

Artigo

Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidoscolus phyllacanthus*

Paula, A. C.; Melo, K. M.; da Silva, A. M.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; Santiago, G. M. P.; Lemos, T. L. G.*; Braz-Filho, R.; Militão, G. C. G.; da Silva, P. B. N.; da Silva, T. G.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (1), 231-241. Data de publicação na Web: 7 de janeiro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Constituents and Cytotoxic Activity of *Cnidoscolus phyllacanthus*

Abstract: The chemical reinvestigation of the hexane extract from stem bark of *Cnidoscolus phyllacanthus* allowed the isolation of 3 β -*O*-nanoyl lupeol (1), the mixture of 3 β -*O*-cinnamoyl lupeol (2) and 3 β -*O*-dihydrocinnamoyl lupeol (3), lupeol (4), the mixture of sitosterol (5) and stigmasterol (6), deoxofaveline (7) and faveline methyl ether (8). The structures of compounds were identified on the basis of their spectral data and by comparison with literature values. This is the first report involving the isolation of 3 β -*O*-nanoyl lupeol (1) from this species. Compounds 1, 7, 8 and the mixture of 2 and 3 were tested for their cytotoxic activity against the cell lines HL-60 (human pro-myelocytic leukemia), NCI-H292 (human lung carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma). Compound 7 was the most active among all, with IC₅₀ values ranging from 2.7 to 8.9 μ g/mL.

Keywords: *Cnidoscolus phyllacanthus*; Euphorbiaceae; terpenoids; faveline; Cytotoxic activity.

Resumo

A reinvestigação química do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidoscolus phyllacanthus* conduziu ao isolamento de 3 β -*O*-nanoil-lupeol (1), a mistura de 3 β -*O*-cinamoil-lupeol (2) e 3 β -*O*-diidrocinaoil-lupeol (3), lupeol (4), a mistura de sitosterol (5) e estigmasterol (6), deoxofavelina (7) e metil favelina (8). As estruturas dos compostos foram identificadas com base nos seus dados espectrais e por comparação com dados da literatura. Este é o primeiro relato de identificação de 3 β -*O*-nanoil-lupeol (1) nesta espécie. Os compostos 1, 7, 8 e a mistura de 2 e 3 foram testados quanto à sua atividade citotóxica contra as linhagens celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana), NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano). O composto 7 foi o mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de CI₅₀ variando de 2,7 a 8,9 μ g/mL.

Palavras-chave: *Cnidoscolus phyllacanthus*; Euphorbiaceae; terpenoides; favelina; Atividade citotóxica.

* Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, CEP 60021-940, Fortaleza-CE, Brasil.

✉ tlemos@dqoi.ufc.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20160015](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160015)

Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidoscolus phyllacanthus*

Anderson C. Paula,^a Karina M. Melo,^a André M. da Silva,^a Daniele A. Ferreira,^a Francisco J. Q. Monte,^a Gilvandete M. P. Santiago,^b Telma L. G. Lemos,^{a,*} Raimundo Braz-Filho,^c Gardênia C. G. Militão,^d Paulo B. N. da Silva,^d Teresinha G. da Silva^d

^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, CEP 60021-940, Fortaleza-CE, Brasil.

^b Universidade Federal do Ceará, Departamento de Farmácia, Rua Capitão Francisco Pedro N° 1210, Campus do Porangabussu, CEP 60430-370, Fortaleza-CE, Brasil.

^c Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Ciências Químicas - CCT, Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-600, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

^d Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rua Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife-PE, Brasil.

* tlemos@dqoi.ufc.br

Recebido em 3 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2016

1. Introdução

2. Material e Métodos

- 2.1. Procedimentos experimentais gerais
- 2.2. Material vegetal
- 2.3. Extração e isolamento dos constituintes
- 2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados
- 2.5. Ensaio de Citotoxicidade in vitro

3. Resultados e Discussão

4. Conclusões

1. Introdução

O gênero *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) compreende cerca de 50 a 75 espécies, distribuídas exclusivamente na América Tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil.¹

Cnidoscolus phyllacanthus (Mull. Arg.) Fern. Casas, conhecida popularmente como “favela”, “faveleiro”, “faveleira” ou “queimadeira”, é uma espécie nativa da caatinga do Nordeste brasileiro.² Suas folhas secas, cascas e ramos são muito usados na alimentação de caprinos, ovinos e asininos, e suas sementes fornecem um óleo fixo e uma

farinha com elevado teor proteico e mineral³ e sem toxicidade.⁴ Casos de intoxicação espontânea têm sido relatados em animais que comem essa planta, especialmente ramos recentemente cortados.⁵ Todas as suas partes são empregadas na medicina popular contra inflamações, dermatoses e para remover verrugas.² Estudos fitoquímicos desta espécie descreveram a ocorrência de aminoácidos⁶ e terpenoides.⁷⁻¹³

Estimativas da Organização Mundial de Saúde demonstraram que anualmente surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer com cerca de 8 milhões de mortes, tornando-se, em países desenvolvidos, a segunda causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares.¹⁴ No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer.¹⁵

Do total de 175 novos fármacos anticâncer utilizados na terapêutica no período de 1981 a 2010, 80% revelaram-se como produtos naturais ou como compostos sintéticos ou semissintéticos baseados em produtos naturais.¹⁶ Desta forma, a busca por novas terapias para esta enfermidade torna-se indispensável, sendo as plantas fontes ricas de novos fármacos para o tratamento e prevenção do câncer.

Este trabalho descreve os resultados obtidos da reinvestigação fitoquímica da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus*, bem como a avaliação da atividade citotóxica de 3 β -*O*-nanoi-lupeol (**1**), deoxofavelina (**7**), metil favelina (**8**) e a mistura de 3- β -*O*-cinamoil-lupeol (**2**) e 3- β -*O*-diidrocinamoil-lupeol (**3**).

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, modelo FP62, e não foram corrigidos. Os espectros na

região do IV foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, em pastilha de KBr. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, uni- 1D) e bidimensionais (2D), foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos DRX-500 e DPX-300, operando nas frequências de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13, respectivamente. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo 17-A, acoplado a cromatógrafo de gás-líquido Shimadzu, modelo GC-MS – QP5050A. Os espectros de massas de alta resolução foram registrados em espectrômetro modelo LCMS-IT-TOF, equipado com fonte de ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo. Nas cromatografias de adsorção em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 como fase estacionária. Na eluição cromatográfica usou-se os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em gradiente de crescente polaridade. As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre poliéster. A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em λ_{max} 254 e 365 nm, utilizando lâmpada, e/ou pela aspersão com solução de vanilina seguida de aquecimento. Nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizado um equipamento Shimadzu, com bomba modelo L201147 e um detector UV-Vis Shimadzu SPD – M20A. Nestas análises foi utilizada uma coluna de fase normal (LUNA 5u sílica) da Phenomenex (250 x 4,60 mm, 5 μ m), em um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Foi empregada a mistura hexano:acetato de etila (7:3) de grau CLAE na eluição de todas as amostras.

2.2. Material vegetal

As cascas do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* foram coletadas no município de Apodi-RN. A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo Professor Afrânio

Gomes Fernandes. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará sob o número 14923.

2.3. Extração e isolamento dos constituintes

As cascas do caule (2,098 Kg) foram secas à temperatura ambiente, trituradas e extraídas com hexano e, em seguida, com etanol, obtendo-se, após concentração 40 g e 60 g, respectivamente. O extrato hexânico foi fracionado em coluna filtrante de gel de sílica sob vácuo, obtendo-se quatro frações eluídas com hexano (4,32 g), diclorometano (CH_2Cl_2) (1,41 g), acetato de etila (AcOEt) (2,01 g) e metanol (MeOH) (675 mg).

A fração obtida com CH_2Cl_2 (1,4 g) no fracionamento do extrato hexânico foi adsorvida em gel de sílica, submetida à coluna filtrante eluindo-se com hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se um total de 121 frações de 10 mL cada. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 22-25 (25 mg), eluída com Hexano: CH_2Cl_2 (6:4), foi identificada como o triterpeno 3 β -*O*-nanoi-lupeol (**1**).^{7,17-18} A fração 29 (30 mg), eluída com Hexano: CH_2Cl_2 (4:6), foi caracterizada como a mistura dos triterpenos 3- β -*O*-cinamoil-lupeol (**2**)⁷ e 3- β -*O*-diidrocinamoil-lupeol (**3**).⁷ A fração 43-49 (79 mg), eluída com Hexano:AcOEt (6:4), quando submetida a nova cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH, em gradiente crescente de polaridade, forneceu na fração 19, eluída com Hexano:AcOEt (9:1), 10 mg de um sólido que foi identificado como o triterpeno lupeol (**4**).¹⁹ O tratamento cromatográfico da fração 50-61 (144,5 mg), eluída com Hexano:AcOEt (7:3), em coluna de gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, resultou na obtenção da fração 19-22, na eluição com Hexano:AcOEt (8:2), constituída de 10 mg de

um sólido que foi identificado como a mistura dos esteroides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**).²⁰

A fração CH_2Cl_2 (6,03 g), obtida do fracionamento do extrato etanólico (60 g) em coluna filtrante de gel de sílica sob vácuo, utilizando hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH como eluentes, foi adsorvida em gel de sílica e submetida à coluna filtrante, eluindo-se com hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH, puros e em misturas crescentes de polaridades (1:1). Este procedimento forneceu frações Hexano (31,3 mg); Hexano: CH_2Cl_2 (1,3 g); CH_2Cl_2 (898 mg); CH_2Cl_2 :AcOEt (2,96 g); AcOEt (413 mg); AcOEt:MeOH (1,34 g) e MeOH (72,2 mg). Uma alíquota da fração Hexano: CH_2Cl_2 (1,10 g) foi adsorvida em gel de sílica, submetida à coluna filtrante eluindo-se com misturas de hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se um total de 97 frações de 10 mL. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 40-41 (90 mg), eluída com Hexano:AcOEt (7:3), foi identificada como um composto tricíclico benzociclohepteno, o bis-nor-diterpeno deoxofavelina (**7**).⁸ A fração 24-35 (850 mg), eluída com Hexano:AcOEt (9:1), foi submetida a novo tratamento cromatográfico em gel de sílica, utilizando hexano, AcOEt e MeOH, puros e em mistura binárias em ordem crescente de polaridade. Na eluição com Hexano:AcOEt (7:3), obteve-se a fração 49, contendo 10 mg do composto identificado como um tricíclico benzociclohepteno, ou bis-nor-diterpeno, conhecido como metil favelina (**8**).^{7,8}

2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados

3 β -*O*-nanoi-lupeol (1) Sólido branco; p.f.: 131-133 °C; EM-ESI m/z 565,4162 [M-H^-] ($\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{O}_2$, calc m/z 565,4984); T.R.: 7,696 min.

3 β -*O*-cinamoil-lupeol (2) Sólido branco; p.f.: 196-199 °C; EM-ESI m/z 579,4203

$[M+Na]^+$ ($C_{39}H_{56}NaO_2$, calc m/z 579,4178).

3 β -O-diidrocinamoil-lupeol (3) Sólido branco; p.f.: 196-199 °C; EM-ESI m/z 581,4349 $[M+Na]^+$ ($C_{39}H_{58}NaO_2$, calc m/z 581,4334).

Lupeol (4) Sólido branco amorfo; p.f.: 210-212 °C.

Deoxofavelina (1H-Dibenzo[α , d]ciclohepten-7-ol, 2,3,4,10,11,11a-hexaidro-1,1,8-trimetila (7). Sólido branco; p.f.: 149-151 °C; EM-IE m/z 256 ($[M]^+$); T.R.: 23,412 min; RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$).⁸

Metil favelina (10H-Dibenzo[α , d]ciclohepten-10-ona, 1,2,3,4,11,11a-hexaidro-7-metoxi-1,1,8-trimetil (8). Sólido branco; p.f.: 135-136 °C; EM-IE m/z 284 ($[M]^+$); T.R.: 24,827 min; RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$).^{7,8}

2.5. Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram HL60 (leucemia pro-mielocítica), MCF-7 (carcinoma da mama) e NCIH292 (câncer de pulmão) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). As células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Analisou-se a citotoxicidade dos compostos contra todas as três linhagens celulares tumorais, utilizando 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis). A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm (DTX 880 multimodo, Beckman Coulter, Inc., Fullerton).

As linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL e a de

HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de $0,3 \times 10^6$.

Os compostos **1**, **7**, **8** e a mistura de **2** e **3** foram previamente dissolvidos em DMSO estéril foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 μ L da solução de MTT (sal de tetrazólio), e as placas foram incubadas por 3 h. Decorrido este período, a absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de intervalos de confiança foram obtidos por regressão não linear usando o programa *Graphpad Prism*, versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Cada amostra foi testada em duplicata. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

3. Resultados e Discussão

A reinvestigação fitoquímica do extrato hexânico da casca do caule de *Cnidocolus phyllacanthus* resultou no isolamento e identificação de 3 β -O-nanoil-lupeol (**1**),^{7,17-18} na mistura dos triterpenos 3- β -O-cinamoil-lupeol (**2**)⁷ e 3- β -O-diidrocinamoil-lupeol (**3**),⁷ lupeol (**4**)¹⁹ e na mistura dos esteroides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**).²⁰ Do extrato etanólico da casca do caule foram isolados e identificados os bis-nor-diterpenos deoxofavelina (**7**)⁸ e metil favelina (**8**)^{7,8} (Figura 1). As estruturas destes metabólitos foram elucidadas através da análise dos dados espectrais 1D de RMN 1H , RMN ^{13}C ($\{^1H\}$ - e DEPT 135°) e 2D 1H - 1H -COSY e interação heteronuclear de átomos de hidrogênio e carbono HSQC ($^1J_{CH}$) e HMBG ($^nJ_{CH}$, n=2 e 3) envolvendo comparação com dados da literatura.^{7,8,17-20}

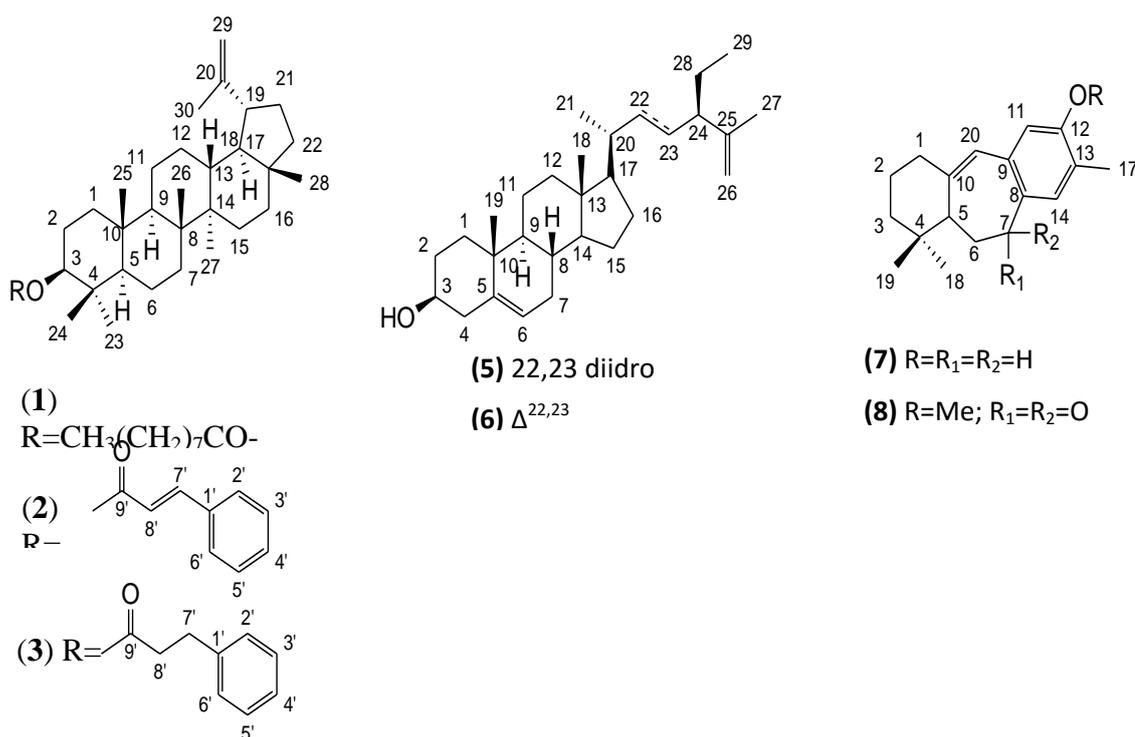


Figura 1. Metabólitos secundários isolados de *Cnidoscopus phyllacanthus*

O espectro de massas de alta resolução de **1**, obtido através da ionização por eletrospray (ESI) no modo no modo negativo forneceu o pico correspondente ao íon molecular em m/z 565,4162 $[\text{M}-\text{H}]^-$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_2$ ($\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{O}_2$, calc m/z 565,4984). O espectro de RMN ^{13}C exibiu os mesmos sinais da unidade triterpênica de derivados acilados do lupeol.^{7,17,18} Sinais adicionais foram observados em δ_{C} 173,8 atribuído à presença de carbono de carbonila de éster (C-1'), que foi confirmada pela banda de absorção em ν_{max} 1734 cm^{-1} no infravermelho; em δ_{C} 22,4 (CH_2 -8'), 25,2 (CH_2 -3'), 29,9 (CH_2 -4', CH_2 -5' e CH_2 -6'), 31,4 (CH_2 -7') e 35,7 (CH_2 -2'), atribuídos a átomos de carbono metilênicos, e em δ_{C} 14,2 que foi atribuído ao carbono metílico da unidade acila. O espectro de RMN ^1H mostrou um tripleto em δ_{H} 2,29 ($J = 6,7$ Hz) referente aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono metilênico CH_2 -2' α ao grupo carboxila. Estas deduções, juntamente com a análise dos espectros 2D HSQC e HMBC permitiram

identificar a substância **1** como 3 β -O-nanoil-lupeol (**1**), previamente isolada de *Plumeria rubra* incluindo os dados de RMN ^1H e ^{13}C .²²

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C da fração 29 (vide parte experimental) conduziu à proposta de uma mistura de dois componentes, **2** e **3**, cuja comparação com dados registrados na literatura⁷ permitiu confirmar a estrutura destes compostos como 3 β -O-cinamoil-lupeol (**2**) e 3 β -O-diidrocinamoil-lupeol (**3**). Esta mistura já isolada desta espécie e publicada a completa atribuição dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de ambos.⁷ Considerando a ocorrência de **1**, **2** e **3** em *C. phyllacanthus*, juntamente com as informações da literatura descrevendo a ocorrência de **2**, 3 β -O-acetil-lupeol e 3 β -O-fenilpropanoil-lupeol em *Cnidoscopus elasticus*,^{17,23} de **2**, **3**, 3 β -O-acetil-lupeol e 3 β -O-hexanoil-lupeol em *Cnidoscopus vitifolius*¹⁸ e de 3 β -O-acetil-lupeol em *Cnidoscopus urens*²⁴ permite sugerir que estes ésteres

podem ser usados como marcadores quimiotaxômicos deste gênero.

O triterpeno lupeol (**4**) e a mistura dos esteroides sitosterol (**5**) e estigmasterol (**6**) foram identificados através da análise de dados fornecidos por métodos espectroscópicos e comparação com dados descritos na literatura.^{19,20}

O espectro na região do infravermelho de **7** apresentou, entre outros sinais, banda em ν_{\max} 3378 e em 1550 cm^{-1} compatíveis com a presença de hidroxila fenólica e anel aromático, respectivamente. A presença de dois singletos em δ_{H} 6,56 (H-11) e 6,78 (H-14) no espectro de RMN ^1H do composto (**7**) permitiu sugerir a presença de átomos de hidrogênios em posição *para* em anel aromático tetrassubstituído. As análises dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C incluindo experimentos HSQC, permitiu identificar sinais de δ_{H} e seus respectivos valores de δ_{C} como, por exemplo, singletos em δ_{H} 0,72 (3H-19)/ δ_{C} 15,4 (CH₃-19), 1,00 (3H-18)/ δ_{C} 30,5 (CH₃-18) e 2,21 (3H-17)/ δ_{C} 20,5 (CH₃-17) que foram atribuídos a três grupos metila, sendo dois grupos ligados a átomos de carbono sp^3 quaternários e um ligado a carbono sp^2 ; enquanto o sinal em δ_{H} 6,26 (s)/ δ_{C} 124,9 foi atribuído ao hidrogênio ligado a carbono olefínico. A análise detalhada do espectro de RMN ^{13}C permitiu identificar sinais de 18 carbonos: seis carbonos não hidrogenados (um sp^3 e cinco sp^2 , incluindo um ligado a átomo de oxigênio em δ_{C} 151,7 (C-12), quatro metínicos (um sp^3 e três sp^2), cinco metilênicos (todos sp^3) e três metílicos = (C)₅(C-O)(CH)₄(CH₂)₅(CH₃)₃ = C₁₈H₂₃O + H de OH = C₁₈H₂₄O, de acordo com o valor do pico do íon molecular em m/z 256 [M]⁺ apresentado pelo espectro de massas (ME-IE), correspondendo a sete graus de insuficiência (quatro de um anel aromático, uma ligação dupla e dois ciclos). Assim, os dados discutidos, juntamente com a análise dos dados de RMN 2D HSQC e HMBC (Tabela 1) foram comparados com valores descritos

na literatura⁸ para o bis-nor-diterpeno deoxofavelina (**7**), metabólito secundário já isolado desta espécie.^{7,8}

O espectro na região do infravermelho de **8** apresentou bandas características de carbonila em sistema α,β -insaturado. O espectro de massas EM-IE apresentou o pico do íon molecular em m/z 284 compatível com a fórmula molecular C₁₉H₂₄O₂. A análise dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC de **8** permitiu identificar os sinais de δ_{H} e seus respectivos δ_{C} , como os singletos atribuídos aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono de sistema aromático (δ_{H} 6,59/ δ_{C} 113,1, CH-11, e 7,63/ δ_{C} 131,4, CH-14, maior δ_{H} revelando efeito anisotrópico do grupo carbonila em posição *orto*), aos átomos de hidrogênio dos grupos metílicos (δ_{H} 0,76/ δ_{C} 20,9, 1,13/ δ_{C} 29,1 e 2,19/ δ_{C} 15,7, correspondentes aos CH₃-19, CH₃-18 e CH₃-17, respectivamente) e do hidrogênio ligado ao carbono olefínico (δ_{H} 6,30/ δ_{C} 125,7); sinais adicionais em δ_{H} 3,88 (s, MeO/ δ_{C} 55,5) e em δ_{H} 3,02 (d, $J = 5,6\text{ Hz}$, / δ_{C} 42,7) que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio de uma metoxila e aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono metilênico α ao grupo carbonila conjugado, respectivamente. A análise detalhada dos demais dados do espectro de HMBC e do espectro de HSQC e comparação desses dados com valores registrados na literatura permitiram identificar **8** como a *O*-metil-favelina, um bis-nor-diterpeno também já identificado nesta espécie.^{7,8}

A proposta de rota biossintética para a bioprodução dos diterpenos **7** e **8** pode envolver a sequência sumarizada na Figura 2, justificando-se a formação do anel de sete membros proveniente do anel ciclopropânico formado do grupo 20, 9 e 10 como verificado no devadarool.

A numeração dos carbonos **7** e **8** respeita as suas origens biossintéticas, como observado em outras referências,²¹ diferente da utilizada por Yuichi e coautores.⁸

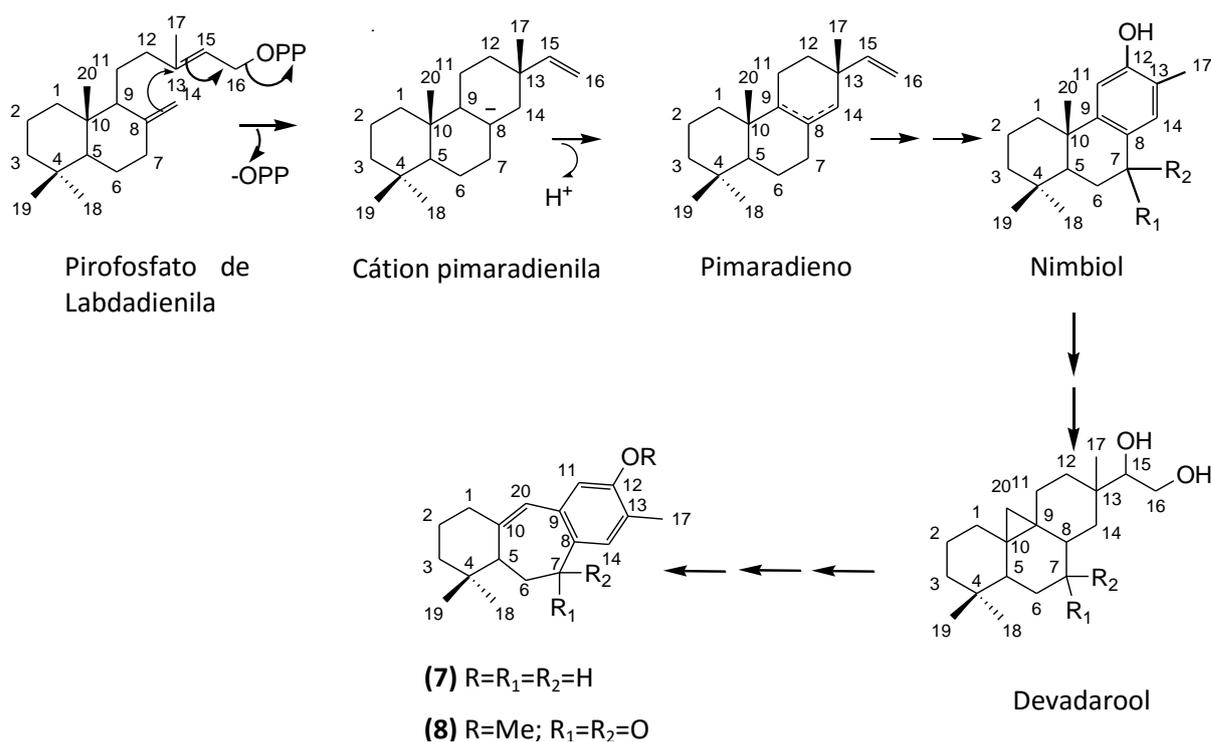


Figura 2. Proposta de rota biogenética para formação de 7 e 8

Os compostos **1**, **7**, **8** e a mistura de **2** e **3** foram submetidos ao ensaio com MTT²⁵ para avaliação dos seus efeitos citotóxicos em linhagens celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) (Tabela 1). O composto **7** foi o mais ativo entre todos os compostos testados, com valores de Cl_{50} variando de 2,7 a 8,9 $\mu\text{g/mL}$. É válido acrescentar que o bis-nor-diterpeno (**8**) foi seletivo para células de leucemia (Cl_{50} 1,6 $\mu\text{g/mL}$), uma vez que mostrou uma atividade fraca nas células de diferentes origens histológicas. O resultado destes testes corroboram com os resultados obtidos previamente por Endo e colaboradores,⁸ que relataram atividade citotóxica dos bis-nor-diterpenoides **7** e **8** em

linhagens celulares de leucemia em murinos (P-388). Por outro lado, pode-se destacar que outros bis-nor-diterpenos isolados de *Drypetes perreticulata* apresentaram forte citotoxicidade sobre linhagens celulares HL-60 (leucemia pro-mielocítica humana),²⁶ entretanto, estes apresentam esqueleto carbônico diferentes do das substâncias citadas neste trabalho.

Os compostos **1**, **7** e **8**, que apresentaram atividade citotóxica, foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando coluna de fase normal, eluída com Hexano:AcOEt (7:3) e apresentaram grau de pureza iguais a 87,86%, 100% e 76,77%, respectivamente. Na Figura 3 estão representados os cromatogramas obtidos para tais substâncias.

Tabela 1. Concentração inibitória em 50% (CI_{50}) e intervalo de confiança (IC) das amostras em três linhagens tumorais

Compostos	HL-60 ^a	MCF-7 ^b	NCI-H292 ^c
	CI_{50} (μ g/mL) (Intervalo de Confiança)		
1	15,6 (10,9 – 22,3)	>25	>25
2/3	>25	>25	>25
7	2,7 (1,6 – 4,5)	8,9 (6,3 – 12,6)	3,1 (2,2 – 4,3)
8	1,6 (1,3 – 2,1)	>25	10,5 (7,2 – 15,2)
Doxorubicina	0,02 (0,01 – 0,02)	0,3 (0,2 – 0,5)	0,2 (0,1 – 0,5)

^aLeucemia pro-mielocítica humana, ^bAdenocarcinoma de mama humano e ^cCarcinoma de pulmão humano

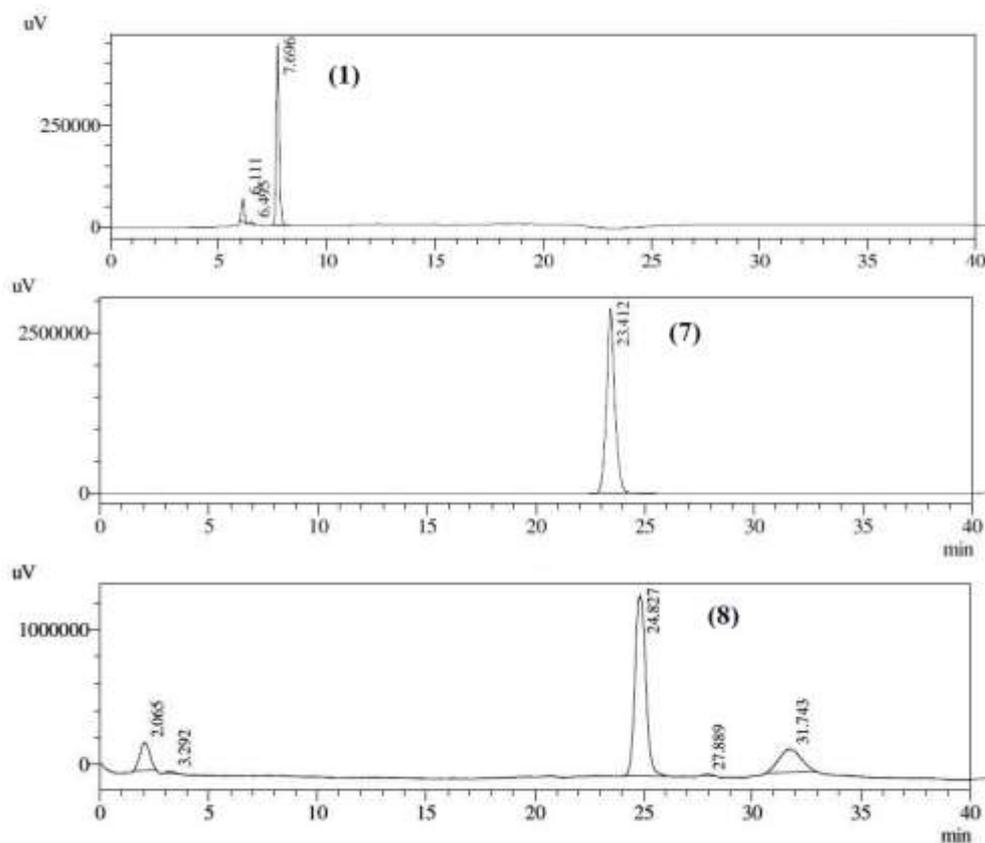


Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE de **1**, **7** e **8**

4. Conclusões

Da casca do caule de *C. phyllacanthus* foram isolados quatro triterpenos, a mistura de dois esterides e dois bis-nor-diterpenos. Dentre os triterpenos isolados pode-se destacar o 3 β -O-nanoil-lupeol (**1**), cujo isolamento está sendo descrito pela primeira vez nesta espécie. O isolamento de derivados acilados do lupeol em espécies de *Cnidoscolus* reforça a importância deste tipo de compostos como possíveis quimiomarcadores para o gênero. A atividade citotóxica observada, principalmente, pelo bis-nor-diterpeno **7** pode levar ao desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

Referências Bibliográficas

- ¹ de Melo, A. L.; de Sales, M. F. O Gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **2008**, *22*, 806. [CrossRef]
- ² Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.; *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*, 2^a. ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, SP, 2008.
- ³ Silva, G. L. S.; Silva, A. M. A.; Nóbrega, G. H.; Azevedo, S. A.; Filho, J. M. P.; Mendes, R. S. Efeito da Inclusão de Fontes Lipídicas na Dieta de Cabras em Lactação sobre os Parâmetros Sanguíneos. *Ciências e Agrotecnologia* **2010**, *34*, 233. [CrossRef]
- ⁴ Matos, F. J. A.; Lorenzi, H.; Dos Santos, L. F. L.; Matos, M. E. O.; Silva, M. G. V.; De Sousa, M. P.; *Plantas Tóxicas: Estudo de Fitotoxicologia Química de Plantas Brasileiras*, 1^a. ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, SP, 2011.
- ⁵ Oliveira, D. M.; Pimentel, L. A.; Araújo, J. A. S.; Medeiros, R. M. T.; Dantas, A. F. M.; Riet-Correa, F. Intoxicação por *Cnidoscolus phyllacanthus* (Euphorbiaceae) em Caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2008**, *28*, 36. [CrossRef]
- ⁶ Ventura, M. M.; Lima, I. H. The Nonnitrogenous Constituents in Oily Seeds. I. Free Amino Acids in Mature Seeds of the Favela Tree. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **1959**, *31*, 191. [Link]
- ⁷ De Lemos, T. L. G.; Silveira, E. R.; Oliveira, M. F.; Braz Filho, R.; Hufford, D. Terpenoids from *Cnidoscolus phyllacanthus* Pax et Hoff. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1991**, *2*, 105. [CrossRef]
- ⁸ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Favelines, Novel Tricyclic Benzocycloheptenes with Cytotoxic Activities from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 3083. [CrossRef]
- ⁹ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Structures of Novel Cytotoxic Compounds from Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1991**, *33*, 425. [Link]
- ¹⁰ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Favelanone, a Novel Tetracyclic Cyclopropane Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 5555. [CrossRef]
- ¹¹ Endo, Y.; Ohta, T.; Nozoe, S. Neofavelanone, a Novel Tetracyclic Cyclobutene Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 353. [CrossRef]
- ¹² Ohta, T.; Endo, Y.; Kikucki, R.; Kabuto, C.; Harada, N.; Nozoe, S. Absolute Stereochemistry of Benzocycloheptenone Derivatives from *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron* **1994**, *19*, 5659. [CrossRef]
- ¹³ Ohta, T.; Endo, Y.; Kikucki, R.; Kabuto, C.; Nozoe, S. Faveloxide, a New Isoprenoid Derivative from the Brazilian Plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Heterocycles* **1994**, *38*, 55. [CrossRef]
- ¹⁴ Sítio da World Health Organization. Disponível em: http://who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/. Acesso em: 28 agosto 2014.

- ¹⁵ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa/2014 – Incidência de Câncer No Brasil*, INCA: Rio de Janeiro, 2014.
- ¹⁶ Newman, D.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, *75*, 311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Caballero, P.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Fernandez, S.; Hernandez, E. The Isolation and Molecular Structure of Lupeol β -Phenylpropionate from *Cnidosculus elasticus*. *Journal of Natural Products* **1984**, *47*, 819. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Brum, R. L.; Honda, N. K.; Hess, S. C.; Cavalheiro, A. J.; Monache, F. D. Acyl Lupeols from *Cnidosculus vitifolius*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1127. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Facundo, V. A.; Polli, A. R.; Rodrigues, R. V.; Militão, J. S. L. T.; Stabelli, R. G.; Cardoso, C. T. Constituintes Químicos Fixos e Voláteis dos Talos e Frutos de *Piper tuberculatum*. *Acta Amazônica* **2008**, *38*, 733. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Ara, I.; Siddiqui, B. S.; Faizi, S.; Siddiqui, S. Tricyclic diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products* **1988**, *51*(6), 1054. [[CrossRef](#)]
- ²² Sengab, A. N.; Meselhey, K. M.; Fahmy, H. A.; Sleem, A. A. Phytochemical and Biological Studies of *Plumeria rubra* L. variety *acutifolia* grown in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy* **2009**, *47*, 147. [[Link](#)]
- ²³ Dominguez, X. A.; Franco, R.; Garcia, S.; Pugliese, O.; Santoyo, A. Lupeol Esters Isolated from Latex of Chilte (*Cnidosculus elasticus* Lundell). *Revista Latinoamericana de Química* **1982**, *13*, 82. [[Link](#)]
- ²⁴ Bhattacharyya, J.; Barros, C. B. Triterpenoids of *Cnidosculus urens*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 274. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Mossman, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Ge, Y-Z.; Zhang, H.; Liu, H-C.; Dong, L.; Ding, J.; Yue, J-M. Cytotoxic dinortriterpenoids from *Drypetes perreticulata*. *Phytochemistry* **2014**, *100*, 120. [[CrossRef](#)]