



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PÂMELA RAFAELA DO PRADO

**ESTUDO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE *Croton urucurana*
(EUPHORBIACEAE)**

CAMPO GRANDE

2017

PÂMELA RAFAELA DO PRADO

**ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Croton urucurana*
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada como requisito para à obtenção do grau de Mestre em Química, no programa de pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
Coorientadora: Prof.^a. Dr^a Patrícia de Oliveira Figueiredo
Colaboração: Prof.^a. Dr^a Nídia Cristiane Yoshida

Campo Grande

2017

Aos meus pais Ivone e Clóvis,
Pelos ensinamentos que guiam os
meus passos,
Por acreditarem que eu seria capaz,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida e pelas pessoas que colocou no meu caminho. São essas pessoas que me mostraram o melhor da vida. Sem elas, talvez, eu ainda tivesse chegado até aqui, mas não seria do modo tão prazeroso e satisfatório. À aquelas que a memória me permite lembrar deixo aqui minha eterna gratidão!

Ao prof. Dr. Walmir Silva Garcez, pela orientação, apoio, paciência, dedicação, amizade e, principalmente, ensinamentos durante esses últimos anos.

A profa. Dra. Patrícia de Oliveira Figueiredo e à profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida por toda ajuda, amizade e orientações.

Aos meus pais, Ivone e Clóvis, e ao meu irmão William, pelo amor incondicional.

Aos amigos Wilson Hino K. Junior, Kátia W. Cordeiro, Caroline F. Dornelles, Karoline R. Mazuy, Isabella Maranhão, Larissa B. B. dos Santos, Angeles Echague, pelo companheirismo, evolução pessoal, ajuda na execução em algumas etapas do projeto e por tornarem esse processo mais divertido. A “bancada C de sucesso” foi a melhor época que vivenciei no laboratório, muito obrigada por isso.

De modo geral a todos da família PRONABIO-UFMS, especialmente ao Danilo Tófoli e Alex F. Souza, pelos conselhos científicos e conhecimentos transmitidos. Não há palavras para descrever esse grupo de pesquisa. Que continuemos a trabalhar com garra, desenvolvendo projetos de qualidade. Sucesso a todos os integrantes dessa “NAVE-LP1”.

Aos todos os amigos, de convivência diária ou não, pelo suporte emocional.

As técnicas Rosianne Tsujisaki do laboratório de Biologia Molecular (UFMS) e Heidi Lacerda A. da Cruz do Laboratório de Genética Molecular Humana – (LGMH/UFPE) por toda ajuda com a parte de biologia molecular.

Ao Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas-LAPNEM/UFMS pelas análises de CLAE-DAD-IES-EM/EM.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos- NPPNS/USP Ribeirão Preto pelas análises de CG-EM.

Aos todos os técnicos do Instituto de Química pelo profissionalismo e pelas análises de RMN, CG, IF, UV, etc.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram na execução deste projeto.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFMS pela oportunidade de pesquisa e infraestrutura oferecida. A todos os professores do Instituto de Química e CCHS da UFMS pelas aulas ministradas.

A CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada.

“O conhecimento coroa os esforços
com o êxito.”
(Textos Budistas)

RESUMO

Conhecida como “sangra d’água” em decorrência do seu látex vermelho vivo, *Croton urucurana* Baill. pertence ao segundo maior gênero da família Euphorbiaceae. O chá de suas cascas é utilizado pela população como analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante. Na literatura, são descritas atividades biológicas como: antimicrobiana, antiulcerogênica e citotóxica. Do látex foi isolado um ciclopeptídeo do tipo orbitídeo, que apresentou atividade citotóxica em células tumorais humanas. Assim, por ser utilizada pela população e ser rica em metabólitos secundários bioativos, os objetivos foram traçar o perfil químico do látex e do extrato metanólico da casca de *C. urucurana* (via CLAE-DAD-IES-EM/EM), analisar os constituintes voláteis (via CG-EM) e, paralelamente, investigar os genes responsáveis pela biossíntese dos ciclopeptídeos produzidos por *C. urucurana*. Para tanto, o extrato metanólico das cascas (EMCu) foi submetido a partição líquido-líquido para obter as fases hexânica (FHC), acetato de etila (FAC) e hidrometanólica (FHMC). Semelhantemente, o látex (LACu) foi suspenso em MeOH e originou as fases hexânica (FHL) e acetato de etila (FAL). As fases acetato de etila foram fracionadas através de técnicas de cromatografia em coluna utilizando como suporte sílica gel e Sephadex LH-20[®] e/ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Como resultado, através do perfil químico foi possível a identificação de 21 compostos. Foram isolados de FAC os diterpenos 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**) e o 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**); de FAL, foram isolados dois ciclopeptídeos o [1-9-NαC]-Crouororb A1 (**18**) e o [1-9-NαC]-Crouororb A2 (**23**), sendo **22** e **23** inéditos na literatura. Dos constituintes voláteis de FHC e FHL foram identificados 95 componentes que correspondem a 66,71% e 67,02 %, respectivamente. Para a busca pelos genes que produzem os ciclopeptídeos foi realizado o desenho de oligonucleotídeos iniciadores a partir do alinhamento de sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para cada módulo. Foram realizadas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o DNA genômico de *C. urucurana* como molde, para a seleção dos genes NRPS alvo. Um par de oligonucleotídeos apresentou uma banda de amplificação, porém os dados obtidos não foram suficientes para formar o consenso de uma sequência completa. Concluindo, com o perfil químico foi possível a identificação de compostos como monômeros e dímeros de flavan-3-ol, alcaloides, ciclopeptídeos e diterpenos. Das fases acetato de etila foram isolados quatro compostos, dos quais um diterpeno de esqueleto clerodano e um ciclopeptídeo do tipo orbitídeo inéditos na literatura. Dos constituintes voláteis foi observado que a maior parte de FHC é formada de diterpenos de esqueleto clerodano e FHL de esteroides e ácidos graxos. Dos oligonucleotídeos degenerados desenhados, com as metodologias utilizadas, não se obteve sucesso nas reações de PCR, os experimentos representaram um avanço na determinação dos genes responsáveis pela produção de ciclopeptídeos em *C. urucurana*.

Palavras chaves: diterpenos clerodano, ciclopeptídeos, orbitídeo, perfil químico, NRPS.

ABSTRACT

As known as "*Dragon's Blood*" because of its red-colored latex, *Croton urucurana* belongs to the second largest genus of the Euphorbiaceae family. The tea from its bark is used by the population as analgesic, anti-inflammatory and healing. In the literature, biological activities are described as: antimicrobial, antiulcerogenic and cytotoxic. A cyclopeptide of the orbitide-type was isolated from the latex, which showed cytotoxic activity in human tumor cells. Thus, because it is used by the population, and because it is rich in bioactive secondary metabolites, the objectives were to trace the chemical profile of the latex and methanol extract from the bark of *C. urucurana* (by HPLC-DAD-ESI-MS/MS), to analyze the volatile constituents (by GC-MS) and, in parallel, to investigate the genes responsible for the biosynthesis of the cyclopeptides produced by *C. urucurana*. For this purpose, the methanol extract of the barks (EMCu) was subjected to liquid-liquid partition to obtain the hexane (FHC), the ethyl acetate (FAC) and the hydromethanolic (FHMC) phases. Similarly, the latex (LACu) was suspended in MeOH and gave the hexane (FHL) and the ethyl acetate (FAL) phases. The ethyl acetate phases were fractionated by column chromatography techniques such as gel carrier and Sephadex LH-20® and/or by high performance liquid chromatography (HPLC). As a result, through the chemical profile it was possible to identify 21 compounds. Were isolated from FAC the diterpenes methyl 3-oxo-12-epi-barbascoate (19) and the methyl 3-hydroxy-12-epi-barbascoate (22); From FAL, two cyclopeptides [1-9-NaC]-Cururorb A1 (**18**) and [1-9-NaC] Crouorb A2 (**23**) were isolated, being **22** and **23** unpublished in the literature. From the FHC and FHL volatile constituents were identified 95 components corresponding to 66.71% and 67.02%, respectively. For the search for genes that produce cyclopeptides was conducted the design of primers from the alignment of sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database for each module. PCR (Polymerase Chain Reaction) reactions were performed using *C. urucurana* genomic DNA as template for the selection of target NRPS genes. A pair of primers had an amplification band, but the data obtained were not sufficient to form the consensus of a complete sequence. In conclusion, with the chemical profile it was possible to identify compounds such as monomers and dimers of flavan-3-ol, alkaloids, cyclopeptides and diterpenes. From the ethyl acetate phases four compounds were isolated, of which a clerodane-type diterpene and an cyclopeptide orbitide-type unpublished in the literature. From the volatile constituents it was observed that the majority of FHC is formed from clerodane-type diterpenes and FHL from steroids and fatty acids. The primers designed, as in the methodologies developed, did not obtain success in the PCR reactions, the experiments represent an advance in the determination of genes responsible for the production of cyclopeptides in *C. urucurana*.

Keywords: clerodane diterpenes, cyclopeptides, orbitide, chemical profile, NRPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos principais terpenos encontrados na família Euphorbiaceae	23
Figura 2. A- Fotografia do tronco de <i>Croton urucurana</i> que permite visualizar seu látex vermelho vivo; B- Fotografia da exsicata semelhante à depositada no herbário (Foto: Nídia C. Yoshida e Arquivo Pessoal). -----	25
Figura 3. Estruturas químicas dos compostos já isolados de <i>C. urucurana</i> -----	27
Figura 4. Classificação dos ciclopeptídeos segundo Tan e Zhou (2006) -----	28
Figura 5. Esquema de formação e organização dos módulos do complexo enzimático Não Ribossomal Peptídeo Sintetase (NRPS). -----	30
Figura 6. Fluxograma do fracionamento da casca de <i>Croton urucurana</i> .-----	36
Figura 7. A-Cromatoplaca com revelador para aminoácidos aplicado após hidrólise com HCl; B- Cromatoplaca com revelador para aminoácidos sem hidrolisar com HC-----	38
Figura 8. Fluxograma do fracionamento do látex de <i>Croton urucurana</i> . -----	40
Figura 9. Principais vias de fragmentação de procianidinas/ prodelfinidinas dimérica por IES negativo. -----	51
Figura 10. Estruturas químicas das substâncias identificadas no EMCu, LaCu, FAC, FAL e FHMC de <i>Croton urucurana</i> . -----	56
Figura 11. Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A- EMCu (modo positivo),B- EMCu (modo negativo);C- LaCu (modo positivo); D-LaCu (modo negativo). -----	58
Figura 12. Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A- FAC (modo positivo), B-FAC (modo negativo), C-FAL (modo positivo), D-FAL (modo negativo). -----	59
Figura 13.Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A-FHMC (modo positivo); B- FHMC (modo negativo); C- Branco (modo positivo), D- Branco (modo negativo)-----	60
Figura 14. Estrutura química do 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (19) -----	62
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CDCl_3) do 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (19)-----	63
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° (75 MHz – CDCl_3) do 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (19)-----	64

Figura 17. HR-IES-EM 3-Oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (19) m/z 375,1800 [M+H] ⁺ -----	65
Figura 18. Principais correlações observadas nos experimentos NOESY. -----	66
Figura 19. Estrutura química do (<i>rel</i> 3R, 4S) 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22). -----	68
Figura 20. Espectro de Infravermelho (KBr) do 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22) -----	69
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz – CDCl ₃) 3-hidróxi-12- <i>epi</i> - barbascoato de metila (22) -----	70
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C e DEPT 135° e 90° (75 MHz – CDCl ₃) 3-hidróxi- 12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22) -----	71
Figura 23. Espectro de correlações ¹ H x ¹³ C - HMBC (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz) do 3- hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22). -----	72
Figura 24. Espectro de correlações ¹ H x ¹³ C - JCH - HSQC (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz) 3- hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22). -----	73
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H x ¹ H COSY (CDCl ₃ , 300 MHz) 3-hidróxi-12- <i>epi</i> - barbascoato de metila (22) -----	74
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H x ¹ H NOESY (CDCl ₃ , 300 MHz) do 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22) -----	75
Figura 27. HR-IES-EM do 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (22), m/z 377,1972 [M+H] ⁺ -----	76
Figura 28. Estrutura química do [1-9-NaC]-crouorb A1 (18) -----	78
Figura 29. Espectro RMN ¹ H (300 MHz-DMSO-d ₆) do ciclopeptídeo [1-9-NaC]- crouorb A1 (18) -----	80
Figura 30. Espectro ¹³ C e Dept 135° (75 MHz-DMSO-d ₆) do ciclopeptídeo [1-9- NaC]-crouorb A1 (18) -----	81
Figura 31. HR-IES-EM do ciclopeptídeo [1-9-NaC]-crouorb A1 (18), m/z 817,4183 [M+H] ⁺ -----	82
Figura 32. Estrutura química do [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23) -----	84
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz-DEMO-d ₆) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)	88
Figura 34. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz - DMSO-d ₆) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23) -----	89

Figura 35. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)-----	90
Figura 36. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH - HSQC (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)-----	91
Figura 37. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)-----	92
Figura 38. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (DMSO- d_6 , 300 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)-----	93
Figura 39. HRIESEM do [1-9-NaC]-crouorb A2 (23) m/z 818,4011 $[\text{M}+\text{H}]^+$ -----	94
Figura 40. Estrutura química de galocatequina (3) e epigalocatequina (7) -----	96
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CD_3OD) galocatequina (3) e epigalocatequina (7)-----	97
Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C e Dept 135° (75 MHz – CD_3OD) galocatequina (3) e epigalocatequina (7)-----	98
Figura 43. Estrutura química de catequina (9) e epicatequina (12) -----	99
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CD_3OD) catequina (9) e epicatequina (12)-----	101
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz – CD_3OD) catequina (9) e epicatequina (12)-----	102
Figura 46. Cromatograma CG-EM (TIC) da fase hexânica do extrato metanólico da casca de <i>C. urucurana</i> (FHC)-----	106
Figura 47. Cromatograma CG-EM (TIC) da fase hexânica do látex de <i>C. urucurana</i> (FHL)-----	106
Figura 48. Espectro de massas GC-EM do ácido hardiwińcko. -----	106
Figura 49. Espectro de massa GC-EM do 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila. ---	107
Figura 50. Espectro de massas CG-EM do 12- <i>epi</i> -barbascoato de metila. -----	107
Figura 51. Espectro de massas CG-EM do 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila. -----	107
Figura 52. Gel de agarose representativo do produto de amplificação por PCR de fragmento do Domínio TE de NRPS. M- marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen);-----	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados, método utilizado e atividade de <i>C. urucurana</i> --	26
Tabela 2. Dados cromatográficos, UV, EM e EM/EM de compostos identificados no EMCu, LaCu, FAC, FAL e FHMC de <i>Croton urucurana</i> . -----	54
Tabela 3. Compostos identificados nas amostras Lacu, EMCu, FAL, FAC e FHMC.	57
Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila em CDCl_3 e da mesma citada na literatura (RMN ^1H 500 MHz e ^{13}C 125 MHz em CDCl_3) -----	62
Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do 3-hidróxi-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila em CDCl_3 -----	67
Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do [1-9- NaC]-crouorb A1 em DMSO-d_6 e da mesma citada na literatura (RMN ^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz em DMSO-d_6)-----	78
Tabela 7. Dados de RMN 1D e 2D do ciclopeptídeo [1-9- NaC]-Crouorb A2-----	85
Tabela 8. Principais fragmentos observados no espectro de HRIESEM/EM (m/z 818,4011, $[\text{M}+\text{H}]^+$, 44,6 eV)-----	87
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da mistura de Galocatequina (3) e Epigalocatequina (7) em CD_3OD e das mesmas citadas na literatura (RMN ^1H 500 MHz e ^{13}C 125 MHz em CD_3OD) -----	96
Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da mistura de Catequina (9) e Epicatequina (12) em CD_3OD e das mesmas citadas na literatura (RMN ^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz em CD_3OD)-----	100
Tabela 11. Composição percentual da fase hexânica do extrato metanólico da casca e da fase hexânica do látex de <i>Croton urucurana</i> -----	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Alanina
AcOEt	Acetato de etila
c	Concentração (g/L)
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
Ce ₂ (SO ₂) ₄	Sulfato de cério
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrila
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
D	Ácido aspártico
d	Dubleto
Da	Dalton
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DEPT 135°	<i>Distortionless Enhancement of Polarization Transfer using 135 degree decoupler pulse</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Domínio A	Domínio de Adenilação
EMCu	Extrato metanólico da casca de <i>C. urucurana</i>
F	Fenilalanina
FAC	Fase acetato de etila do extrato metanólico da casca de <i>C. urucurana</i>
FAL	Fase acetato de etila
FHC	Fase hexânica do extrato metanólico da casca de <i>C. urucurana</i>
FHL	Fase hexânica do látex de <i>C. urucurana</i>

FHMC	Fase hidrometanólica do extrato metanólico da casca de <i>C. urucurana</i>
G	Glicina
g	Grama
h	Hora
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Leucina
LACu	Látex de <i>C. urucurana</i>
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
N	Normalidade
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
nm	Nanômetro
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NRPS	Não Ribossomal Peptídeo Sintetase
Ø	Diâmetro
pb	Pares de bases
PCP	<i>Peptidyl Carrier Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
S	Serina
s	Singleto
sl	Singleto largo

TE	Domínio de tioesterase da NRPS
TFA	Ácido trifluoracético
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USP	Universidade de São Paulo
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV/vis	Ultravioleta/visível
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
δ	Deslocamento químico

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO -----	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO -----	22
2.1. Família Euphorbiaceae -----	22
2.2. Gênero Croton e a espécie <i>Croton urucurana</i> -----	23
2.3. Ciclopeptídeos Não Ribossomal Peptídeo Sintetase (NRPS) -----	28
3. OBJETIVOS -----	32
3.1 Objetivo geral -----	32
3.1.1 Objetivos específicos -----	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	34
4.1. Cascas -----	34
4.1.1. Extrato metanólico da casca de <i>Croton urucurana</i> (EMCu) -----	34
4.1.2. Estudo químico da fração FAC -----	34
4.1.2.1 Fracionamento da fração FAC-5: Isolamento das substâncias 19 e 22 ----	35
4.2 Látex -----	36
4.2.1 Fracionamento do látex (LACu) -----	36
4.2.2 Estudo químico da fração FAL -----	37
4.2.2.1 Detecção de amida peptídica por cromatoplaça de alta resolução (Zhou e Tan, 2000) -----	37
4.2.3. Estudo químico da subfração FAL-1 e FAL-2: Isolamento das substâncias 18 e 23. -----	38
4.2.3.1. Configuração absoluta dos aminoácidos pela análise de Marfey (Bhushan e Brückner, 2004). -----	39
4.2.4. Estudo químico da subfração FAL-4: Identificação das substâncias 3, 7, 9 e 12 -----	40
4.3. Perfil químico por CLAE-DAD-IES-EM/EM (HR-IES-EM/EM) -----	41

4.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) -----	41
4.5. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM)-----	42
4.6. Genes envolvidos na biossíntese dos ciclopeptídeos-----	43
4.6.1. Extração do DNA genômico (Doyle e Doyle, 1987; Ferreira e Grattapaglia, 1998) -----	43
4.6.2. Quantificação do DNA (Sambrook e Green, 2014)-----	43
4.6.3. Construção de oligonucleotídeos para os domínios A, C e TE -----	44
4.6.4. Amplificação dos genes e reação em cadeia da Polimerase (PCR)-----	44
4.6.5. Purificação do produto da PCR com acetato de amônio -----	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	48
5.1. Perfil químico do extrato da casca, látex e frações de <i>C. urucurana</i> .-----	48
5.2. Identificação/Elucidação estrutural das substâncias 19 e 22 -----	61
5.3. Identificação/Elucidação estrutural das substâncias 18 e 23 -----	77
5.4. Identificação/Elucidação estrutural dos compostos 3, 7, 9 e 12-----	95
5.5. Análise dos constituintes voláteis das fases hexânica da casca e látex de <i>C. urucurana</i> -----	103
5.6. Genes envolvidos na biossíntese de ciclopeptídeos -----	108
5.6.1. Extração do DNA genômico -----	108
5.6.2. Amplificação dos genes de NRPS -----	108
6. CONCLUSÕES -----	111
REFERÊNCIAS -----	113

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Durante a evolução biológica os organismos desenvolveram diversas linhas de defesa química, levando ao avanço de grupos de metabólitos secundários que são usados para sua função biológica endógena como múltiplos sistemas de sinalização química, tais como alcaloides, terpenoides, compostos fenólicos (Wink, 2003) e ciclopeptídeos (Zhou e Tan, 2000).

Alguns desses metabolitos secundários são empregados na indústria farmacêutica como fonte de imunossuppressores, anti-helmínticos e antibióticos movimentando, anualmente, no mercado cerca de U\$ 40 bilhões (Demain, 2014). Uma das classes de metabolitos utilizados nessa indústria são os ciclopeptídeos sintetizados por complexos enzimáticos multifuncionais chamados Peptídeos Sintetase Não Ribossomais (NRPS) (O'Brien e Wright, 2011). Esses metabólitos secundários empregados em medicamentos, em sua maioria, são primeiramente oriundos de produtos naturais, principalmente as plantas (Newman e Cragg, 2016; Rates, 2001).

Neste sentido, a pesquisa por novas moléculas proveniente de produtos naturais deve ser estimulada, pois as propriedades terapêuticas conferidas a essas estruturas são notórias pela complexidade estrutural como o número de centros de quiralidade, pontes, anéis e grupos funcionais presentes nesses metabólitos (Demain, 2014). Como exemplo temos o taxol, a forskolina e a artemisinina (Filho e Yunes, 1998; Foglio et al., 2006), utilizadas até hoje na medicina.

As plantas que apresentam algum potencial medicinal são imensuráveis (Veiga Junior et al., 2005). E, levando em consideração que o Brasil ampara cerca de 20 % de toda biodiversidade da terra (Lewinsonhn e Prado, 2002), torna-se fonte natural dessas substâncias ativas (Barreiro e Bolzani, 2009). Assim, a química de produtos naturais, aliada a outras áreas como a biologia molecular, colabora significativamente na busca por protótipos de novos medicamentos (Pupo et al., 2007).

Nesse contexto, destacam-se as espécies da família Euphorbiaceae que são de grande interesse farmacológico. É disseminada em todo globo terrestre em regiões tropicais e subtropicais, principalmente do continente africano e americano (Conegero et al., 2003). No Brasil ocorrem aproximadamente 70 gêneros com 1.100

espécies encontradas em diferentes tipos de biomas como a região amazônica, o cerrado e a caatinga (Filho, 2011).

Inserido nessa família e pertencente à subfamília Crotonoideae (Morais et al., 2006), o gênero *Croton* é considerado o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae (Lima e Pirani, 2008). No Brasil há em média 300 espécies, notoriamente habituados no nordeste (Randau et al., 2004) onde estima-se existirem 52 espécies (Vunda, 2011). Esse gênero ocupa os mais variados ambientes, enfatizando-se o cerrado, campos rupestres e caatinga (Silva et al., 2009).

Dentre as espécies do gênero encontra-se a *Croton urucurana*, alvo de estudo desse trabalho, uma árvore de pequeno médio porte (Sorreano et al., 2011), nativa da região do cerrado (Luchi, 2004). Perante a medicina popular, a casca de *C. urucurana* é utilizada empiricamente na forma de chá como analgésica, anticancerígena (Alves et al., 2008; Antoniazzi et al., 2016), antiviral, anti-inflamatória e também antiulcerogênica (Scalon, et al., 2008). Em que, estudos evidenciam a efetividade da *C. urucurana* na ação antimicrobiana (Oliveira et al., 2008), antidiarreica (Gurgel et al., 2001), cicatrizante (Esmeraldino et al., 2005), antiulcerogênica (Cordeiro et al., 2012), antinociceptiva (Cordeiro et al., 2016), entre outras.

Levando em consideração que a espécie *C. urucurana* é alvo de estudos científicos, como demonstrado, esse estudo objetivou-se contribuir para os estudos fitoquímicos e genéticos avançando na busca por novos constituintes químicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é considerada uma das maiores família com flor, com cerca 307 gêneros e 8000 espécies espalhadas pelos trópicos e subtropicais do globo terrestre (Judd et al., 1999; Webster, 1994). É constituída de arvores, arbustos, ervas, plantas penenes e plantas anuais (Webster, 2014).

Os gêneros mais populosos dessa família são: *Euphorbia* (cerca de 2000 espécies), *Croton* (cerca de 700 espécies), *Phyllanthus* (cerca de 500 espécies), *Acalypha* (cerca de 430 espécies), *Jatropha* (cerca de 175 espécies) e *Manihot* (cerca de 170 espécies) (Webster, 1994).

É caracterizada como uma família complexa composta desde espécies de grande agregação financeira como a mamona (*Ricinus communis* L.), em que das sementes é extraído óleo utilizado na indústria aeronáutica, fonte de polímeros para confecção de próteses humanas; a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), fundamental fonte de amido para alimentação humana; e a seringueira (*Hevea brasiliensis* Willd. Ex. A. Juss), fonte de borracha natural; até ervas daninhas consideradas nocivas à saúde como *Euphorbia maculata* L. (Schultes, 1987).

Alguns espécimes dessa família, além de importância econômica, são tóxicos como a *Ricinus communis* L. da onde é isolada a ricina, uma toxina potente (Palatnick e Tenenbein, 2000, Oliveira et al., 2007); Outras espécies são de uso benéfico na medicina popular como, por exemplo, as espécies *Croton oblongifolius* e *Croton tiglium* utilizadas para tratar convulsões, asma, reumatismo, entre outras (Kapoor, 1989); E algumas espécies são utilizadas meramente como ornamentais, como a *Euphorbia milii* Desmoul, coroa-de-cristo, usada como cerca viva; *Euphorbia pulcherrima*, bico-de-papagaio, cultivada principalmente para decorações natalinas (Biondi et al., 2008). Sendo uma família com potencial de pesquisa interessante.

As propriedades conferidas às espécies dessa família podem ser associadas a metabólitos secundários como diterpenos, taninos, alcaloides,

triterpenos, flavonoides (Seigler, 1994; Mwine e Damme, 2011), ciclopeptídeos (Zhou e Tan, 2000), entre outras. Um exemplo é o eufol (1), um triterpeno tetracíclico, comum nesse grupo (Moreira et al., 2010) e os diterpenos como a jatrofona (2), rodojaponina (3) e *cis*-desidrocrotonina (4) (Figura 1) (Pilon, 2011, Salatino et al., 2007), que são estruturas obtidas, primeiramente, de plantas.

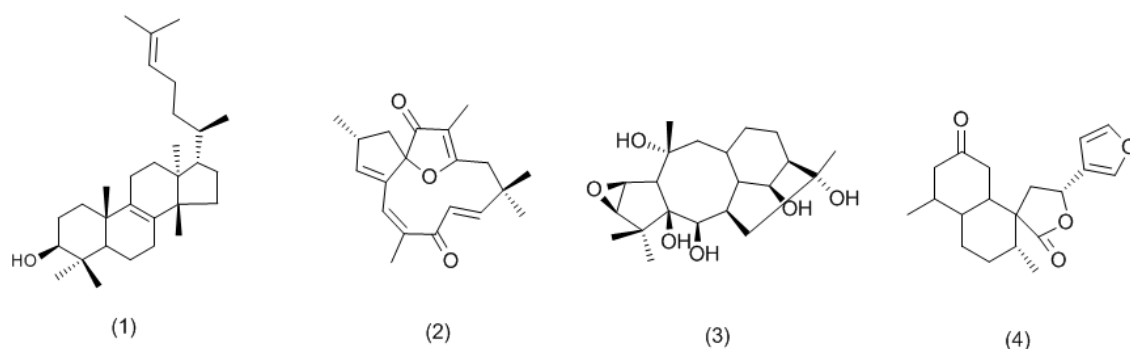


Figura 1. Estrutura dos principais terpenos encontrados na família Euphorbiaceae

2.2. Gênero *Croton* e a espécie *Croton urucurana*

O gênero *Croton*, é o segundo maior da família Euphorbiaceae (Webster, 1994, Lima e Pirani, 2008). No Brasil, são encontradas mais de 300 espécies habitando diversas vegetações, estando concentrada na principalmente na parte leste do país (Caruzo et al., 2011).

O gênero é particularizado e reconhecido pela produção de diterpenos com esqueleto do tipo clerodano como metabólitos secundários predominantes (Maciel et al., 2006). No entanto, as espécies de *Croton* produzem, também, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides, diterpenos (Salatino et al., 2007; Gupta et al., 2008) e ciclopeptídeos (Quintyne-Walcoot et al., 2007; Mehmood e Malik, 2010).

Nas regiões em que *Croton* são distribuídas existem múltiplos registros da utilização dessas plantas no tratamento de distintas enfermidades, ou seja, são usadas como plantas medicinais (Salatino et al., 2007). As atividades farmacológicas relevantes já descritas na literatura são anti-inflamatória, antiulcerogênica, analgésica e anti-hipertensiva (Randau et al., 2004). Alguns

exemplos são a canelinha (*C. zehntneri*), que tem atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas e a sacaca (*C. cajucara*) ou bruxaria segundo os índios Tupi, com atividade anti-inflamatória, anti-nociceptiva (Carvalho et al., 1996), antiulcerogênica (Brito et al., 1998), hipotensor (Silva et al., 2005) e antioxidante (Rodriguez et al., 2004). Em suma, as espécies do gênero *Croton* com propriedades terapêuticas são diversas, entre elas *Croton urucurana*, alvo desse estudo.

Evidenciada por estudos etnobotânicos (Alves et al., 2008; Antoniazzi et al., 2016) e numerosos estudos farmacológicos (Salatino et al., 2007) a *Croton urucurana* Baillon, que libera um látex vermelho vivo quando um talho é feito em seu tronco, é habitualmente chamada de sangue de drago ou sangra d'água (Figura 2) (Peres et al., 1998a). É considerada uma árvore de pequeno-médio porte (Sorreano et al., 2011) e, em geral, é utilizada na reabilitação de vegetações ripárias (Simionatto et al., 2007; Lima et al., 2016) e banhados (Gurgel et al., 2005).

Além de ser importante para reflorestamento de matas ciliares, *C. urucurana* também é um atrativo farmacológico, pois já foi evidenciada sua ação antimicrobiana (Peres et al., 1997; Oliveira et al., 2008), antidiarreica (Gurgel et al., 2001), cicatrizante (Esmeraldino et al., 2005), antiulcerogênica (Cordeiro et al., 2012), antioceptiva (Cordeiro et al., 2016) e toxicidade em ratas grávidas (Moraes-Souza et al., 2017).

Entre as partes da planta utilizadas para estudos científicos e/ou empiricamente na medicina popular encontram-se as folhas, cascas e látex (Salatino et al., 2007; Gupta et al., 2008) as quais estão associadas a atividades como antiulcerogênica (casca) (Cordeiro et al., 2012), antimicrobiana (látex) (Oliveira et al., 2008) e antioxidante (óleos essenciais das folhas) (Costa et al., 2008).



Figura 2. A- Fotografia do tronco de *Croton urucurana* que permite visualizar seu látex vermelho vivo; B- Fotografia da exsicata semelhante à depositada no herbário (Foto: Nídia C. Yoshida e Arquivo Pessoal).

As propriedades terapêuticas estão relacionadas com estruturas presentes e/ou acúmulos de metabólitos secundários nos tecidos vegetais (Moreno et al., 2009). Como mencionado antes, metabólitos secundários como compostos fenólicos, diterpenos, esteróis, flavonoides, alcaloide e triterpenos (Seigler, 1994; Oliveira et al., 2008; Mwine e Damme, 2011). A literatura revela que em extratos da casca e do látex da *C. urucurana* já foram identificados compostos dessas classes, como mostrado na Tabela 1 (Figura 3).

Tabela 1. Compostos identificados, método utilizado e atividade de *C. urucurana*

Compostos identificados	Parte da planta	Método utilizado	Atividade	Referência
Ácido acetil aleuritólico (1); β -sitosterol-3-O-glucosídio (2); Sonderianino (3); Campesterol (4); Estigmasterol (5); β -Sitosterol (6); (+)-catequina (7); (+)-galocatequina (8);	Casca (extrato metanólico)	Cromatografia em coluna aberta (Sílica gel 60)	Antimicrobiana	Peres et al., (1997)
Ácido acetil aleuritólico (1); β -sitosterol-3-O-glucosídio (2); Sonderianino (3); Campesterol (4); Estigmasterol (5); β -Sitosterol (6), (+)-catequina (7); (+)-galocatequina (8); 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodano-trien-2-ona (9); 12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (10);	Casca (extrato metanólico)	Cromatografia em coluna aberta (Sílica gel 60)	—	Peres et al. (1998a)
Ácido acetil aleuritólico (1); β -sitosterol-3-O-glucosídio (2); Sonderianino (3); Campesterol (4); Estigmasterol (5); β -Sitosterol (6); (+)-catequina (7); (+)-galocatequina (8);	Casca (Extrato metanólico)	Cromatografia em coluna aberta (Sílica gel 60)	Analgésica	Peres et al. (1998b)
83 compostos e os principais são: Borneol (11); Acetato de bornila (12); 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol (13); Sesquicineole (14);	Óleo essencial da casca	CG-EM	Antioxidante	Simionatto et al., (2007)
Sonderianino (3); 15,16-epóxi-3,13(16)-clerodano-trien-2-ona (9); 12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (10); 3-oxo-12-epibarbascoato de metila (15);	Casca (Extrato hexano, acetato de etila e etanol)	Cromatografia em coluna aberta (Sílica gel 230-400 mesh)	—	Pizzoatti et al., (2013)
Catequina (7); Galocatequina (8); 12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (10); 3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (15); ácido hardwickiico (16) Epicatequina (17); Procianidina B3 (18), Tembetarina (19); Magnoflorina (20); Taspina (21);	Casca (extrato metanólico)	CLAE-DAD-IES-EM/EM	Anti-inflamatória e antinociceptiva	Cordeiro et al., (2016)
[1-9-NaC]-Crouro A1 (22);	Látex	CLAE	Citotóxica	Cândido-Bacani et al. (2015)

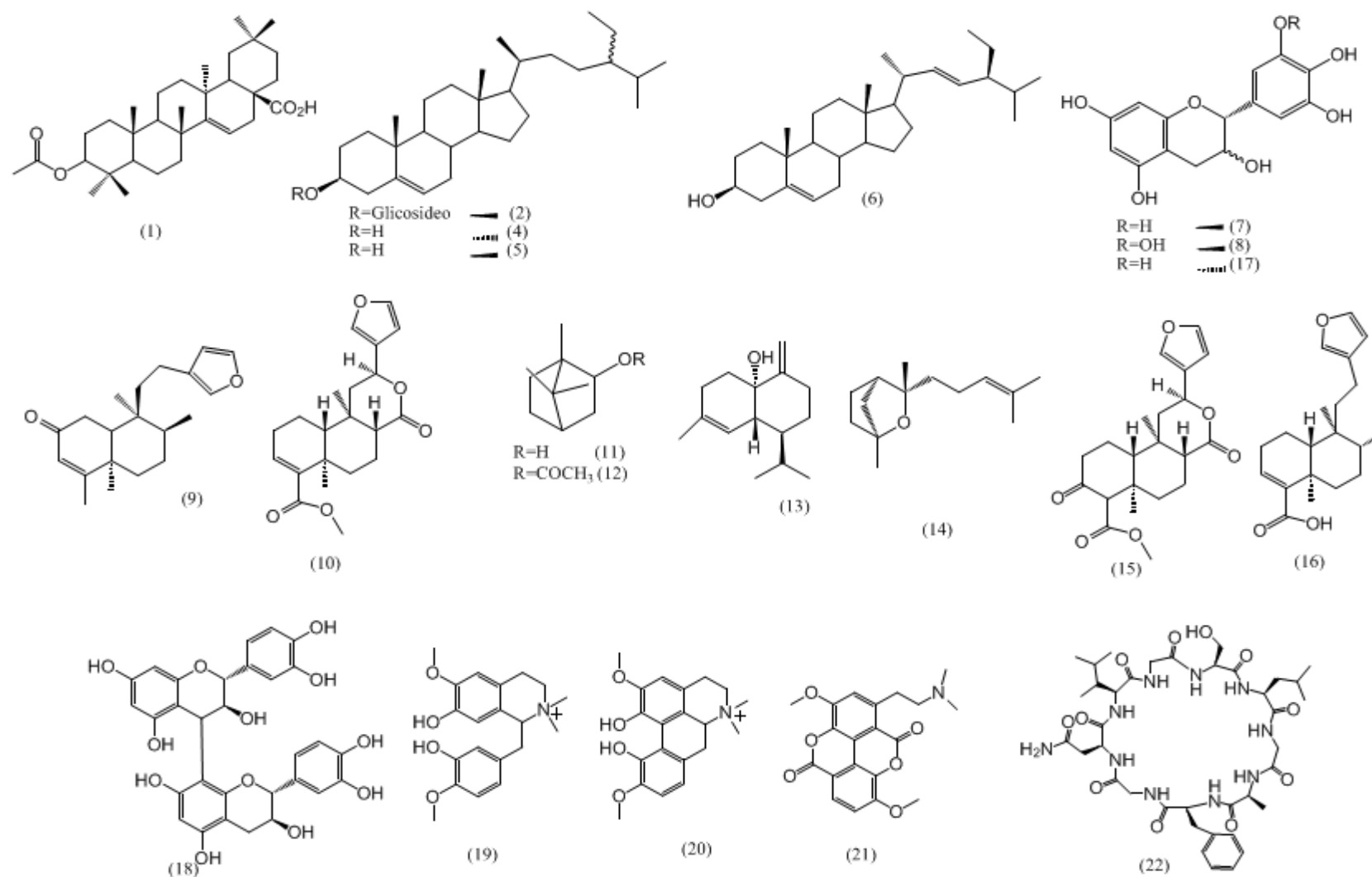
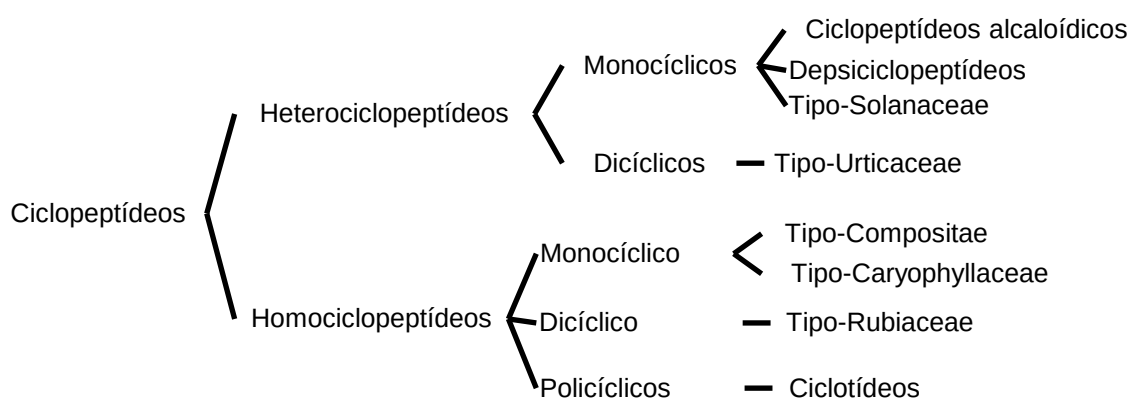


Figura 3. Estruturas químicas dos compostos já isolados de *C. urucurana*

2.3. Ciclopeptídeos Não Ribossomal Peptídeo Sintetase (NRPS)

Ciclopeptídeos são metabólitos secundários constituídos de pequeno número de aminoácidos. Trata-se de uma classe de substâncias de distribuição restrita, muitos deles dotados de importantes atividades biológicas incluindo atividade citotóxica e defesa do organismo (Menezes e Jared, 2002).

Devida à variedade estrutural, os ciclopeptídeos são classificados por níveis e subníveis de acordo com as características biossintéticas e estruturais. A primeira classificação foi dada por Zhou e Tan (2000), porém tais especificações necessitavam de maiores informações taxinômicas, sendo esta divisão revisada pelos autores em 2006 quando beneficiaram alguns ciclopeptídeos antes omitidos (Figura 4) (Picchi et al., 2009; Tan e Zhou, 2006).



Fonte: Adaptado de Tan e Zhou (2006).

Figura 4. Classificação dos ciclopeptídeos segundo Tan e Zhou (2006)

No entanto, a nomenclatura alicerçada em nomes de famílias generaliza os taxons citados e pode levar a conclusão errônea de que todos os peptídeos de natureza cíclica contidos nessa família se enquadram nessa classificação. Mas, é visto pelas características estruturais que essa abordagem é contraditória (Picchi et al., 2009).

Arnison *et al.* (2013) sugeriram então uma revisão bibliográfica, em que os taxons enquadrem o maior número possível de estruturas dadas pelas características biogeneticamente relacionadas. Como, por exemplo, orbitídeos ao invés de Tipo-Caryophyllaceae, que enquadra todas e quaisquer

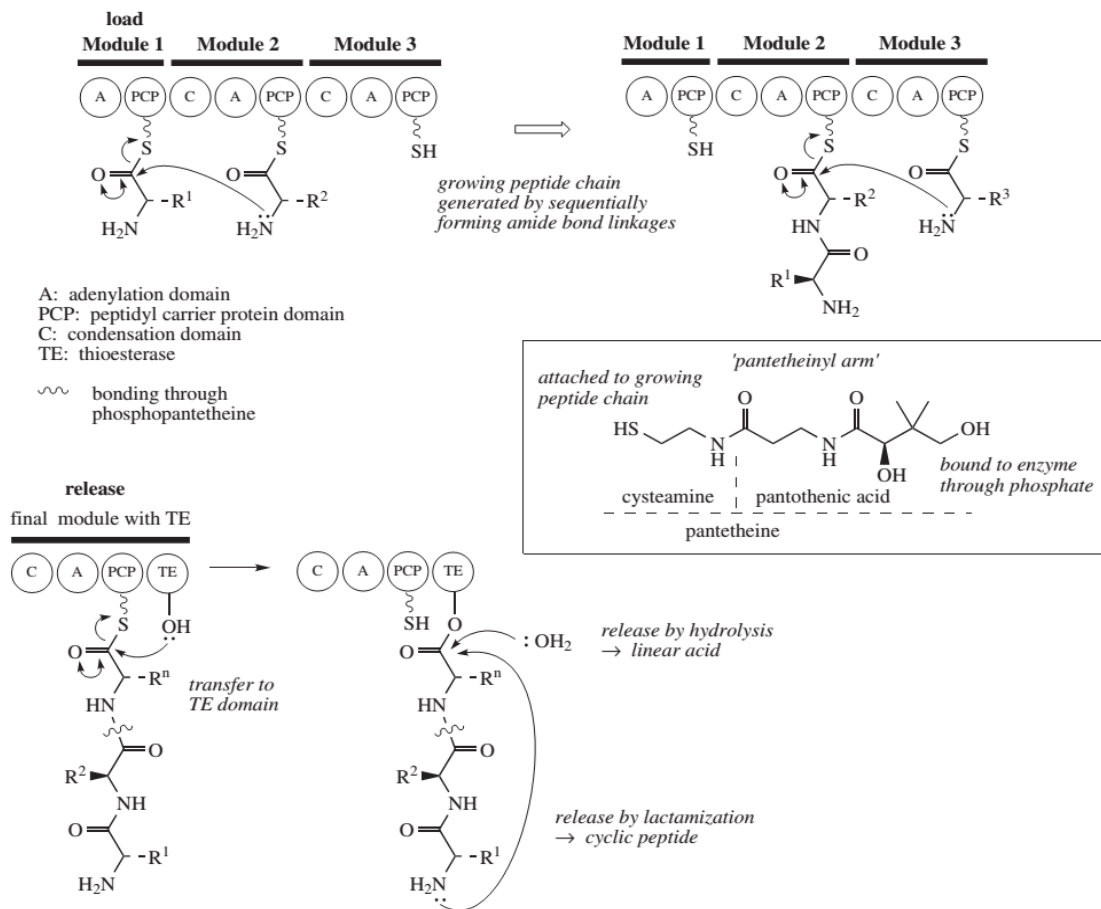
substâncias de natureza peptídicas ciclizadas via “cabeça-cauda”, que não possuem ligações dissulfeto e tenham entre 5-12 resíduos de aminoácidos. Tipo o qual, são encontrados em pelo menos nove famílias de plantas entre elas Annonaceae, Caryophyllaceae e Euphorbiaceae.

A complexidade dessas estruturas desafia a química de produtos naturais na busca por metodologias de isolamento rápido, com as reações complexas que podem realizar e sua biossíntese (Pinto et al., 2002). Em relação à biossíntese, sabe-se que ela ocorre por uma via não ribossomal, observado que mesmo com a adição de inibidores de RNAses (responsáveis pela degradação do RNA) estes peptídicos são gerados (Schwarzer et al., 2003).

A rota de biossíntese contempla um complexo enzimático formado por pelo menos três proteínas (NRPS, do inglês “*Non-Ribosomal Peptide Synthese*”), com arranjo modular. Os domínios básicos são: Domínio de Adenilação (Domínio A), onde os aminoácidos são ativados por conversão em AMP-ésteres com a formação de um aminoacil adenilato pela ação da enzima aminoacil-*t*RNA sintetase; Domínio de Tiolação (Domínio PCP – *peptidyl carrier protein*) que contém fosfopantateína como cofator utilizado para transportar a cadeia peptídica em crescimento através do seu grupo tiol pela ação da fosfopantateína transferase, formando um aminoacil tio éster; E, o Domínio de Condensação que ocorre a formação de ligação peptídica, catalisando o ataque nucleofílico pelo ataque do grupo amino do aminoacil tio éster vizinho. No modulo final, encontra-se um domínio de tioesterase (TE) responsável pela terminação da cadeia. Os módulos são realizados permitindo uma sequencia de ligações peptídicas, até que finalmente o peptídeo é libertado da enzima na forma linear ou cíclica (Figura 5) Dewick, 2009.

Em geral, os processos que levam a produção desses metabolitos são menores do que aqueles apresentados pela via ribossômica já que na síntese não-ribossômica as proteínas modulares catalisam o agrupamento dos peptídeos e simultaneamente servem como molde e utiliza uma grande variação de substratos, incluindo aminoácidos não proteicos. Além disso, a manipulação genética das NRPS permite a produção de peptídeos com modificações programadas de acordo com o gene codificado (Dewick, 2009, Picchi et al., 2009). Ou seja, oferecem vantagens, pois os passos que levam a

formação desses metabólitos ocorrem mais rapidamente com maiores possibilidades de matrizes e formação de estruturas.



Fonte: Dewick, 2009.

Figura 5. Esquema de formação e organização dos módulos do complexo enzimático Não Ribossomal Peptídeo Sintetase (NRPS).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil químico, purificar e caracterizar metabolitos secundários da casca e do látex de *C. urucurana* e, paralelamente, investigar os genes responsáveis pela produção dos ciclopeptídeos produzidos por *C. urucurana*.

3.1.1 Objetivos específicos

- Obter o extrato metanólico da casca de *Croton urucurana*.
- A partir do extrato metanólico, obter as fases hexânica, acetato de etila e hidrometanólica.
- Submeter o látex a partição líquido-líquido e obter a fase hexânica e fase acetato de etila
- Traçar o perfil químico do extrato metanólico da casca, o látex e suas as fases acetato de etila e a fase hidrometanólica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas por ionização de electrospray (CLAE-DAD-IES-EM/EM).
- Proceder o fracionamento cromatográfico das fases acetato de etila do extrato metanólico da casca e do látex, a fim de obter o isolamento, identificação e/ou elucidação estrutural das substâncias majoritárias.
- Analisar os principais constituintes voláteis da fase hexânica, tanto do extrato metanólico da casca quanto do látex, pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por impacto de elétrons (CG-EM).
- Obter dados de sequenciamento dos genes envolvidos na biossíntese dos ciclopeptídeos, com foco nas enzimas do complexo Peptídeo Sintetases Não Ribossomais (*Non-Ribosomal Peptide Synthases*, NPRS) por meio da técnica de PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cascas

Inicialmente as cascas de *C. urucurana* foram coletadas no município de Dourados (22°17'142" S/ 54°43' 327" W longitude), Mato Grosso do Sul, Brasil, previamente identificadas pela Prof^a Dra. Zefa Valdivina Pereira (Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brasil), com a exsicata depositada no Herbário DDMS da Cidade Universitária de Dourados sob o número 4601.

4.1.1. Extrato metanólico da casca de Croton urucurana (EMCu)

As cascas de *C. urucurana* (1 Kg) foram secas em estufa de circulação de ar a 40°C, moídas em moinho de quatro facas (Manesco e Ranieri Ltda, Willey) e extraídas em metanol. O extrato bruto (EMCu) foi concentrado sob pressão reduzida e liofilizado, apresentando um rendimento de 15,4 %. Inicialmente, parte do extrato bruto (100,5 g) foi particionado entre MeOH:H₂O 9:1 v/v (500 mL) e hexano (100 mL, 5x), posteriormente o volume de água foi elevado para MeOH:H₂O 1:1 v/v (900 mL) e a mistura extraída, exaustivamente, com acetato de etila (100 mL, 3x). As fases resultantes foram a FHC (hexânica), a FAC (acetato de etila) e a FHMC (hidrometanólica) com rendimentos de 10,2%, 24,7% e 60,4%, respectivamente (Figura 6).

4.1.2. Estudo químico da fração FAC

Uma parte da fase AcOEt (FAC, 5 g) foi aplicada em uma coluna de sílica gel 70-230 mesh (Ø 9 cm x 12 cm) usando como sistema de eluente Hex:AcOEt 8:2 v/v em gradiente de polaridade até AcOEt 100%. As subfrações resultantes foram avaliadas por cromatografia em camada delgada analítica

(CCDA) em cromatoplaças de sílica gel 60G com fluorescência w/254 nm eluídas com CHCl_3 :MeOH 9,5:0,5 v/v e revelados com MeOH/ H_2SO_4 10% seguido de aquecimento. As subfrações foram reunidas conforme a similaridade do fator de retenção (R_f) resultando em 23 subfrações finais (Figura 6).

4.1.2.1 Fracionamento da fração FAC-5: Isolamento das substâncias 19 e 22

A subfração **FAC-5** (968 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico sobre uma coluna tendo como suporte sílica gel 200-400 mesh ($\varnothing$ 2 cm x 29 cm) eluída com n-hexano e quantidades crescentes de AcOEt (20-100%) e deste processo, foram obtidas 374 frações (~10 mL cada), as quais foram avaliadas por CCDA (CHCl_3 :MeOH 9:1, 8:2 ou 7:3 v/v) e combinadas em 38 frações finais. Dessas a fração 26, inicialmente na forma de um óleo amarelo e depois de lavagens sucessivas com CH_2Cl_2 :MeOH originou **19** (33 mg), sob forma de cristais agulha, $[\alpha]_D + 50,5$ (c 1,03, acetona). De modo semelhante, a fração 32 originou **22** (31 mg), também na forma de cristais; Ponto de fusão = 145,5–147,6 °C; IV (KBr) $\nu_{max}^{\text{CHCl}_3}$ / cm^{-1} : 3455 (OH), 2951, 1727 (CO), 1433, 1342, 1231, 1175, 1070, 1035, 874, 784, 594, $[\alpha]_D - 50$ (c 1,0 ; CHCl_3) (Figura 6).

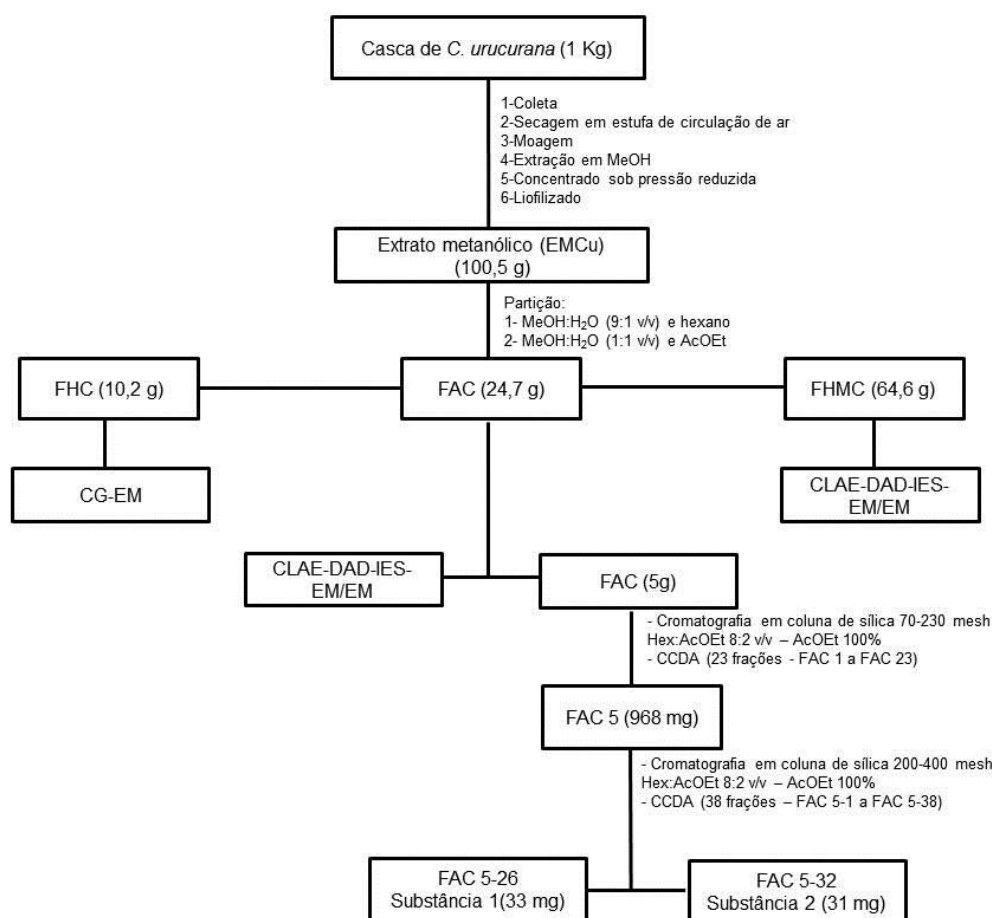


Figura 6. Fluxograma do fracionamento da casca de *Croton urucurana*.

4.2 Látex

O latex de *C. urucurana* foi coletado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°25'13" S/ 54°39'31" W longitude). O espécime foi identificado por Prof. Arnildo Pott (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil), amostra de n. 30924 depositado no Herbário CG/MS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.2.1 Fracionamento do látex (LACu)

O látex (100 g) (LACu), imediatamente após a coleta, foi suspenso em MeOH 9:1 v/v (500 mL), e a mistura foi extraída, exaustivamente, com hexano (100 mL, 5x) e posteriormente com aceto de etila (100 mL, 5x) (Figura 8). As fases resultantes desse procedimento foram FHL (hexânica-7,3%) e FAL (acetato de etila-40,7%).

4.2.2 Estudo químico da fração FAL

Uma alíquota de 3,0 g da fase acetato do látex (FAL) foi aplicada numa coluna Sephadex LH-20[®] (Ø 5 cm × 36 cm) eluída em sistema isocrático com MeOH para se obter um total de 54 subfrações (~10 mL cada). Tais frações foram analisadas por CCDA utilizando cromatoplasas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (Merck). O eluente usado foi CHCl₃:MeOH na proporção 9:1 v/v, reveladas com solução de sulfato de cério (Ce₂(SO₄)₃) seguidas de aquecimento e agrupadas de acordo com a similaridade do fator de retenção (R_f) em 7 subfrações finais (Figura 8).

4.2.2.1 Detecção de amida peptídica por cromatoplasa de alta resolução (Zhou e Tan, 2000)

As 7 subfrações obtidas do fracionamento da fase acetato de etila do látex foram submetidas à detecção de amida peptídica para determinação de ciclopeptídeos nas amostras. As amostras foram aplicadas em cromatoplasas de alta resolução de sílica gel (10 cm x 5 cm, Merck) e eluídas com CHCl₃:MeOH 9:1 v/v. Após esse processo, a cromatoplasa foi colocada, suspensa num recipiente de vidro selado com cerca de 20 mL de HCl concentrado, numa estufa de secagem (100 °C) durante 2 h para promover a hidrólise. Arrefeceu-se durante 10 minutos e em seguida, pulverizada com reagente de 0,2% de ninidrina em acetona seguida de aquecimento. O

aparecimento de manchas vermelho-alaranjadas é um indício que as amostra contém ciclopeptídeos (Figura 7).

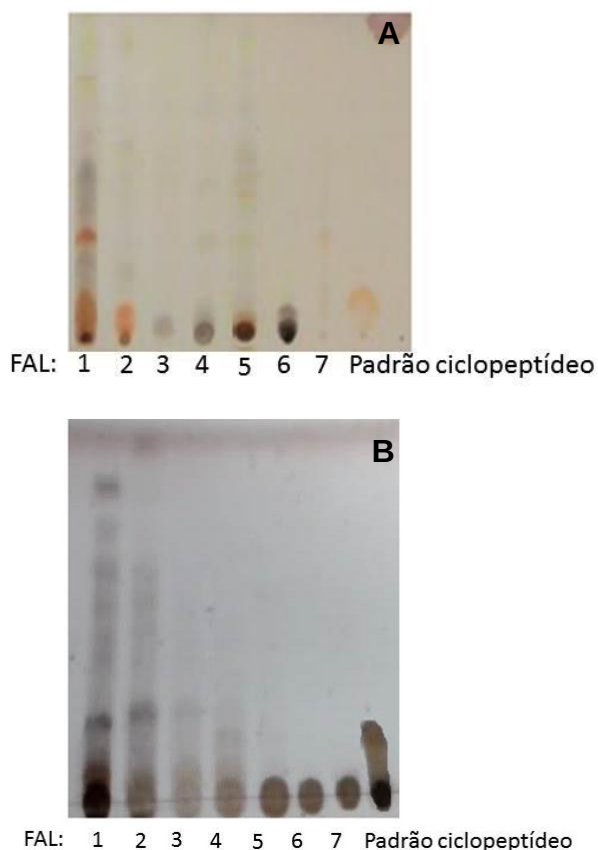


Figura 7. A-Cromatoplaça com revelador para aminoácidos aplicado após hidrólise com HCl;
B- Cromatoplaça com revelador para aminoácidos sem hidrolisar com HCl

4.2.3. Estudo químico da subfração **FAL-1** e **FAL-2**: Isolamento das substâncias **18** e **23**.

As subfrações **FAL-1** (260 mg) e **FAL-2** (40 mg) solubilizadas em DMSO na concentração de 50 mg/mL foram submetidas, separadamente, à CLAE semi-preparativa em coluna cromatográfica de fase reversa C-18 (Luna[®] 5 μ C-18(2), 100 Å, Phenomenex, USA), em aparelho Waters com detector UV/vis Waters 2489 e bombas Waters[™] 600 pump. A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático de CH₃CN 37% com 0,1% de TFA em solução aquosa e detecção em λ 277 e λ 220 nm, resultando no isolamento e elucidação estrutural das substâncias **18** (30 mg), sólido branco amorfo, $[\alpha]_{546} - 27,1(c\ 2,1$

$\times 10^{-3}$, solução aquosa de CH_3CN 37%); e **23** (20 mg), também como sólido branco amorfo, $[\alpha]_{546} - 28,7(c\ 1,4 \times 10^{-3}$, solução aquosa de CH_3CN 37%) (Figura 10).

4.2.3.1. Configuração absoluta dos aminoácidos pela análise de Marfey (Bhushan e Brückner, 2004).

Na primeira etapa, o composto **18** (1 mg) e **23** (1 mg) foi hidrolisado adicionando 1 mL de HCl 6N a 95°C durante 16 h. Após esse período, o hidrolisado foi evaporado com N_2 até a secura para remover qualquer resquício de HCl da amostra e, como segunda etapa, redissolvido em 900 μL de acetona e 20 μL de NaHCO_3 1M. Foi adicionada a mistura 100 μL da solução de N- α -(2,4-dinitro-5-fluorfenil)-L-alaninamida (L-FDDA, reagente de Marfey, sigma) e aquecida durante 1 h. Depois de resfriada em temperatura ambiente, adicionou-se 10 μL de HCl 2N, seco e dissolvido em solução aquosa de acetonitrila 50% (600 μL). Cinco μL dessa solução, amino ácidos derivado de FDDA, foram submetidos á CLAE em escala analítica (Shimadzu, Kyoto, Japan), utilizando coluna C-18 (Shim-pack CLC-ODS(M)[®] 5 μ , 100 Å, Shimadzu, Tokyo, Japan). Como fase móvel foi usada uma solução aquosa de CH_3CN contendo 4% de TFA, em gradiente linear (20-35 % em 40 min) para análise do tempo de retenção para L e D- serina e isocrático (45%) para L e D- alanina, leucina e fenilalanina com fluxo de 0,9 mL.min⁻¹ e detector com absorção em 340 nm.

Padrões de L e D-serina (S), L e D-alanina (A), L e D-leucina (L) e L e D- fenilalanina (F) (50 mM) foram preparados iniciando-se pela segunda etapa e submetidos á CLAE sob condições supracitadas e então observados os tempos de retenção (min) para os aminoácidos derivados de FDDA e o reagente residual de Marfey, respectivamente. Os seguintes tempos foram observados L- Ala (2,04 e 2,36); D-Ala (2,15 e 2,36); L-Leu (3,22 e 2,40); D-Leu (4,41 e 2,40); L- Fen (3,93 e 2,35), D-Fen (3,18 e 2,35), L-Ser (7,32 e 13,13) e D-Ser (7,52 e 13,13). O tempo de retenção (min) do composto **18** e o resíduo de Marfey foram L-Ala (2,05 e 2,39), L-Leu (3,12 e 2,39), L-Fel (3,89 e 2,39) e L-Ser (7,37 e

13,16); para o composto **23** L-Ala (2,08 e 2,40), L-Leu (3,16 e 2,40), L-Fen (3,97 e 2,40) e L-Ser (7,32 e 13,10), nessa ordem.

4.2.4. Estudo químico da subfração FAL-4: Identificação das substâncias **3**, **7**, **9** e **12**

A fração FAL-4 (114 mg) foi submetida à cromatografia em coluna aberta usando como suporte Sephadex LH-20® (2,5x26 cm), eluída com sistema isocrático em MeOH 100%, resultando em 33 frações finais (10 mL). As frações foram avaliadas por CCDA em cromatoplasmas de sílica gel 60G com fluorescência w/254 nm, eluídas com CHCl₃:MeOH 6:4 v/v e revelados com Ce₂(SO₂)₄, seguido de aquecimento. Da subfração 22 levou a identificação, em mistura, das substâncias **3** e **7** (37 mg); e da subfração 27 a identificação, em mistura, das substâncias **9** e **12** (30 mg) (Figura 8).

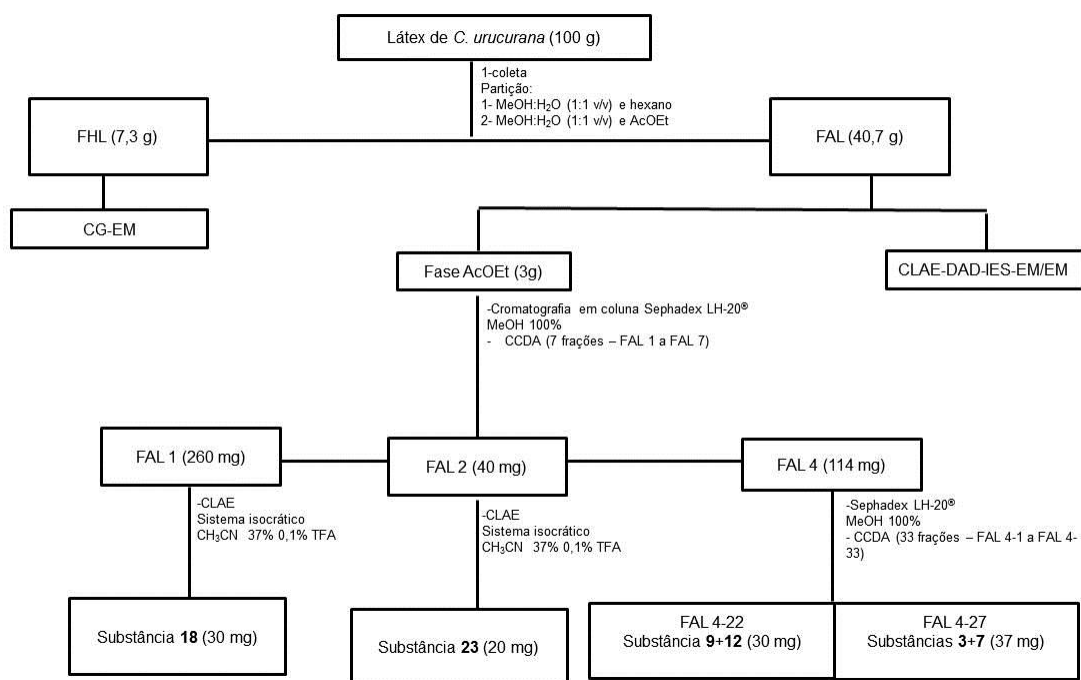


Figura 8. Fluxograma do fracionamento do látex de *Croton urucurana*.

4.3. Perfil químico por CLAE-DAD-IES-EM/EM (HR-IES-EM/EM)

Foi obtido um espectro de massas de alta resolução da substância isolada por ionização por *electrospray* em espectrofotômetro Shimadzu, localizado no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM-UFMS). Para tanto, foram preparadas soluções dos padrões de Galocatequina, Catequina, Epicatequina, Procianidina B3, 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila, 12-*epi*-barbascoato de metila e Ácido Hardwíkiico, todos na concentração final de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e dos extratos e fases, na concentração final de 1 mg.mL^{-1} , previamente submetidos à *clean up* por microextração em fase sólida (Waters, Sep-Pak Classic, C18). Todas as amostras utilizadas para essa análise foram filtradas em membranas de PVDF de 0,22 μm (Allcrom, São Paulo, Brazil), usando como solvente a mistura MeOH-H₂O (8,5:1,5 v/v).

O equipamento é composto por bombas Shimadzu LC-20AT, detector de arranjo de diodos (SPD-M20A DAD) acoplado à um espectrômetro de massas de alta resolução por tempo de voo micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Germany), com fonte de ionização por *electrospray* (IES) e operando no modo positivo e negativo. Um sistema gradiente de dois solventes A e B (A= 1% (v/v) de ácido acético em água Milli-Q; B=1% (v/v) de ácido acético em acetonitrila). Para cada amostra, foi realizada uma eluição de 3% B (0-2 min) avançando para 25% B (2-25 min) e posteriormente para 80% B (25-40 min), em fluxo de 0,3 mL.min^{-1} .

Foram injetadas alíquotas de 5 μL das amostras, individualmente, em coluna RP-18 (Kinetex, 2.6 μm , 150x2.1mm, Phenomenex, USA) com temperatura controlada e 50°C, acoplada a um cartucho SecurityGuard™ ULTRA para C18 HPLC, sub-2 μm (Phenomenex, USA). Os espectros de massas foram obtidos no intervalo de razão *massa/carga* (*m/z*) de 120-1200, sendo essa razão calibrada com adutos de ácido trifluoroacético (TFA).

4.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) uni- e bidimensionais foram adquiridos no equipamento Bruker® DPX-300, localizado no Instituto de Química-UFMS, operando na frequência de 300 MHz para hidrogênio tendo como referência interna sinais de hidrogênio residual do solvente e 75 MHz para carbono dispondo como referência interna o sinal residual do carbono do solvente. As amostras foram preparadas usando os solventes deuterados CDCl_3 , CD_3OD e DMSO-D_6 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

4.5. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos constituintes voláteis de FHC e FHL foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo (USP), através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um aparelho Shimadzu® QP2010 (Kyoto, Japan) utilizando coluna DB-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 mm de espessura do filme). As amostras foram diluídas em hexano na concentração final de 1 mg/mL.

O gás de arraste era Hélio (99,999%) com pressão de 95,8 kPa e fluxo de 1,40 mL/min. A temperatura do injetor foi de 260 °C, *Split* de 1:20 e temperatura da fonte em 250°C. A programação de temperatura foi estabelecida de 80-320 °C aumentando em 4°C/min. Os espectros de massas foram gravados no modo de ionização eletrônica (IE), com energia de ionização de 70 eV. Os espectros de massas de varredura completa foram adquiridos ao longo do intervalo de 35-550 Da (tempo de varredura: 3 scans/s).

A identificação dos constituintes, individualmente das amostras, foi determinada com base nos índices de retenção (IR), calculados a partir de n-alcenos ($\text{C}_{10}\text{-C}_{40}$) preparados em uma mistura diluída em n-hexano, comparação dos espectros de massas com aqueles existentes em banco de dados (WILEY e NIST), dados publicados na literatura (Adams, 2007; Simionatto et al., 2007) e/ou dados de amostras autênticas obtidas no Laboratório de

pesquisa de produtos naturais bioativos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (PronaBio-UFMS).

4.6. Genes envolvidos na biossíntese dos ciclopeptídeos

4.6.1. Extração do DNA genômico (Doyle e Doyle, 1987; Ferreira e Grattapaglia, 1998)

Cerca de 30-50 mg de folhas secas em sílica gel foram trituradas com N₂ líquido, em almoariz e transferido para um microtubo de centrifuga de 1,5 mL com o auxílio de uma espátula de ponta fina. A extração do DNA total foi realizada com a solução de CTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio catiônico 2%; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-Cl pH 8; 2- mercaptoetanol 2%), misturada ao material vegetal com auxílio do vórtex, de acordo com o procedimento de Doyle e Ferreira, seguido de incubação a 65 °C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida foram feitas duas extrações com clorofórmio, invertendo o material por 5 minutos, sendo então submetido à centrifugação (12.000 rpm) durante 5 minutos, seguido da adição de 80 µL de NH₄OAc 7,5 M juntamente com 1,2 mL de isopropanol 70% frio (-20 °C). O material foi deixado em refrigerador à temperatura de -20 °C por 40 minutos, sendo retirado do refrigerador e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, seguido de duas lavagens do *pellet* com etanol 70%. Após ser deixado em repouso por 10 minutos, o material foi centrifugado a 7.000 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o material em 100 µL de água ultrapura.

4.6.2. Quantificação do DNA (Sambrook e Green, 2014)

A quantificação do DNA total extraído foi realizada no espectrofotômetro NonoDrop (Termo Scientific) avaliado nos comprimentos de onda 260 e 280

nm, e o nível de pureza estimado pela relação a razão dos comprimentos de ondas de A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{280} .

4.6.3. Construção de oligonucleotídeos para os domínios A, C e TE

Para o desenho dos iniciadores para amplificação dos genes alvos, a estratégia adotada foi selecionar no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) sequências de nucleotídeos da classe aciltransferases e acil-CoA sintetase a fim de identificar regiões conservadas e desenhar os oligonucleotídeos degenerados para essas regiões. As sequências de nucleotídeos que codificam cada região foram alinhadas com ajuda do programa BioEdit®.

Com base nas sequências de nucleotídeos adquiridos no banco de dados NCBI foram desenhados oligonucleotídeos degenerados para os domínios de Adenilação (A)- direto **5'-TATKTSATSTAYACYTCTGG-3'** e reverso **5'-YYGGTGRWCTSTRGTGTYTCWR-3'**; Para o domínio de Condensação (C)- direto **5'-CCTGCTTAGTSYTGCCCTCACG-3'** e reverso **3'-CGTGAGGCAYSACTAAGCAGG-5'**; E, domínio Tiosterase (TE) – direto **5'-RGTGATGGCWCCTGGBTATG-3'** e reverso **5'-GRTCTGGMACMACATYCAGW-3'**.

4.6.4. Amplificação dos genes e reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene, foram usadas dois oligonucleotídeos alicerçado em regiões conservadas dentro das sequências usadas como molde para as reações de PCR. As reações de amplificação foram preparadas com 1 µL de DNA genômico; 0,4 µL de dNTPs (0,2 mM); 2 µL de cada iniciador (1 µM); 1,2 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM); 4,0 µL de tampão 10x; 0,4 uL de *Taq* DNA polimerase; e completado com água ultrapura para um volume final de 20 µL por reação. A amplificação foi realizada com termociclador TR-100™

(BioRad®) programado da seguinte forma: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, posteriormente foram realizados 30 ciclos em que cada ciclo passou por uma etapa de desnaturação à 95 °C durante 1 min, 2 min à 53 °C na etapa de anelamento (temperatura variável de acordo com o *primer* utilizado) e 1 min à 72 ° para etapa de extensão final.

Para confirmação de amplificação, 8 µL dos produtos finais e do padrão de fragmentos de DNA (100 pb DNA Ladder (Invitrogen™)) foram submetidos à eletroforese sobre gel de 1% agarose em tampão TBE 1X corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizado no transluminador.

4.6.5. Purificação do produto da PCR com acetato de amônio

O conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e adicionado à solução, 2 µL de acetato de amônio 3M (P.A-A.C.S, Synth, Daidema, São Paulo) e 40 µL de álcool etílico absoluto (P.A, CHEMCO, Hortolândia, São Paulo), ambas soluções estavam geladas. A mistura foi homogeneizada em Vórtex e deixada em freezer (-4 °C) *overnight*. Após esse período, a amostra foi centrifugada (12000 rpm) durante 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante descartado por imersão em papel toalha sobre a bancada, até não ter nenhum resíduo líquido dentro do microtubo. Em seguida, 200 µL de álcool etílico 70% foi adicionado e centrifugado durante 5 min (12000 rpm, temperatura ambiente) e novamente o sobrenadante foi descartado. Para garantir que não há resíduo de solvente, a amostra foi seca a 56 °C por 15 min. Por fim, adicionado 15 µL de água ultrapura e mantido *overnight* na geladeira (4°C). Posteriormente, a amostra foi congelada e enviada para sequenciamento na Plataforma de sequenciamento de DNA, Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), sob coordenação da técnica Dr.^a Heidi Lacerda A. da Cruz.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil químico do extrato da casca, látex e frações de *C. urucurana*.

A determinação do perfil químico do extrato metanólico da casca (EMCu) e látex (LaCu) de *C. urucurana* e de suas respectivas frações (FAC, FHMC e FAL) foi realizada por CLAE-DAD-IES-EM/EM (Item 4.3, p. 37) por meio da análise dos tempos de retenção nos cromatogramas e o cruzamento de dados apresentados pelos espectros de UV-vis, EM e EM/EM (Figuras 13, 14 e 15) em comparação com dados de padrões isolados de *C. urucurana* e/ou dados da literatura. No total, 21 compostos foram identificados, conforme mostrado na Tabela 2, 3 e ilustrados na Figura 10.

O composto **1** m/z 341,1076 ($[M-H]^-$, $Tr= 1,2$ min), que não apresentou absorção no espectro de UV, é compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ ($\Delta= 4,0$ ppm,) e sugestivo de um dissacarídeo constituído de unidades de hexoses. A confirmação de cada unidade do dissacarídeo não pode ser confirmada, pois a perda neutra de 162 daltons (Da) pode corresponder à perda de diversas hexoses como: glucose, galactose ou frutose. Os fragmentos observados m/z 179 e m/z 161 indicam a ruptura da ligação glicosídea para formação da molécula de monohexose complementar e subsequente perda de H_2O (Levandi et al., 2014). Dissacários como maltose, sucrose ou lactose possuem m/z 341 e seguem esse padrão de fragmentação (Gabbanini et al., 2010; Levandi et al., 2014). Esse dissacarídeo foi comum a todas as amostras.

As análises dos dados de EM e EM/EM dos picos $[M-H]^-$ dos compostos de **2** a **13** e **16**, com máximos no UV entre λ 270-280 característicos de compostos fenólicos e típicos da absorção do anel A de monômeros, dímeros e trímeros de flavan-3-ol.

Os monômeros **3** m/z 305,0654 ($[M-H]^-$, $Tr= 3,7$ min) e **7** m/z 305,0669 ($[M-H]^-$, $Tr=7,8$ min) são compatíveis com a fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_7$ (Δ 4,3 e 0,2 ppm, respectivamente) identificados como sendo os flavonoides galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**). Os compostos **9** m/z 289,0732 ($[M-H]^-$, $Tr= 8,2$ min) e **12** m/z 289,0723 ($[M-H]^-$, $Tr=11,9$ min) compatíveis com a

fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_6$ (Δ 1,4 ppm, e 1,2 ppm, respectivamente) foram identificados como sendo catequina (**9**) e epicatequina (**12**). A análise dos principais fragmentos no EM/EM são compatíveis com dados citados na literatura (Jaiswal et al., 2012; Cordeiro et al., 2016) e com os dados de UV-Vis, Tr, EM e EM/EM de amostras padrões. Para monômeros desse tipo o tempo de retenção é um importante parâmetro para diferenciação de epímeros, uma vez que é observado na literatura e/ou em amostras padrões tempos de corrida bem diferentes para os compostos. Esses (**3**, **7**, **9** e **12**) previamente isolados de *C. urucurana*. O composto **3** foi encontrado em todas as amostras; **7** nas amostras EMCu, LaCu e FAC; **9** e **12** nas amostras EMCu, LaCu, FAL e FAC.

Os íons $[M-H]^-$ do composto **8**, m/z 577,1326 (Tr=8,0 min), **10**, m/z 577,1343 (Tr= 10,3 min), **11**, m/z 577,1350 (Tr=11,3 min), **13**, m/z 577,1356 (Tr=12,1 min) e **16**, m/z 577,1347 (Tr=14,5 min) correspondem a diferentes dímeros de procianidinas. São compostos formados por unidades de catequina e/ou epicatequina [(epi)catequina], compatíveis com a fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{12}$ (Δ =4,4; Δ =1,5; Δ =0,2; Δ =0,8 e Δ =0,7 ppm, nessa ordem).

Metabólitos secundários dessa classe produzem fragmentos característicos pela fissão Retro-Diels-Alder (RDA) m/z 425 ($[M-H^- - 152]$) e fissão do anel heterocíclico (HRF) m/z 451, fornece informações sobre as ligações entre as duas unidades monoméricas e padrão de hidroxilação do anel B e a fragmentação quinona metideo (QM) m/z 289 que ajuda a definir qual a unidade de base, são as fragmentações que mais prevalecem nesse tipo de composto (Figura 9) (Li e Deinzer, 2007; Callemien e Collin, 2008; Cheng et al., 2011). No presente estudo, o composto **8** foi identificado como procianidina B3 (catequina-(4,8')-catequina), por co-injeção do padrão autêntico e fragmentação EM e EM/EM descritos na literatura (Friedrich et al., 2000). Os demais compostos com mesma razão m/z produziram padrão de fragmentação semelhante e podem ser designados dímeros de (epi)catequina. A presença de íons ($[M-H^+ - H_2O]^+$), segundo Jaiswal et al. (2012), caracteriza uma conectividade 4,8' entre as unidades. Mas, por falta de padrões a estereoquímica das unidades monoméricas não podem ser determinadas por espectrometria de massas.

As substâncias **4** m/z 593.1290 ($[M-H]^-$, $Tr= 3,9$ min), **5** m/z 593.1272 ($[M-H]^-$, $Tr= 4,7$ min) e **6** m/z 593.1286 ($[M-H]^-$, $Tr=11,9$ min) foram compatíveis com a fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{13}$ ($\Delta=1,9$; $\Delta=4,8$ e $\Delta=1,2$ ppm, respectivamente) sendo identificadas como pertencentes à classe das prodelfinidinas tipo B. De acordo com a literatura, as prodelfinidinas seguem a mesma fragmentação das procianidinas (Cheng et al., 2011). Os isômeros **4** e **5** produziram fragmentações semelhantes e os fragmentos no EM/EM de m/z 407,0756 ($C_{22}H_{15}O_8$, $\Delta=4,1$ ppm) e m/z 407,0761 ($C_{22}H_{14}O_8$, $\Delta=2,9$ ppm), compatíveis com uma fissão RDA ($[MH-152]^-$) seguido da perda de água (18 Da), bem como o fragmento QM m/z 289, revelam que a unidade base é uma (epi)catequina, sendo dímeros de isômeros de catequina e galocatequina/epigalocatequina [(epi)galocatequina] do tipo (epi)galocatequina-(4,8')-(epi)catequina. Já o composto **6** apresentou o pico base em m/z 423.0705 ($C_{22}H_{15}O_9$, $\Delta=2.1$ ppm) pela perda de um fragmento RDA ($[M-152]^-$), seguida da perda de água (18 Da); fragmento no espectro EM/EM de m/z 305.0663 ($C_{15}H_{13}O_7$, $\Delta=4.8$ ppm) indicando que a base é uma (epi)catequina, de modo a apontar um composto do tipo (epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina (Jaiswal et al., 2012).

Em contraste, a substância **2** apresentou-se no cromatograma como pico de m/z 609,1228 ($[M-H]^-$, $Tr=3,0$ min), compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{14}$ ($\Delta=3,5$ ppm) e também sugestiva de um composto da classe das prodelfinidinas, porém constituída de unidades de (epi)galocatequina. O fragmento m/z 423,0697 ($C_{22}H_{15}O_9$, $[M-186]^-$, $\Delta=5,8$ ppm), correspondente à perda por fissão RDA, seguido de uma perda de água (18 Da), e o fragmento m/z 305.0683 ($C_{15}H_{13}O_7$, $\Delta=5,2$ ppm), sugerem que a molécula é composta por duas unidades de (epi)galocatequinas (Jaiswal et al., 2012; Rösch et al., 2004). Assim, a análise dos dados de EM e EM/EM, e a comparação com dados da literatura, indica que **2** é uma (epi)galocatequina dimérica.

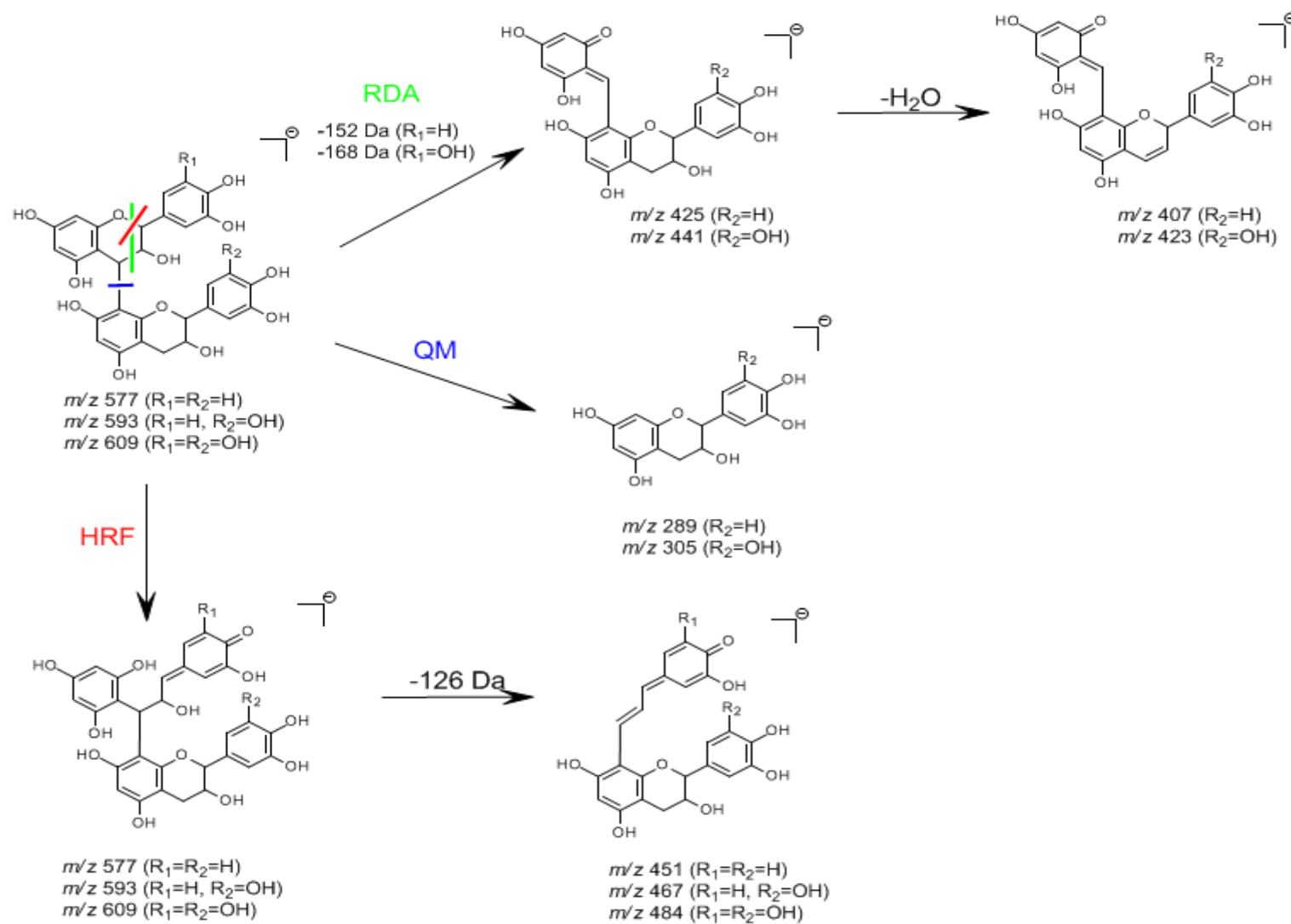


Figura 9. Principais vias de fragmentação de procianidinas/ prodelphinidinas dimérica por IES negativo.

Em ambos os extratos e suas respectivas fases foram observados esses compostos e a literatura revela que as proantocianidinas já foram identificadas no látex vermelho de *C. urucurana* (Esmeraldino et al., 2005; Gurgel et al., 2001). Monômeros e dímeros de catequinas, tais como esses compostos, apresentam atividades antiúlcera (Bezera et al., 2011), antioxidante (Kim et al., 2016; Muccilli, et al., 2017) e anticâncer (Cai et al., 2016), entre outras.

Os compostos **14** [m/z 344,1855 ($[M]^+$, Tr=12,9 min)], **15** [m/z 342,16 ($[M]^+$, Tr= 13,6 min)] e **17** [m/z 370,1298 ($[M]^+$, Tr=21,7 min)] foram identificados como o alcaloide benziltetraidroisoquinolínico (BTIQ) tembetarina e os alcaloides aporfínicos magnoflorine e taspina, respectivamente. A identificação desses compostos baseou-se nas fórmulas moleculares $C_{20}H_{26}NO_4$ ($\Delta=0,4$ ppm), $C_{20}H_{24}NO_4$ ($\Delta=2,9$ ppm), $C_{20}H_{20}NO_6$ ($\Delta=3,4$ ppm), respectivamente, e na observação dos principais fragmentos de base, os quais foram coerentes com aqueles relatados na literatura para estes compostos (Sim et al., 2013; Wang et al., 2013; Le et al., 2014). As fragmentações iniciam com a perda de dimetilamina $[(CH_3)_2NH]^+$ e são seguidas de perdas sucessivas de grupos CH_3 ou CH_3OH (Zhang et al., 2006; Sim et al., 2013). Esses picos foram encontrados nos extratos da casca (EMCu) e no látex (LaCu), sendo que na casca eles estão presentes em maior número em FHMC e no látex em FAL. Em geral, apesar da ocorrência desse tipo de metabólito secundário não ser comum em Euphorbiaceae, alcaloides com esqueleto BTIQ e aporfínicos são isolados do látex e não da casca (Salatino et al., 2007). São compostos que detêm importantes atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, citotóxica, antiviral (Zhan et al., 2011), leishmanicida e antifúngica (Chunmei e Myeong-Hyeon, 2014).

O composto com pico a m/z 817,4192 ($[M+H]^+$, Tr=30,4 min) e fórmula $C_{37}H_{57}N_{10}O_{11}$ (**18**, $\Delta=3,2$ ppm) foi identificado como sendo o ciclopeptídeo, [1-9-N α C]-Crouorb A1, com nove resíduos de aminoácidos, já obtido do látex de *C. urucurana* por nosso grupo de pesquisa (Cândido-Bacani et al., 2015). Essa classe de composto em geral, é extraída com solventes como metanol ou etanol, ou seja, possuem afinidade com solventes de média-alta polaridade como os utilizados para extração dos extratos e frações (Tan e Zhou, 2006). Este composto foi observado em LaCu, de onde foi inicialmente obtido, e também em EMCu, onde não havia sido caracterizado. Este ciclopeptídeo foi

classificado como sendo um orbitídeo e apresenta importante atividade citotóxica contra linhagens de células de cancerígenas humanas (Cândido-Bacani et al., 2015). Em geral, orbitídeos são relatados por possuírem potente atividade citotóxica a diferentes linhagens de células cancerígenas (Tan e Zhou, 2006; Sabandar et al., 2013).

Os picos a m/z 373,1643 ($[M+H]^+$, Tr= 32,5 min), m/z 359,1856 ($[M+H]^+$, Tr=36,5 min) e m/z 315,1972 ($[M+H]^+$, Tr=39,5 min) foram compatíveis com as fórmulas moleculares $C_{21}H_{25}O_6$ (**19**, $\Delta=1,4$ ppm), $C_{21}H_{27}O_5$ (**20**, $\Delta= 0,8$ ppm) e $C_{20}H_{27}O_3$ (**21**, $\Delta=0,7$ ppm), respectivamente. Os valores de m/z associados às fórmulas moleculares prováveis e a ocorrência comum dessa classe na família (Salatino et al., 2007) indicam que os íons protonados pertencem a classe dos diterpenos. A comparação dos tempos de retenção dos espectros de EM e EM/EM com os de padrões co-injetados confirmaram tratar-se dos diterpenos de esqueleto clerodano 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**), 12-*epi*-barbascoato de metila (**20**) e ácido hardwíckico (**21**). Diterpenos com esse esqueleto são associados na literatura a atividade anti-inflamatória (Carvalho et al., 1996), antiúlcera (Antonisamy et al., 2014; Rodriguez et al., 2004), citotóxica (Wang et al., 2013), antifúngica (Tamokou et al., 2009), leishmanicida (Lima et al., 2015), antibacteriana (Du et al., 2015), entre outras propriedades. Os mesmos não foram observados no látex.

Tabela 2. Dados cromatográficos, UV, EM e EM/EM de compostos identificados no EMCu, LaCu, FAC, FAL e FHMC de *Croton urucurana*.

Nº	Tr (min)	Composto	Principais fragmentações [M-H] ⁻	Principais fragmentações [M+H] ⁺	UV (nm)
1	1,2	Di-hexosídio (não especificado)	EM: 341.1076 [M-H] ⁻ , 191.0527. EM/EM: 179.0543, 161.0410		-
2	3,0	(epi)galocatequina-(4,8')-(epi)galocatequina	EM: 609.1228 [M-H] ⁻ , 291.9878, 217.0018. EM/EM: 423.0697, 305.0683, 219.0550, 177.0178	EM: 611,1452, 443,0945, 305, 0635 EM/EM: 425, 0799.	271
3	3,7	Galocatequina*	EM: 305.0654 [M-H] ⁻ , 261.0734, 221.0247, 179.0286. EM/EM: 219.0629 175.0353, 165.0145	307,0815, 267,0750, 218, 0197. EM/EM: 177,0589.	273
4	3,9	(epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	EM: 593.1290 [M-H] ⁻ , 387.0650, 305.0655, 216.9996. EM/EM: 407.0756, 339.0821, 289.0732, 245.0776, 203.0588, 177.0170	—	273
5	4,7	(epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	EM: 593.1272 [M-H] ⁻ , 425.0837, 291.9888. EM/EM: 407.0761, 339.0887, 289.0689, 245.0766, 203.0688, 177.0167	—	273
6	5,2	(epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	EM: 593.1286 [M-H] ⁻ , 425.0710, 291.9882, 216.995. EM/EM (593.1286, 45.9 eV): 423.0705, 305.0663, 289.0717, 245.0465, 219.0605	—	271
7	7,8	Epigalocatequina*	EM: 305.0669 [M-H] ⁻ , 217.0034, 179.0279 EM/EM: 175.0428, 167.0347	EM: 307,0819, 289,0678, 181, 0480 EM/EM: 177,0552, 163,04161	278
8	8,0	(epi)catechin-(4,8')-(epi)catechin [B3]*	EM: 577.1326 [M-H] ⁻ , 425.0867. EM/EM: 407.0763, 289.0714.		278
9	8,3	Catequina*	EM: 289.0732 [M-H] ⁻ , 245.0813, 217.0023, 179.0298 EM/EM: 221.0861, 203.0694, 187.0386, 159.0499	EM: 291, 0838 [M+H] ⁺ , 205,0309, 165,0536. EM/EM: 207,0574, 189,0533, 161,0584.	278
10	10,3	(epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	EM: 577.1343 [M-H] ⁻ , 425.0817, 291.9866. EM/EM: 407.0766, 289.0704.	—	278
11	11,3	(epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	EM: 577.1350 [M-H] ⁻ , 425.0871, 291.9899. EM/EM: 407.0779, 289.0716.	—	278
12	11,9	Epicatequina	EM: 289.0723 [M-H] ⁻ , 245.0828, 221.0786, 203.0670, 179.0289. EM/EM: 221.0799, 203.0696, 175.0621, 159.0482	EM: 291,0854 [M+H] ⁺ , 205,0301, 163,0179. EM/EM: 161,0543.	278
13	12,1	(epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	EM: 577.1356 [M-H] ⁻ , 425.0826, 291.9912. EM/EM: 407.0722, 289.0724.	—	278
14	12,9	Tembetarina	—	EM: 344.1855 [M] ⁺ , 289.0662, 269.0676, 247,0256, 233.0256, 205.0291, 191.9723,	278

				173.9627, 145.0074, 175.0746	163.0181, EM/EM: 267.1018, 192.0996, 175.0746	155.9728, 267.1018, 192.0996, 175.0746	149.0168, 192.0996, 175.0746	
15	13.6	Magnoflorina	—		EM: 342.1686 [M] ⁺ , 297.1108, 262.9768, 232.0006, 217.0671, 205.0289, 191.9731, 173.9589, 163.0188, 155.9739, 145.0053, EM/EM: 297.1105, 282.0887, 265.0835, 237.0905, 222.0633, 191.0868			278
16	14.5	(epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	EM: 577.1347, 425.0865, 291.9892. EM/EM: 407.0814, 289.0749.		—			278
17	21.7	Taspina	—		EM: 370.1298 [M+H] ⁺ , 255.9750, 217.0736, 191.9732, 173.9661, 155.9752, 149.0263, 145.0097. EM/EM: 325.0737, 310.0431			275
18	30.4	[1-9-NaC]-Crouorb A1	EM: 815,4066 [M+H] ⁺ , 588,8969, 475,1573, 407,1711, 248,9599 EM/EM: 615,3022, 555,2612, 487,2325, 413, 2473, 385,1510, 363,1789, 317,1199, 280,1271, 170,0594.		EM: 839.4043 [M+Na] ⁺ , 817.4177 [M+H] ⁺ , 704.3280, 428.1895, 205.0298. EM/EM: 799.4171, 772.4066, 687.3377, 515.2536, 412.1762, 319.1449, 258.1471, 172.0772.			280
19	32.5	3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila*	EM: 409.1401 [M+Cl] ⁻ , 373.1643 [M-H] ⁻ , 330;2056, 305.0223, 263.0350, 223.0186, 201.0266. EM/EM: 341.1382, 325.1012, 297.15, 203.1015, 187.0741		EM: 397,1625 [M+Na] ⁺ , 375,1791 [M+H] ⁺ , 332,2261, 281,1387. EM/EM: 249,1078, 221,1204, 203,1071, 175,1109.			-
20	36.5	12- <i>epi</i> -barbascoato de metila*	—		EM: 717.3433 [2M+H] ⁺ , 359.1856 [M+H] ⁺ , 341.1750, 265.1441, 233.1168, 219.1385. EM/EM: 251.1266, 233.1167, 215.1051, 187.1116, 169.1014, 159.1169			-
21	39.5	Ácido Hardwíkiico*	EM: 315.1972 [M-H] ⁻ , 311.1665, 223.0189. EM/EM: 185.0066.		—			-

*compostos identificados com a co-injeção de padrões

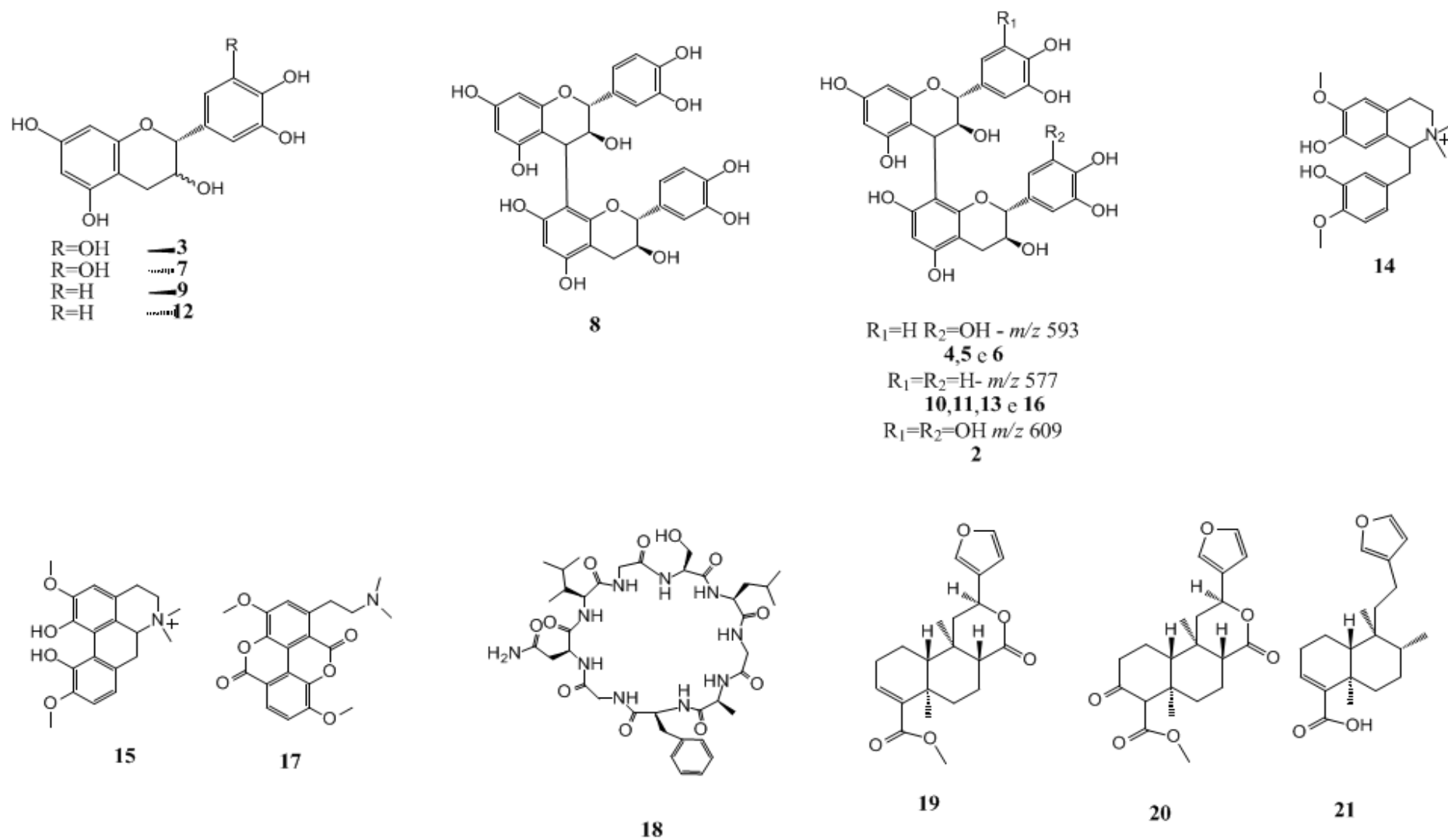


Figura 10. Estruturas químicas das substâncias identificadas no EMCu, LaCu, FAC, FAL e FHMC de *Croton urucurana*.

Tabela 3. Compostos identificados nas amostras LaCu, EMCu, FAL, FAC e FHMC.

Nº	Composto	Amostra				
		LaCu	EMCu	FAL	FAC	FHMC
1	Di-hexosídio (não especificado)	X	X	X	X	X
2	(Epi)galocatequina-(4,8')-(epi)galocatequina		-	-	X	-
3	Galocatequina	X	X	-	X	X
4	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	X	-	-	-	-
5	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	X	X	-	X	X
6	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)galocatequina	X	X	-	X	-
7	Epigalocatequina	X	X	-	X	-
8	(epi)catechin-(4,8')-(epi)catechin [B3]	X	X	-	X	X
9	Catequina	X	X	X	X	-
10	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	X	-	-	-	-
11	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	X	-	-	-	-
12	(-)-epicatequina	X	X	X	X	-
13	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	X	-	-	-	-
14	Tembetarina	X	X	X	-	X
15	Magnoflorina	-	X	X	X	X
16	(Epi)catequina-(4,8')-(epi)catequina	-	-	-	X	-
17	Taspina	X	X	X	-	X
18	[1-9-NαC]-Crouororb A1	X	X	X	X	X
19	3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila	-	X	-	X	-
20	12- <i>epi</i> -barbascoato de metila	-	X	-	X	-
21	Ácido Hardwíkiico	-	X	X	X	-
Total de compostos identificados		15	15	7	15	8

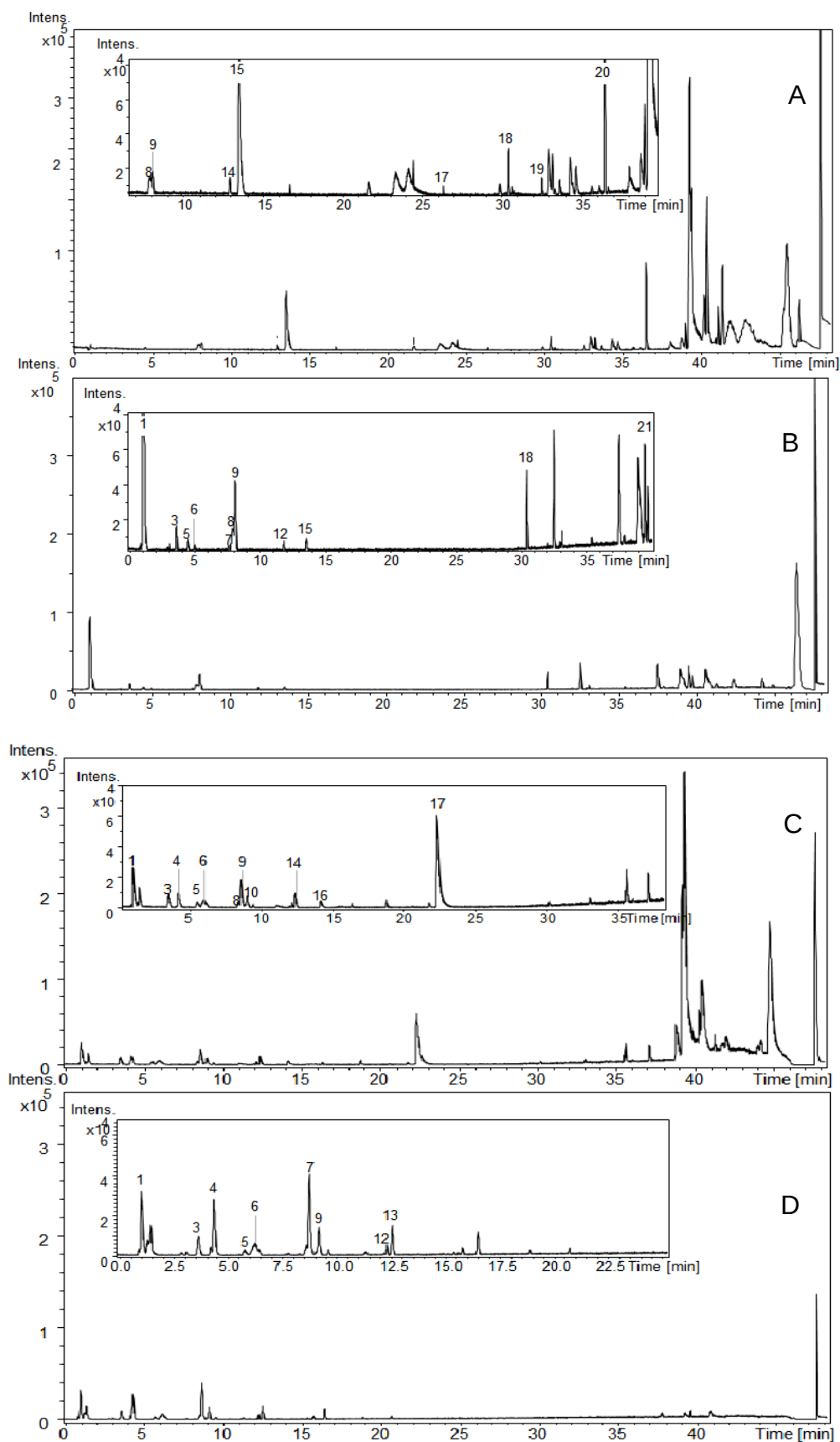


Figura 11. Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A- EMCu (modo positivo), B-EMCu (modo negativo); C- LaCu (modo positivo); D-LaCu (modo negativo).

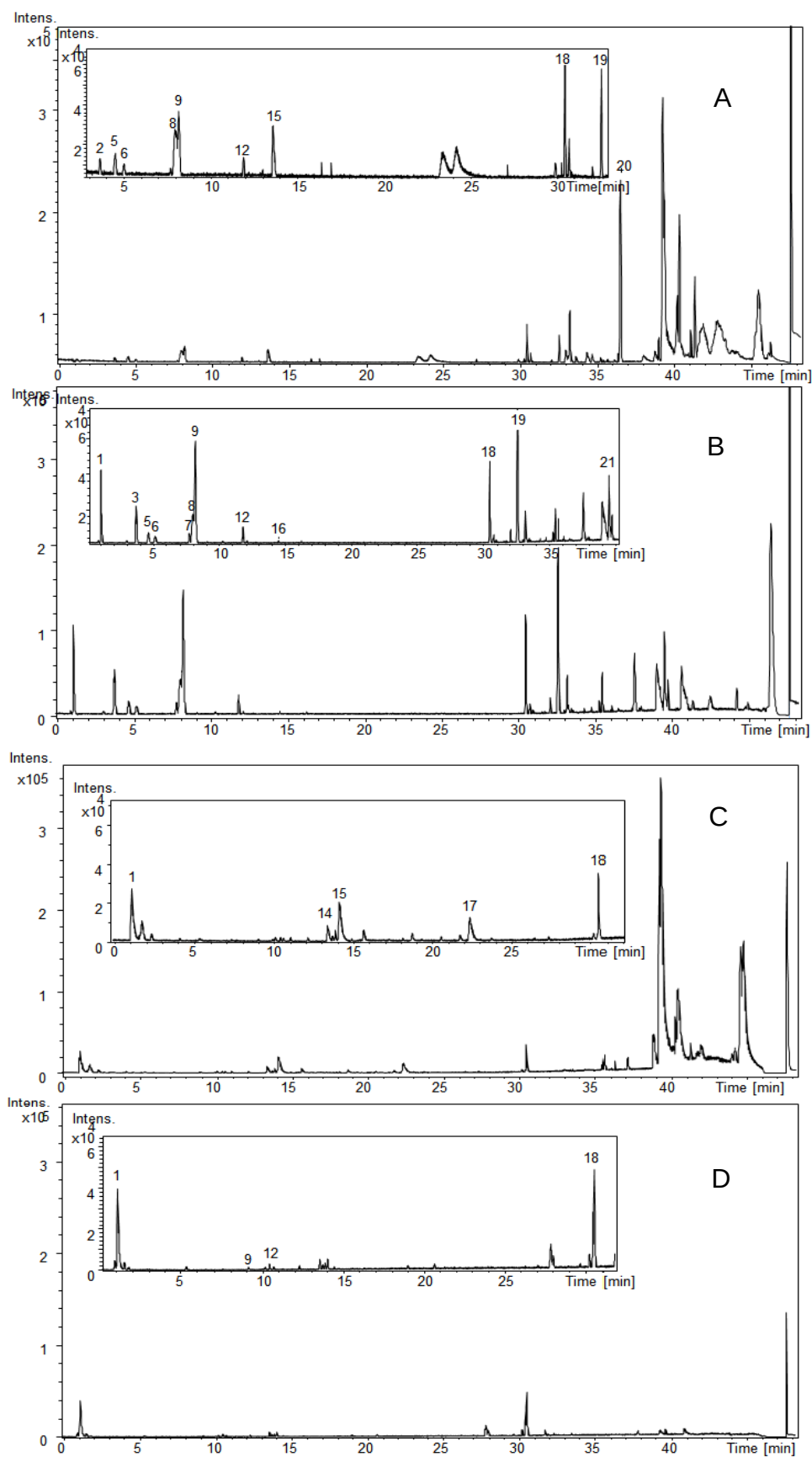


Figura 12. Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A- FAC (modo positivo), B-FAC (modo negativo), C-FAL (modo positivo), D-FAL (modo negativo).

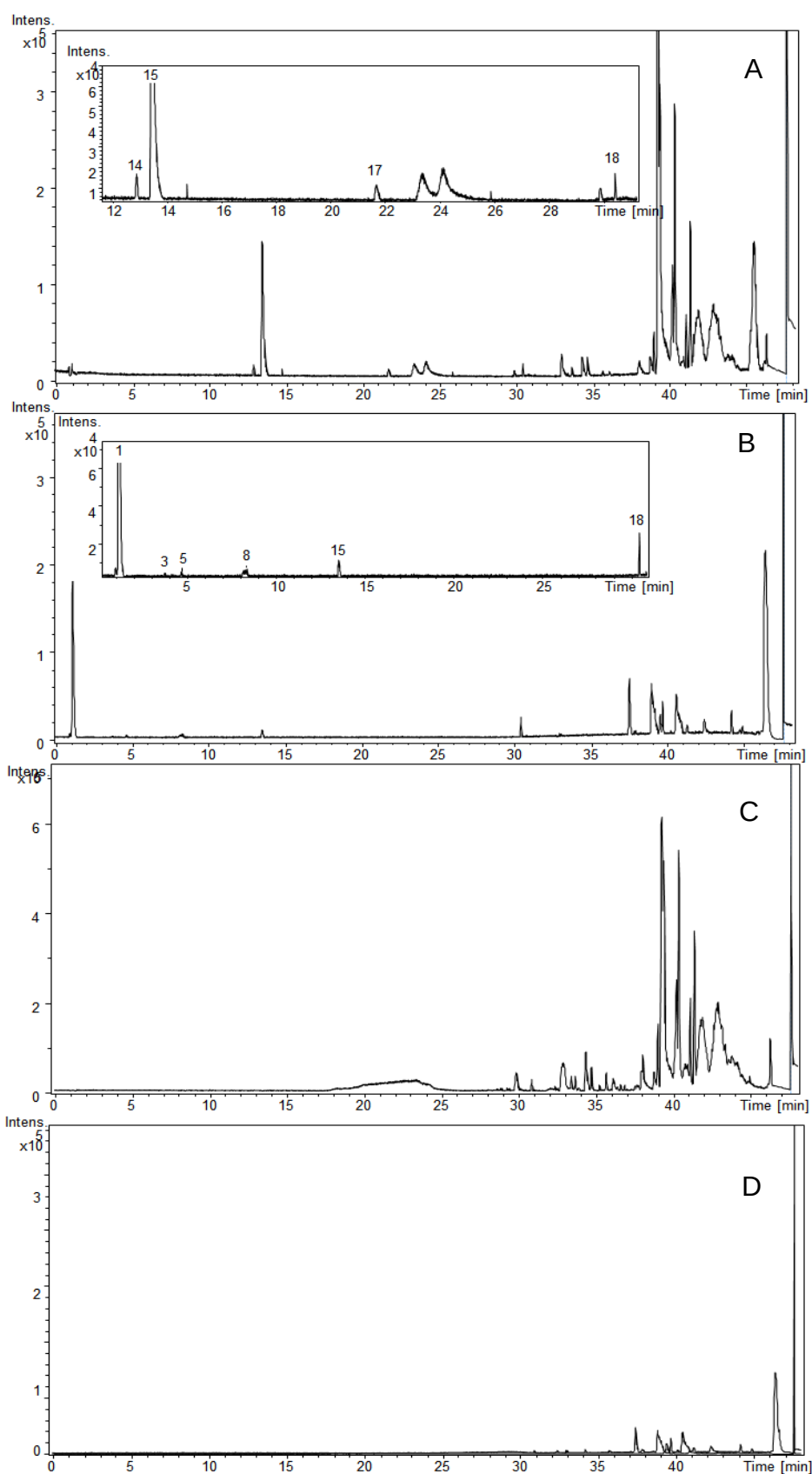


Figura 13. Cromatogramas de CLAE-IES-EM (BPC) A- FHMC (modo positivo); B- FHMC (modo negativo); C- Branco (modo positivo), D- Branco (modo negativo)

5.2. Identificação/Elucidação estrutural das substâncias 19 e 22

A subfração **FAC-5**, proveniente de uma coluna de sílica gel “filtrante” (70-230 mesh) da FAC, foi submetida à cromatografia em coluna aberta usando como suporte sílica gel 200-400 mesh a fim de isolar os componentes majoritários. Desse processo, após análise por CCDA, originou-se 38 frações finais. Este experimento resultou na identificação de dois diterpenos com esqueleto clerodano, **19** (33 mg) e **22** (31 mg) (Item 4.4.1, p. 38).

O composto **19** (Figura 14) foi identificado como sendo o 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila.

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 15) foram observados sinais de hidrogênios característicos de um sistema furano β -substituído: um singlete em δ_{H} 7,44 (H-16), um singlete largo em δ_{H} 7,41 (H-15) e um singlete largo em δ_{H} 6,41 (H-14). Além destes, observa-se um duplo dubleto em δ_{H} 5,49, dois sinais relativos a hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,11 (H-20) e outro em δ_{H} 1,25 (H-19) e um sinal de metoxila em δ_{H} 3,68 (H-21). Além destes sinais, foi observada uma série de sinais entre δ_{H} 1,10-2,5, compatíveis com hidrogênios metilênicos e metínicos (Tabela 4).

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 16) mostrou 21 sinais na região entre δ 15,1 e δ 204,7 sendo 3 CH_3 (uma delas é metoxila - δ 51,9; C-21), 5 CH_2 , 7 CH e 5 C, sendo um deles de carboxila de éster δ 168,3 (C-18). O sinal em δ 171,9 (C-17), quando associado ao sinal δ 71,9 (C-12), é característico da presença de um sistema δ -lactona, enquanto uma carbonila de cetona é evidenciada pelo sinal a δ_{C} 204,7 (C-3). Em adição a estes, há também sinais relativos a carbonos de um anel furano [δ_{C} 139,6 (C-16), 144,1 (C-15) e 108,6 (C-14) e 125,8 (C-13)]. Dentre os sinais de RMN ^{13}C destaca-se o a δ 69,5 (C-4), uma região atípica para um carbono sp^3 não ligado a heteroátomo (Tabela 3).

O espectro de massas - HR-IES-EM - (Figura 17) apresentou um pico a m/z 375,1800 $[\text{M}+\text{H}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_6$ (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_6$, 375,1808 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Estes dados, aliados a análise dos espectros de RMN 1D e comparação com dados da literatura (Pizzolatti et al., 2013) levou à identificação do composto 19, conforme mencionado, como sendo o diterpeno 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila, já isolado anteriormente de *C. urucurana*.

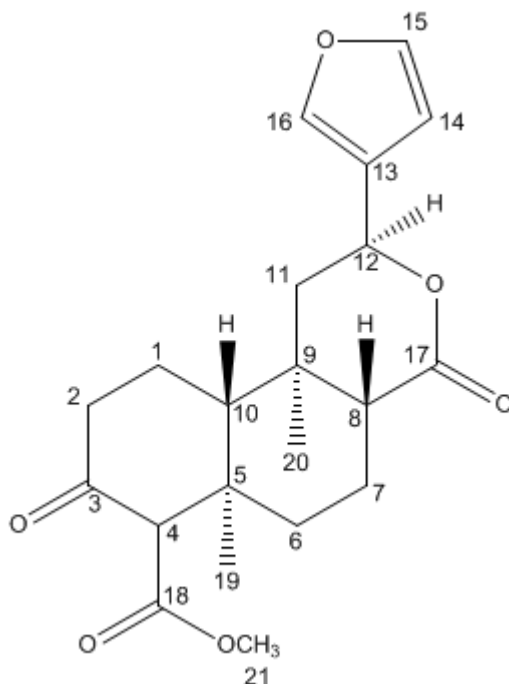


Figura 14. Estrutura química do 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**)

Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila em CDCl_3 e da mesma citada na literatura (RMN ^1H 500 MHz e ^{13}C 125 MHz em CDCl_3)

Substância 4			3-oxo-12- <i>epi</i> -barbascoato de metila (Pizzolatti et al., 2013)	
C/H	δ_{H} m, J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} m, J (Hz)	δ_{C}
1	2,00 m	22,1	2,00, m	22,4
2	2,55 dt, (J 3,0)	40,4	2,54 dt, (J 3,3)	40,6
3	-	203,9	-	204,7
4	3,21 s	69,5	3,22 s	69,6
5	-	37,1	-	37,3
6	1,99 m	37,6	1,90 m	37,7
7	1,35 dd, (J 13; 3,7)	18,2	1,34 m	18,4
8	2,08 dd, (J 11;3,4)	51,1	2,10 dd, (J 12,5; 3,3)	51,6
9	2,22 d, (J 3,1)	41,2	2,23 d, (J 3,3)	41,5
10	-	54,1	-	54,2
11	1,58 m	44,4	1,60 m	44,6
12	5,49 dd, (J 11,5; 5,4)	71,6	5,49 dd, (J 11,4; 5,9)	71,9
13	2,30 dd, (J 13,3; 5,4) 1,74 dl, (J 3,3)	125,6	2,36 dd, (J 13,2; 5,9) 1,75 d, (J 3,7)	125,8
14	6,41, s	108,4	6,41 s	108,6
15	7,40, t	143,9	7,41 s	144,1
16	7,44, s	139,4	7,44 s	139,6
17	-	171,5	-	171,9
18	-	168,0	-	168,3
19	1,24, s	15,2	1,25, s	15,4
20	1,10, s	14,9	1,11, s	15,1
OCH ₃	3,68, s	51,7	3,68, s	51,9

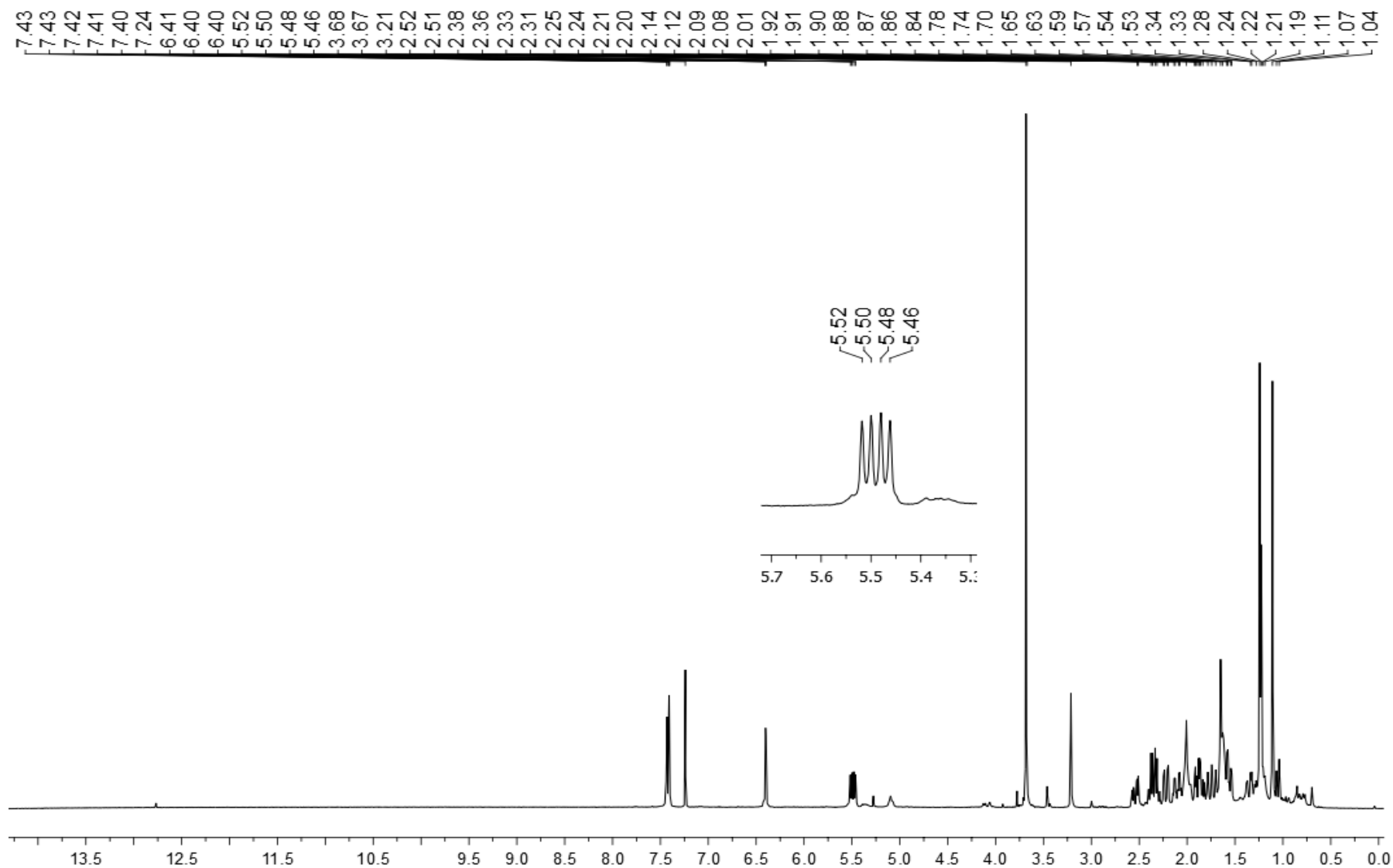


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CDCl_3) do 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**)

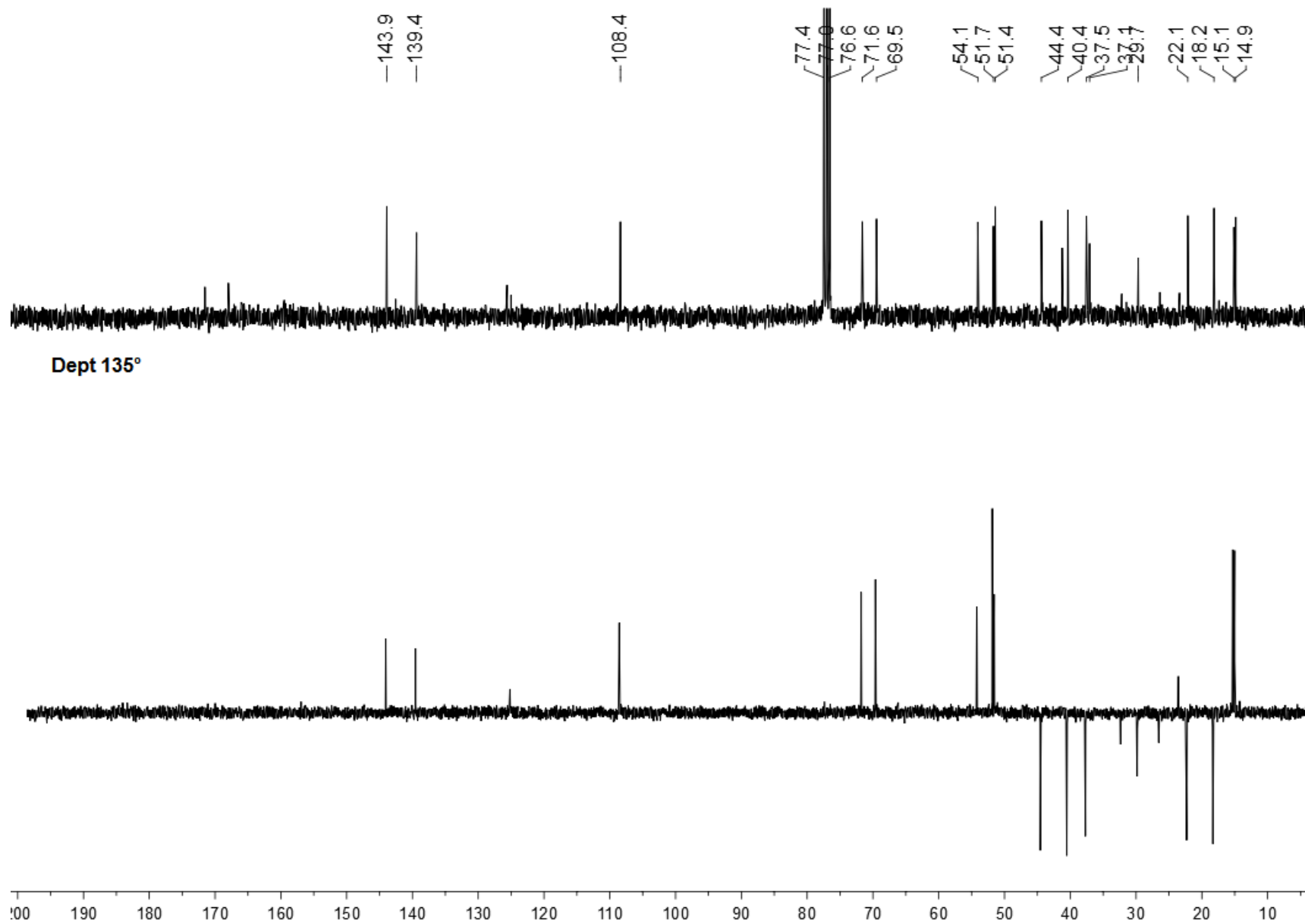


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° (75 MHz – CDCl_3) do 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**)

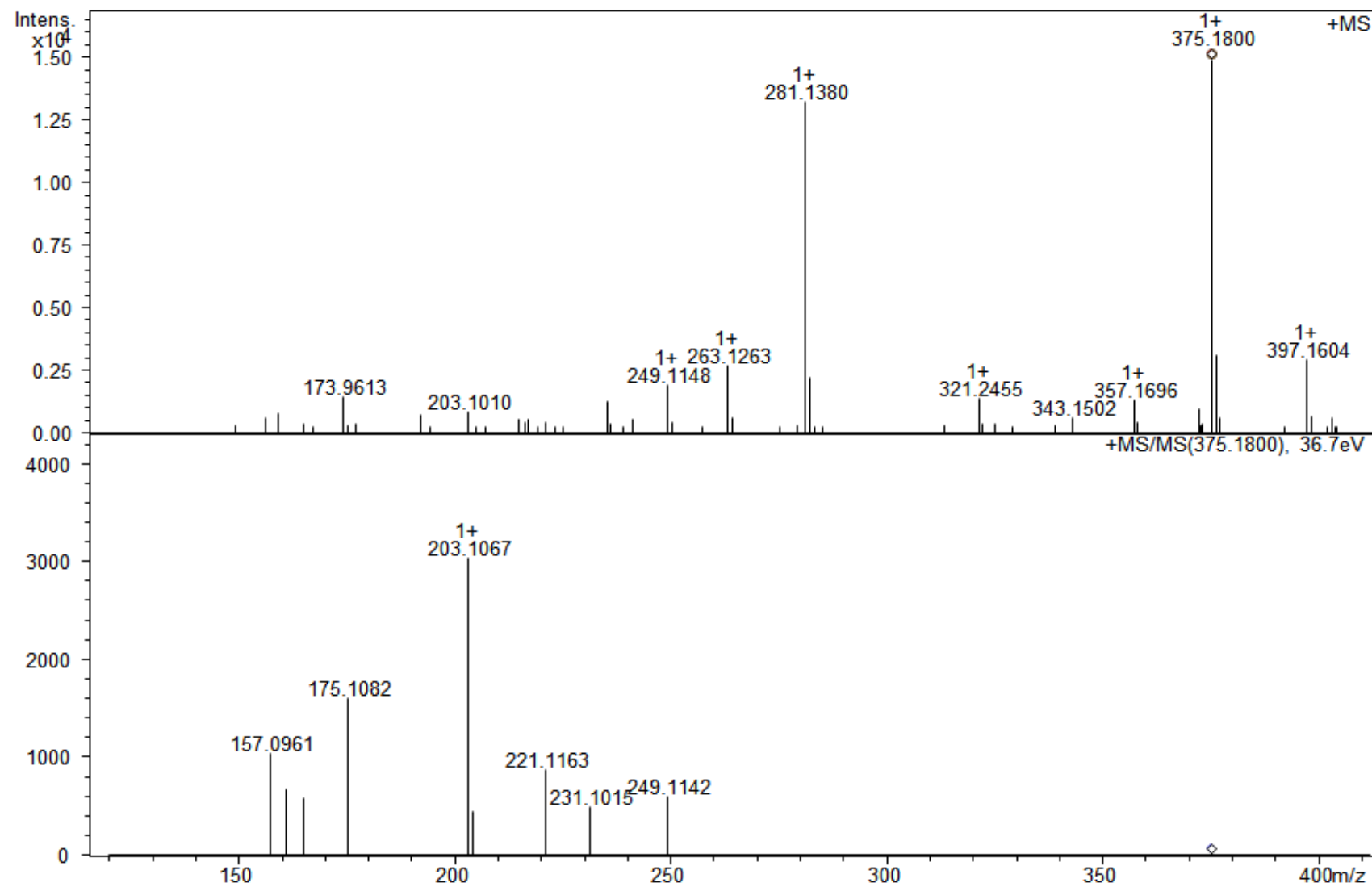


Figura 17. HR-IES-EM 3-Oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (**19**) m/z 375,1800 $[M+H]^+$

O espectro de RMN ^1H (Figura 21) de **22** apresentou as características de um diterpeno, com os sinais típicos de um anel furano 3-substituído (δ_{H} 7,41, H-16, 7,38, H-15 e 6,38, H-14), de duas metilas ligadas a carbonos tetrassubstituídos (δ_{H} 1,22, H-19 e 1,05, H-20), além de uma metoxila (δ_{H} 3,70) e dois hidrogênios ligados a carbonos oxigenados (δ_{H} 4,10, H-3 e 5,48, H-12) (Tabela 5).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 22) mostrou 21 sinais, cujo padrão confirmou a natureza diterpênica e a presença do anel furânico (δ_{C} 143,77, C-15, 139,31, C-16, 125,90, C-13 e 108,47, C-14), além de duas carboxilas (δ_{C} 175,35, C-18 e 172,25, C-17), dois metilenos oximetínicos (δ_{C} 71,93, C-12 e 67,16, C-3), dois metinos, duas metilas e dois carbonos quaternários (Tabela 5).

A análise destes dados revelou uma similaridade grande com os dados de parte da estrutura do composto **19**, um diterpeno com esqueleto clerodano isolado também de *Croton urucurana* (Pizzolatti et al., 2013). A parte da estrutura da molécula que apresenta similaridade corresponde ao anel B, a uma lactona entre os carbonos C-17 e C-12 e ao anel furano. Portanto, a estrutura de **22** se diferencia da estrutura do composto **19** (Figura 14) pelos substituintes do anel A.

A análise dos dados obtidos através dos experimentos HSQC e HMBC (Figuras 23 e 24) permitiram atribuir todos os sinais de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 5), confirmando a parte da estrutura mencionada, definiu que o anel A possui uma carboximetila ligada a C-4 e uma hidroxila ligada a C-3, caracterizando a estrutura como sendo o 3-hidróxi-barbascoato de metila. O experimento NOESY (Figura 26) mostrou correlações que permitiram definir a configuração relativa (rel 3*R*, 4*S*), conforme mostrado na Figura 18.

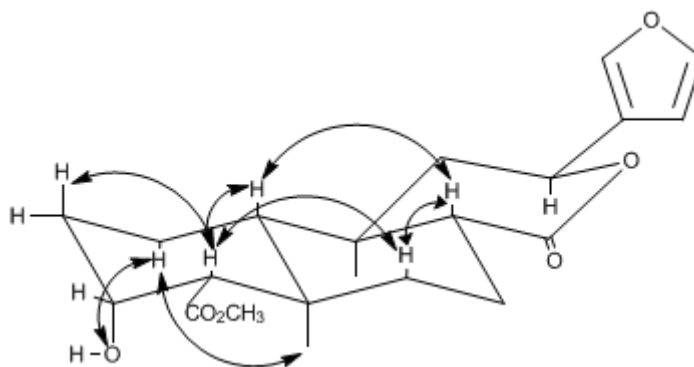


Figura 18. Principais correlações observadas nos experimentos NOESY.

Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do 3-hidróxi-12-epi-barbascoato de metila em CDCl_3

C/H	$\delta_{1\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$ <i>m</i> (J Hz)	HMBC ^1H - ^{13}C	NOE	COSY ^1H - ^1H
1	16,5	1 β -1,44 dt*#, 1 α -1,78 qdl, (<i>J</i> 12,5; 3,3)	56,3; 32,9; 17,6 56,3; 37,1; 32,9; 37,4	4,10; 1,78; 2,33; 1,01 4,02; 1,44; 1,22	1,78 1,44, 1,01
2	32,9	2 β -2,01 dq*# 2 α -1,41 dt *#	37,1; 37,4	2,16; 1,41 2,01; 4,10	- 4,10, 2,01
3	67,2	4,10 dd, (<i>J</i> 5,2; 2,8)	37,4; 16,5	1,41; 2,16	2,16, 1,41
4	58,7	2,16 d, (<i>J</i> 2,5)	175,4; 37,4; 16,73; 56,3; 39,2	4,10; 1,01; 1,27; 2,01	4,10
5	37,4	-	-	-	-
6	39,2	6 β -1,27, td (<i>J</i> 13,8; 13,8; 4,5) 6 α -1,62 dd, (<i>J</i> 13,8; 5,5)*	17,8; 51,4; 14,5 71,9;	2,16; 2,12 -	1,62 1,27
7	17,8	1,98* 1,63*	37,1; 172,3; 39,2; 58,7; 51,4 37,1	-	2,12 2,12
8	51,4	2,12 dd, (<i>J</i> 12,6; 3,7)	37,1; 44,3; 17,8; 172,3; 14,5; 39,2	1,01; 1,27; 6,38; 7,41; 1,63	1,63
9	37,1	-	-	-	-
10	56,3	1,01 dd, (<i>J</i> 12,4; 1,9)	17,6; 14,5; 37,1; 37,4; 17,8; 58,7; 32,9; 16,5	2,16; 2,12; 1,44; 1,59	1,78
11	44,3	11 β -1,59 t, (<i>J</i> 13,7)* 11 α -2,33 dd, (<i>J</i> 13,7; 5,8)	71,9; 37,1 51,4; 37,1; 14,5; 56,3	2,33; 7,41; 1,01; 1,59; 1,05; 5,48; 1,44; 7,41	5,48, 2,33 5,48, 1,59
12	71,9	5,48 dd, (<i>J</i> 11,3; 5,6)	172,3; 139,3; 125,9; 108,5; 44,3	1,05; 2,33; 1,59; 7,41	2,33, 1,59
13	125,9	-	-	-	-
14	108,5	6,38 dd, (<i>J</i> 1,8; 0,8)	139,3; 125,9; 143,8	2,33; 1,59; 7,41; 5,48; 2,12; 7,38	7,38, 7,41
15	143,8	7,38 t, (<i>J</i> 1,8)	125,9; 139,3	6,38	6,38
16	139,3	7,41 m	108,5; 143,8	1,59; 5,48; 2,12; 2,33	6,38, 5,48
17	172,3	-	-	-	-
18	175,4	-	-	-	-
19	17,6	1,22, 3H, s	58,7; 56,3; 39,2; 37,4	1,05; 4,02	-
20 OH	14,5	1,05, 3H, s 4,02 d, (<i>J</i> 1,9)	37,4, 37,1 32,9; 67,2	1,22; 5,48 1,78	- 1,41
OCH ₃	51,7	3,70, 3H, s	175,4	-	-

* sinal sobreposto

multiplicidade observada no experimento *J*res

As correlações observadas no experimento NOESY (Figura 28) evidenciam, portanto, que a hidroxila ligada a C-3 encontra-se axialmente orientada, o que é compatível com os valores das constantes de acoplamento observadas (δ_H 4,10, dd, J 5,2 e 2,8 Hz, H-3) e que a carboximetila ligada a C-4 encontra-se em equatorial. Observa-se que os outros centros quirais possuem as mesmas configurações relativas propostas para a estrutura do composto **19**. Portanto, a estrutura do composto **22** corresponde à representada na Figura 21.

A substância também foi confirmada por espectrometria de massas (HR-IES-EM) e apresentou $[M+H]^+$ a m/z 377,1972, indicando a fórmula molecular $C_{21}H_{28}O_6$ (valor calculado para $[M+H]^+$ 377,1964) (Figura 29).

A busca na literatura a respeito do composto 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila não revelou nenhum relato do seu isolamento e/ou síntese e, assim sendo, refere-se a uma substância inédita na literatura.

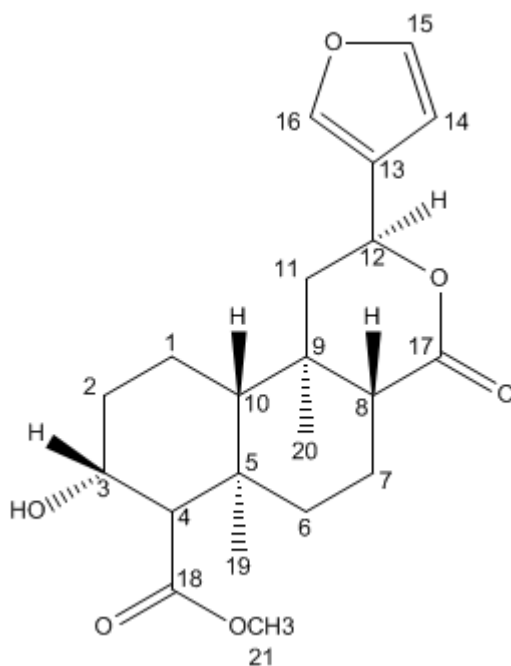


Figura 19. Estrutura química do (*rel* 3R, 4S) 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**).

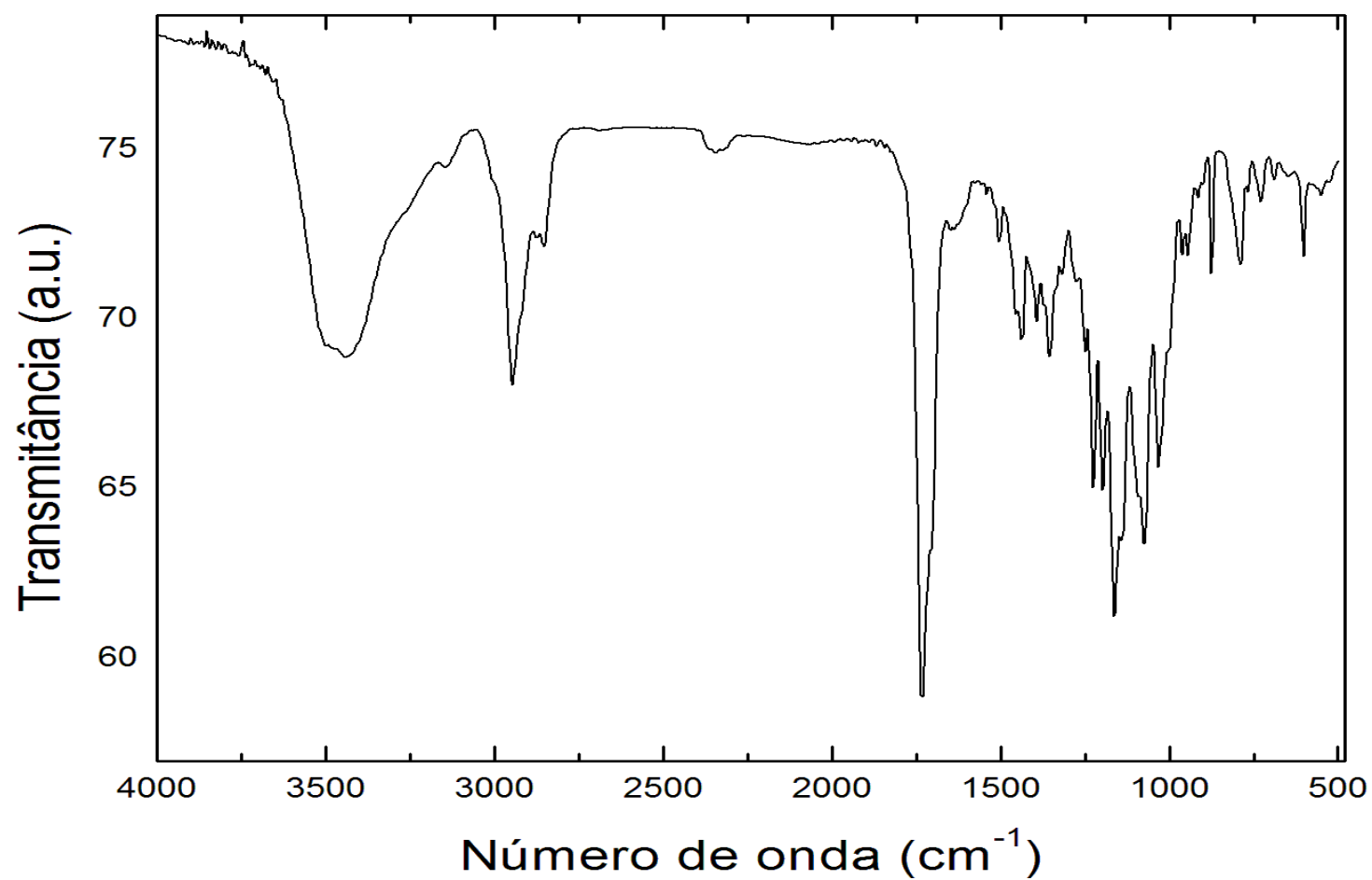


Figura 20. Espectro de Infravermelho (KBr) do 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**)

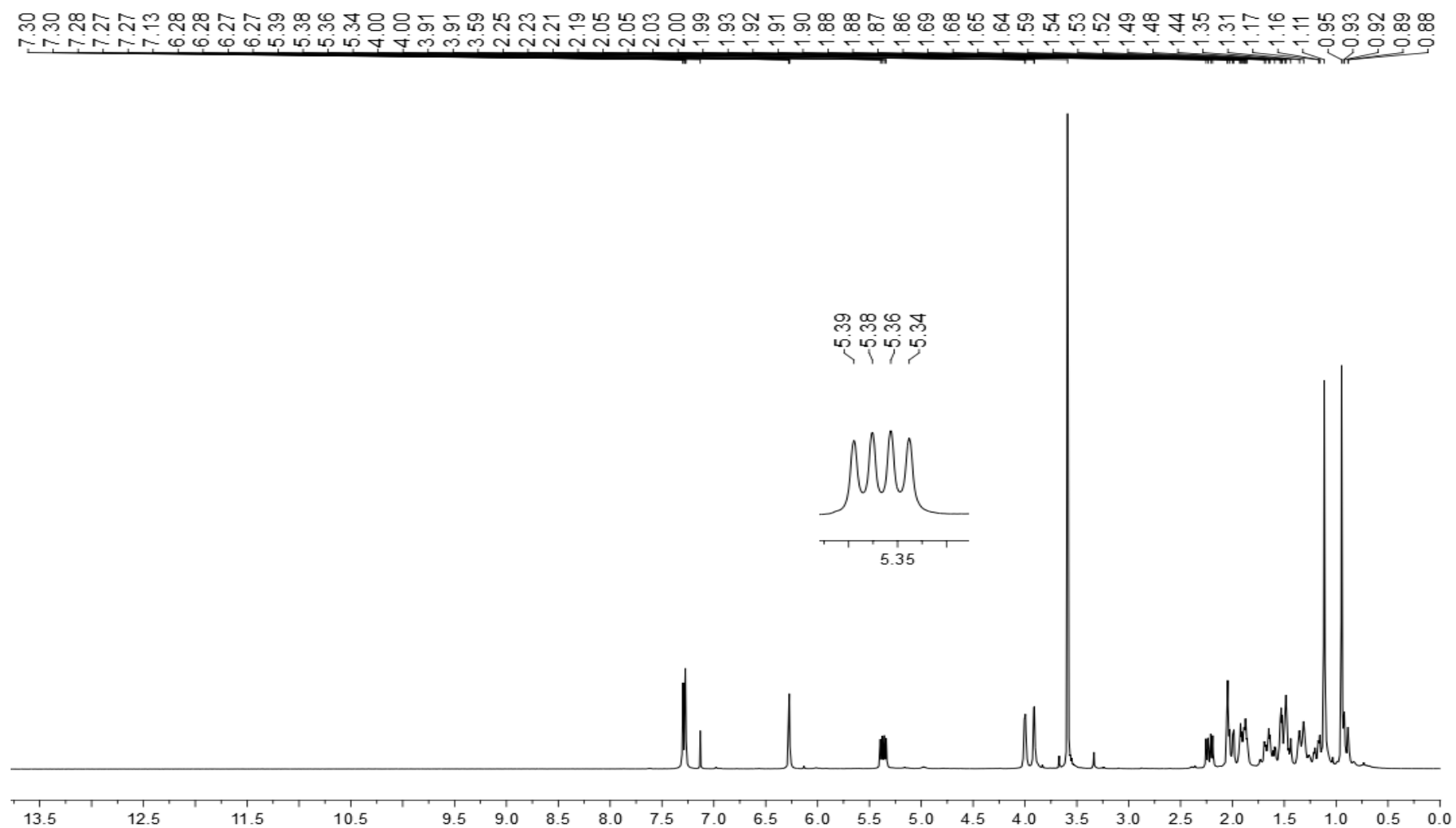


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CDCl_3) 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (22)

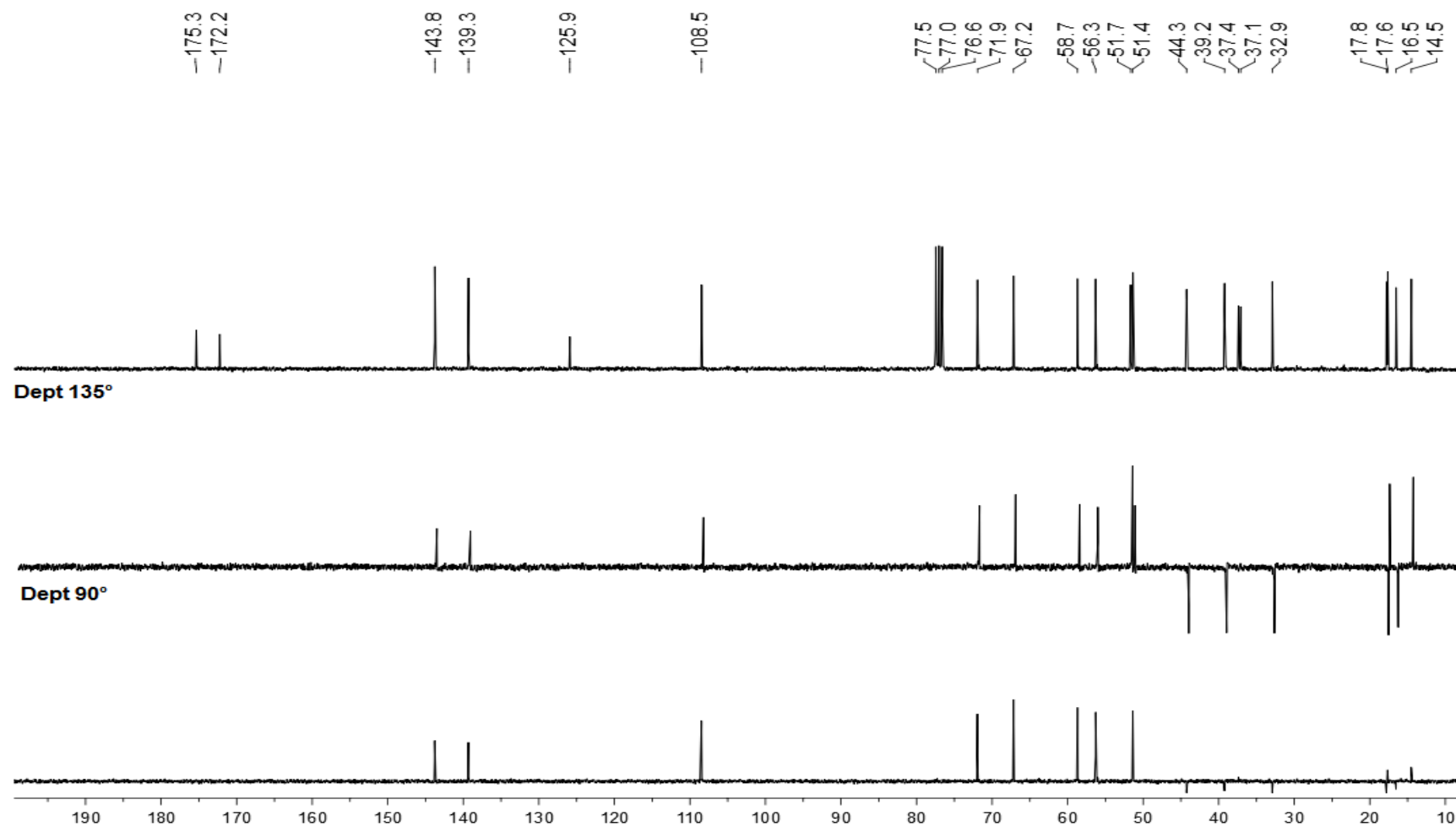


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° e 90° (75 MHz – CDCl_3) 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**)

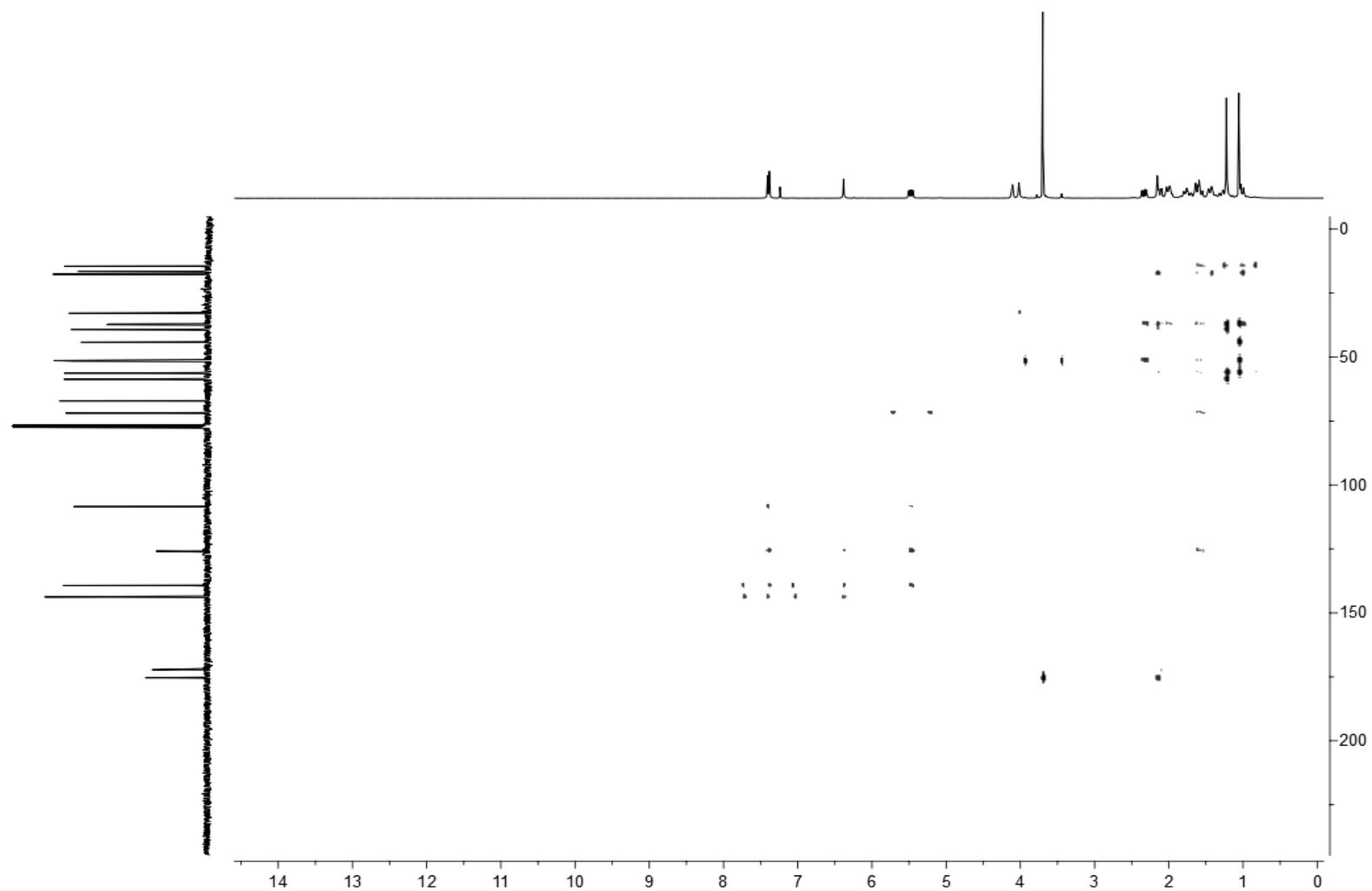


Figura 23. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) do 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**).

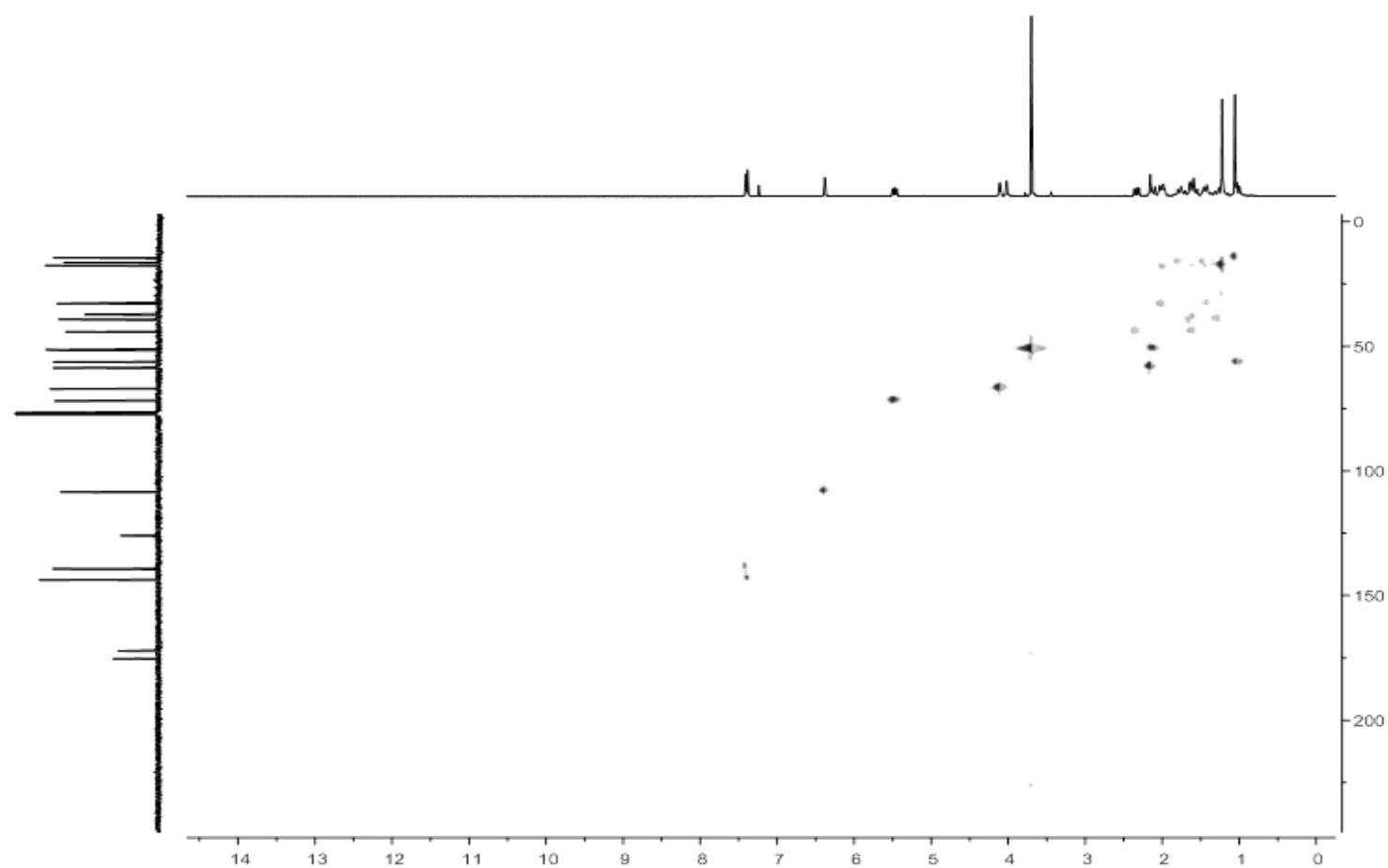


Figura 24. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - JCH - HSQC (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**).

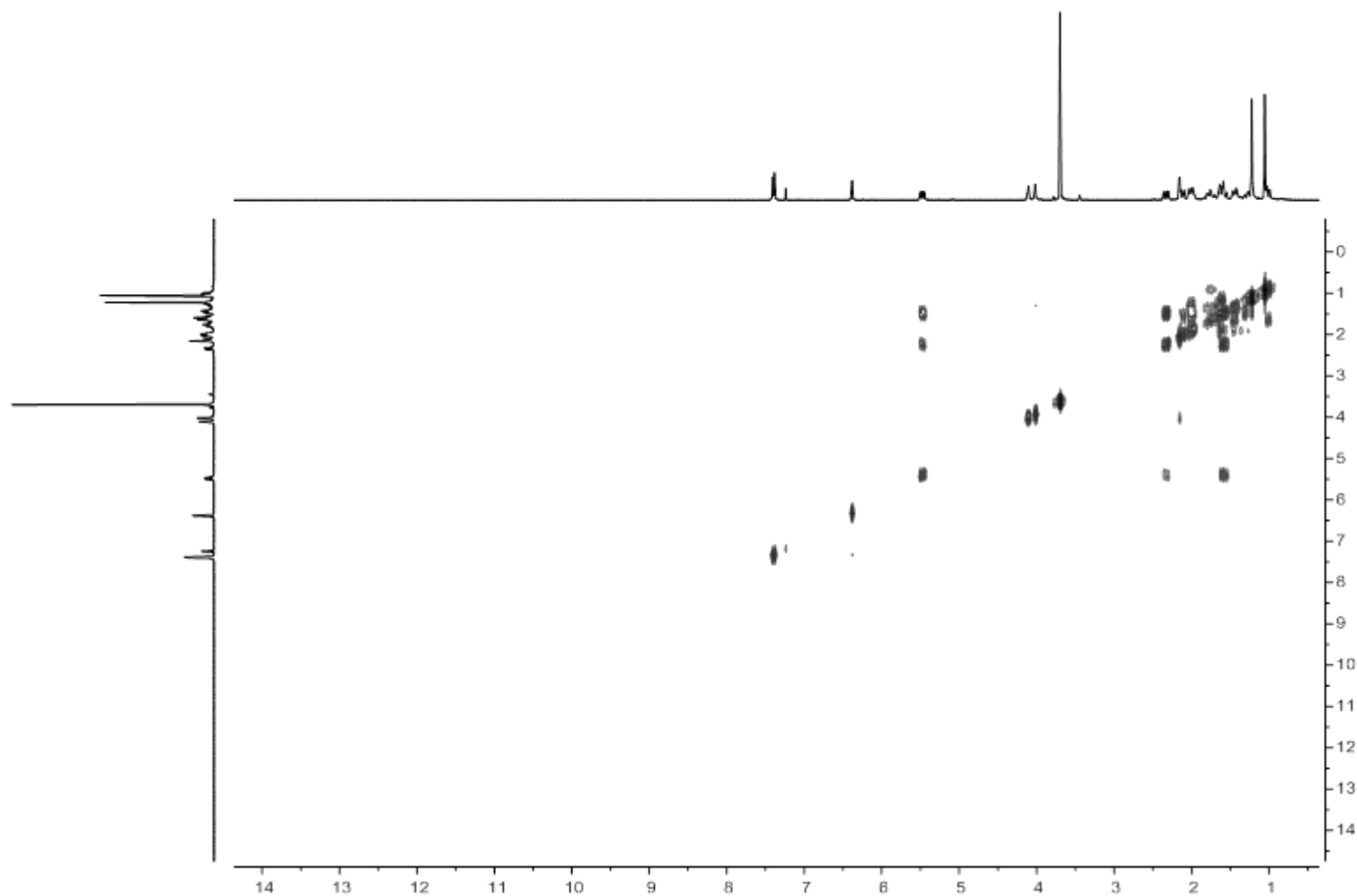


Figura 25. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (CDCl_3 , 300 MHz) 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**)

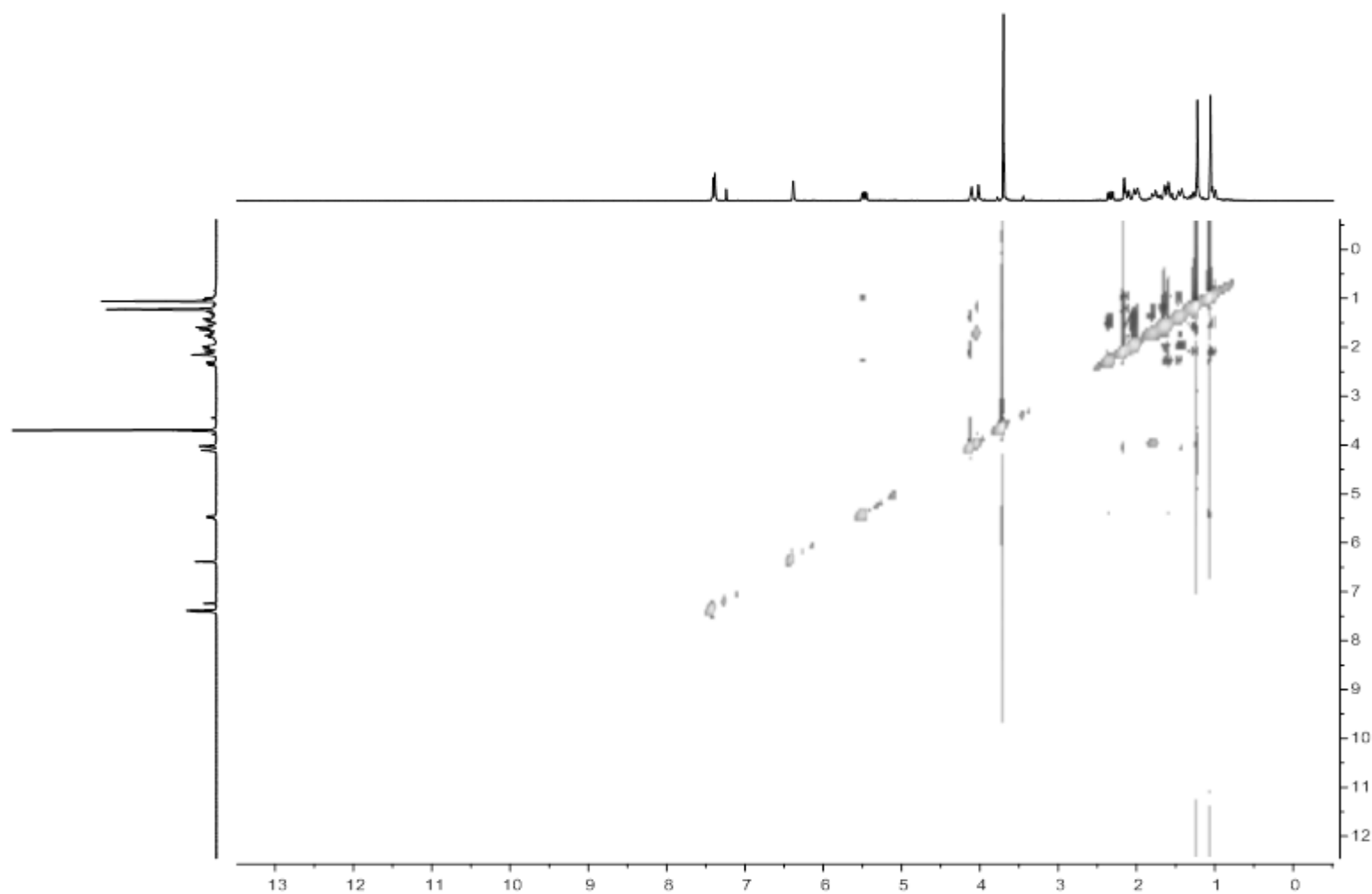


Figura 26. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (CDCl_3 , 300 MHz) do 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**)

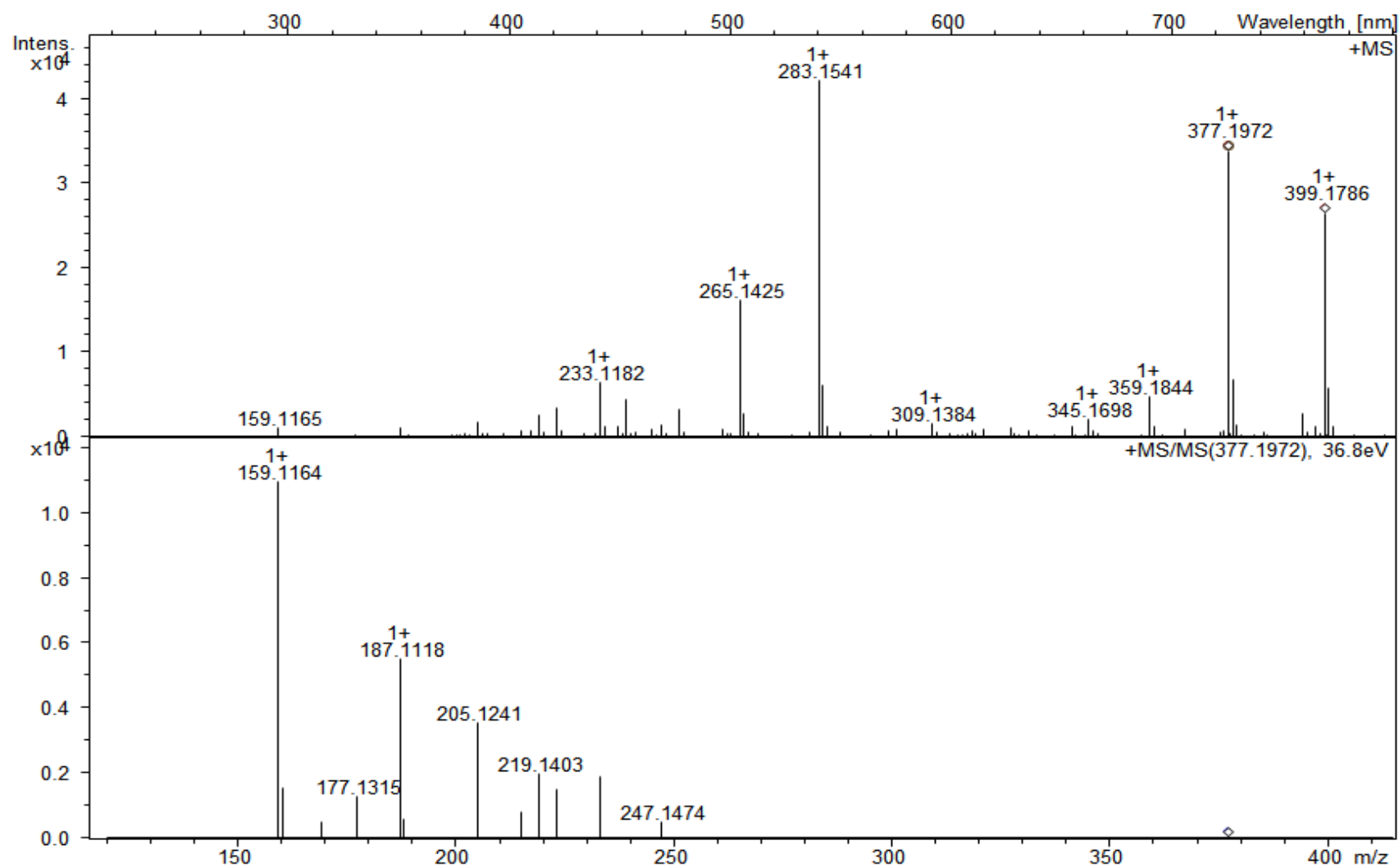


Figura 27. HR-IES-EM do 3-hidr3xi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**), m/z 377,1972 $[M+H]^+$

5.3. Identificação/Elucidação estrutural das substâncias **18** e **23**

As subfrações **FAL-1** e **FAL-2** foram avaliadas por CCDA em cromatoplasacas de alta resolução para detecção de amidas peptídicas, conforme a metodologia de Zhou e Tan (2000) (Item 4.5.1, p. 39), e apresentaram manchas vermelho-alaranjadas, indicando que estas amostras continham ciclopeptídeos. Essas frações foram então submetidas à CLAE semipreparativa para isolar e identificar os componentes majoritários, resultando, até o momento, isolamento e caracterização dos compostos **18** (30 mg) e **23** (20 mg) (Item 4.5.2, p.40).

O composto **18** (Figura 30) foi identificado como o ciclopeptídeo tipo orbitídeo [1–9-NaC]-crouororb A1, isolado anteriormente do látex de *C. urucurana*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 29) apresentou um grupo de sinais entre δ_{H} 8,80 e 6,99, característicos de hidrogênios de anel aromático ou hidrogênios de ligação peptídica; sinais entre δ_{H} 4,54 e 3,19 de hidrogênios ligados a carbonos α de aminoácidos, além de sinais entre δ_{H} 3,08 e 0,81 (Tabela 6).

O RMN de ^{13}C (Figura 30) apresentou 10 sinais entre δ_{C} 174,5 e 169,2, atribuídos a carboxilas de amidas, sustentando a hipótese de que **18** é um peptídeo. O espectro de RMN ^{13}C revelou, também, sinais de anel aromático a δ_{C} 137,2 (x1), 129,4 (x2), 128,3 (x2) e 126,7 e de carbonos α entre, δ_{C} 60,1 e 35,6, e sinais entre δ_{C} 24,1 e 15,9 (Tabela 6).

O pico a m/z 817,4183 $[\text{M}+\text{H}]^+$ no HR-IES-EM foi compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_{11}$ (calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_{11}$, m/z 817,4203) e os fragmentos observados estão consistentes com aqueles descritos para o [1–9-NaC]-crouororb A1 (Figura 31) (Cândido-Bacani et al., 2015).

Os dados de RMN, EM e EM/EM do composto **18** foram compatíveis com aqueles citados na literatura, sendo possível a caracterização do ciclopeptídeo [1–9-NaC]-crouororb A1, constituído da sequência (ciclo)- $\text{G}_a\text{SL}_a\text{G}_b\text{AFG}_c\text{NL}_b^-$.

As configurações absolutas dos resíduos de aminoácidos S (serina), A (alanina), L (leucina) e F (fenilalanina) foram identificados como L(s) pelo

método de Marfey (Item 4.5.2.1, p. 38), como descrito por Cândido-Bacani et al. (2015).

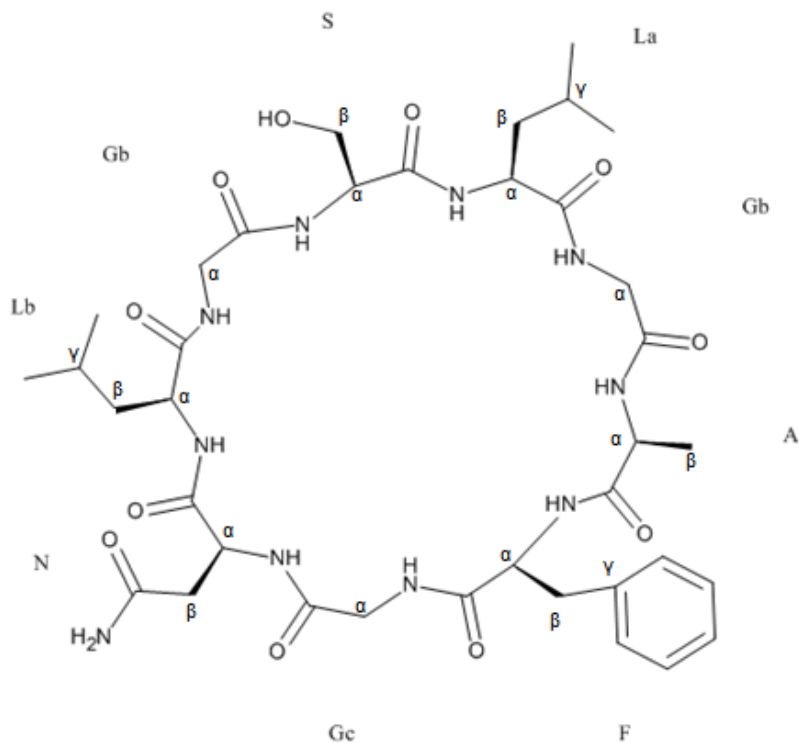


Figura 28. Estrutura química do [1-9-NaC]-crouorb A1 (**18**)

Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do [1-9-NaC]-crouorb A1 em DMSO- d_6 e da mesma citada na literatura (RMN ^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz em DMSO- d_6)

C/H	Substância 18		[1-9-NaC]-crouorb A1 (Cândido-Bacani et al., 2015)	
Glicina A (Ga)	$\delta_{13\text{C}}$	δ_{H} m, (J Hz)	$\delta_{13\text{C}}$	δ_{H} m, (J Hz)
NH		8,57 br, s		8,57 br, s
α	42,8	3,70 sobreposto	42,8	3,76 sobreposto
α'		3,50 dd, (J 17,0; 4,6)		3,59 dd, (J 17,0; 4,6)
CO	169,2		169,2	
Serina (S)				
NH		8,80 br, s		8,84 br, s
OH				5,05 t, (J 6,0)
β, β'	60,1	3,69 m	60,1	3,69 (2H), m
α	58,1	3,88 m	58,1	3,88 t, (J 6,0)
CO	174,5		174,4	
Leucina A (La)				
NH		7,33 br, s		7,33 br, s

δ	23,2	0,91 d, (J 6,2)	23,2	0,90 d, (J 6,5)
δ'	21,4	0,82 d, (J 6,2)	21,4	0,82 d, (J 6,5)
γ	24,1	1,60 m	24,1	1,53 m
β	39,8	1,73 m	39,8	1,75 br, t, (J 12)
β'		1,44 m		1,45 br, dd, (J 12,0; 8,4)
α	50,3	4,55 m	50,3	4,55 ddd, (J 11,4; 8,4; 2,8)
CO	170,9		170,8	
Glicina b (Gb)				
NH		7,98 sl		7,97 t, J 5,9 Hz
α	43,1	3,80	43,1	3,82 sobreposto
α'		3,44 dd, (J 17,0; 6,0)		3,43 dd, (J 17,5; 5,9)
CO	169,3		169,3	
Alanina (A)				
NH		8,53 s		8,52 br, s
β	15,9	1,21 d, (J 6,9)	15,9	1,22 d, J 7,1 Hz
α	49,6	3,76	49,6	3,80 sobreposto
CO	171,9		171,9	
Fenilalanina (F)				
NH		7,59 d, (J 5,8)		7,58 d, (J 6,0)
4'	126,7	7,22 sobreposto	126,7	7,22 sobreposto
3', 5'	128,3	7,24 sobreposto	128,3	7,28 sobreposto
2', 6'	129,4	7,24 sobreposto	129,4	7,28 sobreposto
1'	137,2		137,2	
β	35,9	3,07, m	36,00	3,08 dd, (J 13,5, 7,2)
β'		3,01, m		3,03 dd, (J 13,5, 8,4)
α	56,0	4,22, q, (J 7,1)	56,0	4,24 br, q, (J 7,2)
CO	173,1		173,1	
Glicina C (Gc)				
NH		8,30 m		8,31 m
α	42,9	3,94 dl, (J 7,4)	42,9	3,93 dd, (J 16,8, 7,4)
α'		3,19 sl		3,19 dd, (J 16,8, 3,4)
CO	170,9		170,3	
Asparagina (N)				
NH		8,23 br, d, (J 5,0)		8,22 br, (d, J 6,3)
NHa		6,99 br, s		7,00 br, s
NHb		7,53 br, s		7,52 br, s
γ CO	172,7		172,7	
β	35,6	2,85 dd, (J 15,7, 5,7)	35,6	2,85 br, dd, (J 15,9, 5,9)
β'		2,61 dd, (J 15,7, 6,8)		2,62 dd, (J 15,9, 7,0)
α		4,27 br, m		4,28 br, q, (J 6,5)
CO	172,4		172,4	
Leucina B (Lb)				
NH		7,23 sobreposto		7,22 sobreposto
δ	23,4	0,88 d, (J 6,5)	23,4	0,85 d, (J 6,6)
δ'	21,3	0,83 d, (J 6,5)	21,3	0,84 d, (J 6,6)
γ	23,6	1,60 m	23,6	1,60 m
β, β'	39,2	1,64 m	39,2	1,67 m
α	51,2	4,40 m	51,1	4,40 m
CO	172,7		172,7	

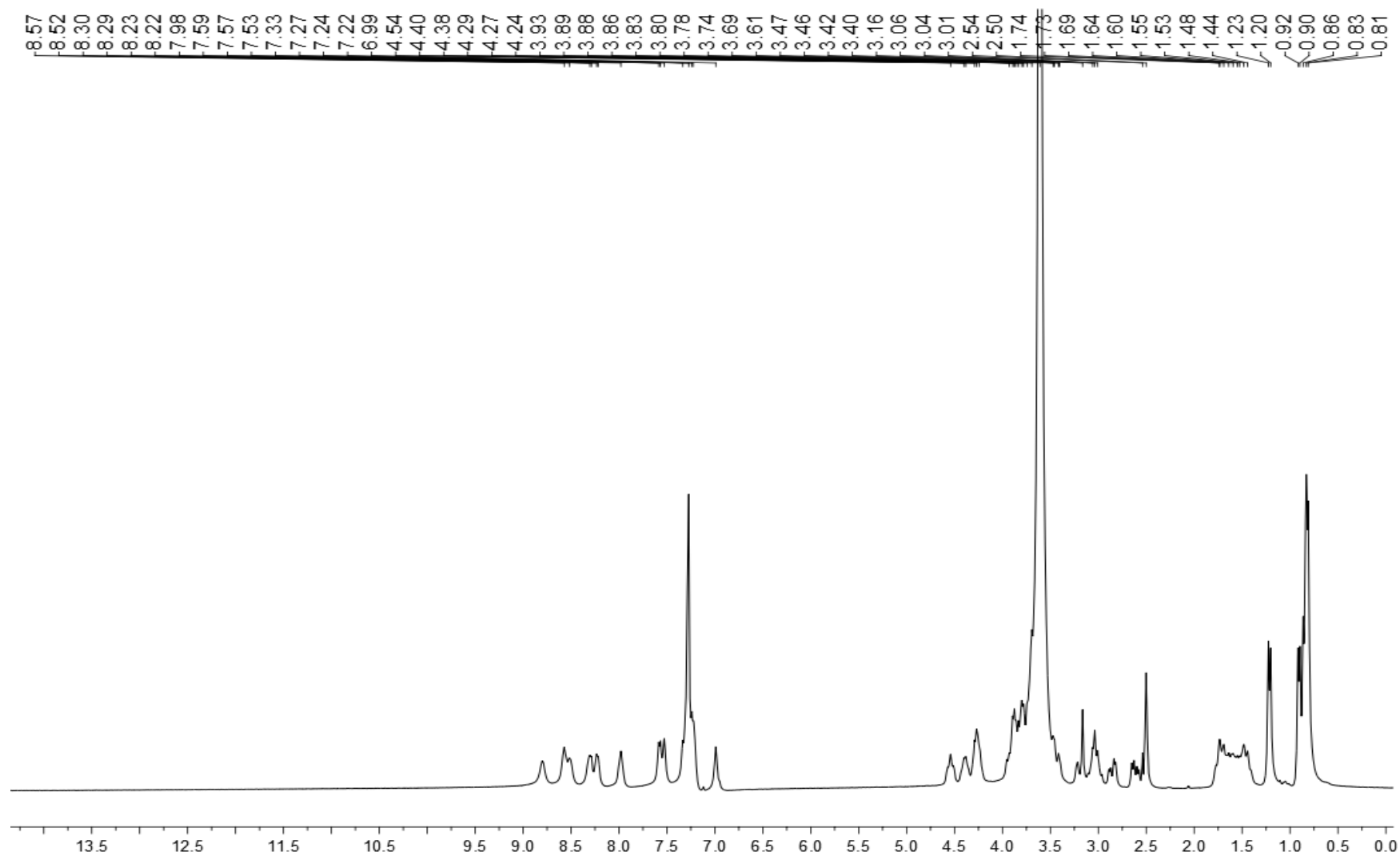


Figura 29. Espectro RMN ^1H (300 MHz- DMSO-d_6) do ciclopeptídeo [1-9-NaC]-crouorb A1 (**18**)

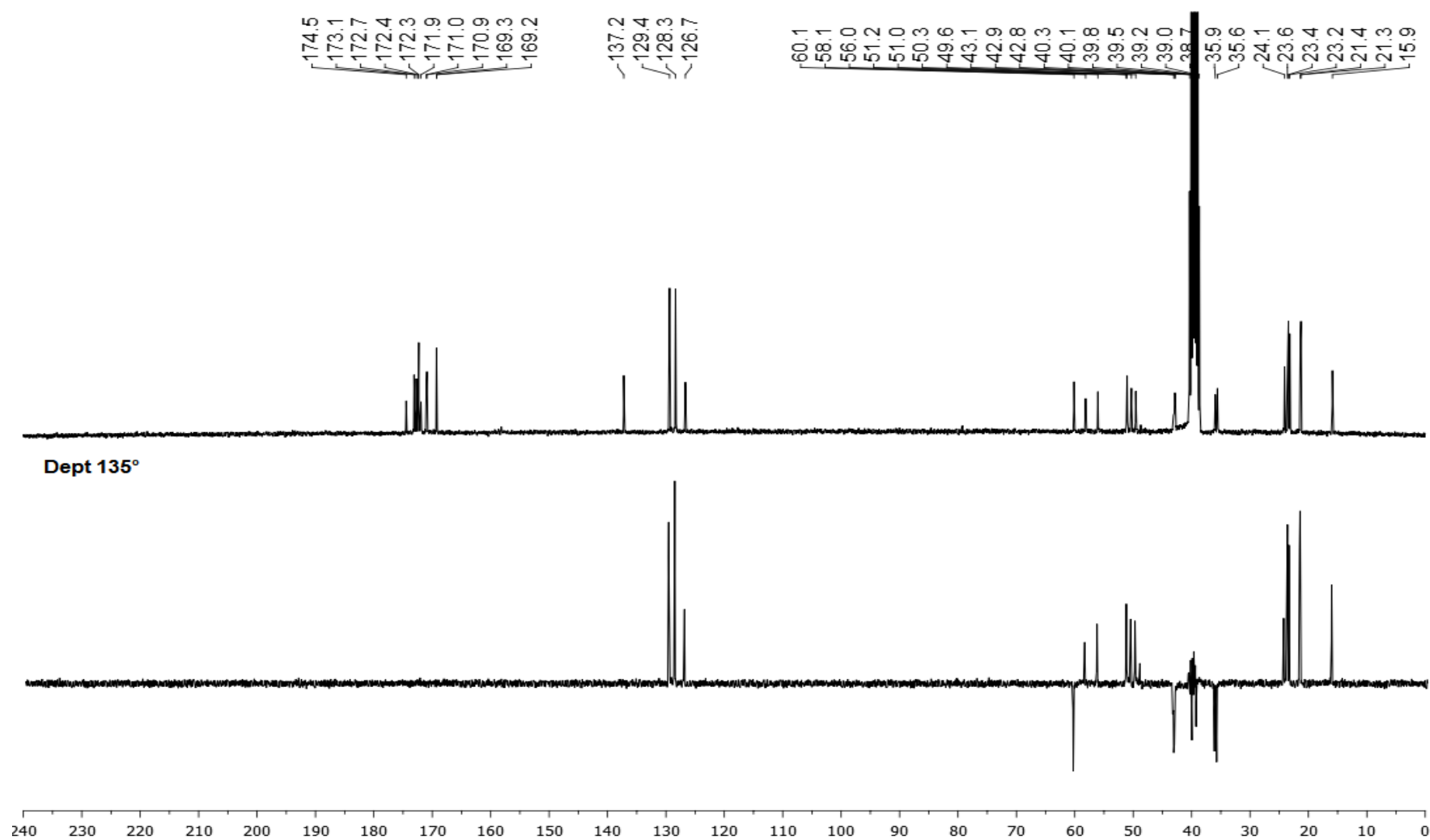


Figura 30. Espectro ^{13}C e Dept 135° (75 MHz-DMSO- d_6) do ciclopeptídeo [1-9-NaC]-crouororb A1 (**18**)

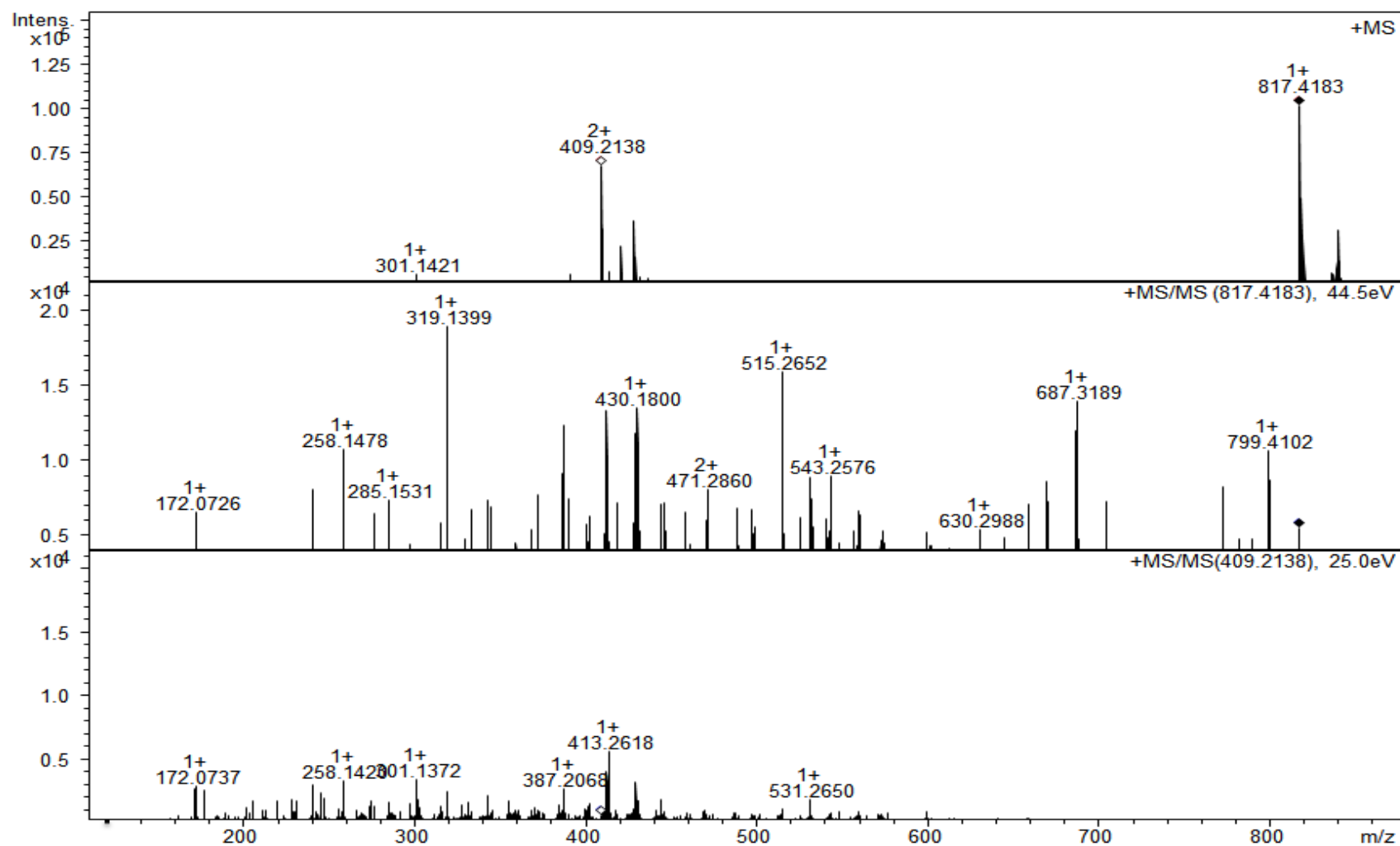


Figura 31. HR-IES-EM do ciclopeptídeo [1-9-NaC]-crouorb A1 (**18**), m/z 817,4183 $[M+H]^+$

O espectro de RMN ^1H (Figura 33) de **23** apresenta sinais característicos de um peptídeo, semelhante a **18**, tais como entre δ_{H} 8.72 e 7.47 e multipletos relativos a hidrogênios α entre δ_{H} 4.31 e 3.88, além de um conjunto de sinais entre δ_{H} 3,48 e 0,77 (Tabela 7).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 34) mostrou 37 sinais, sendo 10 de carbonos carboxílicos, entre δ_{C} 176,7 e 167,2, que foram atribuídos à carboxilas de amidas e sinais de carbonos α entre δ_{C} 56,3 e 41, o que sustenta a hipótese de que **23** um peptídeo. Também apresentou quatro sinais de um anel benzênico: δ_{C} 126,9, 129,4 (x2), 129,7 (x2) e 137,9 (Tabela 7).

A análise dos experimentos de RMN 2D, HSQC, HMBC, NOESY e COSY (Figuras 35, 36, 37 e 38) (Tabela 7), resultou na identificação de nove resíduos de aminoácidos: três glicinas (Ga, Gb, Gc), duas leucinas (La, Lb), uma fenilalanina (F), um ácido aspártico (D), uma alanina e uma serina (S).

O espectro de massas HR-IES-EM mostrou íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 818,4011, consistente com fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_9\text{O}_{13}$ (calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_9\text{O}_{13}$, m/z 818,4048). A análise do EM/EM revelou fragmentos originados pela chamada via **b_x-y_z**, conforme descrito para peptídeos cíclicos (Tabela 8; Figura 39) (Cantú et al, 2008; Paizs et al., 2005; Saminathan et al., 2010).

Nesse processo, acredita-se que a abertura do anel ocorre pela formação de oxazolona, resultando em aminoácidos lineares com N-terminal livre de um lado e do outro um anel oxazolona em C-terminal. Os íons observados no espectro são equivalentes aos fragmentos opostos e complementares entre si, ou seja, os valores de m/z obtidos é correspondem à diferença entre a quebra de dois íons consecutivos da mesma sequência de aminoácidos lineares. São denominados **-a** e os fragmentos resultantes da perda neutra de monóxido de carbono (CO) dos íons de **-b**, além de perdas neutras de H_2O (Cantu et al, 2008; Paizs et al., 2005; Saminathan et al., 2010).

A configuração absoluta dos aminoácidos A, L, F e S foi determinada pelo método de Marfey (Bhushan e Brückner, 2004) como sendo aminoácidos do tipo L(s). Através das correlações espaciais entre os hidrogênios próximos observadas no experimento NOE foi determinada a configuração de D (ácido aspártico) também como sendo L(s). As configurações dos aminoácidos estão de acordo com a configuração observada no ciclopeptídeo anteriormente

isolado de *C. urucurana* e com aqueles relatados em espécies de *Croton* (Quintyne-Walcott et al., 2007; Mehmood e Malik, 2010), que consistem exclusivamente de L-aminoácidos (Cândi-Bacani et al., 2015).

Para determinação da natureza cíclica desse peptídeo foram observadas detalhadamente as correlações observadas no COSY ^1H - ^1H , atribuindo cada H- α ao seu grupo NH correspondente e NOESY, ligando cada grupo NH ao resíduo de aminoácido subsequente ou antecedente (Tabela 7). A sequência de aminoácidos de **23** foi determinada, então, como sendo (ciclo)-GaDLaGbGcSAFLb- (Figura 32).

O sistema de nomenclatura seguiu o método de nomeação sistemático específico para peptídeos cíclicos sugerido por Shim et al. (2015) e Cândido-Bacani et al. (2015), sendo esse ciclopeptídeo denominado [1-9-N α C]-Crouorb A2.

Esse ciclopeptídeo possui esqueleto do tipo orbitídeo e a busca na literatura não revelou relatos sobre o isolamento/síntese do mesmo e, assim sendo, a substância **23** é inédita.

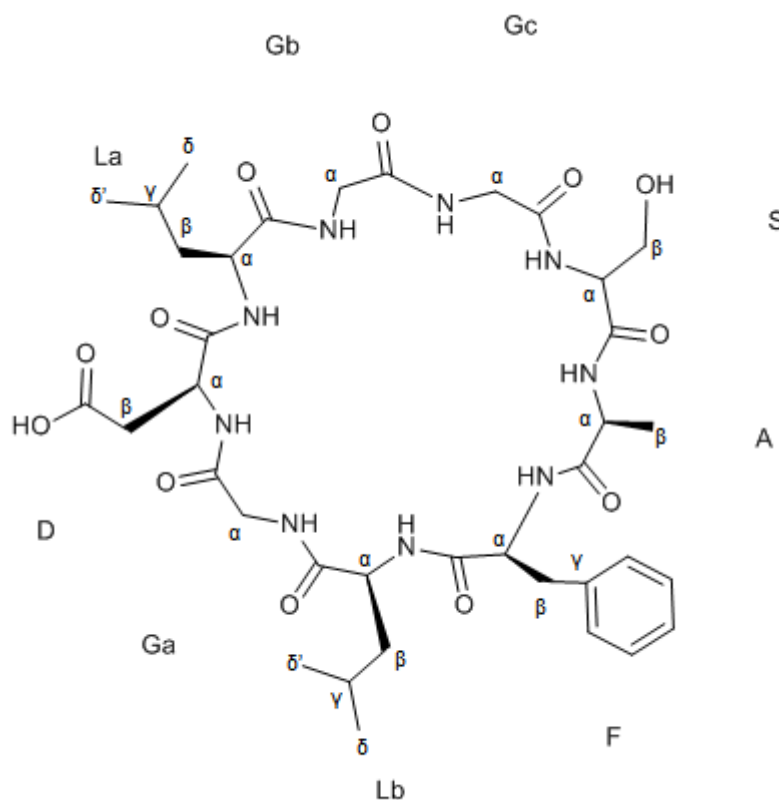


Figura 32. Estrutura química do [1-9-N α C]-Crouorb A2 (**23**)

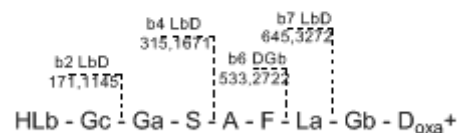
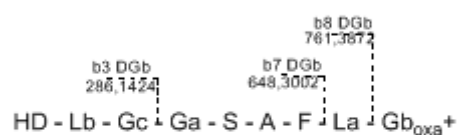
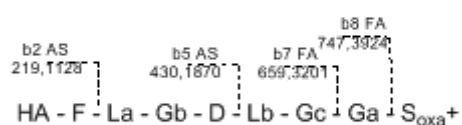
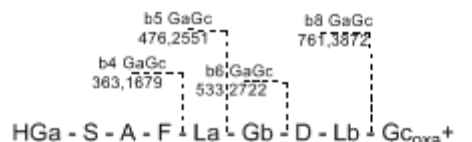
Tabela 7. Dados de RMN 1D e 2D do ciclopeptídeo [1–9-NaC]-Crouorb A2

C/H	δ_c	δ_H m, (J Hz)	HMBC 1H - ^{13}C	NOE	COSY 1H - 1H
Glicina A (Ga)					
NH		8,42 br, s	176,68 DCO; 174,70 D γ CO		7,97 SNH;
α	41,25	4,12 s			
α'		3,97 d, (J 16,3)	167,22 GaCO	8,42 GaNH, 8,39 LbNH;	
CO	167,22				4,05 A α ;
Ácido Aspártico (D)					
NH		8,72 d, (J 6,8)	173,38 LaCO; 49,26 D α	4,36 D α , 2,54 D β'	4,05 A α ;
γ CO	174,70				7,74 ANH; 1,21 A β
β	35,23	3,00 s	174,70 D γ CO;		
β'		2,54 d, (J 5,1)		3,00 D β ; 4,36 D α ; 1,45 Lb β' , 0,80 La δ	4,31 Fa;
α	49,26	4,36 m	176,68 DCO;	2,54 D β' ; 3,00 D β ; 2,49 Lb β	3,00 F β ; 2,88 F β'
CO	176,68				
Leucina A (La)					
NH		7,48 d, (J 7,3)	169,7 GbCO;	4,24 La α ; 1,45 La β' ;	2,88 F β' ; 4,31 Fa
δ	23,57	0,80 d, (J 6,5)	21,76 La δ' ;		
δ'	21,76	0,75 d, (J 6,1)	24,56 Lay		7,67 FNH; 3,02 F β ; 2,88 F β' ;
γ	24,56	1,52 m			
β	40,89	2,49 d, (J 5,0)			
β'		1,45 dd (J 12,0; 8,1)	24,56 Lay; 21,76 La δ' ; 51,67 La α ; 173,06 LaCO	4,24 La α ;	4,29 La α
α	51,67	4,24 m	173,06 LaCO	7,76 GbNH;	1,57 Lay
CO	173,38				
Glicina B (Gb)					
NH		7,76 s	173,38 LaCO		4,29 La α
α	43,26	3,88 s			
α'		3,65 encoberto	169,70 GbCO		8,39 LaNH
CO	169,70				
Glicina C (Gc)					
NH		8,35 s	171,33 SCO	3,80 Gc α ; 7,76 Gb, 4,07 Sa	
α	43,22	3,80 s	169,48 GcCO	8,35 GcNH, 7,76 Gb	3,97 Gb α'
α'		3,52 encoberto			

CO	169,48				
Serina (S)					
NH		7,97 d <i>J</i> 6,0 Hz	173,15 ACO , 56,35 Sα		4,36 Dα
OH		-			
β,β'	61,40	3,70 (2H) <i>m</i>	56,35 Sα		4,36 Dα
α	56,35	4,07 m	171,33 SCO ; 61,35 Sα	1,21 Aβ ; 8,35 GcNH	4,36 Dα
CO	171,33				8,72 DNH ; 2,54 Dβ'
Alanina (A)					
NH		7,74 s	171,50 FCO , 17,48 Aβ	4,05 Aα ;	
β	17,48	1,21 d <i>J</i> 7,1 Hz	49,57 Aα ; 173,15 ACO	4,05 Aα ; 7,21 F3' , 5'	4,24 Lbα ;
α	49,57	4,05	173,15 ACO ; 17,57 Aβ	7,74 ANH , 1,21 Aβ	1,52 Lby
CO	173,15				
Fenilalanina (F)					
NH		7,67 d <i>J</i> 8,5 Hz	50,87 Fα	4,29 Lbα ; 1,42 Lbβ' ;	0,80 Lbδ
4'	126,91	7,18 m	36,63 Fβ ;		4,24 Lbα ;
3', 5'	129,42	7,21 m	129,65 F2',6'	2,88 Fβ' , 8,39 LbNH	7,48 LbNH ; 1,45 Lbβ'
2', 6'	129,65	7,23 m	137,87 F1'		
1'	137,87				
β	36,63	3,00 m	129,42 F3',5' ;	7,21 F3', 5' ; 4,29 Lαα	3,65 Gcα ; '
β'		2,88 m	129,65 F2',6' ; 171,50 FCO	7,21 F3', 5' ; 4,29 Lαα	
α	55,87	4,31*	137,81 F1' ; 171,50 FCO	1,42 Lbβ' ; 3,00 Fβ	7,74 GcNH
CO	171,50				
Leucina B (Lb)					
NH		8,39 d (<i>J</i> 6,5)	167,2 GcCO , 55,87 Fα	3,97 Gαα' ; 4,29 Lbα	3,80 Gαα ; 3,52 Gαα'
δ	23,36	0,82 d (<i>J</i> 6,5)	21,64 Lbδ'	7,21 F3', 5' ; 4,31 Fα ;	8,35 GαNH
δ'	21,64	0,77 d (<i>J</i> 6,1)	24,48 Lby ;		8,35 GαNH
γ	24,48	1,57 m			
β	40,70	2,46 m			
β'		1,42 m	173,06 LbCO , 24,48 Lby ;	4,29 Lbα	4,07 Sα ;
			21,64 Lbδ' ; 50,85 Lbα		
α	50,85	4,29 m	173,06 LbCO	7,74 SNH , 4,05 Sα	
CO	173,06				

Tabela 8. Principais fragmentos observados no espectro de HRIESEM/EM (m/z 818,4011, $[M+H]^+$, 44,6 eV)

m/z	Fragmento
840,3841	$[M+Na]^+$
818,4011	$[M+H]^+$
800,3978	$[M+H-H_2O]$
790,4157	$[M+H-CO]$
782,3922	$[M+H-2H_2O]$
772,3993	$[M+H-CO-H_2O]$
761,3872	[b8 GaGc]; [b8 SGa]; [b8 DGb]
747,3924	[b8 FA];
729,3738	[b8 FA-H ₂ O]
716,3627	[a8 GaGc-NH ₃]; [a8 SGa-NH ₃]; [a8 DGb-NH ₃]
705,3249	[b8 GcLb]; [b8 GbLa];
687,3112	[b8 GcLb-H ₂ O]; [b8 GbLa-H ₂ O];
677,3324	[a8 GcLb]; [a8 GbLa];
671,3345	[b8 LaF];
659,3201	[b7 FA]
653,3254	[b8 LaF-H ₂ O]
648,3002	[b7 GaGc]; [b7 DGb];
645,3272	[b7 LbD];
641,2996	[b7 FA-H ₂ O]
630,2957	[a7 GbLa];
590,2949	[b6 SGa]
533,2713	[b6 GaGc]; [b6 LbD]; [b6 GcLb];
516,2538	[b6 GcLb-H ₂ O]; [b6 LbD-H ₂ O]; [b6 GaGc-H ₂ O];
513,2654	[b6 LaF]
476,2551	[b5 GaGc]; [b5 SGa]
448,1850	[a5 GaGc]; [a5 SGa]
430,1870	[b5 AS]
420,1885	[b5 GcLb]
419,2312	[b4 SGa]
391,1607	[a4 SGa]
386,2033	[b5 LbD]
363,1679	[b4 GaGc]
345,1652	[b4 GaGc-H ₂ O]
315,1671	[b4 LbD]
297,1548	[b4 LbD-H ₂ O]
286,1424	[b3 LaF]; [b3 GbLa]; [b3 DGb]
258,1481	[a3 LaF]; [a3 GbLa]; [a3 DGb]
219,1131	[b2 AS];
171,1145	[b2 LaF]; [b2 LbD];



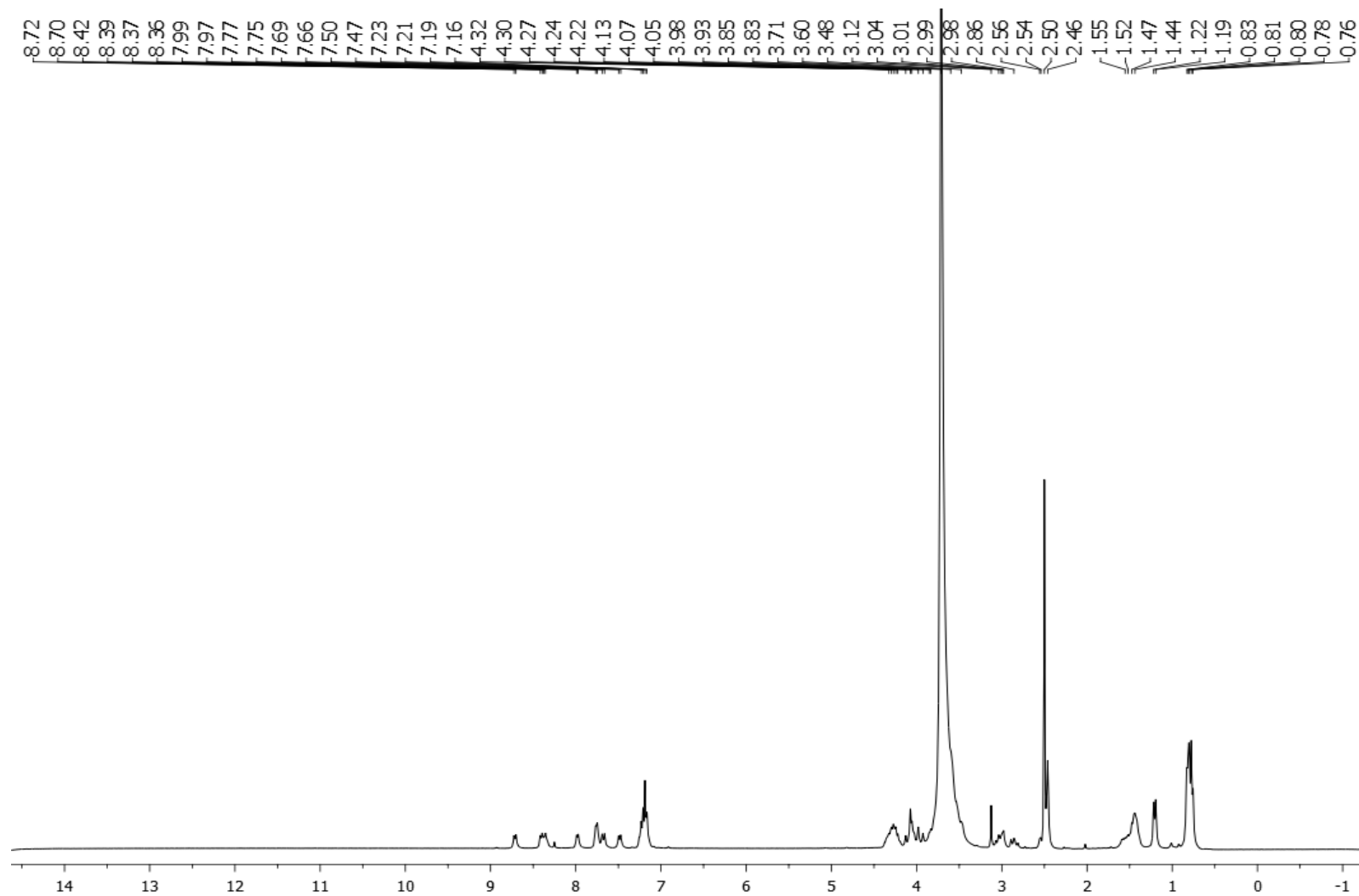


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (300 MHz-DEMO- d_6) [1-9-NaC]-Crouororb A2 (**23**)

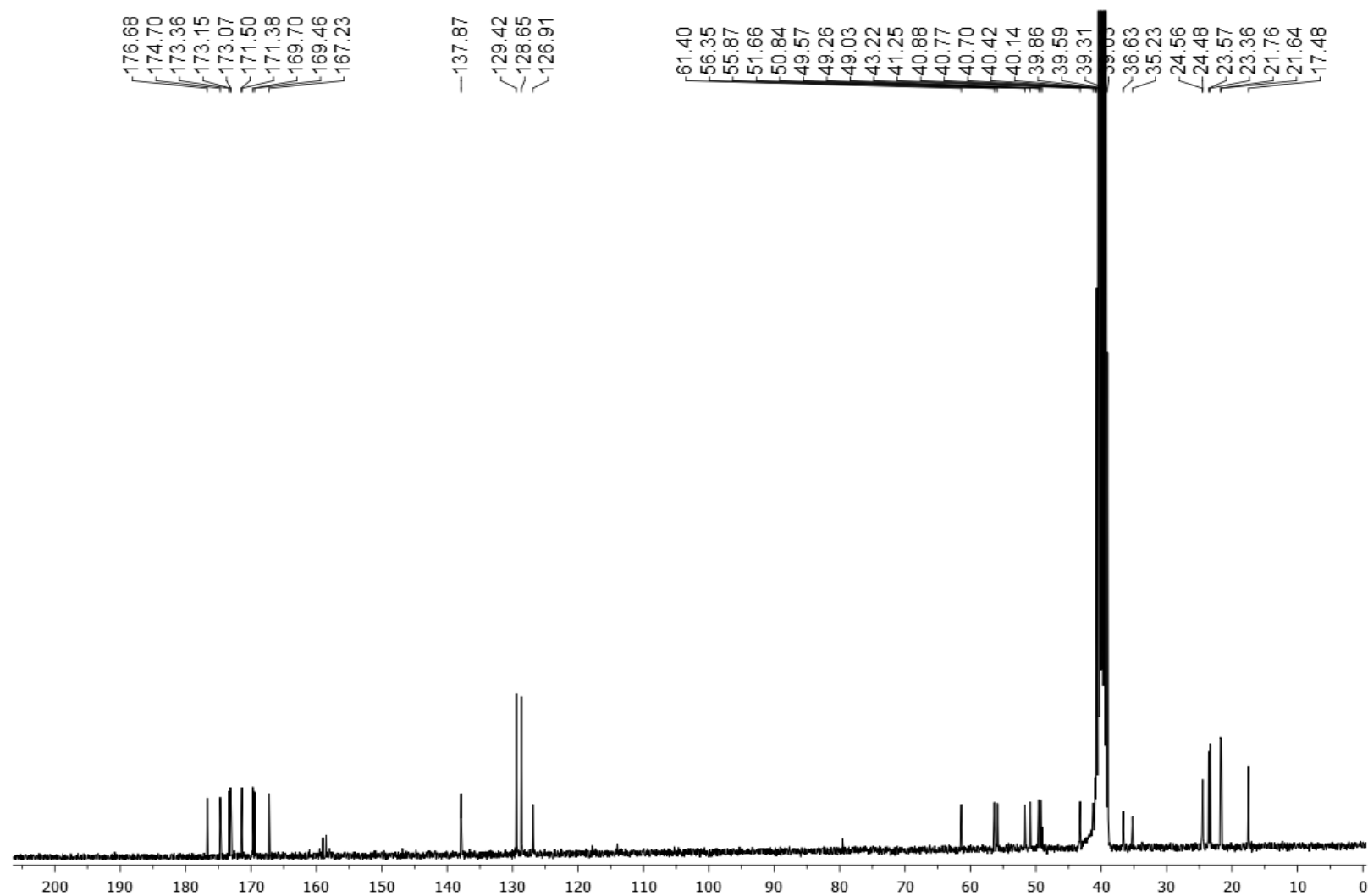


Figura 34. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz - DMSO-d₆) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (23)

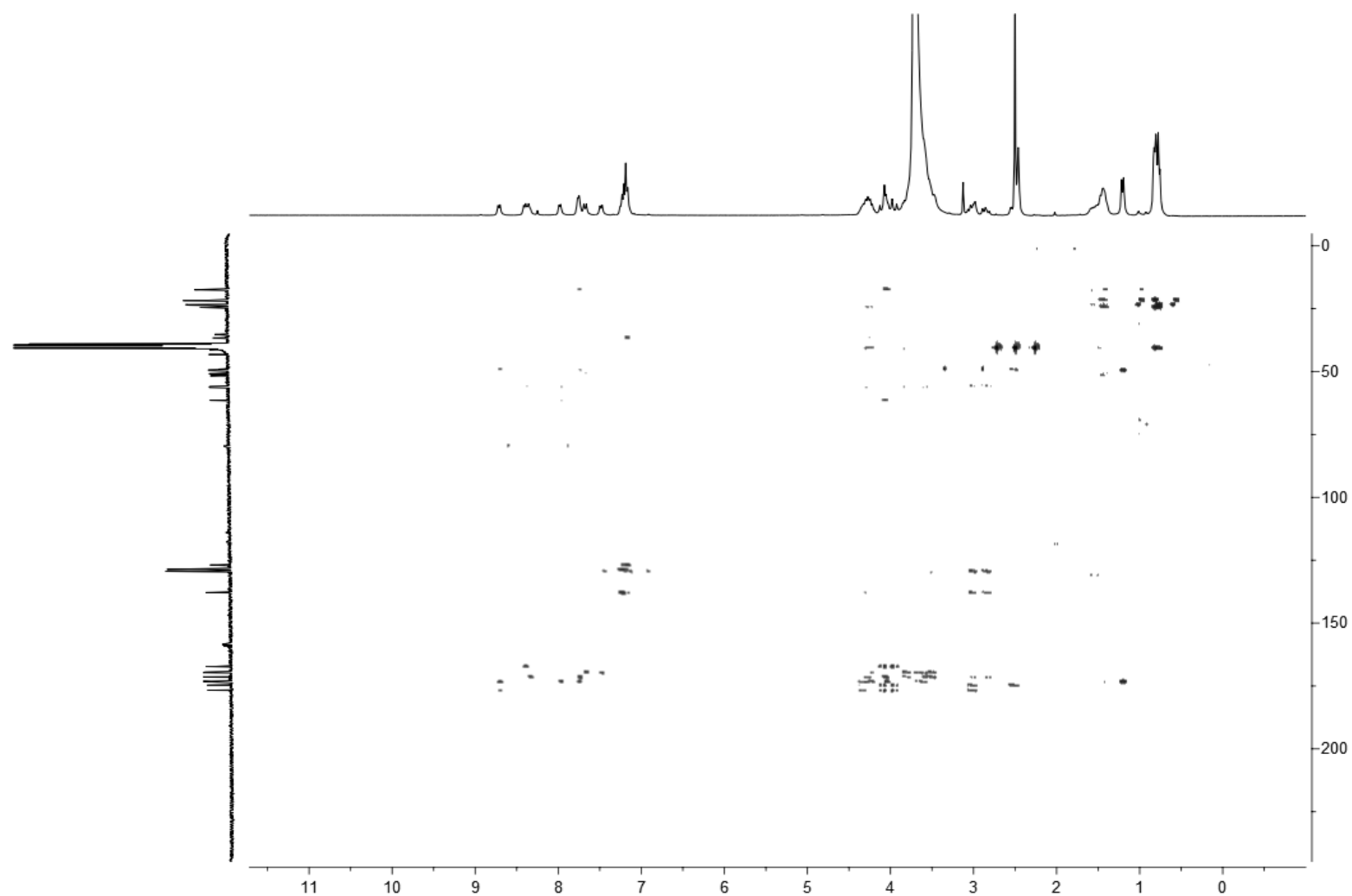


Figura 35. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz) [1-9- ^{13}C]-Crouorb A2 (**23**)

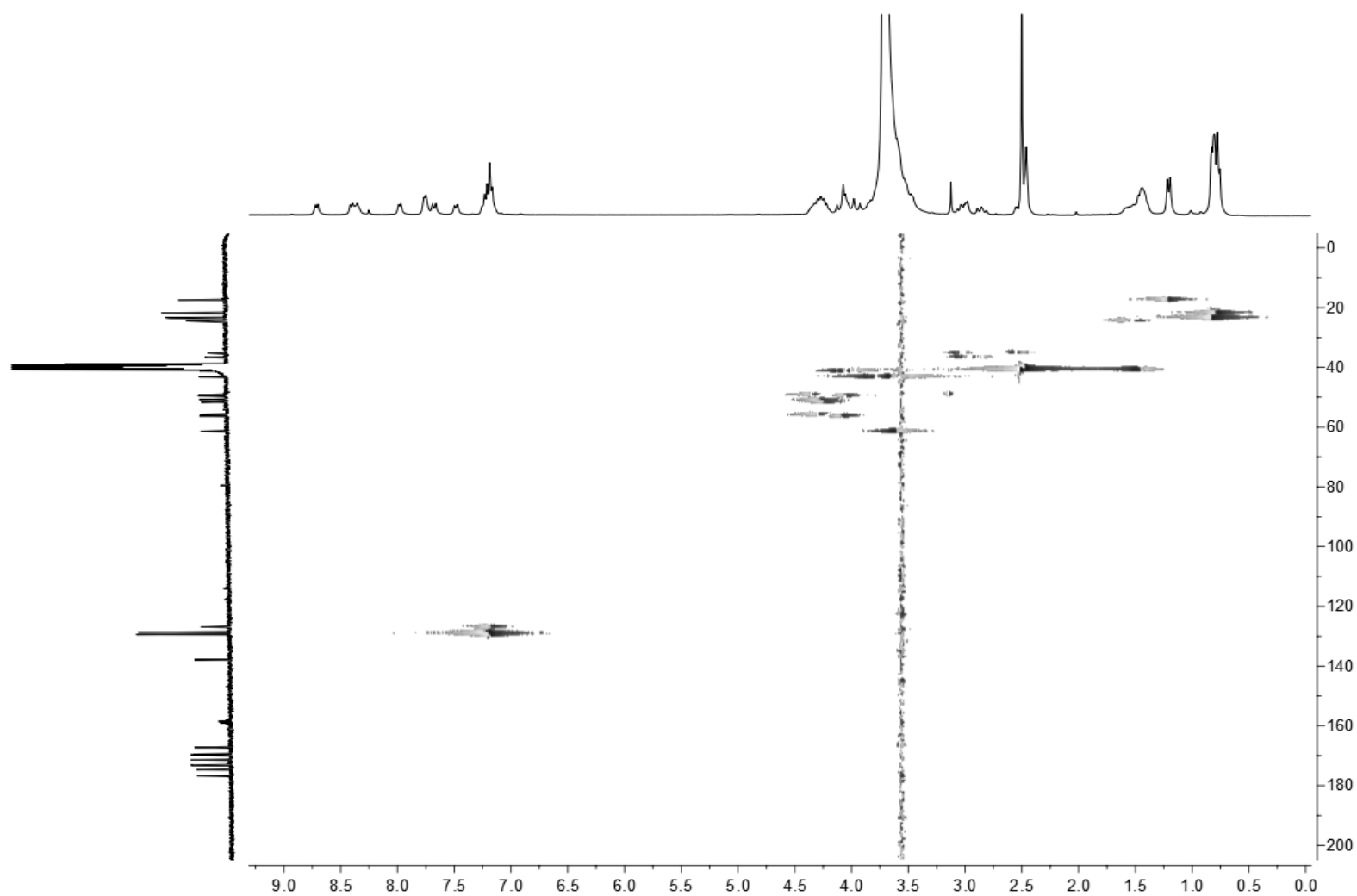


Figura 36. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH - HSQC (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (**23**)

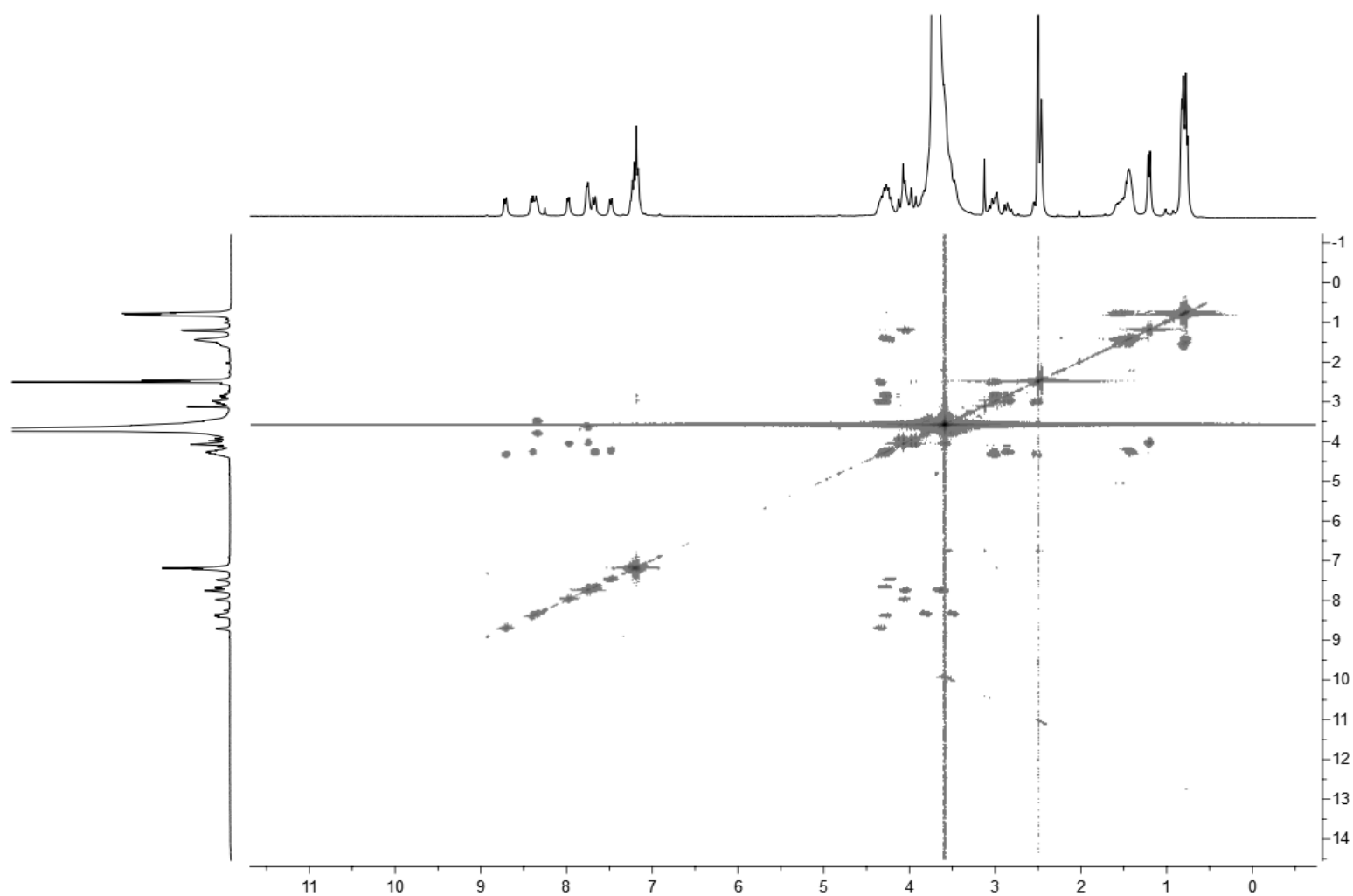


Figura 37. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) [1-9-NaC]-Crouorb A2 (**23**)

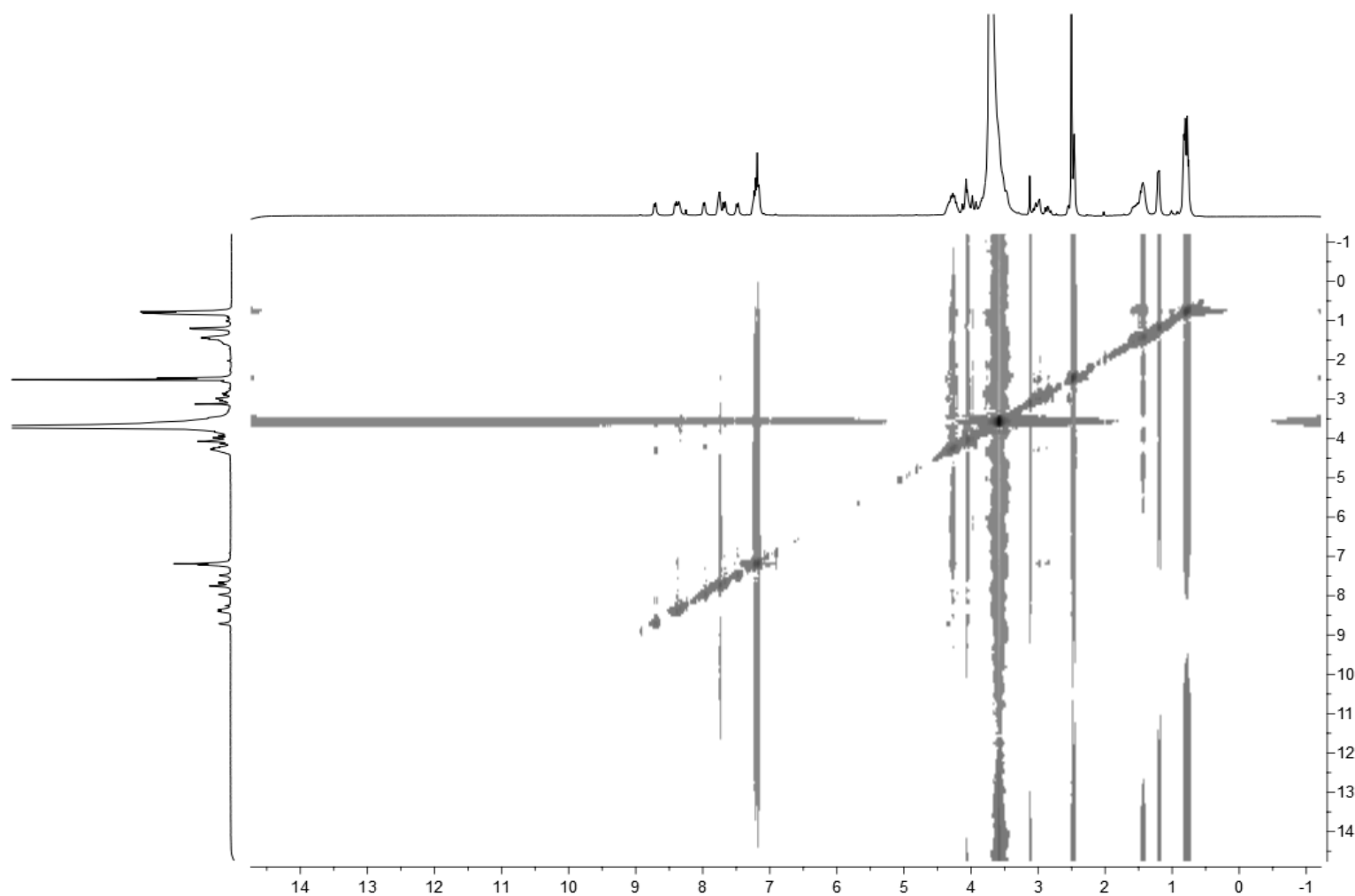


Figura 38. Espectro de correlações $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -NOESY (DMSO- d_6 , 300 MHz) [1-9- NaC]-Crouorb A2 (**23**)

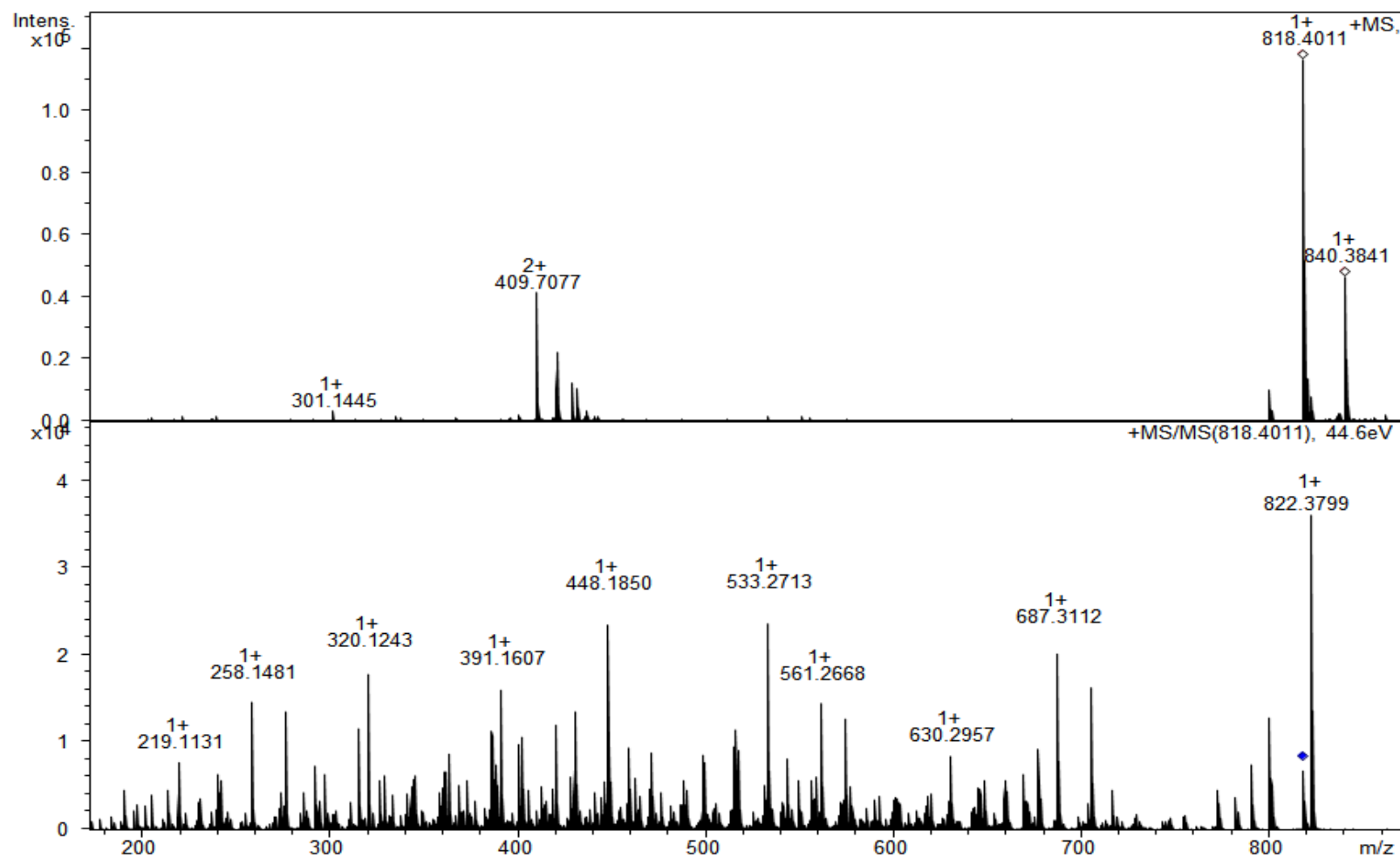


Figura 39. HRIESEM do [1-9-NaC]-crouororb A2 (**23**) m/z 818,4011 $[M+H]^+$

5.4. Identificação/Elucidação estrutural dos compostos 3, 7, 9 e 12

A subfração **FAL-4**, após análise por CCDA, revelada com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, mostrou resultados promissores e foi submetida a cromatografia usando como suporte Sephadex LH-20[®]. Esse processo resultou no isolamento e caracterização dos compostos **3** e **7** (37 mg) e **9** e **12** (30 mg) (Item 4.5.3, p.42).

A subfração 27 foi identificada como sendo uma mistura de galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**) (Figura 40), numa proporção de 1:1.

O espectro de RMN ^1H (Figura 41) apresentou sinais em δ_{H} 2,54 (dd, J 16,1; 7,0 H-4_{ax}), 2,87 (m, H-4_{eq}), 4,02 (m, H-3) e 4,59 (d, J 7,0) característicos do anel C de um flavan-3-ol. Para o anel B o sinal em δ_{H} 6,44 é relativo à 2 prótons correspondentes aos H-2' e H-6', ou seja, substituição 3',4',5'-OH (acoplamento meta). E, ainda, um dubletos δ_{H} 5,92 (J 1,9) e um singlete largo δ_{H} 5,98 típicos dos prótons H-6 e H-8 indicando a substituição OH-5,7 do anel A do flavonoide galocatequina (**3**) (Tabela 9).

Foram observados, também, dois singletos em δ_{H} 4,18 e 4,76 que segundo Weinges et al. (1969) é devido a constante de acoplamento do isômero de galocatequina, a epigalocatequina (**7**) entre os hidrogênios H-2 e H-3 J_{cis} . Esse é o fator determinante para diferenciação entre a galocatequina e epigalocatequina.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) apresenta 25 sinais com descolamentos típicos de flavonoides confirmando a hipótese da presença de flavan-3-ols (Tabela 9).

O padrão de substituição do anel A e B pode ser confirmada pelo RMN ^{13}C pelos sinais δ_{C} 157,4 (C-5), 157,8 (C-7), 148,7 (C-3',4'), 133,9 (C-5') e 107,3 (C-2',6') para galocatequina (**3**); δ_{C} 157,2 (C-5), 157,5 (C-7), 148,5 (C-3',4'), 133,5 (C-5') e 107,1 (C-2',6') para epigalocatequina (**7**) referentes a 5 grupos hidroxilas ligados a anéis aromáticos. Os dados observados foram consistentes com aqueles apresentados na literatura e foi identificada como um mistura de galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**) (Fan et al., 2007).

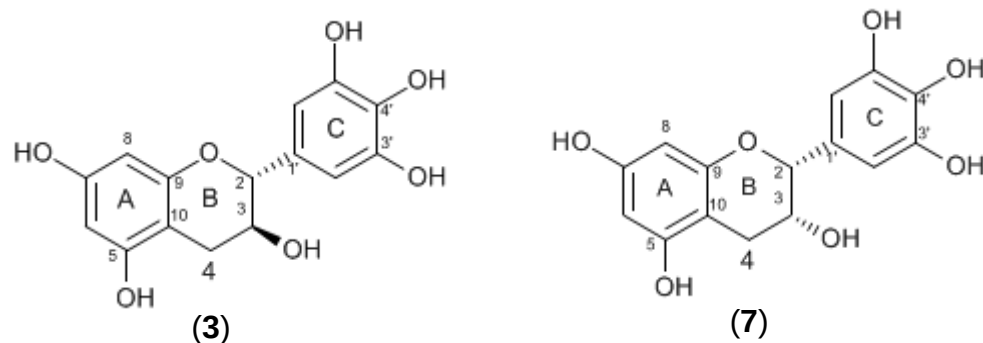


Figura 40. Estrutura química de galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**)

Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da mistura de Galocatequina (**3**) e Epigalocatequina (**7**) em CD_3OD e das mesmas citadas na literatura (RMN ^1H 500 MHz e ^{13}C 125 MHz em CD_3OD)

Substância 3+7			Galocatequina (Fan et al., 2007)		Sustância 3+7		Epigalocatequina (Fan et al., 2007)	
C/H	δ_H m, (J=Hz)	δ_C	δ_H m, (J Hz)	δ_C	δ_H m, (J Hz)	δ_C	δ_H m, (J Hz)	δ_C
2	4,59 d, (J 7,0)	82,8	4,53 d, (J 7,1)	83,1	4,76 s	79,7	4,74 s	80,2
3	4,02 m	68,6	3,87 m	69,0	4,18 s	67,4	4,16 s	67,9
4 _{ax}	2,79 m	27,9	2,82 dd, (J 16,0; 7,8)	28,3	2,86 dd, (J 16,9; 4,4)	29,1	2,87 dd, (J 16,8; 4,5)	29,5
4 _{eq}	2,54 dd, (J 16,1; 7,6)		2,52 dd, (J 16,0; 7,8)		2,75 dd, (J 16,9; 2,1)		2,76 dd, (J 16,8; 2,7)	
5		157,4		157,9		157,2		157,6
6	5,92 d, (J 1,9)	96,0	5,72 d, (J 2,3)	96,6	5,99 sl	96,5	5,96 d, (J 1,8)	96,9
7		157,8		158,1		157,5		157,8
8	5,98 sl	95,7	5,86 d (J 2,3)	95,8	5,98 sl	96,4	5,94 d, (J 1,8)	96,4
9		156,7		157,1		157,4		157,9
10		100,9		101,0		100,3		100,6
1'		131,5		131,9		131,5		132,0
2'	6,44 s	107,3	6,39 s	107,5		107,1		107,5
3'		148,7		147,0	6,56 s	148,5	6,52 s	147,0
4'		148,7		147,0		148,5		147,0
5'		133,9		134,3		133,5		134,0
6'	6,44 s	107,3	6,39 s	107,5	6,56 s	107,1	6,52 s	107,5

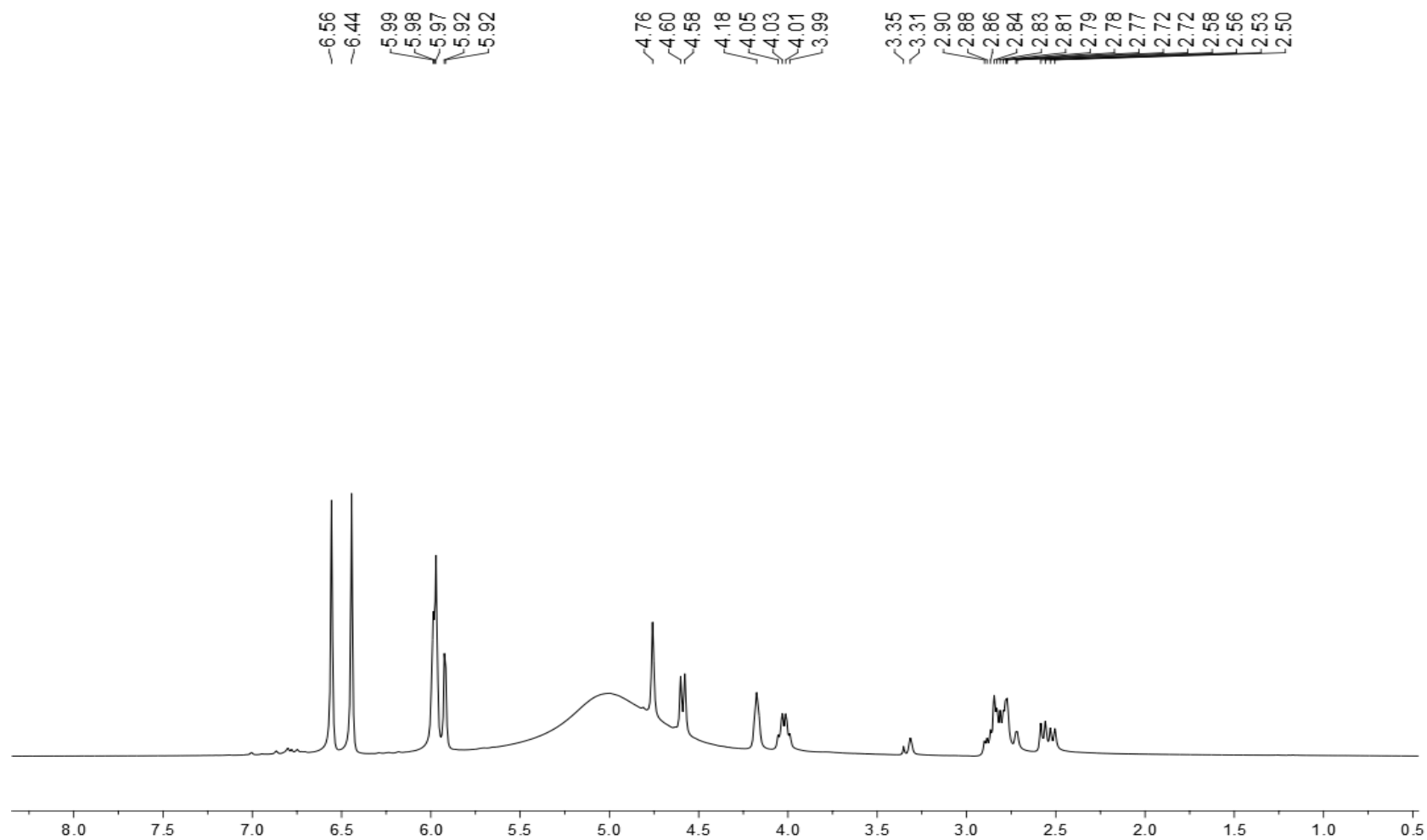


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CD_3OD) galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**)

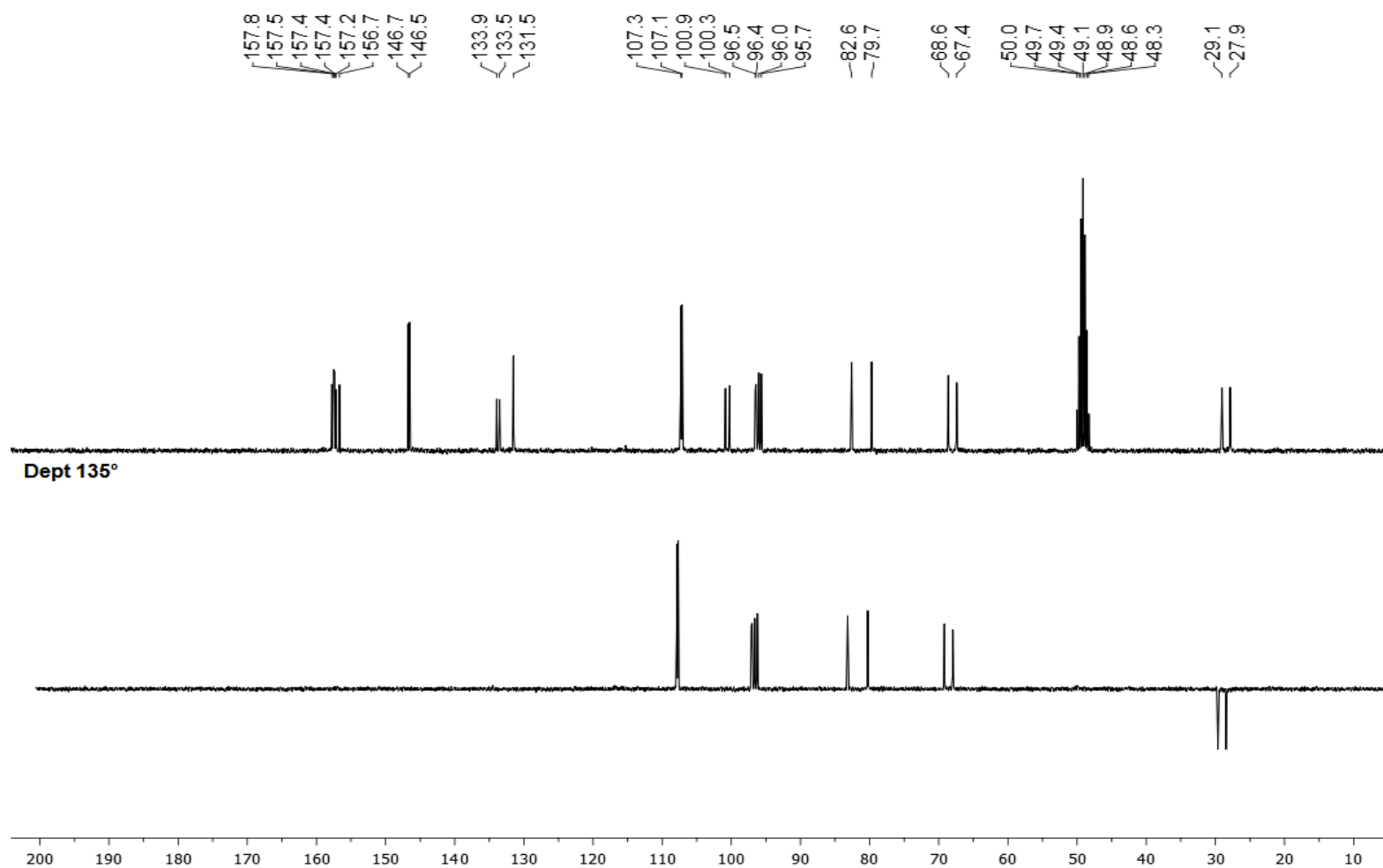


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C e Dept 135° (75 MHz – CD_3OD) galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**)

A subfração 22 resultou na identificação, em mistura, dos compostos **9** e **12** (Figura 43) sendo a catequina (**9**) e epicatequina (**12**), dois flavonoides do tipo flavan-3-ol.

O espectro de RMN ^1H (Figura 44), apresentou-se semelhante ao espectro da mistura de galocatequina (**3**) e epigalocatequina (**7**). A diferença está na multiplicidade do anel B: δ_{H} 6,83 (d, J 1,7 Hz, H-2'), 6,77 (d, J 8,0, H-5') e 6,70 (dd, J 8,0; 1,7, H-6') com multiplicidades indicativa de uma substituição OH-3',4'. Observaram-se também os sinais na região de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,96 a 5,84). Dois dubletos em δ_{H} 5,93 (J 2,1 Hz) e δ_{H} 5,86 (J 2,2 Hz) e δ_{H} 5,8 (J 2,2 Hz) podem ser correlacionados com H-6 e H-8 do anel A de um flavonoide (Tabela 9).

Ainda no RMN ^1H , observaram-se sinais em δ_{H} 2,49 (dd, J 16,0, 8,0 Hz), 2,84 (m), 4,08 (m) e 4,56 (d, J 7,4 Hz) de hidrogênio ligado a carbono oxigenado benzílico, indicativos de flavan-3-ol (anel C) e foram atribuídos a H-4_{ax}, H-4_{eq}, H-3 e H-2, nessa ordem. As constantes de acoplamento observadas para H-3 e H-2 indicam que a configuração *trans* e são atribuídos a molécula de catequina (**3**). A epicatequina foi evidenciada pela presença do singlete largo em δ_{H} 4,79 referente ao H-2, que sugere a configuração *cis* entre H-2 e H-3 (Tabela 10).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 45) apresentou 27 sinais, sendo 13 referentes à catequina e 14 referentes ao seu isômero epicatequina. Destes, os sinais δ_{C} 28,5 e 82,9 e os sinais δ_{C} 29,3 e 79,9 atribuídos a C-4 e C-2 da catequina e epicatequina, respectivamente, confirmam a existência das duas substâncias na fração. Os dados observados foram consistentes com aqueles listados na literatura (Ayres et al., 2009; Tanaka et al., 2005) (Tabela 10).

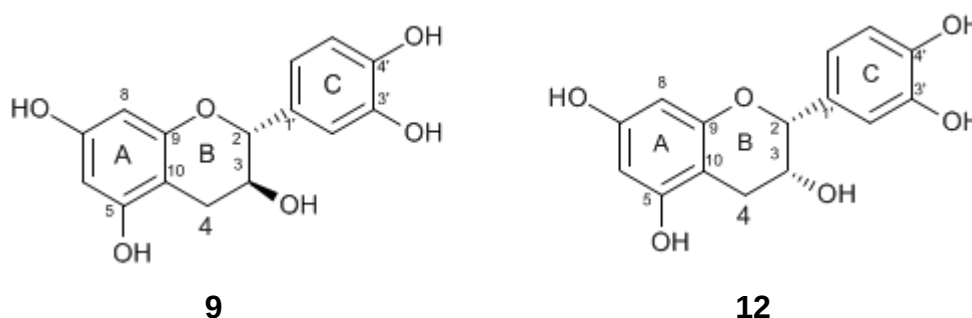


Figura 43. Estrutura química de catequina (**9**) e epicatequina (**12**)

Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da mistura de Catequina (**9**) e Epicatequina (**12**) em CD_3OD e das mesmas citadas na literatura (RMN ^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz em CD_3OD)

Substância 9+12			Catequina (Ayres et al., 2009)			Sustância 9+12		Epicatequina (Tanaka et al., 2005)	
C/H	δ_{H} m, (J Hz)		δ_{H} m, (J Hz)	δ_{C}		δ_{H} m, (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} m, (J Hz)	δ_{C}
2	4,56 d, (J 7,4)	82,9	4,59 d, (J 7,4)	82,6		4,79 sl	79,9	4,81 sl	79,9
3	4,08 m	68,9	4,01 ddd, (J 8,0; 7,4. 5,4)	68,6		4,15 sl	67,6	4,17 m	67,5
4 _{ax}	2,87 m	28,5	2,84 dd, (J 16,0; 5,4)	28,2		2,87 m	29,3	2,86 dd, (J 16,8; 4,7)	29,2
4 _{eq}	2,49 dd, (J 16,0; 8,0)		2,52 dd, (J 16,0; 8,0)			2,74 dd, (J 16,8, 2,6)		2,72 dd, (J 16,8; 2,7)	
5	-	157,2	-	157,3		-	157,9		157,9
6	5,85 d, (J 2,2)	96,5	5,96 d, (J 2,2)	96,4		5,94 d, (J 2,2)	96,3	5,93 d, (J 2,4)	96,5
7	-	157,4	-	157,4		-	157,1		158,2
8	5,93 d, (J 2,1)	95,7	5,89 d, (J 2,2)	95,6		5,91 d, (J 2,2)	96,6	5,91 d, (J 2,4)	96,0
9	-	156,9	-	156,7		-	157,6		157,6
10	-	100,9	-	100,9		-	100,2		100,2
1'	-	132,3	-	132,0		-	132,4		132,4
2'	6,83 d, (J 1,7)	115,4	6,85 d, (J 1,8)	115,2		6,96 sl	115,4	6,97 d, J 2,1 Hz	115,4
3'	-	146,3	-	146,0		-	145,8		146,0
4'	-	146,3	-	146,0		-	146,0		146,1
5'	6,77 d, (J 8,0)	116,1	6,79 d, (J 8,1)	116,2		6,74 sl	116,2	6,75 d, (J 8,4)	116,0
6'	6,70 dd, (J 8,0; 1,7)	120,2	6,72 dd, (J 2,0; 8,0)	120,1		6,78 dd, (J 9,0; 1,9)	119,6	6,79 dd, (J 8,4; 2,1)	119,5

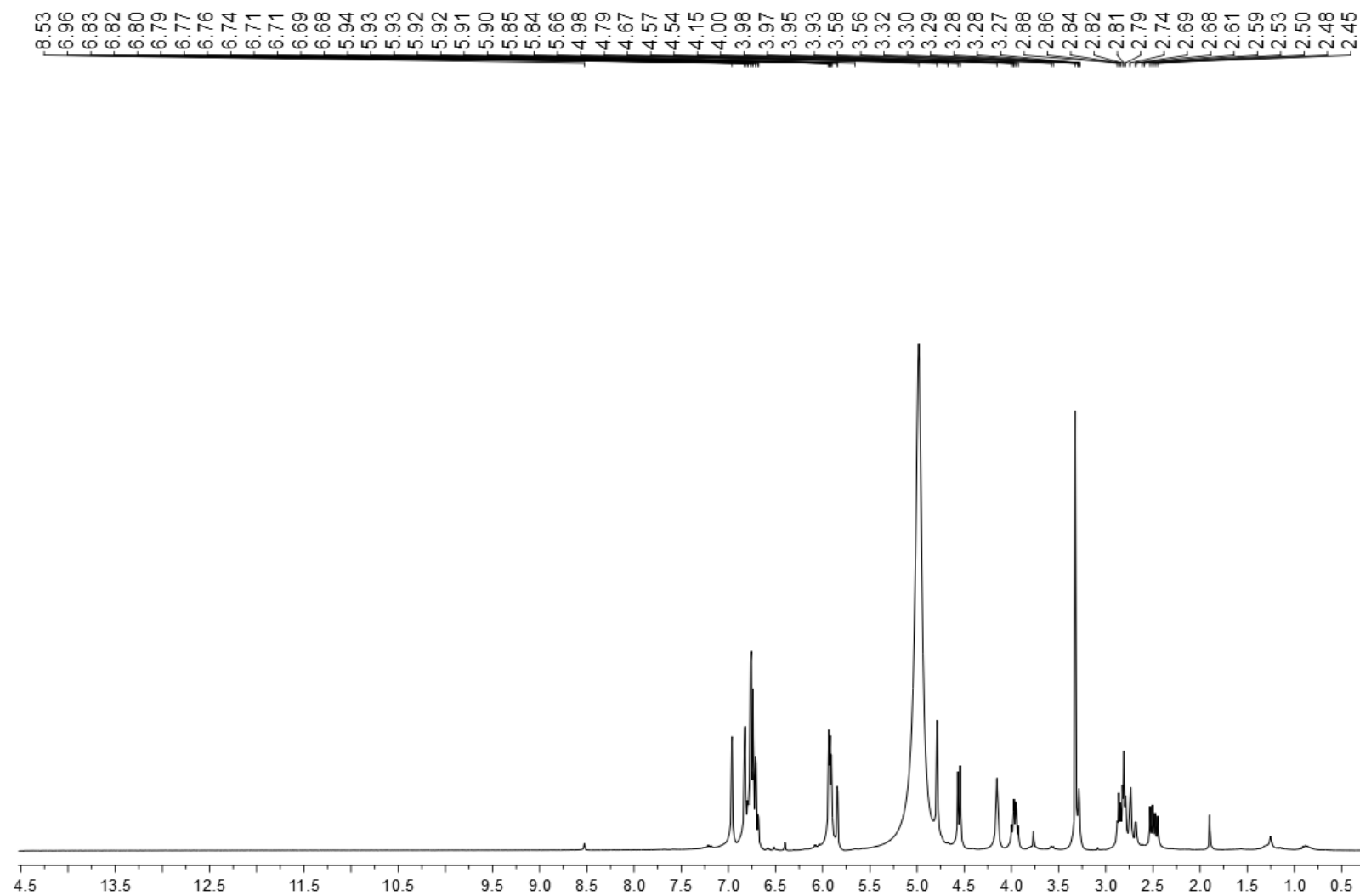


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz – CD_3OD) catequina (**9**) e epicatequina (**12**)

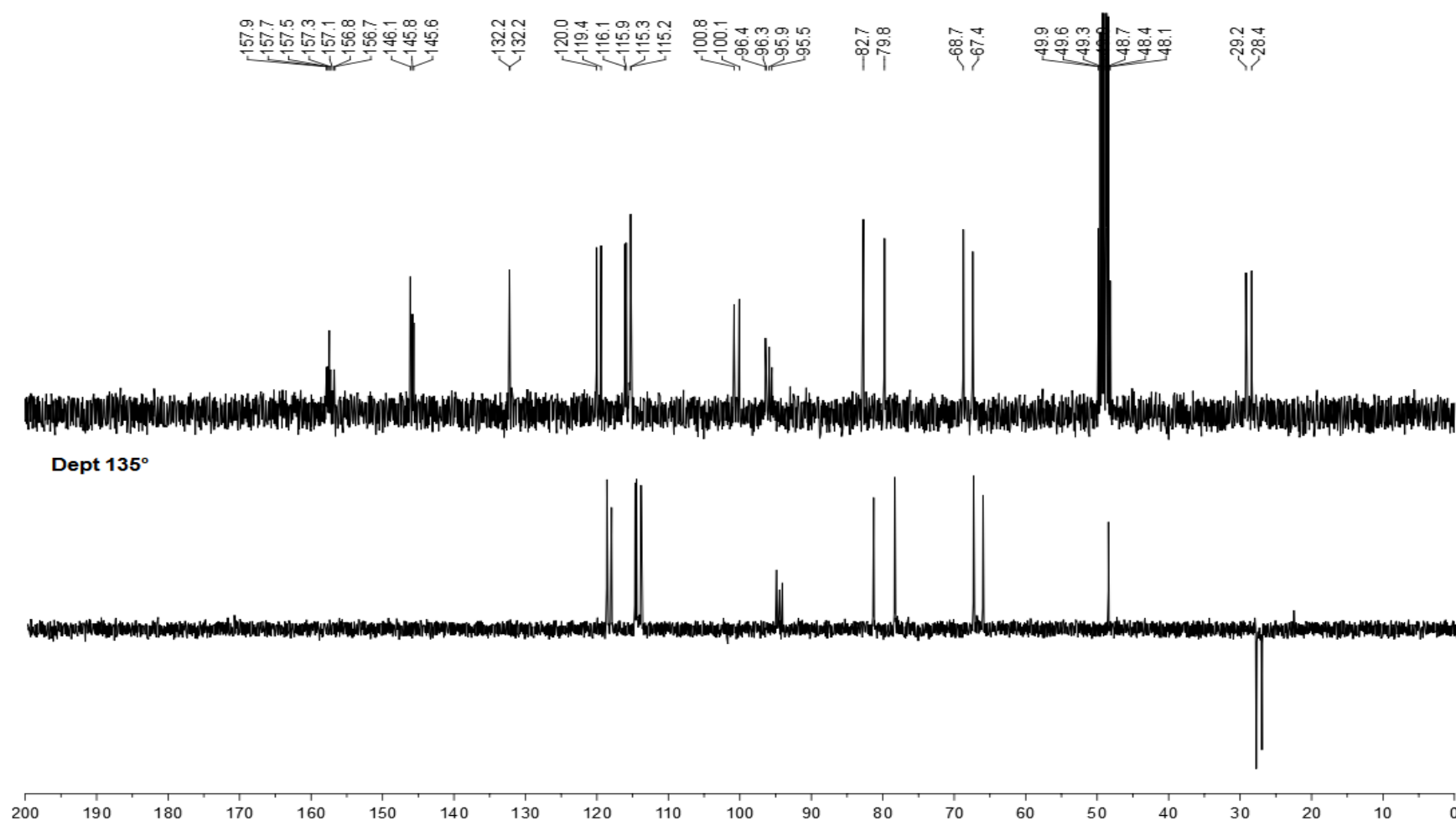


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz – CD_3OD) catequina (9) e epicatequina (12)

5.5. Análise dos constituintes voláteis das fases hexânica da casca e látex de *C. urucurana*

Os componentes voláteis das fases hexânica do extrato metanólico da casca (FHC) e fase hexânica do látex (FHL) foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) e estão mostrados na Tabela 11, registrando os principais constituintes químicos nessas amostras. A análise foi realizada a partir da determinação do índice de retenção linear (IR) determinado em coluna apolar DB-5MS, cruzamento de dados do banco de dados e de amostras isoladas de *C. urucurana* (Item 4.7, p. 43). A análise levou à identificação e quantificação no total de 95 compostos equivalente a 66,71% e 67,02% do total de componentes existentes para FHC e FHL, respectivamente (Figura 48 e 49).

O IR auxilia na identificação dos dados e é o número obtido da interpolação dos dados adquiridos, fazendo a comparação do tempo de retenção de um pico em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (hidrocarbonetos) precedente e subsequente ao pico de interesse (Van Den Dool e Kratz, 1963).

Observou-se que, para FHC, os principais constituintes químicos dessa fase foram os diterpenos tipo clerodano 12-*epi*-barbascoato de metila (16,53%), ácido hardwíkiico (9,79 %), 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (1,55%) e 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila (0,64%) (Figuras 50, 51, 52 e 53) e representam 28,51% do total identificado. Sesquiterpenos como α -bisabolol (4,73%), 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexa-hidro-2H-naftalen-4-ol (3,37%), espatulenol (0,90%), δ -cadineno (0,94%) são 18,09%, seguido de esteroides (7,50%), monoterpenos (0,68%); compostos como ácidos graxos, hidrocarbonetos, entre outros (12,61%) são a porção total identificada e quantificada.

Diferente de FHC, os esteroides β -sitosterol (23,00%), estigmasterol (5,18%) e campesterol (4,34%), 32,52 do percentual total, são os principais componentes, seguido de ácidos graxos (19,52%): ácido linoleico (2,01%), ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (4,04%) são alguns dos encontrados. Aos esteroides e ácidos graxos são atribuídas atividades antifúngica (Mbambo

et al., 2012), antibacteriana (Sen et al., 2012), antioxidante (Farag et al., 1989; Malhotra et al., 2016), entre outras. Os sesquiterpenos α -bisabolol (2,17%), germacra-4(15),5,10,(14)-trien-1- α -ol (2,06%) e sesquicineol (5,44%) somam 11,72%; monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, ésteres graxos (3,26%), fazem parte da fase hexânica do látex.

Tabela 11. Composição percentual da fase hexânica do extrato metanólico da casca e da fase hexânica do látex de *Croton urucurana*

	Compostos ^{a,b}	FHC	FHL	IR ^c	[M ⁺]	FM
1	Ácido hexanóico	-	0,03	980	116	C ₆ H ₂₀
2	β -Pineno	0,02	-	984	136	C ₁₀ H ₁₆
3	α -terpineno	0,01	-	1019	136	C ₁₀ H ₁₆
4	1,8-Cineolo	0,02	-	1033	154	C ₁₀ H ₁₈ O
5	γ -Terpineno	0,03	-	1059	136	C ₁₀ H ₁₆
6	Borneol	0,47	-	1168	154	C ₁₀ H ₁₈ O
7	Terpinen-4-ol	0,33	-	1178	154	C ₁₀ H ₁₈ O
8	α -Terpeniol	0,15	-	1188	154	C ₁₀ H ₁₈ O
9	Acetato de isobornilo	0,10	-	1287	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
10	Timol	0,02	-	1290	150	C ₁₀ H ₁₄ O
11	Carvacrol	0,05	0,06	1296	150	C ₁₀ H ₁₄ O
12	(2E,4E)-Decadienal	-	0,05	1319	152	C ₁₀ H ₁₆ O
13	δ -Elemeno	0,07	-	1339	204	C ₁₅ H ₂₄
14	α -Cubeneno	0,05	0,03	1351	204	C ₁₅ H ₂₄
15	Ciclosativeno	0,03	-	1370	204	C ₁₅ H ₂₄
16	Ácido decanoide	-	0,07	1372	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
17	α -lilangeneno	0,08	-	1378	204	C ₁₅ H ₂₄
18	β -Cubeneno	0,06	-	1392	204	C ₁₅ H ₂₄
19	β -Elemeno	0,06	-	1394	204	C ₁₅ H ₂₄
20	α -Gurjeneno	0,01	-	1402	204	C ₁₅ H ₂₄
21	cis- α -Bergamoteno	0,04	-	1407	204	C ₁₅ H ₂₄
22	α -Cedreno	0,01	-	1411	204	C ₁₅ H ₂₄
23	β -Duprezianeno	0,19	-	1422	204	C ₁₅ H ₂₄
24	β -Copaeno	0,11	-	1432	204	C ₁₅ H ₂₄
25	trans- α -Bergamoteno	0,33	-	1442	204	C ₁₅ H ₂₄
26	Aromadendreno	0,02	-	1446	204	C ₁₅ H ₂₄
27	Acetato de geranilo	0,27	0,03	1455	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
28	(E)- β -Farneseno	0,34	-	1458	204	C ₁₅ H ₂₄
29	Sesquisabineno	-	0,01	1459	204	C ₁₅ H ₂₄
30	Allo-aromadrendreno	0,09	-	1464	204	C ₁₅ H ₂₄
31	α -Acoradiene	0,03	-	1467	204	C ₁₅ H ₂₄
32	trans-Cadina-1(6),4-dieno	0,04	-	1477	204	C ₁₅ H ₂₄
33	γ -Muuroleno	0,50	-	1479	204	C ₁₅ H ₂₄
34	ar-Curcumeno	0,21	0,04	1485	202	C ₁₅ H ₂₂
35	β -Salineno	0,11	-	1489	204	C ₁₅ H ₂₄
36	α -Muuroleno	0,21	-	1503	204	C ₁₅ H ₂₄
37	β -Bisabolenol	0,14	0,03	1510	204	C ₁₅ H ₂₄
38	β -Curcumeno	0,16	-	1513	204	C ₁₅ H ₂₄
39	Sesquicineolo	0,77	5,44	1517	222	C ₁₅ H ₂₆ O
40	δ -cadineno	0,94	-	1525	204	C ₁₅ H ₂₄
41	Sesquifellandreno	-	0,14	1527	204	C ₁₅ H ₂₄
42	α -Cadineno	0,04	-	1541	204	C ₁₅ H ₂₄
43	cis-Sesquisabineno hidratado	0,24	-	1544	222	C ₁₅ H ₂₆ O
44	α -Calacoreno	0,18	-	1547	200	C ₁₅ H ₂₀
45	(E)-nerolidol	0,61	0,09	1566	222	C ₁₅ H ₂₆ O

46	Ácido Dodecanoico	-	0,46	1568	200	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
47	Espatulenol	0,90	0,33	1582	220	C ₁₅ H ₂₄ O
48	Óxido de cariofileno	0,44	-	1587	220	C ₁₅ H ₂₄ O
49	1-hexadeceno	-	0,30	1592	224	C ₁₆ H ₃₂
50	Isoespatulenol	0,18	-	1596	220	C ₁₅ H ₂₄ O
51	Ledol	0,23	0,11	1608	222	C ₁₅ H ₂₆ O
52	Epóxido Humuleno II	0,07	-	1609	220	C ₁₅ H ₂₄ O
53	1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexa-hidro-2H-naftalen-4-ol*	3,37	-	1634	220	C ₁₅ H ₂₄ O
54	Gossomorol	0,42	-	1642	218	C ₁₅ H ₂₂ O
55	epi-α-Muurolol	0,59	-	1647	222	C ₁₅ H ₂₆ O
56	α-cadinol	1,11	-	1652	222	C ₁₅ H ₂₆ O
57	Óxido de α-bisabolol B	-	0,43	1659	238	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
58	cadin-4-en-10-ol	-	-	1660	220	C ₁₅ H ₂₆ O
59	α-bisabolol*	4,73	2,17	1668	222	C ₁₅ H ₂₆ O
60	epi-β-bisabolol	0,15	-	1674	222	C ₁₅ H ₂₆ O
61	Germacra-4(15),5,10,(14-)trien-1-α-ol	-	2,06	1692	220	C ₁₅ H ₂₄ O
62	Heptadecanol	-	0,11	1694	256	C ₁₇ H ₃₆ O
63	Oplopanono	0,03	-	1744	238	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
64	Isocalamendiol	1,25	-	1750	238	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
65	1-Octadeceno	-	0,21	1793	252	C ₁₅ H ₃₆
66	Tetradecanoato de etilo	-	0,14	1795	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
67	Acetato de (z)-epi-β-santalol	1,51	-	1797	262	C ₁₇ H ₂₆ O ₂
68	Neofitadieno	-	0,03	1810	278	C ₂₀ H ₃₈
69	Fitone	-	0,77	1840	268	C ₁₈ H ₃₆ O
70	Hexadecanol	-	0,23	1865	242	C ₁₆ H ₃₄ O
71	Salicilato de benzila	-	0,09	1875	228	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
72	Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil	-	0,29		296	C ₂₀ H ₄₀ O
73	Hexadecanoato de metila	1,03	-	1928	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
74	Ácido hexadecanóico	1,36	4,04	1967	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
75	Hexadecanoato de etilo	0,22	2,55	1996	284	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
76	Heptadecanol-1	0,28	-	2086	256	C ₁₇ H ₃₆ O
77	Heptadecanoato de etila	-	0,15	2095	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
78	Linoleato de metila	1,51	-	2096	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
79	Linolenato de metila	1,57	-	2103	292	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
80	Fitol	-	3,00	2116	296	C ₂₀ H ₄₀ O
81	Octadecanoato de metila	0,53	-	2129	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
82	Ácido linoleico	1,66	2,01	2140	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
83	Z,Z-8,10-Hexadecadien-1-ol	-	0,46	2155	238	C ₁₆ H ₃₀ O
84	Linoleato de etila	-	1,87	2168	308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
85	Octadecanoato de etila	-	0,87	2196	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
86	2-Monopalmitina	-	2,45	2515	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
87	Ácido Hardwikiico*	9,79	-	2523	316	C ₂₀ H ₂₈ O ₃
88	17-Pentatriacontene	-	0,36	2902	490	C ₃₅ H ₇₀
89	3-oxo-12-epi-barbascoato de metila	0,64	-	2979	374	C ₂₁ H ₆ O ₆
90	12-epi-barbascoato de metila*	16,53	-	3008	358	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
91	3-hidróxi-12-epi-barbascoato de metila*	1,55	-	3128	376	C ₂₁ H ₂₈ O ₆
92	α-Tocopherol	0,42	2,99	3145	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
93	Campesterol	0,83	4,34	3241	400	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
94	Stigmasterol*	1,59	5,18	3275	412	C ₂₈ H ₄₈ O
95	β-Sitosterol*	5,08	23,00	3336	414	C ₂₉ H ₅₀ O
TOTAL		66,71	67,02			

^aCompostos listados por ordem de eluição em coluna DB-5MS; ^bidentificação: índice de retenção (IR), cromatográfica gasosa-espectrometria de massas (CG-EM); *identificação por IR, GC-EM e RMN (Ressonância Magnética Nuclear);

^cÍndices de retenção determinados em coluna apolar DB-5MS com temperatura programada (80°-320 °C; 4°C/min);

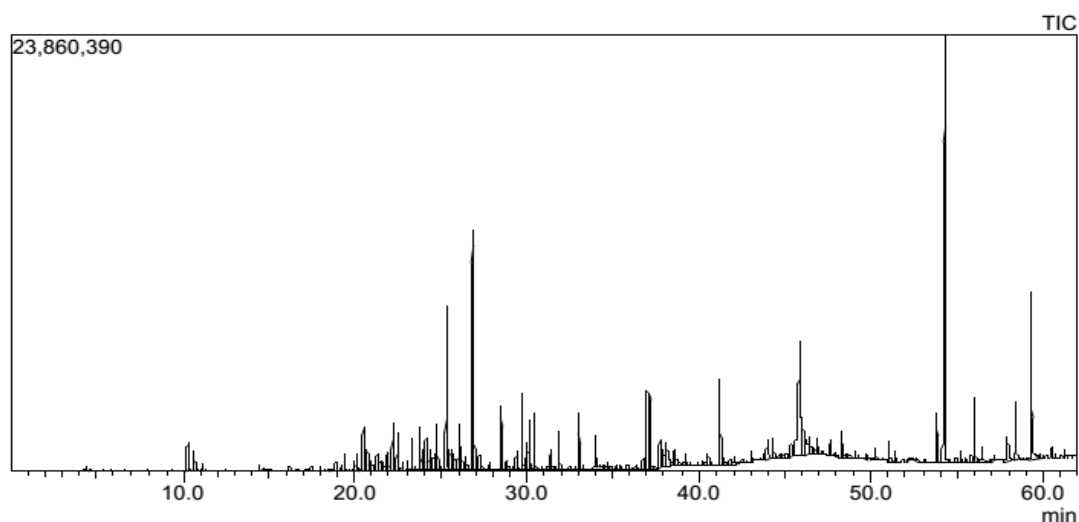


Figura 46. Cromatograma CG-EM (TIC) da fase hexânica do extrato metanólico da casca de *C. urucurana* (FHC)

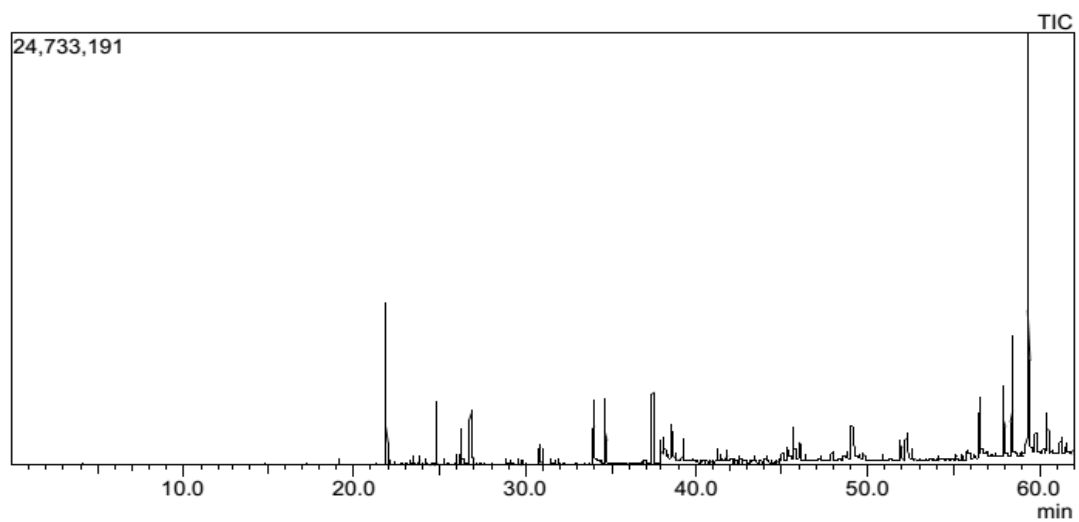


Figura 47. Cromatograma CG-EM (TIC) da fase hexânica do látex de *C. urucurana* (FHL)

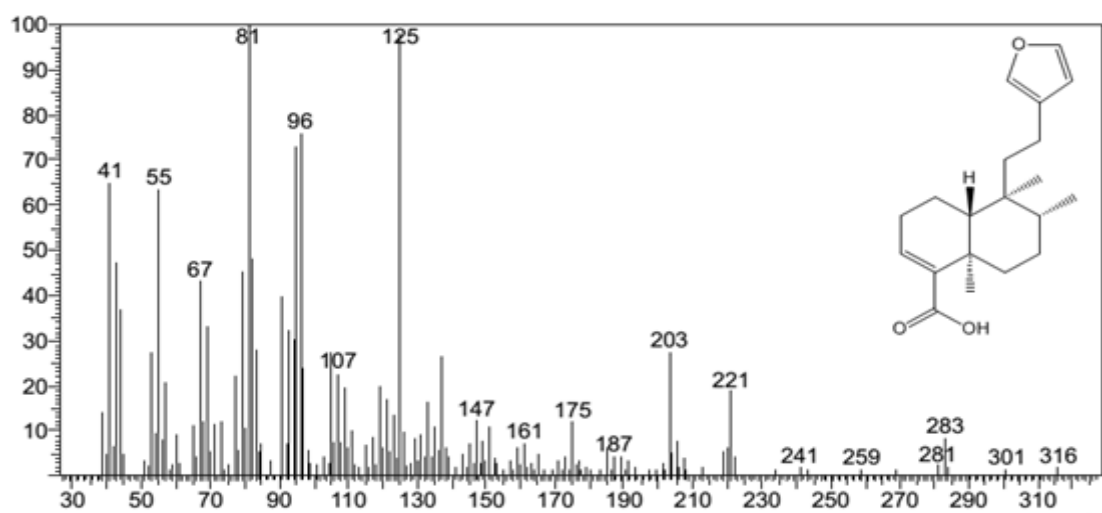


Figura 48. Espectro de massas GC-EM do ácido hardiwiicko.

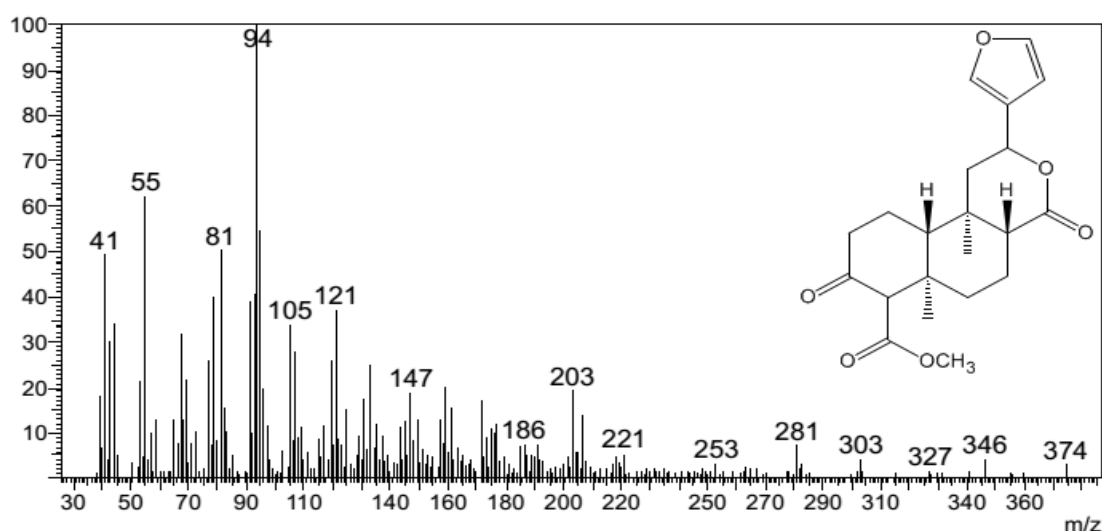


Figura 49. Espectro de massa GC-EM do 3-oxo-12-*epi*-barbascoato de metila.

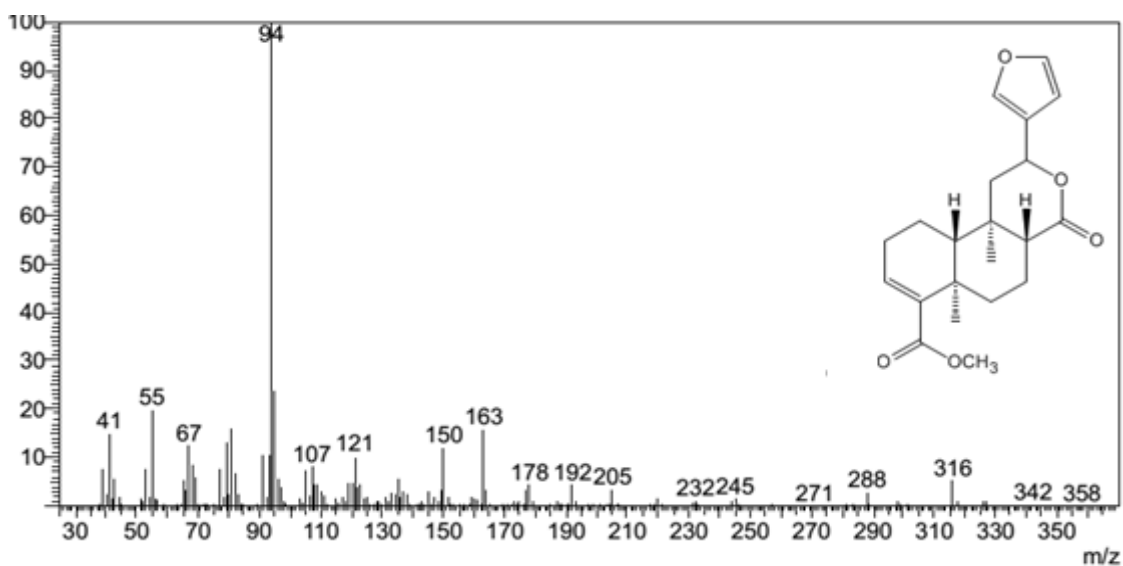


Figura 50. Espectro de massas CG-EM do 12-*epi*-barbascoato de metila.

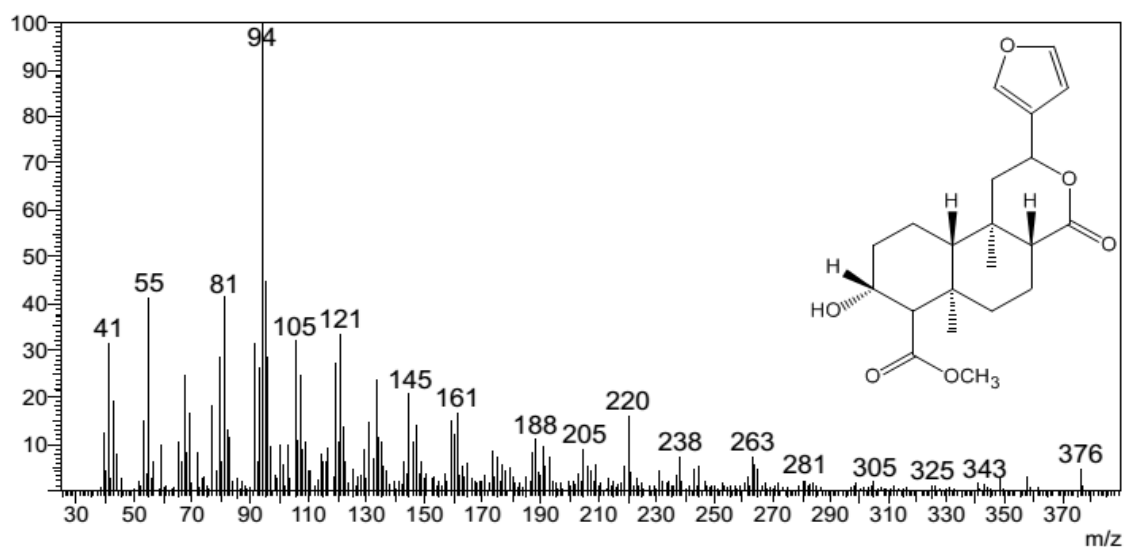


Figura 51. Espectro de massas CG-EM do 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila.

5.6. Genes envolvidos na biossíntese de ciclopeptídeos

A biossíntese de metabólitos envolve uma integração entre atividades enzimáticas, fusão de genes e formação de proteínas complexas. A estrutura das enzimas envolvidas é caracterizada por arranjo modular chamado peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS, do inglês “*Non-Ribosomal Peptide Synthetase*”). As NRPSs funcionam como uma linha de montagem industrial, onde os aminoácidos que constituem a estrutura dos peptídeos são incorporados sequencialmente, por meio de reações enzimáticas repetitivas.

A espécie *Croton urucurana* possui perfil metabólito com evidente acúmulo e produção de ciclopeptídeos. Tal característica torna essa espécie um modelo para estudo da biossíntese de ciclopeptídeos. A busca por informações das relações entre os genes envolvidos na biossíntese de ciclopeptídeos de *C. urucurana* foram selecionados para o presente trabalho os genes: aciltransferases e acil-CoA sintetase.

A presença dos genes envolvidos na biossíntese foi verificada por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores degenerados desenhados baseados em sequências de peptídeos descritas na literatura para as espécies *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Populus euphratica* e *Ricinus communis* (item 4.8., p. 44).

5.6.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico, obtido das folhas de *C. urucurana*, foi realizada com sucesso pelo protocolo utilizado (item 4.8., p. 44). A concentração e pureza do DNA foram determinadas e em seguida foi diluído para uma concentração final de 20 ng/μL.

5.6.2. Amplificação dos genes de NRPS

As reações de amplificação se iniciaram testando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores degenerados para o domínio TE, pois a sequência desse domínio possui regiões bem conservadas, o que indica uma taxa de sucesso maior na amplificação por PCR, quando comparados com os iniciadores desenhados para os outros módulos (item 4.8.4., p. 45). Os iniciadores foram desenhados com base em sequências de nucleotídeos de *Jatropha curcas* e *Populus trichocarpa* baixadas do banco de dados.

A temperatura de anelamento foi de 53,8 °C e foi observado por eletroforese uma banda de ampliação com fragmento com tamanho esperado de 700 pares de base (Figura 54).

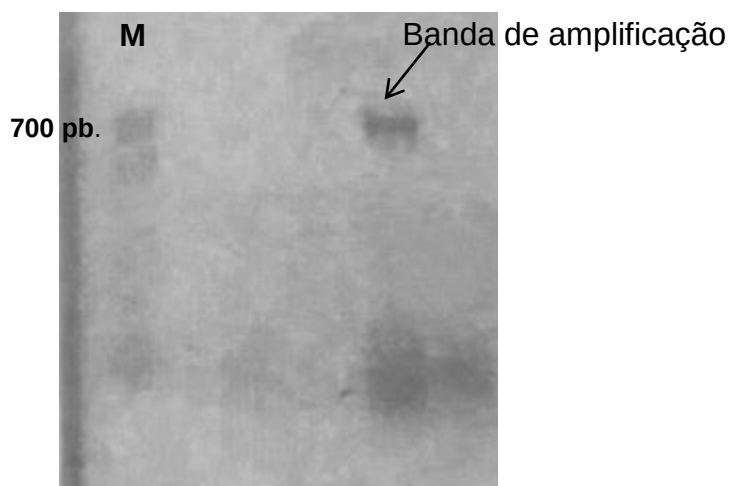


Figura 52. Gel de agarose representativo do produto de amplificação por PCR de fragmento do Domínio TE de NRPS. M- marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen);

Os fragmentos rDNA amplificados para o domínio TE purificados com precipitação em acetato de amônio foram enviados para sequenciados, mas os dados obtidos ainda são preliminares, não sendo possível formar a sequência consenso para os 700 pb.

Os conjuntos de oligonucleotídeos degenerados dos outros domínios foram testados e inicialmente, com as metodologias utilizadas, não se obteve sucesso nas reações de amplificação. Porém, outras metodologias, não previstas nesse trabalho, podem ser testadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores degenerados desenhados.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De modo geral, pelo perfil químico realizado por CLAE-DAD-IES-EM/EM de EMCu, LaCu e suas fases pode-se observar que o extrato da casca é constituído de compostos como ciclopeptídeos, diterpenos, flavan-3-ol e dímeros de (epi)catequina/(epi)galocatequina, que são chamados de procianidinas e proantocianidinas. Já o látex apresenta maior número de monômeros e dímeros de flavan-3-ol e ciclopeptídeos, mas não apresentam diterpenos.

Foram isolados e identificados dois compostos, um da casca: o diterpeno 3-hidróxi-12-*epi*-barbascoato de metila (**22**); e do látex: o ciclopeptídeo [1-9-NaC]-Crouorb A2 (**23**). As substâncias **22** e **23** foram relatos pela primeira vez neste trabalho e são inéditos na literatura.

Nas fases hexânica do extrato metanólico da casca (FHC) e do látex (FHL) de *C. urucurana* observa-se que os principais componentes de FHC são os diterpenos de esqueleto clerodano; já FHL é constituída, basicamente, de esteroides e ácidos graxos.

O trabalho de determinação dos genes responsáveis pela síntese dos ciclopeptídeos foi iniciado. Nesse sentido, até o momento, apenas os oligonucleotídeos iniciadores degenerados desenhados para o Domínio de Tioesterase (TE) do complexo enzimático Não Ribossomal Peptídeo Sintetase (NRPS) apresentou um fragmento de amplificação. Porém, os dados obtidos do sequenciamento não foram suficientes para codificar uma sequência completa. Apesar de não se ter concluído este trabalho, as etapas realizadas apontaram um caminho a ser seguido, no sentido de padronizar outras metodologias para a eficiência na amplificação dos iniciadores desenhados a fim de se obter as informações de interesse a partir do DNA genômico de *Croton urucurana*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Adams R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Allured Publishing Corp.*, Carol Stream, USA, 801p.
- Alves, E. O.; Mota, J.H.; Soares, T.S.; Vieira, M.C., 2008. Crescimento e distribuição espacial de *Croton urucurana* Baill. em Dourados-MS. *Rev. Caatinga*, 21(1), 83-88.
- Antoniuzzi, C. A.; Botini, N.; Ascari, K.; Chaves, C.F.; Añez, R.B., 2016. Estudo Etnobotânico de *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae) na comunidade Salobra Grande, Porto Estrela-MT. *Biodivers.*15(2), 40-52.
- Antonisamy, P.; Dhanasekaran, M.; Ignacimuthu, S.; Duraipandiyan, V.; Balthazar, J. D.; Agastian, P.; Kim, J. H., 2014. Gastroprotective effect of epoxy clerodane diterpene isolated from *Tinospora cordifolia* Miers (Guduchi) on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Phytomedicine*. 21(7), 966-969.
- Arnison, P.G.; Bibb, M.J.; Bierbaum, G.; Bowers, A.A.; Bugni, T.S.; Bulaj, G. et al., 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108–160.
- Ayres, M. C. C.; Chaves, M.H.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Júnior, G.M.V., 2009. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Quim. Nova*, 32(6), 1509-1512.
- Barreiro, E. J. e Bolzani, V. S. 2009. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quím. Nova* 32(3), 679-688.
- Beserra, A. M.; Calegari, P.I.; Souza Mdo, C.; Dos Santos, R.A.; Lima, J.C.; Silva, R.M.; Balogun, S.O.; Martins, D.T., 2011. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6957-6965.
- Biondi, D.; Leal, L.; Schaffer, M., 2008. Aspectos importantes das plantas ornamentais em escolas públicas estaduais da cidade de Curitiba-PR. *Rev. Bras. Cien. Agrária*, 3(3), 267-275.
- Bhushan, R. e Brückner, H., 2004. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids*. 3(4), 231-247.
- Brito, A. R.; Rodriguez, J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M.; Nunes, D.S., 1998. Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Med.* 64, 126-129.

Cai, Y.; Zhang, J.; Chen, N.G.; Shi, Z.; Qui, J.; He, C.; Chen, M., 2016. Recent advances in Anticancer Activities and Drug Delivery Systems of Tannins. *Med. Res. Rev.* 0(00), 1-37.

Callemien, D. e Collin, S., 2008. Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. *J. American Soc. Brewing Chem.* 66(2), 109-115.

Cândido-Bacani, P.M.; Figueiredo, P.O.; Matos, M.F.; Garcez, F.R.; Garcez, W.S., 2015. Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. *J. Nat. Prod.* 78, 2754-2760.

Cantú, M.D.; Carrilho, E.; Wulff, N.A.; Palma, M.S., 2008. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia pratico. *Quim. Nova*, 31(3), 669-675.

Caruzo, M.B.R.; van Ee, B.W.; Cordeiro, I.; Berry, P.E.; Riina, R., 2011. Molecular phylogenetics and character evolution of the “sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section Cleodora (Euphorbiaceae). *Molec. Phylogenet. Evol.* 60, 193-206.

Carvalho, J. C.; Silva, M.F.; Maciel, M.A.; Pinto, A.C.; Nunes, D.S.; Lima, R.M., Bastos, J.K.; Sarti, S.J., 1996. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med.* 62, 402-404.

Cheng, X.L.; Wan, J.Y.; Li, P.; Qi, L.W., 2011. Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus*. *J. Chromatogr. A* 1218, 5774-5786.

Chunmei, L. e Myeong-Hyeon, W. 2014. Potential Biological Activities of Magnoflorine: A Compound from *Aristolochia debilis* Sieb. et Zuc Korean J. *Plant Res.* 27, 223-228.

Cordeiro, K.W.; Pinto, L.A.; Formagio, A.S.N.; Andrade, S.F.; Kassuya, C.A.L.; Freitas, K.C., 2012. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *J. Ethnopharmacol.* 143, 331-337.

Cordeiro, K. W.; Felipe, J.L.; Malange, K.F.; Prado, P.R.; Figueiredo, P.O.; Garcez, F.R.; Freitas, K.C.; Garcez, W.S.; Toffoli-Kadri, M.C., 2016. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *J. Ethnopharmacol.* 183, 128-135.

Correa, M. P. 1969. Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. 6º ed. Ed. Imprensa Nacional Rio de Janeiro. 859 p.

Costa, J. G. M; Rodrigues F.F.G.; Angélico E.C.; Pereira, C.K.B.; Souza E.O.; Caldas, G.F.R. et al., 2008. Composição química e avaliação da atividade

antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Rev. Brasil. Farmacog.* 18, 583-586.

Conegero, L. S.; Ide, R.M.; Nazari, A.S.; Sarragiotto, M.H.; Filho, B.P.D.; Nakamura, C.V.; Carvalho, J.E.; Flogio, M.A., 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Quím. Nova* 26, 825-827.

Demain, A. L. 2014. Importance of microbial natural products and the need revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 185-201.

Dewick, P. M. 2009. Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach. 3^a. ed., Ed. John Wiley and Sons, Ltd.: University of Nottingham, 539 p.

Doyle J. J. e Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.

Du, K.; De Mieri, M.; Neuburger, M.; Zietsman, P. C.; Marston, A.; van Vuuren, S. F.; Ferreira, D.; Hamburger, M.; van der Westhuizen, J. H., 2015. Labdane and Clerodane Diterpenoids from *Colophospermum mopane*. *J. Nat. Prod.* 78(10), 2494-504.

Esmeraldino, L.E.; Souza, A.M., Sampaio, S.V., 2005. 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* 12, 570-576.

Farag, R.S.; Badei, A.Z.M.A.; Hewedi, F.M.; El-Baroty, G.S.A., 1989. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc.* 66(6), 792-99.

Fan, J.; Ding, X.; Gu, W., 2007. Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chem.* 102, 168-177.

Filho, L. O. C. 2011. Interação trófica, composição química e ultraestrutura de ceras epicuticulares em espécies Euphorbiaceae. *Universidade Federal de Pernambuco*.

Filho, V.C. e Yunes, R.A, 1998. Estratégias para a obtenção de compostos para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, 21(1), 99-105.

Foglio, M.A.; Queiroga, C.L.; Sousa, I.M.O.; Rodriguez, R.A.F., 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *MultiCiência.*, 7, 1-8.

Ferreira M. E. e Grattapaglia D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2º Ed. *Embrapa Cenargen*, Brasília, DF.

Friedrich, W.; Eberhardt, A.; Galensa, R., 2000. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 56-64.

Gabbanini, S.; Lucchi, E.; Guidugli, F.; Matera, R.; Valgimigli, L., 2010. Anomeric discrimination and rapid analysis of underivatized lactose, maltose, and sucrose in vegetable matrices by U-HPLC–ESI-MS/MS using porous graphitic carbon. *J. Mass Spectrom.* 45, 1012-1018.

Gupta, D.; Bleakley, B.; Gupta, R.K., 2008. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *J. Ethnopharmacol.* 115, 361-380.

Gurgel, L. A. Silva, R.M.; Santos, F.A.; Martins, D.T.; Mattos, P.O.; Rao, V.S., 2001. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. *Phytother. Res.* 15, 319-322.

Gurgel, L. A.; Sidrim, J.J.; Martins, D.T.; Cechinel Filho, V.; Rao, V.S., 2005. In vitro antifungal activity o dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *J. Ethnopharmacol.* 97, .409-4012.

Jaiswal, R.; Jayasinghe, L.; Kuhnert, N., 2012. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. *J. Mass Spectrom.* 47, 502-515.

Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Teven, P.F., 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 464p.

Kapoor, L. D. 1989. Handbook of Ayurvedic medicinal plants, In L. D. Kapoor, (ed.). *Med.plants. CRC Press.* 424p.

Kim, S.; Requejo, K.I.; Nakamatsu, J.; Gonzales, K.N.; Torres, F.G.; Cavaco-Paulo, A., 2016. Modulating antioxidant activity and the controlled release capability of laccase mediated catechin grafting of chitosan. *Process Biochem.* 0(00), 1-12.

Le, P.M.; McCooeye, M.; Windust, A., 2014. Application of UPLC-QTOF-MS in MSE mode for the rapid and precise identification of alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Analyt. Bioanal. Chem.* 406, 1739-1749.

Levandi, T.; Püssa, T.; Vaher, M.; Ingver, A.; Koppel, R.; Kaljurand, M., 2014. Principal component analysis of HPLC–MS/MS patterns of wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Food Chem.* 63, 86-92.

Lewinsonhn, T. M. e Prado, P.I. 2002. Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento, 1ª. ed., Ed. Pinsky: São Paulo, 176 p.

Li, H.J. e Deinzer, M.L., 2007. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analyt. Chem.* 79, 1739-1748.

Lima, P.A.F.; Gatto, A.; Albuquerque, L.B.; Malaquias, J.; Aquino, F.G., 2016. Crescimento de mudas de espécies nativas na restauração ecológica de matas ripárias. *Neotrop. Biol. Conserv.* 11(2), 72-79.

Lima, G.S.; Castro-Pinto, D.B.; Machado, G.C.; Maciel, M.A.; Echevarria, A., 2015. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Phytomedicine*. 22(12), 1133-1137.

Lima, L.R. e Pirani, J.R., 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.)Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotropica*. 8, 177-231.

Luchi, A.E. 2004. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. *Rev. Bras. Bot.* 27(2), 271-280.

Maciel, M.A.M.; Cortez, J.K.P.C., Gomes, F.E.S., 2006. O gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. *Rev. Fitos*. 2(3), 54-73.

Malhotra, S., Shukla, R.; Kulshrestha, S.; Siddiqui, A., 2016. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Citrus *Medica* Var *Acidica* Essential Oil. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 6(2), 574-80.

Mbambo, B.; Odhav; Mohanhall, V., 2012. Antifungal activity of Stigmasterol, Sitosterol and Ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *J. Med. Pl. Res.* 6(38), 5135-5151.

Mehmood, R. e Malik, A., 2010. Isolation and Characteriation of Crotosparsamide, a New Cyclic Nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. *Nat. Prod. Commum*, 5, 1885-1888.

Menezes, H e Jared, C. 2002. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol.* 132, 1-7.

Moraes-Souza, R.Q.; Soares, T.S.; Carmo, N.O.L.; Damasceno, D.C.; Campos, K.E.; Volpato, G.T., 2017. Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* 199, 328-333.

Morais, S.M.; Junior, F.E.A.C.; Silva, A.R.A.; Neto, J.S.M.; Rondina, D.; Cardoso, J.H.L., 2006. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Quím. Nova* 29, 907-910.

Moreira, C.P.S.; Zani, C.L.; Alves, T.M.A., 2010. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* boiss. (euphorbiaceae) sobre biomphalaria glabrata e isolamento do constituinte majoritário. *Rev. Eletrôn. Farm.* 7, 16-27.

Moreno, P.R.; Lima, M.E.L.; Caruzo, M.B.R.; Torres, D.S.C.; Cordeiro, I.; Young, M.C.M., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the

essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) leaves. *J. Essent. Oil Res.* 21, 190-192.

Muccilli, V.; Cardullo, N.; Spatafora, C.; Cunsolo, V.; Tingali, C., 2017. α -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and ^1H NMR. *Food Chem.* 215, 50-60.

Mwine, J.T. e Damme, P.V., 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.* 5(5), 652-662.

Newman, D.J. e Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Source of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629-661.

NIST/EPA/NIH. Mass Spectral Library. 2005. Nist Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d). *The NIST Mass Spectrometry Data Center*, Gaithersburg, USA;

Oliveira, R.B.; Gimenez, V.M.M.; Godoy, S.A.P., 2007. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. *Rev. Brasil. Bioc.* 5, 69-71.

Oliveira, I.S.; Lima, J.C.S.; Silva, R.M.; Martins, D.T.O., 2008. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Rev. Bras. Farmacog.* 18, 587-593.

Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioen.* 19,1-15.

O'Brien, J. e Wright, G.D., 2011. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 552-558.

Paizs, B.; Suhai, S., 2005. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* 24, 508-548.

Palatnick W. e Tenenbein M., 2000. Hepatotoxicity from Castor Bean Ingestion in a Child. *Clin. Toxicol.* 38, 67-69.

Peres, M.T.L.P.; Monache, F.D.; Cruz, A.B.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A., 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 56, 223-226.

Peres, M.T.L.P.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A.; Monache, F.D., 1998a. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. *Phytochem.* 49, 171-174.

Peres, M.T.L.P.; Monache, F.D.; Pizzolatti M.G.; Santos, A.R.S.; Beirith, A.; Calixto, J.B.; Yunes, R.A., 1998b. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytother. Res.* 12(3), 209-211.

Picchi, D.G.; Altei, W.F.; Saito, M.S.; Bolzani, V.S.; Cilli, E.M., 2009. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Quim. Nova*. 32(5), 1262-1277.

Pilon, A.C., 2011. Estudo de *Jatropha gossypifolia* e *J. multifida* (Euphorbiaceae) aplicando métodos analíticos in silico e de desreplicação, visando a detecção e elucidação in situ dos constituintes micromoleculares com atividade acetilcolinesterásicas e antioxidante. *Univer. Estad. Paulista*. 104p.

Pinto, A.A.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A., 2002. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* 25(1), 45-61.

Pizzolatti, M.G.; Bortoluzzi, A.J.; Brighente, I.M.C.; Zuchinalli, A.; Carvalho, F.K.; Candido, A.C.S.; Peres, M.T.L.P., 2013. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* Baillon. *J. Braz. Chem. Soc.* 0, 1-6.

Pires, M.Y.; Souza, L.A.; Terada, T., 2004. Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Biolog. Scie.* 26, 209-215.

Pupo, M.T.; Gallo, M.B.C.; Vieira, P.C., 2007. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Quím. Nova*, 30(6), 1446-1455.

Quintyne-Walcott, S.; Maxwell, A.R.; Reynolds, W.F., 2007. Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *J. Nat. Prod.* 70(8), 1374-1376.

Randau, K.P.; Florêncio, D.C.; Ferreira, C.P.; Xavier, H.S., 2004. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacog.* 14, p.89-96.

Rates, S.M., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39, 603-613.

Rodriguez, J.A. Hiruma-Lima, C.A.; Souza Brito, A.R., 2004. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Hum. Exp. Toxicol.* 23, 455-461.

Rösch, D.; Krumbein, A.; Kroh, L.W., 2004. Antioxidant gallocatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *Europ. Food Res. Technol.* 219, 605-613.

Sabandar, C.W.; Ahmat, N.; Jaafar, F.M.; Sahidin, I., 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*. 85, 7-29.

Salatino, A.; Salatino, M.L.F.; Negri, G., 2007. Tradicional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 18(1), 11-33.

Sambrook, J. e Green, M. R., 2014. Molecular Cloning: A laboratory manual 4^a. ed., Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring harbor: NY, 2028 p.

Saminathan, I.S.; Wang, X.S.; Guo, Y.; Krakovsha, O.; Voisin, S.; Hopkinson, A.C.; Siu, K.W., 2010. The Extent and Effects of Peptide Sequence Scrambling Via formation of Macrocyclic blonds in Model Proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 2085–2094

Sátiro, L.N. e Roque, N. 2008. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta bot. bras.* 22(1), 99-118.

Scalon, S.P.Q.; Kodama, F.M.; Scalon Filho, H.; Mussury, R.M., 2008. Crescimento inicial de mudas de sangra-d'água (*Croton urucurana* Baill.) sob sombreamento e aplicação de giberelina. *Rev. Bras. Pl. Med.* 10, 61-66.

Schultes R.E. 1987. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. *Bot. J. Linn. Soc.* 94, 79-95.

Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M.A., 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20(3), 275-287.

Seigler, D.S. 1994. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. Mol. Bot. Gard.* 81, 380-401.

Sen, A.; Dhavan, P.; Shukla, K.K.; Singh, S.; Tejovathi, G., 2012. Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia*. *Sci. Secure. J. Biotechnol.* 1(4), 9-13.

Serrano, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, A.M.; Saura-Calixto, F., 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr.Food Res.* 53, 310-329.

Shim, Y.Y.; Young, L.W.; Arnison, P.G.; Gilding, E.; Reaney, M.J.T., 2015. Proposed Systematic Nomenclature for Orbitides. *J. Nat. Prod.* 78, 645–652.

Silva, R.M.; Oliveira, F.A.; Cunha, K.M.; Maia, J.L.; Maciel, M.A.; Pinto, A.C.; Nascimento, N.R.; Santos, F.A.; Rao, V.S., 2005. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vascul. Pharmacol.* 43, 11-18.

Silva, J.S.; Sales, M. F.; Carneiro-Torres, D.S., 2009. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia*, 60, 879-901.

Simionatto, E.; Bonani, V.F.L.; Morel, A.F.; Poppi, N.R.; Raposo, J.L.J.; Stuker, C. Z., Peruzzo, G.M.; Peres, M.T.L.P.; Hess, S.C., 2007. Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(5), 879-885.

Sim, H.J.; Kim, J.H.; Lee, K.R.; Hong, J., 2013. Simultaneous determination of structurally diverse compounds in different *Fangchi* species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. *Molecules* 18, 5235-5250.

Sorreano, M.C.M.; Malavolta, E.; Silva, D.H.; Cabral, C.P.; Rodriguez, R.R., 2011. Deficiência de macronutrientes de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). *Cerne*, 17(3), 347-352.

Tan, N.H. e Zhou, J., 2006. Plant Cyclopeptides. *Chem. Rev.* 106, 840-895.

Tanaka, J.C.A.; Silva, C.C.; Filho, B.P.D.; Nakamura, C.V.; Carvalho, J.E.; Foglio, M.A., 2005. Constituintes Químicos de *Luehea divaricata* MART. (Tiliaceae). *Quim. Nova*, 28(5), 834-837.

Tokuoka, T. 2007. Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae sensu stricto based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution. *J. Plant. Res.* 120, 511-522.

Tamokou, J.D.; Kuate, J.R.; Tene, M.; Tane, P., 2009. Antimicrobial clerodane diterpenoids from *Microglossa angolensis* Oliv. et Hiern. *Indian J. Pharmacol.* 41(2), 60-63.

Van Den Dool, H. e Kratz, P. D., J. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, 11, 463-471.

Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M., 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova* 28, 519-528.

Vunda, S.L.L. 2011. Estudo químico e biológico de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul. *Universid Fed. do Rio Grande do Sul*, 75p.

Wang, H.; Sun, H.; Zhang, A.; Li, Y.; Wang, L.; Shi, H. et al., 2013. Rapid identification and comparative analysis of the chemical constituents and metabolites of *Phellodendri amurensis* cortex and *Zhibai dihuang* pill by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole TOF-MS. *J. Sep. Sci.* 36, 3874-3882.

Weinges, K.; Bahr, W.; Ebert, W.; Goritz, K.; Marx, H.D., 1969. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschr. Chem. Org. Naturst Middlesex*, 27, 589p.

Webster, G.L., 1994. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 81, 3-32.

Webster, G.L., 2014. Euphorbiaceae. *In: The families and genera of vascular plants.* Springer.

Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* 64(1), 3-19.

Zhan, Y.; Sun, M.; Chen, Y.; Zhang, Y., 2011. Determination of Taspine Using HPLC–MS, and Its Effect on EGFR in A431 and HEK293/EGFR Cells. *Chromatographia* 74, 383-389.

Zhang, Y.; Shi, Q.; Shi, P.; Zhang, W.; Cheng, Y., 2006. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2328-2342.

Zhou, J. e Tan, N.H., 2000. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chinese Sci. Bull.* 45(20), 1825-1831.