnifolius*, conduziu ao isolamento e caracterização estrutural de um alcalóide de esqueleto indólico denominado de rhamnifolina, de dois diterpenos do tipo beiereno, denominado de estachenona e 12-oxo-estachenona, e de dois triterpenos pentacíclicos, um da série oleanano, o ácido acetil aleuritólico (AAA) e o outro da série lupano amplamente conhecido como lupeol. Embora os terpenóides já tenham sido descritos na literatura, todas as substâncias são relatadas pela primeira vez na espécie, sendo o diterpeno estachenona inédito no gênero *Croton* e o alcalóide rhamnifolina, inédito na literatura.

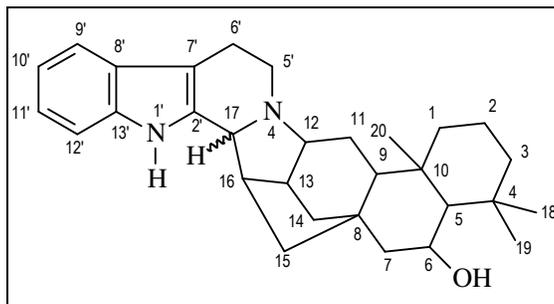
Dados da literatura revelam as atividades antifilarial (NYASSE, 2006) antiespasmódica (MACIEL, 2000), antitumoral (TORRANCE, 1977) e antimicrobiana (PERES, 1997) para o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA). Para o lupeol são citadas várias atividades antitumorais em células leucêmicas, em carcinomas broncopulmonares e células epiteliais, além das atividades nefrolítica, antiplasmodial e antiperoxidativa (TOLSTIKOVA, 2006).

O alcalóide rhamnifolina foi avaliado quanto a sua atividade tripanocida e leishmania, e os testes preliminares indicam uma excelente atividade.

Os resultados mostrados até o momento, além de dois terpenos que se encontram em fase de caracterização, confirmam o grande potencial fitoquímico de espécies do gênero *Croton* e justificam a continuidade dos estudos fitoquímicos para a espécie *Croton rhamnifolius*.

CONSTANTES FÍSICAS
E
DADOS ESPECTROMÉTRICOS

8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Croton rhamnifolius*



CR-1

Nome	<i>Rhamnifolina</i>
Fórm. molecular	C ₃₀ H ₄₀ ON ₂
MM (g/mol)	444
Aspecto	Sólido amarelo claro
Ponto de fusão (°C)	258,6 - 260,1

Espectroscopia na região do Infravermelho (IV): KBr (cm⁻¹):

3449, 3259, 2855, 1461, 1342, 748

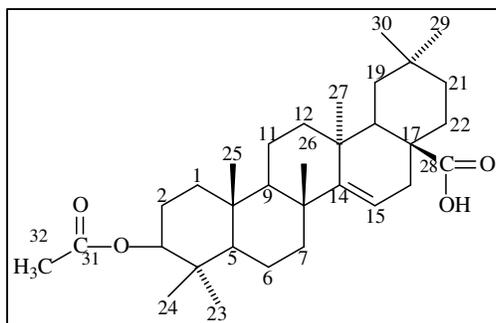
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) – δ (Integração, multiplicidade e constante de acoplamento, correlação):

1,56 (*dt*, J=12,5; 2,7 Hz, H-1), 0,87 (*dt*, J=12,5; 2,7 Hz, H-1), 1,58 (H-2), 1,39 (H-2), 1,39 (H-3), 1,18 (H-3), 1,34 (*d*, J=5,3 Hz, H-5), 4,17 (*m*, H-6), 2,18 (H-7), 1,59 (H-7), 1,98 (*dd*, J=12,0; 5,4 Hz, H-9), 1,59 (*dt*, J=12,5; 3,0 Hz, H-11), 1,05 (*dt*, J=12,5; 3,0 Hz, H-11), 3,44 (*dl*, J=10,0 Hz, H-12), 2,31 (*m*, H-13), 1,44 (*d*, J=11,8 Hz, H-14), 1,01 (*dd*, J=11,8; 3,5 Hz, H-14), 2,17 (*t*, J=12,1 Hz, H-15), 2,10 (*dl*, J=12,1 Hz, H-15), 3,03 (*m*, H-16), 4,42 (*sl*, H-17), 1,23 (*s*, H-18), 0,97 (*s*, H-19), 0,94 (*s*, H-20), 3,36 (H-5'), 3,17 (H-5'), 3,12 (H-6'), 2,53 (H-6'), 7,74 (*dl*, J=7,1 Hz, H-9'), 7,27 (*tl*, H-10'), 7,31 (*tl*, H-11'), 7,61 (*dl*, J=7,3 Hz, H-12')

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – δ (correlação estrutural)

42,06 (C-1), 19,47 (C-2), 43,15 (C-3), 34,32 (C-4), 62,54 (C-5), 67,70 (C-6), 44,45 (C-7), 41,32 (C-8), 54,94 (C-9), 37,11 (C-10), 24,26 (C-11), 58,11 (C-12), 42,12 (C-13), 39,74 (C-14), 53,98 (C-15), 48,65 (C-16), 63,88 (C-17), 34,20 (C-18), 23,10 (C-19), 17,90 (C-20), 138,07 (C-2'), 45,09 (C-5'), 16,98 (C-6'), 108,90 (C-7'), 128,95 (C-8'), 118,73 (C-9'), 119,38 (C-10'), 121,60 (C-11'), 111,88 (C-12'), 137,63 (C-13')

Espectrometria de massas (CG/EM) – m/z : 444, 429, 319, 275, 221, 197, 169, 144

**CR-2**

Nome	<i>Ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico</i>
Fórm. molecular	C ₃₂ H ₄₉ O ₄
MM (g/mol)	498
Aspecto	Sólido branco
Ponto de fusão (°C)	284,3 – 286,1

Espectroscopia na região do Infravermelho (IV): KBr (cm⁻¹):

3449, 2924, 2852, 1655, 1633, 1095, 802

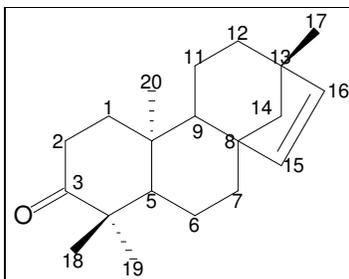
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (Integração, multiplicidade e constante de acoplamento, correlação):

4,47 (*dd*, J=9,3; 6,3Hz, H-3), 1,03 (*dd*, J=13,4; 3,5Hz, H-5), 5,52 (*dd*, J=8,0; 3,3Hz, H-15), 2,37 (*dd*, J=14,4; 8,0 Hz, H-16 α), 1,92 (*dd*, J=14,4;3,3Hz, H-16 β), 2,27 (*dd*,J=13,8; 2,8Hz, H-18), 0,95-0,85 (7 x CH₃-23-27,29,30) e 2,04 (CH₃COO⁻)

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

37,64(C-1), 23,71 (C-2), 81,13 (C-3), 37,57 (C-4), 55,85 (C-5), 18,96 (C-6), 41,03 (C-7), 39,28 (C-8), 49,32 (C-9), 37,92 (C-10), 17,55 (C-11), 33,57 (C-12), 38,18 (C-13), 160,81 (C-14), 117,05 (C-15), 31,59 (C-16), 51,66 (C-17), 41,69 (C-18), 35,59 (C-19), 29,52 (C-20), 33,92 (C-21), 30,97 (C-22), 28,19 (C-23), 16,81 (C-24), 15,83 (C-25), 26,40 (C-26), 22,67 (C-27), 184,01 (C-28), 32,12 (C-29), 28,89 (C-30), 171,20 (C-31), 21,50 (C-32).

Espectrometria de massas (CG/EM) – m/z: 498, 423, 269, 248, 234, 203, 190, 135,119, 81, 69, 43

**CR-3**

Nome	<i>Stachen-15-en-3-ona</i>
Fórm. molecular	C ₂₀ H ₃₀ O
MM (g/mol)	286
Aspecto	Óleo incolor

Espectroscopia na região do Infravermelho (IV): KBr (cm⁻¹):

2920, 2852, 1705, 1450, 1384, 1217, 1158, 1112, 1057, 1006, 952, 772, 668

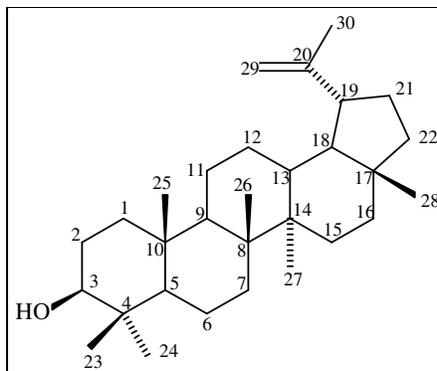
Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (Integração, multiplicidade e constante de acoplamento):

1,38 (*t*, J=1, H-1), 1,34 (*dd*, J=0,6, H-5), 1,39 (*dd*, H-7), 1,04 (*t*, H-9), 1,54 (*dd*, J=1,7, H-11), 1,32 (*dd*, J=2,25, H-12), 1,06 (*s*, H-14), 5,74 (*d*, J=5,7, H-15), 5,53 (*d*, J=5,7, H-16), 1,03 (*s*, H-17), 1,09 (*s*, H-18), 1,06 (*s*, H-19), 0,93 (*s*, H-20)

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

38,24 (C-1), 34,69 (C-2), 217,70 (C-3), 47,84 (C-4), 56,10 (C-5), 20,67 (C-6), 37,01 (C-7), 49,24 (C-8), 52,22 (C-9), 37,01 (C-10), 21,27 (C-11), 33,18 (C-12), 44,07 (C-13), 61,13 (C-14), 134,74 (C-15), 137,17 (C-16), 25,04 (C-17), 26,42 (C-18), 22,14 (C-19), 14,95 (C-20).

Espectrometria de massas (CG/EM) – m/z: 286, 200, 159, 147, 135, 122, 105, 85, 83, 67, 55, 41

**CR-4**

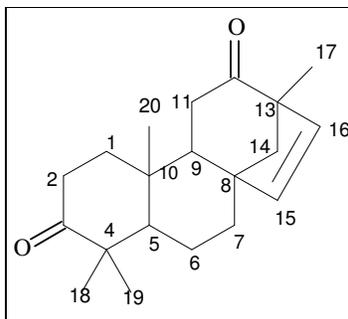
Nome	<i>Lup-20(29)-en-3-ol, 3-beta</i>
Fórm. molecular	C ₃₀ H ₅₀ O
MM (g/mol)	426
Aspecto	Sólido cristalino branco
Ponto de fusão (°C)	172,1 - 173,8

Espectroscopia de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) – δ (Integração, multiplicidade, constante de acoplamento e correlação estrutural):

3,20 (1H, *dd*, H-3), 4,57 (1H, *dd*, H-29), 4,69 (1H, *d*, H-29), 3,18-3,11 (1H, *s*, H-30), 2,41-2,27 (2H, *m*, H-19), 1,54 (3H, *s*, H-30), 0,99 (3H, *s*, H-26), 0,93 (3H, *s*, H-25), 0,91 (3H, *s*, H-24), 0,79 (3H, *s*, H-27), 0,76 (3H, *s*, H-23), 0,72 (3H, *s*, H-28)

Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

38,9 (C-1), 27,6 (C-2), 79,2 (C-3), 39,0 (C-4), 55,5 (C-5), 18,5 (C-6), 34,5 (C-7), 41,0 (C-8), 50,6 (C-9), 37,4 (C-10), 21,1 (C-11), 25,3 (C-12), 38,3 (C-13), 43,0 (C-14), 27,6 (C-15), 35,8 (C-16), 43,2 (C-17), 48,5 (C-18), 48,2 (C-19), 151,2 (C-20), 30,0 (C-21), 40,2 (C-22), 28,2 (C-23), 15,5 (C-24), 16,3 (C-25), 16,2 (C-26), 14,7 (C-27), 18,2 (C-28), 109,5 (C-29), 19,5 (C-30).

**CR-5**

Nome	<i>12-oxo-estachenona</i>
Fórm. molecular	C ₂₀ H ₂₈ O ₂
M.M (g/mol)	300
Aspecto	Sólido branco
Ponto de fusão (°C)	88,1 - 90,6

Espectroscopia na região do Infravermelho (IV): KBr (cm⁻¹):

3469, 3415, 2852, 1704, 1458, 1380

Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (Integração, multiplicidade e constante de acoplamento, correlação):

1,6 (H-1, *ddd*), 2,57 (H-2β, *ddd*), 2,33 (H-2α, *ddd*), 1,28 (H-5, *dd*), 1,45 (H-6), 2,45 (H-7), 2,57 (H-7), 1,31 (H-9, *dd*), 1,31 (H-13), 1,78 (H-14, *d*), 6,08 (H-15, *d*), 5,60 (H-16, *d*), 1,19 (H-1, *s*), 1,01 (H-18, *s*), 1,15 (H-19, *s*), 0,82 (H-20, *s*)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (correlação estrutural):

37,79 (C-1), 34,56 (C-2), 215,50 (C-3), 47,93 (C-4), 55,23 (C-5), 21,36 (C-6), 36,23 (C-7), 49,66 (C-8), 54,42 (C-9), 36,64 (C-10), 36,64 (C-11), 210,52 (C-12), 57,75 (C-13), 58,53 (C-14), 139,79 (C-15), 136,19 (C-16), 17,90 (C-17), 26,45 (C-18), 22,06 (C-19), 13,68 (C-20)

Espectrometria de massas (CG/EM) – m/z: 300, 272, 145, 131, 105, 91, 77, 67, 55, 41

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H. & GUILHON, G. M. S. P.;
Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var
Glabor (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de iniciação Científica UFPA**, v. 1,
n. 2, p. 1-9, 2001.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas
Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured
Publishing Corporation, 456 p. 2001.

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D.; Antiinflammatory and antiarthritic activities
of lupeol and 19a-h lupeol isolated from *strobilanthus callosus* and *strobilanthus*
ixiocephala roots. **Indian J. Pharmacology**. v. 35:, p. 384-387, 2003.

ARATENECHMUGE, Y.; HIBASAMI, H., SANPIN, K.; KATSUZAKI, H.; IMAI,
K.; KOMIYA, T. Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen
(*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells.
Oncology Reports. v. 11, p. 289-292, 2004.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2. Viçosa:
Universidade Federal de Viçosa. 377 p. 1991.

BRAGA, R.A. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. Fortaleza: 2^a
Ed., Imprensa Universitária, 1960.

BYRNE, K. M; SMITH; ONDEYKA, J. G. Biosynthesis of Nodulisporic Acid A:
Precursor Studies. **J. Am. Chem. Soc.**124 (24), p. 7055 -7060, 2002.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; FLAUSINO, O. A.; FURLAN, M. e
BOLZANI, V. S., YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações
relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *uncaria*
guianensis. **Quím. Nova**. v. 27, No. 6, 878-881, 2004.

CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes miers* (Lecythidaceae) **Quím. Nova**. v. 21, n. 6, 1998.

CHEN L.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Thiersindoles A C: New Indole Diterpenoids from *Penicillium thiersii*. **J. Nat. Prod.** v. 66, 1232-1235, 2003.

CHEN L.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Thiersinines A and B: Novel Antiinsectan Indole Diterpenoids from a New Fungicolous *Penicillium Species*. **Org. Lett.**, v. 4, No. 18, p. 3095- 3098, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas-SP: Editora Unicamp. 2006.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; Kovats Indices Simulation Essential Oil Analysis. **Quím. Nova**. v. 13, n. 4, p. 282, 2001.

CRAVEIRO, A. A.; RODRIGUES, A.S.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Volatile constituents of brazilian. Euphorbiaceae . Genus *Croton*. **J. Nat. Prod.** v. 44, p. 602 – 608, 1981.

FILGUEIRAS, J. H. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 1994.

GLOER.; J.B.; RINDERKNECHT, B. L. N.: A New Insecticidal Indole Diterpene from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*. **J. Org. Chem.** vol. 54, p. 2530-2532, 1989.

GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; Modified Distillation Trap. **Chemistry Analyst**. v. 49, p. 114, 1960.

GONZALEZ, M. C.; LULL, C.; MOYA, P.; AYALA, I.; PRIMO, J.; YUFERA, E. P. Insecticidal Activity of Penitrems, Including Penitrem G, a New Member of the

Family Isolated from *Penicillium crustosum*. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 51, p. 2156-2160, 2003.

GRACE, M.H.; FARALDOS, J.A.; LILA, M. A.; COATES, R.M. *ent*-Beyerane diterpenoids from the heartwood of *Excoecaria parvifolia*. **Phytochemistry**. v. 68, p. 546-553, 2007.

GUIMARÃES, L.A.C. **O gênero croton I. Seção cyclostigma griseb ocorrentes na amazônia brasileira**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém-PA. 2006.

HARTWELL, J.L. Plants used against cancer. **Lloydia**. n. 32, p.153-205, 1969.

JOLLY, A. A. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. Ed. Nacional, São Paulo, 344, 1966.

JUNGES, M.J.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES. M.G.F.S.; FILHO, E. R.; FRUHAUF, M.; BARAÑANO, A.G. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC. **Revista de Pesquisa e Pós-Graduação**. Erechim-RS. v. 1, p.13-30, 2000.

KONISHI,T.; KONOSHIMA, T.; FUJIWARA, Y.; KIYOSAWA, S. Excoecarins D, E, and K, from *Excoecaria agallocha*. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 344-346, 2000.

LAAKSO, J. A.; GLOER, J. B. RADARINS A-D: New Antiinsectan and Cytotoxic Indole Diterpenoids from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus* **J. Org. Chem.** Vol. 57, p. 138-14. 1992.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; SILVA, M.N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**. v.49, n. 30, p. 823-828, 1998.

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.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacology**. v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: EUFC, 141 p., 1997.

MCLEAN, S.; DUMONT, M.P.; REYNOLDS, W.F. Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of two triterpenoids of *Maprounea guianensis* by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Can. J. Chem.** v. 65, p. 2519-2525, 1987.

MILES, C.O.; WILKINS, A. L.; GARTHWAITE, I.; EDE, R. M.; MUNDAY-FINCH, S. C. Immunochemical Techniques in Natural Products Chemistry: Isolation and structure determination of novel indole-diterpenoid aided by TCL-ELISAgram. **J. Org. Chem.** v. 60, p. 6067-6069, 1995.

MORAES, S. M.; CATUNDA, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Quím. Nova**. v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MUNDAY, S. C. F.; ALISTAIR, L. W.; MILES, C. O. Isolation of Paspaline b, and indole-diterpenoid from *penicilli um paxilli*. **Phytochemistry**. v. 41, No. 1, p. 327 - 332, 1996.

MUNDAY, F. S. C.; ALISTAIR, L. W.; MILES, C. O., Tomoda, H.; Omura, S. Isolation and Structure Elucidation of Lolilline, a Possible Biosynthetic Precursor

of the Lolitrem Family of Tremorgenic Mycotoxins. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45, p. 199-204, 1997.

MUNDAY, F. S. C.; ALISTAIR, L. W.; MILES, C. O. Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol, and Lolitrem N from *Lolium perenne* Infected with *Neotyphodium lolii* and Evidence for the Natural Occurrence of 31-Epilolitrems N and 31-Epilolitrems F. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 46, p. 590-598, 1988.

NOZAWA, K.; UDAGAWA, S.; NAKAJIMA, S.; KAWA, K. Structures of Two Stereoisomers of a New Type of Indoloditerpene Related to the Tremorgenic Mycotoxin Paxilline, from *Emericella desertorum* and *Emericella striata*. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** p. 1157 – 1159, 1987.

NKUNYA, M. H. H. Unusual metabolites from some Tanzanian indigenous plant species. **Pure Appl. Chem.** vol. 77, No. 11, p. 1943–1955, 2005.

NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; NONO, J. J.; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetyl aleuritolic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. **Nat. Prod. Research, Part B: Bioactive Natural Products.** v. 20, n. 4, p. 391-397, 2006.

PERES, M. T.; DELLE, M. 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.

PETERS, L.; KONIG, G. M.; TERLAU, H.; WRIGHT, A. D. Four New Bromotryptamine Derivatives from the Marine Bryozoan *Flustra foliacea*. **J. Nat. Prod.** v. 65, p. 1633-1637, 2002.

RANAU, K.P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. 2001.

RANAU, K.P.; FLORÊNCIO D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**. v. 24, n. 2, p. 89-96, 2004.

RANAU, K.P.; XAVIER, H.S.; DIMECH, G.S.; WANDERLEY, A.G. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Lecta**. v. 20, n. 1, p. 61-68, 2002.

RIBEIRO-PRATA, E.M.; PAULO, M.Q.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St. Hill. (euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmácia**. v. 2, n. 74, p. 36-41, 1993.

RUNDGBERG, T.; WILKINS, A. L. Thomitrems A and E, two indole-alkaloid isoprenoids from *Penicillium crustosum* Thom. **Phytochemistry**. V. 61, p. 979-985, 2002.

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

SECCO, R. S. Alchorneae (Euphorbiaceae: Alchornea, Aparisthmium e Conceveiba). Flora Neotropica, **Monograph**, Estados Unidos. v. 93, p. 01-195, 2004.

SILVERTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 5ª Ed., 297 p. 1994.

SIMÕES, C. M. O; GOSMANN, E. P. S; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. EDITORA DA UFSC, 821p. 1999.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa**, SP: Instituto Plantarum, 640 p. 2005.

THONGPHASUK, P.; SUTTISRI, R.; BAVOVADA, R.; VERPOORTE, R. Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. **Phytochemistry**. v. 64, p. 897–901, 2003.

TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G.; FLEKHTER, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. natural lupane derivatives. **Russ. J. Bioorganic Chem.** v. 32, n. 1, p. 37-49, 2006.

TOMODA, H.; TABATA, N.; YANG, D.; TAKAYANAGI, H.; OMURA, S. Terpendoles, Novel ACAT Inhibitors Produced by *Albophoma yamanashiensis* III. Production, Isolation and Structure Elucidation of New Components. **The Journal of Antibiotics**. vol. 48, No.1, p. 5-11, 1995.

TORRANCE, S. J.; WIEDHOPF, R. M.; COLE, J. R. Anti tumor agents from *Jatropha macrorhiza* (euphorbiaceae). **J. Pharmaceutical Sciences** v. 66, n. 9, p.1348-1349, 1977.

WEBSTER, G.L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.1, n. 81, p.144, 1994.

WILKINS, A. L.; MILES, C.O.; EDE, R. M.; GALLAGHER, R. T.; MUNDAY, S. C. Structure Elucidation of Janthitrem B, a Tremorgenic Metabolite of *Penicillium janthinellum*, and Relative Configuration of the A and B Rings of Janthitrems B, E, and F. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 40, p. 1307-1309, 1992.