



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

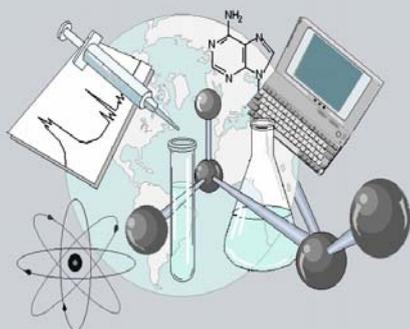
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE VEGETAL *Croton floribundus*
(EUPHORBIACEAE)”**

Dissertação apresentada por
Juliana Luna Bilheiro Peixoto ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química

CE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, Janeiro/2003

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P379e Peixoto, Juliana Luna Bilheiro
Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) / Juliana Luna Bilheiro Peixoto. -- Maringá : [s.n.], 2007.
77 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. Gentil José Vidotti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, 2007.

1. Química orgânica. 2. Fitoquímica. 3. Diterpenos. 3. Ácido caurenóico. 4. *Croton floribundus*. 5. Atividade biológica. 6. Isolamento de substâncias. 7. Capixingui. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química Aplicada.

Cdd 21.ed. 547.71

ABSTRACT

Key words *Croton floribundus*, diterpenes, and biological activity

The specie *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) commonly know a *capixingui*, is usually found in the Brazilian states of *Sao Paulo*, *Rio de Janeiro*, *Minas Gerais* and *Parana*. It is in folk medicine to be the active principle responsible for wound healing. Even though it is large used as folk medicine, it chemical study was not found in literature. The alkaloids are know as taxonomic markers and the diterpenes as the main constituents from *Croton* species. In the present work were used hot (Soxhlet) and cold (maceration) extractions. The soxhlet extracts were fractionated through silica gel chromatography yielding the kaurenoic acid (major constituent- 2%), the candol B and the glycosilated sitosterol. The extracts from maceration were fractionated through columns of silica gel and silica gel impregnated with silver nitrate yielding the diterpenes 16 β , 17- dihydroxy-19-kauranoic acid and 6-hydroxy kaur-16-en-19-ol. The acid fraction from the alcaloidic extract, after to be treated with diazomethane and fractionated through silica gel column, yielded the methyl ester of 16 β -hydroxy-19-kauranoate. The compounds identification were assisted by NMR techniques as ^1H , ^{13}C , HETCOR, HMQC, COSY and by comparison to analogue compounds described in the literature.

The antibacterial activity of the crude ethanolic extract, of the fractions and of the kaurenoic acid was determined by Broth microdilution method using Muller-Hinton medium for antibacterial assay. The microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were tested. To run this experiment, the crude extract was partitioned with hexane, methylene chloride, ethyl acetate, buthyl alcohol and water. The hexanic fraction showed the best activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* microorganisms. The Kaurenoic acid was active against *B. subtilis* (6,2 $\mu\text{g/mL}$)

RESUMO

Palavras chaves: *Croton floribundus*, diterpenos, atividade biológica

A espécie *Croton floribundus* (Euphorbiaceae), conhecida popularmente por capixingui, comumente encontrada no Brasil nos estados de São Paulo Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná, é usada na medicina popular para cicatrizar feridas. Nenhum relato sobre seu estudo químico é apresentado na literatura apesar de ser muito utilizada pela população. A literatura especializada apresenta os alcalóides como marcadores taxonômicos e os diterpenos como os constituintes principais do gênero *Croton*. Neste trabalho foram utilizadas extrações a quente (Soxhlet) e a frio (maceração). Os extratos resultantes da extração por Soxhlet foram submetidos a sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel resultando no isolamento dos compostos ácido caurenóico (constituente majoritário, cerca de 2% da planta seca), candol B e os esteróides β -sitosterol e sitosterol glicosilado. Os extratos provenientes da maceração foram cromatografados em coluna de sílica gel e sílica gel impregnado com nitrato de prata obtendo-se os diterpenos: ácido 16 α , 17-diidróxi -19-cauranóico e 6-hidróxi caur-16-en-19-ol. A fração ácida do extrato alcaloídico tratada com diazometano e submetida a fracionamento em coluna de sílica gel resultou no isolamento do composto 16-hidróxi-19-cauranoato de metila. Para identificação dos compostos foram utilizadas técnicas de RMN ^1H , ^{13}C , HETCOR, HMQC, COSY e comparação com dados da literatura.

Foram avaliados testes de atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico, das frações particionadas e do ácido caurenóico utilizando-se o método de microdiluição em placas de culturas dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Para tanto, o extrato bruto foi particionado, resultando nas frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila, butanólica e aquosa. Dentre as frações testadas, a hexânica foi a que apresentou melhor atividade frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. O ácido caurenóico na concentração (6,26 $\mu\text{g/ml}$) inibiu e matou o microorganismo *B.subtilis*

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE ESQUEMAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Croton</i>	4
4 – PARTE EXPERIMENTAL	14
4.1 – Materiais e métodos	14
4.2 – Estudo químico da espécie vegetal <i>C.floribundus</i>	15
4.2.1 – Coleta e secagem	15
4.2.2 - Preparação dos extratos das cascas	15
4.2.3 – Extratos CF-EBH e CF-EBE	15
4.2.4 – Isolamento dos constituintes químicos das cascas	16
4.2.5 – Fracionamento do extrato hexânico (CF-SH)	16
4.2.6 - Estudo da fração CF-SH-3/Isolamento da substância CF ₂	18
4.2.7 – Fracionamento do extrato CF-EBH	19
4.2.8 – Estudo da fração CF-EBH-3	21
4.2.9 – Estudo da fração CF-EBH - 3.3	22
4.2.10 – Estudo da fração CF-EBH – 5/Isolamento de CF ₃	23
4.2.11 – Fracionamento do extrato bruto etanólico pela metodologia de extração ácido-base	26
4.2.12 – Estudo da fração CF-EA	27
4.2.13 – Estudo da fração CF-EA – 4	27
4.2.14 – Estudo da fração CF-EA – 4.5/Isolamento de CF ₄	29
4.2.15 – Fracionamento de extrato bruto etanólico	30
4.2.16 – Estudo da fração CF-EBE-3/ Isolamento de CF ₅	32
4.2.17 – Fracionamento do extrato diclorometânico / Isolamento de CF ₆	33

4.3 – Estudo da atividade Biológica de <i>C. floribundus</i>	34
4.3.1 – Avaliação da atividade Antibacteriana	34
5 – DISCUSSÃO	36
5.1 – Determinação estrutural dos compostos isolados	37
5.1.1 – Composto CF ₁	37
5.1.2 – Composto CF ₂	44
5.1.3 – Composto CF ₃	48
5.1.4 – Composto CF ₄	54
5.1.5 – Composto CF ₅	60
5.1.6 – Composto CF ₆	66
5.2 – Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e do composto CF₁	70
6 – CONCLUSÕES	72
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Coluna cromatográfica do extrato CF-SH	17
Tabela 02: Frações reunidas da CC da fração CF-SH	17
Tabela 03: Coluna cromatográfica do extrato CF-SH-3	18
Tabela 04: Frações reunidas da CC da fração CF-SH-3	18
Tabela 05: Coluna cromatográfica do extrato CF-EBH	19
Tabela 06: Frações reunidas da CC do extrato CF-EBH	19
Tabela 07: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-3	20
Tabela 08: Frações reunidas da CC de CF-EBH -3.3	21
Tabela 09: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-3.3	22
Tabela 10: Frações reunidas da CC de CF-EBH-3.3	22
Tabela 11: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5	23
Tabela 12: Frações reunidas da CC de CF-EBH-5	24
Tabela 13: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5.4M	24
Tabela 14: Frações reunidas da CC de CF-EBH-5.4M	25
Tabela 15: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5.4M.5	25
Tabela 16: Coluna cromatográfica da fração CF-EA	27
Tabela 17: Frações reunidas da CC de CF-EA	27
Tabela 18: Estudo da fração CF-EA-4	28
Tabela 19: Frações reunidas da CC de CF-EA-4	28
Tabela 20: Coluna cromatográfica da fração CF-EA-5	29
Tabela 21: Frações reunidas da CC de CF-EA-5	29
Tabela 22: Coluna cromatográfica do extrato bruto etanólico	31
Tabela 23: Frações reunidas da CC do extrato CF-EBE	31
Tabela 24: Coluna cromatográfica da fração CF-EBE-3	32
Tabela 25: Frações reunidas da CC de CF-EBE-3	32
Tabela 26: Coluna cromatográfica do extrato CF-SD	33
Tabela 27: Frações reunidas da CC do extrato CF-SD	33
Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^1H de CF_1 com os dados da literatura	38
Tabela 29: Tabela 29: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_1 e comparação com dados da literatura ($^3\text{C}^a$)	43

Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 de CF_2 com os dados da literatura	47
Tabela 31: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_3 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$).	53
Tabela 32: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_4 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$)	59
Tabela 33: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$)	65
Tabela 34: Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (75,5 MHz em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CF_6 com os dados da literatura	69
Tabela 35: Dados da atividade antibacteriana para o extrato bruto, frações e do ácido caurenóico	70

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 01: Isolamento dos constituintes do extrato hexânico da espécie <i>C.floribundus</i>	16
Esquema 02: Fracionamento do extrato bruto hexânico	19
Esquema 03: - Fracionamento do extrato bruto etanólico (CF-EBE) pela metodologia de extração ácido-base	26
Esquema 04: Fracionamento do extrato bruto etanólico	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Foto da planta <i>Croton floribundus</i>	2
Figura 2: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_1	38
Figura 3: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, CDCl_3) do composto CF_1	39
Figura 4: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_1 .	40
Figura 5: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_1 .	41
Figura 6: Espectro de NOESY em CDCl_3 do composto CF_1	42
Figura 7: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_2	45
Figura 8: Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45 MHz, CDCl_3) do composto CF_2	46
Figura 9: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_3	49
Figura 10: Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45 MHz, CDCl_3) do composto CF_3	50
Figura 11: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_3	51
Figura 12: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_3	52
Figura 13: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_4	55
Figura 14: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, CDCl_3) do composto CF_4	56
Figura 15: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_4	57
Figura 16: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_4	58
Figura 17: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_5	61
Figura 18: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_5	62
Figura 19: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5	63
Figura 20: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5	64
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_6	68
Figura 22: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_6	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC - American Type Culture Collection

CC - Cromatografia em Coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CDCl_3 - Clorofórmio Deuterado

$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - Piridina Deuterada

COSY - espectroscopia bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H) a três ligações

C - carbono quaternário

d - dubleto

dd - duplo dubleto

DEPT - Melhoramento sem distorção por transferência de polarização

HETCOR - espectro bidimensional de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) a uma ligação

Hz - hertz

J - constante de acoplamento

m - multiplete

MHz - MEGAHERTZ

ppm - partes por milhão

R_f - fator de retenção

RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN 2D - mressonância magnética nuclear bidimensional

s - singleto

δ - deslocamento químico em ppm

\varnothing - diâmetro interno da coluna

1 - INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana¹.

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem muitas vezes, a prescrição médica. Acredita-se que 80% da população mundial usem plantas como primeiro recurso terapêutico²

A composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais, está longe de ser descrita em sua totalidade. Um enorme arsenal de constituintes naturais ainda não foi isolado e estudado do ponto de vista químico. Por outro lado, uma grande quantidade de compostos, já isolados não foi estudada quanto às suas atividades biológicas, tanto em relação às suas funções na espécie vegetal, quanto nas potencialidades de uso para outras finalidades, especialmente as de interesse terapêutico³.

Entre inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Croton*, pertencentes à família Euphorbiaceae a qual abrange 290 gêneros e cerca de 7500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais, principalmente da América e da África. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies difundidas em todo tipo de vegetação⁴. Estas plantas variam desde ervas, até trepadeiras e árvores de grande porte. O gênero *Croton* compreende cerca de 1000 espécies, 650 das quais se encontram na América e 300 no Brasil⁵.

A *Croton floribundus*, conhecida popularmente por capixingui ou tapixingui, apresenta-se como árvore e pode atingir até 10 m de altura, ocorrem nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Na medicina popular as cascas do tronco desta planta são usadas em forma de chá no combate à sífilis e hemorróidas e as folhas (tintura) tem emprego na medicina humana e veterinária, contra úlceras. A árvore, como uma planta pioneira tolerante a áreas abertas, é útil na preservação permanente através de plantios mistos em reflorestamentos de áreas degradadas e a madeira é usada na carpintaria leve, nas obras internas, na confecção de chapas de aglomerados, brinquedos e tabuados em geral⁶.

Segundo Cronquist⁷, esta planta encontra-se na seguinte classificação:

Divisão: Magnoliopyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Euphorbiales

Família: Euphorbiaceae

Gênero: *Croton*

Espécie: *Croton floribundus*.



Figura 1: Foto *Croton floribundus*

2 -OBJETIVOS

A espécie *C. floribundus*, embora seja muito utilizada na medicina caseira, ainda não foi estudada quimicamente, portanto este trabalho tem por objetivos:

- Estudo fitoquímico das cascas visando isolamento e identificação estrutural dos principais constituintes.
- Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto, frações e compostos isolados.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE PLANTAS DO GÊNERO *Croton*

O gênero *Croton*, o segundo maior da família Euphorbiaceae⁸, inclui aproximadamente 1000 espécies, das quais algumas são conhecidas como fonte de diterpenos pertencente à série dos caurenos, ent-caurenos, labdânicos, ent-labdânicos e clerodânicos⁹. Foram isolados alcalóides, compostos polifenólicos, flavonóides e lignanas.

As espécies *C. lechleri* (Equador), *C. draconoids* (México), *C. draco* (Costa Rica), *C. echinocarpus* (Brasil), *C. gossipifolius* (Venezuela, México), *C. hibiscifolius* (Argentina), *C. palanostigma* (Peru, Brasil), *C. urucurana* (Brasil, Paraguai) *C. xalapensis* (Guatemala, México), têm em comum a presença de uma seiva vermelho sangue obtida pelo corte da casca. Esta seiva é muito utilizada na medicina popular para tratar doenças como: câncer, inflamação intestinal, cicatrização de feridas. Dentre as espécies citadas *C. lechleri* vem sendo muito estudada por apresentar muitas destas propriedades terapêuticas. Um estudo químico realizado por Cai e colaboradores¹⁰ com o látex desta planta revelou a presença de compostos polifenólicos como constituintes majoritários, cerca de 90% do peso seco. Foram isolados a (+) catequina (**1**), (-) epicatequina (**2**), (+) galocatequina (**3**), (-) epigalocatequina (**4**), procianidinas B-1 (**5**) e B-4 (**6**), galocatequina-(4 α →8) epicatequina (**7**) e a catequina-(4 α →8)-epigalocatequina (**8**).

Das cascas desta espécie foram isolados: o alcalóide taspina (**9**)^{11,12} que mostrou ser o princípio ativo responsável pela cicatrização de feridas, os diterpenos Korberina A (**10**) e Korberina B (**11**) que se mostraram ativos contra o *B. subtilis*, os compostos minoritários 1,3,5 trimetoxi-benzeno (**12**) e o 2,4,6 trimetóxi-fenol (**13**) que são 30 vezes mais ativos que a penicilina e também são altamente inibitório contra a *E. coli*¹³.

Do estudo da seiva de *C. draconoids* foi isolado o composto pertencente à classe das lignanas, 3'4'-O-dimetil cedrusina (**14**) que apresentou atividade anti-inflamatória¹⁴.

No Brasil uma espécie que vem despertando muito interesse no meio científico é o *C. cajucara*, muito utilizada na medicina popular da região Amazônica por apresentar propriedades terapêuticas no combate à diabetes, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins, vesícula e no controle de índices elevado de colesterol. O pó das cascas é comercializado em farmácias de manipulação. Estudos químicos realizados por Maciel e colaboradores¹⁵ com a casca reportam o isolamento dos diterpenos transdesicrotonina (DCTN) (**15**), que apresentou um teor de 1,4% da planta seca, cis-cajucarina B (**16**), cajucarinolida (**17**) e a sacarina (**18**). Das folhas foram isolados os flavonóides, 3,7,4'-tri-O-metilcanferol (**19**) e 7,3-di-O-metilcanferol (**20**). Estudos das atividades biológicas realizados

com a DCTN mostraram correlação da presença dos mesmos com grande parte das propriedades terapêuticas da planta.

Estudando a constituição química das sementes de *C.tiglium* (Tailândia), Mekkwaw e colaboradores¹⁶ isolaram os ésteres diterpênicos 12-O-acetil forbol-13-decanoato (**21**), 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (**22**) e 12-O-decanoil-forbol-13-(2metilbutirato). Estas substâncias apresentaram atividades anti-HIV.

Estudos químicos dos galhos de *C. zambesicus* realizados por Ngadjui e colaboradores¹⁷ descrevem o isolamento dos diterpenos crotozambefurano A (**23**), B (**24**), C (**25**), ácido 7 β -acetoxi-labdan-18-óico (**26**) do traquiloban-7 β diol (**27**) e do crotonadiol (**28**).

Trabalhando também com os galhos, Roengsumran e colaboradores¹⁸ isolaram da *C.oblongifolius* os diterpenos 2-acetoxi-3-hidroxi-labda-8(17), 12(*E*)-14-trieno (**29**), 3-acetoxi-2-hidroxi-labda-8(17), 12(*E*)-14-trieno (**30**) e 2,3diidroxi-labda-8(17), 12(*E*)-14-trieno (**31**) que apresentaram atividade citotóxica.

Sutthivaiyakit e colaboradores¹⁹ isolaram das folhas de *C.joufra* os diterpenos 2 α , 3 α -diidroxi-labda-8(17), 12(13), 14(15)-trieno (**32**) e 3 β -hidroxi-19-0-acetilprimara-8(9), 15-dien-7-ona (**33**).

Um estudo realizado com as raízes de *C.macrostachys* por Kapingu e colaboradores²⁰ revela o isolamento dos diterpenos neoclerodan-5,10-en-19,6 β ,20,12diolídeo (**34**), 3 α ,19-diidroxitrachylobane (**35**), 3 α ,18,19-triidroxitrachilobano (**36**).

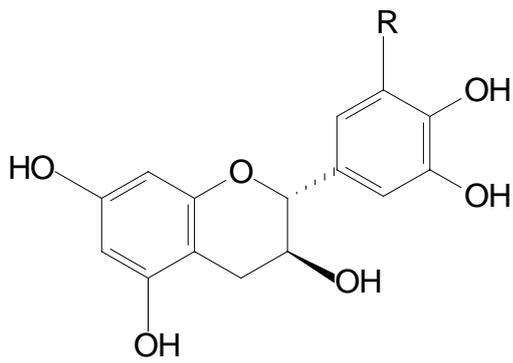
Kitazawa e colaboradores²¹ isolaram de *C.sublyratus* os diterpenos ent-3 α -hidroxi-13-epimanol (**37**) e o ent-16 β ,17-diidroxi caureno (**38**).

Um estudo realizado com as raízes de *C.membranaceus*²² e folhas de *C.flavens*²³ resultou no isolamento dos alcalóides julocrotina (**39**), e (-) amuronina (**40**).

Investigando as raízes da espécie *C. lacciferus*, Bandara e colaboradores²⁴ isolaram diterpenos do grupo caureno ent-15 β , 16 – epoxcauren-17-ol (10) (**41**) e ent – caur- 15-en 3 β ,17- diol (11) (**42**). Estas substâncias mostraram atividade inseticida.

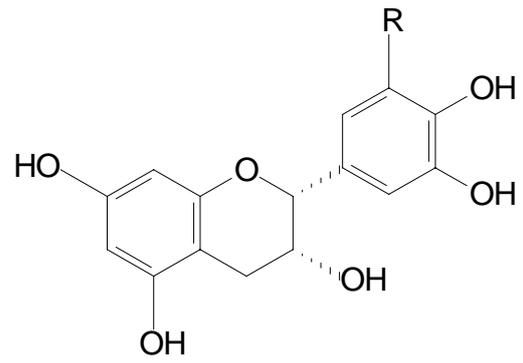
Das cascas de *C.geayi*, Palazzino e colaboradores⁹ isolaram os diterpenos geayina (**43**), 7- deoxogeanina (**44**), geayinina (**45**) e isogeayinina (**46**).

COMPOSTOS POLIFENÓLICOS



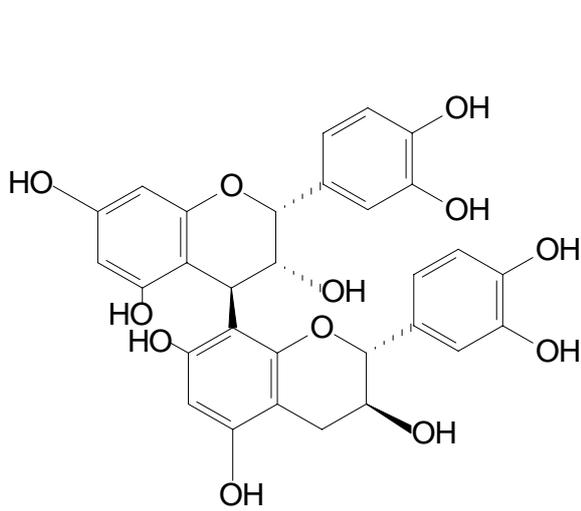
R = H (1)

R = OH (3)

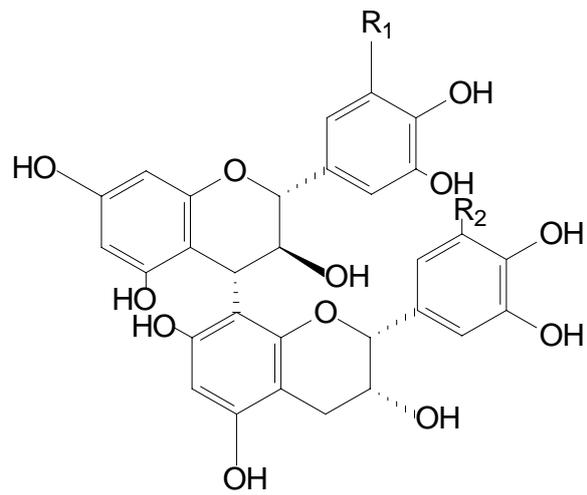


R = H (2)

R = OH (4)



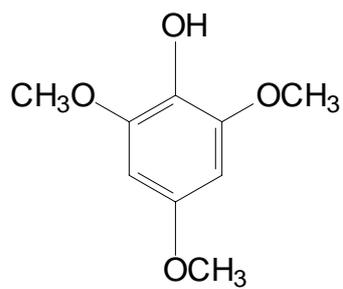
(5)



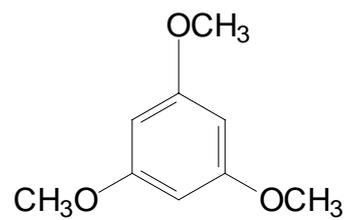
(6) R₁ = R₂ = H

(7) R₁ = H, R₂ = OH

(8) R₁ = OH, R₂ = H

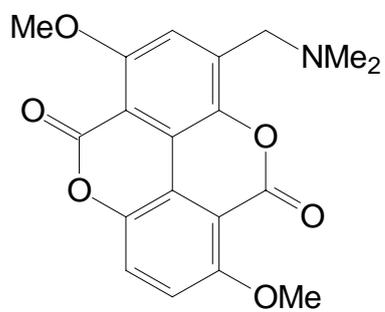


(12)

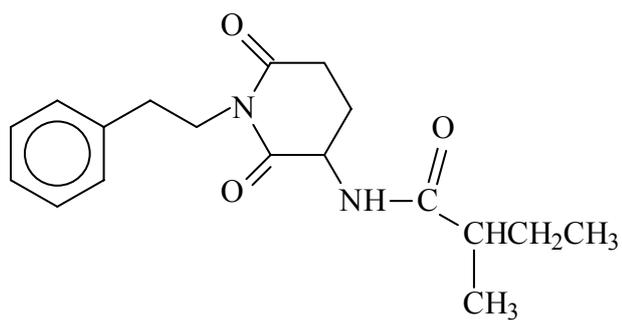


(13)

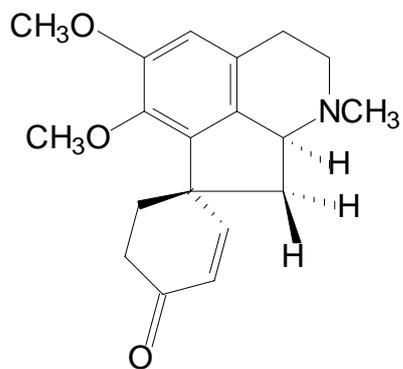
ALCALÓIDES



(9)

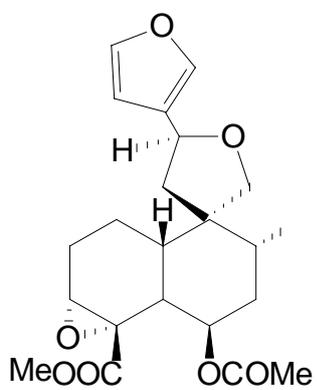


(39)

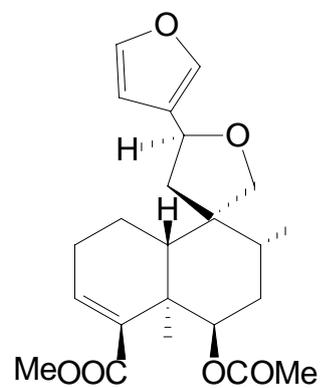


(40)

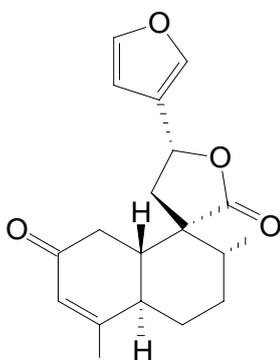
DITERPENOS



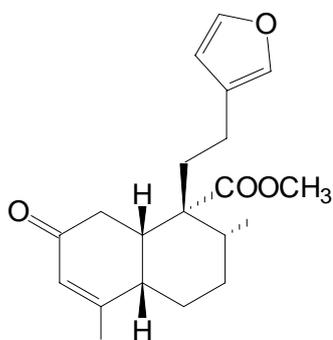
(10)



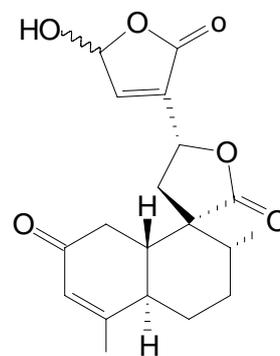
(11)



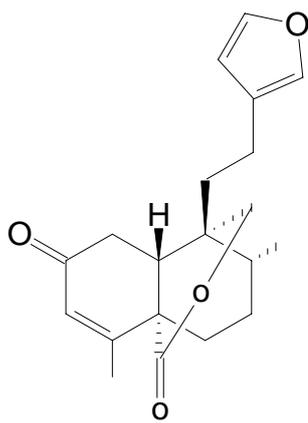
(15)



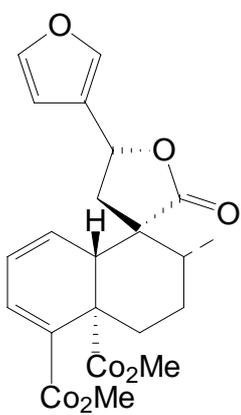
(16)



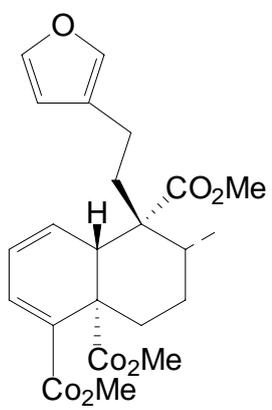
(17)



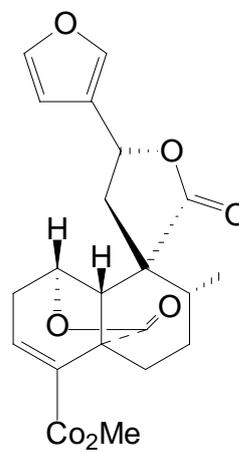
(18)



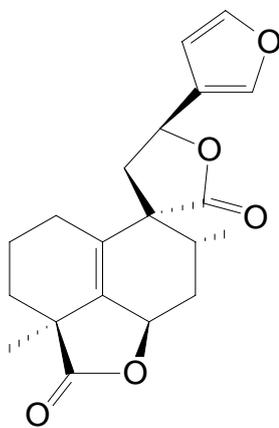
(23)



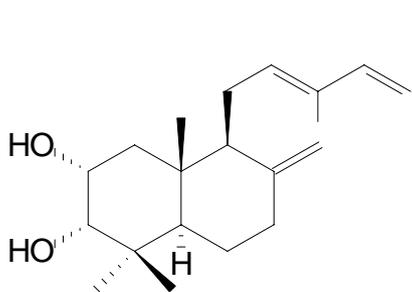
(24)



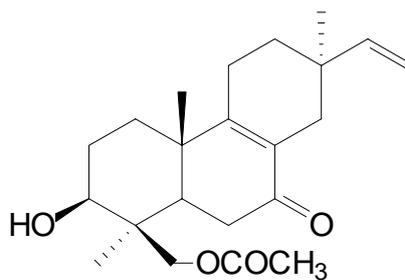
(25)



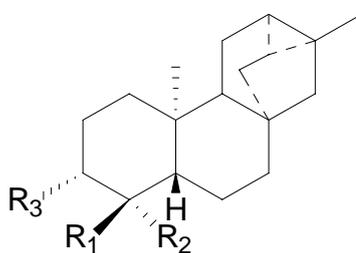
(34)



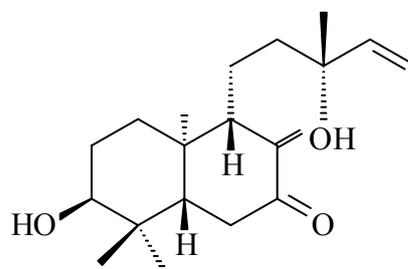
(32)



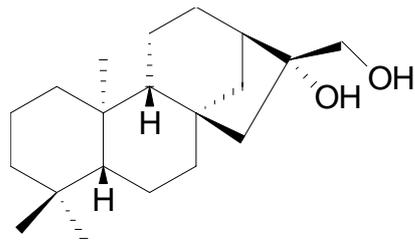
(33)



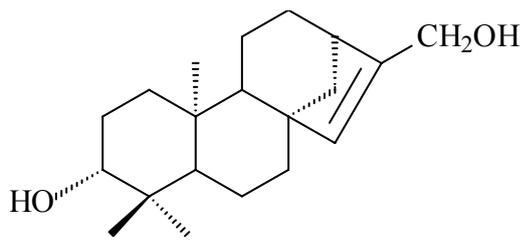
	R ₁	R ₂	R ₃
(35)	CH ₃	CH ₂ OH	OH
(36)	CH ₂ OH	CH ₂ OH	OH



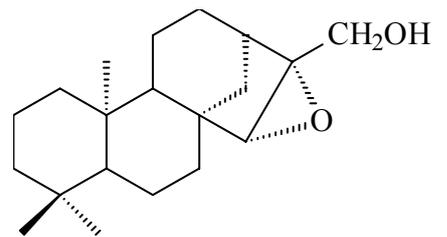
(37)



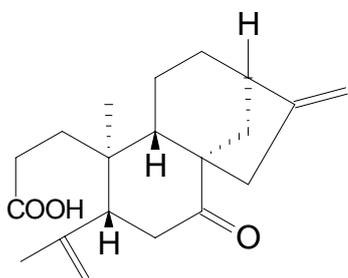
(38)



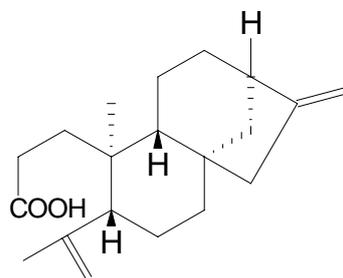
(42)



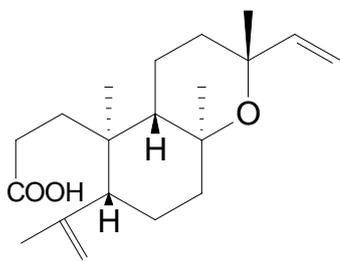
(41)



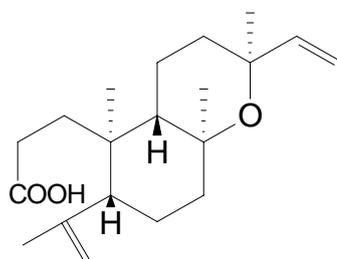
(43)



(44)

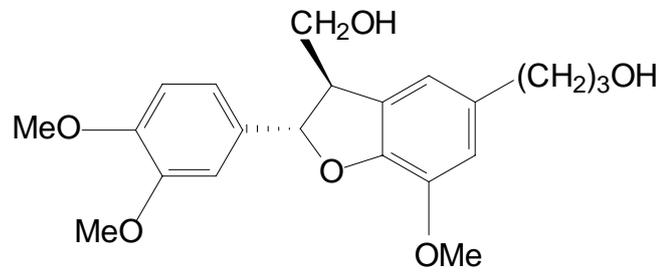


(45)

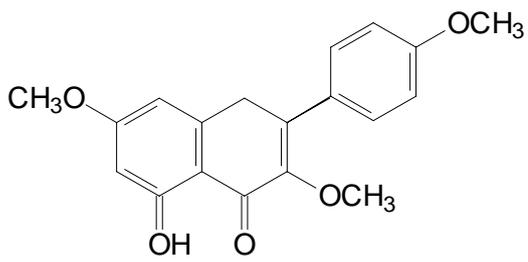


(46)

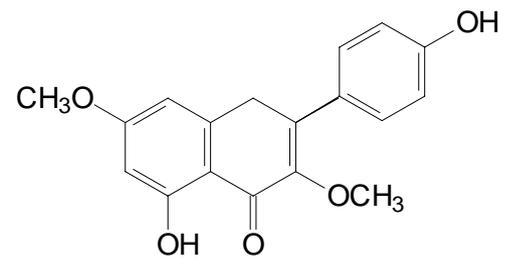
FLAVONÓIDES E LIGNANA



(14)



(19)



(20)

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais e Métodos

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrometro VARIAN, modelo Gemini 2000 BB 300 MHz, (300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos foram apresentados em ppm, tendo como referência interna o TMS ($\delta = 0,0$ ppm). Os solventes deuterados utilizados foram ALDRICH e/ou ISOTEC.

A interpretação dos dados foi realizada com auxílio da técnica DEPT 135 e DEPT 90, e confirmado por dados espectroscópicos de correlações bidimensionais como COSY 45 e HETCOR.

As cromatografias em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando sílica gel [(0,063 – 0,020mm) (70 – 230 mesh ASTM)] da Merck e sílica *flash* [(0,035-0,070mm) (220-440 mesh ASTM)]. As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material empregado. Para acompanhamento da cromatografia em coluna utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD).

As eluições foram feitas com solventes orgânicos puros ou combinadas em ordem crescentes de polaridade sendo as frações obtidas concentradas em evaporador rotativo.

As placas para cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada preparativa foram feitas utilizando-se sílica gel GF254 (Fluka), suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm e 1,00 mm de espessura sobre placas de vidro de 5 x 20 e 20 x 20 cm, respectivamente.

A visualização dos compostos em CCD foi realizada utilizando reveladores como $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) e o revelador para terpenos anisaldeído: ácido acético: ácido sulfúrico: metanol (0.5 : 10 : 5 : 85) com posterior aquecimento em chapa.

4.2 - Estudo químico da espécie vegetal *Croton floribundus*

4.2.1 - Coleta e secagem da planta

A espécie *C. floribundus* utilizada neste estudo foi coletada em Maringá na rodovia Maringá-Paiçandu, em agosto de 2001. A planta foi identificada pela professora Dr^a Cássia Mônica Sakuragui do departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário dessa universidade sob registro HUM 8.406. O material coletado (folhas e cascas) foi seco em estufa e moído, rendendo 1,2 kg de folhas e 2,8 kg de cascas.

4.2.2 - Preparação dos extratos das cascas (CF-SH, CF-SD e CF-SM)

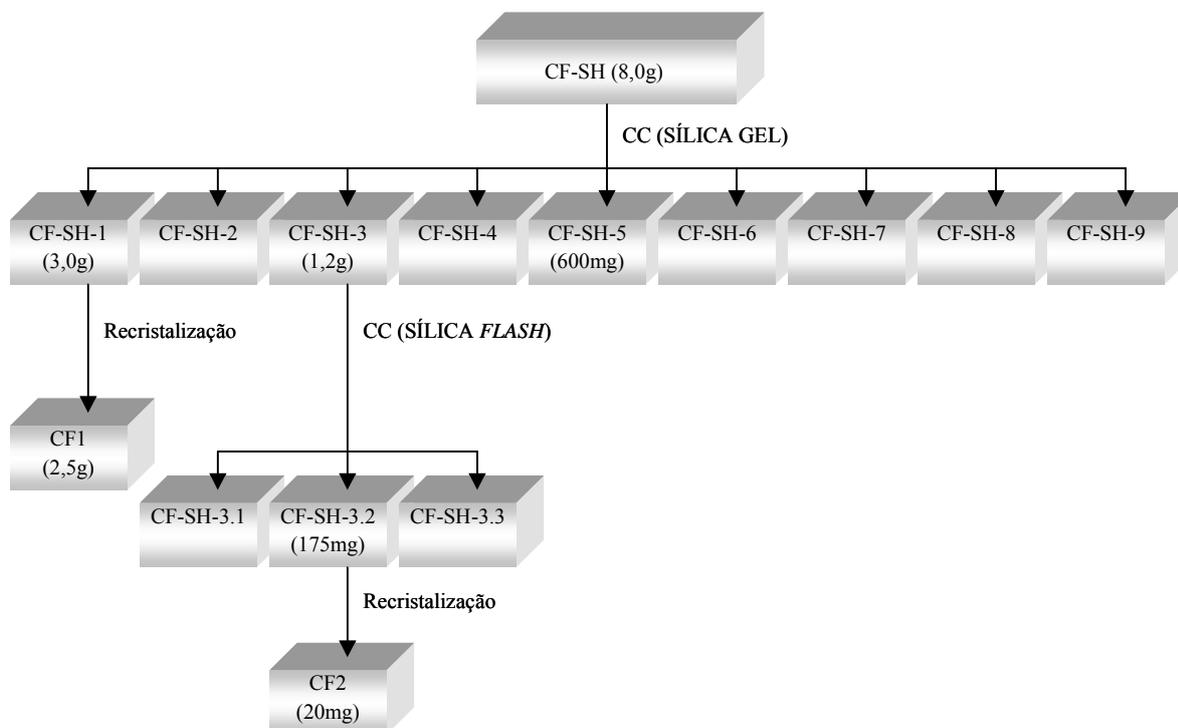
As cascas após secas foram moídas até resultar em pó. Este pó foi submetido a duas metodologias diferentes de extração: extração realizada em aparelho Soxhlet e extração por maceração à temperatura ambiente. Na extração por Soxhlet foram utilizadas 100g do material vegetal seco e moído o qual foi extraído em aparelho Soxhlet, inicialmente com hexano em seguida com diclorometano e etanol, seqüencialmente por 24 horas, cada. Os extratos foram evaporados em rotaevaporador a 40°C e liofilizados fornecendo os extratos codificados como: CF-SH (8,0 g), CF-SD (4,0 g) e CF-SM (30 g).

4.2.3 – Extração por maceração (CF-EBH e CF-EBE)

O pó proveniente das cascas (1,0 kg) foi extraído por maceração com hexano e etanol cada um, por uma semana. Os respectivos extratos foram concentrados em rotaevaporador e liofilizados resultando em 40 g de extrato bruto hexânico (CF-EBH) e 100 g de extrato bruto etanólico (CF-EBE).

4.2.4 - Isolamento dos constituintes químicos das cascas

O **esquema 1** apresenta o procedimento empregado no isolamento dos constituintes do extrato CF-SH



Esquema 1: Isolamento dos constituintes do extrato hexânico (CF-SH) da espécie *C. floribundus*

4.2.5 - Fracionamento do extrato hexânico (CF-SH)

O extrato hexânico (8,0 g) foi adsorvido em 15 g de sílica gel 60 e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30 g de sílica gel 60).

Foram utilizadas como eluentes misturas de hexano/ acetato de etila em ordem crescente de polaridade e em seguida a coluna foi lavada com acetato de etila/metanol 2%.

Foram coletadas 95 frações, de 20 mL cada, conforme mostrado na **Tabela 01**.

Tabela 01: Coluna cromatográfica do extrato CF-SH

eluentes utilizados	frações coletadas
Hexano	1-9
hexano/ acetato de etila 1%	10-14
hexano/ acetato de etila 2%	15-20
hexano/ acetato de etila 3%	21-25
hexano/ acetato de etila 5%	26-31
hexano/ acetato de etila 10%	32-36
hexano/ acetato de etila 15%	37-41
hexano/ acetato de etila 20%	42-47
hexano/ acetato de etila 30%	48-68
hexano acetato de etila 50%	69-78
acetato de etila	79-84
acetato de etila/metanol 2%	85-95

As frações, após análise em CCD, foram reunidas e pesadas conforme a **Tabela 02**.

Tabela 02: Frações reunidas da CC da fração CF-SH

Frações reunidas	código das frações	massa das frações (mg)
1-23	CF-SH-1	3000
24-27	CF-SH-2	400
28-39	CF-SH-3	1200
40-48	CF-SH-4	500
49-60	CF-SH-5	600
61-69	CF-SH-6	325
70-75	CF-SH-7	340
76-85	CF-SH-8	624
85-95	CF-SH-9	100

A fração CF-SH-1 foi recristalizada de MeOH resultando em 2,5 g do composto codificado como CF₁.

Cada uma das frações CF-SH-2 e CF-SH-4 foi submetida à CC usando como eluente Hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade e as subfracções resultantes destas colunas apresentaram-se como mistura de compostos quando analisadas por CCD.

Por apresentarem fluorescência sob luz UV (365nm e 254nm) as frações CF-SH 5,6, 7, 8, 9 foram submetidas a cromatografias em placa preparativa (CCDP). Por análise em CCD foi possível observar que os compostos extraídos das preparativas não estavam puros.

4.2.6 - Estudo da fração CF-SH-3. / Isolamento da substância CF₂.

A fração CF-SH-3 (1,2 g) foi adsorvida em 4 g de sílica gel 60 em seguida foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30 g de sílica gel 60).

Como eluente foi utilizado hexano/ acetato de etila em gradiente de polaridade. Foram coletadas 22 frações de 20 mL cada, conforme mostra a **Tabela 03**.

Tabela 03: Coluna cromatográfica do extrato CF-SH -3

eluentes utilizados	frações coletadas
hexano/ acetato de etila 5%	1-3
hexano/ acetato de etila 7%	4-6
hexano/ acetato de etila 10%	7-8
hexano/ acetato de etila 15%	9-11
Hexano/ acetato de etila 20%	12-14
Hexano/ acetato de etila 50%	15-17
acetato de etila	18-22

As frações foram reunidas por análise em CCD e pesadas conforme apresentado na **Tabela 04**.

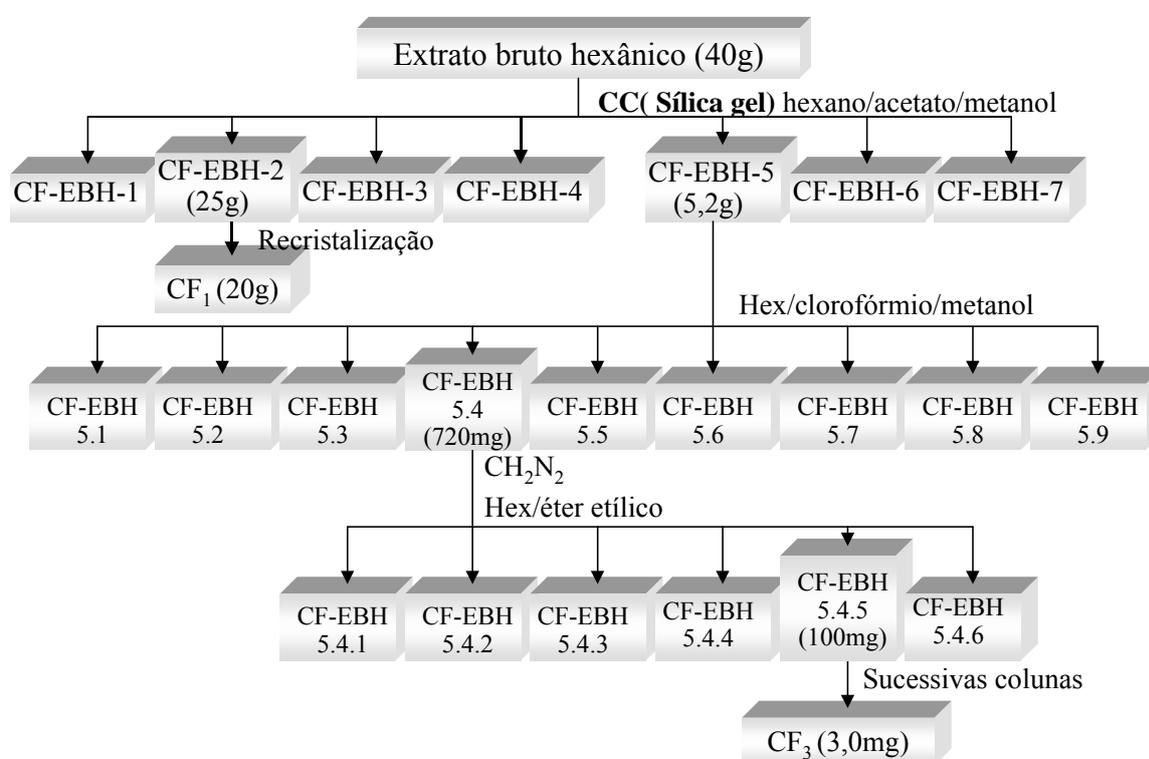
Tabela 04: Frações reunidas da CC da fração CF-SH-3

frações reunidas	código das frações	massa das frações(mg)
1-10	CF-SH-3.1	120
11-17	CF-SH-3.2	175
18-22	CF- SH-3.3	20

A fração CF-SH 3.2 foi recristalizada de MeOH, fornecendo 20 mg de um composto denominado CF₂.

4.2.7– Fracionamento do extrato CF-EBH

O **esquema 2** apresenta o procedimento empregado no isolamento dos constituintes do extrato extrato bruto hexânico



Esquema 02: Isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hexânico

O extrato bruto hexânico (40 g) foi adsorvido em 80 g de sílica gel e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 6$ cm , 350 g de sílica gel 60). A eluição foi realizada utilizando misturas de hexano/acetato em ordem crescente de polaridade, conforme

Tabela 05

Tabela 05: Coluna cromatográfica do extrato CF-EBH

eluentes utilizados	frações coletadas
hexano	1-50
hexano/acetato de etila 1%	51-81
hexano/acetato de etila 2%	82-107
hexano/acetato de etila 3%	108-118
hexano/acetato de etila 5%	119-128
hexano/acetato de etila 10%	129-144
hexano/acetato de etila 15%	145-246
hexano/acetato de etila 30%	247-262
hexano/acetato de etila 50%	263-304
acetato de etila	305-342

As frações foram reunidas após análise em CCD e pesadas como mostra a **Tabela 06**:

Tabela 06: Frações reunidas da CC do extrato CF-EBH

frações reunidas	código das frações	massa (mg)
1-159	CF-EBH-1	1400
160-189	CF-EBH-2	20000
190-264	CF-EBH-3	7500
265-290	CF-EBH-4	3800
291-324	CF-EBH-5	5200
325-340	CF-EBH-6	1200

A fração CF-EBH-1 apresentou-se como um óleo viscoso com cheiro de madeira. Pela revisão bibliográfica encontraram-se muitos relatos no gênero *Croton* de óleos essenciais, esta fração foi analisada em CG-MS, de onde foram detectadas pelo menos 58 substâncias.

Da fração CF-EBH-2, por recristalização de MeOH, foi isolada uma substância que se constatou por análise em CCD e RMN de ^1H se tratar novamente da substância CF₁. As frações CF-EBH-3 e CF-EBH-4 apresentaram basicamente os mesmos compostos sob análise de CCD. Desta forma, optou-se por estudar a fração CF-EBH-3, pois a mesma continha menos pigmentação.

A fração CF-EBH-6 não foi estudada por apresentar-se como mistura complexa de compostos observados por análise em CCD.

4.2.8 - Estudo da fração CF-EBH-3

A fração CF-EBH-3 (7,5 g) foi adsorvida em 8,5 g de sílica gel 60 e eluída em hexano/acetato com gradiente de polaridade ($\phi = 2,5$ cm ; 30 g de sílica gel) como apresentado na **Tabela 07**:

Tabela 07: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-3

eluentes utilizados	frações coletadas
hexano/acetato de etila 0,5 %	1-18
hexano/acetato de etila 1 %	19-39
hexano/acetato de etila 2 %	40-48
hexano/acetato de etila 3 %	49-59
hexano/acetato de etila 5 %	60-64
hexano/acetato de etila 10 %	65-91
hexano/acetato de etila 30 %	92-97

As frações foram reunidas após análise em CCD, conforme a **Tabela 08**:

Tabela 08: Frações reunidas da CC de CF-EBH 3.3

Frações reunidas	código das frações	Massa (mg)
1-30	CF-EBH-3.1	900
31-49	CF-EBH-3.2	1000
50-80	CF-EBH-3.3	1500
81-100	CF-EBH-3.4	2000

Verificou-se, por análise em CCD, que o componente majoritário da fração CF-EBH-3.1 era também o CF₁, portanto não foi estudada.

A fração CF-EBH-3.2 foi submetida a uma CC em sílica gel usando misturas de hexano/acetato como eluentes, resultando em 47 frações que foram re combinadas por análise em CCD em 3 subfrações: 1-19; 20-55 (450 mg); 36-55 (100 mg) que foram codificadas como CF-EBH-3.2.1, CF-EBH-3.2.2, CF-EBH-3.2.3. Das frações CF-EBH-3.2.2, CF-EBH-3.2.3 foram feitas cromatografias em camadas preparativas (CCDP) usando como eluentes hexano/diclorometano com vapor de amônia. Através da análise em CCD, observou-se que os compostos extraídos das cromatografias em camadas preparativas não estavam puros.

4.2.9 - Estudo da fração CF-EBH 3.3

A fração CF-EBH3.3 (1,5 g) foi adsorvida em 3,0 g de sílica gel e fracionada em coluna cromatográfica (CC) ($\phi = 2,5$ cm ; 30 g sílica gel). A eluição foi feita utilizando misturas de hexano/ diclorometano/ acetato de etila em ordem crescente de polaridade conforme a **Tabela 09**

Tabela 09: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH3.3

Eluentes utilizados	Frações coletadas
Hexano/diclorometano 50%	1-27
diclorometano	28-39
Diclorometano/acetato 5%	40-50

As frações foram reunidas por análise em CCD e pesadas conforme a **Tabela 10**

Tabela 10: Frações reunidas da CC de CF-EBH-3.3

Frações reunidas	código das frações	massa (mg)
1-15	CF-EBH3.3.1	82
16-25	CF-EBH3.3.2	300
26-42	CF-EBH3.3.3	510
43-50	CF-EBH3.3.4	50

Na fração CF-EBH-3.3.3 verificou-se, por análise em CCD, a presença de dois compostos que apresentaram fluorescência sob luz UV 254nm e de mais substâncias que só apareciam quando reveladas com ácido ou revelador para terpenos. Foram feitas 5 preparativas (CCDP) usando como fase móvel diclorometano com vapor de amônia as faixas retiradas das preparativas foram extraídas com metanol. Para completa purificação se fez necessário mais uma cromatografia em camada preparativa usando como eluente hexano/diclorometano 50% com vapor de amônia resultando no isolamento de um composto codificado como CFM (3mg). Este composto não foi identificado, pois não apareceram todos os sinais de carbono.(RMN ¹³C)

4.2.10 - Estudo da fração CF-EBH-5/Isolamento de CF₃

Esta fração foi adsorvida em 15 g de sílica gel e submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 6,0$ cm ; 15 g de sílica gel 60) usando como eluentes misturas de hexano/clorofórmio/metanol em ordem crescente de polaridade conforme a **Tabela 11**

Tabela 11: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5

eluentes utilizados	frações coletadas
hexano/clorofórmio 50%	1-20
clorofórmio	21-48
clorofórmio/metanol 0,5%	49-67
clorofórmio/metanol 1%	68-88
clorofórmio/metanol 2%	89-100
clorofórmio/metanol 5%	101-113
clorofórmio/metanol 7 %	114-126
clorofórmio/metanol 10%	127-140
clorofórmio/metanol 15%	141-153
clorofórmio/metanol 20%	154-171
clorofórmio/metanol 30%	172-184
clorofórmio/metanol 50%	185-197

As frações foram reunidas e pesadas como apresentado na **Tabela 12**

Tabela 12: Frações reunidas da CC de CF-EBH-5

Frações reunidas	Código das frações	Massa(mg)
1-59	CF-EBH-5.1	50
60-69	CF-EBH-5.2	90
70-84	CF-EBH-5.3	1500
85-99	CF-EBH-5.4	1930
100-109	CF-EBH-5.5	350
110-119	CF-EBH-5.6	300
120-129	CF-EBH-5.7	80
130-139	CF-EBH-5.8	40
140-197	CF-EBH-5.9	90

As frações CF-EBH-5.3, CF-EBH-5.4, CF-EBH-5.5, CF-EBH-5.6 apresentaram substâncias com os mesmos r_f 's, em virtude disto, foi trabalhado somente com a fração de maior massa (CF-EBH-5.4).

Na fração CF-EBH-5.4 formou um precipitado que foi purificado com MeOH fornecendo 720mg. Com base no perfil em CCD foram observados quatro compostos e esta mistura foi codificada como CF-EBH-5.4 M. A fração (720mg) foi metilada com diazometano e em seguida foi submetida a uma CC ($\phi = 2,5$ cm; 30 g sílica *flash*) usando misturas de hexano/éter etílico em ordem crescente e de polaridade. Foram coletadas 375 frações de 3 mL cada uma como mostra a **Tabela 13**.

Tabela 13: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5.4M

eluentes utilizados	frações coletadas
hexano/éter etílico 2%	1-117
hexano/éter etílico 5%	118-230
hexano/éter etílico 10%	231-256
hexano/éter etílico 20%	257-301
hexano/éter etílico 50%	302-318
éter etílico	319-375

As frações foram reunidas por análise em CCD e pesadas conforme mostra a **Tabela 14**:

Tabela 14: Frações reunidas da CC de CF-EBH-5.4M

Frações reunidas	Código das frações	Massa(mg)
1-150	CF-EBH-5.4.M.1	5
151-239	CF-EBH-5.4.M.2	10
240-245	CF-EBH-5.4.M.3	50
246-319	CF-EBH-5.4.M.4	80
320-339	CF-EBH-5.4.M.5	100
340-375	CF-EBH-5.4.M.6	120

A fração CF-EBH-5.4. M.5 foi novamente cromatografada em coluna isocrática usando como eluente hexano/éter etílico 50%. As frações foram coletadas em volume de 6 mL cada, resultando em 62 frações. A subfração principal 36-54 (50 mg) foi cromatografada em CC ($\phi = 0,7$ cm ; 5 gramas de sílica *flash*). Os eluentes utilizados foram misturas de hexano/ acetato de etila com gradiente de polaridade, como mostra a **Tabela 15**.

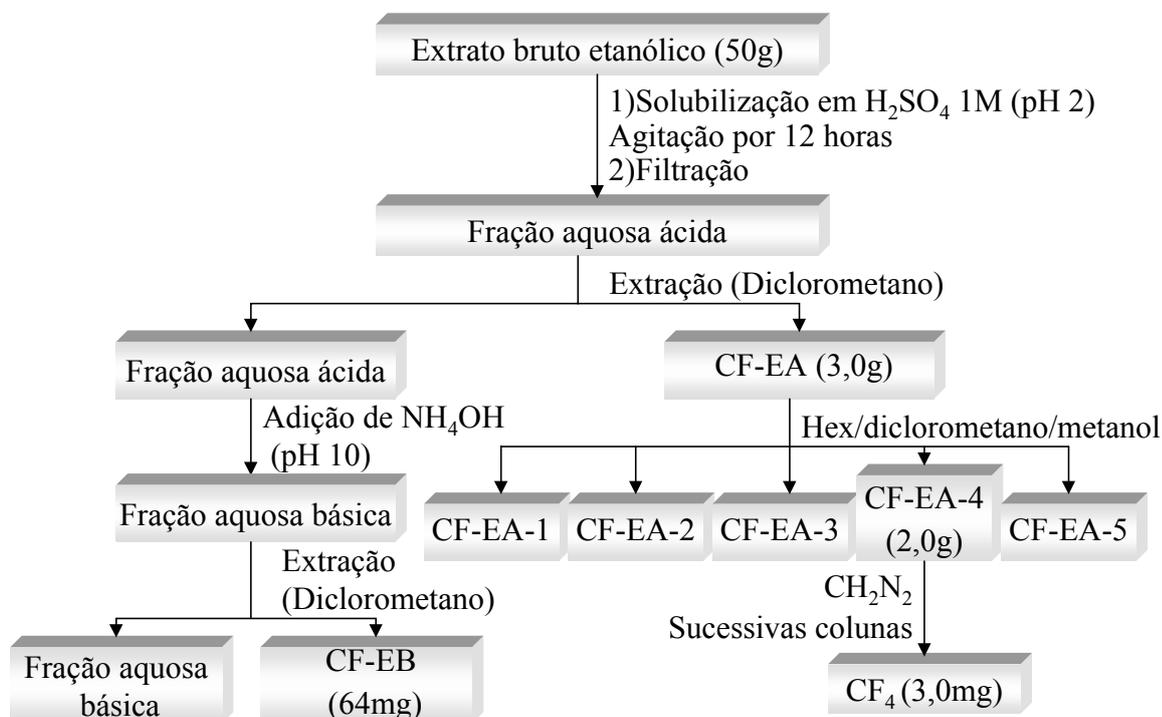
Tabela 15: Coluna cromatográfica da fração CF-EBH-5.4M.5

Eluentes utilizados	Frações coletadas
Hexano/acetato 5%	1-9
Hexano/acetato 7%	10-19
Hexano/acetato 10%	20-49
Hexano/acetato 30%	50-66

As frações 55-56 (4,5 mg) forneceram o composto codificado como CF₃.

4.2.11 - Fracionamento do extrato bruto etanólico (CF-EBE) pela metodologia de extração ácido-base

O **esquema 03** apresenta o procedimento empregado no isolamento dos constituintes do extrato bruto etanólico



Esquema 03 Isolamento dos constituintes do extratobruto etanólico pela metodologia de extração ácido base.

O extrato bruto etanólico (50g) proveniente da maceração foi solubilizado em solução ácida de pH=2. Após filtrada a solução ácida foi extraída exhaustivamente com diclorometano resultando em 3,0 g da fração denominada CF-EA. À solução ácida restante foi adicionada solução de NH₄OH até pH = 10. Entre pH7 e 10 precipitou 30g de um sólido marrom insolúvel denominado CF-EBp. A solução básica foi extraída com diclorometano repetidamente obtendo-se a fração CF-EB (64 mg).

A análise em CCD feita com a fração CF-EB, usando o reagente de Dragendorff como revelador, mostrou teste negativo para alcalóides.

4.2.12 - Estudo da fração CF-EA

A fração CF-EA (3,0 g) foi adsorvida em 9 g de sílica gel e submetida a uma CC ($\phi = 6$ cm; 100 g de sílica gel). A fração foi eluída com misturas de hexano diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade. As frações foram coletadas em volume de 250 mL cada uma conforme apresentado na **Tabela 16**.

Tabela 16: Coluna cromatográfica da fração CF-EA

Elentes utilizados	Frações coletadas
hexano/diclorometano 10%	1-4
hexano/diclorometano 20%	5-6
hexano/diclorometano 50%	7-9
diclorometano	10-12
diclorometano/metanol 5%	13-17
diclorometano/metanol 10%	18-37

As frações foram reunidas (CCD) e pesadas como mostra a **Tabela 17**

Tabela 17: Frações reunidas da CC de CF-EA

Frações reunidas	Código das frações	Massa (mg)
1-8	CF-EA-1	400
9-19	CF-EA-2	140
20-26	CF-EA-3	80
27-36	CF-EA-4	2000
37	CF-EA-5	200

Desta coluna só foi trabalhada a fração CF-EA-4 de maior massa (2,0 g).

4.2.13 - Estudo da fração CF-EA-4

A fração CF-EA-4 (2,0 g) foi submetida ao fracionamento em CC ($\phi = 2,5$ cm; 30 g sílica *flash*). A eluição foi feita utilizando misturas de diclorometano/metanol em ordem

crescente de polaridade. As frações foram coletadas em volume de 20 mL cada uma como está apresentado na **Tabela 18**:

Tabela 18: Coluna cromatográfica da fração CF-EA-4

Eluentes utilizados	Frações coletadas
diclorometano/metanol 0,5%	1-29
diclorometano/metanol 1%	30-40
diclorometano/metanol 2%	41-56
diclorometano/metanol 3%	57-64
diclorometano/metanol 4%	65-73
diclorometano/metanol 5%	74-85
diclorometano/metanol 10%	86-96
metanol	97-107

As frações foram reunidas (CCD) e pesadas como mostra a **Tabela 19**

Tabela 19: Frações reunidas da CC de CF-EA-4

Frações reunidas	Código das frações	Massa (mg)
1-8	CF-EA-4.1	50
9-38	CF-EA-4.2	450
39-45	CF-EA-4.3	150
46-47	CF-EA-4.4	120
48-57	CF-EA-4.5	370
58-62	CF-EA-4.6	139
63-66	CF-EA-4.7	131
67-72	CF-EA-4.8	74
73-76	CF-EA-4.9	30
77-107	CF-EA-4.10	277

Desta coluna só foram trabalhadas as frações que continham maior quantidade de material que são CF-EA-4.2 e CF-EA-4.5.

A fração CF-EA-4.2 foi submetida a uma CCDP (hexano/diclorometano/metanol) 7:7:1. Os compostos extraídos, por apresentarem vários compostos de natureza ácida, foram

metilados com diazometano em seguida foi realizada uma CCDP (éter etílico/metanol 12%) com vapor de amônia, resultando no isolamento de um composto **CFM₁** (3mg) que não foi possível identificar este composto, pois o mesmo não estava puro.

4.2.14 - Estudo da fração CF-EA-4.5/Isolamento de CF₄

Esta fração (370mg) foi metilada com diazometano e submetida ao fracionamento em CC ($\phi = 0,9$ cm; 9 g de sílica *flash*). Foram coletadas 364 frações de 6 mL cada uma conforme mostrado na **Tabela 20**

Tabela 20: Coluna cromatográfica da fração CF-EA-5

Eluentes utilizados	Frações reunidas
hexano/éter etílico 10 %	1-45
hexano/éter etílico 15 %	46-75
hexano/éter etílico 20 %	75-104
hexano/éter etílico 30 %	105-150
hexano/éter etílico 40 %	151-177
hexano/éter etílico 50 %	178-219
hexano/éter etílico 60 %	220-274
Éter etílico	275-364

As frações foram reunidas sob análise por CCD e pesadas como mostra a **Tabela 21**

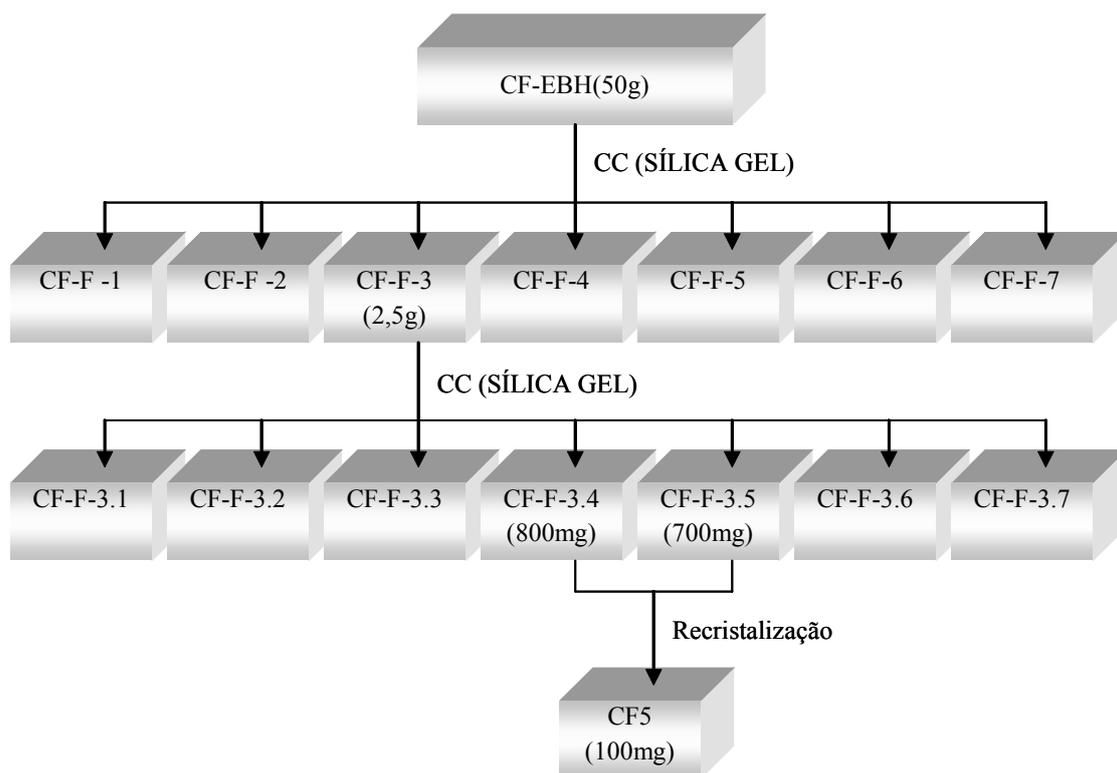
Tabela 21: Frações reunidas da CC de CF-EA-5.

Frações reunidas	código das frações	massa(mg)
1-24	CF-EA4.5M.1	10
25-35	CF-EA4.5M.2	5
36-55	CF-EA4.5M.3	20
56-100	CF-EA4.5M.4	35
101-105	CF-EA4.5M.5	5
106-190	CF-EA4.5M.6	40
191-210	CF-EA4.5M.7	50
211-287	CF-EA4.5M.8	71
288-364	CF-EA4.5M.9	100

A fração CF-EA4.M.5 forneceu (5mg) o composto codificado com CF₄

4.2.15- Fracionamento do extrato bruto etanólico

O esquema 04 apresenta o procedimento empregado no isolamento



Esquema 04: fracionamento do extrato bruto etanólico..

O extrato bruto etanólico 50 g foi adsorvido em 100 g de sílica gel e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 5,5$ cm; 225 g de sílica gel). Foram utilizados como eluentes hexano/ diclorometano /metanol com gradiente de polaridade. As frações em volume de 250 mL cada uma foram coletadas conforme mostrado na **Tabela 22**:

Tabela 22: Coluna cromatográfica do extrato bruto etanólico

Eluentes utilizados	Frações coletadas
hexano/diclorometano 50%	1-17
diclorometano	18-23
diclorometano/metanol 1%	24-27
diclorometano/metanol 2%	28-30
diclorometano/metanol 5%	31-33
diclorometano/metanol 10%	34-38
diclorometano/metanol 20%	39-42
diclorometano/metanol 30%	43-46
diclorometano/metano 50%	47-51
metanol	52-60

As frações foram reunidas (CCD) e pesadas como mostra a **Tabela 23**

Tabela 23: Frações reunidas da CC do extrato CF-EBE

Frações reunidas	Código das frações	Massa (g)
1-17	CF-EBE-1	4,0
18-33	CF-EBE-2	0,5
34-38	CF-EBE-3	2,5
39-42	CF-EBE-4	1,5
43-46	CF-EBE-5	1,0
47-51	CF-EBE-6	15
52-60	CF-EBE-7	18

Com base no perfil em CCD, foi observado que as substâncias contidas nas frações CF-EBE-1 e CF-EBE-2 eram basicamente as mesmas dos extratos (CF-SH e CF-SD), em virtude disto, não foram estudadas.

As frações CF-EBE-4,5,6,7 não foram estudadas, pois apresentaram-se como mistura complexa sob análise em CCD.

4.2.16 - Estudo da fração CF-EBE-3/ Isolamento do composto CF₅

A fração CF-EBE-3 (2,5 g) foi adsorvida em 7,5 g de sílica gel e submetida a uma CC ($\phi = 2,5$ cm; 40 g sílica gel). As frações foram coletadas em volume de 20 mL cada uma conforme apresentado na **Tabela 24**.

Tabela: 24 Coluna cromatográfica da fração CF-EBE-3

Eluentes	Frações coletadas
diclorometano	1-15
diclorometano/metanol 1%	16-26
diclorometano/metanol 3%	27-32
diclorometano/metanol 5%	33-43
diclorometano/metanol 7%	44-49
diclorometano/metanol 10%	50-55
diclorometano/metanol 15%	56-61
diclorometano/metanol 30%	62-67
Diclorometano/metanol 50%	68-72

As frações foram reunidas (CCD) e pesadas como mostra a **Tabela 25**

Tabela 25: Frações reunidas da CC de CF-EBE-3

Frações reunidas	Código das frações	Massa(mg)
1-20	CF-EBE-3.1	50
21-34	CF-EBE-3.2	100
35-40	CF-EBE-3.3	70
45-54	CF-EBE-3.4	800
55-60	CF-EBE-3.5	700
61-73	CF-EBE-3.6	300

As frações CF-EBE-3.4 e CF-EBE-3.5 após recristalização de clorofórmio/ metanol forneceram 100 mg do composto codificado como CF₅.

4.2.17 - Fracionamento do extrato diclorometânico (CF-SD) / Isolamento de CF₆

O extrato CF-SD (4,0 g) foi adsorvido em 8,0 g de sílica gel 60 e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica (CC) ($\phi = 2,5$ cm; 20 g de sílica gel 60). A eluição foi feita inicialmente com clorofórmio e, posteriormente, com gradiente clorofórmio/metanol até proporção de 1:1. Foram coletadas 85 frações de 20 mL cada, conforme apresentado na **Tabela 26**.

Tabela 26: Coluna cromatográfica do extrato CF-SD

eluentes utilizados	frações coletadas
clorofórmio	1-31
clorofórmio/metanol 5%	32-47
clorofórmio/metanol 10%	48-57
clorofórmio/metanol 20%	58-68
clorofórmio/metanol 30%	69-79
clorofórmio/metanol 50%	80-85

As frações foram reunidas e pesadas como apresentado na **Tabela 27**

Tabela 27: Frações reunidas da CC do extrato CF-SD

Frações reunidas	código das frações	massa (mg)
1-31	CF-SD-1	150
32-42	CF-SD-2	2500
43-55	CF-SD-3	325
56-84	CF-SD-4	99

Na fração CF-SD-1 foi observado, por análise em CCD, substâncias que apresentavam fluorescência sob luz UV, foram feitas cromatografias em camadas preparativas na tentativa de isolar estas substâncias, mas só se conseguiu, no máximo, 3 mg de material de cada faixa que ainda continha impureza.

A fração CF-SD-2 foi muito trabalhada por apresentar muitos compostos que apresentavam fluorescência sob luz UV (365nm) observados por CCD. A mesma foi

cromatografada em CC eluída com misturas de clorofórmio/metanol com gradiente de polaridade, sendo obtidas 84 frações que foram re combinadas por análise em CCD resultando em mais 5 subfrações 1-24 (45 mg), 25-29 (526 mg), 30-59 (903,7 mg), 60-70 (300 mg), 70-84 (101,7 mg). As frações 25-29 e 30-59 foram recromatografadas, mas nenhuma substância foi isolada. As demais frações foram submetidas a CCDP, os compostos extraídos das cromatografias em camadas preparativas apresentaram-se como mistura por análise em CCD.

Na fração CF-SD-3 formou um precipitado que após purificação com clorofórmio obteve-se a substância codificada como CF₆.

4.3 - Estudo da atividade Biológica da *Croton floribundus*

Os testes de atividade foram realizados no departamento de análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, sob coordenação do professor Dr. Benedito Dias Prado Filho e pela técnica Marinete Martinez. Em todos os testes realizados foi usado o método da microdiluição. Para realização da atividade antibacteriana a planta seca e moída foi submetida a uma nova extração com metanol apenas. O extrato foi evaporado e então liofilizado em seguida particionado em solventes resultando em: fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila, fração butanólica, fração aquosa e também com o composto CF₁.

4.3.1 - Avaliação da Atividade Antibacteriana

O método utilizado foi o da diluição em caldo (microdiluição): Para determinação da concentração mínima inibitória, duas diluições de todas as amostras dos antibióticos de referência foram feitas em meio Mueller-Hinton (Merck SA). O inóculo foi preparado com o mesmo meio e a densidade ajustada por comparação ao tubo n^o 5 da escala da MacFarland (10⁸ UFC/mL), em seguida diluído 1:10 no mesmo meio. Aliquotas de 100 µL da suspensão de bactérias foram adicionados a cada poço da placa de microdiluição contendo 100 µL das diluições decimais da amostra ou antibióticos de referência (controle). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A concentração mínima inibitória (**CMI**) é considerada a menor concentração da amostra que previne o crescimento visível. A concentração mínima bactericida (**CMB**) é determinada pelo subcultivo de 10 µL de cada poço negativo e dos controles positivos. A **CMB** é definida como a menor concentração produzindo subcultivo negativo ou o crescimento de uma só colônia.

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Escherichia coli* ATCC25922 e os antibacterianos penicilina, vancomicina e tetraciclina, respectivamente.

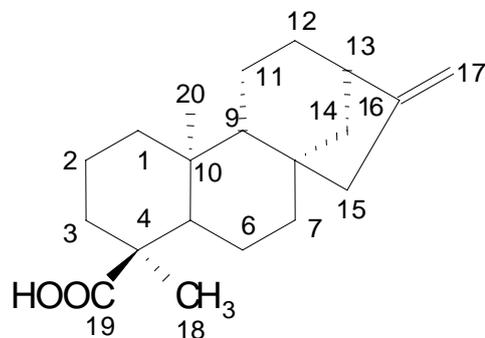
5 – DISCUSSÃO

Os extratos das cascas de *C.floribundus* foram submetidos a duas metodologias diferentes de extração: extração por SOXHLET e por maceração. Segundo a medicina popular, as cascas, em forma de infuso, têm propriedades cicatrizantes, logo, foram realizadas extrações à quente a fim de que fosse extraído o princípio ativo responsável pela cicatrização das feridas. A extração a quente é muito eficaz, porém o aquecimento pode gerar mudanças nos metabólitos secundários (artefatos), sendo assim, foi realizada a extração por maceração de modo que a metodologia à quente fosse validada.

Pela revisão bibliográfica foi visto que os alcalóides eram os marcadores taxonomicos do genero *Croton*, com base nesta informação traçamos um perfil cromatográfico em camada delgada com o extrato bruto (CF-EBE) usando como revelador o reagente de Dragendorf o perfil mostrou que muitos compostos deram teste positivo (apresentaram cor laranja quando borrifado com este revelador). Uma extração ácido-base do extrato bruto foi realizada, resultando nos extratos ácido e básico de alcalóides. O extrato básico de alcalóides foi submetido a uma CCDP na tentativa de separar o possível alcalóide, mas o composto extraído da placa preparativa por análise de RMN ^1H e ^{13}C apresentou-se como mistura de diterpenos do grupo caureno.

5.1 – Determinação Estrutural dos Compostos Isolados

5.1.1 – Composto CF₁



(CF₁)

O composto **CF₁** foi isolado das frações CF-SH e CF-EBH, na forma de cristal, como componente majoritário da planta, cerca de 2% do peso seco e rotação óptica ($\alpha_D = -151,0$).

A análise do espectro de RMN ¹H (**Figura 2**) apresentou sinais característicos de hidrogênios olefínicos em $\delta = 4,74$ e $4,80$, respectivamente. Os grupos metilas apresentaram um singlete em 1,24 ppm H-18 e outro em 0,95 ppm H-20.

No espectro de ¹³C/DEPT (**Figura 3**) foi possível visualizar 20 sinais que foram identificados como sendo (3 x CH), (10 x CH₂), (2 x CH₃) e cinco carbonos não ligados a hidrogênio (5 x C). Destes carbonos foram caracterizados pelo valor $\delta = 185,4$ (C) o grupamento ácido e $\delta = 156,0$ e $103,3$ (CH₂) referente aos carbonos olefínicos.

A comparação dos dados de ¹³C com os da literatura²⁵, permitiu a identificação deste composto como sendo o ácido caurenóico. A **Tabela 28** apresenta uma comparação entre alguns dados de RMN ¹H de CF₁ com os dados da literatura²⁵. A análise do espectro de HETCOR (¹³C x ¹H) (**Figura 4**), mostrou que os hidrogênios dos carbonos 1, 2, 3, 14 e 17 são heterotópicos e os demais hidrogênios dos carbonos metilênicos são homotópicos. O espectro de COSY (¹H x ¹H) (**Figura 5**) mostrou várias correlações, muitas destas em regiões de sinais sobrepostos, sendo possível evidenciar algumas informações sobre as conectividades do composto comprovando a estrutura proposta, tais como: H-1_a x H-2_b; H-5 x H-6; H-6 x H-7; H-9 x H-11; H-12 x H-13; H-13 x H-14_a e H-15 x H-17_b. A correlação H-15 x H-17_b é confirmada pelo espectro de NOESY (**Figura 6**) onde observou-se também a correlação do H-13 x H-17_a. Estas informações estão reunidas na **Tabela 29**

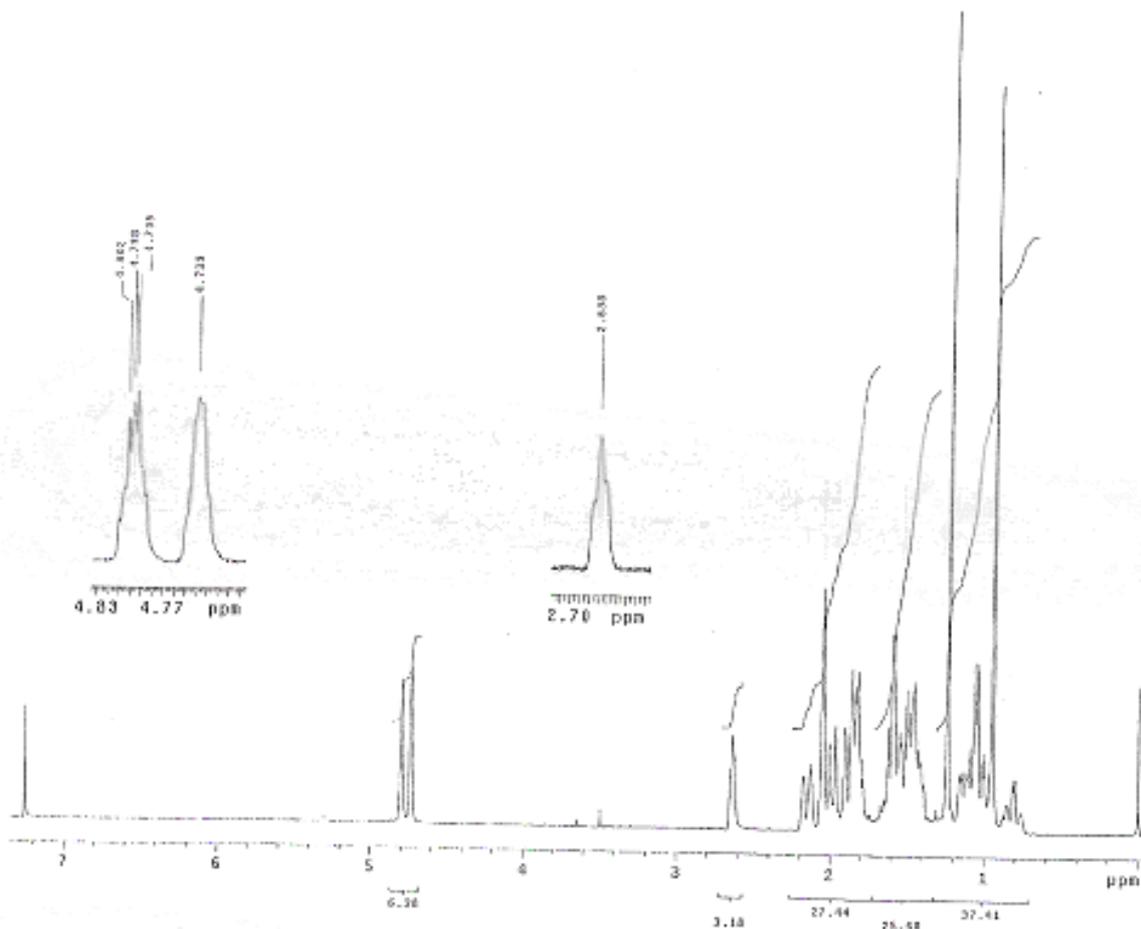


Figura 2: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_1

Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^1H (300,06MHz, ppm) de CF_1 com os dados da literatura²⁵

Ácido caur-16-en-19-óico.	CF_1^*
0,97 (3H, s H-20)	0,95 (3H, s H-20)
1,25 (3H, s, H-18)	1,24 (3H, s, H-18)
2,65 (1H, m, H-13)	2,64 (1H, m, H-13)
4,77 (2H, s, H-17)	4,74 (1H, sl, H_a -17)
	4,80(1H, sl, H_b -17)

- solvente utilizado: CDCl_3

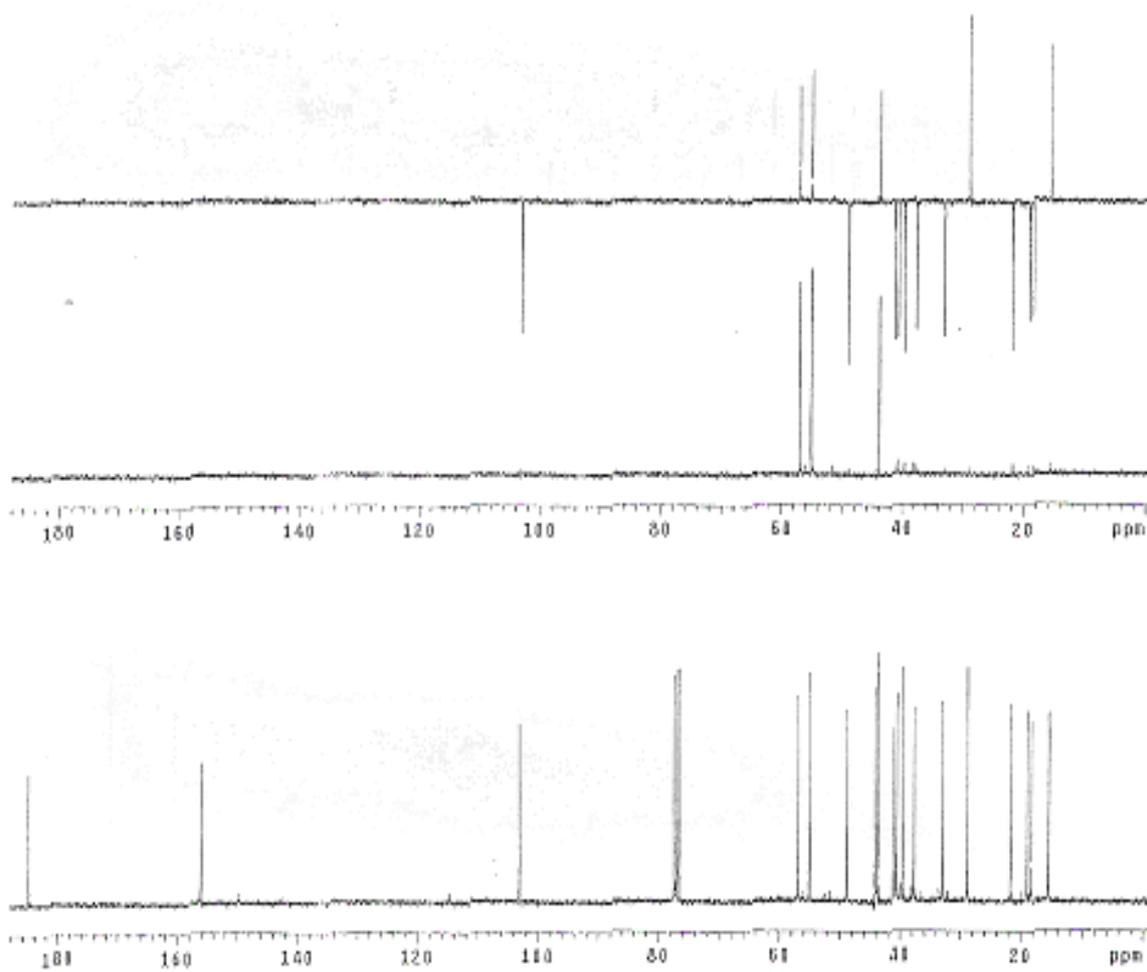


Figura 3: Espectro de ^{13}C /DEPT (75,5 MHz, CDCl_3) do composto CF_1

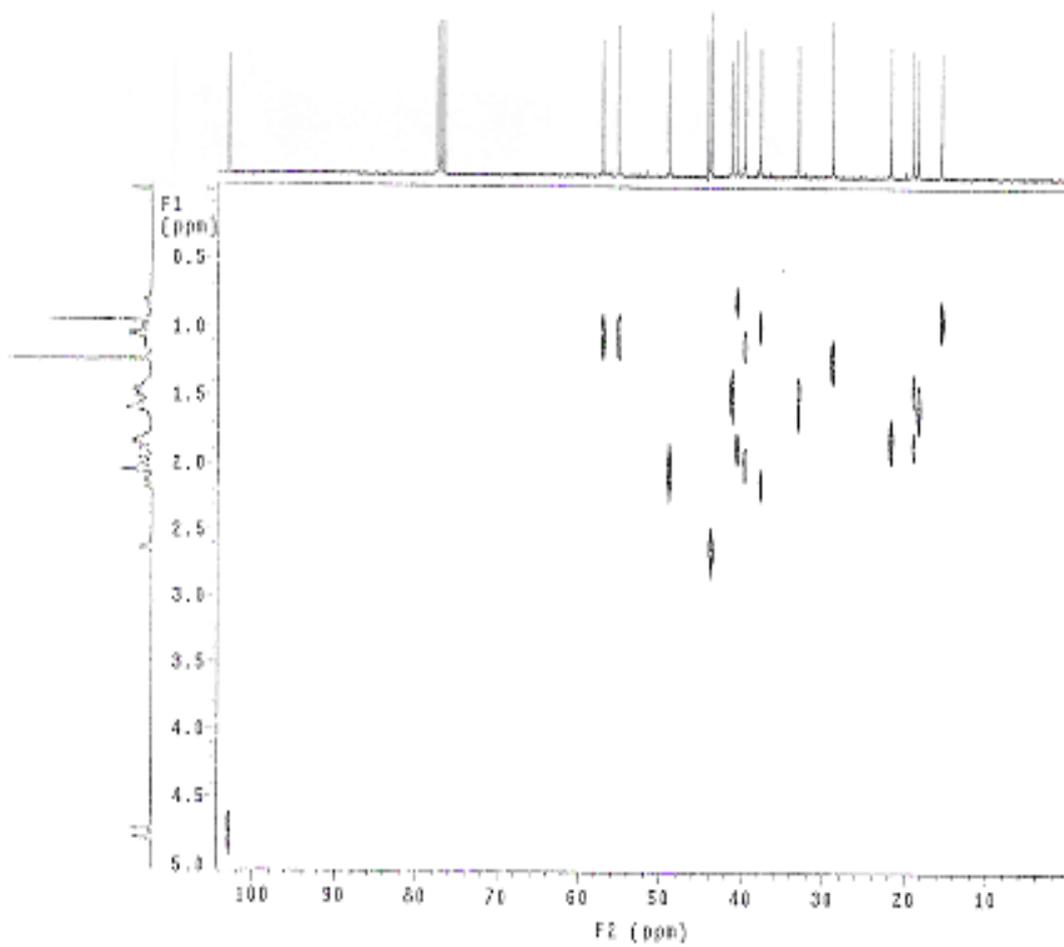


Figura 4: Espectro de HETCOR (^{13}C x ^1H) em CDCl_3 do composto CF_1 .

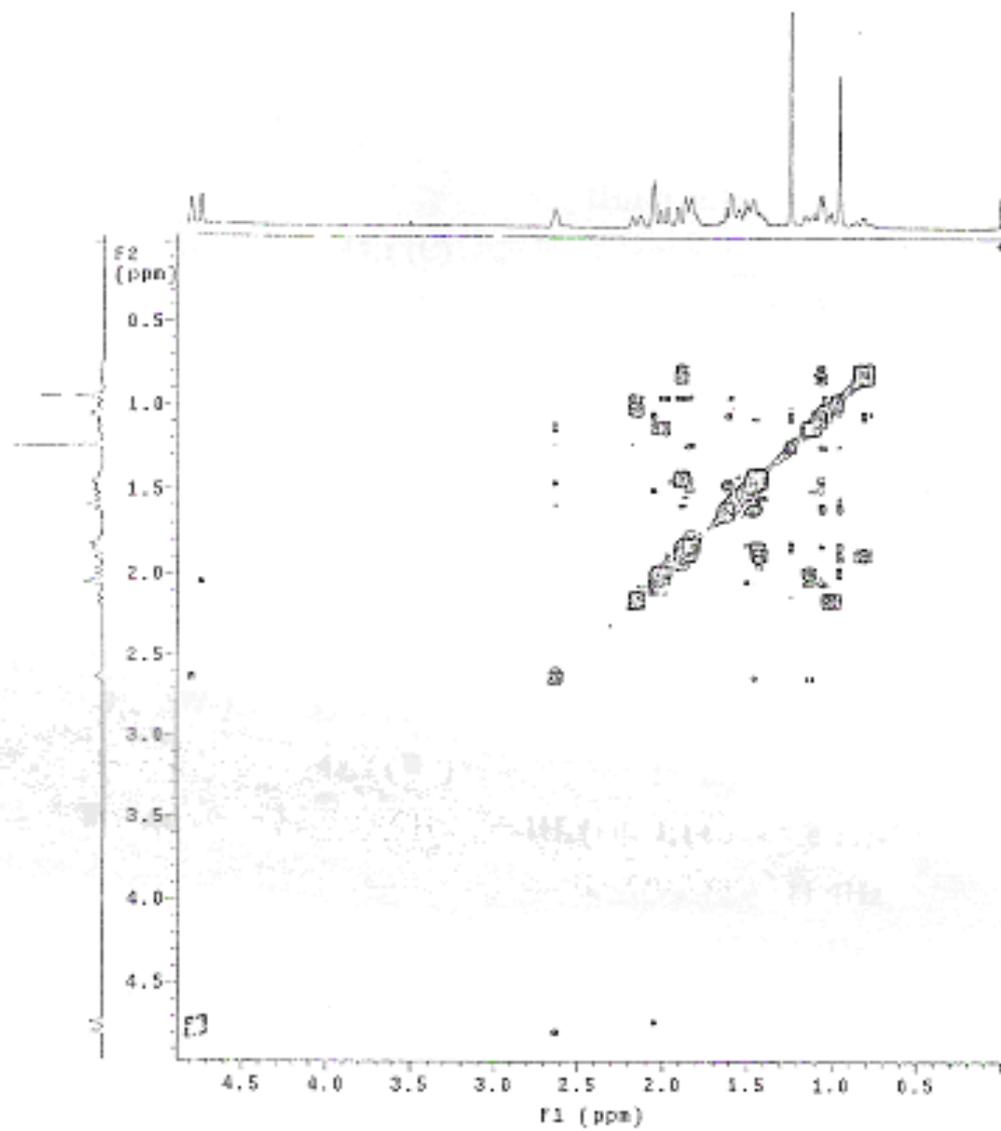


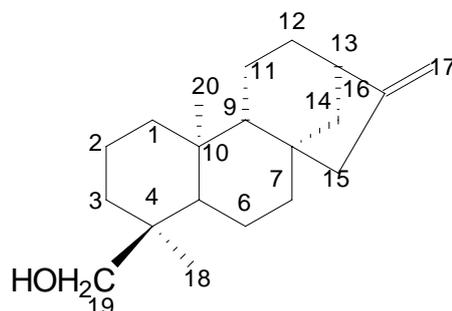
Figura 6: Espectro de NOESY em CDCl₃ do composto CF₁.

Tabela 29: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_1 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$).

C	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^{13}\text{C}/(\text{DEPT})$	HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) $\delta^1\text{H}$	COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) ($^2J, ^3J$ e 4J)
1	41,5 (CH ₂)	40,6 (CH ₂)	1H _a (m) 0,73-0,91 1H _b (m) 1,84-1,93	H-1 _b , H-2 _b H-1 _a
2	19,2 (CH ₂)	18,9 (CH ₂)	1H _a (m) 1,48-1,52 1H _b (m) 1,78-1,93	H-1 _a
3	38,0 (CH ₂)	37,7 (CH ₂)	1H _a (m) 0,97-1,04 1H _b (dl) 2,16 $J=14,4\text{Hz}$	H-3 _b H-3 _a
4	44,0 (C)	44,1 (C)	—	—
5	57,3 (CH)	57,0 (CH)	1H(m) 1,03-1,10	H-6
6	22,0 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)	2H(m) 1,78-1,93	H-5 e H-7
7	41,5 (CH ₂)	41,2 (CH ₂)	2H(m) 1,36-1,56	H-6
8	44,4 (C)	43,6 (C)	—	—
9	55,4 (CH)	55,0 (CH)	1H(m) 1,03-1,10	H-11
10	39,8 (C)	39,6 (C)	—	—
11	18,5 (CH ₂)	18,3 (CH ₂)	2H (m) 1,60	H-9
12	33,2 (CH ₂)	33,0 (CH ₂)	2H (m) 1,36-1,48	H-13
13	44,0 (CH)	43,7 (CH)	1H(m) 2,64	H-12 e H-14 _a
14	39,8 (CH ₂)	39,6 (CH ₂)	1H _a (ddl) 1,14 $J=4,8$ e 11,4Hz 1H _b (dl) 1,99 $J=11,4\text{Hz}$	H-13
15	49,0 (CH ₂)	48,9 (CH ₂)	2H (d) 2,05 $J=2,4\text{Hz}$	H-17 _b
16	156,0 (C)	156,0 (C)	—	—
17	103,3 (CH ₂)	103,0 (CH ₂)	H _a (sl) 4,74 e H _b (sl) 4,80	H-15
18	29,0 (CH ₃)	28,8 (CH ₃)	3H(s) 1,24	—
19	185,4 (C)	184,3 (C)	—	—
20	15,7 (CH ₃)	15,4 (CH ₃)	3H(s) 0,95	—

¹³C^a dados da literatura²⁵ para o ácido caurenóico em CDCl_3

5.1.2 – Composto CF₂



(CF₂)

O composto CF₂ foi isolado da fração CF-SH-3 por recristalização de MeOH . O espectro de hidrogênio (**Figura 7**) deste composto apresentou sinais semelhantes ao do CF₁, evidenciando a presença de sinais de hidrogênios olefínicos em 4,74 (sl) e 4,79(sl) característicos da série dos caurenos e as metilas em 0,96 ppm e em 1,56 ppm que por analogia com CF₁ são dos hidrogênios H-18 e H-20. Além destes sinais este composto apresentou em δ 3,44 (dd $J_{gem} = 10,8$ Hz e $J = 5,1$ Hz) e δ 3,75 (dd $J_{gem} = 10,8$ Hz e $J = 6,6$ Hz). O espectro de ¹³C/DEPT (**Figura 8**) apresentou 20 sinais sendo 11 x CH₂, 3 x CH, 2 x (CH₃) e 4 carbonos não ligados a hidrogênios (C). Os carbonos olefínicos foram caracterizados pelos valores em 102,9 ppm (CH₂) e 156,0 ppm (C) e o grupo álcool foi confirmado pelo valor do carbono metilênico em 65,5 ppm. A comparação dos dados de RMN ¹³C de CF₂ com os dados da literatura²⁶ permitiu identificar esse composto como sendo o candol B. A **Tabela 30** apresenta a comparação dos dados de RMN ¹³C de CF₂ com os da literatura²⁶.

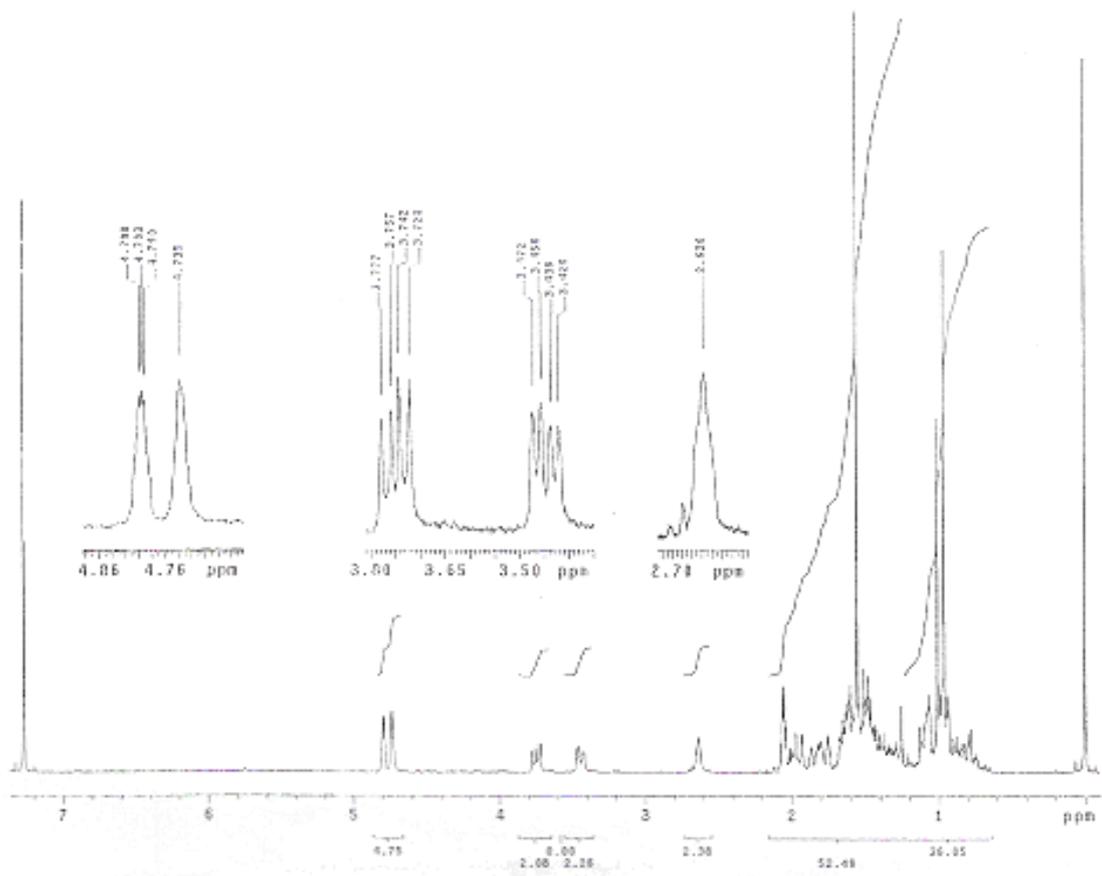


Figura 7: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_2

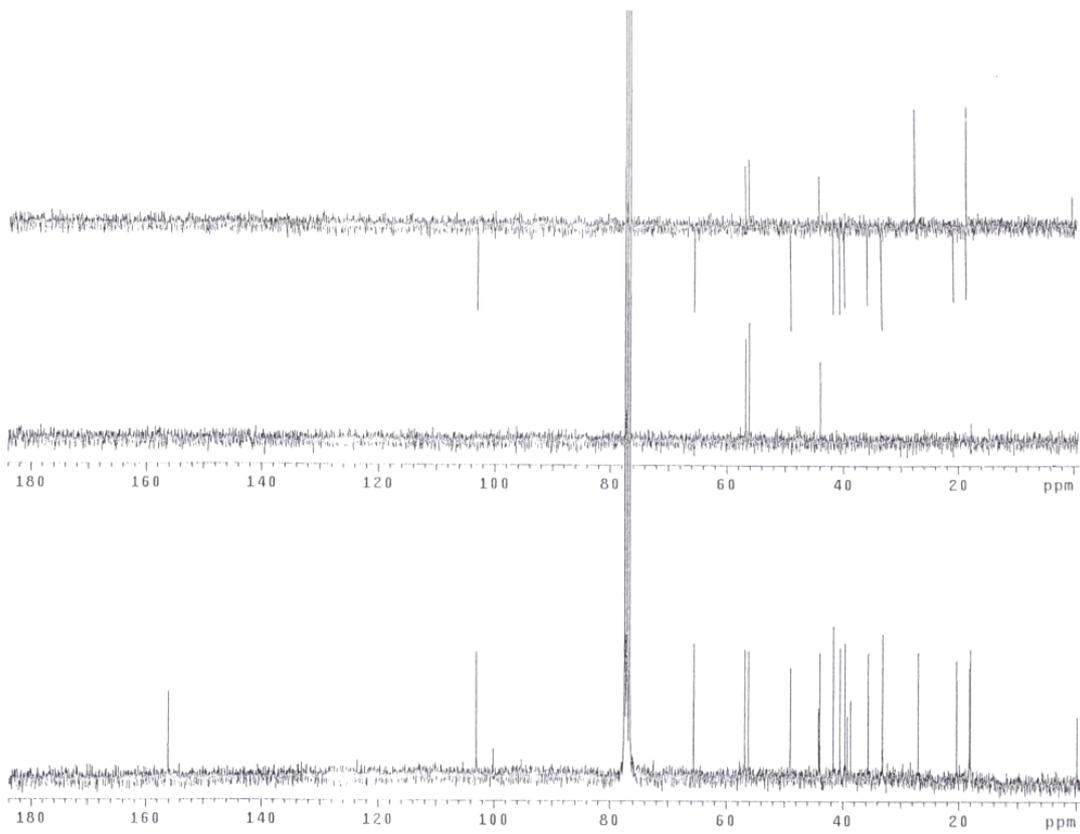
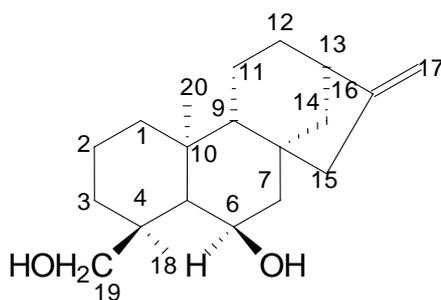


Figura 8: Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45 MHz, CDCl_3) do composto CF_2 .

Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (75,45 MHz) em CDCl_3 de CF_2 com os dados da literatura²⁶

Carbono	Candol B	CF_2
1	40,5	39,1
2	18,3	18,1
3	35,6	35,5
4	38,7	38,5
5	56,8	56,7
6	20,5	20,3
7	41,6	41,5
8	44,2	44,0
9	52,2	56,1
10	39,2	40,4
11	18,2	18,0
12	33,2	33,0
13	44,0	43,8
14	39,7	39,6
15	49,1	48,9
16	155,8	156,0
17	103,0	102,9
18	27,1	26,9
19	65,4	65,5
20	18,5	17,9

5.1.3 – Composto CF₃



(CF₃)

O composto **CF₃** foi isolado do extrato bruto hexânico (CF-EBH) após sucessivas (CC) na forma de um pó amarelo.

A análise do espectro de hidrogênio **Figura 9** apresentou sinais característicos de olefinas em 4,75 (sl) e 4,81 (sl) ppm e também dois hidrogênios com acoplamento geminal da função álcool em 3,12 (d $J = 11,4$ Hz) e 4,24 (d $J = 11,4$ Hz). Outros sinais observados neste espectro foram o das 2 metilas em 1,03 ppm (H-18) e 1,42 ppm (H-20). O espectro de ¹³C **Figura 10** apresentou 20 sinais sendo 10 CH₂, 4 CH, 4 C, e duas metilas. O CH com deslocamento em 66,40 ppm foi atribuído ao carbono 6, pois esta é a posição mais blindada do anel, uma vez que a hidroxila ligada em outras posições leva a um deslocamento na faixa entre 72-80 ppm. Pela análise do HETCOR (¹³C x ¹H) **Figura 11**, foi visto que o composto apresenta seis hidrogênios heterotópicos (H-1, H-3, H-12, H-14, H-17 e H-19) e quatro homotópicos (H-2, H-7, H-11 e H-15). Pelo espectro de COSY **Figuras 12**, foram observadas as correlações entre os hidrogênios H-6 x H-7; H-11 x H-12_a, H-12_a x H-13; H-13 x H-14_a; H-15 x H-17_{a,b} que dão informações a respeito das conectividades do composto. Dentre estas correlações a considerada mais relevante foi a dos hidrogenios H-6 com H-7 e H-5 que apresentou constante de acoplamento $J = 3$ Hz indicando que o hidrogenio do carbono 6 do anel esta em equatorial.

Este composto foi identificado através destas análises e por comparação com os dados do composto CF₂ (candol B)²⁶. Estas informações estão reunidas na **Tabela 31**

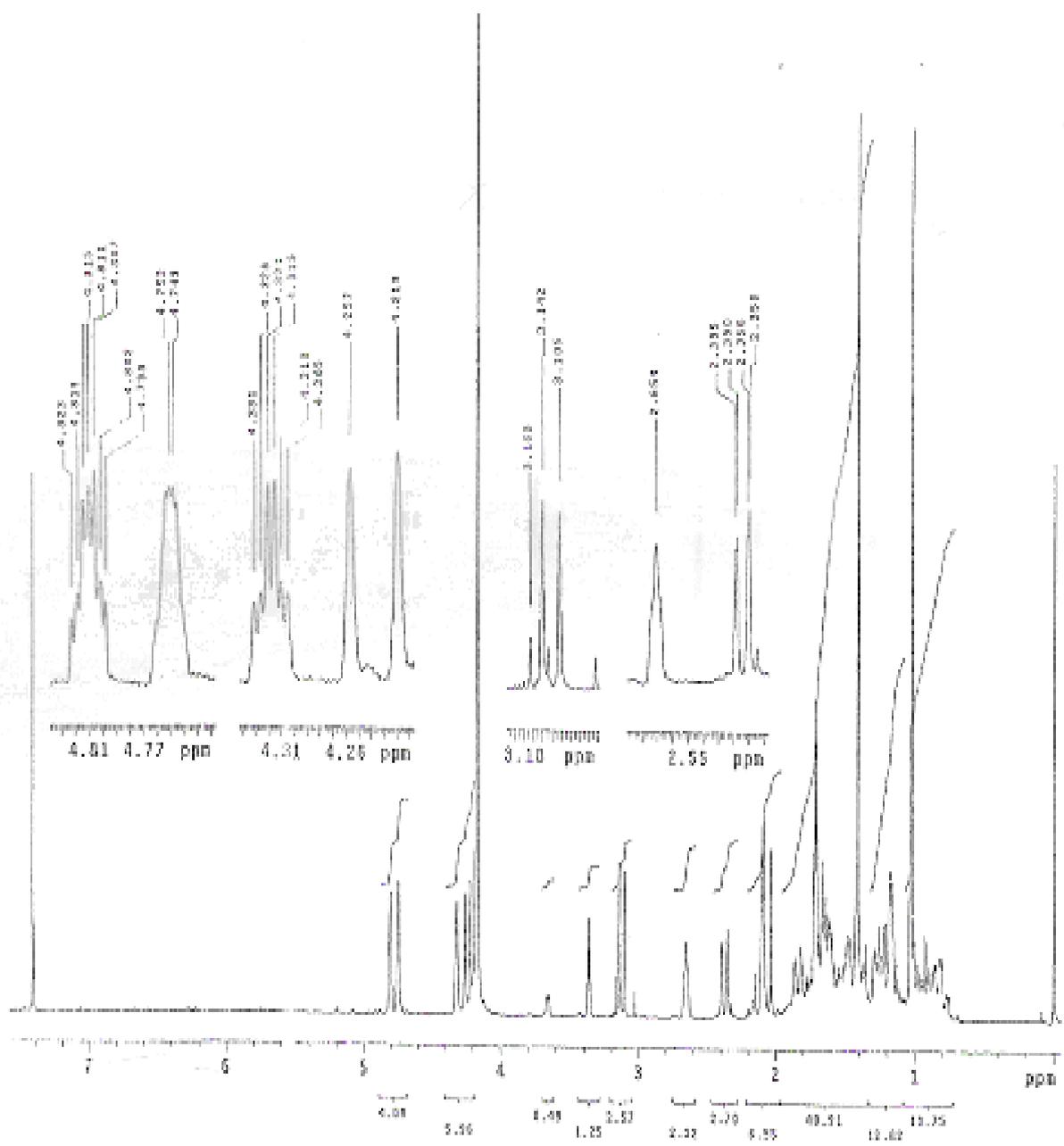


Figura 9: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto CF₃

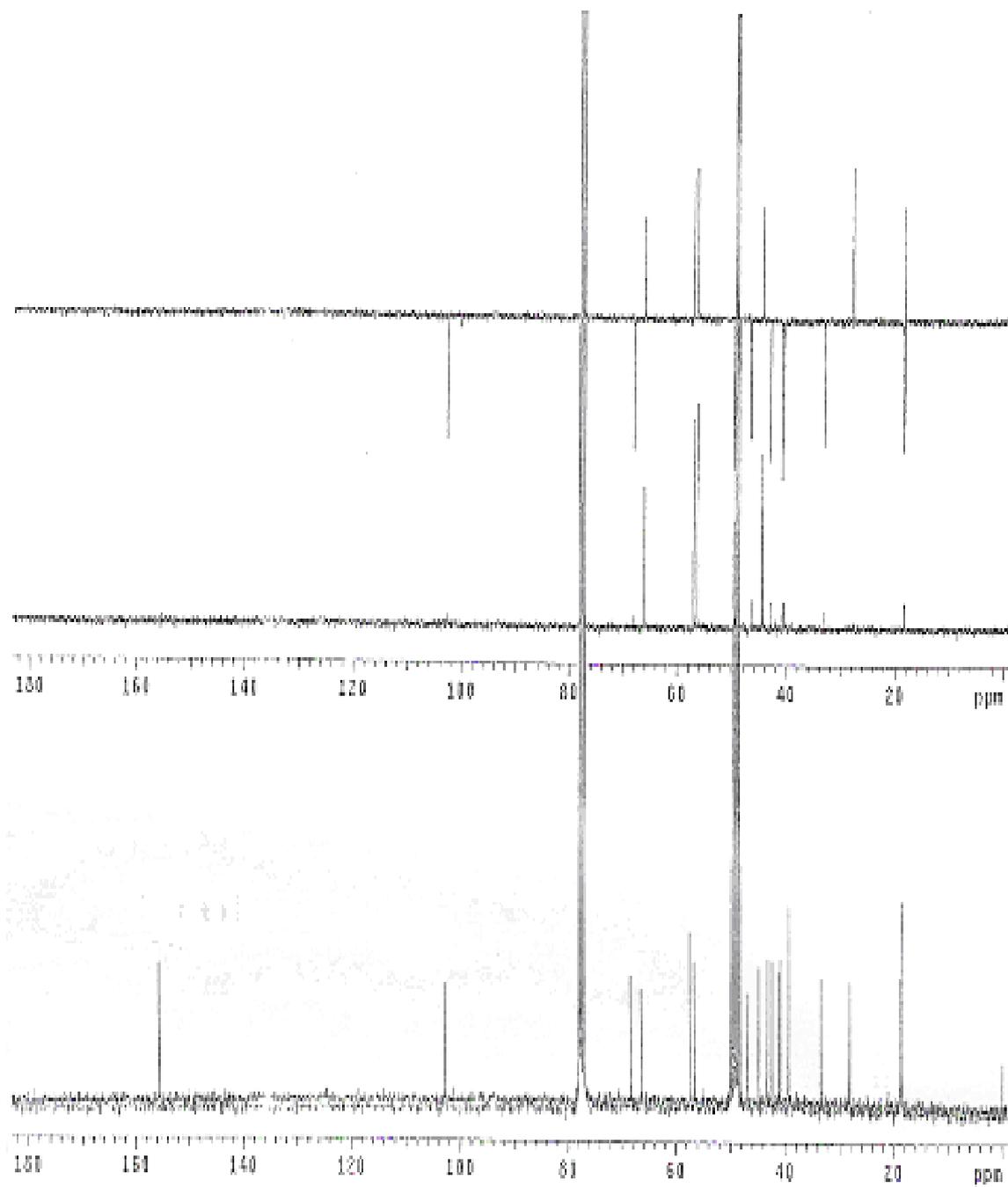


Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C /DEPT (75,45 MHz, CDCl_3) do composto CF_3

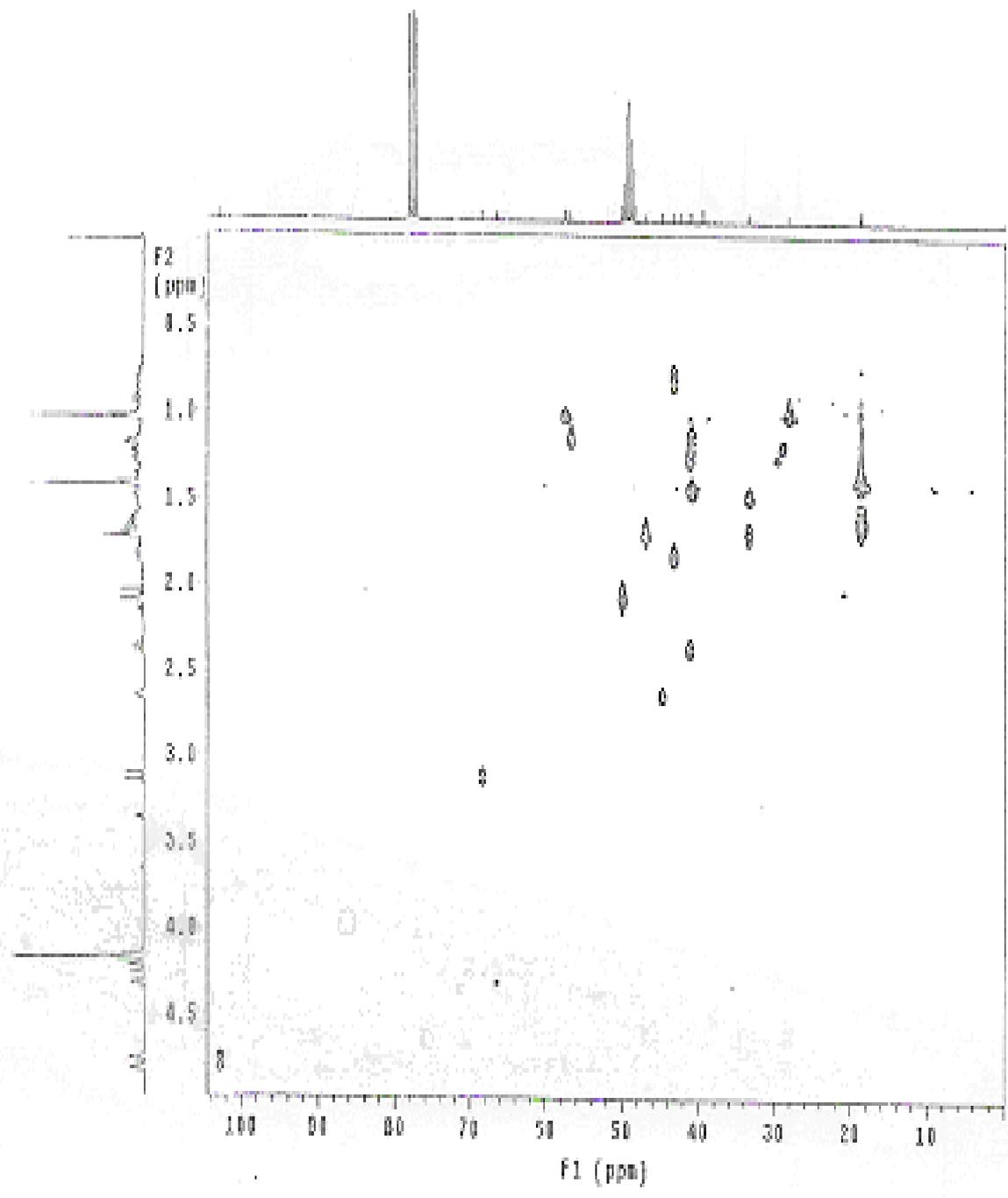


Figura 11: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_3

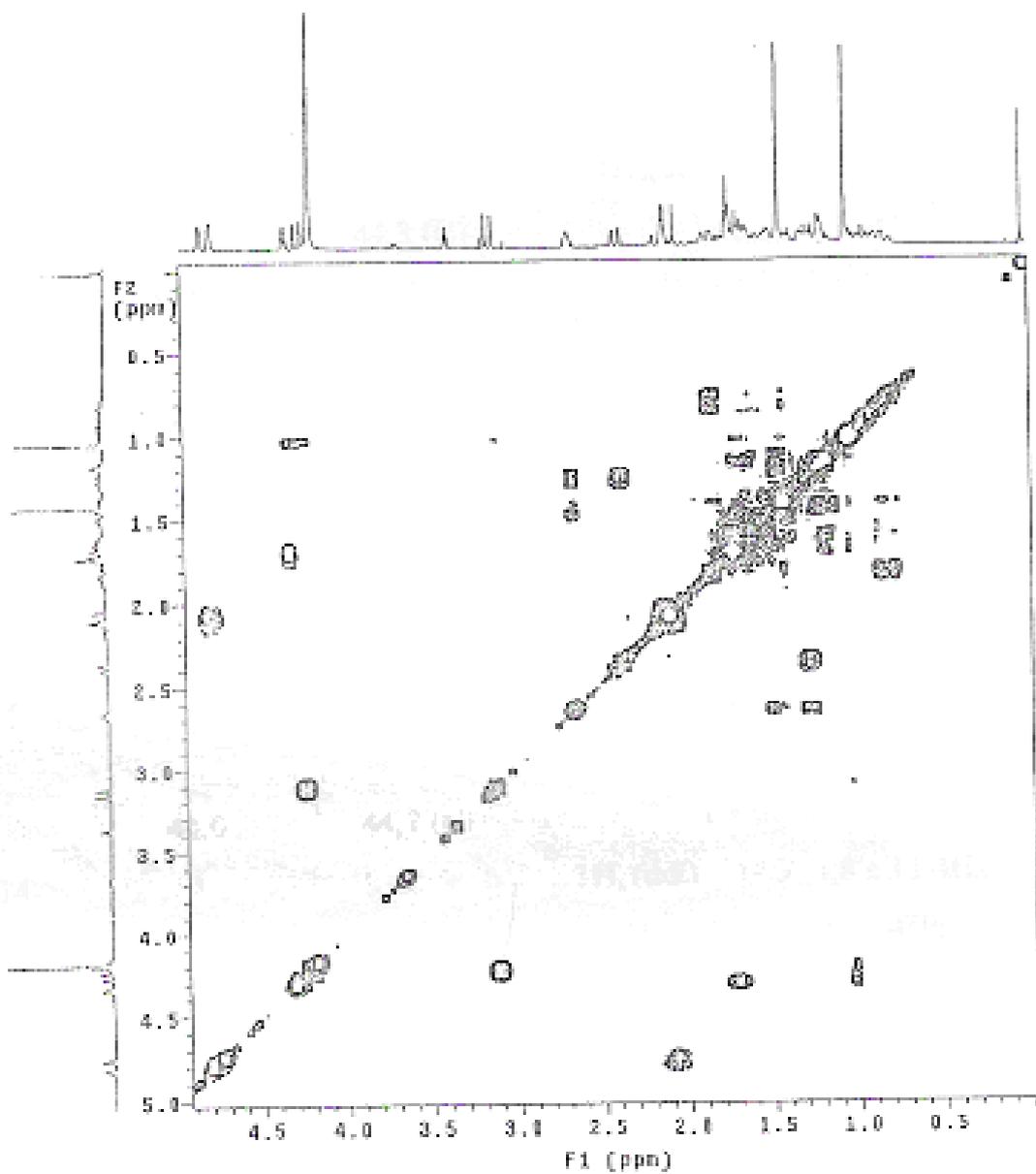


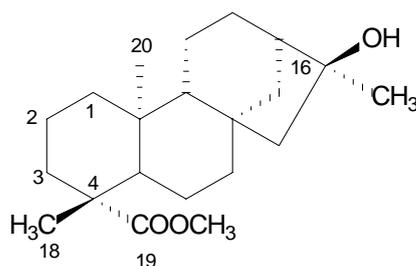
Figura 12: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_3

Tabela 31: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_3 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$).

C	$\delta^{13}\text{C}$ candol B ^a	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) $\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) (2J , 3J e 4J)
1	40,5	40,8(CH ₂)	1H _a (m) 1,22 1H _b (m) 1,45-1,53	
2	18,3	18,6 (CH ₂)	2H(m) 0,79-0,88	
3	35,6	43,2 (CH ₂)	1H _a (m) 0,76 1H _b (dd $J=12,3\text{Hz}$) 1,84	
4	38,7	44,3 (C)	—	—
5	56,8	56,6(CH)	1H(m) 1,11-1,15	H-6
6	20,5	66,4(CH)	1H(dt $J=3\text{Hz}$) 4,30-4,34	H-7, H-5
7	41,6	46,8 (CH ₂)	2H(m) 1,72	H-6
8	44,2	42,4(C)	—	—
9	52,2	57,4 (CH)	1H(s) 1,00	
10	39,2	39,3 (C)	—	—
11	18,2	18,8 (CH ₂)	2H (m) 1,17	1H-12 _a
12	33,2	33,4 (CH ₂)	1H _a (m) 1,45-1,53 1H _b (m) 1,64-1,68	H-11 e H-13
13	44,0	44,7 (CH)	1H(m) 2,64	H-12 _a e H-14 _a
14	39,7	41,1 (CH ₂)	1H _a (ddl) 1,14 $J=4,8$ e 11,4Hz 1H _b (dl) 1,99 $J=11,4\text{Hz}$	H-13 H-14 _b H-14 _a
15	49,1	49,9 (CH ₂)	2H (m) 2,09	H-17 _a e H-17 _b
16	155,8	156,6 (C)	—	—
17	103,0	103,0 (CH ₂)	H _a (sl) 4,75 H _b (sl) 4,81	H-15 H-15
18	27,1	28,1 (CH ₃)	3H(s) 1,03	—
19	65,4	68,3 (CH ₂)	1H _a (d $J=11,4\text{ Hz}$) 3,12 1H _b (d $J=11,4\text{ Hz}$) 4,24	—
20	18,5	18,6 (CH ₃)	3H(s) 1,42	—

¹³C^a dados da literatura²⁶ para o candol B

5.1.4- Composto CF₄



CF₄

A metilação, com diazometano, da fração ácida de alcalóides e sucessivamente cromatografadas resultou no isolamento do composto **CF₄** na forma de éster.

O espectro de hidrogênio **Figura 13** para este composto apresenta um singlete em 3,64 ppm referente ao sinal da metoxila e mais três metilas em 0,83 ppm (H-20, singlete), 1,36 (H-17, singlete) e 1,16 ppm (H-18, singlete). O espectro de ¹³C/DEPT **Figura 14** apresentou 21 sinais sendo 9 CH₂, 3 CH, 5 C e 4 CH₃. O sinal em 178,0ppm (C) foi caracterizado como éster e o sinal em 79,3 ppm de carbono ligado a hidroxila. O espectro de HETCOR **Figura 15** mostrou que 5 carbonos apresentam hidrogênios heterotópicos (H-1, H-2, H-3, H-7, H-14) e os demais carbonos metilênicos apresentam hidrogênios homotópicos. O espectro de COSY **Figura 16** apresentou as seguintes correlações H-5 x H-6; H-9 x H-11; H-11 x H-12; H-13 x H-14_a.

De acordo com a literatura²⁷ o carbono 16 apresenta descolamento químico de em $\sigma_c = 79,3$ enquanto que o CF₄ apresenta deslocamento em 67,1 esta diferença pode ser devido a hidroxila do **CF₄** estar em posição β caracterizando uma série β de compostos isolados.

Estas informações comprovam algumas conectividades da estrutura proposta. Tais informações estão reunidas na **Tabela 32**. Este composto foi identificado através destas análises e por comparação com dados do composto ácido 16 α hidroxiado 19 kaurenóico²⁷.

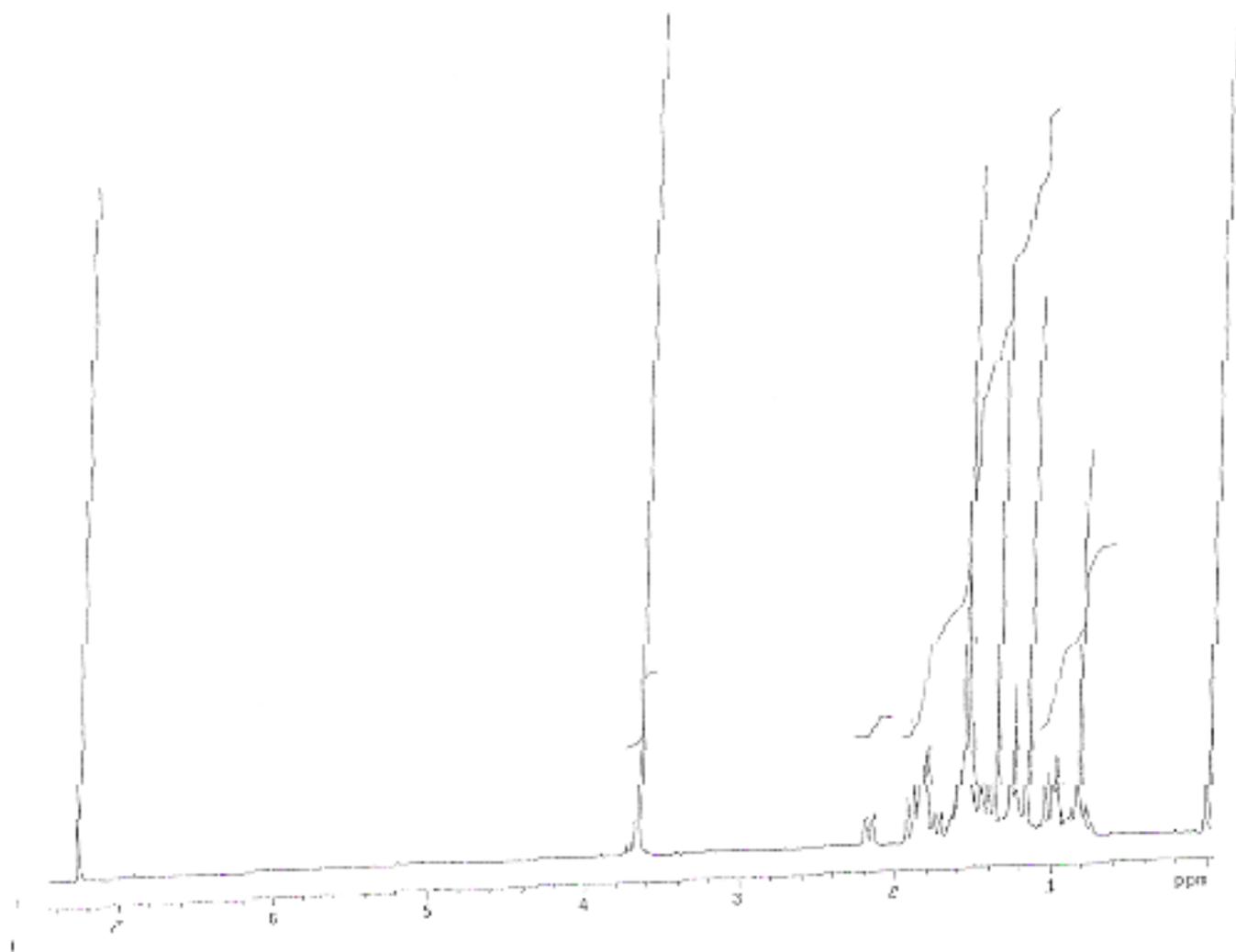


Figura 13: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto CF_4

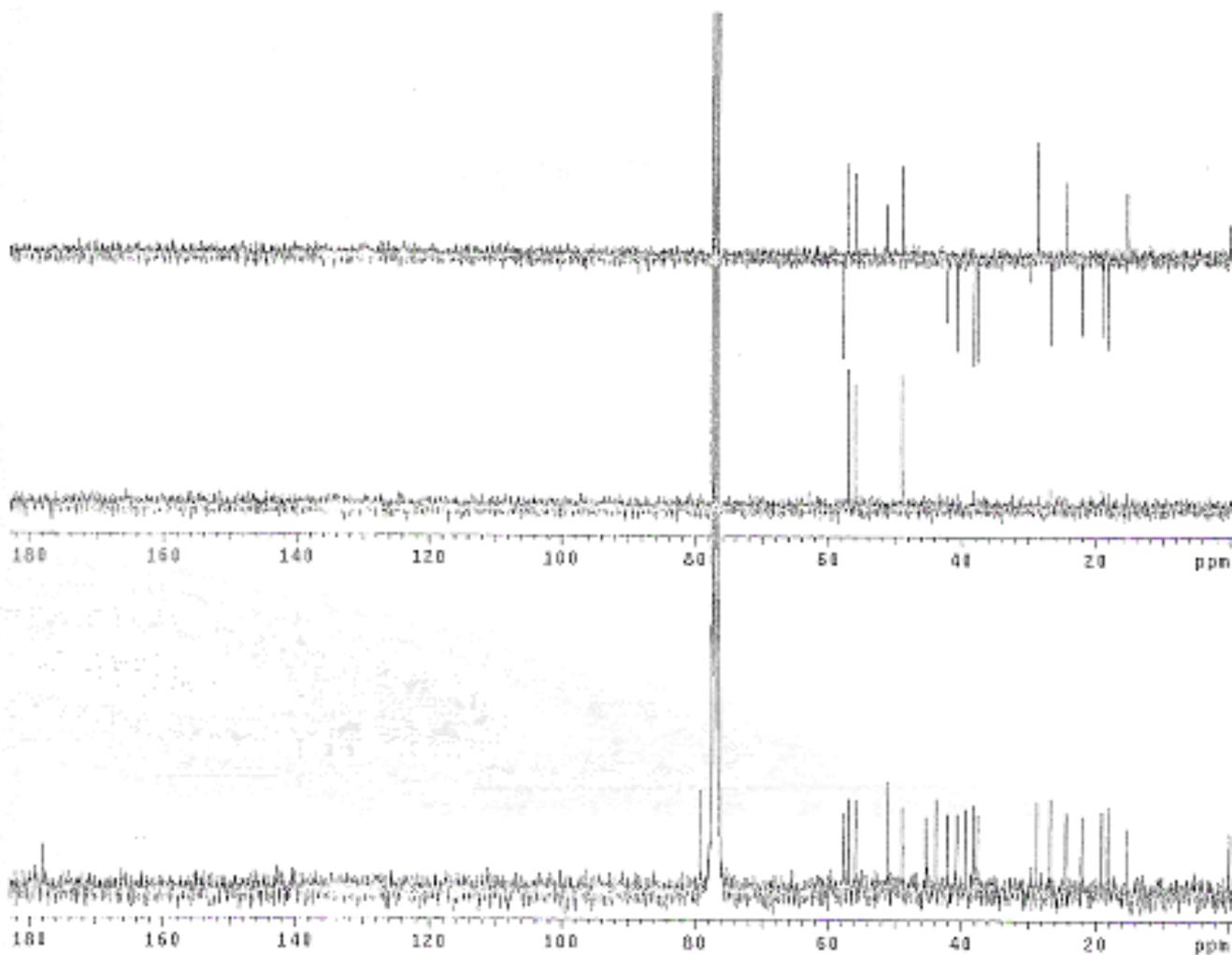


Figura 14: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, CDCl_3) do composto CF_4

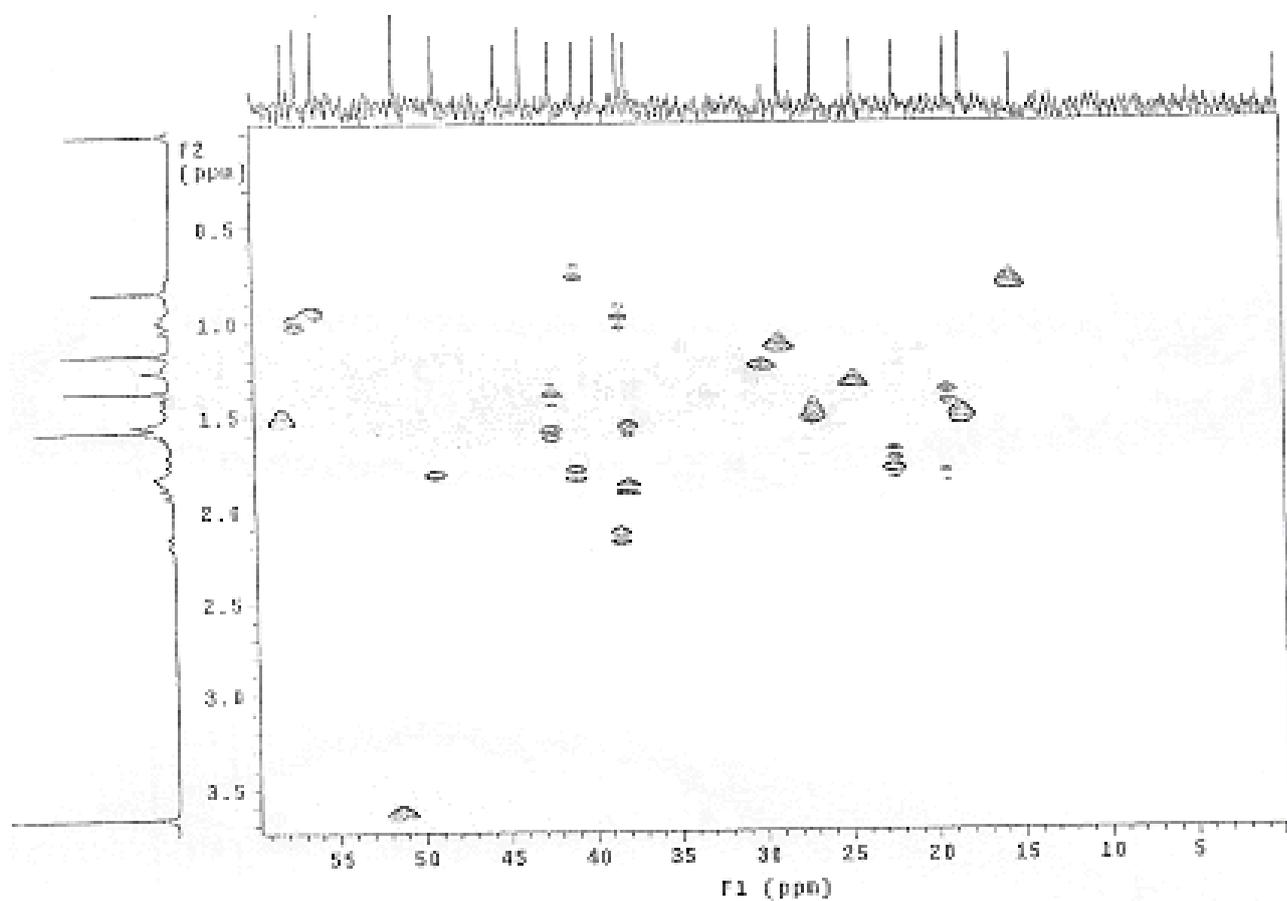


Figura 15: Espectro de HETCOR (¹³C x ¹H) em CDCl₃ do composto CF₄

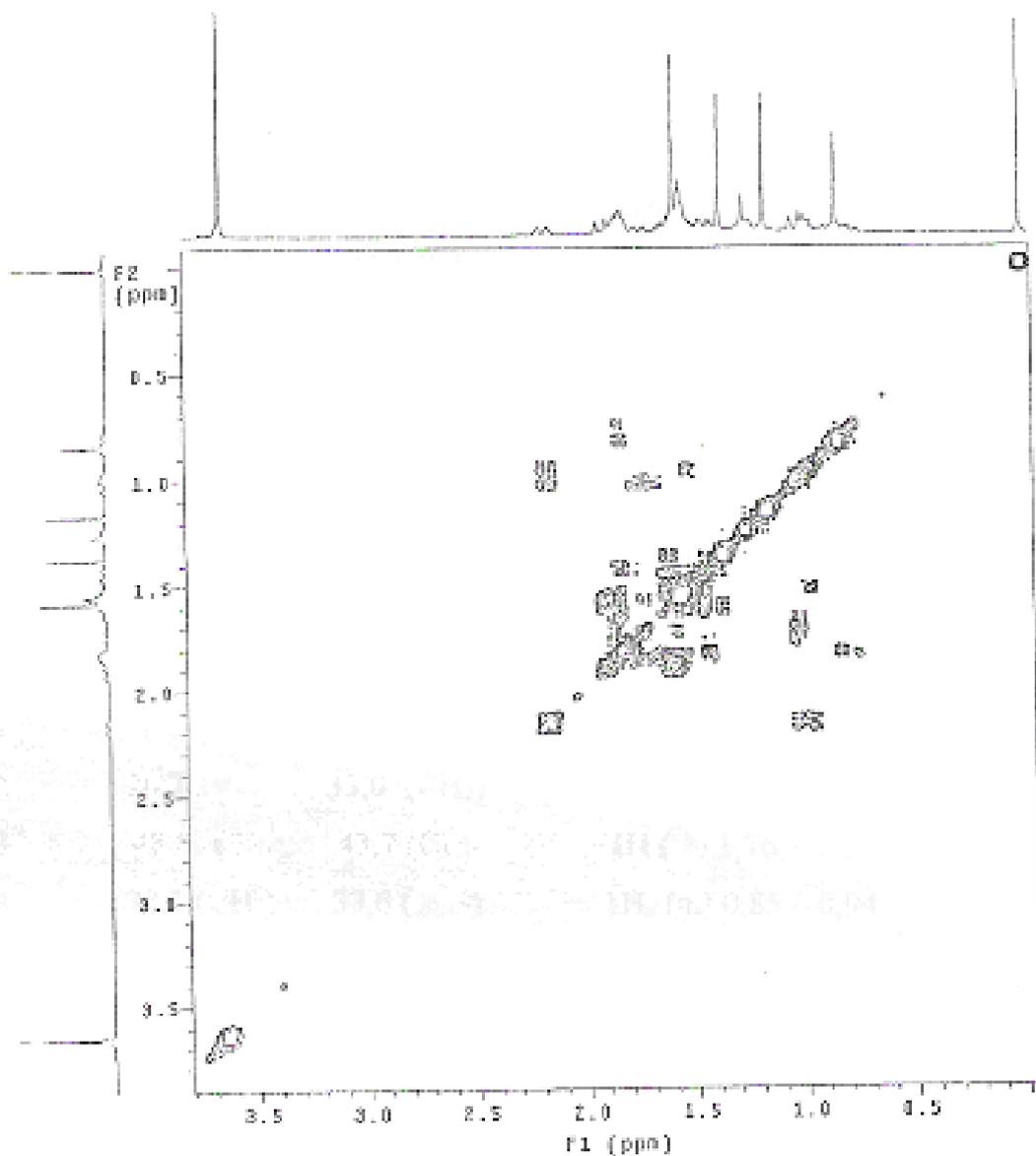


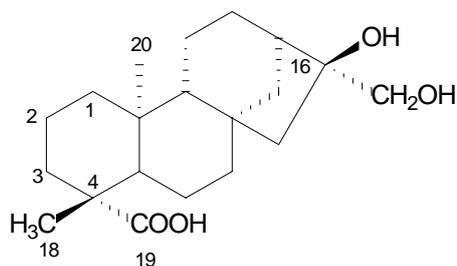
Figura 16: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em CDCl_3 do composto CF_4

Tabela 32: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em CDCl_3 do composto CF_4 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$).

C	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT) CF_4	$\delta^{13}\text{C}^a$	HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) $\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) (2J , 3J e 4J)
1	40,6 (CH ₂)	39,3 (CH ₂)	1H _a (m) 0,72 - 0,79 1H _b (m) 1,77 - 1,86	H-1 _b H-1 _a , H-2
2	19,0 (CH ₂)	19,8 (CH ₂)	1H _a (dd $J=3,9$ e $13,2$ Hz) 1,43 1H _b (m) 1,78 - 1,86	H-1 _b
3	37,6 (CH ₂)	37,4 (CH ₂)	1H _a (m) 1,49 - 1,59 1H _b (m) 1,84 - 1,9	H-3 _b H-3 _a
4	43,8 (C)	46,7 (C)		
5	56,9 (CH)	57,0 (CH)	1H (m) 0,93 - 1,00	H-6
6	22,1 (CH ₂)	19,2 (CH ₂)	1H (m) 1,69 - 1,74	H-5
7	42,0 (CH ₂)	37,4 (CH ₂)	1H _a (m) 1,31 - 1,39 1H _b (m) 1,59 - 1,7	H-7 _b H-7 _a
8	45,3 (C)	43,5 (C)	—	
9	55,9 (CH)	55,0 (CH)	1H (m) 0,94 - 1,00	H-11
10	39,4 (C)	36,9 (C)	—	
11	18,2 (CH ₂)	22,3 (CH ₂)	2H (m) 1,47 - 1,53	H-9, H-12
12	26,7 (CH ₂)	23,3 (CH ₂)	2H (m) 1,39 - 1,47	H-11
13	48,8 (CH)	49,8 (CH)	1H (m) 1,76 - 1,85	H-14 _b
14	38,1 (CH ₂)	37,7 (CH ₂)	1H _a (m) 0,85 - 0,94 1H _b (m) 2,1 - 2,2	H-14 _b H-14 _a , H-13
15	57,7 (CH ₂)	58,6 (CH ₂)	2H (s) 1,57	—
16	79,3 (C)	67,1 (C)	—	—
17	24,4 (CH ₃)	25,5 (CH ₂)	1,36 (s)	—
18	28,7 (CH ₃)	21,3 (CH ₃)	1,16 (s)	—
19	178,1 (C)	181,79 (C)	—	—
20	15,3 (CH ₃)	20,8 (CH ₃)	0,83 (s)	—
21	51,1 (CH ₃)		3,65 (s)	—

^a Dados da literatura²⁷ para o ácido 16 α hiroxido 19 kaurenoico.

5.1.5-Composto CF₅



CF₅

O composto CF₅ foi isolado do extrato bruto etanólico, por sucessivas cromatografias em coluna usando sílica gel como suporte e em seguida uma recristalização de CHCl₃/MeOH.

O espectro de RMN ¹H (**Figura 17**) apresentou dois sinais 4,04 (d *J* = 10,8 Hz) e 4,13 (d *J* = 10,8 Hz) referentes aos hidrogênios do carbono 17. Os dois singletos com integração igual a 3 foram atribuídos as metilas em 1,33 ppm (H-18) e 1,18 ppm (H-20). O espectro de ¹³C/DEPT (**Figura 18**) apresentou 20 sinais sendo 11 (CH₂), 3 (CH), 4(C), e 2 CH₃. Destes sinais pode-se caracterizar o (C) em 180,2 ppm referente a carbonila do ácido e o sinal em 66,32 ppm (CH₂) referente ao carbono 17. Por comparação com os dados da literatura²⁸ pode-se concluir que este composto se trata do ácido 16β,17-diidroxi-19-cauranóico. Pelo espectro de HETCOR (**Figura 19**) foi possível evidenciar sete carbonos metilênicos com hidrogênios heterotópicos : H-1, H-2, H-6, H-7, H-12, H-14 e H-17. Pelo COSY (**Figura 20**). As correlações entre os hidrogênios H-2_a x H-3, H-5 x H-6_a; H-5 x H-6_b, H-6_a x H-7_b; H-9 x H-11; H-12_b x H-13; H-13 x H-15 possibilitaram o estabelecimento de algumas conectividades do composto. Com base nestas informações foi possível atribuir todos os sinais de hidrogênio. Tais informações estão reunidas na **Tabela 33**.

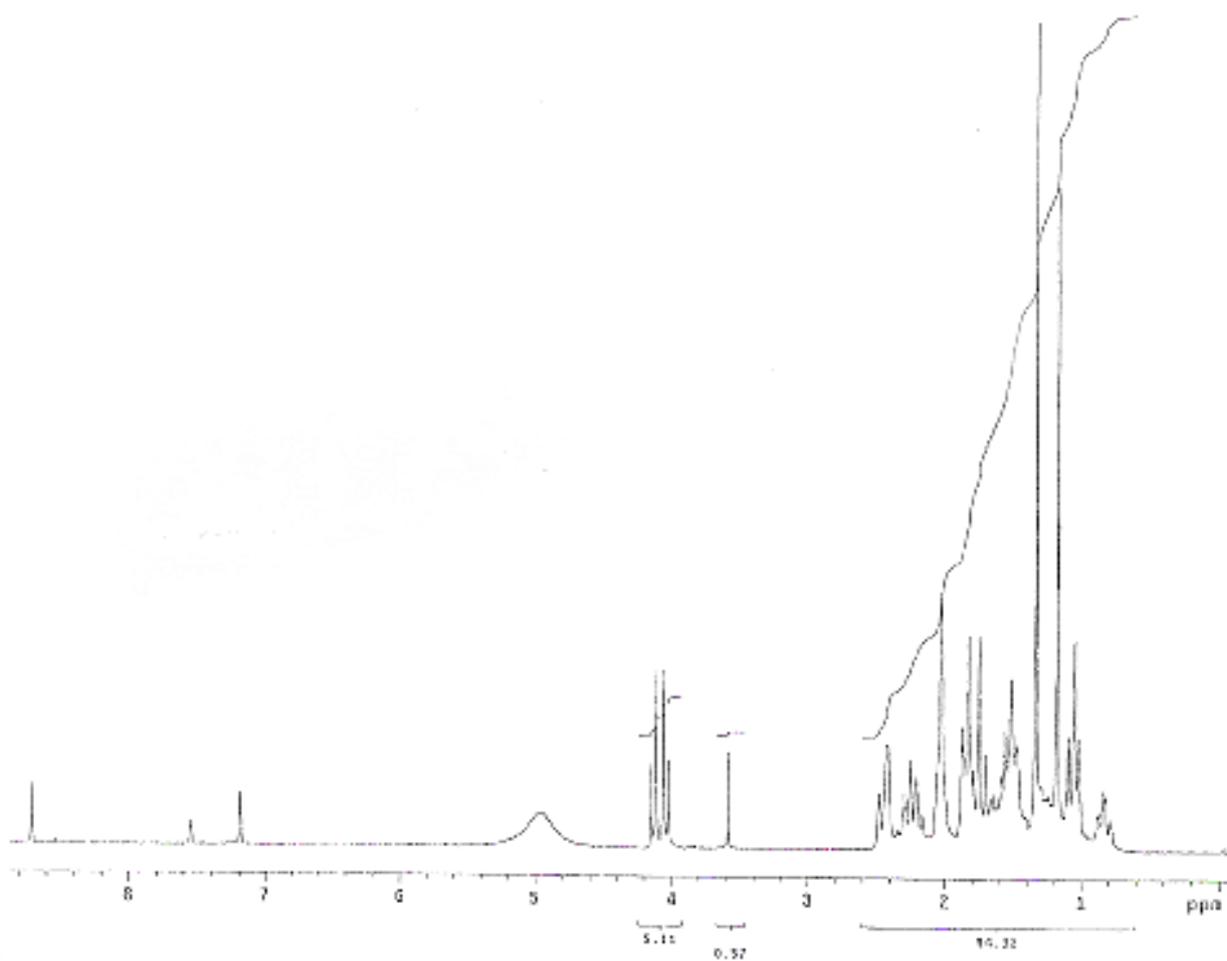


Figura 17: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_5

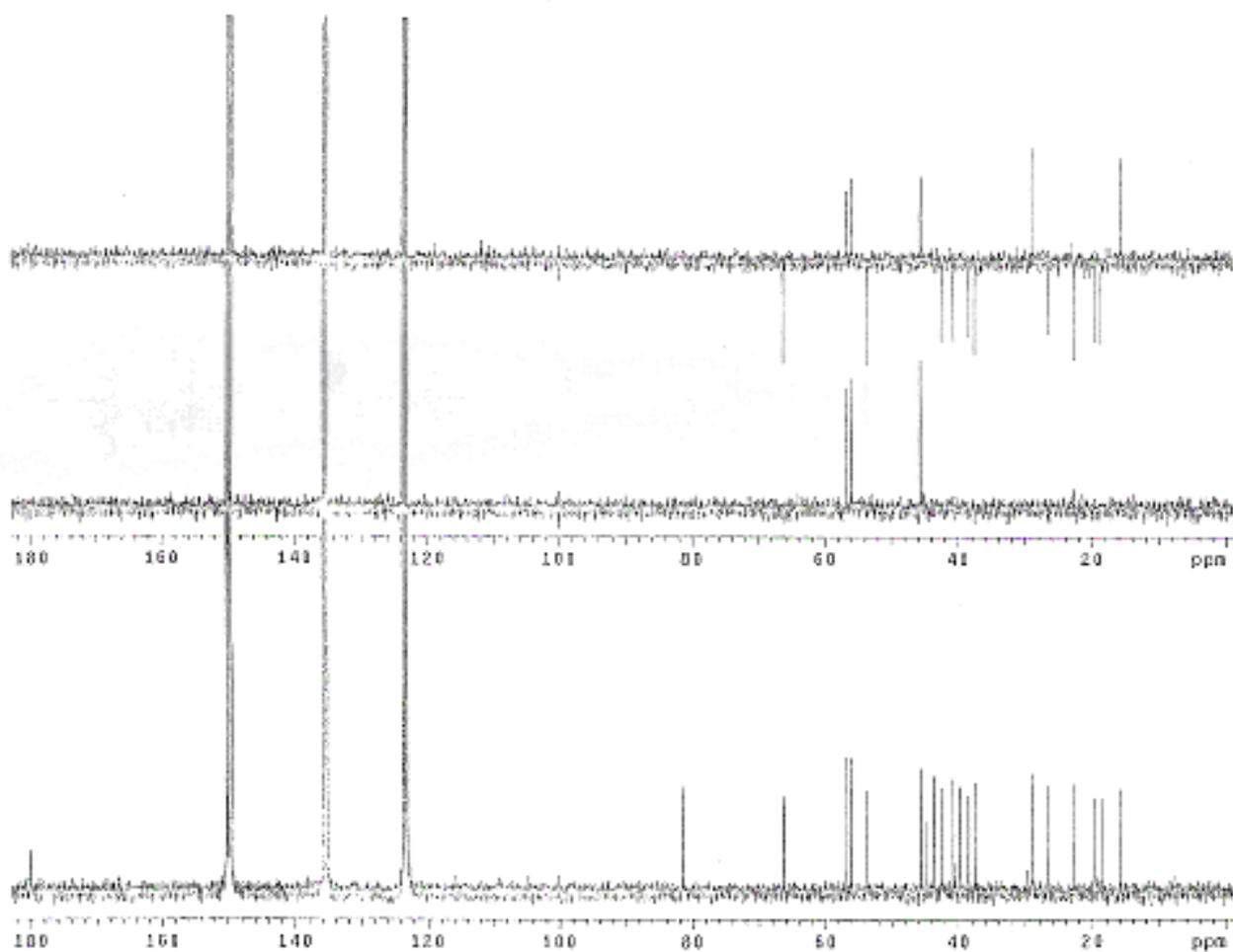


Figura 18: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_5

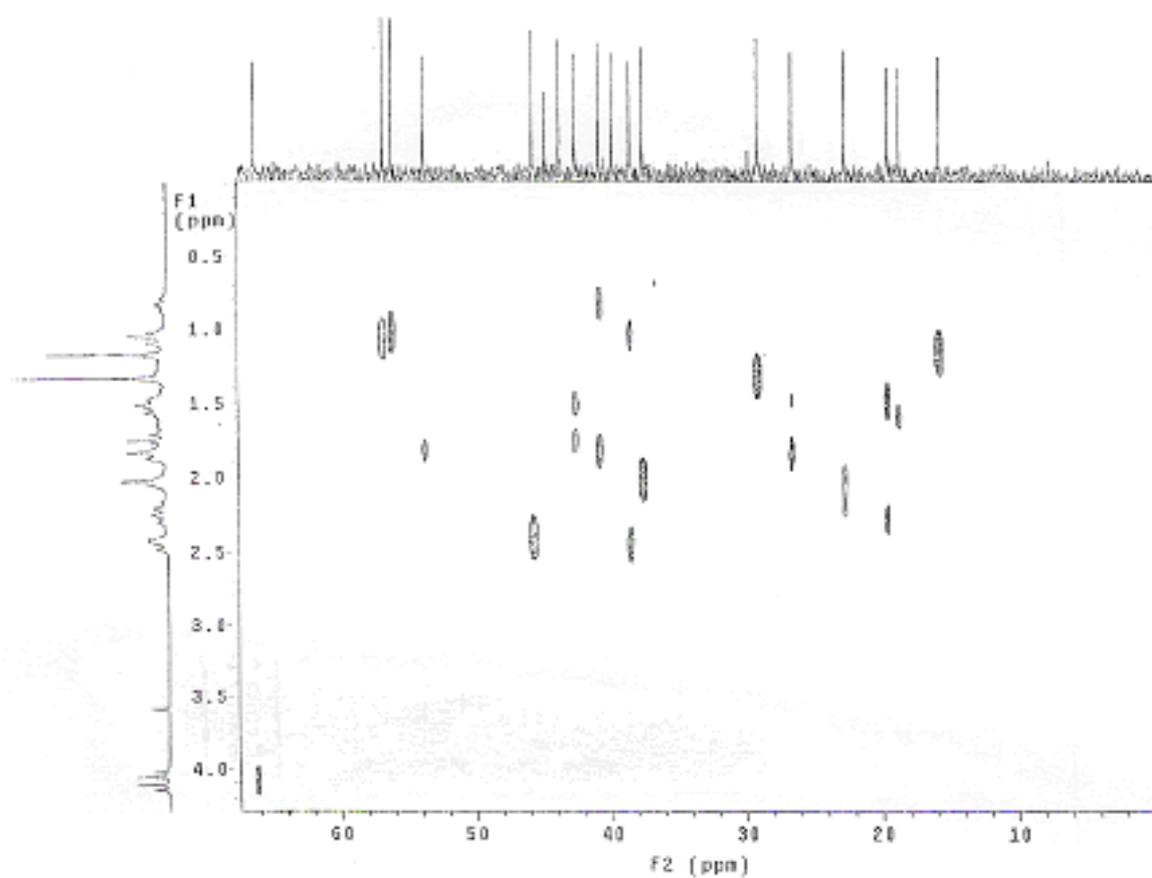


Figura 19: Espectro de HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5

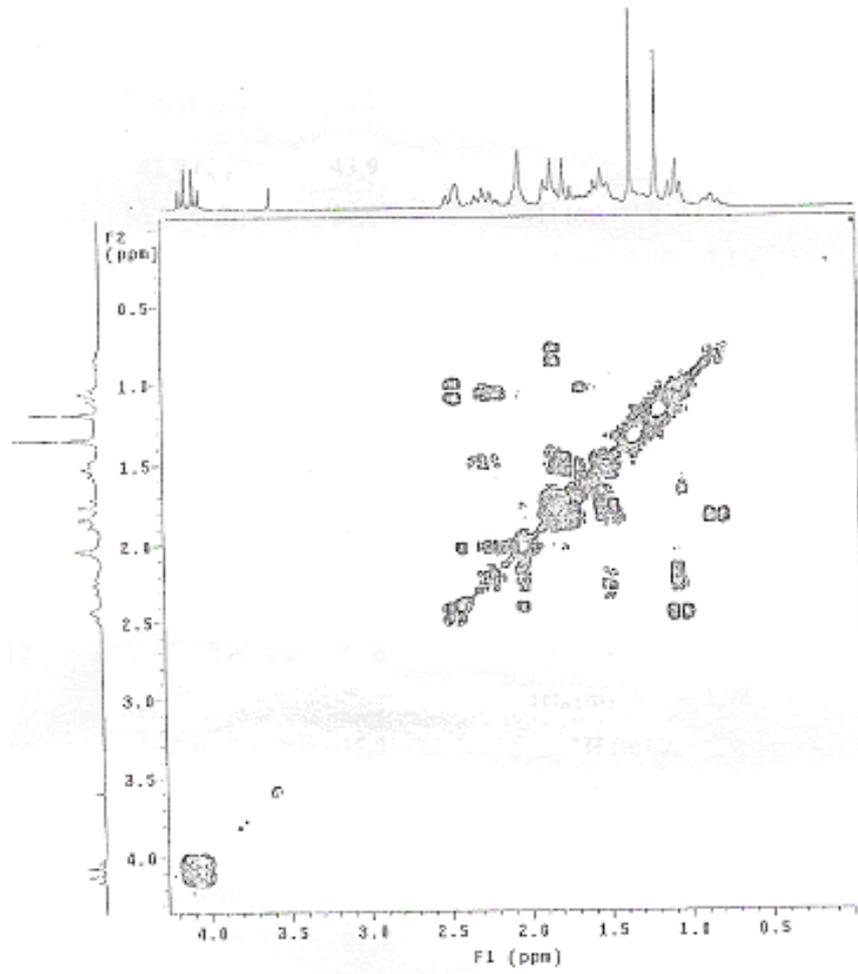


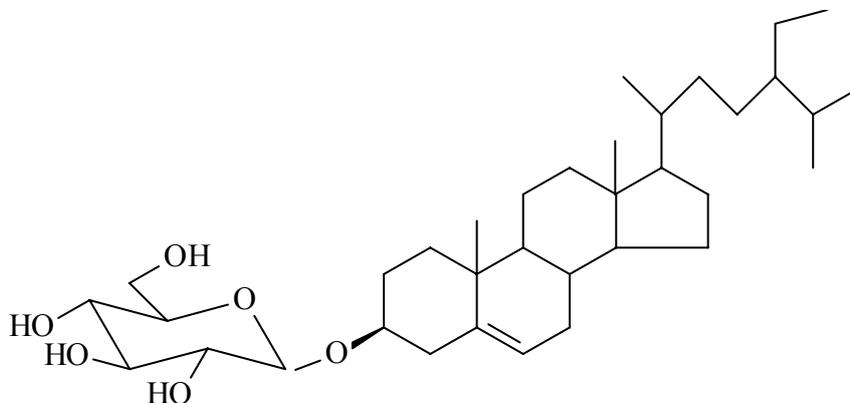
Figura 20: Espectro de COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5

Tabela 33: Dados de ^{13}C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ do composto CF_5 e comparação com dados da literatura ($^{13}\text{C}^a$).

C	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT) CF ₅	$\delta^{13}\text{C}^a$	HETCOR ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) $\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) ($^2J, ^3J e ^4J$)
1	40,8 (CH ₂)	41,1	1H _a (ddd $J=4,0\text{Hz}$) 0,832 1H _b (sl) 1,828	H-1 _b H-1 _a
2	19,5 (CH ₂)	19,8	1H _a (m) 1,48-1,55 1H _b (m) 2,27-2,32	H-2 _b H-2 _a , H-3
3	37,6 (CH ₂)	38,7	1H _a (m) 2,025	H-2 _a
4	43,7 (C)	43,9	—	—
5	56,8 (CH ₂)	57,0	1H (m) 0,95 – 1,17	H-6 _a , H-6 _b
6	22,7 (CH ₂)	23,0	1H _a (m) 1,89 – 2,1 1H _b (m) 2,251	H-7 _b , H-5 H-7 _a , H-5
7	42,5 (CH ₂)	42,8	1H _a (m) 1,41 – 1,58 1H _b (m) 1,751	H-6 _a H-6 _b
8	44,7 (C)	45,0	—	—
9	56,1 (CH)	56,3	1H (m) 0,89 – 1,14	H-11
10	39,8 (C)	40,1	—	—
11	18,7 (CH ₂)	19,0	2H (m) 1,61 – 1,70	H-9
12	26,5 (CH ₂)	26,8	1H _a (m) 1,42 – 1,48 1H _b (m) 1,86 – 1,98	H-13
13	45,7 (CH)	45,9	1H (m) 2,42	H-15, H-12 _b
14	38,5 (CH ₂)	37,8	1H _a (m) 2,43 1H _b (m) 1,01 – 1,16	H-14 _b H-14 _a
15	53,7 (CH ₂)	53,9	2H (m) 1,85-1,97	H-13
16	81,5 (C)	81,7	—	—
17	66,3 (CH ₂)	66,5	1H _a (d $J=10,8\text{Hz}$) 4,04 1H _b (d $J=10,8\text{Hz}$) 4,13	H-17 _a H-17 _b
18	29,1(CH ₃)	29,3	3H (s) 1,33	—
19	180,2 (C)	180,1	—	—
20	15,7 (CH ₃)	16,0	3H (s) 1,18	—

C^a dados da literatura²⁸

5.1.6 – Composto CF₆



(CF₆)

O composto CF₆ foi isolado da fração diclorometânica (CF-SD) como um sólido cristalino. Pelo espectro de RMN de ¹H (**Figura 21**) pode-se constatar pelos sinais em δ 3,80 a 5,40 ppm que o composto possui uma unidade glicosídica. O dubleto em 5,03 ppm ($J = 7,5$ Hz) é referente ao próton anomérico. Na região de campo alto, observam-se várias metilas. Pelo espectro de ¹³C/DEPT (**Figura 22**) verificam-se seis sinais, os quais estão condizentes com a unidade glicosídica. O sinal em 102,5 é típico de carbono anomérico. A comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ¹³C de CF₆ com os dados da literatura²⁹ (**Tabela 34**) possibilitou a identificação deste composto como sendo 3, O- β - glicopiranosil sitosterol.

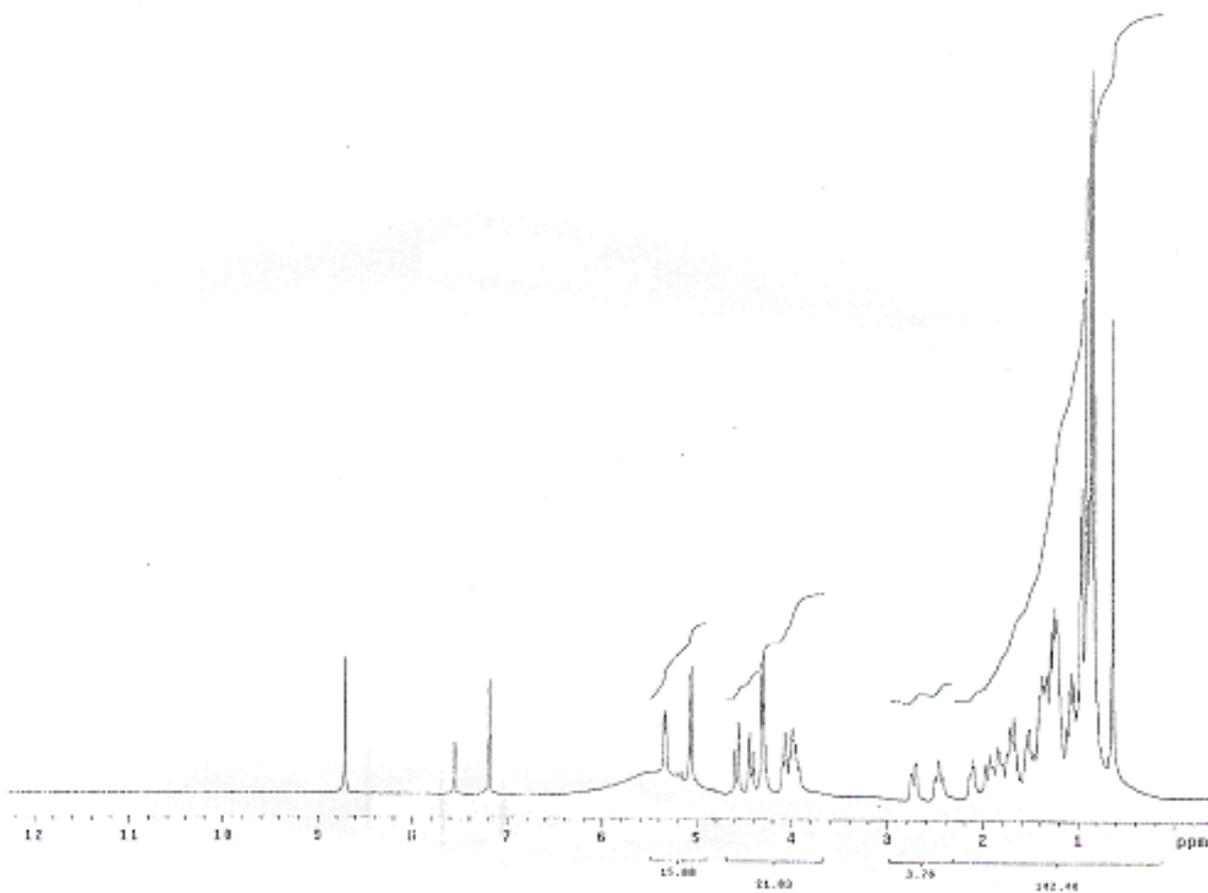


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_6

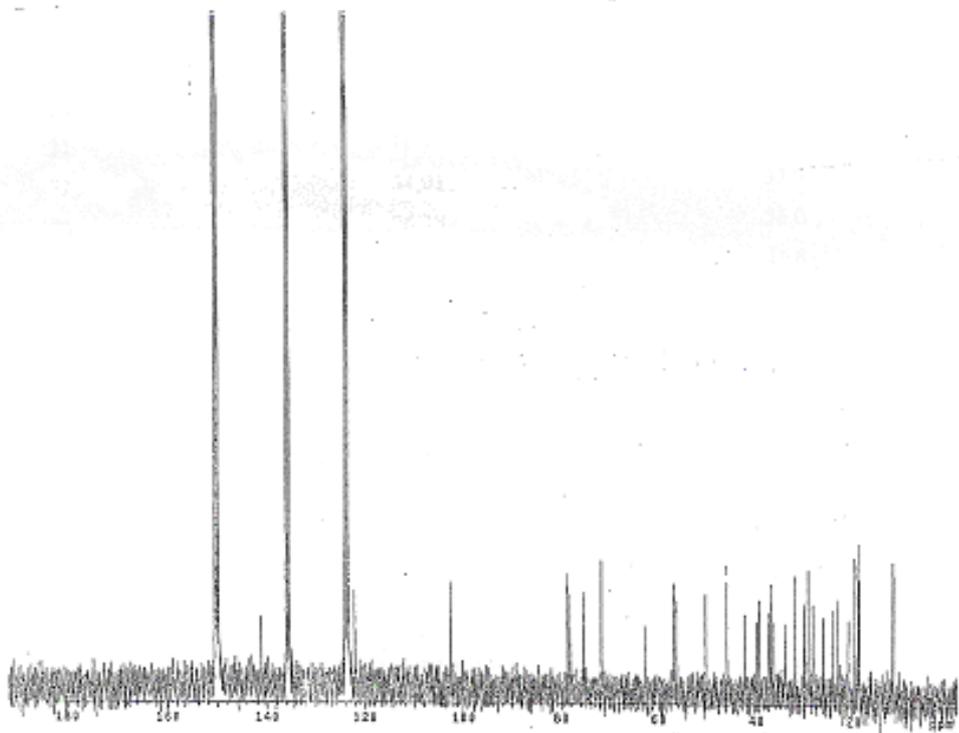
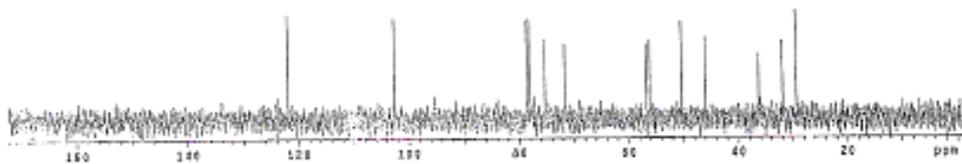
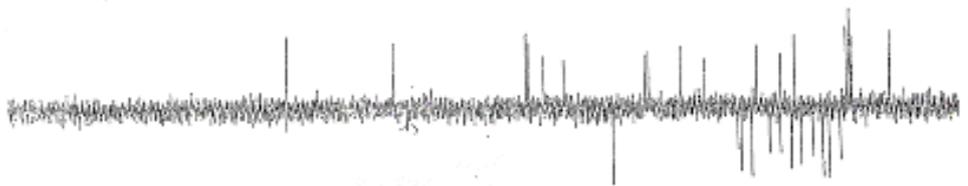


Figura 22: Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto CF_6

Tabela 34: Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (75,5 MHz em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de CF_6 com os dados da literatura²⁹

Carbono	CF_6	3, O- β - glicopiranosil sitosterol
1	37,24	37,2
2	29,26	29,7
3	78,51	80,0
4	39,15	38,9
5	140,91	140,3
6	121,90	122,1
7	31,86	31,8
8	31,98	31,9
9	50,17	50,1
10	36,74	36,7
11	21,07	21,0
12	39,76	39,7
13	42,30	42,3
14	56,67	56,7
15	24,30	24,3
16	28,34	28,2
17	56,09	56,0
18	11,75	11,8
19	19,20	19,3
20	36,21	36,1
21	18,79	18,8
22	34,01	33,9
23	26,18	26,0
24	45,86	45,8
25	30,07	29,5
26	18,99	19,0
27	19,76	19,8
28	23,18	23,0
29	11,93	11,9
30	102,52	99,6
31	75,25	71,7
32	77,98	71,5
33	71,58	68,5
34	78,40	72,9
35	62,71	62,7

5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *C.floribundus*

O extrato seco das cascas foi submetido a uma maceração em metanol e em seguida liofilizado. O extrato liofilizado foi particionado em solventes resultando nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e aquoso. Os extratos da partição foram testados frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Os resultados das análises estão na **Tabela 35**

Tabela 35: Dados da atividade antibacteriana para o extrato bruto, frações e do ácido caurenóico de *C.floribundus*

Frações (µg/mL)	<i>S.aureus</i> ATCC 25923 (1,5 x 10 ⁵ UFC/mL)		<i>B.subtilis</i> ATCC 6623 (1,5 x 10 ⁵ UFC/mL)		<i>E.coli</i> ATCC 25922 (1,5 x 10 ⁵ UFC/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Extrato bruto das cascas	62,5	125	31,2	62,5	> 1000	> 1000
Extrato hexânico	16,0	31,2	6,2	6,2	> 1000	> 1000
Extrato clorofórmico	125	250	125	250	> 1000	> 1000
Extrato acetato	500 >	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Extrato butanólico	500 >	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Extrato aquoso	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Ácido caurenóico	> 1000	> 1000	6,2	6,2	> 1000	> 1000
(CF1)						
Penicilina	0,00975					
Vancomicina			0,09			
Tetraciclina					0,078	

CMI : concentração mínima inibitória **CMB**: concentração mínima bactericida

O extrato bruto na concentração de 62,5 µg/mL inibiu o crescimento do microorganismo *S.aureus* e apresentou uma **CMB** de 125 µg/mL podendo ser considerada uma atividade moderada. Além do microorganismo *S.aureus*, o extrato bruto mostrou bom resultado para *B.subtilis* apresentando uma **CMI** de 31,2 µg/mL e **CMB** de 62,5 µg/mL. Das

frações testadas, a hexânica, que tem como composto majoritário o CF₁, obteve melhor resultado para os microorganismos *S.aureus* e *B.subtilis*. Para o *B.subtilis* o extrato hexânico apresentou uma **CMI** e **CMB** de 6,2 µg/mL. Este mesmo extrato se mostrou ativo contra o microorganismo *S.aureus* apresentando uma **CMI** de 16,0 µg/mL e uma **CMB** de 31,2 µg/mL.

Através de um levantamento bibliográfico foi constatado que o ácido caurenóico apresenta atividade contra o *S.aureus*³⁰, atividades antinociceptiva³¹ atividades embriotóxica e citotóxica³² (inibiu o crescimento de células leucêmicas e do colo do útero) além de estimular a contração uterina³³. Em nossas análises não foi detectada atividade contra *S.aureus* e sim uma significativa atividade contra *B.subtilis*.

6- CONCLUSÕES

Nenhum relato sobre o estudo químico da espécie *Croton floribundus* é apresentado na literatura apesar de ser muito utilizada na medicina popular. A literatura especializada apresenta os alcalóides como marcadores taxonômicos e os diterpenos como os constituintes principais do gênero *Croton*. Neste trabalho, foram isolados da *Croton floribundus* 5 diterpenos (**CF**₁ - ácido caur-16-en-19-óico; **CF**₂ - candol B; **CF**₃ - 6-hidróxi caur-16-en-19-ol; **CF**₄ - 16-hidróxi-19-cauranoato de metila e **CF**₅ - ácido 16 α , 17-diidróxi -19-cauranóico), 1 esteróide (**CF**₆ - sitosterol glicosilado) e não foi detectada a presença de alcalóides. Estes diterpenos estão sendo relatados no gênero *Croton* pela primeira vez. O ácido caurenóico (constituente majoritário, cerca de 2% da planta seca) é facilmente isolado do extrato bruto hexânico através de simples recristalização de metanol. Os demais diterpenos necessitaram de cromatografia em sílica gel impregnada com nitrato de prata e/ou tratamento com diazometano para serem isolados.

A fração hexânica foi a que apresentou melhor atividade frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. O ácido caurenóico na concentração (6,2 μ g/ml) inibiu e matou o microorganismo *B.subtilis*. Esta potente ação antimicrobiana do ácido caurenóico induz a uma conclusão de que a atividade da fração hexânica está relacionada com a presença do mesmo. Porém o ácido caurenóico não deu atividade frente ao *S. aureus* como citado na literatura.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JR, V.F.V; Plantas medicinais : A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25 (3) 429-438, 2002
2. SILVA, L.K.; FILHO, C.V .Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição Química e potencial farmacológico. **Química Nova**, 25 (3) 449-454, 2002.
3. STASI, D.C.L. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. São Paulo. Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 110, 1996.
4. BARROSO, G.M., *et.al.* **Sistemática de Angiospermas do Brasil** Viçosa , UFV. Imp. Univ., v.2, p. 198, 1984
5. CRAVEIRO, A. A. ; AFRÂNIO, G.A.G.; ANDRADE, H.S; MATOS, F.J. A. ; ALENCAR, J.W e Machado, M.I.L; **Óleos essenciais de Plantas do nordeste**. Edições UFC, Fortaleza CE, pg 36 – 37, 1981
6. CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol 1, p.503-504, 1984
7. CRONQUIST, A., **An integrated system of classification of flowering plants**, New york Columbia University Press, p.736 1986
8. BRAGA, R.; **Plantas do nordeste, especialmente do de Ceará**; Escola de agricultura de Mossoro, Fortaleza, 1976.
9. PALAZZINO, G.; FEDERICI, E.; RASOANAIVO, P.; GALEFFI.C; MONACHE, F.D; 3,4 - seco diterpenes of *Croton geayi*. **Gazzeta Chimica Italiana**, 127, p.311-314, 1997

10. CAI, Y., EVANS, F.J.; ROBERTS, F.M.; PHILLIPSON, J.D; ZENK, H.M.GLEBAS Y.Y.; Polyphenolic compounds from *C.lechleri*. **Phytochemistry**, 30 (6), p. 2033-2040, 1991
11. CAI, Y., CHEN, Z.P.; PHILLIPSON, J.D; Diterpenes from *C.lechleri*. **Phytochemistry**, 34 (1), p.755-760, 1993.
12. CAI, Y., CHEN, Z.P.; PHILLIPSON J.D; Clerodanes diterpenoids from *C. lechleri*. **Phytochemistry**, 34 (1), p.265-268, 1993
13. PHILLIPSON, J.David, A matter of some sensitivity. Review article number 101. **Phytochemistry**, 38 (6), p.1319-1343, 1995
14. PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.; CALOMINE, M. and VAN DEN BERBHE, D. **Journal Natural Product**. 56, p.899, 1993
15. MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, R.S.G.S.; VANDERLINDE, A.F.; LAPA, A.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, F.N.; CÔLUS, M.S.I.; FARIAS, A.F. R.; COSTA, L.M.A.; RAO, S.N.V.; Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara* **Journal of Ethnopharmacology**, 70, p. 41-55, 2000
16. EL-MEKKAWWY, S.; MESELHY, R.M.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium* **Phytochemistry**, 53, 457-464, 2000
17. NAGADJUI, B. T.; ABEGAZ, M. B.; KEUMEDJO, F.; FOLEFOC, N. G.; KAPCHE, F.W.; Diterpenoids from the stem bark of *Croton zambesicus* **Phytochemistry**, 60 p. 345-349, 2002.
18. ROENGSUMRAN, A .P.; KUPTIYANUWAT, N.; VILAIVAN, T.; NGAMROJNAVANICH, N.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PHUTHONG, S.; Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Phytochemistry**, 56, p. 103-107, 2001.

19. SUTTHIVAIYAKIT, S.; NAREEBOON, P.; RUANGRAGSI, N.; RUCHIRAWAT, S.; PISUTJAROENPONG, S.; MACHIDOL, C.; Labdane and primarane diterpenes from *Croton joufra*. **Phytochemistry**, 56 p. 811-814, 2001.
20. KAPINGU, C.M.; GUILLAUME, D.; MBWAMBO, M.J.M.; ULISO, C.F.; MAHUNNAH, A. L.R.; Diterpenoids from the roots of *Croton macrostachys*. **Phytochemistry**, 54, p.767-770, 2000.
21. KITAZAWA, E.; OGISO, A.; Two diterpenes alcohols from *Croton sublyratus*. **Phytochemistry**, 20, p.287-289, 1981.
22. ABOAGYE, F.A.; SAM, G.H.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; Julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton membranaceus*. **Fitoterapia**, 71 p.461-42-62, 2000.
23. CHARRIS, J.; DOMÍNGUES, R.D.C.; CARO, C.; `(-)- Amuronine from the leaves of *Croton flavens* L. (euphorbiaceae). **Biochemical systematics and ecology**, 28, p.795-797, 2000.
24. BANDARA, R.M.B.; WIMALASIRI, W.R. and MACLEOD, K.J.; Ent-kaurenes and oleananes from *Croton lacciferus*. **Phytochemistry**, 27 (3) p.869-871, 1988.
25. HASAN, M. C.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kolovane and kaurane diterpenes from the stem bark of *Xylopiya aethiopica*. **Phytochemistry**, 1982, 21, 1365.
26. GONZALES, A. H.; et al. The ¹³C NMR spectra of some Ent-18-hidroxykaur-16-enes. **Phytochemistry**, 20 (4) 846-847, 1981
27. WIART, C., AU. S.T., MOHD.Y, HAMIMAH.H., SULAIMAN.M., 16 α hydroxy(-)-kauran-19-oic Acid : An antibacterial diterpene from sweet apple. **International journal of pharmacology**, 1 (3) 296-298,2005
28. WU, C.Y.; HUNG, C. Y.; CHANG, F.R.; COSENTINO, M.; WANG, K.H AND LEE, H.K.; Identification of ent-16 β , 17- dihydroxykauran-19-oic acid as Anti-HIV

principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona aquamosa*. **Journal Natural Product**, 59, 635-637, 1996.

29. MATIDA, K. A.; ROSSI, M.H.; BLUMENTAL, A .B.E.E.; SHUQUEL, A. T. I.; MALHEIROS, A .; VIDOTTI, J .G.; 3- β - glicopiranosil in sitosterolin espécies of Labiatae, O- β - Verbenaceae and Apocynaceae, *Anais Assoc. Brás. Quím.* , 45 (3), p. 147-151, 1996.
30. VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, A. K.; MARCUCCI, M.C.; Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, 71 p.693-696, 2000.
31. BLOCK, C.L.; SANTOS, S.R.A.; DE SOUZA, M.M.; SCHEIDT, R. A. Y.; SANTOS, A.M.; MONACHE, D.F.; FILHO, C.V.; Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of ethnopharmacology**, 61 p.85-89, 1998.
32. COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, M. A.P, VIANA, B.S.G.; CUNHA, C.P.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V; RAO, N.S.V.; The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **TOXICON**, 40 p.1231-1234, 2002.
33. PAGE, E.J.; BALZA, F.; NISHIDA, T.; TOWERS, N. G.H.; Biologically active diterpenes from *Aspilia Mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant, **Phytochemistry**, 31(10) p.3437-3439, 1992.

