

Isolamento e identificação de terpenos da espécie *Croton echioides*

Isolation and identification of terpenes of the species *Croton echioides*

RESUMO

Maheus Farinhuk
matheusfarinhuk@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Cláudio Roberto Novello
cnovello@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* em humanos que representa um grande problema de saúde pública em países subdesenvolvidos. Seu tratamento é complicado, pois os poucos quimioterápicos disponíveis no mercado apresentam graves efeitos colaterais aos usuários. Uma alternativa promissora para o tratamento da doença é o uso de plantas medicinais, bem como os compostos isolados e frações obtidas destas. Uma classe de compostos químicos naturais que têm demonstrado atividade leishmanicida em estudos *in vitro* é a dos diterpenos do tipo clerodano. Esta classe de diterpenos pode ser encontrada em diversos gêneros de plantas, sendo o gênero *Croton* uma rica fonte destes compostos. O *Croton echioides* Baill. (Euphorbiaceae), popularmente conhecido por quebra-faca, caatinga branca e velame, apresenta-se como uma arvoreta nativa encontrada na região Nordeste do Brasil. Este artigo teve como objetivo a obtenção de diterpenos do tipo clerodano desta espécie vegetal *Croton echioides* para uma futura avaliação da atividade leishmanicida sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*. Por meio do fracionamento cromatográfico da fração hexânica, obtida a partir do extrato bruto do caule de *C. echioides*, foi obtida a substância ptychonolide. Esse diterpeno foi caracterizado por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania*, *Croton echioides*, Diterpenos clerodanos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a protozoan disease caused by the *Leishmania* genus in humans that represents a major public health problem in underdeveloped countries around the world. Its treatment is a difficult one due to the few available chemotherapeutics on market still having serious collateral effects on its users. A promising alternative for treating the disease is the use of medicinal plants, as well as isolated compounds and obtained fractions of them. A class of natural chemical compounds that have demonstrated leishmanicidal activity on *in vitro* studies is the clerodane diterpene. This diterpene class can be found in many genera of plants, being the genus *Croton* an abundant source of these compounds. The *Croton echioides* Baill. (Euphorbiaceae), commonly known as *quebra-faca*, *caatinga-branca* and *velame*, is a plant native to the northeastern region of



Brazil. This article aimed to obtain clerodane-type diterpene from this *Croton echioides* plant species for a later evaluation of leishmanicidal activity on the *L. amazonensis* promastigote form. Through chromatographic fractionation of the hexane fraction, obtained from crude extract of the stalk of *C. echioides*, the substance ptychonolide was obtained. This diterpene was characterized through nuclear magnetic resonance spectroscopy.

KEYWORDS: Leishmania, *Croton echioides*, Clerodane diterpene.

INTRODUÇÃO

Mesmo com a evolução da medicina, as plantas medicinais têm importância consolidada no uso popular. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65-80% da população dependem das mesmas para cuidados básicos de saúde (ABUBAKAR *et al.*, 2020).

Atualmente doenças causadas por protozoários em humanos representam um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. As principais são a malária, causada por *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, a doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, a esquistossomose, causada por *Schistosoma* spp., e a leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012). A leishmaniose faz parte de um conjunto de doenças ditas negligenciadas, para as quais há um desinteresse comercial por parte dos grandes laboratórios, devido ao fato dessas doenças afetarem principalmente populações pobres.

Nos dias de hoje, existem mais de 20 tipos de espécies de leishmaniose, que se caracterizam em três principais formas, sendo estas as LV (Leishmaniose Visceral), LC (Leishmaniose Cutânea) e LMC (Leishmaniose Mucocutânea), transmitida pela picada da fêmea do inseto vetor mosquito-palha. (WHO, 2020). Esta zoonose possui duas formas de vida, sendo estas, promastigotas, que se desenvolvem dentro do vetor, e amastigotas, que se reproduzem dentro de mamíferos, sendo estritamente intracelular e atacando principalmente células de macrófagos (CROFT; COOMBS, 2003).

A doença é principalmente presente em países que sofrem com falta de saneamento básico, más condições habitacionais, desigualdade social e muitos outros aspectos que evidenciam a pobreza em uma parte da população, facilitando sua contaminação nessas regiões (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Portando continentes como da África, América do sul e Ásia possuem uma vasta e maioria quantidade de ocorrências, que se estima entre 700 mil a 1 milhão novos casos por ano (WHO, 2020). Os infectados por essa doença apresentam principalmente sintomas de febre alta, pancitopenia, perda de peso, anemia, aumento do baço e fraqueza, que persistem no indivíduo por semanas ou até meses (ALVES *et al.*, 2018).

No Brasil a LV tem uma incidência muito grande, sendo que apenas nas Américas o Brasil representa mais de 97% dos casos (WHO, 2020), sendo a maioria destes na região Nordeste do país, segundo o Ministério de Saúde. Porém sua problemática não se restringe a esta área, já alcançando grande parte das outras regiões do território da nacional. Seu foco é observado principalmente

em crianças com menos de 10 anos, com aproximadamente 80% dos casos apenas nessa faixa etária. Em algumas pesquisas também foram identificados alguns casos onde adultos jovens foram acometidos pela zoonose (SILVA *et al.*, 2001).

O tratamento da leishmaniose é difícil por ser causada por protozoários, pois, por serem também eucariotos compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2006). Não existem vacinas e os quimioterápicos de primeira escolha indicados para o tratamento da leishmaniose são os compostos antimoniais pentavalentes, como o antimoniato N-metil-glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) (CROFT; COOMBS, 2003). Dessa forma, apesar do desenvolvimento obtido na última década, ainda se faz necessário tratamentos seguros que não causem malefícios ao usuário, como ocorrem na maioria dos tratamentos feitos atualmente, e que possam ser implementados nas regiões com maior incidência de casos de maneira eficiente e acessível.

O tratamento também se mostra problemático principalmente para criação de vacinas, devido a ser necessária uma nova alteração da dose para cada espécie do parasita, em vista de suas próprias características e formas de atuação, mostrando-se mais eficiente a busca de fármacos com eficácia oral (ALVES *et al.*, 2018).

Nesse contexto, uma alternativa bastante promissora é o uso de espécies vegetais, o que na verdade já vem sendo utilizado desde o início da civilização no processo de cura de inúmeras doenças, ou de seus metabólitos devidamente isolados (CALIXTO, 2000; KINGSTON, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Uma classe de compostos químicos naturais que tem se demonstrado ativo são os diterpenos do tipo clerodano, encontrados em diversos gêneros de planta (WIDYOWATI *et al.*, 2015). Os diterpenos do tipo clerodano são um vasto grupo de metabolitos que existem não somente em plantas como também em outros diversos grupos, como das bactérias, fungos e esponjas marinhas (LI; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016). LIMA e colaboradores (2015) demonstraram a alta eficácia do diterpeno do tipo clerodano *trans*-dehydrocrotonina contra promastigotas ($IC_{50}=6,3 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$) e amastigotas axênicos ($IC_{50}=19,9 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *L. amazonensis*. O efeito citotóxico foi avaliado em macrófago peritoneais infectados de ratos ($IC_{50}=0,47 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o tratamento revelou que o diterpeno se mostrou pouco tóxico enquanto reduzia a infecção ($>100 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem apresentar nenhuma morte de macrófago, indicando ser um composto promissor para a produção de um novo medicamento.

Dentre os gêneros de planta em que podemos encontrar os diterpenos do tipo clerodano no território brasileiro, destaca-se o gênero *Croton*, que é um dos maiores gêneros da família Euphorbiaceae, abrangendo um número considerável de espécies no mundo (cerca de 1200) com aproximadamente 300 delas abrigadas no Brasil (BERRY *et al.*, 2005; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

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

compostos encontrados no gênero *Croton* são os diterpenos do tipo clerodano. Estruturalmente são diterpenos com a presença de anel furano, com um número significativo deles apresentando atividade biológica como antibiótica, antitumoral, inseticida, anti-inflamatória, antinociceptiva, hipoglicêmica, anti-úlceras e cardiovascular (SILVA *et al.*, 2009; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Croton echinoides Baill., é popularmente conhecido por quebra-faca, caatinga branca, velame e canela-de-velho e apresenta-se como uma arvoretinha nativa encontrada na região Nordeste do Brasil (BARBOSA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Os caules desta planta são extensivamente comercializados como tônico e afrodisíaco em substituição das raízes da marapuama amazônica, *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae) tanto no Brasil como no exterior (NOVELLO *et al.*, 2012).

Devido a sua constante utilização como substituinte da marapuama, se torna uma planta que se tem uma utilização frequente no comércio, sendo interessante um maior conhecimento sobre seus metabolitos e assim poder ser consumida e explorada de maneira mais eficiente.

Assim, diante da magnitude e da gravidade da leishmaniose no Brasil e em vários outros países tropicais e das dificuldades enfrentadas para controlá-la, investimentos urgentes em pesquisa devem ser realizados na prospecção de novos metabolitos secundários, derivados de espécies vegetais, com a finalidade de se obter uma nova droga com maior eficácia, menor custo e menores efeitos colaterais em comparação aos quimioterápicos atualmente utilizados. Portanto, este trabalho teve como objetivo a obtenção de substâncias puras, preferencialmente os diterpenos do tipo clerodano, por meio do fracionamento da fração hexânica obtida a partir da espécie vegetal *Croton echinoides*, para uma futura avaliação da atividade leishmanicida sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cromatografia a pressão normal. Foram utilizadas colunas cromatográficas preparadas segundo os procedimentos descritos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997) utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 de 70-230 mesh (Merck). Como fase móvel foram utilizados solventes puros ou mistura destes para obter polaridade ideal para cada fração a ser cromatografada. As dimensões de coluna e volume coletado, foram selecionados de acordo com a quantidade de material a separar.

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

Cromatografia a vácuo (CLV). Para a CLV foram utilizadas colunas cromatográficas acopladas a equipamento de vácuo empacotadas com gel de

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

Cromatografia em camada delgada analítica. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel GF254 (Merck), e posteriormente reveladas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e pela utilização de reveladores cromogênicos como solução etanólica de cloreto férrico a 1%, vanilina sulfúrica, vapores de iodo ou anisaldeído sulfúrico a 0,5% (STHAL, 1972). Para os extratos brutos e frações obtidas da partição do EB e FH, foi utilizado como eluente hexano: diclorometano: metanol (6:3:1; v/v) e como revelador anisaldeído sulfúrico. Para as frações obtidas da purificação da FA foi utilizado como eluente clorofórmio: metanol (7:3; v/v).

Análise estrutural de substâncias isoladas. A análise estrutural de substâncias isoladas foi realizada por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear 1D (^1H e ^{13}C) e 2D ($^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY e HMBC), relativos ao TMS (7.02T-VARIAN Mercury Plus 300) operando a 75,5 MHz para ^{13}C e 300 MHz para ^1H .

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

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

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

Parte do EB (300 g) foi ressuspenso em 2,5 L de água e submetido à partição líquido-líquido em proporção volumétrica com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol de acordo com (HASAN *et al.*, 2000). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, liofilizadas e denominadas de CEH, CED, CEAE, CEB e CEAQ, respectivamente. Após foram cromatografadas em CCD.

Foram cromatografados 45,3 g da CEH em CLV (\emptyset 6,0 x 20 cm) a vácuo contendo gel de sílica 60 (70-230 mesh) eluída com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol combinados em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 37 frações de 100 mL cada. As frações obtidas foram analisadas

por CCD, reveladas com anisaldeído sulfúrico e reunidas por semelhança cromatográfica em 5 novas frações renomeadas de CEH-1 a CEH-5.

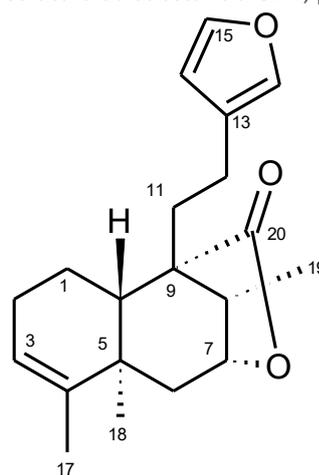
A partir da análise da CCD das frações obtidas da fração CEH, optou-se por purificar a CEH-3 (10,41 g) em coluna aberta (\varnothing 2,6 x 68 cm) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh). A coluna foi eluída com hexano e acetona puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de aproximadamente 3 mL cada, reunidas em 27 novas frações por semelhança cromatográfica em CCD, após serem reveladas com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 110 °C.

A partir do perfil obtido por CCD das frações provenientes da CEH-3, optou-se por purificar a subfração 7 (2,80 g), denominada de CEH-3.7. A fração CEH-3.7 foi purificada em coluna em aberta (\varnothing 2,6 x 65 cm) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh). A coluna foi eluída com hexano e éter etílico puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de aproximadamente 3 mL cada, reunidas em 16 novas frações por semelhança cromatográfica em CCD, após serem reveladas com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 110 °C. Deste procedimento foi isolada a substância denominada **CE-1** (12,3 mg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância denominada **CE-1** foi identificada como sendo ptychonolide, um diterpeno do tipo clerodano previamente isolado da espécie vegetal *Ptychopetalum olacoides*, por meio da espectroscopia de RMN e comparação com dados reportados na literatura (TANG *et al.*, 2008). Este é o primeiro relato do ptychonolide na família Euphorbiaceae.

Figura 1 – Estrutura da substância **CE-1**, ptychonolide



Fonte: Autoria própria (2020).

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 2) e ^{13}C da **CE-1** evidenciaram a presença do anel furânico por meio dos sinais em δ_{H} 6,29 (H-14), 7,26 (H-16) e 7,37 (H-15), juntamente com os sinais dos respectivos carbonos em δ_{C} 110,7, 138,6 e 143,0 e do carbono não ligado a hidrogênio C-13, em δ_{C} 124,2.

A presença do anel decalínico penta substituído, contendo uma ligação dupla, foi caracterizada pelos sinais em δ_H/δ_C 1,69-1,73/18,4; 2,12-2,16/25,2 e 1,173-2,16/38,2 referentes aos hidrogênios e carbonos metilênicos C-1, C-2 e C-6; sinais em δ_H/δ_C 4,47/82,4; 2,08/47,9 e 2,03/47,5, correspondente aos carbonos metínicos C-7, C-8 e C-10; sinais em δ_C 38,1 e 50,2 dos carbonos C-5 e C-9 além dos sinais em δ_H/δ_C 5,09/119,1 e δ_C 145,3 que evidenciam a ligação dupla entre os C-3 e C-4.

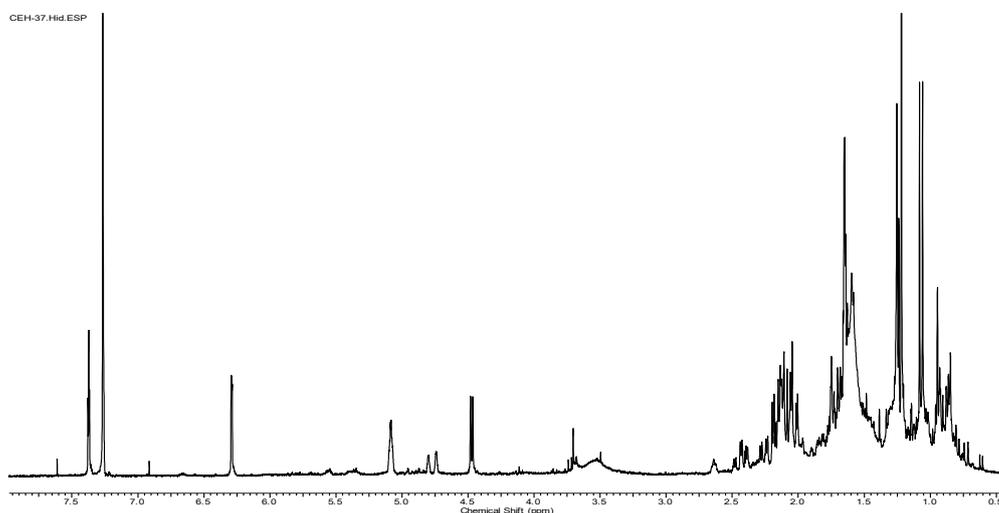
Os sinais em δ_H/δ_C 1,65/18,0, 1,22/24,0 e 1,07/14,4 comprovam a presença dos grupos metilas Me-17, Me-18 e Me-19, ligados aos C-4, C-5 e C-9, respectivamente.

O anel furânico está ligado ao sistema decalínico na posição C-9 por uma unidade etileno caracterizada por intermédio dos sinais em δ_H/δ_C 1,63-2,12/27,1 e 2,19-2,43/18,6.

O grupo lactona fundido a decalina nas posições C-7 e C-9 foi evidenciado pelo sinal δ_C em 179,4 bem como pelo sinal em δ_C 82,4 relativo a carbono metínico ligado a oxigênio.

No espectro de 1H encontram-se vários sinais sobrepostos na região entre δ_H 1,00 a 2,50, o que dificultou a determinação de algumas constantes de acoplamento. As atribuições de todos os sinais de RMN 1H e as respectivas correlações no COSY estão demonstradas na Tabela 1, confirmando a estrutura proposta e o posicionamento dos grupos ligados no esqueleto terpênico.

Figura 2 – Espectro de RMN de 1H da substancia CE-1, ptychonolide



Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) e correlações observadas no COSY da CE-1

H	δH (m, J em Hz)	COSY	C
1a	1,73 (m)	H-1b, H-10	18,4
1b	1,69 (m)	H-1a	
2a	2,16 (m)		25,2
2b	2,12 (m)	H-3	
3	5,09 (m)	H-2b, H-18	119,1
4			145,3
5			38,1
6a	2,16 (m)	H-6b	38,2
6b	1,73 (m1)	H-6a	
7	4,47 (d, 4,58)	H-8	82,4
8	2,08 (m)	H-7	47,9
9			50,2
10	2,03 (dd, 13,2, 3,12)	H-1a	47,5
11a	2,12 (m)	H-11b	27,1
11b	1,63 (m)	H-11a	
12a	2,43 (m)		18,6
12b	2,19 (m)		
13			124,2
14	6,29 (dd, 1,65, 0,9)	H-15	110,7
15	7,37 (dd, 1,65, 1,65)	H-14	143,0
16	7,21 (sl)		138,6
17	1,65 (d, 1,65)		18,0
18	1,22 (s)	H-3	24,0
19	1,07 (s)		14,4
20			179,4

Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÃO

A partir da fração hexânica do extrato de *Croton echioides* obteve-se o diterpeno do tipo clerodano ptychonolide. A caracterização estrutural pode ser feita por espectroscopia de RMN. Este é o primeiro relato do ptychonolide na família Euphorbiaceae.

AGRADECIMENTO

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-PROPPG da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos recursos financeiros. Ao campus da UTFPR de Francisco Beltrão por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.

REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, I. B. *et al.* An inventory of medicinal plants used for treatment of cancer in Kwara and Lagos state, Nigeria. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 34, p. 101062, 2020.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 268-286, 2012.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 10 set. 2020.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

ALVES, F. *et al.* Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, England, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

LI, R.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 10, p. 1166-1226, 2016.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

WIDYOWATI, R. *et al.* Phytochemistry letters new *cis*-ent-clerodanes from *Linaria japonica*. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 56–62, 2015.

LIMA, G. S. *et al.* Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara Benth* (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1133–1137, 2015.

BERRY, P. E. *et al.* Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, United States, v. 92, n. 9, p. 1520–1534, 2005.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11–33, 2007.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguesia**. v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.

BARBOSA, P. S. *et al.* Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei var. glabrior* Lanj. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 887–890, 2007.

NOVELLO, C. R. *et al.* Morphoanatomy and pharmacognostic study of the wood of *Croton echioides*, the Northeastern Marapuama. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1997.

STILL, W. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923-2924, 1978.

STHAL, E. **Thin layer chromatography**. New York: Springer Verlag, 1962.

HASAN, C. M. *et al.* Nasimaluns A and B: neo-clerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.410-411, 2000.

TANG, W. *et al.* Clerodane diterpenoids with NGF-potentiating activity from *Ptychopetalum olacoides*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1760-1763, 2008.