



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

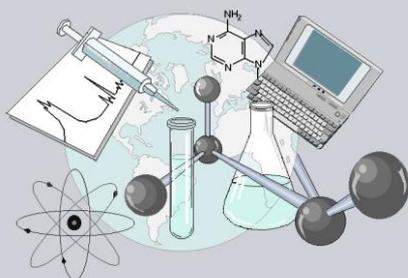
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E ADAPTÓGENA DO LENHO  
DE *CROTON ECHIOIDES* BAILL. - EUPHORBIACEAE**

Tese apresentada por  
**Cláudio Roberto Novello** ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de Química  
do Centro de Ciências Exatas da  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências.



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, DEZEMBRO/2011**



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA,  
ANTIOXIDANTE E ADAPTÓGENA DO LENHO DE *CROTON*  
*ECHIOIDES* BAILL. - EUPHORBIACEAE**

**CLÁUDIO ROBERTO NOVELLO**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Sarragiotto**

**Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello**

**Maringá, dezembro de 2011**



**Universidade Estadual de Maringá**

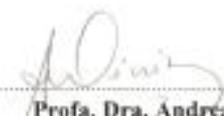
Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por Cláudio Roberto Novello, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 19 de dezembro de 2011.

**COMISSÃO JULGADORA:**

  
**Prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto**  
PRESIDENTE - DQ/UEM

  
**Prof. Dra. Debora Cristina Baldoqui**  
MEMBRO - DQ/UEM

  
**Prof. Dra. Andrea Diniz**  
MEMBRO - DE/UEM

  
**Prof. Dr. Wagner Villegas**  
MEMBRO - UNESP

  
**Prof. Dr. Fernando Batista da Costa**  
MEMBRO - USP

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

N939e      Novello, Cláudio Roberto  
            Estudo fitoquímico e avaliação da atividade  
            citotóxica, antioxidante e adaptógena do lenho de  
            *Croton echiioides* Baill. - Euphorbiaceae / Cláudio  
            Roberto. -- Maringá, 2011.  
            xxiii, 205 f. : il. (algumas col.), figs., tabs.,  
            esquemas.

            Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena  
            Sarragiotto.

            Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de  
            Mello.

            Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
            Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de  
            Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

            1. *Croton echiioides*. 2. *Croton echiioides* - Estudo  
            fitoquímico. 3. *Croton echiioides* - Atividade  
            citotóxica. 4. *Croton echiioides* - Atividade  
            antioxidante. 5. *Croton echiioides* - Atividade  
            adaptógena. 6. Marapuama. 7. Diterpenos clerodanos.  
            8. Alcaloides indólicos. 9. Flavonoides. I.  
            Sarragiotto, Maria Helena, orient. II. Mello, João  
            Carlos Palazzo de, co-orient. III. Universidade  
            Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas.  
            Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação  
            em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.7

AMMA- 00338

## AGRADECIMENTOS

Meus especiais agradecimentos ao professor Dr. Gentil José Vidotti (*in memoriam*) pela orientação no início desta tese, a sua lembrança e seus ensinamentos estarão para sempre em minha memória. À professora Dra. Maria Helena Sarragiotto pela confiança, competência e aceitação para prosseguir na orientação desta tese. Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello agradeço não somente pela valiosa co-orientação, mas pela disponibilidade e generosidade demonstrados durante todo o tempo em que tenho trabalhado nesta universidade.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Dr. Luís Carlos Marques da Universidade Bandeirante de SP pela co-orientação informal na parte biológica, realização dos testes comportamentais e, principalmente, pela indicação e grande ajuda na localização da espécie estudada.

Aos professores do Departamento de Farmácia da UEM Izabel Cristina Piloto, Marcos Luciano Bruschi, Marli Miriam de Souza Lima e Selma Lucy Franco pela compreensão, sugestões e ensinamentos oportunos.

Sou grato ao Departamento de Psicobiologia da UNIFESP, especialmente ao professor Dr. Fúlvio Rieli Mendes pela contribuição com os ensaios comportamentais.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas-UEM Celso Nakamura, Tânia Nakamura e Benedito Dias Filho e a acadêmica de pós-graduação Samara Nocchi, pelos ensaios de citotoxicidade.

Pela identificação botânica sou grato às professoras Dra. Daniela Santos Carneiro-Torres da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez (Dôra) do Departamento de Biologia da UEM.

Aos professores do Departamento de Química no curso de pós-graduação, meus sinceros agradecimentos.

Ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, na Alemanha, especialmente ao Dr. Heinrich Luftmann pela aquisição dos espectros de massas.

Merecem especial referência os acadêmicos e amigos Alexandre Augusto de Carvalho, Anna Paula Kutschenko e Murilo Eduardo Vieira Pires, vocês muito contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço também aos colegas de trabalho na UEM, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel, pela aquisição dos espectros de RMN e auxílio na identificação de algumas substâncias, Claudemir Nagahama, Cristina da Silva Correia e Admir Arantes pelos inúmeros auxílios prestados.

Aos colegas de pós-graduação Renata Longhini e Traudi Klein, vocês sempre ajudaram muito e Gisely Lopes pelo auxílio na realização do estágio docência.

Finalmente, um agradecimento todo especial a minha esposa Cecília e aos membros de nossa família.

*“Render-te-ei graças, Senhor, de todo o meu coração.” Salmo 138*

## RESUMO

Palavras-chave: *Croton echiodes*, marapuama, diterpenos clerodanos, alcaloides, flavonoides.

*Croton echiodes* Baill. (Euphorbiaceae) é uma planta medicinal encontrada no semi-árido brasileiro, denominada popularmente como velame. Na medicina popular é reconhecida por suas propriedades tônica e afrodisíaca. Os caules tem sido amplamente comercializados em substituição as raízes de *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae), a marapuama da Amazônia. As plantas do gênero *Croton* são ricas em diterpenos, alcaloides e flavonoides, que são princípios ativos com diversas atividades biológicas associadas como antitumoral e antioxidante.

Neste estudo utilizou-se o lenho com casca de *C. echiodes*, com o qual foram realizados ensaios físico-químicos de controle de qualidade e a otimização do solvente extrator. Para a escolha do melhor solvente extrator foram determinados o teor de resíduo seco e a capacidade antioxidante dos extratos obtidos com vários solventes de polaridade diversa. A mistura etanol/água a 70% foi o solvente mais eficaz entre os parâmetros testados sendo utilizado para a produção do extrato bruto (**EB**) pelo processo de Ultra-Turrax.

O extrato bruto foi suspenso em água e particionado em cinco frações com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. As frações obtidas com *n*-hexano (**FH**) e acetato de etila (**FA**) foram submetidas a sucessivos processos cromatográficos de separação. Foram isolados e identificados por análises espectroscópicas, espectrométricas e comparação com dados da literatura, da fração **FH**, os diterpenos do tipo clerodano 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17,18-dicarboxilato de metila (nasimalun B) (**CEH-1**), 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila (**CEH-2**), 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila (**CEH-3**), ptychonal-hemiacetal (**CEH-4a**) e ptychonal (**CEH-4b**) (em mistura), e éster metílico do ácido hardwickico (**CEH-5**); o sesquiterpeno *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (**CEH-6**); o triterpeno lupeol (**CEH-7**); os fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol (**CEH-8**) e estigmasterol (**CEH-9**) (em mistura) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**CEH-10**). Da fração **FA** foram isolados e identificados os alcaloides indólicos *N-trans-p*-coumaroil-triptamina (**CEA-1**), *N-trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (**CEA-2**), *N-trans*-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (**CEA-3**), *N-trans*-feruloil-5-hidroxitriptamina (moschamina) (**CEA-4**)

e *N-trans*-feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona (**CEA-5**); os flavonoides 3-*O*-metilcanferol (**CEA-6**), 3-*O*-metilquercetina (**CEA-7**), 3,7-di-*O*-metilquercetina (**CEA-8**) e 3,3'-di-*O*-metilquercetina (**CEA-9**) e os derivados de ácido benzóico 4-hidróxi ácido benzóico (**CEA-10**), 4-hidróxi-3-metóxi ácido benzóico (**CEA-11**) e 4-hidróxi-3,5-dimetóxi ácido benzóico (**CEA-12**). As substâncias **CEH-2**, **CEH-3** e **CEA-5** são inéditas na literatura enquanto a substância **CEA-3** foi isolada pela primeira vez de um produto natural.

Foram realizados testes comportamentais com o extrato bruto em camundongos jovens: *screening* farmacológico, atividade motora, tempo de sono induzido por hexabarbital, coordenação motora e labirinto em cruz elevado. No *screening* farmacológico o extrato mostrou efeito estimulante em baixas doses tanto por administração via oral quanto intraperitoneal e toxicidade evidente nas maiores doses por via intraperitoneal. Os resultados da avaliação da atividade motora não confirmaram a ação estimulante encontrada no *screening* e indicou efeito depressor na dose 50 mg/Kg. Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados no teste de coordenação motora e tempo de sono induzido pelo hexabarbital, mas apenas indícios de efeito depressor na dose de 50 mg/kg neste último. O teste do labirinto em cruz elevada mostrou resultados contraditórios sem prevalência de efeito depressor ou estimulante. Foi determinada a capacidade antioxidante do extrato bruto, das frações obtidas da partição líquido/líquido e dos compostos isolados da fração **FA**. O valor  $IC_{50}$  para o **EB** foi de 167,6  $\mu$ g/mL e 48,9  $\mu$ g/mL para a **FA**, a fração mais ativa. Os compostos mais ativos foram **CEA-2** ( $IC_{50}$  de 10,7 $\pm$ 0,4  $\mu$ mol/L), **CEA-3** ( $IC_{50}$  de 17,5 $\pm$ 0,4  $\mu$ mol/L), **CEA-4** ( $IC_{50}$  de 14,5 $\pm$ 0,4  $\mu$ mol/L), **CEA-7** ( $IC_{50}$  de 9,2 $\pm$ 0,3  $\mu$ mol/L), **CEA-8** ( $IC_{50}$  de 11,0 $\pm$ 0,6 $\mu$ mol/L) e **CEA-12** ( $IC_{50}$  de 20,2 $\pm$ 0,7  $\mu$ mol/L).

Os alcaloides indólicos isolados da fração **FA** foram testados frente a linhagem de células tumorais de cólon humanas HCT-116 pelo ensaio da sulforhodamina, destacando-se o *N-trans*-4-metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina com  $IC_{50}$  de 29,3  $\mu$ g/mL e morte de 90% das células tumorais na concentração de 72  $\mu$ g/mL.

## ABSTRACT

Keywords: *Croton echioides*, marapuma, clerodane diterpenes, alkaloids, flavonoids.

*Croton echioides* Baill. (Euphorbiaceae) is a medicinal plant found in semi-arid Brazilian areas, known popularly as “velame”. In folk medicine it is renowned for its tonic and aphrodisiac properties. Its stem bark has been widely sold as an aphrodisiac and tonic, as a substitute for the roots of *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae), the Amazon Marapuama. Plants of the *Croton* genus are rich in diterpenes, alkaloids and flavonoids, which are active principles associated with many biological activities such as antitumor and antioxidant.

In this study stem bark of *C. echioides* was used to perform quality control physico-chemical tests and optimization of the solvent extractor. To choose the best solvent extractor dry residue content and antioxidant capacity of extracts obtained were determined with several solvents of different polarity. The mixture of ethanol/water at 70% was the most effective solvent in the parameters tested being used for the production of crude extract (**EB**) through Ultra-Turrax process.

The crude extract was suspended in water and partitioned into five fractions with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The fractions obtained with *n*-hexane (**FH**) and ethyl acetate (**FA**) were subjected to successive chromatographic separation processes. Through spectroscopic and spectrometric analysis and comparison with literature data were isolated and identified, from the **FH** fraction, the diterpenes of the type clerodane 15,16-epoxy-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17,18-methyl dicarboxylate (nasimalun B) (**CEH-1**), 15,16-epoxy-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carboxy-18-methyl carboxylate (**CEH-2**), 3-oxo-15,16-epoxy-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-methyl dicarboxylate (**CEH-3**), ptychonal hemiacetal (**CEH-4a**) and ptychonal (**CEH-4b**) (in mixture), and hardwickiic acid methyl ester (**CEH-5**); the sesquiterpene *trans*-1(10)-epoxy-4(15)-caryophyllene (**CEH-6**), the triterpene lupeol (**CEH-7**); the phytosteroids  $\beta$ -sitosterol (**CEH-8**) and stigmasterol (**CEH-9**) (in mixture) and  $\beta$ -sitosterol glycoside (**CEH-10**). From the **FA** fraction were isolated and identified the indole alkaloids *N-trans-p*-coumaroyl-tryptamine (**CEA-1**), *N-trans-p*-coumaroyl-5-hydroxytryptamine (**CEA-2**), *N-trans*-4-methoxy-cinnamoyl-5-hydroxytryptamine (**CEA-3**), *N-trans*-feruloyl-5-hydroxytryptamine (moschamine) (**CEA-4**) and *N-trans*-feruloyl-3,5-dihydroxyindolin-

2-one (**CEA-5**); the flavonoids 3-O-methyl kaempferol (**CEA-6**), 3-O-methyl quercetin (**CEA-7**), 3,7-di-O-methyl quercetin (**CEA-8**) and 3,3'-di-O-methyl quercetin (**CEA-9**) and the benzoic acid derivatives 4-hydroxybenzoic acid (**CEA-10**), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**CEA-11**) and 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (**CEA-12**). The **CEH-2**, **CEH-3** and **CEA-5** are new compounds in the literature while **CEA-3** was isolated from a natural product for the first time.

Behavioral tests were performed with the crude extract in young mice: pharmacological screening, motor activity, hexobarbital-induced sleeping time, motor coordination and elevated plus maze. In pharmacological screening the extract showed stimulating effect at low doses by both intraperitoneal and oral administration and toxicity evident in larger intraperitoneal doses. The motor activity evaluation results have not confirmed the stimulating action found in the screening and indicated a depressing effect at a 50 mg/kg dose. Significant differences were not found in the evaluated parameters in the motor coordination and hexobarbital-induced sleeping time tests, but only signs of depressing effect at a 50 mg/kg dose in this last test. The elevated plus maze test showed contradictory results without the prevalence of depressing or stimulating effect.

The antioxidant capacity of the crude extract was determined for the fractions obtained from the liquid/liquid partition and from the **FA** fraction isolated compounds. The  $IC_{50}$  value for **EB** was 167.6  $\mu\text{g/mL}$  and 48.9  $\mu\text{g/mL}$  for **FA**, the most active fraction. The most active compounds were **CEA-2** ( $IC_{50}$  of  $10.7 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ ), **CEA-3** ( $IC_{50}$  of  $17.5 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ ), **CEA-4** ( $IC_{50}$  of  $14.5 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ ), **CEA-7** ( $IC_{50}$  of  $9.2 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ ), **CEA-8** ( $IC_{50}$  of  $11.0 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ ) and **CEA-12** ( $IC_{50}$  of  $20.2 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ ).

The indole alkaloids isolated from the **FA** fraction were tested against a strain of human colon tumor cells HCT-116 by sulforhodamine assay, highlighting the *N-trans*-4-methoxy-cinnamoyl-5-hydroxytryptamine with  $IC_{50}$  of 29.3  $\mu\text{g/mL}$  and death of 90% of tumor cells at a concentration of 72  $\mu\text{g/mL}$ .

## FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Árvore de velame ( <i>C. echiodes</i> ) no município de Lagoa Real-BA (a), detalhes do caule (b) e folhas e flores (c).....                                    | 5  |
| <b>Figura 2:</b> Compostos isolados de <i>C. lechleri</i> .....   | 9  |
| <b>Figura 3:</b> Compostos isolados de <i>C. cajucara</i> .....   | 11 |
| <b>Figura 4:</b> Compostos isolados de <i>C. urucurana</i> .....  | 13 |
| <b>Figura 5:</b> Compostos isolados de <i>C. sonderianus</i> .....  | 14 |
| <b>Figura 6:</b> Compostos isolados de <i>C. zehntneri</i> .....  | 15 |
| <b>Figura 7:</b> Diterpenos isolados de <i>C. campestris</i> .....  | 16 |
| <b>Figura 8:</b> Compostos isolados de <i>C. moritibensis</i> .....   | 16 |
| <b>Figura 9:</b> Compostos isolados de <i>C. muscicapa</i> .....  | 17 |
| <b>Figura 10:</b> Diterpenos isolados de <i>Croton nepetifolius</i> .....   | 17 |
| <b>Figura 11:</b> Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH dos extratos de <i>C. echioides</i> na concentração de 150 µg/mL em relação ao líquido extrator.....           | 39 |
| <b>Figura 12:</b> Teor de resíduo seco dos extratos de <i>C. echioides</i> com vários líquidos extratores.....  | 40 |
| <b>Figura 13:</b> CCD da partição líquido-líquido do EB de <i>C. echioides</i> .....  | 40 |
| <b>Figura 14:</b> Comparação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH das frações FAQ, FB, FA, FD e FH na concentração de 150 µg/mL. Controle positivo vitamina C..... | 41 |
| <b>Figura 15:</b> CCD das frações obtidas da purificação da FA de 1 a 26, eluída com clorofórmio: metanol (85:15; v/v) e revelada com solução metanólica de DPPH.....           | 42 |
| <b>Figura 16:</b> Espectro de massas (ESI-MS) da substância <b>CEH-1</b> , no modo positivo.....  | 43 |
| <b>Figura 17:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-1</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....   | 44 |
| <b>Figura 18:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEH-1</b> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....  | 45 |
| <b>Figura 19:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>CEH-1</b> (75,5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....  | 47 |
| <b>Figura 20:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-1</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....   | 47 |
| <b>Figura 21:</b> Espectro de ESI-MS da substância <b>CEH-2</b> , no modo positivo.....   | 49 |
| <b>Figura 22:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-2</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....   | 50 |
| <b>Figura 23:</b> Ampliação parcial do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-2</b> .....   | 51 |
| <b>Figura 24:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEH-2</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....  | 51 |
| <b>Figura 25:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>CEH-2</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....  | 53 |
| <b>Figura 26:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-2</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....   | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 27:</b> Espectro de HMBC da substância <b>CEH-2</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....   | 55 |
| <b>Figura 28:</b> Principais correlações observadas no espectro de HMBC da substância <b>CEH-2</b> . .....                                    | 55 |
| <b>Figura 29:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-3</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                           | 58 |
| <b>Figura 30:</b> Ampliação parcial do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-3</b> . .....                                   | 58 |
| <b>Figura 31:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEH-3</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....  | 60 |
| <b>Figura 32:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>CEH-3</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                  | 61 |
| <b>Figura 33:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-3</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....   | 62 |
| <b>Figura 34:</b> Ampliação parcial do espectro de HMBC da substância <b>CEH-3</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                      | 63 |
| <b>Figura 35:</b> Ampliação parcial do espectro de HMBC da substância <b>CEH-3</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                      | 64 |
| <b>Figura 36:</b> Espectro de ESI-MS da substância <b>CEH-3</b> no modo positivo. ....  | 66 |
| <b>Figura 37:</b> Espectro de ESI-MS da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> , no modo positivo. ....                                     | 68 |
| <b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....          | 70 |
| <b>Figura 39:</b> Ampliação parcial do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> . .....                  | 70 |
| <b>Figura 40:</b> Espectro de COSY da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                           | 71 |
| <b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). ..... | 74 |
| <b>Figura 42:</b> Espectro de HSQC da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).<br>75                          |    |
| <b>Figura 43:</b> Espectro de HMBC da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                          | 76 |
| <b>Figura 44:</b> Principais correlações do espectro de HMBC de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> . ....  | 76 |
| <b>Figura 45:</b> Espectro de NOESY da mistura de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                         | 77 |
| <b>Figura 46:</b> Principais correlações do espectro de NOESY de <b>CEH-4a</b> e <b>CEH-4b</b> . ....   | 78 |
| <b>Figura 47:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>CEH-5</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                           | 82 |
| <b>Figura 48:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEH-5</b> (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....  | 83 |
| <b>Figura 49:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>CEH-5</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....                  | 85 |
| <b>Figura 50:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-5</b> (75,5 MHz; CDCl <sub>3</sub> ). .....   | 85 |
| <b>Figura 51:</b> Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância <b>CEH-5</b> . ....  | 87 |
| <b>Figura 52:</b> Espectro de ESI-MS, no modo negativo, da substância <b>CEH-6</b> . ....   | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 53:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEH-6</b> (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                             | 89  |
| <b>Figura 54:</b> Ampliação parcial do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>CEH-6</b> (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                   | 90  |
| <b>Figura 55:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEH-6</b> (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....  | 91  |
| <b>Figura 56:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEH-6</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                  | 92  |
| <b>Figura 57:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-6</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....   | 93  |
| <b>Figura 58:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEH-7</b> (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                             | 95  |
| <b>Figura 59:</b> Ampliação parcial do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <b>CEH-7</b> (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                   | 95  |
| <b>Figura 60:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEH-7</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                  | 97  |
| <b>Figura 61:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEH-7</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....   | 99  |
| <b>Figura 62:</b> Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância <b>CEH-7</b> . .....   | 100 |
| <b>Figura 63:</b> Cromatograma de íons totais (TIC), no modo positivo, da FH-2.4.6. ....  | 102 |
| <b>Figura 64:</b> Espectro de GC-EI-MS das substâncias <b>CEH-8</b> e <b>CEH-9</b> . .....  | 102 |
| <b>Figura 65:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT das substâncias <b>CEH-8</b> e <b>CEH-9</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). ..... | 103 |
| <b>Figura 66:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>CEH-10</b> (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....                        | 104 |
| <b>Figura 67:</b> Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância <b>CEH-10</b> . .....  | 104 |
| <b>Figura 68:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-1</b> no modo positivo. .....  | 107 |
| <b>Figura 69:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-1</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                      | 108 |
| <b>Figura 70:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-1</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                     | 109 |
| <b>Figura 71:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-1</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....           | 110 |
| <b>Figura 72:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-1</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                    | 112 |
| <b>Figura 73:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-2</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                      | 114 |
| <b>Figura 74:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-2</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                     | 115 |
| <b>Figura 75:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-2</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....           | 116 |
| <b>Figura 76:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-2</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                    | 118 |
| <b>Figura 77:</b> Espectro de ESI-MS da substância <b>CEA-2</b> no modo positivo. .....   | 119 |
| <b>Figura 78:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-3</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                      | 121 |
| <b>Figura 79:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-3</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                     | 122 |
| <b>Figura 80:</b> Espectro de NOE da substância <b>CEA-3</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                      | 123 |
| <b>Figura 81:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-3</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....           | 124 |
| <b>Figura 82:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-3</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....                                    | 125 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 83:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-3</b> no modo positivo. ....   | 126 |
| <b>Figura 84:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <b>CEA-4</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                        | 128 |
| <b>Figura 85:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-4</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                            | 129 |
| <b>Figura 86:</b> Espectro de NOESY 2D da substância <b>CEA-4</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                        | 130 |
| <b>Figura 87:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-4</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....  | 131 |
| <b>Figura 88:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-4</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                           | 133 |
| <b>Figura 89:</b> Espectro de ESI-MS da substância <b>CEA-4</b> , modo positivo. ....   | 134 |
| <b>Figura 90:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-5</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....             | 135 |
| <b>Figura 91:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-5</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                            | 136 |
| <b>Figura 92:</b> Espectro de NOESY 2D da substância <b>CEA-5</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                        | 137 |
| <b>Figura 93:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-5</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....  | 138 |
| <b>Figura 94:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-5</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                           | 139 |
| <b>Figura 95:</b> Espectro de HMBC da substância <b>CEA-5</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                           | 140 |
| <b>Figura 96:</b> Correlações importantes no HMBC da <b>CEA-5</b> . ....  | 140 |
| <b>Figura 97:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-5</b> , modo positivo. ....  | 142 |
| <b>Figura 98:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-6</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....             | 143 |
| <b>Figura 99:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-6</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                            | 144 |
| <b>Figura 100:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-6</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .... | 145 |
| <b>Figura 101:</b> Espectro de ESI-MS da substância <b>CEA-6</b> no modo positivo. ....   | 147 |
| <b>Figura 102:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-6</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                          | 147 |
| <b>Figura 103:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-7</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....            | 148 |
| <b>Figura 104:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-7</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                           | 149 |
| <b>Figura 105:</b> Espectro de NOESY de <b>CEA-7</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                                     | 150 |
| <b>Figura 106:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-7</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .... | 151 |
| <b>Figura 107:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-7</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                          | 152 |
| <b>Figura 108:</b> Espectro de ESI-MS do flavonoide <b>CEA-7</b> , no modo positivo. ....   | 154 |
| <b>Figura 109:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-8</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....            | 156 |
| <b>Figura 110:</b> Espectro de COSY de <b>CEA-8</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                                      | 157 |
| <b>Figura 111:</b> Espectro de NOESY 2D de <b>CEA-8</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                                  | 158 |
| <b>Figura 112:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT de <b>CEA-8</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....            | 159 |
| <b>Figura 113:</b> Espectro de HMQC de <b>CEA-8</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....                                     | 159 |
| <b>Figura 114:</b> Espectro ESI-MS do flavonoide <b>CEA-8</b> no modo positivo. ....  | 161 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 115:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-8</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ )....  | 163 |
| <b>Figura 116:</b> Espectro de COSY da substância <b>CEA-9</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....  | 163 |
| <b>Figura 117:</b> Espectro de NOESY 2D da substância <b>CEA-9</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ )....   | 164 |
| <b>Figura 118:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-9</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....  | 165 |
| <b>Figura 119:</b> Espectro de HMQC da substância <b>CEA-9</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....   | 166 |
| <b>Figura 120:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-9</b> no modo positivo. ....  | 167 |
| <b>Figura 121:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-10</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ )..   | 168 |
| <b>Figura 122:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-11</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).  | 169 |
| <b>Figura 123:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>CEA-12</b> (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ )..   | 170 |
| <b>Figura 124:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>CEA-10</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....  | 171 |
| <b>Figura 125:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT da substância <b>CEA-11</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....   | 171 |
| <b>Figura 126:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>CEA-12</b> (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....  | 172 |
| <b>Figura 127:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-10</b> no modo negativo.....  | 173 |
| <b>Figura 128:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-11</b> no modo positivo. ....   | 173 |
| <b>Figura 129:</b> Espectro ESI-MS da substância <b>CEA-12</b> no modo positivo. ....   | 174 |
| <b>Figura 130:</b> Resultados do teste de atividade motora de camundongos jovens (n= 10) tratados agudamente com água (controle) e doses de 10 e 50 mg/kg de extrato liofilizado de CE (via i.p).....   | 176 |
| <b>Figura 131:</b> Resultados do teste de atividade antitumoral HCT-116 dos alcaloides <b>CEA-1 a CEA-4</b> . ....  | 186 |
| <b>Figura 132:</b> CCD em cromatoplaça de gel de sílica 60 F <sub>254</sub> comparativa entre: A - extrato bruto; B - diterpeno <b>CEH-2</b> e C - lupeol, eluída com hexano:diclorometano:metanol (6:3:1; v/v) e revelada com anisaldeído sulfúrico..... | 187 |

## ESQUEMAS

- Esquema 1:** Partição do extrato bruto com solventes de polaridade crescente de *echioides*. .....23
- Esquema 2:** Fracionamento da FH por cromatografia em coluna com solventes de polaridade crescente. ....23
- Esquema 3:** Fracionamento e obtenção da substância **CEH-1** a partir da fração FH-1. ....24
- Esquema 4:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-5, CEH-6, CEH-8, e CEH-9** a partir da fração FH-2.....25
- Esquema 5:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-3, CEH-4a e CEH-4b** a partir da FH-3. ....26
- Esquema 6:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-2 e CEH-10** a partir da fração FH-4. ....27
- Esquema 7:** Fracionamento da FA por cromatografia em coluna empregando-se Sephadex LH-20. ....28
- Esquema 8:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-5, CEA-10, CEA-11 e CEA-12** a partir da FA-9.....29
- Esquema 9:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-3 e CEA-4** a partir da FA-17.....30
- Esquema 10:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-8 e CEA-9** a partir da FA-18.....31
- Esquema 11:** Fracionamento e obtenção da substância **CEA-2** a partir da FA-19. .31
- Esquema 12:** Fracionamento e obtenção da substância **CEA-7** a partir da FA-20 ..32

## TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da substância <b>CEH-1</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{H}}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).....                                | 46 |
| <b>Tabela 2:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>CEH-1</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ (150 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).....                         | 48 |
| <b>Tabela 3:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da substância <b>CEH-2</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{H}}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).....                                | 52 |
| <b>Tabela 4:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>CEH-2</b> .....   | 56 |
| <b>Tabela 5:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY de <b>CEH-3</b> .....   | 59 |
| <b>Tabela 6:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) da <b>CEH-3</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o nasimalun B (150 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (HASAN et al., 2000). .....                            | 65 |
| <b>Tabela 7:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY para o <b>CEH-4a</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{H}}$ (600 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) para o 20-O-metil-ptychonal-acetal descritos na literatura (TANG et al., 2008)..... | 72 |
| <b>Tabela 8:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da <b>CEH-4b</b> comparados com os dados descritos na literatura para o ptychonal (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008). .....   | 73 |
| <b>Tabela 9:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-4a</b> comparados com os dados descritos na literatura para o 20-O-metil-ptychonal-acetal (150 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008). .....                                  | 79 |
| <b>Tabela 10:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-4b</b> comparados com os dados descritos na literatura para o 20-O-metil-ptychonal-acetal (150 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008). .....                                 | 80 |
| <b>Tabela 11:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no espectro de COSY de <b>CEH-5</b> . .....  | 84 |
| <b>Tabela 12:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-5</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) para o éster metílico do ácido hardwickico descritos na literatura (COSTA et al., 1998). .....      | 86 |
| <b>Tabela 13:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e COSY (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-6</b> , comparados com os valores descritos na literatura de $\delta_{\text{H}}$ (400 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) para o <i>trans</i> -1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (HEYMANN et al., 1994).....          | 90 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 14:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) da <b>CEH-6</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o <i>trans</i> -1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (100 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (HEYMANN et al., 1994). .....   | 93  |
| <b>Tabela 15:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-7</b> . .....   | 96  |
| <b>Tabela 16:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) da <b>CEH-7</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o lupeol (50,3 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (CARVALHO et al., 1998). .....  | 98  |
| <b>Tabela 17:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>CEH-8</b> , <b>CEH-9</b> e <b>CEH-10</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (25,2 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) descritos por Wright et al. (1978) e $\beta$ -sitosterol glicosilado (25,2 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) descrito por Iribarren e Pomilio (1983).<br>105 |     |
| <b>Tabela 18:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da substância <b>CEA-1</b> . .....  | 108 |
| <b>Tabela 19:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da <b>CEA-1</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o <i>N-trans-p</i> -coumaroil-triptamina (100 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ANDRIANAIVORAVELONA et al, 1999). .....   | 111 |
| <b>Tabela 20:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da <b>CEA-2</b> . .....   | 114 |
| <b>Tabela 21:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da <b>CEA-2</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para o <i>N-trans-p</i> -coumaroil-5-hidroxitriptamina (125 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ZHANG et al, 1997). .....   | 117 |
| <b>Tabela 22:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da substância <b>CEA-3</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{H}}$ para o <i>N-trans</i> -4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (300 MHz; $\text{Me}_2\text{CO-D}_6$ ) descritos na literatura (JENETT-SIEMS et al, 2003). .....   | 123 |
| <b>Tabela 23:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz), em $\text{CD}_3\text{OD}$ , de <b>CEA-3</b> . .....  | 126 |
| <b>Tabela 24:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D da substância <b>CEA-4</b> . .....   | 129 |
| <b>Tabela 25:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; em $\text{CD}_3\text{OD}$ ), da substância <b>CEA-4</b> , comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ para a moschamina (125 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ZHANG et al, 1997). .....   | 132 |
| <b>Tabela 26:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da substância <b>CEA-5</b> . .....  | 137 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 27:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>CEA-5</b> .....   | 141 |
| <b>Tabela 28:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da <b>CEA-6</b> , comparados com os dados da literatura (LEE et al., 2003). para o 3-O-metilcanferol (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....   | 144 |
| <b>Tabela 29:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>CEA-6</b> comparados com os dados da literatura (LEE et al., 2003) para o 3-O-metilcanferol (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ). .....   | 146 |
| <b>Tabela 30:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D de <b>CEA-7</b> comparados com dados reportados na literatura (LEE et al., 2003) para a 3-O-metilquercetina (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....  | 149 |
| <b>Tabela 31:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e HMQC (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>CEA-7</b> comparados com os valores de $\delta_{\text{C}}$ da 3-O-metilquercetina (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da literatura (LEE et al., 2003). .....   | 153 |
| <b>Tabela 32:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D de <b>CEA-8</b> comparados com os $\delta_{\text{H}}$ da 3,7-di-O-metilquercetina (500 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ) descritos na literatura (GRAYER et al., 2010).....   | 157 |
| <b>Tabela 33:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e HMQC (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ), de <b>CEA-8</b> , comparados com dados de $\delta_{\text{C}}$ (125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ) reportados na literatura para a 3,7-di-O-metilquercetina (GRAYER et al., 2010). .....  | 160 |
| <b>Tabela 34:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY da substância <b>CEA-9</b> . .....  | 164 |
| <b>Tabela 35:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>CEA-9</b> comparados com dados de $\delta_{\text{C}}$ para a 3,3'-di-O-metilquercetina (50,6 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ) reportados na literatura (WANG et al., 1989).....   | 166 |
| <b>Tabela 36:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) das substâncias <b>CEA-10</b> , <b>CEA-11</b> e <b>CEA-12</b> comparados com os dados de $\delta_{\text{H}}$ da literatura para os ácidos <i>p</i> -salicílico (500 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ), vanílico (200 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e siríngico (500 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (TAN et al., 2004; ALBARICI, 2006). ..... | 170 |
| <b>Tabela 37:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias <b>CEA-10</b> , <b>CEA-11</b> e <b>CEA-12</b> . .....  | 172 |
| <b>Tabela 38:</b> Resultados obtidos do teste <i>screening</i> farmacológico do extrato bruto de <i>C. echinoides</i> em camundongos machos jovens.....  | 175 |
| <b>Tabela 39:</b> Resultados obtidos do teste de tempo de sono barbitúrico do extrato de CE em camundongos machos jovens. ....   | 177 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 40:</b> Resultados obtidos do teste de tempo de coordenação motora do extrato de CE em camundongos machos jovens.....                        | 177 |
| <b>Tabela 41:</b> Dados parciais do teste de labirinto em cruz elevado em camundongos tratados por 7 dias com água e duas doses de extrato de CE. .... | 178 |
| <b>Tabela 42:</b> Dados parciais do teste de labirinto em cruz elevado em camundongos tratados por 7 dias com água e duas doses de extrato de CE. .... | 178 |
| <b>Tabela 43:</b> Atividade antioxidante do EB e das frações FAQ, FB, FA, FD e FH comparados com o trolox.....   | 180 |
| <b>Tabela 44:</b> Atividade antioxidante dos flavonoides <b>CEA-6</b> a <b>CEA-9</b> comparados com o trolox. ....                                     | 182 |
| <b>Tabela 45:</b> Atividade antioxidante dos derivados de ácido benzóico <b>CEA-10</b> a <b>CEA-12</b> comparados com o trolox.....                    | 183 |
| <b>Tabela 46:</b> Atividade antioxidante dos alcaloides <b>CEA-1</b> a <b>CEA-5</b> comparados com o trolox. ....                                      | 184 |
| <b>Tabela 47:</b> Atividade citotóxica dos alcaloides isolados <b>CEA-1</b> a <b>CEA-5</b> . ....  | 185 |
| <b>Tabela 48:</b> Resultados do controle de qualidade do lenho de <i>C. echinoides</i> . ....  | 187 |

## ABREVIATÖES

|                  |  |
|------------------|--|
| $\delta$         | Deslocamento químico, em ppm   |
| CC               | Coluna cromatográfica  |
| CCD              | Cromatografia em camada delgada  |
| COSY             | Correlation spectroscopy   |
| <i>d</i>         | Dupleto  |
| <i>dd</i>        | Duplo dupleto  |
| <i>ddd</i>       | Duplo duplo dupleto  |
| DEPT             | <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>   |
| ESI-MS           | Espectrometria de massas acoplada a ionização electrospray   |
| GC-EI-MS         | Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico  |
| GC-MS            | Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas                                       |
| HETCOR           | <i>Heteronuclear spectroscopy</i>  |
| HMBC             | <i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>   |
| HMQC             | <i>Heteronuclear spectroscopy quantum coherence</i>  |
| HSCCC            | <i>High Speed Counter Current Chromatography</i> – Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade |
| IC <sub>50</sub> | Concentração inibitória de 50% dos individuos analisados   |
| ip               | Intraperitoneal  |
| <i>J</i>         | Constante de acoplamento, em Hertz   |
| <i>m</i>         | Multipeto  |
| <i>m/z</i>       | razão massa carga  |
| n                | Número de repetições   |
| NOESY            | <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>  |
| RMN              | Ressonância magnética nuclear  |
| s                | Simpleto   |
| <i>s/</i>        | Simpleto largo   |
| TMS              | Tetrametilsilano   |
| UV               | Ultravioleta   |

## SUMARIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.1 ASPECTOS GERAIS .....</b>   | <b>6</b>  |
| 2.1.1 Família Euphorbiaceae.....   | 6         |
| 2.1.2 Gênero <i>Croton</i> .....   | 6         |
| <b>2.2 ASPECTOS QUÍMICOS, FARMACOLÓGICOS E USO TRADICIONAL DO GÊNERO CROTON.....</b> | <b>7</b>  |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>   | <b>18</b> |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 18        |
| <b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>19</b> |
| 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 19        |
| 4.1.1 Cromatografia líquida de média pressão (MPLC) .....                            | 19        |
| 4.1.2 Cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC).....                   | 19        |
| 4.1.3 Cromatografia a pressão normal .....   | 20        |
| 4.1.4 Cromatografia “flash” .....  | 20        |
| 4.1.5 Cromatografia a vácuo (CLV).....   | 20        |
| 4.1.6 Cromatografia em camada delgada analítica .....                                | 20        |
| 4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....                                  | 21        |
| 4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO .....   | 21        |
| 4.3.1 Material vegetal .....   | 21        |
| 4.3.2 Avaliação do solvente extrator .....   | 21        |
| 4.3.3 Preparação e partição do extrato bruto .....                                   | 22        |
| 4.3.4 Estudo da fração FH .....  | 23        |
| 4.3.5 Estudo da fração FA.....   | 28        |
| 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....   | 32        |
| 4.4.1 Testes comportamentais .....   | 32        |
| 4.4.1.1 <i>Screening</i> farmacológico .....   | 32        |
| 4.4.1.2 Atividade motora.....  | 33        |
| 4.4.1.3 Tempo de sono barbitúrico .....  | 33        |
| 4.4.1.4 Coordenação motora .....   | 33        |
| 4.4.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado.....                                      | 34        |
| 4.4.2 Atividade antioxidante .....   | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.2.1 Avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH ..... | 34        |
| 4.4.2.2 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH em CCD .....       | 35        |
| 4.4.3 Avaliação da atividade citotóxica.....                              | 35        |
| 4.4.3.1 Cultura de células .....  | 35        |
| 4.4.3.2 Avaliação da citotoxicidade sobre células HCT-116 .....           | 35        |
| 4.5 CONTROLE DE QUALIDADE .....   | 36        |
| 4.5.1 Resíduo seco .....  | 36        |
| 4.5.2 Granulometria média.....  | 36        |
| 4.5.3 Perda por dessecação .....  | 37        |
| 4.5.4 Teor de extrativos.....   | 37        |
| 4.5.5 Cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido .....                    | 38        |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 38        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                      | <b>39</b> |
| 5.1 AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO EXTRATOR .....                                   | 39        |
| 5.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES.....                                     | 41        |
| 5.2.1 Fracionamento e isolamento de substâncias a partir da FH .....      | 41        |
| 5.2.2 Fracionamento e isolamento de substâncias a partir da FA.....       | 41        |
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FH ...           | 42        |
| 5.3.1 Diterpeno CEH-1 .....   | 43        |
| 5.3.2 Diterpeno CEH-2.....  | 49        |
| 5.3.3 Diterpeno CEH-3.....  | 57        |
| 5.3.4 Diterpenos CEH-4a e CEH-4b .....                                    | 67        |
| 5.3.5 Diterpeno CEH-5.....  | 81        |
| 5.3.6 Sesquiterpeno CEH-6 .....   | 88        |
| 5.3.7 Triterpeno CEH-7 .....  | 94        |
| 5.3.8 Esteroides CEH-8, CEH-9 e CEH-10 .....                              | 101       |
| 5.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FA .             | 106       |
| 5.4.1 Alcaloide CEA-1 .....   | 106       |
| 5.4.2 Alcaloide CEA-2 .....   | 113       |
| 5.4.3 Alcaloide CEA-3.....  | 120       |
| 5.4.4 Alcaloide CEA-4 .....   | 127       |
| 5.4.5 Alcaloide CEA-5 .....   | 135       |
| 5.4.6 Flavonoide CEA-6 .....  | 143       |
| 5.4.7 Flavonoide CEA-7 .....  | 148       |

|   |            |
|---|------------|
| 5.4.8 Flavonoide CEA-8 .....  | 155        |
| 5.4.9 Flavonoide CEA-9 .....  | 162        |
| 5.4.10 Derivados de ácido benzóico CEA-10, CEA-11 e CEA-12.....                                   | 168        |
| 5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....  | 175        |
| 5.5.1 Testes comportamentais .....  | 175        |
| 5.5.1.1 Screening farmacológico .....   | 175        |
| 5.5.1.2 Atividade motora.....   | 176        |
| 5.5.1.3 Tempo de sono barbitúrico .....   | 176        |
| 5.5.1.4 Coordenação motora .....  | 177        |
| 5.5.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado .....  | 177        |
| 5.5.2 Atividade antioxidante .....  | 179        |
| 5.5.2.1 Capacidade antioxidante do Extrato Bruto (EB) e das frações FAQ,<br>FB, FA, FD e FH ..... | 180        |
| 5.5.2.2 Atividade antioxidante dos flavonoides CEA-6 a CEA-9.....                                 | 181        |
| 5.5.2.3 Atividade antioxidante dos derivados de ácido benzóico CEA-10 a<br>CEA-12. ....           | 183        |
| 5.5.2.4 Atividade antioxidante dos alcaloides CEA-1 a CEA-5.....                                  | 184        |
| 5.5.3 Atividade citotóxica dos alcaloides CEA-1 a CEA-5.....                                      | 185        |
| 5.6 CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL.....   | 186        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>188</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>189</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para tratamento de doenças, sendo estas frequentemente empregadas em serviços primários e atendimento básico em saúde. Em regiões de difícil acesso ou em áreas pobres onde os serviços de saúde são limitados, as plantas medicinais têm tido ampla utilização e por vezes são os únicos medicamentos disponíveis. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 80% da população de alguns países da Ásia e África dependem da medicina tradicional para o atendimento primário em saúde, onde as plantas medicinais correspondem a maior proporção (BRASIL, 2006).

Motivado por questões como custo e pela atual comprovação pela ciência da eficácia de várias espécies vegetais, mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis, o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (HEINRICH, 2010; TROVO et al., 2003) como pode ser visto pelo aumento de publicações em periódicos especializados de alto impacto (NEWMAN e CRAGG, 2007).

No Brasil o uso das plantas medicinais é bastante comum em várias camadas populacionais. O conhecimento de plantas medicinais é de domínio popular e está geralmente associado a um forte componente cultural, existindo ainda a crença que além de possuírem atividade terapêutica são desprovidas de efeitos tóxicos, por estarem sendo utilizadas ao longo de décadas.

A OMS reconhece a importância e estimula o uso das plantas medicinais pela população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso pela distribuição de manuais para orientar estudos científicos, que confirmem sua segurança e eficácia clínica (CALIXTO, 2001).

Por outro lado, plantas medicinais constituem importantes fontes de novos medicamentos para a indústria farmacêutica (KINGSTON, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2007). O crescente interesse pelo uso, criou a necessidade de uma melhor precisão no preparo e na avaliação, e tem estimulado a pesquisa com plantas, como seus usos e aplicações (VLIENTINCK, et al., 2009; SOUZA-MOREIRA et al., 2008).

Como exemplos gerais pode-se citar que na China, 30 a 50% do consumo medicinal total são preparações tradicionais de plantas. Na Europa, América do Norte e em outras regiões industrializadas, mais de 50% da população já utilizou, ao

menos uma vez, a chamada medicina alternativa ou complementar. Na Alemanha, 90% da população já utilizaram um remédio natural. O mercado global de medicamentos a base de plantas ultrapassa 60 bilhões de dólares anualmente e está crescendo continuamente. Estima-se que 25% dos medicamentos atuais são feitos de plantas utilizadas primeiramente na medicina tradicional (BAGOZZI, 2005).

A não regulamentação do setor ou o uso inapropriado das chamadas medicinas e práticas tradicionais, podem ter efeitos negativos e perigosos. Como exemplos temos a erva “Ma Huang” (efedra) que é tradicionalmente utilizada na China para congestão respiratória. Nos Estados Unidos, essa erva foi comercializada como um auxiliar dietético, cuja overdose conduziu a doze mortes, no mínimo, por ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais. Na Bélgica, no mínimo, setenta pessoas necessitaram de transplante renal ou diálise devido à fibrose intersticial do rim, após tomar uma preparação feita com espécies erradas de plantas que eram utilizadas para o tratamento emagrecedor (BAGOZZI, 2005). Segundo artigos publicados pelo EMEA (1997, 2000), a planta responsável por este problema renal é do gênero *Aristolochia* e o composto químico associado é o ácido aristolóquico (DEBELLE et al., 2008). Outro exemplo é o caso dos efeitos nefro e hepatotóxico causados pela utilização do confrei (*Symphytum officinale* L. – Boraginaceae) que tiveram repercussão nacional (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005).

Este contexto mostra que o uso popular, ou mesmo tradicional, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Para isso devem ser desenvolvidos estudos toxicológicos, farmacológicos, pré-clínicos, e químicos visando estabelecer a composição química bem como a toxicidade e a eficácia terapêutica da planta (KLEIN et al., 2009; LAPA et al., 2001).

A otimização de recursos e procedimentos com intuito de garantir à população produtos eficazes, seguros e com qualidade tem sido um esforço coletivo por parte dos pesquisadores e do governo brasileiro. Em 1983 teve início o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (vinculado à antiga CEME/MS), o qual lançou as bases de integração entre governo e instituições de pesquisa. Atualmente o governo brasileiro tem estimulado o desenvolvimento e consumo de fitoterápicos, bem como incentivado o cultivo, pesquisa e capacitação humana em prol de inovações e geração de tecnologia em plantas medicinais através da elaboração de diretrizes como a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS

(BRASIL, 2006a), criada pelo Ministério da Saúde em 2006, aprovada por meio do decreto n. 5813, de 22 de junho 2006, (BRASIL, 2006b).

Os produtos de origem natural, com reputadas ações afrodisíacas, sempre foram alvo de grande interesse da terapêutica e mesmo da indústria farmacêutica mundial, sendo procurados e estudados há milênios. Entre as espécies vegetais da biodiversidade brasileira com interesse popular e comercial pelo potencial de seus efeitos afrodisíacos encontra-se a marapuama, cascas das raízes de *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae), droga vegetal que vem sendo comercializada e exportada desde o início do século XX, quando já sofria falsificação por substituição por raízes de goiabeira (SILVA, 1925), e que posteriormente foi oficializada na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926).

Diversos estudos têm evidenciado ações dessa droga vegetal no sistema nervoso central, de forma a embasarem o efeito afrodisíaco, popularmente atribuído (TOYOTA et al., 1979; PAIVA et al., 1998; SILVA et al., 2004; PIATO et al., 2009; PIATO et al., 2010). O interesse neste efeito e o folclore temático da Amazônia brasileira têm mantido esta espécie em evidência (CHARAM, 1987; POZZOLI, 1999). Em vista disso, sua comercialização e exportação vêm sendo mantida há décadas na forma de exploração contínua. Devido a isto e por ser endêmica da flora amazônica, o emprego das raízes e a falta de iniciativas de cultivo para abastecimento dessa demanda devem ter levado à sua redução expressiva em termos de ocorrência na natureza.

Quando essa situação se configura, geralmente o mercado busca alternativas de fornecimento, acabando por desencadear a substituição da espécie verdadeira por outra com as mesmas indicações, embora nem sempre similares quimicamente. No caso de *P. olacoides*, a substituição comercial levou à exploração de caules, inicialmente ofertados da própria espécie, numa estratégia de evitar a destruição dos exemplares pela retirada das raízes e, posteriormente, caules de *Croton echioides* Baill., família Euphorbiaceae, originária do interior da Bahia. Vale destacar que ambas não tem nada em comum, não pertencem ao mesmo grupo botânico, nem ocorrem na mesma região, embora sejam popularmente utilizadas para os mesmos fins terapêuticos.

Neste contexto, escolheu-se como objeto de estudos neste trabalho a espécie vegetal *Croton echioides* (Figura 1), conhecida popularmente na região nordeste do

Brasil como velame, quebra-faca, caatinga-branca e canela-de-velho. É uma espécie restrita ao bioma Caatinga, ocorrendo no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Bahia e Minas Gerais em vegetações de caatingas arbustivas a arbóreas (BARBOSA et al., 2007; AGUIAR e SANTOS, 2007; SILVA et al., 2009).

Os caules de *C. echiodes* tem uso na medicina tradicional bastante difundido como tônico e afrodisíaco. Entretanto, não foi encontrado na literatura científica nenhum registro de estudos químicos ou farmacológicos que pudessem respaldar a utilização popular atribuída à espécie.

Desta forma, esta espécie vegetal necessita de estudos que possam suportar ou restringir o seu emprego na medicina popular e ainda gerar conhecimento a seu respeito.



**Figura 1:** Árvore de velame (*C. echiodes*) no município de Lagoa Real-BA (a), detalhes do caule (b) e folhas e flores (c). Foto: Cláudio R Novello, 2008.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS

#### 2.1.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae Juss. é representada por 290 gêneros e cerca de 7500 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente da América e África. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies, de hábito e habitat diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação, se apresentam como árvores, arbustos, subarbustos ou ervas.

Esta família é conhecida em diferentes partes do mundo como medicinal e/ou tóxica incluindo muitas plantas úteis ao homem. Dentre estas se destacam a mamona (*Ricinus communis* L.), originária da região norte-africana e com sementes ricas em óleo, a maniçoba (*Manihot glaziovii* Müll. Arg.) a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a seringueira da Amazônia (*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex. A. Juss.) Müll. Arg.) (SILVEIRA, 1979; BARROSO, 1984; JOLY, 2002). Um grande número de espécies tem sido usado para o tratamento de câncer e tumores desde a época de Hipócrates, com referências publicadas em muitos países (ITOKAWA et al., 1991; SANDOVAL et al., 2002).

#### 2.1.2 Gênero *Croton*

*Croton* é um dos maiores gêneros da família Euphorbiaceae, abrangendo um número considerável de espécies no mundo (cerca de 1200) (WEBSTER, 1994; GOVAERTS, 2000), das quais 400 são reportadas na América tropical e subtropical, desde o sul do México, adentrando pela América Central, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (PINEDO et al., 1997) e cerca de 300 delas abrigadas no Brasil (BERRY, 2005).

O gênero, de acordo com Cronquist (1988), pertence à família Euphorbiaceae, ordem Euphorbiales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida, das Magnoliophytas. A classificação e a diferenciação do gênero são extremamente controversas, pela grande diversidade no plano morfológico, citológico e anatômico (WEBSTER, 1993).

Webster (1993) re-classificou as espécies do gênero *Croton* dividindo-as em 40 seções que, supostamente, refletem melhor os relacionamentos filogenéticos em relação à classificação de Müller (1873). Este gênero compreende árvores,

arbustos, ervas semilenhosas ou ervas. Crescem em uma grande variedade de habitats e de solos, encontram-se frequentemente a beira dos rios e riachos e não se desenvolvem em áreas com inundações periódicas. Preferem os locais alterados, fragmentos de florestas e especialmente os campos de cultivo abandonados onde se convertem em espécies pioneiras (NASCIMENTO, 1999; MEZA e PARIONA, 1999; FORERO et al., 2000; POLLITO, 2004;).

## **2.2 ASPECTOS QUÍMICOS, FARMACOLÓGICOS E USO TRADICIONAL DO GÊNERO *CROTON***

As espécies do gênero *Croton* chamam a atenção pela diversidade de uso popular e de atividade biológica, explicado pela grande diversidade de compostos ativos encontrados nelas. Estas espécies são promissoras segundo a perspectiva química e medicinal e tem atraído grande interesse no seu estudo.

Várias espécies de *Croton* apresentam a exsudação de látex, que é obtido quando se corta a casca, de cor avermelhada em algumas delas. Esta é a razão pela qual estas espécies são conhecidas na região amazônica, especialmente na Bolívia, Colômbia, Equador e Peru como “sangre-de-drago” ou “sangre-de-grado” (SANDOVAL et al., 2002), traduzido para o português como sangue de dragão. O látex é geralmente associado a alguma propriedade medicinal, principalmente cicatrizante. Deve-se ressaltar, entretanto, que o sangue de dragão, extraído originalmente das espécies *Dracaena cinnabari* Balf. f. e *D. draco* (L.) L., foi ao longo do tempo sendo obtido de outras espécies dos gêneros *Croton*, *Daemonorops* e *Pterocarpus*, tornando-se um termo genérico para o exsudato destes quatro distintos gêneros de planta (GUPTA et al., 2008).

No Brasil a principal espécie conhecida que apresenta o látex assemelhado ao descrito é o *Croton lechleri* Müll. Arg., uma das maiores fontes de sangue de dragão na atualidade e a de maior importância econômica. O Peru é o maior produtor mundial desta resina, que é vendida como sendo um produto terapêutico saudável (ROSSI et al., 2003). O sangue de dragão obtido do gênero *Croton* é utilizado como cicatrizante (PORRAS-REYES et al., 2003), para diarreia (HOLODNIY et al., 1999), úlcera gástrica e inflamação intestinal (MILLER et al., 2000), como antimicrobiano e antioxidante (GUPTA et al., 2008). Em regiões tropicais da América do Sul é usado contra certas formas de câncer gastrointestinal.

Esta ação tem sido associada com a atividade citotóxica e antitumoral embora os mecanismos ainda não estejam bem elucidados (CHEN et al., 1994).

Na medicina popular, plantas do gênero *Croton* têm sido empregadas em tratamento de diversas doenças como diarreias, úlceras intestinais e estomacais, faringites, vírus da herpes, hemorróidas, brotoeja e câncer e, usadas como anti-inflamatório, anti-reumático e em fraturas, entre outros empregos (PERDUE et al., 1979; BETOLLO e SCARPATI, 1979; CHEN et al., 1994; PIETERS et al., 1995; WILLIAMS, 2001; GUPTA, 2008).

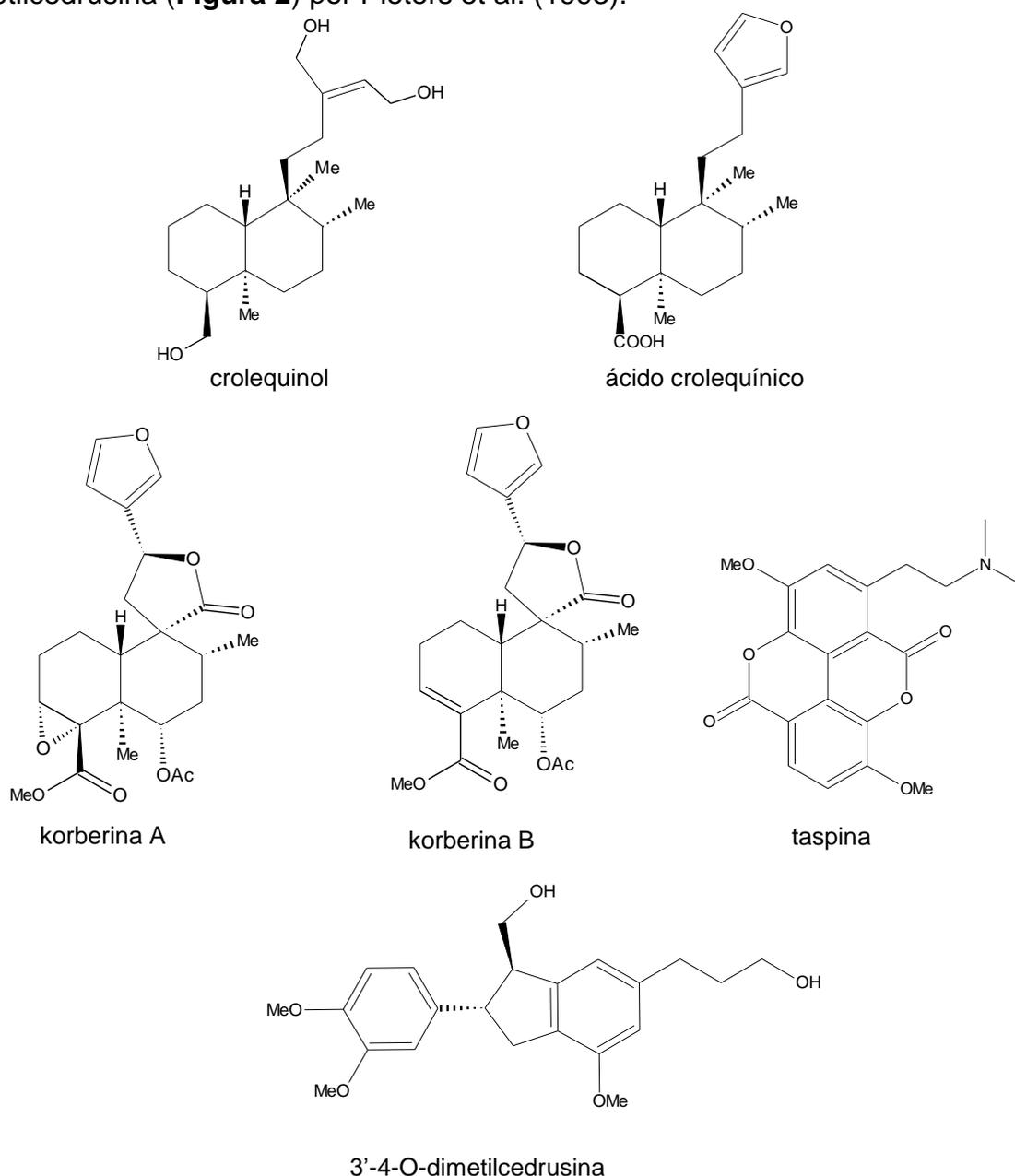
Os principais compostos encontrados no gênero *Croton* são os diterpenos do tipo clerodano (CRAVEIRO et al., 1981). Estruturalmente são diterpenos com a presença de anel furano, sendo que mais de 800 já foram isolados, com um número significativo deles apresentando atividade biológica como antibiótica, antitumoral, inseticida, anti-inflamatória, antinociceptiva, hipoglicêmica, anti-úlceras e cardiovascular (MACIEL et al., 1998a; SILVA et al., 2005). Também são encontrados diterpenos do tipo cleistanano (CRAVEIRO et al., 1982), caurano (GONZALEZ et al., 1981), labdano (ROENGSUMRAM et al., 1999), casbano (MOURA e MONTE 1990), beierano, cembranoide, neoclerodano, halimano, isopimarano, seco-caurano, traquilobano, forbol e atisano (SALATINO et al., 2007). *Croton* também é rico em alcaloides de diversas classes, o que é de grande importância sob a ótica medicinal, e óleos voláteis contendo mono e sesquiterpenoides. Existem ainda relatos de triterpenoides pentacíclicos ou esteroidais. Substâncias fenólicas como flavonoides, lignoides e proantocianidinas também têm suas ocorrências registradas neste gênero (SALATINO et al., 2007).

Estudos diversos com várias espécies de *Croton* têm demonstrado atividades biológicas relevantes tanto em extrato bruto como em compostos puros, comprovando o uso destas plantas na medicina popular. Nesta revisão, buscou-se descrever os dados químicos e etnofarmacológicos de algumas espécies de *Croton*, sem a pretensão de ser de forma exaustiva. Optou-se por priorizar plantas encontradas no Brasil, relevantes sob a ótica química e medicinal, dada a rica diversidade de plantas bioativas deste gênero no mundo.

*Croton lechleri* Müll. Arg. conhecido como sangue de grado, sangue de dragão, sangue de galo ou sangue de pau, é uma das espécies de *Croton* usadas como purgativo e tônico (AZEVEDO et al., 2008). Esta espécie tem uma longa história de utilização como planta medicinal, principalmente como cicatrizante, anti-

inflamatório, tratamento de problemas no sistema digestivo (PIETERS et al., 1993; UBILLAS, 1994) e anticâncer (LOPES e LOPES et al., 2004). É uma árvore de pequeno porte originária da América do Sul, habita especialmente os bosques úmidos, sendo encontrada na região amazônica do Peru, Equador e Brasil (SALATINO et al., 2007; AZEVEDO et al., 2008).

O alcaloide taspina (**Figura 2**) é considerado o principal princípio ativo de *C. lechleri* a quem inicialmente foram atribuídas as ações anti-inflamatória (PERDUE et al., 1979), cicatrizante (VAISBERG et al., 1989) e citotóxica (CHEN et al., 1994) do látex. Posteriormente, a ação cicatrizante também foi atribuída à lignana 3'-4-O-dimetilcedrusina (**Figura 2**) por Pieters et al. (1993).



**Figura 2:** Compostos isolados de *C. lechleri*.

Cai et al. (1991) encontraram que 90% do látex seco é composto de uma mistura de proantocianidinas composta por catequina, epicatequina, galocatequina, procianidinas diméricas e flavonoides. Desta resina também foram isolados por Cai et al. (1993a; 1993b) os diterpenos clerodanos korberina A e korberina B, com atividade antibacteriana demonstrada, crolequinol e ácido crolequínico (**Figura 2**) juntamente com fitoesteroides e outros compostos minoritários.

Ubillas et al. (1994) isolaram a proantocianidina oligomérica (MM=2200Da) denominada de SP-303 com atividade antiviral e, posteriormente, foi comprovada a sua ação antidiarreica no modelo de secreção intestinal induzida por toxina da cólera por Fisher et al. (2004).

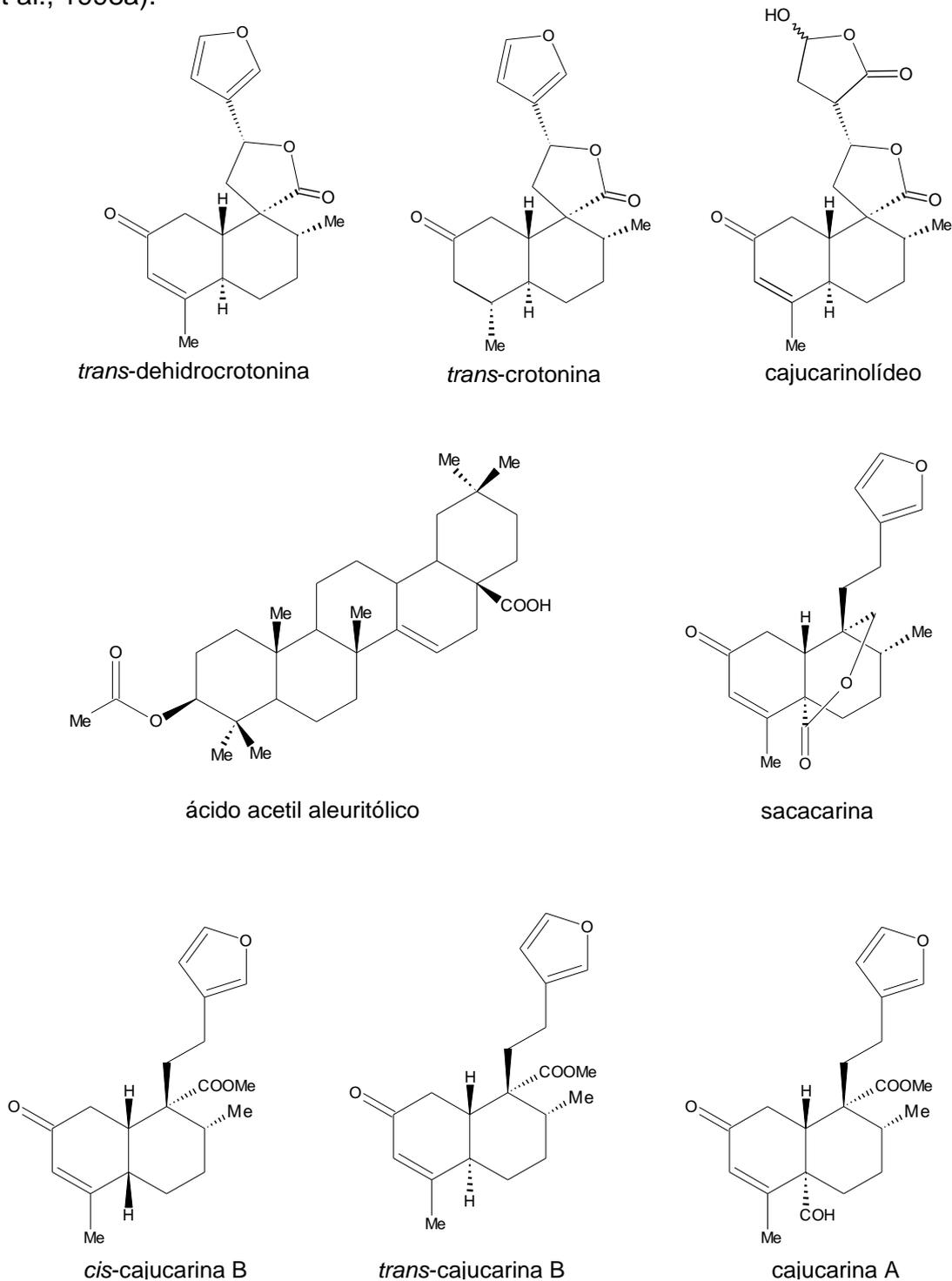
Lopes e Lopes et al. (2004) demonstraram o potencial mutagênico e antioxidante do látex de *C. lechleri* em sistemas biológicos e Froidi et al. (2009) que o látex aumenta a contratilidade de músculos gástrico liso e vascular com resposta dose-dependente.

Rossi et al. (2003) examinaram a atividade antiproliferativa *in vivo* em células de leucemia humanas K562 e a ação mutagênica e antimutagênica em testes com cepas de *Salmonella* do látex obtido de *C. lechleri*. Os resultados obtidos por Rossi et al. (2003) demonstraram que o látex inibe a proliferação das células K652 e não consegue promover danos ao DNA, no modelo testado, comprovando a segurança genética e corroborando com a atribuição de ser o látex um produto saudável e eficaz.

*C. cajucara* Benth, conhecido popularmente como sacaca, é uma planta medicinal encontrada na região amazônica brasileira. Os caules e folhas são usados na forma de chá ou pílulas para o tratamento do diabetes, nível alto de colesterol no sangue, inflamação do fígado, rins e bexiga e distúrbios gastro-intestinais (MACIEL et al., 2000).

Estudos realizados com as raízes, caules e folhas separadamente de *C. cajucara* demonstraram que o caule é a fonte mais rica em diterpenos clerodano sendo a *trans*-desidrocrotonina o composto majoritário, com os principais efeitos farmacológicos associados, juntamente com o triterpeno ácido acetil aleuritólico (MACIEL et al., 1998a, b). Outros diterpenos minoritários também foram isolados: *trans*-cajucarina B, sacacarina, *trans*-crotonina, *cis*-cajucarina B e cajucarinolideo (**Figura 3**), juntamente com os esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol

glicosilado e os flavonoides 3,4,7-trimetóxi-canferol e 3,7-dimetóxi-canferol (MACIEL et al., 1998a).



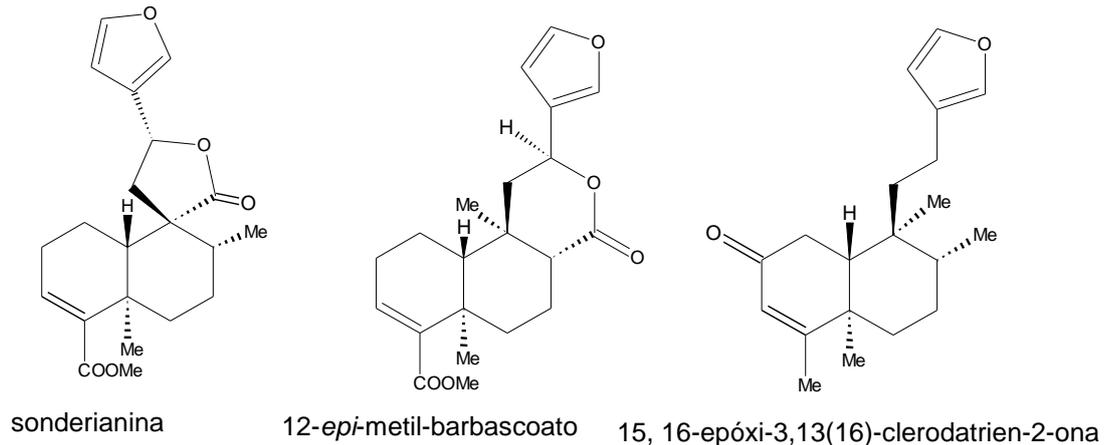
**Figura 3:** Compostos isolados de *C. cajucara*.

De Paula et al. (2008) comprovaram o efeito anti-úlceras do óleo essencial de *C. cajucara* em experimento com tratamento crônico em ratos. Ichihara et al. (1992) demonstraram que o cajucarínolídeo isolado apresenta atividade anti-inflamatória e inibe a ação do veneno de abelha *in vitro*.

Em estudos com a *trans*-desidrocrotonina Agner et al. (1999) não encontraram genotoxicidade e citotoxicidade enquanto Maciel et al. (2000) demonstraram ação anti-inflamatória, analgésica, anti-úlceras, anti-espasmódica, antitumor, antiestrogênica e significativo efeito hipoglicêmico em diabete. Anazetti et al. (2004) encontraram citotoxicidade contra células leucêmicas humanas HL60 e Silva et al. (2005) demonstraram os efeitos hipotensivo e bradicárdico, sugerindo que este diterpeno possui potencial efeito terapêutico para doenças crônicas como hipertensão, diabetes e arteriosclerose. Poersch et al. (2007), da mesma forma que Agner et al. (1999) obtiveram resultados negativos para a atividade citotóxica e também para a clastogênica, corroborando com a informação de segurança no uso do *trans*-dehidrocrotonina para fins terapêuticos.

*C. urucurana* Baill. é uma árvore que pode ser encontrada no Brasil desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PERES et al., 1997) também no Paraguai, Argentina e Uruguai (GURGEL et al., 2005). Da casca pode ser obtido látex vermelho, semelhante ao que ocorre com *C. lechleri*, o que leva esta espécie a ser reconhecida como um sangue de dragão ou em algumas regiões do Brasil, sangra d'água. Tanto a resina quanto a casca são utilizadas pelos índios da região amazônica para estancar sangramento e cicatrizante de ferimentos. Na medicina popular a utilização estende-se para atividades anti-inflamatória, antiséptica, antiviral e no tratamento de úlceras de estômago e intestino (PERES et al., 1997; SALATINO et al., 2007; RAO et al., 2007).

Alguns trabalhos têm comprovado algumas das atividades citadas. Peres et al. (1997) isolaram do extrato metanólico da casca e caule de *C. urucurana* o diterpeno sonderianina (**Figura 4**), com atividade antimicrobiana demonstrada por Craveiro e Silveira (1982), juntamente com os compostos ácido acetil aleuritólico, estigmaterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol glicosilado, catequina e galocatequina. Também foi comprovada a ação antimicrobiana do extrato contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Em outro estudo Peres et al. (1998) relataram o isolamento e identificação de dois diterpenos da casca desta espécie, 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodatrien-2-ona e 12-*epi*-metil-barbascoato (**Figura 4**). Milo et al. (2002) determinaram que o furoarabinogalactana é o principal polissacarídeo encontrado no exsudato da planta.

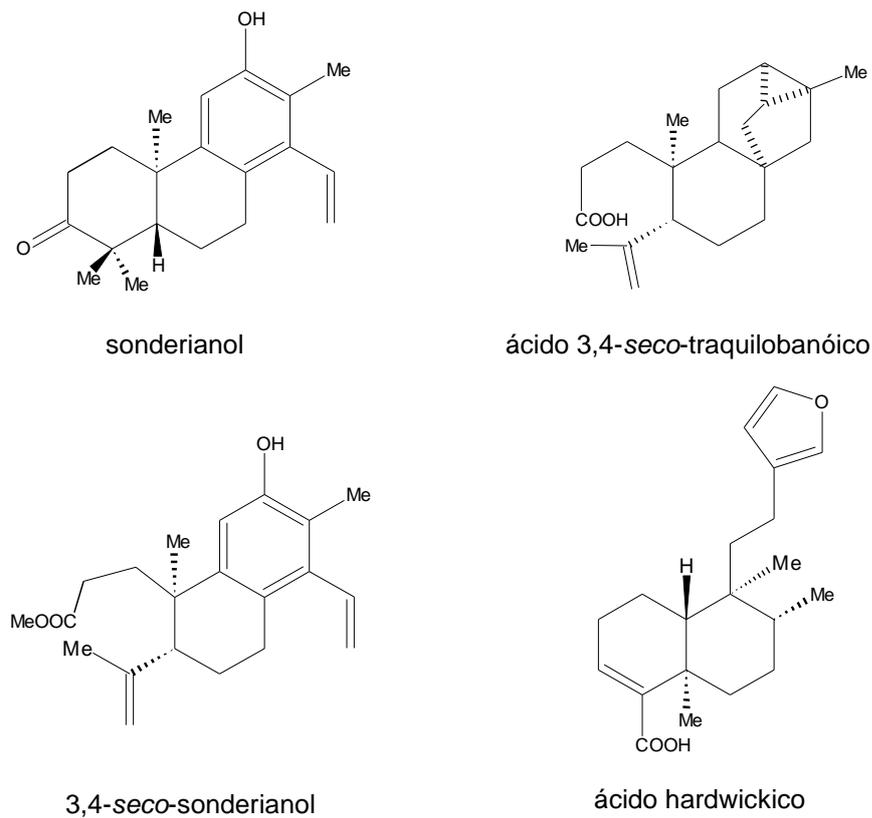


**Figura 4:** Compostos isolados de *C. urucurana*.

Rao et al. (2007) demonstraram a ação antinociceptiva do látex de *C. urucurana* e Gurgel et al. (2005) comprovaram a atividade antifúngica contra os dermatófitos *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton occossum*. Já Esmeraldino et al. (2005) demonstraram a ação anti-hemorrágica do extrato aquoso e frações semipurificadas desta espécie, sugerindo que a fração butanólica é um promissor antídoto para os efeitos do veneno da cobra da espécie *Bothrops jararaca*.

*Croton sonderianus* Müll Arg., popularmente conhecido como marmeleiro-preto ou marmeleiro, é um arbusto encontrado na região nordeste do Brasil. Os dados etnofarmacológicos registram o uso das cascas e folhas para combater problemas estomacais, no tratamento de hemorróidas inflamadas, distúrbios gastro-intestinais, reumatismo e nos casos de hemorragia uterina (SANTOS et al., 2005).

Esta planta é rica em diterpenos do tipo clerodano e cleistantano com diversas atividades biológicas associadas (McCHESNEY e CLARK, 1991). Do caule de *C. sonderianus* foram isolados os diterpenos sonderianina (**Figura 4**) (CRAVEIRO et al., 1978), sonderianol e 3,4-*seco*-sonderianol (CRAVEIRO et al., 1981a) (**Figura 5**). Nas raízes foram encontrados o ácido 2-hidróxi-hardwickico e sonderianial (McCHESNEY e SILVEIRA, 1989). O extrato *n*-hexânico da resina das raízes mostrou atividade antimicrobiana, que foi atribuída principalmente aos diterpenos ácido hardwickico e ácido 3,4-*seco*-traquilobanóico (**Figura 5**) (McCHESNEY e CLARK, 1991).

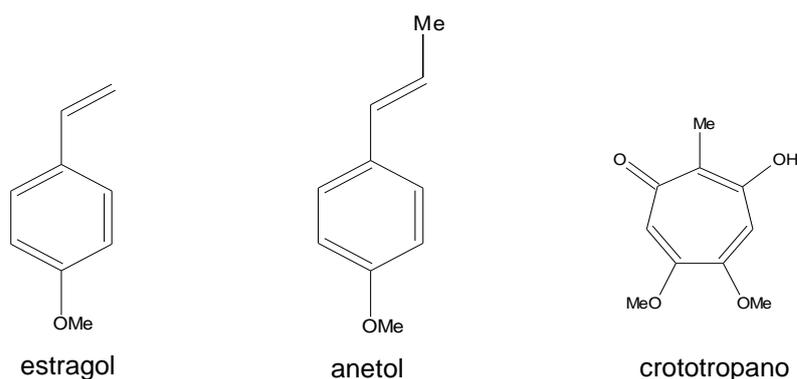


**Figura 5:** Compostos isolados de *C. sonderianus*.

Santos et al. (2005) comprovaram a ação antinociceptiva do óleo essencial de *C. sonderianus* e, recentemente, Pinho-da-Silva et al. (2010) demonstraram o efeito brônquio-dilatador do óleo essencial sugerindo que este pode ser um potencial agente terapêutico para o tratamento da asma.

*Croton zehntneri* Pax. & K. Hoffm. é uma planta aromática nativa da região nordeste do Brasil, popularmente conhecida como “canela-de-cunhã”. De forma semelhante ao *C. urucurana*, tem os mesmos usos populares, mas também é empregada como calmante, estimuladora de apetite, indutora do sono (SALATINO et al., 2007) e distúrbios nervosos como ansiedade, irritabilidade e convulsões (BATATINHA et al., 1995).

O óleo essencial desta espécie é composto por mono e sesquiterpenos, principalmente estragol e anetol (**Figura 6**) (ALBUQUERQUE et al., 1995, 1981b; LUCIANO e MORAIS, 2000) que são reportados como tendo atividade antiespasmódica (COELHO-DE-SOUZA et al., 1997 e 1998) justificando o uso popular da planta para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (SIQUEIRA et al., 2006). Bracher et al., (2008) isolaram das raízes de *C. zehntneri* um derivado do tropano, o crototropano (**Figura 6**).



**Figura 6:** Compostos isolados de *C. zehntneri*.

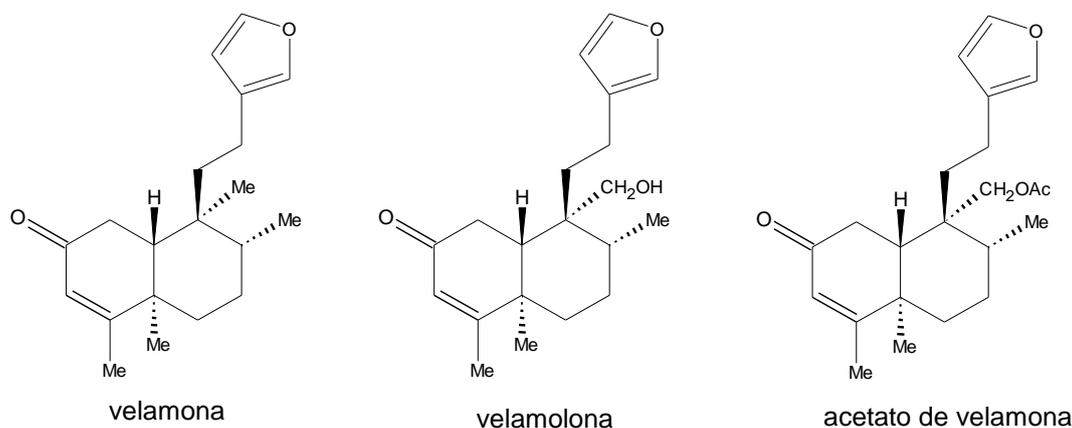
Bernardi et al., (1991) demonstraram que o chá preparado com as folhas e galhos de *C. zehntneri* apresenta propriedades estimulantes em ratos, entretanto, o extrato liofilizado mostrou que possui um ou mais princípios ativos com ação característica depressora do sistema nervoso central (SNC). Batatinha et al. (1995) pesquisaram a ação do óleo essencial das folhas de *C. zehntneri* em experimentos de avaliação comportamental em ratos e camundongos. Foi observado, em geral, um decréscimo de atividade dos animais, sugerindo um efeito depressor do SNC. Os autores concluíram que talvez o óleo essencial possa ser o responsável pela ação da planta em distúrbios nervosos. Camurça-Vasconcelos et al. (2007) avaliaram a ação anti-helmíntica do óleo essencial encontrando resultados promissores e Siqueira et al. (2006) demonstraram a ação cardiovascular.

*Croton celtidifolius* Baill., árvore encontrada na floresta atlântica do sul do Brasil, estados de Rio de Janeiro até Goiás e São Paulo, é conhecida como sangue-de-adave, pau-de-andrade ou pau-sangue (NARDI et al. 2003; 2006). A infusão do caule e das folhas é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, para o tratamento da leucemia, úlcera e reumatismo (SALATINO et al., 2007; NARDI et al., 2003).

Nardi et al. (2003, 2007) demonstraram que o caule de *C. celtidifolius* possui significativa atividade anti-inflamatória e antioxidante. Em outro estudo, Nardi et al. (2006) demonstram efeito antinociceptivo para as cascas, numa fração rica em proantocianidinas finalizando com Dal Bó et al. (2006) sugerindo que o mecanismo de ação desta fração envolve atuação direta no sistema dopaminérgico.

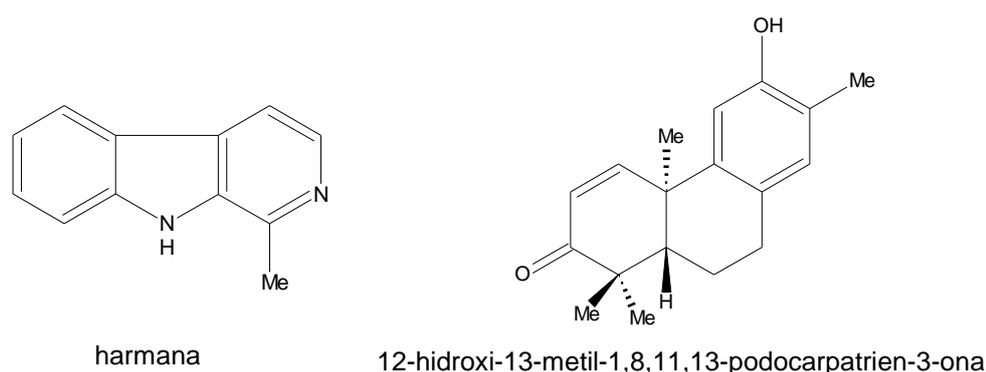
*C. campestris* S. St-Hil. é um arbusto disperso por todo o Brasil. Conhecido como velame do campo é utilizado na medicina popular em preparações de uso interno e externo como um potente purgativo, no tratamento da sífilis e infecções do

canal da bile (colédoco). Das raízes foram isolados os diterpenos clerodanos velamona, velamolona e acetato de velamolona (**Figura 7**) que apresentaram promissora atividade moluscicida contra *Bulinus truncatus* (EL BABILI et al., 2006, 1998).



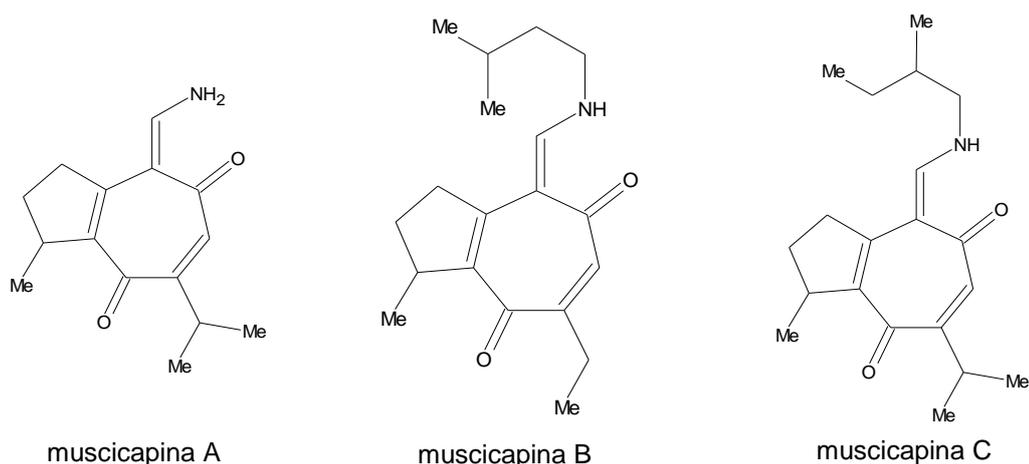
**Figura 7:** Diterpenos isolados de *C. campestris*.

Das partes aéreas de *Croton moritibensis* Baill., popularmente conhecida como velame-preto, Araújo-Júnior et al. (2004) isolaram os alcaloides do tipo  $\beta$ -carbolina a harmana (**Figura 8**), tetrahydroharmana, 2-etoxicarbonil tetrahydroharmana e 6-hidróxi-2-metiltetrahydroharmana; os diterpenos 12-hidróxi-13-metil-1,8,11,13-podocarpatrien-3-ona (**Figura 8**) e sonderianol, também encontrados em *C. salutaris* e *C. sonderianus*, respectivamente.



**Figura 8:** Compostos isolados de *C. moritibensis*.

De *C. muscicapa*, um arbusto encontrado na região nordeste do Brasil conhecido como velame de cheiro, foram isolados os alcaloides sesquiterpênicos do tipo guaiano muscicapina A, muscicapina B e muscicapina C (**Figura 9**) (ARAÚJO-JUNIOR et al., 2005).

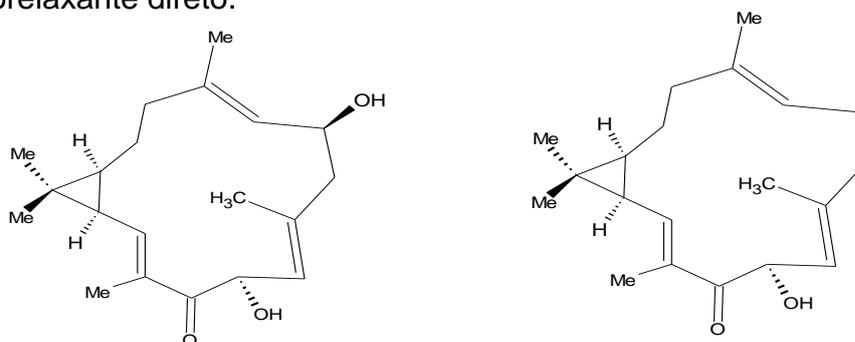


**Figura 9:** Compostos isolados de *C. muscapa*.

*C. nepetifolius* Baill. é uma planta aromática, rica em óleo essencial, endêmica da região nordeste brasileira. Conhecida popularmente como marmeleiro-sabiá ou marmeleiro-vermelho é utilizada na medicina popular para distúrbios gastro-intestinais, como carminativa e tratamento de cólica intestinal (ABDON et al., 2002).

Do caule de *C. nepetifolius* Baill. Moura e Monte (1990) identificaram o diterpeno macrocíclico do tipo casbano 1,4-dihidróxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano (**Figura 10**) juntamente com o arilpropanóide elemicina e a 2-hidróxi-4,6-dimetóxiacetofenona. Posteriormente Santos et al. (2008) isolaram o 4-hidróxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano (**Figura 10**) juntamente com acetofenonas.

Magalhães et al. (1998, 2004) comprovaram as propriedades antiespasmódica e miorelaxante do óleo essencial de *C. nepetifolius*, de acordo com o uso na medicina popular desta planta como antiespasmódico intestinal. Em outros estudos com o óleo essencial, Abdon et al. (2002) avaliaram a atividade antinociceptiva encontrando resultados promissores e Lahlou et al. (1999, 2000) encontraram efeitos cardiovasculares sugerindo que o óleo essencial pode ser um agente vasorelaxante direto.



1,4-diidróxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano

4-hidróxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano

**Figura 10:** Diterpenos isolados de *Croton nepetifolius*.

### 3 OBJETIVOS

Tendo em vista a relevância dos efeitos medicinais dos extratos de *Croton echioides*, uma espécie de uso difundido na medicina popular, este trabalho teve por objetivo fornecer dados químicos, biológicos, de controle de qualidade físico-químico, cromatográfico e botânico para dar suporte a esse emprego tradicional e gerar novos conhecimentos da planta.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o método extrativo visando obter-se maior teor de extrativos e maior capacidade antioxidante;
- Avaliar a presença dos marcadores quimiotaxonômicos em *C. echioides*;
- Purificar, isolar e identificar constituintes químicos presentes no extrato bruto do lenho de *C. echioides*;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto, frações purificadas e substâncias isoladas;
- Avaliar a atividade citotóxica de substâncias isoladas;
- Avaliar a ação farmacológica do extrato bruto do lenho em animais de laboratório;
- Estabelecer parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Cromatografia líquida de média pressão (MPLC)

A cromatografia líquida de média pressão foi utilizada empregando-se colunas empacotadas com gel de sílica Septra C-18 (20-40  $\mu\text{m}$ ) com dimensões de 34x3 cm, 45x1 cm ou 35x0,5 cm, injetor manual com alça de 10 mL, bomba de fluxo (Waters – Mod 510) e coletor de frações para tubos de 5 mL (Pharmacia-Biotech mod. FRAC-200). A coluna, sistema eluente e volume coletado foram selecionados de acordo com a polaridade e quantidade das frações a serem aplicadas.

#### 4.1.2 Cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC)

Foi utilizado cromatógrafo em contracorrente equipado com uma coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 2,5 mm de diâmetro interno, volume de 200 mL de capacidade total, injetor para 20 mL de amostra, 800 rpm, bomba de solvente de duplo pistão com vazão de 1,0 mL (Waters mod. 510). Os sistemas fase estacionária/ fase móvel e volume coletado foram otimizados segundo o descrito por Hostetterman et al. (2001). Para a otimização dos sistemas de separação para cada fração, foram determinados os coeficientes de partição (K) por espectrofotometria de UV. K pode ser expresso como:

$$K = C_{\text{FASE SUPERIOR}}/C_{\text{FASE INFERIOR}}$$

Foram adicionados 5 mL dos solventes escolhidos para cada fração em funil de separação e agitados ligeiramente. Foram deixados em repouso até a separação de fases. Foram tomados 3 mL de cada fase em tubo de ensaio, adicionados 1 mg da fração a ser separada, agitados, deixados em repouso até a separação de fases e separadas. As fases foram escaneadas em espectrofotômetro de UV (Shimadzu mod. UV-1650PC) de 190 a 350 nm escolhendo-se para o cálculo do K a banda de maior absorção para cada sistema. O sistema foi considerado otimizado quando valor de K se aproximou de 0,7, sendo estabelecida a fase com maior concentração de amostra como estacionária e a com menor concentração como móvel. Os sistemas de separação foram preparados em volume suficiente para cada procedimento cromatográfico de forma semelhante ao descrito, até a etapa de

repouso e separação de fases. O volume coletado variou de acordo com a quantidade de amostra injetada.

#### **4.1.3 Cromatografia a pressão normal**

Foram utilizadas colunas cromatográficas preparadas segundo os procedimentos descritos por Collins et al. (1997) utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 de 70-230 mesh (Merck) ou Sephadex LH 20 (Pharmacia). Como fase móvel foram utilizados solventes puros ou mistura destes para obter polaridade ideal para cada fração a ser cromatografada. As dimensões de coluna e volume coletado, foram selecionados de acordo com a quantidade de material a separar.

#### **4.1.4 Cromatografia “flash”**

Foram utilizadas colunas cromatográficas de tamanho proporcional a quantidade de material a ser cromatografado (STILL, 1978) acopladas a aparelho de ar comprimido, utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 de 230-400 mesh (Merck). Como fase móvel, foram utilizadas misturas binárias e ternárias de solventes, em sistemas com gradiente crescente de polaridade ou isocrático. As dimensões das colunas utilizadas e volume coletado foram selecionadas de acordo com a quantidade de material a separar.

#### **4.1.5 Cromatografia a vácuo (CLV)**

Para a CLV foram utilizadas colunas cromatográficas acopladas a equipamento de vácuo empacotadas com gel de sílica 60 de 70-230 mesh. Como fase móvel, foram utilizadas misturas binárias de solventes em sistemas com gradiente crescente de polaridade. As dimensões das colunas utilizadas e volume coletado foram selecionadas de acordo com a quantidade de material a separar.

#### **4.1.6 Cromatografia em camada delgada analítica**

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel GF254 (Merck), e posteriormente reveladas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e pela utilização de reveladores cromogênicos como solução etanólica de cloreto férrico a 1%, vanilina sulfúrica, vapores de iodo ou anisaldeído sulfúrico a 0,5% (STHAL, 1962). Para os extratos brutos e frações obtidas da partição do EB e FH, foi utilizado como eluente hexano: diclorometano: metanol (6:3:1; v/v) e como revelador

anissaldeído sulfúrico. Para as frações obtidas da purificação da FA foi utilizado como eluente clorofórmio: metanol (7:3; v/v).

## 4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A análise estrutural de substâncias isoladas foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY, HSQC e HMBC), relativos ao TMS (7.02T-VARIAN Mercury Plus 300) operando a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$  e 300 MHz para  $^1\text{H}$ .

A espectrometria de massas foi realizada em baixa resolução, ESI-MS, (Waters-Micromass mod. Quattro LC), GC-EI-MS (Waters-Micromass mod. Quattro Micro) e em alta resolução ESI-MS (BRUKER-DALTONICS mod. MicroTof), ESI-MS (Thermo Scientific mod. Orbitrap LTQ XL) e CG-MS (Waters-Micromass mod. GC Tof). As análises foram realizadas no Organische-Chemisches Institut da Universidade de Münster, Alemanha e Central de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá. Sempre que possível os espectros das substâncias foram analisados por comparação com dados constantes na literatura.

## 4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

### 4.3.1 Material vegetal

Caules secos de *C. echinoides* (CE) (10 kg) foram adquiridos da empresa distribuidora e comercializadora de matérias-primas vegetais IDEALFARMA, com sede na cidade de São Paulo-SP, com comprovação de autorização de coleta e funcionamento do IBAMA.

Foram coletadas as partes aéreas floridas de CE no município de Lagoa Real-BA (autorização de coleta nº11995-3 de 02/11/2010, registro no IBAMA nº1844493, responsável, João Carlos Palazzo de Mello). As exsiccatas foram montadas e identificadas pela Profa. Dra. Daniela Santos Carneiro-Torres como *Croton echinoides* Baill. e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o tombo Novello, C. R. 01 - HUEFS 139049.

### 4.3.2 Avaliação do solvente extrator

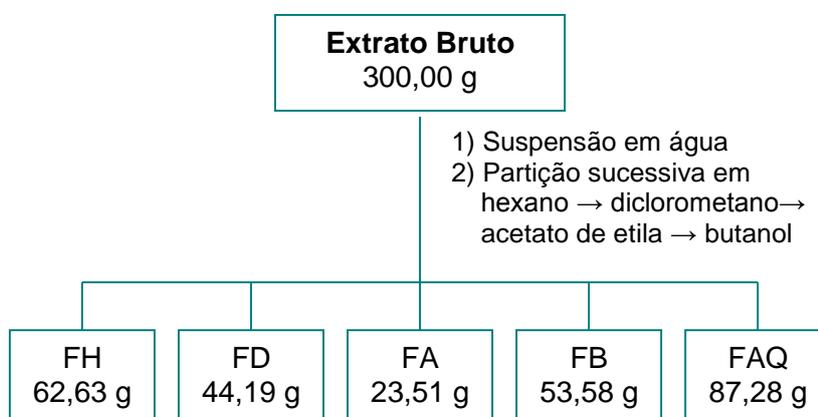
Foi avaliado o melhor solvente extrator pelo método de extração por turbólise por um período de 15 min com controle de temperatura ( $\leq 40\text{ }^\circ\text{C}$ ). Os extratos foram preparados utilizando-se 20 g de planta moída em 200 mL de solvente. Foram

empregados os seguintes solventes extratores em proporção volumétrica: 1) água; 2) etanol:água 1:1; 3) etanol:água 7:3; 4) etanol:água 9,5:0,5; 5) metanol; 6) metanol:água 1:1; 7) acetato de etila; 8) diclorometano e 9) acetona:água 7:3. Com os extratos obtidos foram realizadas as determinações do resíduo seco e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

### 4.3.3 Preparação e partição do extrato bruto

A extração do caule de *C. echinoides* foi realizada por turbólise com solvente hidroalcoólico 70% (p/p), levando-se em consideração os resultados obtidos na avaliação do líquido extrator. Uma quantidade de 7,6 kg do material vegetal moído foi extraído em ultra-turrax (Ika Works, mod. UTC 115/KT) por um período de 48 h, sendo este período composto por 5 min de agitação seguidos por repouso de 2 h, sucessivamente. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo liofilizado, fornecendo 383,8 g do extrato bruto (EB), portanto, com rendimento de 4,4 % em peso.

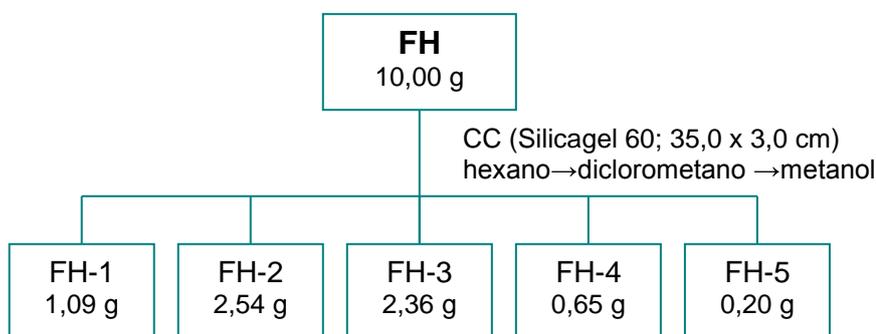
Parte do EB (300 g) foi ressuspensão em 2,5 L de água e submetido a partição líquido-líquido em proporção volumétrica com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol de acordo com Cechinel Filho e Yunes (2001). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, liofilizadas e denominadas de FH, FD, FA, FB e FAQ, respectivamente (**Esquema 1**). Após foram cromatografadas em CCD e testadas quanto a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH para se determinar quais as frações seriam utilizadas nos procedimentos de isolamento e identificação estrutural.



**Esquema 1:** Partição do extrato bruto com solventes de polaridade crescente de *C. echioides*.

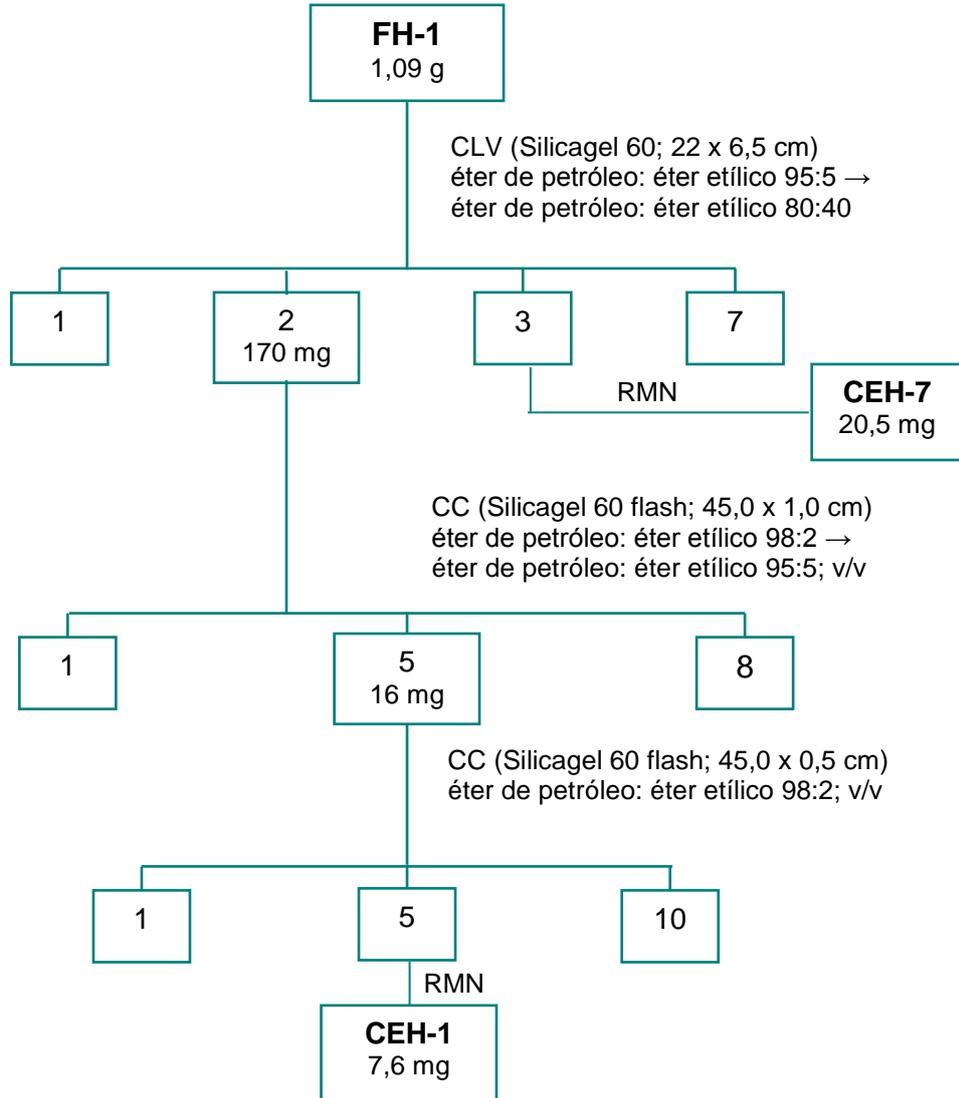
#### 4.3.4 Estudo da fração FH

Foram cromatografados 10 g da FH em coluna contendo gel de sílica 60, eluída com *n*-hexano, diclorometano e metanol combinados em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por CCD, reunidas por semelhança cromatográfica nomeadas de FH-1 a FH-5 (**Esquema 2**).



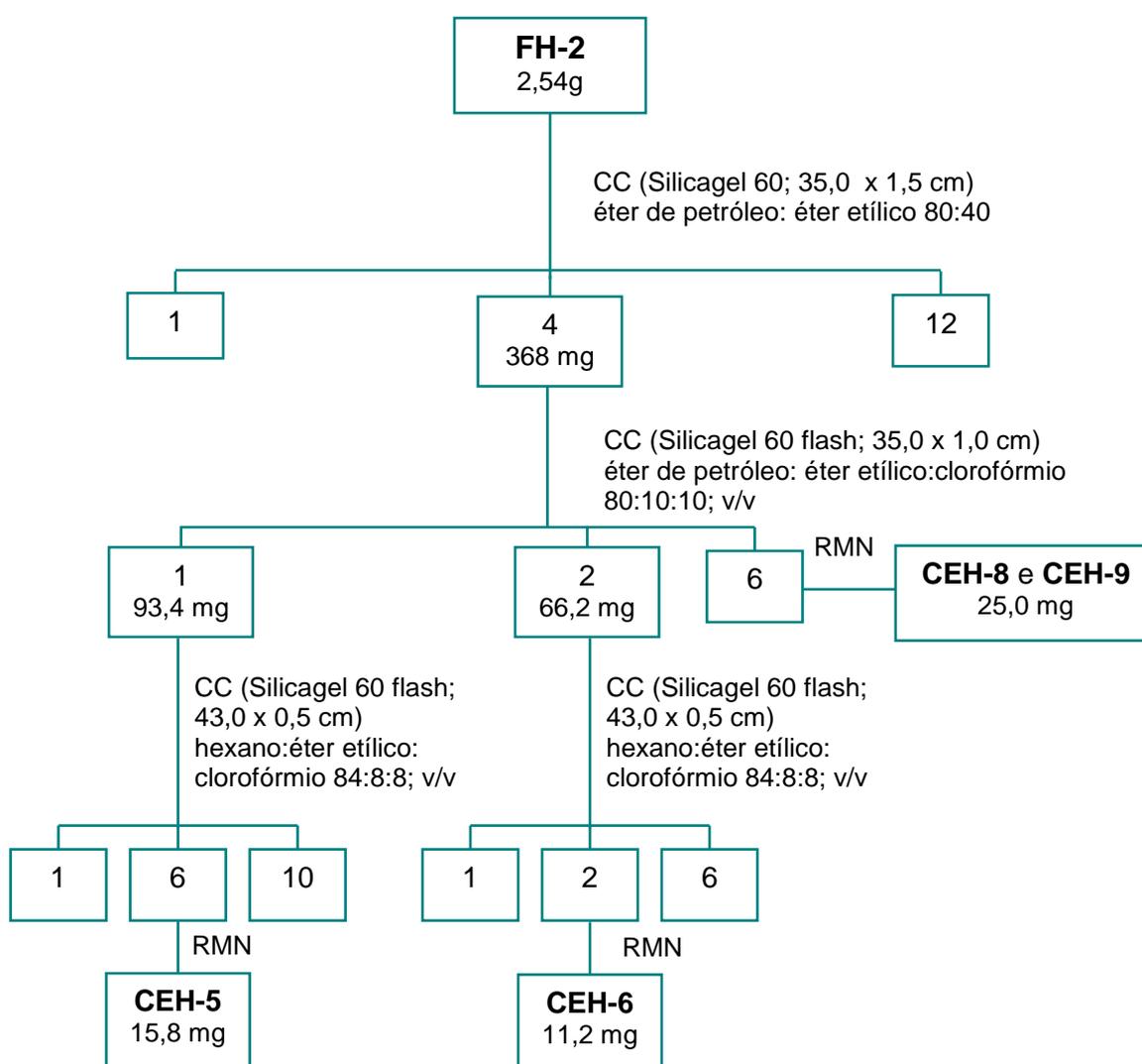
**Esquema 2:** Fracionamento da FH por cromatografia em coluna com solventes de polaridade crescente.

A FH-1 (1,09 g) foi cromatografada em sistema de cromatografia líquida a vácuo (CLV) obtendo-se 110 frações que foram aplicadas em CCD e reunidas em 7 frações (**Esquema 3**). Deste procedimento foi isolada a substância denominada **CEH-7**. A subfração 2 foi recromatografada da mesma forma que a anterior, sucessivamente, até o isolamento da substância denominada **CEH-1** (7,6 mg).



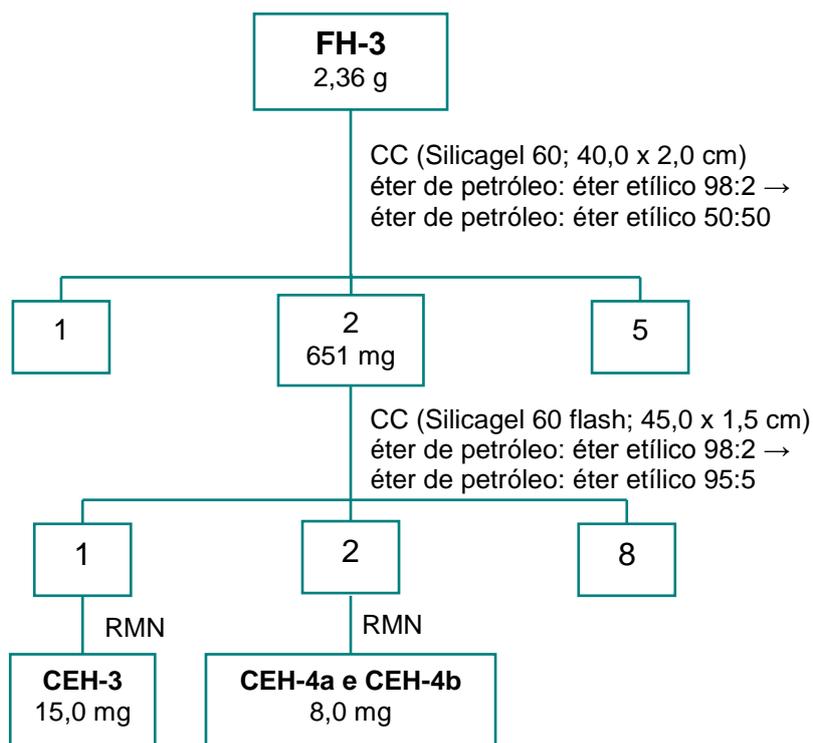
**Esquema 3:** Fracionamento e obtenção da substância **CEH-1** a partir da fração FH-1.

A FH-2 (2,54 g) foi cromatografada em CC e as frações obtidas foram aplicadas em CCD e reunidas em 12 frações. Em seguida, a subfração 4 (368 mg) foi recromatografada obtendo-se 144 frações que por semelhança cromatográfica em CCD forneceu 6 frações, sendo isolado a mistura de substâncias denominadas **CEH-8** e **CEH-9** (25 mg). Já as subfrações 1 (93,4 mg) e 2 (66,2 mg) foram purificadas separadamente em sistema de cromatografia “flash”, de onde foram isoladas as substâncias denominadas de **CEH-5** (15,8 mg) e **CEH-6** (11,2 mg) (**Esquema 4**).



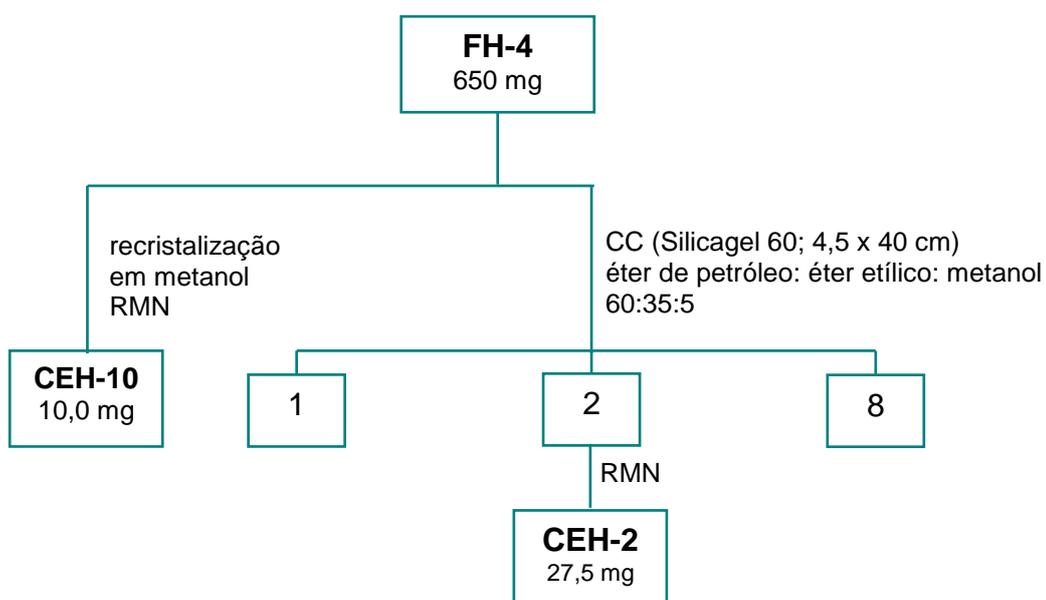
**Esquema 4:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-5**, **CEH-6**, **CEH-8**, e **CEH-9** a partir da fração FH-2.

Procedeu-se o fracionamento da fração FH-3 (2,36 g) em CC com posterior purificação das frações de interesse em CC em sistema “flash”. Destes procedimentos foi possível isolar as substâncias denominadas **CEH-3** (15 mg) e **CEH-4a** e **CEH-4b** (8 mg) em mistura (**Esquema 5**).



**Esquema 5:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-3**, **CEH-4a** e **CEH-4b** a partir da FH-3.

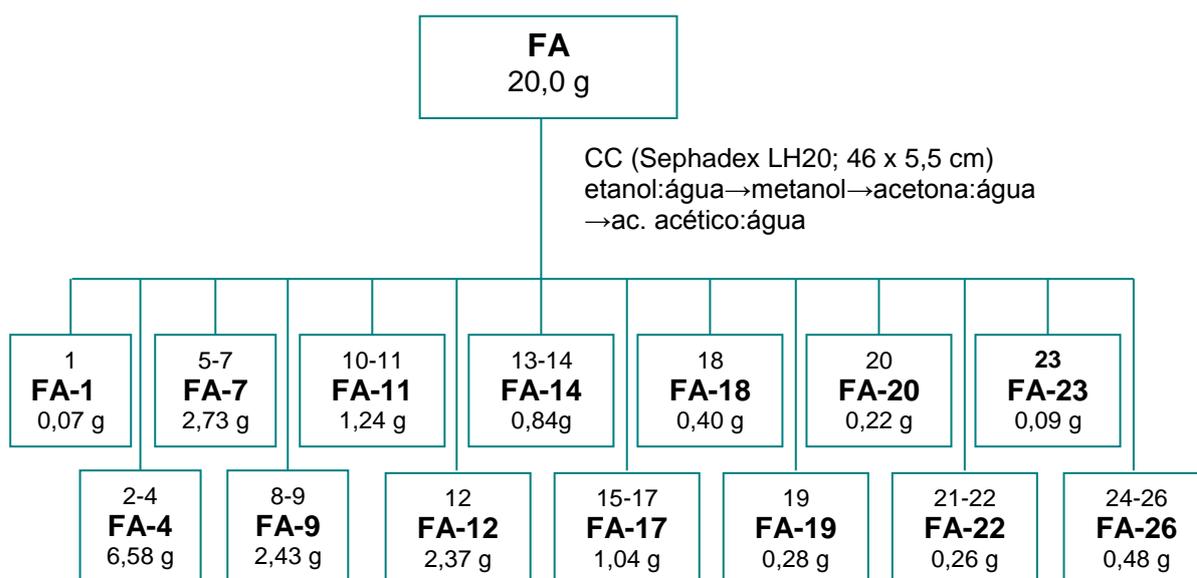
Da fração FH-4 observou-se a formação de um precipitado, que foi separado por centrifugação e denominado de **CEH-10** (10,0 mg). Da purificação da FH-4 (650 mg) em CC obtiveram-se 150 frações, reunidas por semelhança cromatográfica em CCD em 8 frações. Deste procedimento foi obtida a substância denominada **CEH-2** (27,5 mg) (**Esquema 6**).



**Esquema 6:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEH-2** e **CEH-10** a partir da fração FH-4.

### 4.3.5 Estudo da fração FA

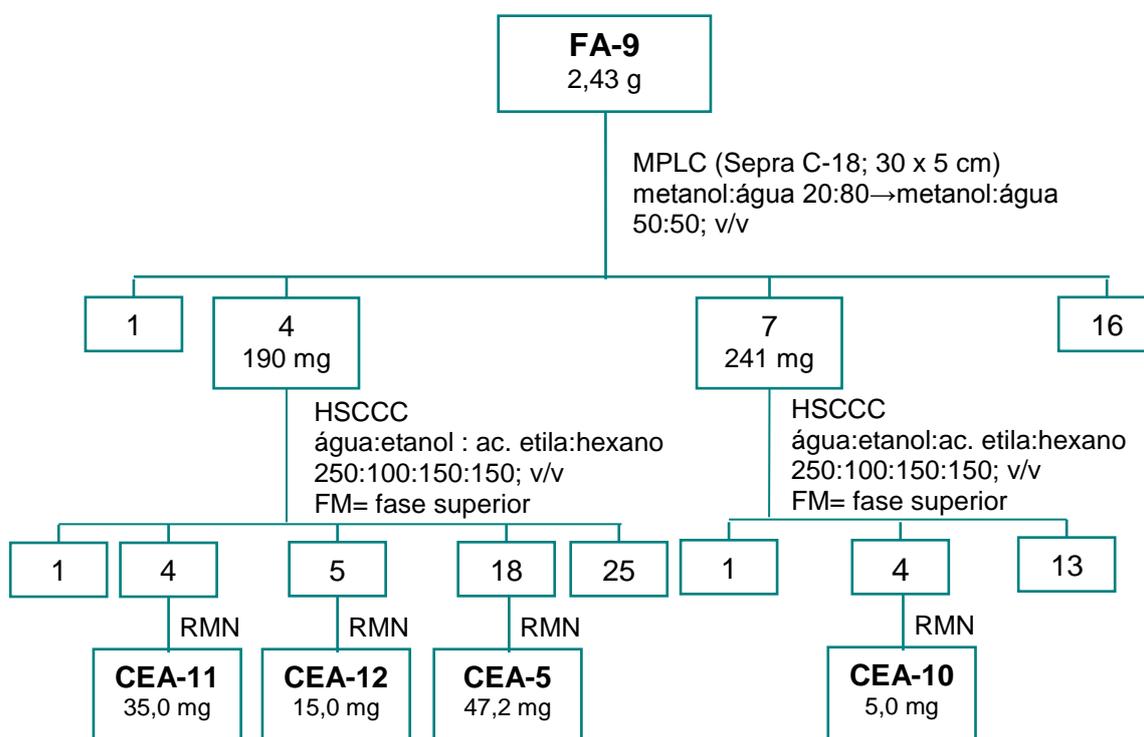
A FA (20 g) foi submetida a purificação em CC utilizando-se Sephadex LH-20 como suporte sendo eluída com etanol, metanol, acetona e ácido acético, puros ou combinados com água, em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram reunidas por semelhança cromatográfica por CCD, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (**Esquema 7**). Após, foram novamente aplicadas em CCD e reveladas com solução etanólica de DPPH. Algumas frações foram novamente reunidas e as mais ativas foram selecionadas para serem submetidas novamente a purificação cromatográfica.



**Esquema 7:** Fracionamento da FA por cromatografia em coluna empregando-se Sephadex LH-20.

A fração FA-9 (92,4 g) foi diluída em metanol:água (20:80; v/v), injetada no sistema de MPLC acoplado a coluna empacotada com gel de sílica de fase reversa C-18 e eluída em gradiente decrescente de polaridade partindo de metanol:água (20:80 até 50:50; v/v) com vazão de 2,5 mL/min. Foram obtidas 224 frações e reunidas por semelhança cromatográfica em CCD em 16 frações. As frações foram novamente aplicadas em CCD e reveladas com solução de DPPH. As frações que

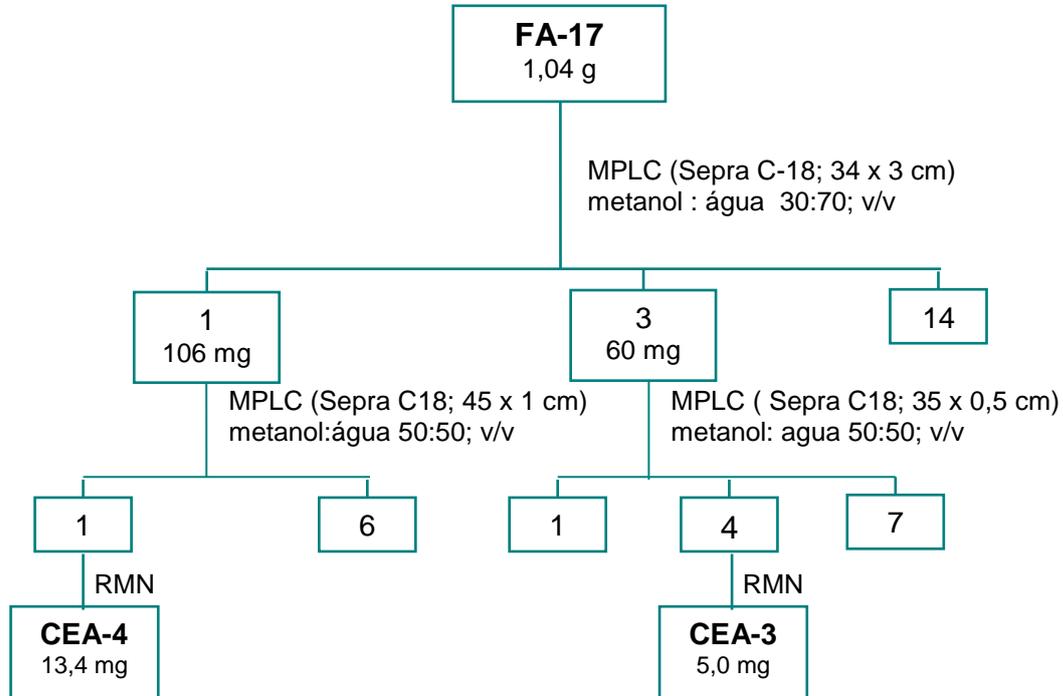
se mostraram ativas foram novamente purificadas. As subfrações 4 (190,0 mg) e 7 (241,0 mg) foram injetadas separadamente em cromatógrafo de contra-corrente utilizando-se o sistema metanol:água:acetato de etila:hexano (25:10:15:15; v/v) sendo a fase inferior empregada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel, vazão de 1 mL/min. Deste procedimento foi possível obter as substâncias denominadas **CEA-5** (47,2 mg), **CEA-10** (5,0 mg), **CEA-11** (35,0 mg) e **CEA-12** (15,0 mg) (**Esquema 8**).



**Esquema 8:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-5**, **CEA-10**, **CEA-11** e **CEA-12** a partir da FA-9.

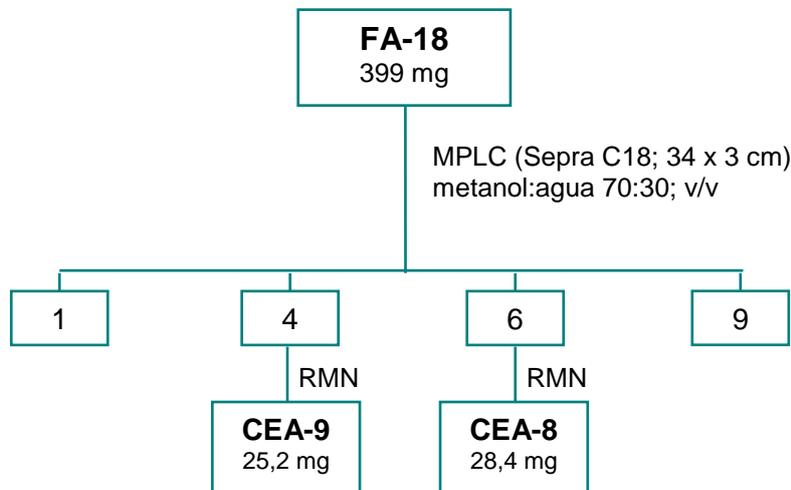
A fração FA-17 (1,04 g) foi diluída em metanol:água (30:70; v/v), injetada no MPLC acoplado a coluna empacotada com gel de sílica de fase reversa C-18 e eluída no modo isocrático com metanol:água (30:70; v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. Foram obtidas 240 frações que foram reunidas com base no perfil cromatográfico em CCD em 14 frações. As 14 frações foram novamente aplicadas em CCD e reveladas com solução de DPPH. Foram selecionadas as subfrações ativas 1 (106 mg) e 3 (60 mg) para serem novamente cromatografadas em MPLC (fase reversa), eluídas no modo isocrático com metanol:água (50:50; v/v), fluxo de 1 mL/min,

forneendo as substâncias denominadas de **CEA-3** (5,0 mg) e **CEA-4** (13,4 mg) (**Esquema 9**).



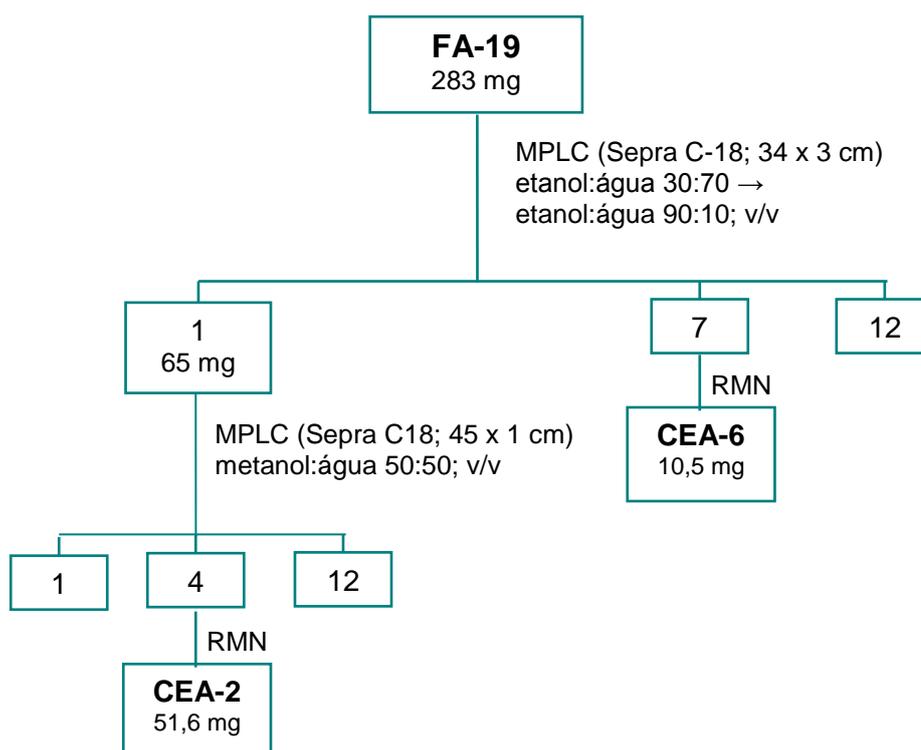
**Esquema 9:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-3** e **CEA-4** a partir da FA-17.

A fração FA-18 (398,8 mg) foi submetida ao fracionamento por MPLC (fase reversa), usando-se como eluente metanol:água (70:30; v/v isocrático) e fluxo de 1,5 mL/min. Este procedimento resultou no isolamento das substâncias denominadas de **CEA-8** (28,4 mg) e **CEA-9** (25,2 mg) (**Esquema 10**).



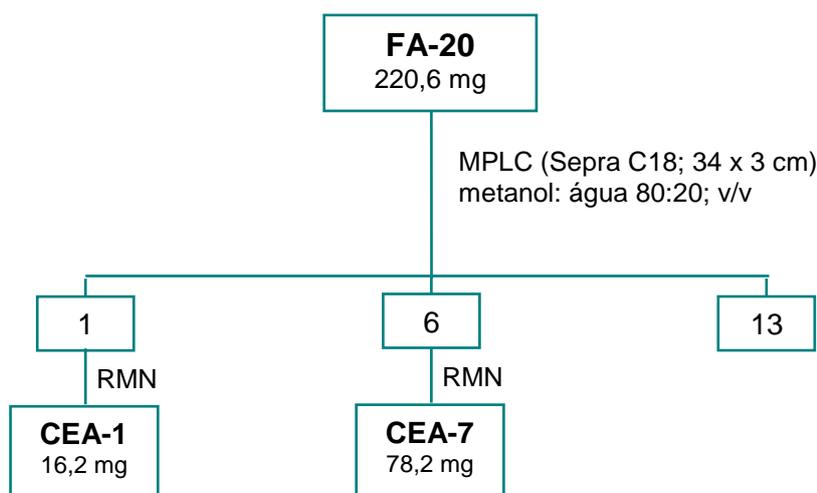
**Esquema 10:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-8** e **CEA-9** a partir da FA-18.

O fracionamento da FA-19 (283,0 mg) por MPLC (fase reversa), sistema gradiente decrescente de polaridade com etanol:água (30:70 até 90:10; v/v) e vazão de 1,5 mL/min forneceu 117 frações que foram reunidas em 12 frações por semelhança cromatográfica em CCD. Estas foram novamente aplicadas em CCD e reveladas com solução de DPPH. Este fracionamento resultou no isolamento da substância denominada de **CEA-6** (10,5 mg). A subfração 1 (65,0 mg) foi purificada em MPLC usando-se metanol:água (50:50; v/v) como eluente e vazão de 1 mL/min. Obtiveram-se 55 frações que foram reunidas em 12 por semelhança cromatográfica em CCD, resultando no isolamento da substância denominada de **CEA-2** (51,6 mg) (**Esquema 11**).



**Esquema 11:** Fracionamento e obtenção da substância **CEA-2** a partir da FA-19.

O fracionamento da FA-20 (220,6 mg) por MPLC (fase reversa), sistema eluente isocrático composto por metanol:água (80:20; v/v), vazão de 2,0 mL/min forneceu 130 frações que foram reunidas em 13 novas frações por semelhança cromatográfica em CCD. As frações obtidas foram cromatografadas em CCD e reveladas com solução de DPPH. Deste procedimento foram isoladas as substâncias denominadas de **CEA-1** (16,2 mg) e **CEA-7** (78,2 mg) (**Esquema 12**).



**Esquema 12:** Fracionamento e obtenção das substâncias **CEA-1** e **CEA-7** a partir da FA-20.

## 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 4.4.1 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados na Universidade Bandeirante de São Paulo e Centro de Psicobiologia Aplicada da Universidade Federal de São Paulo sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Carlos Marques e do pesquisador Dr. Fúlvio Rieli Mendes.

#### 4.4.1.1 *Screening* tóxico-farmacológico

Cinco grupos de cinco camundongos machos, de 4 meses de idade, receberam doses de 1, 10, 100 e 500 mg/kg do EB de *C. echinoides* liofilizado solubilizado em água por via intraperitoneal e 500 mg/kg via oral (gavagem), juntamente com os grupos controle para cada dosagem.

Imediatamente após, foram colocados em gaiolas de arame, com barras espaçadas de 1 cm, em número de cinco por gaiola, sendo observados nos tempos de 5, 15 e 30 min e após, 1, 2, 4 e 24 h. Foram anotados todos os comportamentos pertinentes a expressão de algum efeito farmacológico e/ ou tóxico. Como roteiro usou-se o protocolo empregado no Departamento de Psicobiologia da Unifesp (CARLINI, 1972; OLIVEIRA et al., 1991) que avalia sinais gerais como: micção, defecação, “writhes”, pêlos arrepiados, atividade motora, tremor, convulsão, ataxia, perda do reflexo de postura, sensibilidade dolorosa, ptose palpebral, cauda de Straub, abdução das patas posteriores, sinais de estereotipia, bocejos, sono, “grooming” excessivo, tônus muscular, lacrimejamento, exoftalmia, salivação e morte.

#### **4.4.1.2 Atividade motora**

Empregaram-se três grupos de camundongos jovens com dez animais cada. Um grupo, controle, recebeu água e os dois grupos restantes 10 e 50 mg/kg de EB liofilizado de *C. echoides* solubilizado em água por via intraperitoneal. Imediatamente após foram colocados em caixas eletrônicas de avaliação de movimentação e contados os movimentos no período de 60 min (OLIVEIRA et al. 1991).

#### **4.4.1.3 Tempo de sono barbitúrico**

Foram utilizados camundongos machos jovens tratados agudamente por via intraperitoneal com água (grupo controle) e EB de *C. echoides* nas doses de 10 e 50 mg/kg (grupos tratados) solubilizado em água. Passados 60 min receberam uma dose de 80 mg/kg de hexabarbital por via intraperitoneal. Foram avaliados os tempos de latência para iniciar o sono e entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento do animal (tempo de sono). O critério para a recuperação do reflexo de endireitamento foi fixado quando o animal, por três vezes consecutivas saiu da posição de decúbito dorsal que foi imposta (CARLINI et al., 1986).

#### **4.4.1.4 Coordenação motora**

Realizou-se a avaliação da coordenação motora dos animais por meio do aparelho rota-rod, o qual consiste de uma barra giratória de superfície áspera, com diâmetro de 3 cm e comprimento de 60 cm, dividida em cinco compartimentos iguais separados por discos de 24 cm de diâmetro. O aparelho fica elevado a 40 cm da base e gira na velocidade de 12 rpm. Realizou-se uma prévia seleção dos animais

no aparelho no dia anterior, selecionando-se os que conseguiam permanecer no equipamento por 60 seg em até três tentativas. Foram utilizados camundongos machos jovens divididos em grupos. O grupo controle recebeu água e dois grupos foram tratados com o EB liofilizado de *C. echioides* solubilizado em água com doses de 10 e 50 mg/kg pela via intraperitoneal. A avaliação envolveu tempo de permanência na barra giratória bem como número de quedas em três minutos de avaliação, nos tempos de 30, 60 e 120 min após a administração (OLIVEIRA et al., 1991).

#### **4.4.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado**

Foram utilizados três grupos de camundongos machos jovens, sendo que o grupo controle foi tratado com água e os dois grupos restantes tratados com EB liofilizado solubilizado em água de *C. echioides* nas doses de 10 e 50 mg/kg respectivamente, todos por via oral no período de sete dias. Os animais foram submetidos individualmente por cinco minutos ao labirinto em cruz elevado que consiste em uma estrutura de quatro braços, elevados 50 cm do chão, dois braços possuem paredes, sendo chamados de “braços fechados” e os outros dois braços não possuem as paredes, sendo chamados de “braços abertos”. Foram avaliados os parâmetros: número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; tempo de permanência nos braços abertos; tempo de permanência nos braços fechados e número de segmentos cruzados nos braços abertos.

#### **4.4.2 Atividade antioxidante**

##### **4.4.2.1 Avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH**

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001).

Para a análise preliminar do extrato bruto e subfrações provenientes de sua partição foram preparadas soluções na concentração de 150 µg/mL de amostra em metanol e como controle positivo solução padrão de ácido ascórbico (vitamina C) na mesma concentração. Para a determinação do IC<sub>50</sub> do extrato bruto, subfrações, substâncias puras e controle positivo foram utilizadas pelo menos cinco concentrações diferentes. O controle positivo foi solução de Trolox<sup>®</sup> (ácido 6-hidróxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo2-carboxílico) nas mesmas concentrações das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 0,3 mmol/L (1 mL) foi adicionada à amostra (2,5 mL) deixando-se reagir em temperatura ambiente. Metanol (1 mL) com adição de solução amostra (2,5 mL) foram utilizados como branco. Solução de DPPH 0,3 mmol/L (1,0 mL) e metanol (2,5 mL) foram usados como controle negativo. Após 30 min os valores de absorbância foram medidos a 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH consumido (AA%), utilizando-se para isso a seguinte fórmula:  $AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco) \times 100}{Abs\ controle} \right\}$ .

#### **4.4.2.2 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH em CCD**

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel GF254 (Merck®), onde foram aplicadas amostras das frações e substâncias purificadas, usando-se fase móvel apropriada para cada caso. Em seguida, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH em etanol. O desenvolvimento de manchas de coloração amarela demonstrou reação positiva (CONFORTI et al., 2002).

#### **4.4.3 Avaliação da atividade citotóxica**

A avaliação da atividade citotóxica foi desenvolvida sob a responsabilidade do prof. Dr. Celso Vataru Nakamura do Departamento de Ciências Básicas da Saúde-UEM.

##### **4.4.3.1 Cultura de células**

Células HCT-116 (célula de câncer colo-retal humano), foram cultivadas usando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 50 µg/mL de gentamicina. A cultura foi mantida em garrafas plásticas com tampa de rosca e dispositivo para entrada de CO<sub>2</sub> e incubadas a 37 °C em estufa úmida com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> (Fischer Scientific, modelo Isotemp). Sempre que a monocamada de células encontrava-se confluenta era feita a renovação ou repique da cultura, utilizando solução de tripsina-EDTA a 37 °C.

##### **4.4.3.2 Avaliação da citotoxicidade sobre células HCT-116**

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método da sulforodamina B, descrito por Skehan et al., 1990, com algumas modificações. Células HCT-116 foram cultivadas em placas de 96 poços. Após a formação da monocamada confluenta, aproximadamente 24 h, o meio antigo foi retirado e 100 µL de DMEM foram adicionados em cada poço. Em seguida, o meio foi retirado e 100 µL das várias

concentrações dos compostos foram adicionados por poço, em triplicata, exceto nos poços destinados ao controle de células, em que, ao invés das concentrações da droga, foram adicionados 100 µL de DMEM. Foram testadas as concentrações de 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. Após a adição das amostras as placas foram incubadas por 48 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio foi removido de cada poço e lavado com PBS (tampão fosfato salina) estéril. Para fixação foram adicionados, em cada poço, 50 µL de ácido tricloroacético a 10% por 1h sob refrigeração e ao abrigo de luz. Após, a placa foi lavada 4x em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar. Após a secagem da placa, adicionou-se, a cada poço, 50 µL de uma solução a 0,4% de sulforrodamina B em ácido acético 1%. A placa foi incubada novamente sob refrigeração e ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida, o corante foi retirado e a placa lavada 4x com ácido acético glacial a 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10mmol/L. Após, determinou-se a absorbância em leitor de ELISA (Bio-Tek, modelo Power Wave XS) a 530 nm.

Os resultados foram comparados com o controle de células e a citotoxicidade foi determinada pela destruição celular provocada pelos compostos, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de toxicidade celular} = 100 - (\text{DO}_{\text{tto}} / \text{DO}_{\text{cc}})$$

## **4.5 CONTROLE DE QUALIDADE**

### **4.5.1 Resíduo seco**

A avaliação do resíduo seco foi feita de acordo com a técnica descrita por Mello e Petrovick (2000). Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até secar em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações.

### **4.5.2 Granulometria média**

A determinação da granulometria (tamanho das partículas do pó e distribuição de tamanho) foi realizada segundo a metodologia prevista na Farmacopéia Brasileira (1988). Foram utilizados tamises de malha com 150, 180, 212, 300, 600 e 850 µm

previamente tarados. Uma porção de 25,0 g foi colocada no tamis de maior malha e submetida à agitação mecânica durante 30 min em agitador de peneiras eletromagnético (Bertel, modelo AGT-01) superpostos, partindo-se de maior diâmetro ao menor. Após os tamises foram pesados e realizados os cálculos de acordo com a seguinte fórmula.

$$\bar{D}_{part} = \sum (\% \text{ Fração residual} \times \text{abertura média}) / 100 = X \text{ mm}$$

#### 4.5.3 Perda por dessecação

A avaliação da perda por dessecação foi feita de acordo com a técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira (1988). Pesou-se exatamente cerca de 3 g do lenho moído da planta em pesa-filtro de vidro previamente dessecado e tarado nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Os pesa-filtros foram colocados na estufa por 2 h a 105 °C, posteriormente resfriados em dessecador e pesados. Repetiu-se a operação até peso constate. Os valores são expressos em % (p/p), calculados pela fórmula:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

$P_a$  = massa da amostra  
 $P_u$  = massa do pesa-filtro mais a amostra antes da dessecação  
 $P_s$  = massa do pesa-filtro mais a amostra após a dessecação

#### 4.5.4 Teor de extrativos

A avaliação do teor de extrativos foi feita de acordo com a técnica descrita por Mello & Petrovick (2000). Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foi submetida à decocção com 100,0 g de água, durante 10 min. Após resfriamento o volume foi completado para 100,0 mL. A solução restante foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Do restante do filtrado foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até secura em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de cinco determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g \cdot FD \cdot 100}{m}$$

onde:

TE = teor de extrativos (%; m/m)  
 g = massa de resíduo seco (g)  
 FD = fator de diluição (5)  
 m = massa da amostra (g).

#### **4.5.5 Cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido**

A avaliação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis foi feita de acordo com a técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira (2010). Pesaram-se cerca de 3,0 g do lenho moido em cadinho de sílica previamente calcinado, resfriado e pesado. Incinerou-se em mufla a 450 °C até eliminação total do carvão. Resfriou-se à temperatura ambiente e pesou-se, repetindo o experimento até peso constante. Calculou-se a porcentagem de cinzas totais. Para as cinzas insolúveis em ácido, foram adicionados 25 mL de HCl 20% no cadinho com resíduos de cinzas, sendo então fervida a amostra em manta aquecedora por 5 min e filtrada 2 vezes em papel de filtro isento de cinzas. A seguir lavou-se o papel de filtro com água fervente até o pH tornar-se neutro. Acondicionou-se o papel de filtro no cadinho estabilizado e tarado, o qual foi carbonizado na mufla por quatro horas, sendo a seguir esfriado em dessecador e pesado para o cálculo de cinzas insolúveis em ácido.

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias para os testes paramétricos com variáveis intervalares, seguidas do teste de Tukey *a posteriori* se necessário; dados de frequência foram analisados pelo teste de Fisher unicaudal. O nível de significância aceito foi de  $p \leq 0,05$  para todos os experimentos. Essas análises foram realizadas por software estatístico (STATISTICA).

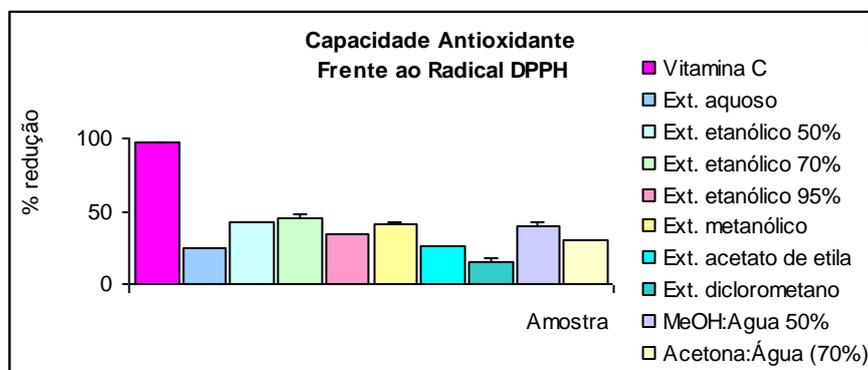
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO EXTRATOR

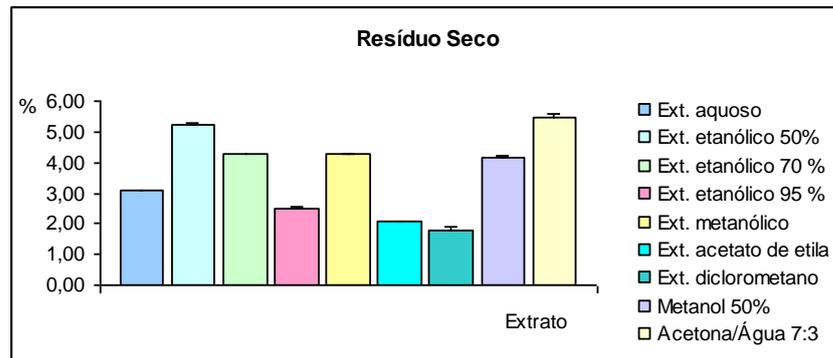
Com a finalidade de obter extrato(s) bruto(s) em bom rendimento, alta concentração das substâncias presentes e com maior capacidade antioxidante, para os estudos fitoquímicos e biológicos, foi realizada a otimização de extração dos caules da planta, utilizando-se diferentes sistemas de solvente, tais como, etanol, metanol e acetona puros ou em mistura com água, e posterior análise do teor de resíduo seco, capacidade antioxidante e cromatografia em camada delgada.

O método de extração escolhido foi a turbólise por ser um processo rápido e eficiente (VOIGT, 1993). A comparação com a capacidade antioxidante deve-se à presença comum de alcaloides e flavonoides no gênero *Croton*, metabólitos secundários que comumente apresentam este tipo de atividade biológica (RIZSK, 1987; PAYO et al, 2001).

A análise estatística por variância entre as médias de capacidade antioxidante ( $p \leq 0,05$  – ANOVA seguida por Tukey) mostrou que os extratos obtidos com etanol:água (7:3; v/v), etanol:água (1:1; v/v), metanol:água (1:1; v/v) e metanol foram os que demonstraram os melhores resultados, não apresentando diferença significativa entre si (**Figura 11**). Estes extratos também apresentaram os maiores teores de resíduo seco (**Figura 12**), sendo que o extrato etanol:água 1:1 (v/v) foi o que demonstrou o maior teor dentre eles, seguido pelo etanol:água (7:3; v/v). A presença comum de terpenoides, substâncias de baixa polaridade, no gênero *Croton* levou a escolha do solvente etanol:água (7:3; v/v), de menor polaridade que etanol:água (1:1; v/v).



**Figura 11:** Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH dos extratos de *C. echinoides* na concentração de 150 µg/mL em relação ao líquido extrator

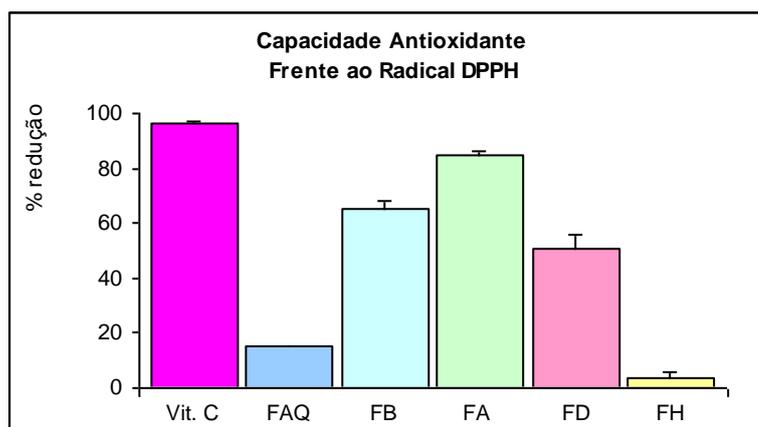


**Figura 12:** Teor de resíduo seco dos extratos de *C. echinoides* com vários líquidos extratores.

O extrato bruto obtido nestas condições foi fracionado por partição líquido-líquido segundo Cechinel Filho e Yunes (2001), utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade. Deste processo, resultaram cinco frações que foram cromatografadas em CCD (**Figura 13**) e testadas quanto à capacidade antioxidante frente ao radical DPPH para se determinar quais as frações seriam utilizadas nos procedimentos de isolamento e identificação estrutural. Por meio da CCD resultante, revelada com anisaldeído sulfúrico, pode-se observar que a FH apresentava um perfil rico em substâncias de baixa polaridade. No teste de capacidade antioxidante, a fração que apresentou maior atividade foi a FA (**Figura 14**).



**Figura 13:** CCD da partição líquido-líquido do EB de *C. echinoides* eluída com hexano:diclorometano:metanol (6:3:1; v/v) e revelada com anisaldeído sulfúrico.



**Figura 14:** Comparação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH das frações FAQ, FB, FA, FD e FH na concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$ . Controle positivo vitamina C.

Tomando-se por base estes dois parâmetros, as frações FH e FA foram escolhidas para o estudo fitoquímico, a FH por provavelmente conter compostos diterpênicos, que são considerados marcadores químicos do gênero e a FA por ser a fração com maior capacidade antioxidante.

## 5.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES

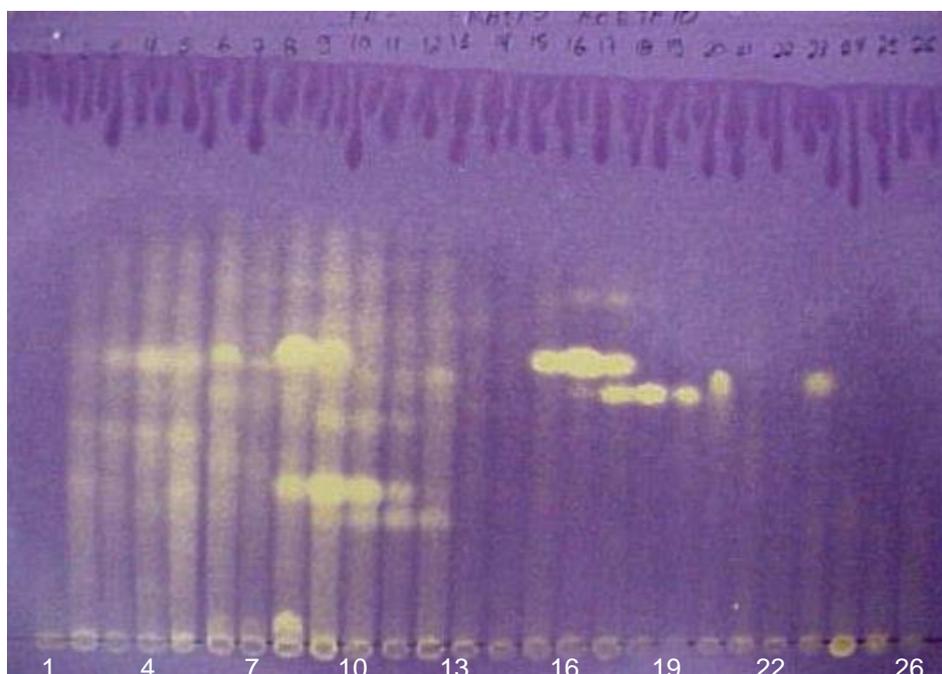
### 5.2.1 Fracionamento e isolamento de substâncias a partir da FH

O fracionamento da fração FH e purificação das sub-frações resultantes, por cromatografia em coluna de fase normal (**Esquemas 1 a 6**), levaram ao isolamento das substâncias que foram denominadas de **CEH-1** a **CEH-10**. Pela análise dos dados espectroscópicos de RMN associados aos dados espectrométricos de massas das substâncias isoladas, foram identificados os diterpenos, **CEH-1**, **CEH-2**, **CEH-3**, **CEH-4a**, **CEH-4b** e **CEH-5**, o sesquiterpeno **CEH-6**, o triterpeno **CEH-7** e os fitoesteroides **CEH-8**, **CEH-9** e **CEH-10**. Não foram encontrados dados na literatura para os diterpenos **CEH-2** e **CEH-3**, indicando serem substâncias inéditas.

### 5.2.2 Fracionamento e isolamento de substâncias a partir da FA

Das frações obtidas na purificação do EB por partição líquido-líquido, a FA foi a que apresentou melhor capacidade antioxidante. Com o objetivo de isolar e identificar substâncias bioativas, as frações obtidas do fracionamento da FA foram aplicadas em CCD e reveladas com solução de etanólica de DPPH (**Figura 15**). As zonas que apresentaram descoloração visível (de cor amarela) são as que possuem

capacidade antioxidante. Algumas frações foram novamente reunidas e as mais ativas foram selecionadas para serem submetidas novamente à purificação cromatográfica.



**Figura 15:** CCD das frações obtidas da purificação da FA de 1 a 26, eluída com clorofórmio: metanol (85:15; v/v) e revelada com solução metanólica de DPPH.

O fracionamento e purificação das subfracções resultantes foram feitos por meio de cromatografia em coluna de fase reversa, de adsorção ou de contra-corrente. Estes procedimentos levaram ao isolamento de doze substâncias denominadas de **CEA-1** a **CEA-12**. Pela análise dos dados espectroscópicos de RMN associados aos dados espectrométricos de massas das substâncias isoladas, foram identificados cinco alcaloides indólicos, **CEA-1**, **CEA-2**, **CEA-3**, **CEA-4** e **CEA-5**, quatro flavonoides, **CEA-6**, **CEA-7**, **CEA-8** e **CEA-9**, e três derivados de ácido benzóico **CEA-10**, **CEA-11** e **CEA-12**. Não foram encontrados dados na literatura para o alcaloide **CEA-5** indicando ser uma substância inédita.

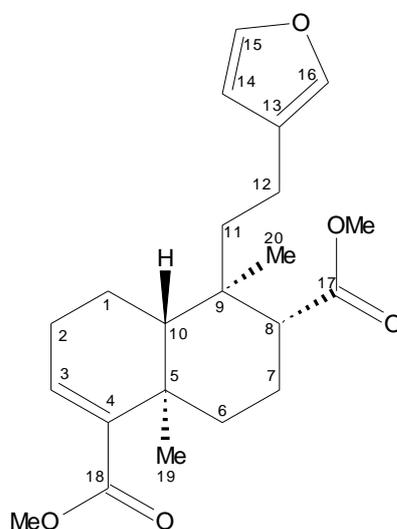
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FH

As estruturas moleculares das substâncias isoladas foram determinadas com base em dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectrométricos de IV e EM

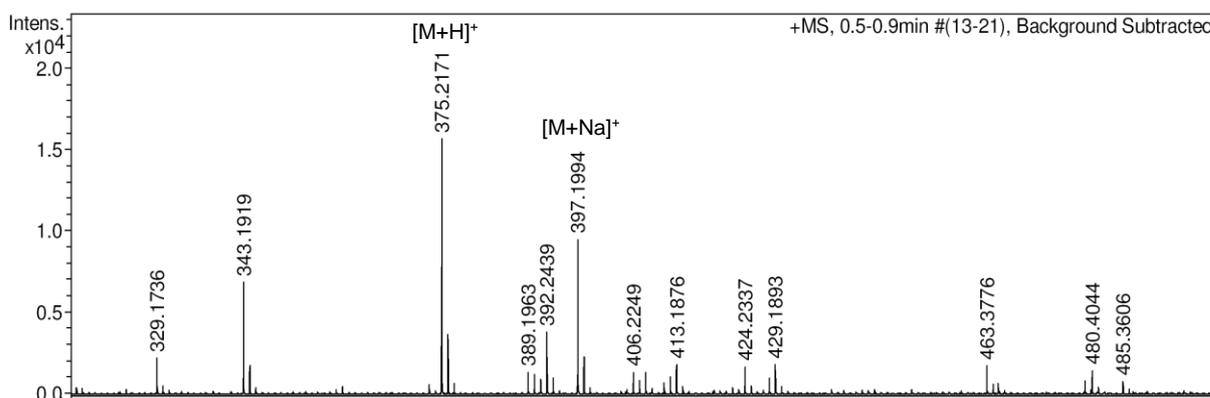
e comparação com dados descritos na literatura. Os diterpenos **CEH-2** e **CEH-3** estão sendo descritos pela primeira vez, tratando-se de substâncias inéditas.

### 5.3.1 Diterpeno CEH-1

O espectro de massas (ESI-MS, modo positivo) do diterpeno **CEH-1** mostrou os picos em  $m/z$  375,2171  $[M+H]^+$  e 397,1994  $[M+Na]^+$  (**Figura 16**) que associados aos dados de RMN  $^{13}C$  (**Figura 19**) permitiram propor a fórmula  $C_{22}H_{30}O_5$ . A interpretação e comparação dos dados de RMN com os da literatura (HASAN et al., 2000) levaram-nos à identificação do **CEH-1** como sendo o 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17,18-dicarboxilato de metila (nasimalun B).



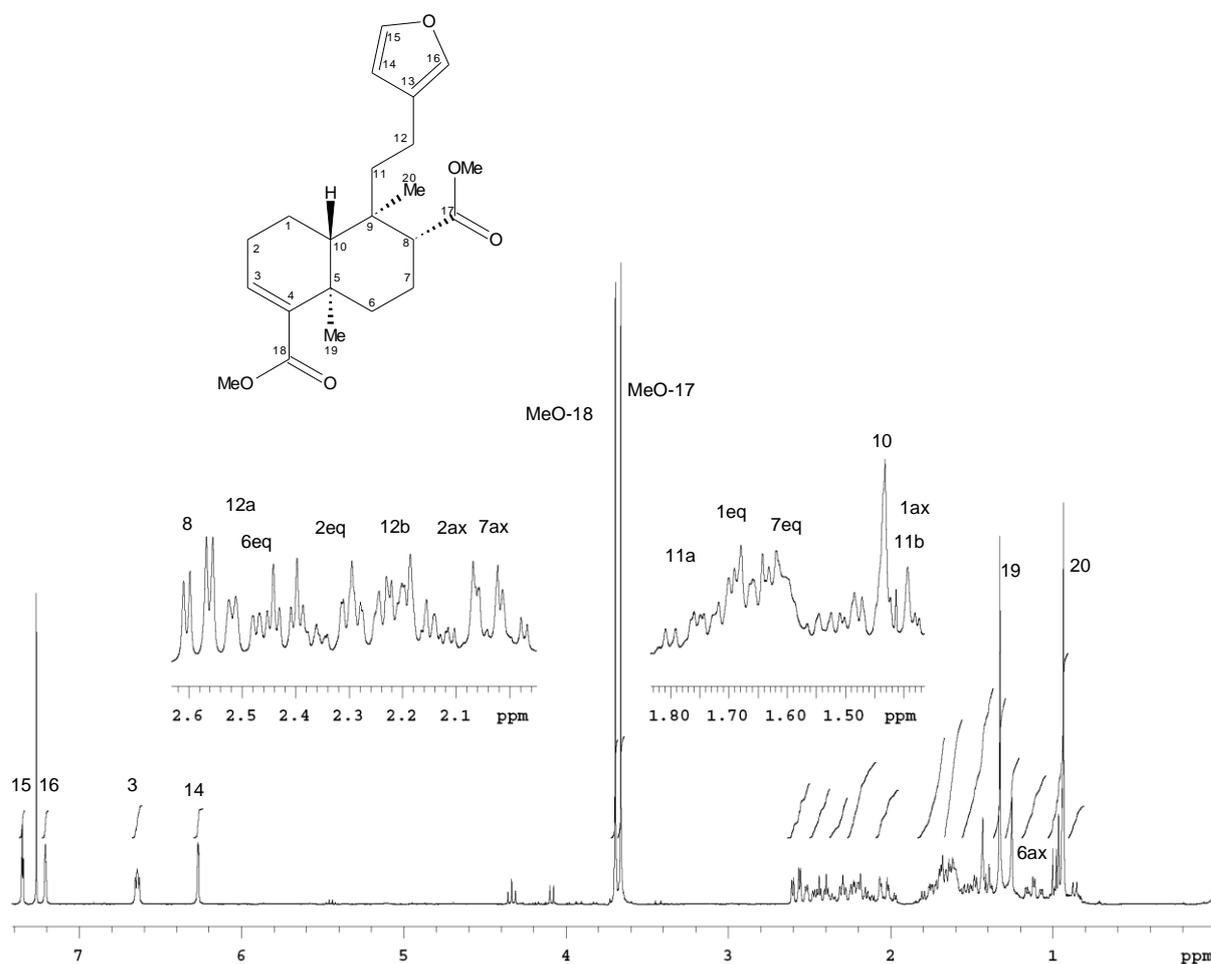
**CEH-1**



**Figura 16:** Espectro de massas (ESI-MS) da substância **CEH-1**, no modo positivo.

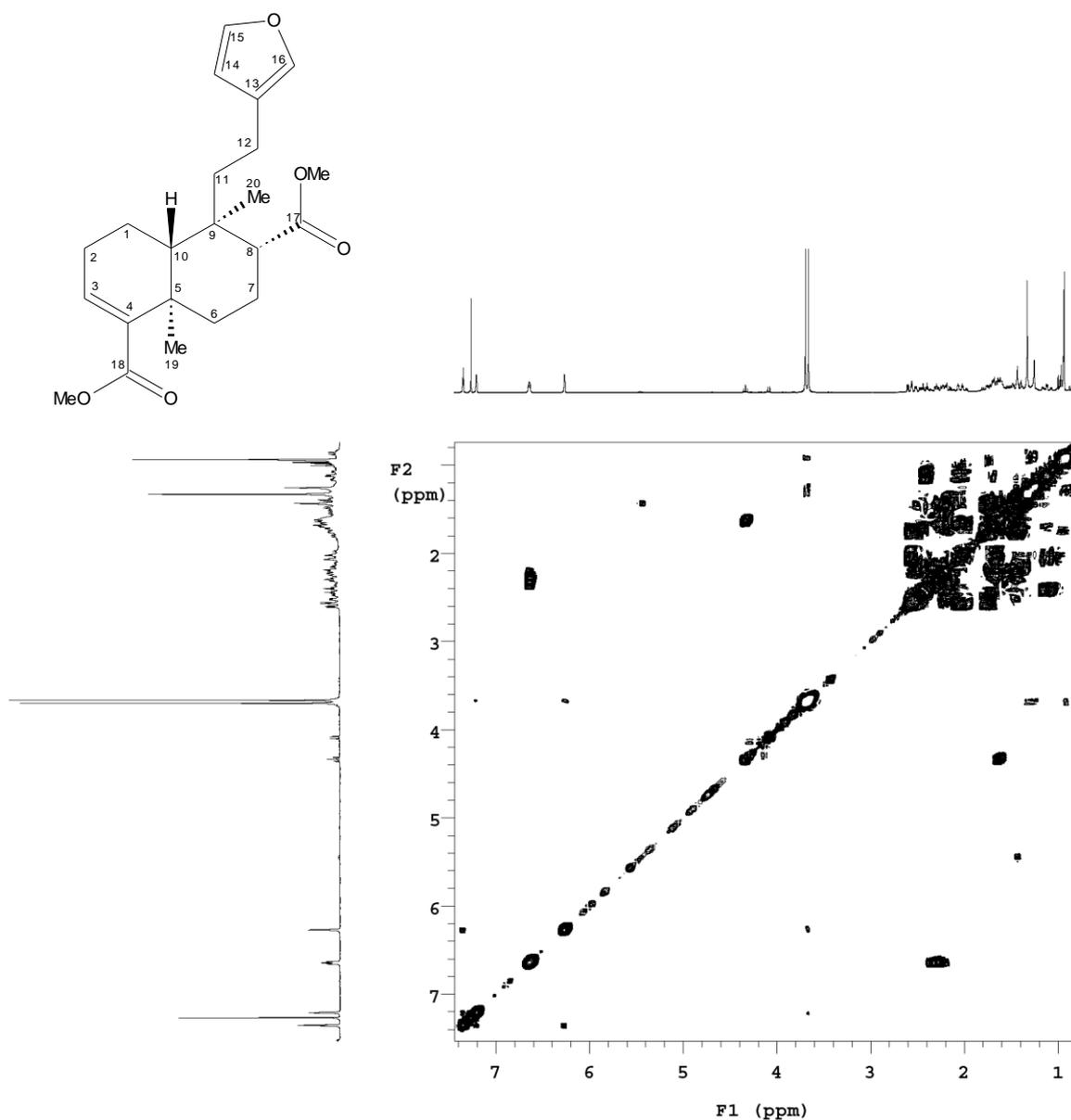
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 17, Tabela 1) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 19, Tabela 2) do **CEH-1** evidenciaram a presença do anel furânico por meio dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,27 (H-14), 7,20 (H-16) e 7,35 (H-15), juntamente com os sinais dos respectivos carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  111,2, 138,7 e 143,0 e do carbono não ligado a hidrogênio C-13, em  $\delta_{\text{C}}$  125,4.

A presença do anel decalínico penta substituído, contendo uma ligação dupla, foi caracterizada pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,41-1,68/17,3; 2,15-2,33/27,2; 1,13-2,41/35,0 e 1,60-2,02/21,8, referentes aos hidrogênios e carbonos metilênicos C-1, C-2, C-6 e C-7; sinais em  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2,58/49,4 e 1,43/46,6 correspondente aos carbonos metínicos C-8 e C-10; sinais em  $\delta_{\text{C}}$  37,5 e 38,9 dos carbonos C-5 e C-9 além dos sinais em  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6,65/137,5 e  $\delta_{\text{C}}$  142,0 que evidenciam a ligação dupla entre os C-3 e C-4. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,33 e 0,94/21,0 e 20,2 comprovam a presença dos grupos metilas Me-19 e Me-20, ligados aos C-5 e C-9, respectivamente.



**Figura 17:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-1** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A presença dos sinais de grupo metoxila em  $\delta_H$  3,66 e 3,70, com integração para três hidrogênios cada, associados aos sinais de carbonila em  $\delta_C$  175,2 e 167,7 comprovam a presença dos dois grupos carbometóxi que estão ligados nas posições C-4 e C-8 do sistema decalínico, respectivamente.



**Figura 18:** Espectro de COSY da substância **CEH-1** (300 MHz,  $CDCl_3$ ).

O anel furânico está ligado ao sistema decalínico na posição C-9 por uma unidade etileno caracterizada por intermédio dos sinais em  $\delta_H/\delta_C$  1,40-1,76 e 2,20 e 2,50/ 46,6 e 18,5.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  encontram-se vários sinais sobrepostos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,00 a 2,50, o que dificultou a determinação de algumas constantes de acoplamento. As atribuições de todos os sinais de RMN  $^1\text{H}$  e as respectivas correlações observadas no COSY (**Figura 18**) estão demonstradas na **Tabela 1**, confirmando a estrutura proposta e o posicionamento dos grupos ligados no esqueleto terpênico

**Tabela 1:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da substância **CEH-1**, comparados com os valores de  $\delta_{\text{H}}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).

| H      | CEH-1                            |                           | nasimalun B                        |
|--------|----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
|        | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY                      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz)   |
| 1ax    | 1,46 (m)                         | H-1eq, H-2eq, H-2b, H-10  | 1,53 (dddd, 13,5; 13,5; 13,5; 5,0) |
| 1eq    | 1,68 (m)                         | H-1ax, H-2eq, H-2ax, H-10 | 1,70 (dddd, 13,5; 5,0; 5,0; 5,0)   |
| 2ax    | 2,15 (m)                         | H-1eq, H-1ax, H-2eq       | 2,19 (m)                           |
| 2eq    | 2,33 (ddd, 19,8; 4,8; 4,8)       | H-1eq, H-1ax, H-2ax, H-3  | 2,33 (ddd, 20,0; 5,0; 5,0)         |
| 3      | 6,65 (dd, 4,2; 3,0)              | H-2eq                     | 6,65 (dd, 5,0; 3,0)                |
| 6ax    | 1,13 (ddd, 13,5; 13,5; 3,6)      | H-6eq, H-7eq              | 1,13 (ddd, 13,5; 13,5; 4,0)        |
| 6eq    | 2,41 (ddd, 13,2; 3,6; 3,6)       | H-6ax                     | 2,44 (ddd, 13,5; 3,0; 3,0)         |
| 7ax    | 2,02 (ddd, 13,5; 13,5; 3,6)      | H-7eq, H-8                | 2,05 (dddd, 13,5; 13,5; 13,5; 3,0) |
| 7eq    | 1,60 (m)                         | H-6ax, H-7ax, H-8         | 1,66 (m)                           |
| 8ax    | 2,58 (dd, 12,9; 3,6)             | H-7eq, H-7ax              | 2,59 (dd, 13,5; 4,0)               |
| 10ax   | 1,43 (m)                         | H-1eq, H-1ax              | 1,43 (dd, 12,0; 6,0)               |
| 11a    | 1,76 (ddd, 14,7; 14,7; 5,0)      | H-11b, H-12a, H-12b       | 1,77 (ddd, 18,0; 13,5; 5,0)        |
| 11b    | 1,40 (m)                         | H-11a, H-12a, H-12b       | 1,45 (m)                           |
| 12a    | 2,50 (ddd, 13,2; 13,2; 4,0)      | H-12b, H-11a, H-11b       | 2,53 (ddd, 13,5; 13,5; 3,5)        |
| 12b    | 2,20 (ddd, 11,0; 11,0; 3,5)      | H-12a, H-11a, H-11b       | 2,21 (m)                           |
| 14     | 6,27 (dd, 1,5; 0,6)              | H-15                      | 6,28 (d, 2,0)                      |
| 15     | 7,35 (dd, 1,5; 1,5)              | H-14                      | 7,36 (dd, 2,0; 1,0)                |
| 16     | 7,20 (s)                         |                           | 7,22 (s)                           |
| 19     | 1,33 (s)                         |                           | 1,34 (s)                           |
| 20     | 0,94 (s)                         |                           | 0,95 (s)                           |
| MeO-17 | 3,66 (s)                         |                           | 3,68 (s)                           |
| MeO-18 | 3,70 (s)                         |                           | 3,71 (s)                           |

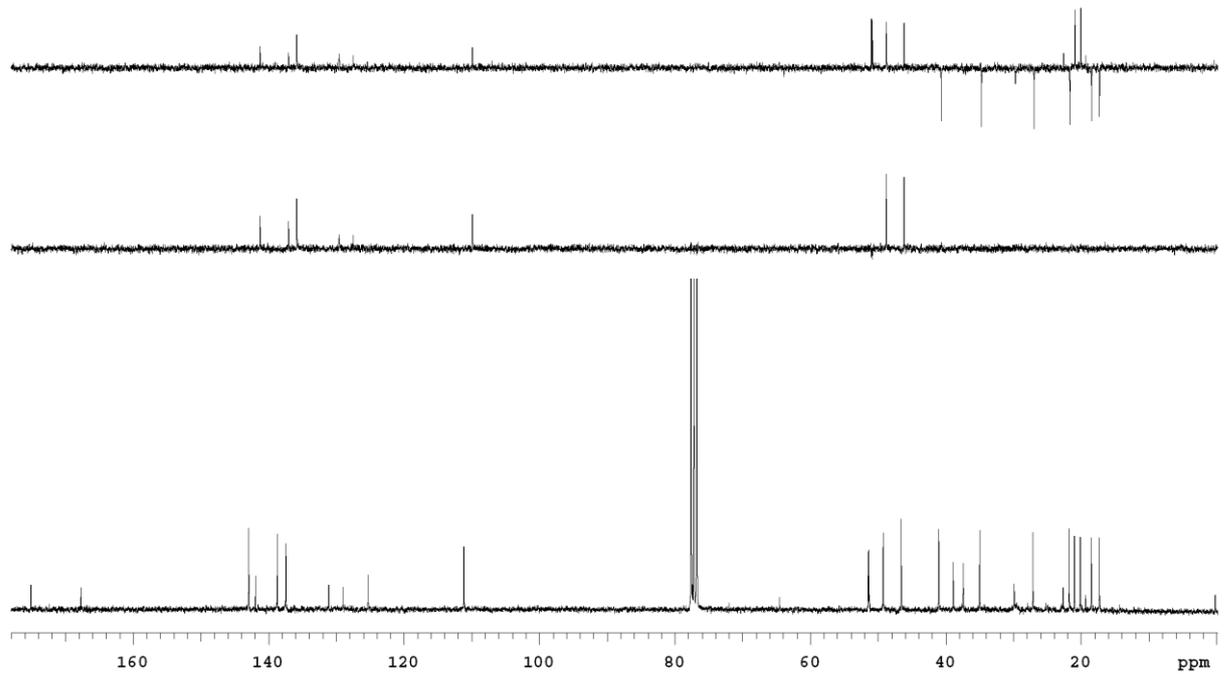


Figura 19: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEH-1** (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

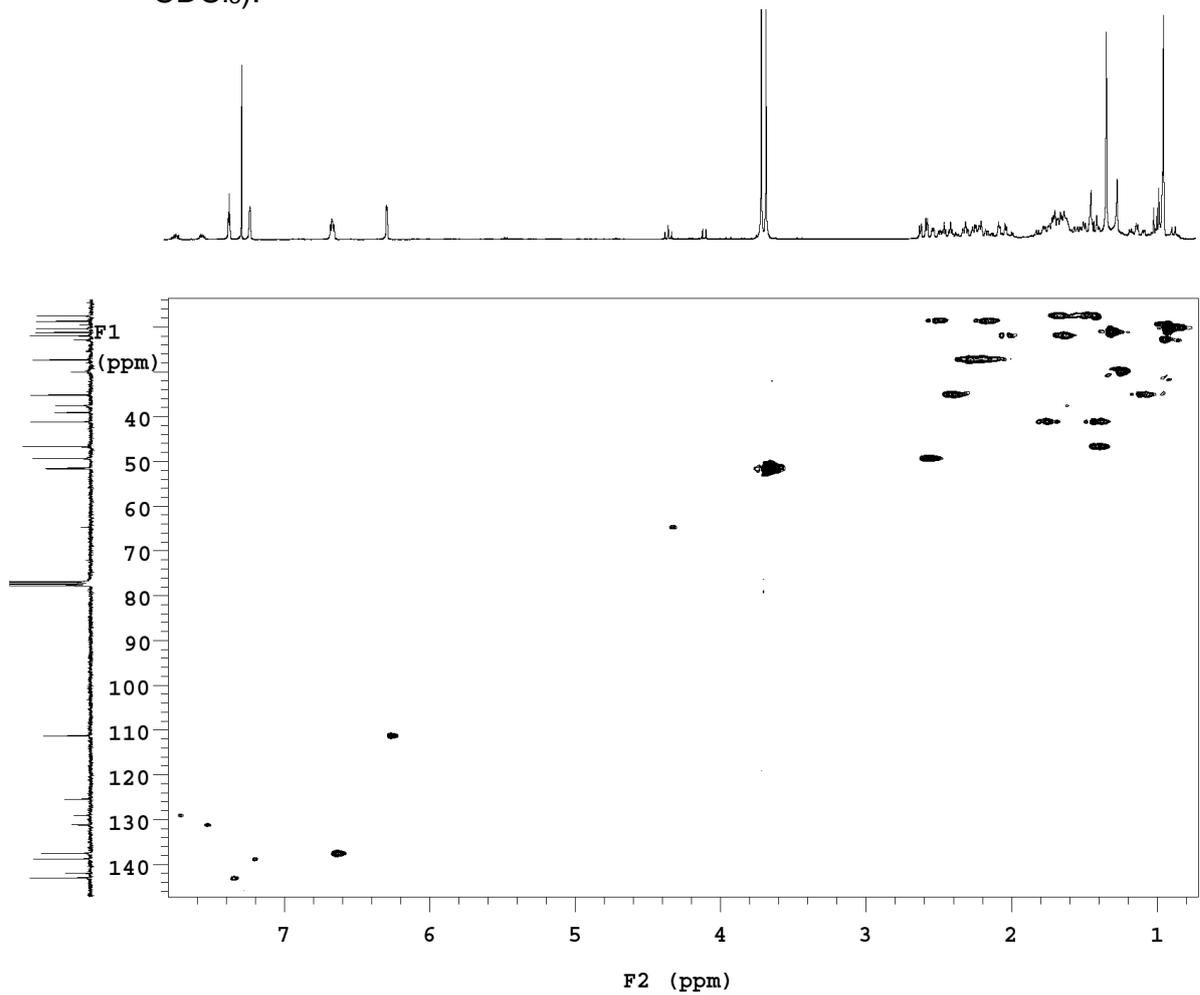


Figura 20: Espectro de HMQC da substância **CEH-1** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

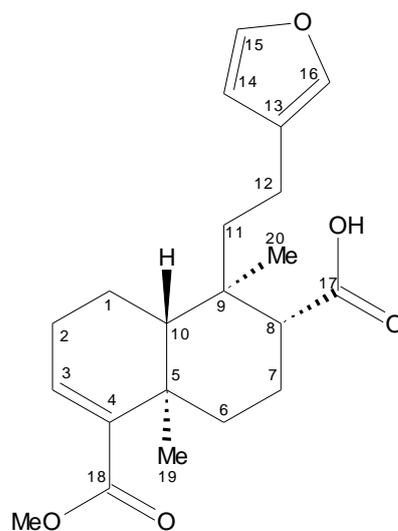
Na **Tabela 2** estão demonstrados os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$ , associados aos dados dos espectros de DEPT e HMQC, comparados com os valores de  $\delta_{\text{C}}$  descritos na literatura para o nasimalun B.

**Tabela 2:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **CEH-1** comparados com os valores de  $\delta_{\text{C}}$  (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).

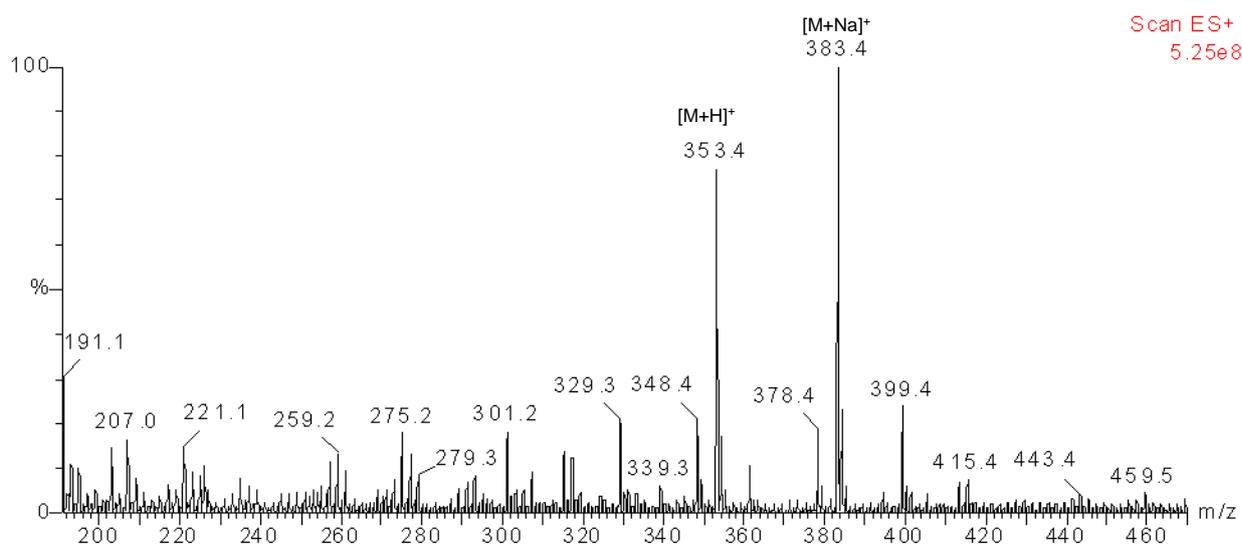
| C      | $\delta_{\text{C}}$ | CEH-1         |            | nasimalun B         |
|--------|---------------------|---------------|------------|---------------------|
|        |                     | DEPT          | HMQC       | $\delta_{\text{C}}$ |
| 1      | 17,3                | $\text{CH}_2$ | 1,41; 1,68 | 17,2                |
| 2      | 27,2                | $\text{CH}_2$ | 2,15; 2,33 | 26,9                |
| 3      | 137,5               | CH            | 6,65       | 137,2               |
| 4      | 142,0               | C             |            | 141,8               |
| 5      | 37,5                | C             |            | 37,3                |
| 6      | 35,0                | $\text{CH}_2$ | 1,13; 2,41 | 34,9                |
| 7      | 21,8                | $\text{CH}_2$ | 1,60; 2,02 | 21,6                |
| 8      | 49,4                | CH            | 2,58       | 49,1                |
| 9      | 38,9                | C             |            | 38,7                |
| 10     | 46,6                | CH            | 1,43       | 46,4                |
| 11     | 41,1                | $\text{CH}_2$ | 1,40; 1,76 | 40,9                |
| 12     | 18,5                | $\text{CH}_2$ | 2,20; 2,50 | 18,1                |
| 13     | 125,4               | C             |            | 125,1               |
| 14     | 111,2               | CH            | 6,27       | 111,0               |
| 15     | 143,0               | CH            | 7,35       | 142,7               |
| 16     | 138,7               | CH            | 7,20       | 138,5               |
| 17     | 175,2               | C             |            | 174,9               |
| 18     | 167,7               | C             |            | 167,5               |
| 19     | 21,0                | $\text{CH}_3$ | 1,33       | 20,8                |
| 20     | 20,2                | $\text{CH}_3$ | 0,94       | 19,9                |
| MeO-17 | 51,4                | $\text{CH}_3$ | 3,66       | 51,1                |
| MeO-18 | 51,5                | $\text{CH}_3$ | 3,70       | 51,2                |

### 5.3.2 Diterpeno CEH-2

A comparação dos dados de RMN com os dados do **CEH-1** associados à análise do espectro de massas (ESI-MS, no modo positivo), o qual apresentou picos em  $m/z$  361,4  $[M+H]^+$  e 383,3  $[M+Na]^+$  (**Figura 21**), permitiram propor a fórmula  $C_{21}H_{28}O_5$  e a identificação da substância como sendo a 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila. Após ampla revisão bibliográfica, não foi encontrada referência à substância, indicando ser inédita.



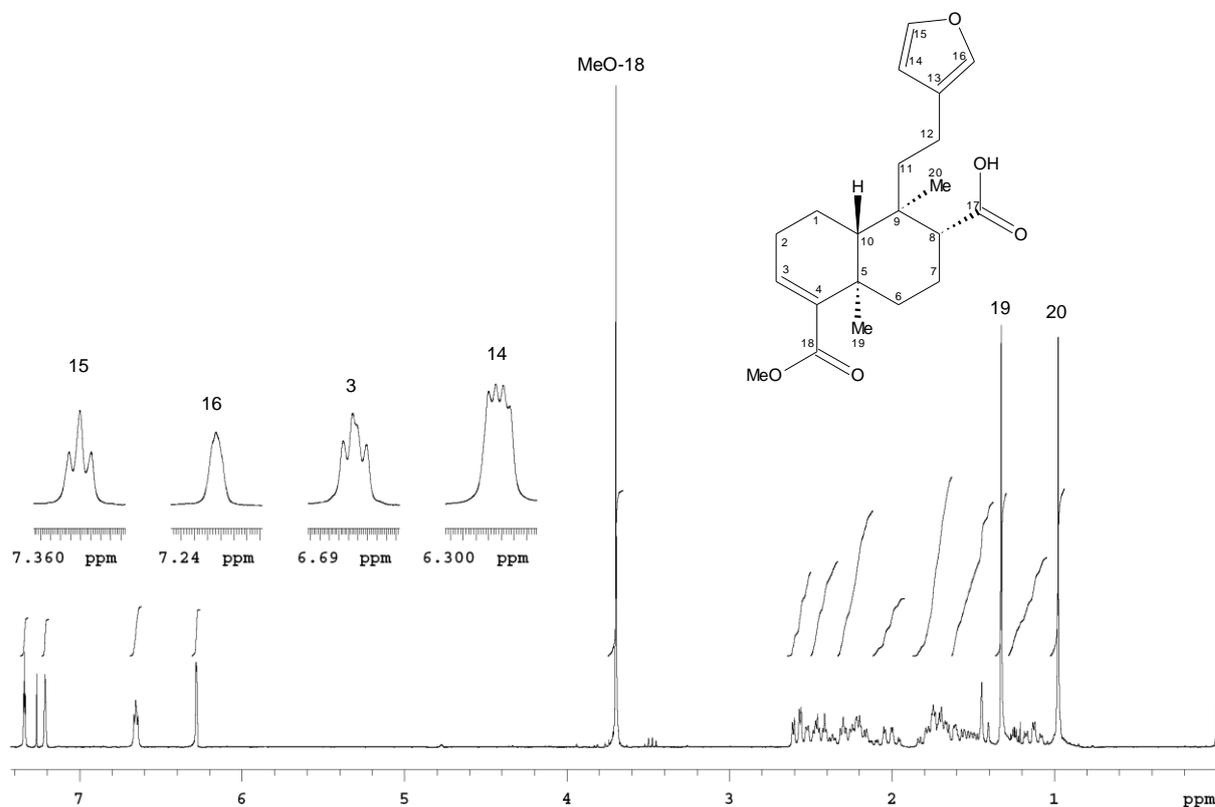
**CEH-2**



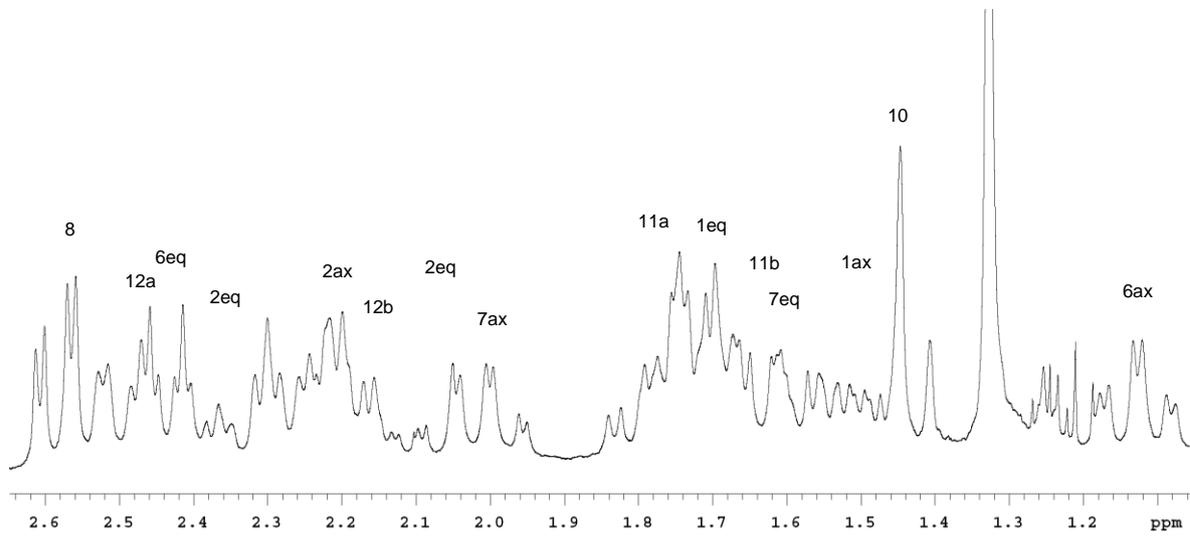
**Figura 21:** Espectro de ESI-MS da substância **CEH-2**, no modo positivo.

Os espectros de RMN do diterpeno **CEH-2** (Figuras 22 a 27) mostraram-se semelhantes ao do **CEH-1**. A ausência de um dos dois sinais de metoxila, presentes no **CEH-1**, e o deslocamento do sinal de carbonila em  $\delta_C$  167,7 para 180,8 sugeriram a substituição de grupo carbometóxi, em **CEH-1**, para carbóxi, em **CEH-2**.

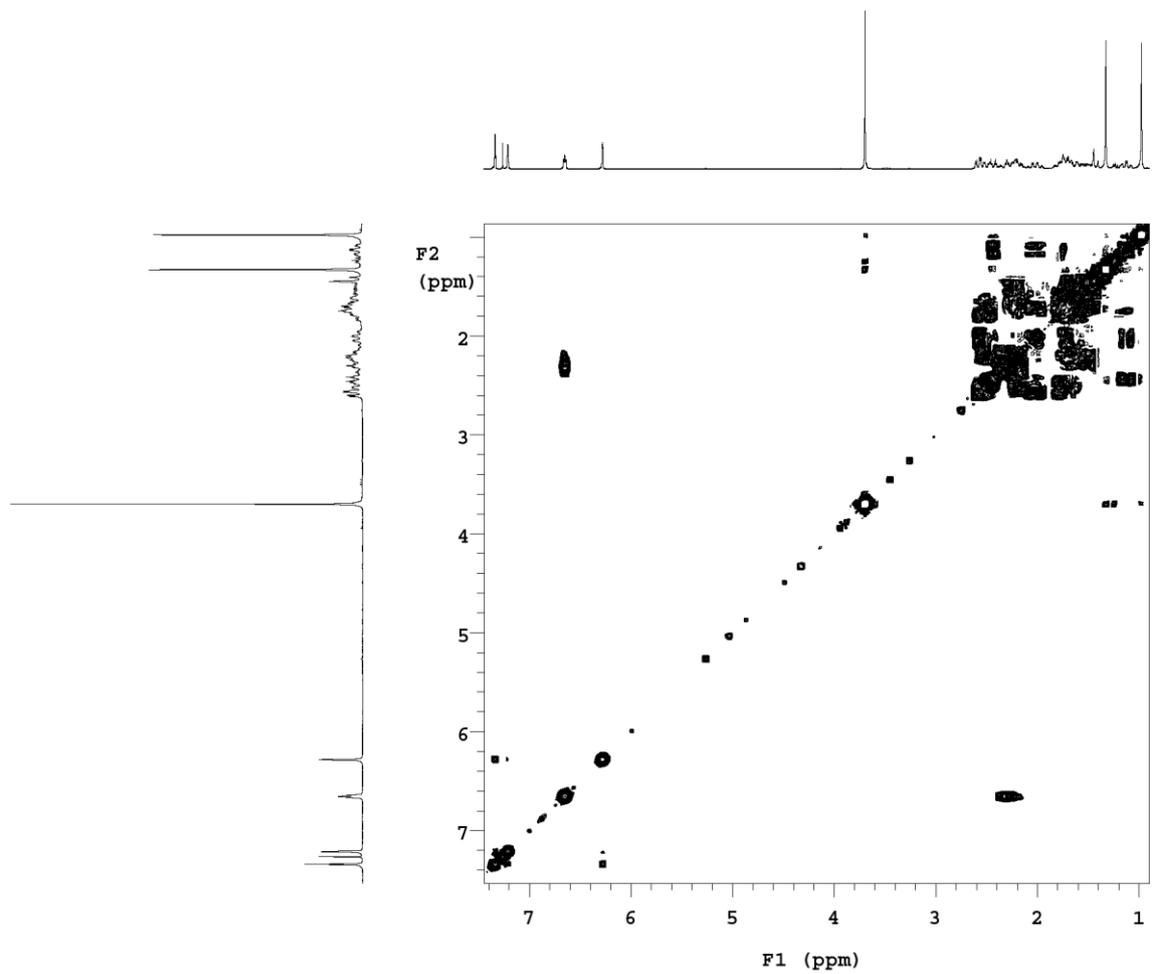
A presença do anel furano foi confirmada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 22 e 23) pelos sinais em  $\delta_H$  6,28, 7,21 e 7,34. O sinal de hidrogênio vinílico em  $\delta_H$  6,65, atribuído ao H-3, os sinais de hidrogênios metínicos em  $\delta_H$  2,58 (H-8) e 1,45 (H-10) e os de hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  1,70 (H-1eq), 1,50 (H-1ax), 2,33 (H-2eq), 2,20 (H-2ax), 2,45 (H-6eq), 1,12 (H-6ax), 2,02 (H-7ax) e 1,62 (H-7eq) caracterizam o sistema decalínico do esqueleto terpênico. O grupo carbometóxi foi estabelecido pelo sinal em  $\delta_H$  3,70 (3H) bem como metílicos 19 e 20 pelos sinais em  $\delta_H$  0,98 (3H) e 1,33 (3H). Os sinais de hidrogênio metilênico em  $\delta_H$  1,74 (H-11a), 1,61 (H-11b), 2,45 (H-12a) e 2,15 (H-12b) são referentes ao sistema etilênico. Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  com as respectivas multiplicidades e correlações observadas no COSY (Figura 24) estão expressos na Tabela 3.



**Figura 22:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-2** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 23:** Ampliação parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-2**.



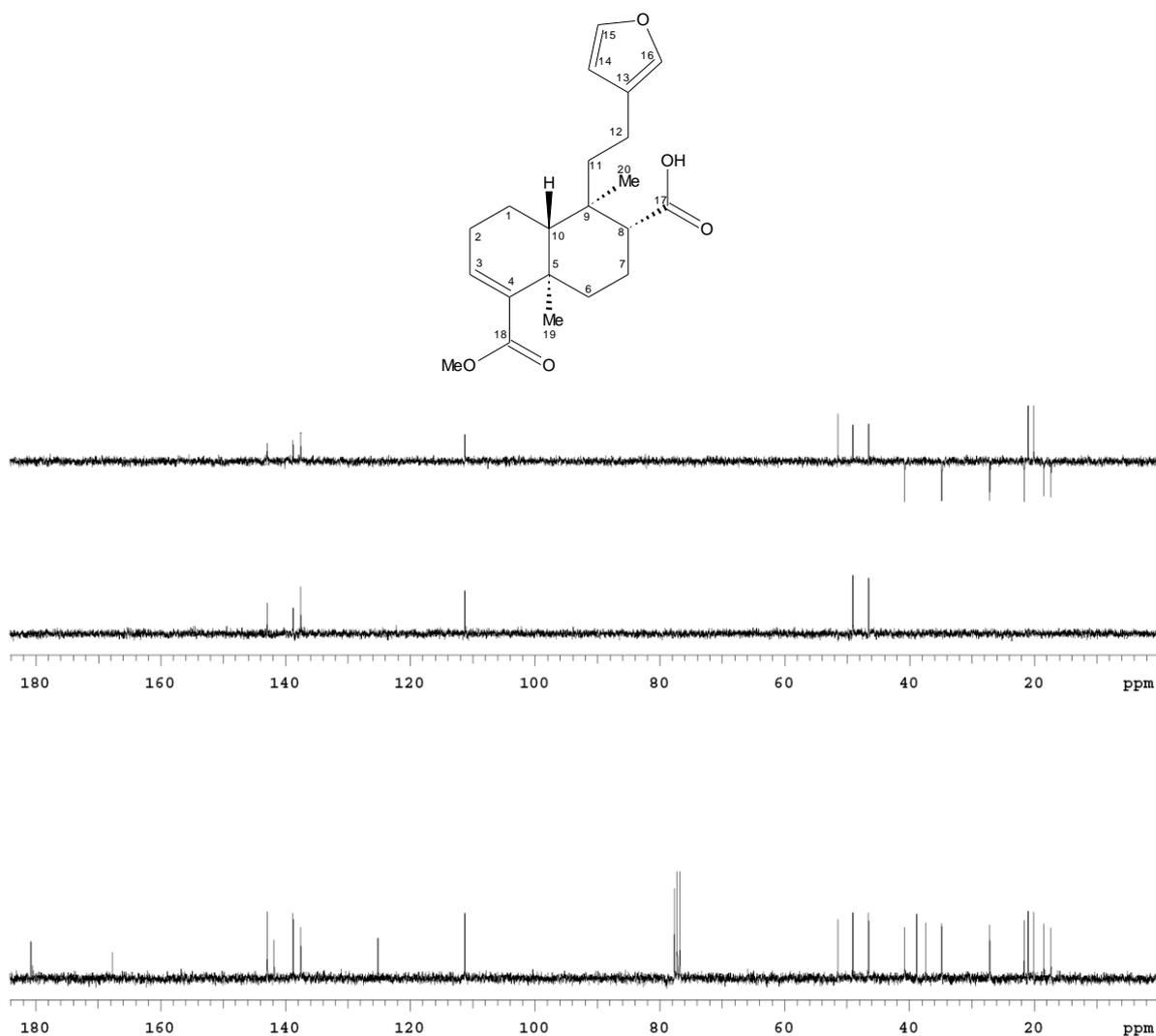
**Figura 24:** Espectro de COSY da substância **CEH-2** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 3:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da substância **CEH-2**, comparados com os valores de  $\delta_{\text{H}}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o nasimalun B (HASAN et al., 2000).

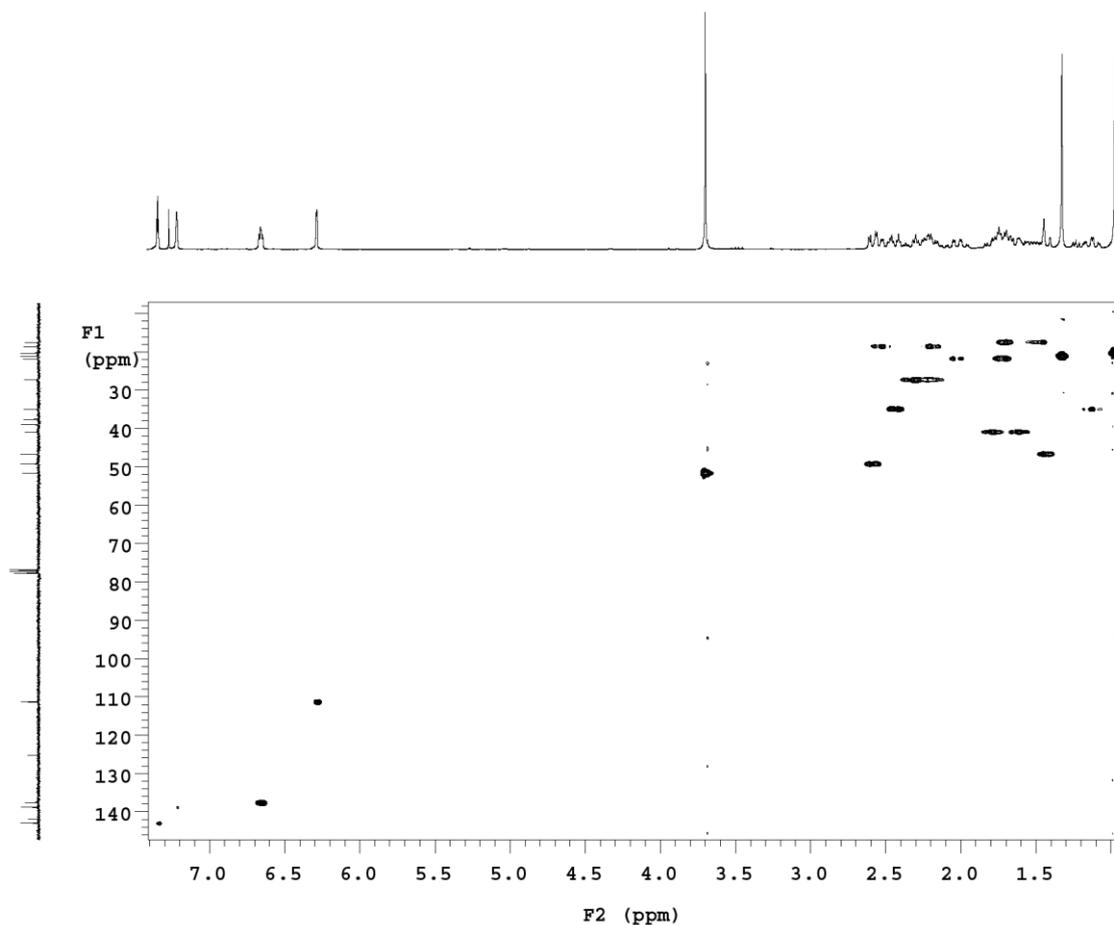
| H      | CEH-2                            |                          | nasimalun B                        |
|--------|----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
|        | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY                     | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz)   |
| 1ax    | 1,50 (m)                         | H-1eq, H-2eq, H-10       | 1,53 (dddd, 13,5; 13,5; 13,5; 5,0) |
| 1eq    | 1,70 (m)                         | H-1ax, H-2eq, H-10       | 1,70 (dddd, 13,5; 5,0; 5,0; 5,0)   |
| 2ax    | 2,20 (m)                         | H-2eq                    | 2,19 (m)                           |
| 2eq    | 2,33 (ddd, 19,8; 4,8; 4,8)       | H-1eq, H-1ax, H-2ax, H-3 | 2,33 (ddd, 20,0; 5,0; 5,0)         |
| 3      | 6,65 (dd, 4,2; 3,0)              | H-2eq                    | 6,65 (dd, 5,0; 3,0)                |
| 6ax    | 1,12 (ddd, 13,5; 13,5; 3,5)      | H-6eq, H-7eq, H-7ax      | 1,13 (ddd, 13,5; 13,5; 4,0)        |
| 6eq    | 2,45 (ddd, 13,2; 3,3; 3,3)       | H-6ax, H-7eq, H-7ax      | 2,44 (ddd, 13,5; 3,0; 3,0)         |
| 7ax    | 2,02 (ddd, 13,5; 13,5; 3,0)      | H-7eq, H-6ax             | 2,05 (dddd, 13,5; 13,5; 13,5; 3,0) |
| 7eq    | 1,62 (m)                         | H-7ax, H-6ax, H-8        | 1,66 (m)                           |
| 8ax    | 2,58 (dd, 12,9; 3,5)             | H-7eq                    | 2,59 (dd, 13,5; 4,0)               |
| 10ax   | 1,45 (m)                         | H-1eq, H-1ax             | 1,43 (dd, 12,0; 6,0)               |
| 11a    | 1,74 (ddd, 14,7; 14,7; 5,1)      | H-12a                    | 1,77 (ddd, 18,0; 13,5; 5,0)        |
| 11b    | 1,61 (m)                         | H-12b                    | 1,45 (m)                           |
| 12a    | 2,45 (ddd; 13,2; 13,2; 4,0)      | H-12b, H-11b             | 2,53 (ddd, 13,5; 13,5; 3,5)        |
| 12b    | 2,15 (ddd, 11,0; 11,0; 3,3)      | H-12a, H-11a             | 2,21 (m)                           |
| 14     | 6,28 (dd, 1,8; 0,6)              | H-15                     | 6,28 (d, 2,0)                      |
| 15     | 7,34 (dd, 1,8; 1,5)              | H-14                     | 7,36 (dd, 2,0; 1,0)                |
| 16     | 7,21 (s)                         |                          | 7,22 (s)                           |
| 19     | 1,33 (s)                         |                          | 1,34 (s)                           |
| 20     | 0,98 (s)                         |                          | 0,95 (s)                           |
| MeO-17 | -                                |                          | 3,68 (s)                           |
| MeO-18 | 3,70 (s)                         |                          | 3,71 (s)                           |

A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT (**Figura 25**) e HMQC (**Figura 26**) confirmou a estrutura proposta ao **CEH-2**. O anel furânico foi evidenciado pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  111,3 (CH), 138,8 (CH), 142,9 (CH) e 125,2 (C). Para o sistema decalínico penta substituído, foram atribuídos os sinais de carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  17,3 (C-1), 27,1 (C-2) 34,8 (C-6) e 21,6 (C-7); metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  137,6 (C-3), 49,1 (C-8), 46,6 (C-10) e os sinais de carbono não ligado a hidrogênio em  $\delta_{\text{C}}$  141,8 (C-4), 37,4 (C-5), 38,9 (C-9). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  137,6 e 141,8 evidenciaram a dupla ligação entre C-3 e C-4.

O grupo carbometóxi foi comprovado por intermédio dos sinais em  $\delta_c$  51,5 e 167,7 e o grupo carbóxi pelo sinal em 180,8. Os sinais em  $\delta_c$  20,1 e 21,0 indicaram a presença de dois grupos metilas e os sinais de carbono metilênico em 40,8 e 18,5 a presença do sistema etilênico. Todos os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e as respectivas conectividades com os sinais de hidrogênio observadas no HMQC podem ser visualizados na **Tabela 4**.



**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEH-2** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 26:** Espectro de HMQC da substância **CEH-2** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

A comprovação do posicionamento do grupo carbóxi em C-8, bem como as atribuições dos demais carbonos não ligados a hidrogênio foram feitas por experimento de HMBC (**Figura 27**). As correlações do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,58, referente ao H-8, com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  180,8, referente ao carbono carbonílico do grupo carbóxi, e com o grupo metila C-20 em  $\delta_{\text{C}}$  20,1 comprovam a proximidade destes grupos e suas respectivas atribuições (**Figura 28**). Para o grupo metila C-20 tem-se também a correlação a  $^3J_{\text{CH}}$  com o C-11, em  $\delta_{\text{C}}$  40,8, da unidade etilênica e a  $^2J_{\text{CH}}$  com o carbono quaternário C-9 em  $\delta_{\text{C}}$  38,9. Para o grupo metila C-19 observou-se correlações com C-4 e C-5. As correlações dos H-12a e H-12b, da unidade etilênica, H-14 e H-15 do anel furano, com o carbono quaternário C-13, comprovam a conexão destes dois sistemas. As demais correlações podem ser observadas na **Tabela 4** comprovando a estrutura sugerida para o diterpeno **CEH-2**.

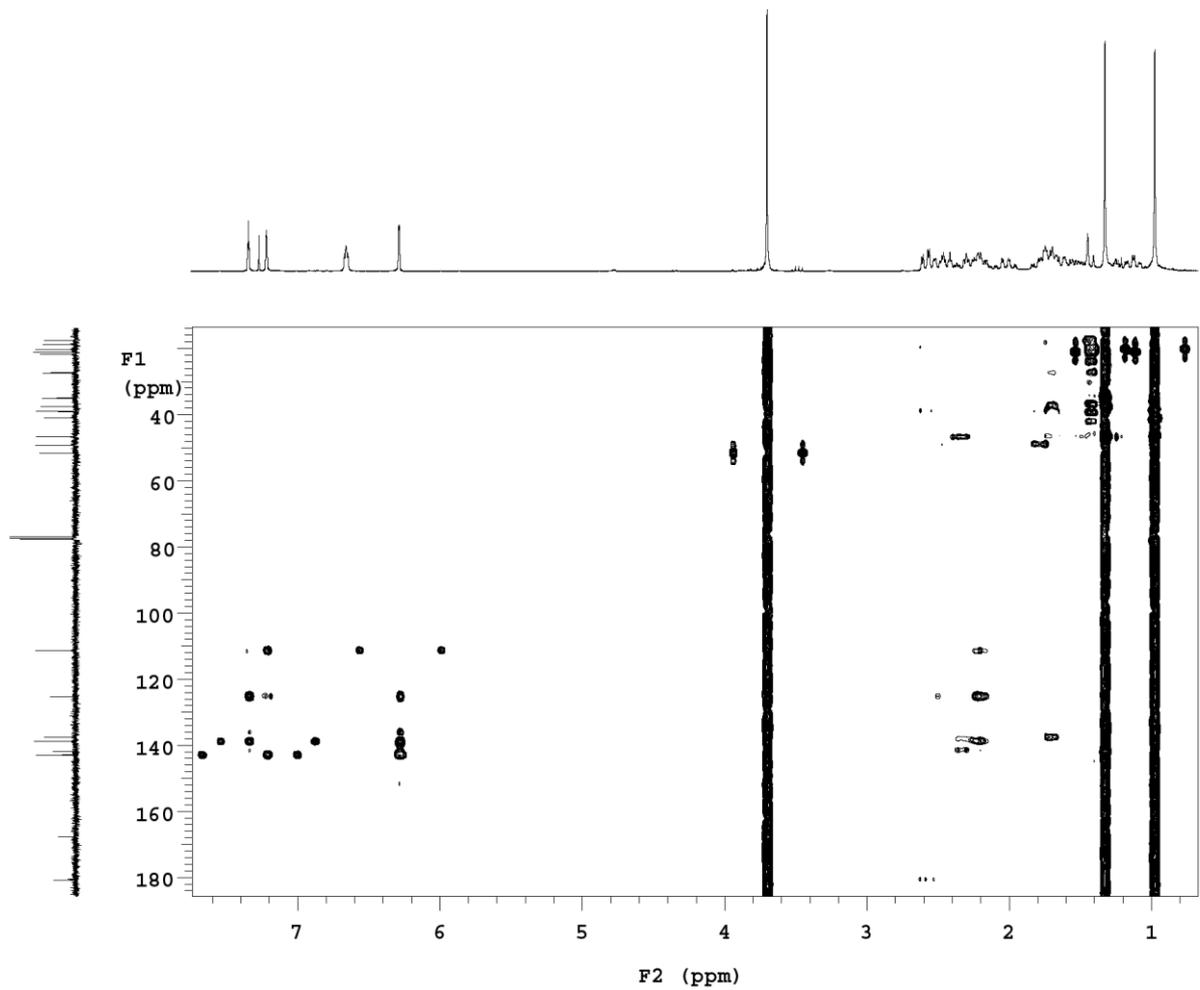


Figura 27: Espectro de HMBC da substância **CEH-2** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

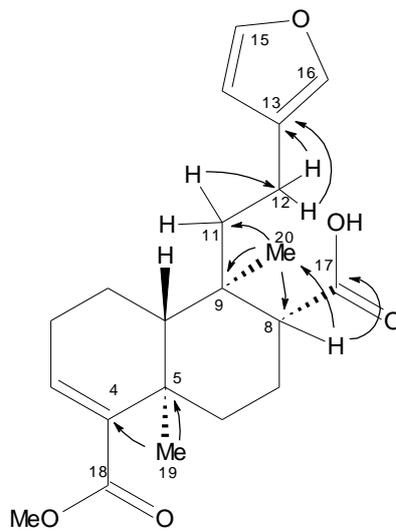


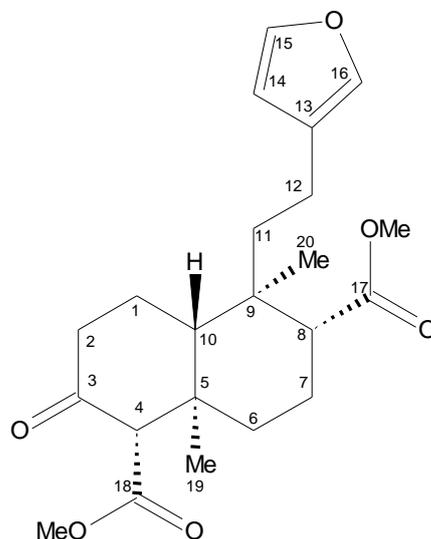
Figura 28: Principais correlações observadas no espectro de HMBC da substância **CEH-2**.

**Tabela 4:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **CEH-2**.

| C      | $\delta_c$ | DEPT          | HMQC       | HMBC               |                            |
|--------|------------|---------------|------------|--------------------|----------------------------|
|        |            |               |            | $^2J_{\text{CH}}$  | $^3J_{\text{CH}}$          |
| 1      | 17,3       | $\text{CH}_2$ | 1,50; 1,70 | H-2, H-10          |                            |
| 2      | 27,1       | $\text{CH}_2$ | 2,20; 2,33 | H-1, H-10          |                            |
| 3      | 137,6      | CH            | 6,65       |                    | H-1                        |
| 4      | 141,8      | C             |            |                    | H-2eq, H-2ax, Me-19        |
| 5      | 37,4       | C             |            | H-1, H-6a, Me-19   |                            |
| 6      | 34,8       | $\text{CH}_2$ | 1,12; 2,45 |                    | Me-19                      |
| 7      | 21,6       | $\text{CH}_2$ | 1,62; 2,02 |                    |                            |
| 8      | 49,1       | CH            | 2,58       |                    | H-11a, Me-20               |
| 9      | 38,9       | C             |            | H-8, H-10, Me-20   |                            |
| 10     | 46,6       | CH            | 1,45       | H-1eq              | H-2eq, H-11a, Me-19, Me-20 |
| 11     | 40,8       | $\text{CH}_2$ | 1,61; 1,74 | H-12ax             | Me-20                      |
| 12     | 18,5       | $\text{CH}_2$ | 2,15; 2,45 | H-11a, H-11b       |                            |
| 13     | 125,2      | C             |            | H-12a, H-12b, H-14 | H-15                       |
| 14     | 111,3      | CH            | 6,28       |                    | H-11b, H-16                |
| 15     | 142,9      | CH            | 7,34       | H-14               | H-16                       |
| 16     | 138,8      | CH            | 7,21       |                    | H-14-H-15                  |
| 17     | 180,8      | C             |            | H-8                |                            |
| 18     | 167,7      | C             |            |                    | MeO-18                     |
| 19     | 21,0       | $\text{CH}_3$ | 1,33       |                    |                            |
| 20     | 20,1       | $\text{CH}_3$ | 0,98       |                    | H-8                        |
| MeO-18 | 51,5       | $\text{CH}_3$ | 3,70       |                    |                            |

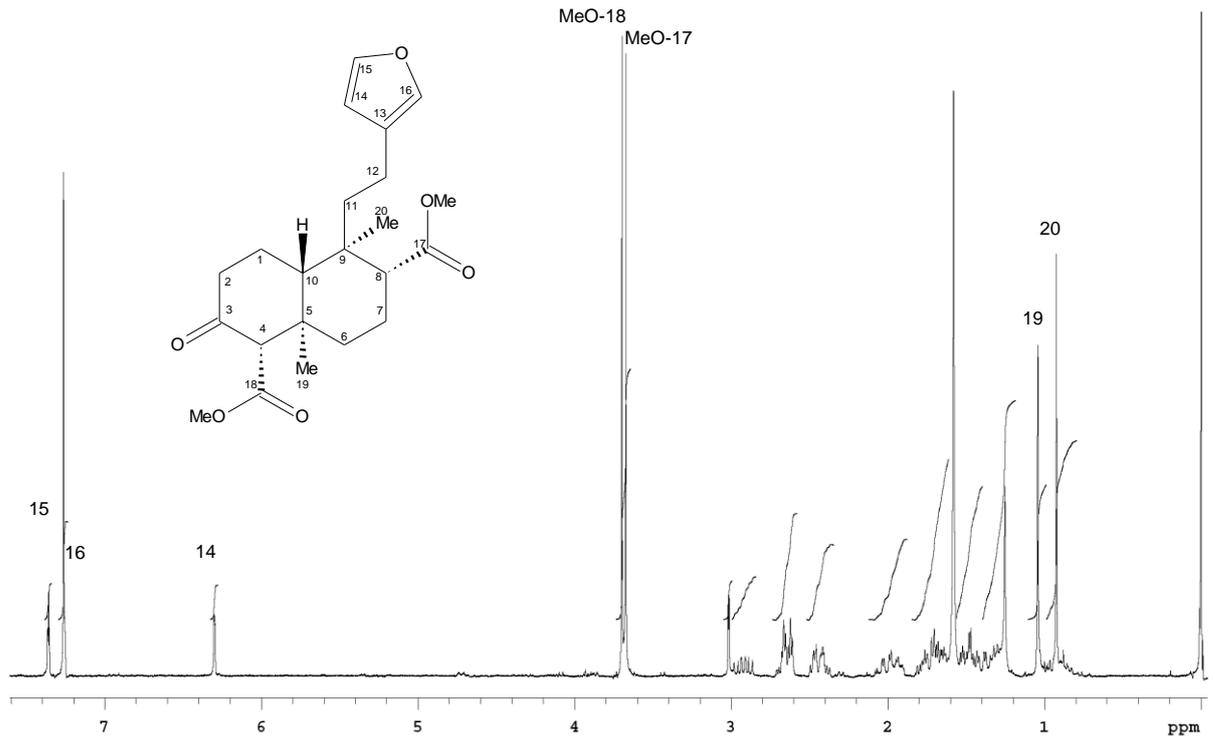
### 5.3.3 Diterpeno CEH-3

O diterpeno **CEH-3** foi identificado com base na comparação de seus dados espectroscópicos com os de **CEH-1** (nasimalun B).

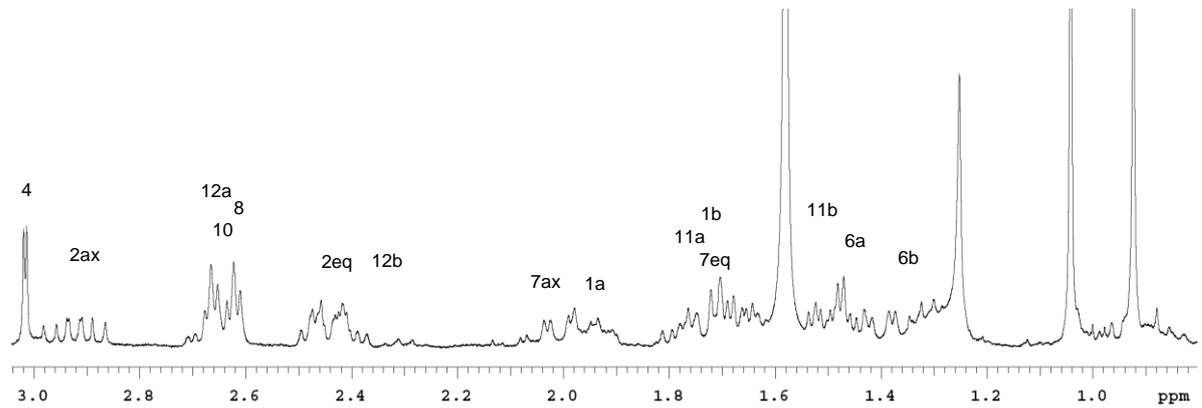


**CEH-3**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 29 e 30, Tabela 5) da substância **CEH-3** apresenta sinais para três hidrogênios aromáticos característicos do anel furano em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (H-14), 7,26 (H-16) e 7,36 (H-15), confirmados por suas correlações no espectro de COSY. A presença do sistema decalínico foi confirmada, principalmente, pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,20 (H-1a), 1,70 (H-1b), 2,93 (H-2ax), 2,42 (H-2eq), 1,42 (H-6a), 1,32 (H-6b), 2,02 (H-7ax) e 1,70 (H-7eq), atribuídos aos hidrogênios metilênicos e sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,01 (H-4), 2,63 (H-8) e 2,64 (H-10), referentes aos hidrogênios metínicos. Em relação a **CEH-1**, observa-se a presença de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,01, atribuído ao hidrogênio H-4, e a ausência do sinal referente ao hidrogênio sobre dupla ligação em  $\delta_{\text{H}}$  6,65. Em  $\delta$  3,67 (3H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (3H) observam-se os sinais das metoxilas dos grupos carbometóxi ligados ao C-8 e C-4, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,04 e 0,92 foram atribuídos aos grupos metila Me-19 e Me-20, respectivamente. A unidade etilênica foi caracterizada pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,74 (H-11a), 1,50 (H-11b) 2,67 (H-12a) e 2,33 (H-12b),



**Figura 29:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-3** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

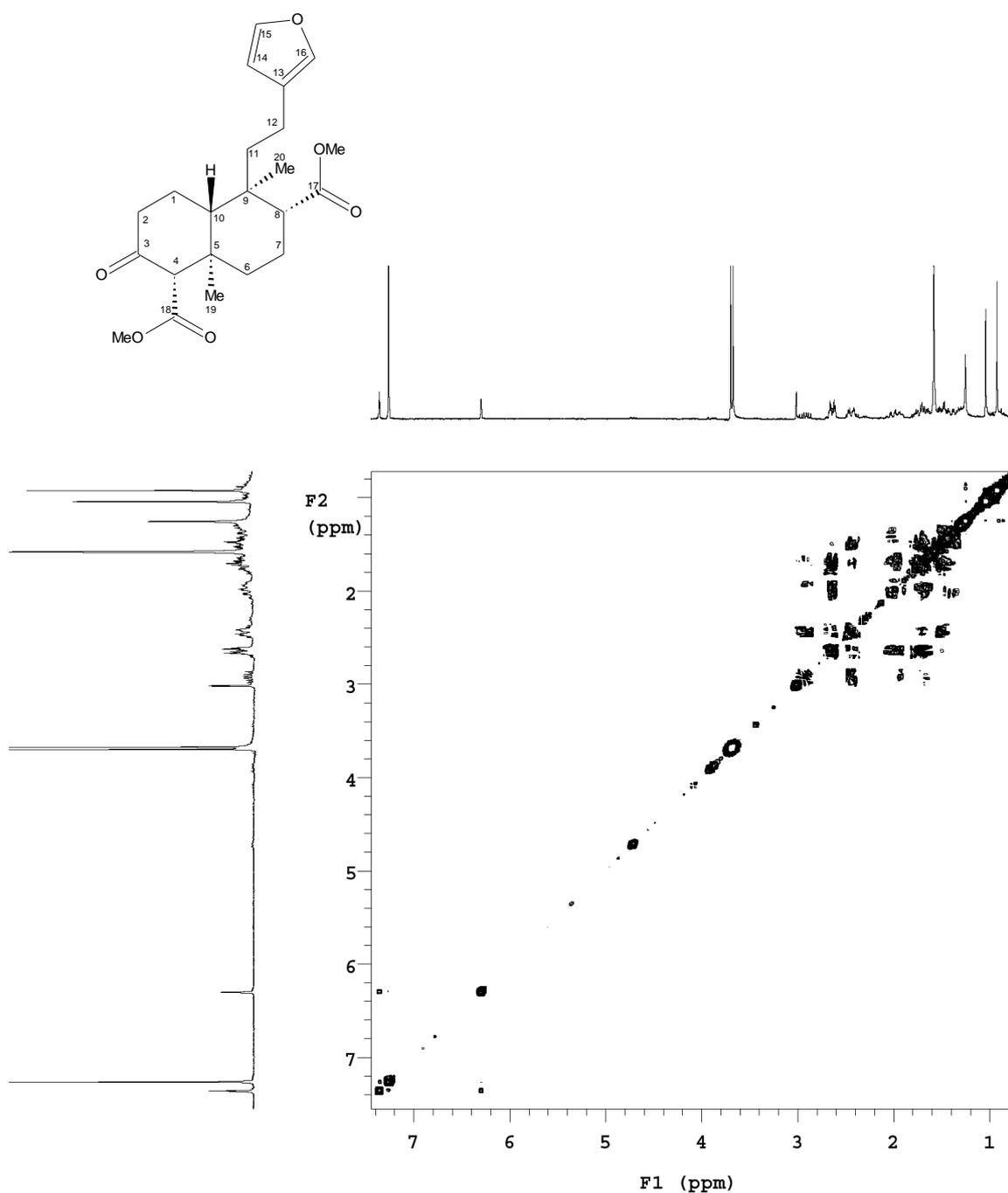


**Figura 30:** Ampliação parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-3**.

**Tabela 5:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY de **CEH-3**.

| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY                   |
|--------|----------------------------------|------------------------|
| 1a     | 1,95 (m)                         | H-1b, H-2a, H-10       |
| 1b     | 1,70 (m)                         | H-1a, H-2a, H-10       |
| 2ax    | 2,93 (ddd, 14,4; 13,5; 7,5)      | H-1a, H-1b, H-2eq, H-4 |
| 2eq    | 2,42 (m)                         | H-2ax                  |
| 4ax    | 3,01 (d, 1,8)                    | H-2ax                  |
| 6a     | 1,42 (m)                         | H-6b, H-7ax, H-7eq     |
| 6b     | 1,32 (m)                         | H-6a, H-7ax            |
| 7ax    | 2,02 (ddd, 13,8; 13,8; 3,6)      | H-6a, H-7ax            |
| 7eq    | 1,70 (m)                         | H-7ax, H-6a, H-6b, H-8 |
| 8ax    | 2,63 (dd, 9,0; 3,6)              | H-7ax                  |
| 10ax   | 2,64 (dd, 9,3; 3,6)              | H-1a, H1b              |
| 11a    | 1,74 (ddd, 14,7; 14,7; 5,4)      | H-11b, H-12a, H-12b    |
| 11b    | 1,50 (m)                         | H-11a, H-12a           |
| 12a    | 2,67 (m)                         | H-12b, H-11a, H-11b    |
| 12b    | 2,33 (m)                         | H-12a, H-11a           |
| 14     | 6,30 (dd, 1,8; 0,9)              | H-15                   |
| 15     | 7,36 (t, 1,8)                    | H-14, H-16             |
| 16     | 7,26 (m)                         | H-15                   |
| 19     | 1,04 (s)                         |                        |
| 20     | 0,92 (s)                         |                        |
| MeO-17 | 3,67 (s)                         |                        |
| MeO-18 | 3,70 (s)                         |                        |

A configuração relativa de **CEH-3** foi definida pelos valores das constantes de acoplamento ( $J$ ) usando-se como modelo o diterpeno nasimalum (b) (HASAN et al., 2001). A constante de acoplamento de 1,8 Hz relativa ao acoplamento em W entre H-4 e H-2ax, como observado no espectro de COSY, determina a orientação  $\beta$ -axial para o H-4 e, conseqüentemente,  $\alpha$ -equatorial para o grupo carbometóxi ligado em C-4. A orientação  $\alpha$ -equatorial para o grupo carbometóxi em C-8 foi estabelecida pela constante de acoplamento de 9,0 Hz entre H-8ax e H-7ax. A configuração *trans* para a decalina foi determinada pela constante de acoplamento de 9,3 Hz observado entre H-10ax e H-7ax.

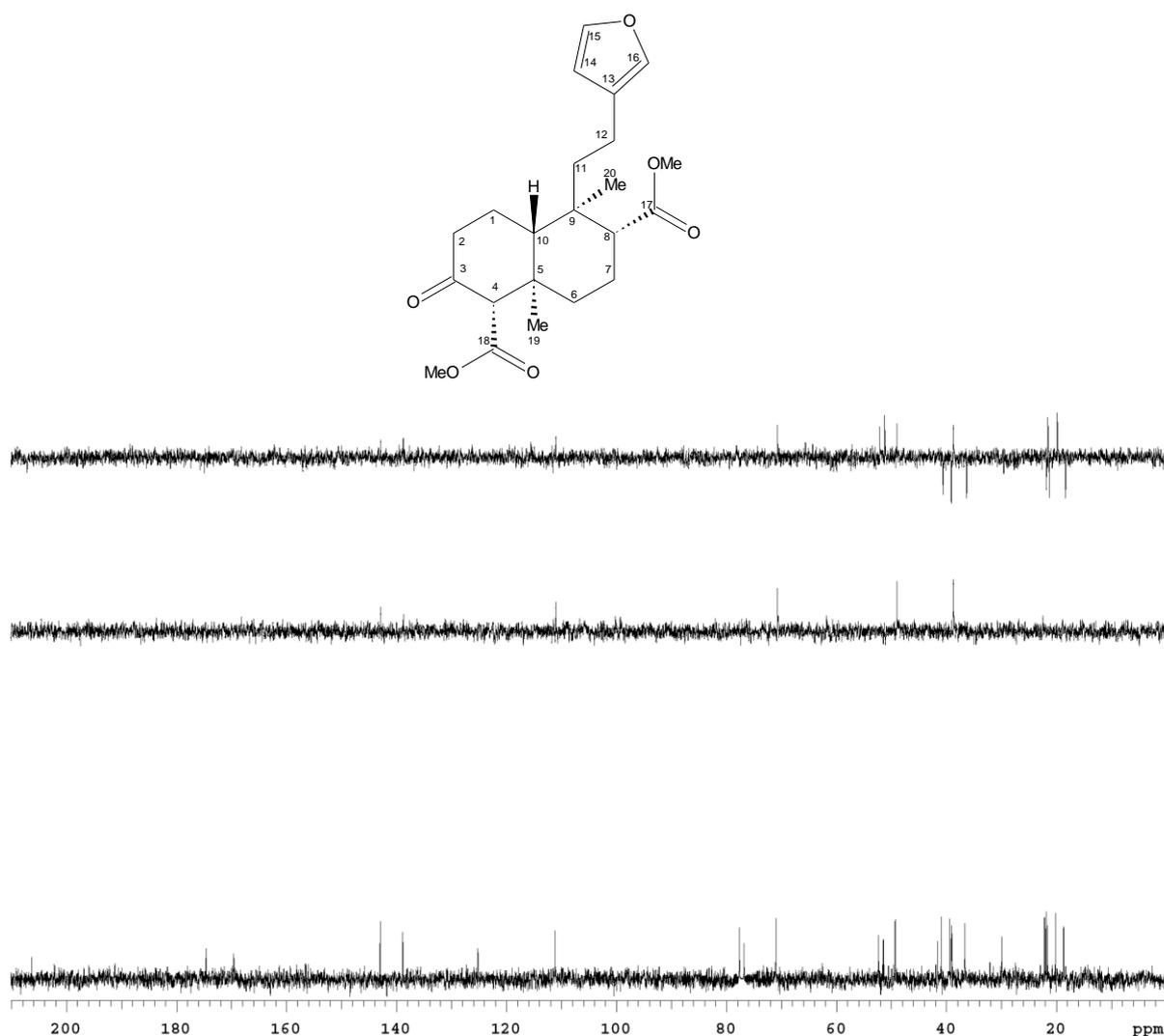


**Figura 31:** Espectro de COSY da substância **CEH-3** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

As diferenças observadas no espectro de RMN <sup>13</sup>C do diterpeno **CEH-3** em relação ao observado para **CEH-1** foram, principalmente, a presença de sinais adicionais para uma carbonila e um carbono metínico, em  $\delta_c$  206,4 e 71,0, respectivamente, em **CEH-3**, e a ausência dos sinais da insaturação do esqueleto

terpênico em  $\delta_c$  137,5 (C-3) e 142,0 (C-4), em **CEH-1**. Estas diferenças levaram a atribuir a carbonila  $\delta_c$  206,4 em C-3 e o carbono metínico  $\delta_c$  71,0 em C-4.

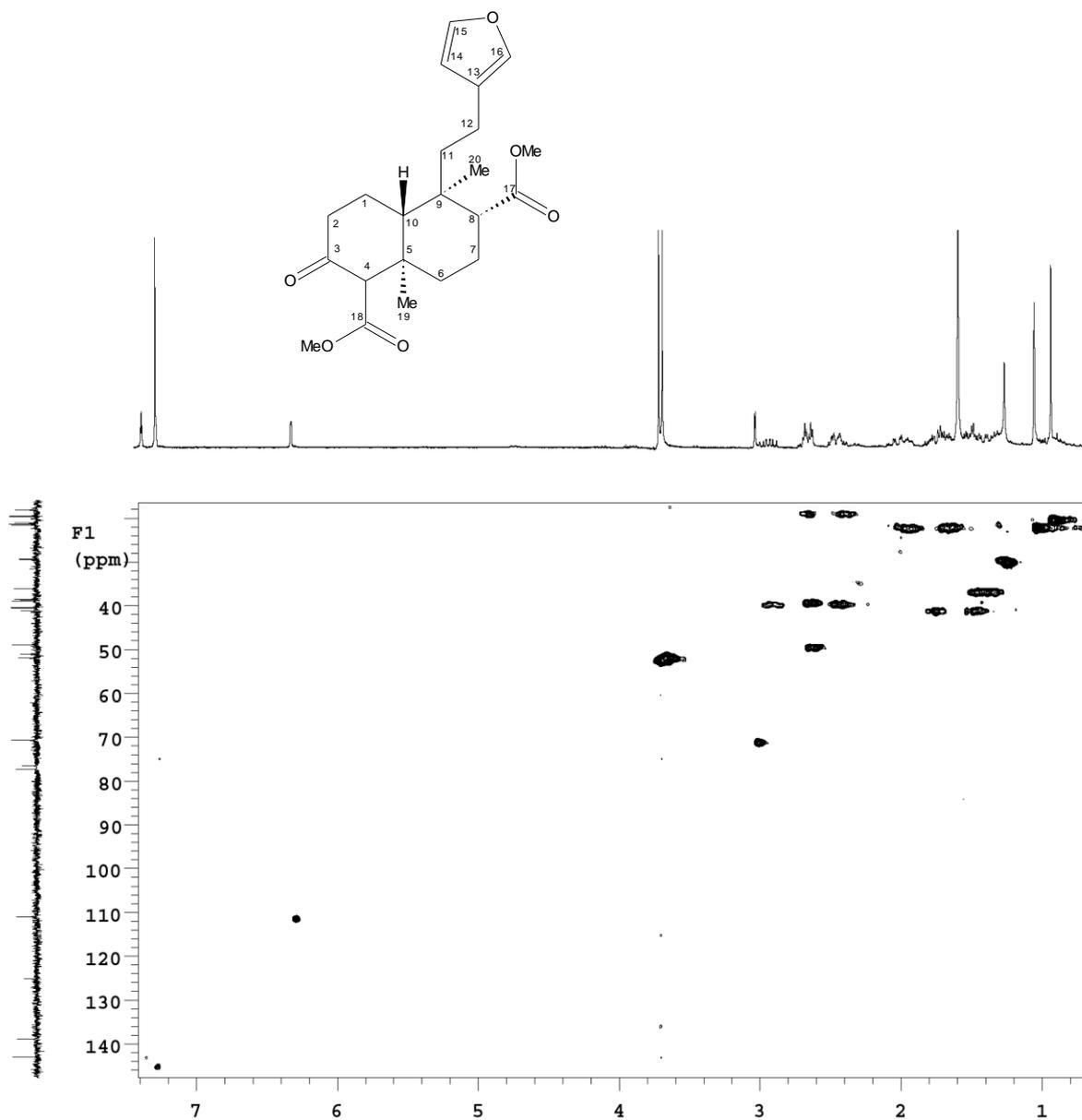
Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  foram analisados conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 32**) e HMQC (**Figura 33**), sendo que 22 sinais foram atribuídos ao diterpeno **CEH-3** por comparação com os dados de **CEH-1**.



**Figura 32:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEH-3** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

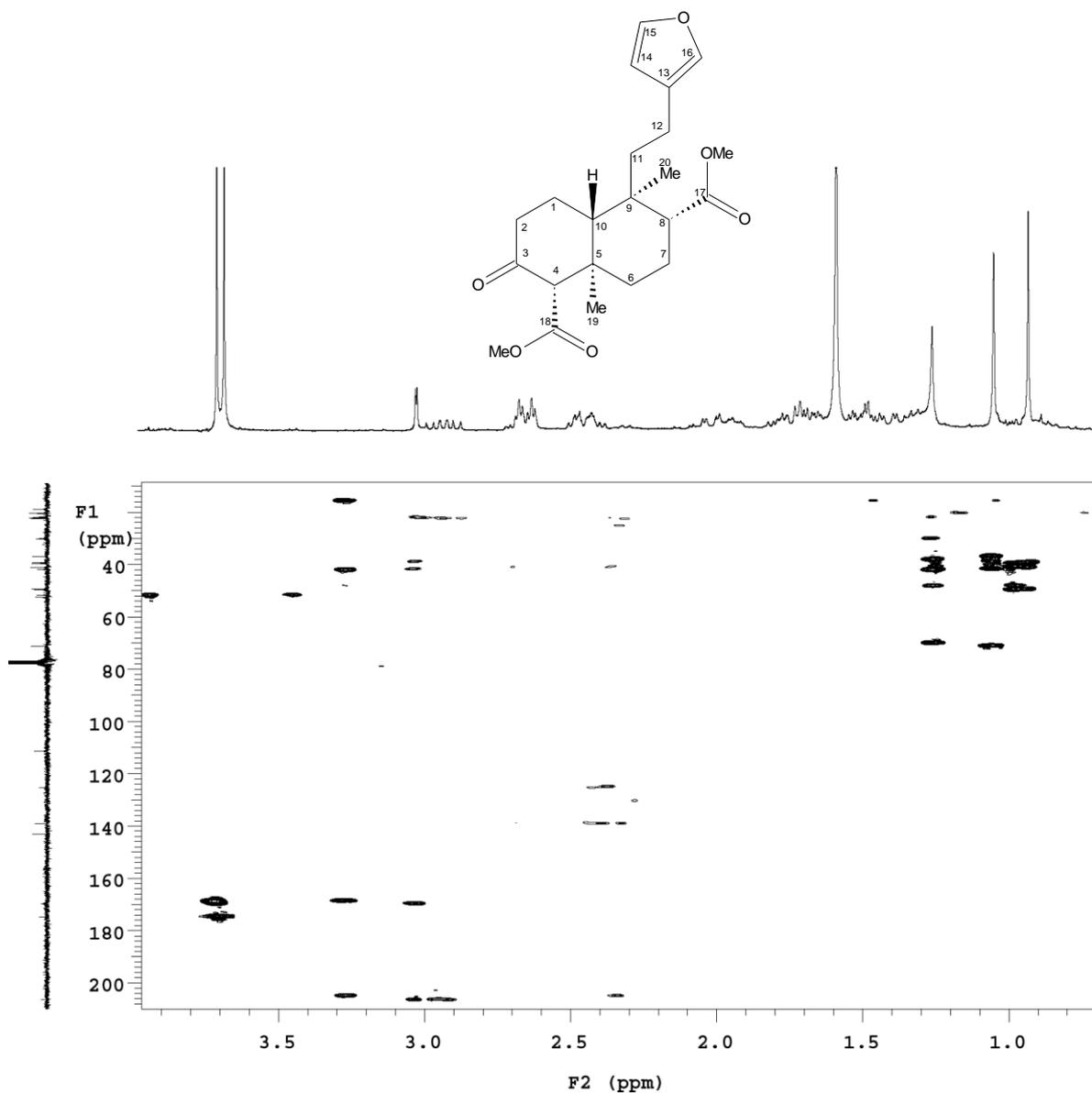
O sistema furânico foi evidenciado pelos sinais em  $\delta_c$  125,2 (C-13), 111,2 (C-14), 143,0 (C-15) e 138,9 (C-16). Os sinais dos carbonos metilênicos em  $\delta_c$  22,2 (C-1), 39,5 (C-2), 36,7 (C-6), 21,7 (C-7), 40,9 (C-11) e 18,7 (C-12); carbonos metínicos em  $\delta_c$  71,0 (C-4), 49,3 (C-8) e 39,0 (C-10) e carbonos não ligados a hidrogênio em  $\delta_c$  41,6 (C-5), 39,4 (C-9), confirmaram a presença do sistema diterpênico. Os grupos

carbometóxi foram evidenciados pelos sinais em  $\delta_c$  174,6 (C-17), 169,6 (C-18), 51,5 (MeO-17) e 52,4 (MeO-18).



**Figura 33:** Espectro de HMQC da substância **CEH-3** (75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

No espectro de HMBC (**Figuras 34 e 35**), observaram-se as correlações do H-4 com a carbonila em C-3 e com o carbono quaternário C-5, bem como as correlações para as metilas Me-19 com o C-5 e Me-20 com o C-8, comprovando as suas respectivas atribuições. Não foram encontradas correlações dos grupos carbometóxi com o esqueleto terpênico, entretanto as demais correlações observadas, mostradas na **Tabela 6**, são compatíveis com a estrutura proposta.



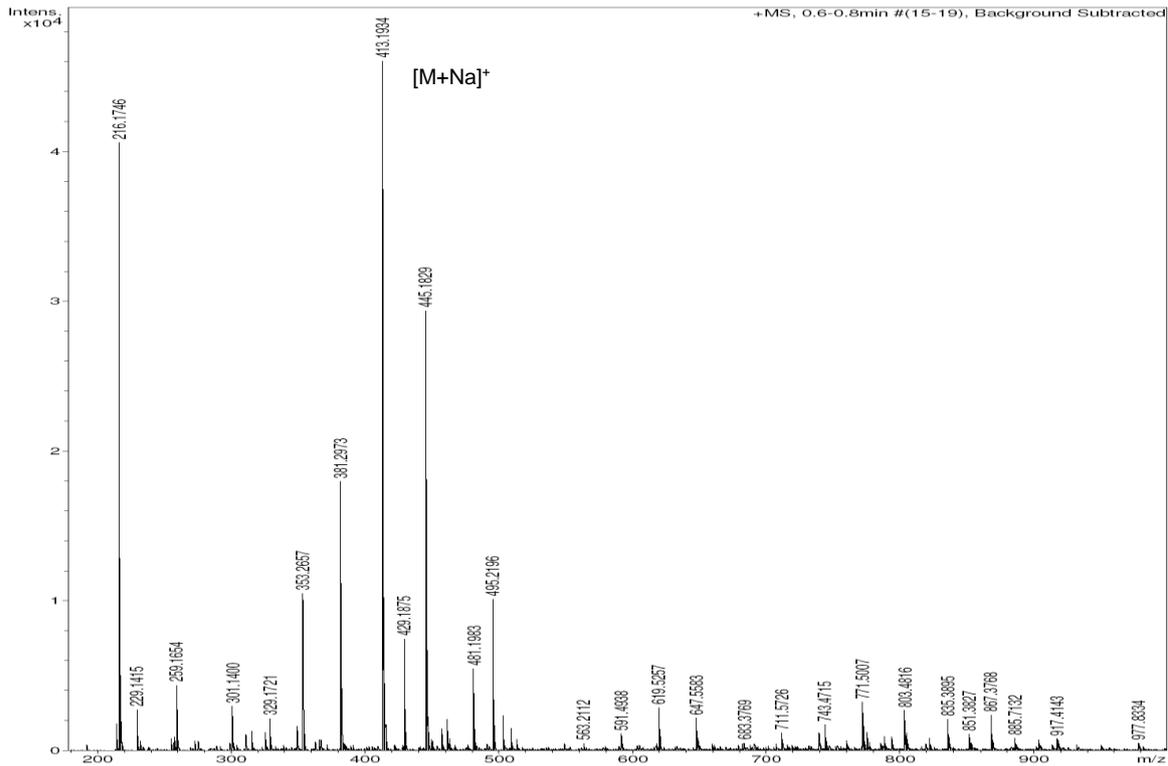
**Figura 34:** Ampliação parcial do espectro de HMBC da substância **CEH-3** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) da **CEH-3** comparados com os valores de  $\delta_c$  para o nasimalun B (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (HASAN et al., 2000).

| C      | $\delta_c$ | DEPT          | CEH-3      |                   | nasimalun B       |       |
|--------|------------|---------------|------------|-------------------|-------------------|-------|
|        |            |               | HMQC       | HMBC              | $\delta_c$        |       |
|        |            |               |            | $^2J_{\text{CH}}$ | $^3J_{\text{CH}}$ |       |
| 1      | 22,2       | $\text{CH}_2$ | 1,95; 1,70 | H-2               |                   | 17,2  |
| 2      | 39,5       | $\text{CH}_2$ | 2,93; 2,42 |                   |                   | 26,9  |
| 3      | 206,4      | C             |            | H-4               |                   | 137,2 |
| 4      | 71,0       | CH            | 3,01       |                   |                   | 141,8 |
| 5      | 41,6       | C             |            | H-4, Me-19        |                   | 37,3  |
| 6      | 36,7       | $\text{CH}_2$ | 1,42; 1,32 |                   | H-4               | 34,9  |
| 7      | 21,7       | $\text{CH}_2$ | 2,02; 1,70 | H-6b              |                   | 21,6  |
| 8      | 49,3       | CH            | 2,63       |                   | Me-20             | 49,1  |
| 9      | 39,4       | C             |            | Me-20             |                   | 38,7  |
| 10     | 39,0       | CH            | 2,64       |                   | Me-19,<br>Me-20   | 46,4  |
| 11     | 40,9       | $\text{CH}_2$ | 1,74; 1,50 |                   |                   | 40,9  |
| 12     | 18,7       | $\text{CH}_2$ | 2,67; 2,33 |                   | H-11a             | 18,1  |
| 13     | 125,2      | C             |            |                   |                   | 125,1 |
| 14     | 111,2      | CH            | 6,30       |                   | H-16              | 111,0 |
| 15     | 143,0      | CH            | 7,36       | H-14              | H-16              | 142,7 |
| 16     | 138,9      | CH            | 7,26       |                   | H-14              | 138,5 |
| 17     | 174,6      | C             |            |                   | MeO-17            | 174,9 |
| 18     | 169,6      | C             |            |                   | MeO-18            | 167,5 |
| 19     | 21,9       | $\text{CH}_3$ | 1,04       |                   |                   | 20,8  |
| 20     | 20,2       | $\text{CH}_3$ | 0,92       |                   | H-11a             | 19,9  |
| MeO-17 | 51,5       | $\text{CH}_3$ | 3,67       |                   |                   | 51,1  |
| MeO-18 | 52,4       | $\text{CH}_3$ | 3,70       |                   |                   | 51,2  |

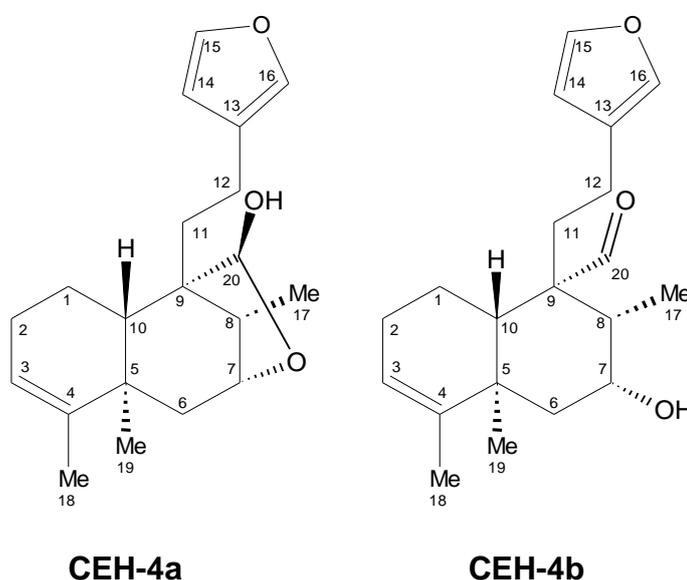
As evidências apresentadas pelos dados de RMN somadas aos dados do espectro de massas (ESI-MS), no modo positivo, com o pico do íon molecular em  $m/z$  413,1934  $[M+Na]^+$  (**Figura 36**) permitiram propor a fórmula  $C_{22}H_{30}O_5$  e confirmar a estrutura de **CEH-3** como sendo 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila.



**Figura 36:** Espectro de ESI-MS da substância **CEH-3** no modo positivo.

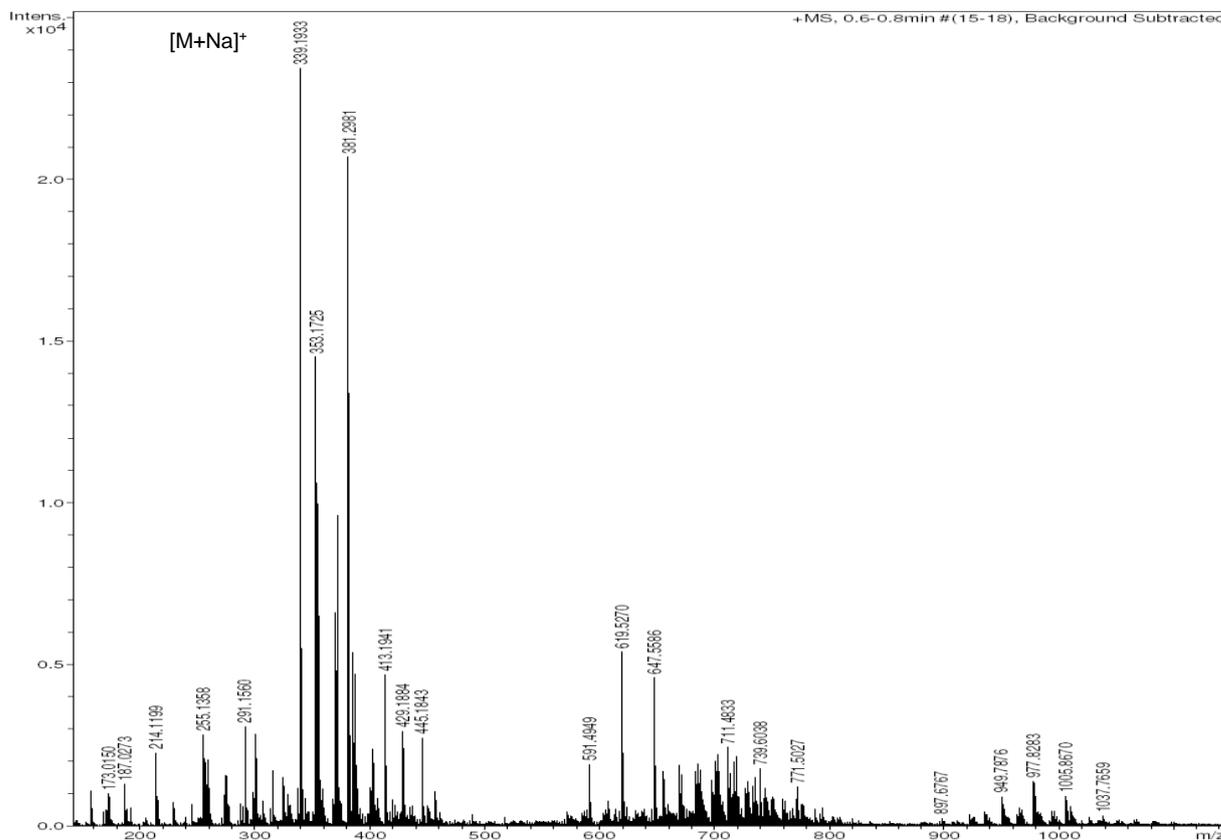
### 5.3.4 Diterpenos CEH-4a e CEH-4b

Os diterpenos **CEH-4a** e **CEH-4b** foram obtidos na forma de uma mistura em equilíbrio de proporção aproximada 3:1. A fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_3$  foi estabelecida para os diterpenos por intermédio de espectrometria de massas (ESI-MS), no modo positivo, que mostra o pico referente ao íon molecular acrescido de sódio em  $m/z$  339,1933  $[M+Na]^+$  (**Figura 37**). A comparação dos dados de RMN obtidos com a literatura (TANG et al., 2008) levou a identificar a mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** como sendo o ptychonal-hemiacetal e ptychonal, respectivamente.



A maior concentração de **CEH-4a** na amostra resultou em maior intensidade dos sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  e integração dos sinais de RMN de  $^1H$  para este diterpeno o que possibilitou a atribuição respectiva dos dados de RMN para **CEH-4a** e **CEH-4b**.

A mistura de ptychonal-hemiacetal e ptychonal foi previamente isolada de *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) por Tang et al. (2008) e, apesar de terem sido reportados como substâncias inéditas, foram publicados somente os principais sinais de RMN de  $^1H$  para ambas. A insuficiência de dados espectrais na literatura levou a comparar os dados de RMN de **CEH-4a** e **CEH-4b** com os do 20-O-metil-ptychonal-acetal (TANG et al., 2008).



**Figura 37:** Espectro de ESI-MS da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b**, no modo positivo.

A comparação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **CEH-4a** e **CEH-4b** (Figuras 38 e 39, Tabelas 7 e 8) com os dos diterpenos discutidos anteriormente mostrou a presença de sinais adicionais na região de  $\delta_{\text{H}}$  4,20 a 5,30 sugerindo mudanças no padrão de substituição do sistema decalínico em ambos os diterpenos e, também, de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  10,01, comprovando a presença do grupo aldeído em **CEH-4b**.

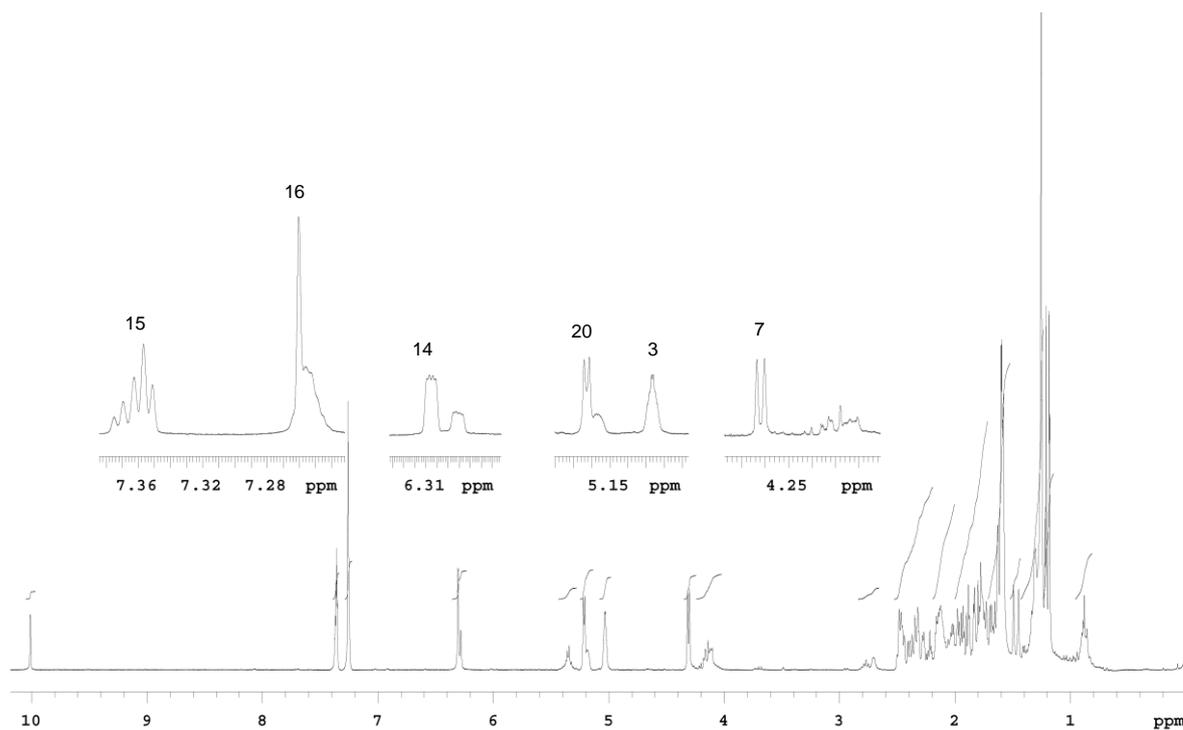
Os sinais observados em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (H-14), 7,36 (H-15), 7,26 (H-16) comprovaram a presença de anel furânico para o diterpeno **CEH-4a** e, da mesma forma, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,28 (H-14), 7,37 (H-15), 7,26 (H-16) comprovaram a presença deste grupo para o **CEH-4b**. Os sistemas etilênicos em ambos os diterpenos foram evidenciados pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,97 (H-11a), 1,74 (H-11b), 2,44 (H-12a) e 2,26 (H-12b).

O espectro mostrou os sinais de grupos metila secundário (Me-17) em  $\delta_{\text{H}}$  1,19 (*d*, 6,9), para **CEH-4a** e 1,23 (*d*, 7,5) para **CEH-4b**; grupos metílicos terciários (Me-18 e 19) em  $\delta$  1,60 (*d*, 1,8) e 1,25 (*s*) para **CEH-4a** e em 1,60 (*m*) e 1,18 (*s*) para

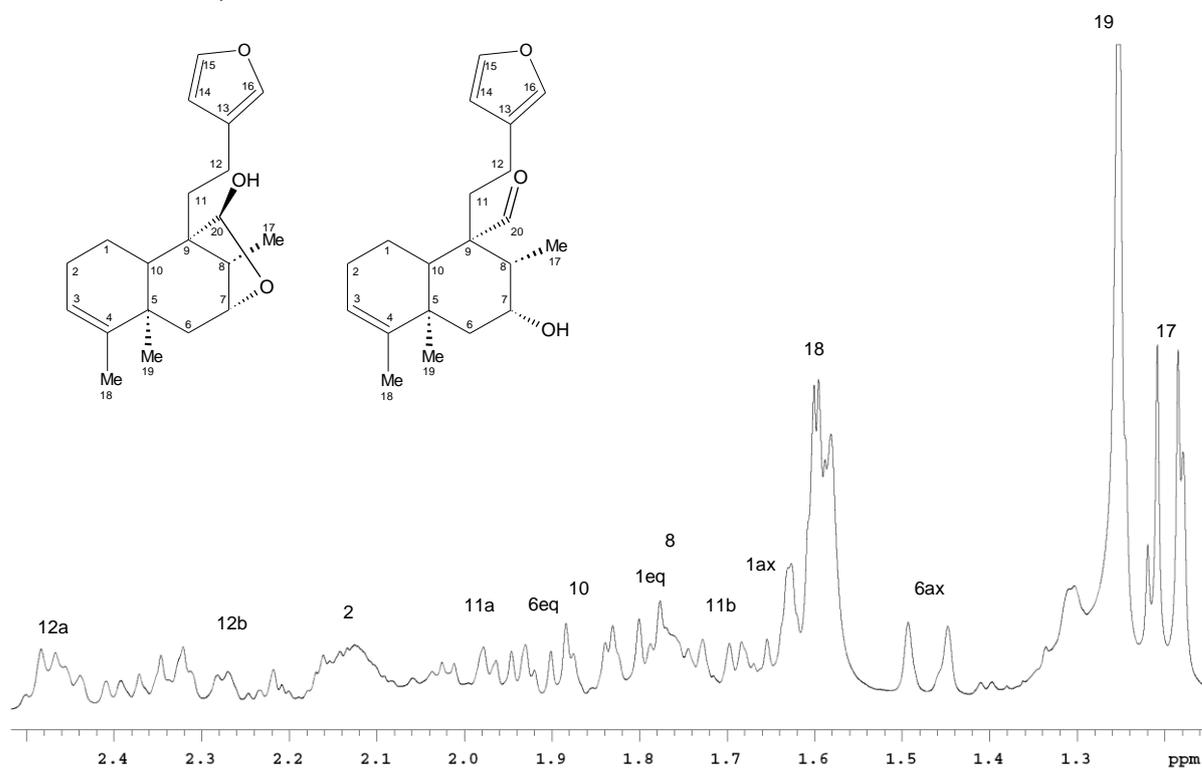
**CEH-4b.** Os sinais em  $\delta_H$  5,03 (*dl*) e 5,19 (*m*) são referentes aos hidrogênios sobre dupla ligação (H-3) de **CEH-4a** e **CEH-4b**, respectivamente. Os sinais em  $\delta_H$  1,78 (1ax), 1,66 (1eq) e 2,12 (2ax, eq) correspondem aos hidrogênios metilênicos de ambos os diterpenos bem como os sinais para hidrogênio metínico em  $\delta_H$  1,78 (*m*) (H-8) e 1,86 (H-10).

Para o diterpeno **CEH-4a**, o sinal de hidrogênio hemiacetálico em  $\delta_H$  5,21 (*d*, 4,5; H-20) e de hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  4,31 (*d*, 4,8; H-7) caracterizam a presença do anel lactol ligado em C-7 e C-9 do sistema decalínico. Em  $\delta_H$  1,92 (*dd*, 13,5; 5,0) e 1,46 (*d*, 13,5) temos os sinais dos hidrogênios metilênicos H-6eq e H-6ax, respectivamente. De forma semelhante ao relatado para o 20-O-metil-ptychonal-acetal (TANG et al., 2008), não foi observado acoplamento entre H-7 e H-6ax e a constante de acoplamento de 4,7 Hz observada entre H-7 e H-6eq pode ser explicada pelo ângulo diedro ser de aproximadamente 90° entre estes hidrogênios.

Para **CEH-4b**, os sinais do H-6eq em  $\delta_H$  2,18 (*dd*, 15,0; 2,1), H-6ax em 1,42 (*d*, 15,3, 4,2) e H-7 em 1,78 (*m*) demonstram, como esperado, pelas constantes de acoplamento observada de 4,2 Hz entre H-7 e H-6ax, alteração no ângulo de ligação entre estes hidrogênios ocasionada pela ausência do anel lactol na estrutura como em **CEH-4a**.

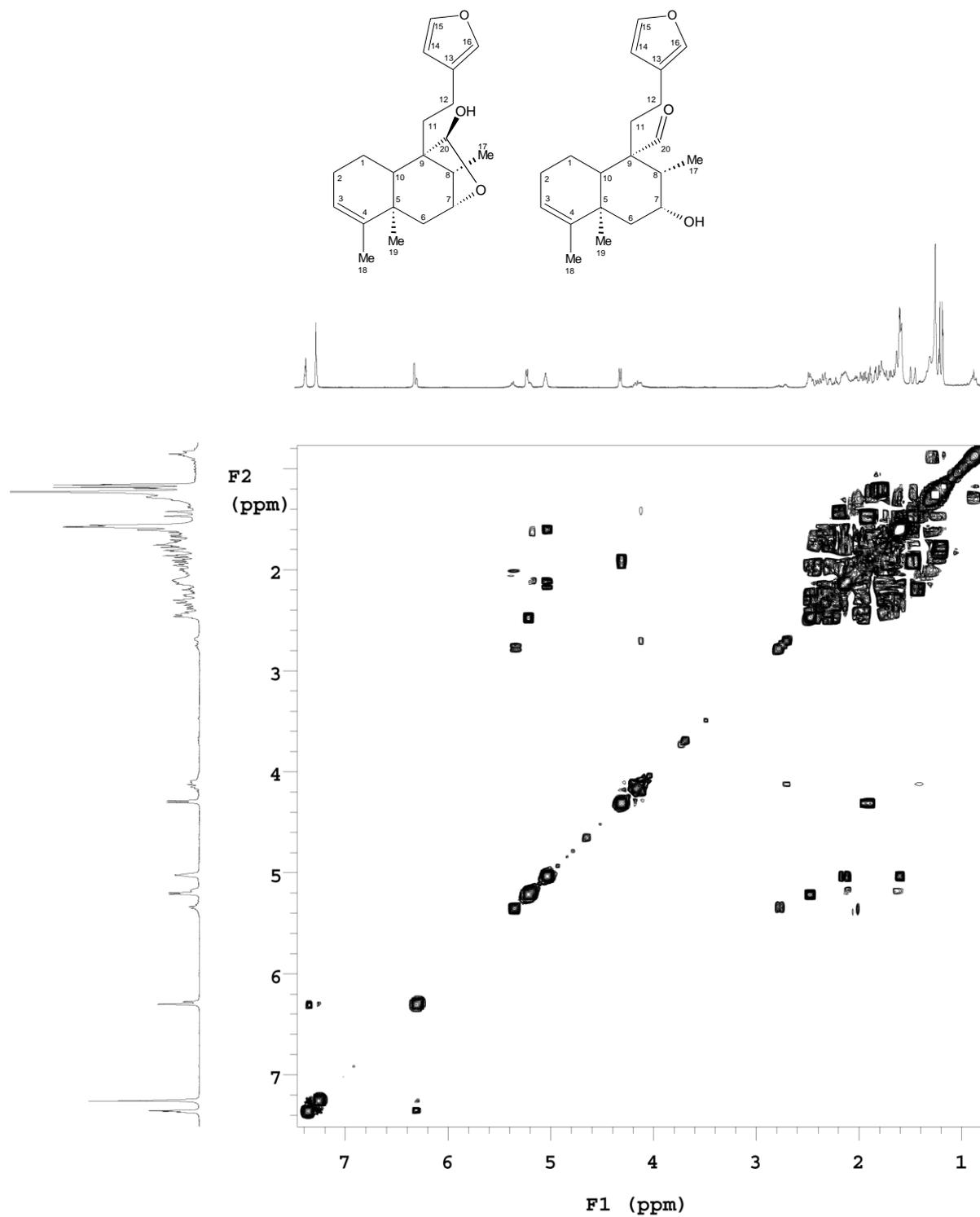


**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 39:** Ampliação parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b**.

As correlações observadas no COSY para os diterpenos **CEH-4a** e **CEH-4b** podem ser observadas na **Figura 40** e **Tabelas 7 e 8**.



**Figura 40:** Espectro de COSY da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY para o **CEH-4a** comparados com os valores de  $\delta_{\text{H}}$  (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) para o 20-O-metil-ptychonal-acetal descritos na literatura (TANG et al., 2008).

| CEH-4a |                                  |                     | 20-O-metil-ptychonal-acetal      |
|--------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY                | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) |
| 1ax    | 1,66 (m)                         | H-1aeq, H-2, H-10   | 1,68 (m)                         |
| 1eq    | 1,78 (m)                         | H-1ax, H-2          | 1,79 (m)                         |
| 2ax    | 2,12 (m)                         | H-1ax, H-1eq, H-3   | 2,15 (m)                         |
| 2eq    | 2,12 (m)                         | H-1ax, H-1eq, H-3   | 2,13 (m)                         |
| 3      | 5,03 (dl)                        | H-2, H-18           | 5,03 (dl)                        |
| 6ax    | 1,46 (d, 13,5)                   | H-6eq               | 1,48 (d, 13,4)                   |
| 6eq    | 1,92 (dd, 13,5; 5,0)             | H-6ax, H-7          | 1,91 (dd, 13,4; 4,7)             |
| 7eq    | 4,31 (d, 4,8)                    | H-6eq               | 4,25 (d, 4,7)                    |
| 8ax    | 1,78 (m)                         | H-17                | 1,75 (q, 7,1)                    |
| 10ax   | 1,86 (dd, 13,5; 2,7)             | H-1eq               | 1,85 (dd, 13,4; 2,6)             |
| 11a    | 1,97 (ddd, 14,4; 14,4; 4,2)      | H-11b, H-12a, H-12b | 1,94 (m)                         |
| 11b    | 1,74 (ddd, 13,5; 13,5; 4,0)      | H-11a, H-12a, H-12b | 1,64 (m)                         |
| 12a    | 2,44 (ddd, 13,8; 13,5; 5,1)      | H-12b, H-11a, H-11b | 2,41 (m)                         |
| 12b    | 2,26 (ddd, 14,7; 14,7; 4,0)      | H-12a, H-11a, H-11b | 2,25 (m)                         |
| 14     | 6,30 (dd, 2,4; 0,9)              | H-15, H-16          | 6,30 (dd, 1,6; 0,8)              |
| 15     | 7,36 (dd, 1,8; 1,5)              | H-14                | 7,35 (dd, 1,6; 1,6)              |
| 16     | 7,26 (sl)                        | H-14                | 7,24 (dd, 1,6; 0,8)              |
| 17     | 1,19 (d, 6,9)                    | H-8                 | 1,13 (d, 7,1)                    |
| 18     | 1,60 (d, 1,8)                    | H-3                 | 1,60 (sl)                        |
| 19     | 1,25 (s)                         |                     | 1,25 (s)                         |
| 20     | 5,21 (d, 4,5)                    | H-12a               | 4,64 (s)                         |
| MeO    | -                                | -                   | 3,32 (s)                         |

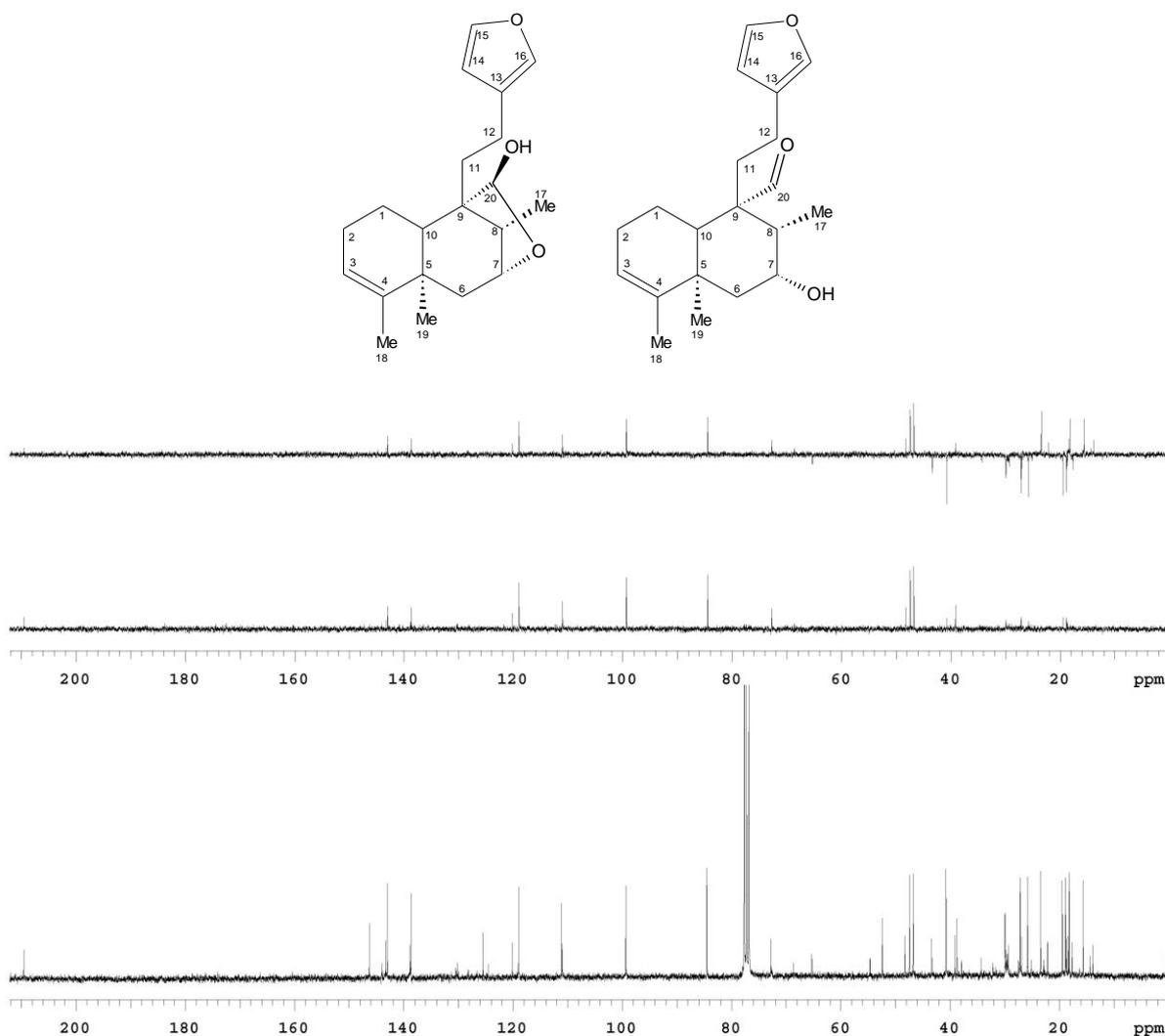
**Tabela 8:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no COSY da **CEH-4b** comparados com os dados descritos na literatura para o ptychonal (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008).

| CEH-4b  |                                  | Ptychonal |
|---------|----------------------------------|-----------|
| H       | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | H         |
| 1eq     | 1,78 (m)                         | 1eq       |
| 1ax     | 1,66 (m)                         | 1ax       |
| 2ax, eq | 2,12 (m)                         | 2ax, eq   |
| 3       | 5,19 (m)                         | 3         |
| 6ax     | 1,42 (d, 15,3, 4,2)              | 6ax       |
| 6eq     | 2,18 (dd, 15,0; 2,1)             | 6eq       |
| 7eq     | 4,14 (m)                         | 7eq       |
| 8ax     | 1,78 (m)                         | 8ax       |
| 10ax    | 1,86 (m)                         | 10ax      |
| 11a     | 1,97 (m)                         | 11a       |
| 11b     | 1,74 (m)                         | 11b       |
| 12a     | 2,44 (m)                         | 12a       |
| 12b     | 2,26 (m)                         | 12b       |
| 14      | 6,28 (m)                         | 14        |
| 15      | 7,37 (m)                         | 15        |
| 16      | 7,26 (s)                         | 16        |
| 17      | 1,23 (d, 7,5)                    | 17        |
| 18      | 1,60 (m)                         | 18        |
| 19      | 1,18 (s)                         | 19        |
| 20      | 10,01 (s)                        | 20        |

A presença de sinais duplicados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 41**) com intensidade na proporção de 3:1 permitiu atribuí-los aos diterpenos **CEH-4a** e **CEH-b** distintamente com o auxílio dos dados publicados para o 20-O-metil-ptychonal-acetal conforme pode ser observado nas **Tabelas 9 e 10**.

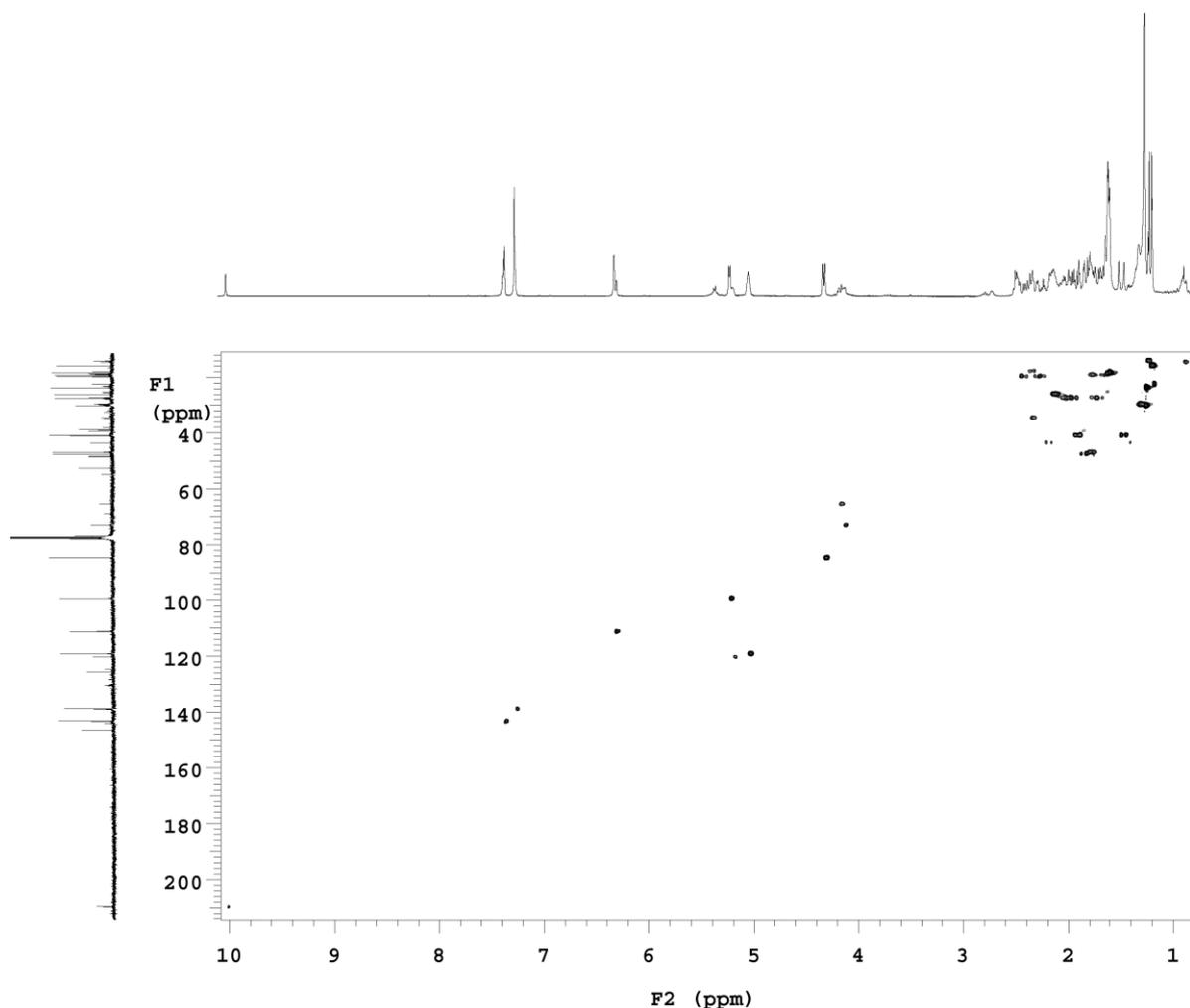
As diferenças estruturais entre os diterpenos estão relacionadas principalmente ao C-20, que no caso de **CEH-4a** é notado pelo sinal de carbono hemiacetálico em  $\delta_{\text{C}}$  99,3 e em **CEH-4b** pelo sinal de carbono aldeídico em  $\delta_{\text{C}}$  209,6. Estes grupos distintos induziram em diferenças significativas nos deslocamentos químico, principalmente, no C-7, carbono metínico ligado a oxigênio, em  $\delta_{\text{C}}$  84,5 (**CEH-4a**) e 72,8 (**CEH-4b**); no C-6, carbono metilênico, em  $\delta_{\text{C}}$  40,7 (**CEH-4a**) e em

$\delta_c$  43,31 (**CEH-4b**); no carbono metílico Me-17 em  $\delta_c$  15,6 (**CEH-4a**) e em  $\delta_c$  13,8 (**CEH-4b**) entre outros efeitos menos intensos observados.



**Figura 41:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

Na região compreendida entre  $\delta_c$  111,0 a 146,3 ppm foram observados 12 sinais que foram atribuídos aos anéis furano (C-13 a C-16) e sobre dupla ligação (C-3 e C-4) de ambos os diterpenos. Os carbonos metilênicos C-1, C-2, C-11 e C-12 foram observados na região de  $\delta_c$  18,8 a 27,2 ppm e os carbonos metílicos Me-18 e Me-19 entre  $\delta_c$  18,2 a 23,4 ppm. A atribuição destes e demais sinais estão mostrados nas **Tabelas 9** e **10** e são concordantes com a estrutura proposta.

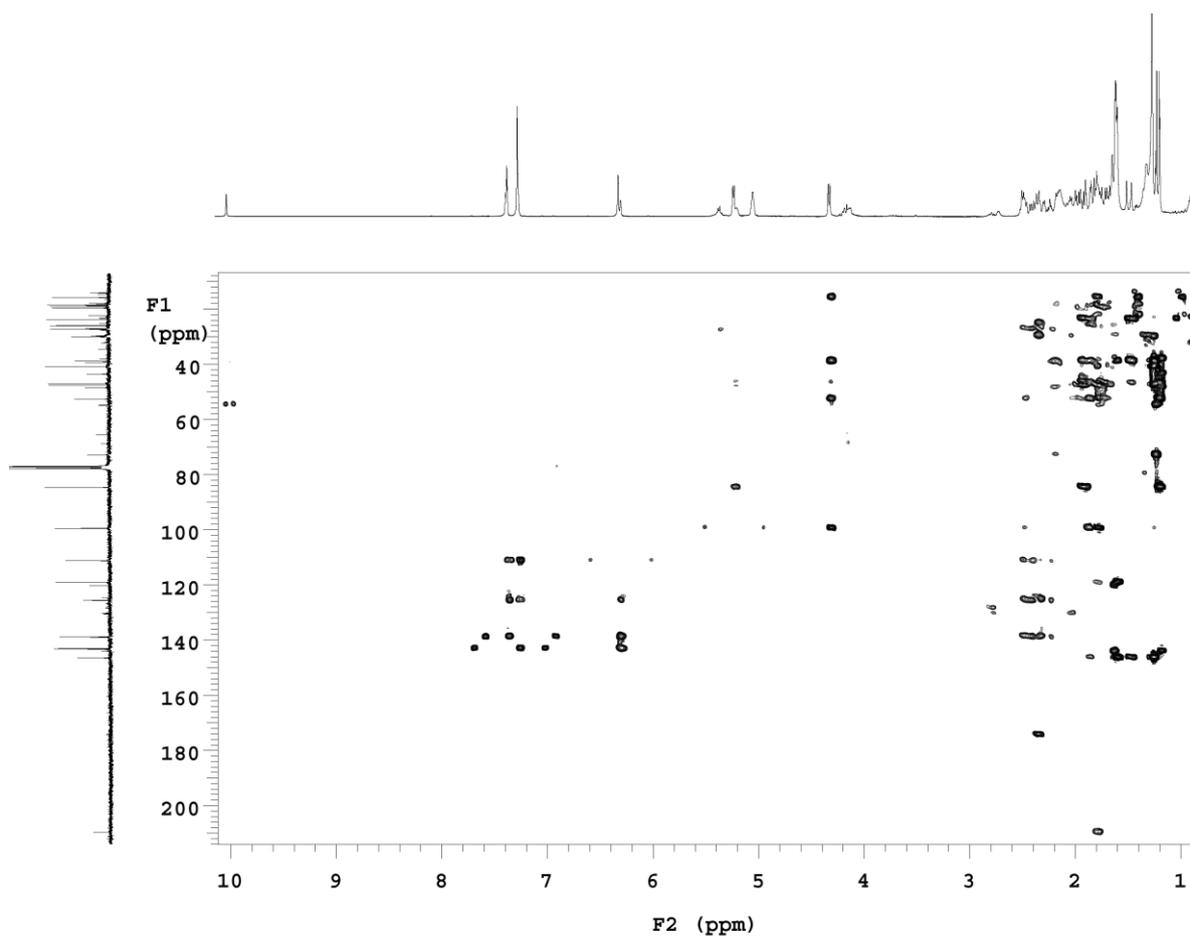


**Figura 42:** Espectro de HSQC da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

O experimento de HMBC (**Figura 43, Tabelas 9 e 10**) foi utilizado para se comprovar as atribuições, principalmente, do grupo lactol em **CEH-4a**, bem como dos carbonos não ligados a hidrogênio e dos grupos metilas em ambos os diterpenos. Por intermédio desta técnica foi possível estabelecer inequivocamente todos os deslocamentos químicos para o **CEH-4a**.

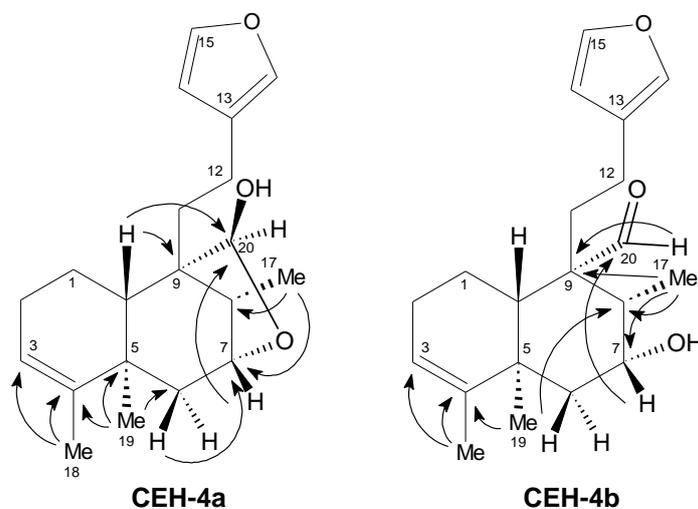
Para o diterpeno **CEH-4a**, o posicionamento do grupo lactol entre C-9 e C-7 foi confirmado pelas correlações dos hidrogênios H-7, H-8 e H-10 com o C-20, juntamente com as correlações observadas dos H-6a e H-20 com o carbono metínico C-7. As correlações do grupos metílicos Me-17 com o H-7 e H-8; Me-18 com o carbono C-3 e Me-19 com C-4, C-5 e C-6, confirmaram o posicionamento destes grupos ligados, respectivamente, aos C-8, C-4 e C-5.

Para o diterpeno minoritário **CEH-4b** foi possível observar as correlações entre H-8/C-20 e H-10/C-9 comprovando que o grupo aldeído encontra-se ligado em C-9. A correlação do grupo Me-17 com C-7 comprova o posicionamento deste carbono oxi-metínico, bem como o posicionamento do grupo Me-19 ligado em C-5 pela correlação do H-6b com este grupo.



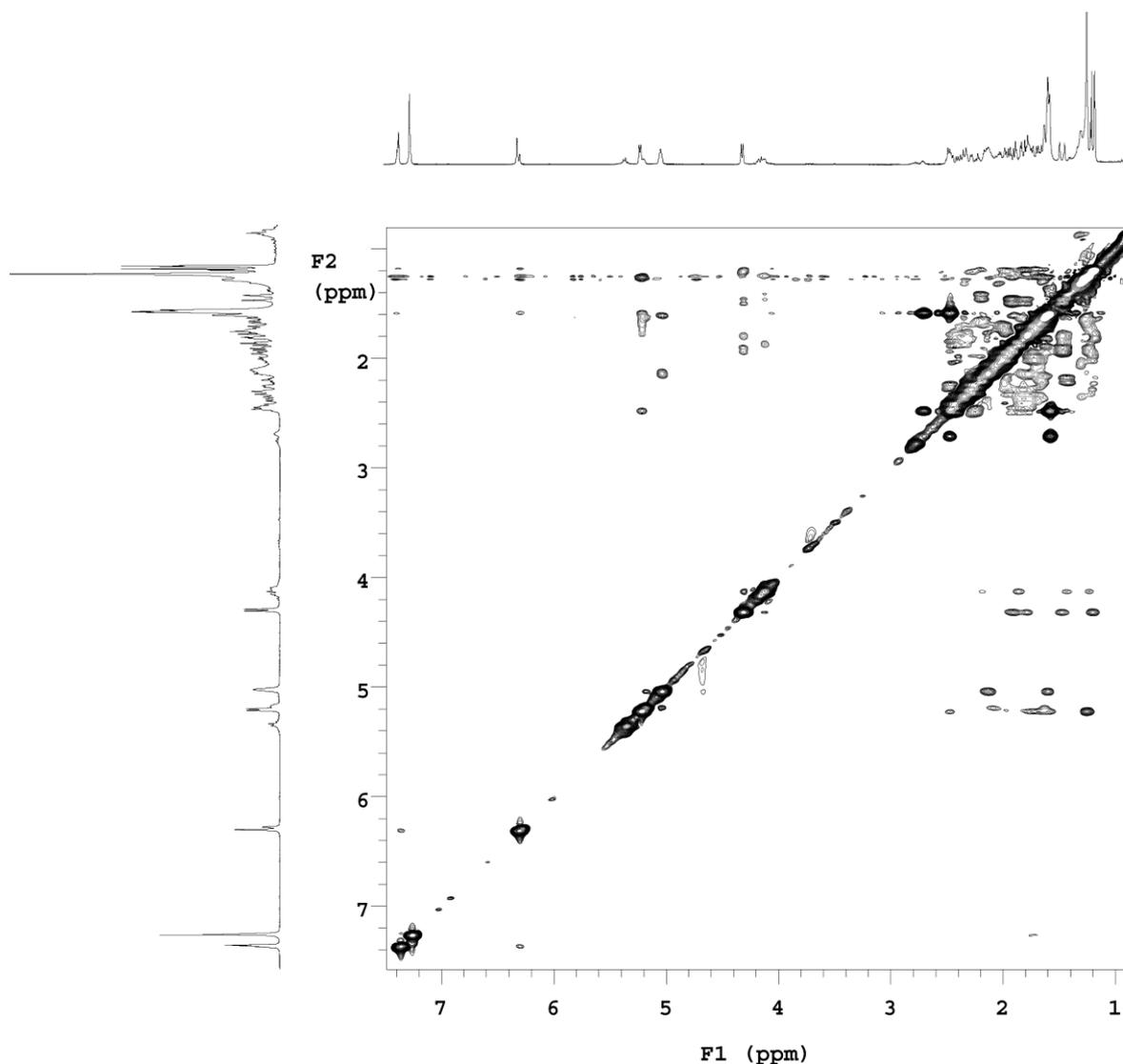
**Figura 43:** Espectro de HMBC da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

As correlações observadas para os diterpenos **CEH-4a** e **CEH-4b** estão mostradas nas **Tabelas 9 e 10** e as principais correlações na **Figura 44**.



**Figura 44:** Principais correlações do espectro de HMBC de **CEH-4a** e **CEH-4b**.

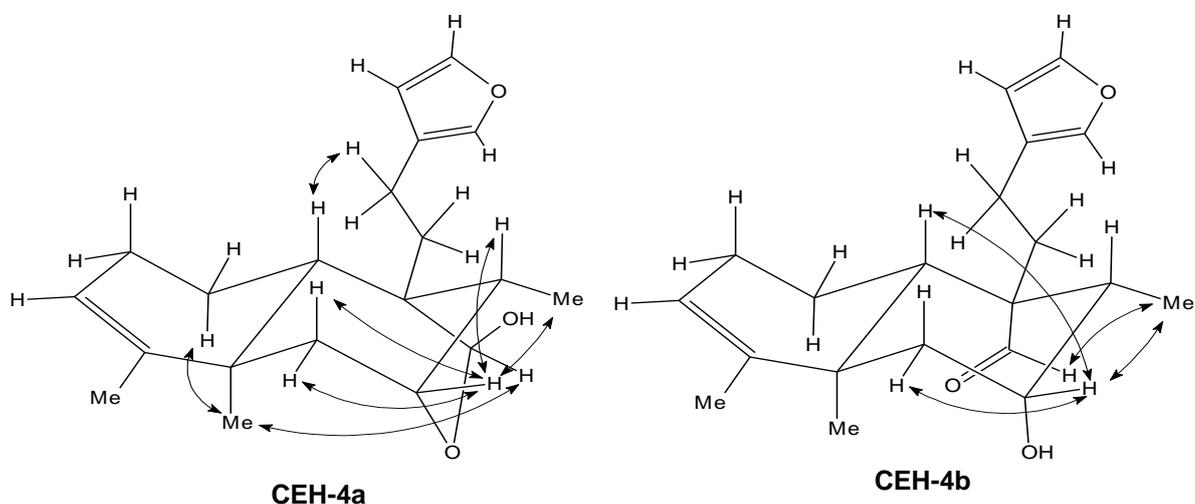
As configurações relativas de **CEH-4a** e **CEH-4b** foram definidas pela técnica de NOESY (**Figura 45**, **Tabelas 9** e **10**) e pelos valores das constantes de acoplamento ( $J$ ), de acordo com o estabelecido para o ptychonal-hemiacetal e ptychonal na literatura.



**Figura 45:** Espectro de NOESY da mistura de **CEH-4a** e **CEH-4b** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

Para o **CEH-4a**, a constante de acoplamento de 4,8 Hz observada entre H-7 e H-6eq, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , evidencia a posição- $\alpha$  para o anel lactol, em relação ao H-7, definido como  $\beta$ -equatorial. A correlação entre H-10 e H-12b confirma a orientação  $\beta$  do grupo etileno-furânico e a correlação entre H-8 e H-11a e H-12b confirma a orientação  $\alpha$  do grupo metila Me-17. A configuração *trans* da

decalina é confirmada pela ausência de correlação entre H-10 e Me-19 bem como pela correlação entre H-1ax e Me-19. A configuração- $\beta$  do grupo hidroxila ligado ao C-20 foi estabelecida pela correlação entre H-20 e o grupo Me-19, ambos na mesma face (face- $\alpha$ ) da estrutura. As correlações observadas para o **CEH-4a** estão mostradas na **Figura 46** e **Tabela 9**. Para o **CEH-4b** a ausência de correlação espacial entre H-10 e o grupo Me-19 comprova a configuração *trans* do sistema decalínico. A orientação- $\alpha$  para o grupo hidroxila ligado ao C-7 foi definida pela correlação entre H-7 e H-10, que encontram-se em posição  $\beta$ -axial.



**Figura 46:** Principais correlações do espectro de NOESY de **CEH-4a** e **CEH-4b**.

As correlações observadas para o **CEH-4b** estão mostradas na **Figura 46** e **Tabela 10**.

**Tabela 9:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-4a** comparados com os dados descritos na literatura para o 20-O-metil-ptychonal-acetal (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008).

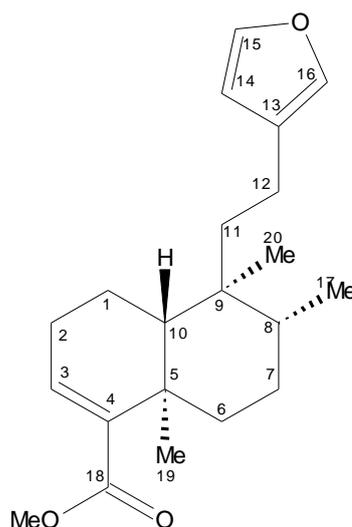
| C         | $\delta_c$ | DEPT            | CEH-4a                    |                             | NOESY   | 20-O-metil-<br>ptychonal-<br>acetal $\delta_c$ |      |
|-----------|------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|---|--|------|
|           |            |                 | HMQC<br>$^2J_{\text{CH}}$ | HMBC<br>$^2J_{\text{CH}}$   |   |  |      |
| 1         | 18,8       | CH <sub>2</sub> | 1,66<br>1,78              |                             | Me-19   | 18,6   |      |
| 2         | 25,8       | CH <sub>2</sub> | 2,12                      | H-1a                        | H-3   | 25,6   |      |
| 3         | 119,0      | CH              | 5,03                      |                             | H-1a, Me-18<br>H-2;Me-18                      | 118,7  |      |
| 4         | 146,3      | C               |                           | Me-18                       | H-6a, H-6b,<br>Me-19                          | 146,3  |      |
| 5         | 38,7       | C               |                           |                             |   | 38,5   |      |
| 6         | 40,7       | CH <sub>2</sub> | 1,46<br>1,92              |                             | H-8, Me-19<br>H-7                             | 40,6   |      |
| 7         | 84,5       | CH              | 4,31                      |                             | H-6a, H-20,<br>Me-17<br>H-6; H-8;<br>Me17     | 84,1   |      |
| 8         | 46,7       | CH              | 1,78                      |                             | H-6b, H-11a,<br>H-11b, Me-17<br>H-7; H-12a, b | 46,6   |      |
| 9         | 52,4       | C               |                           | H-8, H-10, H-11a, H-11b     | H-7, Me-17                                    | 52,3   |      |
| 10        | 47,4       | CH              | 1,86                      | H-1a, H-1b                  | H-11a, Me-19                                  | Me-18;<br>H-12a                                | 47,1 |
| 11        | 27,2       | CH <sub>2</sub> | 1,74<br>1,97              | H-12a                       |   | 26,8   |      |
| 12        | 19,5       | CH <sub>2</sub> | 2,26<br>2,44              | H-11a, H-11b                |   | H-8;H-10<br>H-8                                | 19,2 |
| 13        | 125,5      | C               |                           | H-12a, H-12b,<br>H-14, H-16 | H-15  | 125,3  |      |
| 14        | 111,1      | CH              | 6,30                      | H-15                        | H-12a, H-16                                   | 110,9  |      |
| 15        | 143,0      | CH              | 7,36                      | H-14                        | H-16  | 142,7  |      |
| 16        | 138,7      | CH              | 7,26                      |                             | H-14, H-15, H-12a, H-12b                      | 138,5  |      |
| 17        | 15,6       | CH <sub>3</sub> | 1,19                      | H-8                         | H-7a  | 15,1   |      |
| 18        | 18,2       | CH <sub>3</sub> | 1,60                      |                             |   | H-3; H-10;<br>H-20;                            | 18,6 |
| 19        | 23,4       | CH <sub>3</sub> | 1,25                      |                             | H-6a, H-6b                                    | H-1b; H-20                                     | 23,5 |
| 20<br>MeO | 99,3       | CH              | 5,21                      |                             | H-7, H-8, H-10                                | 106,0<br>55,4                                  |      |

**Tabela 10:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-4b** comparados com os dados descritos na literatura para o 20-O-metil-ptychonal-acetal (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) por Tang et al. (2008).

| C   | $\delta_c$ | DEPT          | CEH-4b       |                   | NOESY                | 20-O-metil-ptychonal-acetal $\delta_c$ |
|-----|------------|---------------|--------------|-------------------|----------------------|--|
|     |            |               | HMQC         | HMBC              |                      |  |
|     |            |               |              | $^2J_{\text{CH}}$ | $^2J_{\text{CH}}$    |  |
| 1   | 18,7       | $\text{CH}_2$ | 1,66<br>1,78 |                   |                      | 18,6                                   |
| 2   | 25,8       | $\text{CH}_2$ | 2,12         |                   |                      | 25,6                                   |
| 3   | 120,2      | CH            | 5,19         |                   | Me-18                | 118,7                                  |
| 4   | 143,9      | C             |              | Me-18             | Me-19                | 146,3                                  |
| 5   | 37,9       | C             |              |                   |                      | 38,5                                   |
| 6   | 43,3       | $\text{CH}_2$ | 2,18<br>1,42 |                   |                      | 40,6                                   |
| 7   | 72,8       | CH            | 4,14         |                   | Me-17<br>H-6b; Me-17 | 84,1                                   |
| 8   | 48,3       | CH            | 1,78         |                   | H-6a, Me-17          | 46,6                                   |
| 9   | 54,6       | C             |              | H-20              | Me-17                | 52,3                                   |
| 10  | 47,4       | CH            | 1,86         |                   | H-7                  | 47,1                                   |
| 11  | 26,9       | $\text{CH}_2$ | 1,66<br>1,97 |                   |                      | 26,8                                   |
| 12  | 19,5       | $\text{CH}_2$ | 2,26<br>2,44 |                   |                      | 19,2                                   |
| 13  | 124,6      | C             |              | H-14, H-16        | H-15                 | 125,3                                  |
| 14  | 111,0      | CH            | 6,28         |                   |                      | 110,9                                  |
| 15  | 143,3      | CH            | 7,37         |                   |                      | 142,7                                  |
| 16  | 138,9      | CH            | 7,26         |                   | H-12b                | 138,5                                  |
| 17  | 13,8       | $\text{CH}_3$ | 1,23         |                   |                      | 15,1                                   |
| 18  | 18,4       | $\text{CH}_3$ | 1,60         |                   |                      | 18,6                                   |
| 19  | 22,1       | $\text{CH}_3$ | 1,18         |                   | H-6b                 | 23,5                                   |
| 20  | 209,6      | CH            | 10,01        |                   | H-8<br>Me-17         | 106,0                                  |
| MeO |            |               |              |                   |                      | 55,4                                   |

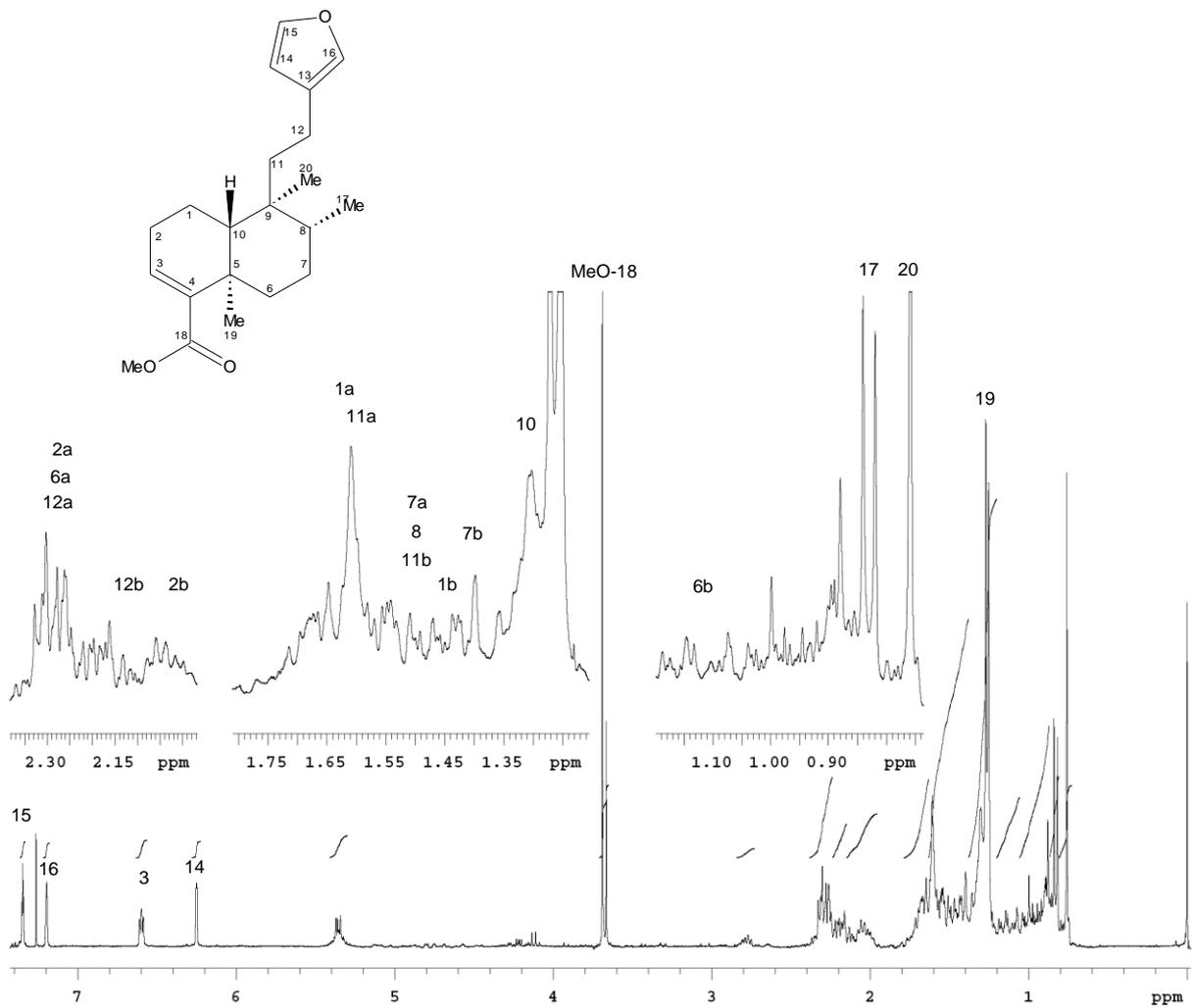
### 5.3.5 Diterpeno CEH-5

Os dados espectroscópicos de RMN (**Figuras 47 a 50**) do diterpeno **CEH-5** são similares aos do **CEH-1**. As principais diferenças observadas referem-se aos deslocamentos químicos para os hidrogênios e carbonos nas posições C-7 e C-8, a ausência dos sinais correspondentes a um grupo carbometóxi e a presença de sinais para um grupo metila em  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  0,83/16,2. Estas observações levaram-nos a propor a substituição de um grupo carbóxi em **CEH-1**, por um grupo metila, em **CEH-5**. Esta substituição resultou no deslocamento do sinal do C-8 de  $\delta_{\text{C}}$  49,4, em **CEH-1**, para 36,1, em **CEH-5**, e do H-8 de  $\delta_{\text{H}}$  2,58 para 1,50 bem como, do sinal do C-7 de  $\delta_{\text{C}}$  21,8 para 27,5 e de seus respectivos hidrogênios, entre outros efeitos menos intensos observados no esqueleto terpênico.

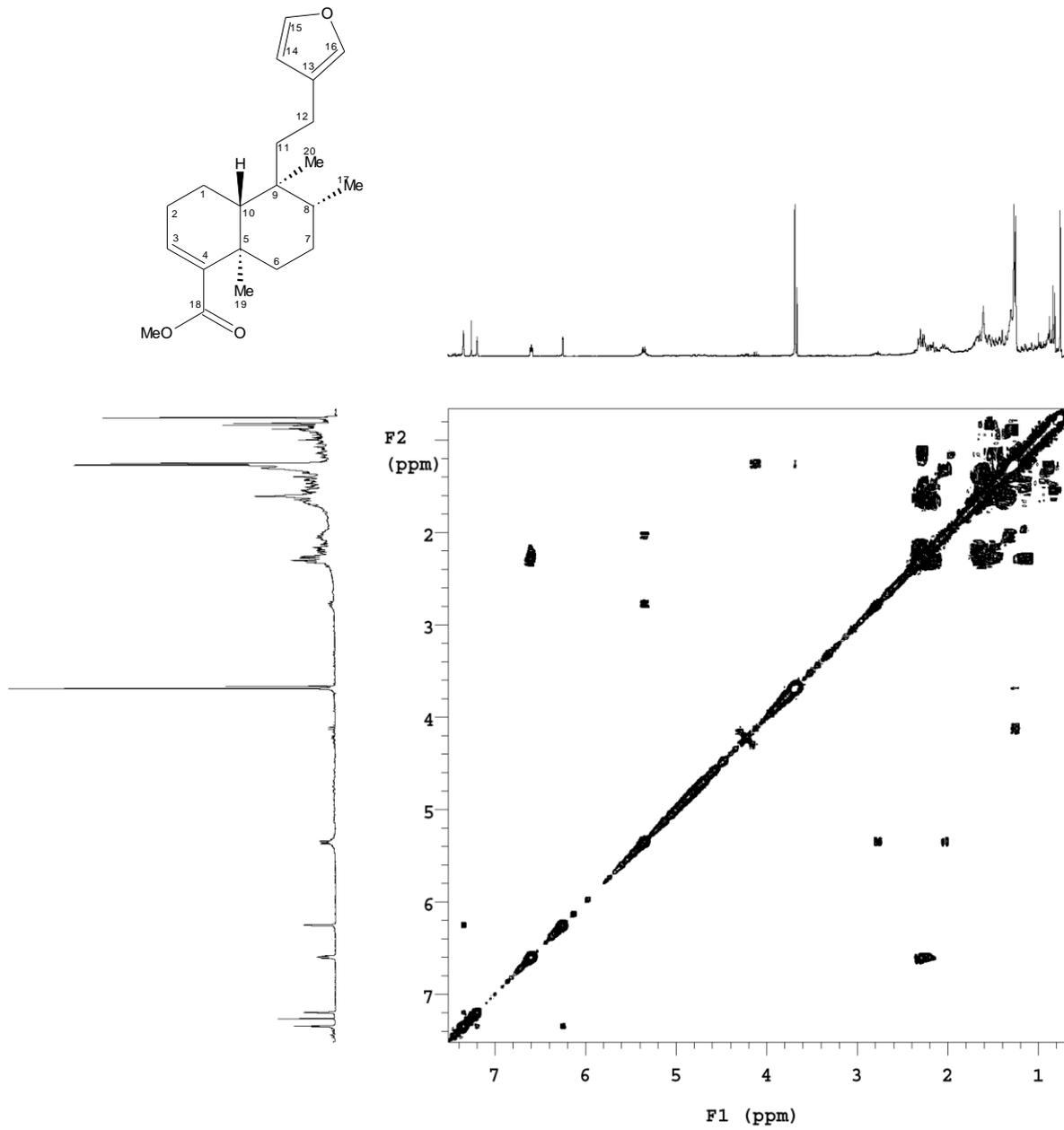


**CEH-5**

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 47**) estão apresentados na **Tabela 11**. A presença do anel furano foi evidenciada pelos sinais em 6,25 (H-14), 7,35 (H-15) e 7,26 (H-16). O sistema *trans*-decalínico foi caracterizado principalmente pelos sinais dos hidrogênio metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,63 (H-1a), 1,45 (H-1b), 2,28 (H-2a), 2,04 (H-2b), 2,28 (H-6a), 1,10 (H-6b), 1,50 (H-7a) e 1,40 (H-7b) e metínicos em 6,60 (H-3), 1,50 (H-8) e 1,30 (H-10).



**Figura 47:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-5** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

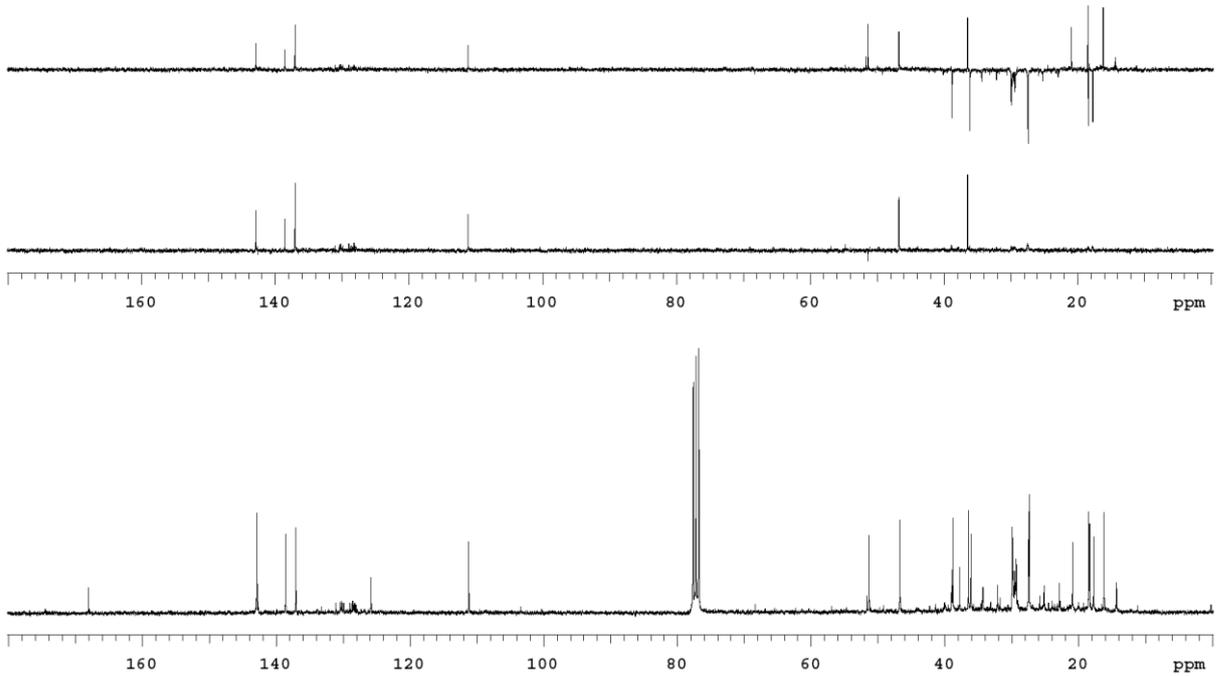


**Figura 48:** Espectro de COSY da substância **CEH-5** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

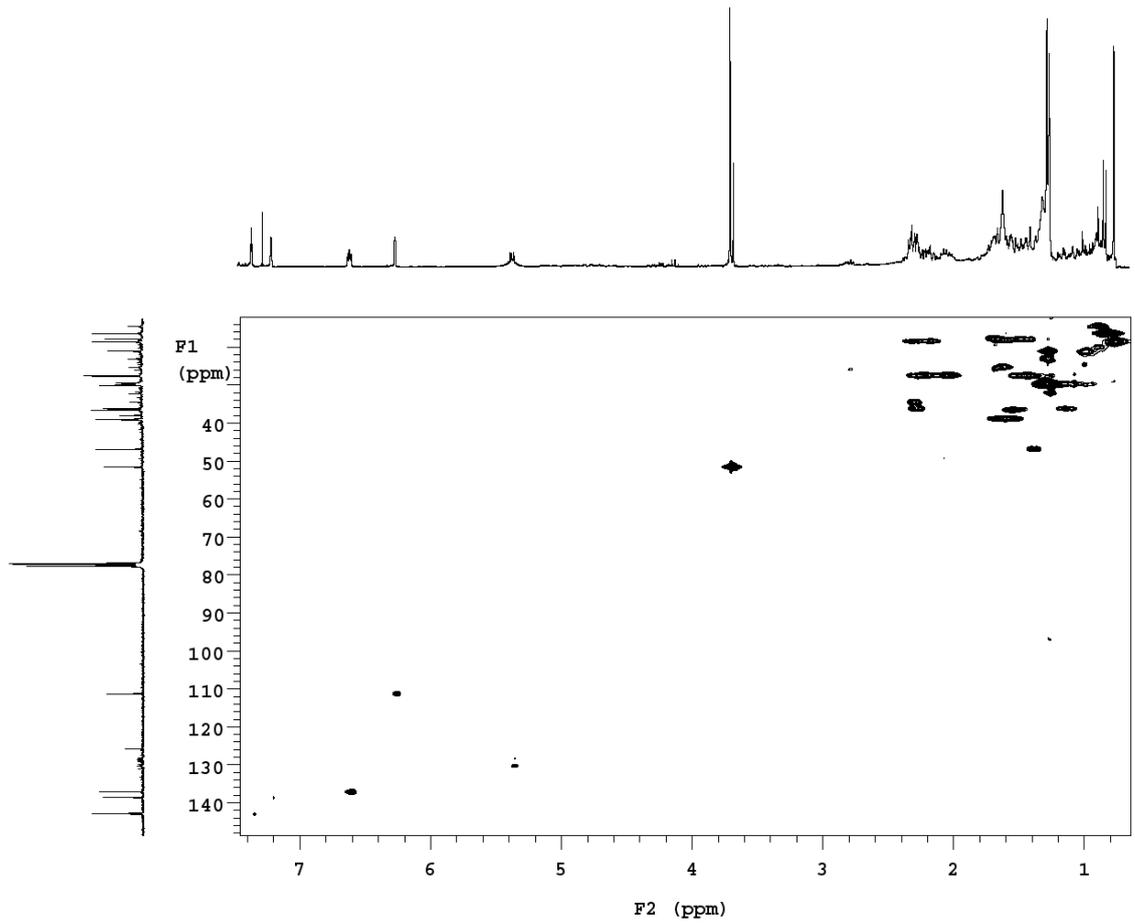
**Tabela 11:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) e correlações observadas no espectro de COSY de **CEH-5**.

| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY             |
|--------|----------------------------------|------------------|
| 1a     | 1,63 (m)                         | H-1b, H-2a, H-10 |
| 1b     | 1,45 (m)                         | H-1a, H-2a, H-2b |
| 2a     | 2,28 (m)                         | H-1a, H-1b, H-3  |
| 2b     | 2,04 (m)                         | H-1b             |
| 3      | 6,60 (dd, 3,6; 3,6)              | H-2a             |
| 6a     | 2,28 (m)                         | H-6b, H-7a       |
| 6b     | 1,10 (ddd, 13,2; 13,2; 3,9)      | H-6a             |
| 7a     | 1,50 (m)                         | H-6a             |
| 7b     | 1,40 (m)                         |                  |
| 8      | 1,50 (m)                         | H-17             |
| 10     | 1,30 (m)                         | H-1a             |
| 11a    | 1,62 (m)                         |                  |
| 11b    | 1,50 (m)                         | H-12a            |
| 12a    | 2,30 (m)                         | H-12b, H-11b     |
| 12b    | 2,14 (m)                         | H-12a            |
| 14     | 6,25 (dd, 0,9; 0,9)              | H-15             |
| 15     | 7,35 (dd, 1,8; 1,5)              | H-14             |
| 16     | 7,26 (s)                         |                  |
| 17     | 0,83 (d, 6,3)                    | H-8              |
| 19     | 1,25 (s)                         |                  |
| 20     | 0,76 (s)                         |                  |
| MeO-18 | 3,66 (s)                         |                  |

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi analisado conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 49**) e HMQC (**Figura 50**). Os dados obtidos foram atribuídos à estrutura e são concordantes com o descrito na literatura para o éster metílico do ácido hardwickico descrito na literatura por COSTA et al. (1998), como poder ser observado na **Tabela 12**.



**Figura 49:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEH-5** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

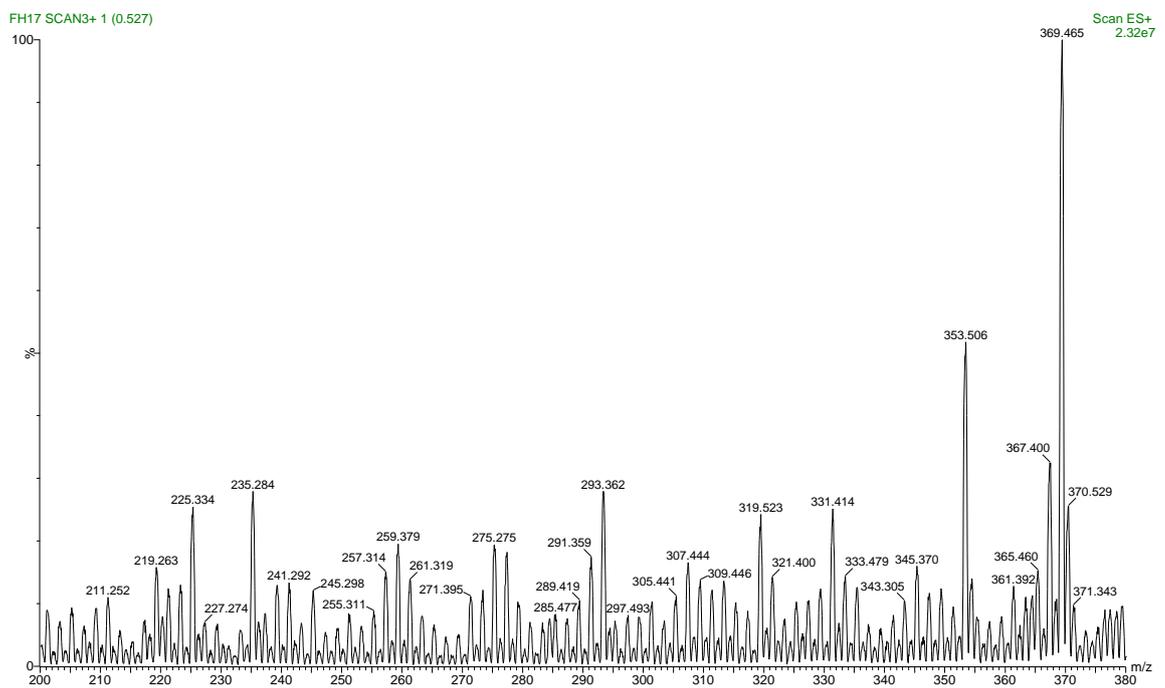


**Figura 50:** Espectro de HMQC da substância **CEH-5** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 12:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-5**, comparados com os valores de  $\delta_c$  (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) para o éster metílico do ácido hardwickico descritos na literatura (COSTA et al., 1998).

| <b>C</b> | $\delta_c$ | <b>CEH-5<br/>DEPT</b> | <b>HMQC</b> | <b>éster metílico do ácido<br/>hardwickico - <math>\delta_c</math></b> |
|----------|------------|-----------------------|-------------|--|
| 1        | 17,7       | CH <sub>2</sub>       | 1,45; 1,63  | 17,4   |
| 2        | 27,4       | CH <sub>2</sub>       | 2,04; 2,28  | 27,0   |
| 3        | 137,1      | CH                    | 6,60        | 136,9  |
| 4        | 142,7      | C                     |             | 142,6  |
| 5        | 37,8       | C                     |             | 35,8   |
| 6        | 36,1       | CH <sub>2</sub>       | 1,10; 2,28  | 37,5   |
| 7        | 27,5       | CH <sub>2</sub>       | 1,40; 1,50  | 27,1   |
| 8        | 36,5       | CH                    | 1,50        | 46,1   |
| 9        | 40,0       | C                     |             | 38,7   |
| 10       | 46,7       | CH                    | 1,30        | 46,4   |
| 11       | 38,8       | CH <sub>2</sub>       | 1,50; 1,62  | 38,5   |
| 12       | 18,4       | CH <sub>2</sub>       | 2,14; 2,30  | 18,0   |
| 13       | 125,8      | C                     |             | 125,7  |
| 14       | 111,2      | CH                    | 6,25        | 111,0  |
| 15       | 142,9      | CH                    | 7,35        | 142,8  |
| 16       | 138,2      | CH                    | 7,26        | 138,5  |
| 17       | 16,2       | CH <sub>3</sub>       | 0,83        | 15,8   |
| 18       | 168,1      | C                     |             | 168,0  |
| 19       | 20,9       | CH <sub>3</sub>       | 1,25        | 20,6   |
| 20       | 18,5       | CH <sub>3</sub>       | 0,76        | 18,1   |
| MeO-18   | 51,4       | CH <sub>3</sub>       | 3,66        | 51,4   |

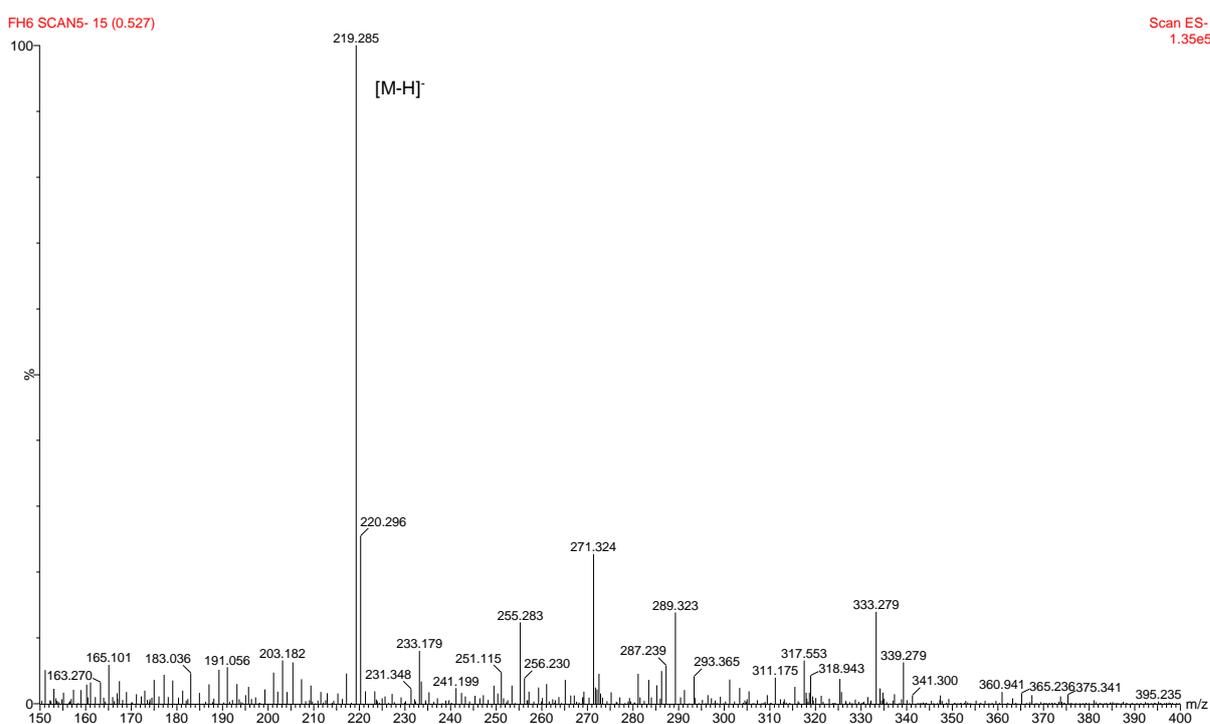
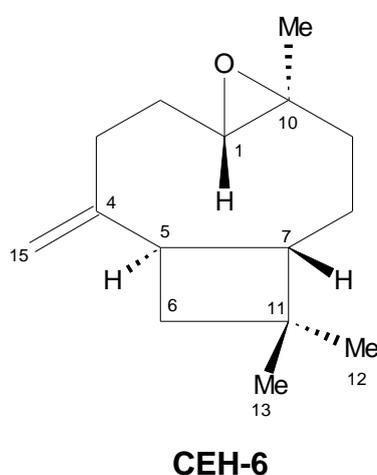
A identificação do diterpeno **CEH-5** como sendo o éster metílico do ácido hardwickico foi comprovada pelo espectro de massas (ESI-MS), no modo positivo, que apresentou os picos referentes ao íon molecular em  $m/z$  353,5  $[M+Na]^+$  e 369,5  $[M+K]^+$  (**Figura 51**).



**Figura 51:** Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância **CEH-5**.

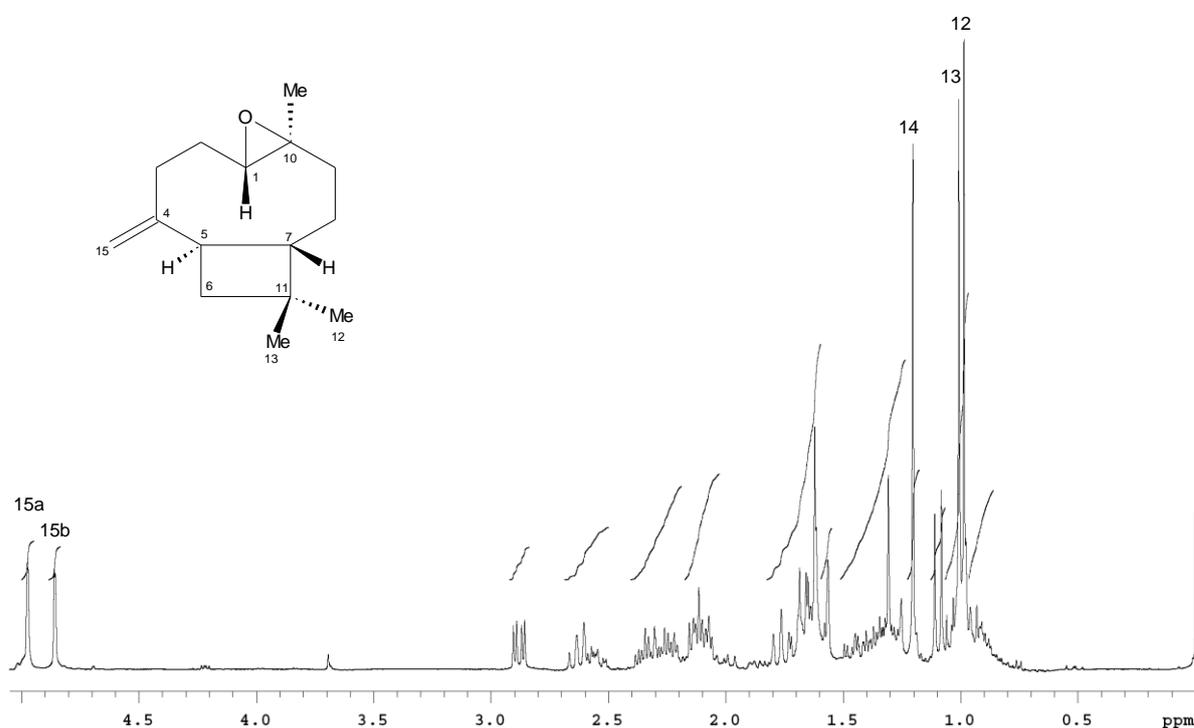
### 5.3.6 Sesquiterpeno CEH-6

A substância **CEH-6** apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  219,3 [M-H] no espectro de ESI-MS, no modo negativo, (**Figura 52**) compatível com a fórmula molecular  $C_{15}H_{24}O$ . A partir da análise dos dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (**Figuras 53, 54 e 56, Tabelas 13 e 14**) e comparação com os citados na literatura (HEYMANN et al., 1994), a substância **CEH-6** foi identificada como sendo o *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno.

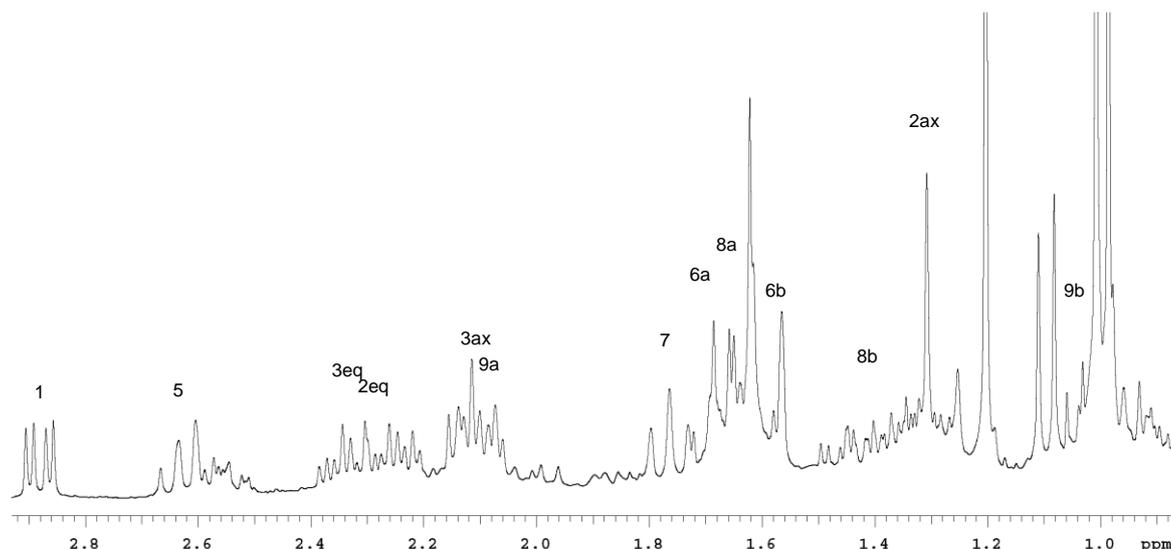


**Figura 52:** Espectro de ESI-MS, no modo negativo, da substância **CEH-6**.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 53 e 54**) os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,86 (d, 0,9) e 4,90 (d, 0,9) evidenciaram a presença de um grupo metilênico exocíclico e os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,98 (3H), 1,08 (3H) e 1,20 (3H) a presença dos três grupos metílicos, sendo que o último está ligado ao anel epóxido. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,88 refere-se ao hidrogênio H-1, ligado ao anel epóxido. Os sinais dos demais hidrogênios metínicos e metilênicos foram atribuídos a estrutura de acordo com o reportado na literatura para o *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (HEYMANN et al., 1994) e estão expressos na **Tabela 13**.



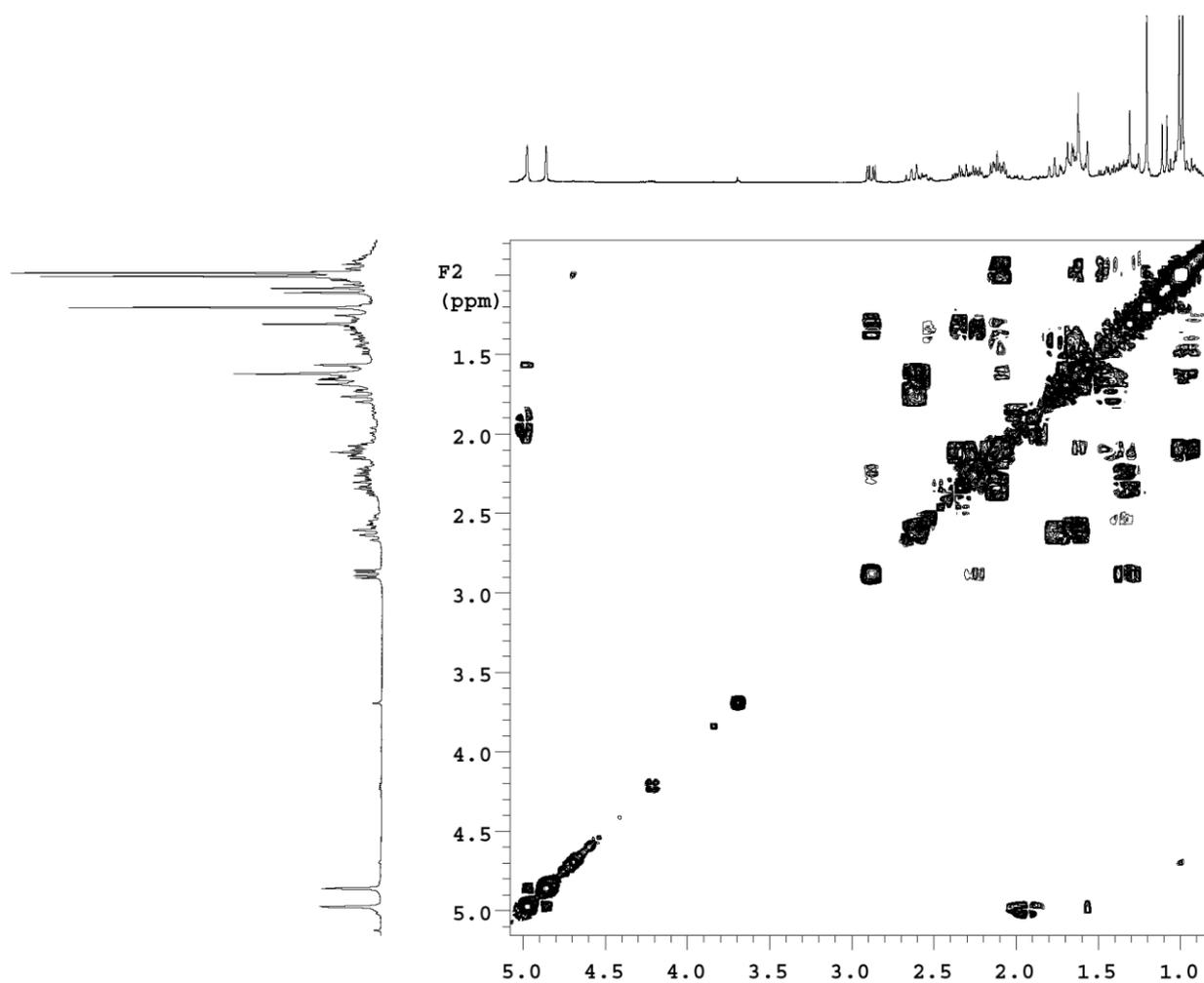
**Figura 53:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-6** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 54:** Ampliação parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **CEH-6** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

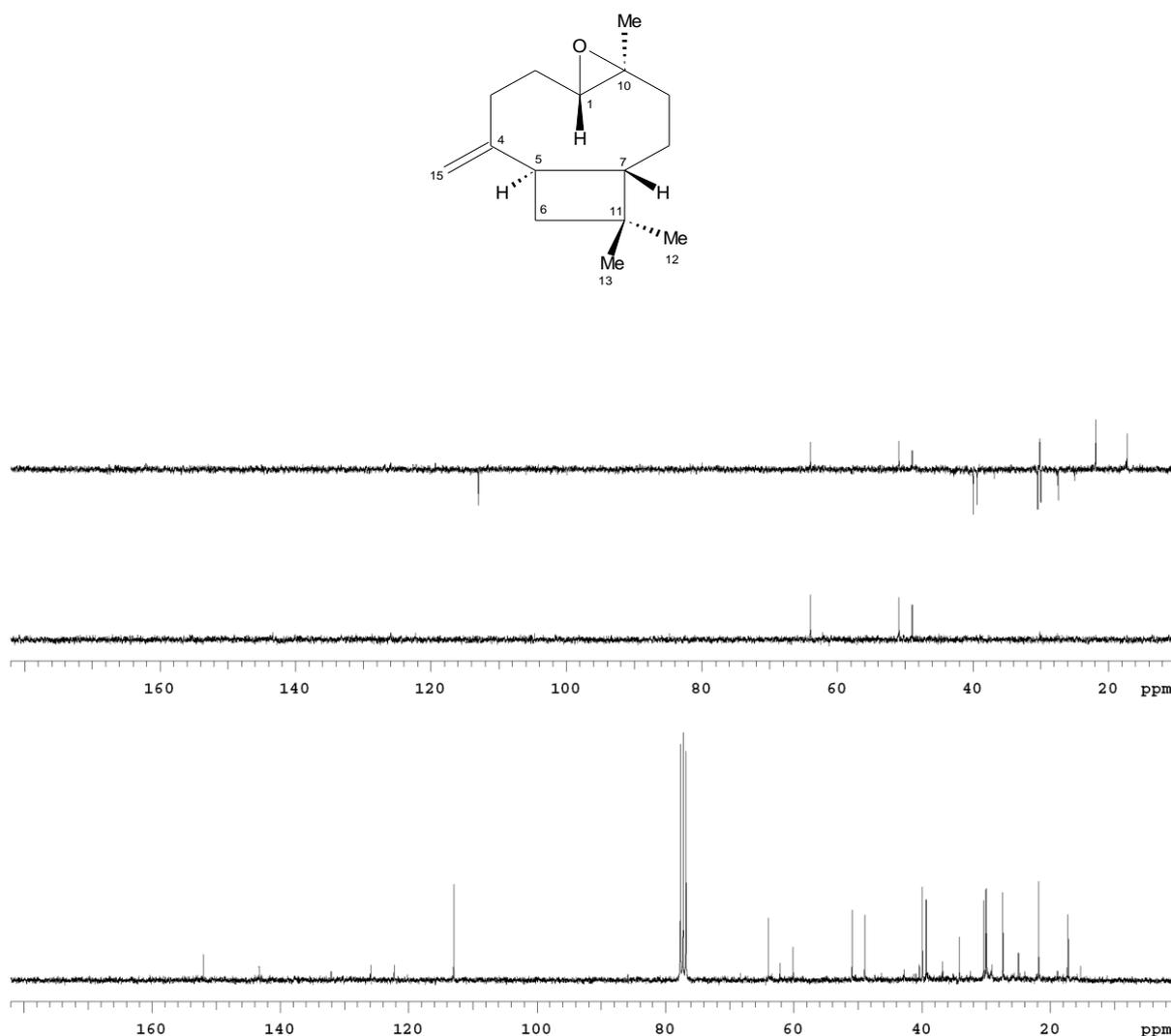
**Tabela 13:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-6**, comparados com os valores descritos na literatura de  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) para o *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (HEYMANN et al., 1994).

| H   | CEH-6  |                            | <i>trans</i> -1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno      |
|-----|--|----------------------------|--|
|     | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) | COSY                       | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) |
| 1ax | 2,88 ( <i>dd</i> , 10,8; 4,0)                    | H-2ax                      | 2,87 ( <i>dd</i> , 11,0; 4,0)                    |
| 2ax | 1,30 ( <i>m</i> )                                | H-1ax, H-1eq, H-2eq, H-3eq | 1,32 ( <i>dddd</i> , 12,5; 11,0; 8,0; 4,5)       |
| 2eq | 2,30 ( <i>ddd</i> , 12,6; 8,1; 3,9)              | H-2ax                      | 2,25 ( <i>ddt</i> , 12,0; 8,0; 4,0)              |
| 3ax | 2,10 ( <i>m</i> )                                | H-3eq                      | 2,11 ( <i>ddd</i> , 12,5; 8,0; 4,5)              |
| 3eq | 2,35 ( <i>dd</i> , 12,6; 8,1; 3,9)               | H-2ax, H-3ax               | 2,34 ( <i>dd</i> , 12,5; 8,0; 4,5)               |
| 5eq | 2,62 ( <i>dd</i> , 18,6; 9,6)                    | H-6b, H-7                  | 2,62 ( <i>dt</i> , 10,0; 9,5)                    |
| 6ax | 1,62 ( <i>m</i> )                                | H-5                        | 1,62 ( <i>t</i> , 10,0)                          |
| 6eq | 1,70 ( <i>m</i> )                                |                            | 1,69 ( <i>t</i> , 10,8)                          |
| 7   | 1,77 ( <i>t</i> , 9,9)                           | H-5, H-8a                  | 1,76 ( <i>t</i> , 10,0)                          |
| 8a  | 1,65 ( <i>ddd</i> , 12,9; 8,1; 2,7)              | H-7, H8b                   | 1,66 ( <i>dddd</i> , 13,5; 5,0; 3,5; 1,0)        |
| 8b  | 1,40 ( <i>m</i> )                                | H-8a, H-9b                 | 1,43 ( <i>tdt</i> , 13,5; 10,5; 4,0)             |
| 9a  | 2,08 ( <i>m</i> )                                | H-9b                       | 2,09 ( <i>dt</i> , 13,0; 3,5)                    |
| 9b  | 1,00 ( <i>m</i> )                                | H-8b, H-9a                 | 0,97 ( <i>dt</i> , 13,0; 5,0)                    |
| 12  | 0,98 ( <i>s</i> )                                |                            | 0,98 ( <i>s</i> )                                |
| 13  | 1,08 ( <i>s</i> )                                |                            | 1,01 ( <i>s</i> )                                |
| 14  | 1,20 ( <i>s</i> )                                |                            | 1,20 ( <i>s</i> )                                |
| 15a | 4,90 ( <i>d</i> , 0,9)                           | H-15b                      | 4,97 ( <i>d</i> , 1,0)                           |
| 15b | 4,86 ( <i>d</i> , 0,9)                           | H-15a                      | 4,86 ( <i>d</i> , 1)                             |



**Figura 55:** Espectro de COSY da substância **CEH-6** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

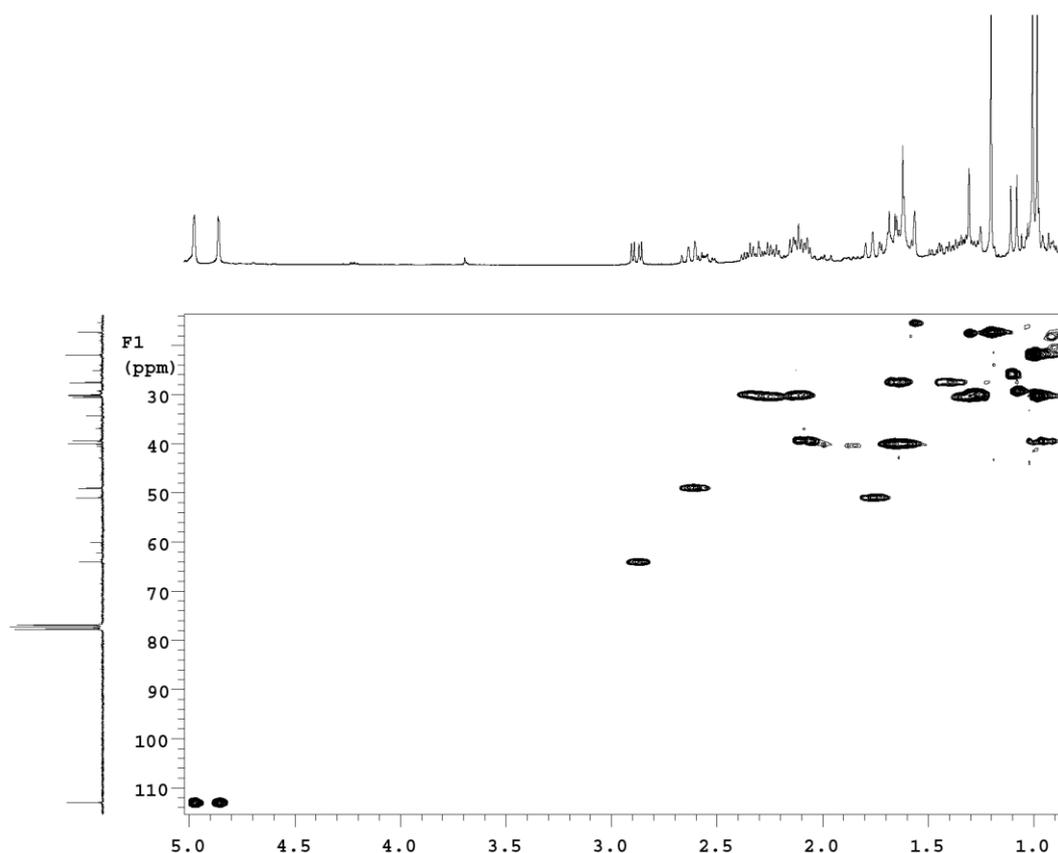
O espectro de RMN <sup>13</sup>C foi analisado conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 56**) e HMQC (**Figura 57**) e apresentou quinze sinais que foram atribuídos à estrutura com auxílio dos dados relatados para o *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (**Tabela 14**).



**Figura 56:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT da substância **CEH-6** (75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

Os sinais em  $\delta_c$  152,0 e 113,0 caracterizaram a olefina exocíclica e os sinais em  $\delta_c$  64,0 (CH) e 60,1 (C) sugeriram a presença do anel epóxido. O sinal de carbono quaternário em  $\delta_c$  34,2 comprovou a presença do anel ciclobutano com dois grupos metílicos vicinais ligantes em  $\delta_c$  21,8 (C-12) e 30,1 (C-13).

A configuração *trans* para C-1/C-10 foi determinada pela comparação dos  $\delta_c$  dos C<sub>γ</sub>, C-3 e C-8, em relação ao oxigênio do epóxido, com os valores reportados na literatura (HEYMANN et al., 1994), como pode ser observado na **Tabela 14**.



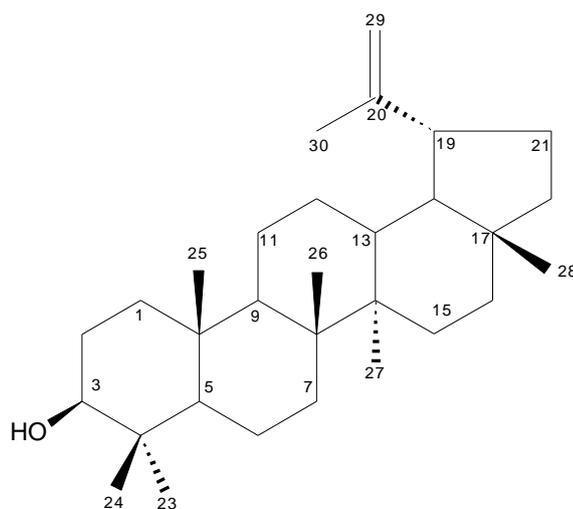
**Figura 57:** Espectro de HMQC da substância **CEH-6** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 14:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) da **CEH-6**, comparados com os valores de  $\delta_{\text{C}}$  para o *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (HEYMANN et al., 1994).

| C  | $\delta_{\text{C}}$ | CEH-6<br>DEPT | HMQC       | <i>trans</i> -1(10)-<br>epóxi-4(15)-<br>cariofileno - $\delta_{\text{C}}$ |
|----|---------------------|---------------|------------|---|
| 1  | 64,0                | CH            | 2,88       | 63,7  |
| 2  | 30,4                | $\text{CH}_2$ | 2,30; 1,30 | 30,3  |
| 3  | 30,0                | $\text{CH}_2$ | 2,35; 2,10 | 29,8  |
| 4  | 152,0               | C             |            | 151,8   |
| 5  | 48,9                | CH            | 2,62       | 48,7  |
| 6  | 39,9                | $\text{CH}_2$ | 1,70; 1,62 | 39,8  |
| 7  | 50,9                | CH            | 1,77       | 50,8  |
| 8  | 27,4                | $\text{CH}_2$ | 1,65; 1,44 | 27,2  |
| 9  | 39,3                | $\text{CH}_2$ | 2,08; 1,00 | 39,2  |
| 10 | 60,1                | C             |            | 59,8  |
| 11 | 34,2                | C             |            | 34,1  |
| 12 | 21,8                | $\text{CH}_3$ | 0,98       | 21,7  |
| 13 | 30,1                | $\text{CH}_3$ | 1,08       | 29,9  |
| 14 | 17,2                | $\text{CH}_3$ | 1,20       | 17,0  |
| 15 | 113,0               | $\text{CH}_2$ | 4,90; 4,86 | 112,8   |

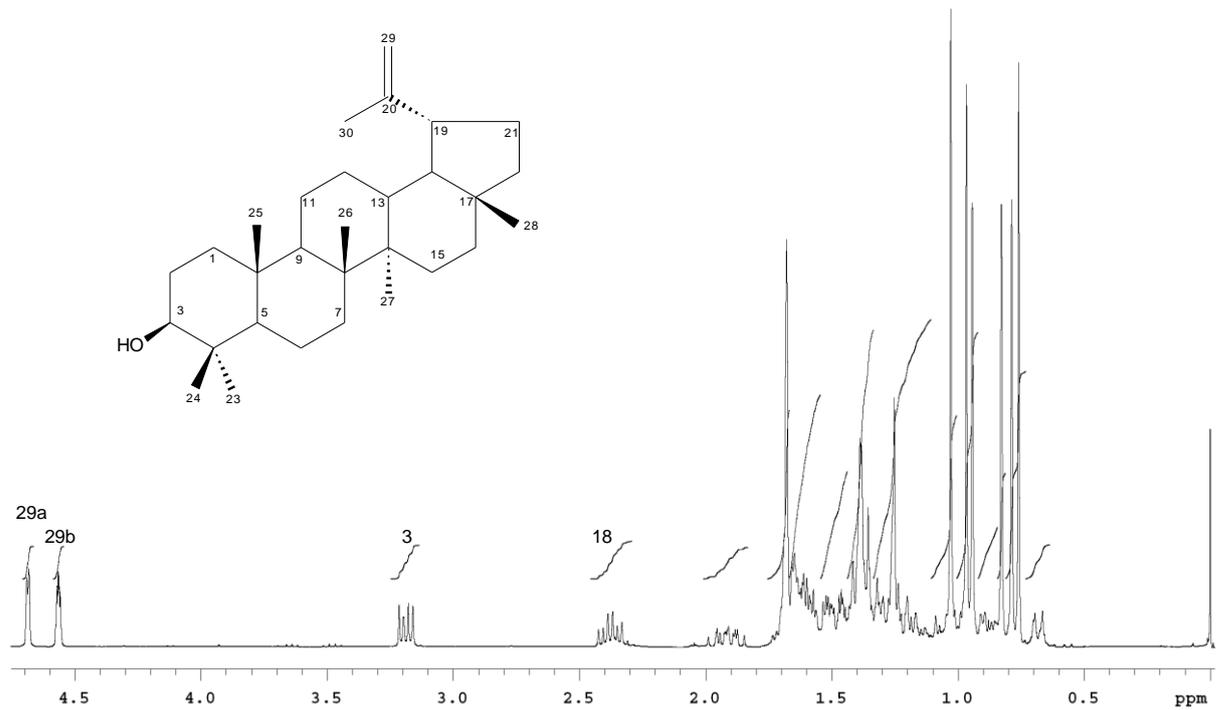
### 5.3.7 Triterpeno CEH-7

Os dados de RMN comparados com os da literatura (CARVALHO et al., 1998) associados ao espectro de massas levou-nos a identificação da substância **CEH-7** como sendo o lupeol.

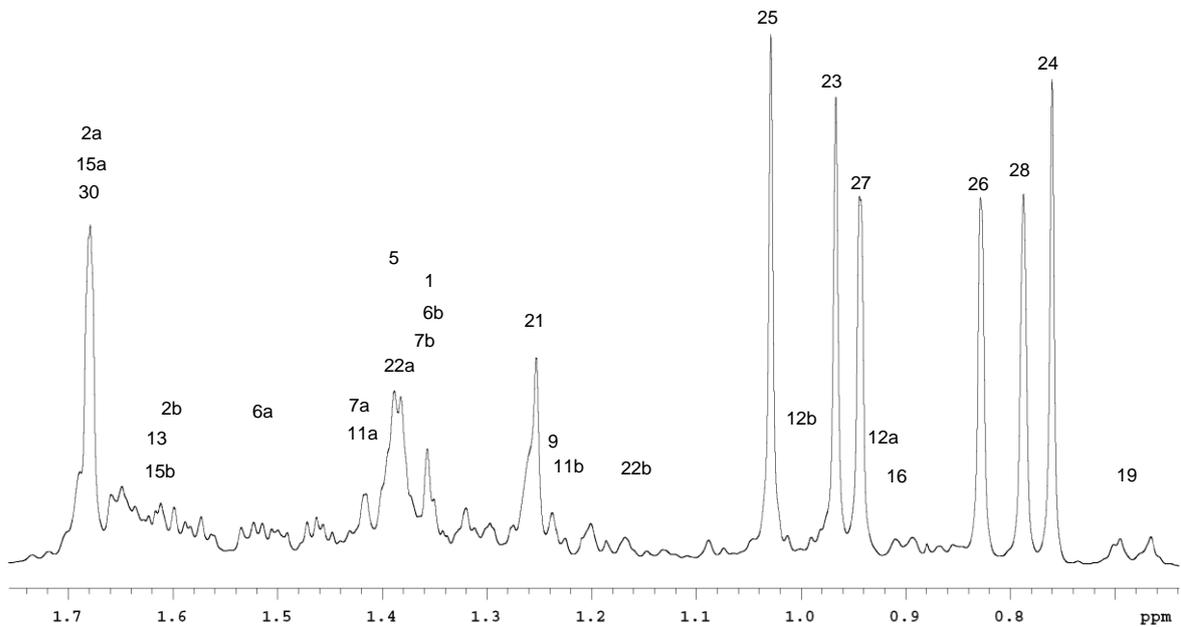


**CEH-7**

A estrutura do **CEH-7** foi caracterizada por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 58 e 59**) principalmente pelos sinais para sete metilas, C-23 a C-28 e C-30, em  $\delta_{\text{H}}$  0,97, 0,76, 1,03, 0,83, 0,94, 0,79 e 1,68, para um hidrogênio  $\alpha$ -carbinólico em  $\delta_{\text{H}}$  3,18 (H-3; *dd*, 11,1; 5,4), para dois hidrogênios vinílicos de dupla terminal em  $\delta_{\text{H}}$  4,57 (*d*, 2,7) e 4,69 (*d*, 2,4) e para um metino em 2,39 (H-18). Os demais dados observados estão expressos na **Tabela 15**.



**Figura 58:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEH-7** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



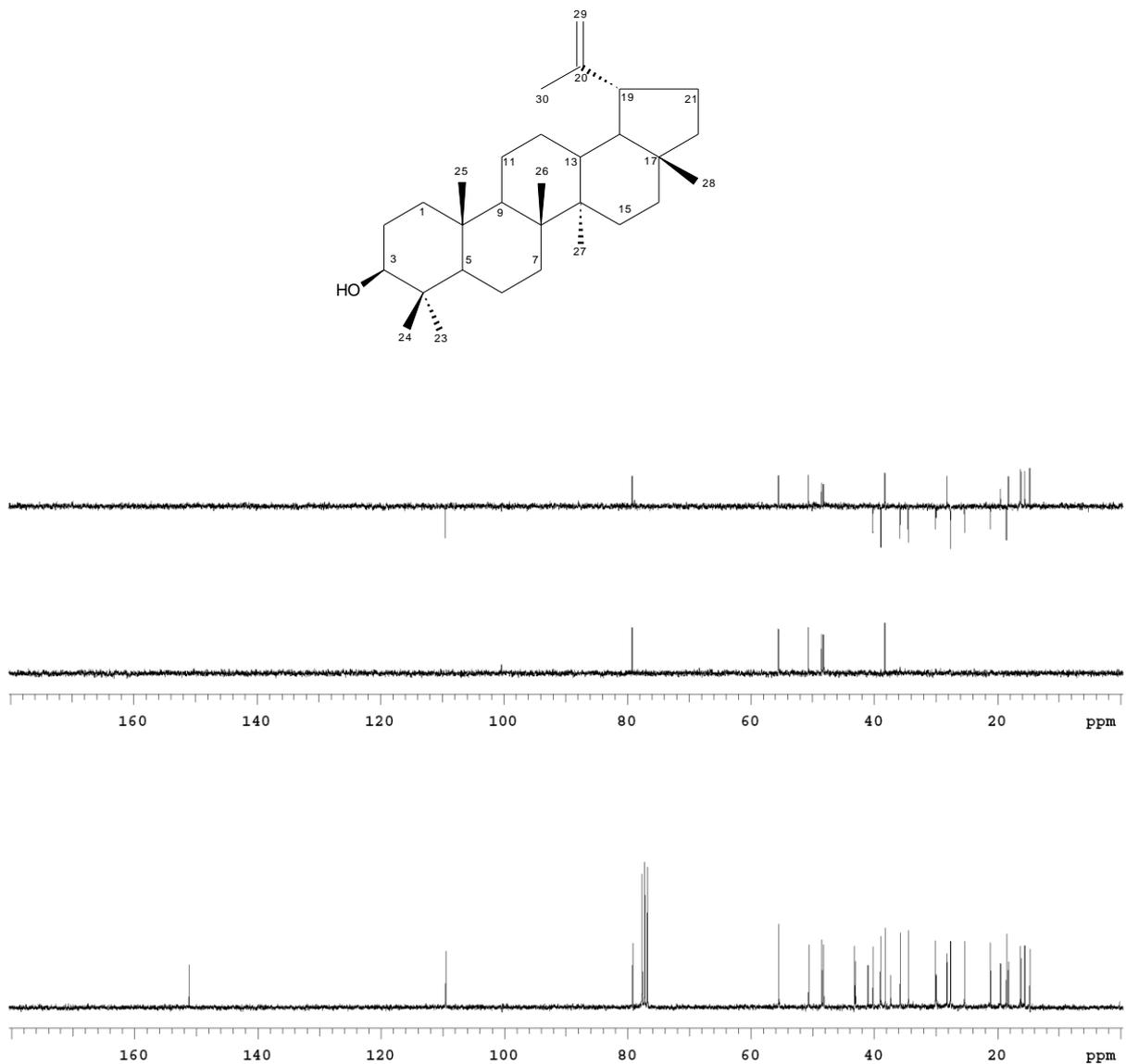
**Figura 59:** Ampliação parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da **CEH-7** (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 15:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-7**.

| H   | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) |
|-----|----------------------------------|
| 1   | 1,36 (m) 2H                      |
| 2a  | 1,68 (m)                         |
| 2b  | 1,60 (m)                         |
| 3   | 3,18 (dd, 11,1; 5,4)             |
| 5   | 1,38 (m)                         |
| 6a  | 1,52 (m)                         |
| 6b  | 1,35 (m)                         |
| 7a  | 1,42 (m)                         |
| 7b  | 1,36 (m)                         |
| 9   | 1,22 (m)                         |
| 11a | 1,42 (m)                         |
| 11b | 1,23 (m)                         |
| 12a | 0,92 (m)                         |
| 12b | 1,00 (m)                         |
| 13  | 1,62 (m)                         |
| 15a | 1,68 (m)                         |
| 15b | 1,62 (m)                         |
| 16  | 0,90 (m) 2H                      |
| 18  | 2,39 (ddd, 11,1; 11,1; 5,7)      |
| 19  | 0,68 (m)                         |
| 21  | 1,30(m)                          |
| 22a | 1,38 (m)                         |
| 22b | 1,16 (m)                         |
| 23  | 0,97 (s)                         |
| 24  | 0,76 (s)                         |
| 25  | 1,03 (s)                         |
| 26  | 0,83 (s)                         |
| 27  | 0,94 (s)                         |
| 28  | 0,79 (s)                         |
| 29a | 4,69 (d, 2,4)                    |
| 29b | 4,57 (d, 2,7)                    |
| 30  | 1,68 (s)                         |

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 60**) apresentou os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  109,6 (C-29) e 151,2 (C-20), referentes a dupla terminal e em 79,2 correspondente ao metino carbinólico (C-3). Os grupos metilas foram caracterizados pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  29,9, 40,2, 28,2, 15,6, 16,2, 16,4, 14,8, 18,2 e 19,5, respectivamente C-23 a C28 e C-30. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **CEH-7** foram comparados com os dados da

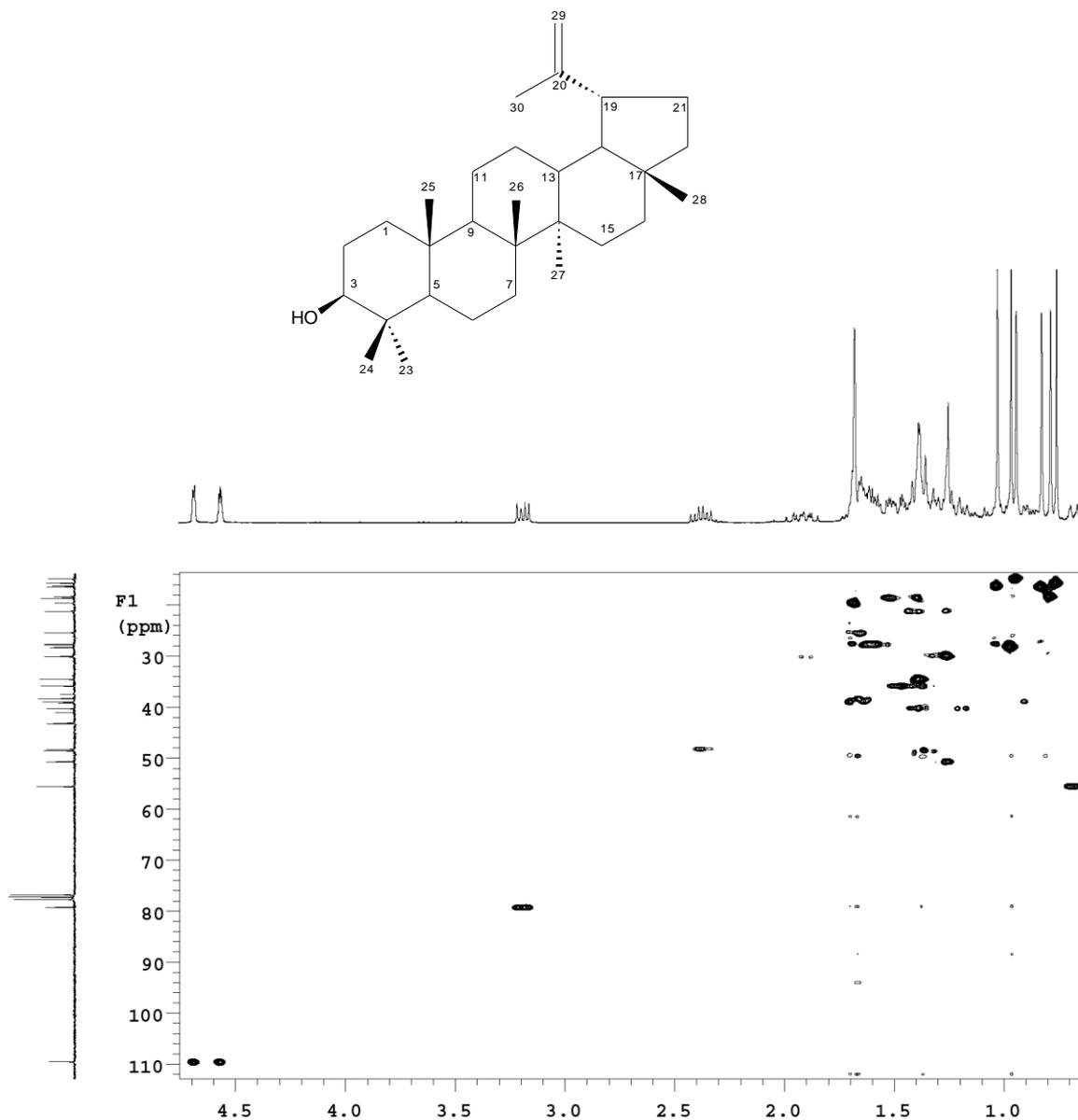
literatura para o lupeol (CARVALHO et al., 1998) como pode ser observado na **Tabela 16**.



**Figura 60:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT da substância **CEH-7** (75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

**Tabela 16:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) da **CEH-7**, comparados com os valores de  $\delta_c$  para o lupeol (50,3 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (CARVALHO et al., 1998).

| <b>C</b> | $\delta_c$ | <b>CEH-7<br/>DEPT</b> | <b>HMQC</b> | <b>lupeol<br/><math>\delta_c</math></b> |
|----------|------------|-----------------------|-------------|---|
| 1        | 34,5       | $\text{CH}_2$         | 1,36        | 34,0                                    |
| 2        | 25,4       | $\text{CH}_2$         | 1,68; 160   | 23,6                                    |
| 3        | 79,2       | CH                    | 3,20        | 75,0                                    |
| 4        | 37,4       | C                     |             | 38,8                                    |
| 5        | 48,5       | C                     |             | 49,5                                    |
| 6        | 18,5       | $\text{CH}_2$         | 1,52; 1,35  | 18,2                                    |
| 7        | 35,8       | $\text{CH}_2$         | 1,42; 136   | 34,7                                    |
| 8        | 39,8       | C                     |             | 39,7                                    |
| 9        | 50,7       | CH                    | 1,22        | 50,5                                    |
| 10       | 41,1       | C                     |             | 37,1                                    |
| 11       | 21,2       | $\text{CH}_2$         | 1,42; 1,23  | 21,0                                    |
| 12       | 27,6       | $\text{CH}_2$         | 1,00; 0,92  | 26,0                                    |
| 13       | 38,3       | CH                    | 1,62        | 38,0                                    |
| 14       | 43,1       | C                     |             | 42,5                                    |
| 15       | 27,7       | $\text{CH}_2$         | 1,68; 1,62  | 27,2                                    |
| 16       | 38,9       | $\text{CH}_2$         | 0,90        | 35,0                                    |
| 17       | 43,2       | C                     |             | 43,5                                    |
| 18       | 48,2       | CH                    | 2,39        | 49,0                                    |
| 19       | 55,5       | CH                    | 0,68        | 47,6                                    |
| 20       | 151,2      | C                     |             | 153,1                                   |
| 21       | 29,9       | $\text{CH}_2$         | 1,3         | 29,4                                    |
| 22       | 40,2       | $\text{CH}_2$         | 1,38; 1,16  | 39,7                                    |
| 23       | 28,2       | $\text{CH}_3$         | 0,97        | 28,0                                    |
| 24       | 15,6       | $\text{CH}_3$         | 0,76        | 15,5                                    |
| 25       | 16,2       | $\text{CH}_3$         | 1,03        | 16,0                                    |
| 26       | 16,4       | $\text{CH}_3$         | 0,83        | 16,0                                    |
| 27       | 14,8       | $\text{CH}_3$         | 0,94        | 14,1                                    |
| 28       | 18,2       | $\text{CH}_3$         | 0,79        | 18,2                                    |
| 29       | 109,6      | $\text{CH}_2$         | 4,69; 4,57  | 109,1                                   |
| 30       | 19,5       | $\text{CH}_3$         | 1,68        | 19,5                                    |



**Figura 61:** Espectro de HMQC da substância **CEH-7** (75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

A fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O foi estabelecida por espectrometria de massas, no modo positivo, que mostrou os sinais em *m/z* 449,3752 [M+Na]<sup>+</sup> e 875,7598 [M+M+Na]<sup>+</sup> (**Figura 62**).

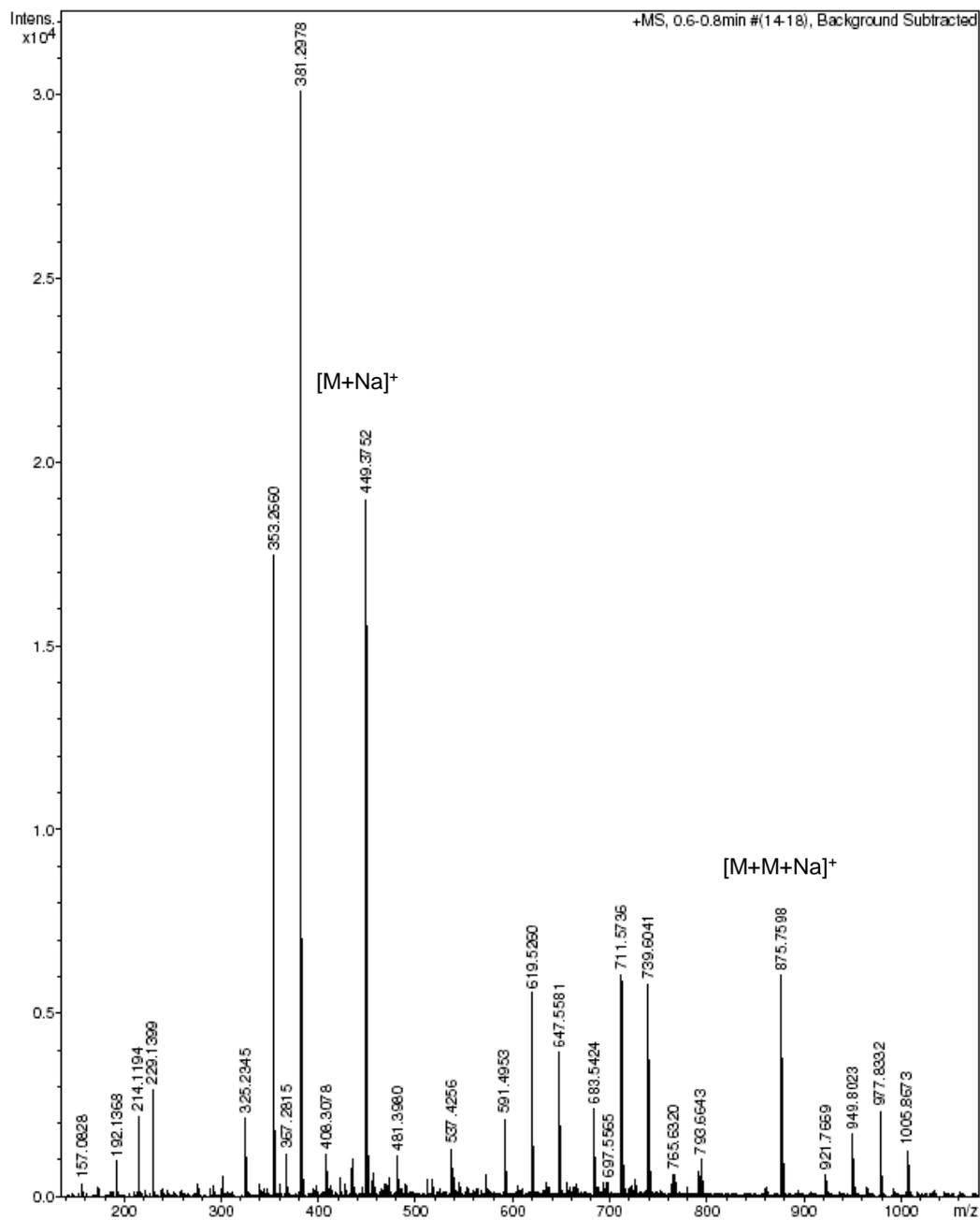
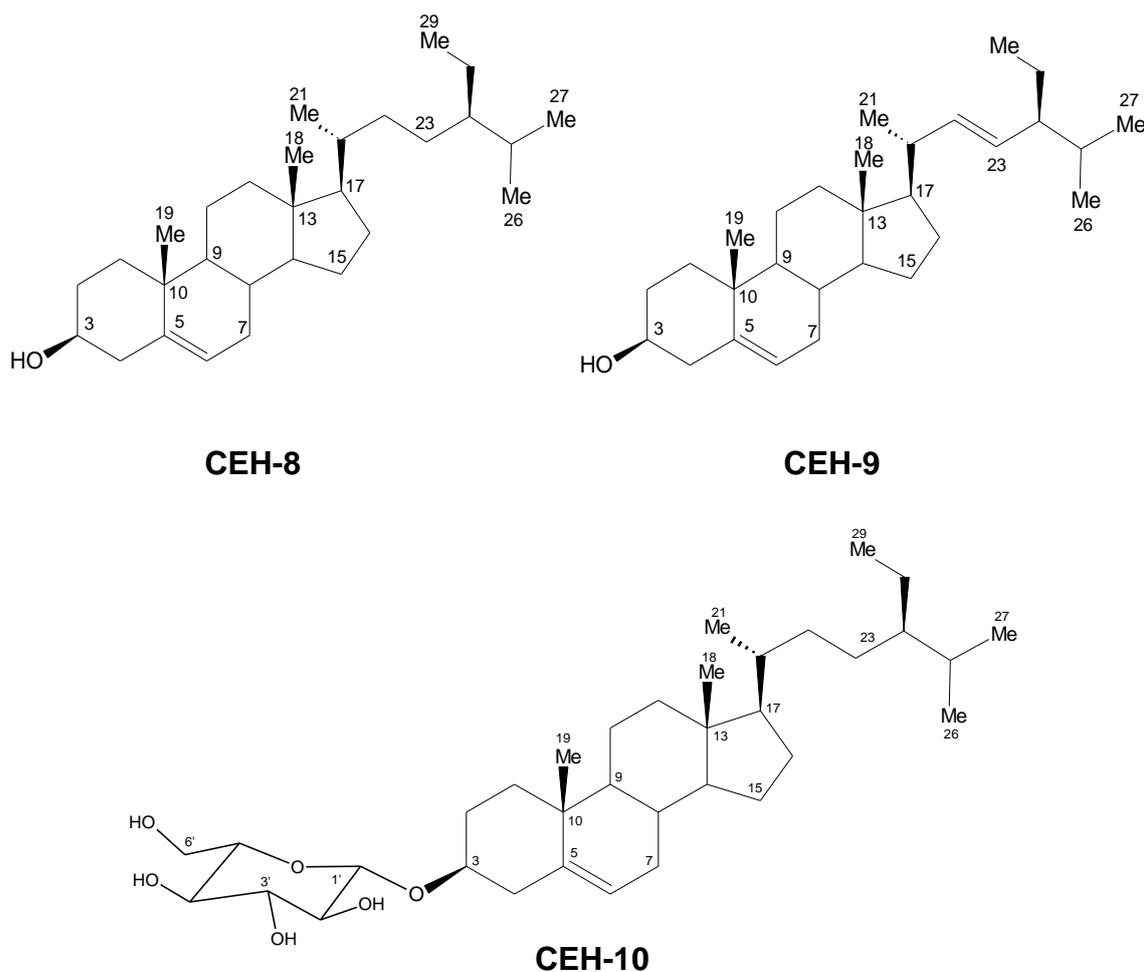


Figura 62: Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância CEH-7.

### 5.3.8 Esteróides CEH-8, CEH-9 e CEH-10

Os espectros de RMN (**Figuras 65 e 67**) da fração FH-2.4.6 mostra que a mesma trata-se da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, denominados **CEH-8** e **CEH-9** e a fração FH-4 trata-se do  $\beta$ -sitosterol glicosilado, denominado **CEH-10**.



As estruturas do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram propostas com base na comparação dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  com os reportados na literatura por Wright et al. (1978) e comprovadas pela análise da fração em GC-EI-MS (**Figuras 63 e 64**).

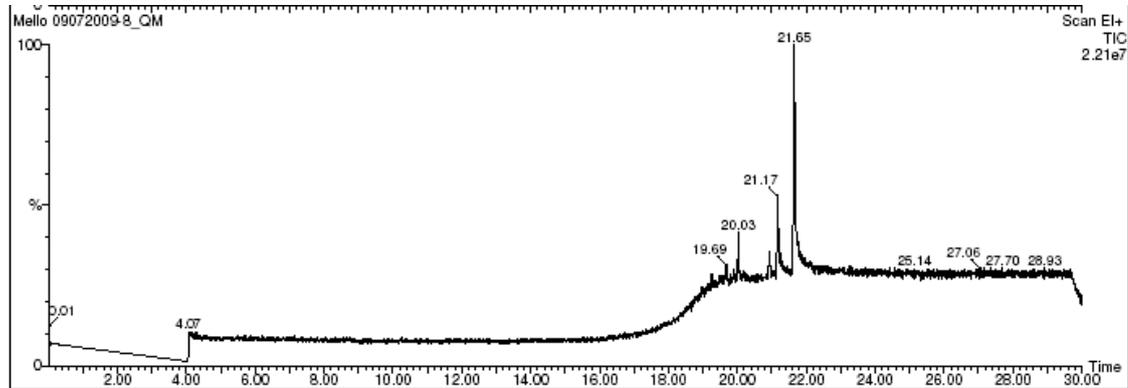


Figura 63: Cromatograma de íons totais (TIC), no modo positivo, da FH-2.4.6.

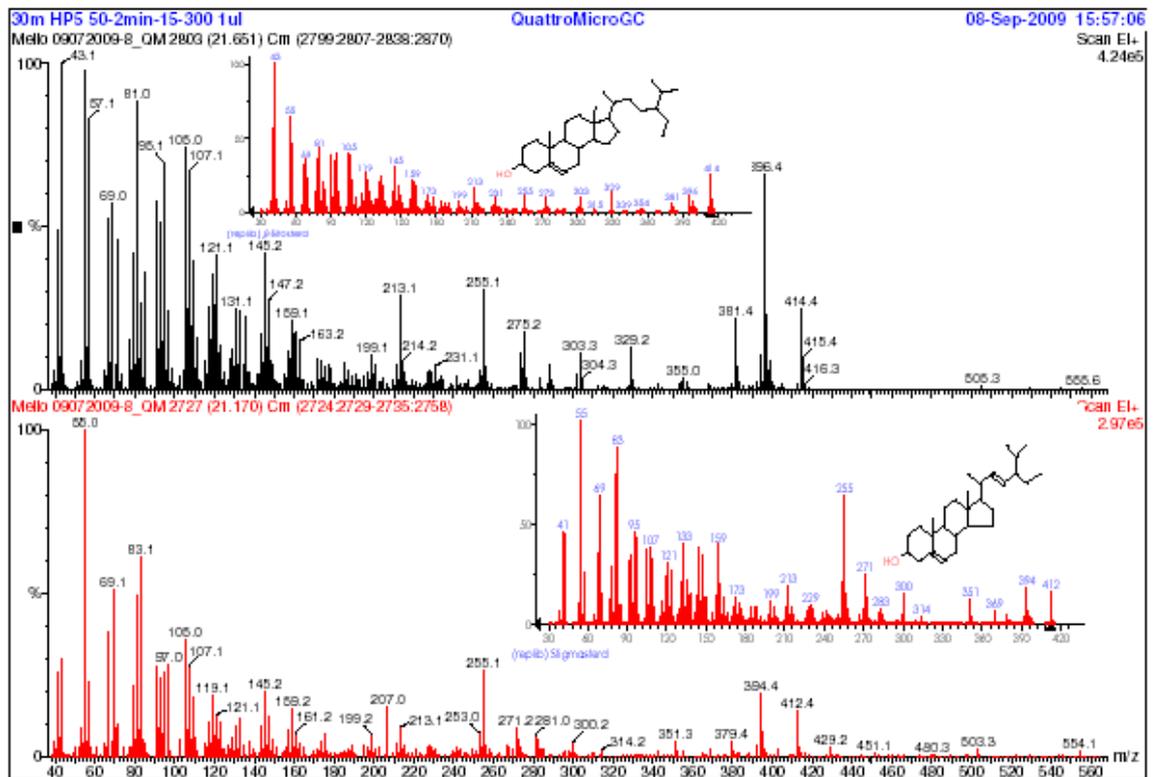
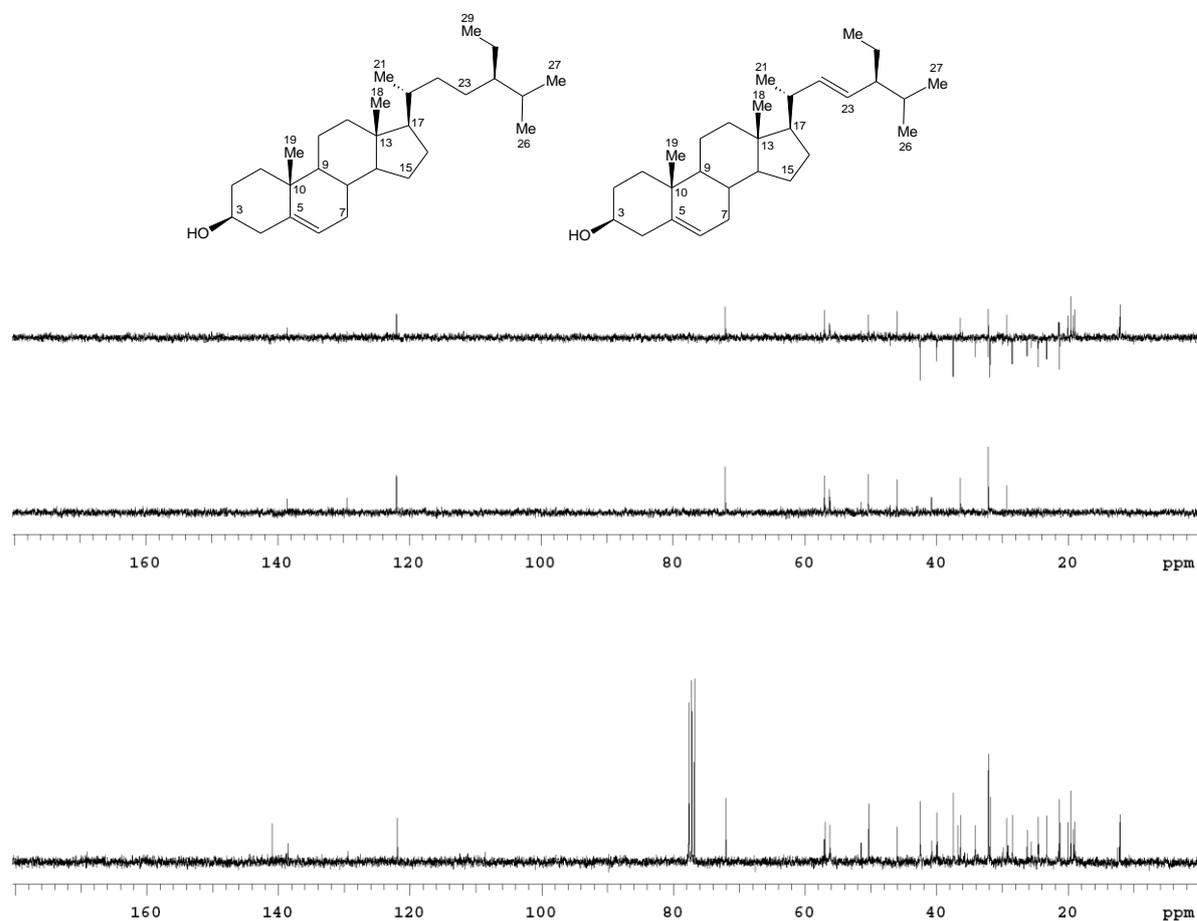
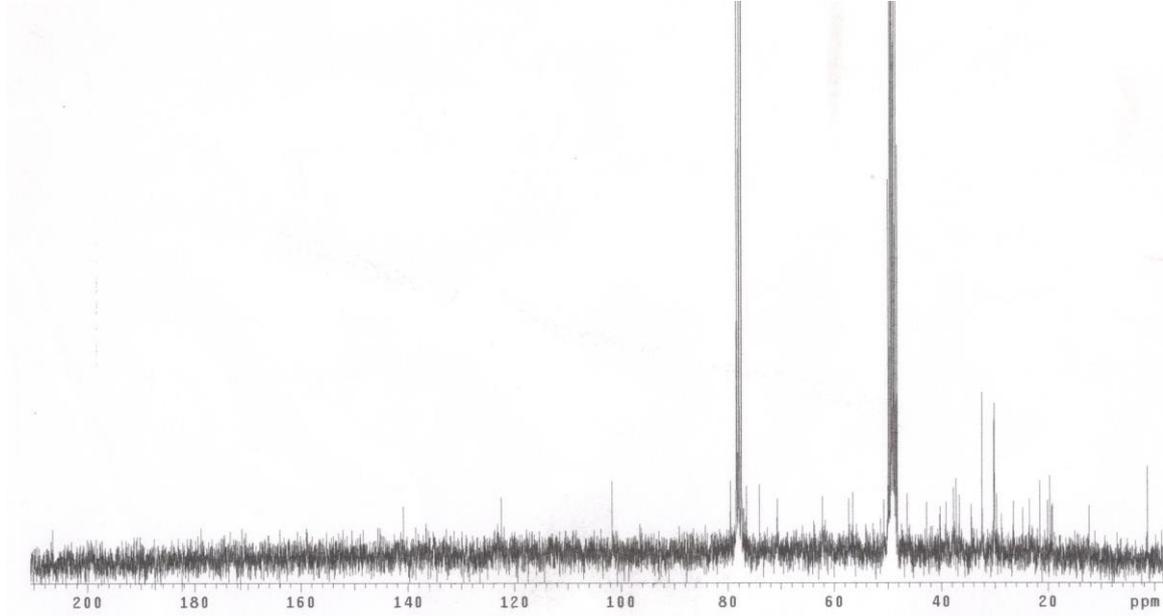


Figura 64: Espectro de GC-EI-MS das substâncias CEH-8 e CEH-9.



**Figura 65:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT das substâncias **CEH-8** e **CEH-9** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

A proposta da estrutura do  $\beta$ -sitosterol glicosilado para **CEH-10** foi feita com base na comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 66**) com os reportados na literatura por Iribarren e Pomilio (1983) (**Tabela 17**) e sua fórmula molecular  $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$  foi comprovada por ESI-MS que mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  599,7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (**Figura 67**).



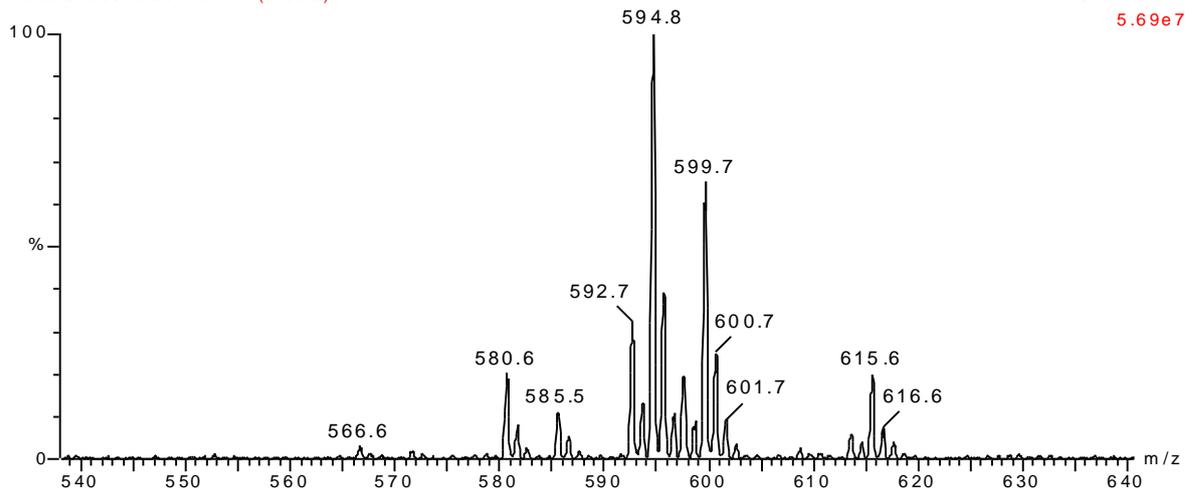
**Figura 66:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **CEH-10** (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

De Mello sample in MeOH/ $\text{CHCl}_3$ / $\text{NH}_4\text{OAc}$  Quattro - LC

MELLO 25072007-2-A 1 (0.628)

06-Sep-2007

Scan ES+  
5.69e7



**Figura 67:** Espectro de ESI-MS, modo positivo, da substância **CEH-10**.

**Tabela 17:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **CEH-8**, **CEH-9** e **CEH-10**, comparados com os valores de  $\delta_c$  para o  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (25,2 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) descritos por Wright et al. (1978) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (25,2 MHz, piridina- $d_5$ ) descrito por Iribarren e Pomilio (1983).

| <b>C</b> | <b>CEH-8</b> | <b><math>\beta</math>-sitosterol</b> | <b>CEH-9</b> | <b>Estigmasterol</b> | <b>CEH-10</b> | <b><math>\beta</math>-sitosterol glicosilado</b> |
|----------|--------------|--------------------------------------|--------------|----------------------|---------------|--|
| 1        | 37,5         | 37,3                                 | 37,5         | 37,3                 | 37,1          | 37,6   |
| 2        | 31,9         | 31,6                                 | 31,9         | 31,7                 | 30,0          | 30,4   |
| 3        | 72,0         | 71,7                                 | 72,0         | 71,8                 | 77,0          | 78,1   |
| 4        | 42,5         | 42,3                                 | 42,5         | 42,4                 | 39,0          | 40,0   |
| 5        | 141,0        | 140,8                                | 141,0        | 140,8                | 140,8         | 140,8  |
| 6        | 121,9        | 121,6                                | 121,9        | 121,7                | 122,5         | 121,9  |
| 7        | 32,1         | 31,9                                 | 32,1         | 31,9                 | 26,4          | 26,5   |
| 8        | 32,1         | 31,9                                 | 32,1         | 31,9                 | 32,3          | 32,2   |
| 9        | 50,3         | 50,2                                 | 50,3         | 50,2                 | 50,6          | 50,4   |
| 10       | 36,7         | 36,5                                 | n. a.        | 36,6                 | 37,5          | 37,0   |
| 11       | 21,3         | 21,1                                 | 21,3         | 21,1                 | 21,5          | 21,4   |
| 12       | 39,9         | 39,8                                 | 39,9         | 39,7                 | 40,2          | 39,4   |
| 13       | 42,5         | 42,3                                 | 42,5         | 42,3                 | 42,7          | 42,6   |
| 14       | 57,0         | 56,8                                 | 57,1         | 56,9                 | 57,2          | 56,9   |
| 15       | 24,5         | 24,3                                 | 24,5         | 24,4                 | 24,7          | 24,6   |
| 16       | 28,5         | 28,3                                 | 29,2         | 28,9                 | 28,6          | 28,6   |
| 17       | 56,3         | 56,1                                 | 56,3         | 56,0                 | 56,5          | 56,3   |
| 18       | 12,1         | 11,9                                 | 12,3         | 12,0                 | 12,1          | 12,1   |
| 19       | 19,2         | 19,4                                 | 19,2         | 19,4                 | 19,2          | 19,5   |
| 20       | 36,4         | 36,3                                 | 40,8         | 40,5                 | 36,6          | 36,5   |
| 21       | 19,0         | 18,8                                 | 21,4         | 21,1                 | 19,0          | 19,1   |
| 22       | 34,2         | 34,0                                 | 138,6        | 138,4                | 34,3          | 34,1   |
| 23       | 26,3         | 26,4                                 | n. a.        | 129,3                | 30,0          | 32,2   |
| 24       | 46,3         | 46,0                                 | 51,4         | 51,3                 | 46,3          | 46,1   |
| 25       | 29,3         | 29,0                                 | 29,9         | 31,9                 | 29,5          | 29,6   |
| 26       | 19,6         | 19,0                                 | 21,3         | 21,3                 | 19,6          | 19,3   |
| 27       | 20,0         | 19,6                                 | 19,6         | 19,0                 | 20,0          | 20,1   |
| 28       | 23,3         | 23,1                                 | 25,7         | 25,4                 | 23,4          | 23,5   |
| 29       | 12,2         | 12,3                                 | 12,5         | 12,3                 | 12,2          | 12,3   |
| 1'       | -            | -                                    | -            | -                    | 101,6         | 102,6  |
| 2'       | -            | -                                    | -            | -                    | 74,0          | 75,3   |
| 3'       | -            | -                                    | -            | -                    | 76,5          | 78,5   |
| 4'       | -            | -                                    | -            | -                    | 70,7          | 71,0   |
| 5'       | -            | -                                    | -            | -                    | 79,5          | 78,6   |
| 6'       | -            | -                                    | -            | -                    | 62,2          | 62,9   |

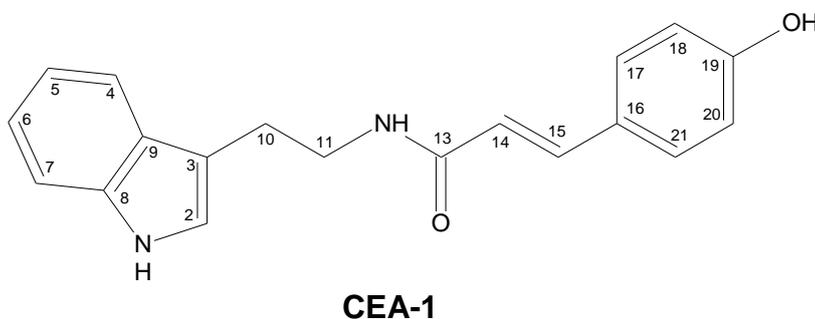
## 5.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FA

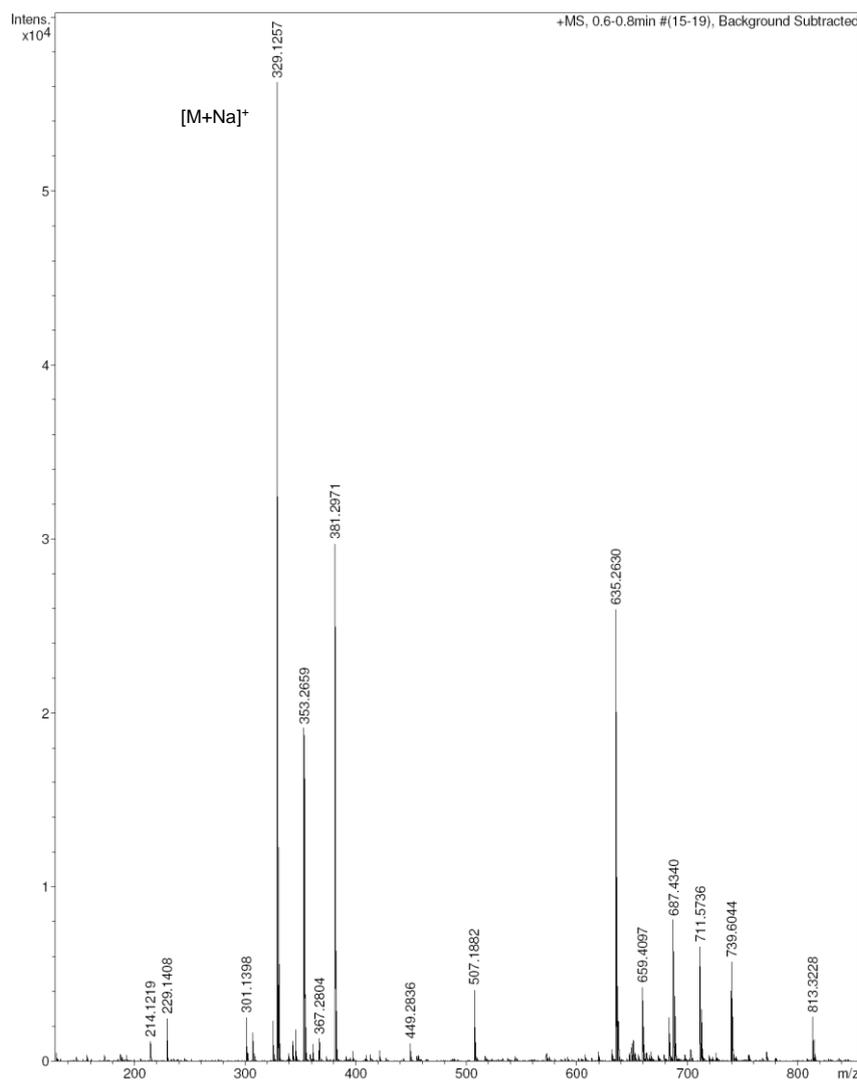
Da fração FA foram isolados os alcaloides denominados de **CEA-1** a **CEA-5**, os flavonoides **CEA-6** a **CEA-9** e os derivados de ácido benzóico **CEA-10** a **CEA-12**.

As substâncias foram identificadas com base na interpretação dos espectros de massas, dados de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados encontrados na literatura. Após revisão bibliográfica, não foi encontrado referência ao alcaloide **CEA-5**, indicando que o mesmo é inédito.

### 5.4.1 Alcaloide CEA-1

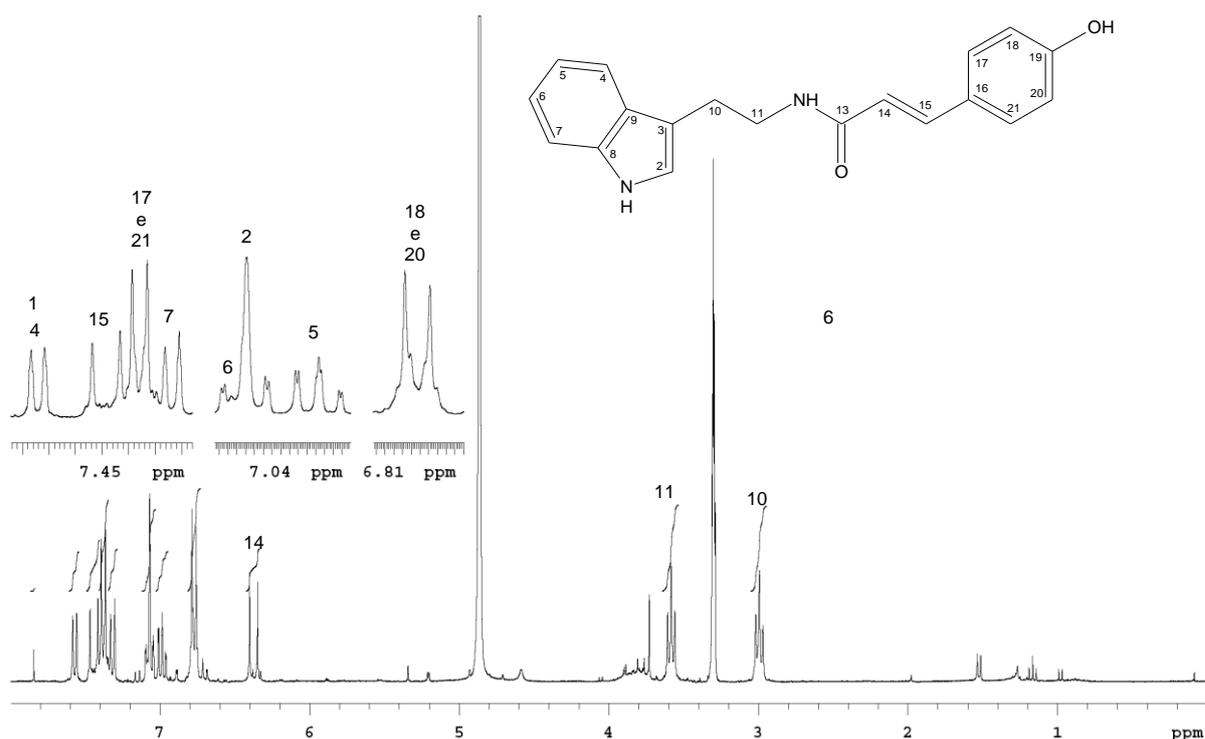
O alcaloide **CEA-1** foi identificado como sendo a *N-trans-p-coumaroil-triptamina* através de comparação dos dados de RMN com a literatura (ANDRIANAIVORAVELONA et al., 1999). O espectro de ESI-MS, no modo positivo, apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  329,1257  $[M+Na]^+$  (**Figura 68**) compatível com a estrutura proposta.





**Figura 68:** Espectro ESI-MS da substância **CEA-1** no modo positivo.

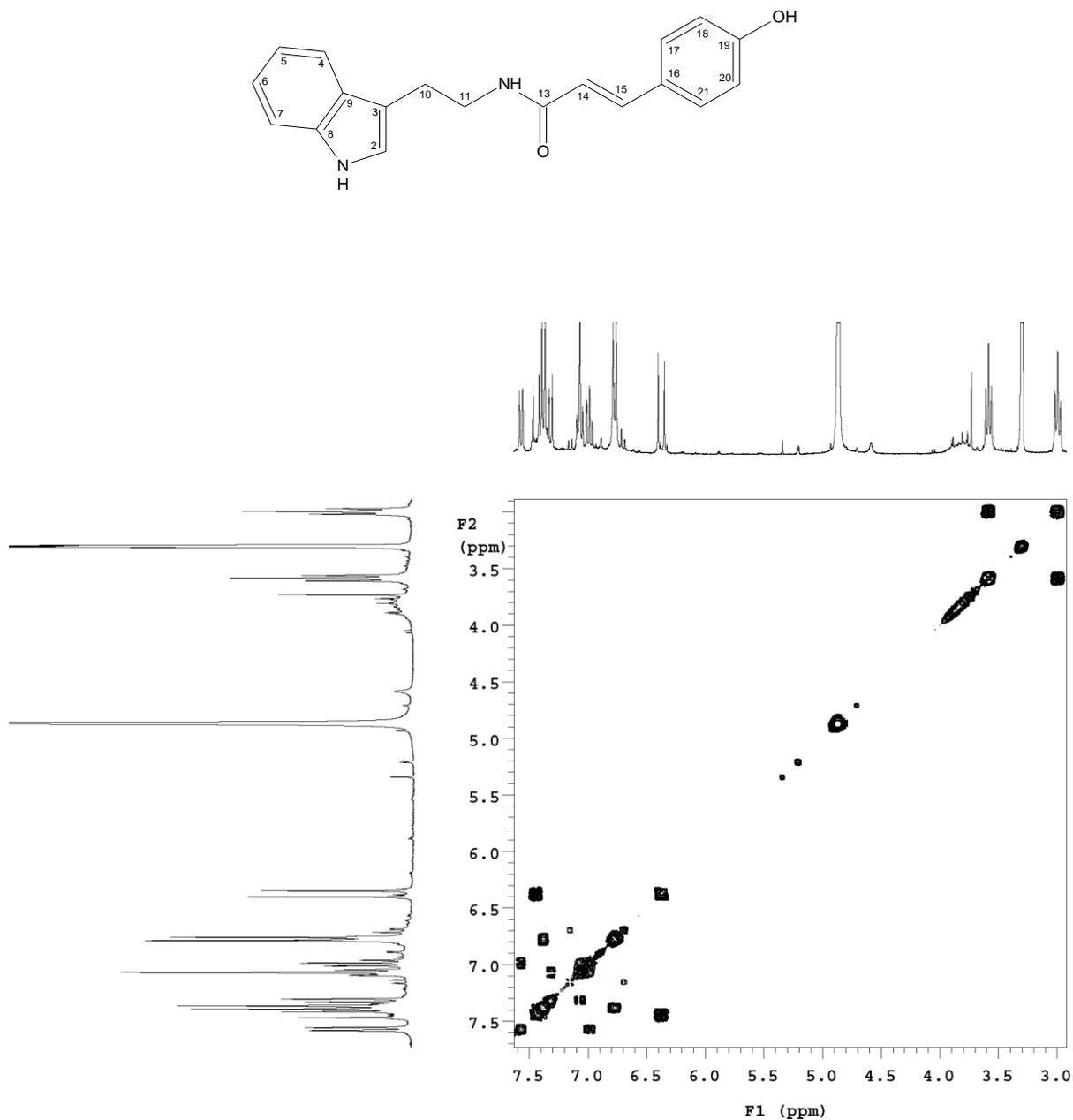
No espectro de RMN <sup>1</sup>H de **CEA-1** (**Figura 69**, **Tabela 18**) a unidade triptamínica foi evidenciada pelos sinais em  $\delta_H$  7,57 (H-4), 6,99 (H-5), 7,06 (H-6), 7,32 (H-7) e 7,07 (H-2), relativos aos hidrogênios aromáticos do sistema indólico, em conjunto com os sinais em  $\delta_H$  2,99 e 3,58, na forma de dois tripletos, atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-11. A unidade *trans-p*-coumaroil foi caracterizada pelos sinais em  $\delta_H$  6,38 (*d*, 15,9 Hz) e 7,44 (*d*, 15,9 Hz) que foram atribuídos ao H-14 e H-15 da *trans*-olefina e pelos sinais em  $\delta_H$  7,38 (2H) e 6,77 (2H) que foram atribuídos ao H-17/ H-21 e H-18/H-21, respectivamente.



**Figura 69:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **CEA-1** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

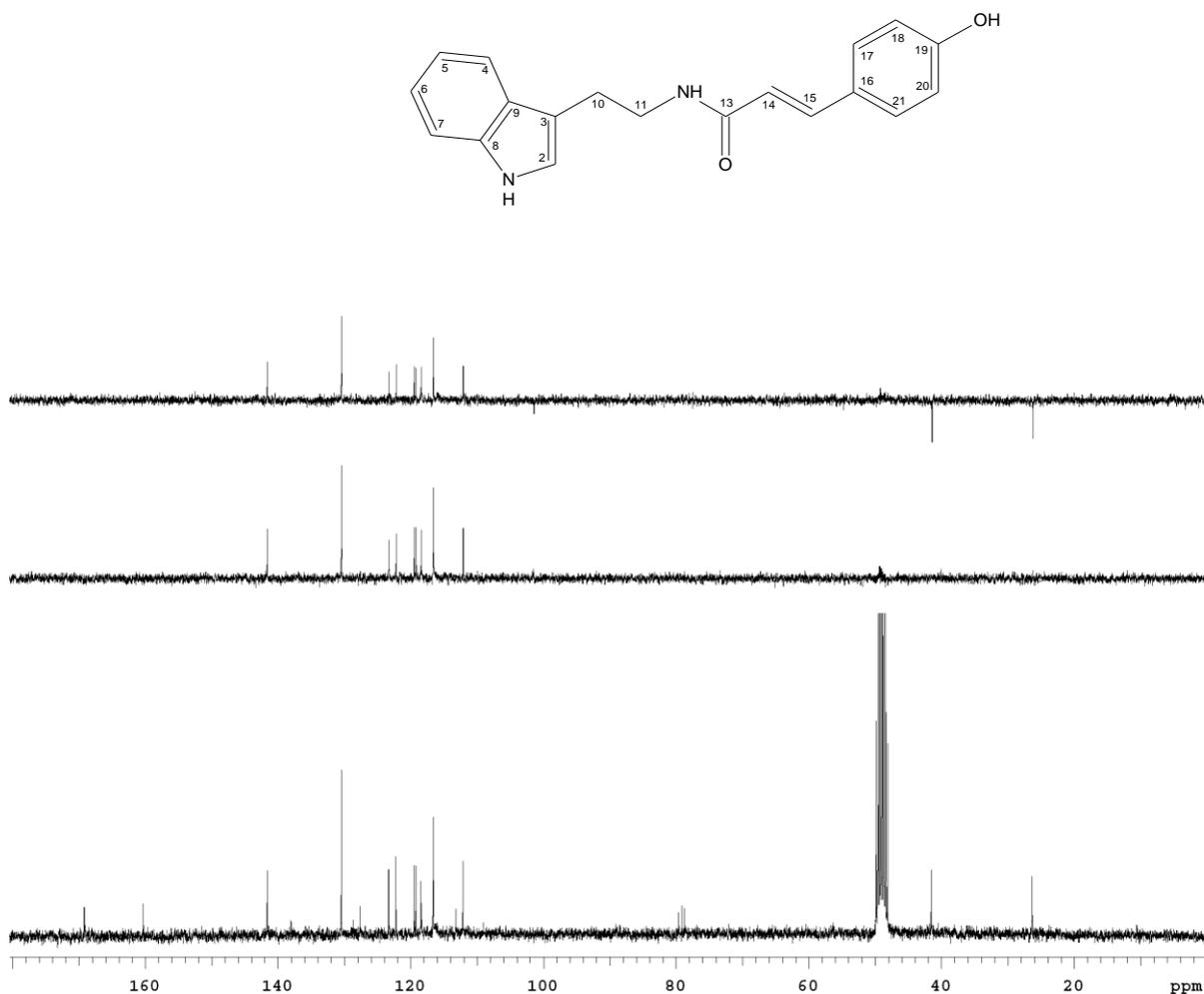
**Tabela 18:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD) e correlações observadas no COSY da substância **CEA-1**.

| H  | δ <sub>H</sub> (m, J em Hz) | COSY     |
|----|-----------------------------|----------|
| 2  | 7,07 (s)                    |          |
| 4  | 7,57 (dt 7,8; 1,2)          | H-5      |
| 5  | 6,99 (ddd, 7,8; 6,9; 1,2)   | H-4, H-6 |
| 6  | 7,06 (ddd, 7,8; 6,9; 1,2)   | H-5, H-7 |
| 7  | 7,32 (dt, 7,8; 1,2)         | H-6      |
| 10 | 2,99 (t, 7,2)               | H-11     |
| 11 | 3,58 (t, 7,2)               | H-10     |
| 14 | 6,38 (d, 15,9)              | H-15     |
| 15 | 7,44 (d, 15,9)              | H-14     |
| 17 | 7,38 (d, 8,7)               | H-18     |
| 18 | 6,77 (d, 8,7)               | H-17     |
| 20 | 6,77 (d, 8,7)               | H-21     |
| 21 | 7,38 (d, 8,7)               | H-20     |



**Figura 70:** Espectro de COSY da substância **CEA-1** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C foi analisado conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 71, Tabela 19**) e HMQC (**Figura 72, Tabela 19**) e apresenta 19 sinais que foram atribuídos à estrutura de **CEA-1** com base nos dados da literatura para o *N-trans-p*-coumaroil-triptamina.

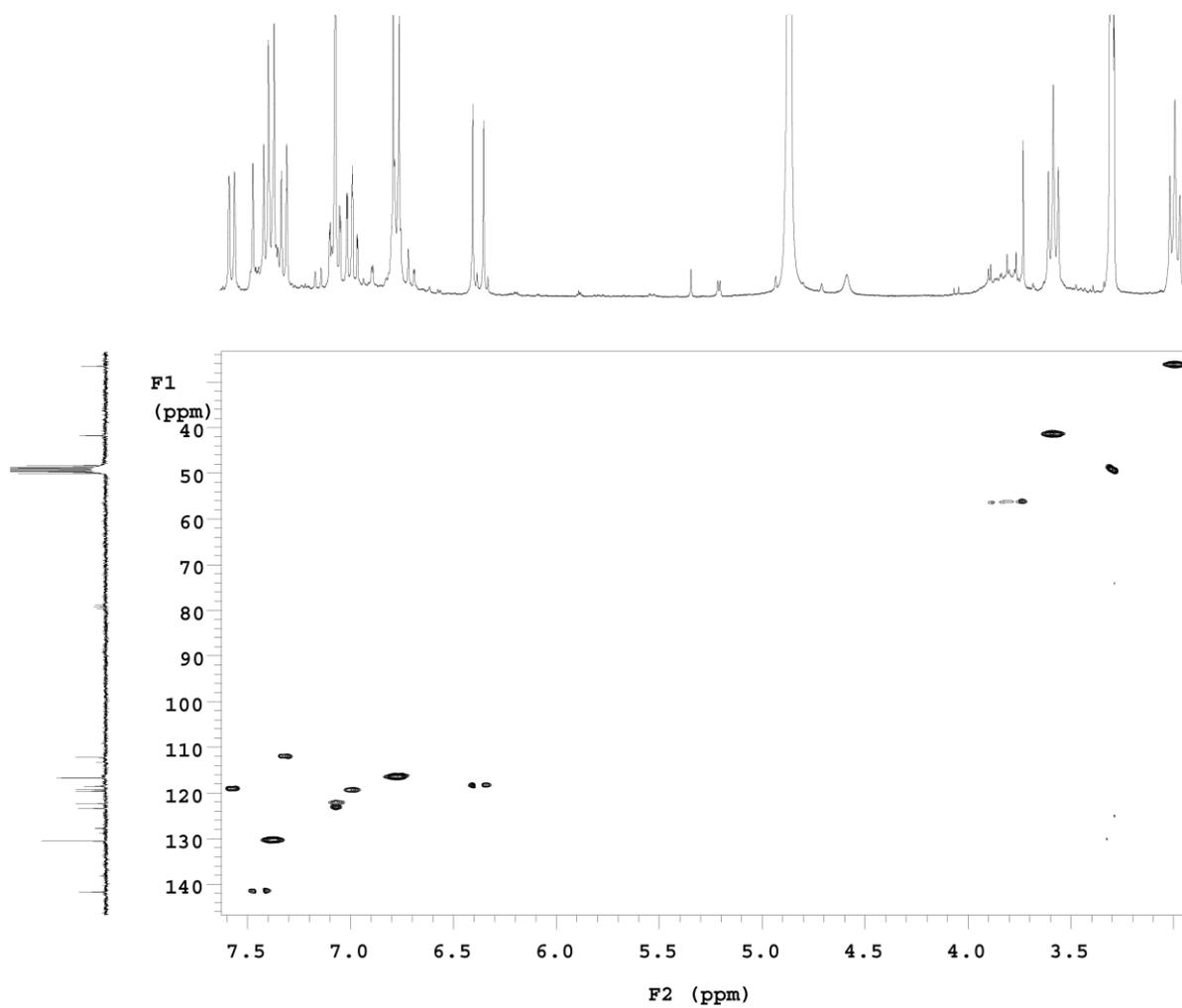


**Figura 71:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-1** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  123,4, 113,2, 119,3, 119,6, 122,3, 112,2, 138,1 e 127,7 foram atribuídos aos carbonos de C-2 até C-9 do esqueleto indólico. Estes dados associados aos sinais para carbonos metilênicos em 26,3 (C-10) e 41,6 (C-11) caracterizaram a unidade triptamínica. O sistema *trans-p*-coumaroil foi evidenciado pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  169,2, atribuído em C-13, pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  118,5 (CH) e 141,7 (CH), atribuídos a *trans*-olefina, e em  $\delta_{\text{C}}$  128,7, 130,5, 116,7 e 160,4, atribuídos ao anel aromático. Os sinais do C-17/C-21 e C-18/C-20 estão reportados intercambiados na literatura.

**Tabela 19:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da **CEA-1** comparados com os valores de  $\delta_c$  para o *N-trans-p*-coumaroil-triptamina (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ANDRIANAIVORAVELONA et al, 1999).

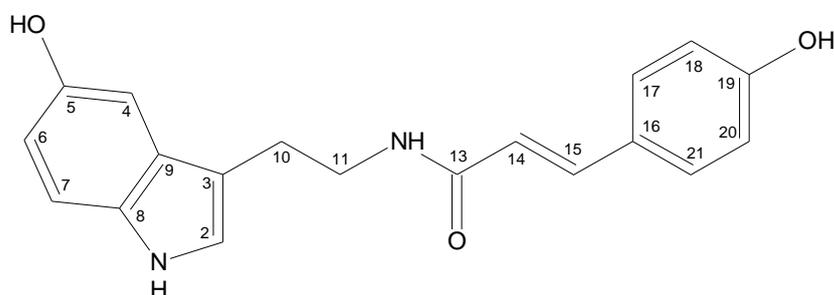
| C  | $\delta_c$ | CEA-1         | HMQC | N-trans-p-coumaroil- |
|----|------------|---------------|------|----------------------|
|    |            | DEPT          |      | triptamina           |
|    |            |               |      | $\delta_c$           |
| 2  | 123,4      | CH            | 7,07 | 123,4                |
| 3  | 113,2      | C             |      | 113,3                |
| 4  | 119,3      | CH            | 7,57 | 119,3                |
| 5  | 119,6      | CH            | 6,99 | 119,5                |
| 6  | 122,3      | CH            | 7,06 | 122,3                |
| 7  | 112,2      | CH            | 7,32 | 112,2                |
| 8  | 138,1      | C             |      | 138,1                |
| 9  | 127,7      | C             |      | 128,8                |
| 10 | 26,3       | $\text{CH}_2$ | 2,99 | 26,4                 |
| 11 | 41,6       | $\text{CH}_2$ | 3,58 | 41,6                 |
| 13 | 169,2      | C             |      | 169,2                |
| 14 | 118,5      | CH            | 6,38 | 118,5                |
| 15 | 141,7      | CH            | 7,44 | 141,6                |
| 16 | 128,7      | C             |      | 127,7                |
| 17 | 130,5      | CH            | 7,38 | 116,7                |
| 18 | 116,7      | CH            | 6,77 | 130,5                |
| 19 | 160,4      | C             |      | 160,4                |
| 20 | 116,7      | CH            | 6,77 | 130,5                |
| 21 | 130,5      | CH            | 7,38 | 116,7                |



**Figura 72:** Espectro de HMQC da substância **CEA-1** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

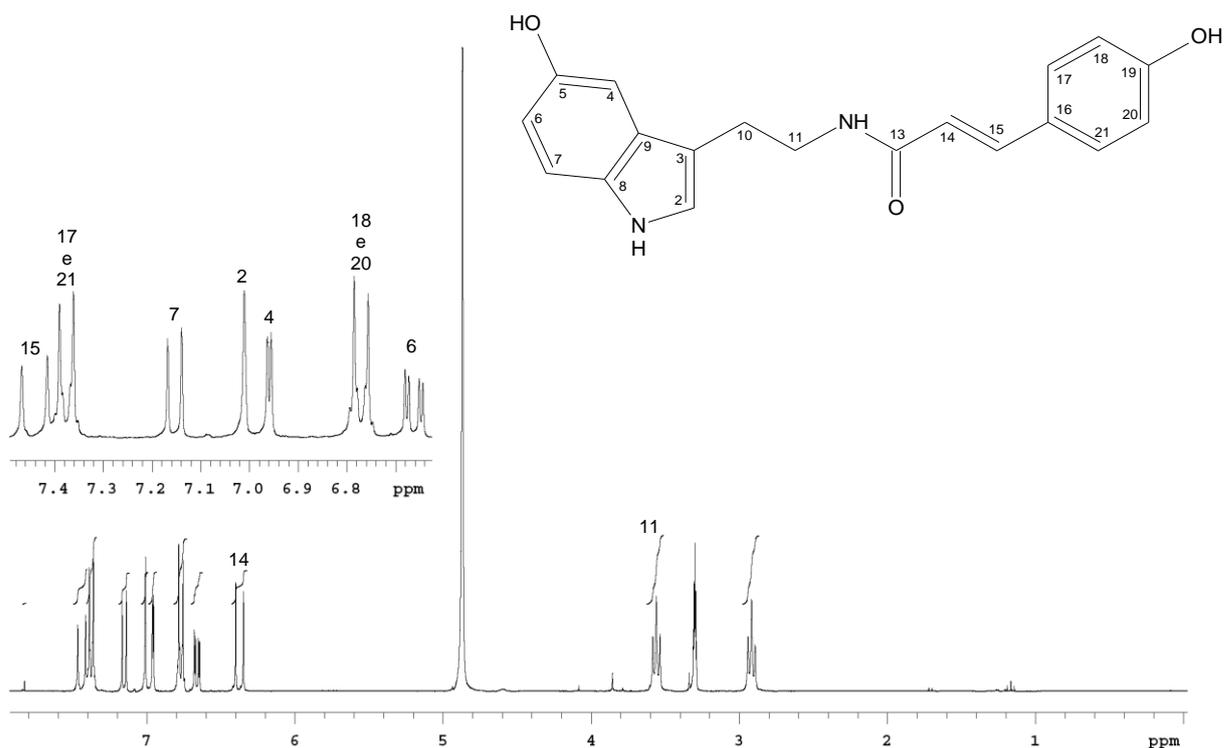
### 5.4.2 Alcaloide CEA-2

O alcaloide **CEA-2** foi identificado como sendo o N-*trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina por meio da análise e comparação de seus espectros de RMN com os do alcaloide **CEA-1**. Observou-se alterações nos sinais do esqueleto indólico como a ausência do sinal de um carbono metínico aromático em  $\delta_c$  119,6, no alcaloide **CEA-1**, por um carbono não ligado a hidrogênio em  $\delta_c$  151,0, no **CEA-2**, indicando a presença de um grupo hidroxila na posição C-5.



**CEA-2**

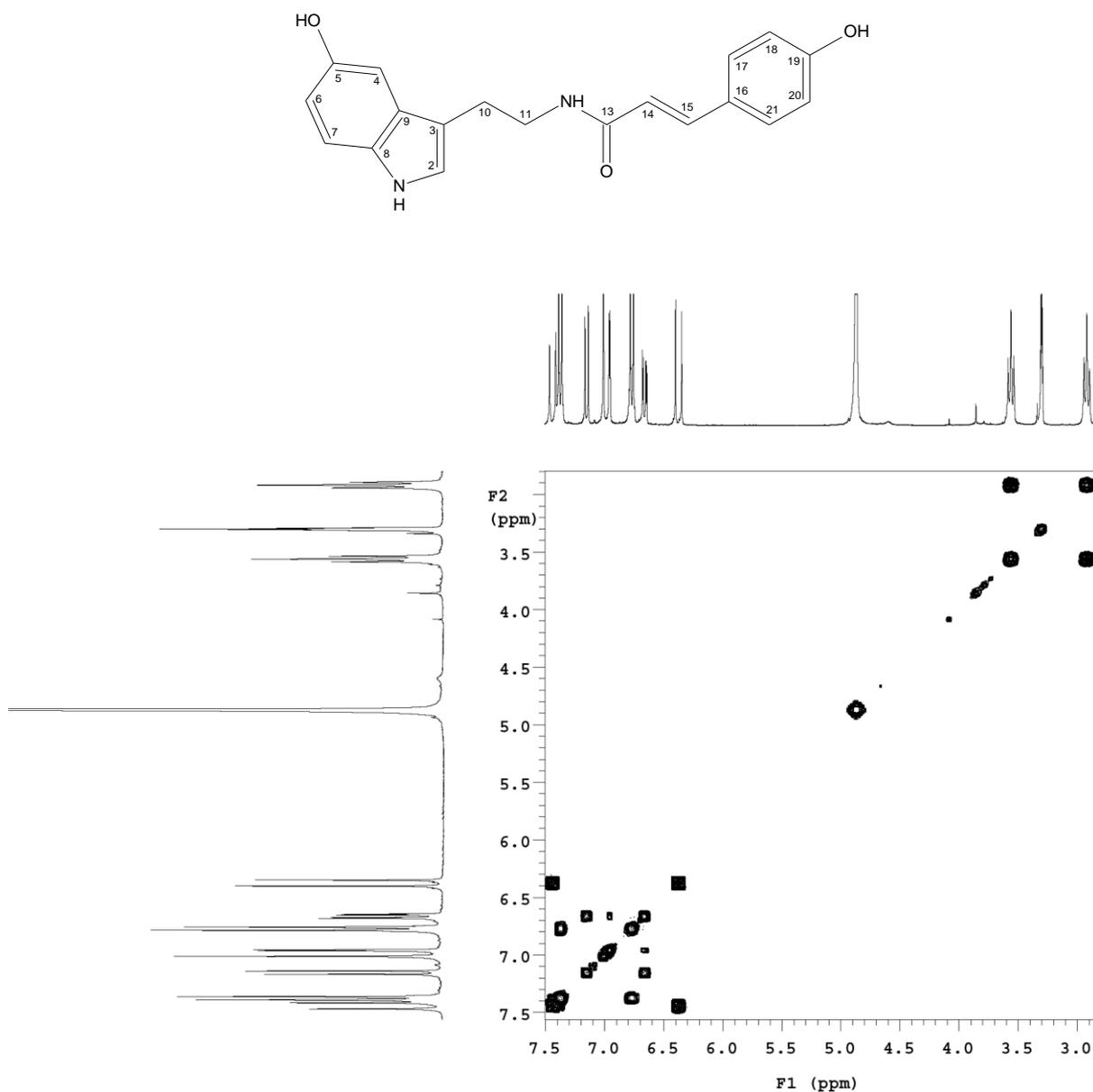
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 73**) da substância **CEA-2**, a alteração no padrão de substituição do anel benzênico do sistema indólico, pela presença do grupo hidroxila em C-5, pode ser comprovado pelos sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  6,96 (*d*, 2,4), 6,66 (*dd*, 8,4; 2,4) e 7,15 (*d*, 8,4), em acordo com as correlações observadas no COSY (**Figura 74**) para estes sinais. Observou-se também a presença do singlete em  $\delta_H$  7,01 (H-2) e de dois tripletos em  $\delta_H$  2,92 (H-10) e 3,57 (H-11), caracterizando a unidade 5-hidroxitriptamina (serotonina). Os demais sinais foram concordantes com o sistema *trans-p*-coumaroil (**Tabela 20**) à semelhança com o demonstrado para **CEA-1**.



**Figura 73:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-2** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

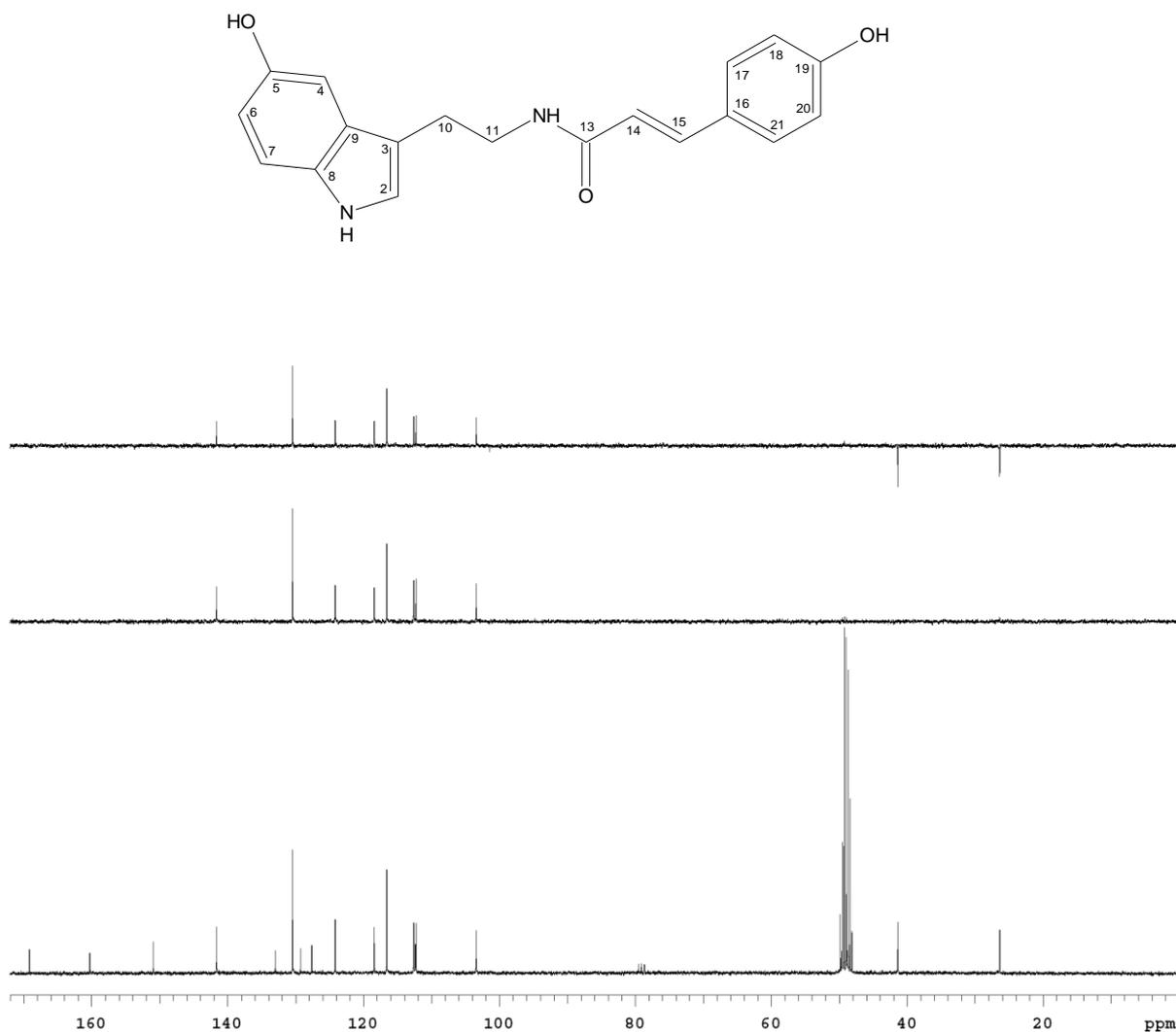
**Tabela 20:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da **CEA-2**.

| H  | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY     |
|----|----------------------------------|----------|
| 2  | 7,01 (s)                         |          |
| 4  | 6,96 (d, 2,4)                    | H-6      |
| 6  | 6,66 (dd, 8,4; 2,4)              | H-4, H-7 |
| 7  | 7,15 (d, 8,4)                    | H-6      |
| 10 | 2,92 (t, 7,2)                    | H-11     |
| 11 | 3,57 (t, 7,2)                    | H-10     |
| 14 | 6,38 (d, 15,6)                   | H-15     |
| 15 | 7,44 (d, 15,6)                   | H-14     |
| 17 | 7,38 (d, 8,4)                    | H-18     |
| 18 | 6,77 (d, 8,4)                    | H-17     |
| 20 | 6,77 (d, 8,4)                    | H-21     |
| 21 | 7,38 (d, 8,4)                    | H-20     |



**Figura 74:** Espectro de COSY da substância **CEA-2** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C que foi analisado conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 75**) e HMQC (**Figura 76**), mostra 19 sinais que foram atribuídos à estrutura com base nos dados da **CEA-1** e comparados com os dados da literatura para a N-*trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (**Tabela 21**).

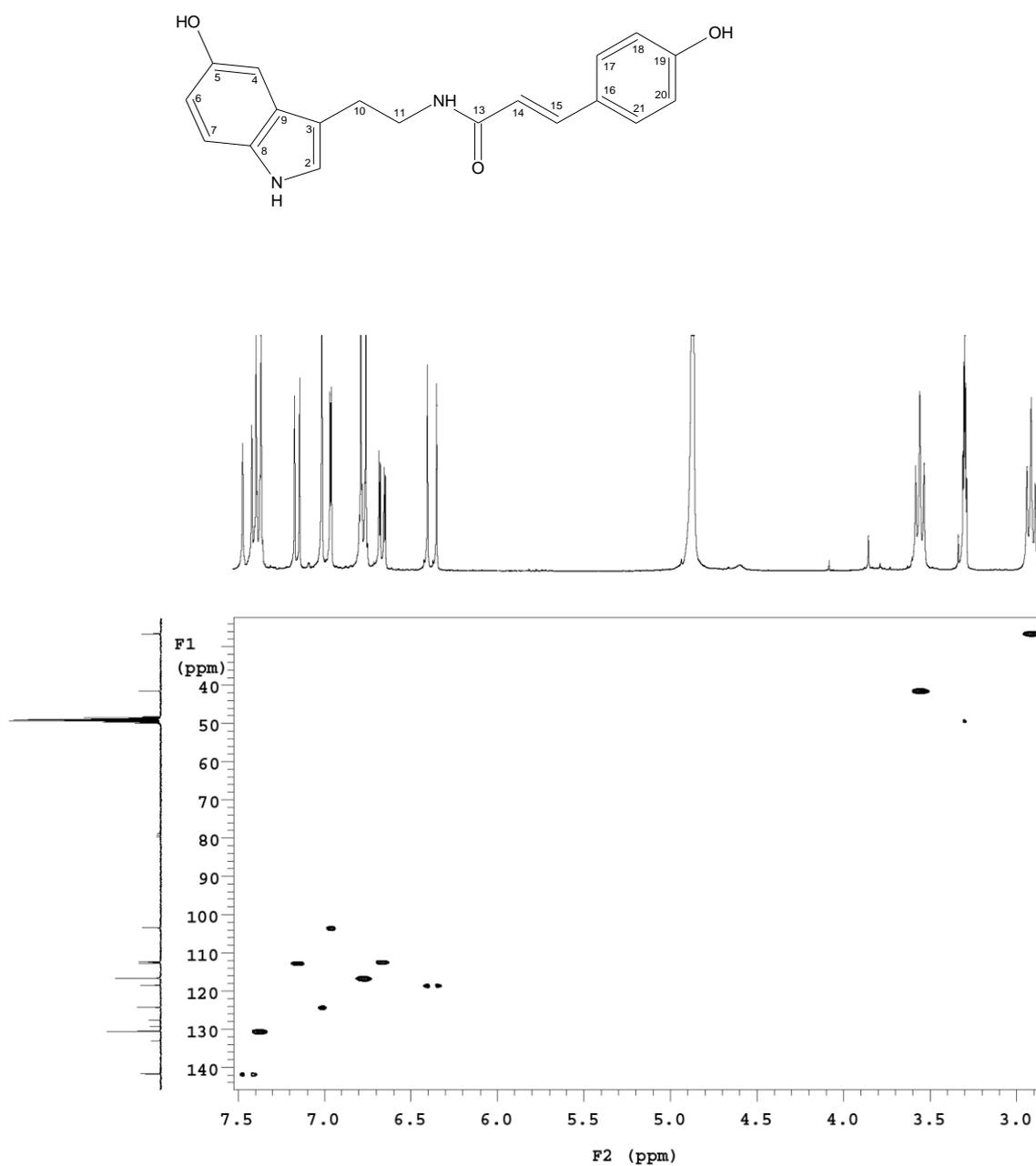


**Figura 75:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-2** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

A presença do sistema 5-hidroxitriptamina foi evidenciado pelos sinais de carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  124,2, 112,4, 103,5, 151,0, 112,3, 112,6, 133,0 e 129,3, C-2 a C-9 e pelos sinais de carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  26,4 (C-10) e 41,4 (C-11). O sistema *N-trans-p*-coumaroil foi comprovado pelo sinal de carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  169,2 (C-13), de carbono vinílico em  $\delta_{\text{C}}$  118,5 (C-14) e 141,7 (C-15) e aromático em  $\delta_{\text{C}}$  127,7 (C-16), 130,5 (C-17/ C-21), 116,6 (C-18/C-20) e 130,5 (C-21).

**Tabela 21:**Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da **CEA-2**, comparados com os valores de  $\delta_c$  para o *N-trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (125 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ZHANG et al, 1997).

| C  | $\delta_c$ | CEA-2<br>DEPT | HMQC | <i>N-trans-p</i> -coumaroil-5-<br>hidroxitriptamina |
|----|------------|---------------|------|---|
|    |            |               |      | $\delta_c$  |
| 2  | 124,2      | CH            | 7,01 | 124,1   |
| 3  | 112,4      | C             |      | 112,4   |
| 4  | 103,5      | CH            | 6,96 | 103,5   |
| 5  | 151,0      | C             |      | 151,5   |
| 6  | 112,3      | CH            | 6,66 | 112,4   |
| 7  | 112,6      | CH            | 7,15 | 112,5   |
| 8  | 133,0      | C             |      | 132,2   |
| 9  | 129,3      | C             |      | 129,3   |
| 10 | 26,4       | $\text{CH}_2$ | 2,92 | 26,4  |
| 11 | 41,4       | $\text{CH}_2$ | 3,57 | 40,8  |
| 13 | 169,2      | C             |      | 165,1   |
| 14 | 118,5      | CH            | 6,38 | 119,6   |
| 15 | 141,7      | CH            | 7,44 | 140,4   |
| 16 | 127,7      | C             |      | 127,7   |
| 17 | 130,5      | CH            | 7,38 | 130,2   |
| 18 | 116,6      | CH            | 6,77 | 116,6   |
| 19 | 160,3      | C             |      | 159,8   |
| 20 | 116,6      | CH            | 6,77 | 116,6   |
| 21 | 130,5      | CH            | 7,38 | 130,2   |



**Figura 76:** Espectro de HMQC da substância **CEA-2** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Através da análise dos espectros de RMN e comparação com a literatura (ZHANG et al, 1997) a estrutura da *N-trans-p-coumaroyl-5-hydroxytryptamine* foi proposta para o alcaloide **CEA-2**, sendo comprovada pelo espectro de ESI-MS, modo positivo, que apresentou o pico em  $m/z$  345,1212 [M+Na]<sup>+</sup> (**Figura 77**).

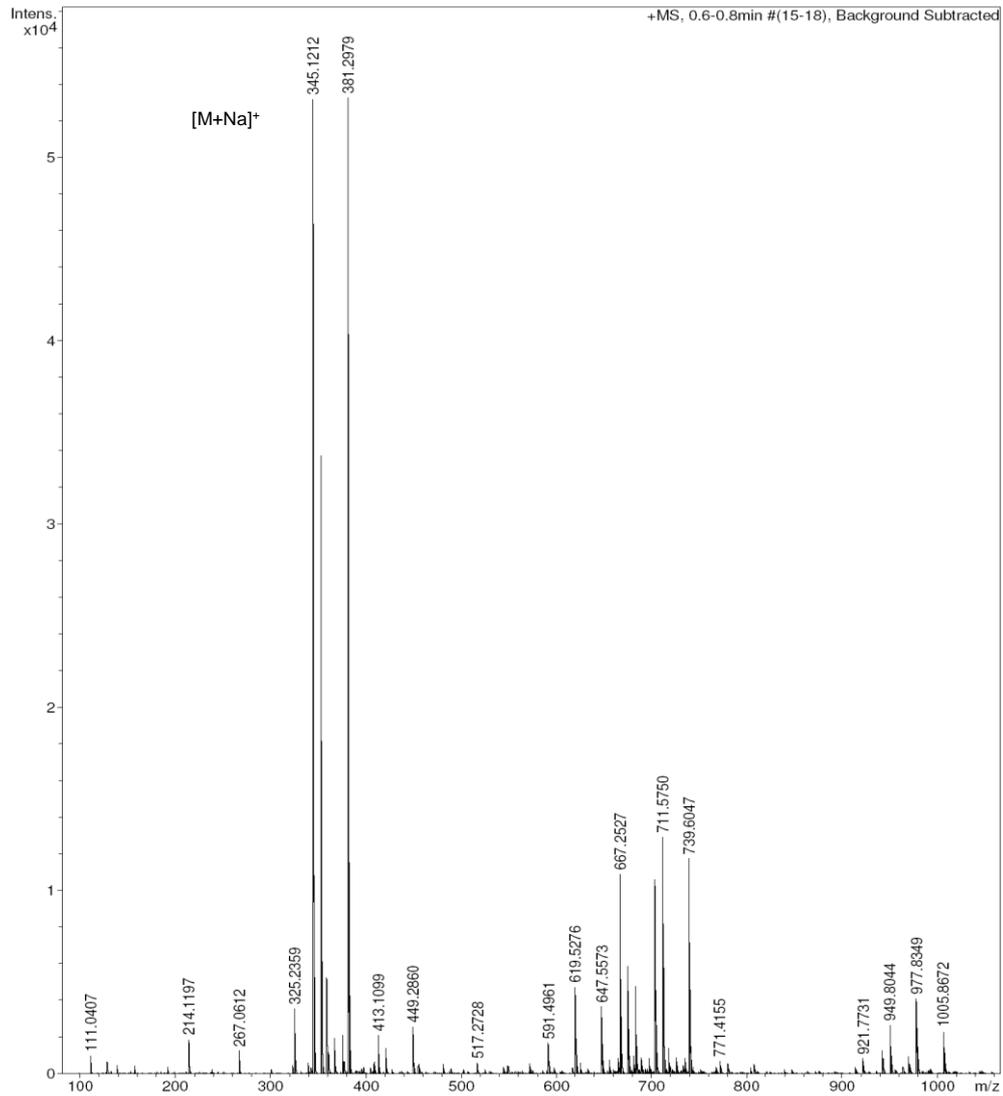
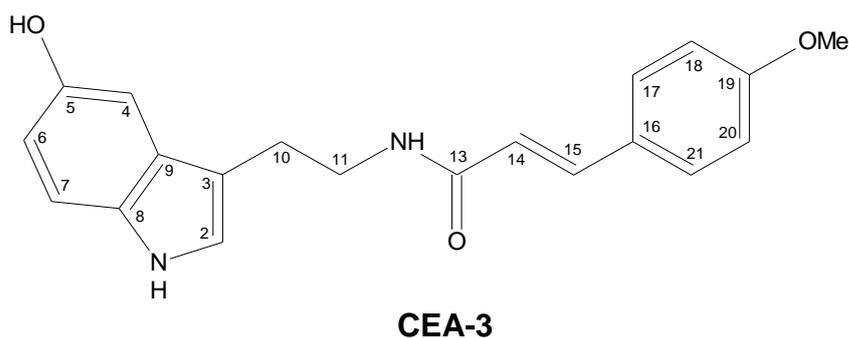


Figura 77: Espectro de ESI-MS da substância **CEA-2** no modo positivo.

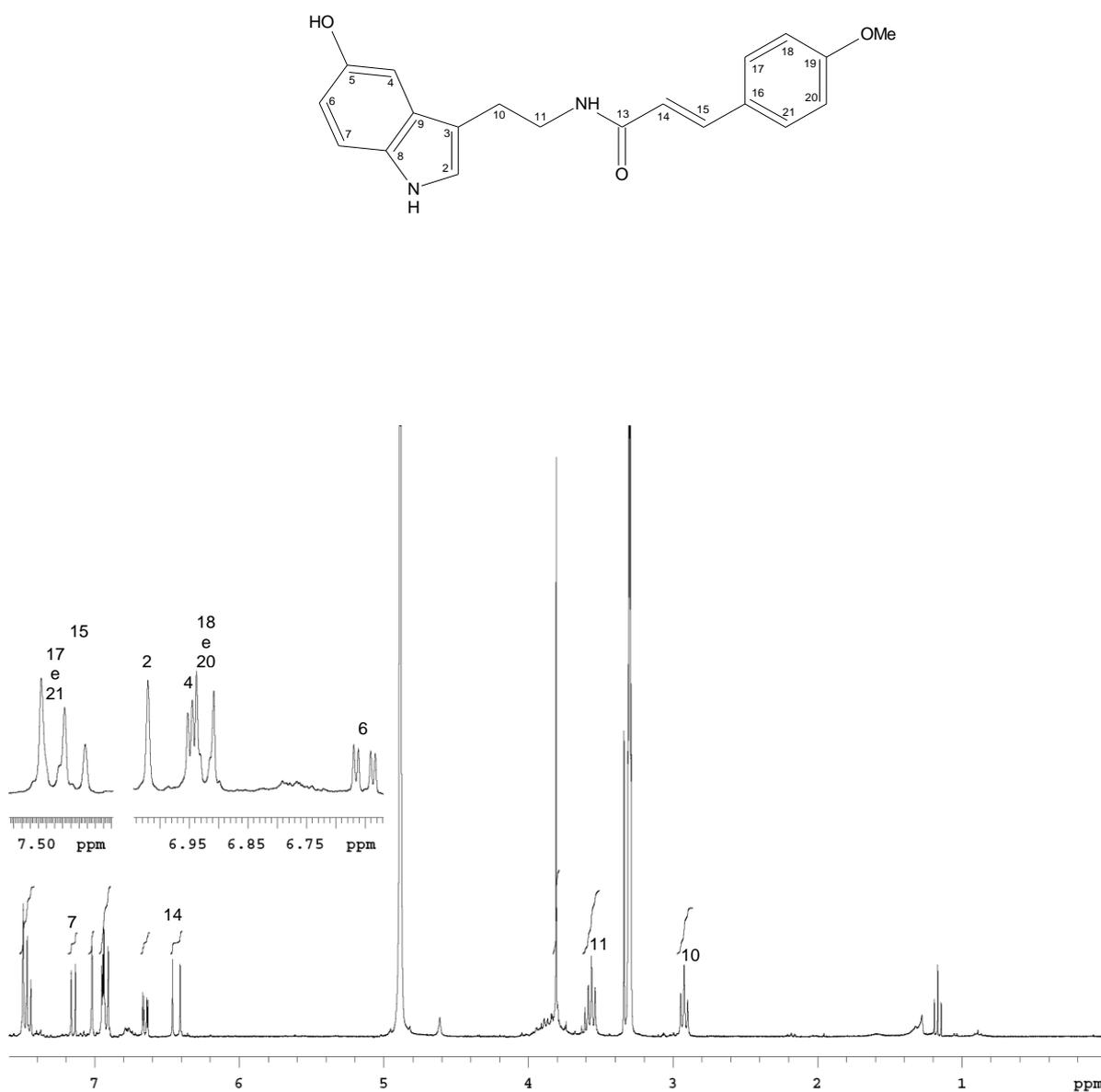
### 5.4.3 Alcaloide CEA-3

A análise dos espectros de RMN do alcaloide **CEA-3** em comparação com os do alcaloide **CEA-2**, demonstrou grande similaridade nos sinais registrados. A única diferença notada foi a presença do sinal de um grupo metoxila em  $\delta_H$  3,81 (s) e  $\delta_C$  54,7, em **CEA-3**, sugerindo a substituição de um grupo hidroxila, em **CEA-2**, por este grupo, em **CEA-3**.



Os dados de RMN de  $^1H$  (**Figura 78**, **Tabela 22**) do alcaloide **CEA-3** foram comparados com os dados reportados na literatura por Jennett-Siems et al. (2003) para o *N-trans*-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina. Os relatos encontrados para esta substância a referem como produto de síntese (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011; JENNETT-SIEMS et al. 2003), indicando ter sido neste trabalho isolada pela primeira vez de um produto natural. Dados de RMN de  $^{13}C$  não foram encontrados.

Para o alcaloide **CEA-3**, no espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 78**), os sinais em  $\delta_H$  6,95 (*d*, 2,4), 6,65 (*dd*, 8,7; 2,4) e 7,15 (*d*, 8,7), comprovam pelas constantes de acoplamento o padrão de substituição do anel benzênico do sistema indólico, de forma semelhante ao descrito para o alcaloide **CEA-2**. Os sinais em  $\delta_H$  7,02 (H-2; *s*), 2,92 (H-10; *t*, 7,2) e 3,56 (H-11; *t*, 6,9) comprovam o sistema 5-hidroxitriptamina e os sinais dos hidrogênios da *trans*-olefina em  $\delta_H$  6,44 (*d*, 15,6) e 7,47 (*d*, 16,2), sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,45 (2H; *d*, 8,4) e 6,93 (2 H; *d*, 9,0) e de grupo metoxila em  $\delta_H$  3,81 (*s*) justificam as atribuições para o sistema *N-trans*-4-metóxi-cinamoil.



**Figura 78:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **CEA-3** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

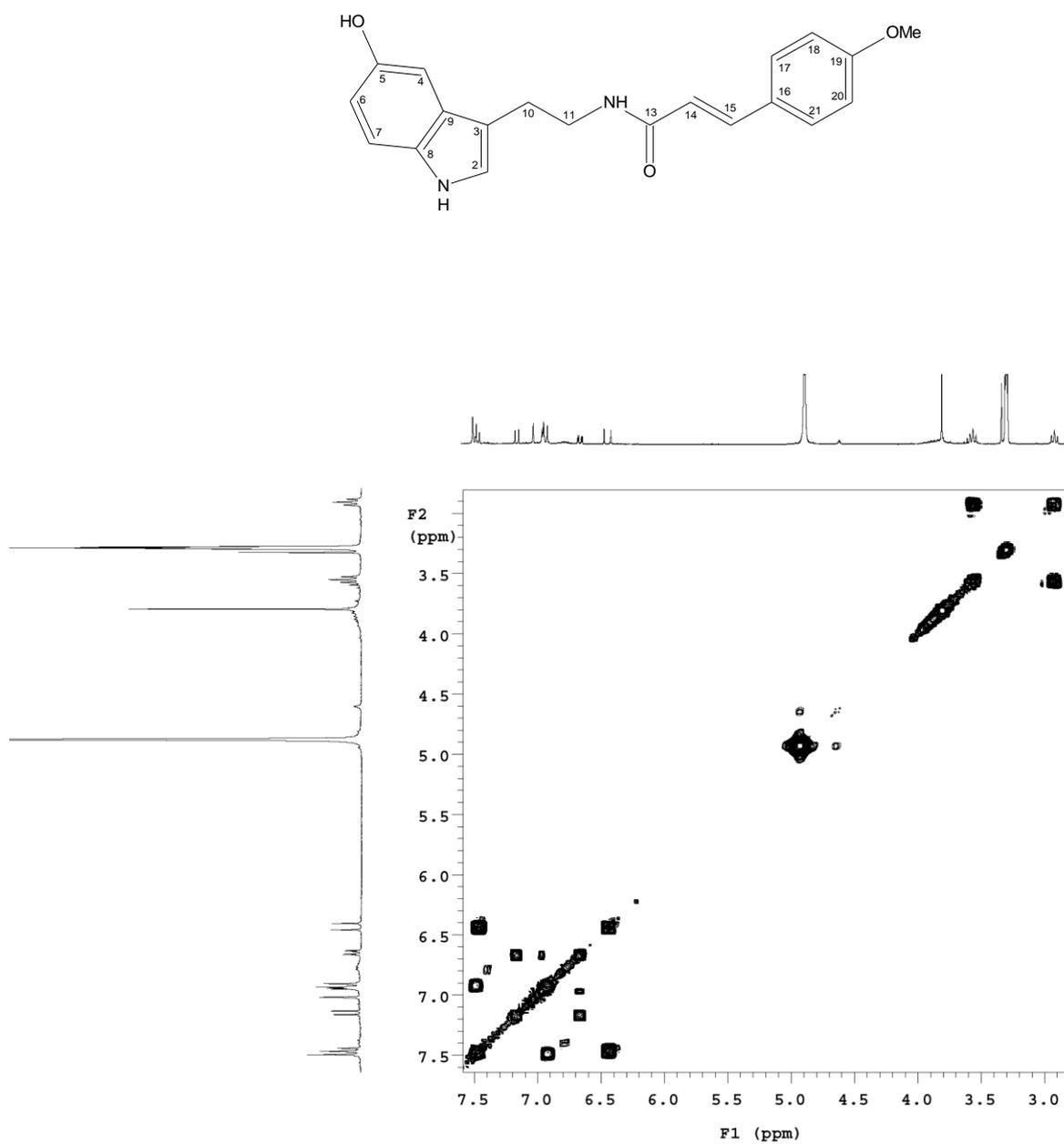
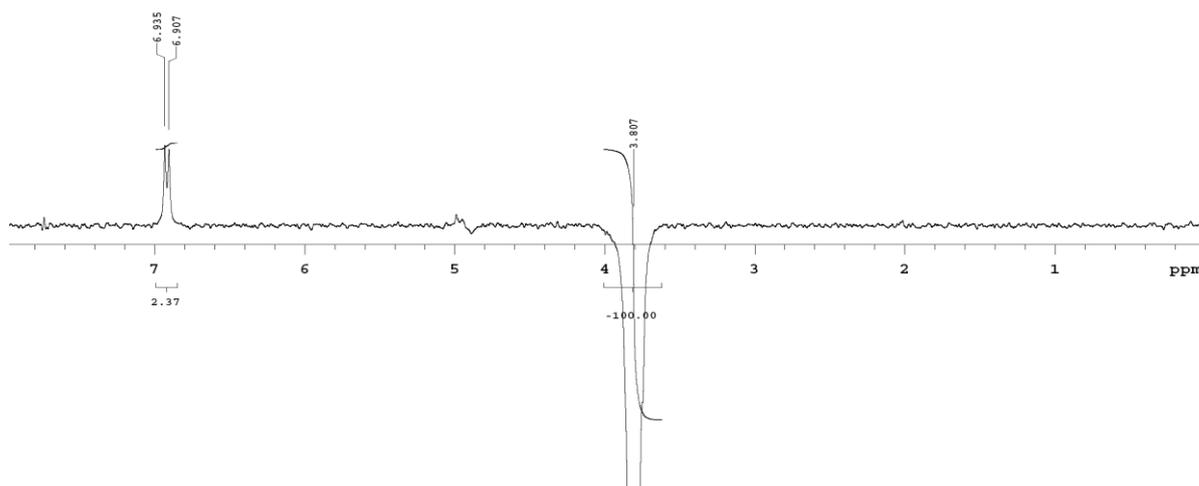


Figura 79: Espectro de COSY da substância **CEA-3** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

**Tabela 22:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da substância **CEA-3** comparados com os valores de  $\delta_{\text{H}}$  para o *N-trans-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina* (300 MHz;  $\text{Me}_2\text{CO-D}_6$ ) descritos na literatura (JENETT-SIEMS et al, 2003).

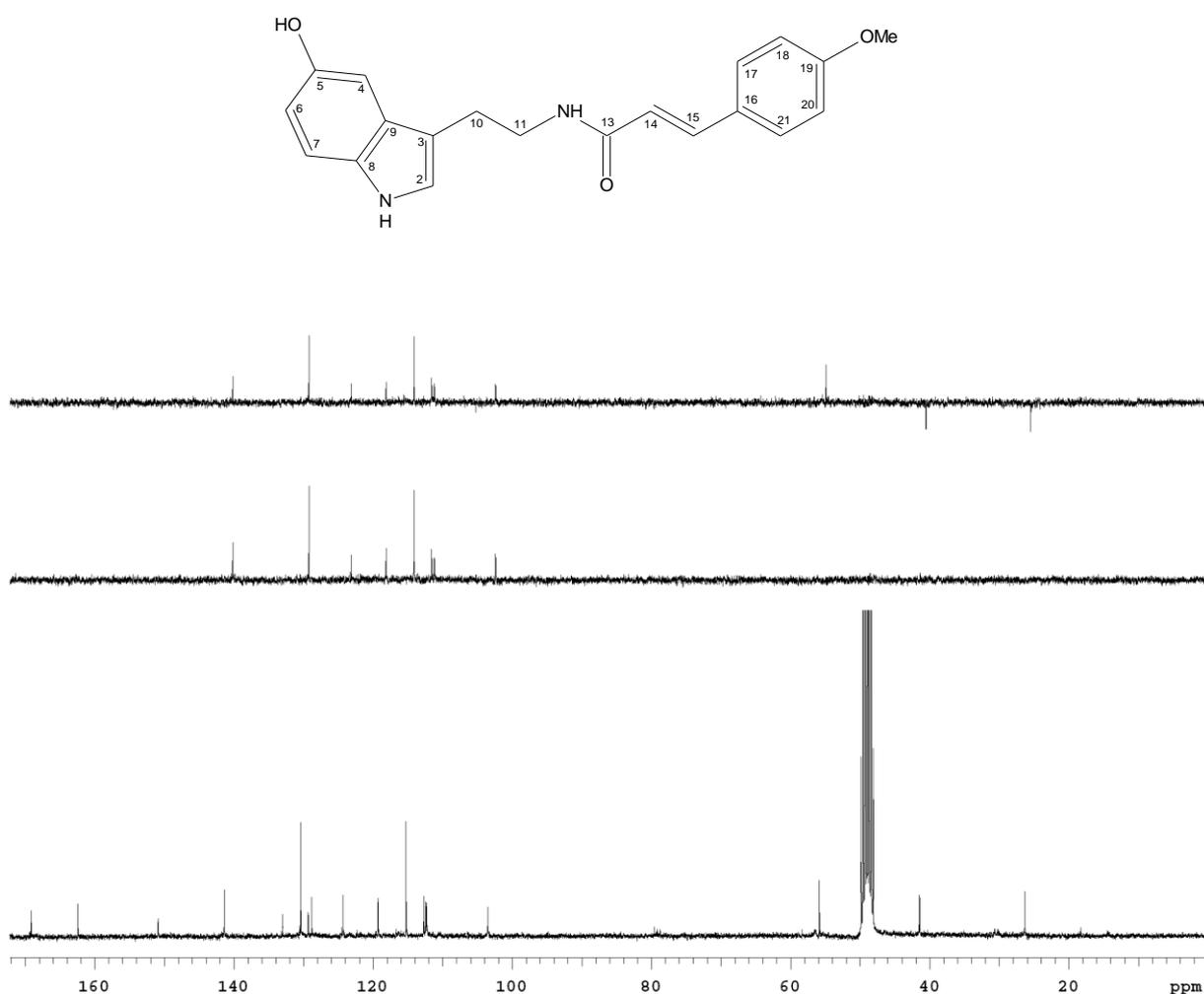
| H      | CEA-3<br>$\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY     | <i>N-trans-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina</i><br>$\delta_{\text{H}}$ |
|--------|---|----------|---|
| 2      | 7,02 (s)                                  |          | 7,10 (d, 2,0)   |
| 4      | 6,95 (d, 2,4)                             | H-6      | 7,02 (d, 2,5)   |
| 6      | 6,65 (dd, 8,7; 2,4)                       | H-4, H-7 | 6,70 (dd, 8,5; 2,5)   |
| 7      | 7,15 (d, 8,7)                             | H-6      | 7,20 (d, 8,5)   |
| 10     | 2,92 (t, 7,2)                             | H-11     | 2,91 (t, 7,5)   |
| 11     | 3,56 (t, 6,9)                             | H-10     | 3,58 (dt, 7,5; 6,0)   |
| 14     | 6,44 (d, 15,6)                            | H-15     | 6,54 (d, 15,5)  |
| 15     | 7,47 (d, 16,2)                            | H-14     | 7,51 (d, 15,5)  |
| 17     | 7,45 (d, 8,4)                             | H-18     | 7,50 (d, 9,0)   |
| 18     | 6,93 (d, 9,0)                             | H-17     | 6,95 (d, 9,0)   |
| 20     | 6,93 (d, 9,0)                             | H-21     | 6,95 (d, 9,0)   |
| 21     | 7,45 (d, 8,4)                             | H-20     | 7,50 (d, 9,0)   |
| MeO-18 | 3,81 (s)                                  |          | 3,83 (s)  |

A atribuição da metoxila em C-19 foi feita por meio de experimento de NOE (**Figura 80**), que mostrou o aumento de intensidade do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,94, atribuído ao H-18 e H-20, quimicamente equivalentes, pela irradiação do sinal da metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,81, indicando a proximidade destes hidrogênios.

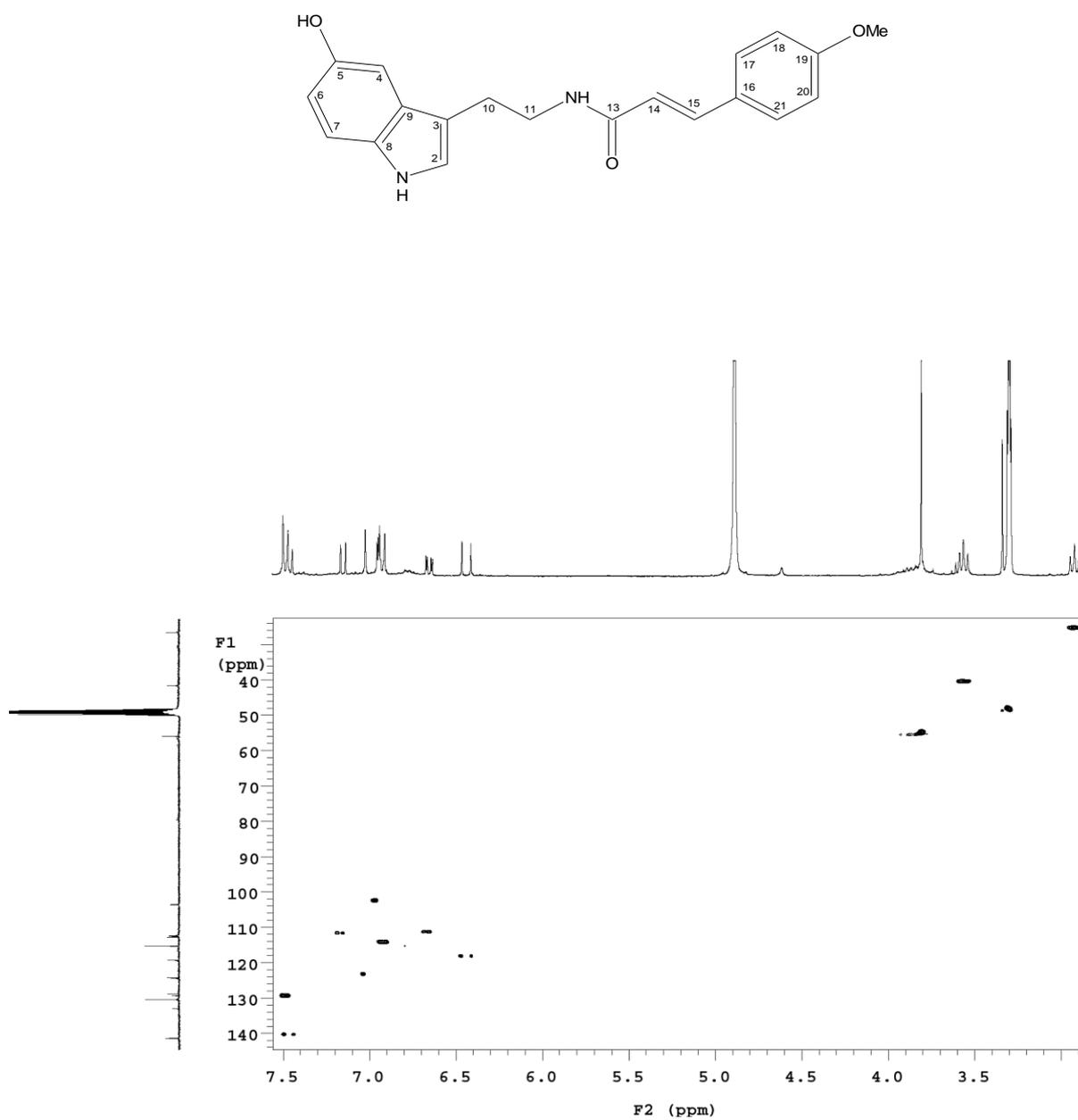


**Figura 80:** Espectro de NOE da substância **CEA-3** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , que foi analisado juntamente com os espectros de DEPT (**Figura 81, Tabela 23**) e HMQC (**Figura 82, Tabela 23**), mostra 20 sinais que foram atribuídos à estrutura com base nos dados do alcaloide **CEA-2**, previamente descrito. Todos os dados estão tabelados e são coerentes com a estrutura proposta para o **CEA-3**.



**Figura 81:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-3** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

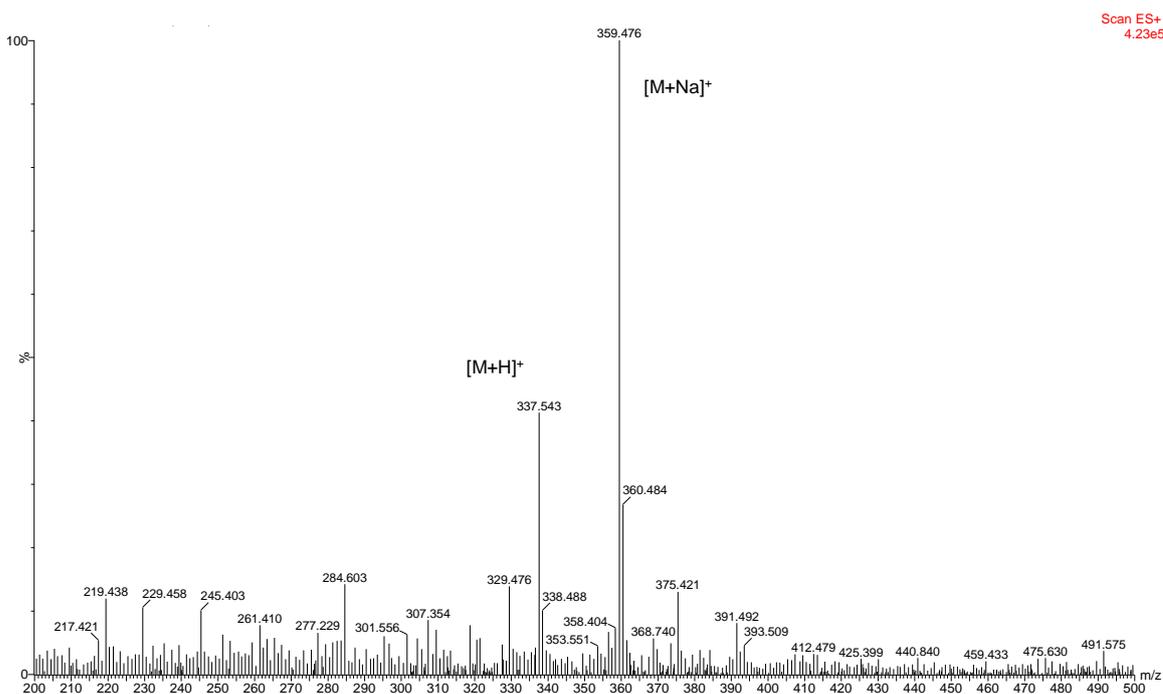


**Figura 82:** Espectro de HMQC da substância **CEA-3** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de massas (ESI-MS; **Figura 83**), no modo positivo, apresentou os sinais em  $m/z$  375,5 [M+H]<sup>+</sup> e 359,5 [M+Na]<sup>+</sup>, concordantes com a estrutura da *N*-*trans*-4-metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina proposta para para **CEA-3**.

**Tabela 23:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz), em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , de **CEA-3**.

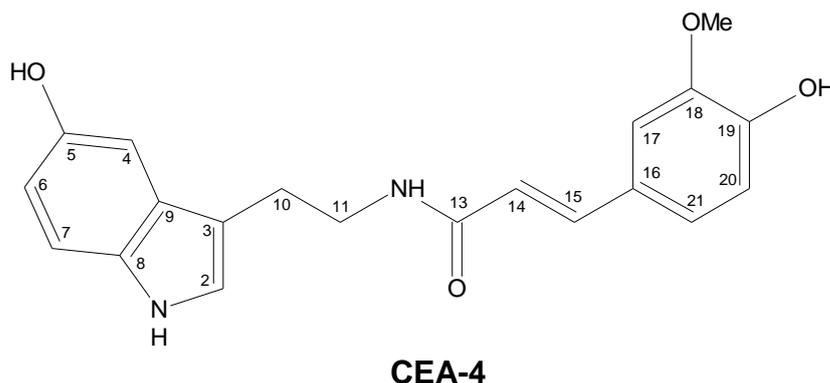
| C      | $\delta_c$ | DEPT          | HMQC |
|--------|------------|---------------|------|
| 2      | 123,2      | CH            | 7,02 |
| 3      | 111,3      | C             |      |
| 4      | 102,4      | CH            | 6,95 |
| 5      | 149,8      | C             |      |
| 6      | 111,2      | CH            | 6,65 |
| 7      | 111,6      | CH            | 7,15 |
| 8      | 131,9      | C             |      |
| 9      | 128,2      | C             |      |
| 10     | 25,2       | $\text{CH}_2$ | 2,92 |
| 11     | 40,3       | $\text{CH}_2$ | 3,56 |
| 13     | 168,0      | C             |      |
| 14     | 118,2      | CH            | 6,44 |
| 15     | 140,3      | CH            | 7,47 |
| 16     | 127,7      | C             |      |
| 17     | 129,3      | CH            | 7,45 |
| 18     | 114,1      | CH            | 6,93 |
| 19     | 161,3      | C             |      |
| 20     | 114,1      | CH            | 6,93 |
| 21     | 129,3      | CH            | 7,45 |
| MeO-18 | 54,7       | $\text{CH}_3$ | 3,81 |



**Figura 83:** Espectro ESI-MS da substância **CEA-3** no modo positivo.

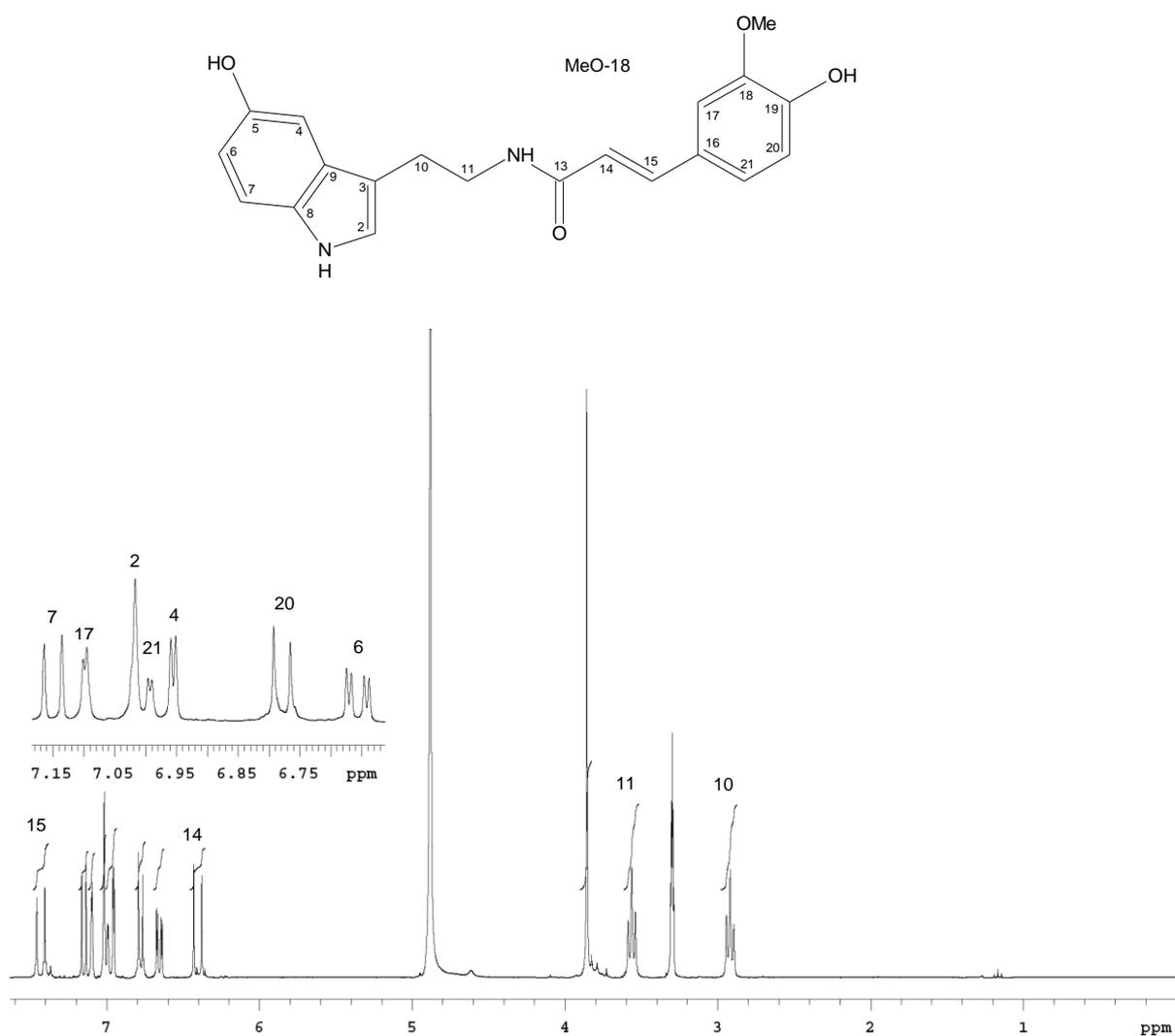
#### 5.4.4 Alcaloide CEA-4

O alcaloide **CEA-4** foi caracterizado pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 84 e 87**) e comparação com os dados reportados na literatura para a *N-trans*-feruloil-5-hidroxitriptamina (moschamina) por Zhang et al. (1997).



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 84**) do alcaloide **CEA-4** em comparação com o **CEA-2** mostrou que os sinais da unidade 5-hidroxitriptamina permaneceram inalterados, mantendo o mesmo perfil de substituição para o anel benzênico, confirmado pelo intermédio dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,96 (*d*, 2,4), 6,66 (*dd*, 8,4-2,4) e 7,15 (*d*, 8,4). Os sinais para a unidade etilenoamina foram  $\delta_{\text{H}}$  2,92 (*t*, 7,2) e 3,56 (*t*, 7,2).

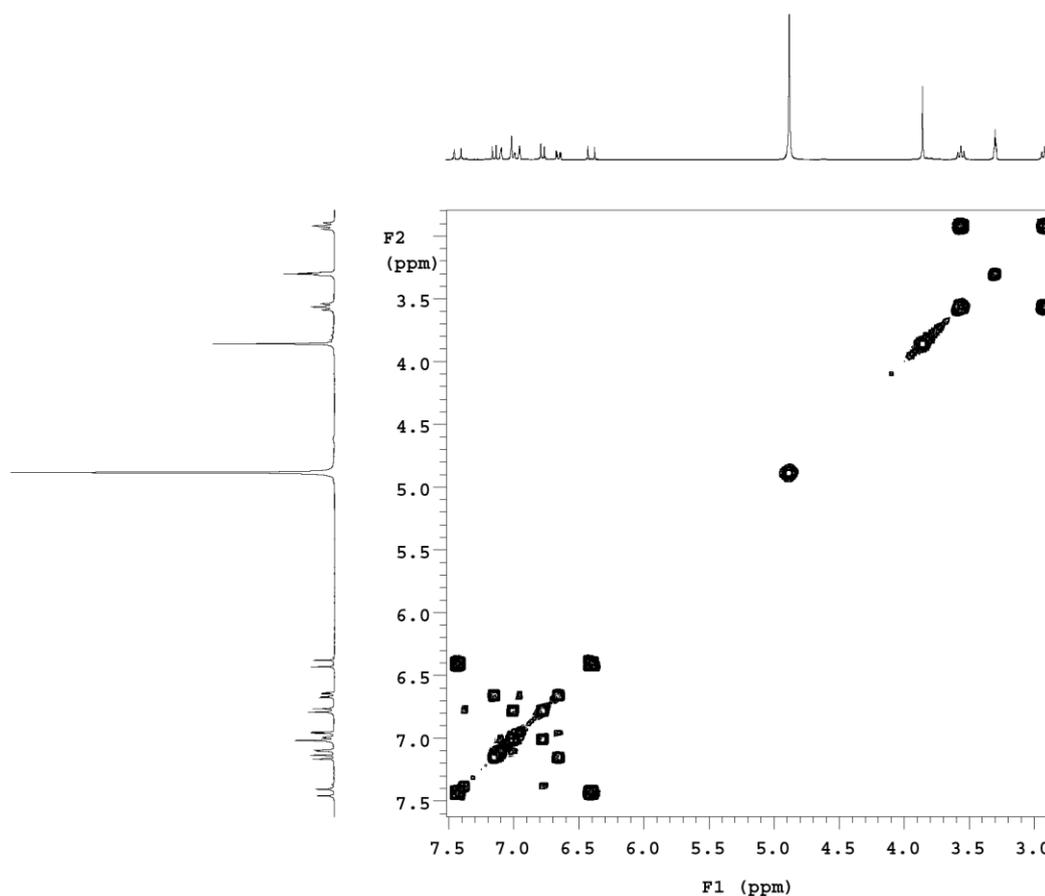
Os sinais para hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  7,10 (*d*, 1,8), 6,78 (*d*, 8,1) e 7,00 (*dd*, 8,1-1,8), pelo padrão de acoplamento, sugeriram a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Estes dados associados à presença do sinal do grupo metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (*s*) e do hidrogênio vinílico em  $\delta_{\text{H}}$  6,41 (*d*, 15,6) e 7,43 (*d*, 15,6) caracterizaram o sistema *N-trans*-feruloil.



**Figura 84:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da **CEA-4** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

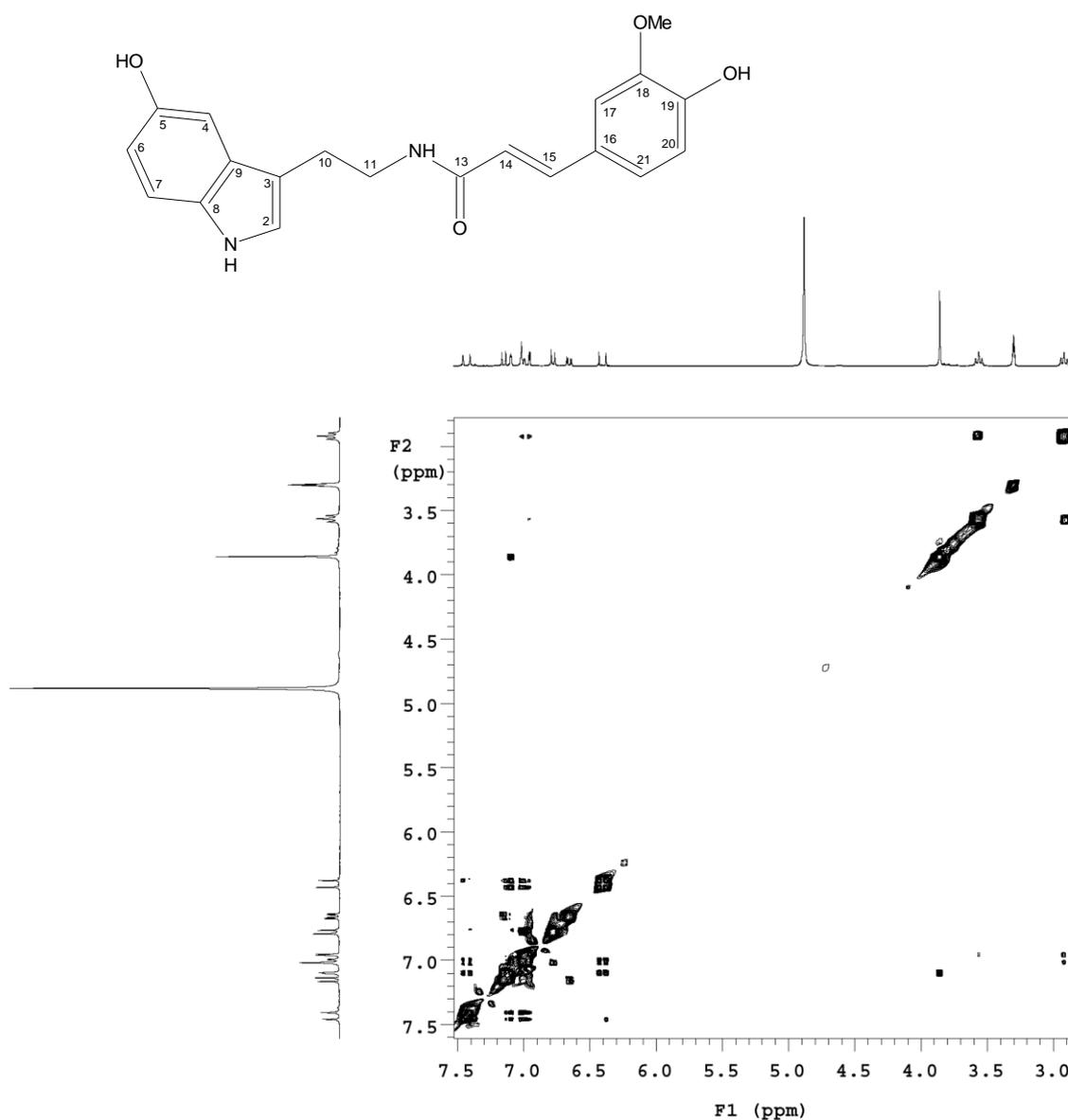
**Tabela 24:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D da substância **CEA-4**.

| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY       | NOESY              |
|--------|----------------------------------|------------|--------------------|
| 2      | 7,02 (s)                         |            |                    |
| 4      | 6,96 (d, 2,4)                    | H-6        | H-10, H-11         |
| 6      | 6,66 (dd, 8,4; 2,4)              | H-4, H-6   |                    |
| 7      | 7,15 (d, 8,4)                    | H-6        |                    |
| 10     | 2,92 (t, 7,2)                    | H-11       | H-4                |
| 11     | 3,56 (t, 7,2)                    | H-10       | H-4                |
| 14     | 6,41 (d, 15,6)                   | H-15       | H-17, H-21         |
| 15     | 7,43 (d, 15,6)                   | H-14       | H-17, H-21         |
| 17     | 7,10 (d, 1,8)                    | H-21       | H-14, H-15, MeO-18 |
| 20     | 6,78 (d, 8,1)                    | H-21       |                    |
| 21     | 7,00 (dd, 8,1; 1,8)              | H-17, H-20 | H-14, H-15         |
| MeO-18 | 3,86 (s)                         |            | H-17               |



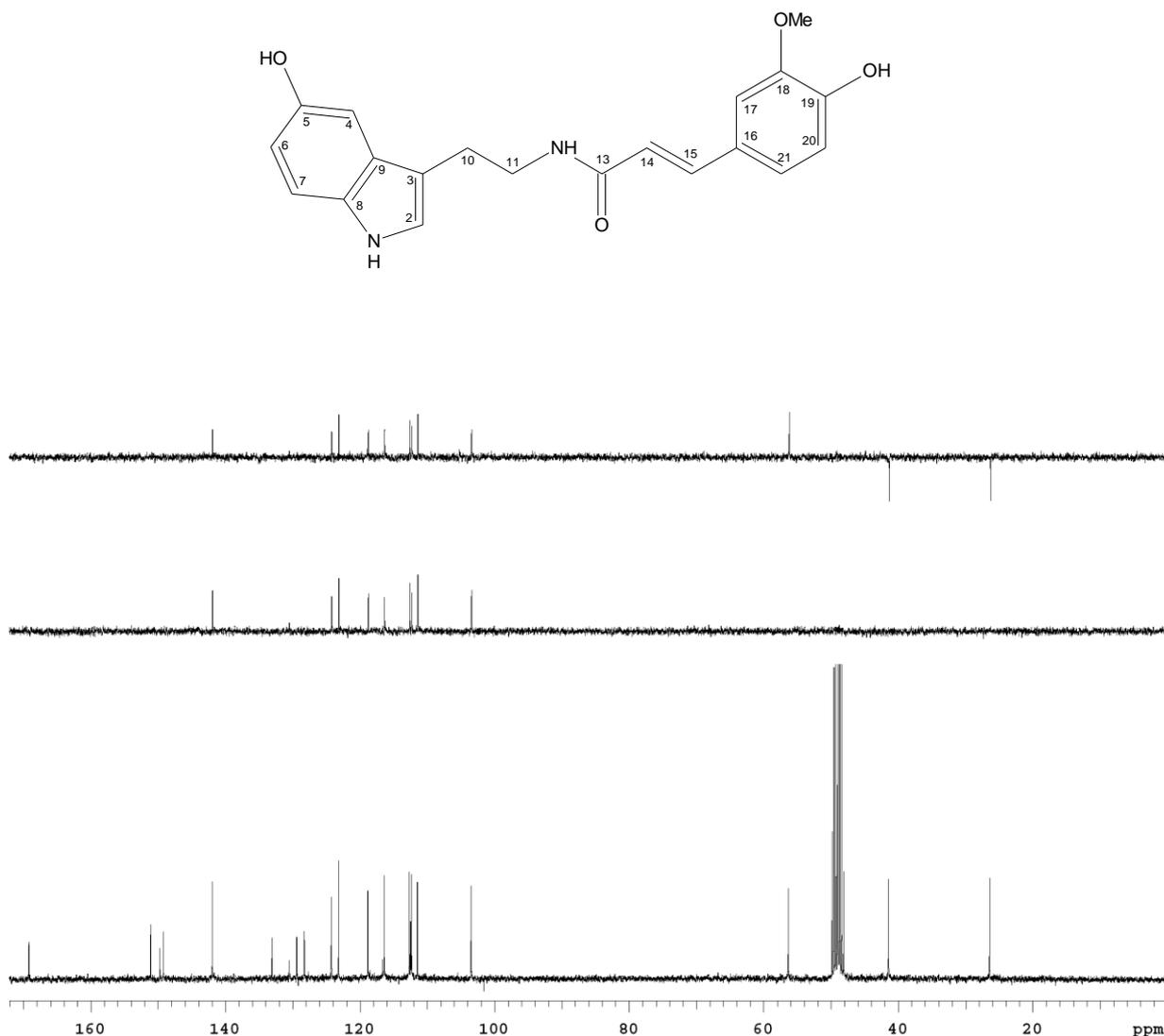
**Figura 85:** Espectro de COSY da substância **CEA-4** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

A ligação da metoxila no anel aromático em C-18 foi estabelecida pela correlação observada no espectro de NOESY 2D (**Figura 86**) do sinal em  $\delta_H$  3,86 com 7,10, atribuído ao H-17, indicando a proximidade entre eles.



**Figura 86:** Espectro de NOESY 2D da substância **CEA-4** (300 MHz;  $CD_3OD$ ).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 87**), analisado conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 87**) e HMQC (**Figura 88**), mostra 20 sinais que foram atribuídos à estrutura com base nos dados da substância **CEA-2** e comparados com os dados da literatura para a moschamina (ZHANG et al, 1997).

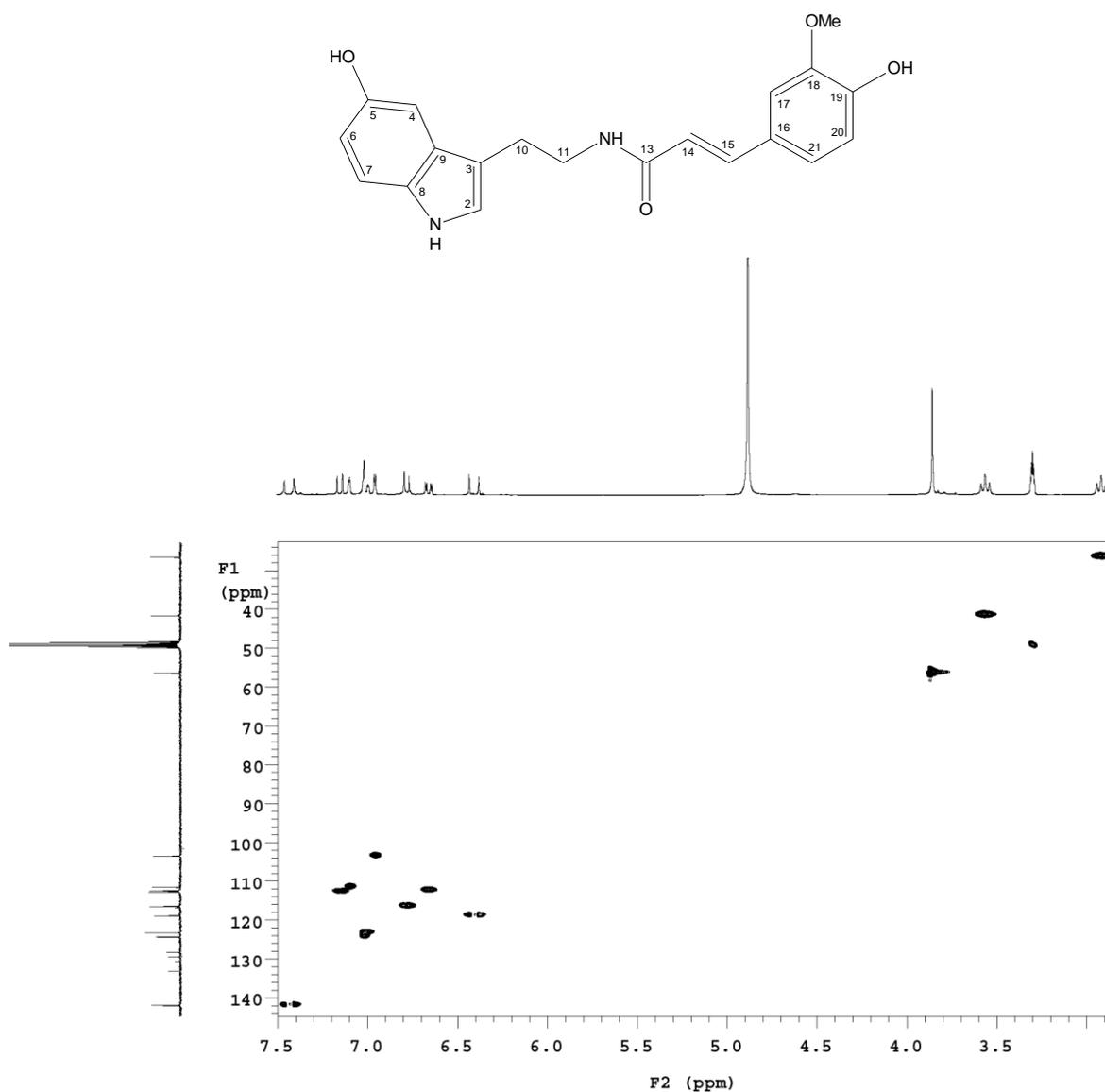


**Figura 87:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-4** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

O sistema 5-hidroxitriptamina foi evidenciado pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  123,2, 111,3, 102,4, 149,8, 111,2, 111,6, 131,9, 128,2, 25,2, 40,3, atribuídos de C-2 a C-11 e a unidade *N-trans*-feruloil por intermédio dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  168,0, 118,2, 140,3, 127,7, 129,3, 114,1, 161,3, 114,1, 129,3, atribuídos de C-12 a C-21. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  54,7, comprova a presença do grupo metoxila.

**Tabela 25:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e HMQC (75,5 MHz; em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), da substância **CEA-4**, comparados com os valores de  $\delta_c$  para a moschamina (125 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), descritos na literatura (ZHANG et al, 1997).

| C      | CEA-4      |               |      | moschamina |
|--------|------------|---------------|------|------------|
|        | $\delta_c$ | DEPT          | HMQC | $\delta_c$ |
| 2      | 124,3      | CH            | 7,02 | 124,0      |
| 3      | 112,5      | C             |      | 112,6      |
| 4      | 103,5      | CH            | 6,96 | 103,5      |
| 5      | 151,1      | C             |      | 151,6      |
| 6      | 112,4      | CH            | 6,66 | 112,3      |
| 7      | 112,7      | CH            | 7,15 | 112,5      |
| 8      | 133,1      | C             |      | 132,5      |
| 9      | 129,4      | C             |      | 129,4      |
| 10     | 26,5       | $\text{CH}_2$ | 2,92 | 26,4       |
| 11     | 41,5       | $\text{CH}_2$ | 3,56 | 40,8       |
| 13     | 169,21     | C             |      | 166,5      |
| 14     | 118,9      | CH            | 6,41 | 120,2      |
| 15     | 142,0      | CH            | 7,43 | 140,3      |
| 16     | 128,3      | C             |      | 128,3      |
| 17     | 111,5      | CH            | 7,10 | 111,3      |
| 18     | 149,3      | C             |      | 148,6      |
| 19     | 149,8      | C             |      | 149,1      |
| 20     | 116,4      | CH            | 6,78 | 116,1      |
| 21     | 123,1      | CH            | 7,00 | 122,6      |
| MeO-18 | 56,41      | $\text{CH}_3$ | 3,86 | 56,2       |



**Figura 88:** Espectro de HMQC da substância **CEA-4** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Os dados do espectro de massas (ESI-MS, modo positivo), que apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  375,1310 [M+Na]<sup>+</sup> (**Figura 89**), associados ao de RMN e dados da literatura (ZHANG et al., 1997) permitiram propor a estrutura da moschamina para a substância **CEA-4**.

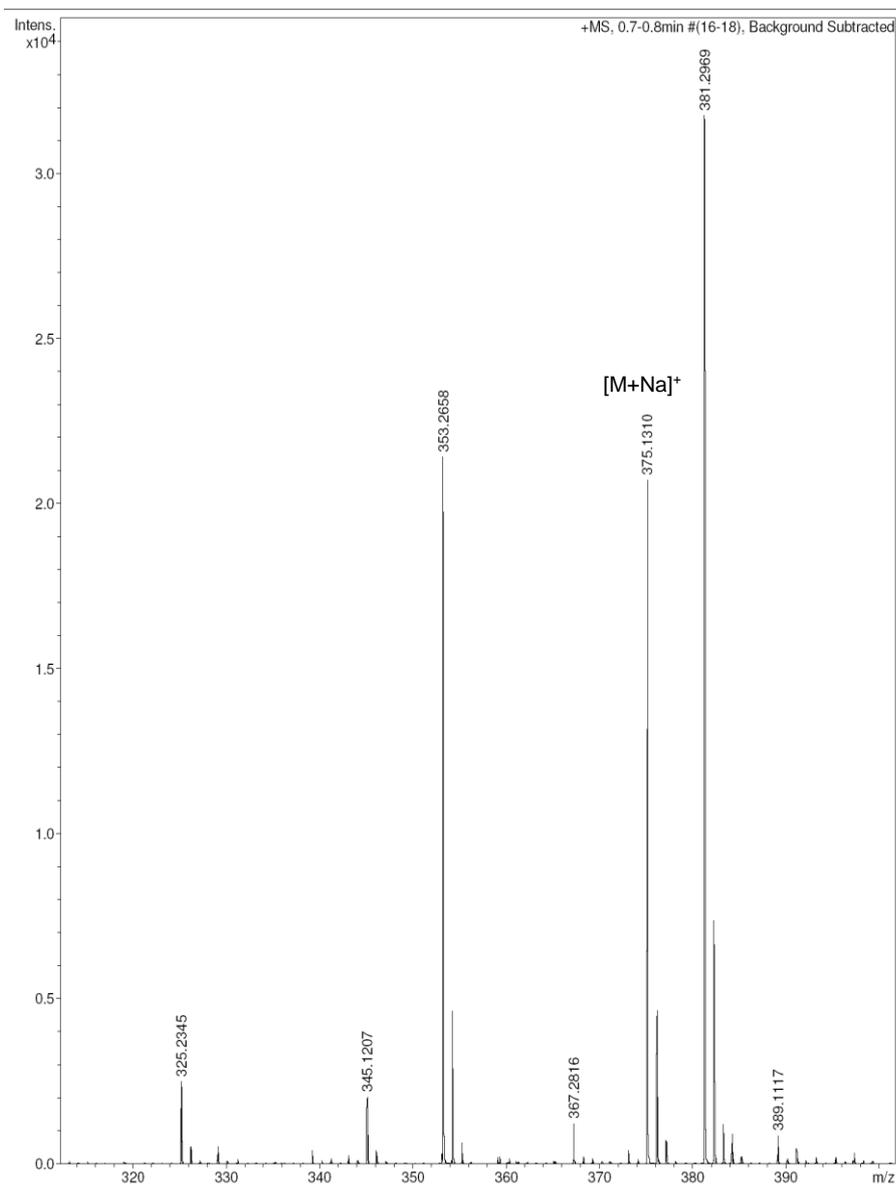
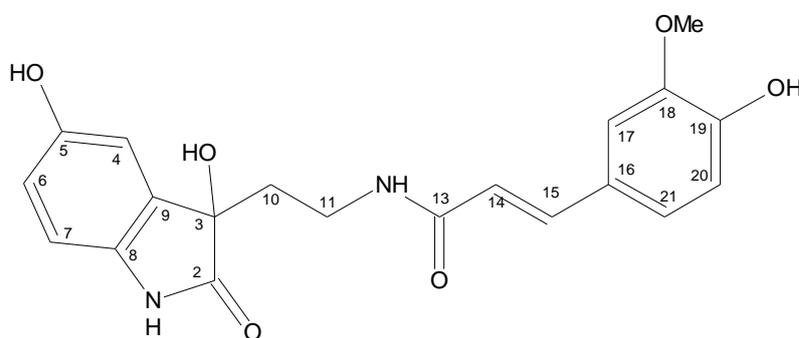


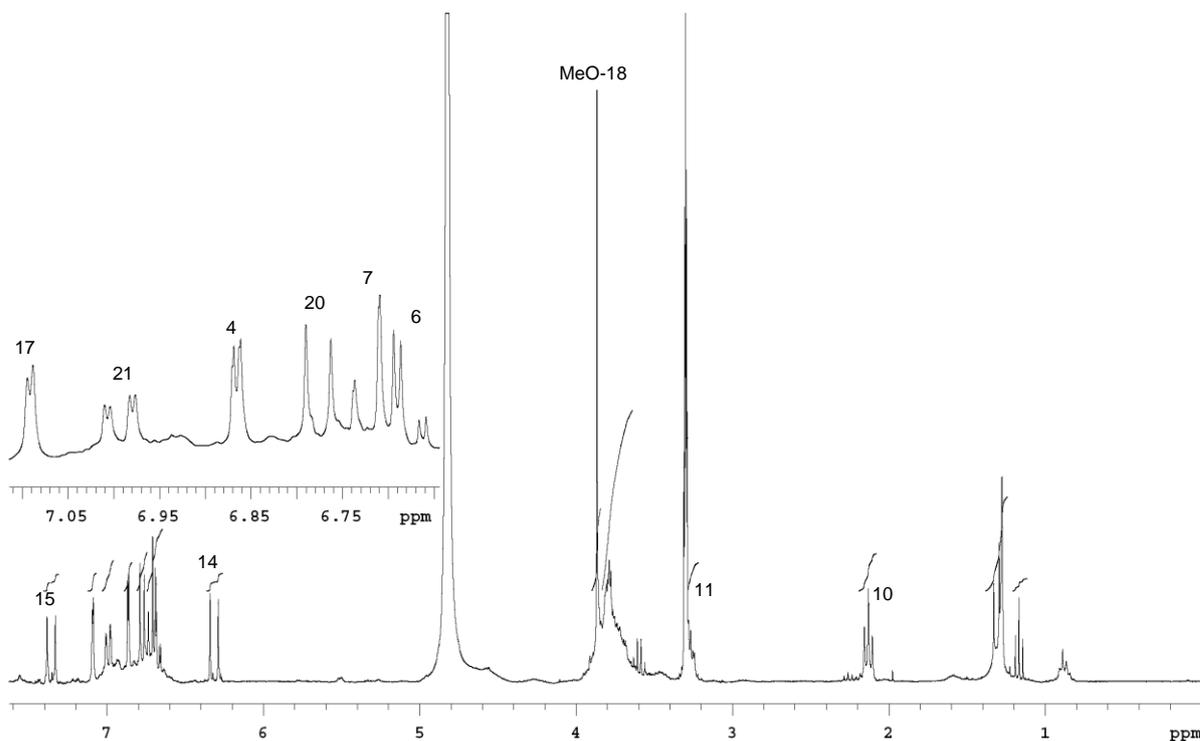
Figura 89: Espectro de ESI-MS da substância **CEA-4**, modo positivo.

### 5.4.5 Alcaloide CEA-5

Para o alcaloide **CEA-5** a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 90**, **Tabela 26**) evidenciou a presença de um grupo feruloil por meio dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,09 (*d*, 1,8), 6,78 (*d*, 8,4) e 6,99 (*dd*, 8,4-1,8), atribuídos ao anel aromático, e em  $\delta_{\text{H}}$  6,32 (*d*, 15,6) e 7,36 (*d*, 15,6), atribuídos ao sistema *trans*-olefínico. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,13 e 3,16, na forma de dois tripletos, sugeriram a presença da unidade etilenoamina. Os sinais de hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,87, 6,68 e 6,72, foram atribuídos ao anel aromático da unidade indolinona.



**CEA-5**



**Figura 90:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-5** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

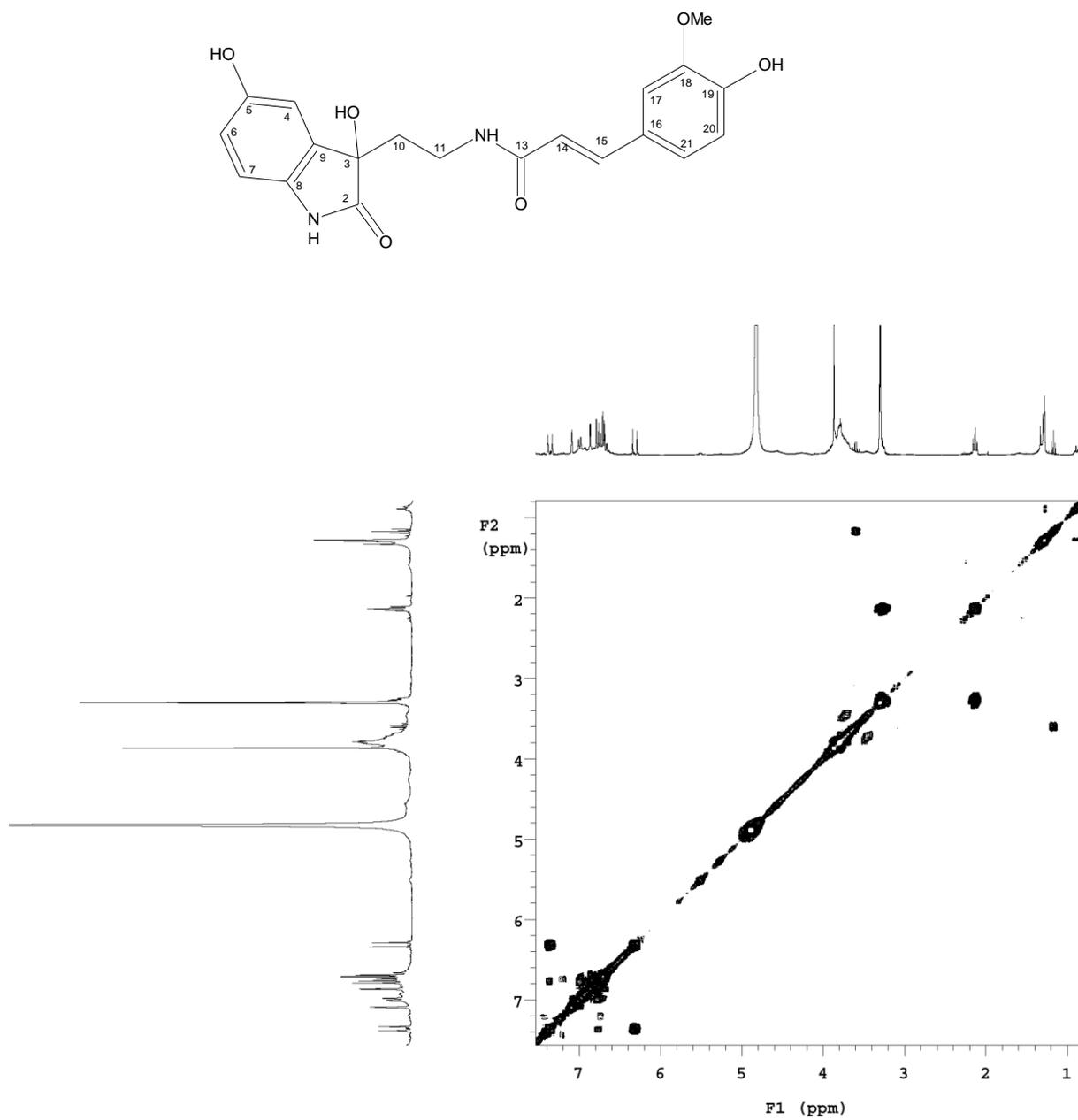
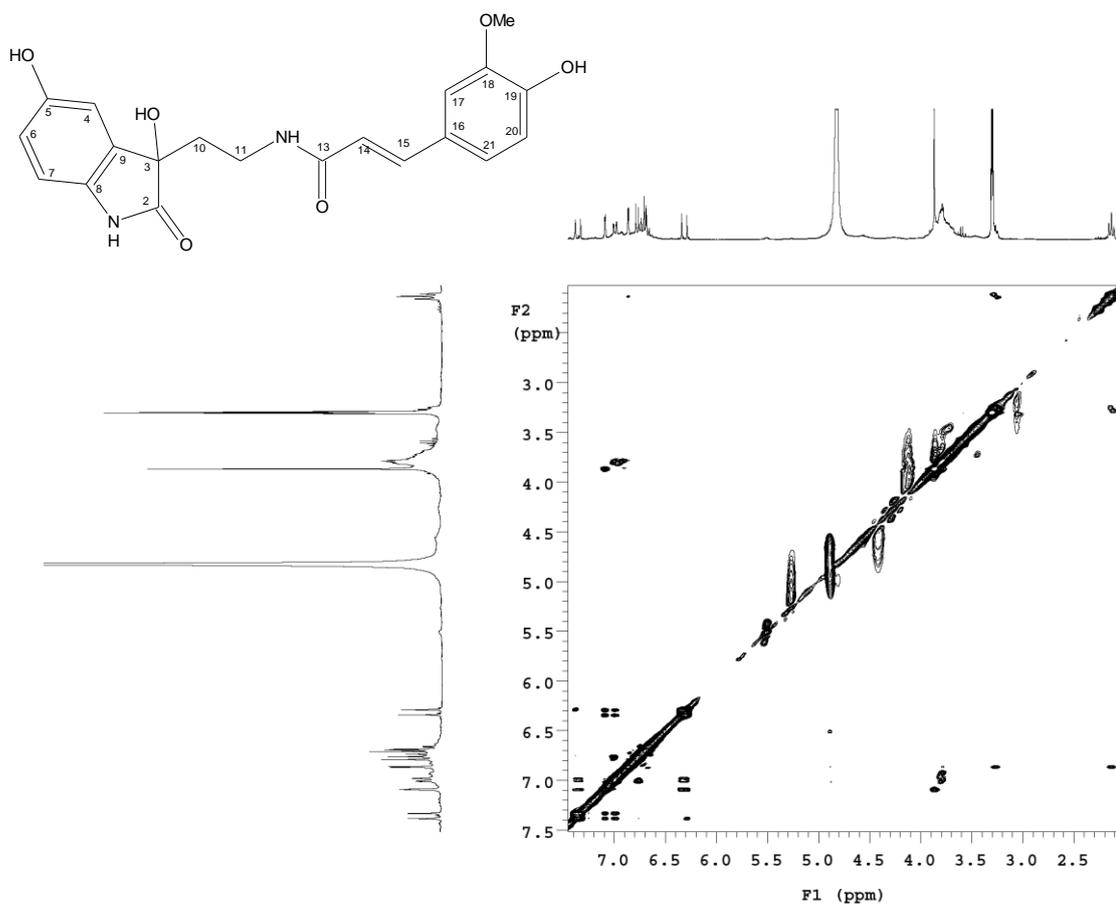


Figura 91: Espectro de COSY da substância CEA-5 (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

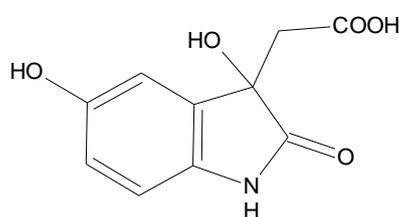
**Tabela 26:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da substância **CEA-5**.

| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY       |
|--------|----------------------------------|------------|
| 4      | 6,87 (d, 2,1)                    | H-6, H-7   |
| 6      | 6,68 (dd, 8,4, 2,1)              | H-4, H-7   |
| 7      | 6,72 (d, 8,4)                    | H-4, H-6   |
| 10     | 2,13 (t, 7,8)                    | H-11       |
| 11     | 3,26 (m)                         | H-10       |
| 14     | 6,32 (d, 15,6)                   | H-15       |
| 15     | 7,36 (d, 15,6)                   | H-14       |
| 17     | 7,09 (d, 1,8)                    | H-21       |
| 20     | 6,78 (d, 8,4)                    | H-21       |
| 21     | 6,99 (dd, 8,4, 1,8)              | H-17, H-20 |
| OMe-18 | 3,87 (s)                         |            |

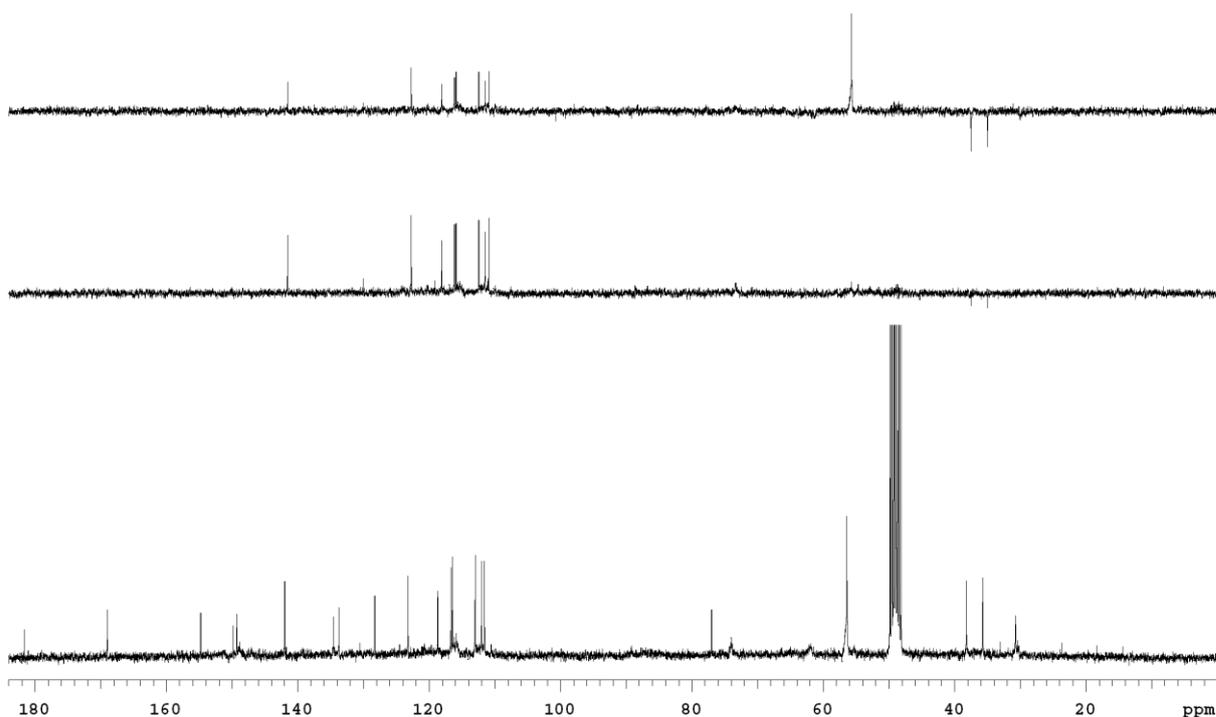


**Figura 92:** Espectro de NOESY 2D da substância **CEA-5** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

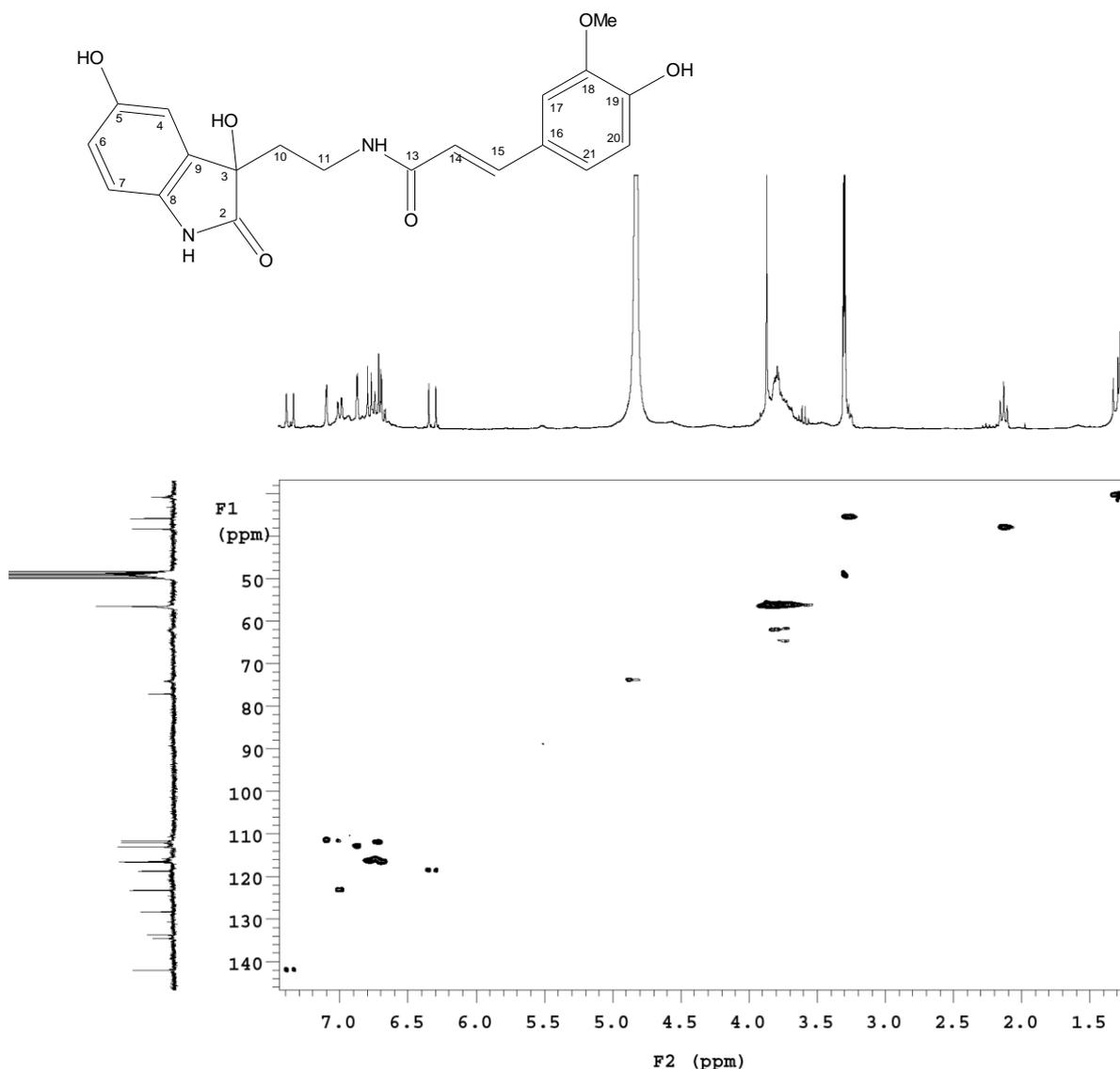
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 93, Tabela 27**), observou-se a presença de uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  181,7 e de um carbono quaternário em  $\delta_{\text{C}}$  77,0, região de carbono alifático oxigenado. Estes sinais foram atribuídos ao C-2 e C-3, respectivamente, sugerindo-se um esqueleto oxindólico semelhante ao proposto por Suzuki et al. (1977) ao 5-hidro-dioxindol-3-ácido acético isolado de *Oryza sativa* L. (arroz). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  134,6, 113,0, 154,8, 116,7, 112, e 133,7 foram atribuídos aos carbonos de C-4 até C-9 da unidade indolinona. A unidade feruloil foi caracterizada pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  118,7 e 142,0, atribuídos a *trans*-olefina, e em 128,3, 111,6, 149,3, 149,8, 116,5 e 123,2, atribuídos ao anel aromático.



**5-hidro-dioxindol-3-ácido acético**



**Figura 93:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-5** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Figura 94:** Espectro de HMQC da substância **CEA-5** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de HMBC do alcaloide **CEA-5** (**Figura 95**) apresentou todas as correlações esperadas, possibilitando a atribuição inequívoca de todos os sinais de carbono e comprovando desta forma a estrutura proposta. Para o grupo feruloil as correlações foram concordantes com o observado no espectro de COSY. As atribuições referentes ao anel aromático do esqueleto indolinona foram comprovadas pelas correlações dos hidrogênios H-4 e H-6 com o carbono quaternário C-5, H-7 com o C-8 e H-4 com C-9. As correlações do H-10 com a carbonila C-2 e carbinol C-3 confirmam as atribuições destes carbonos quaternários. As correlações mais importantes para o alcaloide **CEA-5** podem ser visualizadas na **Figura 96** bem como na **Tabela 27**.

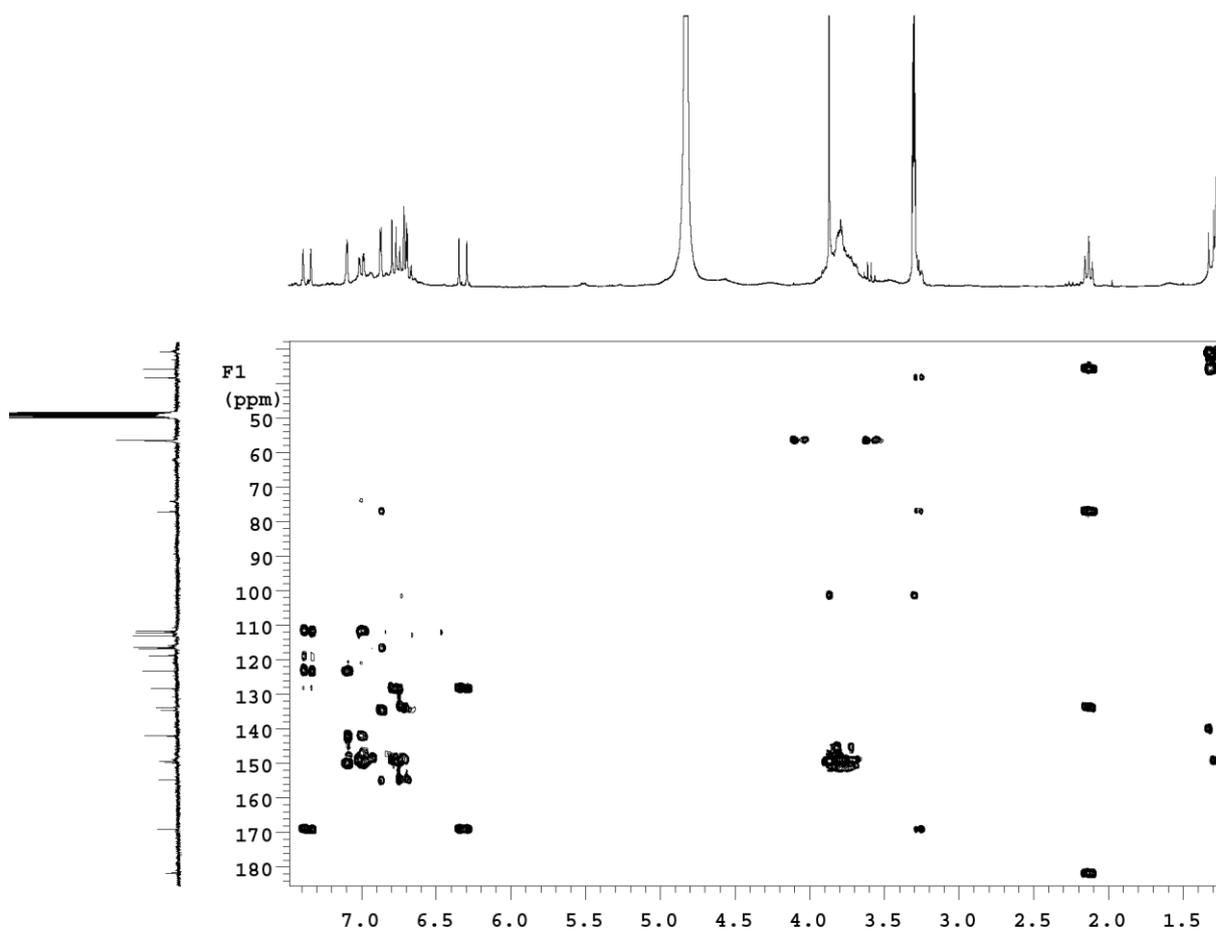


Figura 95: Espectro de HMBC da substância **CEA-5** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

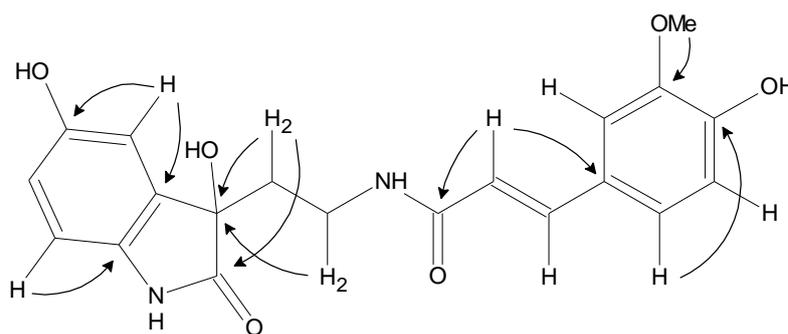
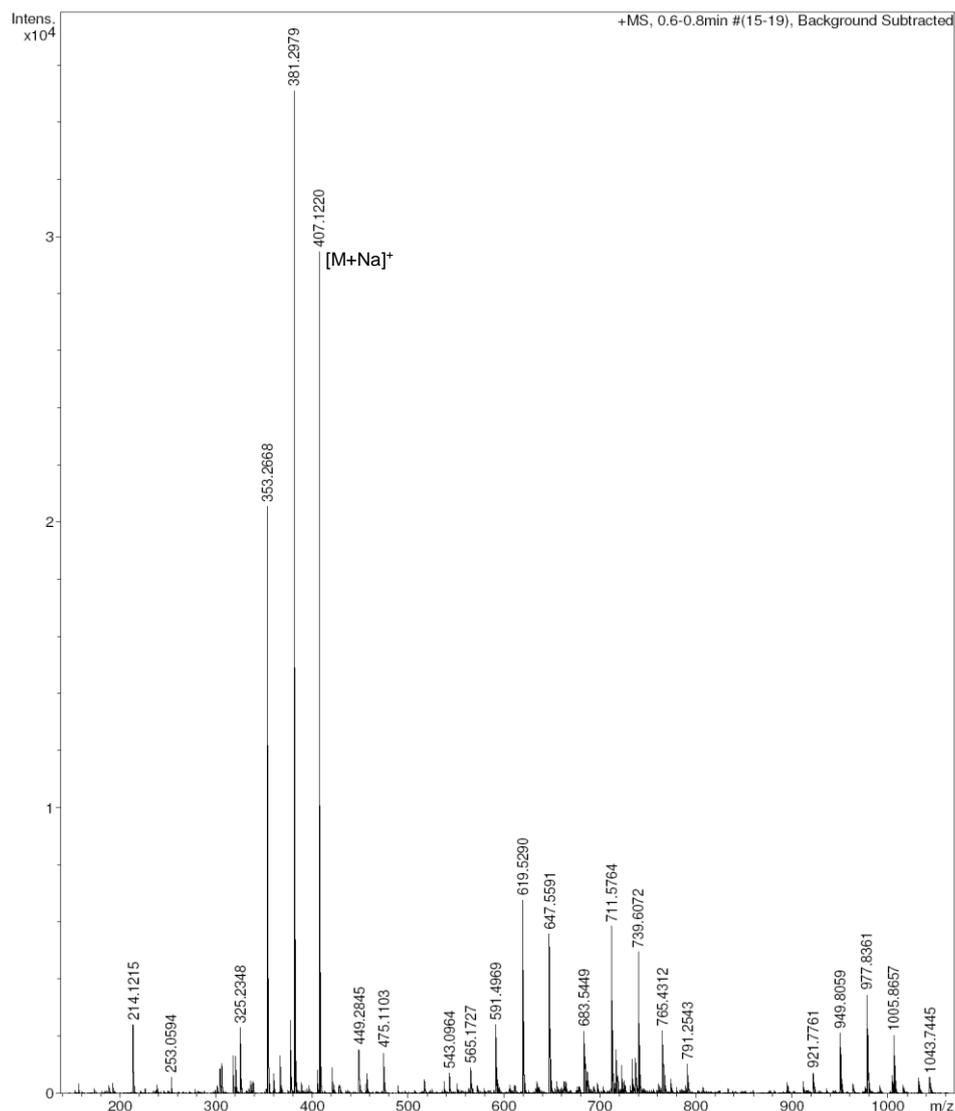


Figura 96: Correlações importantes no HMBC da **CEA-5**.

**Tabela 27:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC e HMBC (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **CEA-5**.

| C      | $\delta_c$ | DEPT          | HMQC | HMBC              |                   |
|--------|------------|---------------|------|-------------------|-------------------|
|        |            |               |      | $^2J_{\text{CH}}$ | $^3J_{\text{CH}}$ |
| 2      | 181,7      | C             |      |                   | H-10              |
| 3      | 77,0       | C             |      | H-10              | H-4, H-11         |
| 4      | 113,0      | CH            | 6,87 |                   |                   |
| 5      | 154,8      | C             |      | H-4, H-6          | H-7               |
| 6      | 116,7      | CH            | 6,68 |                   | H-4               |
| 7      | 112,0      | CH            | 6,72 |                   |                   |
| 8      | 133,7      | C             |      | H-7               |                   |
| 9      | 134,6      | C             |      |                   | H-10              |
| 10     | 38,2       | $\text{CH}_2$ | 2,13 | H-11              |                   |
| 11     | 35,7       | $\text{CH}_2$ | 3,26 | H-10              |                   |
| 13     | 169,2      | C             |      | H-14              | H-11, H-15        |
| 14     | 118,7      | CH            | 6,32 | H-15              |                   |
| 15     | 142,0      | CH            | 7,36 |                   | H-17, H-21        |
| 16     | 128,3      | C             |      | H-15              | H-14, H-20        |
| 17     | 111,6      | CH            | 7,09 |                   | H-15, H-21        |
| 18     | 149,3      | C             |      |                   | MeO-18            |
| 19     | 149,8      | C             |      | H-20              | H-17, H-21        |
| 20     | 116,5      | CH            | 6,78 |                   |                   |
| 21     | 123,2      | CH            | 6,99 |                   | H-15, H-17        |
| MeO-18 | 56,4       | $\text{CH}_3$ | 3,87 |                   |                   |

Estas deduções, somadas aos dados dos espectros de ESI-MS, modo positivo, em alta resolução que mostrou o pico em  $m/z$  407,1220 (**Figura 97**) referente ao íon  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , permitiram propor a estrutura da *N-trans*-feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona para o alcaloide **CEA-5**.

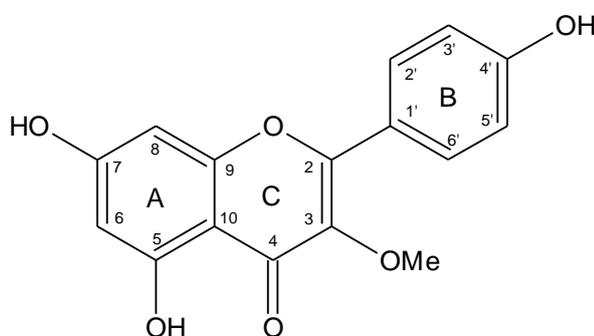


**Figura 97:** Espectro ESI-MS da substância **CEA-5**, modo positivo.

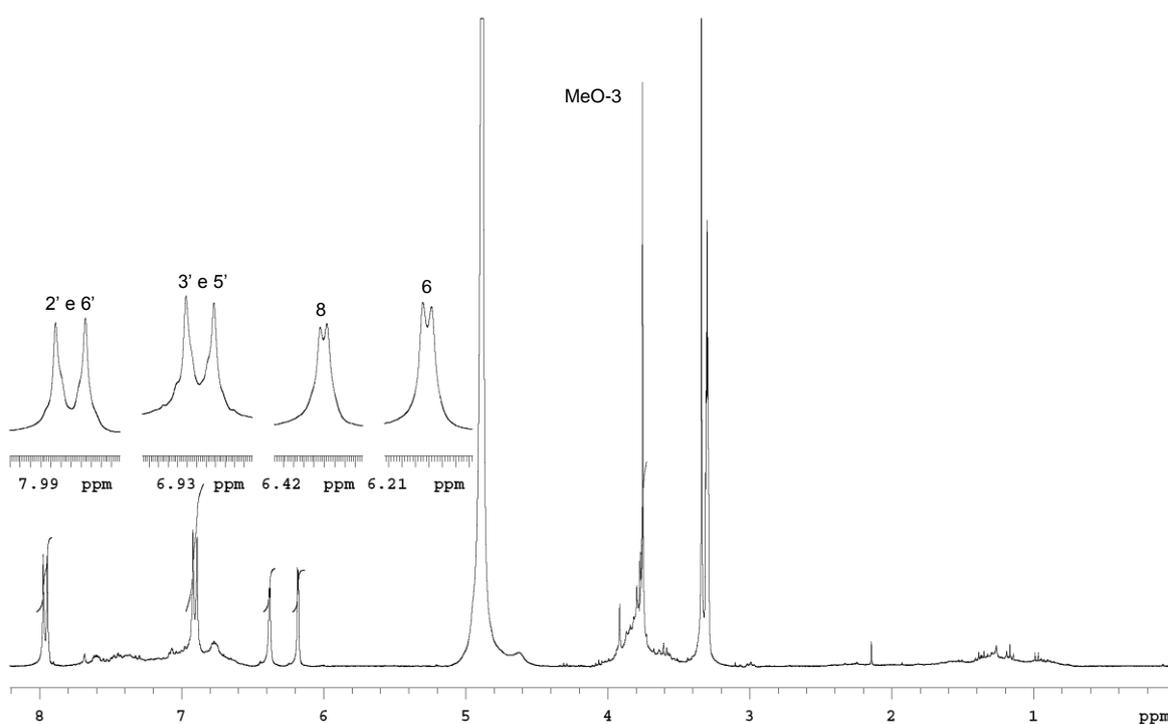
Apesar de serem encontrados facilmente compostos oxindólicos isolados de produto natural (RAJ et al., 2010), a ocorrência de alcaloides do tipo 3,5-dihidroindol-2-ona ou mesmo 3-hidroindol-2-ona é rara. Após busca na literatura não foram encontradas referências para a estrutura proposta, indicando se tratar de uma substância inédita.

### 5.4.6 Flavonoide CEA-6

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 98**, **Tabela 28**) da substância **CEA-6** sugeriu a presença de um flavonoide contendo o esqueleto do canferol pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (*d*, 8,7) e 7,96 (*d*, 8,7), atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' no anel B, hidroxilado na posição C-4'; sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,18 (*d*, 1,8) e 6,38 (*d*, 1,8) atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6 do anel A, hidroxilado nas posições C-5 e C-7. As correlações entre H-2'/H-6' e H-3'/H-5' e H-8 e H-6 foram evidenciadas pelo espectro de COSY (**Figura 99**). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 indicou a presença de uma metoxila, ligada em C-3.



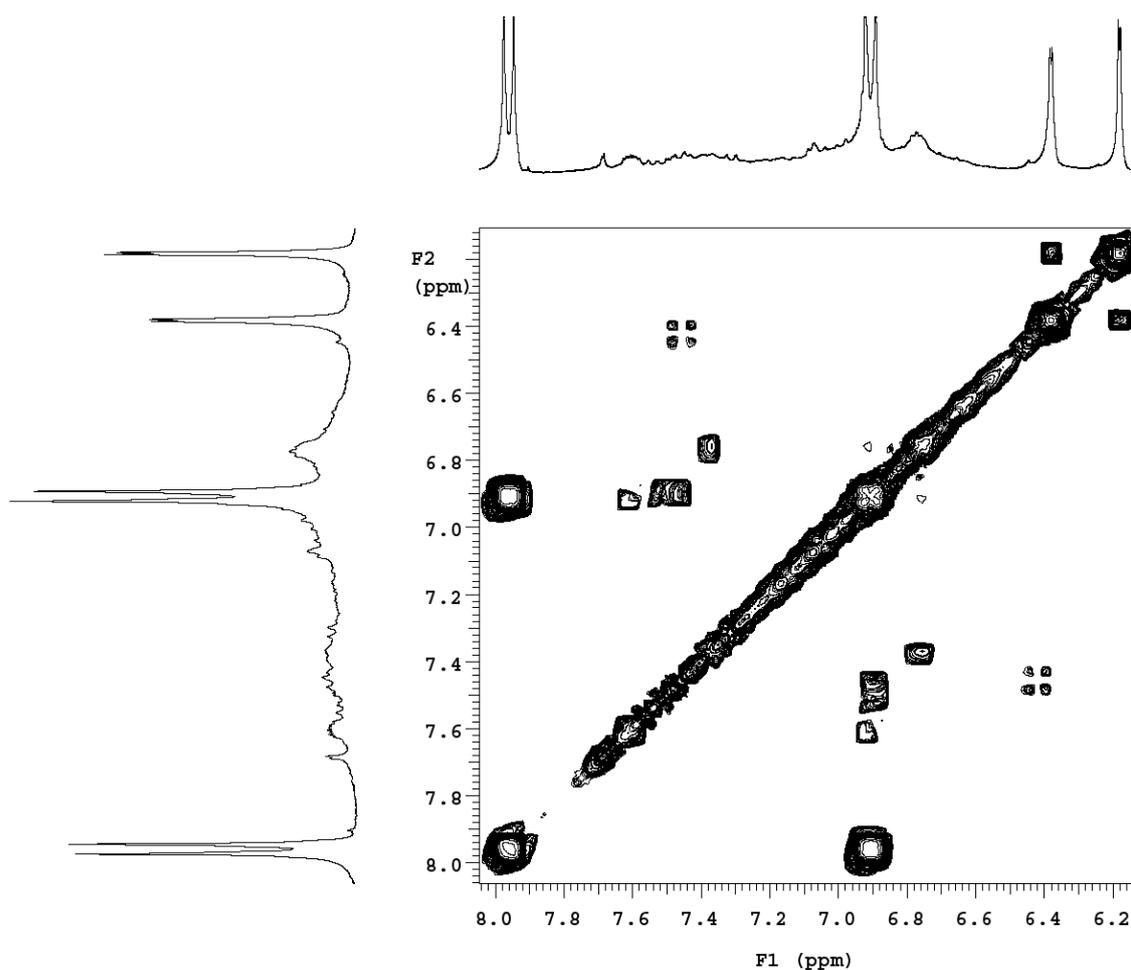
**CEA-6**



**Figura 98:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-6** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

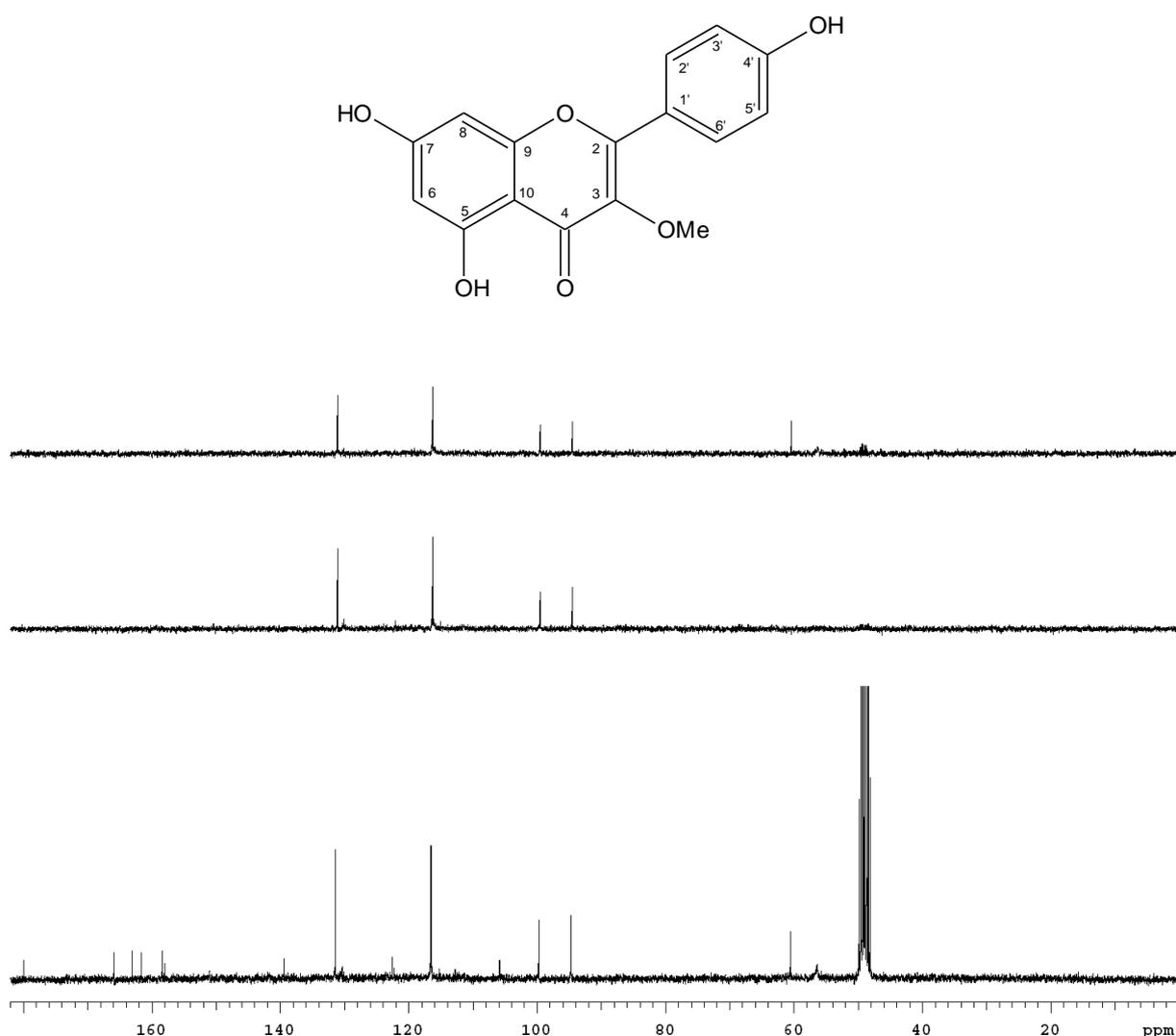
**Tabela 28:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz; em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY da **CEA-6**, comparados com os dados da literatura (LEE et al., 2003). para o 3-O-metilcanferol (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

| CEA-6 |                                  |      | 3-O-metilcanferol                |
|-------|----------------------------------|------|----------------------------------|
| H     | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) |
| 6     | 6,18 (d,1,8)                     | H-8  | 6,10 (d,1,8)                     |
| 8     | 6,38 (d,1,8)                     | H-6  | 6,30 (d,1,8)                     |
| 2'    | 7,96 (d, 8,7)                    | H-3' | 7,88 (d, 8,9)                    |
| 3'    | 6,90 (d, 8,7)                    | H-2' | 6,82 (d, 8,8)                    |
| 5'    | 6,90 (d, 8,7)                    | H-6' | 6,82 (d, 8,8)                    |
| 6'    | 7,96 (d, 8,7)                    | H-5' | 7,88 (d, 8,9)                    |
| MeO-3 | 3,75 (s)                         |      | 3,68 (s)                         |



**Figura 99:** Espectro de COSY da substância **CEA-6** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em conjunto com os espectros de DEPT (Figura 100, Tabela 29) e HMQC (Figura 102, Tabela 30) mostrou a presença de 14 sinais, sendo 6 CH em  $\delta_{\text{C}}$  94,8, 99,8, 116,6 e 134,4; 9 carbonos não ligados a hidrogênio em  $\delta_{\text{C}}$  105,9, 122,6, 139,5, 158,1, 158,4, 161,7, 163,1, 165,9 e 180,0 e um carbono de grupo metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  60,5. O posicionamento da metoxila em C-3 foi baseada nos valores de deslocamentos químicos para a carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  180,0 (C-4), e para o carbono C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  139,5, que são característicos de esqueleto flavonoidico com grupo metoxila nesta posição (AGRAWAL, 1989).



**Figura 100:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-6** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

**Tabela 29:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **CEA-6** comparados com os dados da literatura (LEE et al., 2003) para o 3-O-metilcanferol (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

| C     | $\delta_c$ | CEA-6         |      | 3-O-metilcanferol |
|-------|------------|---------------|------|-------------------|
|       |            | DEPT          | HMQC | $\delta_c$        |
| 2     | 158,1      | C             |      | 158,5             |
| 3     | 139,5      | C             |      | 139,9             |
| 4     | 180,0      | C             |      | 180,4             |
| 5     | 163,1      | C             |      | 163,5             |
| 6     | 99,8       | CH            | 6,18 | 100,2             |
| 7     | 165,9      | C             |      | 166,5             |
| 8     | 94,8       | CH            | 6,38 | 95,2              |
| 9     | 158,4      | C             |      | 158,9             |
| 10    | 105,9      | C             |      | 106,3             |
| 1'    | 122,6      | C             |      | 123,0             |
| 2'    | 131,4      | CH            | 7,96 | 131,8             |
| 3'    | 116,6      | CH            | 6,90 | 117,0             |
| 4'    | 161,7      | C             |      | 162,1             |
| 5'    | 116,6      | CH            | 6,90 | 117,0             |
| 6'    | 131,4      | CH            | 7,96 | 131,8             |
| MeO-3 | 60,5       | $\text{CH}_3$ | 3,75 | 60,9              |

A comparação dos dados de RMN com os da literatura (LEE et al., 2003), em conjunto com as informações do espectro de massas (ESI-MS) no modo positivo (**Figura 101**) que apresentou os picos em  $m/z$  301,1405  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e 323,0525  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , nos levaram a definir a estrutura de **CEA-6** como sendo a do flavonoide do 3-O-metilcanferol.

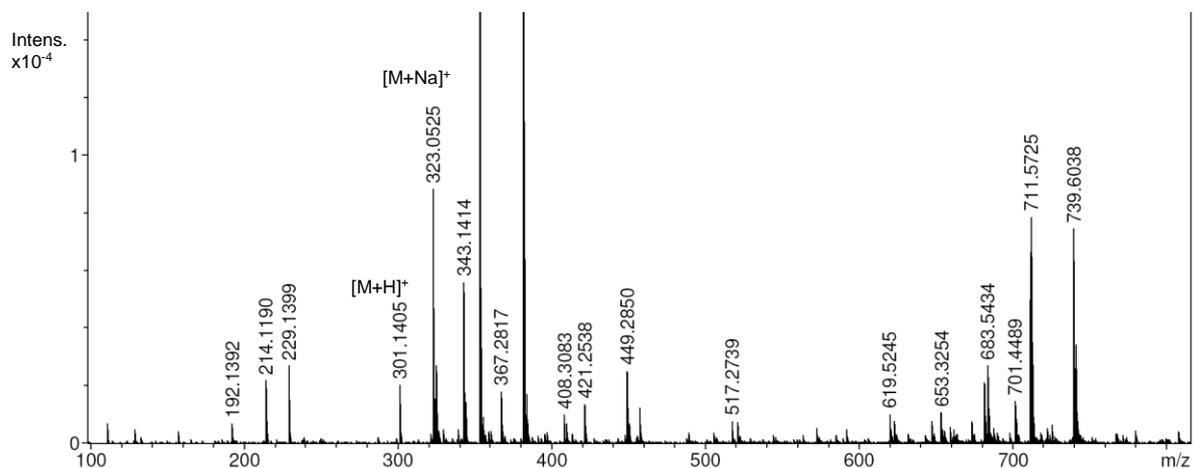


Figura 101: Espectro de ESI-MS da substância **CEA-6** no modo positivo.

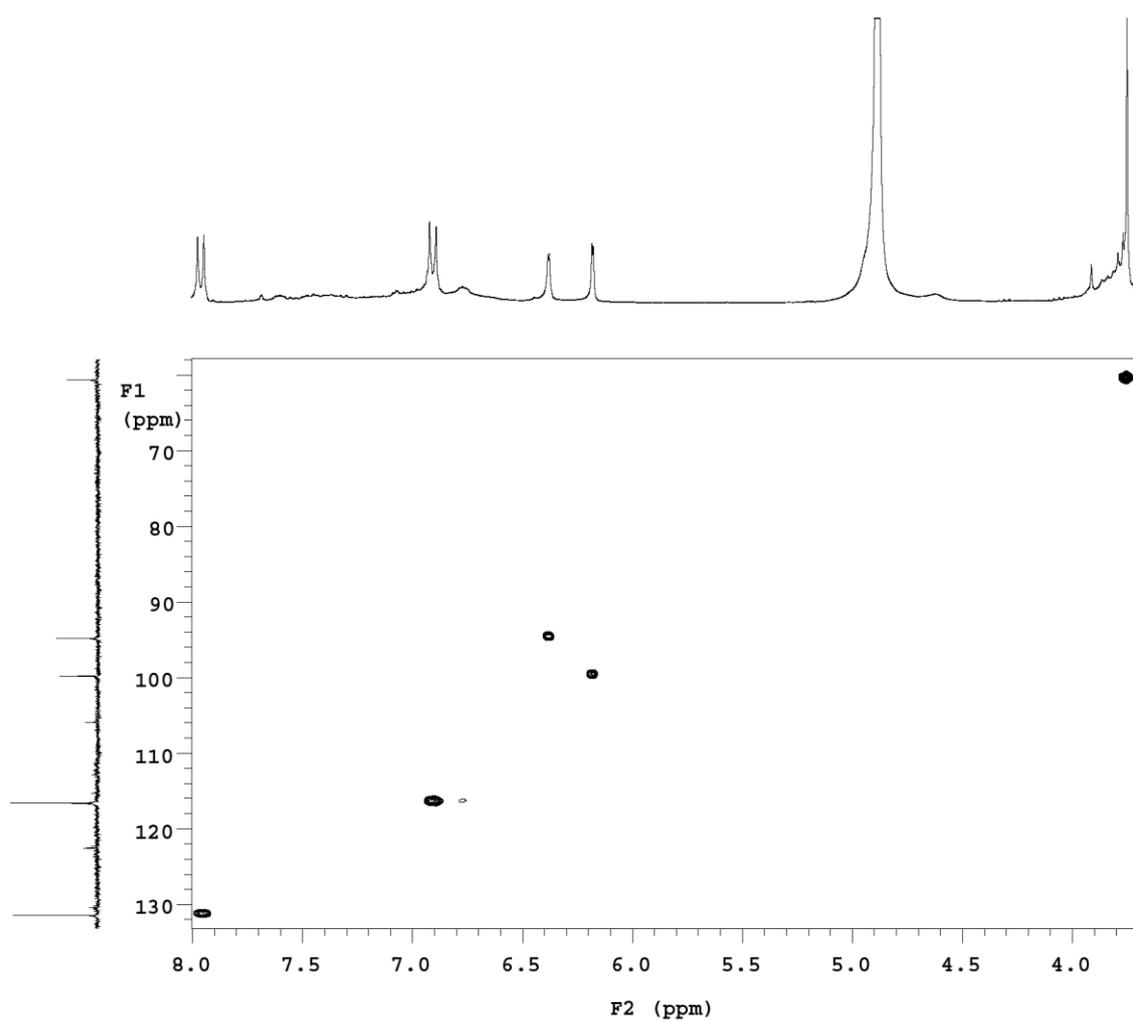
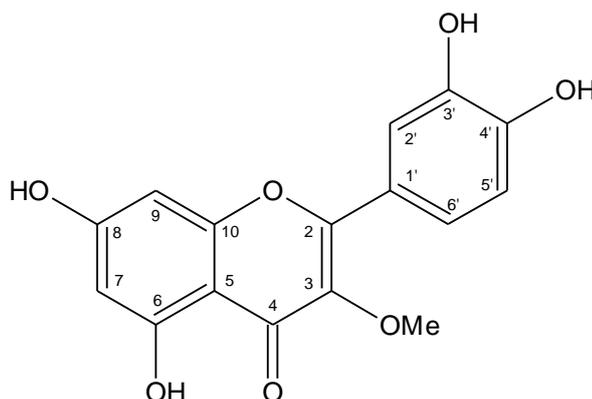


Figura 102: Espectro de HMQC da substância **CEA-6** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

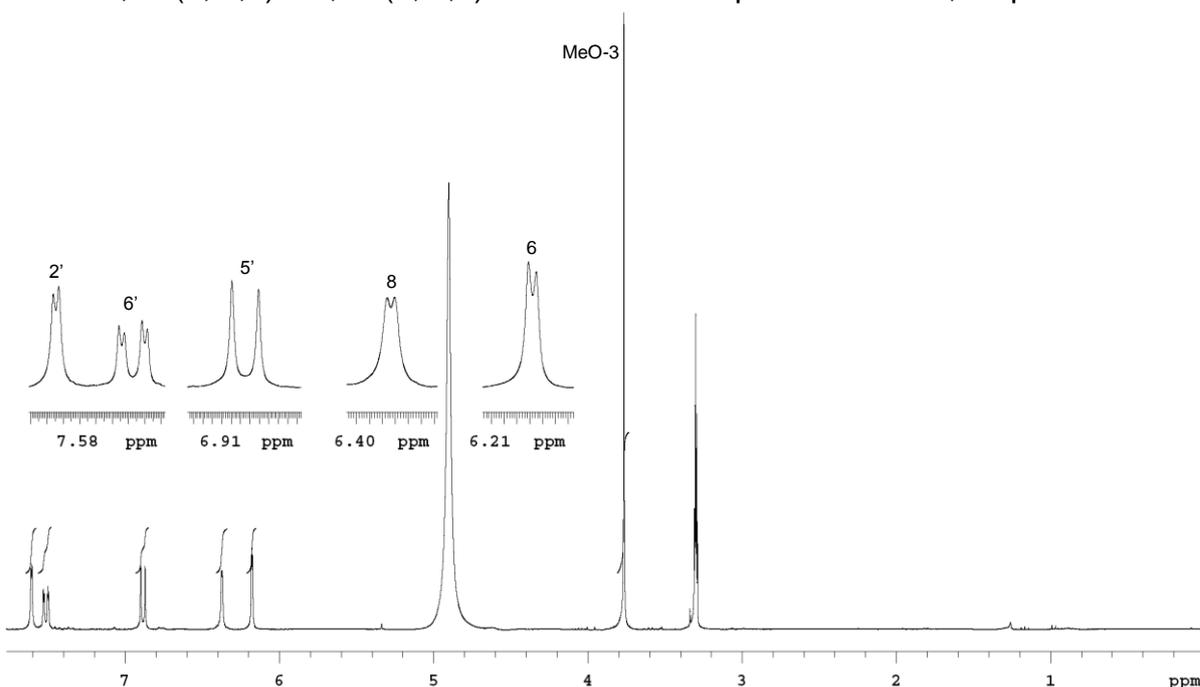
### 5.4.7 Flavonoide CEA-7

O flavonoide **CEA-7** foi identificado como sendo o 3-O-metilquercetina através da comparação de dados de RMN (**Figuras 103 a 107, Tabelas 30 e 31**) com o flavonoide anteriormente descrito **CEA-6** e dados da literatura (LEE et al., 2003).



**CEA-7**

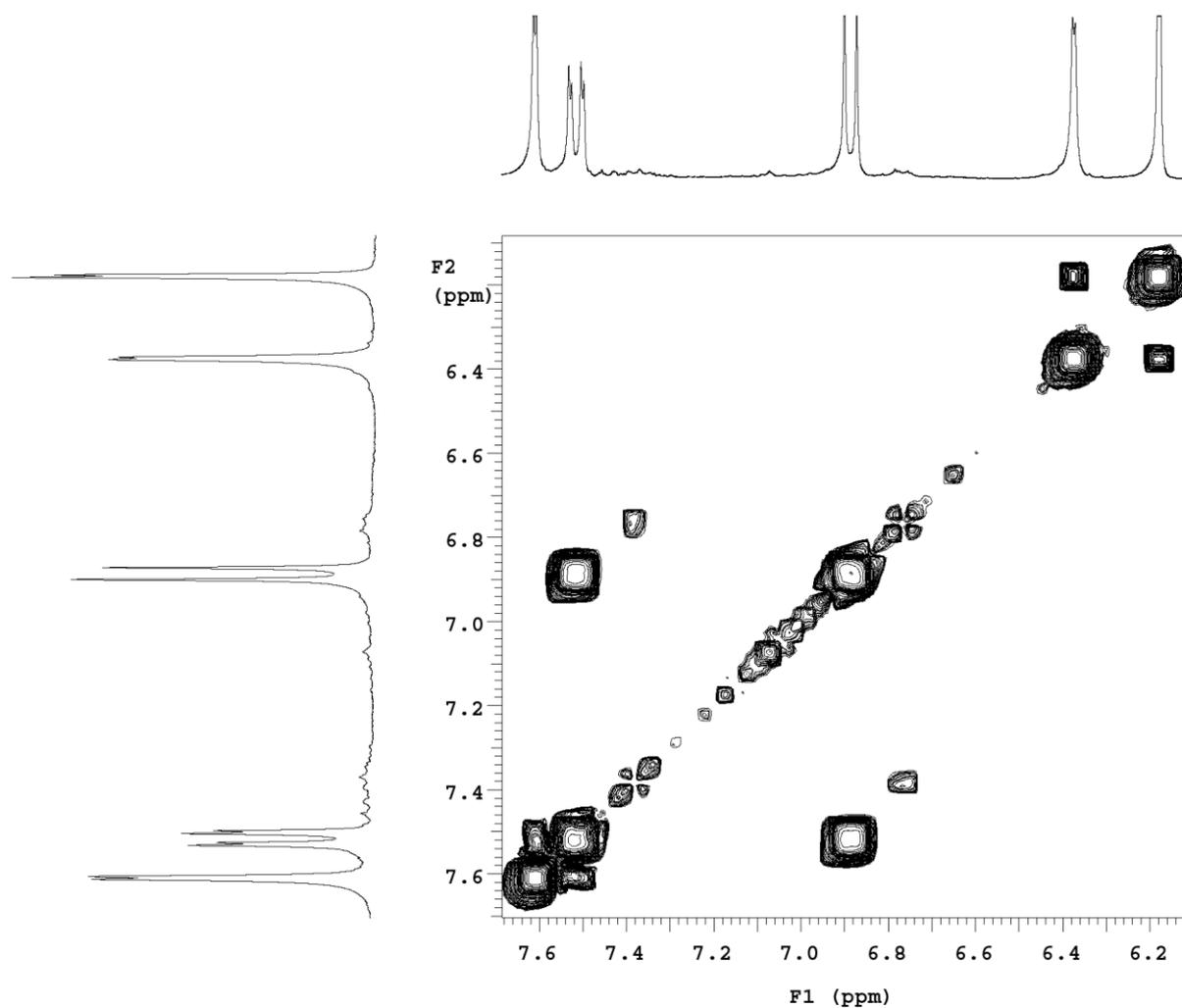
Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  do flavonoide **CEA-7**, quando comparados aos do **CEA-6** apresentaram alterações no padrão de substituição somente para o anel B. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,61 (*d*, 1,8), 6,87 (*d*, 8,4) e 7,51 (*dd*, 8,7-1,8) são compatíveis com o padrão 1,3,4-trissubstituído, característico da quercetina, para o anel B. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,18 (*d*, 1,8) e 6,37 (*d*, 1,8) foram atribuídos para H-8 e H-6, respectivamente.



**Figura 103:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-7** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

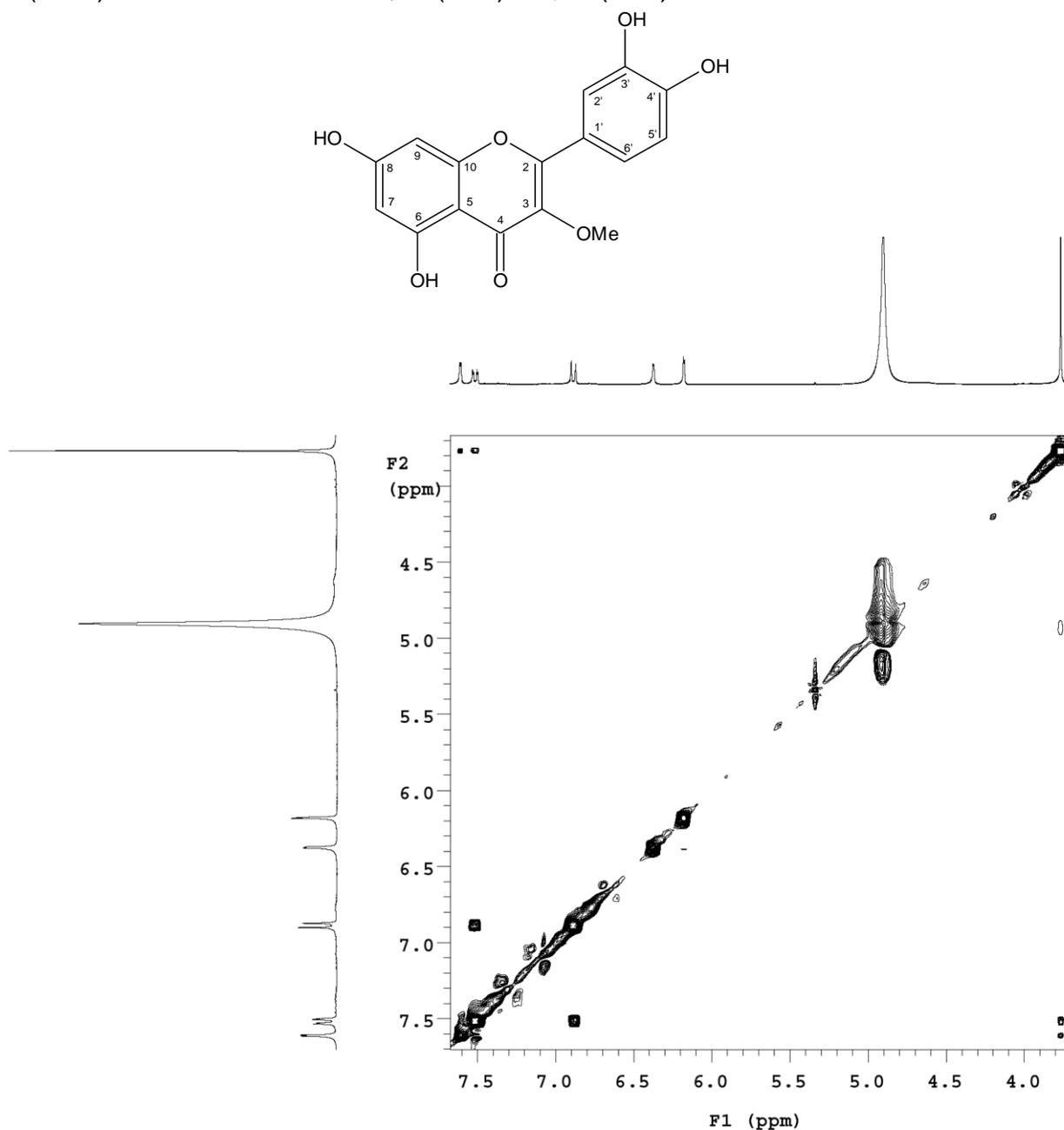
**Tabela 30:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D de **CEA-7** comparados com dados reportados na literatura (LEE et al., 2003) para a 3-O-metilquercetina (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

| H     | $\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) | CEA-7      | 3-O-metilquercetina          |
|-------|--|------------|------------------------------|
|       |  | COSY       | NOESY                        |
| 6     | 6,18 ( <i>d</i> , 1,8)                           | H-8        | 6,09 ( <i>d</i> , 1,8)       |
| 8     | 6,37 ( <i>d</i> , 1,8)                           | H-6        | 6,29 ( <i>d</i> , 1,8)       |
| 2'    | 7,61 ( <i>d</i> , 1,8)                           | H-6'       | 7,52 ( <i>d</i> , 2,0)       |
| 5'    | 6,87 ( <i>d</i> , 8,4)                           | H-6'       | 6,87 ( <i>d</i> , 8,5)       |
| 6'    | 7,51 ( <i>dd</i> , 8,7; 1,8)                     | H-2', H-5' | 7,51 ( <i>dd</i> , 8,5; 2,0) |
| MeO-3 | 3,77 ( <i>s</i> )                                |            | 3,68 ( <i>s</i> )            |



**Figura 104:** Espectro de COSY da substância **CEA-7** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

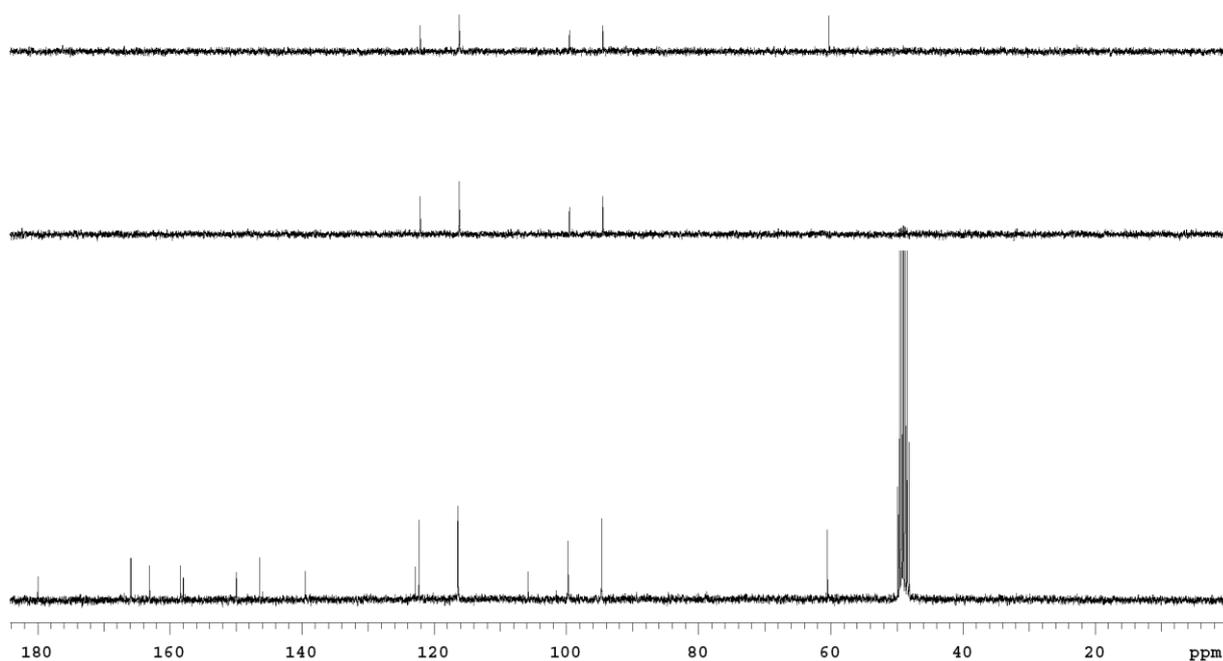
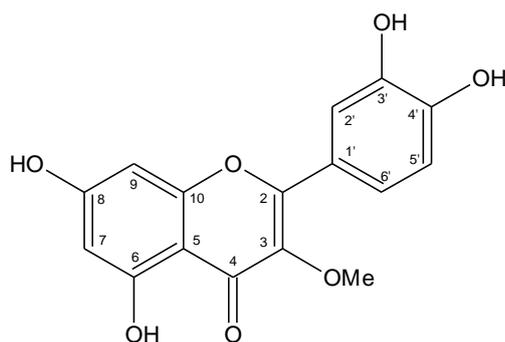
A posição da metoxila no C-3 foi determinada por meio de experimento de NOESY 2D (**Figura 105**), que mostra correlações espaciais do sinal em  $\delta_H$  3,77 (OMe) com os sinais em  $\delta_H$  7,61 (H-2') e 7,51 (H-6').



**Figura 105:** Espectro de NOESY de **CEA-7** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Os dados do espectro de RMN <sup>13</sup>C conjuntamente com os espectros de DEPT (**Figura 106, Tabela 31**) e HMQC (**Figura 107; Tabela 31**) foram compatíveis para o padrão de substituição para o anel B com presença dos sinais em  $\delta_C$  122,9 (C), 116,5 (CH), 146,5 (C), 150,0 (C), 116,4 (CH) e 122,3 (CH). Os sinais em 158,0 (C),

139,5 (C), 180,0 (C), 163,7 (C), 99,8 (CH), 165,9 (C), 94,7 (CH), 158,4 (C), 105,8 (C) foram atribuídos aos carbonos C-2 até C-10, respectivamente.



**Figura 106:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT da substância **CEA-7** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

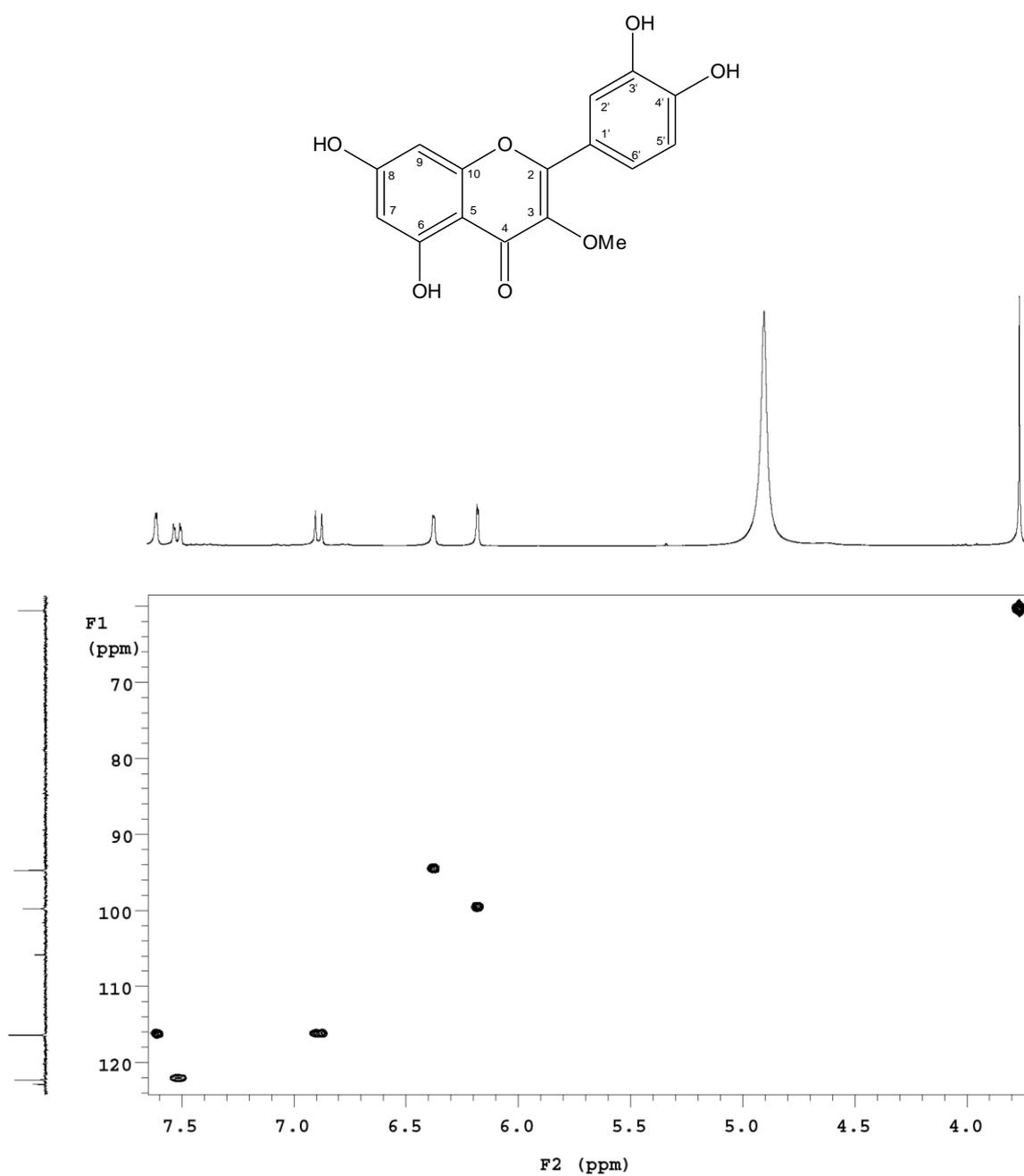
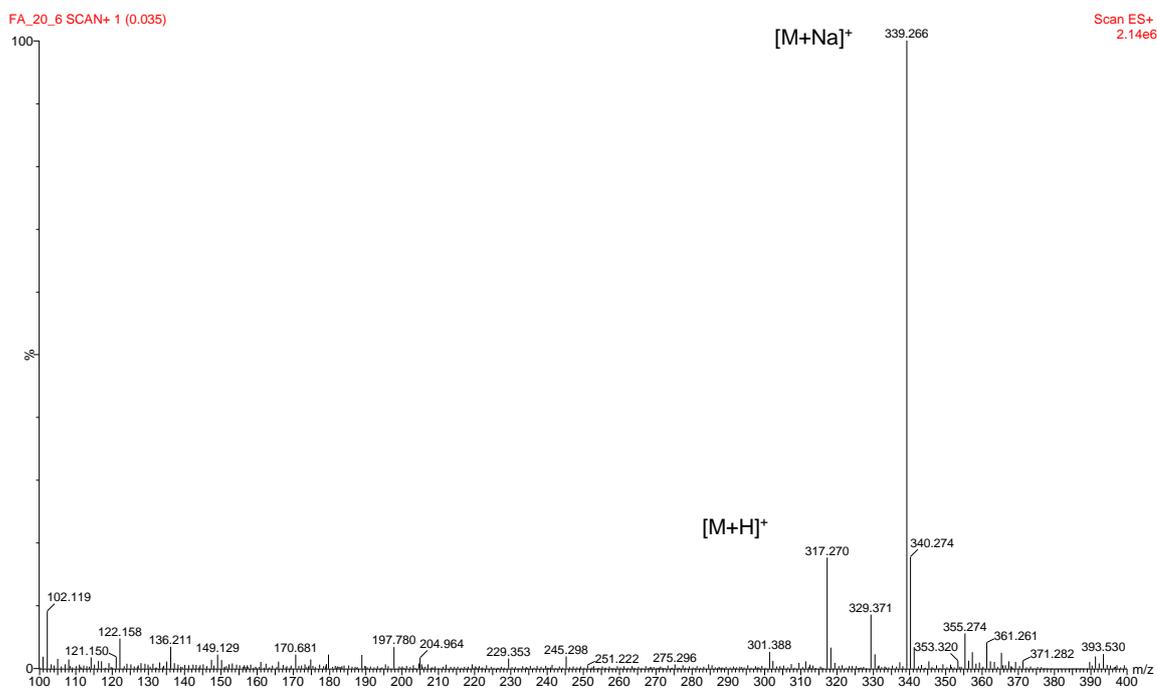


Figura 107: Espectro de HMQC da substância **CEA-7** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

**Tabela 31:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **CEA-7** comparados com os valores de  $\delta_{\text{C}}$  da 3-O-metilquercetina (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da literatura (LEE et al., 2003).

| <b>C</b> | $\delta_{\text{C}}$ | <b>CEA-7<br/>DEPT</b> | <b>HMQC</b> | <b>3-O-metilquercetina<br/><math>\delta_{\text{C}}</math></b> |
|----------|---------------------|-----------------------|-------------|---|
| 2        | 158,0               | C                     |             | 158,4   |
| 3        | 139,5               | C                     |             | 139,9   |
| 4        | 180,0               | C                     |             | 180,4   |
| 5        | 163,7               | C                     |             | 163,5   |
| 6        | 99,8                | CH                    | 6,30        | 100,1   |
| 7        | 165,9               | C                     |             | 166,3   |
| 8        | 94,7                | CH                    | 6,52        | 96,1  |
| 9        | 158,4               | C                     |             | 158,8   |
| 10       | 105,8               | C                     |             | 106,2   |
| 1'       | 122,9               | C                     |             | 123,3   |
| 2'       | 116,5               | CH                    | 7,63        | 116,8   |
| 3'       | 146,5               | C                     |             | 146,8   |
| 4'       | 150,0               | C                     |             | 150,3   |
| 5'       | 116,4               | CH                    | 6,90        | 116,9   |
| 6'       | 122,3               | CH                    | 7,53        | 122,7   |
| MeO-3    | 60,5                | CH3                   | 3,72        | 60,9  |

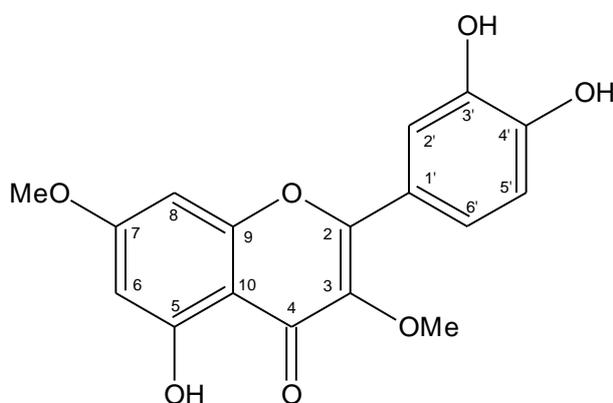
A fórmula molecular do flavonoide **CEA-7**  $C_{16}H_{12}O_7$  foi estabelecida por espectrometria de massas (ESI-MS), no modo positivo, (**Figura 108**) que apresentou os sinais em  $m/z$  317,3  $[M+H]^+$  e 339,3  $[M+Na]^+$ .



**Figura 108:** Espectro de ESI-MS do flavonoide **CEA-7**, no modo positivo.

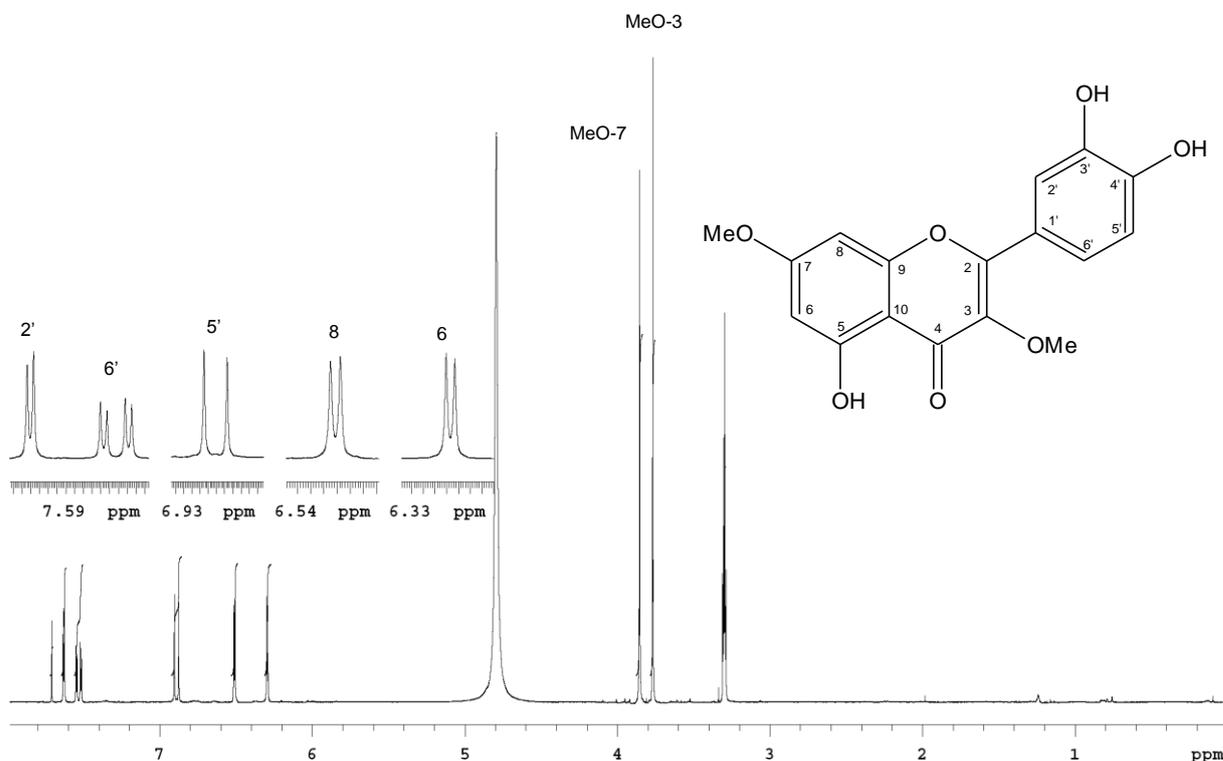
### 5.4.8 Flavonoide CEA-8

O flavonoide **CEA-8** teve seus dados de RMN comparados com a literatura (GRAYER et al., 2010) e foi identificado como sendo o 3,7-di-O-metilquercetina. A comparação com os dados de RMN do flavonoide **CEA-7** demonstrou a grande similaridade entre ambos, com exceção de um sinal em  $\delta_{H/C}$  3,86 (s)/56,3 que indicou a substituição de um grupo hidroxila em **CEA-7** por um grupo metoxila em **CEA-8**.



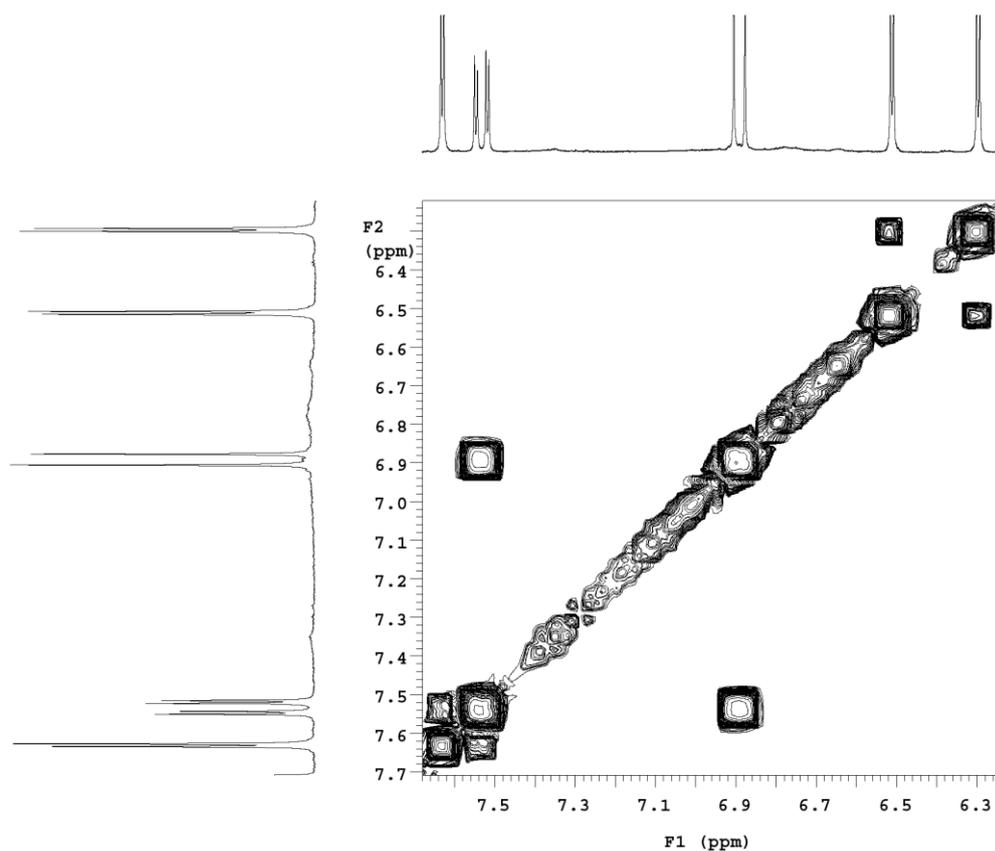
**CEA-8**

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 109, Tabela 32**) e COSY (**Figura 110, Tabela 32**) evidenciou o padrão de substituição para o anel A, di-substituído em C-5 e C-7, por intermédio dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (*d*, 2,1) e 6,52 (*d*, 2,1). Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (*d*, 8,4), 7,53 (*dd*, 8,4-2,1) e 7,63 (*d*, 2,1) caracterizaram o anel B, di-hidroxilado nas posições C-3' e C-4'.



**Figura 109:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-8** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

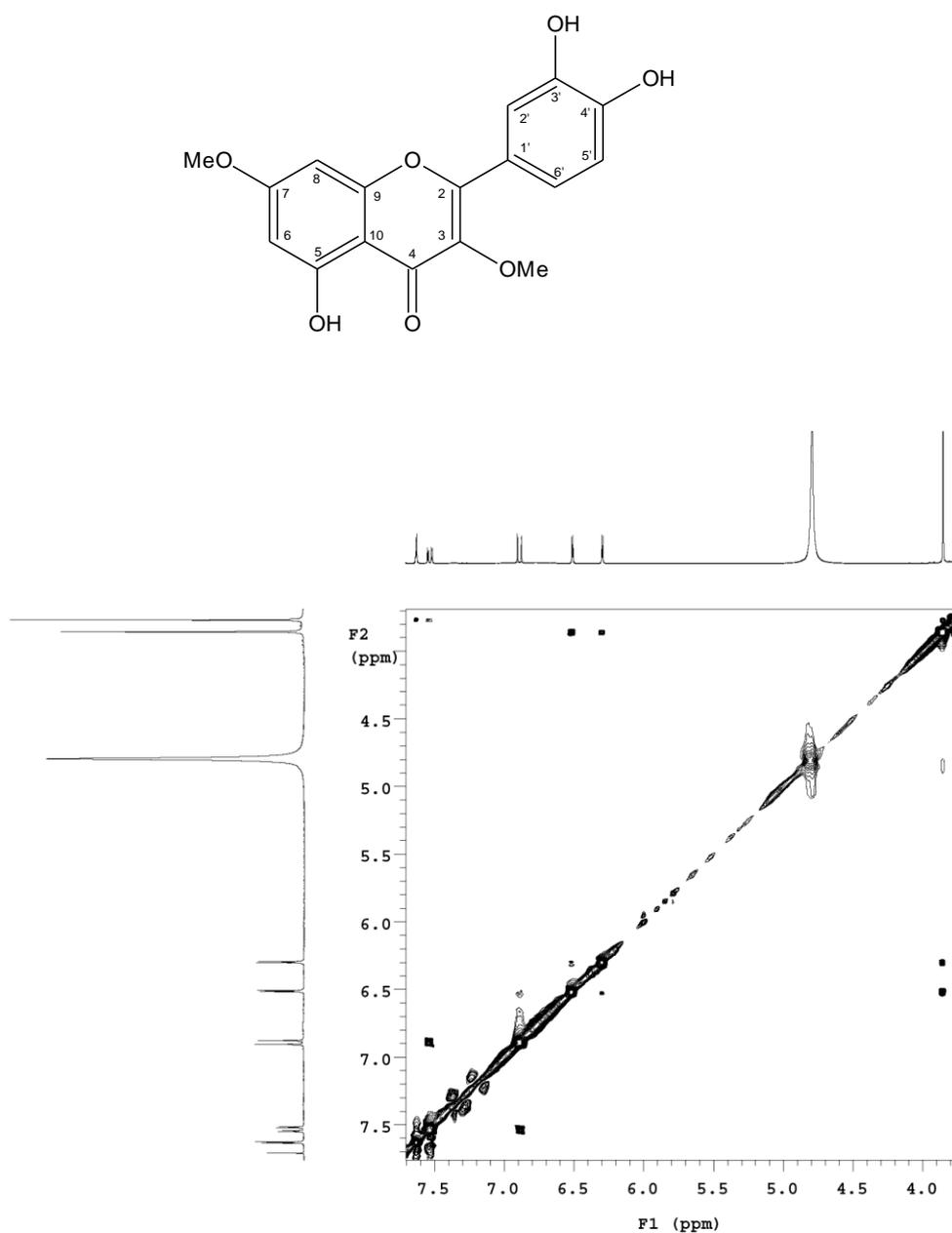
A atribuição dos grupos metoxilas foi feita com base no espectro de NOESY 2D (**Figura 111**). As correlações espaciais do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,72 (MeO) com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 e 7,53, atribuídos ao H-2' e H-6', comprovam a sua atribuição em C-3 e as correlações do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (MeO) com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 e 6,52, atribuídos ao H-6 e H-8, posicionam este grupo metoxila em C-7.



**Figura 110:** Espectro de COSY de **CEA-8** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

**Tabela 32:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD) e correlações observadas no COSY e NOESY 2D de **CEA-8** comparados com os δ<sub>H</sub> da 3,7-di-O-metilquercetina (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) descritos na literatura (GRAYER et al., 2010).

| H     | δ <sub>H</sub> ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) | CEA-8<br>COSY | NOESY      | 3,7-di-O-<br>metilquercetina<br>δ <sub>H</sub> ( <i>m</i> , <i>J</i> em Hz) |
|-------|---|---------------|------------|---|
| 6     | 6,30 ( <i>d</i> , 2,1)                      | H-8           |            | 6,36 ( <i>d</i> , 2,0)  |
| 8     | 6,52 ( <i>d</i> , 2,1)                      | H-6           |            | 6,70( <i>d</i> , 2,0)   |
| 2'    | 7,63 ( <i>d</i> , 2,1)                      | H-6'          |            | 7,58 ( <i>d</i> , 2,2)  |
| 5'    | 6,90 ( <i>d</i> , 8,4)                      | H-6'          |            | 6,88 ( <i>d</i> , 8,5)  |
| 6'    | 7,53 ( <i>dd</i> , 8,4; 2,1)                | H-2', H-5'    |            | 7,48 ( <i>dd</i> , 8,5; 2,2)  |
| MeO-3 | 3,75 ( <i>s</i> )                           |               | H-2', H-6' | 3,80 ( <i>s</i> )   |
| MeO-7 | 3,86 ( <i>s</i> )                           |               | H-6, H-8   | 3,86 ( <i>s</i> )   |



**Figura 111:** Espectro de NOESY 2D de **CEA-8** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Na **Tabela 33** estão os dados comparados do espectro de RMN <sup>13</sup>C, DEPT e HMQC (**Figuras 112 e 113**) da **CEA-8** com os da literatura para a substância 3,7-di-O-metilquercetina. Estes dados são concordantes com a estrutura proposta.

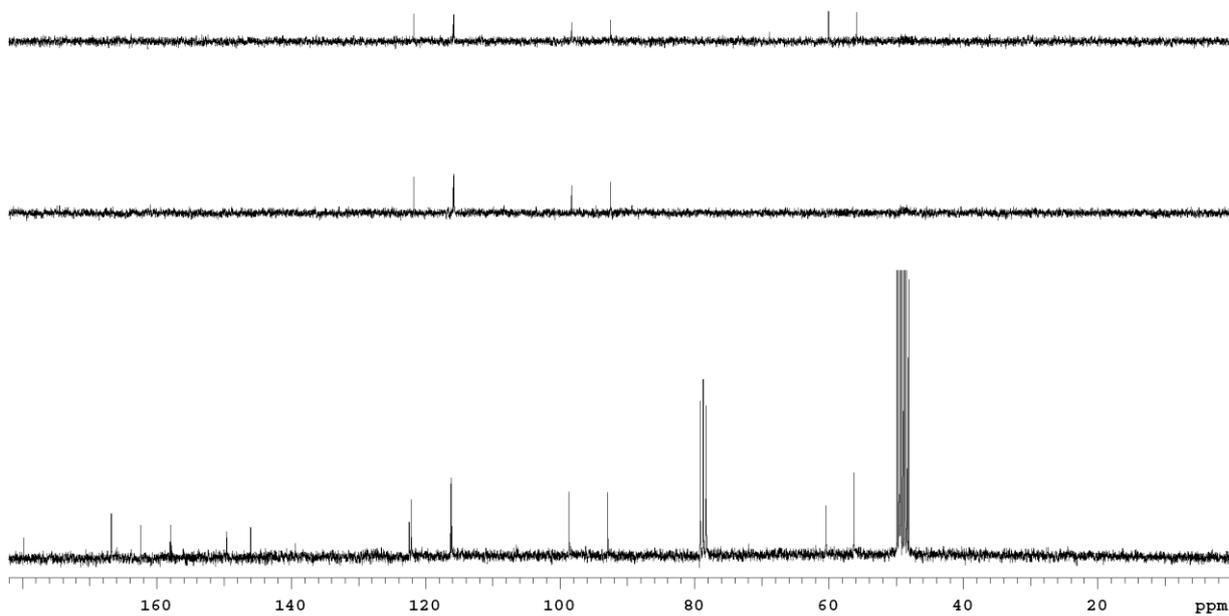


Figura 112: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT de **CEA-8** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

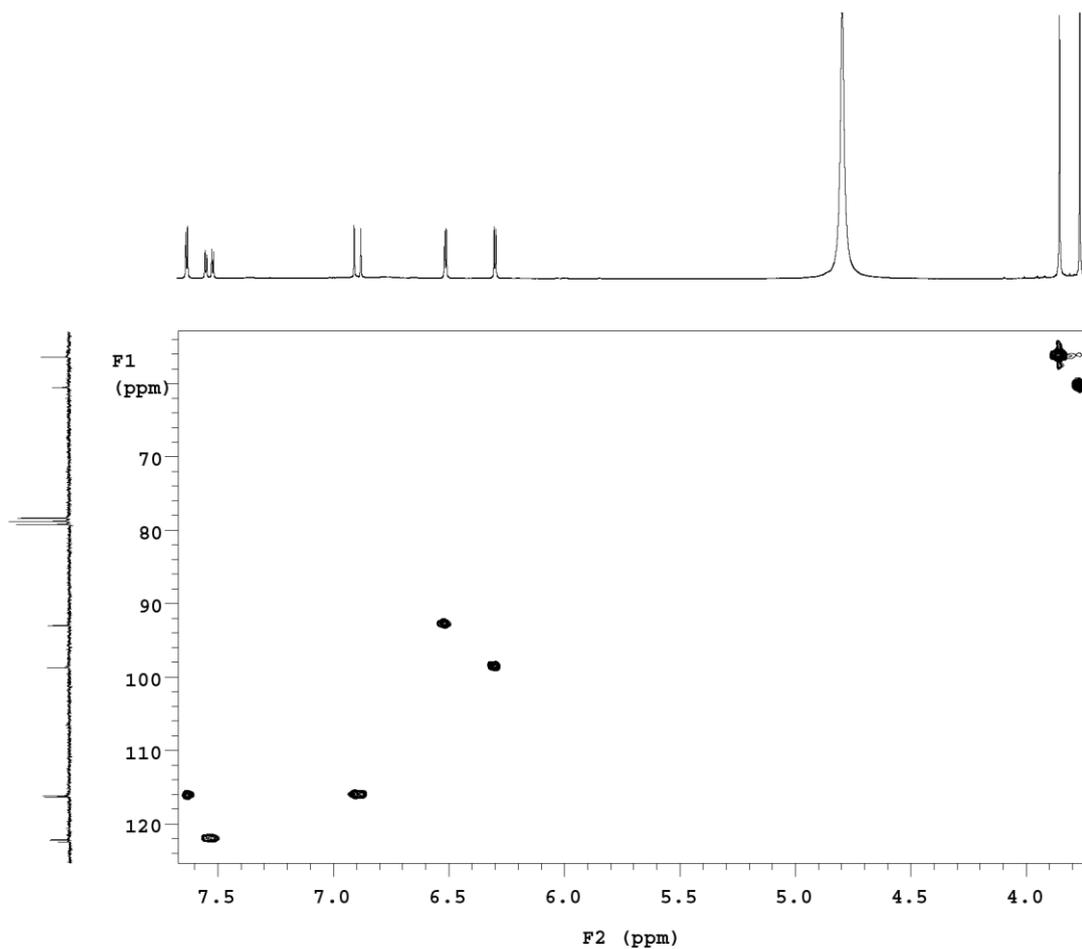
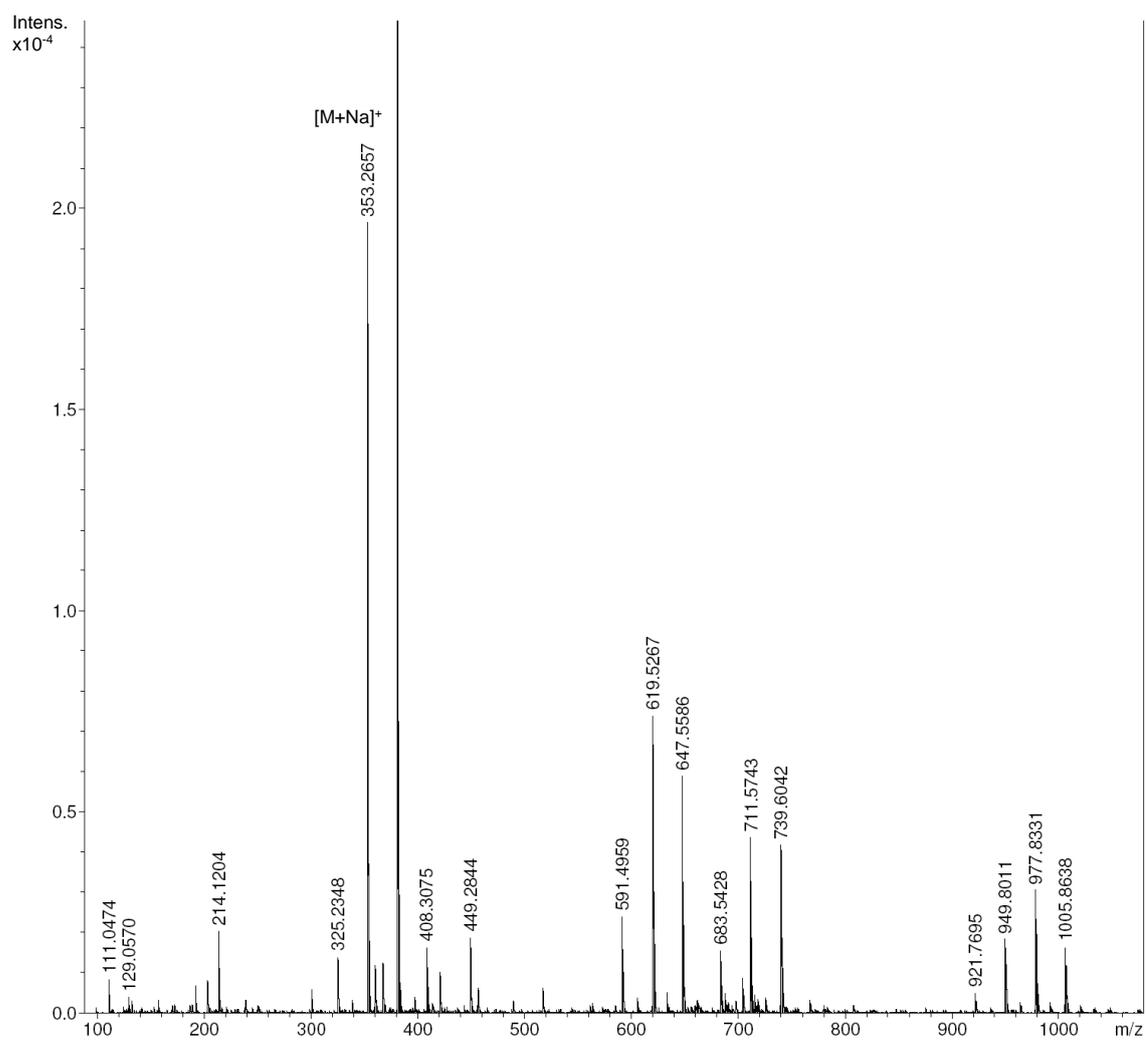


Figura 113: Espectro de HMQC de **CEA-8** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

**Tabela 33:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HMQC (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), de **CEA-8**, comparados com dados de  $\delta_c$  (125 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ .) reportados na literatura para a 3,7-di-O-metilquercetina (GRAYER et al., 2010).

| <b>C</b> | $\delta_c$ | <b>CEA-8<br/>DEPT</b> | <b>HMQC</b> | <b>3,7-di-O-<br/>metilquercetina<br/><math>\delta_c</math></b> |
|----------|------------|-----------------------|-------------|--|
| 2        | 157,9      | C                     |             |  |
| 3        | 139,4      | C                     |             |  |
| 4        | 179,8      | C                     |             |  |
| 5        | 162,4      | C                     |             |  |
| 6        | 98,7       | CH                    | 6,30        | 97,5   |
| 7        | 166,8      | C                     |             |  |
| 8        | 92,9       | CH                    | 6,52        | 91,9   |
| 9        | 158,0      | C                     |             |  |
| 10       | 106,5      | C                     |             |  |
| 1'       | 122,5      | C                     |             |  |
| 2'       | 116,3      | CH                    | 7,63        | 115,0  |
| 3'       | 146,1      | C                     |             |  |
| 4'       | 149,6      | C                     |             |  |
| 5'       | 116,2      | CH                    | 6,90        | 115,5  |
| 6'       | 122,2      | CH                    | 7,53        | 120,7  |
| MeO-3    | 60,4       | $\text{CH}_3$         | 3,72        | 59,3   |
| MeO-7    | 56,3       | $\text{CH}_3$         | 3,86        | 55,8   |

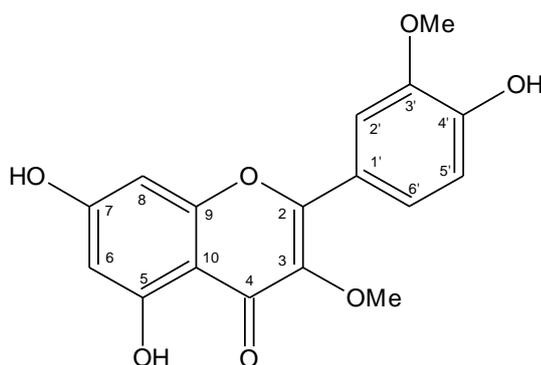
A estrutura do flavonoide **CEA-8** foi confirmada por ESI-MS, modo positivo, que mostrou o pico de  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  353,2657 (**Figura 114**).



**Figura 114:** Espectro ESI-MS do flavonoide **CEA-8** no modo positivo.

### 5.4.9 Flavonoide CEA-9

Comparando-se os dados de RMN do flavonoide denominado **CEA-9** (**Figuras 115 a 119, Tabelas 34 e 35**), com os do **CEA-8**, 3,7-di-O-metilquercetina, pode-se observar pequenas diferenças nos deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Estas diferenças levaram-nos a propor a mudança do grupo metoxila da posição C-7, em **CEA-8**, para a posição C-3', em **CEA-9**.



**CEA-9**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 115, Tabela 34**) e COSY (**Figura 116, Tabela 34**), mostram os sinais  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (*d*, 8,7), 7,61 (*dd*, 8,7-2,1) e 7,68 (*d*, 2,1), que foram atribuídos ao anel B, dissubstituído em C-3' e C-4'. Da mesma forma, os sinais  $\delta_{\text{H}}$  6,29 (*d*, 2,1) e 6,39 (*d*, 2,4) caracterizaram o anel A, dihidroxilado em C-5 e C-7.

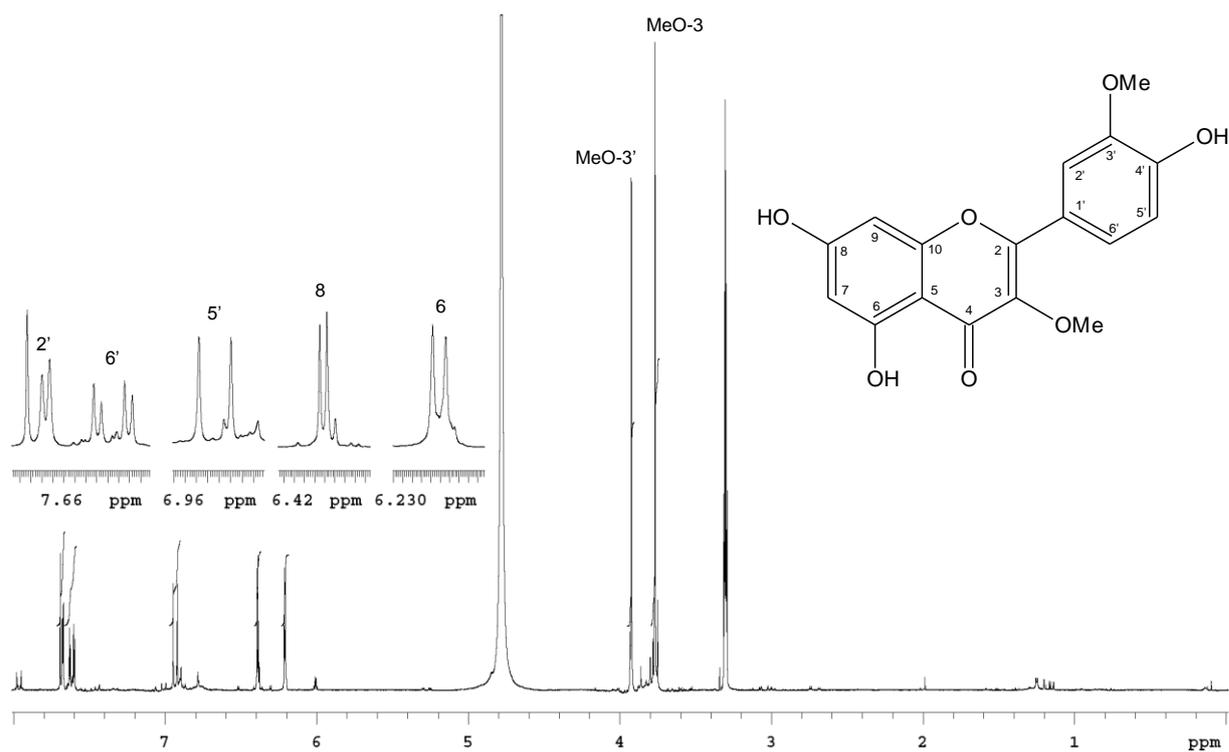


Figura 115: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-8** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

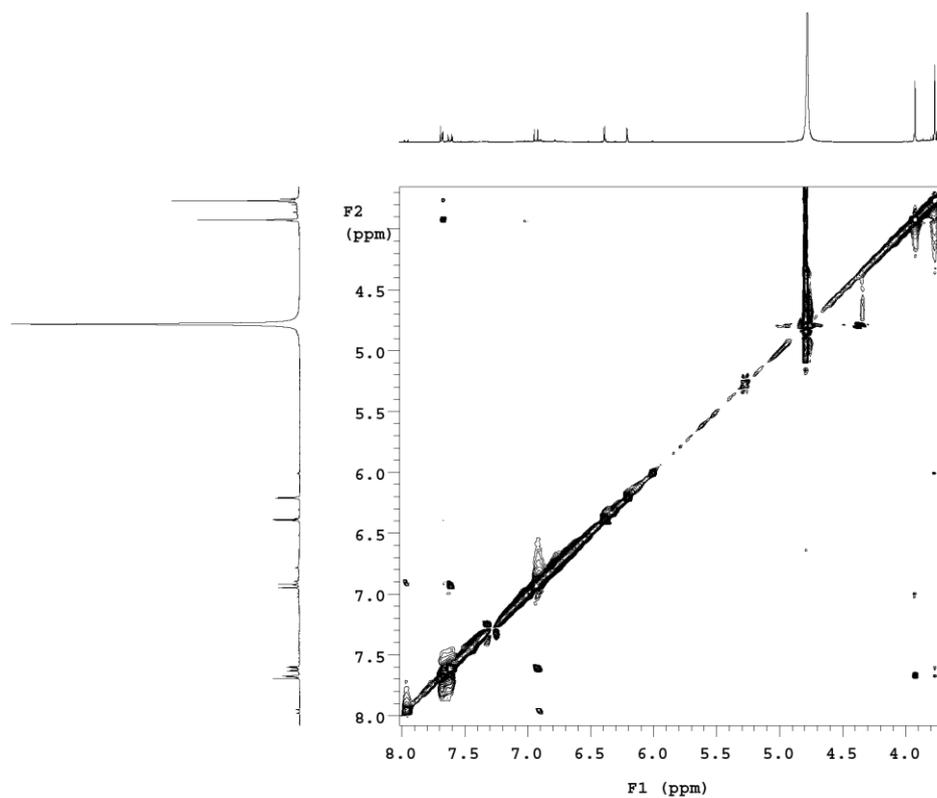
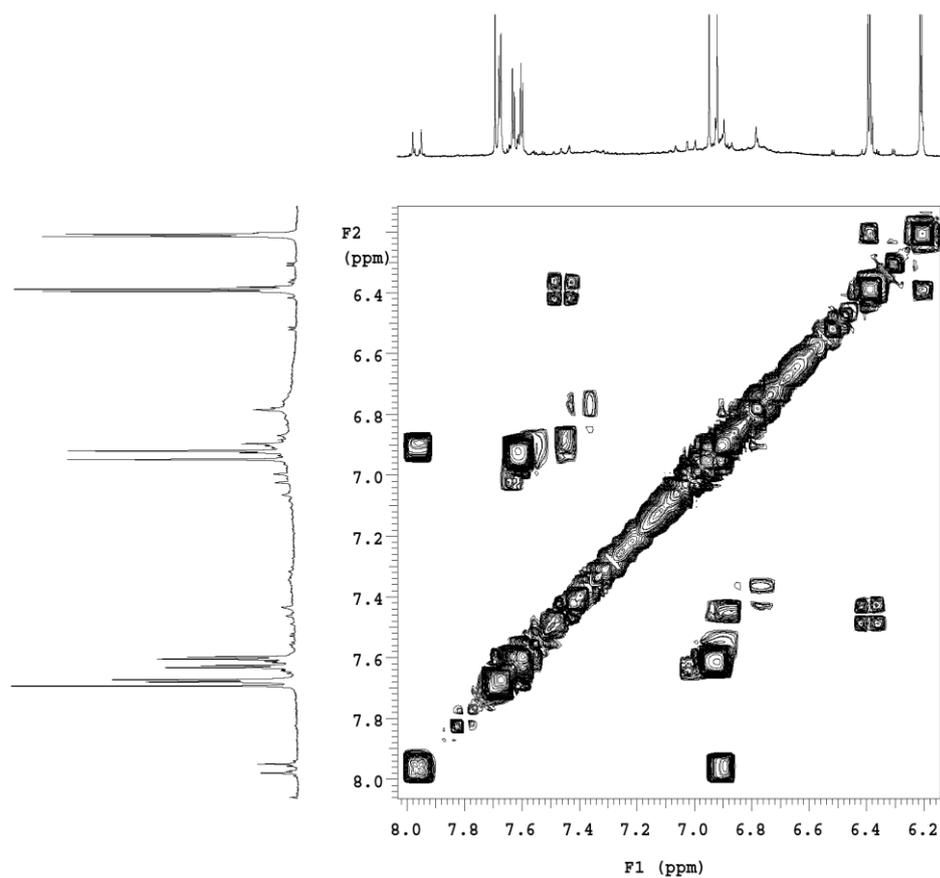


Figura 116: Espectro de COSY da substância **CEA-9** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

**Tabela 34:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e correlações observadas no COSY e NOESY da substância **CEA-9**.

| H      | $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz) | COSY       | NOESY      |
|--------|----------------------------------|------------|------------|
| 6      | 6,20 (d, 2,1)                    | H-8        |            |
| 8      | 6,39 (d, 2,4)                    | H-6        |            |
| 2'     | 7,68 (d, 2,1)                    | H-6'       |            |
| 5'     | 6,92 (d, 8,7)                    | H-6'       |            |
| 6'     | 7,61 (dd, 8,7; 2,1)              | H-2', H-5' |            |
| MeO-3  | 3,76 (s)                         |            | H-2', H-6' |
| MeO-3' | 3,92 (s)                         |            | H-2', H-5' |

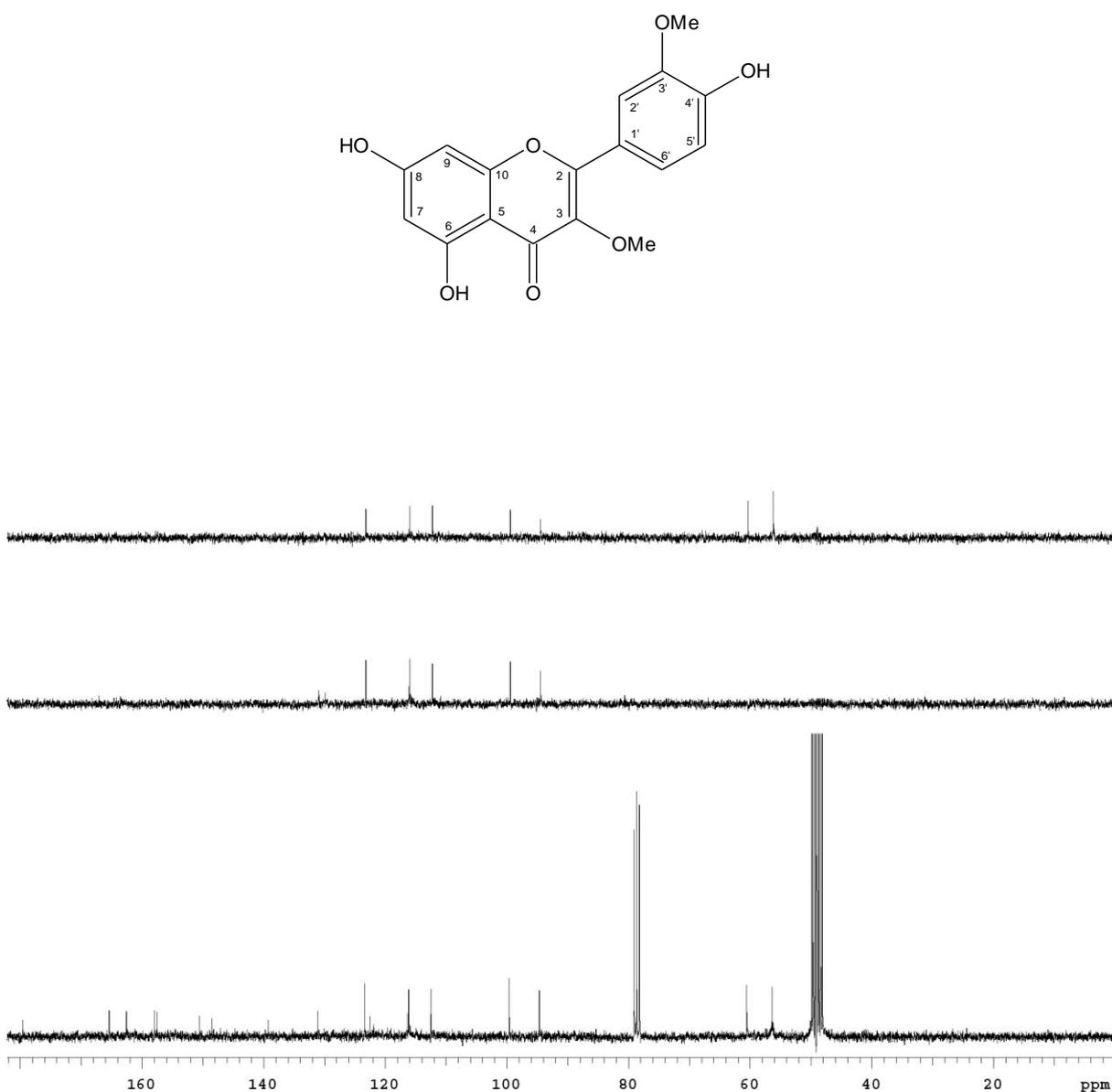
A proposta estrutural para **CEA-9** foi confirmada por meio de experimento de NOESY 2D (**Figura 117**)



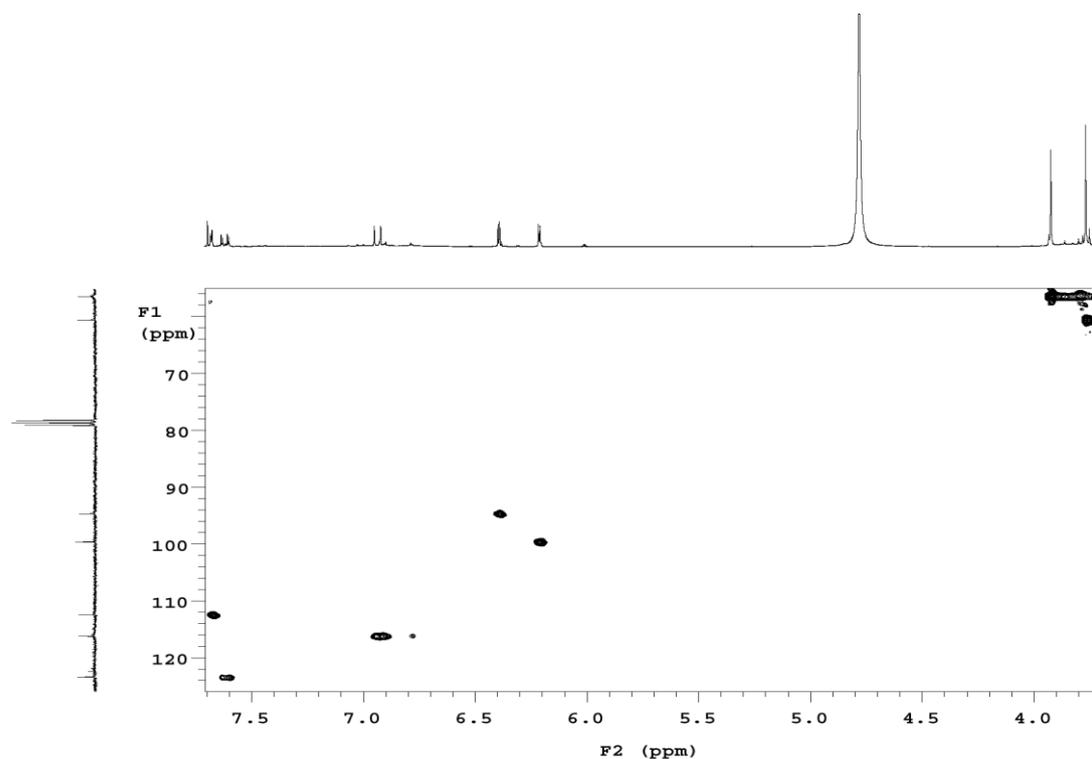
**Figura 117:** Espectro de NOESY 2D da substância **CEA-9** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

As correlações do sinal em  $\delta_H$  3,92 (MeO) com os sinais em  $\delta_H$  7,68 e 6,92, atribuídos ao H-2' e H-5', atribuem este grupo metoxila em C-3'. A atribuição do segundo grupo metoxila em C-3 foi comprovada pela correlação do sinal em  $\delta_H$  3,76 (MeO) com os sinais em  $\delta_H$  7,68 e 7,61, atribuídos ao H-2' e H-6'.

Na **Tabela 35** estão os dados comparados do espectro de RMN  $^{13}C$ , DEPT e HMQC (Figuras 118 e 119) do flavonoide **CEA-8** com os da literatura para a substância 3,3'-di-O-metilquercetina.



**Figura 118:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  e DEPT da substância **CEA-9** (75,5 MHz;  $CD_3OD$ ).

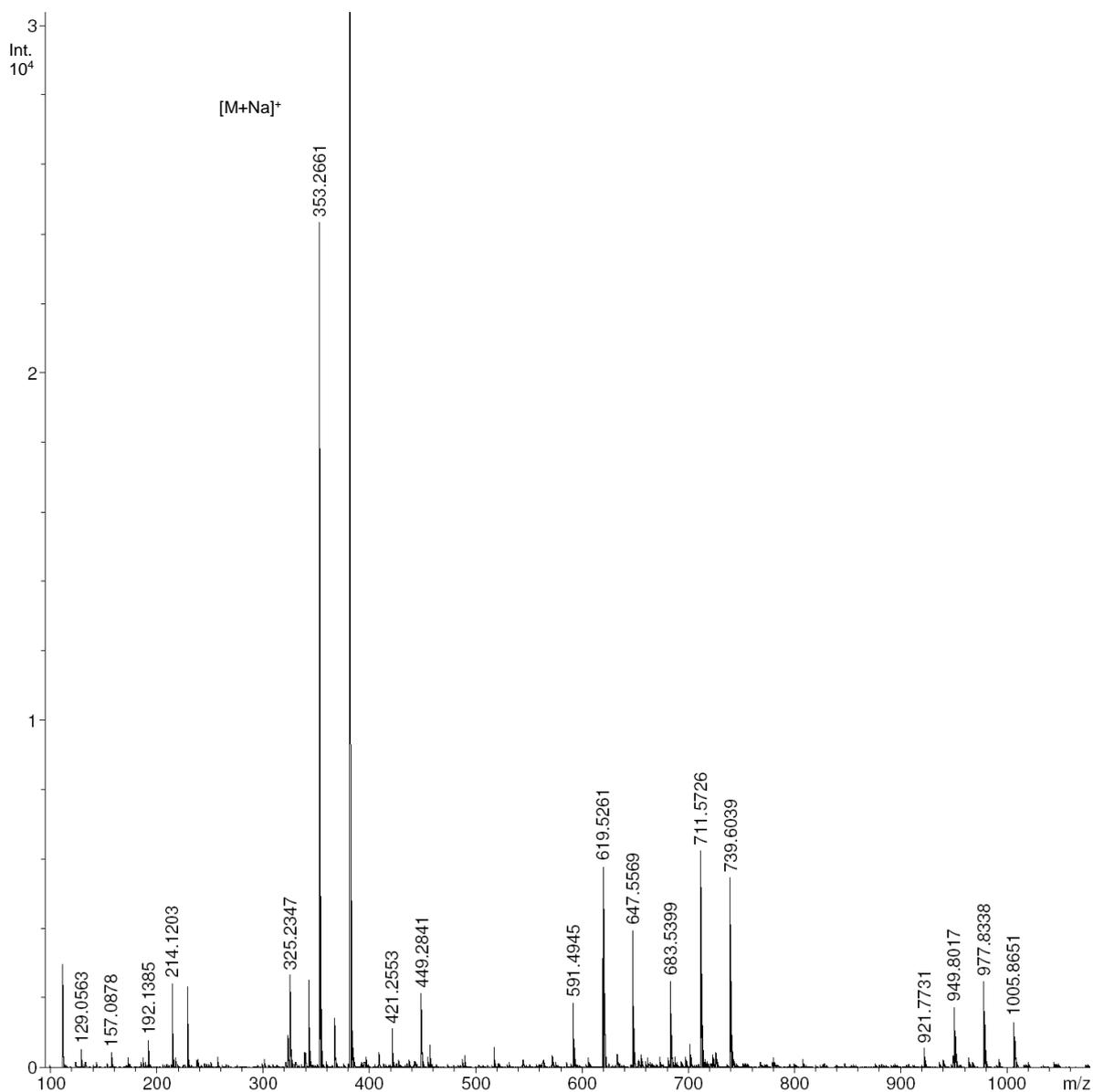


**Figura 119:** Espectro de HMQC da substância **CEA-9** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

**Tabela 35:** Dados de RMN de <sup>13</sup>C, DEPT e HMQC (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD) da substância **CEA-9** comparados com dados de  $\delta_c$  para a 3,3'-di-O-metilquercetina (50,6 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) reportados na literatura (WANG et al., 1989).

| C      | $\delta_c$ | CEA-9<br>DEPT   | HMQC | 3,3'-di-O-<br>metilquercetina |
|--------|------------|-----------------|------|-------------------------------|
|        |            |                 |      | $\delta_c$                    |
| 2      | 157,5      | C               |      | 155,4                         |
| 3      | 139,3      | C               |      | 137,7                         |
| 4      | 179,6      | C               |      | 177,9                         |
| 5      | 162,6      | C               |      | 161,2                         |
| 6      | 99,7       | CH              | 6,30 | 98,6                          |
| 7      | 165,4      | C               |      | 164,1                         |
| 8      | 94,7       | CH              | 6,52 | 93,8                          |
| 9      | 158,0      | C               |      | 156,3                         |
| 10     | 105,7      | C               |      | 104,2                         |
| 1'     | 122,5      | C               |      | 120,8                         |
| 2'     | 112,5      | CH              | 7,63 | 112,0                         |
| 3'     | 148,5      | C               |      | 147,4                         |
| 4'     | 150,6      | C               |      | 149,7                         |
| 5'     | 116,2      | CH              | 6,90 | 115,6                         |
| 6'     | 123,4      | CH              | 7,53 | 122,2                         |
| MeO-3  | 60,6       | CH <sub>3</sub> | 3,72 | 59,7                          |
| MeO-3' | 56,4       | CH <sub>3</sub> | 3,92 | 55,7                          |

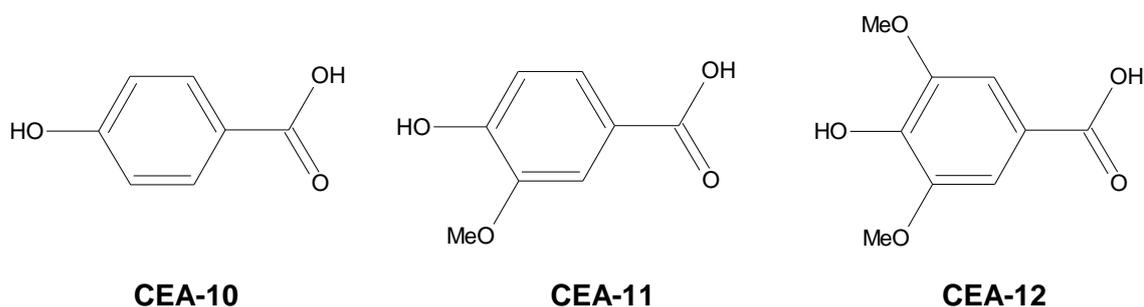
A fórmula molecular  $C_{17}H_{14}O_7$  foi estabelecida por espectrometria de massas (ESI-MS), no modo positivo, (**Figura 95**) que apresentou o pico de  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  353,2661, em conjunto com RMN de  $^{13}C$ . A comparação destes dados com os da literatura (WANG et al., 1989) permitiram elucidar a estrutura de **CEA-9** como sendo a da 3, 3'-di-O-metilquercetina.



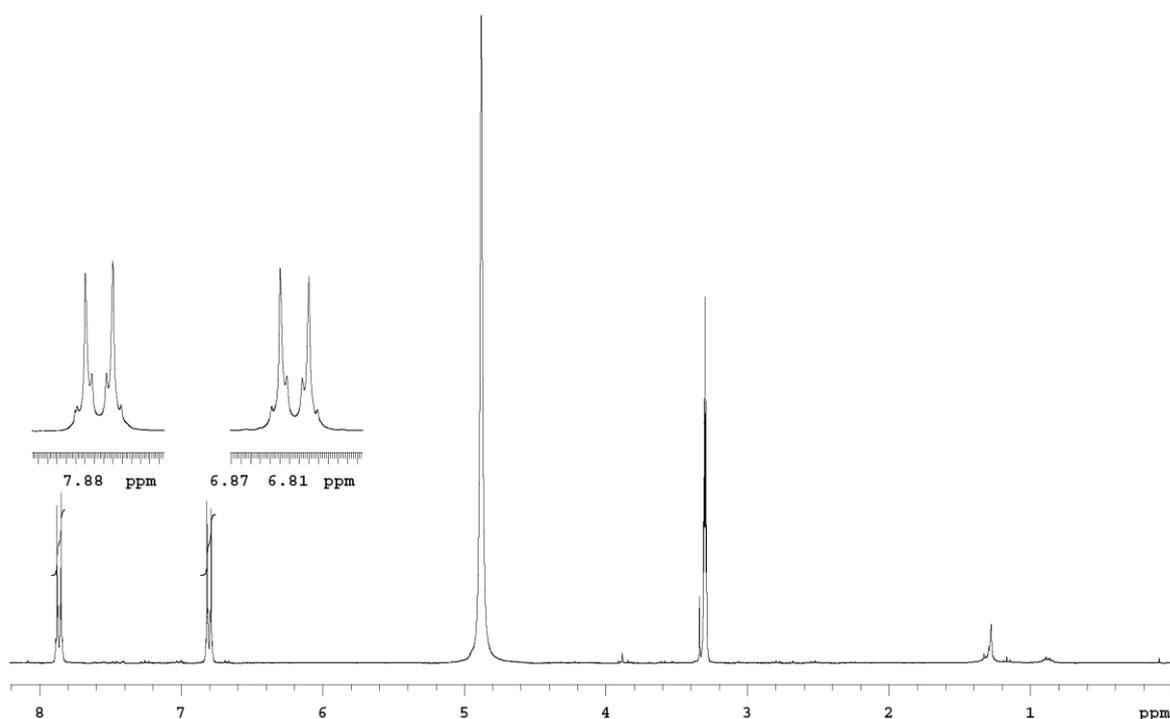
**Figura 120:** Espectro ESI-MS da substância **CEA-9** no modo positivo.

### 5.4.10 Derivados de ácido benzóico CEA-10, CEA-11 e CEA-12

A interpretação dos espectros de RMN das frações denominadas de **CEA-10** a **CEA-12** levou-nos a identificar a série de ácidos 4-hidróxi, 4-hidróxi-3-metóxi e 4-hidróxi-3,5-dimetóxi benzóico, respectivamente. Os dados de RMN foram comparados e são concordantes com os da literatura (TAN et al., 2004; ALBARICI, 2006).

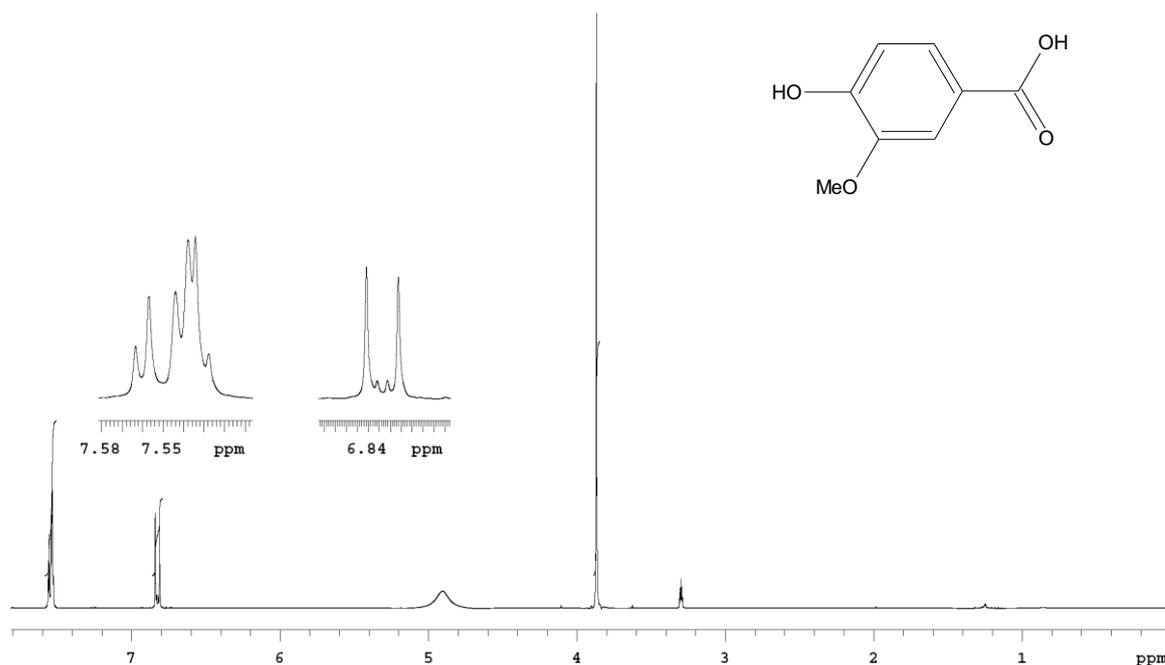


Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 121**, **Tabela 36**) da substância **CEA-10** revelam a presença dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (*d*, 9,0) e 7,86 (*d*, 9), característico de anel benzênico *para* substituído.



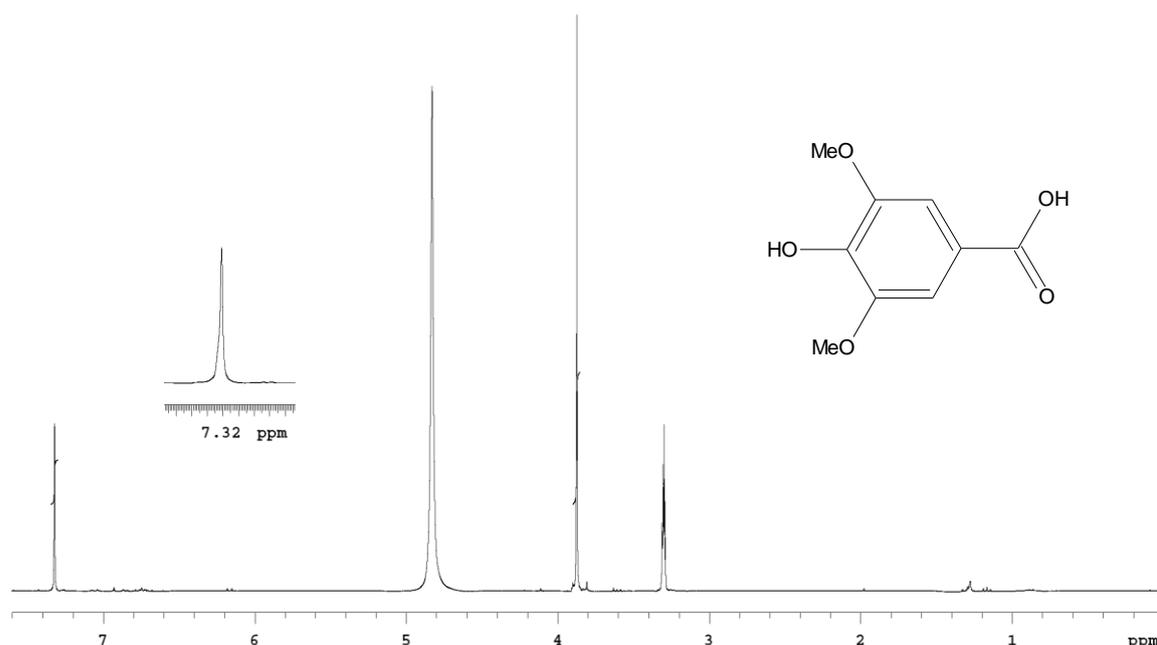
**Figura 121:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-10** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Para a substância **CEA-11** o espectro de  $^1\text{H}$  (**Figura 122, Tabela 36**) mostrou o sinal de uma metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,88 e a presença dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,54 (*d*, 1,8), 7,54 (*dd*, 8,4-1,8), e 6,83 (*d*, 8,7), característicos de anel benzênico *meta-para* substituído.



**Figura 122:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **CEA-11** (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Para a substância **CEA-12**, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,88, com integração para duas metoxilas e em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 (*s*) para dois hidrogênios magneticamente equivalentes, no espectro de  $^1\text{H}$  (**Figura 123, Tabela 36**), caracterizaram o anel benzênico 1,3,4,5 substituído.

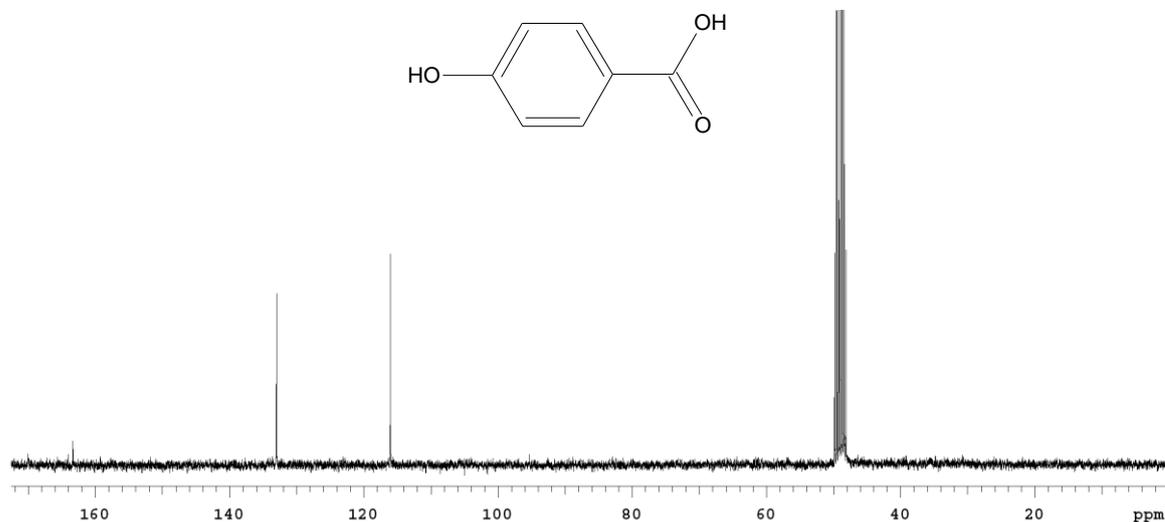


**Figura 123:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **CEA-12** (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

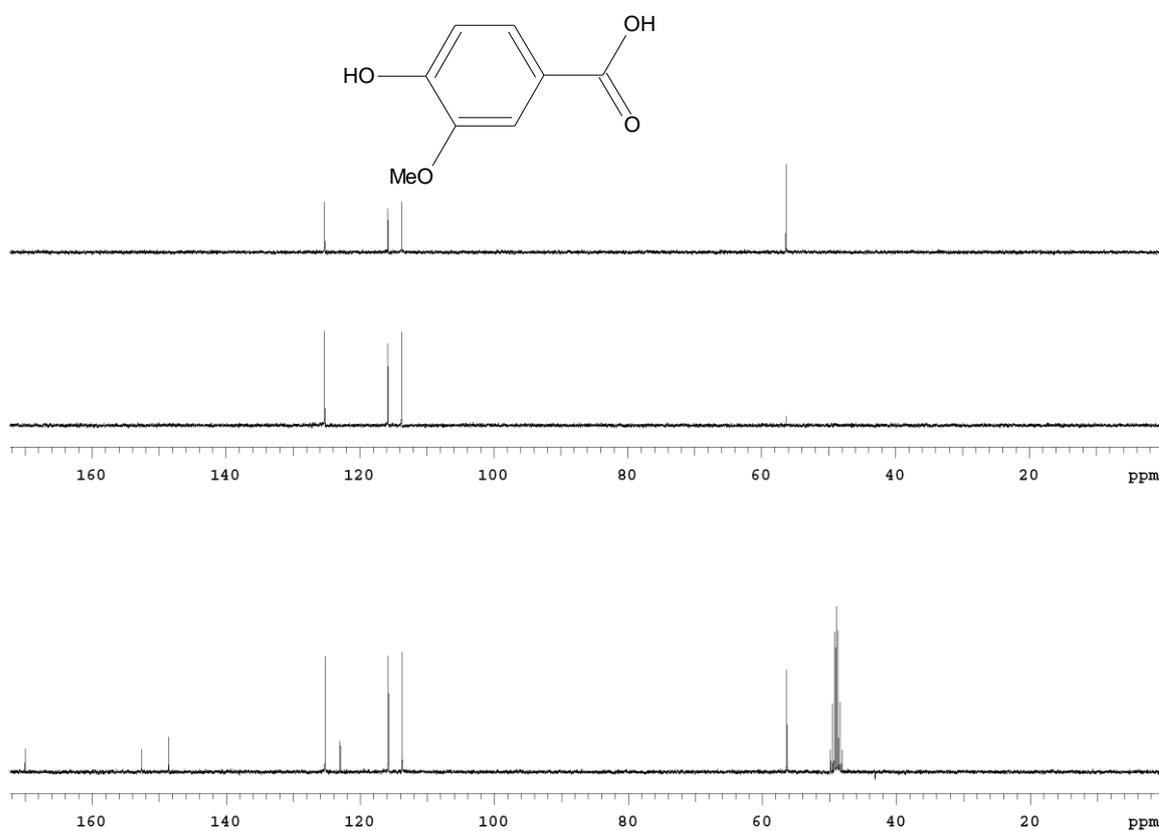
**Tabela 36:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (*m*, *J* em Hz) das substâncias **CEA-10**, **CEA-11** e **CEA-12** comparados com os dados de δ<sub>H</sub> da literatura para os ácidos *p*-salicílico (500 MHz; CD<sub>3</sub>OD), vanílico (200 MHz; CD<sub>3</sub>OD) e siríngico (500 MHz; CD<sub>3</sub>OD) (TAN et al., 2004; ALBARICI, 2006).

| H     | CEA-10                    | Ac. <i>p</i> -salicílico  | CEA-11                          | Ac. vanílico                    | CEA-12               | Ac. siríngico        |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| 2     | 7,86<br>( <i>d</i> , 9,0) | 7,86<br>( <i>d</i> , 8,6) | 7,54<br>( <i>d</i> , 1,8)       | 7,57<br>( <i>d</i> , 1,8)       | 7,33<br>( <i>s</i> ) | 7,32<br>( <i>s</i> ) |
| 3     | 6,80<br>( <i>d</i> , 9,0) | 6,80<br>( <i>d</i> , 8,6) | -                               | -                               | -                    | -                    |
| 5     | 6,80<br>( <i>d</i> , 9,0) | 6,80<br>( <i>d</i> , 8,6) | 6,83<br>( <i>d</i> , 8,7)       | 6,92<br>( <i>d</i> , 8,2)       | -                    | -                    |
| 6     | 7,86<br>( <i>d</i> , 9,0) | 7,86<br>( <i>d</i> , 8,6) | 7,54<br>( <i>dd</i> , 8,4; 1,8) | 7,42<br>( <i>dd</i> , 8,2; 1,8) | 7,33<br>( <i>s</i> ) | 7,32<br>( <i>s</i> ) |
| MeO-3 | -                         | -                         | 3,88<br>( <i>s</i> )            | 3,96<br>( <i>s</i> )            | 3,88<br>( <i>s</i> ) | 3,84<br>( <i>s</i> ) |
| MeO-5 | -                         | -                         | -                               | -                               | 3,88<br>( <i>s</i> ) | 3,84<br>( <i>s</i> ) |

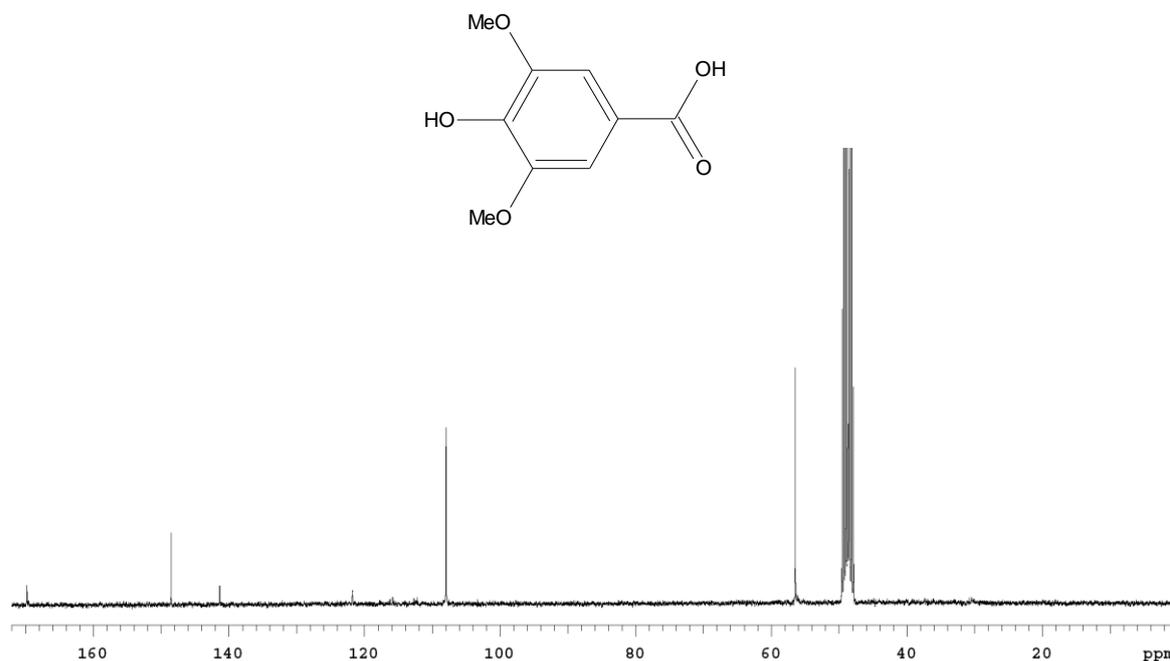
Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para as substâncias **CEA-10**, **CEA-11** e **CEA-12** estão mostrados nas **Figuras 124 a 126** e **Tabela 37**.



**Figura 124:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **CEA-10** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).



**Figura 125:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT da substância **CEA-11** (75,5 MHz; CD<sub>3</sub>OD).



**Figura 126:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **CEA-12** (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

**Tabela 37:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias **CEA-10**, **CEA-11** e **CEA-12**.

| C     | CEA-10 | CEA-11 | CEA-12 |
|-------|--------|--------|--------|
| 1     | n. a   | 123,0  | 122,09 |
| 2     | 133,01 | 113,8  | 108,3  |
| 3     | 116,03 | 148,6  | 148,8  |
| 4     | 163,4  | 152,6  | 141,7  |
| 5     | 116,03 | 115,8  | 148,8  |
| 6     | 133,01 | 125,3  | 108,3  |
| 7     | 170,1  | 170,0  | 170,1  |
| MeO-3 | -      | 56,4   | 56,8   |
| MeO-5 | -      | -      | 56,8   |

As fórmulas moleculares,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ,  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$  e  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$  foram estabelecidas por espectrometria de massas (ESI-MS; **Figuras 127 a 129**), por intermédio dos sinais em  $m/z$  137,1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 191,0305  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 221,0409  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , respectivamente para as substâncias **CEA-10** a **CEA-12** em conjunto com os dados da RMN de  $^{13}\text{C}$ .

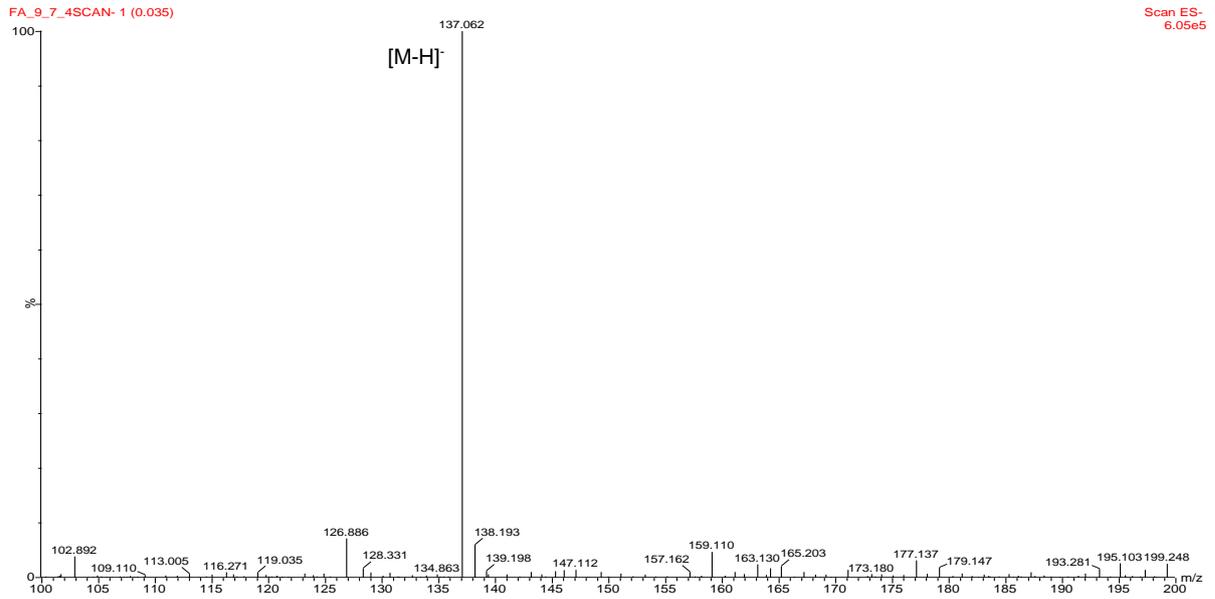


Figura 127: Espectro ESI-MS da substância **CEA-10** no modo negativo.

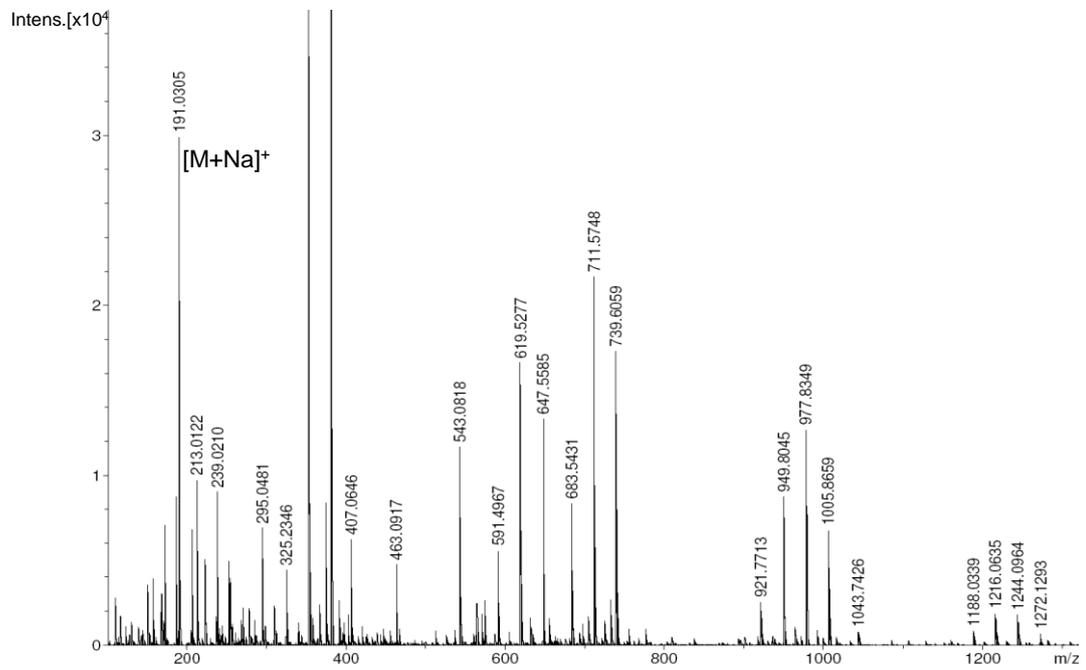


Figura 128: Espectro ESI-MS da substância **CEA-11** no modo positivo.

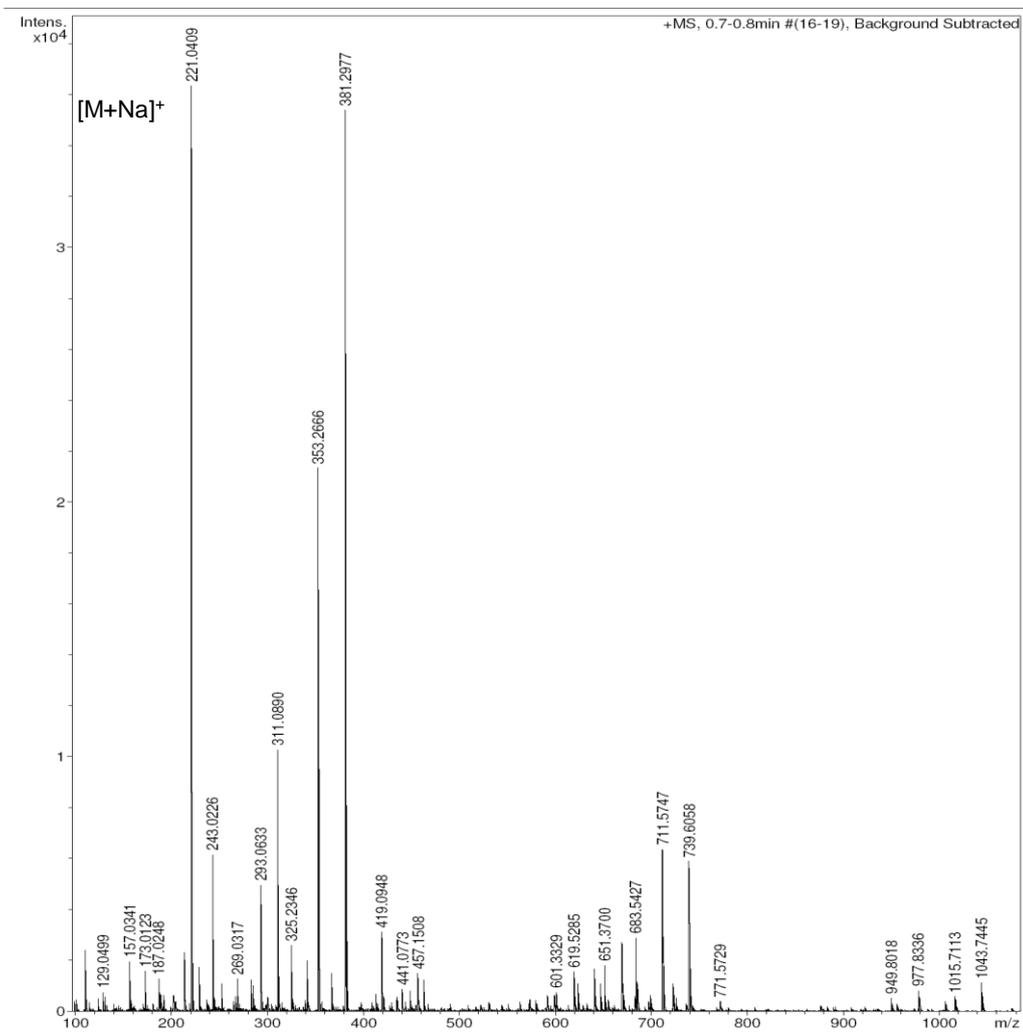


Figura 129: Espectro ESI-MS da substância **CEA-12** no modo positivo.

## 5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 5.5.1 Testes comportamentais

Visando detectar uma possível ação farmacológica, especificamente a ação adaptógena, foi realizada uma série de testes psicofarmacológicos com o extrato bruto liofilizado de *C. echinoides* (CE).

#### 5.5.1.1 Screening tóxico-farmacológico

Os resultados dos experimentos do “screening” tóxico-farmacológico, expressos na **Tabela 38**, servem de parâmetro orientador para ensaios mais específicos e dão informação preliminar sobre níveis de dosagem e tempo de administração que possam ser usadas posteriormente.

**Tabela 38:** Resultados obtidos do teste *screening* farmacológico do extrato bruto de *C. echinoides* em camundongos machos jovens.

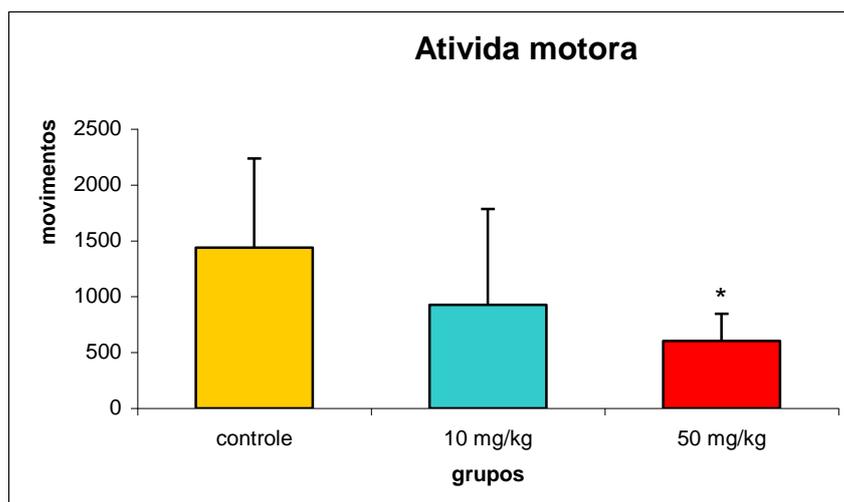
| Efeito observado         | Dose (via intraperitoneal) |     |     |     | Dose (via oral) 500 |
|--------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|---------------------|
|                          | 1                          | 10  | 100 | 500 |                     |
| Mortalidade              | não                        | não | não | 5   | não                 |
| Contorções abdominais    | não                        | não | +   | +   | não                 |
| Tremores                 | não                        | não | +   | +   | não                 |
| Atividade motora         | ++                         | ++  | ▼   | -   | +                   |
| Comportamento de escalar | sim                        | sim | não | -   | não                 |
| Cauda de Straub          | não                        | não | 1   | -   | não                 |

N por grupo= 5 animais; doses em mg/kg; (+) presença, (-)ausência (▼) diminuição do efeito.

O extrato mostrou efeito estimulante em baixas doses nas vias oral e ip, e toxicidade evidente nas maiores doses ip, com mortalidade de 100% do grupo 10 min após a administração. Em vista desse perfil, decidiu-se continuar os testes com a dose de 10 mg/kg e a metade da dose de 100 mg/kg que manifestou efeitos negativos (50 mg/kg). A ocorrência de um caso com cauda de Straub, que é indicativo de estimulação de receptores opioides, indicou como interessante à realização de testes de analgesia.

### 5.5.1.2 Atividade motora

A avaliação estatística dos dados do experimento não confirmou a ação estimulante detectada no *screening* e indicou efeito depressor na maior dose (como apareceu no *screening* na dose de 100 mg/kg). Os resultados estão apresentados na **Figura 130**.



**Figura 130:** Resultados do teste de atividade motora de camundongos jovens (n= 10) tratados agudamente com água (controle) e doses de 10 e 50 mg/kg de extrato liofilizado de CE (via i.p).

### 5.5.1.3 Tempo de sono barbitúrico

No grupo de animais tratados com a dose de 10 mg/kg dois camundongos não dormiram, manifestando uma particularidade fisiológica e por isso não foram considerados. Não foram encontradas diferenças nos dois parâmetros avaliados, latência para iniciar o sono e tempo total de sono entre os três grupos. Novamente a dose de 50 mg/kg mostra perfil depressor, embora sem significância frente ao controle. Os resultados estão expressos na **Tabela 39**.

**Tabela 39:** Resultados obtidos do teste de tempo de sono barbitúrico do extrato de CE em camundongos machos jovens.

| Grupo         | n  | Latência (s) | Tempo de sono (min) |
|---------------|----|--------------|---------------------|
| Controle      | 10 | 2,0 ± 1,1    | 42,3 ± 20,1         |
| 10 mg/kg      | 8  | 2,1 ± 1,3    | 47,0 ± 18,7         |
| 50 mg/kg      | 10 | 2,1 ± 1,0    | 54,0 ± 22,0         |
| significância |    | $p=0,99$     | $p=0,45$            |

#### 5.5.1.4 Coordenação motora

A avaliação envolveu tempo de permanência na barra giratória bem como número de quedas em 3 min de avaliação, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após a administração. Os dados estão expressos na **Tabela 40**.

**Tabela 40:** Resultados obtidos do teste de tempo de coordenação motora do extrato de bruto de CE em camundongos machos jovens.

| Tempo de avaliação (min) | parâmetro | controle  | 10 mg/kg  | 50 mg/kg  | p    |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| 30                       | tempo     | 2,6 ± 0,6 | 2,4 ± 1,0 | 2,7 ± 0,8 | 0,76 |
|                          | n. quedas | 1,3 ± 1,2 | 1,3 ± 1,2 | 1,1 ± 1,2 | 0,92 |
| 60                       | tempo     | 2,9 ± 0,2 | 2,8 ± 0,8 | 2,5 ± 0,9 | 0,40 |
|                          | n. quedas | 0,7 ± 1,2 | 0,9 ± 1,2 | 1,2 ± 1,4 | 0,67 |
| 120                      | tempo     | 2,9 ± 0,3 | 2,8 ± 0,6 | 2,5 ± 0,8 | 0,34 |
|                          | n. quedas | 0,5 ± 0,9 | 0,9 ± 1,1 | 1,0 ± 1,4 | 0,61 |

#### 5.5.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado

Os dados obtidos no teste do labirinto em cruz elevada estão expressos nas **Tabelas 41 e 42**.

**Tabela 41:** Resultados do teste de labirinto em cruz elevado em camundongos tratados por 7 dias com água e duas doses de extrato bruto de CE.

| Grupos        | n  | Braços abertos |               | Braços fechados |               |
|---------------|----|----------------|---------------|-----------------|---------------|
|               |    | Nº entradas    | Tempo (s)     | Nº entradas     | Tempo (s)     |
| Controle      | 10 | 3,7 ± 2,4      | 67,2 ± 42,5   | 6,2 ± 3,7       | 232,8 ± 42,5  |
| 10 mg/kg      | 10 | 2,7 ± 1,5      | 85,5 ± 32,2   | 4,4 ± 2,0       | 214,5 ± 32,2  |
| 50 mg/kg      | 11 | 2,7 ± 2,9      | 60,5 ± 52,7   | 4,1 ± 2,7       | 239,5 ± 52,7  |
| Significância |    | NS<br>p= 0,16  | NS<br>p= 0,41 | NS<br>p= 0,22   | NS<br>p= 0,41 |

NS= não significativo

**Tabela 42:** Resultados do teste de labirinto em cruz elevado em camundongos tratados por 7 dias com água e duas doses de extrato bruto de CE.

| Grupos            | Cruzamentos   |                       | Ameaças de entrada | Mergulhos de cabeça (head dip) | Defecação     |
|-------------------|---------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------|---------------|
|                   | Nº            | Tempo na área central |                    |                                |               |
| controle<br>n=10  | 4,1 ± 2,4     | 39,4 ± 19,5           | 10,8 ± 5,6         | 11,8 ± 7,2                     | 1,1 ± 1,2     |
| 10 mg/kg<br>n= 10 | 3,3 ± 1,9     | <b>16,0 ± 14,3*</b>   | <b>18,6 ± 5,3*</b> | 14,9 ± 4,8                     | 0,4 ± 0,7     |
| 50 mg/kg<br>n= 11 | 3,9 ± 3,1     | <b>12,0 ± 15,2*</b>   | 13,5 ± 7,6         | 11,8 ± 9,3                     | 0,5 ± 0,8     |
| Significância     | NS<br>p= 0,76 | <b>p&lt;0,01</b>      | <b>p&lt;0,05</b>   | NS<br>p= 0,56                  | NS<br>p= 0,19 |

NS= não significativo

Os dados mostram resultados contraditórios, sem prevalência de efeito ansiolítico ou estimulante e com dois resultados significantes igualmente indefinidos isoladamente.

Os resultados obtidos nos testes comportamentais chamam a atenção pela escassez de efeitos positivos significativos o que não tira a relevância dos mesmos. Este fato pode estar associado à natureza dos ensaios, que geralmente são agudos, ou seja, doses únicas ou poucas doses administradas por via intraperitoneal (ip) ou

oral. Esta forma de administração pode não representar necessariamente a forma de ação dos adaptógenos que geralmente não apresentam efeitos agudos notáveis, mas precisam de um tempo mais longo de administração (MARQUES, 1998). Outro fator associado pode ser as doses utilizadas, pois nem sempre existe uma relação direta crescente entre dose e resposta neste tipo de experimento ou seja, podem ser encontrados melhores respostas utilizando-se doses menores. Desta forma, novos experimentos precisam ser feitos, com outras doses e administração prolongada, de modo a poderem expressar mais concretamente o perfil farmacológico dessa espécie.

### **5.5.2 Atividade antioxidante**

Tendo em vista que nem todas as plantas tidas como adaptógenas tenham atividade antioxidante comprovada, mas este efeito pode estar associado na manifestação dos efeitos positivos de várias delas (PANOSSIAN et al., 1999) e certamente contribui para o conjunto de ações dos adaptógenos (MENDES, 2006) foi determinada a capacidade antioxidante do extrato bruto, frações derivadas da partição líquido-líquido, FAQ, FB, FA, FD e FH, e substâncias isoladas da FA que deram resultado positivo em CCD quando reveladas com solução de DPPH.

O método químico utilizando o DPPH para a determinação da capacidade antioxidante destaca-se dentre os demais por ser um método rápido, acessível, que não requer equipamentos sofisticados e poder ser desenvolvido à temperatura ambiente, onde a possibilidade de degradação térmica é reduzida (BONDET et al., 1997). Este método adapta-se bem a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais como extratos brutos vegetais e frações purificadas, podendo ser encontrado diversos relatos na literatura com esta aplicação (HOLLEY e CHEESEMAN, 1993; MENSOR et al., 2001; BRACA, et al., 2002).

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico formando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (KOLEVA et al., 2002). Esta reação produz mudança de coloração violeta para amarelo em aproximadamente 30 min, com intensidade de coloração proporcional à concentração de acordo com a lei de Lambert-Beer, sendo monitorada por espectrofotometria UV em 518 nm. Quanto maior a atividade antioxidante, menor a coloração violeta. Esta mudança de cor

gradativa deve-se ao pareamento gradativo dos elétrons de DPPH disponíveis (BLOIS, 1958).

Os resultados deste método podem ser expressos de várias formas, o que pode causar problemas na comparação de resultados com outros estudos (SHARMA e BHAT, 2009). A forma mais comum de expressão é pelo valor de IC<sub>50</sub>, que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH e, quanto menor for o valor encontrado, maior a atividade antioxidante da amostra. Neste trabalho foram realizadas as curvas para o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub> com, pelo menos, triplicata de amostra e cinco pontos. As concentrações de amostra foram adequadas para reduzir o radical DPPH entre 20 e 80%.

#### 5.5.2.1 Capacidade antioxidante do Extrato Bruto (EB) e das frações FAQ, FB, FA, FD e FH

O IC<sub>50</sub> do EB e das frações analisadas (FAQ, FB, FA, FD e FH) de *C. echinoides* foi obtido pela regressão linear da curva de inibição do DPPH em relação às amostras e estão apresentados na **Tabela 43**.

**Tabela 43:** Atividade antioxidante do EB e das frações FAQ, FB, FA, FD e FH comparados com o trolox.

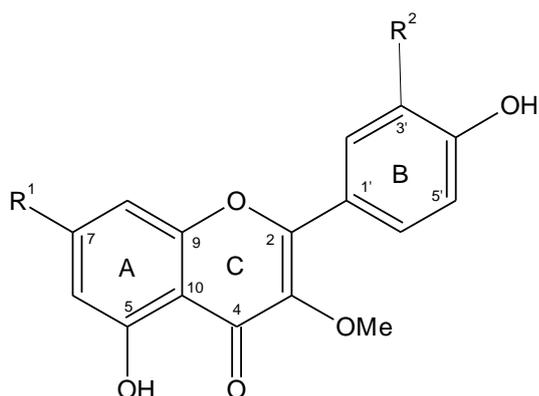
| Amostras           | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|--------------------|--------------------------|
| Extrato Bruto (EB) | 167,6 ± 16,1             |
| Aquosa (FAQ)       | 634,1 ± 34,8             |
| Butanólica (FB)    | 65,7 ± 2,3               |
| Acetato (FA)       | 42,0 ± 0,3               |
| Diclorometano (FD) | 118,7 ± 2,6              |
| Hexânica (FH)      | 3376,2 ± 59,3            |
| Trolox             | 4,5 ± 0,2                |

Os resultados obtidos mostram grande seletividade por parte do solvente utilizado na partição em separar compostos com atividade antioxidante como pode ser observado nas diferenças de  $IC_{50}$  entre a fração FH 3376,2 e FA 48,9  $\mu\text{g/mL}$ , como demonstrado na **Tabela 43**. Das frações testadas, as que apresentaram algum resultado foram as de média polaridade, FA 48,9 e FB 65,7  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparados ao do trolox 4,5  $\mu\text{g/mL}$ , levando-se em consideração que se trata de uma mistura complexa de substâncias comparadas com substância padrão pura.

#### 5.5.2.2 Atividade antioxidante dos flavonoides CEA-6 a CEA-9

Várias substâncias naturais de diferentes classes químicas possuem ação antioxidante reconhecida, especialmente os que possuem um grupo fenólico em sua estrutura. Dentre estes, os flavonoides tem tido especial atenção por ter ampla distribuição, sendo encontrado em praticamente todas as plantas, e bastante presente na dieta alimentar de homens e animais. Flavonoides tem demonstrado que são bons neutralizadores de várias espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e radicais hidroxila e peroxila (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HERNANDEZ et al., 2009; SOUZA e SILVA, 2010). A relação entre a estrutura e a capacidade antioxidante já está bem estabelecida para os flavonoides, sendo que a presença de grupo *orto*-dihidróxi no anel B é um dos principais fatores associados à alta capacidade de alguns deles e ainda, embora com contribuição menos efetiva, a presença de grupos hidroxila nas posições 3 e 5 do anel A (YOO et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2009; SOUZA e SILVA, 2010).

Os flavonoides isolados **CEA-6** a **CEA-9** foram avaliados quanto à atividade antioxidante e os valores de  $IC_{50}$  foram determinados (**Tabela 44**).



CEA-6 a CEA-9

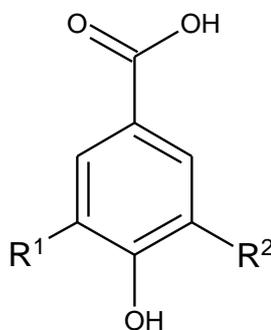
**Tabela 44:** Atividade antioxidante dos flavonoides **CEA-6** a **CEA-9** comparados com o trolox.

| Flavonoide                | Cód          | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> (μM) |
|---------------------------|--------------|----------------|----------------|-----------------------|
| 3-O-metilcanferol         | <b>CEA-6</b> | OH             | H              | 71,3 ± 2,2            |
| 3-O-metilquercetina       | <b>CEA-7</b> | OH             | OH             | 9,2 ± 0,3             |
| 3,7-di-O-metilquercetina  | <b>CEA-8</b> | MeO            | OH             | 11,0 ± 0,6            |
| 3,3'-di-O-metilquercetina | <b>CEA-9</b> | OH             | OMe            | 47,5 ± 1,2            |
| Trolox                    | -            | -              | -              | 17,8 ± 0,8            |

Os resultados obtidos estão concordantes com o exposto em relação à estrutura atividade destas substâncias (**Tabela 44**). A substância **CEA-7** apresentou a maior capacidade antioxidante seguida da **CEA-8**, ambas com grupo *orto*-dihidróxi no anel B, com valores de IC<sub>50</sub> inferiores ao do trolox. Pode-se observar também a pouca influência da substituição do grupo hidroxila na posição R<sup>1</sup> por um grupo metoxila em **CEA-8**. Já a substituição do grupo hidroxila por metoxila na posição R<sup>2</sup> da **CEA-9** ou a inexistência deste em **CEA-6** representa um decréscimo significativo na atividade.

### 5.5.2.3 Atividade antioxidante dos derivados de ácido benzóico CEA-10 a CEA-12

Os valores obtidos de IC<sub>50</sub> para a série de ácido benzóico nomeados de **CEA-10** a **CEA-12** estão demonstrados na **Tabela 45**.



**CEA-10 a CEA-12**

**Tabela 45:** Atividade antioxidante dos derivados de ácido benzóico **CEA-10** a **CEA-12** comparados com o trolox.

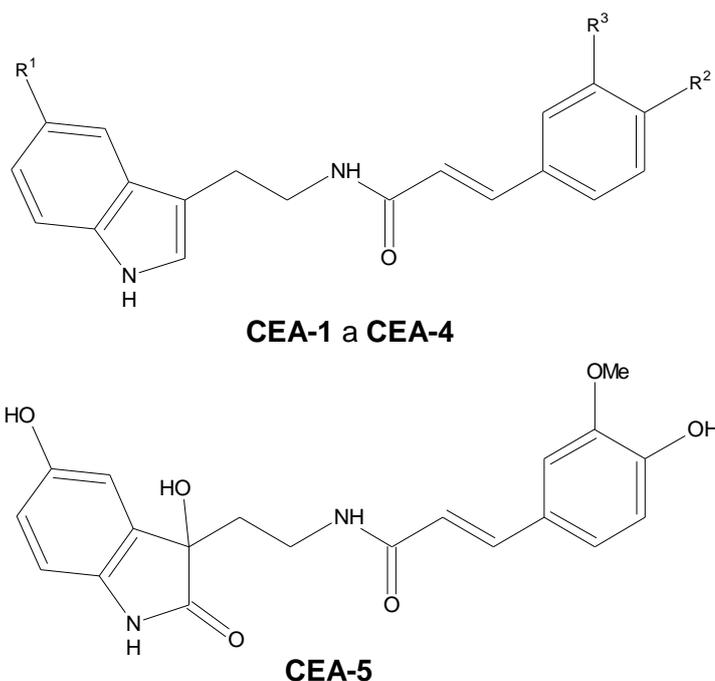
| Substância                 | Cod.          | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> (μmol/L) |
|----------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------------------|
| Ácido <i>p</i> -salicílico | <b>CEA-10</b> | H              | H              | n. a.                     |
| Ácido vanílico             | <b>CEA-11</b> | MeO            | H              | 75,5 ± 7,86               |
| Ácido siríngico            | <b>CEA-12</b> | MeO            | MeO            | 20,2 ± 0,7                |
| Trolox                     | -             |                |                | 17,9 ± 1,1                |

n.a.—não apresentou atividade.

Nota-se, como esperado, que conforme insere-se grupos oxigenados doadores de elétrons vizinhos a hidroxila, a capacidade antioxidante das substâncias aumenta. Este resultado contribui na afirmação desta proposição para os compostos fenólicos em geral (KAJIYAMA e OHKATSU, 2001; SOARES, 2002).

### 5.5.2.4 Atividade antioxidante dos alcaloides CEA-1 a CEA-5

Os valores de IC<sub>50</sub> para os alcaloides **CEA-1** a **CEA-5** foram determinados seguindo-se o mesmo protocolo utilizado para os flavonoides e estão demonstrados na **Tabela 46**.



**Tabela 46:** Atividade antioxidante dos alcaloides **CEA-1** a **CEA-5** comparados com o trolox.

| Substância   | Cód          | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | IC <sub>50</sub><br>(μmol/L) |
|--|--------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|
| <i>N-trans-p</i> -coumaroil-triptamina               | <b>CEA-1</b> | H              | OH             | H              | 203,7 ± 25,3                 |
| <i>N-trans-p</i> -coumaroil-5-hidroxitriptamina      | <b>CEA-2</b> | OH             | OH             | H              | 10,7 ± 0,4                   |
| <i>N-trans-4</i> -metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina | <b>CEA-3</b> | OH             | MeO            | H              | 17,5 ± 0,4                   |
| <i>N-trans</i> -feruloil-5-hidroxitriptamina         | <b>CEA-4</b> | OH             | OH             | OMe            | 14,5 ± 0,4                   |
| <i>N-trans</i> -feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona    | <b>CEA-5</b> | OH             | OH             | OMe            | 30,0 ± 0,7                   |
| Trolox   | -            | -              | -              | -              | 17,9 ± 1,1                   |

A comparação dos resultados obtidos leva a sugerir que a presença de grupo hidroxila na posição R<sup>1</sup> da unidade triptamina é fundamental para a atividade antioxidante destes alcaloides. Chama a atenção o valor de IC<sub>50</sub> do alcaloide **CEA-1** (203,7 µmol/L), comparado com o do **CEA-2** (10,7 µmol/L), cuja única diferença estrutural é a presença da referida hidroxila sendo que, este último, obteve atividade antioxidante relativamente maior do que o trolox (17,9 µmol/L). Nota-se também que o grupo triptamina parece ser a parte da molécula de maior influência nos resultados, pois variações nos grupos R<sup>2</sup> e R<sup>3</sup> dos alcaloides **CEA-2**, **CEA-3** e **CEA-4**, não levam a grandes variações de resultado como o observado no caso dos alcaloides **CEA-1** e **CEA-2**. A comparação do valor de IC<sub>50</sub> do alcaloide **CEA-4** com o do **CEA-5** mostra que a ausência do grupo 5-hidroxitriptamina leva a um decréscimo da atividade antioxidante, mostrando a importância desta unidade para a atividade sequestradora do radical livre DPPH.

### 5.5.3 Atividade citotóxica dos alcaloides CEA-1 a CEA-5

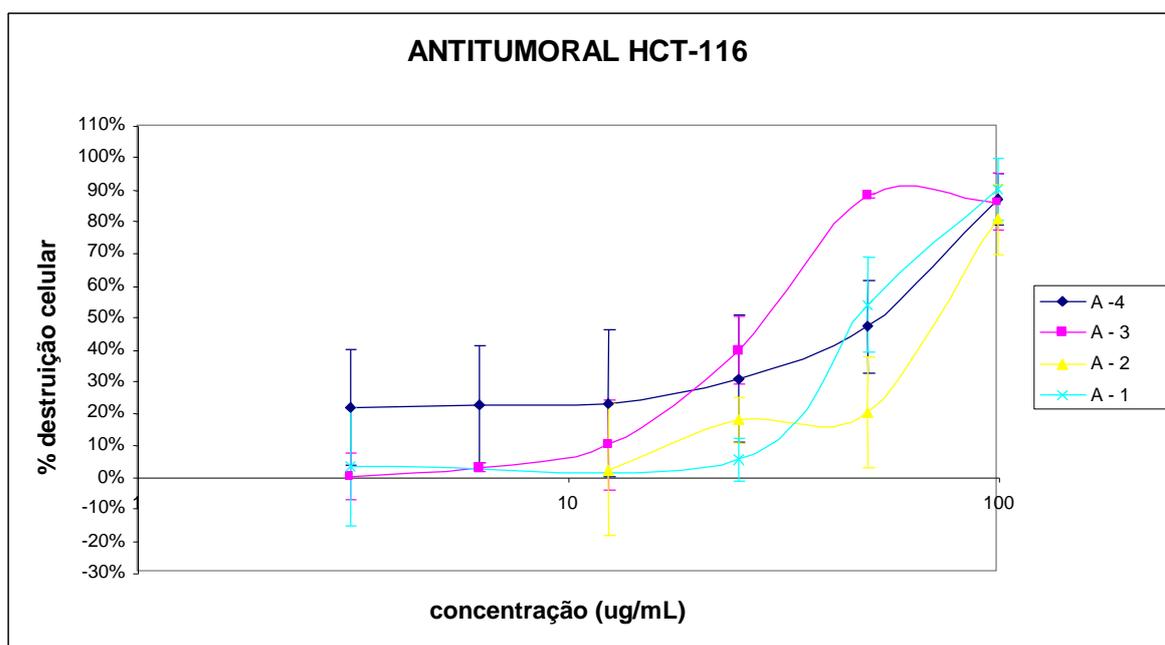
Os alcaloides isolados foram testados contra a linhagem de células tumorais de cólon humanas HCT-116 pelo ensaio da sulforhodamina tendo em vista que foi encontrado relato de atividade citotóxica significativa (28,54 µg/mL) contra células tumorais Caco2 (cólon) para a moschamina (SHOEB et al., 2006), o mesmo alcaloide isolado neste trabalho denominado de **CEA-4**.

Os alcaloides foram testados nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL, em triplicata e em pelo menos 3 momentos diferentes (experimentos independentes) e os resultados obtidos estão expressos na **Tabela 47** e **Figura 131**.

**Tabela 47:** Atividade citotóxica dos alcaloides isolados **CEA-1** a **CEA-5**.

| Substância   | Cód          | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|--|--------------|--------------------------|
| <i>N-trans-p-coumaroil-triptamina</i>                    | <b>CEA-1</b> | 47,5 ± 9,4               |
| <i>N-trans-p-coumaroil-5-hidroxitriptamina</i>           | <b>CEA-2</b> | 72,7 ± 0,5               |
| <i>N-trans-4-metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina</i>      | <b>CEA-3</b> | 29,3 ± 3,3               |
| <i>N-trans-feruloil-5-hidroxitriptamina</i> (moschamina) | <b>CEA-4</b> | 53,3 ± 22,7              |
| <i>N-trans-feruloil-3,5- dihidroxindolin-2-ona</i>       | <b>CEA-5</b> | n.a.                     |

n.a.- não apresentou atividade.

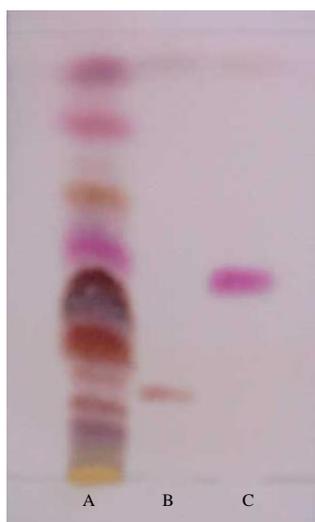


**Figura 131:** Resultados do teste de atividade antitumoral HCT-116 dos alcaloides **CEA-1** a **CEA-4**.

Dentre os alcaloides testados destaca-se o **CEA-3** com  $IC_{50}$  de  $29,3 \mu\text{g/mL}$  e morte de 90% das células tumorais na concentração de  $72 \mu\text{g/mL}$ . Esta atividade antitumoral pode ser considerada significativa se comparada a encontrada para a moschamina,  $28,54 \mu\text{g/mL}$ , contra células tumorais Caco2 (SHOEB et al., 2006). Entretanto deve-se levar em consideração que o Instituto Nacional do Câncer (NCI) americano preconiza valores menores que  $30 \mu\text{g/mL}$  para ensaios preliminares com extrato bruto de plantas, para serem promissoras fontes de novas substâncias com atividade antitumoral (JOKHADZE et al., 2007).

## 5.6 CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL

Os resultados das análises de qualidade da matéria-prima vegetal estão expressos na **Tabela 48**. A CCD do extrato metanólico mostra a presença de compostos apolares, tipicamente terpenoides, que são os compostos comumente utilizados como marcadores químicos desta espécie, comparado com dois padrões, o lupeol, encontrado em diversas espécies e famílias vegetais e o diterpeno **CEH-2**, isolado pela primeira vez (**Figura 132**).



**Figura 132:** CCD em cromatoplaça de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> comparativa entre:  
 A - extrato bruto; B - diterpeno **CEH-2** e C - lupeol, eluída com hexano:  
 diclorometano: metanol (6:3:1; v/v) e revelada com anisaldeído sulfúrico.

Estas informações são importantes no sentido de se caracterizar o lenho da planta, parte usada como droga comercial, estabelecendo parâmetros de qualidade e padronização. Esses dados permitem ainda que se identifique e autentique pedaços do lenho isolados, sem a necessidade do material florido e acesso a especialista em taxonomia vegetal.

**Tabela 48:** Resultados do controle de qualidade do lenho de *C. echioides*.

| Análise              | n | Resultado | dp   | CV   |
|----------------------|---|-----------|------|------|
| Granulometria        | 3 | 0,36 mm   | 0,01 | 2,76 |
| Perda por dessecação | 5 | 9,26 %    | 0,07 | 0,82 |
| Teor de extrativos   | 5 | 3,92 %    | 0,19 | 4,97 |
| Cinzas totais        | 5 | 1,24 %    | 0,06 | 4,79 |
| Cinzas insolúveis    | 5 | 0,16 %    | 0,01 | 3,51 |

## 6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da fração FH resultou no isolamento e identificação dos diterpenos tipo clerodano 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17,18-dicarboxilato de metila (nasimalun B) (**CEH-1**), 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila (**CEH-2**), 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila (**CEH-3**), ptychonal-hemiacetal (**CEH-4a**) e ptychonal (**CEH-4b**) (em mistura), e éster metílico do ácido hardwickico (**CEH-5**); o sesquiterpeno *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (**CEH-6**); o triterpeno lupeol (**CEH-7**); os fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol (**CEH-8**) e estigmasterol (**CEH-9**) (em mistura) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**CEH-10**).

O estudo fitoquímico bioguiado pela atividade antioxidante pelo método do DPPH da fração FA resultou no isolamento e identificação dos alcaloides indólicos *N-trans-p*-coumaroil-triptamina (**CEA-1**), *N-trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (**CEA-2**), *N-trans*-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (**CEA-3**), *N-trans*-feruloil-5-hidroxitriptamina (moschamina) (**CEA-4**) e *N-trans*-feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona (**CEA-5**); os flavonoides 3-O-metilcanferol (**CEA-6**), 3-O-metilquercetina (**CEA-7**), 3,7-di-O-metilquercetina (**CEA-8**) e 3,3'-di-O-metilquercetina (**CEA-9**) e os derivados de ácido benzóico 4-hidróxi ácido benzóico (**CEA-10**), 4-hidróxi-3-metóxi ácido benzóico (**CEA-11**) e 4-hidróxi-3,5-dimetóxi ácido benzóico (**CEA-12**).

Os diterpenos 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila (**CEH-2**) e 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila (**CEH-3**), e o alcaloide indólico *N-trans*-feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona (**CEA-5**) são substâncias inéditas na literatura, já o alcaloide *N-trans*-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (**CEA-3**) foi isolado pela primeira vez de um produto natural.

Todas as substâncias identificadas neste trabalho são inéditas para *C. echioides*, sendo de grande relevância para o conhecimento químico desta espécie vegetal. Os compostos ptychonal-hemiacetal (**CEH-4a**), ptychonal (**CEH-4b**), *N-trans-p*-coumaroil-triptamina (**CEA-1**), *N-trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (**CEA-2**) e *N-trans*-feruloil-5-hidroxitriptamina (**CEA-4**) estão sendo relatados pela primeira vez na família Euphorbiacea.

O isolamento de diterpenos clerodânicos corrobora na utilização destes compostos como marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Croton*.

Os resultados obtidos no *screening* farmacológico do EB de *C. echinoides* em camundongos demonstraram efeito estimulante em baixas doses, tanto por administração via oral quanto intraperitoneal (ip) e toxicidade evidente nas maiores doses por via ip.

Os dados da avaliação da atividade motora em camundongos demonstraram efeito depressor na dose de 50 mg/kg.

Houve ausência de significância nos testes agudos de coordenação motora e tempo de sono induzido por hexabarbital em camundongos.

Não foi possível detectar um perfil depressor ou estimulante para o EB no teste do labirinto em cruz elevado utilizando-se camundongos, necessitando de mais testes com outras doses e administração prolongada.

Os resultados dos ensaios de capacidade antioxidante demonstraram a alta atividade da fração **FA** (IC<sub>50</sub> de 48,9 ± 0,2 µg/mL) e das substâncias **CEA-2** (IC<sub>50</sub> de 10,7 ± 0,4 µmol/L), **CEA-3** (IC<sub>50</sub> de 17,5 ± 0,4 µmol/L), **CEA-4** (IC<sub>50</sub> de 14,5 ± 0,4 µmol/L), **CEA-7** (IC<sub>50</sub> de 9,2 ± 0,3 µmol/L), **CEA-8** (IC<sub>50</sub> de 11,0 ± 0,6 µmol/L) e **CEA-12** (IC<sub>50</sub> de 20,2 ± 0,7 µmol/L).

O alcaloide *N-trans*-4-metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina (**CEA-3**) apresentou atividade significativa frente à linhagem de células tumorais de cólon humanas HCT-116 com IC<sub>50</sub> de 29,3 µg/mL e morte de 90% das células tumorais na concentração de 72 µg/mL

## Referências Bibliográficas

- ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. A. Antinociceptive effects of the essential oil of *C. nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, p. 1215-1219, 2002.
- AGNER, A. R.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; PAMPLONA, S. G.; COLUS, I. M. Investigation of genotoxic activity of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**. v. 19, n. 6, p. 377-384, 1999.
- AGRAWAL, P. H. **Carbon-13 NMR of flavonoides: Studies in organic chemistry**. v. 39, Lucknov, India, Elsevier, 1989.
- AGUIAR, C. M. L.; SANTOS, G. M. M. Compartilhamento de recursos florais por vespas sociais (Hymenoptera: *Vespidae*) e Abelhas (Hymenoptera: *Apoidea*) em uma area de caatinga. **Neotropical Entomology**. v. 36, n. 6, p. 836-842, 2007.
- ALBARICI, T. R. Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macropyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, p. 135, 200 f., 2006.
- ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, n. 1, p. 41-49, 1995.
- ANAZETTI, M. C.; MELOA, P. S.; DURAM, N.; HAUNA, M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2,-6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicology**. v. 203, p. 123-137, 2004.
- ANDRIANAIVORAVELONA, J. O.; TERREAUX, C.; SAHPAZ, S.; RASOLONDRAMANITRA, J.; HOSTETTMANN, K. A phenolic glycoside and *N*-(*p*-coumaroyl)-tryptamine from *Ravensara anisata*. **Phytochemistry**. v. 52, p. 1145-1148, 1999.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V. T.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. F.; SILVA-FILHO, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. **Pharmaceutical Biology**. v. 42, p. 62-67, 2004.

- ARAÚJO-JÚNIOR, V. T.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 3B, p. 553-557, 2005.
- AZEVEDO, K.; ALECHANDRE, A.; LIMA, A.; CAMPOS, C. A.; COSTA, J.; PEREIRA, M. A.; LEITE, A.; MELO, T.; LIMA, A. **Guia para a extração de sangue de grado (*Croton lechleri* Müll. Arg.)**: recomendações técnicas para a extração de látex de sangue de grado (sangue de dragão). Rio Branco-AC: USAID/IPAM, 28p. il. 2008.
- BAGOZZI, D. Traditional medicine. World Health Organization Fact sheet nº 134. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em 14 mar. 2005.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no cariri paraibano. **Oecologia Brasiliensis**. v. 11, n. 3, p. 313-322, 2007.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária da UFV: Viçosa, p. 198-202, 1984.
- BATATINHA, M. J. M.; SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, p. 53-57, 1995.
- BERNARDI, M. M.; DE SOUZA-ESPINOSA, H.; BATATINHA, M. J. M.; GIORGI, R. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 33, p. 285-288, 1991.
- BERRY, P. E.; HIPPEL, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EEL, B. W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**. v. 92, p. 1520–1534, 2005.
- BETTOLO, R. M.; SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**. v. 18, p. 520, 1979.
- BLOIS M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**. v. 181, pp. 1199-1200, 1958.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft un-Technologie**. v. 30, p. 609-615, 1997.

- BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p. 379-381, 2002.
- BRACHER, F.; RANDAU, K. P.; LERCHE, H. Crotonopone, a new tropone derivative from *Croton zehntneri*. **Fitoterapia**. v. 79, p. 236–237, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 60 p. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS-PNPIC-SUS/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde. 92 p. (Série B), 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Brasília: Ministério da Saúde; 2006b.
- CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. v. 34, n. 1, p. 265-268, 1993a.
- CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. v. 32, n. 3, p. 755-760, 1993b.
- CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M. H.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 6, p. 2033-2040, 1991.
- CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.(orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A., VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**. v. 148, p. 288–294, 2007.
- CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.)- I Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 17, p. 37-64, 1986.

- CARLINI, E. *Screening* farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 32, n. 2, p. 265-274, 1972.
- CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**. v. 21, n. 6, 740-743, 1998.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- CHARAM I. Há ações afrodisíacas nas plantas medicinais do Brasil? **A Folha Médica**. n. 94, v. 5, p. 303-309, 1987.
- CHEN, Z. P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J. D. Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of Dragon's blood. **Planta Médica**. v. 60, p. 541-545, 1994.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytotherapy Research**. v. 11, p. 299– 304, 1997.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. **Phytotherapy Research**. v. 12, p. 189– 194, 1998.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed., Campinas: Editora Unicamp, 1997.
- CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**. v.73, p.479-483, 2002.
- COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**. v. 50, n. 1, p. 117-122, 1998.
- CRAVEIRO, A. A., AFRÂNIO, G. A., ANDRADE, H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. E.; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, CE, 1981.

- CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Essential and fatty oils of *Croton sonderianus*. **Revista Latinoamericana de Química**. v.9, p.95-97, 1978.
- 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*. **Journal of Natural Products**. v. 44, n. 5, p. 602-608, 1981b.
- CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**. v. 21, p. 2571-2574, 1982.
- CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ FILHO, R.; MASCARENHAS, I. P. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**. v. 20, n. 4, p. 852-854, 1981a.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. The New York Botanical Garden Press: New York, p. 555, 1988.
- DAL BÓ, S.; JUGERSEN, S.; HORST, H.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 85, p. 317-323, 2006.
- DE PAULA, A. C.; GRACIOSA, J. S.; TOMAA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; BRITO, A. R. M. S. The antiulcer effect of *Croton cajucara* Benth in normoproteic and malnourished rats. **Phytomedicine**. v. 15, p. 815-825, 2008.
- DEBELLE, F. D.; VANHERWEGHEM, J. L.; NORTIER, J. L. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. **Kidney International**. v. 74, n. 2, p. 158-169, 2008.
- EL BABILI, F.; FABRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**. v. 77, p. 384-387, 2006.
- EL BABILI, F.; MOULIS, C.; BON, M.; RESPAUD, M. R.; FOURASTE, I. Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. **Phytochemistry**. v. 48, p. 165-169, 1998.
- EMEA. Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing Aristolochia species. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Working Party on Herbal Medicinal Products. 2000. Disponível em <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/hmpc/002300en.pdf>>. Acesso em 08 ago. 2004.

- EMEA. Summary Report – Aristolochia. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Committee for veterinary medical products. 1997. Disponível em <<http://www.eu.int/pdfs/vet/mrls/027197en.pdf>>. Acesso em 14 ago. 2004.
- ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**. v. 12, p. 570–576, 2005.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª Ed., 2010.
- FISHER, H.; MACHENB, T. E.; WIDDICOMBE, J. H.; CARLSON, T. J. S.; KING, S. R.; CHOWK, J. W. S.; LLEK, B. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v.93, p. 351–357, 2004.
- FORERO, E.; CHAVEZ, R. BERNAL, H. Y. Agrotecnologia para el cultivo de sangre de grado o sangregado. In: MARTINEZ J. V.; BERNAL, H. J.; CACERES, A. Fundamentos de agrotecnologia para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo: Santafé de Bogotá; Co, p. 157-190, 2000.
- FROLDI, A.; ZAGOTTO, G.; FILPPINI, R.; MONTOPOLI, M.; DORIGO, P.; CAPARROTTA. L. Activity of sap from *Croton lechleri* on rat vascular and gastric smooth muscles. **Phytomedicine**. v. 16, p. 768–775, 2009.
- GONZALEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; HANSON, J. R. The <sup>13</sup>CNMR spectra of some *ent*-18-hydroxykaur-16-*enes*. **Phytochemistry**. v. 20, p. 846-847, 1981.
- GOVAERTS, R.; FRODIN D. G.; RADCLIFFE-SMITH A. **World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae) 1-4**. The Royal Botanic Gardens, Kew, Great Britain. 2000.
- GRAYER, R. J.; ECKERT, M. R.; LEVER, A.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; PATON, A. J. Distribution of exudates flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 38, p. 335–341, 2010.
- GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**. v.115, p 361–380, 2008.
- GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL FILHO, V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 409–412, 2005.

- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.
- HASAN, C. M.; KHAN, S.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Nasimaluns A and B: neoclerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 410-411, 2000.
- HEINRICH, M. Ethnopharmacology in the 21st century – grand challenges. **Frontiers in Pharmacology**. v. 1, p. 1-3, 2010.
- HERNANDEZ, I.; ALEGRE, L.; BREUSENGEM, F. V.; MUNNE-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in Plant Science**. v. 14, n. 3, p. 125-132, 2009.
- HEYMANN, H.; TEZUKA, Y.; KIRUCHI, T.; SUPRIYATNA, S. Constituents of *Sindora sumatrana* Miq. I. isolation and NMR spectral analysis of sesquiterpenes from the dried pods. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 42, n. 1, p. 138-146, 1994.
- HOLLEY, A. E; CHEESEMAN, K. H. Measuring free radical reactions *in vivo*. **British Medical Bulletin**. v. 49, p. 494-505, 1993.
- HOLIDNIY, M.; KOCH, J.; MISTAL, M.; SCHIMIDT, J. M.; KHANDWALA, A.; PENNINGTON, J. E.; PORTER, S. B. A double blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the safety and efficacy of orally administered SP-303 for the symptomatic treatment of diarrhea in patients with AIDS. **American Journal of Gastroenterol**. v. 94, p. 3267-3273, 1999.
- ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 549-551, 1992.
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal of Natural Products**. v. 46, n. 5, p. 752-753, 1983.
- ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKA, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, O.; INAMATSU, M.; TAYEKA, K. A cytotoxic substance from Sangre de Grado. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 39, p. 1041-1042, 1991.
- JENETT-SIEMS, K.; WEIGL, R.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; EICH, E. Ipobscurines C and D: macrolactam-type indole alkaloids from the seeds of *Ipomoea obscura*. **Phytochemistry**. v. 62, p. 1257-1263, 2003.

- JOKHADZE, M.; ERISTAVI, L.; KUTCHUKHIDZE, J.; CHARIOT, A.; ANGENOT, L.; TITS, M.; JANSEN, O.; FREDERICH, M. In vitro cytotoxic of some medicinal plants from Georgian *Amaryllidaceae*. **Phytotherapy research**. v. 21, p. 622-624, 2007.
- JOLY, A. B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. Companhia Editora Nacional: São Paulo, p.398-406, 2002.
- KAJIYAMA, T.; OHKATSU, Y. Effect of *para*-substituents of phenolic antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**. v. 71, p. 445-452, 2001.
- KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**. v. 74, 496–511, 2011.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R. BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSSEN, J. P.; DE GROOTT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**. v.13, p. 8-17, 2002.
- LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**. v. 65, n. 6, p. 553-557, 1999.
- LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decrease blood pressure through na action upon vascular smooth muscle: studies in OCA-salt hypertensive rats. **Planta Medica**, v. 66, n. 2, p. 138-143, 2000.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001.
- LEE, H. L.; KIM, H. J.; SONG, Y. S.; JIN, C.; LEE, K. T.; CHO, J.; LEE, Y. S. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Archives of Pharmacal Research**. v. 26, n. 12, p. 1018-1023, 2003.
- LOPES e LOPES, M. I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 437–445, 2004.

- LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. estudo químico dos óleos essenciais do *Croton zehntneri* de Viçosa (CE) e do *Zanthoxylum syncarpum* de Fortaleza (CE). In: 23ª Reunião Anual da SBQ, 2000, Poços de Caldas. Anais da 23ª Reunião Anual da SBQ, 2000.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; ARRUDA, A. C. Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados de *C. cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. **Revista Universidade Rural Série Ciências Exatas Terra** v. 18 n. 20, p. 17–34, 1998b.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; DA SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**. v.49, n.3, p.823-828, 1998a.
- MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; COLUS, I. M.; FARIAS, R. A.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.
- MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**. v. 12, p. 172–177, 1998.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 18, p. 539–546, 2004.
- MARQUES, L. C. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen – *Amaranthaceae*. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, p. 61, 145 fls., 1998.
- McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**. v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.
- McCHESNEY, J. D.; SILVEIRA, E. R. 12-Hydroxyhardwickic acid and sonderianial, neo-clerodanes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**. v. 28, n. 12, p. 3411-3414, 1989.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

- MENDES, F. R. Plantas adaptógenas. **Sociedade Brasileira de Medicina Farmacêutica**, p. 5, 19 fls., Disponível em <<http://sbfm.org.br>>, 2006.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127–130, 2001.
- MEZA, E. N.; PARIONA, M. Nombres aborígenes peruanos de los especies de *Croton* que producen el látex denominado sangre de grado. Fondo Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima, 1999. p.44.
- MILLER, M. J. S.; MacNAUGHTON, W. K.; ZHANG, X. J., THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M., BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**. v. 279, p. 192-200, 2000.
- MILO, B.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S. Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**. v. 65, p. 1143-1146, 2002.
- MOURA, V. L. A.; MONTE, F. J. O. A new casbane type diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **Journal of Natural Products**. v. 53, n. 6, p. 1566-1571, 1990.
- MÜELLER, J. *Croton*. **Flora Brasiliensis**. Von Martius, v.11, n.2, p.81-274, 1873.
- NARDI, G. M.; DAL BÓ, S.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, p. 73–78, 2006.
- NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DAL BÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**. v. 10, p. 176–184, 2003.
- NARDI, G. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Baillon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**. v. 14, p. 115–122, 2007.
- NASCIMENTO, H. E. Estrutura e dinâmica de populações arbóreas de um fragmento de floresta estacional semidecidual na região de Piracicaba, São Paulo Brasil. São Carlos. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 59, n. 2, p. 329-342, 1999.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.
- OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. Ed. Atheneu: São Paulo, 1998.
- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 34, p. 29-41, 1991.
- PANOSSIAN, A.; WIKMAN, H. Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine**. v. 6, p. 287-300, 1999.
- PAYO, H. A.; DOMINICIS, M. E.; MAYOR J.; OQUENDO, M.; SARDUY, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del genero *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**. v. 35, p. 203-206, 2001.
- POZZOLI C. Sù con le piante! Quattro antidote tradizionali contro le disfunzioni erettile. **Erboristeria Domani**. (sem vol. e número), P. 52-58, março,1999.
- PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N.; BLAKE, D. A.; FARNSWORTH, N. R. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 68, n. 1, p. 124-126, 1979.
- PERES, M. T. L. P.; DELE MONACHE, F.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) **Journal of Ethnopharmacology**. v. 56, p. 223–226, 1997.
- PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELE MONACHE. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 1, p 171-174, 1998.
- PIATO, A. L.; RIZON, L. P.; MARTINS, B. S.; NUNES, D. S.; ELISABETTSKY, E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Marapuama) in mice. **Phytotherapy Research**. v. 23, n. 4, p. 519-24, 2009.
- PIATO A. L.; DETANICO B. C.; LINCK, V. M.; HERMANN, A. P.; NUNES, D. S.; ELISABETTSKY, E. Anti-stress effects of the "tonic" *Ptychopetalum olacoides* (marapuama) in mice. **Phytomedicine**. v. 17, n. 3-4, p. 48-53, 2010.
- PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.; CALOMME, M.; BERGHE, V. D. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Product**. v.56, n.6, p.899-906, 1993.

- PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; TOTTE, V. J.; BERGHE, V. D.; VLIETINCK, A. *In vivo* wound healing activity of dragon's blood (*Croton* spp.) a traditional South American drug, and its constituents. **Phytomedicine**. v.2, p.17-22, 1995.
- PINEDO, P. M.; RENGIFO, E.; CERRUTI, T. **Plantas medicinales de la amazonia peruana: estudio de su uso y cultivo**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazônia Peruana, 315 p., 1997.
- PINHO-DA-SILVA, L.; MENDES-MAIA, P. V.; GARCIA, T. M. N.; CRUZ, J. S.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat air way smooth muscle. **Phytomedicine**. v. 17, p. 721-725, 2010.
- POERSCH, A.; VIEIRA DOS SANTOS, F.; MACIEL, M. A. M.; CAMARA, J. K. P.; DANTAS, T. N. C.; COLLUS, I. M. S. Protective effect of DCTN (*trans*-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. **Mutation Research**. v. 629, p. 14–23, 2007.
- POLLITO, P. A. Z. Dendrologia, anatomia do lenho e “status” de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004. 200f.
- PORRAS-REYES, R. H.; LEWIS, W. H.; ROMAN, J.; SIMCHOWITZ, L.; MUSTOE, T. A. Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 203, p. 18-25, 1993.
- RAJ, M.; VEERASAMY, N.; SINGH, V. K. Highly enantioselective synthesis of 3-cycloalkanone-3-hydroxy-2-oxindoles, potential anticonvulsants. **Tetrahedron letters**. v. 51, p. 2157-2159, 2010.
- RAO, V. S.; GURGEL, L. A.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; MARTINS, D. T. O.; CECHINEL-FILHO, V. SANTOS, F. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 357–360, 2007.
- RIZSK, A. F. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 94, p. 293-326, 1987.
- ROENGSUMRAM, S.; SAMMIT, A. D.; PETSOM, A.; VILAIIVAM, T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Phytochemistry**. v. 50, p. 449-453, 1999.

- ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine**. v. 10, p. 139–144, 2003.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. I. F.; NEGRI, G.; Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.
- SANDOVAL, M.; OKURAMA, N.; CLARK, M.; ANGELES, F.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. S. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 80, p. 121-129, 2002.
- SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**. v. 77, p. 2953–2963, 2005.
- SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.
- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry** v. 113, pp. 1202–1205, 2009.
- SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants, **Bangladesh Journal of Pharmacology**. v. 1, p. 35-45, 2006.
- SHOEB, M.; MacMANUS, S. M.; JASPARS, M.; TREVIDU, J.; NAHAR, L.; KONGTHOO-LIN, P.; SARKER, S. D. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea Montana* (Asteraceae), and *in vitro* cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. **Tetrahedron**. v. 62, p. 11172-11177, 2006.
- SILVA, R. A. D. Plantas medicinais brasileiras: estudo botânico e farmacognóstico – muirapuama. **Revista Brasileira de Medicina e Farmacia**. v. 1, n. 1, p. 37-41, 1925. Republicada pela **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 70, n. 2, p. 34-35, 1989.
- SILVA R. A. D. Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1149p. 1926.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O genero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernanbuco, Brasil. **Rodriguesia**. v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.

- SILVA, A. L., PINTO A. L. S., BARDINI, S., NETTO, C. A., NUNES D. S., ELIZABETSKY, E. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, p.199-203, 2004.
- SILVA, R. M.; OLIVEIRA, F. A.; CUNHA, K. M. A.; MAIA, J. L.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Cardiovascular effects of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. **Vascular Pharmacology**. v. 43, n.1, p.11-18, 2005.
- SILVEIRA, E. R. Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste- *Croton sonderianus* Muell. Arg. Dissertação de mestrado, Fortaleza, 1979.
- SIQUEIRA, R. J. B.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sciences**. v. 78, p. 2365 – 2372, 2006.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDEIRO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82, p.1107-1112, 1990.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDEIRO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82, p.1107-1112, 1990.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOUZA e SILVA, M. B. Flavonoides com capacidade antioxidante. Química Aplicada, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos%20DI%20PDF/Artigo%20Marisa.pdf>. Acesso em: Dez. 2010.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.
- STHAL, E. **Thin Layer chromatography**. New York: Springer Verlag, 1962.
- STILL, W. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923-2924, 1978.

- SUZUKI, Y.; KINASHI, H.; TAKEUCHI, S.; KAWARADA, A. (+)-5-hydroxy-dioxindole-3-acetic acid, a synergist from rice bran of auxin-induced ethylene production in plant tissue. **Phytochemistry**. v. 16, p. 635-637, 1977.
- TAKAHASHI T., MIYAZAWA, M. Synthesis and structure-activity relationships of phenylpropanoid amides of serotonin on tyrosinase inhibition, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, n. 7, p. 1983-1986, 2011.
- TAN, J.; BEDNAREK, P.; LIU, J.; SCHNEIDER, B.; SVATOS, A.; HAHLBROCK, K. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. **Phytochemistry**. v. 65, p. 691–699, 2004.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Clerodane diterpenoids with NGF-potentiating activity from *Ptychopetalum olacoides*. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 1760-1763, 2008.
- TROVO, M. M.; SILVA, E. R.; LEÃO, E. R. Terapias alternativas/ complementares no ensino público e privado: análise do conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. **Revista Latino Americana de Enfermagem**. v. 11, n. 4, p. 483-489, 2003.
- UBILLAS, R. SP 303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the sap of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine**. v.1, p. 77–106, 1994.
- VAISBERG, A. J.; MILLA, M.; PLANAS, M. C.; CORDOVA, J. L.; AGUSTI, E. R.; FERREYRA, R.; MUSTIGA, M. C.; CARLIN, L.; HAMMOND, G. B. Taspine is the cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Medica**. v. 55, n. 2, p.140-143, 1989.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VLIETINCK, A.; PIETERS, L.; APERS, S. Legal requirements for the quality of herbal substances and herbal preparations for the manufacturing of herbal medicinal products in the european union. **Planta Medica**. v. 75, n. 7, p. 683-688, 2009.
- VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7 ed ., Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, 1993.
- WANG, Y.; HAMBURGER, M.; GUEHO, J.; HOSTETTMANN, K. Antimicrobial flavonoides from *Psiadia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. **Phytochemistry**. v. 28, n. 9, p. 2323-2327, 1989.
- WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (*Euphorbiaceae*). **Taxon**. v. 42, p. 793-823, 1993.

- WEBSTER, G.L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annales Missouri Botanical Garden**. v. 81, p. 3-32, 1994.
- WEBSTER, G.L.; DEL-ARCO-AGUILAR, M. J.; SMITH, B. A. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 121, p.41-57, 1996.
- WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on uña de gato and sangre de grado. **Alternative Medicine Review**. v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.
- WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A. Identification of C-24 epimers of marine sterols by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 56, p. 1898-1901, 1978.
- YOO, H.; KIM, S. H.; LEE, J.; KIM, H. J.; SEO, S. H.; CHUNG, B. Y.; JIN, C.; LEE, Y. S. Synthesis and antioxidant activity of 3-methoxyflavones. **Bulletin Korean Chemical Society**. v. 26, n. 12, p. 2057-2060, 2005.
- ZHANG, H. L.; NAGATSU, A.; WATANABE, T.; SAKAKIBARA, J.; OKUYAMA, H. Antioxidative compounds isolated from sanflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 45, n. 12, p. 1910-1914, 1997.