

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

**MARCELO TOMCZAK
SIMONE REICHERT**

**ESTUDOS FITOQUÍMICOS ADICIONAIS COM AS FOLHAS E
CASCAS DE *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE)**

Itajaí (SC)

2013

MARCELO TOMCZAK
SIMONE REICHERT

**ESTUDOS FITOQUÍMICOS ADICIONAIS COM AS FOLHAS E
CASCAS DE *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE)**

Monografia apresentada como requisito para
obtenção do título de farmacêutico pela
Universidade do Vale do Itajaí, Centro de
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Meyre da
Silva Bittencourt.

Itajaí (SC)
Abril de 2013

MARCELO TOMCZAK E SIMONE REICHERT

**“ESTUDOS FITOQUÍMICOS ADICIONAIS COM AS FOLHAS E
CASCAS DE *Aleurites moluccana* L. willd. (euphorbiaceae)”**

Esta Monografia foi julgada adequada para obtenção do título de Farmacêutico e aprovada pelo Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Saúde.

Itajaí (SC), 26 de abril de 2013.



Prof^ª. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt

UNIVALI - CCS

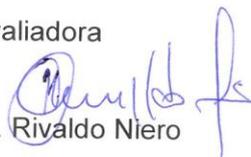
Orientadora



Prof^ª. Dra. Angela Malheiros

UNIVALI - CCS

Avaliadora



Prof^º. Dr. Rivaldo Niero

UNIVALI - CCS

Avaliador

Dedicamos este trabalho aos nossos pais e a Luís Fortunato Luciani (*in memoriam*) pelos valores ensinados, honestidade, fé, companheirismo e persistência, não desistir dos nossos sonhos, acreditar e confiar em Deus acima de tudo. A vocês o nosso muito Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, por todas as bênçãos recebidas e por iluminar nossa caminhada.

Aos nossos pais (Maurinho Tomczak e Mirtes Maiochi Tomczak), (Adílzio José Reichert e Silene Luciane Reichert), a nossos irmãos Matheus Tomczak e Edilson Ramon Reichert, e a toda nossa família, pelo carinho e apoio, e por nos ajudarem a chegar nesta etapa de nossas vidas.

Agradecimentos especiais se devem a nossa professora e orientadora Christiane Meyre da Silva Bittencourt, pela paciência, pela amizade, e por não medir esforços em nos ajudar na pesquisa, elaboração e conclusão desta monografia.

Aos professores Ângela Malheiros e Rivaldo Niero, pelos conselhos, orientações e pela ajuda desde quando começamos o estágio no laboratório até a conclusão do nosso trabalho de iniciação científica.

A professora Ruth Meri Lucinda da Silva, pela dedicação empregada para nos ajudar na parte final da monografia.

Agradecimentos especiais para Zé barranco, dupla na música e na amizade, por todo sucesso alcançado. Zé Barranco e Precipício Forever.

Aos eternos amigos Alexandra, Mariana, Ingrid, Andressa e Josiane por sempre estarem ao nosso lado, só nós sabemos o que passamos, nossa amizade foi validada, e conseguiu patente eterna.

Aos nossos amigos e colegas de turma, pelo incentivo, e pela amizade.

*“Deus não escolhe os preparados, prepara os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo, só depende da sua vontade e perseverança”.*

Albert Einstein

ESTUDOS FITOQUÍMICOS ADICIONAIS COM AS FOLHAS E CASCAS DE *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE)

Marcelo TOMCZAK e Simone REICHERT

Orientadora: Christiane Meyre da Silva Bittencourt.

Defesa em: Abril de 2013.

Resumo:

A espécie vegetal *Aleurites moluccana*, alvo de extensos estudos conduzidos pelos pesquisadores do NIQFAR/UNIVALI, tem exibido promissores resultados biológicos com as folhas culminando no desenvolvimento de um novo fitoterápico analgésico e anti-inflamatório em parceria com o Laboratório Farmacêutico Eurofarma. Além do amplo uso das folhas, as cascas também são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de tumores, diarreia sangrenta e disenteria, porém faltam estudos químicos e biológicos que assegurem seu uso medicinal. O objetivo do presente estudo foi avaliar a composição química das cascas e folhas de *A. moluccana* a partir de procedimentos cromatográficos. As cascas secas e trituradas foram submetidas à extração sequencial utilizando solventes de polaridade crescente como n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol durante 5 dias. Cada extrato foi separadamente submetido à concentração para obtenção do resíduo seco utilizando evaporador rotatório sob pressão reduzida. As folhas também secas foram submetidas à extração com o solvente metanol por 7 dias e posteriormente foi realizado fracionamento com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. Os extratos e frações de interesse foram submetidos à purificação utilizando cromatografia em coluna (CC) com monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo os compostos identificados através de HMBC, HMQC, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13 e Dept. O extrato de hexano obtido das cascas por apresentar a formação de um sólido branco durante o processo de concentração foi avaliado por CCD em comparação ao padrão autêntico e técnicas espectrais sendo caracterizado como o triterpeno ácido acetil aleuritólico. A partir do terceiro procedimento cromatográfico obteve-se um óleo o qual foi identificado como sendo o diterpeno Sonderianol e deste mesmo procedimento obteve-se também um óleo, que após análise espectral foi identificado como um derivado do Sonderianol. Das folhas foi realizada uma CC a partir da fração de diclorometano, obtido do extrato bruto metanólico, resultando num sólido branco na fase móvel hexano (H): acetato de etila (AcOET) (90:10) que após passar por análise espectral verificou-se que se tratava da mistura dos triterpenos α,β -amirina. Outro triterpeno foi isolado a partir de outra fração também de diclorometano, denominada α,β -amirinona. Esta substância foi isolada na fase móvel H:AcOET (95:5). Este estudo foi importante para comprovar o uso popular desta planta, sendo que as substâncias isoladas correspondem à parte dos efeitos biológicos observados quando utilizada na medicina popular.

Palavras chave: *Aleurites moluccana*. Cromatografia. Terpenos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do diterpeno espruceanol.....	30
Figura 2 - Estrutura molecular do triterpeno ácido aleuritólico.....	30
Figura 3 - Estrutura geral de uma cumarina.....	31
Figura 4 - Estrutura geral de um flavonoide.....	32
Figura 5 - Estrutura molecular da (+)-catequina.....	33
Figura 6 - Estrutura molecular da morfina.....	34
Figura 7 - Fotos das partes aéreas de <i>Aleurites moluccana</i> . A-Árvore <i>Aleurites moluccana</i> ; B- Cascas; C-Frutos; D- folhas e flores.....	37
Figura 8 - Avaliação do perfil cromatográfico das cascas de <i>A.moluccana</i> utilizando cromatoplaça de sílica gel 60 F254. 1-Fração de H; 2- Extrato de H; 3- Fração de DCM; 4-Extrato de DCM.....	51
Figura 9 - Estrutura molecular do ácido acetil aleuritólico.....	53
Figura 10 - Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMCP.....	54
Figura 11 - Espectro de RMN- ¹³ C (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMCP.....	54
Figura 12 - Espectro de RMN- ¹³ C/Dept (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMCP.....	55
Figura 13 - Fluxograma do procedimento de purificação com o extrato de hexano obtido das cascas de <i>A.moluccana</i>	58
Figura 14 - Estrutura molecular do Sonderianol.....	59
Figura 15 - Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 17-36.....	59
Figura 16 - Espectro de RMN- ¹³ C (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 17-36.....	60
Figura 17 - Espectro de RMN- ¹³ C/Dept (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 17-36.....	60
Figura 18 - Estrutura molecular do derivado do Sonderianol	62
Figura 19 - Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 07-16.....	63
Figura 20 - Espectro de RMN- ¹³ C (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 07-16.....	63
Figura 21 - Espectro de RMN- ¹³ C/Dept (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 07-16.....	64
Figura 22 - Espectro de HMBC (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMC 17-36.....	64
Figura 23 - Esquema de purificação da coluna cromatográfica 1.....	66
Figura 24 - Estrutura molecular da mistura de triterpeno α,β-amirina respectivamente.	67
Figura 25 - Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF489.....	67
Figura 26 - Espectro de RMN- ¹³ C (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF489.....	68
Figura 27 - Espectro de RMN- ¹³ C/Dept (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF489.....	68
Figura 28 - Esquema de purificação da CC2 e CC3 das folhas.....	71
Figura 29 - Esquema de purificação fração enriquecida de DCM das folhas.....	72
Figura 30 - Estrutura molecular do triterpeno α,β-amirinona, respectivamente.....	72
Figura 31 - Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF79.....	73
Figura 32 - Espectro de RMN- ¹³ C (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF79.....	73
Figura 33 - Espectro de RMN- ¹³ C/Dept (75,5 MHz, CDCl ₃ /TMS) do AMEUF79.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa e rendimentos dos extratos e frações obtidos das cascas de <i>A. moluccana</i>	52
Tabela 2 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMCP e dados da literatura para o ácido acetil aleuritólico.....	56
Tabela 3 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMC 17-36 e dados da literatura para o sonderianol.....	61
Tabela 4 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMC 17-36 e dados da literatura.....	65
Tabela 5 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o AMEUF489 e dados da literatura para 3 β -OH amirina e 3 α -OH amirina.....	69
Tabela 6 - Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o AMEUF79 e dados da literatura para 3 oxo beta- amirinona e 3 oxo alfa- amirinona.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA – ácido acetil aleuritólico

AcOEt - Acetato de etila

AMC – *A. moluccana* cascas

AMCP – *A. moluccana* cascas precipitado

AMEUF – *A. moluccana* Euphorbiaceae folhas

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

COSY – Espectroscopia de Correlação Homonuclear

DCM – Diclorometano

H – Hexano

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

MeOH – Metanol

R_f – Fator de retenção

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	25
3.2 FITOTERÁPICO.....	26
3.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE METABOLISMO VEGETAL.....	28
3.3.1 TERPENOIDES.....	29
3.3.2 CUMARINAS	30
3.3.3 FLAVONOIDES	31
3.3.4 TANINOS	32
3.3.5 ALCALÓIDES	33
3.4 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE	34
3.5 GÊNERO <i>ALEURITES</i>	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAL.....	47
4.1.1 MATERIAL VEGETAL:.....	47
4.1.2 REAGENTES	47
4.1.3 EQUIPAMENTOS	48
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS	48
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS	49
4.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS CASCAS E FOLHAS DE <i>A. MOLUCCANA</i>	49
4.5 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>A. MOLUCCANA</i>	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PERFIL FITOQUÍMICO.....	51
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO AMCP	52
5.3 IDENTIFICAÇÃO DO AMC 07-16 E AMC 17-36.....	57

5.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA AMEUF 489	66
5.5 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA AMEUF79	71
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

As plantas superiores representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. A área de pesquisa em produtos naturais juntamente com a síntese vem se destacando no âmbito de desenvolvimento de fármacos representada pela descoberta de moléculas com grande diversidade química e propriedades físico-químicas e biológicas importantes, otimizando desta forma, o processo industrial farmacêutico através do fornecimento de protótipos ou mesmo de substâncias inéditas (BUTLER, 2008; MAIER, 2009).

A importância da natureza como fonte de novos quimiotipos e farmacoforos pode ser observado com o resultado das pesquisas realizadas nesta área onde aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados na clínica em todo mundo, originam-se de produtos naturais e derivados (GURIB-FAKIM, 2006). Dos medicamentos disponíveis para o tratamento de infecções e no combate ao câncer, 60% foram advindos de fonte natural conforme descrito no *Annual Reports of Medicinal Chemistry* demonstrando o potencial relevante do estudo fitoquímico e biológico das plantas medicinais (BRAZ FILHO, 2009).

A natureza tem sido pródiga na elaboração de moléculas, na maioria de grande complexidade estrutural e as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das suas virtudes terapêuticas. Com a diversidade química, surge a necessidade de se utilizar métodos de extração que possam funcionar como verdadeiros filtros de distintas classes de compostos relativa as suas aptidões e características (CRAGG; NEWMANN, 2012; KAITIN, 2010).

A diversidade brasileira em seus múltiplos aspectos e seu potencial de aproveitamento equilibrado representam um desafio para a comunidade científica nacional. Portanto, cabem as nossas Universidades, um enorme desafio científico, o de transformar um imenso patrimônio natural, em riqueza de compostos bioativos para a medicina, gerando matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater doenças como: câncer, doenças tropicais, infecções fúngicas e bacterianas, doenças neurológicas como o Mal de Alzheimer, pois a natureza de uma forma ou outra continua a influenciar a concepção de moléculas pequenas que

podem ser protótipos de novos fármacos. O intuito da pesquisa nesta área consiste especialmente na identificação dos princípios ativos das plantas medicinais que possam ser posteriormente avaliados biologicamente na tentativa de validar o uso medicinal das plantas superiores (CRAGG; NEWMANN, 2012; KAITIN, 2010).

O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais. As atividades da fitoquímica podem contribuir significativamente para este desenvolvimento, através da investigação da flora, da divulgação e geração de novos conhecimentos e da formação de recursos humanos qualificados (BRAZ FILHO, 2009).

Considerando a importância química e biológica da espécie vegetal *Aleurites moluccana*, que despertou o interesse da indústria Eurofarma por apresentar efeitos biológicos comprovados, surgindo uma parceria entre universidade e indústria farmacêutica para o desenvolvimento de um novo produto fitoterápico inovador que está prestes a ser lançado no mercado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar os metabólitos secundários ativos majoritários a partir de extrato e frações obtidas das folhas e cascas de *A. moluccana*.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar o processo de extração dos compostos de interesse através de extração direta ou partição líquido-líquido a partir das cascas de *A. moluccana*;
- Avaliar o perfil cromatográfico e rendimento dos distintos extratos e frações;
- Fracionar e isolar os compostos majoritários presentes nas cascas e folhas de *A. moluccana*;
- Identificar a estrutura química dos compostos por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13 e técnicas bidimensionais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância das plantas medicinais

Os produtos naturais, em especial as plantas, têm sido utilizados para o tratamento de doenças por milhares de anos e ainda hoje são usadas para tratar distúrbios que vão da tosse a infecção, e estão relacionadas com os saberes e práticas adquiridas ao longo de muito tempo. As plantas têm sido usadas com fim medicinal no Egito, China, Índia e Grécia nos tempos antigos e os estudos científicos têm conduzido à um grande número de fármacos disponibilizados na terapêutica (FERREIRA, PINTO, 2010; SHOEB, 2006; YUNES, CECHINEL FILHO, 2009). Os primeiros registros medicinais são descritos na Mesopotâmia e são datados de aproximadamente 2100 a.C. (YUNES, CECHINEL FILHO, 2009).

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e a preservação desta é fundamental tanto pelo valor intrínseco da riqueza biológica como pelo potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO, BONZANI, 2009).

As plantas produzem diferentes metabólitos secundários (alcalóides, esteróides, flavonóides, terpenos) que despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas pela imensa atividade farmacológica desses compostos (ALVES, 2001; FERREIRA, PINTO, 2010). Porém, existem algumas dificuldades em quantificar estes metabólitos, pois muitos metabólitos secundários são produzidos em diferentes quantidades e, apesar da existência de um controle genético, há características que podem sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

A partir dos metabólitos secundários produzidos pela planta que foram criados os fitoterápicos e devido à diversidade de estruturas e composição química dos extratos dos fitoterápicos, eles podem desempenhar efeitos farmacológicos desejados, porém deve ocorrer uma padronização do extrato apontando quais são os metabólitos secundários majoritários e as suas concentrações, deste modo a

pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os metabólitos secundários majoritários que podem contribuir para a descoberta da atividade biológica apresentada pela planta (FERREIRA, PINTO, 2010; YUNES, CECHINEL FILHO, 2009).

A descoberta de produtos naturais em sua forma pura, no fim do século XIX, foi um decisivo e importante passo para a criação e desenvolvimento da indústria farmacêutica, sendo os produtos naturais a principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos, quando esta iniciava seu desenvolvimento (COSTA, 2009).

Nos últimos anos, têm-se observado um significativo avanço científico no que se refere aos estudos químicos e farmacológicos de compostos orgânicos oriundos de plantas, particularmente através de mudanças estruturais, obtendo-se análogos com propriedades terapêuticas maximizadas. Isto se deve ao fato de muitas moléculas naturais apresentarem efeitos farmacológicos relevantes, levando à síntese de derivados da molécula protótipo com maior potência e seletividade (CRAGG, NEWMANN, 2010; YUNES, CECHINEL FILHO, 2009).

Produtos naturais vêm sendo utilizados como fonte e inspiração para uma grande quantidade de medicamentos da farmacopeia atual. Pode-se afirmar que entre 25% e 50% dos medicamentos comercializados atualmente devem suas origens aos produtos naturais, isto é possível devido ao descobrimento e refinamento de técnicas como a cromatografia tornando possível a separação e caracterização de componentes individuais de diversas misturas complexas (KINGSTON, 2011; MEINWALD, 2011).

3.2 Fitoterápicos

Enquanto os medicamentos apresentam, em sua quase totalidade, um único princípio ativo que é responsável pelo seu efeito farmacológico, os extratos vegetais e de fungos, identificado como fitoterápico, são constituídos por misturas multicomponentes de substâncias ativas, parcialmente ativas e inativas, que, muitas vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes, identificado como fitoterápico (FERREIRA; PINTO, 2010).

O produto fitoterápico vem crescendo no mercado movimentando mundialmente US\$ 21,7 bilhões por ano. O aquecimento desse mercado atraiu

várias indústrias, nacionais e internacionais, estimulando a pesquisa nesta área. Neste nicho de mercado dos fitoterápicos um grande exemplo é o Acheflan[®], medicamento fitoterápico desenvolvido pelo laboratório Aché com investimento de aproximadamente 15 milhões de reais (NIERO, 2010).

Em diversos países incluindo o Brasil, um grande número de plantas vem sendo utilizado como fontes alternativas de medicamentos, é o que mostra os dados do *Food and Drug Administration*, onde 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006 são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais. Entre os europeus e os asiáticos observou-se um aumento no uso deste tipo de medicamento em cerca de 35% desde a década de 70 (FERREIRA, PINTO, 2010; MALHEIROS et al., 2010).

No Brasil a pesquisa e descoberta de novos fármacos, além de propiciar o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, contribuem também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em consideração que o bioma brasileiro é ainda muito pouco explorado como fonte de substâncias farmacológicas (BARREIRO; BONZANI, 2009).

Os fitoterápicos representam aproximadamente 15% do capital da indústria farmacêutica mundial e cerca de 40% dos medicamentos existentes no mercado, são obtidos de forma indireta ou diretamente através de fontes naturais, sendo que 20% das plantas com substâncias biologicamente ativas que são conhecidas estão no Brasil (NIERO, 2010).

O interesse da pesquisa na fitoquímica tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem sido prioridade na maioria delas. Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais (YUNES, CECHINEL-FILHO, 2009).

Essa valorização ocasionou crescimento na procura de informações e comprovações científicas, sobre segurança, qualidade e eficácia terapêutica. Apesar das plantas medicinais serem largamente utilizadas, somente com estudos químicos e biológicos são confirmadas sua eficácia, qualidade e segurança na terapêutica, apontando a necessidade de desenvolvimento de métodos de otimização e

padronização das preparações vegetais (MALHEIROS et al., 2010; YUNES et al., 2001).

As plantas medicinais ainda são utilizadas pela população devido a insatisfação com a eficácia, alto custo e reações adversas dos medicamentos sintéticos, acompanhado da admiração pelos “produtos naturais”. O uso das plantas medicinais é devido ao metabolismo delas, onde são produzidas substâncias chamadas metabólitos secundários que são responsáveis pelo efeito terapêutico, exercendo funções diferentes de acordo com o que cada planta necessita para sua sobrevivência (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; MALHEIROS et al., 2010).

3.3 Aspectos gerais sobre metabolismo vegetal

As plantas para sua própria sobrevivência produzem substâncias através de reações contínuas nas estruturas celulares, o metabolismo, que tem como objetivo a produção de energia e biossíntese de substâncias essenciais para a planta. Ele pode ser dividido em metabolismo primário que são processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos e secundário que não é essencial a planta, mas que a ajudam a ter vantagens de sobrevivência e perpetuação de sua espécie. Os compostos químicos gerados, degradados ou transformados durante o metabolismo são chamados metabólitos (SANTOS, 2003).

Os metabólitos secundários são compostos sintetizados pela planta com função de defesa contra pássaros, raios UV, insetos, microrganismos, entre outros, podendo sofrer influência do ambiente e hereditariedade (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; SANTOS, 2003).

Outros fatores que influenciam e alteram a composição química dos vegetais e sua produção de metabólitos secundários são o tipo de solo, umidade, vento, temperatura e poluição atmosférica. Além da defesa para a planta os metabólitos secundários possuem uma imensa atividade biológica e podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos (cumarinas, flavonoides e taninos) e alcaloides. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquimico ou ácido mevalônico. Os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), que são derivados do ácido chiquimico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Os metabólitos secundários isolados das plantas podem apresentar

diferentes atividades farmacológicas, de acordo com seu grupo e estrutura química (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; PERES, 2004).

3.3.1 Terpenoides

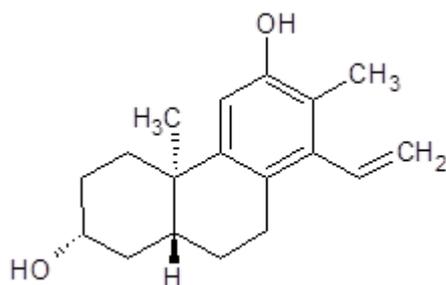
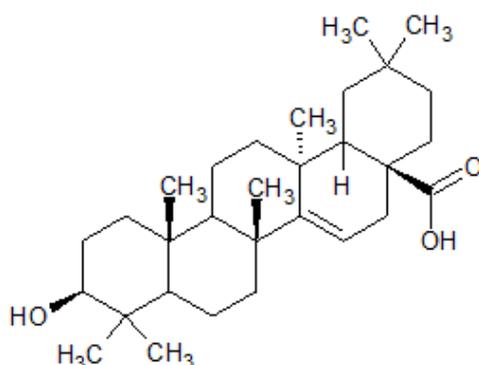
Os terpenoides são biossintetizados a partir de unidades de isopreno, através da via acetato-mevalonato, onde são conhecidos cerca de 30000 terpenos, que são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em: hemiterpenos (C5), Monoterpenos (C10), Sesquiterpenos (C15), Diterpenos (C20) como, por exemplo, o espruceanol (Figura 1), Triterpenos (C30) como o ácido aleuritólico (Figura 2), e Tetraterpenos (C40). Os terpenoides ocorrem na forma cíclica que são obtidas através de reações de oxiredução, hidratação e isomerização, e por isso eles apresentam ampla diversidade estrutural (DEGENHARDT et al., 2009).

Terpenos são identificados como principais constituintes dos óleos voláteis (monoterpenos), e apresentam diversas funções nos vegetais como atração a polinizadores, termotolerância, proteção contra stress oxidativo, insetos, fungos, bactérias e herbívoros. Desempenham também atividade antimicótica, origem a hormônios de crescimento vegetal, germinação da semente e inibição do crescimento da raiz (MALHEIROS, NIERO, 2010; THOLL, 2006).

Dentre os grupos mais importantes dos terpenoides se encontram os triterpenos, apresentando atividades biológicas importantes como anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, antibacteriana, antiviral, anti HIV, cardiovascular, herbicida e hipoglicemiante e hepatoprotetor, possuindo um baixo efeito tóxico (CONNOLLY, HILL, 2007; JAGER et al., 2009; NIERO, MALHEIROS, 2010).

Triterpenos são uma fonte de ativos para o desenvolvimento fitofarmacêutico, pois há uma ampla quantidade de triterpenos em plantas e são utilizados comumente na medicina popular (JAGER et al., 2009).

Efeitos antitumorais estão correlacionados muitas vezes com os frutos e as cascas, que contém triterpenos, sendo que as maiores fontes conhecidas de triterpenos estão essencialmente na superfície das plantas como na casca, o caule ou folha e ceras de frutas. Também são utilizados no tratamento de ceratose actínica e pode ser aplicado em preparações parenterais (JAGER et al., 2009).

Figura 1 - Estrutura molecular do diterpeno espruceanol.**Figura 2** - Estrutura molecular do triterpeno ácido aleuritólico.

3.3.2 Cumarinas

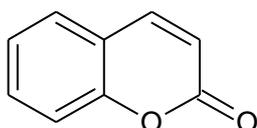
As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, mas também são encontradas em fungos e bactérias. Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo a cumarina o representante mais simples (Figura 3). Cerca de 1300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais. Suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem das ligações dos seus radicais no seus anéis (EVANS, 1996).

São derivadas do metabolismo da fenilalaninas e encontram-se distribuídas predominantemente em angiospermas, sendo as estruturas mais simples as mais encontradas podendo estar presente em todas as partes de uma planta (KUSTER; ROCHA, 2000)

Cumarinas identificadas a partir de fontes vegetais apresentaram atividade anti-HIV. Essas substâncias inibiram a replicação in vitro do HIV-1, provavelmente, por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase (RADUNZ et al., 2012).

Algumas cumarinas apresentam ação anticoagulante como a dicumarol, que é utilizada como protótipo no desenvolvimento de anticoagulantes como a varfarina. A escoparona possui ação imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora. O ostol age como antiagregante plaquetário, no relaxamento da musculatura lisa e cardíaca e a escopoletina como antiespasmódica e importante atividade antioxidante (KUSTER; ROCHA, 2003; RAZAVI et al., 2008).

Figura 3 - Estrutura geral de uma cumarina.

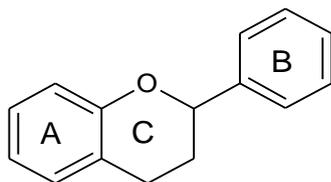


3.3.3 Flavonoides

Os flavonoides são polifenóis, biossintetizados pela via dos fenilpropanóides, possuem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas onde são conhecidos mais de 6000 flavonóides diferentes, sendo distribuídos amplamente no reino vegetal, podendo ser encontrados também em angiospermas e um relato em fungos. São classificados entre flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóise, chalconas (MACHADO et. al., 2008; ZUANAZZI, 2000).

São constituídos por dois anéis benzeno (A, B), conectados ao anel pirano (C) por um oxigênio (Figura 4). São classificados de acordo com a introdução dos grupos hidroxil ou metil na molécula. Estão em maior parte na forma de glicosídeos. Quando o metabólito está sem o açúcar é chamado de aglicona. No mínimo oito combinações de monossacarídeos ou dissacarídeos e trissacarídeos podem se ligar a diferentes grupos hidroxil das agliconas, com maior frequência a D-glicose e L-raminose. Os glicosídeos são usualmente O-glicosídeos, onde o açúcar se liga ao grupo hidroxil (ZUANAZZI, MONTANHA, 2003).

Os flavonóides fitoestrogênios, como a isoflavona, tem potencial hormonal, podendo ser utilizado na deficiência de estrogênio na menopausa, diminuindo o risco de câncer de mama e derrame causado pelo uso contínuo dos hormônios estrogênio e progesterona (JACOB, et al., 2011).

Figura 4 - Estrutura geral de um flavonoide

Os flavonoides apresentam diversas funções como: proteção dos vegetais contra a incidência de raios UV e visível, contra insetos, fungos, bactérias e vírus, atraentes de animais com a finalidade de polinização e antioxidante. Eles podem ser encontrados nas folhas, flores, galhos, raízes e frutos, podendo ser diferentes estruturalmente e também em concentração diferente dependendo do órgão vegetal que ele se encontra (ZUANAZZI, 2000).

Os flavonoides possuem grande interesse farmacológico, pois apresentam propriedades importantes como anti-inflamatória, anticarcinogênico, antialérgico, antiulceroso e antiviral. Possui também propriedades antioxidantes, ação estrogênica e antibacteriana, além de influenciar o sistema imune através de sua ação na proteína quinase (RIJKE et. al., 2006; ZUANAZZI, 2000).

3.3.4 Taninos

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas. Possuem grande importância, pois são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fator de controle de insetos, fungos e bactérias, assim como para seus principais usos industriais, como na manufatura do couro (MELLO; SANTOS, 2000).

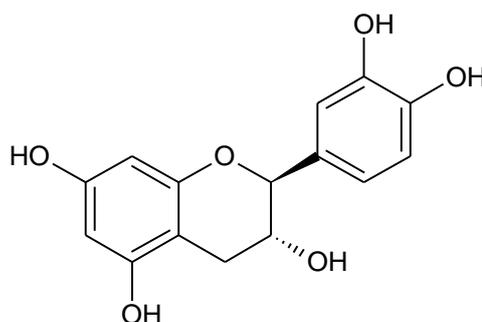
Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diarreia, antisséptico, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas e queimaduras pois age como impermeabilizante das camadas expostas da pele, antídoto em intoxicações, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; MONTEIRO et al., 2005).

Estudos *in vitro* tem revelado ação fungicida, bactericida, moluscida e antitumoral para esta classe. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos

taninos são devido a três características: complexação com íons metálicos (ferro, manganês, cálcio entre outros), atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de complexar com outras moléculas como proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS, 2000).

Devido a sua capacidade antioxidante e de captação de radicais livres, os taninos tornam os radicais livres em radicais estáveis e deste modo combatem doenças degenerativas como o câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose e o próprio processo de envelhecimento, pois estas doenças estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres. Um exemplo que temos desta classe é a catequina (Figura 5) (MONTEIRO et al., 2005).

Figura 5: Estrutura molecular da (+)-catequina



3.3.5 Alcalóides

Os alcaloides típicos são de origem vegetal, com caráter básico, contendo um ou mais átomos de nitrogênio e podem ter ação fisiológica no ser humano e nos outros animais. Vários compostos desta classe também foram encontrados em bactérias, fungos e animais como insetos, sendo considerados alvo de muita atenção (EVANS, 1991).

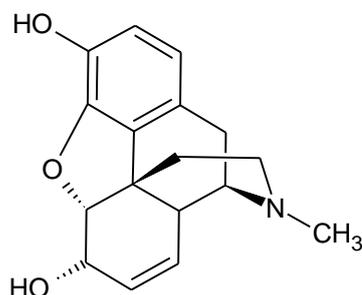
Os alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. São sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se nos vacúolos e desta forma, não aparecem em células jovens antes de ocorrer a formação dessas estruturas. As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas protoalcalóides. Compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que são

derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (HENRIQUES et al., 2000).

Podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal e muitos possuem função de proteção contra insetos, vírus, microrganismos e radiação UV para as plantas. Foram muito usados pelos povos antigos como veneno na ponta das flechas. Como atividade farmacológica destacam ação analgésica como por exemplo um derivado desta classe a morfina (Figura 6), anticancerígena, anticolinérgica, anti-hipertensiva, antimalárico, hipnoanalgésico, depressor cardíaco, estimulante do SNC, diurético, tratamento de gota, miorelaxante, simpatomimético, antiviral entre outras (HENRIQUES et al., 2000; PERES, 2004).

Outras aplicações terapêuticas de alcalóides estão relacionadas com o tratamento de desordem lisossomal, infecções e doenças autoimunes como artrite e esclerose múltipla (JUSTO et al., 2009).

Figura 6- Estrutura molecular da morfina.



3.4 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é largamente distribuída na região pantropical, incluindo cerca de 300 gêneros e 6000 espécies. No Brasil existem cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, sendo uma das principais famílias da flora brasileira (SOUZA, LORENZI, 2008).

As plantas pertencentes a esta família são de hábitos variados, existindo como ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. Possuem folhas alternas inteiras ou partidas. Flores de sexo separado, reunidas em inflorescências muito variadas em geral do tipo cacho, com número de 5-6 tépalas. Fruto seco esquisocarpo, sendo separado elasticamente em três cocos. Estes abrindo-se posteriormente e sementes ricas em endosperma, em maioria das vezes oleaginoso (SOUZA, LORENZI, 2008).

Dentre os vários gêneros pertencentes à Euphorbiaceae, podem ser citados como os de maior importância, devido a diversidade, aplicação e interesse econômico: *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Jatropha*, *Sapium*, *Ricinus* e *Aleurites* (WEBSTER, 1994).

As Euphorbiaceae incluem diversas espécies de interesse econômico, destacando-se a seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se trata de uma espécie nativa da Amazônia brasileira, responsável por um de nossos ciclos econômicos. Possui diversas plantas muito úteis ao homem, como por exemplo o tungue (*Aleurites fordii* Hemsley) ou a noqueira-de-iguape (*Aleurites moluccana*), ambos do gênero *Aleurites*, com sementes que produzem o óleo industrial. Esta família também é utilizada como ornamental, mas, evidentemente por possuírem flores não vistosas, o aspecto ornamental se dá pelas brácteas ou pela folhagem (SOUZA, LORENZI, 2008).

Muitas Euphorbiaceae produzem sementes que são irritantes ao homem, sendo comum os acidentes como intoxicação pela sua ingestão, incluindo plantas como a noqueira-de-iguape (*Aleurites moluccana*) e a purga-de-cavalo (*Joannesia princeps*). Outros acidentes que podem ocorrer é devido ao látex das Euphorbiaceae por serem cáusticos se em contato com mucosas, principalmente a dos olhos (SOUZA, LORENZI, 2008).

Estudos têm sido publicados com investigação de lipídios, terpenoides e alcalóides com várias espécies desta família. As duas primeiras espécies de plantas investigadas desta família foram a *Aleurites moluccana* L.Willd e a *Bischofia trifoliata* Roxb, onde foram encontrados entre os triterpenos cinco pentacíclicos (bauerenol, germanicol, epigermanicol, multiforenol e phyllanthol) e três tetracíclicos (euphol, euphorbol e tirucallo) (HUI, HOI, 1968).

3.5 Gênero *Aleurites*

O gênero *Aleurites* subdivide-se em *A. trisperma*, *A. cordata*, *A. montana*, *A. fordii*, *A. montance*, *A. rockinghamensis*, além da *A. moluccana*, a qual é abordada neste trabalho (VILLALOBOS, CASTELLANOS, 1992).

É uma árvore de porte médio, com cerca de 20m de altura. A cor de sua casca é castanha-acinzentada, com finas linhas verticais. Apresenta folhas simples, palmadas, grandes, medindo até 30 cm, esbranquiçada quando jovem, e com a

idade adquire cor verde. Suas flores possuem 5 pétalas e medem cerca de 10-15cm, com cor branca ou creme (ORWA et al., 2009). Os frutos são de verde para amarronzado, medem cerca de 5-7 cm de largura e as sementes estão contidas dentro de uma concha dura, de cor preta e medem aproximadamente 2,5-3,5 cm de comprimento (Figura 7) (ELEVITCH, MANNER, 2006).

A espécie vegetal *A. moluccana* L. Willd., é uma árvore exótica, natural da Indonésia e largamente cultivada no Estado de Santa Catarina conhecida popularmente como “Nogueira-da-Índia” ou “Nogueira-do-Iguape”. Destaca-se pelo seu uso medicinal no tratamento de úlceras, febre, dor de cabeça, asma, conjuntivite, gonorréia, inflamação, hepatite, hiperlipidemia, antirreumático e suas cascas como antitumoral, para diarreia sangrenta, disenteria, tratamento e cicatrização de feridas e erupções na pele, e como desintoxicante alimentar (CESCA et al., 2012a; DUKE, 1991; PIO CORREA, 1984; PRAZAD et al., 2011).

O óleo das sementes é usado, com modificações, para substituir o diesel, os resíduos são convertidos para álcool ou pirólise e as suas cascas contém aproximadamente de 4-6% de taninos (ORWA et al., 2009).

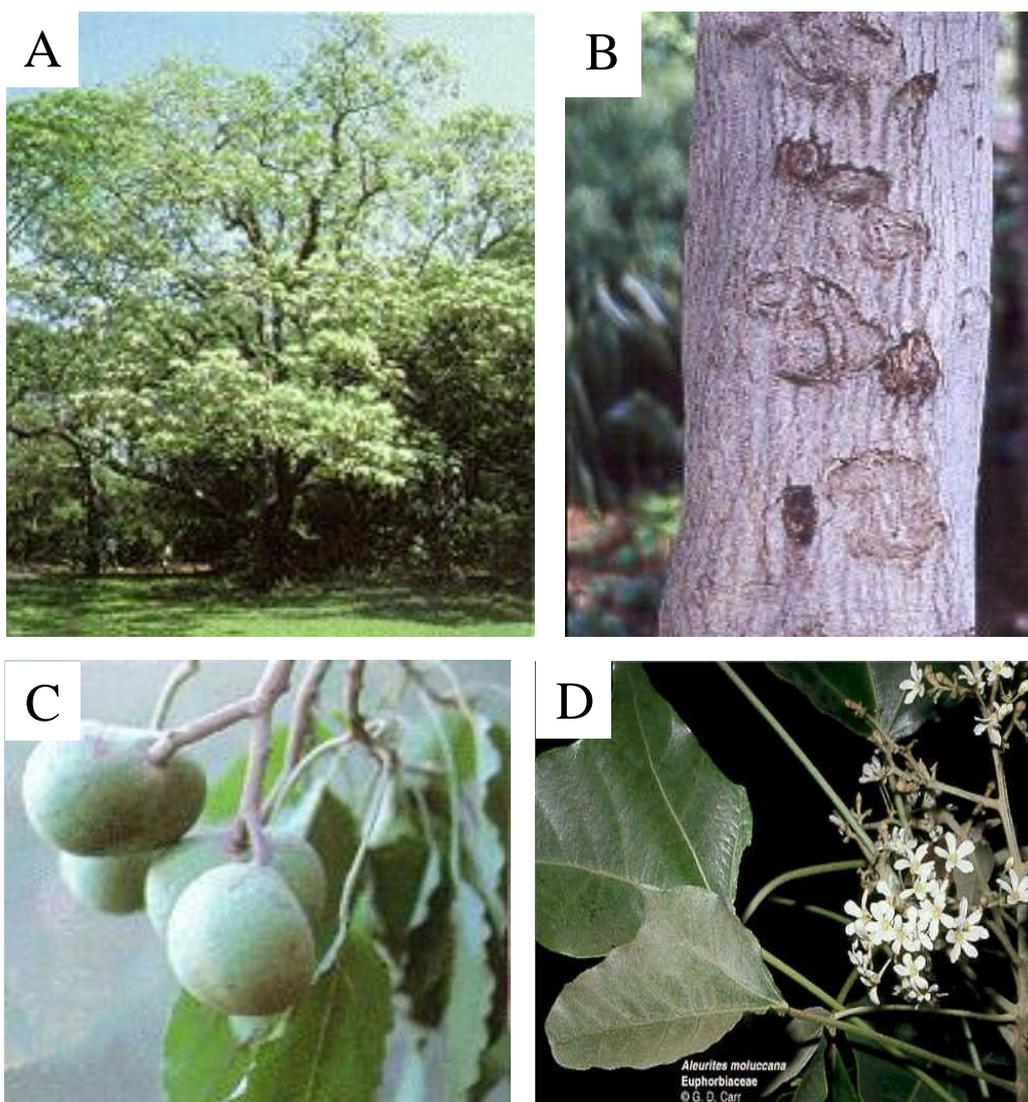
Os estudos fitoquímicos têm sido conduzidos principalmente com as partes aéreas observando a presença de triterpenos, esteróides, flavonóides e lignanas (LIU et al., 2007; LIU et al., 2008; MEYRE-SILVA et al., 1997, 1998, 1999).

Investigação realizada com extrato metanólico e frações de hexano das folhas de *A. moluccana*, revelaram potencial analgésico em diferentes modelos experimentais tendo como compostos majoritários os flavonoides swertisina (1) e 2''-O-ramnosil swertisina (2). O composto 2-O-ramnosil swertisina apresentou efeito analgésico cerca de 16 vezes maior que a Aspirina, sendo considerado marcador fitoquímico das folhas desta planta (MATOS et al., 2011; MEYRE-SILVA et al., 1998; 1999).

A ação de redução dos lípidos das folhas do extrato metanólico de *A. moluccana* foi realizada em ratos com dieta hiperlipídica, com o objetivo de *A. moluccana* diminuir os níveis de colesterol e triglicerídeos em ratos com hipercolesterolemia. Os resultados mostraram a redução de lípidos pela inibição da biossíntese hepática do colesterol e a redução da absorção de lípidos no intestino (PEDROSA et al., 2002).

Estudos demonstraram que a fração de diclorometano obtida das folhas e cascas de *A. moluccana* apresentaram atividade antiviral e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (QUINTÃO et al., 2011).

Figura 7 - Fotos das partes aéreas de *Aleurites moluccana*. A-Árvore *Aleurites moluccana*; B- Cascas; C-Frutos; D- folhas e flores.



Fonte: Andrés E.L. Reyes, 2012. <www.esalq.usp.br/Trilhas/medicina/am19>

Em um estudo com extrato padronizado de *A.moluccana* com 3% do marcador 2-O-ramnosil swertisina e para o outro flavonoide, a swertisina, mostraram efeitos antinociceptivos, em um modelo experimental de sensibilização mecânica

inflamatória, utilizando agente indutor diferente, como λ -carragenina, CFA, ou PGE2 em ratos (QUINTÃO et al., 2011).

A comparação dos efeitos de extrato seco com o marcador fitoquímico e seu derivado, com drogas clinicamente utilizado para tratar a inflamação e dor revelaram que a potência do extrato seco de *A. moluccana* é atribuída a partir destes dois flavonoides. O medicamento à base do extrato foi transformado em comprimidos a base de extrato seco de *A. moluccana* padronizado em 250 e 500 mg (CESCA et al., 2012b).

Estudos realizados com o extrato etanólico de *A. moluccana* incorporado em pomada base a 2% e 4% para tratar feridas e queimaduras mostrou uma atividade notável na aceleração do processo de cicatrização das feridas em ratos, reduzindo o tempo de epitelização e contribuindo para a síntese de colágeno (PRAZAD et al., 2011).

Uma investigação fitoquímica preliminar realizada com extrato das folhas de *A. moluccana* evidenciou a presença do triterpenóide moretenona (3), moretenol e β -sitosterol, este último também isolado do caule da mesma planta (HUI, HOI, 1968).

Meyre-Silva e colaboradores (1997,1998), realizaram estudos com extrato etanólico das folhas da *A. moluccana*, que levou ao isolamento do hidrocarboneto n-hentriacontano (4), a mistura de triterpenos α -amirina (5) e β -amirina (6), estes dois últimos muito conhecidos por apresentarem ação anti-inflamatória e os esteroides β -sitosterol (7) e stigmasterol (8). Da fração de diclorometano obtida das cascas de *A. moluccana* foi isolado o Ácido acetil aleuritólico (9), que apresenta atividade antibacteriana, antimicrobiana e também gastroprotetora com inibição de 50% das lesões (MATHABE, 2008; MEYRE-SILVA et al., 1997, 1998; PERTINO et al., 2007).

Com o extrato metanólico dos caules de *A. moluccana*, foram conduzidos estudos que levaram ao isolamento de um cumarinolignóide denominado molucanin (10), sendo derivado um da cumarina (SHAMSUDDIN et al., 1988).

Estudos realizados por Liu e colaboradores (2008) com os galhos e folhas de *A. moluccana*, permitiram a identificação do ácido molucânico (11), metil éster do ácido molucânico e ácido 6,7-dihidroximolucânico (12). Ambos foram testados de atividade citotóxica *in vitro* contra Raji (Burkitt's linfoma) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) com linhagem de células humanas, porém ambos foram inativos nesse sistema de testes.

Derivados cumarínicos também foram isolados em pesquisas conduzidas com os caules de *A. moluccana* levando ao isolamento de substâncias como a aleuritina (13) e o 5,6,7 trimetoxi cumarina (14) (FOZDAR et al., 1989).

Nonaka e colaboradores (1990) realizaram pesquisas que permitiram o isolamento de estruturas complexas como: aleuritina A (15), aleuritina B (16), aleuritina C (17), corilagina (18), geranina (19) e ácido chebulágico (20) do extrato das folhas de *A. moluccana*.

A partir das cascas de *A. moluccana*, foram realizados estudos fitoquímicos que possibilitaram o descobrimento da estrutura química do ácido aleuritólico (21) e o 3 β - acetoxi-metil aleuritolato (22) (MISRA, KHASTGIR, 1970).

Pesquisas realizadas por Satyanarayana e colaboradores (2001) permitiram o descobrimento de uma substância da classe dos forbóis, sendo denominado de 13-O-miristil-20-O-acetil-12-deoxiforbol (23) a partir de *A. moluccana*.

Pesquisas feitas por Bittencourt (2003) com a fração de diclorometano obtida a partir do extrato metanólico de *A. moluccana* revelaram a presença de um diterpeno da série rara de cleistanol chamado espruceanol (24).

Uma investigação preliminar com cascas de *A. moluccana*, a partir da fração de diclorometano, levaram ao isolamento de um sólido branco, que após análise espectral foi caracterizado como o ácido atrárico (25) (BITTENCOURT, 2003).

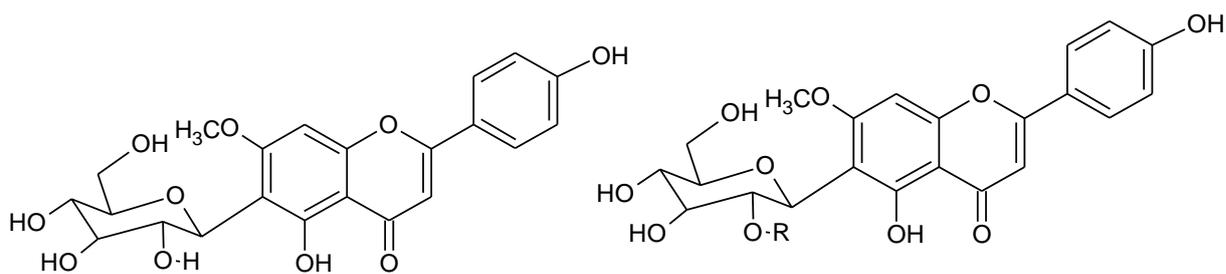
A partir do extrato etanólico das folhas de *A. moluccana* foram realizados estudos fitoquímicos que levaram ao isolamento da estrutura química de um composto da classe dos megastigmanos chamado reosideo (26). Esta classe de compostos possui significantes atividades biológicas como antitumoral, antialérgica, antibacteriano e antinociceptivo (DA-SILVA et al., 2012).

Recentemente estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com a espécie vegetal *A. moluccana* validaram a estabilidade de um método por HPLC-UV, previamente desenvolvido para a análise da flavonóide 2"-O-rhamnosyl swertisina, sendo totalmente validado com a inclusão também da swertisina. Foi analisado também um suporte sólido para a aplicação de dispersão da matriz em fase sólida para a extração de flavonoides de *A. moluccana* (CESCA et al., 2012b; STENGER et al., 2009).

Outro estudo foi desenvolvido para avaliar a estabilidade e eficácia de um medicamento contendo 0,5 e 1,0% de extrato seco padronizado de *A. moluccana* para uso tópico no tratamento de dor, inflamação e feridas onde os resultados pré-

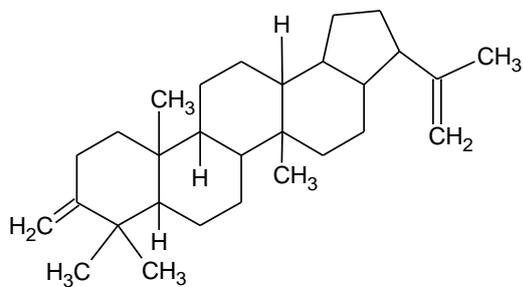
clínicos mostraram que foram obtidos os efeitos esperados neste estudo (CESCA et al., 2012a).

Esta espécie vegetal tem sido alvo de extensas pesquisas científicas na Universidade do Vale do Itajaí o que culminou na solicitação de pedido de patente sob o número NPI 020070151574 em colaboração com indústria farmacêutica Eurofarma. A presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo o extrato de *A. moluccana* com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, bem como a um método de preparação da mesma. Este projeto entre o laboratório e a universidade só deram mais ênfase a importância desta espécie vegetal, onde também é notada a importância de esclarecer sua composição química e suas atividades biológicas, através de estudos fitoquímicos e farmacológicos.

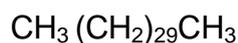


(1)

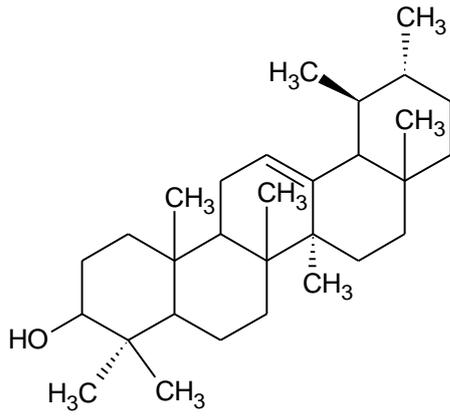
(2)



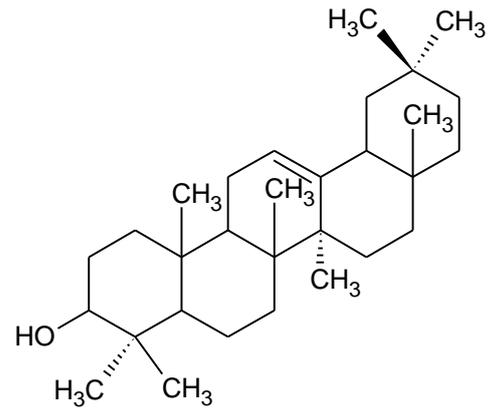
(3)



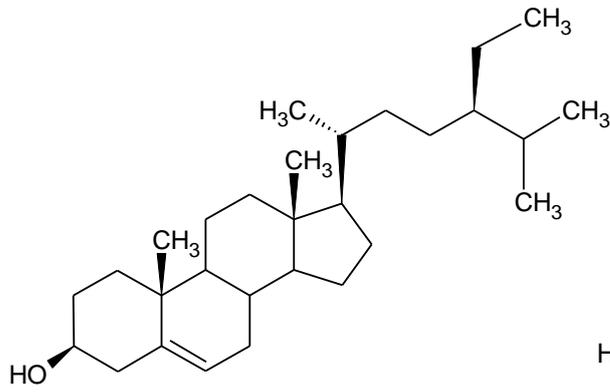
(4)



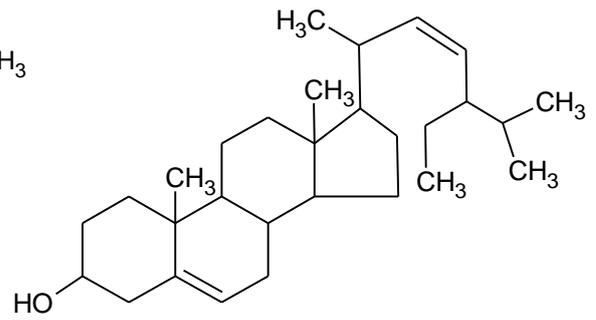
(5)



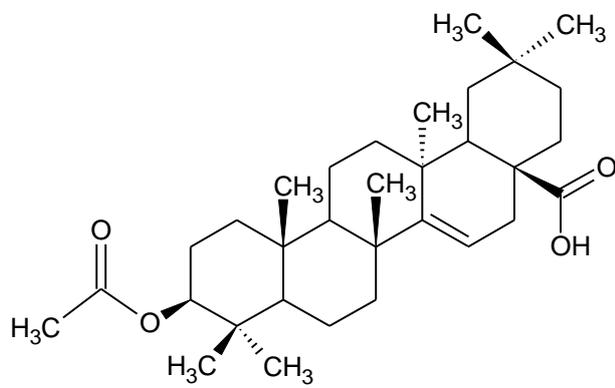
(6)



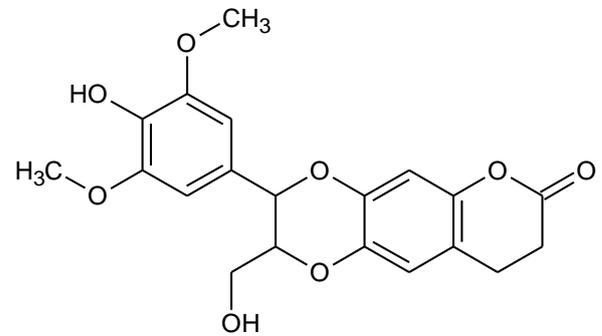
(7)



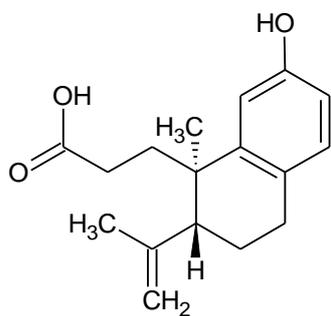
(8)



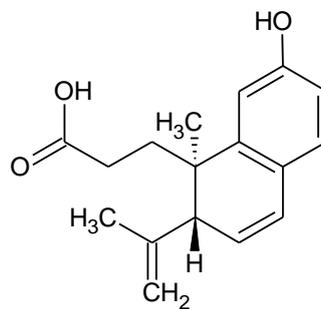
(9)



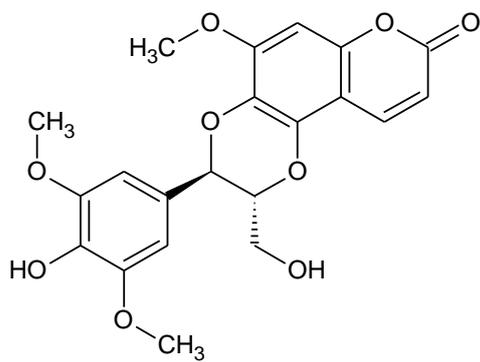
(10)



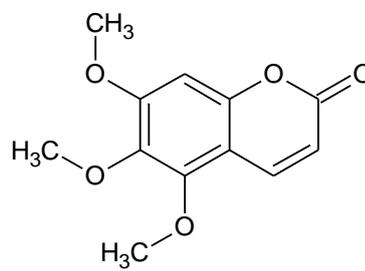
(11)



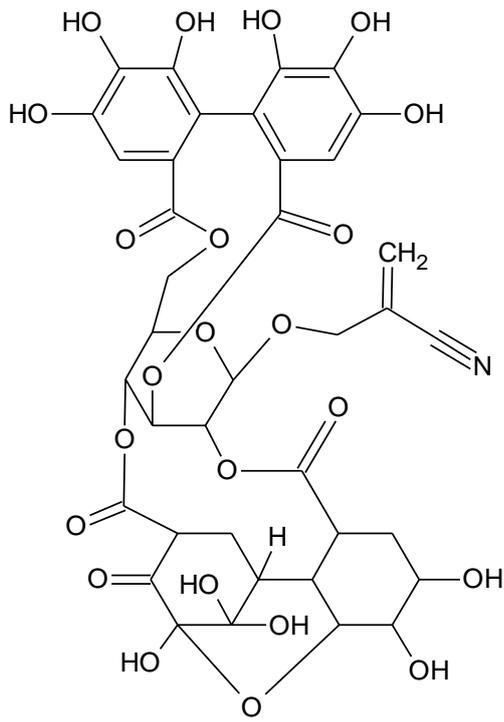
(12)



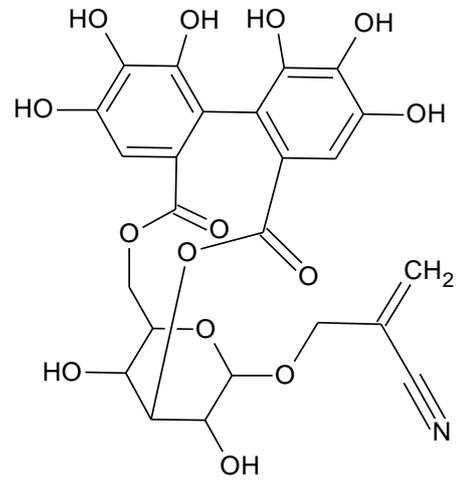
(13)



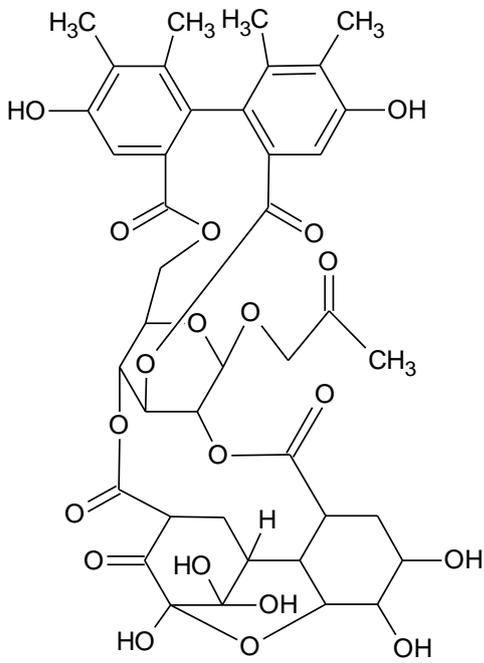
(14)



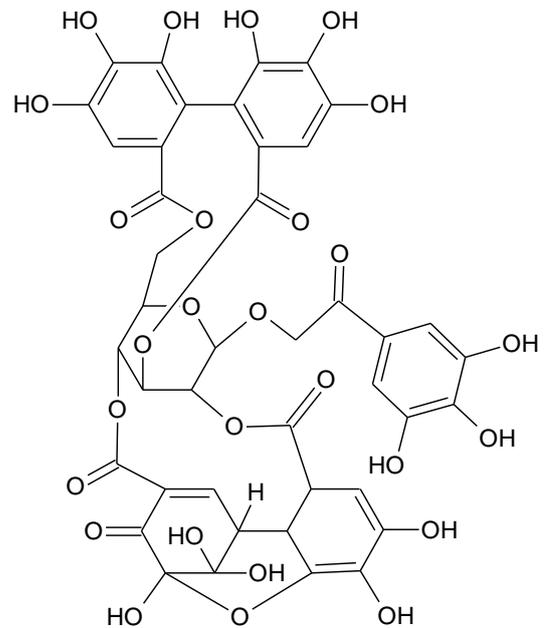
(15)



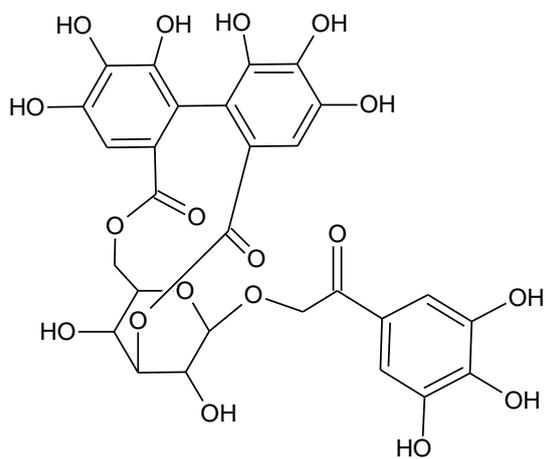
(16)



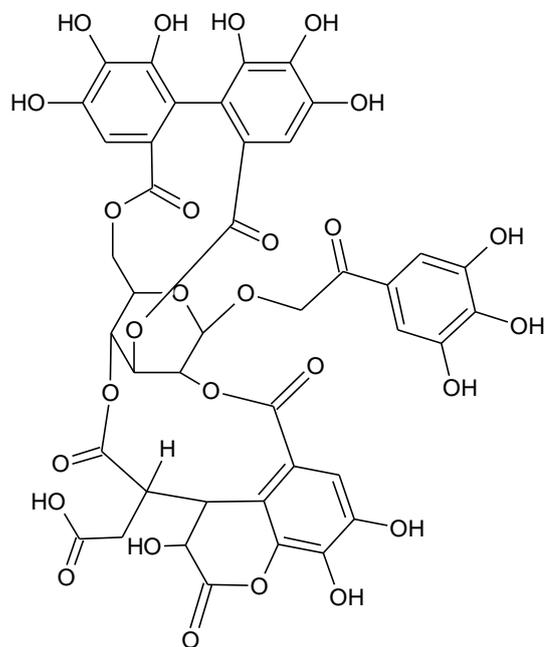
(17)



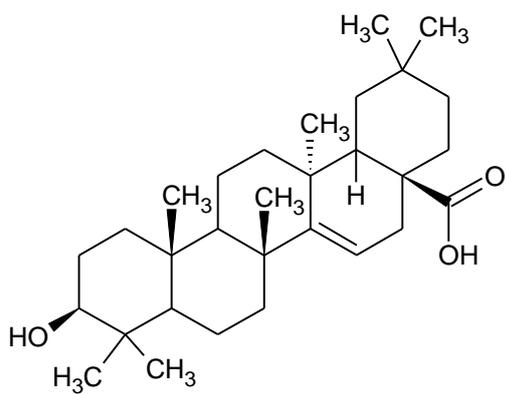
(18)



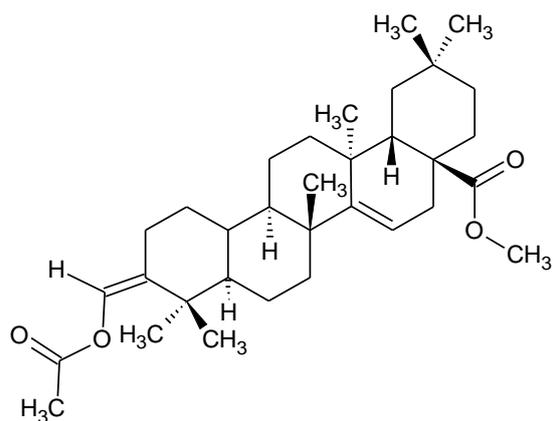
(19)



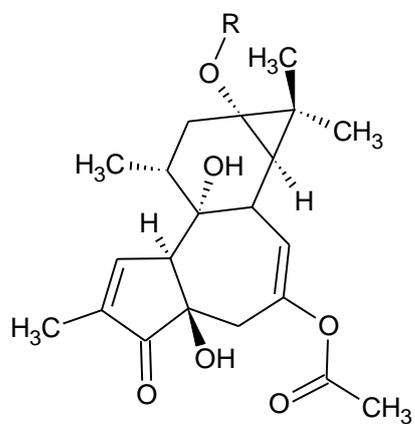
(20)



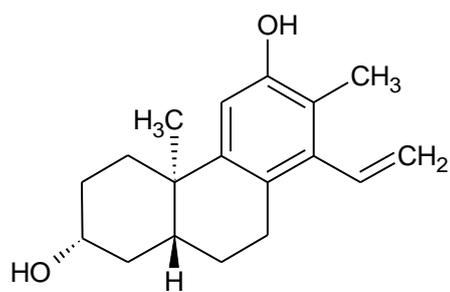
(21)



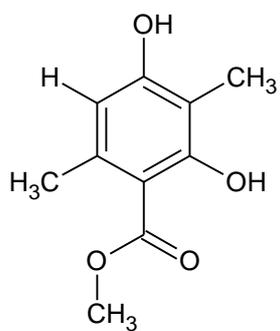
(22)



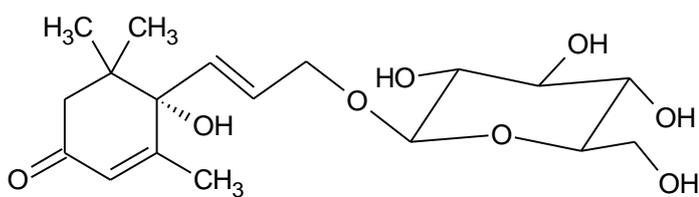
(23)



(24)



(25)



(26)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material vegetal:

As cascas e folhas de *A. moluccana* L. Willd, foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Ademir Reis através de exsicata depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues, Itajaí-SC, sob o número VC Filho 001. Os materiais vegetais foram coletados em Tijucas-SC, as cascas no mês de dezembro de 2011 e as folhas em julho de 2008 e submetidos à secagem em estufa de circulação de ar na temperatura máxima de 40°C durante 3 dias e trituradas utilizando-se moinho de facas.

4.1.2 Reagentes

O perfil cromatográfico dos extratos e frações obtidos foram avaliados através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a escolha e direcionamento do procedimento de purificação. Para esta análise inicial foram utilizadas placas de sílica gel 60 GF 254 (Merck).

As placas foram borrifadas com reveladores específicos para cada grupo químico como anisaldeído sulfúrico (esteroides e/ou terpenoides) e ácido sulfúrico a 10% em etanol (revelador universal).

Para Cromatografia em Coluna (CC), foi utilizada sílica gel (0,063 – 0,200 mesh) Merck como suporte. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. As eluições foram realizadas com solventes orgânicos de pureza analítica com polaridade crescente, sendo eles hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, além destes para o uso em atividades cotidianas do laboratório foram utilizados acetona e clorofórmio provenientes dos Laboratórios Dinâmica e Vetec.

Nas análises de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram utilizados clorofórmio deuterado (pureza 99,8%) procedentes da Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Todos os reagentes, solventes e suportes cromatográficos utilizados para a purificação dos compostos foram adquiridos comercialmente da Dinâmica[®] ou

VETEC® com recursos de projetos realizados pelo NIQFAR-UNIVALI.

A fração de interesse foi submetida à purificação através de cromatografia em coluna (CC) utilizando eluentes com aumento gradativo de polaridade. As sub-frações obtidas analisadas por CCD que se apresentarem semelhantes foram reunidas e submetidas novamente à CC. Este procedimento foi repetido até a obtenção de substâncias puras observadas por CCD com a apresentação de uma única mancha na placa cromatográfica.

4.1.3 Equipamentos

Os extratos foram concentrados para obtenção do resíduo seco no rotavapor TECNAL TE-211 com controle de temperatura de 45°C.

Para a observação da fluorescência dos compostos por CDD, foi utilizada radiação ultravioleta Minerallight ($\lambda = 254$ e 366 nm).

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro BRUKER AC-300F 300 MHz, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente para o aparelho da Univali e o equipamento VARIAN®, modelo Mercury Plus, operando a 300,06 MHz para o ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C , tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS), sendo a elucidação dos dados auxiliada pelas técnicas de RMN Dept, HMBC, HMQC e COSY, estes três últimos foram realizados na cidade de Maringá-PR, utilizando para as análises de RMN um espectrômetro varian, modelo Mercury plus 300, que opera a 300 MHz para o núcleo de ^1H e 75 MHz para o núcleo de ^{13}C .

4.2 Obtenção do extrato e frações das cascas

Inicialmente foi avaliado a melhor forma de extração dos compostos de interesse. Neste sentido foram realizados os procedimentos de extração descritos abaixo:

- 1) As cascas secas e trituradas de *A. moluccana* (8,258g) foram submetidas a procedimento extrativo utilizando metanol (MeOH). A maceração foi de 5 dias, após este período, o líquido extrator foi removido e submetido à evaporação do solvente utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura máxima de 45°C até obtenção de resíduo seco.

O extrato metanólico concentrado foi ressuscitado em mistura de etanol:água na proporção 7:3 e submetido ao fracionamento com partição líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente como n-hexano (H), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt). As frações obtidas foram submetidas ao evaporador rotatório sob pressão reduzida para a obtenção do resíduo seco.

2) As cascas secas e trituradas de *A. moluccana* (8,073g), foram submetidas ao procedimento extrativo, utilizando inicialmente H durante 5 dias, após este período o líquido extrator foi removido utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura máxima de 45°C até obtenção de resíduo seco e posteriormente a planta foi remacerada com H por mais 5 dias. O mesmo procedimento extrativo foi realizado com solventes de polaridade crescente como DCM, AcOEt e MeOH.

4.3 Obtenção do extrato e frações das folhas

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar na temperatura máxima de 40 °C durante 3 dias e trituradas utilizando-se moinho de faca, obtendo-se 1,5 kg. O material vegetal foi submetido à extração utilizando solvente metanol por sete dias. Após este período o extrato metanólico foi filtrado e submetido à concentração utilizando evaporador rotatório sob pressão reduzida na temperatura máxima de 45 °C para obtenção do extrato metanólico mole.

Com o propósito de separar os compostos por diferença de polaridade o extrato metanólico foi ressuscitado em uma mistura de solventes, etanol:água (7:3) e submetido à partição líquido-líquido utilizando solventes com aumento de polaridade: H, DCM e finalizando com AcOEt. As frações obtidas foram submetidas ao evaporador rotatório sob pressão para a obtenção do resíduo seco.

4.4 Purificação do extrato de hexano e frações das cascas de *A. moluccana*

O processo de purificação com o extrato de H foi realizado por cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel 60 GF 254 (Merck) como fase estacionária. A fase móvel utilizada na primeira e segunda CC foi com H 100%, mistura de hexano e acetato de etila, com aumento gradativo de polaridade. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico e reveladas com anisaldeído sulfúrico. O

procedimento foi repetido até a obtenção de substâncias com elevado grau de pureza que pudessem ser analisadas por RMN.

Na terceira coluna foi utilizada como fase móvel DCM: Acetona 99:1, com polaridade crescente, iniciando com DCM 100%, passando por DCM: Acetona 99:1 e revelado com anisaldeído sulfúrico. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico e encaminhadas para análise por RMN.

4.5 Purificação das frações de DCM obtidas das folhas de *A. moluccana*

Foi realizada a extração de 1,5kg de planta com o solvente metanol que resultou no extrato bruto, este foi ressuspendido em etanol:água (7:3) e submetido à partição líquido-líquido utilizando solventes com aumento de polaridade, fração de H, fração de DCM e fração de AcOEt. Por apresentar maior rendimento e com o intuito de isolar substâncias apolares, a fração escolhida para a purificação foi a de DCM.

A fração de diclorometano foi submetida à cromatografia aberta utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel H com aumento gradativo de polaridade com o incremento de AcOEt.

Com o intuito de obter maiores quantidades de outro triterpeno de interesse biológico (α,β -amirinona), uma nova coluna cromatográfica foi realizada a partir de frações enriquecidas deste triterpeno obtidas pela acadêmica do mestrado de Ciências Farmacêuticas da Univali, Vanessa D. Claudino.

A fração enriquecida (66,30 g) foi submetida à purificação utilizando coluna cromatográfica aberta, sílica gel 60 como fase estacionária e como fase móvel n-hexano com aumento gradativo de polaridade pelo uso de acetato de etila e finalizando com etanol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e perfil cromatográfico das cascas de *A. moluccana*

Os extratos e frações das cascas foram submetidos à avaliação do perfil cromatográfico utilizando cromatoplaça de sílica gel 60 F254, distintos sistemas de eluentes e reveladores específicos para cada classe química de compostos, além da avaliação do rendimento em relação ao material vegetal seco de partida.

Com relação ao sistema de extração observa-se que a partição líquido-líquido apresenta algumas diferenças em relação à composição química quando comparado ao sistema de extração direta, ambos extraídos com H e posteriormente com DCM por 24h. Como apresentado na figura 8 observa-se uma quantidade maior de substâncias extraíveis para o extrato de H e DCM quando comparada com as frações de mesma polaridade.

Figura 8 - Avaliação do perfil cromatográfico das cascas de *A. moluccana* utilizando cromatoplaça de sílica gel 60 F254. 1-Fração de H; 2- Extrato de H; 3- Fração de DCM; 4-Extrato de DCM.



Nota: Eluente: H: AcOEt 7:3. Revelador: UV, Solução de Anisaldeído sulfúrico 10% a quente.
(10mg/ml / aplicação 10µl)

A placa mostra uma concentração maior do composto com Rf: 0,32, que se trata do ácido acetil aleuritólico sendo o composto majoritário da planta.

Outra ferramenta utilizada para a escolha do melhor sistema de extração foi a análise do rendimento dos extratos e frações. Como pode ser observado na tabela 1, o método de extração direta forneceu um maior rendimento principalmente para o

extrato de H e DCM. Esta informação vem de encontro ao observar por CCD onde pode-se evidenciar um maior número de substâncias.

Tabela 1- Massa e rendimentos dos extratos e frações obtidos das cascas de *A. moluccana*.

	Partição líquido-líquido		Extração direta	
	Rendimento	Rendimento	Rendimento	Rendimento
	(g)	(%)	(g)	(%)
Material vegetal	8,0733		8,2585 g	
Hex	0,0303	0,375 %	0,0398 g	0,482%
DCM	0,0244	0,302 %	0,0325 g	0,393 %
AcOEt	0,0085	0,105 %	0,0210g	0,254 %
MeOH	-	-	0,3570g	4,322%

Devido ao maior rendimento e interesse dos compostos apolares exibido pelo método de extração direta optou-se por esta metodologia para dar continuidade aos estudos fitoquímicos. Pelo interesse do isolamento da classe dos terpenoides, pois seria mais fácil o isolamento das substâncias apolares e como se tratava do início dos estudos com as cascas, foi escolhido o extrato de hexano.

5.2 Identificação do AMCP

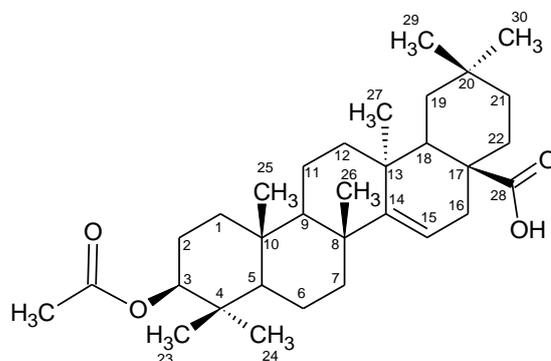
Ao concentrar o extrato de n-hexano no evaporador rotatório foi observado a formação de um precipitado branco, o qual foi previamente denominado de **AMCP**. A substância foi submetida ao procedimento de lavagem com n-hexano e analisada por CCD utilizando padrões de substâncias anteriormente isolada das folhas desta espécie vegetal como o triterpeno α,β -amirina, o esteróide β -sitosterol e o ácido acetil aleuritólico (AAA). Pode-se observar que o precipitado isolado apresentava o mesmo valor de fator de retenção ($R_f = 0,32$) quando comparado ao padrão do ácido acetil aleuritólico, apresentando uma única mancha.

O composto isolado resultou em 16,2 mg sendo submetido à caracterização estrutural através de análises de RMN de ^1H e de ^{13}C , Dept.

Através da análise dos dados e comparação com dados descritos na literatura, o AMCP pode ser caracterizado como sendo o ácido acetil aleuritólico

(Tabela 2) (figura 9), apresentando 0,2% de rendimento quando comparada com o material vegetal seco.

Figura 9 – Estrutura molecular do ácido acetil aleuritólico.



Os dados espectrais de RMN ^1H (Figura 10) mostraram um duplo dubleto em aproximadamente em 4,5 ppm referente a substituição do grupo acetil em C-3 do AAA, em 5,5 ppm caracteriza um hidrogênio olefínico H-15 e o simpleto em aproximadamente 2,1 ppm é característico do hidrogênio do grupo acetil ligado ao C-3.

No espectro de RMN do ^{13}C (Figura 11) observa-se em 184,29 ppm, sinal do grupamento ácido ligado ao C-17 (51,48 ppm), em 171,02 ppm referente a carbonila do grupo éster em C-3 (80,87 ppm) (Figura 12 e 13) e os sinais em 160,54 e 116,85 ppm caracterizam o grupo olefínico atribuídos aos C-14 e C-15, respectivamente. Todos estes dados são condizentes quando comparado com a literatura conforme apresentado na tabela 2.

No espectro de Dept (Figura 12) percebe-se a presença em 80,87 ppm o sinal do C-3 ligado ao grupo éster, e em 116,85 um sinal do C-15 que faz um dupla ligação no anel.

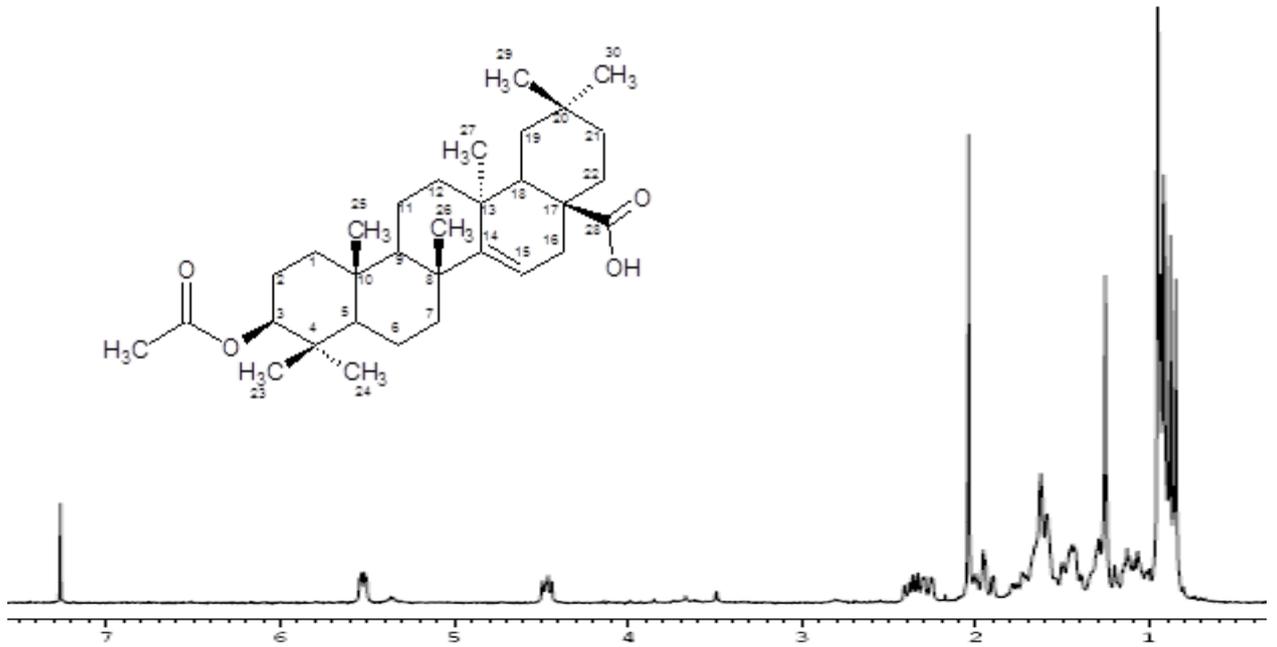
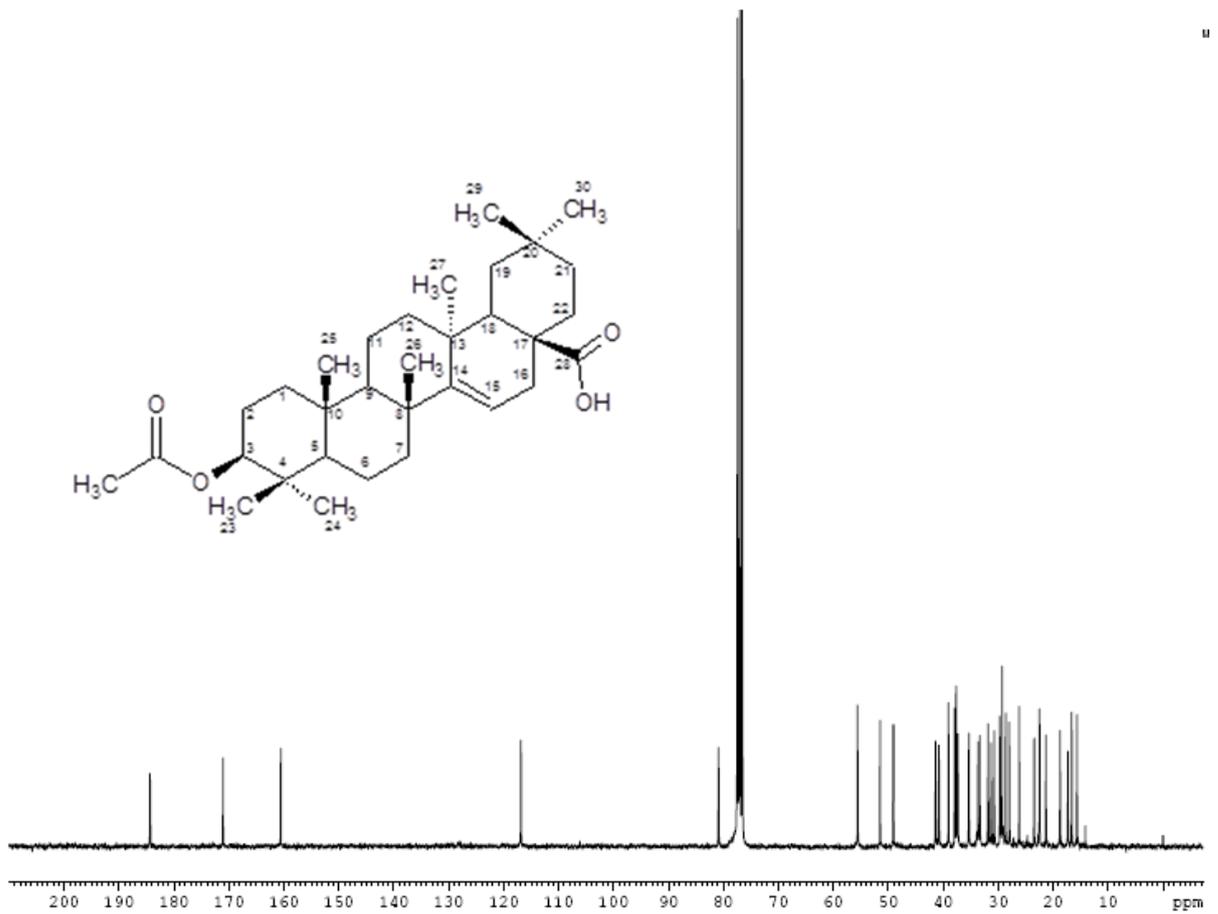
Figura 10- Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do AMCP .**Figura 11 -** Espectro de RMN- ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do AMCP.

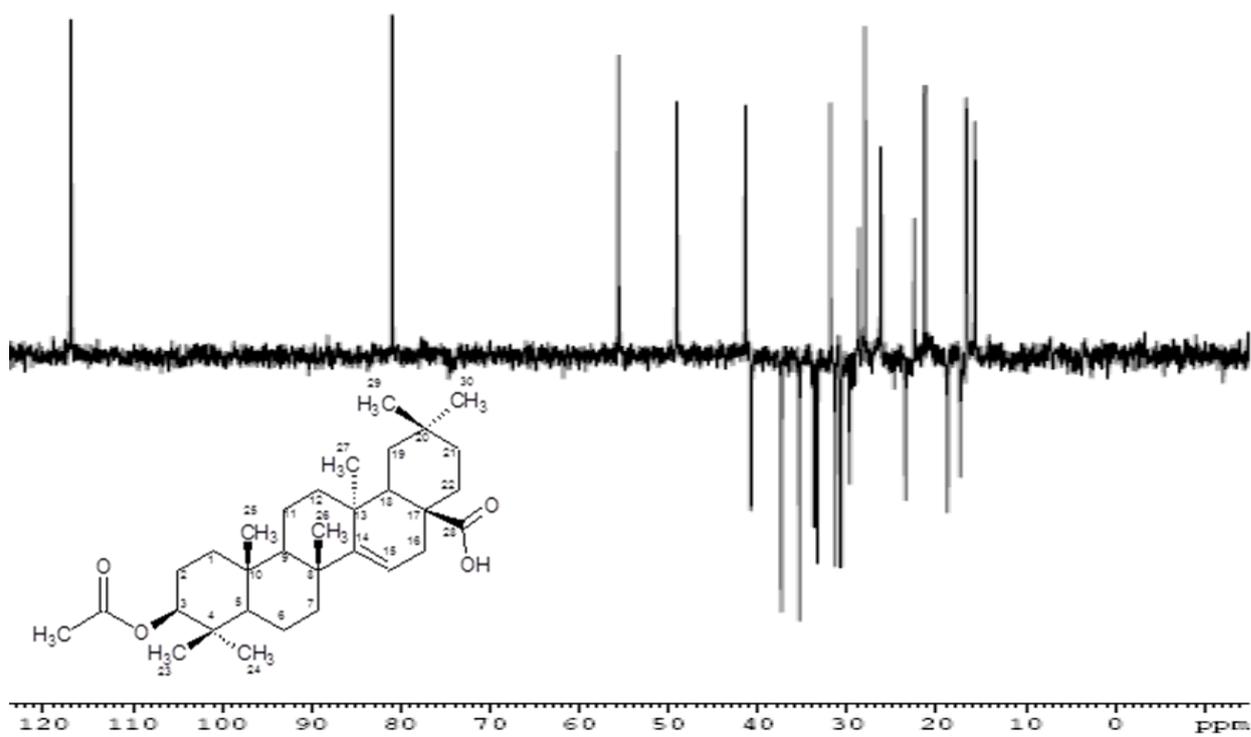
Figura 12- Espectro de RMN-¹³C/Dept (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMCP.

Tabela 2. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMCP e dados da literatura para o ácido acetil aleuritólico.

Posição C	δ RMN- ^{13}C do AMCP/Dept	RMN- ^{13}C do AAA*
1	37,34 (CH ₂)	37,45
2	23,43 (CH ₂)	23,50
3	80,87 (CH)	80,92
4	37,67 (-)	37,71
5	55,55 (CH)	55,66
6	18,71 (CH ₂)	18,77
7	40,70 (CH ₂)	40,83
8	39,03 (-)	39,08
9	49,03 (CH)	49,13
10	37,92 (-)	37,98
11	17,28 (CH ₂)	17,33
12	33,29 (CH ₂)	33,36
13	37,38 (-)	37,36
14	160,54 (??)	160,58
15	116,85 (CH)	116,87
16	31,25 (CH ₂)	31,37
17	51,48 (-)	51,50
18	41,33 (CH)	41,48
19	35,30 (CH ₂)	35,40
20	29,69 (-)	29,31
21	33,63 (CH ₂)	33,73
22	30,66 (CH ₂)	30,76
23	27,93 (CH ₃)	27,98
24	16,57 (CH ₃)	16,60
25	15,63 (CH ₃)	15,64
26	26,18 (CH ₃)	26,19
27	22,44 (CH ₃)	22,48
28	184,29 (-)	184,18
29	31,82 (CH ₃)	31,90
30	28,62 (CH ₃)	28,66
CH ₃	21,29	21,25
CO	171,02	170,93
Solvente	CDCl ₃	CDCl ₃

Fonte: GIL et al., 2008

O ácido acetil aleuritólico já foi isolado anteriormente desta espécie vegetal e também observado em outras plantas como *Croton cajucara*, *Spirostachys africana*, *Jatropha isabelli* e *Croton uracurana* (MATHABE, et al., 2008; PERAZZO et al., 2007; PERES et al., 1997; PERTINO et al., 2007).

Estudos realizados com o AAA tem revelado atividade antibacteriana contra diferentes bactérias patogênicas gram positiva e gram negativa e gastroprotetora com inibição de 50% das lesões podendo ser esta última, a inibição atribuída devido

ao potencial anti-inflamatório e analgésico exibido pelo AAA quando avaliado pelo método de indução por ácido clorídrico/etanol (GIL, et al., 2008; MATHABE, et al., 2008; MEYRE-SILVA et al., 1997; 1998; PERTINO et al., 2007).

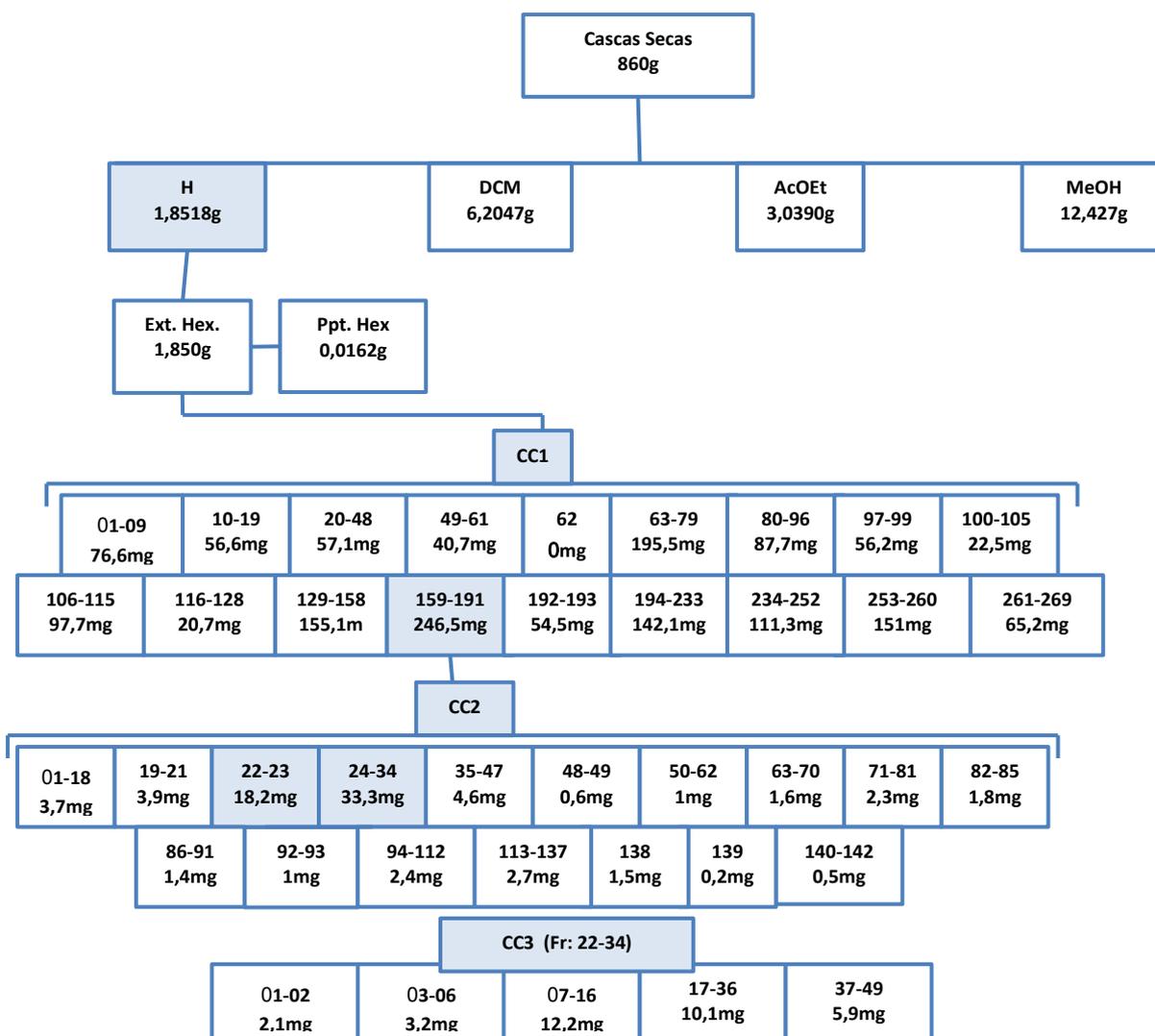
5.3 Identificação do AMC 07-16 e AMC 17-36.

Dando continuidade ao processo de purificação com o extrato de H (1,85g) inicialmente foi realizado cromatografia em coluna (CC) e identificado como procedimento CC1, totalizando 269 frações coletadas (Figura 13), sendo reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. O procedimento foi repetido até a obtenção de substâncias com elevado grau de pureza que pudessem ser analisadas por RMN. Desta maneira foi realizada a segunda coluna cromatográfica (CC2) a partir da fração 159-191 (205,7mg) da CC1 que apresentou um bom perfil cromatográfico e foi submetida à purificação, sendo esta ressuspensa em DCM para a preparação da pastilha em sílica gel e submetida à cromatografia em coluna.

Deste procedimento obteve-se 142 frações (Figura 13) que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico dando origem a terceira coluna cromatográfica (CC3), onde foi avaliado o perfil cromatográfico por CCD das frações 22-23 e 24-34 da CC2 que mostraram-se semelhantes comparando o R_f, portanto foram reunidas para obter maior rendimento do próximo procedimento, formando a fração 22-34 (21,5mg) que apresentou um bom perfil cromatográfico e foi submetida a purificação sendo esta ressuspensa em diclorometano para a preparação da pastilha em sílica gel e submetida à cromatografia em coluna.

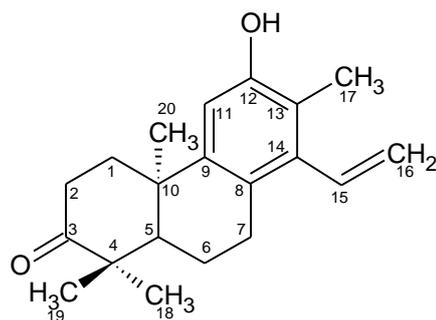
Desta CC foram coletadas 49 frações (Figura 13) que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico. Ao serem avaliadas por CCD dois compostos se apresentaram puros, com aspecto oleoso de cor amarelo castanho sendo denominadas de **AMC 07-16** e **AMC 17-36**.

Figura 13- Fluxograma do procedimento de purificação com o extrato de hexano obtido das cascas de *A.moluccana*.



Com o intuito de caracterizar suas estruturas as substâncias **AMC 07-16** e **AMC 17-36** foram encaminhadas à análise espectral como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H), Carbono 13 (RMN-¹³C) e Dept.

Do composto AMC 17-36 foi isolado a quantidade de 10,1mg com Rf de 0,24 e através da análise dos dados e comparação com as substâncias previamente isoladas e descritas na literatura, o composto foi caracterizado como sendo o Sonderianol (Tabela 3) (Figura 14), apresentando 0,12% de rendimento quando comparado com as cascas secas.

Figura 14- Estrutura molecular do Sonderianol.

O espectro de RMN-¹H (Figura 15) mostra um duplo dubleto em 5,21 e 5,57 ppm, atribuído aos hidrogênios da dupla ligação do H-16 confirmado pelo sinal característico de carbono secundário =CH₂ no RMN-¹³C (Figura 16), evidenciado no dept em 119,8 ppm (Figura 17). Há o aparecimento de um simpleto em 6,63 ppm atribuído ao hidrogênio ligado ao C-15 em 135,3 ppm, um simpleto em 6,68 ppm referente ao H-11 e um simpleto em 2,17 ppm referente aos hidrogênios ligados ao grupo metila no C-17.

No espectro de RMN-¹³C (Figura 16) é possível observar a presença de um sinal em 152,2 ppm referente ao C-12 ligado ao grupamento hidróxi (OH) e outro sinal em 217,4 ppm correspondente ao C-3 do grupo cetona. Abaixo encontram os dados espectroscópicos do composto isolado em comparação ao diterpeno sonderianol (Tabela 3).

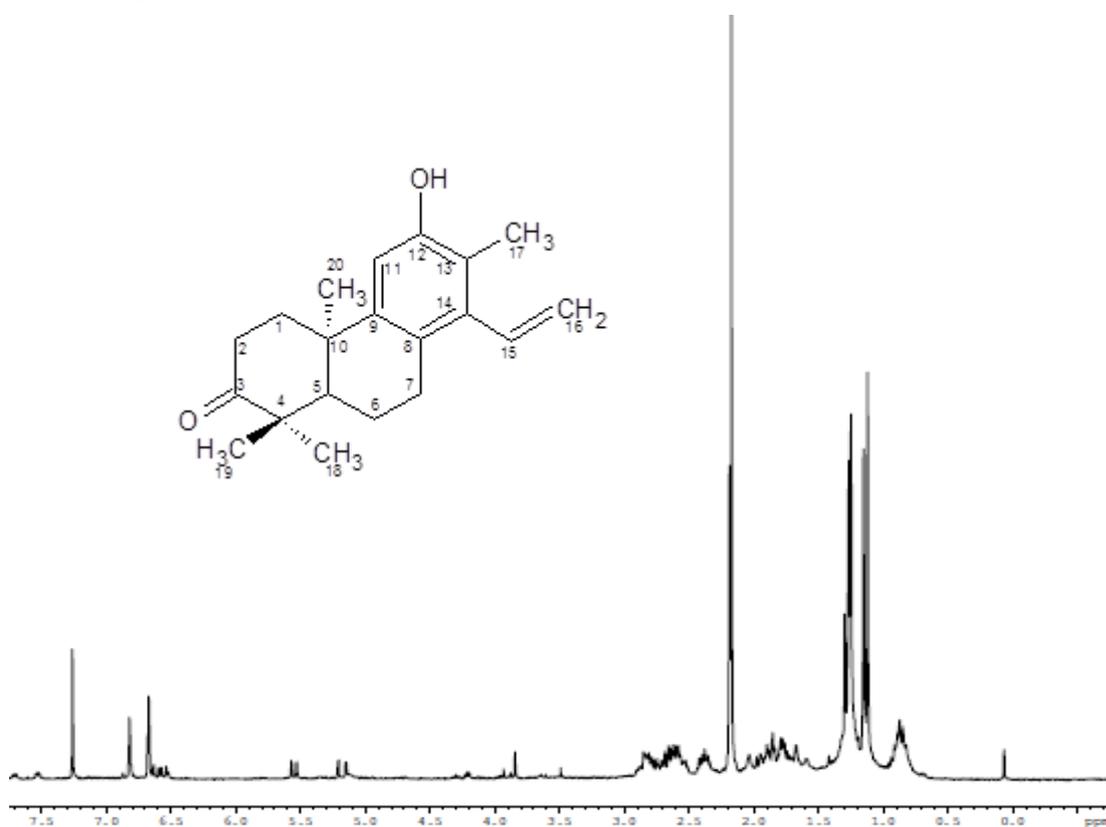
Figura 15 - Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 17-36 .

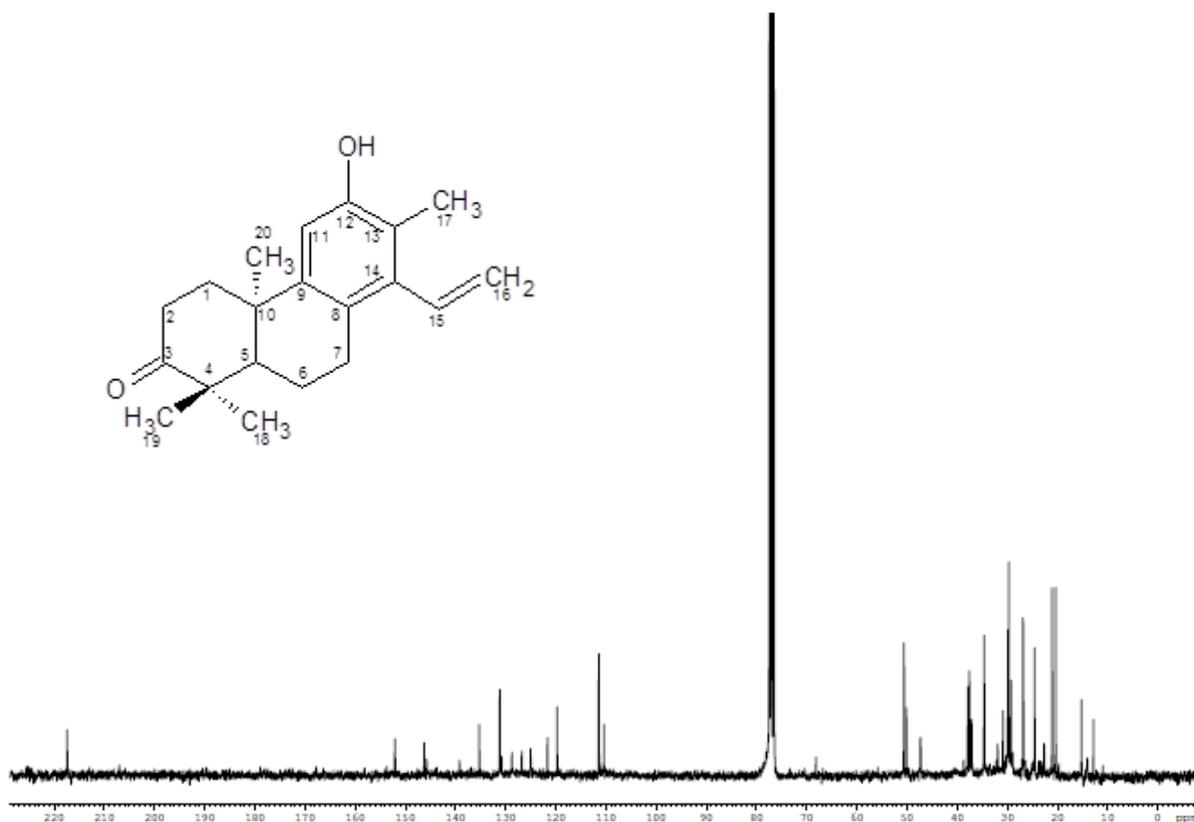
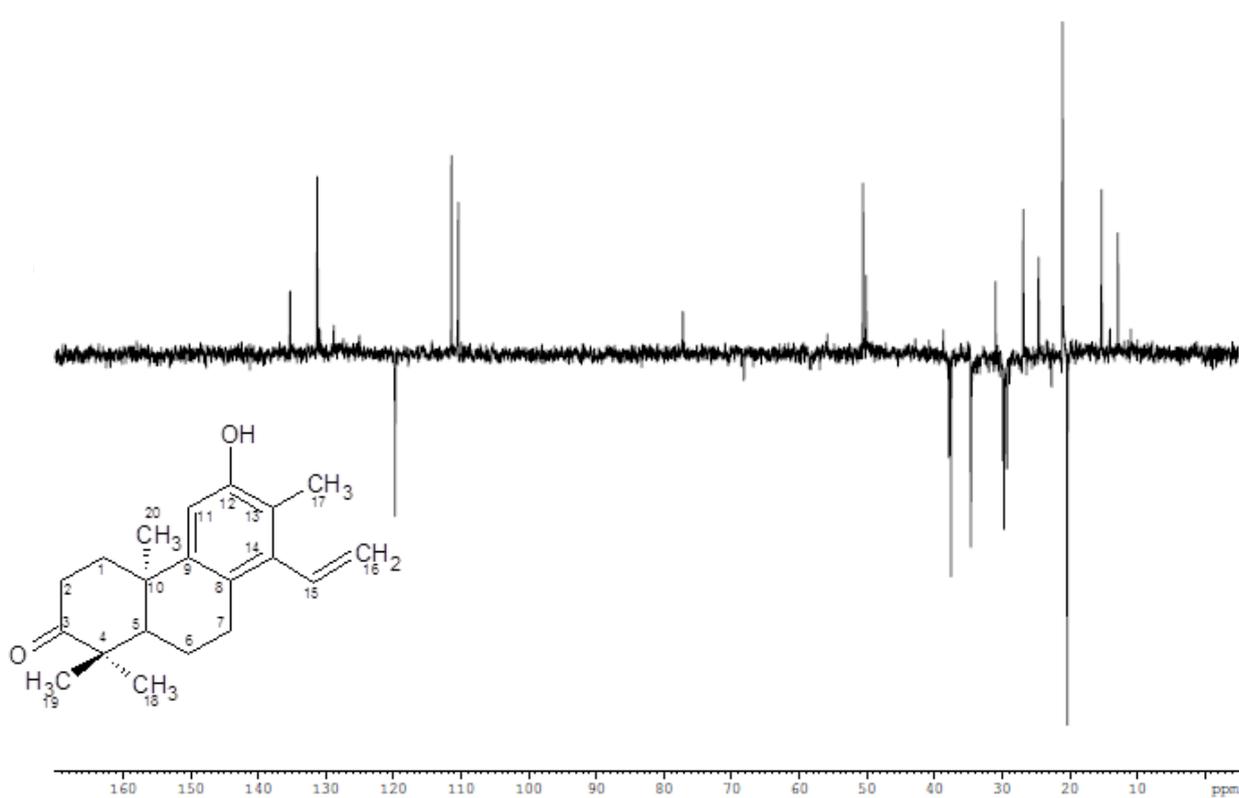
Figura 16- Espectro de RMN-¹³C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 17-36.**Figura 17 -** Espectro de RMN-¹³C/Dept (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 17-36.

Tabela 3. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMC 17-36 e dados da literatura para o Sonderianol

Posição	δ RMN- ^1H do AMC 17-36	RMN- ^1H do Sonderianol*	δ RMN- ^{13}C do AMC 17-36/Dept	RMN- ^{13}C do Sonderianol*
1	1,67-1,95 (CH ₂)	1,66-1,94	37,8	38,2
2	2,36-2,83 (CH ₂)	2,36-2,82	34,6	34,9
3	- (-)	-	217,4	219,7
4	- (-)	-	47,3	47,6
5	2,36-2,83 (CH)	2,36-2,82	50,5	50,5
6	1,67-1,95 (CH ₂)	1,66-1,94	20,3	20,5
7	2,36-2,83 (CH ₂)	2,36-2,82	29,2	29,4
8	- (-)	-	125,1	125,7
9	- (-)	-	139,2	140,1
10	- (-)	-	37,5	37,6
11	6,68 (CH)	6,68	111,4	111,2
12	- (-)	-	152,2	153,4
13	- (-)	-	121,7	120,8
14	- (-)	-	146,3	146,6
15	6,63 (CH)	6,60	135,3	136,2
16	5,21 e 5,57 (CH ₂)	5,23 e 5,55	119,8	120,5
17	2,17 (CH ₃)	2,2	12,8	13,1
18	1,15 (CH ₃)	1,15	24,6	24,7
19	1,12 (CH ₃)	1,12	26,8	26,9
20	1,30 (CH ₃)	1,29	21,0	21,2
Solvente	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃

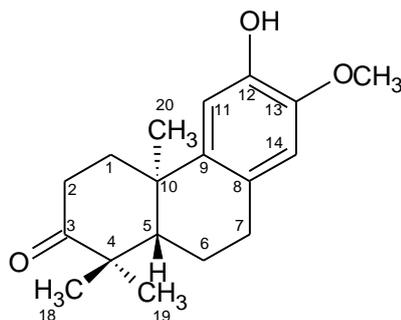
Fonte: ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2004

O Sonderianol foi previamente isolada a partir de outras plantas como *Petalostigma pubescens*, *Croton moritibensis*, *Croton salutaris* e *Croton sonderianus* (ARAÚJO-JÚNIOR, et al., 2004; CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982; GRACE, et al., 2006; ITOKAWA et al., 1991) sendo a primeira vez isolado do gênero *Aleurites*. Estudos biológicos conduzidos com esta substância contra células leucêmicas de ratos revelaram inibição de 100% do crescimento celular numa concentração de 50ug/ml e exibindo moderada toxicidade contra células cancerígenas hepáticas dos ratos (GRACE, et al., 2006).

Além do composto supracitado a partir do procedimento cromatográfico utilizando a fase móvel H : Acetona na proporção de 99:1 pode-se evidenciar por CCD o isolamento de outro composto com Rf de 0,43 denominado previamente

como **AMC 07-16** (12,2mg). Este composto apresentou-se como um óleo de cor castanha com um rendimento de 0,15% quando comparado com as cascas secas. A partir da análise espectral pode-se caracteriza-lo como sendo o derivado do sonderianol (Figura 18) quando comparado com a literatura (Tabela 4).

Figura 18 – Estrutura molecular do derivado do Sonderianol.



No espectro de RMN-¹H (Figura 19) do derivado do sonderianol é observado um simpleto em 3,85 ppm, atribuído ao hidrogênio do grupo metóxi (OCH₃), o qual não é encontrado no espectro de RMN-¹H do sonderianol.

No espectro de RMN-¹³C (Figura 20) observa-se a presença de um sinal em 55,8 ppm atribuído ao grupo metóxi que também é observado no Dept (Figura 21) nesta mesma região como CH₃, nesta mesma região, sendo este sinal muito importante para diferenciar estes dois compostos, pois não é encontrado no dept do sonderianol.

As estruturas do sonderianol e de seu derivado são semelhantes, porém alguns sinais demonstram suas diferenças estruturais como ligação dupla do C-16 do sonderianol em 119,8 ppm, que está ausente no espectro de RMN-¹³C do seu derivado. Outra diferença está relacionada ao C-14 do sonderianol em 146,6 ppm no RMN-¹³C que não pode ser observado no Dept pois se trata de um carbono quaternário. Por outro lado no derivado do sonderianol, por apresentar um carbono terciário mostra um sinal em 110,5 ppm

Figura 19 - Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 07-16.

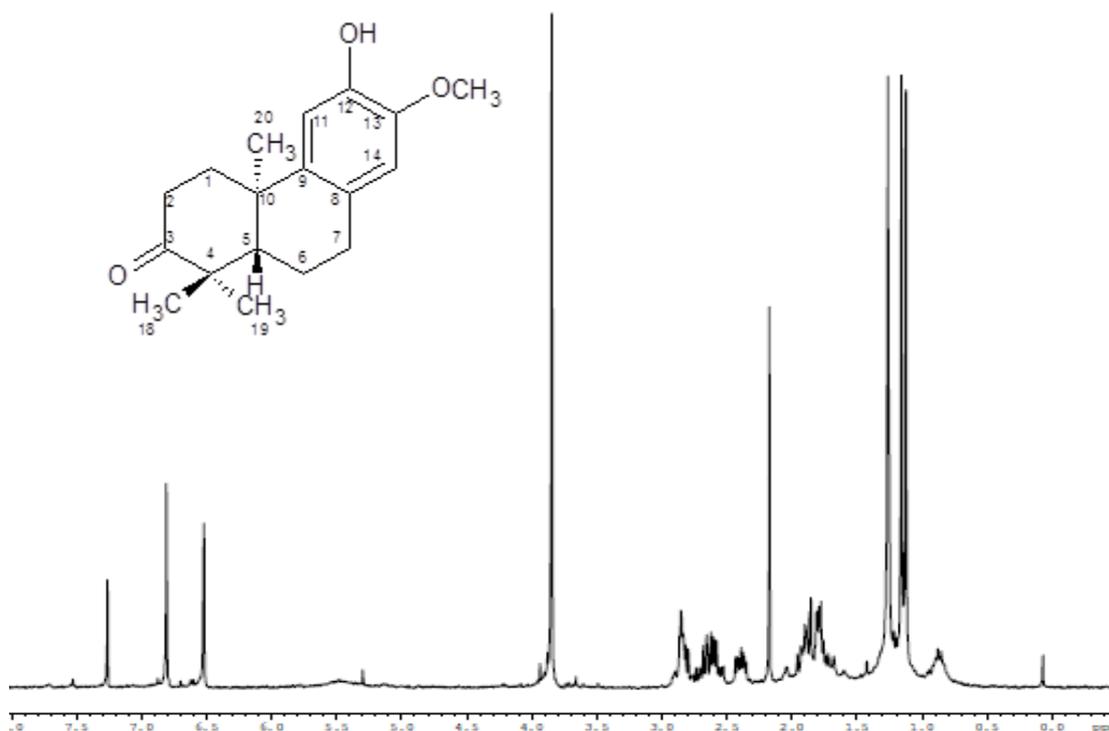


Figura 20 - Espectro de RMN-¹³C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 07-16.

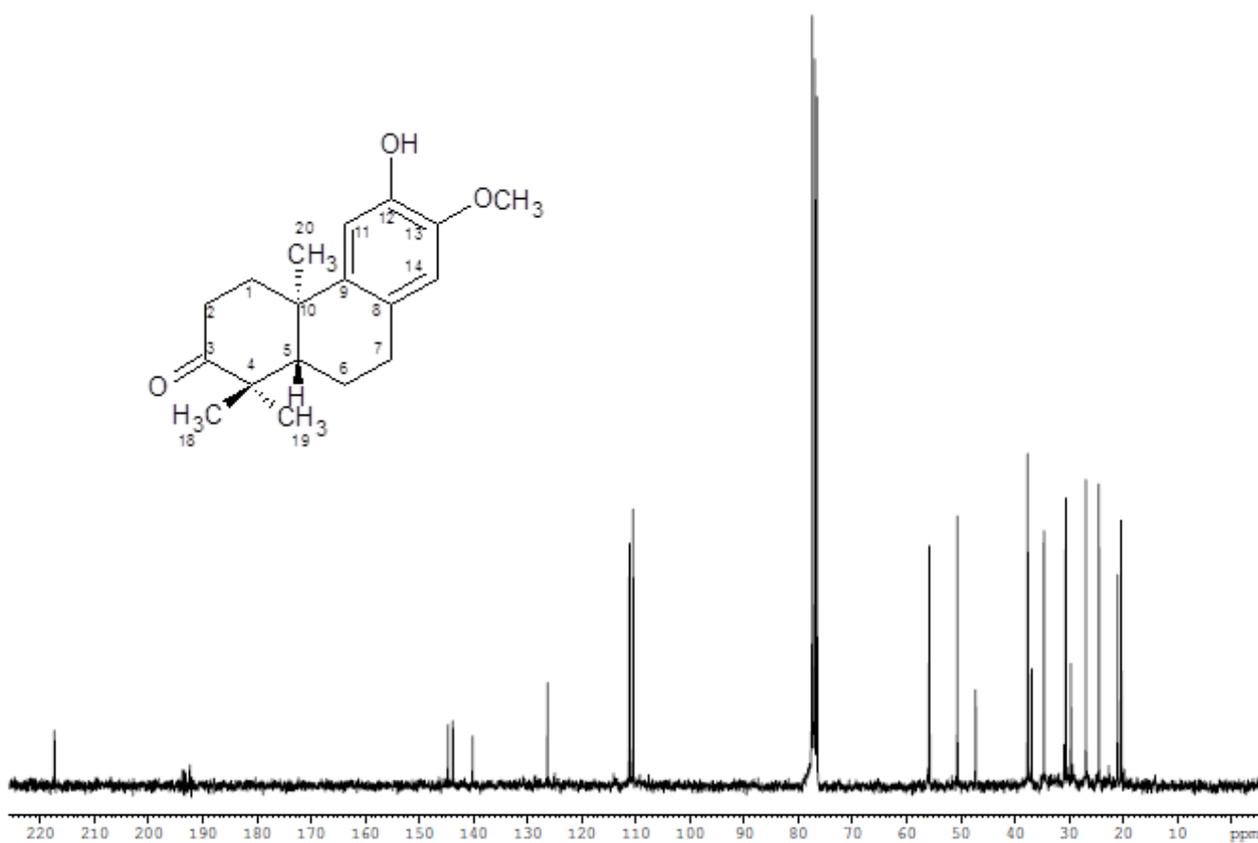


Figura 21 - Espectro de RMN-¹³C/Dept (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 07-16.

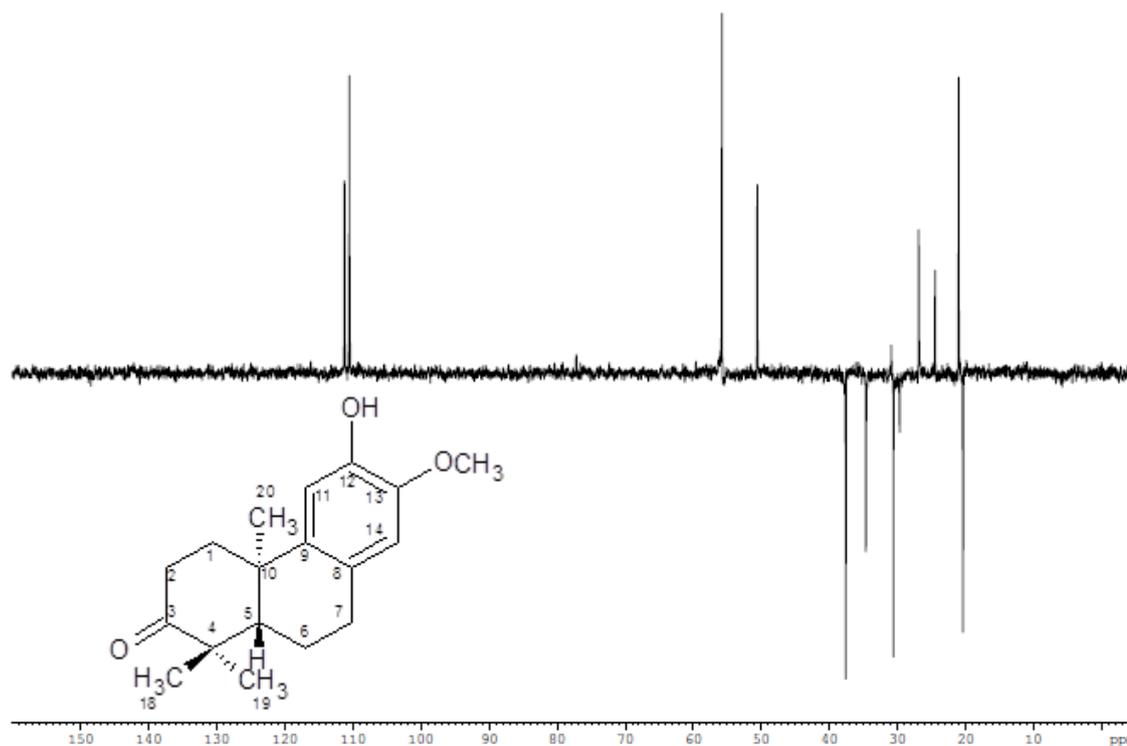
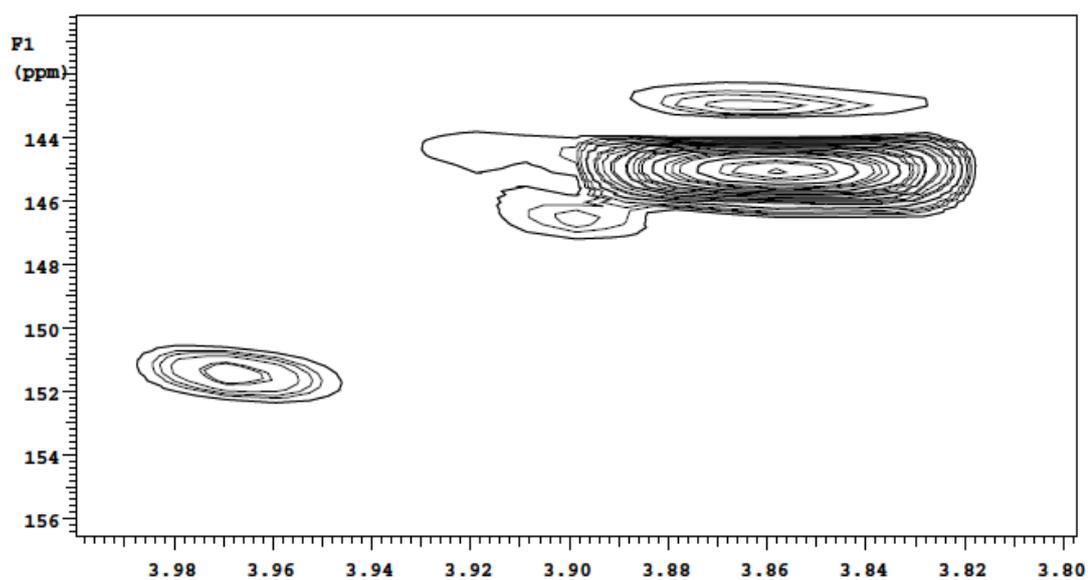


Figura 22 - Espectro de HMBC (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMC 17-36.



Os dados que evidenciam a posição do grupo metóxi no anel aromático são os cruzamentos dos sinais no espectro de HMBC (figura 22). Neste espectro, é possível observar a interação dos hidrogênios do grupo metóxi na região de 3,85

ppm com o C-12 e C-13 em 143,8 e 144,7 ppm, respectivamente. A interação mais forte entre estes hidrogênios com o C-13, sugere a provável ligação do grupo metóxi com este carbono.

Esta substância já foi previamente isolada dos galhos e folhas desta espécie vegetal, porém não foram realizados estudos farmacológicos para avaliar seus efeitos biológicos (LIU et al., 2007).

Tabela 4. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^1H e ^{13}C para o AMC 17-36 e dados da literatura.

nC	$\delta^{13}\text{C}$	gHSQC	gCOSY	gHMBC	$\delta^{13}\text{C}$ (lit.)*
		$\delta^1\text{H}$ (m, J em Hz)	$^1\text{Hx}^1\text{H}$	$^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$	
1	37,6/CH ₂	2,40 (<i>ddd</i> ; 13,2; 7,5; 4,2)	H1a; H2		38,8 (CH ₂)
		1,87 (<i>m</i>)	H1b; H2		
2	34,6/CH ₂	2,63-2,51 (<i>m</i>)	H1a; H1b	C3	35,5 (CH ₂)
3	217,3/C	-	-		220,2 (-)
4	47,3/C	-	-		48,4 (-)
5	50,7/CH	1,88 (<i>m</i>)	-		52,1 (CH)
6	20,4/CH ₂	1,80-1,70 (<i>m</i>)	H7		21,5 (CH ₂)
7	30,6/CH ₂	2,87-2,79 (<i>m</i>)	H6	C8	31,5 (CH ₂)
8	126,3/C	-	-		127,9 (-)
9	140,2/C	-	-		141,0 (-)
10	36,9/C	-	-		38,0 (-)
11	111,2/CH	6,81 (<i>s</i>)	-	C10, C13, C8	113,1 (CH)
12	143,8/C	-	-		147,2 (-)
13	144,7/C	-	-		145,7 (-)
14	110,5/CH	6,52 (<i>s</i>)	-	C7, C12, C9	112,6 (CH)
18	26,9/CH ₃	1,16 (<i>s</i>)	-	C19	27,4 (CH ₃)
19	21,0/CH ₃	1,13 (<i>s</i>)	-	C3, C4, C5, C18	21,4 (CH ₃)
20	24,5/CH ₃	1,27 (<i>s</i>)	-	C9	24,9 (CH ₃)
OMe	55,8/CH ₃	3,85 (<i>s</i>)	-	C13, C12	56,3 (CH ₃)
Solvente	CDCl ₃	CDCl ₃		CDCl ₃	CDCl ₃

Fonte: LIU et al., 2007.

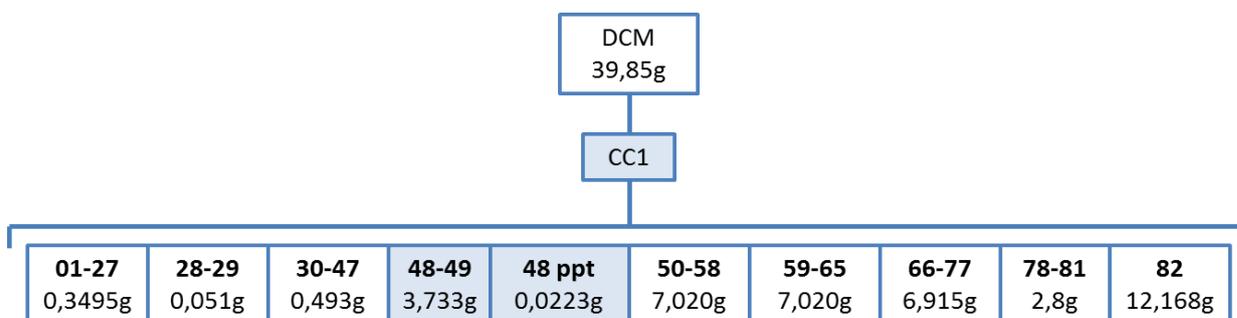
5.4 Identificação da substância AMEUF 489

O intuito de trabalhar com as folhas foi de caracterizar a composição química desta planta e isolar substâncias já conhecidas e destas desvendar suas propriedades químicas, assim auxiliando nos estudos farmacológicos.

Da extração de 1,5kg das folhas desta planta com o solvente metanol resultou em 73,698g de extrato bruto. Posteriormente este foi ressuspendido em etanol:água (7:3) e submetido à partição líquido-líquido utilizando solventes com aumento de polaridade resultando na fração de H (6,70g) , fração de DCM (39,85g) e fração de AcOEt (11,3g). Por apresentar maior rendimento e com o intuito de isolar substâncias apolares, o extrato que foi escolhido para a purificação foi o de DCM.

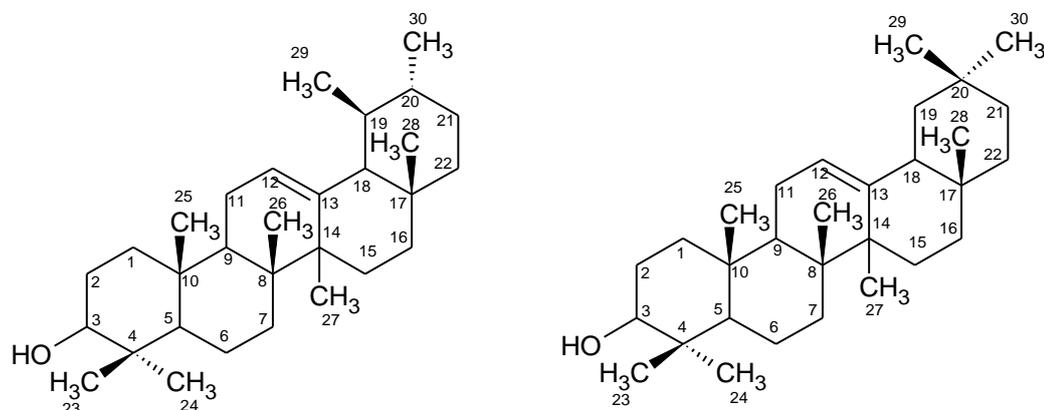
A fração de DCM foi submetida à cromatografia aberta utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel H com aumento gradativo de polaridade com o incremento de AcOEt. As frações coletadas foram monitoradas utilizando-se CCD. A partir do procedimento cromatográfico foram coletadas 82 frações agrupadas por semelhança de perfil cromatográfico (Figura 23).

Figura 23 - Esquema de purificação da coluna cromatográfica 1.



A substância denominada 48 (22,3 mg) por apresentar formação de cristais foi submetida à lavagem utilizando acetona que a partir da filtração possibilitou a obtenção de uma substância pura por apresentar uma única mancha quando observada por CCD. Esta substância denominada previamente como **AMEUF489** foi encaminhada à análise espectral de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , Dept. Posteriormente os dados do composto foram comparados com os da literatura e com padrões previamente isolados, tratando-se da mistura do triterpeno α,β -amirina (Tabela 5) (Figura 24).

Figura 24 – Estrutura molecular da mistura de triterpeno α,β -amirina respectivamente.



O espectro de RMN- H^1 (Figura 25) mostra a presença de um dubleto em 5,2-5,3 ppm atribuído ao hidrogênio da dupla ligação no C-12 os quais são observados no RMN- C^{13} (Figura 26) do C-12 (121,6-124,3 ppm) e C-13 (139,5-145,1 ppm). Outro sinal importante do RMN- C^{13} encontra-se em 79 ppm pertencente ao C-3, característico de carbono ligado a hidroxila, este sinal também pode ser observado no Dept, (Figura 27) indicando um carbono terciário.

Figura 25 - Espectro de RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) do AMEUF489.

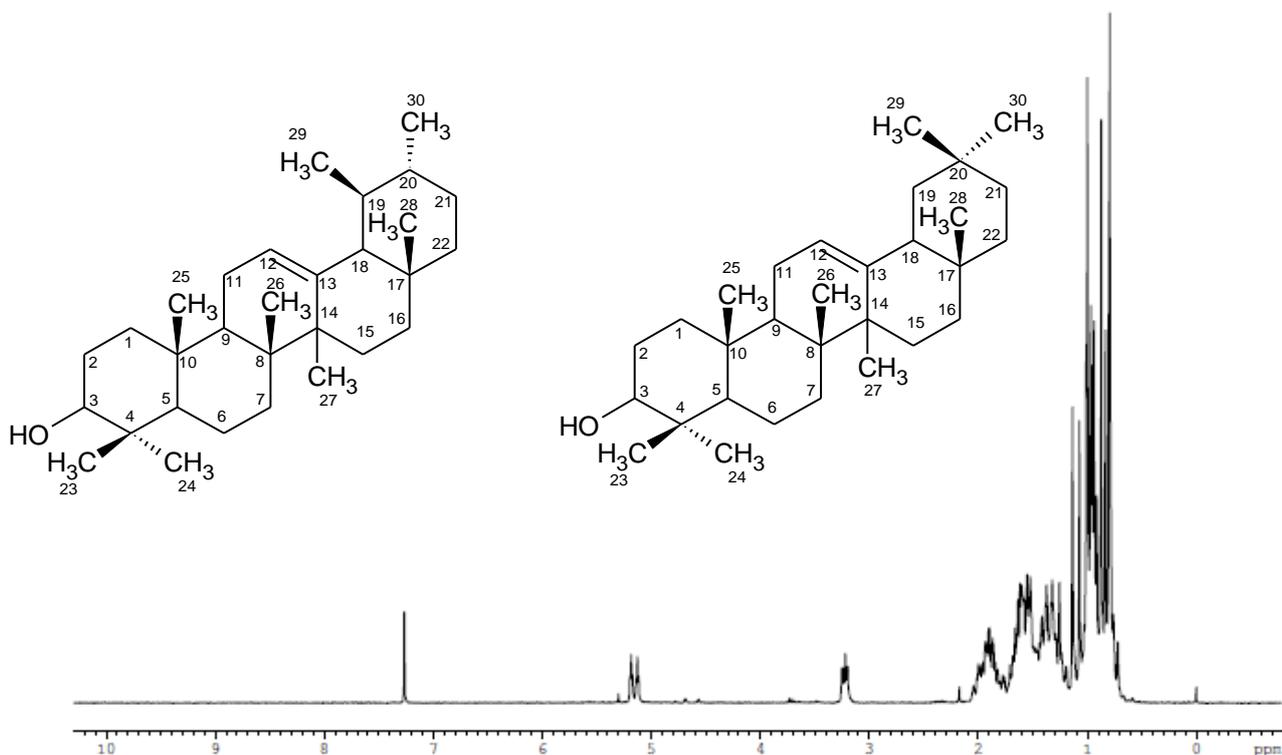


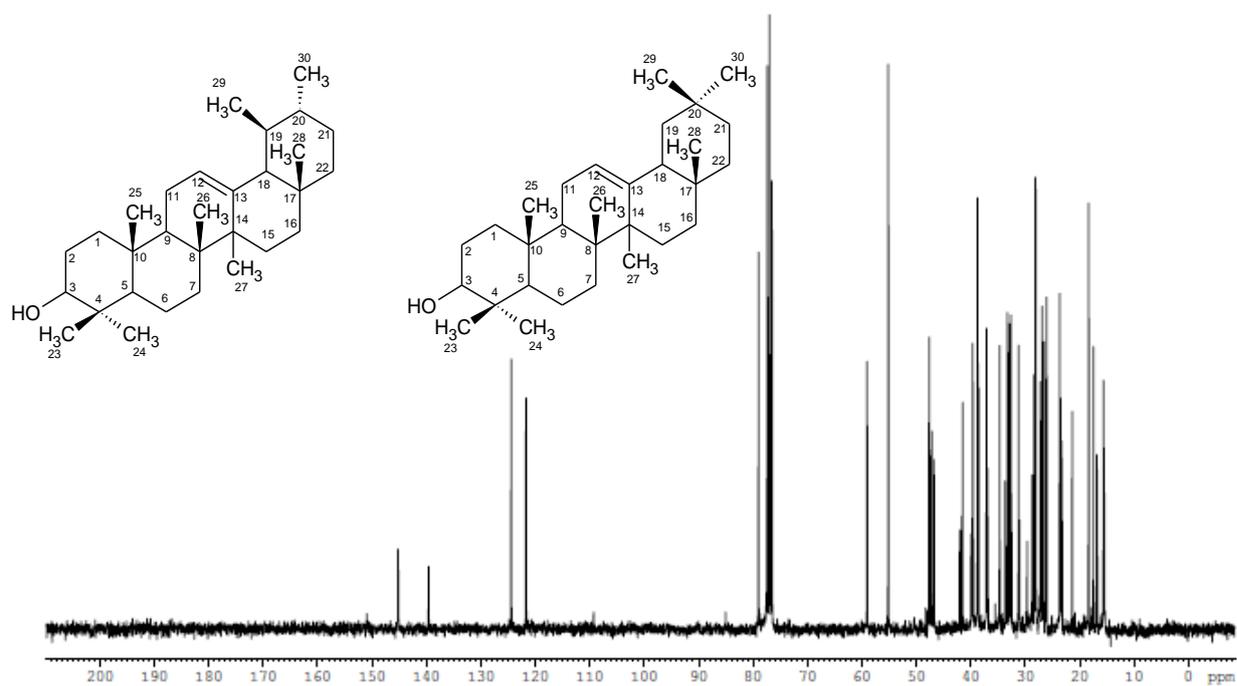
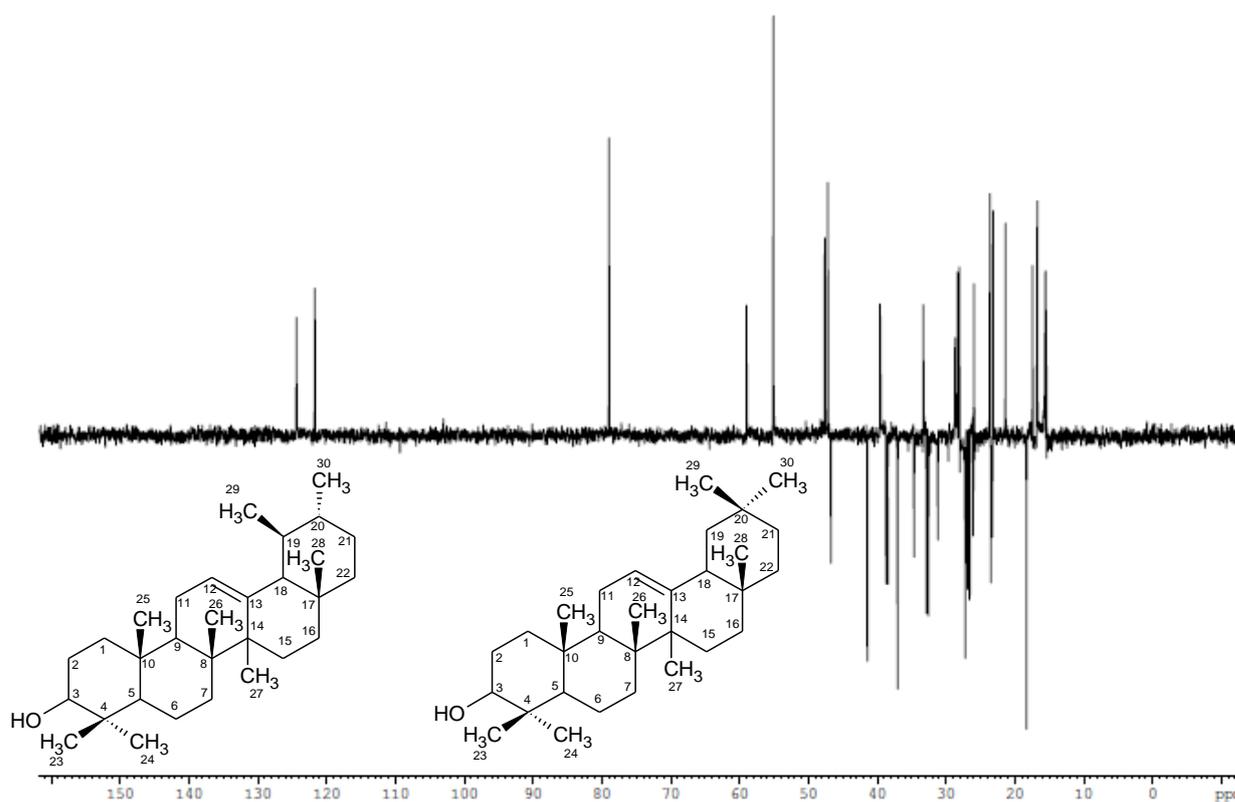
Figura 26- Espectro de RMN-¹³C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMEUF489.**Figura 27 -** Espectro de RMN-¹³C/Dept (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMEUF489.

Tabela 5. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o AMEUF489 e dados da literatura para 3 β -OH amirina e 3 α -OH amirina.

Posição	AMEUF489	3 β -OH	3 α -OH
		β -amirina ^{13}C δ	α -amirina ^{13}C δ
1	38,7 (CH ₂)	38,7	38,7
2	27,2 (CH ₂)	27,3	27,2
3	79,0 (CH)	79,0	78,3
4	38,5 (-)	38,8	38,7
5	55,1 (CH)	55,3	55,2
6	18,3 (CH ₂)	8,5	18,3
7	32,8 (CH ₂)	32,8	32,9
8	39,5 (CH)	38,8	40,0
9	47,7 (-)	47,7	47,7
10	36,8 (CH)	37,6	36,9
11	23,6 (CH ₂)	23,0	23,3
12	121,6-124,3 (CH)	121,8	124,3
13	139,5/145,1 (-)	145,1	139,3
14	41,4 (-)	41,8	42,0
15	26,8 (CH ₂)	26,2	28,7
16		27,0	26,6
17		32,5	33,7
18	47,5-59,0 (CH)	47,4	58,9
19	39,6 (CH)	46,9	39,6
20	31,2-39,5 (CH)	31,1	39,6
21	34,7 (CH ₂)	34,8	31,2
22	41,5 (CH ₂)	37,2	41,5
23	28,7 (CH ₃)	28,2	28,1
24		15,5	15,6
25	15,4-15,6 (CH ₃)	15,6	15,6
26	16,7 (CH ₃)	16,9	16,8
27	23,5 (CH ₃)	26,0	23,3
28	28,3 (CH ₃)	28,4	28,1
29	17,4 (CH ₃)	33,3	17,4
30	21,3-23,6 (CH ₃)	23,7	21,3

*BITTENCOURT, 2003.

As frações (39-47, 471 sobrenadante, 48-57) foram avaliadas por CCD

utilizando padrão autêntico das substâncias previamente isoladas desta espécie vegetal e exibiram a presença da mistura de triterpenos α,β -amirina porém com certo grau de impureza, necessitando de futura purificação.

Esta substância trata-se de um triterpeno, classe química que ocorre naturalmente em plantas superiores possuindo comprovadas propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetor, e anti-alérgica (SOLDI, et al., 2008).

Estudos demonstraram que a mistura de α,β -amirina apresenta atividade anti-inflamatória e atividades gastro protetoras, em camundongos e ratos (OLIVEIRA et al., 2004).

Outro estudo mostrou um efeito protetor da mistura α,β -amirina contra lesões hepáticas provocadas pelo paracetamol quando avaliada em camundongos (OLIVEIRA et al., 2005).

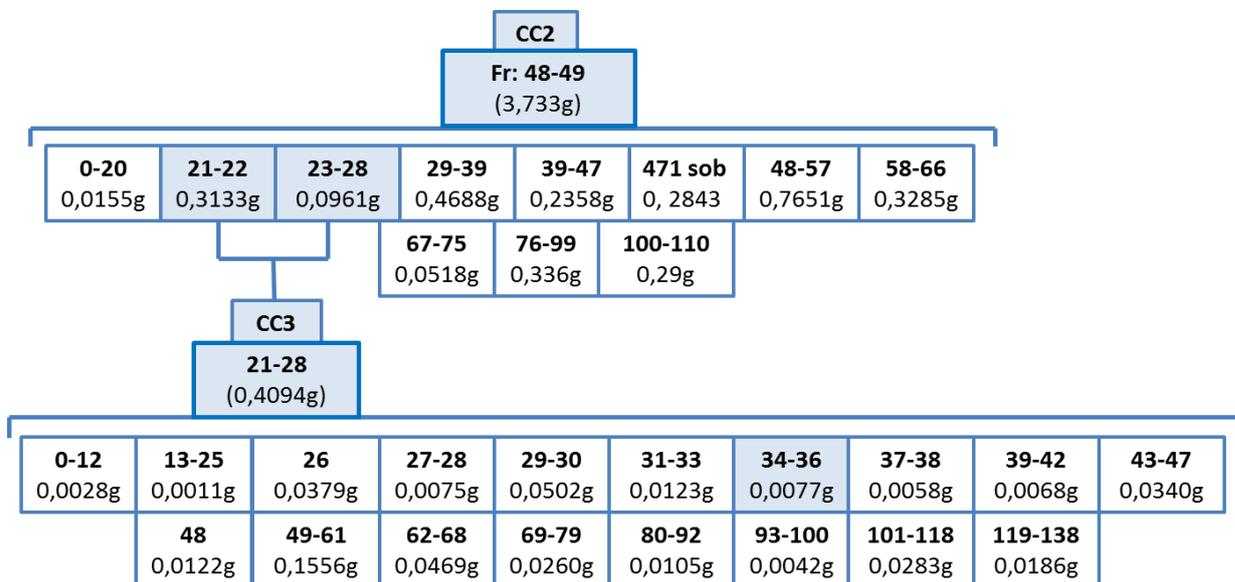
O sobrenadante obtido da fração 48-49 (3,733g) da primeira coluna foi submetida ao processo de lavagem e que resultou na obtenção de mais precipitado isolado anteriormente identificado posteriormente como sendo a mistura de triterpenos α,β -amirina. O restante desta fração que se apresentava com pequena contaminação foi submetida á purificação, onde foi ressuspensa em clorofórmio para a preparação da pastilha em sílica gel e submetida à cromatografia em coluna utilizando-se como fase móvel H: AcOEt, com polaridade crescente, iniciando com H 100%, passando por H: AcOEt 99:1, 98:2, 95:5, 70:30 e finalizando com AcOEt 100%.

Ao longo do procedimento, a coluna cromatográfica totalizou 110 frações que foram reagrupadas através da análise por CCD por semelhança do perfil cromatográfico. As frações (39-47, 471 sobrenadante, 48-57) foram avaliadas por CCD utilizando padrão autêntico das substâncias previamente isoladas desta espécie vegetal onde as mesmas revelaram conter nas frações a α,β -amirina.

As frações (21-22 e 23-28) quando analisadas por CCD apresentaram grande quantidade da mistura de triterpenos α,β -amirina reveladas pela intensidade da mancha desenvolvida na cromatoplaça, sendo assim as mesmas foram agrupadas para que fosse realizado mais um procedimento cromatográfico com intuito do isolamento. A fração (21-28) (0,4094 g) foi ressuspensa em clorofórmio para a preparação da pastilha e submetida à cromatografia em coluna utilizando-se como fase móvel H: AcOEt, com polaridade crescente, iniciando com H 100%, H: AcOEt

98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, finalizando com AcOEt 100%, totalizando 138 frações como mostra a figura 28.

Figura 28 - Esquema de purificação da CC2 e CC3 das folhas.



Ao longo do procedimento, a coluna cromatográfica totalizou 138 frações que foram reagrupadas. A fração 34-36 obtida desta coluna (0,077g) que foi analisada por cromatografia em camada delgada com padrão da mistura de triterpenos α,β -amirina onde pode-se confirmar a presença desta substância impura também nesta fração, porém estas não foram posteriormente purificadas.

5.5 Identificação da substância AMEUF79

Com o intuito de obter maiores quantidades de outro triterpeno de interesse (α,β -amirinona) para os ensaios biológicos, uma nova coluna cromatográfica foi realizada a partir de frações enriquecidas deste triterpeno obtidas pela acadêmica do mestrado de Ciências farmacêuticas da Univali, Vanessa D. Claudino.

A fração enriquecida (66,30 g) foi submetida à purificação utilizando coluna cromatográfica aberta, sílica gel 60 como fase estacionária e como fase móvel n-hexano com aumento gradativo de polaridade pelo uso de acetato de etila e finalizando com etanol. Foram coletadas 52 frações de 200 mL que foram avaliadas por CCD. A fração 9-40 (18,72 g) por apresentar o composto de interesse foi recromatografada utilizando sílica gel e mistura de H: AcOEt como eluente. O procedimento cromatográfico rendeu 35 frações (Figura 29) A fração denominada

previamente como **AMEUF79** (100 mg) por apresentar o mesmo fator de retenção da mistura de triterpenos α,β -amirinona na análise por CCD foi submetida á análise espectral e os dados obtidos desta análise estão representados na tabela 6.

Figura 29 – Esquema de purificação fração enriquecida de DCM das folhas.

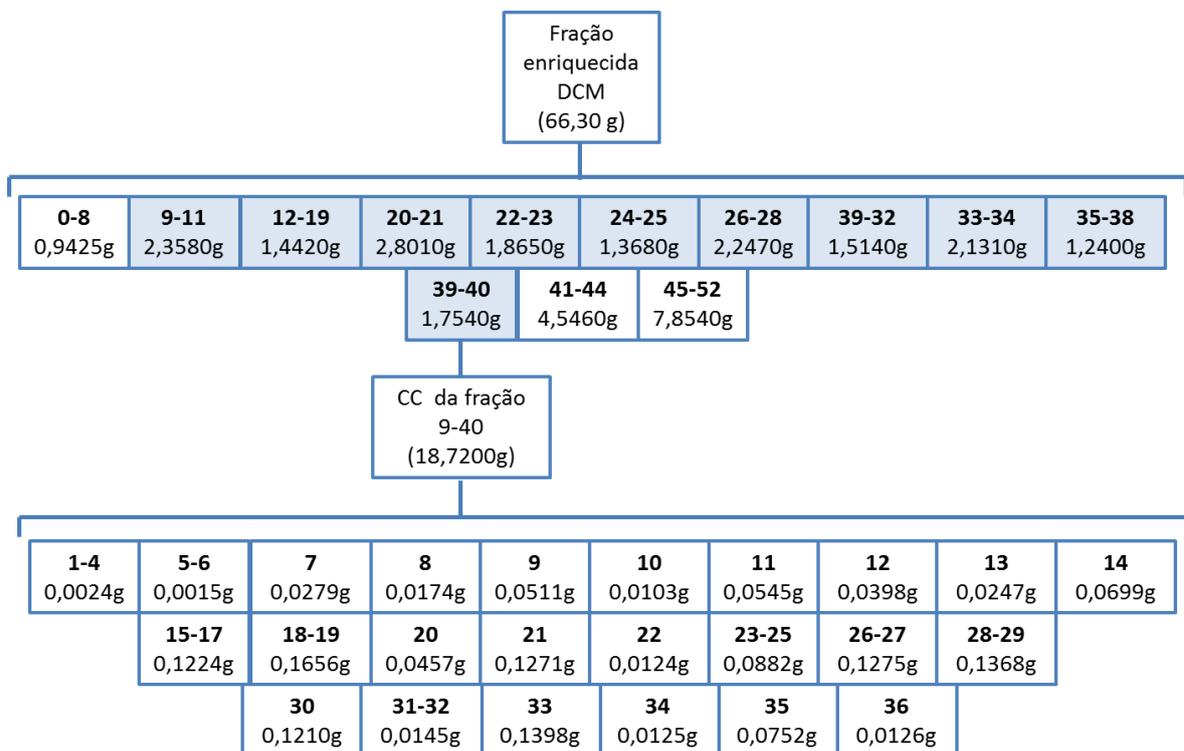
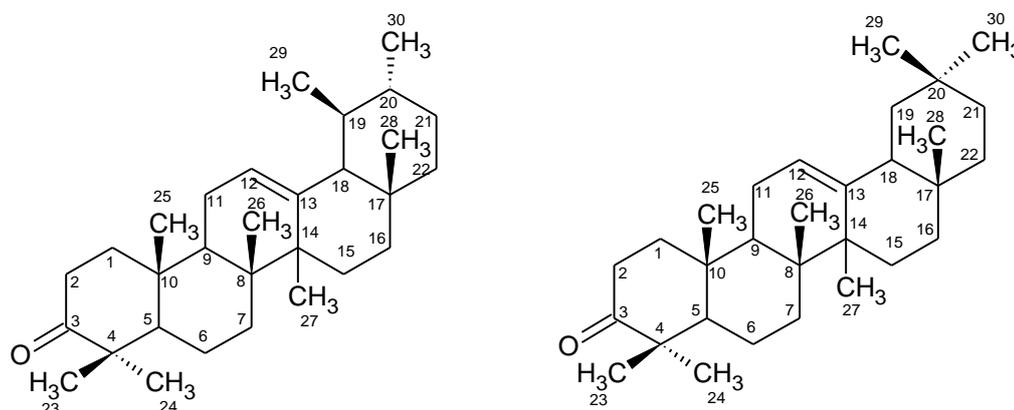


Figura 30 – Estrutura molecular do triterpeno α,β -amirinona, respectivamente.



Pode ser observado no espectro de RMN-¹H (Figura 31), um simpleto em 4,7 ppm característicos de dupla ligação, qual encontra-se no C-12 e C-13, os quais são observados no RMN-¹³C (Figura 32) em C-12 (125,4) e C-13 (138,4). Outro sinal

importante do RMN- C^{13} encontra-se em 217,8 ppm pertencente ao C-3, característico de carbono da carbonila. Os sinais no Dept, (Figura 33) também caracterizam esta estrutura.

Figura 31 - Espectro de RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) do AMEUF79.

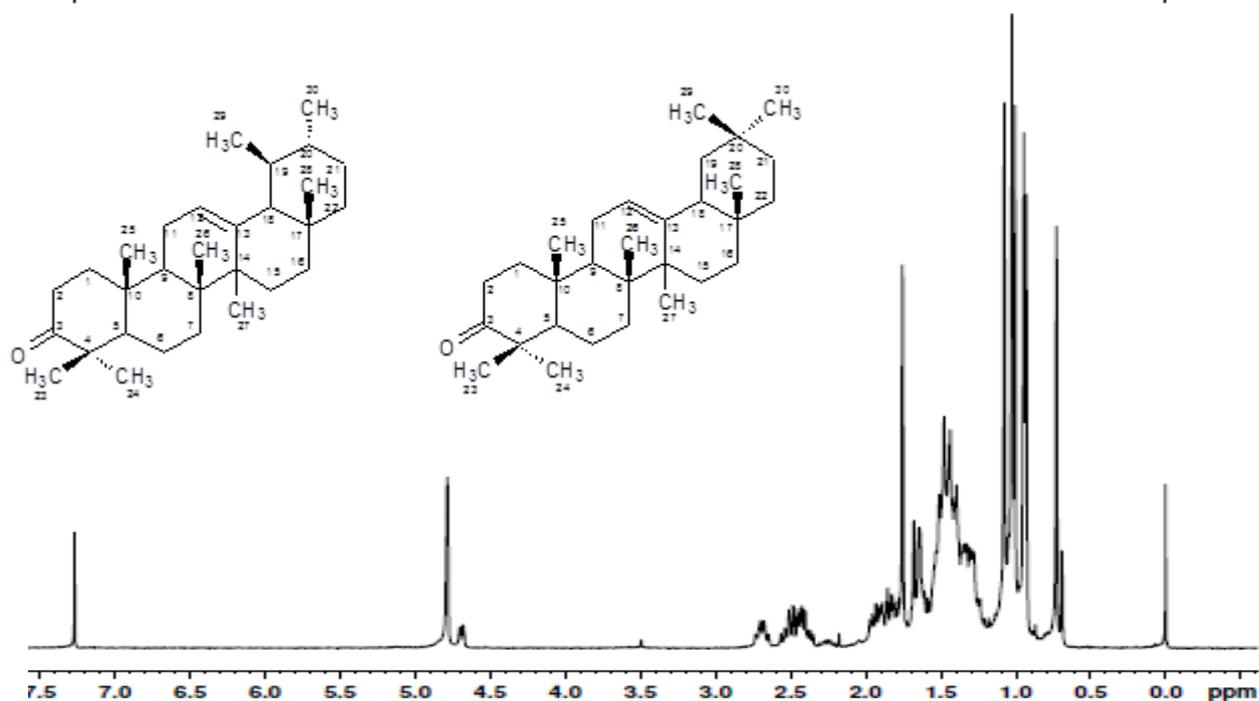


Figura 32 - Espectro de RMN- ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3/TMS$) do AMEUF79.

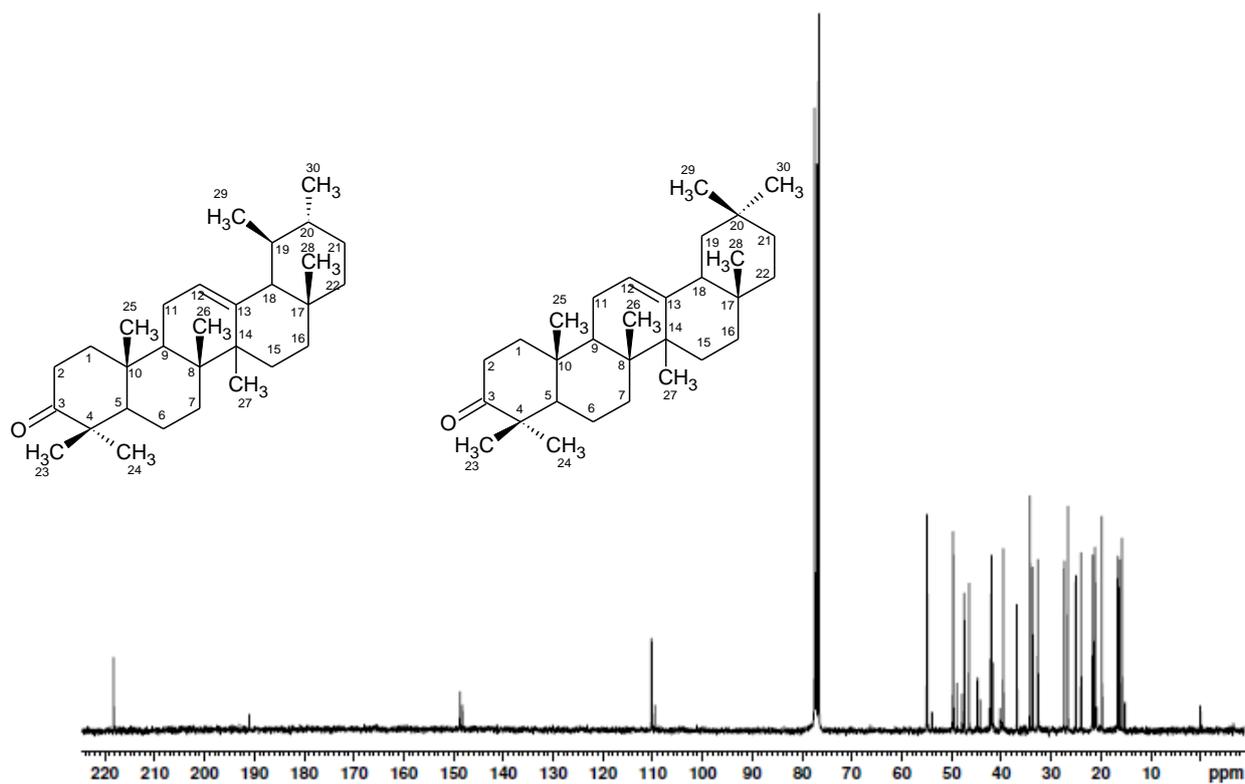
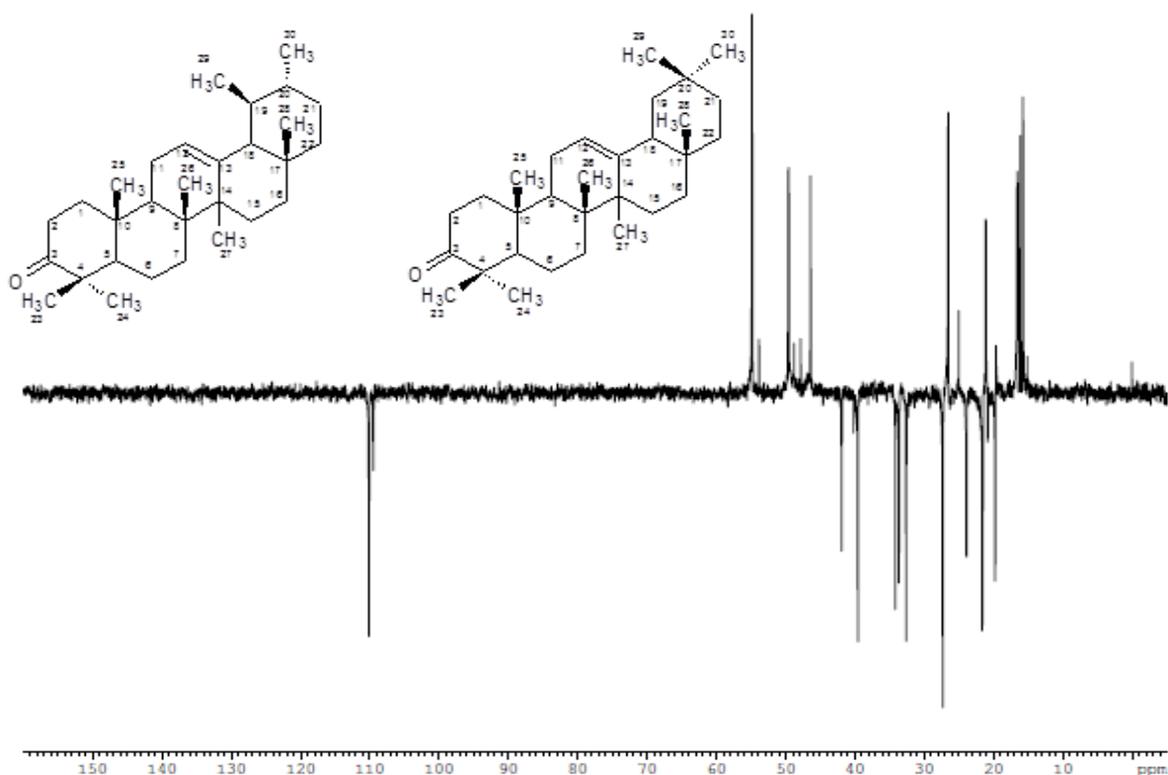


Figura 33 - Espectro de RMN-¹³C/Dept (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) do AMEUF79.

Os dados espectroscópicos do AMEUF79 e comparação com o padrão autêntico da mistura de α,β -amirinona confirmam a estrutura desta substância.

É válido ressaltar que apesar dos triterpenos isolados serem comumente encontrados em plantas superiores são consideradas substâncias apolares que contribuem para a atividade analgésica e anti-inflamatória observada para o extrato obtido a partir das folhas de *A. moluccana*. Estudos em nossa instituição estão sendo conduzidos para avaliação de seu potencial anti-inflamatório e como anti-acetilcolinesterase agindo sobre o sistema nervoso central, desta forma o presente isolamento contribuirá para a continuidade destes estudos.

Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos (δ , ppm) de RMN ^{13}C para o AMEUF79 e dados da literatura para 3 oxo- β - amirinona e 3 oxo- α - amirinona.

Posição	RMN- ^{13}C AMEUF79	de RMN- ^{13}C do 3- oxo; 28-COOCH $_3$ β -amirinona*	RMN- ^{13}C do 3- oxo; 28-COOCH $_3$ α -amirinona*
1	39,4	39,1	39,4 (CH $_2$)
2	34,7	34,1	34,2 (CH $_2$)
3	217,3	217,6	217,8 (-)
4	47,4	47,4	47,4 (-)
5	55,2/ 55,3	55,3	55,4 (CH)
6	19,6	19,6	19,7 (CH $_2$)
7	32,5	32,2	32,6 (CH $_2$)
8	39,3	39,3	39,1 (-)
9	46,7/46,8	46,0	46,8 (CH)
10	36,6/36,6	36,7	36,6 (-)
11	23,5/23,1	23,0	23,6 (CH $_2$)
12	124,1/121,5	122,1	125,4 (CH)
13	139,7/145,2	143,8	138,4 (-)
14	42,0/41,9	41,8	42,2 (-)
15	28,8/26,5	27,7	28,1 (CH $_2$)
16	26,1/26,9	23,5	24,3 (CH $_2$)
17	33,7/32,4	46,7	48,2 (-)
18	59,1/47,3	41,4	53,0 (CH)
19	39,6/46,9	45,8	39,0 (CH)
20	39,5/31,2	30,6	38,9 (CH)
21	34,7	33,8	30,7 (CH $_2$)
22	37,1/41,5	32,3	36,7 (CH $_2$)
23	25,6	26,4	26,6 (CH $_3$)
24	21,5	21,4	21,5 (CH $_3$)
25	15,4/15,2	14,9	15,2 (CH $_3$)
26	16,7/16,8	16,7	16,9 (CH $_3$)
27	23,5/25,9	25,8	23,5 (CH $_3$)
28	28,1/28,4	-	78,0 (CH $_3$)
29	17,5/33,3	33,0	17,1 (CH $_3$)
30	21,4/23,6	23,6	21,2 (CH $_3$)
Solvente	CDCl $_3$	CDCl $_3$	CDCl $_3$

*BITTENCOURT, 2003

Portanto das folhas foram isolados os compostos triterpenoides α,β -amirina e α,β -amirinona, sendo que o primeiro triterpeno apresenta ação anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetor e antialérgica, já o segundo triterpeno não foi encontrados dados na literatura para elucidação de sua atividade biológica.

É previsto que, em 2014, a UNIVALI e a empresa Eurofarma lancem o primeiro fitoterápico analgésico e anti-inflamatório de uso oral totalmente desenvolvido no Brasil. Os primeiros testes realizados em camundongos, surpreenderam os pesquisadores, efeito do componente encontrado no pó das folhas, foi 16 vezes mais potente do que a aspirina (BAZI, 2012).

Nos testes realizados o medicamento não apresentou nenhuma reação adversa à saúde até agora. Os testes finais estão sendo realizados em humanos, a primeira fase já foi concluída, sendo que cem pessoas se submeteram ao teste de segurança e o medicamento não apresentou nenhum grau de toxicidade (BAZI, 2012).

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *A.moluccana* confirmou a composição rica em terpenos característica do gênero através da purificação do extrato de hexano obtido das cascas, sendo o ácido acetil aleuritólico o constituinte majoritário, este tendo como atividade biológica anti-inflamatório, analgésico e antibacteriano. Também foi possível o isolamento do Sonderianol, composto com atividade antitumoral, comprovando o seu uso medicinal pela população, descrito pela primeira vez na família Euphorbiaceae estimulando a continuação das investigações fotoquímicas deste gênero. Outro composto isolado neste estudo foi um derivado do sonderianol, descrito pela primeira vez na família Euphorbiaceae, porém sem estudos biológicos.

Estudos conduzidos com as folhas resultaram no isolamento de duas substâncias já descritas na literatura, a mistura de triterpenos α,β -amirina e α,β -amirinona, sendo na parte apolar do extrato que contribui para atividades biológicas como analgésica e anti-inflamatória, demonstrando a importância dos estudos realizados.

Estes estudos realizados com as folhas e cascas de *A. moluccana* tem se demonstrado de extrema importância terapêutica, pois comprovam seu uso popular. O que também demonstra sua importância é a patente criada entre pesquisadores da UNIVALI e a indústria de medicamentos Eurofarma, que está desenvolvendo um medicamento fitoterápico à partir desta planta.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, 2001.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V. T.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. F.; SILVA-FILHO, R.N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 62-67, 2004.
- BARREIRO, E.; BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 679-88, 2009.
- BAZI, A. P. A cura nas plantas. **Abstract**, n.15, p. 10-14, 2012.
- BITTENCOURT, C. M. S. **Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare***. 2003. 179f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2009.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.
- CESCA, T.G.; FAQUETI, L.G.;ROCHA, L.W.; MEIRA, N.A.; MEYRE-SILVA, C.; SOUZA, M.M.; QUINTÃO, N.L.M.; SILVA, R.M.L.; FILHO, V.C.; BRESOLIN, T.M.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: Semisolid herbal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 355-362, 2012a.
- CESCA, T. G.; BLOCK, L. C.; MACHADO, M. S.; WITTKOWSKI, C; MEYRE-SILVA, C; SOUZA, M. M; QUINTÃO, N. L. M; SILVA, R. M. L; SILVA, D. B; FERNANDES, E; FERREIRA, L. S; LOPES, N. P;CECHINEL FILHO, V; BRESOLIN, T.M.B. Validation of the Stability-Indicating HPLC Method for the Major Flavonoids in Spray- Dried Leaf Extract of *Aleurites moluccana* L. Willd. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.8, n.2, p. 01-11, 2012b.
- CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 465, 2007.
- COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármaco com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual Química**, v.1, n.1, p. 57-66, 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. In comprehensive natural products. II chemistry and biology. **Editora Elsevier**, v. 3, p. 40, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleisthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**. v.21, p. 2571-2574, 1982.

DA-SILVA, D. B.; FERNANDES, E. F. A.; FERREIRA, L. S.; CALLEJON, D. R.; GUARATINI, T.; LOPES, J. N. C.; MEYRE-SILVA, C.; CECHINEL-FILHO, V.; LOPES, N. P. Megastigmanes from *Aleurites moluccana* (L.) Willd. (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 40, p. 34-37, 2012.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v.70, p.1621–1637, 2009.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. USA: CRC Press, p. 677, 1991.

ELEVITCH, C. R.; MANNER, H. I. *Aleurites moluccana* (kukui), 2006. **Species Profiles for Pacific Islands Agroforestry**, version 2.1, Disponível em : <<http://www.traditionaltree.org>>. Acesso em: 20/04/2011.

EVANS, W.C. **Trease & Evans Farmacognosia**. 13th. ed. Mexico: Interamericana, 1991.

EVANS, W.C. **Trease & Evans Farmacognosia**. 14 ed., WB Saunders Company: Londres, 1996.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. **Quimica Nova**, v.33, n.9, p.1829, 2010.

FOZDAR, B. I.; KHAN, S. A.; SHAMSUDDIN, T.; SHAMSUDDIN, K. M.; KINTZINGER, J. P. Aleuritin, a coumarinolignoid, and a coumarin from *Aleurites fordii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2459-2461, 1989.

GIL, R. A. S. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C.; GOMES, F. E. S.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. Solid-state ¹³C NMR and molecular modeling studies of acetyl aleuritolic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. **Journal of molecular structure**, v.885, p. 82-88, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRACE, M. H.; JIN, Y.; WILSON, G. R.; COATES, R. M. Structures, biogenetic relationships, and cytotoxicity of pimarane-derived diterpenes from *Petalostigma pubescens* **Phytochemistry**. v.67, p. 1708-1715, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, 1996.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Ed UFSC, p. 641-656, 2000.

HUI, W. H.; HOI, C. T. An Examination of the Euphorbiaceae of Hong-Kong. **Australian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 1675-1677, 1968.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; MORITA, H.; MOTIDOME, M. Diterpenes. **Phytochemistry**, v. 30, p. 4071-4073, 1991.

JACOB, V.; HAGAI, T.; SOLIMAN, K. Structure-Activity Relationships of Flavonoids. **Current Organic Chemistry**, v. 15, n. 15, p. 2641-2657, 2011.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. **Molecules**. v.14, p. 2016-2031, 2009.

JUSTO, O. R.; HABER-PEREZ, V.; VIANA, C. O.; ALEGRE, R. M. Effect of the precursor addition on the anticancer alkaloid production using experimental design methodology. **Química Nova**,v.32, n.6, 2009.

KAITIN, K. I. Deconstruction the drug development process: the new face of innovation. **Nature**, v. 87, n. 3, p. 356-361, 2010.

KINGSTON, D. G. I; Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

KUSTER, R. M. Título. In: ROCHA, L. M.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: Ed UFSC, 2000.

KUSTER R. M.; In ROCHA, L. M.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Ed UFSC, 2003.

LIU, H.; LI, S.; ZHAO, Y.; HAO, X.; LI, J.; HUA, Y.; XIE, B.; QING, C.; CHEN, C. Four new podocarpane-type trinoditerpenes from *A. moluccana*. **Helvetica Chimica Acta**, v.90, p. 2017-2023, 2007.

LIU, H.; DI, Y.; YANG, J.; TENG, F.; LU, Y.; NI, W.; CHEN, C.; HAO, X. Three novel 3,4-seco-podocarpane trinorditerpenoids from *A. moluccana*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p.5150-5151, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. G.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do centro de biologia da reprodução**, Juiz de fora, v. 27, n. 1/2, 2008.

MAIER, M. E. Structural revisions of natural products by total synthesis. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 1105-1124, 2009.

MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V. Considerações Gerais sobre Aspectos Químicos e Biológicos de Plantas Medicinais. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Organizadores) **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p. 417, 2010.

MATHABE, M. C.; HUSSEIN, A. A.; NIKOLOVA, R. V.; BASSON, A. E.; MEYER, J. J. M.; LALL, N. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys Africana*. **Journal of Ethnopharmacology**,v.116, p.194-197, 2008.

MATOS, D. C. S.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, R. M. L.; CECHINEL-FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. Assay of total flavonoids in dried extract of *Aleurites moluccana*.**Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, n.2, p.213-219, 2011.

MEINWALD, J. Natural Products as Molecular Messengers. **Journal of Natural Products**. v.74, p. 305-309, 2011.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7 ed. Florianópolis: Ed UFSC, p.517-544, 2000.

MEYRE-SILVA, C.; MORE, T. C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.16, n.3, p.169-172, 1997.

MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves (L.) Willd. **Phytomedicine**, v. 5, n.2, p.109-113, 1998.

MEYRE-SILVA, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DAL MAGRO, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Isolation of a C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. **Planta Medica**, v. 65, n. 3, p. 293-294, 1999.

MISRA, D. R.; KHASTGIR, H. N. Chemical investigation of *Aleurites moluccana* and the structure of Aleuritolic acid - a new triterpene acid. **Tetrahedron**, v.26, n.12, 3017-3021, 1970.

MONTEIRO, J. M; ALBUQUERQUE, U. P; ARAÚJO, E. L; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, 2005.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: Abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Organizadores) **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p. 08-11, 2010.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Triterpenos e sua importância químico-medicinal. In: **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, p. 257-278, 2010.

NONAKA, G.; HAYASHI, M.; TANAKA, T.; SAIJO, R.; NISHIOKA, I. Isolation and characterization of cyanogenic ellagitannins, aleurinin A and B, and a related O-glycosidic ellagitannin, aleuritin C, from *Aleurites fordii* Hemsley. **Pharmacy Society**, v. 38, n. 4, p. 861-865, 1990.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JR, R. G.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v.49, p.105-111, 2004.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; CAVALCANTE, I. J.; LIMA, A.F.; LIMA-JR, R. C.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.103, 2005.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS, A. **Agroforestry Database**: a tree reference and selection guide version 4.0, 2009. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>>. Acesso em: 25/06/2012.

PEDROSA, R.C.; MEYRE-SILVA, C.; CECHINEL-FILHO, V.; BENASSI, J.C.; OLIVEIRA, L.F.S.; ZANCANARO, V.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R.A. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. **Phytotherapy Research**, v.16, p.1-4, 2002.

PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; RODRIGUES, M.; MORAIS, E. K. L.; MACIEL, M. A. M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.521-528, 2007.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.56, p. 223-226, 1997.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: USP, 2004.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabellii*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 553-559, 2007.

PIO CORREA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.5, p.294-295, 1984.

PRASAD, B. D.; KANTH, B. C.; BABU, B. R.; KUMAR, K. P.; SASTRY, V. G. Screening of wound healing activity of bark of *Aleurites moluccana* L. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**, v.1, p. 21-25, 2011.

QUINTÃO, N. L. M.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; ROCHA, L. W.; LUCINDA-SILVA, R. M.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties of a Standardized Dried Extract and Its Chemical Markers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2011, p. 10, 2011.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; BERBERT, P. A. Extraction yield of coumarin from guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) leaves subjected to different drying temperatures. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.3, 2012.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, 2008.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, p. 31-63, 2006.

SANTOS, R. I.; Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Ed UFSC, 2003.

SATYANARAYANA, P.; KUMAR, K. A.; SINGH, S. K.; RAO, G. N. A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 304-306, 2001.

SHAMSUDDIN, T.; RAHMAN, W.; KHAN, S. A.; SHAMSUDDIN, K. M.; KINTZINGER, T. Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. **Phytochemistry**, v.27, n.6, p.1908-1909, 1988.

SHOEB, M; Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh Journal Pharmacology** v. 1, n. 3, p. 35-41, 2006.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p.3377-3386, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, p.640, 2008.

STENGER, F. C.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C.; BRESOLIN, T. M. B.; RODRIGUES, C. A. Synthesis of Laurylchitosan and Its Use in the Separation of Flavonoids from *Aleurites moluccana* by Matrix Solid-Phase Dispersion. **Chromatographia Supplement**, v. 69, 2009.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Editora Elsevier**, v.9, p.297-304, 2006.

VILLALOBOS, M. J. P.; CASTELLANOS, E. C. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. **Grasas y Aceites**, v. 43, n. 1, p. 39-44, 1992.

WEBSTER, G. L. Classification of the euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 3-32, 1994.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, p.319, 2009.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.147-152, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: Ed UFSC, p.489-516 2000.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A; SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Ed UFSC, 2003.