

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

Estudo Químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae)

Dissertação de Mestrado

Clêrton Linhares Gomes

Fortaleza - Ceará 2010

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

Estudo Químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química na Área de Concentração em Química Orgânica.**

Aluno: Clêrton Linhares Gomes

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

Fortaleza - Ceará 2010 Este trabalho foi realizado sob a orientação da Prof. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

"Seja modesto, queira o impossível" Che Guevara

"Eu sou eu e minhas circunstâncias" Prof. Nelson Campos

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida e por ter me inserido no seio de uma família excessivamente amável.

À minha mãe Valdênia Maria Linhares e ao meu padrasto Euriberto César que sempre me apoiaram e incentivaram em minhas escolhas.

À minha noiva Eveline e o meu querido enteado lago pelo carinho, cumplicidade, amor e respeito dedicados nestes últimos anos.

Aos meus irmãos, Sabrina e Daniel, sempre ao meu lado, e em que sei onde futuramente poderei contar.

Em memória de meu pai-avô Cristovão Fiúza Gomes que sempre fez tudo para educar seus netos sem medir esforços, sempre lembrarei dos seus ensinamentos.

À minha avó Aurelina e ao meu Pai Clêrton Cunha Gomes que sempre torceram pelo meu crescimento.

À minha avó Yayá que enfrentou várias adversidades na vida, sendo um exemplo de uma pessoa batalhadora e vitoriosa para seus filhos e netos.

À minha orientadora prof. Dra Nilce Viana Gramosa, pela atenção dispensada, pela amizade dedicação e por todas as criticas e sugestões que contribuíram para o meu crescimento e realização desse trabalho.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Química.

Agradecimento ao pesquisador Kirley Marques Canuto e ao Analista Hilton César Rodrigues Magalhães pelos espectros de massas realizados na Embrapa Agroindústria tropical.

Aos meus amigos dos grupos Lafiplam I e II pelo apoio, convivência e horas de descontração.

Aos meus amigos de bancada: Mariano, Vanessa, João Vito, Neto e Antonio Neto pelo apoio nos procedimentos experimentais e pela convivência sempre alegre e divertida.

Aos meus amigos de turma: Luiz Claúdio, Hozana Patrícia, Pérsio, Barbara e Francisco.

Aos funcionários do Departamento: Mundinha, Lana, Sr. Paulo e Célia.

Aos órgãos financiadores CNPQ, CAPES, FUNCAP e PRONEX.

A todos que influenciaram diretamente ou indiretamente nesse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE FLUXOGRAMAS	vii
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	X

INTRODUÇÃO OBJETIVOS	1 4
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	5
1.1 Considerações botânicas sobre a família Euphorbiaceae	6
1.2 Considerações gerais sobre o gênero Croton	6
1.3 Considerações quimiotaxonômicas de C. muscicarpa	7
1.4 Descrição botânica de C. muscicarpa	8
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRAFICA SOBRE OS DADOS DE DE FLAVONAS 3-METOXILADAS E FLAVÓNOIS DO <i>Croton</i>	RMN ¹³ C GÊNERO 10
2.1 Flavonoides: Definição e Biossíntese	
2.2 Dados de RMN ¹³ C de flavonoides: flavonas 3-metoxiladas e flavonois <i>Croton</i>	do gênero
2.2.1 Flovonas 3-metoxiladas	12
2.2.2 Flavonois	24
CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	
3.1 Determinação estrutural de CMF 1	30
3.2 Determinação estrutural de CMF 2	
3.3 Determinação estrutural de CMF 3	50
3.4 Determinação estrutural de CMF 4	58

CAPÍTULO 4 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	.64
4.1 Material botânico	.64
4.2 Métodos cromatográficos	.64
4.3 Métodos físicos	.65
4.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	.65
4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	.65
4.3.3 Espectrometria de massas (EM)	.66
4.4 Ponto de fusão (p.f.)	.66
4.6 Estudo dos constituintes não voláteis de C. muscicarpa	.67
4.6.1 Obtenção dos extrato etanólico das folhas de C. muscicarpa	.67
4.6.2 Tratamento cromatografico do extrato etanólico das folhas de <i>C. muscicarpa</i> (CMEF)	.68
4.6.3 Tratamento cromatografico de CMEF- D e isolamento de CMF 1	69
4.6.4 Tratamento cromatografico de CMEF- D e isolamento de CMF 2	70
4.6.5 Tratamento cromatográfico de CMEF- D e isolamento de CMF 1, 2 e 3	72
4.6.6 Tratamento cromatográfico de CMEF- D e isolamento de CMF 4	72
4.6.7 Tratamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de C. muscicarpa	.74
4.6.8 Tratamento cromatográfico da fração CMHF- H e isolamento de CMF 4	.75

CAPÍTULO 5- AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL DE C.

<i>muscicarpa</i> e C.glutinosus	77
5.1 Introdução	17
5.2 Estudo dos constituintes voláteis de <i>C. muscicarpa</i> e <i>C. glutinosus</i>	77
5.3 Investigação da atividade antibacteriana do óleo essencial de C. glutinosus	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Deslocamento químico RMN ¹³ C-BB de CMF 1 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-CPD e DEPT (θ =135), δ , CD ₃ OD, 125MHz)31
Tabela 2: Comparação dos dados de CMF 1 (RMN 13 C, 125 MHz e RMN 1 H, CD ₃ OD)com os dados da literatura do Canferol (RMN 13 C, 125 MHz, CD ₃ OD)34
Tabela 3: Deslocamento químico RMN ¹³ C-CPD de CMF 2 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-CPD e DEPT (θ = 135), δ , CDCl ₃ , 125 MHz)40
Tabela 4: Comparação dos dados de CMF 2 (RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz e RMN ¹ H 500MHz, CDCl ₃) com os dados da literatura da Casticina (RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz,CDCl ₃)
Tabela 5: Dados de RMN 1 H, 13 C e correlações de 1 H, 13 C -HMBC (3 J) (500x125MHz, CDCl ₃) de CMF 2
Tabela 6: Deslocamento químico de RMN ¹³ C-CPD de CMF 3 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-CPD e DEPT ($\theta = 135$), δ , CDCl ₃ , 125 MHz)
Tabela 7 - Comparação dos dados de CMF 3 (RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz e RMN ¹ H500 MHz, CDCl ₃) com os dados da literatura do 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona(RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz, CDCl ₃)
Tabela 8: Deslocamento químico RMN ¹³ C-CPD de CMF 4 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-CPD e DEPT (θ =135), δ , CDCl ₃ , 125MHz)
Tabela 9: Comparação dos dados de CMF 4 com os dados da literatura do Esqualeno
Tabela 10: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de CMEF-D
Tabela 11: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de CMEF- D71

Tabela 12: Frações reunidas da coluna da fração 4 coluna da CMEF-D	71
Tabela 13: Frações da coluna "flash" da CMEF-D	.73
Tabela 14: Frações provenientes do fracionamento de extrato hexânico de C. <i>muscicarpa</i>	.75
Tabela 15: Frações reunidas após análise por CCD	76
Tabela 16: Composição do óleo essencial das folhas de C.muscicarpa	.81

Tabela 17: Composição do óleo essencial das folhas de C. glutinosus	82
Tabela 18: Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de C. glutinosus	
(OECG)	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias isoladas das folhas de Croton muscicarpa.	3
Figura 2: Núcleos básicos dos principais diterpenos isolados do gênero Croton	6
Figura 3: Metabólitos secundários não-voláteis isolados das raízes de C. muscica	rpa7
Figura 4: Metabólitos secundários não-voláteis isolados do exsudado <i>muscicarpa</i>	de <i>C</i> .
Figura 5: Fotografias de C. muscicarpa (Chapada Diamantina- BA)	9
Figura 6: Biossintese de Flavonóides	11
Figura 7: Estrutura básica de uma flavona	32
Figura 8: Espectro na região de infravermelho de CMF 1 (KBr)	35
Figura 9: Espectro de Massas de CMF 1 (IE 70 eV)	35
Figura 10 : Espetro RMN ¹ H de CMF 1 (500 MHz, CD ₃ OD)	36
Figura 11: Espectro de RMN ¹³ CPD de CMF 1 (125 MHz, CD ₃ OD)	36
Figura 12 : Espectro RMN ¹³ C DEPT (θ =135) de CMF 1 (CD ₃ OD, 125 MHz)	37
Figura 13: Espectro COSY (500 x 500 MHz, CD ₃ OD) de CMF 1	37
Figura 14: Espectro HSQC de CMF 1 (500 x 125 MHz, CD ₃ OD)	38
Figura 16: Espectro no Infravermelho de CMF 2 (KBr)	45
Figura17: Espectro de Massas (IE 70 eV) de CMF 2	45
Figura 18: Espectro RMN ¹ H de CMF 2 (500MHz, CDCl ₃)	46
Figura 19: Espectro de RMN ¹³ C- CPD CMF 2 (125MHz,CDCl ₃)	46
Figura 20: Espectro RMN ¹³ C DEPT de CMF 2 (θ =135) (125 MHz, CDCl ₃)	47
Figura 21: Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H , ¹ H COSY de 0 (500 x 500 MHz, CDCl ₃)	CMF 2 47
Figura 22: Espectro HSQC de CMF 2 (500 x 125 MHz, CDCl ₃)	48
Figura 23: Expansão do espectro de HSQC de CMF 2 (500 x 125 MHz, CDCl ₃)	48
Figura 24: Espectro HMBC de CMF 2 (500 x 125 MHz, CDCl ₃)	49

Figura 25: Espectro na região de infravermelho de CMF 3 (KBr)54	
Figura 26: Espectro de Massas de CMF 3 (IE 70 eV)54	
Figura 27: Espetro RMN ¹ H de CMF 3 (500 MHz, CDCl ₃)55	
Figura 28: Espectro de RMN ¹³ C-CPD de CMF 3 (125 MHz, CD ₃ OD)55	
Figura 29: Espectro COSY (500 x 500 MHz, CDCl ₃) de CMF56	
Figura 30 : Espectro RMN ¹³ C DEPT (θ =135) de CMF 3 (CDCl ₃ , 125 MHz)56	
Figura 31: Espectro HSQC de CMF 3 (500 x 125MHz, CDCl ₃)57	
Figura 32: Espectro HSQC de CMF 3 (500 x 125 MHz, CDCl ₃)57	
Figura 32: Espectro de Infravermelho de CMF 4 (KBr)61	
Figura 33: Espectro de RMN ¹ H de CMF 4 (500 MHz, CDCl ₃)61	
Figura 34: Espectro de RMN ¹³ C-CPD de CMF 3 (125MHz CDCl ₃)62	
Figura 35: Espectro RMN ¹³ C DEPT (θ =135) de CMF 4 (CDCl ₃ , 125 Mhz62	
Figura 36: Espectro de massas de CMF 3 (IE 70 eV)63	
Figura 37: Cromatograma por CG/EM de OECM	
Figura 38: Cromatograma por CG/DIC de OECM	
Figura 39: Cromatograma por CG/EM de OECM	
Figura 40: Cromatograma por CG/DIC de OECM	
Figura 41: Espectro de massas do α-pineno	
Figura 42: Espectro de massas do β-mirceno88	
Figura 43: Espectro de massas do D-limoneno88	
Figura 44: Espectro de massas do α-copaeno88	
Figura 45: Espectro de massas do β-borboneno88	
Figura 46: Espectro de massas do longifoleno88	
Figura 47: Espectro de massas do germacreno D	
Figura 48: Espectro de massas do β-guaieno	
Figura 49: Espectro de massas do cubebol	
Figura 50: Espect ro de massas do δ-amorfeno89	

Figura 51: Espectro de massas do zonareno	89
Figura 52: Espectro de massas do óxido de cariofileno	90
Figura 53: Espectro de massas do viridifloreno	90
Figura 54: Espectro de massas do gossonoro	90
Figura 55: Espectro de massas do β-elemeno	90
Figura 57: Espectro de massas do espatulenol	90

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas de Croton
muscicarpa67
Fluxograma 2: Tratamento cromatográfico de CMEF
Fluxograma 3: Isolamento de CMF 1 e CMF 272
Fluxograma 4: Isolamento de CMF1, CMF 2 e CMF 374
Fluxograma 5: Fracionamento de extrato hexânico de Croton muscicarpa
Fluxograma 4: Isolamento de CMF 476
Fluxograma 5: Esquema de obtenção dos óleos essenciais de C. muscicarpa e
glutinosus

С.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPD	Composite pulse decouplino
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
CG	Cromatografia gasosa
DIC	Detector de ionização por chama

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico de Croton muscicarpa Mull. Arg. (Euphorbiaceae) conhecido popularmente por "Velame de cheiro", bem como, o estudo da composição química volátil das folhas de C. muscicarpa e C. glutinosus. A investigação fitoquímica do extrato etanólico das folhas de C. muscicarpa resultou no isolamento dos flavonóides: canferol (CMF 1), casticina (CMF 2) e 5-hidroxi-3,6,7,4'tetrametoxiflavona (CMF 3). Do extrato hexânico foi obtido o triterpeno identificado como esqualeno (CMF 4). Os compostos isolados foram identificados através dos métodos espectrométricos EM, IV e RMN ¹H e RMN ¹³C, inclusive técnicas bidimensionais (COSY, HMBC e HSQC), bem como, comparação com dados da literatura. O estudo dos constituintes voláteis das folhas de C. muscicarpa resultou na identificação de 15 compostos, sendo o α-pineno (30,0%) e longifoleno (16,4%) os constituintes majoritários. O estudo dos constituintes voláteis das folhas de C. glutinosus resultou na identificação de 9 compostos sendo o a-pineno (51,0%) o majortário seguido do β -mirceno (14,2 %). Os resultados da atividade antibacteriana do óleo das folhas de C. glutinosus mostraram moderado efeito frente às cepas de bactérias Gram-positivas S. aureus e B. subtilis. Este é o primeiro relato do estudo químico dos constituintes não-voláteis das folhas de C. muscicarpa Müll. Arg. (Euphorbiaceae), dos constituintes voláteis de C. muscicarpa e C. glutinosus; e da investigação da atividade antimicrobiana do óleo essenciais obtido das folhas de C. glutinosus.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of Croton muscicarpa Mull. Arg. (Euphorbiaceae), known popularly as "Velame de cheiro", as well as, the chemical composition of the essential oil from C. muscicarpa and C. glutinosus. The phytochemical investigation of the ethanol extract from leaves of C. muscicarpa resulted in the isolation and identification of the flavonoids kaempferol (CMF 1), casticin (CMF 2) and 5-hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone (CMF 3). The squalene was isolated of the hexane extract from the leaves (CMF 4). All isolated compounds were characterized based on IR, MS, ¹H and ¹³C NMR, including 2D analyses (COSY, HSQC and HMBC) and comparison with data from the literature. The study of volatile constituents from leaves of C. muscicarpa resulted in the identification of 15 compounds, and the α -pinene (30.0%) and longifoleno (16.4%) were the major constituents. The study of volatile constituents from leaves of C. glutinosus resulted in the identification of 9 compounds being α -pinene (51.0%) followed by the majortário β myrcene (14.2%). The results of the antibacterial activity of leaf oil of C. glutinosus showed moderate effect against the strains of Gram-positive S. aureus and B. subtilis. This is the first report of the study of chemical constituents of volatile non-leaves of C. muscicarpa Müll. Arg. (Euphorbiaceae), the volatile constituents of C. muscicarpa and C. glutinosus, and investigation of antimicrobial activity of essential oil obtained from the leaves of C. glutinosus.

Introdução

Deste a antigüidade, as plantas fazem parte da vida do homem como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, utensílios para manifestações artísticas, culturais, religiosas e no tratamento de doenças. Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas Farmacopéias da época. Assim, as plantas e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos que pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SIMÕES et al., 2004).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos naturais revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, que há muitos anos vem sendo utilizado na medicina tradicional em diferentes partes do mundo. Tais usos incluem tratamento de câncer, constipação intestinal, diarréia e outros problemas digestivos, diabetes e feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, malária, úlcera e obesidade (SALATINO et al., 2007).

O interesse pelo estudo fitoquímico das folhas foi motivado por relatos na literatura de estudo químico das raízes (BARBOSA FILHO et al., 2005) e do exsudato (BARRETO, 2008) de *C. muscicapa*. Apesar de não haver relatos sobre a utilização desta espécie na medicina popular.

O presente trabalho descreve o estudo dos constituintes voláteis e da composição dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Croton muscicapa* coletada na Chapada Diamantina no Estado da Bahia, bem como, o estudo dos constituintes voláteis das folhas de *C. glutinosus* e a investigação da atividade antimicrobiana de *C. glutinosus*.

O estudo fitoquímico das folhas de *C. muscicapa* resultou no isolamento de três flavonóides e um triterpeno. O triterpeno foi caracterizado como esqualeno (CMF 4) e os flavonóides foram caracterizados como 3,5,7,4' tetrahidroxiflavona (canferol, CMF 1), 5,3'-dihdroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (casticina, CMF 2) e 5-hidroxi-3,6,7,4' tetrametoxiflavona (CMF 3) (Fig. 1).

Este trabalho divide-se em cinco capítulos, 1) Considerações Botânicas, 2) Revisão bibliográfica sobre dados de RMN ¹³C de flavonóides: flavonas 3metoxiladas e flavonóis no gênero *Croton*, 3) Determinação Estrutural, 4) Estudo dos constituintes voláteis de *C. muscicapa* e *C. glutinosus* e 5) Procedimento Experimental.

No primeiro capítulo são relatadas informações quimiotaxonômicas sobre *C. muscicapa*, o gênero *Croton* e a família Euphorbiaceae.

O segundo capítulo aborda a revisão bibliográfica sobre dados de RMN ¹³C de flavonóides: flavonas 3-metoxiladas e flavonois no gênero *Croton*.

O terceiro capítulo trata das determinações estruturais dos compostos isolados, utilizando técnicas como Espectroscopia na região do Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C), incluindo técnicas bidimensionais como COSY, HMBC e HSQC.

No quarto capítulo são citadas as técnicas utilizadas para o isolamento dos constituintes não voláteis de *C. muscicapa* entre elas cromatografia gravitacional, utilizando gel de sílica.

O quarto capítulo trata do estudo dos constituintes voláteis das folhas de *C*. *muscicapa* e *C*. *glutinosus*, bem como, a investigação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *C*. *glutinosus*.



Figura 1: Substâncias isoladas das folhas de C. muscicapa.

OBJETIVOS

<u>Geral</u>

Contribuir com o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Croton*, investigando os principais metabólitos secundários das folhas da espécie *C. muscicarpa*, estudo dos constituintes voláteis de *C. muscicarpa* e *C. glutinosus*, e investigação da atividade antimicrobiana de *C. glutinosus*.

Específicos

- Isolar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas de Croton muscicarpa;
- Identificar os constituintes químicos isolados utlizando métodos Espectrométricas como Espectrometria de Massas, Espectroscopia na região do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C uni e bidimensional;
- Obter óleos essenciais das folhas de C. muscicarpa e C. glutinosus;
- Identificar os constituintes principais dos óleos essenciais das folhas de *C*. *muscicarpa* e *C. glutinosus*;
- Investigação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *C*. *glutinosus*;

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

1.1 Considerações botânicas sobre a família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é complexa e diversificada com aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies distribuídas principalmente na região dos trópicos. (WEBSTER, 1994). Os gêneros mais representativos são *Euphorbia* (1500 espécies), *Croton* (1300 espécies) e *Phyllanthus* (400 espécies). No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies representadas por todos os tipos de vegetação e habitats (CONSERVA et al., 2005).

"Essa família apresenta plantas bastante variadas, existindo ervas, árvores, sub-arbustos e também trepadeiras, com folhas alternadas internas ou partidas, em geral estipuladas, latentes ou não. Flores sempre de sexo separado, em geral monoclamídeas, ocorrendo também diclamídeas em plantas monóicas, reunidas em inflorescência muito variadas, em geral tipo cacho. Às vezes com flores femininas acima (Ricinus) ou em geral embaixo (Croton) ou inflorescência de sexo separado (Euphorbia). No gênero Euphorbia as flores são reunidas em inflorescências especiais denominadas ciátio, sempre com uma flor feminina central e muitos grupos (em geral 5) de flores masculinas. Tanto estas como aquelas são nuas. Estas constam apenas de um único estame. Ovário sempre súpero, caracteristicamente tricarpelar e triocular, cada lóculo contendo 1 ou 2 óvulos (Phyllanthus) . Fruto seco esquizocarpo, separando-se elasticamente em 3 cocos, que se abrem posteriormente. Sementes ricas em endosperma, muitas vezes oleaginoso (Ricinus, Aleurites), providas de grande carúnculos" (JOLY, 1998).

1.2 Considerações gerais sobre o gênero Croton

O gênero *Croton* é o segundo em número da família Euphorbiaceae compreendendo cerca de 1300 espécies de árvores, arbustos e ervas distribuídas nos trópicos e subtrópicos de ambos os hemisférios (SALATINO et al, 2007). Aproximadamente 300 espécies de *Croton* são encontradas no Brasil, muitas das quais são utilizadas na medicina popular, para os mais diversos fins. Dentre as propriedades

farmacológicas destacam-se: antiinflamatória, antiulcerogênica, antidiabética e inibidora da enzima acetilcolinesterase (PALMEIRAS JR et al, 2006).

A química do gênero *Croton* é muito diversa. Os terpenóides são os metabólitos secundários mais encontrados no gênero, sendo os diterpenos os mais comuns, como clerodano, cembrano, traquilobano, halimanos, cauranos, e labdanos. Os triterpernos pentacíclicos e esteroides são relatados freqüentemente nesse gênero. Outras classes de produtos naturais como alcaloides, flavonóides, saponinas, fenilbutanoides têm também sido isoladas de espécies de *Croton* (CONSERVA et al, 2005).



Figura 2: Núcleos básicos dos principais diterpenos isolados do gênero Croton.

1.3 Considerações quimiotaxonômicas de C. muscicarpa

Croton muscicarpa é um arbusto oriundo do Nordeste brasileiro, popularmente conhecido como "velame-de-cheiro" (BARBOSA FILHO et al., 2005). A pesquisa bibliográfica nos <u>sites</u> científicos *SciFinder Scholar*, *Science Direct* e *Web of Science* possibilitou verificar a existência de um relato sobre isolamento de três alcaloides sesquiterpênicos do tipo-guaiano (Muscicapina A, B e C) e um alcalóide derivado da nicotina anabasina (Fig.3) do extrato etanólico das raízes de *C. muscicarpa* (BARBOSA FILHO, 2005). O triterpeno damaradienol e quatro flavonoides: retusina, pachipodol, ombuina e 5-hidroxi-3,7,4'- trimetoxicanferol foram isolados do exsudado do *C. muscicarpa* em estudo e descritos em trabalhos anterior (BARRETO, 2008).



Figura 3: Metabólitos secundários não-voláteis isolados das raízes de C. muscicarpa



Figura 4: Metabólitos secundários não-voláteis isolados do exsudado de C. muscicarpa

1.4- Descrição botânica de Croton muscicarpa.

Arbusto de 1 m de altura, erecto, com caule, folhas jovens e inflorescência bastante viscosa. O pecíolo e limbo são subiguais, sendo o limbo palmatinérvio de 3 a 5 cm de comprimento, sem glândulas na base; as estípulas são suborbiculares, com inflorescência longas de 5 a 8 cm de comprimento. As flores femininas são longas pecioladas, lacínia do cálice feminina linear-lanceolada de ambos os glandulos; petalada

masculina, com a base interna pubescente, margem liciada com ambos as faces sem pêlo; as brácteis, de 2,5 mm de comprimento, são linear-lanceolada em ambas faces com glândulas pequenas. Os frutos de 8 mm de comprimento são escuros e brilhantes, contendo sementes de 6 mm de comprimento e 3,5 mm de largura (MARTIUS, 1873) (Fig. 5, p. 9).



A-Fotografia de um exemplar de C. muscicarpa



B- Fotografia detalhes dos frutos e folhas de C. muscicarpa

Figura 5: Fotografias de C. muscicarpa na Chapada Diamantina-Ba.

2- Revisão bibliográfica sobre os dados de RMN ¹³C de flavonas 3-metoxiladas e flavonóis no gênero *Croton*.

Neste levantamento bibliográfico são apresentados os dados de RMN ¹³C de flavonas 3-metoxiladas e flavonóis isolados do gênero *Croton*. Os dados fornecidos foram obtidos de artigos publicados até maio de 2010, através de pesquisas buscadas no *Scifinder* e nos "<u>sites</u>" científicos *Science direct (http://www.sciencedirect.com)* e *Web of Science (<u>http://www.isiwebofknowledge.com</u>).*

2.1- Flavonóides: definição e biossintese.

Flavonoide é uma classe de compostos fenólicos de origem natural. Sua estrutura básica consiste em um núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C_6 - C_3 - C_6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Fig. 7, pág 23). Os anéis A e B são hidroxilados e podem conter substituintes metoxilados (HERRMANN et al, 2001).

Existem aproximadamente 8000 flavonóides relatados na literatura. Eles apresentam origem biossintética mista, com parte da molécula proveniente da rota do ácido chiquímico e parte do ácido mevalônico, com estrutura química baseada no esqueleto 2-fenilcromano. Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato, via ácido malônico, com posterior ciclização da estrutura (DI CARLO et al., 1999) (Fig.6, pág 11)

Algumas das espécies do gênero *Croton* tem apresentado atividade antioxidante que pode ser relacionado à presença de flavonóides. É importante notar, entretanto, que nenhuma investigação direcionada para flavonóides, que é normalmente feito em extrato hidroalcoolico, foi realizada com as espécies de *Croton*. Assim, é bastante possível que por isso flavonóis e/ flavonas glicosiladas não tenham sido detectados nas análises químicas para este gênero.



Figura 6: Biossintese de Flavonóides

2.2-Dados de RMN ¹³C flavonóides: flavonas 3-metoxilados e flavonois no gênero *Croton*.

Na tabela 1 são descritos as espécies de *Croton* que apesentam flavonóides do tipo flavona 3- metoxiladas e flavonois.

Flavonóide	Espécie	Referência
Isocampferideo	C. glabellus	GARCIA et al., 2006
-	C. insularis	GRAIKOU et al., 2005
3,7-Dimetoxicanferol	C. cajucara	MACIEL et al., 2000
3,7-Dimetoxicanferol	C. cajucara	MACIEL et al., 2000
3,7,4'-Trimetoxicanferol	C. cajucara	MACIEL et al.,2000
Penduletina	C. brasiliensis	CONSERVA et al., 2005
	C. Sellowii	PALMEIRA JR et al.,
		2006
Crisosplenol D	C. brasiliensis	CONSERVA et al.,2005
Artemitina	C. brasiliensis	CONSERVA et al.,2005
	C. Sellowii	PALMEIRA JR et al.,
		2006
Crisosplenetina	C. Sellowii	PALMEIRA JR et al.,
		2006
	C. brasiliensis	CONSERVA et al.,2005
Casticina	C. Sellowii	PALMEIRA JR et al.,
		2006
3-Metoxiquercetina	C. glabellus	GARCIA et al.,2006
3,4'-Dimetoxiquercetina	C. arboreous	RIOS & AGUILAR-
		GUADARRAMA et al.,
		2004
Aianina	C. schiedeanus	CONSERVA et al., 2005
Crisosplenol D	C. brasiliensis	CONSERVA et al.,2005

Tabela1: Espécies de Croton que contêm flavonóides em relatodas literatura.

Tabela1: Espécies de *Croton* que contêm flavonóides em relatodas literatura.Cont.

Flavonóide	Espécie	Referência
Retusina	C. muscicarpa	BARRETO, 2008
	C. ciliatoglanduliferus	GONZALEZ et al., 2006
Canferol	C. glabellus	GARCIA et al., 2006
	C. insularis	GRAIKOU et al., 2005
7,4'-Dimetoxicanferol	C. cajucara	MACIEL et al., 2000
Quercetina	C. cajucara	MACIEL et al., 2000
Isorhamnetina	C. cajucara	MACIEL et al.,2000

A análise dos dados de RMN ¹³C para flavanóides 3-metoxiladas e flavonóis de *Croton* permitiu a proposição de 2 grupos de flavanóides levando-se em conta as substituições no anel B.

Grupo 1: Flavonas e flavonóis substituídos em 4'

Grupo 2: Flavonas e flavonóis substituídos 3'e 4'

As flavonas 3-metoxiladas do grupo 1 (Quadro 1) não mostraram variações significativas no deslocamento químico de C-4' na presença ou não de metoxila nesta posição, como o observado para o 3,7-dimetocanferol e 3,7,4'- trimetoxicanferol. Entretanto, quando se trata dos flavanóis canferol e 7-4'-dimetoxicanferol, a presença da metoxila em C-4' desprotege os carbonos em 5,7 ppm.

A substituição do hidrogênio em C-6 por um grupo metoxila resulta na proteção significativa dos carbonos C-5 e C-7, bem como, do carbono C-8, como o observado para o 3,7-dimetoxicanferol e a penduletina, que variou de δc 92,4 para δc 90,4, respectivamente. As diferenças maiores nos valores de δc refrem-se aos carbonos C-5 e C-7 destes compostos.

Os flavanóides pertencentes ao grupo 2 (Quadro 2) apresentam as posições 3'e 4' substituidos por grupos hidroxilas e/ou metoxila. O carbono em 4' é, em geral, mais desprotegido do anel B, especialmente se ligado a um grupo metoxila. Esta desproteção pode ser relacionada com efeito mesomérico retirador da carbonila. Na comparação dos valores de δc do crisosplenol D, artemitina, crisosplenetina e casticina pode ser observado que não houve influência nos dados de δc dos carbonos do anel A frente a alternância entre presença de hidroxila ou metoxila nas posições 3' e 4'.

Quadro 1: Flavonas e flavonóis substituídos em 4'





Quadro 2: Flavonas e flavonóis substituídos 3'e 4'



Quadro 2 : Flavonas e flavonóis substituídos 3'e 4'(Cont)

CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3.1 Determinação Estrutural de CMF 1

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas de *C. muscicarpa* (CMEF-D) resultou no isolamento de 55,4 mg de cristais amarelos, com (p.f 265° - 267 ° C) denominado CMF 1.

O espectro na região do Infravermelho de CMF 1 (Fig. 8, p. 35) apresentou uma banda larga centrada em 3461 cm⁻¹ referente à deformação axial de ligação O-H, uma banda em 1650 cm⁻¹ compatível com uma carbonila conjugada, bandas em 1606 e 1504 cm⁻¹ referentes às vibrações de deformação axial de ligação C=C_{arom} e bandas em 1183 e 1070 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CD₃OD) de CMF 1 (Fig. 11, p. 36) apresentou 13 linhas espectrais, uma relacionada a carbonila em $\delta_{\rm C}$ 177,5 e as outras 12 entre $\delta_{\rm C}$ 165,7 e 94,6. Dos carbonos, seis eram oxigenados $\delta_{\rm C}$: 165,7; 162,7; 160,7; 158,4; 148,2 e 137,3.

A comparação dos espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT (θ = 135) (125 MHz, CD₃OD) de CMF 1 (Fig. 12, p. 37) revelou a presença de 9 sinais relativo a carbonos não hidrogenados e 6 de carbonos mono-hidrogenados (Tab. 1, p. 31).

С	СН	
177,5 (C=O)	130,9 (2x)	
165,7 (C-O)	115,7 (2x)	
162,7 (C-O)	99,4	
160,7 (C-O)	94,6	
158,4 (C-O)		
148,2 (C-O)		
137,3 (C-O)		
123,9		
104,7		
9C	6CH	
Fórmula molecular: CicHioOc		

Tabela 1: Deslocamento químico de RMN ¹³C-CPD de CMF 1 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³C-CPD e DEPT ($\theta = 135$), δ , CD₃OD, 125 MHz)

Formula molecular: $C_{15}H_{10}O_6$

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 9, p. 35) forneceu um pico correspondente ao íon molecular com razão massa/carga (m/z) de 286 Da, compatível com a fórmula molecular C₁₅H₁₀O₆, conforme proposta pela análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e IV, com IDH igual a 11. Uma das lacunas foi atribuída a uma carbonila, oito a dois anéis aromáticos e as duas restantes a uma ligação dupla e a um anel. Assim, CMF 1 pode ser relacionado a um flavonoide do tipo flavonol com a estrutura básica contendo 15 átomos de carbono C₆-C₃-C₆.



Figura 7: Estrutura básica de uma flavona

A identificação das posições dos substituintes nos anéis A e B foram sugeridas a partir dos espectros de RMN ¹H (Fig. 11, p. 36) e ¹³C. Os hidrogênios em $\delta_{\rm H}$ 8,09 (d; J= 9,0 Hz; 2H) e 6,90 (d; J = 9,0 Hz; 2H) foram relacionados ao sistema AA'XX' no anel "B". O dupleto em $\delta_{\rm H}$ 8,09 foi relacionado aos hidrogênios H-2' e H-6' desprotegidos devido ao efeito de conjugação com a carbonila, enquanto que o dupleto em $\delta_{\rm H}$ 6,90 foi relacionado aos hidrogênios H-3' e H-5', *orto* à hidroxila. Os dupletos em $\delta_{\rm H}$ 6,39 (d; J = 2 Hz, 1H) e $\delta_{\rm H}$ 6,17 (d; J = 2 Hz, 1H) foram relacionados aos hidrogênios *meta* posicionados H-6 e H-8 do anel A. Os acoplamentos *orto* entre os hidrogênios H-2' e H-3', bem como, H-5' e H-6' foram observados no espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H - COSY (Fig. 13, p. 37).




No espectro bidimensional de correlação heteronuclear do tipo ¹H, ¹³C - HSQC (Fig.14, p. 38) foi possível observar os acoplamento ¹J C-H entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos. Neste espectro foi observado o acoplamento do hidrogênio em $\delta_{\rm H}$ 6,17 (H-6), como o carbono em $\delta_{\rm C}$ 99,4 (C-6), bem como, do hidrogênio em $\delta_{\rm H}$ 6,39 (H-8) com o carbono em $\delta_{\rm C}$ 94,6 (C-8) (Tab. 2, p. 34).

Comparando os dados obtidos com os dados da literatura (MARKHAM et al., 1978) foi possível propor que CMF 1 trata-se do canferol, um importante flavonóide com características antioxidantes, inédito na espécie *C. muscicarpa*, mas descrito anteriormente na espécie *C. caudatus* (GUO-AN ZOU et al., 2010).



CMF 1

Tabela 2 - Comparação dos dados de CMF 1 (RMN ¹³C-CPD, 125 MHz e RMN ¹H 500 MHz, CD₃OD) com os dados da literatura do Canferol (RMN ¹³C-CPD, 125 MHz, CD₃OD).

С		Lit*					
	$\delta_{\rm C}$	δ H	δc				
2	148,2	-	146,8				
3	137,3	-	135,6				
4	177,5	-	175,6				
5	162,7	-	160,7				
6	99,4	6,17 (d; $J = 2$ Hz, 1H)	98,2				
7	165,7	-	163,9				
8	94,6	6,39 (d; $J = 2$ Hz, 1H)	93,5				
9	158,4	-	156,2				
10	104,7	-	103,1				
1'	123,9	-	121,7				
2'	130,9	8,09 (d; $J = 9$ Hz; 1H)	129,5				
3'	115,7	6,90 (d; $J = 9$ Hz; 1H)	115,4				
4'	160,7	-	159,2				
5'	115,7	6,90 (d; $J = 9$ Hz; 1H)	115,4				
6'	130,9	8,10 (d; $J = 9$ Hz; 1H)	129,5				
* Deslocamentos químicos da literatura (MARKHAM et al., 1978).							



Figura 8: Espectro na região de Infravermelho de CMF 1 (KBr), cm⁻¹



Figura 9: Espectro de Massa de CMF 1 (IE 70 eV)



Figura 10: Espetro RMN ¹H de CMF 1 (δ ,500 MHz, CD₃OD)



Figura 11: Espectro de RMN ¹³C-CPD de CMF 1 (δ,125 MHz, CD₃OD)



Figura 12: Espectro RMN ¹³C DEPT (θ =135) de CMF 1 (δ ,CD₃OD, 125 MHz)



Figura 13: Espectro COSY (δ,500 x 500 MHz, CD₃OD) de CMF 1.



Figura 14: Espectro HSQC de CMF 1 (δ , 500 x 125 MHz, CD₃OD)

3.2 Determinação Estrutural de CMF 2

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato etanólico da folhas de *Croton muscicarpa* (CMEF-D) resultou no isolamento de 35,0 mg de cristais amarelos, com ponto de fusão na faixa de 171,5 -173,0 ° C, denominados CMF 2.

O espectro na região do infravermelho de CMF 2 (Fig. 16, p. 45) apresentou uma banda larga centrada em 3456 cm⁻¹ referente à deformação axial de ligação O-H, uma banda em 2931 cm⁻¹ que foi atribuída à deformação axial de C-H de carbono sp³, uma banda em 1651 cm⁻¹ compatível com uma carbonila conjugada, bandas referentes à vibração de deformação axial de ligação C=C_{arom} em 1600 e 1460cm⁻¹ e bandas em 1270 e 1220 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CDCl₃) de CMF 2 (Fig. 19, p. 46) apresentou 19 linhas espectrais, dentre estas, uma em δ_C 179,0, relacionada a uma carbonila, e 14 linhas espectrais entre δ_C 158,8 e 90,3 , oito das linhas espectrais observadas foram atribuídas a carbonos oxigenados: δ_C 158,8; 155,6; 152,7; 152,3; 148,7; 145,5; 139,0; 132,2 e quatro a grupos metoxila δ_C 60,9; 60,1; 56,3; 56,0.

A comparação dos espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT (θ = 135) (125 MHz, CDCl₃) de CMF 2 (Fig. 20, p. 47) revelou a presença de 11 absorções relativas a carbonos não hidrogenados (C), 4 carbonos monohidrogenados (CH) e 4 carbonos metílicos (Tab. 3, p. 40).

С	СН	CH ₃
179,0 (C=O)	90,3	56,0
158,8 (C-O)	106,6	56,3
155,6 (C-O)	110,4	60,1
152,7 (C-O)	114,3	60,9
152,3 (C-O)		
148,7 (C-O)		
145,5 (C-O)		
139,0 (C-O)		
132,2 (C-O)		
123,6		
121,6		
11C	4CH	4CH ₃

Tabela 3: Deslocamento químico RMN ¹³C-CPD de CMF 2 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³C-CPD e DEPT ($\theta = 135$), δ , CDCl₃, 125 MHz)

Fórmula molecular: C₁₉H₁₈O₈

O espectro de massa obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 17, p. 45) forneceu o pico correspondente ao íon molecular com razão massa/carga (m/z) de 374 Da, compatível com a fórmula molecular C₁₉H₁₈O₈, conforme proposta pela análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e IV, compatível com IDH igual a 11 . Uma das lacunas foi atribuída a uma carbonila, oito a dois anéis aromáticos e as outras duas restantes, a uma ligação dupla e a um anel. Sendo assim, CMF 2 pode ser relacionado a um composto com a estrutura básica de 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), característico de um flavonóide do tipo flavona.

No espectro de RMN ¹H de CMF 2 (Fig. 18, p. 46) foram observados três sinais característicos de hidrogênios aromáticos em $\delta_{\rm H}$ 7,74 (dd; J = 9 Hz; 2 Hz; 1H), $\delta_{\rm H}$ 7,69 (d; J = 2 Hz; 1H) e 6,98 (d; J = 9 Hz; 1H) que foram relacionados a um sistema ABX no anel "B". Este sistema foi confirmado a partir das informações obtidas do espectro bidimensional de correlação homonuclear COSY (Fig. 21, p. 47), que mostrou claramente o acoplamento *orto* do H-5' ($\delta_{\rm H}$ 6,98) com H-6' ($\delta_{\rm H}$ 7,74), observado na estrutura abaixo. Observou-se ainda o acoplamento do H-2' ($\delta_{\rm H}$ 7,69) com H-6' ($\delta_{\rm H}$ 7,74) e os acoplamentos *orto* e *meta* do H-6'($\delta_{\rm H}$ 7,74) com H-5'($\delta_{\rm H}$ 6,98) e H-2' ($\delta_{\rm H}$ 7,69) respectivamente, observado na estrutura abaixo. No mesmo espectro, foi observado ainda um singleto em $\delta_{\rm H}$ 6,52 (1H), referente a um hidrogênio do anel A. Quatro sinais com integração para 3H foram observados entre $\delta_{\rm H}$ 4,00 e 3,87 referentes a hidrogênios de metoxila, sugerindo um flavonoide tetrametoxilado.



O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC de CMF 2 (Fig.22 e Fig 23, p. 48) mostrou as correlações entre os hidrogênios metoxilados em $\delta_{\rm H}$ 4,00; 3,93; 3,91 e 3,87 com os carbonos em $\delta_{\rm C}$ 56,0 (4'-OCH₃), 56,3 (7-OCH₃), 60,9 (6-OCH₃) e 60,1 (3'-OCH₃), respectivamente. Ainda no HSQC foram observadas as correlações entre os hidrogênios aromáticos em $\delta_{\rm H}$ 7,69 (H-2'), $\delta_{\rm H}$ 6,98 (H-5'), $\delta_{\rm H}$ 7,74 (H-6') com $\delta_{\rm C}$ 114,3 (C-2'), 110,4 (C-5') e 121,6 (C-6'), respectivamente.

A partir da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear C-H a duas ou mais ligações HMBC de CMF 2 (Fig.24, p. 49) foi possível propor posicionamento do grupo metoxila em $\delta_{\rm H}$ 3,87 já que foi observada uma correlação a três ligações (³ J) com o carbono em $\delta_{\rm C}$ 139 (C-3). As correlações entre os hidrogênios metoxílicos $\delta_{\rm H}$ 3,91, 3,93 e 4,00 ppm com os carbonos $\delta_{\rm C}$ 132,2, 158,8 e 148,7, mostrou que estas metoxilas estavam posicionadas nos carbonos C-6, C-7 e C-4', respectivamente. Comparando os dados experimentais com os dados da literatura (BROWN et al., 2003), foi possível propor que CMF 2 trata-se do flavonóide conhecido como casticina, inédito na espécie *C. muscicarpa*, mas descrito anteriormente para as espécies do gênero *Croton brasiliensis* (CONSERVA et al, 2005) e *Croton sellowianos* (PALMEIRA JR et al., 2006)



Casticina

Tabela 4 - Comparação dos dados de CMF 2 (RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz e RMN ¹ H
500 MHz, CDCl ₃) com os dados da literatura do Casticina (RMN ¹³ C-CPD, 125 MHz,
CDCl ₃).

	CMF 2					
С	δς	$\delta_{ m H}$	δc			
2	155,6	-	155,7			
3	139,0	-	139,0			
4	179,0	-	179,0			
5	152,7	-	152,7			
6	132,2	-	132,3			
7	158,8	-	158,8			
8	90,3	6,52 (s; 1H)	90,4			
9	152,3	-	152,4			
10	106,6	-	106,6			
1'	123,6	-	123,6			
2'	114,3	7,69 (d; $J = 2$ Hz; 1H)	114,4			
3'	145,6	-	145,6			
4'	148,7	-	148,8			
5'	110,4	6,98 (d; <i>J</i> = 8,5 Hz; 1H)	110,4			
		7,74 (dd; <i>J</i> = 10,5 Hz; 2				
6'	121,6	Hz; 1H)	121,6			
6-OMe	60,9	3,91 (s; 3H)	60.9			
7-OMe	56,3	3,93 (s; 3H)	56,3			
3-OMe	60,1	3,87 (s; 3H)	60,2			
4'-OMe	56,0	4,00 (s; 3H)	56,1			

* Deslocamentos químicos da literatura em $CDCl_3$ (BROWN et al., 2003).

		HMBC	
С	δc	δ H	δς
			³ J
2	155,6	-	-
3	139,0	-	3-OMe
4	179,0	-	-
5	152,7	-	-
6	132,2	-	6- OMe
7	158,8	-	7- OMe
8	90,3	6,52 (s; 1H)	-
9	152,3	-	-
10	106,6	-	-
1'	123,6	-	-
2'	114,3	7,69 (d; <i>J</i> = 2 Hz; 1H)	-
3'	145,6	-	-
4'	148,7	-	4'- OMe
5'	110,4	6,98 (d; <i>J</i> = 8,5; 1H)	-
		7,74 (dd; $J = 10,5$ Hz; $J =$	
6'	121,6	2Hz; 1H)	-
6-OMe	60,9	3,91 (s; 3H)	-
7-OMe	56,3	3,93 (s; 3H)	-
3-OMe	60,1	3,87 (s; 3H)	-
4'-OMe	56,0	4,00 (s; 3H)	-

Tabela 5: Dados de RMN 1 H, 13 C e correlações de 1 H, 13 C -HMBC (3 *J*) (500 MHz, CDCl₃) de CMF 2



Figura 16: Espectro no Infravermelho de CMF 2 (KBr), cm⁻¹



Figura17: Espectro de Massas (IE 70 eV) de CMF 2



Figura 18: Espectro RMN ¹H de CMF 2 (δ, 500 MHz, CDCl₃)



Figura 19: Espectro de RMN ¹³C- CPD CMF 2 (δ,125 MHz, CDCl₃)



Figura 20: Espectro RMN ¹³C DEPT (θ =135) de CMF 2 (δ ,125 MHz, CDCl₃)



Figura 21:Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H , ¹H COSY de CMF 2 $(\delta, 500 \times 500 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$



Figura 22: Espectro HSQC de CMF 2 (\delta, 500 x 125 MHz, CDCl₃)



Figura 23: Expansão do espectro de HSQC de CMF 2 (δ, 500 x 125MHz, CDCl₃)



Figura 24: Espectro HMBC de CMF 2 (δ,125 x 500 MHz, CDCl₃)

3.3 Determinação Estrutural de CMF 3

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas de *C. muscicapa* (CMEF-D) resultou no isolamento de 21 mg de cristais amarelos, com ponto de fusão de 171,0 - 175,0 °C, denominado CMF 3.

O espectro na região do IV de CMF 3 (Fig. 25, p. 53) apresentou uma banda larga centrada em 3442 cm⁻¹ referente à deformação axial de ligação O-H, uma banda em 1660 cm¹ compatível com uma carbonila conjugada, banda em 1590 cm⁻¹ referente a vibrações de deformação axial de ligação C=C_{arom}, duas bandas em 1460 e 1360 cm⁻¹ referentes a deformação angular C-H no plano e uma banda em 1180 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CDCl₃) de CMF 3 (Fig. 28, p. 54) apresentou 17 linhas espectrais, uma relacionada a carbonila em $\delta_{\rm C}$ 179,1 e as outras 12 entre $\delta_{\rm C}$ 161,9 e 90,5. Dos carbonos, 6 carbonos eram oxigenados $\delta_{\rm C}$: 161,9; 159,0; 156,2; 153,0; 152,5 e 138,9 e quatro a grupos metoxila $\delta_{\rm C}$ 61,0; 60,3; 56,5; 55,6.

A comparação dos espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT (θ = 135) (125 MHz, CDCl₃) de CMF 3 (Fig. 29, pág 55) revelou a presença de 9 absorções relativas a carbonos não hidrogenados, 6 de carbonos monohidrogenados e 4 de carbonos metoxílicos (Tab. 6, pág 51).

С	СН	CH ₃
179,1 (C=O)	130,3 (2x)	61,0
161,9 (C-O)	114,3 (2x)	60,3
159,0 (C-O)	90,5	56,5
156,2 (C-O)		55,6
153,0 (C-O)		
152,5 (C-O)		
138,9 (C-O)		
132,5 (C-O)		
123,0		
106,8		
10C	3CH	4CH ₃

Tabela 6: Deslocamento químico de RMN ¹³C-CPD de CMF 3 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³C-CPD e DEPT ($\theta = 135$), δ , CDCl₃, 125 MHz)

Fórmula molecular: C₁₉H₁₈O₈

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig.26, p. 54) forneceu um pico correspondente ao íon molecular com razão massa/carga (m/z) de 358 Da, compatível com a fórmula molecular C₁₉H₁₈O₈, conforme proposta pela análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e IV, com IDH igual a 11 . Uma das lacunas foi atribuída a uma carbonila, oito a dois anéis aromáticos e as duas restantes a uma ligação dupla e a um anel. Assim, CMF 3 pode ser relacionado a um flavonóide do tipo flavona com a estrutura básica contendo 15 átomos de carbono C₆-C₃-C₆.

A identificação das posições dos substituintes nos anéis A e B foram sugeridas a partir dos espectros de RMN ¹H e ¹³C. Os hidrogênios em $\delta_{\rm H}$ 8,06 (d; J = 9,0 Hz; 2H) e 7,02 (d; J = 9,0 Hz; 2H) foram relacionados ao sistema AA'XX' no anel "B", semelhante ao sistema proposto para o composto CMF 1. O dupleto em $\delta_{\rm H}$ 8,06 foi relacionado aos hidrogênios H-2' e H-6' desprotegidos devido ao efeito de conjugação com a carbonila, enquanto que o dupleto em $\delta_{\rm H}$ 7,02 foi relacionado aos hidrogênios H-3' e H-5', *orto* à hidroxila. Os acoplamentos *orto* entre os hidrogênios H-2' e H-3', bem como, H-5' e H-6' foram observados no espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H - COSY (Fig. 29, p. 56). Ainda neste espectro, foi observado um singleto em $\delta_{\rm H}$ 6,50 (1H), referente a um hidrogênio do anel A, semelhante ao observado no composto CMF 2. Quatro sinais com integração 3 foram observados entre $\delta_{\rm H}$ 3,96 e 3,86 referentes a hidrogênios de metoxila, sugerindo um flavonoide tetrametoxilado.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear do tipo ¹H, ¹³C - HSQC de CMF 3 (Fig. 30 e 31, p. 57) mostrou as correlações entre os hidrogênios metoxilados em $\delta_{\rm H}$ 3,96; 3,92; 3,90 e 3,86 com os carbonos em δ c 55,6 (4'-OCH₃), 56,5 (7-OCH₃), 61,1 (6-OCH₃) e 60,3 (3'-OCH₃), respectivamente. Ainda nesse espectro foi observada uma correlação entre o hidrogênio aromático em $\delta_{\rm H}$ 6,50 (H-8') com o carbono em δ c 90,5 (C-8), assim como o composto CMF 3.

Comparando os dados obtidos com os dados da literatura (PAULA et al., 2006) foi possível propor que este composto trata-se do flavonoide 5-hidroxi-3,6,7,4'tetrametoxiflavona, ainda não relatado no gênero *Croton*.



CMF 3

Tabela 7 - Comparação dos dados de CMF 3 (RMN 13 C-CPD, 125 MHz e RMN 1 H500 MHz, CDCl₃) com os dados da literatura do 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona(RMN 13 C-CPD, 125 MHz, CDCl₃).

	Lit*		
С	бс	$\delta_{ m H}$	δc
2	156,2	-	156,3
3	138,9	-	139,0
4	179,1	-	179,2
5	153,0	-	152,6
6	132,5	-	132,3
7	159,0	-	159,0
8	90,5	6,50 (s; 1H)	90,5
9	152,5	-	153,0
10	106,8	-	106,8
1'	123,0	-	123,0
2'	130,3	8,06 (d; <i>J</i> = 9,0 Hz; 2H)	130,4
3'	114,3	7,02 (d; <i>J</i> = 9,0 Hz; 2H)	114,3
4'	161,9	-	161,9
5'	114,3	7,02 (d; <i>J</i> = 9,0 Hz; 2H)	114,3
6'	130,3	8,06 (d; <i>J</i> = 9,0 Hz; 2H)	130,4
6-OMe	61.0	3,90 (s; 3H)	61,2
7-OMe	56,5	3,92 (s; 3H)	56,6
3-OMe	60,3	3,86 (s; 3H)	60,4
4'-OMe	55,6	3,96 (s; 3H)	55,7
* D 1			1 2005

* Deslocamentos químicos da literatura em CDCl₃ (PAULA et al., 2006).



Figura 25: Espectro na região de Infravermelho de CMF 3 (KBr), cm⁻¹



Figura 26: Espectro de Massas de CMF 3 (IE 70 eV)



Figura 27: Espectro RMN ¹H de CMF 3 (δ, 500 MHz, CDCl₃)



Figura 28: Espectro de RMN ¹³C-CPD de CMF 3 (δ,125 MHz, CDCl₃)



Figura 29: Espectro COSY (δ, 500 x 500 MHz, CDCl₃) de CMF 3



Figura 30: Espectro RMN ¹³C DEPT (θ =135) de CMF 3 (δ , CDCl₃, 125 MHz)



Figura 31: Espectro HSQC de CMF 3 (\delta, 500 x 125 MHz, CDCl₃)



Figura 32: Espectro HSQC de CMF 1 (δ , 500 x 125 MHz, CDCl₃

3.4 Determinação Estrutural de CMF 4

O tratamento cromatográfico da fração hexânica do extrato hexânico das folhas de *Croton muscicarpa* (CMEEH-FH) resultou no isolamento de 27 mg de um óleo incolor denominado de CMF 4.

O espectro na região do infravermelho de CMF 4 (Fig. 32, p. 61) apresentou três bandas em 2942, 2918 e 2851 cm⁻¹ referentes à deformação axial C-H de carbono sp³, uma banda em 1636 cm⁻¹ referente à vibração de deformação axial de ligação C=C de alceno e duas banda em 1452 e 1380 cm⁻¹ referentes a deformação angular C-H no plano e outra em 882 cm⁻¹ referente deformação angular fora do plano C-H.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CDCl₃) de CMF 3 (Fig. 24, p. 62) apresentou 15 linhas espectrais, sendo 6 sinais (δ_{C} 135,1; 131,2; 124,3; 124,3; 124,4; 124,9) relacionados a carbonos olefínicos, 5 sinais (δ_{C} 39,8; 39,7; 26,8; 26,7; 28,3) relacionados a carbonos metilênicos e 4 sinais (δ_{C} 25,7;17,7; 16,0; 15,9) relacionados a carbonos metilênicos.

A comparação dos espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT (θ =135) (125 MHz, CDCl₃) de CMF 3 (Fig. 25, p. 62) revelou a presença de 15 absorções relativas a 3 carbonos olefínicos não hidrogenados, 3 carbonos olefínicos hidrogenados, 5 carbonos metilênicos e 4 carbonos metílicos como mostra a Tabela abaixo.

С	СН	CH ₂	CH ₃
124,9	124,3	26,7	25,7
131,2	124,3	26,8	17,7
134,1	124,4	28,3	16,0
135,1		39,8	15,9
		39,7	
3C	3CH	5CH ₂	4CH ₃

Tabela	8:	Deslocamento	químico	RMN ¹⁵	C-CPD	de	CMF	4	com	padrão	de
hidroger	naçã	o (RMN ¹³ C-CI	PD e DEP	Т (θ=135), δ, CD	Cl ₃ ,	125MI	Hz)			

Fórmula molecular C₁₅H₂₅

O espetro de massas obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig 54, p. 63) forneceu o pico correspondente ao íon molecular com razão massa/caga (m/z) de 410 Da, referente a fórmula molecular C₃₀H₅₀, sugerida após análise dos 15 sinais do espectro RMN ¹³C-CPD e proposição de uma estrutura simétrica.

A partir dos dados de RMN, Infravermelho e Espectrometria de Massas, foi possível sugerir que CMF 4, apresentava IDH igual a 6.

O espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) (Fig. 52, p. 61) apresentou sinais em $\delta_{\rm H}$ 1,62 (s, 18H) e $\delta_{\rm H}$ 1,70 (s, 6H) característicos de hidrogênios de carbonos metílicos mostrou um multipleto em $\delta_{\rm H}$ 2,04 (m, 20H) característico de hidrogênios de carbonos metilênicos e um sinal em $\delta_{\rm H}$ 5,14 (m, 6H) associado a hidrogênio de carbono olefínico. O sinal em $\delta_{\rm H}$ 1,62 (s, 18H) ppm mais protegido foi atribuído aos hidrogênios de carbonos metílicos Z (C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30) da olefina e o sinal em $\delta_{\rm H}$ 1,70 (s, 6H) referentes a hidrogênios de carbonos metílicos situados na posição *E* (C-1 e C-24).

Com base na análise dos espectros de RMN ¹H, ¹³C, IV e EM foi possível concluir que CMF 4 tratava-se do triterpeno de cadeia alifática identificado como Esqualeno (SOZZANI DI SILVESTRO et al.,1988). Esse composto já foi isolado no gênero *Croton*, mas está sendo relatado pela primeira vez para a espécie em estudo.



CMF 4

	CMF 4		Lit.			
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$\delta_{ m C}*$			
1;24	25,7	1,7 (s; 6H)	25,6			
2;23	131,2	-	131,0			
3;22	124,4	5,14 (m; 2H)	124,0			
4;21	26,8	2,04 (m; 4H)	26,6			
5;20	39,7	2,04 (m; 4H)	39,6			
6;19	134,8	-	135,0			
7;18	124,3	5,14 (m; 2H)	124,0			
8;17	26,7	2,04 (m; 4H)	26,6			
9;16	39,8	2,04 (m; 4H)	39,6			
10;15	135,1	-	135,0			
11;14	135,1	5,14 (m; 2H)	124,0			
12;13	28,3	2,04 (m; 4H)	28,2			
25;30	17,6	1,62 (s; 6H)	17,6			
26;29	16,0	2,04 (m; 4H)	15,9			
27;28	15,9	1,62 (s; 6H)	15,9			
*SOZZANI DE SILVESTRO et al., 1988						

Tabela 9: Comparação dos dados de CMF 4 com os dados da literatura do Esqualeno



Figura 32: Espectro de Infravermelho de CMF 4 (KBr), cm⁻¹



Figura 33: Espectro de RMN ¹H de CMF 4 (δ, 500 MHz, CDCl₃)



Figura 34: Espectro de RMN ¹³ CPD de CMF 4 (δ, 125MHz, CDCl₃)



Figura 35: Espectro RMN ¹³C DEPT (θ =135) de CMF 4 (δ , CDCl₃, 125 MHz)



Figura 36: Espectro de massas de CMF 4 (IE 70 eV)

CAPÍTULO 4: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Material Botânico

As folhas de *C. muscicarpa* selecionados para o estudo foram coletadas na Chapada Diamantina - Bahia em fevereiro de 2006. A identificação botânica foi realizada pela Prof^a Daniela Santos Carneiro Torres do Departamento de Ciências Biológicas Jequié pertencente à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). A exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia - UFC, registrada sob número 38.644.

4.2 Métodos Cromatográficos

As cromatografias de adsorção em Coluna (CC) foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (Φ 63-200 µm) da Vetec e sílica 60 para cromatografia "flash" (Φ 40-63 µm) da Merck. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e quantidade de sílica a serem utilizadas. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob média pressão (cromatografia "flash") foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice para armazenamento do solvente.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de gel de sílica 60 (Φ 2-25 μ m) sobre alumínio da Merck (com indicador de fluorescência na faixa de 254nm) e / ou placas de vidro cobertas com gel de sílica 60G da Vetec preparadas no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais I (LAFIPLAM -I).

Foram usados solventes PA nos procedimentos cromatográfico: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros e misturas binárias, usando gradiente de concentração em ordem crescente de polaridade.

As revelações das substâncias nas cromatoplacas e em lâminas de vidro foram realizadas através da exposição destas à radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (315 e 365 nm), emitidos por lâmpadas de modelo 25 CN-15

LM da Vilbert Lourmat, pulverização da vanilina (5,0 g) em 100 mL da solução de ácido perclórico 0,75 M / etanol (100 mL), seguido de aquecimento em chapa aquecedora (120° C) por 5 min.

4.3 Métodos Espectrométricos

4.3.1 Espectrometria na região de absorção do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando-se um espectrofotômetro ABB Bomem, modelo FTLA2000-102, com janela espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ pertencente ao laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.3.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN ¹H) e de carbono 13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker modelos Avance DPX-300 e DRX-500 pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, operando na freqüência de hidrogênio a 300 e 500 MHz, e na freqüência de carbono a 75MHz e a 125MHz, respectivamente.

Quantidades variadas das amostras foram dissolvidas nos solventes deuterados clorofórmio (CDCl₃) e metanol (CD₃OD) para a obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para RMN ¹H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente de clorofórmio (δ 7,27) e de metanol (δ 3,31). Para o RMN ¹³C o padrão foi o pico central do tripleto em δ 77,23 para clorofórmio e do septeto em δ 49,1 para o metanol deuterado. As multiplicidades das bandas de absorção do hidrogênio nos espectros de RMN ¹H foram indicadas segundo convenção: *s* (simpleto), *d* (dupleto) e *dd* (duplo dupleto).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN 13 C foi determinado a partir da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) utilizando o ângulo de nutação (θ) de 135°. Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela comparação dos espectros de RMN 13 C DEPT 135° com os espectros de RMN 13 C-CPD. Os sinais dos carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH₃) apresentaram amplitude positiva e os sinais de carbono metilênicos (CH₂) amplitude negativa no espectro DEPT 135°.

4.3.3 Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de massa Shimazu modelo QP5050, por impacto eletrônico a 70 eV do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

4.4 Pontos de Fusão (PF)

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento de microdeterminação Mettler, provido de placa aquecedora modelo FP82HT e unidade de controle FP90, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.6 Estudo dos constituintes não voláteis de C. muscicarpa

4.6.1 Obtenção do Extrato etanólico das folhas de C. muscicarpa

As folhas secas e trituradas (2,34 Kg) foram inicialmente maceradas e extraídas com hexano (3x5 L) por 3 dias. As soluções resultantes foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório, obtendo-se 63,3 g de extrato hexânico, denominado CMHF, com rendimento de 2,7 %. A torta foi extraída com etanol bruto (3x5 L) por 3 dias. As soluções resultantes foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório, obtendo-se 262,3 g de extrato etanólico, denominado CMEF, com rendimento de 11,0 %.

Fluxograma 1: Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas de C.

muscicarpa



*Descartado

4.6.2 Tratamento Cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *C. muscicarpa* (CMEF)

Uma alíquota de 50,7 g do extrato etanólico das folhas de *C. muscicarpa* foi dissolvida em 200 mL de Água/metanol 80: 20 e fracionada por cromatografia de partição utilizando-se: hexano PA (1200 mL), diclorometano PA (400 mL) e acetato de etila PA (300 mL). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório resultando nas frações hexano (CMEF-H; 17,9 g), diclorometano (CMEF-D; 11,9 g) acetato de etila (CMEF-Ac ; 1,7 g) e aquosa (CMEF-PAq; 5,1 g), observada no Fluxograma abaixo:




4.6.2 Tratamento Cromatográfico de CMEF-D e isolamento de CMF 1.

Uma alíquota de 5,0 g de CMFE-D foi adsorvida em 15 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de diâmetro interno de 5 cm sobre 35 g de gel de sílica. Foram coletadas 10 frações de volumes de 100 e 200 mL, eluídas com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A fração 7 eluída com diclorometano:acetato de etila 1: 1, resultou em 37,5 mg de cristais amarelos insolúveis em diclorometano e solúvel em metanol, que após análise por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, Infravermelho e Espectrometria de Massas, revelou tratar-se de um flavonóide denominado CMF 1(determinação estrutural p. 21).

Frações	Concentração	Volume (mL)	Massa (g)	Rendimento
1	Hexano	100	0	-
	Hexano/diclorometano			
2	75: 25	100	0	-
	Hexano/diclorometano			
3	1: 1	100	0,167	3,3%
	Hexano/diclorometano			
4	25: 75	100	0,600	12%
5	Diclorometano	100	0,219	4,4%
	Diclorometano/acetato de			
6	etila 75: 25	100	0,126	2,5%
	Diclorometano/acetato de			
7	etila 1: 1	200	0,113	22,6%
	Diclorometano/acetato de			
8	etila 25: 75	100	0,330	6%
9	Acetato de etila	100	0,693	14%
10	Metanol	200	0,125	25%
			0,452	89,8%

Tabela 10: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de CMEF-D

4.6.3 Tratamento Cromatográfico de CMEF-D e isolamento de CMF 2.

A fração 4 (600 mg) foi adsorvida em 3,7 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de diâmetro interno de 2,5 cm sobre 26,3 g de gel de sílica. Foram coletadas 45 frações de aproximadamente 15 mL, eluídas com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puro ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório. As frações 29 a 31 foram reunidas por apresentarem as mesmas características quando analisadas por CCD. Depois de reunidas, obteve-se 4 mg de cristais amarelos (insolúvel em metanol e solúvel em diclorometano) denominado CMF 2 (determinação estrutural p. 30).

Frações	Eluentes	Volume (mL)
1 - 5	Hexano	100
6-10	Hexano/diclorometano 1: 1	200
11-15	Hexano/diclorometano 25: 75	100
16-20	Hexano/diclorometano 10: 90	100
21-25	Diclorometano	100
26-30	Diclorometano/acetato de etila75: 25	100
31-35	Diclorometano/acetato de etila 1: 1	100
36-40	Diclorometano/acetato de etila 25: 75	100
40-45	Acetato de etila/ metanol 1: 1	100
46-50	Metanol	100

Tabela 11: Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de CMEF-D

Tabela 12: Frações reunidas da coluna da fração 4 coluna da CMEF-D

Frações	Massa (mg)	Rendimento(%)
1-24	-	-
25	22,8	4
26-27	53,1	9
28	31,5	5
29-31	104,9	18
32-34	97,4	16
35	45,1	8
36-37	33,9	6
38	20	3
39	20,7	3
40-50	13,6	2
	443	74

Fluxograma 3: Isolamento de CMF 1 e CMF 2



4.6.4 Tratamento Cromatográfico de CMEF-D e isolamento de CMF 1, CMF 2 e CMF 3.

Uma alíquota de 2,8 g de CMFE-D foi adsorvida em 6,3 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna do tipo "flash" de diâmetro interno de 2,5 cm sobre 74,8 g de gel de sílica. Foram coletadas 15 frações de volumes de 100 e 200 mL, eluídas com os solventes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

A fração 4, eluída com hexano/ acetato de etila 60: 40, resultou em um 18 mg de cristais amarelos insolúveis em diclorometano e solúveis em metanol, que ao serem analisados espectrometricamente por RMN, Infravermelho e Espectrometria de Massas, revelou um flavonóide denominado CMF 1 (determinação estrutural encontrase na p. 30).

A fração 5, eluida com hexano/ acetato de etila 60: 40, resultou em 31 mg de um sólido amorfo amarelo, insolúvel em metanol e solúvel em diclorometano, que ao ser analisado espectrometricamente por RMN, infravermelho e espectrometria de massa, revelou um flavonóide denominado CMF 2 (determinação estrutural encontra-se na p. 39).

A fração 7 eluída com hexano/ acetato de etila 40: 60, resultou em 21 mg de sólido amorfo amarelo insolúvel em metanol e solúvel em diclorometano, que ao ser analisado espectrometricamente por RMN, revelou um flavonóide denominado CMF 3 (determinação estrutural p. 50)

Frações	Concentração	Volume (mL)	Massa (mg)	Rendimento
1	Hexano	100	0	-
	Hexano/Ac. de etila			
2	90: 10	100	45	1.6%
	Hexano/Ac. de etila			
3	80: 20	200	52	1.8%
	Hexano/Ac. de etila			
4	60: 40	200	387	13,8%
	Hexano/Ac. de etila			
5	60: 40	200	250	9,0%
	Hexano/Ac. de etila			
6	60: 40	200	72	2,60%
	Hexano/AC. de etila			
7	40: 60	200	66	2,40%
	Hexano/Ac. de etila			
8	40: 60	200	166	6,0%
	Hexano/AC. de etila			
9	40: 60	200	74	3,0%
10	Ac. de etila	200	93	3,0%
11	Ac. de etila	200	147	5,2%
12	Ac. de etila	200	62	2,2%
13	Ac. de etila	200	40	1,4%
14	Ac. de etila / Metanol 1: 1	200	430	18,8%
15	Metanol	100	120	4,3%
			2004	71,6%

Tabela 13: Frações da coluna "flash" da CMEF-D

Fluxograma 3: Isolamento de CMF1, CMF 2 e CMF 3



4.6.5 Tratamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de C. muscicarpa

Uma alíquota de 36,5 g do extrato hexânico das folhas de *C. muscicarpa* foi adsorvida em 120 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de 7,5 cm de diâmetro sobre 119,3 g de gel de sílica. Foram coletadas 4 frações, eluídas com os solventes hexano (800 mL), diclorometano (600 mL), acetato de etila (700 mL) e metanol (200 mL) puros e em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório, resultando nas frações hexano (CMHF-H), diclorometano (CMHF-D), acetato de etila (CMHF-A) e metanol (CMHF-M).

Fluxograma 4: Fracionamento de extrato hexânico de C. muscicarpa



Tabela 14: Frações provenientes do fracionamento de extrato hexânico de *C*.*muscicarpa*

Fração	Solventes	Peso (g)	Rendimento
CMHF-H	Hexano	1,29	4%
CMHF-D	Diclorometano	14,2	39%
CMHF-A	Acetato de etila	17,4	48%
CMHF-M	Metanol	0,2	1%
		33,1	92%

4.6.5-Tratamento cromatográfico da fração CMHF-H e isolamento de CMF 4

Uma alíquota de 550 mg da fração hexânica foi adsorvida em 5,10 g de gel de sílica e acondicionada em um coluna de diâmetro 2,5 cm sobre 19,8 g de gel de sílica. Foram coletadas 57 frações eluídas com hexano (600 mL) puro. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório. As frações 1 a 12 foram reunidas por apresentarem as mesmas características quando analisadas por CCD. Depois de reunidas, obteve-se um

líquido incolor e viscoso de massa 27 mg solúvel em diclorometano, denominado CMF 4 (determinação estrutural p. 58).

Fração	Peso (mg)	Rendimento
1-12	27	5,4%
13-29	2	0,4%
30-46	21	4%
47-54	18	0,5%
55-57	15	3%
	83	13,3

Tabela 15: Frações reunidas por análise por CCD

Fluxograma 5: isolamento de CMF 4



5-AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL DE Croton muscicarpa e Croton gluitnosus

5.1- Introdução

As plantas aromáticas, além de fornecedoras de óleos voláteis são em grande parte medicinais e estão presentes no cotidiano das pessoas. Estas plantas, ou as substâncias voláteis delas extraídas, têm sido emprgadas como flavorizantes, aromatizantes, terapêuticas e nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Pesquisas indicam aumento regular no mercado de produtos naturais, apresentando a média anual de crescimento estimada em 22 % nos setores industriais de perfumaria e de aromatizantes para produtos alimentícios, assim como, em setores de processamento de óleos essenciais (BARRETO, 2008).

Na indústria, os óleos essênciais são extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, na grande maioria das vezes também pela prensagem do pericarpo de frutas cítricas, que no Brasil dominam o mercado de exportação. São constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos e fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO et al, 2009).

Segundo Salatino e colaboradores (2007), os óleos voláteis das espécies de *Croton* analisados são divididos em duas categorias: a primeira rica somente em fenilpropanóides e terpenoides (mono e sesquiterpenos), enquanto que a segunda categoria contem terpenóides.

5.2- Estudos dos constituintes voláteis de C. muscicarpa e C. glutinosus

As folhas de *C. muscicarpa* e *C. glutinosus* foram coletas na chapada Diamantina no estado da Bahia. A coleta de *C. glutinosus* ocorreu em janeiro de 2009 e a de *C. musciapa* em dezembro do mesmo ano. A espécie *C. glutinosus* foi identificada pela Profa Maria Lenise Silva Guedes do Departamento de Botânica da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Alexandre Leal Costa da UFBA ALCB nº 88.235. A identificação da espécie *C. muscicarpa* já foi citada no capítulo parte experimental (p. 55).

O óleo essencial obtido da espécie *C. muscicarpa* foi denominado OECM, enquanto que o óleo essencial obtido da espécie *C. glutinosus* foi denominado OECG.

Os óles essenciais foram obtidos por hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger. A biomassa a ser analisada de cada uma das espécies estudadas foi acondicionada em um balão de fundo redondo de 5,0 L, seguido da adição de 2,0 L de água destilada. O sistema foi mantido sob aquecimento por 2 horas. Todos os rendimentos dos óleos essenciais foram obtidos através da relação volume de óleo extraído / massa de planta (v/p). Para a obtenção do óleo essencial das folhas de *C. muscicarpa* (OECM), utilizou-se 410 g de material vegetal, obtendo-se um rendimento de 0,21 (v/p) %. O óleo essencial das folhas de *C. glutinosus* (OECG) foi obtido a partir de 327 g de material vegetal, obtendo-se um rendimento de 0,24 (v/p) %.

Fluxograma 5: Esquema de obtenção dos óleos essenciais de C. muscicarpa e C. glutinosus



*Descartado

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização por Chama (CG-DIC). Os constituintes químicos foram identificados através de comparação de seus espectros de massa e índices de Kovats, corrigidos por regressão linear, com os espectros de massas armazenados em um banco de dados WILEY 229 e confirmados através de comparação visual com espectros de massas disponíveis na literatura (ADAMS, 2001).

Os espectros de massas dos óleos essenciais obtidos em Espectrômetro de Massa SHIMADZU QP2010, acoplado a Cromatógrafo Gás-Líquido provido de coluna capilar DB-5 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4 °C/min de 70 °C-180 °C e 20 °C/min de 180 °C-280 °C, sendo a temperatura do injetor e do detector de 250 °C e 280 °C, respectivamente. Como gás de arraste foi utilizado gás hélio com um fluxo de 1,5 ml/min. A análise pó CG-DIC foi realizada em um cromatógrafo Varian CP-3380, utilizando uma coluna CSil8-Varian 30 m x 0,25 de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, utilizando mesma razão de aquecimento usada em CG-EM, e usando hidrogênio como gás de arraste. As análises foram realizadas na central analítica do Laboratório de Bioprocessos (EMBRAPA-CE).

Constituintes	IK-1 ^a	IK-2 ^b	(%) ^c
monoterpenos			33,8
α-pineno	939	939	30,0
β-mirceno	991	991	1,5
limoneno	1029	1028	2,3
sesquiterpenos			57,4
α-copaeno	1351	1353	1,0
β-borboneno	1388	1390	4,2
β –cariofileno	1409	1409	6,2
longifoleno	1408	1413	16,4
germacreno D	1485	1484	1,4
β-guaieno	1493	1493	5,3
cubebol	1504	1504	1,3
δ-amorfeno	1512	1512	6,3
zonareno	1530	1530	6,1
óxido de cariofileno	1583	1583	1,2
viridifloreno	1593	1593	4,0
gossonorol	1637	1637	4,0
Total			91,2

Tabela 17: Composição do óleo essencial das folhas de C. muscicarpa

^aÍndices de Kovats corrigidos para óleo obtido das folhas de *C. muscicarpa*.

^bÍndices de Kovats da literatura.

^cPercentual obtido por CG-DIC.

Constituintes	IK-1 ^a	IK-2 ^b	(%) ^c
Monoterpenos			65,2
α-pineno	939	939	51
β-mirceno	991	991	14,2
Sesquiterpenos			27,1
α-copaeno	1377	1377	3,1
β-elemeno	1391	1391	5,6
germacreno D	1485	1485	9,7
viridifloreno	1498	1497	4,4
cupareno	1506	1505	1,3
espatulenol	1576	1578	1,3
óxido de cariofileno	1583	1583	1,7
Total			92,3

Tabela 18: Composição do óleo essencial das folhas de C. glutinosus

^aÍndices de Kováts corrigidos para óleo obtido das folhas de *C. glutinosus*.

^bÍndices de Kováts da literatura.

^cPercentual obtido por CG-DIC.

O óleo obtido das folhas de *C. muscicarpa* apresentou 15 constituintes principais sendo o α -pineno (30 %) e longifoleno (16,4 %) os constituintes majoritários (Tab. 17, pág 81). O óleo essencial obtido das folhas de *C. glutinosus* apresentou 9 constituintes sendo o α -pineno (51%), assim como observado no óleo de *C. muscicarpa*, o majortário seguido do β -mirceno (14,2 %) (Tab. 18, pág 82). A literatura relata o α -pineno como constituinte majoritário em outras espécies do gênero *Croton*; como nos óleos essenciais de *C. palanostigma* Klotzch (BRASIL et al, 2009), *C. monteverdensis* e *C. niveus* (SETZER,2006), *C. flavens* (SILVESTRE et al, 2006) e *C. stellulifer* (MARTINS, 2001).

O óleo essencial de *C. muscicarpa* foi constituído principalmente de sesquiterpenos (57,4%) enquanto que no óleo essencial de *C. glutinosus* os monoterpenos (62,5%) foram predominantes.

Os óleos de *C. muscicarpa* e *C. glutinosus* são ricos em terpenóides, portanto, podem ser incluídos, no grupo dos terpenoides, levando-se em consideração os dados de Salantino e colaboradores (2007) para os óleos essenciais de *Croton*.

5.2- Investigação da atividade antibacteriana do óleo essencial de Croton glutinosus

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados pela Profa Vânia Maria Maciel Melo do Departamento de Biologia-UFC. A investigação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizada segundo a técnica de difusão em discos. Cinco cepas de bactérias foram utilizadas: duas Gram-positivas (Bacillus subtilis spizizenii ATCC 6633 e Staphylococcus aureus aureus ATCC 25923) e quatro Gramnegativas (Enterobacter aerogenes ATCC 13048, Klebsiella pneumoniae pneumoniae ATCC 10031, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 e Salmonella enterica enterica ATCC 10708). As culturas das bactérias foram estriadas em meio ATGE, incubadas a 37 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas e, algumas destas, selecionadas e inoculadas em solução salina a 0,9% resultando numa suspensão com densidade óptica a 600 nm, ajustada para uma faixa entre 0,08 e 0,1 da escala de McFarland. As suspensões foram então semeadas em meio ágar Müller-Hinton utilizando um swab, no qual foram colocados, em pontos equidistantes, discos de papel de filtro de 0,6 cm de diâmetro saturados com 30 µL da solução do óleo essencial de C. glutinosus com DMSO 2% (732 mg/1mL) e 30 µL de DMSO 2% para o controle negativo. Para controle positivo foi utilizado o antibiótico Ciprofloxacina (CECON) a 5 µg por disco. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e, em seguida, foi feita a leitura dos halos de inibição. Os experimentos foram feitos em quintuplicata.

O óleo essencial de *C. muscicarpa* foi investigado quanto a atividade antifúngica pelo Prof. Afrânio Cunha do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-UFC, mas não apresentou resultados significativos.

	OECG	^b ciprofloxacina
Gram-positivas		
B. subtilis	10,0	35
S. aureus	13,0	24,0
Gram-negativas		
P. aeruginosa	-	-
E. aerogenes	-	-
K. pneumoniae	-	-
S. enterica	-	-

Tabela 19: Atividade antibacteriana^a do óleo essencial das folhas de *C. glutinosus* (OECG)

^aMédia dos halos de inibição em mm. ^bControle positivo. Controle negativo: DMSO 2%. Concentração do óleo em DMSO 2%: 732 mg/1mL

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. glutinosus* foi avaliada utilizando uma solução do óleo em DMSO 2% (732 mg/1mL) contra duas cepas de bactérias Gram-positivas e quatro cepas Gram-negativas. Os resultados obtidos mostraram moderada atividade antimicrobiana *in vitro*, observada a partir da inibição do crescimento das cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) em comparação com o controle positivo (ciprofloxacina), enquanto que as bactérias Gram-negativas mostraram-se resistentes. Em geral, os óleos essenciais de várias espécies vegetais mostram atividade antimicrobiana mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas, como das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC (PELISSARI et al., 2010). Na Tabela 19 são encontrados os dados das atividades antimicrobianas de OECG e do controle positivo ciprofloxacina. A atividade antimicrobiana dos terpenos pode estar ligada às propriedades lipofílicas destes compostos e suas interações com as bicamadas fosfolipídicas das bactérias (DORMAN e DEANS, 2000). A atividade do óleo de *C. muscicarpa* contra os microrganismos Gram-positivos pode estar relacionada com a estrutura da parede celular das bactérias

testadas (*S. aureus* e *B. subtilis*) formada por peptidioglicanos e ácidos teicóicos, enquanto que nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é mais complexa, com uma camada lipídica maior do que as Gram-positivas, que pode atuar como uma barreira contra antibióticos (PELISSARI et al , 2010). Segundo Dorman e colaboradores (DORMAN e DEANS, 2000), que testaram os óleos essenciais de 6 espécies vegetais e 21 amostras de terpenoides e fenilpropanoides comumente presentes em óleos essenciais contra 25 cepas de microorganismos, o maior espectro de atividades dos componentes individuais foi o timol seguido do carvacrol. Enquanto o α -pineno mostrou atividade contra apenas 5 das cepas testadas, dentre Gram-positivas e Gramnegativas: *Enterococcus faecalis, Erwinia carotovora, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.







Figura 38: Cromatograma por CG/DIC de OECM



Figura 39: Cromatograma por CG/EM de OECG



Figura 40: Cromatograma por CG/DIC de OECM

As Figuras a seguir representam os espectros de massa dos constituintes químicos voláteis de identificados nos óleos essenciais de *C. muscicarpa* e *C. glutinosus* :



Figura 41: Espectro de massas do α-pineno



Figura 42: Espectro de massas do β-mirceno



Figura 43: Espectro de massas do D-limoneno



Figura 44: Espectro de massas do α-copaeno



Figura 45: Espectro de massas do β-borboneno



Figura 46: Espectro de massas do longifoleno



Figura 47: Espectro de massas do germacreno D



Figura 48: Espectro de massas do β-guaieno



Figura 49: Espectro de massas do cubebol



Figura 50: Espectro de massas do δ -amorfeno



Figura 51: Espectro de massas do zonareno



Figura 52: Espectro de massas do óxido de cariofileno



Figura 53: Espectro de massas do viridifloreno



Figura 54: Espectro de massas do gossonoro



Figura 55: Espectro de massas do β -elemeno



Figura 56: Espectro de massa do cupareno



Figura 57: Espectro de massa do Espatulenol

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico das folhas de *C. muscicarpa* (Euphorbiaceae) permitiu o isolamento de quatro substâncias, um triterpeno identificado como esqualeno (CMF 4) e três flavonóides identificados como canferol (CMF 1), casticina (CMF 2) e 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (CMF 3). Todos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie *C. muscicarpa* e o flavonóide 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (CMF 3) é relatado pela primeira vez no gênero *Croton*.

O estudo dos constituintes voláteis das folhas de *C. muscicarpa* apresentou 15 compostos sendo o α -pineno (30%) e longifoleno (16,4%) os constituintes majoritários. O estudo dos constituintes voláteis obtido das folhas de *C. glutinosus* apresentou 9 compostos, sendo o α -pineno (51%) o majortário seguido do β -mirceno (14,2%). Os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *C. glutinosus* mostraram moderada atividade antimicrobiana *in vitro*, observada a partir da inibição do crescimento das cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) em comparação com o controle positivo (ciprofloxacina), enquanto que as bactérias Gramnegativas mostraram-se resistentes.

Os resultados mostrados confirmam o potencila fitoquímico de espécie do gênero *Croton* justificam a continuidade dos estudos fitoquímicos para espécie do *Croton muscicarpa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential oil Components by Gas Cromatography/ Quadruplo Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- AGRAWAL, P. K. Carbono-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdan Netherlands, 1989.
- BARRETO, M. B.; Estudo químico de Croton muscicapa Müll. Arg (Euphorbiaceae) e avaliação da composição química volátil de Ocimum spp (Lamiaceae). 2008, Dissertação (Mestrado), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BARBOSA FILHO, B. A. Estudo fitoquímico de *E. almawillia* (Rutaceae).
 2005, Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BRASIL, D. S. B.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; J. Braz. Chem. Soc. v. 20, n. 6, 1188-1192, 2009.
- BROWN, G. D.; LIANG, GUANG- YI.; SY, LAI-KING. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 64 p. 303-323, 2003.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Química Nova, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

- CONSERVA, L. M.; SILVEIRA, E. R.; PALMEIRA JUNIOR, Two clerodane diterpenes anda flavonoids form *Croton brasiliensis*. J. Braz. Chem. Soc., v. 16n. 6B, p. 1420, 2005.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. , Life Science. , v. 65, p. 337-353, 1999.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobional agentes from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology., v. 88, p. 308-316, 2000.
- GARCIA, A.; RAMIREZ-APAN, T.; COGORCAN, J. A.; DELGADO, G. Absolute configuration assignments by experimental and theoretical approaches of ent-labdane and *cis-ent*-clerodane-type diterpenes isolated from *Croton glabellus*. Canadian Journal of Chemistry., v.84, n. 12, p.1593-1602, 2006.
- GONZALEZ, R. V.; DÍAZ, B. K.; AGUILAR, M. I.; DIEGO, N.; LOTINA, B. Pachipoldol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. As Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. J.Agric. Food Chem., v. 54, p.1217-1221, 2006.
- GRAIKOU, K.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A.; CHINOU, I.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; LITAUDON, M. New Diterpenes from *Croton insularis*. Journal of Natural Products. V. 67, n. 4, p. 685-688, 2004.
- GUO, A. Z.; ZHI-HENG, S.; HONG-WU, Z.; YUAN, W.; JUN- SHAN, Y.; ZHONG-MEI, Z. Flavonoids from them stem of *Croton caudatus* Geisel. Var. tomenstosus Hook. Molecules., v. 15, p. 1097-1102, 2010.
- HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M.; JANKE, H. D, Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. Water Research. v. 35, n. 11, p. 2575-2582, 2001.

- HIU-DONG.; YU-LIN, G.; SHUN-GENG, C.; SHAO-XING, C.; KENG-YEOW, S.; SWEE-HOCK, G., R. MAJUNATHA, K. Eicosenones and methylated flavonol from Amomum koeniggii. Phythochemistry., v. 50, p. 899-902, 1999.
- JOLY, A. B. Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal., 12° Ed. São Paulo, Editora Nacional, 1998.
- LAI-KING, S., BROWN, G. D. Three sesequiterpenes from *Artemísia annua*.
 Phytochemistry., v 48, n 7, p. 1207- 1211. 1998.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.
 ; VANDERLINDE, F. A. ; ECHEVARRIA, A. ; LAPA, A. J. ; CÓLIUS, I. M.
 S. ; GRYNBERG, N. F. ; FARAIAS, R. A. F. ; LUNA COSTA, A. M. ; RAO,
 V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. Journal of Ethnopharmacology.
 , v. 70, p.41-55, 2000.
- MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T.
 J. Carbon-13 NMR studies of flavanoids III. Naturally occouring flavanoid glycosides and their acylated derivates. Tetraedron.,v34. p.1389-1397, 1978.
- MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L. R.; GONÇALVES, M. J.; VILA, R.; TOMI, F.; ADZET, T.; DA CUNHA, A. P.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Three Zingiberaceae from S.Tomé e Príncipe. Planta Med., v.66, n.6., 647, 2001.
- MARTIUS, C. F. P., EICHLER, A. W.; URBAN, I, Flora Brasiliensis., v. 11, part. 2, fasc. 61, p. 199-200, 1873.
- PALMEIRAS JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F A.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos da folhas de

Croton sellowii (Euphorbiaceae), **Rev. Bras. Farmacog**., v.16, n.3, p.397-402, 2006.

- PAULA, V. F.; CRUZ, M. P.; BARBOSA, L. C. A. Constituintes químicos de bombacopsis glabra (BOMBACACEAE). Química Nova, v. 29, n.2, p. 213-215, 2006.
- PELISSARI, G. P.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacterina do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. Rev. Bras. Farmacogn., v.20, n.1, p. 70-74, 2010.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR, G. A. B. Three new sesquiterpenes from *Croton arboreous*. Journal of Natural Products., v. 67, n. 5, p. 914-917, 2004.
- SALANTINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc., vol.18, n.1, p.11-33, 2007.
- SETZER, W. N. Chemical compositions of the bark essential oils of *C. monteverdensis* and *C. niveus* from Monteverde *Nat. Prod. Commun.*,v. 1, p. 567-572, 2006.

• SILVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from

Guadeloupe. Journal of Ethnopharmacology., v. 103, p. 99-102, 2006

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

- SOZZANI, P.; DI SILVESTRO, G. New assingnment of C-13 NMR-spectrum of squalene, Gazzetta Chimica Italiana., v 118, n.5, p. 385-389, 1988.
- SUBRAMANIAN, S. S.; NAGARAJAN, S.; SULOCHANA, N. Flavonoids of some Euphorbiaceae plants. **Phytochemistry** ., v. 10, n. 10, p. 2548-2549, 1971.
- VALENCIA, A.; RODRIGUEZ, L. H., SAUCEDO, R. ; DIAZ, E. ; NEGRON, GUILLERMO. Separation and structure of the chemical components of *Croton pyramidalis*. Revista Latinoamericana de Química ., v. 12, n. 1, p. 16-19, 1981.
- WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic.
 J. Ethnophamacology., v. 51, p. 239-254, 1996.
- WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. Annals of the Missorine Botanical Garden. v1, n.81, p 144, 1994.