

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANALICE ZUCHINALLI

**ESTUDO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
VEGETAL *Croton urucurana***

FLORIANÓPOLIS

2009

ANALICE ZUCHINALLI

**ESTUDO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTUTURAIIS E BIOLÓGICAS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Croton urucurana***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina por Analice Zuchinalli, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

FLORIANÓPOLIS

2009

Analice Zuchinalli

**ESTUDO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Croton urucurana***

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 03 de março de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química (UFSC)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Prof^a. Dra. Inês Maria da Costa Brighente

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

*Dedico este trabalho à minha
nona Alice, que sempre me
considerou uma vencedora.
Saudades eternas.*

AGRADECIMENTOS

Aos que me fortaleceram durante esta jornada: Deus, meus pais Marilu e Claudemir, meu esposo Rodolfo, meu irmão Junior e ao médico Dr. Cirilo.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, que me acolheu como aluna de iniciação científica e se disponibilizou a me orientar no curso de mestrado. Da mesma forma, sou grata aos colegas com quem convivi no LQPN: Ana Paula, Aline, Beatriz, Cristian, Fabiana, Guilherme, Henrique, Heros, Juliana, Luciana, Mariana, Michele, Munique, Patrícia, Prof^ª. Inês, Solomon e especialmente a Andressa, que sempre esteve disponível para me ajudar.

Por todo apoio, carinho e risadas trocados durante o curso das disciplinas do mestrado agradeço as minhas queridas colegas Aline Signori, , Silvane Morés, Karen L. Lang e Kelly de O. Santos. Pela simpatia e disponibilidade, sou muito grata aos funcionários da secretaria da pós-graduação: Graça e Jadir.

Aos funcionários da Central de Análises e a todos os professores do departamento de Química, que de forma direta ou indireta foram fundamentais para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço ao professor Dr. Adailton Bortoluzzi pelas análises cristalográficas e por suas explicações sobre a técnica de difratometria de raios-X.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela possibilidade de uma ótima formação. Pelo apoio financeiro, agradeço aos órgãos do governo federal CAPES E CNPQ.

RESUMO

ESTUDO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTUTURAIS E BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Croton urucurana*

Croton urucurana é uma árvore, pertencente a família *Euphorbiaceae*, usada na medicina popular no tratamento de dor, inflamação, infecções cutâneas, cicatrização e câncer. Desta planta, utilizam-se preparações das cascas, o látex e a goma liberados pelo ferimento do caule. Estudos farmacológicos revelam que a espécie possui atividades cicatrizantes, antidiarréico, anticâncer, antiinflamatório, antioxidante, antireumático, antibacteriano e antifúngica contra dermatites. Existem poucas pesquisas sobre a fitoquímica de *C. urucurana*, sendo que estas relatam o isolamento de dez compostos, destacando a presença de três diterpenos clerodanos. O presente trabalho objetivou avaliar a composição química, fracionar e isolar compostos de *C. urucurana*, focalizando a busca por novos diterpenos. A partir das cascas secas e moídas da planta foram preparados três extratos brutos: extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato etanólico. Os compostos isolados foram identificados por técnicas espectroscópicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e difratometria de raios-X. A partir do fracionamento dos extratos hexânico e acetato de etila foram isolados uma mistura de esteróis e dois diterpenos, sendo um deles inédito na literatura. Do extrato etanólico foram isolados quatro compostos. A partir da reunião de frações ricas em diterpenos isolou-se um outro diterpeno, cuja proposta estrutural também inexistente na literatura. Os três extratos foram submetidos à determinação de compostos fenólicos através dos métodos Folin-Ciocalteu, sendo que o extrato etanólico foi o que apresentou maior concentração. Da mesma forma, os três extratos tiveram o teor de flavonóides avaliado, pelo método AlCl_3 e via eletroforese capilar, sendo que o extrato acetato de etila apresentou maior valor. Também foi avaliado o teor de proantocianidinas totais, pelo método colorimétrico, sendo que os resultados não foram relevantes. Com relação ao potencial antioxidante, a maior atividade de seqüestro de radical livre DPPH foi apresentada pelo extrato acetato de etila. Como análise biológica, os três extratos foram submetidos ao estudo de atividade antibacteriana através da concentração inibitória mínima, sendo que o resultado mais expressivo foi apresentado pelo extrato hexânico sobre a bactéria *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: *Croton urucurana*, Diterpenos, Atividade antioxidante

ABSTRACT

Croton urucurana is a tree belonging to the *Euphorbiaceae*'s family used as a popular medicine to treat pain, inflammation, skin infections, wounds healing and cancer. From this plant we can make use of the bark preparations, red sap and the gum released by the tree trunk harming. Pharmacological studies have shown that this species keeps healing activities, antidiarrhoea, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antirheumatic, antibacterial and antifungal against dermatophytes. However there are a few phytochemistry studies from croton urucurana reporting the isolation of ten compounds, highlighting the presence of three clerodane diterpenoids. The following dissertation aim to evaluate the chemical composition, fractionate and isolate the *Croton Urucurana* compounds focusing the search of new diterpenes. From the crushed and dried barks of the plant, three crude extracts were prepared: hexane extract, ethyl acetate extract and ethanol extract. The isolated compounds were identified by spectroscopic techniques of infrared, nuclear magnetic resonance of ^1H and ^{13}C uni and bi-dimensional and X-ray diffraction. From the fractionation of hexane extract and ethyl acetate were isolated a mixture of sterols and two diterpenes, one of which unpublished in the literature. From the ethanol extract, four compounds were isolated. From the richest fractions in diterpenes another one was isolated whose structural proposal is also unpublished in the literature. The three extracts were submitted to the determination of phenolic compounds by the methods by Folin-Ciocalteu, whereas ethanol extract shown the highest concentration, Similarly, the three extracts had flavonoids contents evaluated by AlCl_3 method and capillary electrophoresis, and ethyl acetate extract had the highest value among them. Was also evaluated the content of total proanthocyanidins, by means of the colorimetric method, however the results were not relevant. Take into account the antioxidant potential, the greatest activity of capture of free radical DPPH was presented by the ethyl acetate extract. As biological analysis, the three extracts were submitted to the antibacterial activity study by means of the minimum inhibitory concentration, whereas the most substantial result was presented by hexane extract against the *Enterococcus faecalis* bacterium.

Key-words: *Croton urucurana*, diterpenos, antioxidant potential

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Exemplo de espécies de <i>Croton</i> , com suas aplicações populares e efeitos farmacológicos (SALATINO, 2007)	3
Tabela 2: Diterpenos clerodanos em algumas espécies de <i>Croton</i> (PALMEIRA et al., 2006).....	4
Tabela 3: Rendimentos de cada extrato bruto	8
Tabela 4: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do composto 2 com os valores da literatura (Peres et al., 1998), em CDCl_3	13
Tabela 5: Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (ppm) do composto 3, em CDCl_3	17
Tabela 6: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do composto 5 com os valores da literatura (Kadowaki et al., 2003).	20
Tabela 7: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) dos diterpenos 2, 3, sonderiano e composto 6, em CDCl_3	22
Tabela 8: Resultados da determinação de proantocianidinas	26
Tabela 9: Teor de fenólicos totais, flavonóides e captura de DPPH.....	28
Tabela 10: Classificação de atividade antibacteriana para extratos brutos (MACHADO et al., 2005).	31
Tabela 11: Resultados de atividade antibacteriana	32

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelos de esqueletos estruturais de clerodanos encontrados no gênero <i>Croton</i>	5
Figura 2: Imagem de <i>Croton urucurana</i>	5
Figura 3: Diterpenos isolados em <i>C. urucurana</i>	6
Figura 4 Frações fonte do composto (2)	11
Figura 5: Estrutura de raio-X do composto 12-epi-metil-barbascoato (2)	13
Figura 6: Frações fonte do composto (3)	14
Figura 7: Expansão do espectro de COSY do composto 3	16
Figura 8: Estrutura de raio-X do composto 3	17
Figura 9: Expansão do espectro bidimensional HMQC do composto 6, em CDCl ₃	22
Figura 10: Estrutura do diterpeno sonderianino	23
Figura 11: Expansão do espectro bidimensional HMBC do composto 6, em CDCl ₃	23
Figura 12: Proposta estrutural para o composto 6	24
Figura 13: Modelo de estrutura de taninos condensados (Schofield et al., 2001)	25
Figura 14: Esquema da reação de polimerização oxidativa (Schofield et al., 2001)	25
Figura 15: Estrutura ácido gálico	27
Figura 16: Estrutura básica dos flavonóides	27
Figura 17: Estrutura da catequina e galocatequina	29
Figura 18: Estrutura do DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil)	30
Figura 19: Fluxograma com esquema de preparação dos extratos – 1ª remessa	36
Figura 20: Fluxograma com esquema de preparação dos extratos – 2ª remessa	37
Figura 21: Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila – 1ª remessa	38
Figura 22: Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila – 2ª remessa	39
Figura 23: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico – 1ª remessa	41
Figura 24: Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico – 1ª remessa	42
Figura 25: Curva de calibração para proantocianidinas	45
Figura 26: Curva de calibração (padrão) para o teor de fenólicos totais	46
Figura 27: Curva de calibração (padrão) para determinação de flavonóides via complexação AlCl ₃ ..	47
Figura 28: Exemplo da curva para atividade antioxidante do extrato acetato de etila	48

ABREVIATURAS E SIGLAS

IV	Infravermelho
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹³ C
COSY	Espectroscopia de correlação ¹ H- ¹ H
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
DEPT	Intensificação sem distorção por transferência de polarização
TMS	Tetrametilsilano
TBS	Tetraborato de sódio
DPPH	2,2-difenil-picril-hidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ν	Número de onda (1/λ)
φ	Diâmetro interno
R.f.	Índice de retenção
P.f.	Ponto de fusão
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
BHI	Brain heart infusion
s	Singleto
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
t	Tripleto
m	Multiplete
Pr-i	Iso-prenil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A pesquisa em produtos naturais	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Considerações gerais sobre a família <i>Euphorbiaceae</i>	2
2.2 Considerações gerais sobre o gênero <i>Croton</i>	2
2.3 Clerodanos do gênero <i>Croton</i>	4
2.4 Considerações gerais sobre a espécie <i>Croton urucurana</i>	5
3 OBJETIVOS	7
3.1 Objetivos gerais	7
3.2 Objetivos específicos	7
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
4.1 Preparação dos extratos brutos.....	8
4.2 Caracterização e identificação dos compostos	9
4.2.1 Identificação da mistura de campesterol, stigmasterol e β -sitosterol (1)	9
4.2.2 12-epi-metil-barbascoato (2)	10
4.2.3 4-oxo-12-epi-metil-barbascoato (3)	14
4.2.4 Composto (4)	18
4.2.5 β -sitosterol glicosilado (5).....	19
4.2.7 Composto (6)	21
4.3 Hidrólise das frações mais polares de Cr1E.....	24
4.4 Análise fitoquímica preliminar	24
4.4.1 Determinação de proantocianidinas totais pelo método colorimétrico.....	24
4.4.2 Determinação de fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteau	26
4.4.4 Determinação do teor de flavonóides – Método $AlCl_3$	27
4.4.4 Determinação de flavonóides – Método eletroforese capilar	29
4.4.5 Determinação da atividade antioxidante - Captura de radicais livres usando DPPH	29
4.5 Avaliação das atividades biológicas	30
4.5.1 Avaliação da toxicidade através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	30
4.5.2 Estudo da atividade antibacteriana através da concentração inibitória mínima (CIM)	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Material vegetal.....	33
5.2 Solventes	33
5.3 Instrumentação	33
5.3.1 Determinação do ponto de fusão	33
5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
5.3.3 Espectroscopia no Infravermelho	34
5.3.4 Espectroscopia no UV-visível.....	34

5.3.5 Difractometria de Raios-X	34
5.3.6 Eletroforese capilar	35
5.3.7 Cromatografia gasosa	35
5.3.8 Demais métodos cromatográficos	35
5.4 Preparação dos extratos vegetais	36
5.5 Procedimento para o fracionamento dos extratos	37
5.5.1 Extrato acetato de etila – 1ª remessa (Cr1A)	37
5.5.2 Extrato acetato de etila – 2ª remessa (Cr2A)	39
5.5.3 Extrato hexânico – 1ª remessa (Cr1H)	40
5.5.4 Extrato hexânico – 2ª remessa (Cr2H)	41
4.5.5 Extrato etanólico – 1ª remessa (Cr1E)	42
5.5.6 Frações potencialmente ricas em diterpenos	44
5.6 Análise fitoquímica preliminar	44
5.6.1 Determinação de proantocianidinas totais pelo método colorimétrico	44
4.6.2 Determinação de fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteau	45
5.6.3 Determinação do teor de flavonóides – Método AlCl ₃	46
5.6.4 Determinação de flavonóides– Método eletroforese capilar	47
4.6.5 Determinação da atividade antioxidante - Captura de radicais livres usando DPPH	48
5.7 Avaliação das propriedades biológicas	49
5.7.1 Avaliação da toxicidade através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	49
5.7.2 Estudo da atividade antibacteriana através da concentração inibitória mínima (CIM)	49
6 CONCLUSÕES	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8 ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pesquisa em produtos naturais

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS et al., 2006).

Dentro deste contexto de pesquisa em produtos naturais, o Brasil possui vantagens, tais como a maior biodiversidade de plantas, rica diversidade étnica e cultural, tradição de uso das plantas medicinais com conhecimento transmitido oralmente por gerações, além de tecnologia para validar cientificamente este conhecimento (RODRIGUES, 2005).

A evolução científica da química dos produtos naturais (QPN) no Brasil teve seu marco histórico na fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), implantada e estruturada por pesquisadores de excelência, como Otto R. Gottlieb, de onde surgiram grupos consolidados e atuantes na área por todo o país. A partir de 1999, além dos estudos clássicos, observou-se um aumento significativo de trabalhos focalizando atividade biológica, passando de cerca de 16% em 1996 para 26% em 2001 (PINTO et al., 2002).

Pesquisas datadas do ano 2000, estimavam que cerca de 80% dos países em desenvolvimento encontravam nas plantas medicinais a primeira opção no tratamento de doenças (SALATINO et al., 2007). Desta forma, é cada vez mais válido o aprimoramento e a ampliação nos estudos químicos e farmacológicos dos recursos vegetais com conhecidas propriedades terapêuticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre a família *Euphorbiaceae*

Euphorbiaceae é uma família botânica representada por 222 gêneros e cerca de 5.970 espécies, que podem se apresentar como arbóreas, arbustivas, subarbustos e ervas.

Dentro desta família as espécies mais conhecidas são: a seringueira (*Hevea* sp.) e a mamona (*Ricinus communis*). Entre suas características botânicas principais tem-se a presença de substâncias laticíferas, visíveis quando a planta é submetida às injúrias mecânicas (WATSON, 2008).

2.2 Considerações gerais sobre o gênero *Croton*

Croton é um gênero da família *Euphorbiaceae* com cerca de 1300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais de todo mundo. Várias espécies desempenham papel importante na terapêutica tradicional com plantas medicinais na África, Ásia e América do Sul (SALATINO et al., 2007). Este gênero compreende ervas, arbustos e árvores, os quais estão descritos em diversas farmacopéias.

Em geral, preparações com as espécies do gênero *Croton* são usados como estimulante, inseticida, vermífugo, diurético, antisséptico, purgativo, analgésico, antipirético e cicatrizante. Da mesma forma preparações de espécies de *Croton* são aplicadas no tratamento de tumor, câncer, epilepsia, inflamação, malária, diarreia, tuberculose e em uma série de sintomas gastrointestinais (PALMEIRA, 2006). A tabela 1 sumariza usos populares e atividade farmacológicas estudadas das principais espécies de *Croton*.

O gênero *Croton* possui diversas espécies produtoras de óleo. Análises químicas dos óleos essenciais de algumas espécies reportam que monoterpenóides, sesquiterpenóides e fenilprenóides são os constituintes majoritários. Atualmente inúmeros trabalhos têm sido publicados tratando das propriedades biológicas dos óleos. Entre elas destacam-se as atividades gastroprotetiva, miorelaxante, antiespasmódica, antinociceptiva e sobre alterações comportamentais.

Tabela 1: Exemplo de espécies de *Croton*, com suas aplicações populares e efeitos farmacológicos (SALATINO, 2007)

Espécie	Uso tradicional	Atividades comprovadas
<i>C. cajucara</i>	Diabetes, controle do colesterol, distúrbios digestivos e hepáticos, perda de peso	Cicatrização de úlceras gástricas, leshimanicida, efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos, anticâncer, antibacteriano e antifúngico.
<i>C. celtidifolius</i>	Inflamação, leucemia, úlceras e reumatismo	Antiinflamatória, antioxidante, antinociceptiva
<i>C. eleuteria</i>	Bronquite, febre, malária, distúrbios digestivos e hipertensão	Estimulação de secreção gástrica
<i>C. lechleri</i>	Hemostático, cicatrização, purgativo	Antiinflamatória, antiviral, anti-leucemica,
<i>C. malambo</i>	Dor, reumatismo, diabetes, inflamação, diarreia, úlceras gástricas	Antinociceptiva e antiinflamatória
<i>C. zambesicus</i>	Febre, malária, convulsão, infecção microbiana, disenteria	Citotoxicidade

Levando em conta a grande dimensão do gênero e a dispersão dos estudos sobre as espécies, não existem conclusões definitivas sobre a relação química entre as espécies de *Croton*. Os estudos relatam que a química do gênero *Croton* é diversa. Na literatura, estão descritos o isolamento de alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignanas, benzenóides, poliprenóides, quinóides e um grande número de diterpenóides. Nesta última classe se encaixa a maior parte dos compostos identificados, com relevante destaque aos diterpenos com esqueleto clerodano (SALATINO et al.,2007) .

2.3 Diterpenos clerodanos do gênero *Croton*

Diterpenos são, dentro da classe dos terpenos, metabólitos secundários derivados do ácido mevalônico. Possuem grande variedade de estruturas, que contem 20 átomos de carbono. O interesse no isolamento deste composto está em crescimento devido suas atividades biológicas, função ecológica, utilidade como modelo em sínteses e funções taxonômicas (PALMEIRA et al., 2006).

Desconhece-se a regra fisiológica dos diterpenos no metabolismo secundário das plantas das quais eles são extraídos, entretanto acredita-se que a habilidade de sintetizar estes compostos traga benefícios às plantas (GEBBINCK et al., 2002).

Dentro da classe dos diterpenos, existe um grupo chamado de clerodanos, ao qual pertence a maioria dos diterpenos isolado das espécies de *Croton* (Tabela 2).

Tabela 2: Diterpenos clerodanos em algumas espécies de *Croton* (PALMEIRA et al., 2006)

Espécie	Diterpenos		
<i>C. cajucara</i>	trans-crotonino cajuocarínolido	trans-dehidrocrotonino sacarino	cajuocarino A, B e β
<i>C. eleuteria</i>	cascalino casacariladiona	cascarilona eleuterinos	cascarilinos pseudoeleuterino B
<i>C. urucurana</i>	sonderiano 12-epi-metilbarsbacoato	15,16-epoxy-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona	
<i>C. lechleri</i>	crolequinol metil-barsbacoato	ácido clorequínico	korbeninos
<i>C. zambesicus</i>	crotoacorilifurano crotozambefurano		

Segundo publicação de Palmeira e colaboradores (2006), o gênero *Croton* é bastante rico em diterpenos clerodanos, que podem ser encontrados em distintas partes das plantas, inclusive nos óleos essenciais. Para o gênero *Croton*, existem mais de uma centena de distintos diterpenos clerodanos cujas estruturas são relatadas na literatura; porém estas seguem apenas quatro tipos de esqueletos (Figura 1), que se distinguem através dos grupos existentes na cadeia ligada ao C-9.

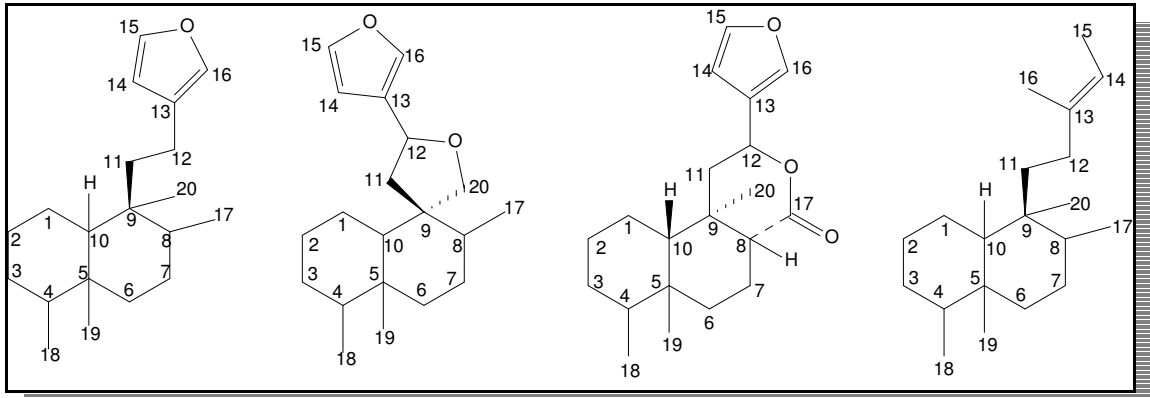


Figura 1: Modelos de esqueletos estruturais de clerodanos encontrados no gênero *Croton*

2.4 Considerações gerais sobre a espécie *Croton urucurana*

Croton urucurana Baill. (*Euphorbiaceae*) é uma árvore (Figura 2), com 10 a 12m de altura, comumente encontrada na região de Dourados - Mato Grosso do Sul; também é encontrada na Bahia, Mato Grosso e Rio Grande do Sul. Ela cresce em solos arenosos e úmidos, sujeitos a inundações em épocas de chuvas, bem como na beira de rios. Três diferentes produtos dessa espécie são utilizados na medicina popular: o látex, a casca e a goma (MILO et al., 2002).



Figura 2: Imagem de *Croton urucurana*

Segundo Peres e colaboradores (1997), sua casca, quando ferida, libera uma seiva vermelho-sangue; sendo por esta razão que algumas espécies de *Croton* são popularmente conhecidas como Sangue de Grado ou Sangra d'água. Após a

“sangria” do látex, ocorre o acúmulo de uma goma no local do corte (MILO et al., 2002). Preparações de *C. urucurana* são usadas popularmente de forma oral ou tópica. No primeiro caso, são usadas contra disenteria, no tratamento de câncer, reumatismos, dor. Topicamente, é usada diretamente sobre feridas, ulcerações, dermatites (MILO et al., 2002; RAO et al., 2007).

Milo e colaboradores (2002) relatam a caracterização de um polissacarídeo fuarabinogalactana como principal constituinte da goma. Também descrevem a presença da proantocianidina oligomérica SP-303 como principais constituintes do látex.

Existem três publicações a respeito da química das cascas, todas estas vinculadas ao nosso grupo de pesquisa (PERES et al., 1997; PERES et al., 1998a; PERES et al., 1998b) que descrevem a presença de ácido acetilaleurítico; dos flavonóides catequina e galocatequina; dos diterpenos clerodanos (Figura 3) sonderianino, 12-epi-metilbarsbacoato e 15,16-epoxy-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona; e dos esteróis: campesterol, stigmasterol, β -sitosterol e seu glicosídeo. A respeito da composição do óleo essencial, Simionatto e colaboradores (2007), relatam que os principais componentes do óleo essencial de *Croton urucurana* foram identificados como o monoterpene borneol (14,7%), borneol acetato (5.2%), 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4-ol (14.7%), sesquicineol (10.5%) e epóxido de g-gurjuneno (5.4%).

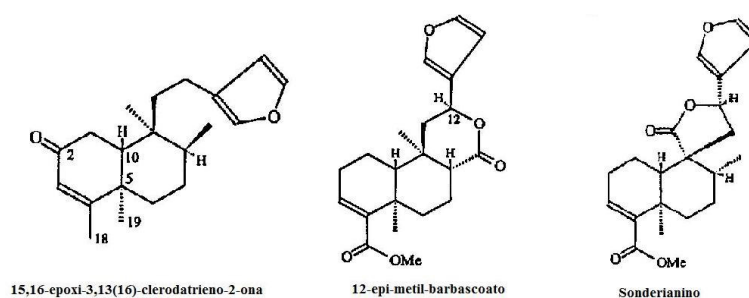


Figura 3: Diterpenos isolados em *C. urucurana*

Estudos farmacológicos realizados com *Croton urucurana* descrevem a capacidade de cicatrização de feridas e ulcerações, atividades antidiarréica, anticâncer, antiinflamatória, antioxidante, antireumática, antibacteriana e antifúngica contra dermatites (GURGEL et al., 2005; RAO et al., 2007; SIMIONATTO et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Ampliar o estudo fitoquímico da espécie *Croton urucurana*, direcionando aos seus aspectos quimiotaxonômicos, na busca por novos compostos diterpênicos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos brutos das cascas de *Croton urucurana*, utilizando solventes de diferentes polaridades.
- Isolar e caracterizar os metabólitos secundários da espécie *Croton urucurana* através de técnicas de cromatografia, de recristalização e análises espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos, bem como o conteúdo de fenólicos e de flavonóides totais.
- Analisar via técnica de eletroforese capilar a existência de flavonóides nos extratos brutos.
- Avaliar a atividade citotóxica frente a *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana, através da concentração inibitória mínima.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O eixo central deste trabalho consistiu na obtenção dos constituintes fitoquímicos de *Croton urucurana*, em especial no isolamento de compostos diterpênicos. Em paralelo, foi realizado um estudo de algumas propriedades químicas e biológicas dos extratos. Desta forma, dividiu-se o trabalho em quatro frentes: preparação dos extratos brutos; caracterização e identificação dos compostos isolados; avaliação do potencial antioxidante dos extratos e do teor de fenólicos, flavonóides e proantocianidinas totais; e avaliação das atividades citotóxicas e antibacteriana.

4.1 Preparação dos extratos brutos

Com a completa evaporação dos solventes, foi possível calcular o rendimento de cada extrato bruto, conforme tabela 3. Estes valores foram obtidos sem considerar as perdas de material durante o manuseio bem como sem levar em conta a perda de massa devido a extração anterior.

Tabela 3: Rendimentos de cada extrato bruto

Solvente	Rendimento (%)	
	1ª remessa	2ª remessa
n-Hexano	0,56	0,54
Acetato de etila	1,62	1,61
Etanol	1,23	1,24

Analisando os rendimentos de cada extrato bruto, expressos na tabela acima, observou-se baixo aproveitamento para todas as extrações. Este resultado pode ser explicado considerando que o material vegetal utilizado (cascas) é constituído por tecidos extraordinariamente compactos, debilitando a capacidade de penetração do solvente.

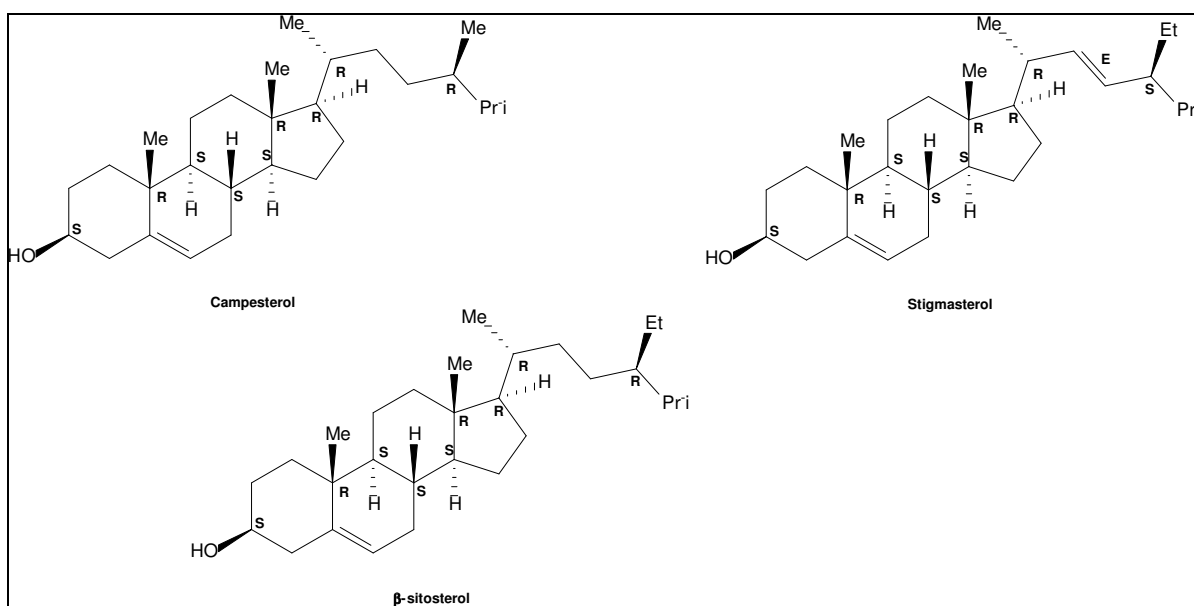
Não obstante ao parágrafo anterior, é proposto na literatura (REIS et al, 2004) que espécies vegetais apresentam épocas específicas cuja concentração de princípios ativos em seus tecidos é maior e que o período de armazenamento pós-

colheita deve ser o menor possível. Sugere-se que o melhor momento para coleta das cascas é durante o outono e início do inverno; o que não ocorreu neste trabalho.

4.2 Caracterização e identificação dos compostos

Os compostos isolados e as misturas foram caracterizados e, quando possível, identificados através da análise de suas propriedades físicas, químicas e espectroscópicas.

4.2.1 Identificação da mistura de campesterol, stigmasterol e β -sitosterol (1)



(1)

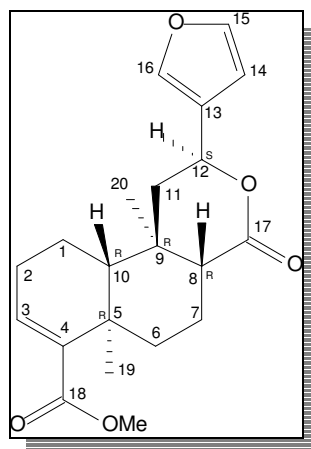
Misturas dos esteróis campesterol, stigmasterol e β -sitosterol foram obtidas a partir de frações eluídas com solvente 75:25 n-hexano: acetato de etila, nos fracionamentos cromatográficos dos extratos brutos Cr1A, Cr2A e Cr1H. No extrato Cr2H, esta mistura foi coletada na fração eluída com solvente 78:22 n-hexano: acetato de etila. As frações foram solubilizadas em n-hexano e deixadas em repouso para precipitação dos esteróis. Após a remoção do sobrenadante, obteve-se uma mistura de esteróis na forma de um sólido cristalino. No total foram obtidas 287mg da mistura.

Analisando os espectros de infravermelho (Anexo 8.1), obtidos em pastilha de KBr, observou-se um perfil de absorção característico da família dos fitoesteróis. Na região de ν 3427cm^{-1} observou-se a presença de banda de vibração da ligação OH. O espectro também apresentou absorção em ν 2936cm^{-1} correspondente a estiramento C-H alifático.

A confirmação da identidade dos esteróis se deu via análise por cromatografia gasosa através da co-injeção desta mistura com padrões existentes no laboratório. O cromatograma da fração 13-16 do Cr1A (Anexo 8.2) apresentou três picos, com tempos de retenção de 29,923, 30,650 e 31,952 minutos, que foram coincidentes com os dos padrões dos esteróis campesterol, stigmasterol e β -sitosterol, nesta ordem. Para esta mistura, o cálculo de proporções estabeleceu uma relação de 6,668% : 34,360% : 58,971% para os esteróis campesterol, stigmasterol e β -sitosterol. Através da co-eluição de todas as misturas em CCD ($R_f = 0,58$; n-Hex:AcOEt 70:30) foi observado o mesmo perfil, caracterizando que todas eram compostas pelos mesmos esteróis.

O ponto de fusão das quatro amostras de mistura ocorreu numa faixa de temperatura, que oscilou entre $132 - 138^\circ\text{C}$ (Lit.: Campesterol= $157 - 158^\circ\text{C}$ (ZHANG et. al., 2006), Stigmasterol= $170 - 172^\circ\text{C}$ (ABOU-DOUH et. al., 2005) e β -sitosterol= $130 - 135^\circ\text{C}$ (YUN-CHOI et. al., 2003)).

4.2.2 12-epi-metil-barbascoato (2)



(2)

O diterpeno 12-epi-metil-barbascoato foi obtido a partir de frações coletadas dos extratos brutos Cr1A, Cr2A, Cr1H e Cr2H conforme esquema apresentado no fluxograma da figura 4.

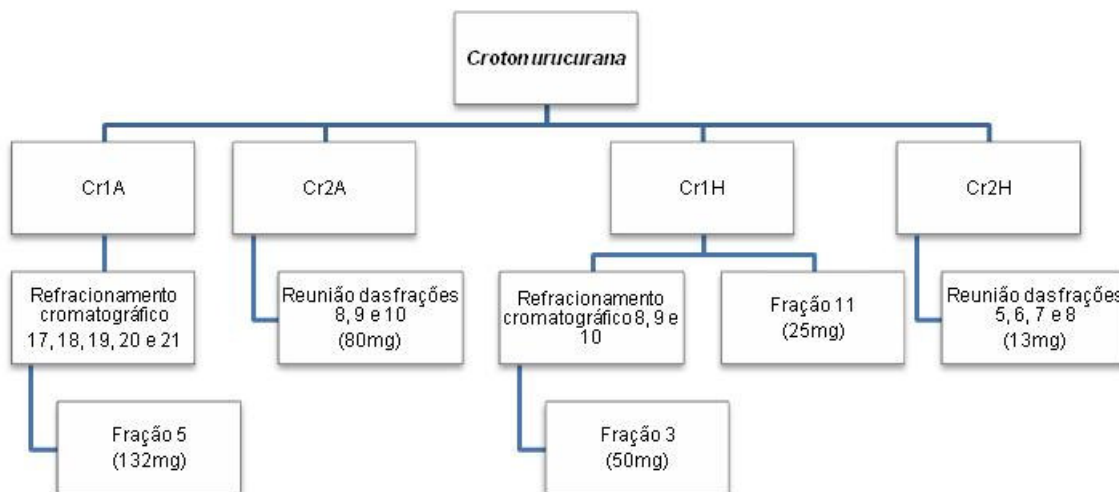


Figura 4 Frações fonte do composto (2)

Em todas as frações o composto foi isolado sob a forma de um óleo amarelado, com índice de retenção em CCD igual a 0,7 (n-hexano:acetato de etila 70:30).

O aspecto oleoso e a presença de uma mancha no formato de cauda, na placa cromatográfica, eram indícios de que havia contaminação nas amostras. Em concordância com esta observação, dados da literatura (PERES et al., 1998) relatavam o isolamento deste composto como um sólido, com ponto de fusão 115 – 117°C. Procedimentos de recristalização com acetona levaram até a obtenção de um sólido cristalino, com ponto de fusão de 117-120°C.

A análise do espectro de IV, obtido em pastilha de KBr, do composto purificado (Anexo 8.3) apresentou uma larga banda de absorção em ν 1713 cm^{-1} correspondendo a deformação axial da ligação C=O. Observaram-se também bandas médias de absorção na região de ν 2951 cm^{-1} , referentes a estiramentos C-H alifáticos. A presença de bandas de absorção em valores próximos a ν 1200 - 1300 cm^{-1} indicam vibrações de deformação axial de C-O. Estas últimas bandas e as de carbonila propõem a presença de ésteres na estrutura do composto.

O espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 (Anexo 8.4), apresentou três sinais de hidrogênios de um sistema heteroaromático: um singlete em δ_{H} 7,79ppm referente ao H-16, um singlete em δ_{H} 7,76ppm atribuído do H-15 e um tripleto em δ_{H} 6,98ppm relativo ao H-14, todos referentes ao anel furano. Adicionalmente, foi observado um duplo duplete em δ_{H} 5,87ppm referente a um hidrogênio vizinho ao sistema aromático e a um heteroátomo. O espectro também apresentou dois singletos relativos ao grupo metila em δ_{H} 1,45ppm (H-20) e outro em δ_{H} 1,6 ppm (H-19), bem como um singlete de metoxila em δ_{H} 4,05 ppm (H-21). Além destes sinais, foi observada uma série de sinais na região de δ_{H} 1,00 – 3,00 ppm, relativos a hidrogênios de grupos CH e CH_2 .

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 8.5) apresentou 20 sinais de carbono, numa região espectral compreendida entre δ_{C} 14,78ppm e 172,69ppm. Juntamente com o DEPT 135° (Anexo 8.6), observou-se que a estrutura **(2)** é composta por 4 carbonos quaternários, 7 metínicos, 5 metilênicos e 3 carbonos metílicos, estando um destes localizado na região espectral de carbono ligado a oxigênio, com absorção em δ_{C} 52,74ppm. Os demais carbonos metílicos aparecem na região espectral de hidrocarbonetos acíclicos.

Foram observados dois sinais na faixa de absorção de derivados de ácido carboxílico; sendo um sinal com deslocamento químico à δ_{C} 167,51 ppm referente ao átomo de carbono quaternário de um éster metílico. O outro sinal, com deslocamento químico em δ_{C} 172,69ppm, corresponde ao carbono quaternário de um éster cíclico. Este sinal, associado ao sinal em δ_{C} 72,10ppm, caracterizam um sistema de δ -lactona.

A estrutura **(2)** foi confirmada através da análise comparativa dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura (PERES et al., 1998), que relatavam o isolamento deste diterpeno na espécie.

A obtenção de monocristais, através de recristalização em CH_2Cl_2 , permitiu uma análise cristalográfica através de difratometria de raio-X (Figura 14 e Anexo 8.7) que veio a ratificar a identificação do composto **(2)** como sendo um diterpeno clerodano, e definiu exatamente as configurações relativas de todos os centros quirais da molécula (C-5, C-8, C-9, C-10 e C-12).

Tabela 4: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do composto **2** com os valores da literatura (Peres et al., 1998), em CDCl_3 .

Posição	12-epi-metil-barbascoato (2)	Literatura
1	17,62	17,4
2	27,02	26,8
3	137,39	137,1
4	141,40	141,2
5	36,97	36,7
6	35,05	34,8
7	18,59	18,3
8	51,49	51,2
9	37,26	37,0
10	51,54	52,5
11	44,26	44,0
12	72,10	71,8
13	126,16	125,9
14	108,74	108,5
15	144,01	143,8
16	139,57	139,3
17	172,69	172,4
18	167,51	167,3
19	21,18	20,9
20	14,78	14,5
OMe	52,74	51,3

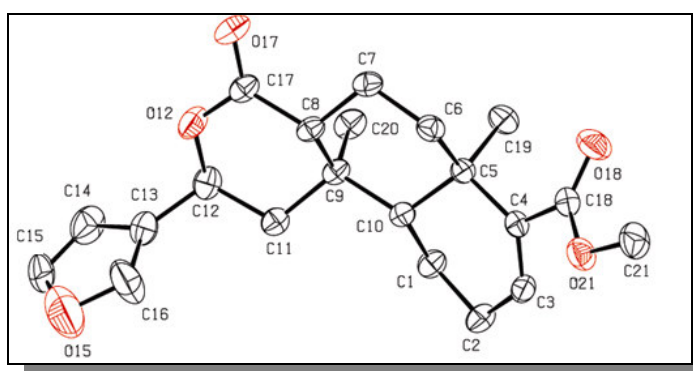
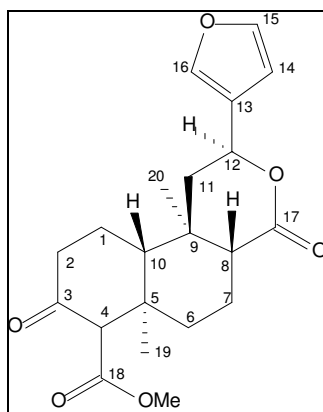


Figura 5: Estrutura de raio-X do composto 12-epi-metil-barbascoato (**2**)

4.2.3 4-oxo-12-epi-metil-barbascoato (3)



(3)

O composto 4-oxo-12-epi-metil-barbascoato (3) foi obtido a partir de frações coletadas dos extratos brutos Cr1A, Cr2A e Cr1H, de acordo com o fluxograma da figura 6.

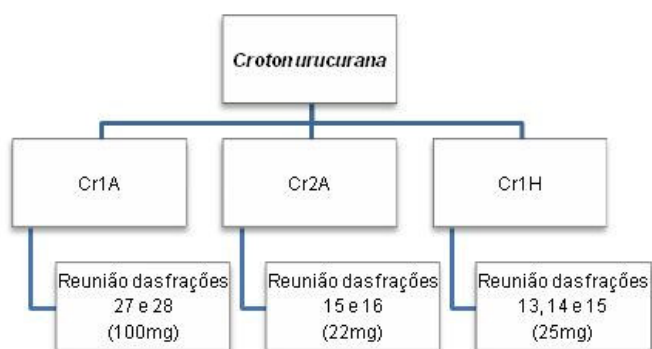


Figura 6: Frações fonte do composto (3)

Após a purificação através de recristalização em acetona, foram obtidos 30mg de um sólido cristalino, de p.f. 156°C e R.f. 0,3 (n-hexano:acetato de etila 70:30). A análise de cromatografia gasosa (Anexo 8.8) comprovou a pureza do produto cristalizado, pela observação de um único pico, com tempo de retenção de 25,112 minutos.

Analisando o resultado da espectroscopia de infravermelho (Anexo 8.9), realizada em pastilha de KBr, observam-se duas bandas na região referente aos estiramentos da ligação C-H, sendo que a mais intensa, em ν 2952cm⁻¹, indica

ligação C-H de sistemas alifáticos e a outra, menos intensa, em ν 3151 cm^{-1} , relativa ao estiramento C-H de carbonos sp^2 . Ainda na região de IV, destacaram-se as absorções para carbonilas de ésteres em ν 1736 cm^{-1} e de cetona exocíclica em, aproximadamente, ν 1700 cm^{-1} .

No espectro de RMN ^1H (Anexo 8.10) observaram-se dois sinais em δ_{H} 7,44ppm (H-16) e 7,41ppm (H-15) indicando a presença de dois átomos de hidrogênio ligados cada um a um átomo de carbono sp^2 de anel aromático ou vizinhos a um átomo eletronegativo, como oxigênio, por exemplo. Estes sinais, juntamente ao sinal em δ_{H} 6,41ppm (H-14) e a comparação com o espectro de RMN ^1H apontam para a presença de um anel furano (sistema aromático). No espectro destacam-se, também, vários outros sinais entre δ_{H} 1,0 e 2,0ppm de grupos CH, CH_2 e CH_3 , bem como um duplo duplete em aproximadamente δ_{H} 5,49ppm relativo ao um hidrogênio de um CH endocíclico ligado a oxigênio e vizinho a um CH_2 . Através da observação da correlação entre os sinais de deslocamento químico de CH em δ_{H} 5,49ppm com o sinais dos hidrogênios CH_2 em δ_{H} 2,45ppm e δ_{H} 1,75ppm, pelo espectro COSY (Figura 7), foi possível confirmar a existência do sistema C12-C11(CH- CH_2).

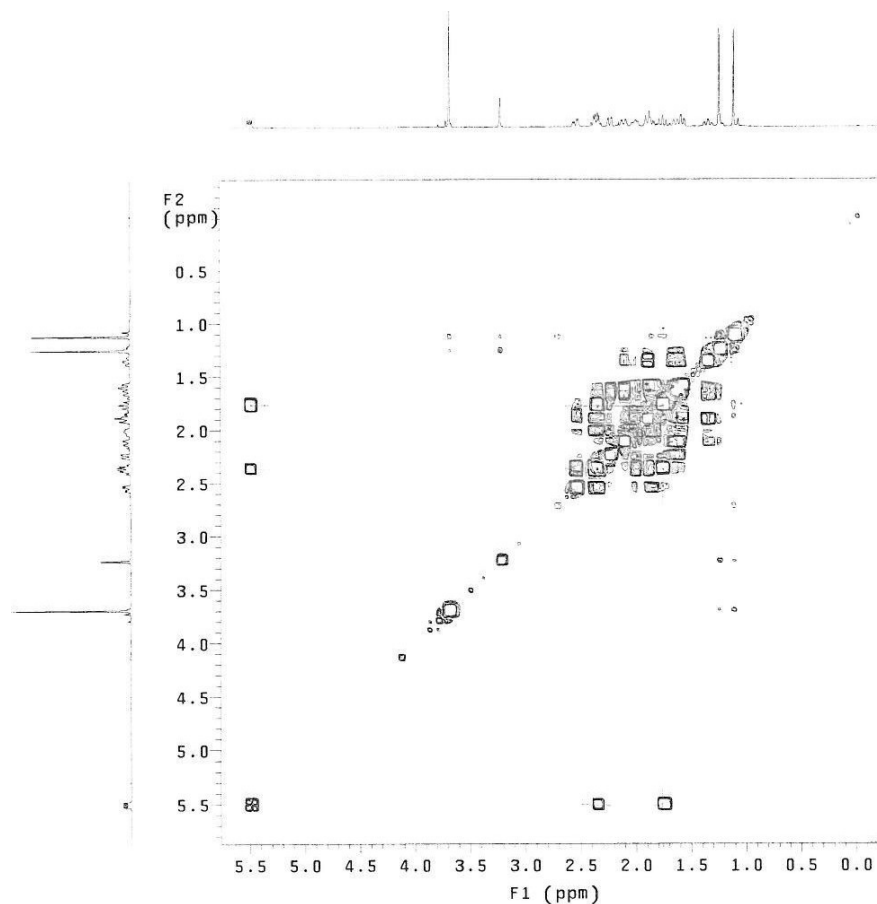


Figura 7: Expansão do espectro de COSY do composto **3**

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo 8.11) observou-se a presença de 21 carbonos numa região espectral compreendida entre δ_{C} 15,102 ppm e 204,268 ppm. O espectro de RMN ^{13}C confirma a existência do anel furano devido a presença dos sinais em δ_{C} 139,648, 144,145 e 108,650 ppm, além do sinal em δ_{C} 125,789 ppm referente ao sinal de absorção de um carbono quaternário.

Além destes sinais, aparecem absorções para mais três carbonos quaternários, sendo provavelmente de carboxila de éster em δ_{C} 168,264 e 171,867 ppm e carbonila de cetona em δ_{C} 204,268 ppm.

Com a ajuda do espectro de RMN ^{13}C DEPT 135°C (Anexo 8.12), foram contabilizados 3 sinais de CH_3 , 5 sinais de CH_2 e 7 sinais de CH , de onde se deduziu a fórmula molecular expandida $3\text{CH}_35\text{CH}_27\text{CH}6\text{C}6\text{O}$.

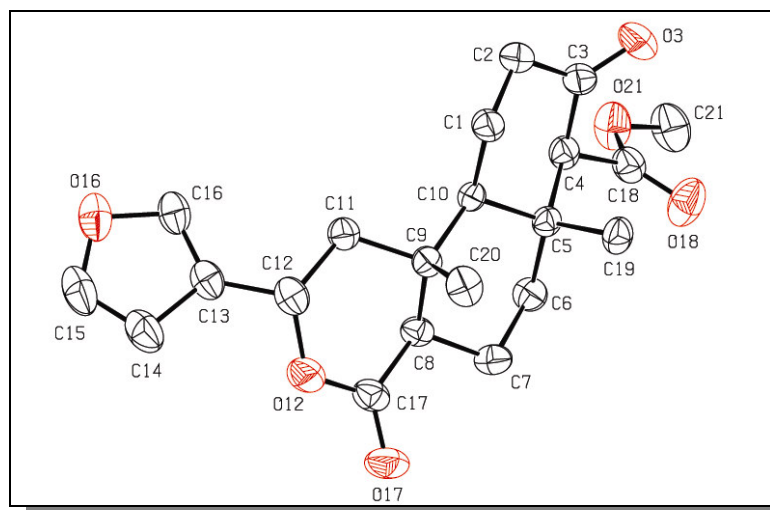
Analisando as informações discutidas nos parágrafos anteriores e comparando os com dados da literatura (PERES et al., 1998), observaram-se congruências em vários sinais de absorção. Estes dados orientaram para uma estrutura diterpênica do tipo clerodano, constituído por sistema conhecido como 5-(fúril)- δ -valerolactona (PALMEIRA et al., 2006).

Através da análise do espectro bidimensional HMQC (Anexo 8.13) tornou-se possível fazer a atribuição de todos os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos, conforme explicitado na tabela 5. Estas informações juntamente com o espectro de RMN ^1H permitiram a identificação dos hidrogênios e o cálculo de suas constantes de acoplamento (J)

Mesmo considerando as informações discutidas acima, não foi possível concluir com exatidão a estrutura total do composto. Porém, através da difratometria de raios-X obteve-se a elucidação estrutural da molécula (Figura 8 e anexo 8.14).

Tabela 5: Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (ppm) do composto **3**, em CDCl_3 .

Posição	δ_{C}	δ_{H}
1	22,4	2,10 m
2	40,6	2,00 dd (J= 2,8 e 14,4)
3	204,7	-
4	69,6	3,22 s
5	37,3	1,34 td (J=13,4 e 5,0) e 1,90 m
6	37,7	1,90 m
7	18,4	2,11 m
8	51,6	2,23 dd (J= 12,0 e 2,0)
9	37,3	-
10	54,2	1,60 dd (J= 12,4 e 10,4)
11	44,6	1,75 t (J= 12,4) e 2,36 dd (J= 13,2 e 5,6)
12	71,9	5,49 dd (J= 10,8 e 5,2)
13	125,8	-
14	108,6	6,41 s
15	144,1	7,44 s
16	139,6	4,41 s
17	171,9	-
18	168,3	-
19	15,4	1,25 s
20	15,1	1,11 s
OMe	51,9	3,68 s

Figura 8: Estrutura de raio-X do composto **3**

Após realizar uma vasta busca na literatura, não se encontrou nenhum diterpeno com estrutura igual a proposta, significando o isolamento de um diterpeno de estrutura inédita em *Croton urucurana*.

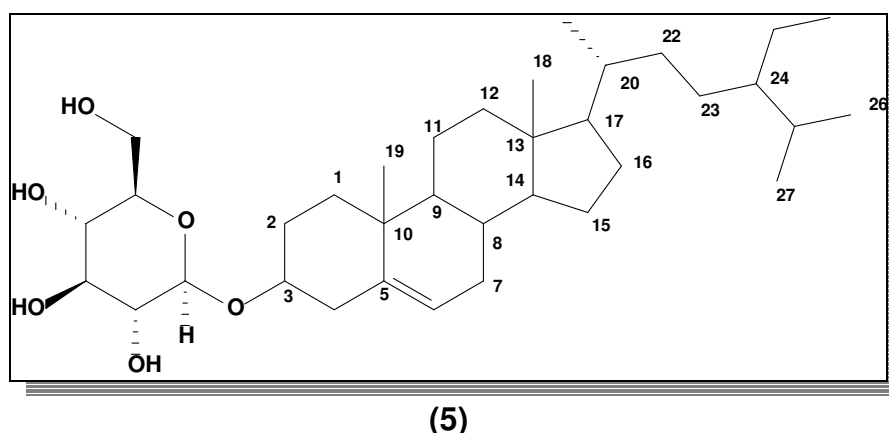
4.2.4 Composto (4)

A partir da primeira fração do extrato Cr1E foram isolados 22mg de um sólido branco, com ponto de fusão de 68 – 69°C. O espectro de infravermelho (Anexo 8.15), em pastilha de KBr, apresentou dois sinais intensos de absorção em ν 2918 cm^{-1} e ν 2850 cm^{-1} relativos aos estiramentos de C-H alifáticos indicando a presença de uma longa cadeia hidrocarbonada linear. Observou-se também absorção em ν 3439 cm^{-1} atribuída a vibração da ligação O-H.

O espectro de RMN ^1H (Anexo 8.16), em CDCl_3 , apresentou um sinal intenso em δ_{H} 2,340ppm referente a hidrogênios de CH_2 vizinhos a uma carbonila. A presença de um forte sinal de absorção em δ_{H} 1,25ppm indica hidrogênios metilênicos pertencentes a uma cadeia longa e linear. O sinal em δ_{H} 0,88ppm se refere a hidrogênios metílicos terminais. Analisando o espectro de RMN ^{13}C (Anexo 8.17), em CDCl_3 , observa-se uma série de sinais na região de δ_{C} 29ppm referentes aos carbonos CH_2 , confirmando a existência uma cadeia longa linear. Em δ_{C} 179ppm observa-se sinal de absorção de carbono carbonílico de ácido. Em δ_{C} 14,36ppm observa-se um sinal de CH_3 .

Os resultados acima nos permitem afirmar que o composto em questão se trata de uma mistura de ácidos e ésteres graxos de cadeia linear.

4.2.5 β -sitosterol glicosilado (5)



O composto β -sitosterol glicosilado (**5**) foi obtido na fração 19-20, eluída com um sistema de solvente composto por 90% da mistura n-hexano:acetato de etila 2:8 e 10% de etanol.

Após purificação, através de recristalização em clorofórmio:metanol 1:1, deixou-se a fração em repouso para que houvesse a precipitação do composto. Então, o sobrenadante foi retirado, obtendo-se 23mg de um sólido branco com ponto de fusão acima de 250°C (Lit. 289 -290 °C; QUIN e WANG, 2003).

O espectro na região do IV (Anexo 8.18), obtido em pastilha de KBr, apresentou intensa absorção em ν 3414 cm^{-1} , correspondendo ao sinal de absorção referente ao estiramento da ligação O-H. Observou-se também absorção na região ν 2935 cm^{-1} correspondendo a estiramentos C-H alifático.

No espectro de RMN ^{13}C em DMSO (Anexo 8.19) foi observada presença da ligação dupla trissubstituída, definida pelos sinais δ_{C} 121,9ppm (CH-6) e δ_{C} 141,1ppm (C-5). Além destes, foram observados uma série de sinais característicos de carbonos carbinólicos de açúcares.

Os valores apresentados na tabela 6, que compara os dados de RMN ^{13}C do composto **5** com informações do β -sitosterol β -D-glicopironosídeo (Kadowaki, et al. 2003), indicam que o composto em questão possui estrutura muito semelhante ao da literatura. Porém, para que esta conclusão seja comprovada seriam necessárias análises que caracterizassem a estereoquímica do açúcar.

Tabela 6: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do composto **5** com os valores da literatura (Kadowaki et al., 2003).

Posição	Composto (7)*	Literatura**
1	37,5	37,5
2	30,0	30,2
3	77,5	78,5
4	39,0	39,3
5	141,1	140,9
6	121,9	121,9
7	32,0	32,0
8	32,0	32,2
9	50,3	50,3
10	36,9	36,9
11	21,3	21,3
12	***	39,9
13	42,5	42,5
14	56,9	56,8
15	24,5	24,5
16	28,5	28,5
17	56,1	56,2
18	12,5	12,2
19	19,8	19,4
20	36,2	36,4
21	19,3	19,0
22	34,0	34,2
23	26,0	26,4
24	45,8	46,0
25	29,4	29,4
26	19,6	19,2
27	20,4	20,0
28	23,3	23,4
29	12,4	12,0
1'G	101,5	102,6
2'G	74,1	75,4
3'G	77,6	78,6
4'G	70,7	71,7
5'G	77,4	78,1
6'G	61,7	62,8

* Resultados obtidos em DMSO

** Resultados obtidos em piridina – d₅

*** δ_{C} sobreposto ao sinal do solvente

4.2.7 Composto (6)

O composto **6** foi isolado sob a forma de um óleo de coloração castanho claro. Comparando o perfil cromatográfico deste composto com o dos diterpenos **2** e **3** observou-se semelhança de cor e forma da mancha, bem como um valor de índice de retenção intermediário aos dois diterpenos (R.f. **2**= 0,7; R.f. **3**= 0,3 e R.f. **6**= 0,5; n-hexano:acetato de etila 70:30).

Analisando o espectro de RMN ^1H (Anexo 8.20), obtido em CDCl_3 , do composto **6** observa-se a presença de três sinais característicos do anel furano: um em δ_{H} 7,47ppm relativo ao H-16, outro em δ_{H} 7,43ppm referente ao H-15 e o último em δ_{H} 6,45ppm atribuído ao H-14. A presença do duplo duplete em δ_{H} 5,51ppm indica a existência de um hidrogênio carbinólico vizinho ao anel furano (H-12). Além destes sinais, observou-se um singlete em δ_{H} 3,69ppm relativo aos hidrogênios de uma metoxila. O espectro também revela a presença de um sinal em δ_{H} 3,02ppm, que pode ser atribuído a presença de um hidrogênio metínico (H-4) em C-4 especialmente desprotegido. Além destes sinais, foi observada uma série de sinais na região abaixo de δ_{H} 3,00ppm com um padrão de absorção semelhante ao do diterpeno **2** e **3**, atribuídos a hidrogênios de grupos alifáticos.

Através do espectro de RMN ^{13}C (Anexo 8.21) foram contabilizados 21 sinais de carbono, localizados entre δ_{C} 15,296ppm e 205,725ppm. Com auxílio do DEPT (Anexo 8.22) observaram-se 3 sinais de carbonos metílicos, 5 metilênicos e 7 metínicos, indicando a existência de 6 carbonos quaternários na estrutura do composto. Dentre os carbonos metílicos, observa-se um sinal em δ_{C} 52,4ppm atribuído ao átomo de carbono da unidade éster metílico. A presença desta metoxila na estrutura foi confirmada através do espectro bidimensional HMQC, que mostra a correlação entre o sinal δ_{C} 52,4ppm e o sinal δ_{H} 3,6ppm (Figura 9). Observa-se também correlação entre o sinal δ_{C} 72,1ppm e o sinal δ_{H} 5,5ppm, confirmando a presença de um carbono metínico ligado ao C-13 do anel furano e a um CH_2 do restante da estrutura. Considerando as semelhanças dos deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C do composto **6** com diterpenos já identificados neste trabalho e comparando com os dados descritos por Palmeira e colaboradores (2006) (Tabela 7), concluiu-se que o composto **6** possui estrutura semelhante ao diterpeno sonderianino (Figura 10), com um maior grau de oxidação em C-3.

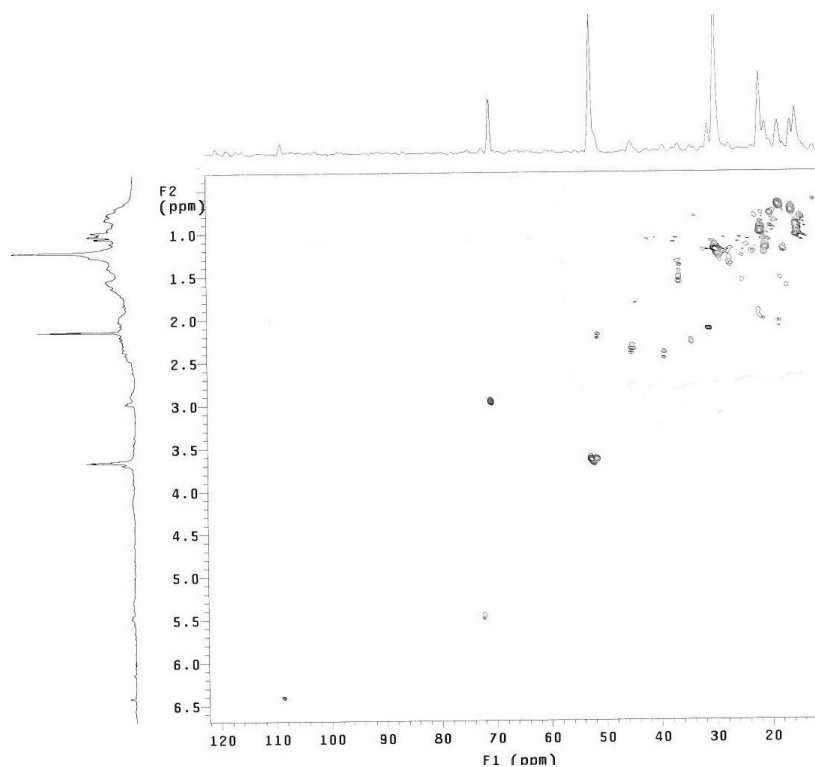


Figura 9: Expansão do espectro bidimensional HMQC do composto **6**, em CDCl_3

Tabela 7: Comparação entre os deslocamentos químicos $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) dos diterpenos **2**, **3**, sonderiano e composto **6**, em CDCl_3 .

Posição	12-epi-metil-barbascoato (2)	4-oxo-12-epi-metil-barbascoato (3)	Sonderianino *	Composto 6
1	17,62	22,4	19,7	22,1
2	27,02	40,6	26,8	44,3
3	137,39	204,7	135,3	205,7
4	141,40	69,6	142,3	70,8
5	36,97	37,3	37,6	36,9
6	35,05	37,7	Ns	36,5
7	18,59	18,4	26,5	18,4
8	51,49	51,6	40,4	45,1
9	37,26	41,2	51,6	41,2
10	51,54	54,2	52,4	51,4
11	44,26	44,6	44,7	39,2
12	72,10	71,9	71,6	72,1
13	126,16	125,8	125,6	125,8
14	108,74	108,6	108,0	108,7
15	144,01	144,1	143,8	144,0
16	139,57	139,6	139,3	139,7
17	172,69	171,9	16,8	21,8
18	167,51	168,3	164,5	169,4
19	21,18	15,4	19,7	15,29
20	14,78	15,1	173,0	171,6
OMe	52,74	51,9	51,2	52,4

* Palmeira et. al., 2006.

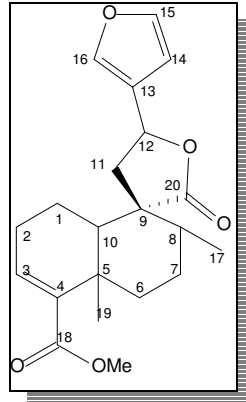


Figura 10: Estrutura do diterpeno sonderianino

Com auxílio do espectro bidimensional HMBC (Figura 11), foi possível confirmar a existência de um carbono carbonílico na posição C-3 (δ_C 205,7ppm), através da correlação a longa distância com o hidrogênio ligado ao carbono C-4 e do C-18 com os hidrogênios ligados aos carbonos C-4 e C-21.

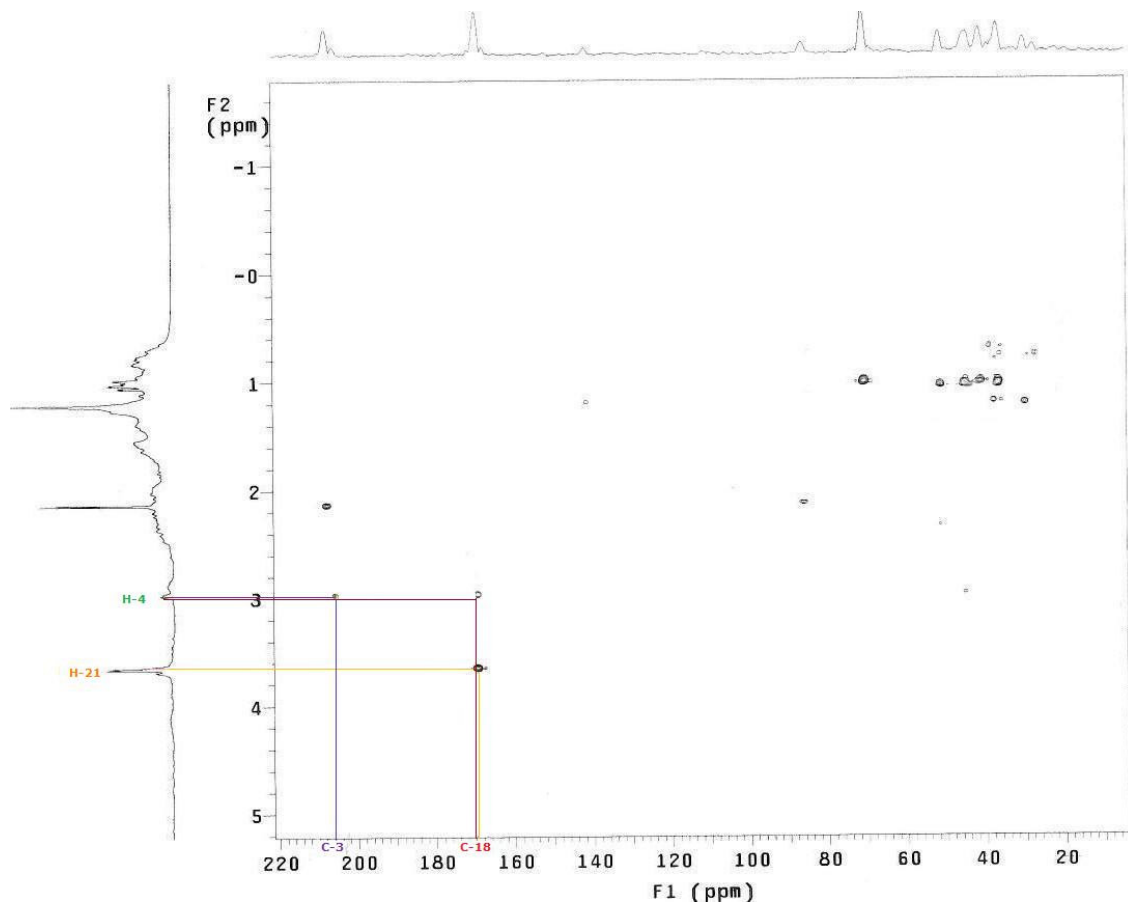


Figura 11: Expansão do espectro bidimensional HMBC do composto **6**, em $CDCl_3$

Desta forma, tem-se como proposta estrutural para o composto **6** um diterpeno derivado do sonderianino, oxidado na posição C-3 (Figura 12).

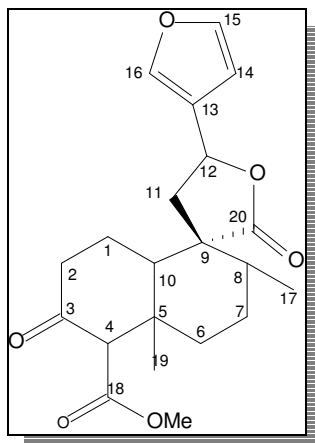


Figura 12: Proposta estrutural para o composto 6

4.3 Hidrólise das frações mais polares de Cr1E

Levando em conta estudos que relatam o isolamento de catequinas e outros compostos hidrolisáveis a partir dos extratos obtidos de *C. urucurana* (RAO et al., 2007), submeteu-se as frações mais polares obtidas com o extrato etanólico, a uma reação de hidrólise em meio ácido para verificar a presença de taninos hidrolisáveis e outros constituintes sensíveis a hidrólise ácida.

A análise por cromatografia de camada delgada dos resultados obtidos desta hidrólise mostrou que não ocorreu nenhuma hidrólise nas frações mais polares do extrato etanólico de *C. urucurana*, mostrando assim a ausência de compostos hidrolisáveis.

4.4 Análise fitoquímica preliminar

4.4.1 Determinação de proantocianidinas totais pelo método colorimétrico

Taninos condensados, ou proantocianidinas, compreendem um grupo de oligômeros e polímeros, unidos por ligações carbono-carbono entre sub-unidades flavonólicas (Figura 13). A reatividade das proantocianidinas com moléculas de

significância biológica tem importantes conseqüências nutricionais e fisiológicas. Seus múltiplos grupos fenólicos permitem a formação de complexos com proteínas, com íons metálicos e com outras macromoléculas, como polissacarídeos (SHOFIELD et al., 2001).

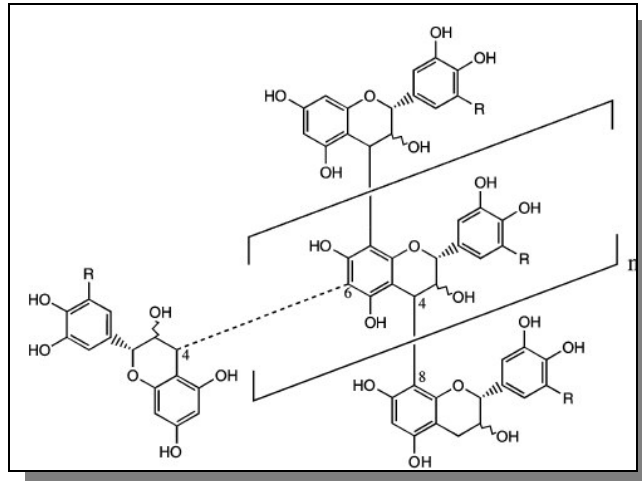


Figura 13: Modelo de estrutura de taninos condensados (Schofield et al., 2001)

O procedimento utilizado para determinação quantitativa de proantocianidinas baseou-se na depolimerização oxidativa das mesmas através do aquecimento em ácido mineral com posterior formação de antocianinas de cor vermelha, que absorvem em 550nm (WATERMAN e MOLE, 1994). A intensidade da cor é proporcional a concentração de antocianinas, obedecendo a lei de *Lambert-Beer* ($A = \epsilon bC$). Em meio ácido, alcoólico e a quente, as proantocianidinas caracterizam-se pela liberação de antocianidinas, devido à ruptura das ligações estabelecidas entre as unidades monoméricas (Figura 14). As antocianidinas liberadas para o meio poderão ser a pelargonidina, a cianidina ou a delphinidina, consoante se trate da propelargonidina, procianidina ou da prodelfinidina, respectivamente.

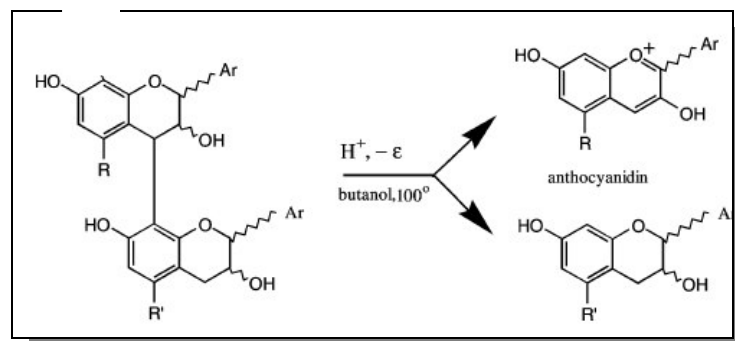


Figura 14: Esquema da reação de polimerização oxidativa (Schofield et al., 2001)

Para calcular o teor de proantocianidinas foi utilizada a curva de calibração construída com a solução padrão (Figura 25, página 45). Sabendo que o coeficiente angular da reta (B, em $y = A + Bx$) equivale ao produto ϵb (absortividade molar e espessura da cubeta (1 cm)) e tomando os valores de absorbância encontrados para cada extrato, determinou-se o teor proantocianidinas (%).

Tabela 8: Resultados da determinação de proantocianidinas

Extrato	Massa extrato (mg)	Absorbância*	Proantocianidinas	
			Massa (mg)	Teor (%)
AcOEt	11,0	0,513	0,469	4,3
EtOH	13,0	0,185	0,169	1,3

Não são descritas na literatura análises quantitativas do teor de proantocianidinas em *C. urucurana*, entretanto Esmeraldino et al. (2004) diz que frações ricas em proantocianidinas desta planta, funcionam como potentes inibidores de enzimas metaloproteínases existentes no veneno de *Bothrops jararaca*, sendo então, um promissor antídoto para o veneno desta cobra.

De forma a estabelecer um paralelo quantitativo, os resultados de *C. urucurana* foram comparados com os da espécie *Croton celtidifolius* (HORST, 2006), amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa e comprovadamente rica em proantocianidinas, de onde se observou que *C. urucurana* possui baixos teores desta classe de compostos.

4.4.2 Determinação de fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu

Substâncias fenólicas são amplamente distribuídas nas plantas superiores e possuem relação com diversos efeitos biológicos, como potencial antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatório e vasodilatador. O efeito antioxidante das plantas também tem sido bastante estudado em relação à prevenção de doenças coronárias, câncer e doenças degenerativas do sistema nervoso (PAREJO et al., 2002).

A determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou et al., 2006). Nesta reação, ocorre a formação

de um cromóforo na forma um complexo azulado fosfotungstico-fosfomolibdico de estrutura indefinida. Um dos pontos fracos deste método é a formação de precipitados que interferem nas medidas espectrofotométricas (SCHOFIELD et al., 2001). O resultado deste procedimento é dado em função do ácido gálico (Figura 15), utilizado como padrão para a construção da curva de calibração.

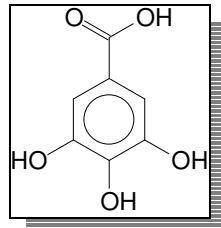


Figura 15: Estrutura ácido gálico

Analisando os resultados apresentados na tabela 9 (página 28), observa-se que o extrato etanólico foi o que apresentou maior conteúdo de fenólicos (99,6 mg de ácido gálico/grama de extrato seco).

4.4.4 Determinação do teor de flavonóides – Método $AlCl_3$

Produtos naturais com atividade antioxidante são usados pelo corpo humano para reduzir danos diversos oxidativos. Muitas frutas, vegetais, ervas, cereais, brotos, sementes e cogumelos vêm sendo estudadas devidos as suas atividades antioxidante. A presença de compostos fenólicos em extratos vegetais está bastante relacionada com sua atividade antioxidante (Soares, 2009).

A estrutura básica dos flavonóides (Figura 16) está fundamentada em um núcleo formado de dois anéis fenílicos, A e C, ligados por uma cadeia de três átomos de carbono. Esta cadeia, por sua vez, fecha-se como um terceiro anel, C, heterocíclico do tipo pirano com um átomo de oxigênio (Zuanazzi e Montanha, 2003).

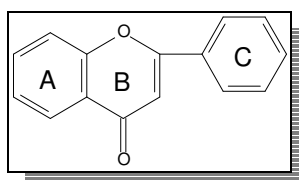


Figura 16: Estrutura básica dos flavonóides

O método cloreto de alumínio (AlCl_3) é usado para determinar o conteúdo de flavonóides, baseando-se na formação de um complexo entre a carbonila C-4 e a hidroxila fenólica em C-5 ou grupos catecóis com o íon Al^{3+} (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). A formação deste complexo proporciona um deslocamento batocrômico das bandas de absorvância do espectro UV-vis (WOISKY, 1998).

Apesar do método colorimétrico para determinação de flavonóides totais, através do AlCl_3 , ser rápido e prático, não é um método preciso, pois o efeito batocrômico da absorção não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque a formação de quelatos entre o Al^{3+} e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo do flavonóide (JURD e GEISSMAN, 1956).

Tabela 9: Teor de fenólicos totais, flavonóides e captura de DPPH

	Extratos		
	Cr2H	Cr2A	Cr2E
Fenólicos totais*	19,4	81,2	99,6
Flavonóides totais**	14,8	17,8	25,5
Captura de DPPH***	> 200,0	36,0	99,5

* O teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico/g de extrato seco

** O teor de flavonóides totais foi expresso em mg de quercetina/g de extrato seco

*** IC_{50} expresso em ppm ($\mu\text{g/mL}$)

Analisando os resultados apresentados na tabela 9, observou-se que o teor de flavonóides foi mais elevado para o extrato etanólico. Cabe ressaltar, todavia, que de acordo com Salatino et al. (2007) e Simionatto et al. (2007) na espécie *C. urucurana* são relatados apenas o isolamento dos flavonóides catequina e galocatequina (Figura 17) e, segundo Jurd e Geissman (1956), estes flavonóides possuem fraca tendência de formar complexos estáveis com o AlCl_3 ; sendo possível concluir que talvez o método escolhido não tenha sido o mais apropriado.

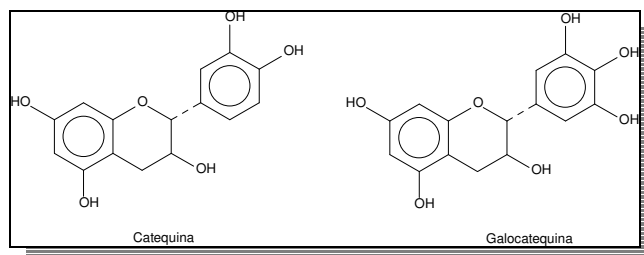


Figura 17: Estrutura da catequina e galocatequina

4.4.4 Determinação de flavonóides – Método eletroforese capilar

De acordo com Suntornsuk (2002) a técnica de eletroforese capilar (EC) pode ser aplicada para a análise de uma ampla faixa de compostos, inclusive de produtos naturais. Este método é vantajoso em termos de velocidade de análise, eficiência, baixo custo e simplicidade quando comparado as técnicas de cromatografia de camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, comumente utilizadas na análise de substâncias fitoquímicas.

Os extratos brutos Cr2H, Cr2A e Cr2E de *C. urucurana* foram submetidos à análise dos flavonóides via eletroforese capilar. Todas as amostras foram analisadas em comparação com um banco de padrões de flavonóides existentes no laboratório de Eletrofose Capilar e nenhum pico referente a compostos fenólicos foi observado.

4.4.5 Determinação da atividade antioxidante - Captura de radicais livres usando DPPH

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em uma concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o avanço oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução (Silva et al., 1999).

Segundo Anagnostopoulou et al. (2006), compostos fenólicos, particularmente flavonóides, possuem valiosa atividade antioxidante relacionada à captura de radicais livres, principalmente devido as suas características estruturais (número e posição de hidroxilas fenólicas, outros grupos substituintes e conjugações). Não

obstante, a atividade antioxidante de compostos fenólicos se dá devido sua capacidade de atuar como agente redutor, doando hidrogênios (Kaur et al., 2008).

A técnica de captura de radicais livres via DPPH utiliza este radical (Figura 18) para avaliar, de forma genérica, o potencial antioxidante de extratos vegetais. Este radical é bastante estável e tem seu centro radicalar sobre um átomo de nitrogênio (Kaur et al., 2008).

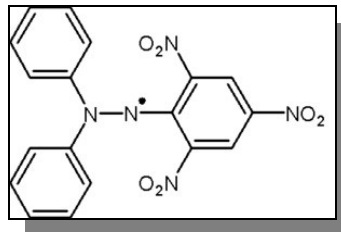


Figura 18: Estrutura do DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil)

De acordo com os resultados já expostos na tabela 9 (página 28), observa-se que o extrato acetato de etila foi o que demonstrou maior capacidade de seqüestro de radicais livres, com um valor de $IC_{50} = 36,0ppm$, seguido do extrato etanólico. Este resultado coincide em relação ao teor de fenólicos totais, indicando ser o extrato acetato de etila, a fração com maior potencial antioxidante. Segundo Peres et al. (1997), a partir do extrato AcOEt foram isolados os flavonóides catequina e galocatequina.

4.5 Avaliação das atividades biológicas

4.5.1 Avaliação da toxicidade através do bioensaio com *Artemia salina* Leach

Os ensaios de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* são amplamente usados como técnica de triagem para verificar a atividade biológica de extratos vegetais e seus compostos isolados (LUNA et al., 2005). As amostras são colocadas em incubação durante 24 horas com a larva do microcrustáceo, e após este período, conta-se o número de sobreviventes. Uma das vantagens deste ensaio é que, devido à grande sensibilidade deste crustáceo, várias atividades biológicas podem estar relacionadas a este, pois os compostos ativos podem ser

potencialmente tóxicos, em relação à dose (MEYER et al, 1982). São considerados ativos os extratos ou frações que apresentam valores da DL₅₀ de até 1000 µg/mL.

Avaliaram-se os extratos brutos pelo teste de toxicidade frente à *Artemia salina* baseado na metodologia de Meyer et. al. (1982). Dos extratos brutos submetidos ao bioensaio o extrato acetato de etila (Cr2) foi apresentou melhor resultado, com um valor de DL₅₀ de 383,6ppm seguido do extrato hexânico com um valor de DL₅₀ 685,9ppm. Entretanto, o extrato etanólico apresentou valor de DL₅₀>1000ppm, sendo inativo. A atividade demonstrada pelo extrato acetato de etila pode ser vista perspectiva, sugerindo que este extrato possua outras atividades farmacológicas.

4.5.2 Estudo da atividade antibacteriana através da concentração inibitória mínima (CIM)

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos. Neste contexto e decorrente do uso etnomédico, a utilização de fitoterápicos é amplamente praticada. Considerando que poucas plantas medicinais utilizadas pela população têm ação comprovada, o uso popular tem servido como guia para pesquisas químico-farmacológicas (MICHELIN, 2005).

Segundo Tavares (2000), as principais espécies bacterianas causadoras de infecção no homem são o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*. Estas apresentam resistência natural a diversos antimicrobianos, incluindo aztreonam, cotrimoxazol, clindamicina e cefalosporinas. Dessa forma, a busca por novos agentes bacterianos são de grande relevância. A tabela 10, cujos parâmetros foram propostos por Machado e colaboradores (2005), resume a classificação de atividade antibacteriana para extratos brutos vegetais e suas respectivas frações, não purificadas.

Tabela 10: Classificação de atividade antibacteriana para extratos brutos (MACHADO et al., 2005)

Valor de CIM (µg/mL)	Atividade
Menor que 10	Excelente
10 a 100	Boa
100 a 500	Moderada

500 a 1000	Fraca
Maior que 1000	Nula

Considerando a classificação acima e os resultados da tabela 11, o extrato bruto hexânico (Cr2H) foi considerado inativo contra todas as bactérias testadas, exceto para a bactéria *Enterococcus faecalis*. Para esta bactéria, a atividade apresentada pelo Cr2H pode ser considerada boa. O extrato acetato de etila (Cr2A) apresentou atividade moderada para esta mesma bactéria e atividade fraca para o microorganismo *Shigella flexineri*. De forma semelhante, o extrato mais polar (Cr2E) apresentou apenas atividade moderada para *Enterococcus faecalis*.

Tabela 11: Resultados de atividade antibacteriana

	CIM (µg/mL)	Cr2H	Cr2A	Cr2E	Gentamicina
Bactérias Gram-positivas	Methicilin resistant- <i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	>1000	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>	>1000	>1000	>1000	0,2
	<i>Enterococcus faecalis</i>	73	220	406	6,2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	>1000	1,0
Bactérias Gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	1,0
	<i>Shigella flexineri</i>	>1000	890	>1000	3,1
	<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000	6,0

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Para a realização dos estudos fitoquímicos com a espécie *Croton urucurana* foram utilizadas cascas secas e trituradas da planta, coletadas em momentos distintos. O primeiro lote de material vegetal foi coletado em fevereiro de 2005. A partir deste material obteve-se a primeira remessa de extrato bruto, identificada como Cr1.

A segunda remessa de extratos da planta foi obtida com material coletado em outubro de 2006, sendo identificado como Cr2.

Ambas as coletas foram realizadas no município de Dourados, MS. A planta foi identificada por comparação com exsicata depositada no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o código 5009.

5.2 Solventes

Os solventes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação. As misturas de solventes foram feitas considerando proporção volume por volume (v/v).

5.3 Instrumentação

5.3.1 Determinação do ponto de fusão

Para a obtenção do ponto de fusão de cada substância sólida isolada, utilizou-se o aparelho MQAPF-302 do laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC.

5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C utilizou-se o espectrômetro Varian 400, do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina que operou a 400 MHz para ^1H e a 100 Mhz para ^{13}C , em tubos de 5 mm. Para análise das amostras foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl_3) e DMSO como solventes.

Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm), em relação ao padrão interno TMS ($\delta= 0,00$).

5.3.3 Espectroscopia no Infravermelho

Para obtenção dos espectros de infravermelho, utilizou-se o espectrômetro Perkin-Elmer FT 16PC, do departamento de química da UFSC. As amostras foram analisadas em pastilha de KBr ou filme de NaCl, dependendo de suas características físicas. A aquisição dos espectros se deu na região entre 4000 e 400cm^{-1} .

5.3.4 Espectroscopia no UV-visível

Para obtenção dos espectros de absorção na região de ultravioleta e do visível, utilizou-se o espectrômetro Perkin Elmer Lambda 2S, do laboratório Química de Produtos Naturais da UFSC.

5.3.5 Difratomia de Raios-X

Para obtenção dos dados de raio-X utilizou-se o difratômetro CAD4 Enraf-Nonius com tubo de molibdênio e dotado com monocromador de grafite, pertencente a Central de Análises do departamento de química da UFSC.

5.3.6 Eletroforese capilar

Na análise em eletroforese capilar foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu CLASS LC, equipado com detector SPD 10AVP DAD (Diode Array Detector), coluna C18 Supelco 5 μ M (25cm x 4,6mm ϕ).

5.3.7 Cromatografia gasosa

Para as análises utilizou-se o cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-14B, com detector de ionização em chama (FID), coluna capilar de sílica fundida CBP20, do laboratório Química de Produtos Naturais da UFSC.

5.3.8 Demais métodos cromatográficos

Para os fracionamentos cromatográficos em coluna (CC), utilizou-se como fase fixa sílica-gel, na granulometria de 70 – 230 mesh (Merck). Já nos fracionamentos em coluna de forma isocrática (coluna Flash), utilizou-se sílica-gel de 230 – 400 mesh (Merck). A altura da camada de sílica-gel e o diâmetro interno das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser cromatografado. As amostras foram preparadas em pastilhas de sílica-gel, na proporção 1:2 de substrato:fase fixa.

Foram realizadas eluições com solventes n-hexano, acetato de etila e etanol na forma de gradiente de polaridade, conforme cada caso. Coletadas as frações, os solventes foram evaporados, em evaporador rotatório sob pressão reduzida (50°C). As frações obtidas foram reunidas conforme semelhança no perfil cromatográfico obtido com cromatografia de camada delgada (CCD).

Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatofolhas de alumínio, revestido com uma camada de sílica-gel (F_{254}) com 0,2 mm de espessura (Merck). As placas foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366nm) e imersão em anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. Os índices de retenção foram calculados através da razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo sistema eluente, a partir do ponto de aplicação da amostra.

5.4 Preparação dos extratos vegetais

A obtenção dos extratos brutos, de ambas remessas de material vegetal seguiu metodologia idêntica, havendo diferença apenas na quantidade de planta utilizada.

Metodologia: determinada quantia de material vegetal foi submetida à extração exaustiva por maceração, à temperatura ambiente, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (n-hexano, acetato de etila e etanol hidratado 80%), sendo que estes foram evaporados à pressão reduzida (50°C) em evaporador rotativo. Foram feitas três reposições de volume para cada solvente. Estas reposições ocorreram depois de completados o período de uma semana de maceração (Figuras 19 e 20).

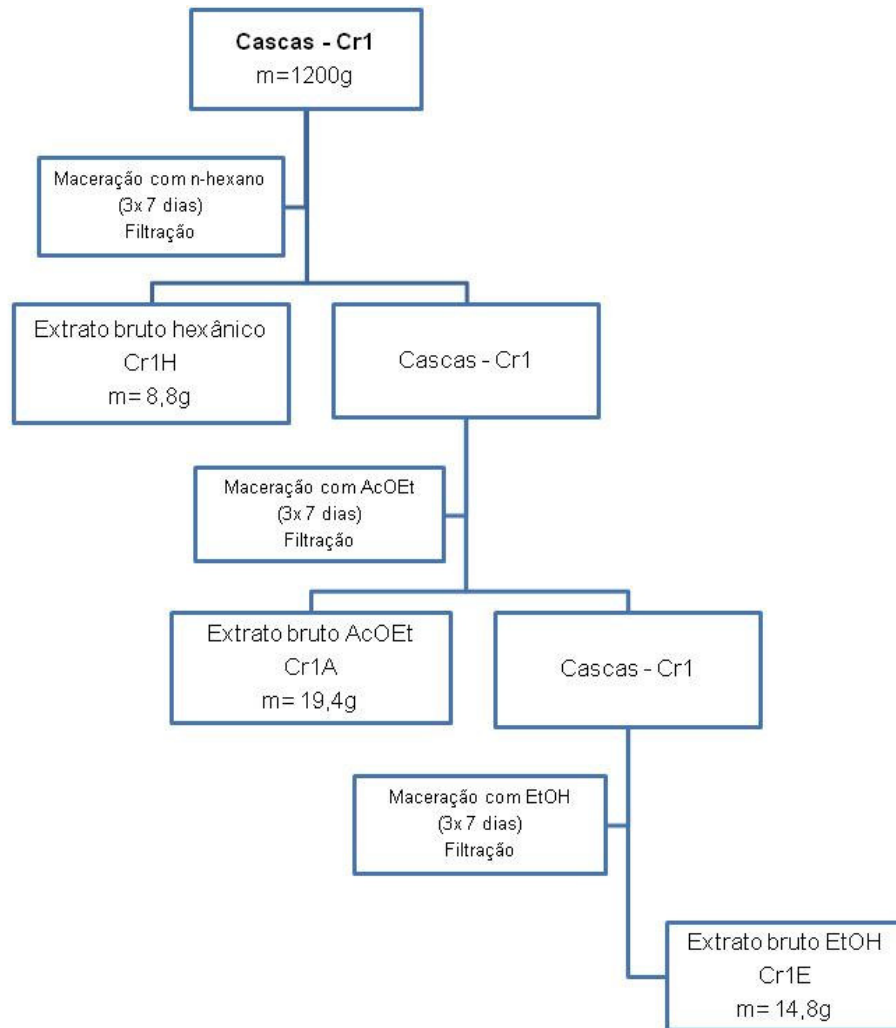


Figura 19: Fluxograma com esquema de preparação dos extratos – 1ª remessa

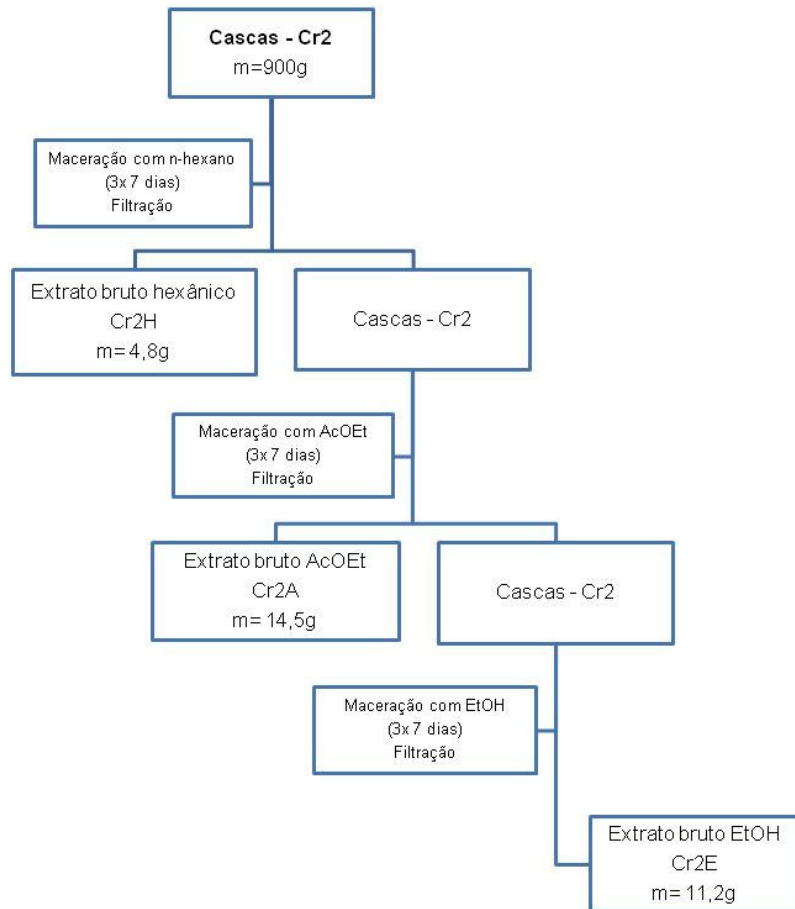


Figura 20: Fluxograma com esquema de preparação dos extratos – 2ª remessa

5.5 Procedimento para o fracionamento dos extratos

O fracionamento dos três extratos da primeira remessa de planta (Cr1H, Cr1A e Cr1E) ocorreu através de colunas cromatográficas (CC), com consumo total do material.

Apenas dois extratos da segunda remessa de planta (Cr2H e Cr2A) foram fracionados, sendo que apenas parte de suas massas foi usada neste procedimento. O restante do material foi utilizado para a realização de bioensaios.

5.5.1 Extrato acetato de etila – 1ª remessa (Cr1A)

O extrato bruto acetato de etila foi fracionado através de uma coluna cromatográfica, com dimensões de 4,5cm de diâmetro interno por 15,0cm de altura

da fase sólida, adsorvido em um volume sílica suficiente para formar uma pastilha de 2,5cm de altura. Como fase móvel, iniciou-se a coluna com 100% de n-hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente, através da adição de acetato de etila. Desta coluna foram coletadas 30 frações de 150mL cada, que depois de evaporadas, foram comparadas via CCD e então reunidas (Figura 21).

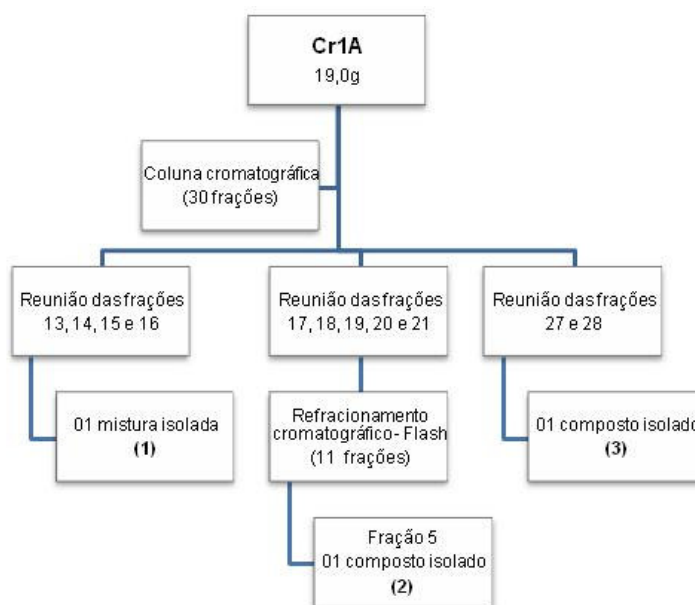


Figura 21: Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila – 1ª remessa

A partir da reunião das frações 13, 14, 15 e 16 e após remoção do sobrenadante, separaram-se 134mg de um material cristalino que foi analisado através de ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e cromatografia gasosa e identificado como sendo uma mistura de campesterol, stigmasterol e β -sitosterol, sendo que este último estava em maior quantidade na mistura.

As frações 17, 18, 19, 20 e 21 foram reunidas e recromatografadas, através de coluna tipo Flash. Para este refração utilizou-se, como eluente, uma mistura de n-hexano:acetato de etila, na proporção de 7:3. Foram recolhidas 11 frações, sendo que na quinta obteve-se o isolamento de um composto puro (2), sob a forma de óleo amarelado (132mg). Este foi identificado como sendo o diterpeno 12-epi-metilbarbascoato através das análises espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . A Confirmação estrutural foi por comparação com dados da literatura.

As frações 27 e 28 foram reunidas (100mg) com base na análise por CCD. A nova fração foi purificada através de sucessivas recristalizações em acetona, até a obtenção de cristais incolores do diterpeno 4-oxo-12-epi-metilbarbascoato (**3**) (30mg). A determinação estrutural com composto (**3**) se deu através das análises de ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN uni e bidimensionais (RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC e HMBC). Após a aplicação da técnica de recristalização a quente, utilizando diclorometano como solvente, obteve-se um monocristal que foi analisado via difratometria de raios-X, confirmando a estrutura proposta.

5.5.2 Extrato acetato de etila – 2^a remessa (Cr2A)

Parte do extrato Cr2A (7,0g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna (4,5cm ϕ interno) empacotada com uma camada de fase estacionária (sílica gel). Ao topo desta coluna a amostra foi aplicada sob a forma de uma pastilha de sílica de 1,0cm de altura. O sistema foi eluído com n-hexano:acetato de etila, gerando 20 frações (Figura 22)

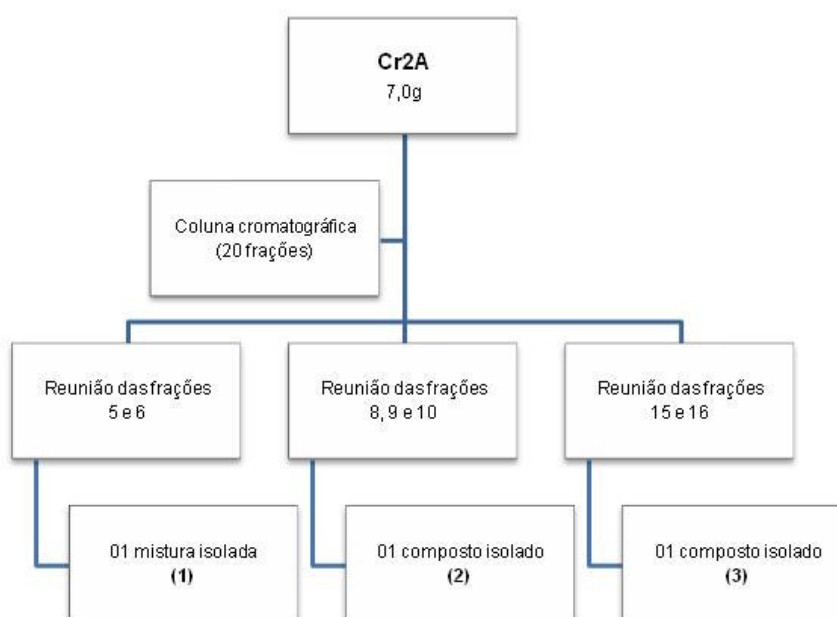


Figura 22: Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila – 2^a remessa

A partir das frações eluídas com 75% de n-hexano e 25% de acetato de etila (frações 5 e 6), separou-se a mistura de esteróis **(1)** (53 mg) que foi caracterizada através de CCD comparativa com a mistura isolada anteriormente e por ponto de fusão.

Com a reunião das frações 8 e 9 obteve-se um óleo amarelado (80mg) que foi caracterizado por comparação via CCD, infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C . como sendo o diterpeno **(2)**. Após recristalizações com acetona, obteve-se a formação de um sólido cristalino, que teve seu ponto de fusão determinado. Uma pequena parte deste sólido foi dissolvida, a quente, em um volume mínimo de diclorometano. Após dissolução, o sistema foi mantido em repouso até ocorrer a formação de um monocristal, que foi analisado via difratometria de raios-X, confirmando a estrutura proposta.

A partir das frações 15 e 16 obteve-se um produto oleoso, de cor marrom (22mg), com perfil cromatográfico idêntico ao diterpeno **(3)**. Para garantir que se tratava do mesmo composto, o mesmo foi submetido a RMN ^1H .

5.5.3 Extrato hexânico – 1ª remessa (Cr1H)

O extrato seco (6,8g) foi fracionado através de coluna cromatográfica, com diâmetro interno de 2,5cm e altura da camada de sílica igual a 17,0cm. O sistema foi eluído utilizando n-hexano como eluente inicial, com aumento gradativo da polaridade, através do acréscimo de acetato de etila, que foi o solvente de finalização da coluna.

Deste fracionamento foram obtidas 19 frações, de 125 mL cada. Estas foram comparadas através de CCD. As frações que possuíam valores de R.f. idênticos e aspectos visuais semelhantes foram reunidas para posterior refracionamento ou purificação (Figura 23).

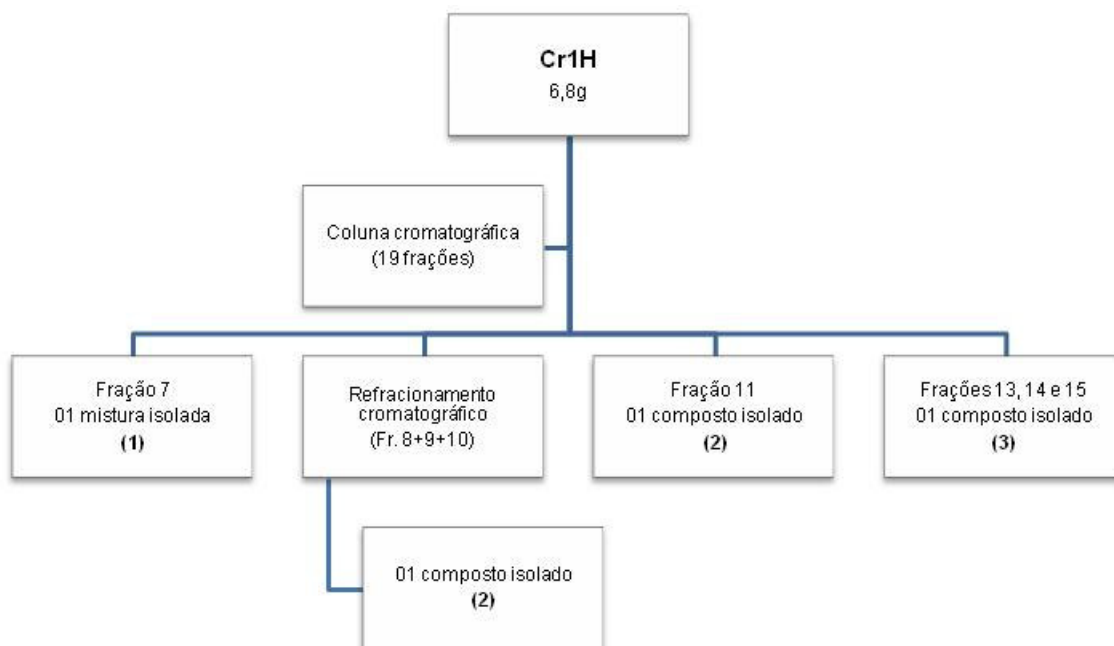


Figura 23: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico – 1ª remessa

A fração 7 foi solubilizada em n-hexano e mantida em repouso. Com a remoção do sobrenadante, separaram-se 75mg de um sólido branco **(1)**, que foi caracterizado por CCD, ponto de fusão e cromatografia gasosa.

As frações de 8 a 10 (150mg) foram reunidas e recromatografadas através de coluna cromatográfica (ϕ interno= 2,0cm), eluída com n-Hex:AcOEt, com aumento gradual na polaridade do solvente. Na terceira fração recolhida, foram isoladas 50mg do composto **(2)** sob a forma de um óleo amarelado, identificado através de CCD comparativa.

As frações 13 a 15 foram reunidas e dissolvidas em acetona. Após a retirada do sobrenadante observou-se a decantação de um óleo denso e amarelado **(3)** (18mg), que foi comparado via CCD e analisado via infravermelho.

5.5.4 Extrato hexânico – 2ª remessa (Cr2H)

Parte da massa total do extrato bruto Cr2H (1,5g) foi fracionada via coluna cromatográfica (diâmetro interno de 2,0cm). Como fase móvel do sistema utilizou-se mistura de n-hexano:acetato de etila, partindo de n-hexano puro, com aumento gradual de polaridade. Desde processo foram obtidas, 15 frações de 50 mL.

Da fração 3, após purificação com acetona, foram obtidas 25mg de um sólido cristalino **(1)**, identificado através de comparação via CCD e ponto de fusão. As frações 5, 6, 7, e 8 foram reunidas e tratadas com diclorometano. Este processo resultou na purificação de um óleo amarelado (13mg), que foi identificado via CCD como sendo o composto **(2)**.

5.5.5 Extrato etanólico – 1ª remessa (Cr1E)

Para fracionar o extrato etanólico de *Croton urucurana* preparou-se uma pastilha de sílica gel utilizando 14,5g de amostra, que foi depositada sobre uma coluna cromatográfica com 4,5cm de diâmetro interno. Utilizou-se como eluente uma mistura de n-hexano:acetato de etila:etanol, com aumento gradual de polaridade, resultando na coleta de 28 frações de 125mL cada (Figura 24).

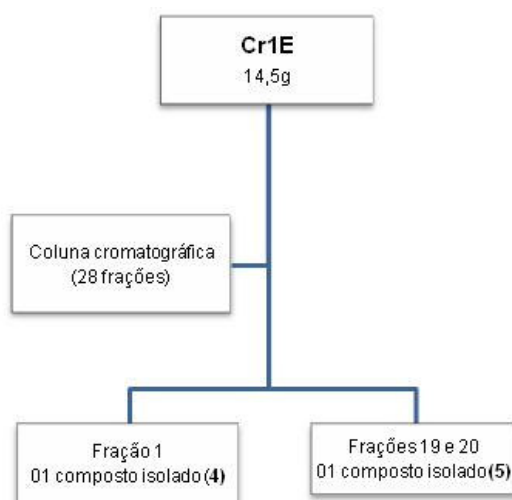


Figura 24: Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico – 1ª remessa

Após analisar os perfis cromatográficos em CCD de cada fração obtidas no fracionamento, reuniram-se as que se assemelhavam. Purificando a fração 1, com acetona, foram obtidos 22mg de um sólido branco amorfo **(4)**, que foi caracterizado por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

As frações 19 e 20 foram solubilizadas com a mistura acetona:metanol 4:1 e deixadas em repouso. Com a remoção do sobrenadante foi isolado 23mg do

composto β -sitosterol glicosilado como um sólido branco (**5**), caracterizado por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e análises de RMN de ^1H e ^{13}C e identificado por comparação com a literatura.

As frações 23 a 28 não apresentaram boa resolução em CCD e as tentativas de purificação foram sem sucesso. Desta forma, reuniram-se as frações para reação de hidrólise ácida.

5.5.5.1 Hidrólise de frações polares

Para realizar a reação de hidrólise das frações mais polares do Cr1E, cerca de 100mg de amostra foram dissolvidas em 4,5mL de MeOH. Após a dissolução, adicionou-se 0,1mL de solução aquosa de HCl 50% (v/v) e manteve-se o sistema sob agitação, a temperatura ambiente, por cerca de 15 horas. O progresso da reação foi monitorado por CCD, utilizando acetato de etila como eluente (R.f.= 0,00 e 0,28 para o sistema de partida e para o meio reacional, respectivamente).

O tratamento da reação ocorreu, primeiramente, com a evaporação do solvente à pressão reduzida (50°C), em evaporador rotativo, com posterior lavagem com acetona. A fração solúvel foi separada do restante da reação, que foi dissolvido em MeOH.

A parte solúvel em acetona e a parte solúvel em metanol foram analisadas através de CCD, usando acetato de etila como eluente, apresentando valores de R.f. de 0,83 e 0,16, respectivamente. A fração menos polar foi submetida a cromatografia em coluna CC, usando acetato de etila como eluente, resultando em um sólido. O produto da reação foi submetido às análises de IV e RMN ^1H e ^{13}C

IV (v Max KBr, cm^{-1}): 2955, 2929, 2857, 1728, 1280.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 0,9 (m); 1,3 (m); 1,7 (m); 2,2 (s); 2,4 (t); 3,7 (m); 4,2 (m), 5,3 (s); 7,5 (dd); 7,7 (dd).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, ppm):11,188; 14,290; 23,216; 23,963; 29,147; 29,932; 30,580; 38,942; 68,388; 129,034; 131,122; 132,662; 168,016

5.5.6 Frações potencialmente ricas em diterpenos

Após análise dos perfis cromatográficos de todas as frações eluídas próximas das frações em que foram isolados diterpenos, reuniu-se aquelas que apresentavam possibilidade de conterem diterpenos para uma nova cromatografia.

Desta forma, reuniram-se as frações 22 a 26 do fracionamento de Cr1A com as frações 10 a 14 de Cr2A. Neste grupo acrescentou-se a fração 12 de Cr1H, as frações 10 a 15 de Cr2H e a fração 2 de Cr1E. Este material (250mg) foi cromatografado em uma coluna de diâmetro interno de 2,0cm, recheada com uma altura de 15,0cm de sílica-gel. O sistema foi eluído com mistura de n-hexano:acetato de etila:etanol, com aumento gradual da polaridade. Desta cromatografia, foram coletadas 14 frações.

A partir da fração 5, foram isoladas 22mg de um óleo amarelado denominado de composto **(6)**. O mesmo foi submetido à análise por espectroscopia de ressonância nuclear de ^1H e ^{13}C , e as correlações bidimensionais HMQC e HMBC.

5.6 Análise fitoquímica preliminar

5.6.1 Determinação de proantocianidinas totais pelo método colorimétrico

Os extratos Cr2A e Cr2E foram submetidos à determinação do teor de proantocianidinas pelo procedimento de depolimerização oxidativa. O mesmo baseou-se na transferência de 10mg de extrato para um tubo de ensaio onde foram acrescentados 2mL de solução n-BuOH:HCl 80:20 v/v. O tubo foi fechado e mantido em banho-maria, a $100\pm 2^\circ\text{C}$, durante 2 horas. Após o término da reação, uma alíquota de 0,5mL da solução de cada tubo foi diluída em 8,5mL de n-BuOH. A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro de UV-visível, em λ 550 nm.

A curva de calibração (Figura 25) foi obtida a partir de uma solução padrão, preparada por meio da dissolução de 10,5mg de amostra padrão de proantocianidinas em 5mL de n-BuOH. Alíquotas crescentes da solução padrão foram diluídas em um volume de 2,0mL da solução n-BuOH:HCl 90:10 e submetidas a reação de butanólise, descrita no parágrafo anterior. Finalizada a reação, as

soluções tiveram seus volumes equiparados com n-BuOH e as absorbâncias foram determinadas em λ 550nm, utilizando n-BuOH puro como branco.

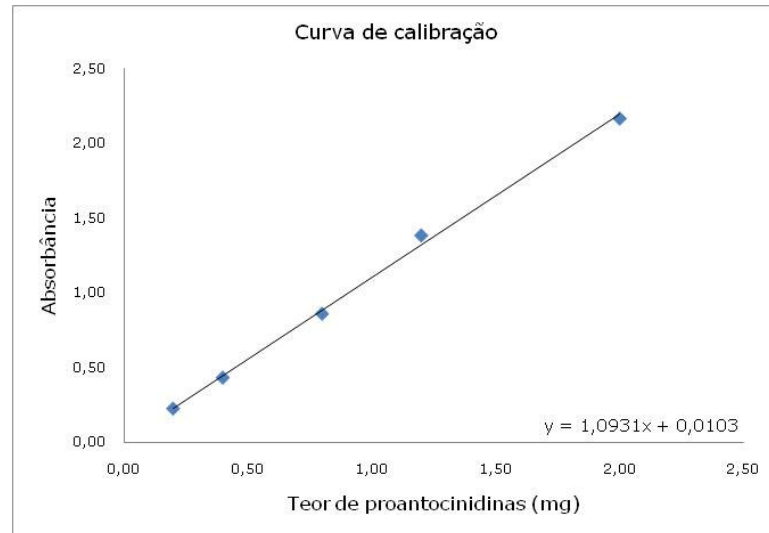


Figura 25: Curva de calibração para proantocianidinas

4.6.2 Determinação de fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006).

A 0,5 mL de cada solução de extrato bruto (concentração 1000ppm, em etanol) foram adicionados 5,0mL de água destilada e 0,25mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 1,0mL da solução saturada de Na_2CO_3 . O sistema foi agitado e deixado em repouso por 1 hora. As absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução de extrato.

Foi construída uma curva de calibração (Figura 26) com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500ppm, diluído em etanol, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de extrato seco.

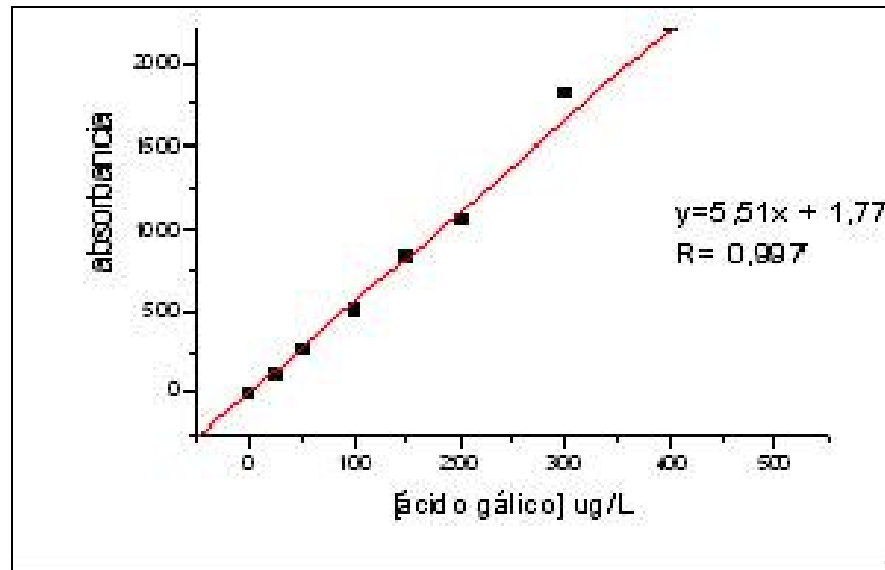


Figura 26: Curva de calibração (padrão) para o teor de fenólicos totais

5.6.3 Determinação do teor de flavonóides – Método $AlCl_3$

A determinação do teor de flavonóides totais se deu conforme método descrito por Woisky e Salatino (1998).

Sobre 0,5 mL de uma solução de amostra (extratos brutos, na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), adicionaram-se 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de $AlCl_3$ 2%. A mistura foi deixada em repouso, a temperatura ambiente, e, após 1 hora, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-VIS a 415nm. Como branco foi utilizado etanol.

Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100 ppm, diluída em etanol, para comparação (Figura 27). Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo que o teor de flavonóides foi determinado em mg de quercetina/g de extrato seco.

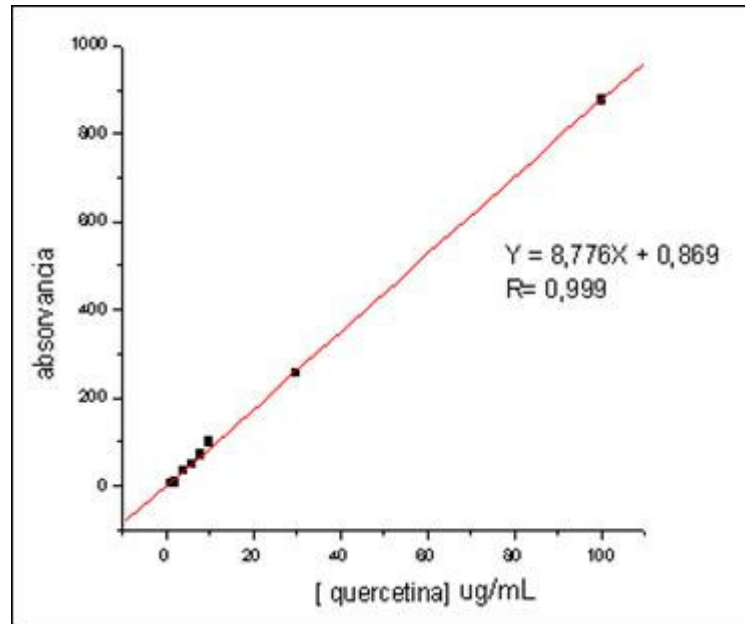


Figura 27: Curva de calibração (padrão) para determinação de flavonóides via complexação $AlCl_3$

5.6.4 Determinação de flavonóides– Método eletroforese capilar

A análise de eletroforese capilar foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar do Departamento de Química da UFSC, pela mestrandia Melina Heller. O ensaio foi realizado com os extratos Cr2H, Cr2A e Cr2E de *C. urucurana*. Para realizar esta análise as amostras foram diluídas em água destilada até atingir a concentração de 1000ppm.

Para realizar o ensaio, as amostras e os padrões foram injetados, hidrodinamicamente, a 50mbar por 9,0 s, sendo a temperatura mantida em 25°C. A voltagem aplicada foi de 30kV de polaridade positiva. Utilizou-se um capilar de poliacrilato (48,5 cm de comprimento efetivo x 50 µm φ interno). O eletrólito era composto de uma solução de 20mmol/L de tetraborato de sódio (TBS) em água e metanol (10%).

A análise qualitativa foi realizada através da comparação dos tempos de migração de um banco de padrões de flavonóides com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra.

4.6.5 Determinação da atividade antioxidante - Captura de radicais livres usando DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseou-se no método descrito por Cavin e colaboradores (1998), com algumas modificações.

Como princípio do método, um determinado volume de uma solução recém preparada de DPPH 0,004% foi adicionada sobre as amostras, diluídas em MeOH, à diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL). Após 30 minutos do preparo da solução, mediu-se a absorbância da solução de DPPH (2mL), acrescido de 1 mL de MeOH, obtendo-se assim a absorbância no tempo inicial, através de um espectrofotômetro UV-vis (517nm).

Em seguida, adicionou-se 2mL de solução de DPPH a 1 mL da solução contendo amostra vegetal. O sistema foi agitado e após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância, a 517 nm. Esta leitura foi comparada com um branco, que consistiu na solução de DPPH na ausência do extrato vegetal.

O gráfico do percentual de decréscimo na absorbância do DPPH em função da concentração do extrato vegetal fornece o valor referente na concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante (IC₅₀). Na figura 28 está representado a atividade antioxidante do extrato acetato de etila.

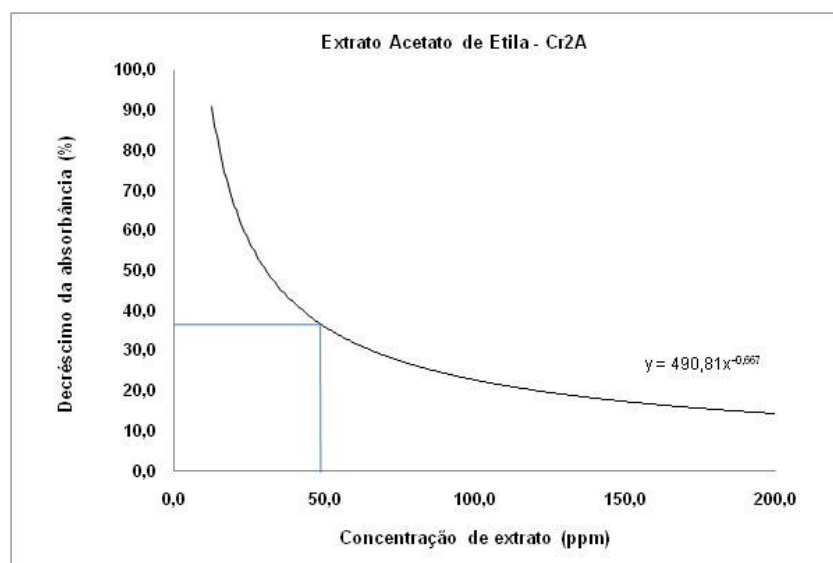


Figura 28: Exemplo da curva para atividade antioxidante do extrato acetato de etila

5.7 Avaliação das propriedades biológicas

5.7.1 Avaliação da toxicidade através do bioensaio com *Artemia salina* Leach

Para os bioensaios de letalidade frente *A. salina*, utilizou-se a metodologia de Meyer et al. (1982), com pequenas modificações. Os extratos brutos de *C. urucurana*, obtidos na segunda remessa de material vegetal, foram diluídos em água destilada, a fim de obterem-se concentrações necessárias para o ensaio.

O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi água salgada (3,8 g de sal marinho/L de água destilada). As larvas foram utilizadas nos ensaios 24 h após a eclosão. Para realizar o teste foram transferidas entre 6 e 10 larvas de *Artemia salina* para cada cavidade de uma placa de 24 poços, contendo solução marinha com 1% de Tween 80 (v/v) e os respectivos extratos em diferentes concentrações (250 a 100m µg/mL). Passadas 24 horas de contato, contou-se o número de larvas mortas. Obteve-se a DL₅₀ através do gráfico do percentual de animais mortos em função do logaritmo da dose testada.

Neste ensaio, utilizou-se como controle negativo o solvente onde os extratos foram diluídos (H₂O) e como controle positivo utilizou-se K₂Cr₂O₇ cuja DL₅₀ é aproximadamente de 20 – 40 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata.

5.7.2 Estudo da atividade antibacteriana através da concentração inibitória mínima (CIM)

Os experimentos para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos foram realizados no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau, sob a supervisão do professor MSc. Eduardo M. Dalmarco. Os extratos brutos *C. urucurana* foram testados frente a microorganismos padrões, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, foram preparadas diluições seriadas em caldo BHI (meio de cultura), com concentrações variando de 50 a 0,19 mg/mL, as quais foram distribuídas em volumes de 100 µL em placa de microdiluição estéreis contendo 96 poços.

Em cada orifício teste e de controle de crescimento, foi adicionado 10 µL de inóculo bacteriano (0.5 da escala de McFarland). Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em seguida, adicionou-se 10 µL da solução de cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazolio em metanol (5% v/v) a cada microcavidade da placa utilizada no experimento. Logo após, se realizou uma incubação (30 min.) à 37°C , onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho se existir presença de bactérias viáveis.

Como controle da inibição bacteriana, utilizou-se o antibiótico gentamicina, que possui boa atividade contra todas as cepas testadas, exceto para o *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA). Como controle de crescimento e esterilidade foram utilizadas apenas as misturas do caldo BHI e DMSO com e sem adição da bactéria teste, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

Como resultado do estudo fitoquímico e das propriedades biológicas realizadas com os extratos de *Croton urucurana* pode-se concluir que:

1) Considerando todos os extratos obtido de *C. urucurana*, foram isolados e identificados três diterpenos clerodanos **(2)**, **(3)** e **(6)**; o composto β -sitosterol β -D-glicopironosídeo **(5)**, uma mistura de esteróis contendo campesterol, β -sitosterol e stigmasterol **(1)**, além de uma mistura de ácidos e ésteres graxos.**(4)**.

2) Como material inédito na espécie foram isolados e determinadas as estruturas de dois diterpenos clerodanos: compostos **(3)** e **(6)**; sendo que o clerodano 4-oxo-12-epi-metilbarsbacoato **(3)** teve sua a estrutura confirmada através de cristalografia de raios-X.

3) Em relação a determinação de proantocinidinas e teor de flavonóides, conclui-se que os métodos utilizados neste trabalho não foram eficazes, gerando resultados inconclusíveis. Entretanto, a determinação de fenólicos totais através do método Folin-Ciocalteau mostrou um teor de compostos fenólicos que pode explicar a atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH. Estas duas análises apontaram que o extrato acetato de etila foi o que apresentou melhor perfil antioxidante.

3) Em relação às atividades biológicas, novamente o extrato acetato de etila se destacou, apresentando bons valores de citotoxicidade (Cr2A= 383,6ppm) e ação antibacteriana moderada para a bactéria *Enterococcus faecalis*. Porém cabe ressaltar que para esta atividade o extrato hexânico apresentou melhor resultado frente a bactéria *Enterococcus faecalis*, com um valor de CIM= 73 μ g/mL.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-DOUH, Ahmad M et al. Prenylated flavonoids from the root of Egyptian *Tephrosia apollinea* - crystal structure analysis. **Chemical Sciences**, Egito, v. 4, n. 60, p.458-470, 2005.

ANAGNOSTOPOULOU, Maria et al. Radical scavenging activity of various extracts. **Food Chemistry**, Grécia, v. 1, n. 94, p.18-25, 2006.

CAVIN, A. et al. LC-UV-MS and LC-NMR of an anti-oxidant fraction from *Orophea enneandra* and the isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, 1998, p.1497.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15^o suplemento informativo. M 100 Wayne, 2005. 177 p. Vol. 25, n. 1.

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V.. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, Brasil, n. 12, p.570-576, 2005.

GEBBINCK, Edwin A. Klein; JANSEN, Ben J.m.; GROOT, Aede de. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. **Phytochemistry**, Paises Baixos, n. 61, p.737-770, 2002.

GÓMEZ-CARAVACA, A.m. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Espanha, n. 41, p.1220-1234, 2006.

GURGEL, Luilma A. et al. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal Of Ethnopharmacology**, Brasil, n. 97, p.409-412, 2005.

HORST, Heros. **Análise química e biológica de compostos fenólicos em *Croton celtidifolius* baill.** 2006. Dissertação (Mestrado) - UFSC, Florianópolis.

JURD, Leonard; GEISSMAN, T. A.. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. **Journal Of Organic Chemistry**, Eua, n. 21, p.1395-1401, 1956.

KADOWAKI, Emiko et al. Feeding Stimulative Activity of Steroidal and Secoiridoid Glucosides and Their Hydrolysed Derivatives toward the Olive Weevil (*Dyscerus perforatus*). **Zeitschrift Für Naturforschung C**, Japão, n. 58, p.441-445, 2003.

KAUR, Rajbir; ARORA, Saroj; SINGH, Bikram. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves. **Bioresource Technology**, India, n. 99, p.7692-7698, 2008.

LUNA, J S et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of. **Journal Of Ethnopharmacology**, Brasil, v. 97, n. 2, p.199-206, 28 fev. 2005.

MACHADO, K. E. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, Brasil, n. 43, p.636-639, 2005.

MICHELIN, D.c. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 4, n. 15, p.316-320, 2005.

MILO, Begonã et al. Characterization of a Fucoarabinogalactan, the Main Polysaccharide from the Gum Exudate of *Croton urucurana*. **Journal Of Natural Products**, Espanha, n. 65, p.1143-1146, 2002.

MUELLE-HARVEY, Irene. Analysis of hydrolyssable tannins. **Animal Feed Science And Technology**, Inglaterra, n. 91, p.3-20, 2001.

PALMEIRA JUNIOR, Sebastião F et al. Clerodane diterpenes from *Croton* species: Distribution and a Compilation of their and ¹³C NMR. **Natural Product Communications**, Brasil, v. 4, n. 1, p.319-344, 2006.

PAREJO, Irene et al. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Espanha, n. 50, p.6882-6890, 2002.

PERES, Marize T. L. P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (*Euphorbiaceae*). **Journal Of Ethnopharmacology**, Brasil, n. 56, p.223-226, 1997.

PERES, Marize T. L. P. et al. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, Brasil, v. 1, n. 49, p.171-174, 1998a.

PERES, Marize T. L. P. et al. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, Brasil, n. 12, p.209-211, 1998b.

PERES, Lázaro E. P.. **Metabolismo secundário**. São Paulo: ESALQ/USP, 2003. p. 25.

PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, Brasil, v. 1, n. 25, p.45-61, 2002.

QIN, Min-jian; WANG, Heng-gi. Studies on chemical constituents on *Phellodendron chinese* Schneid bark. **Linchan Huaxue Yu Gongye**, China, v. 4, n. 23, p.42-46, 2003.

RAO, Vietla S. et al. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates. **Journal Of Ethnopharmacology**, Brasil, n. 113, p.357-360, 2007.

REIS, Mauricio Sedrez Dos; MARIOT, Alexandre; STEENBOCK, Walter. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, Claudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2004. Cap. 3, p. 45.

RODRIGUES, Angel Giovani (Aut.). Apresentação. In: AMARAL, Ana Cláudia Fernandes do; SIMÕES, Eliane Velasco; FERREIRA, José Luiz Pinto (Comp.). **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Curitiba: Fiocruz, 2005. p. 5.

SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria L. F.; NEGRI, Giuseppina. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal Of Brazilian Chemical Society**, Brasil, n. 18, p.11-33, 2007.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N.. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science And Technology**, EUA, n. 91, p.21-40, 2001.

SILVA, Francisco A. M.; BORGES, M. Fernanda M.; FERREIRA, Margarida A.. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, Portugal, v. 1, n. 22, p.93-103, 1999.

SIMIONATTO, Euclésio et al. Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. **Journal Of Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 5, n. 18, p.879-885, 2007.

SOARES, Andréia Assunção et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis*. **Food Chemistry**, Brasil, n. 112, p.775-781, 2009.

SUNTORNUSUK, Leena. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Tailândia, n. 27, p.679-698, 2002.

TAVARES, Walter. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 3, n. 33, p.281-301, 2000.

VIEGAS JUNIOR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Brasil, v. 2, n. 29, p.326-337, 2006.

WATSON, L. e DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Versão: 25/11/2008. <http://delta-intkey.com>.

WATERMAN, P. G; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Inglaterra: Oxford: Blackwell Scientific, 1994. 238 p.

WOISKY, Ricardo G; SALATINO, Antonio. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Of Apicultural Reserach**, Brasil, v. 2, n. 37, p.99-105, 1998.

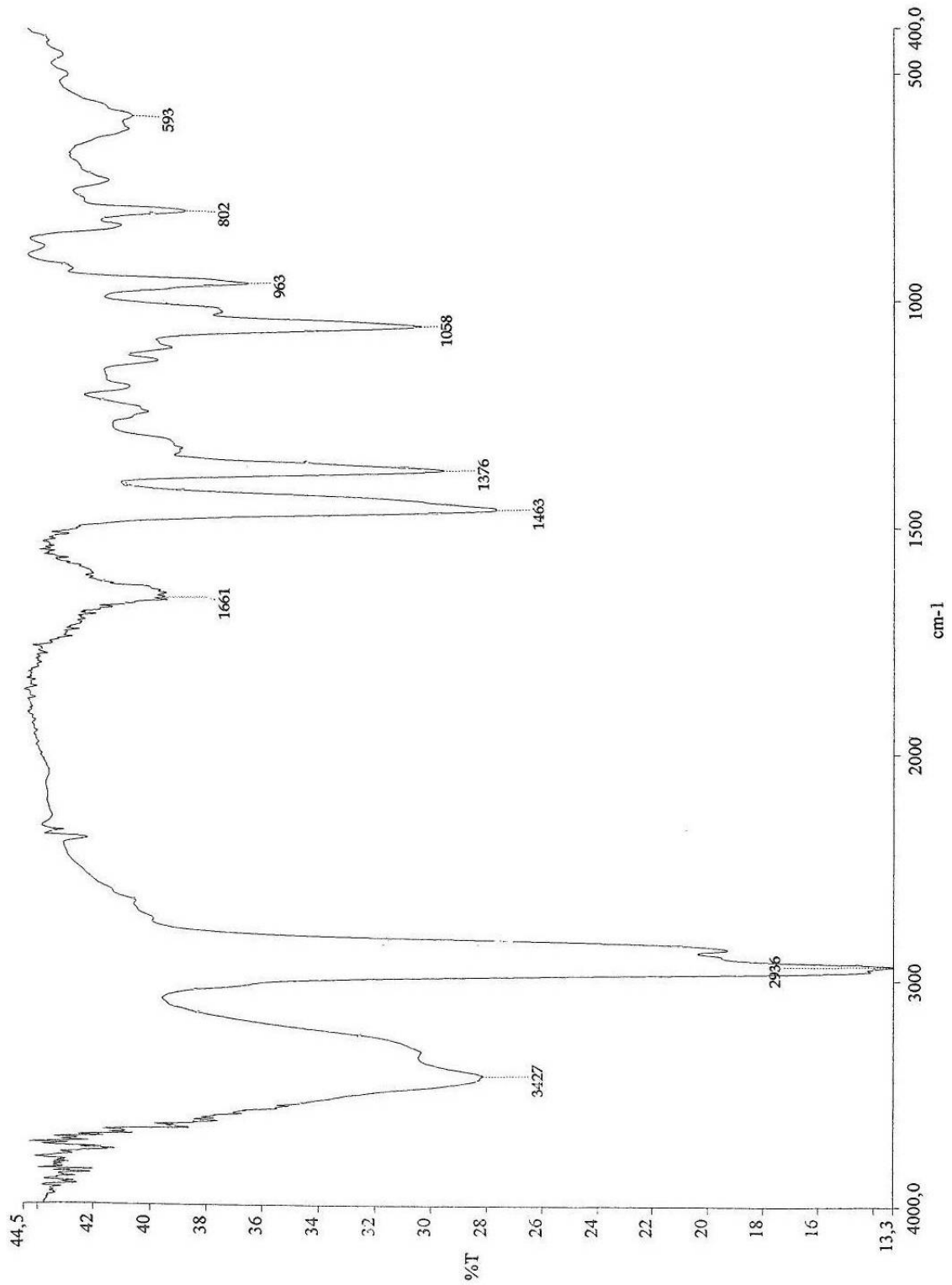
YUN-CHOI, Hye Sook et al. Constituents of *Euphorbia millii*. **Natural Product Sciences**, Coréia, v. 4, n. 9, p.270-272, 2003.

ZHANG, Xin et al. Separation of β 5- and β 7-phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, França, v. 4, n. 54, p.1196-1202, 2006.

ZUANAZZI, José Angelo Silveira; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonóides. In: SIMÕES, Claudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2004. p. 577-615.

8 ANEXOS

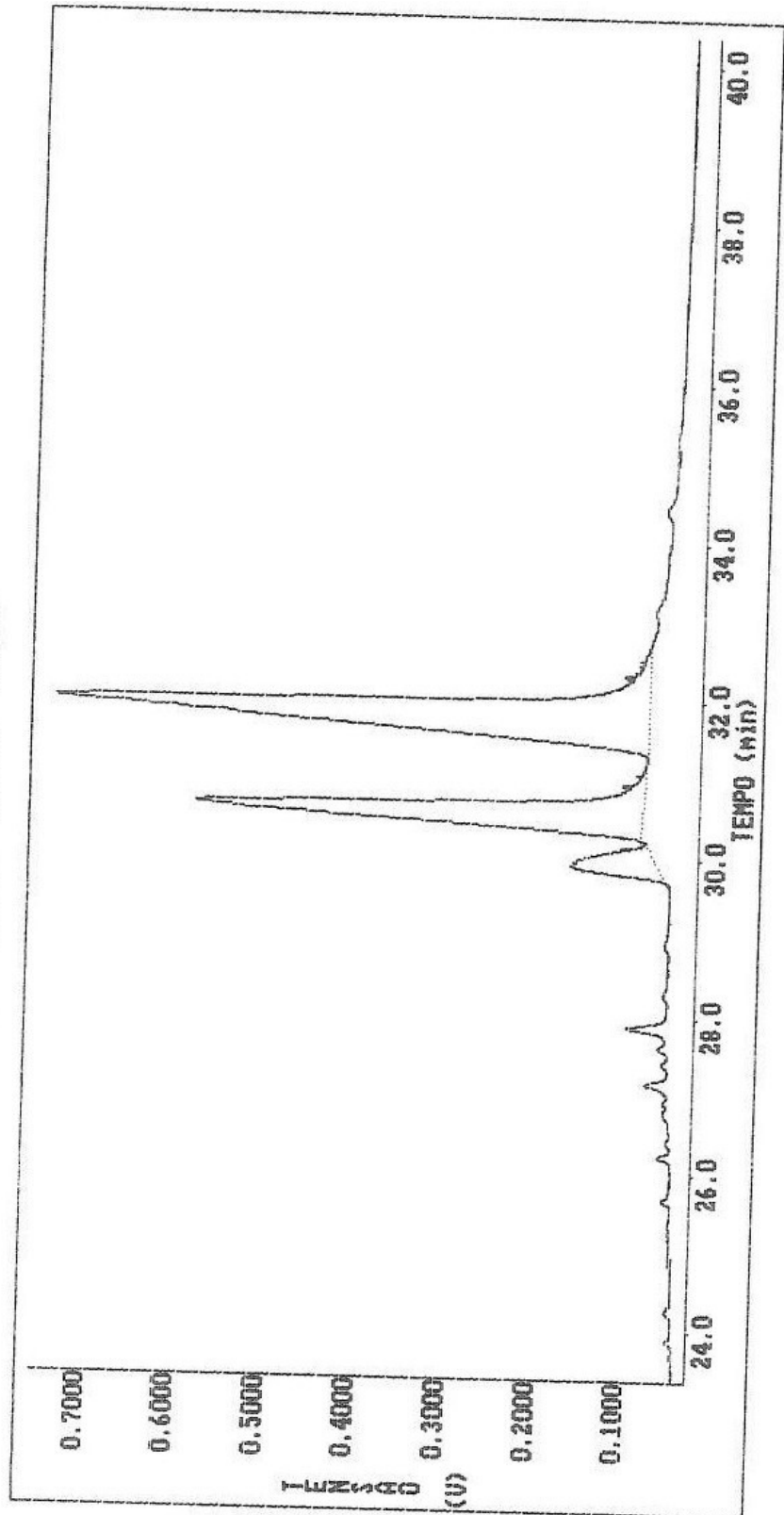
8.1 Espectro de infravermelho – Composto 1



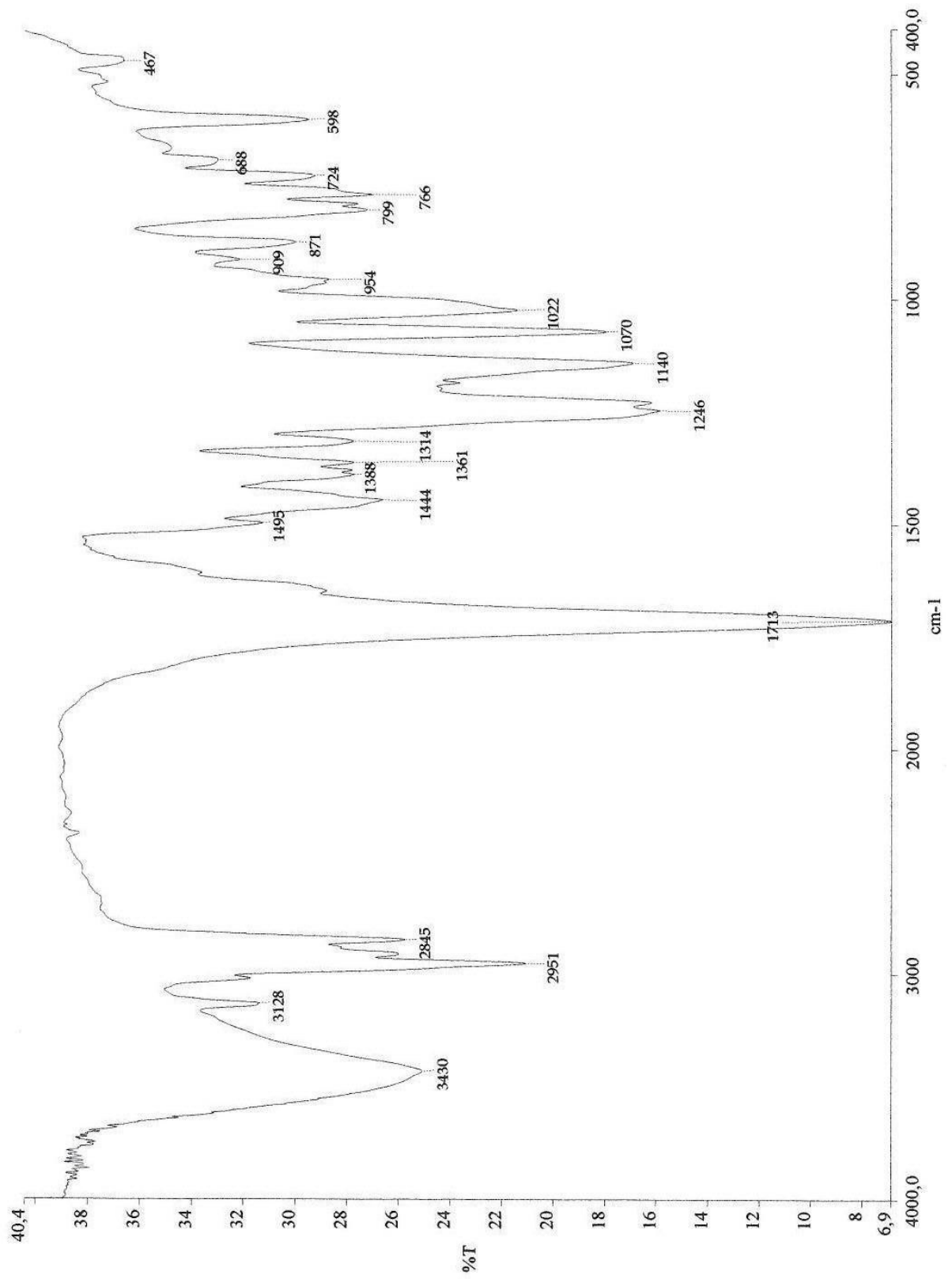
8.2 Cromatograma – Composto 1

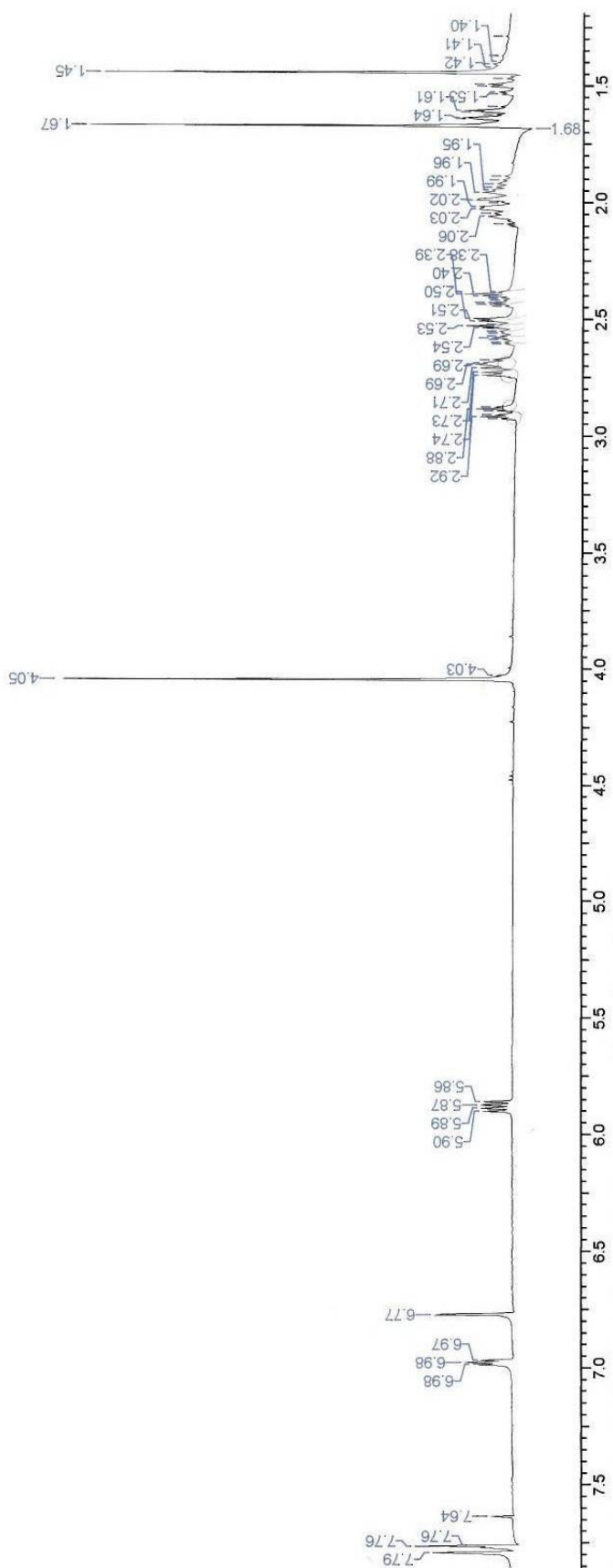
Tipo de coluna: CBP20
 Temperatura da coluna: 200
 Temperatura do detector: 235
 Temperatura do injetor: 235
 Quantidade de amostra: 1.000
 Taxa de compressao de dados ..: 20

Nº Nome	Tempo	Area	Area%	Altura	Altura%
1 SEMNOME	29.923	15.697	6.668	0.0969	7.73
2 SEMNOME	30.650	80.885	34.360	0.4981	39.73
3 SEMNOME	31.952	138.820	58.971	0.6587	52.54

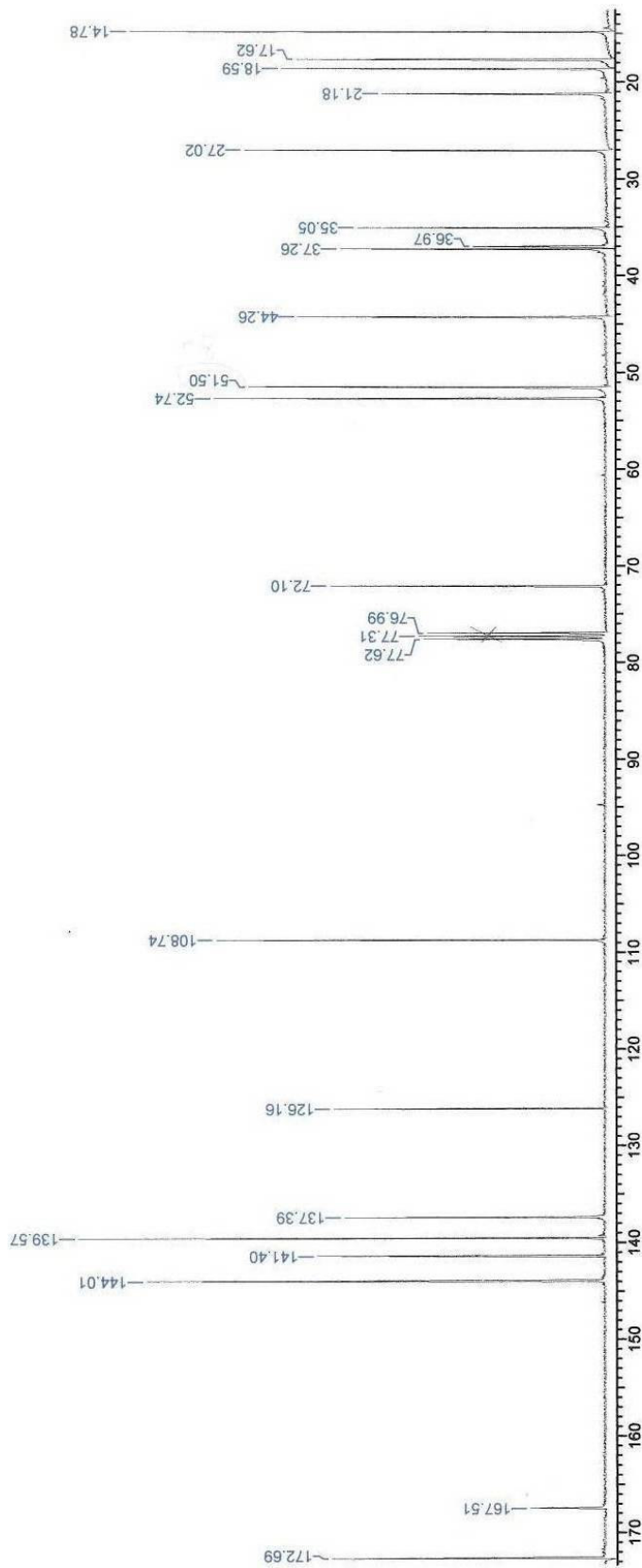


8.3 Espectro de infravermelho – Composto 2

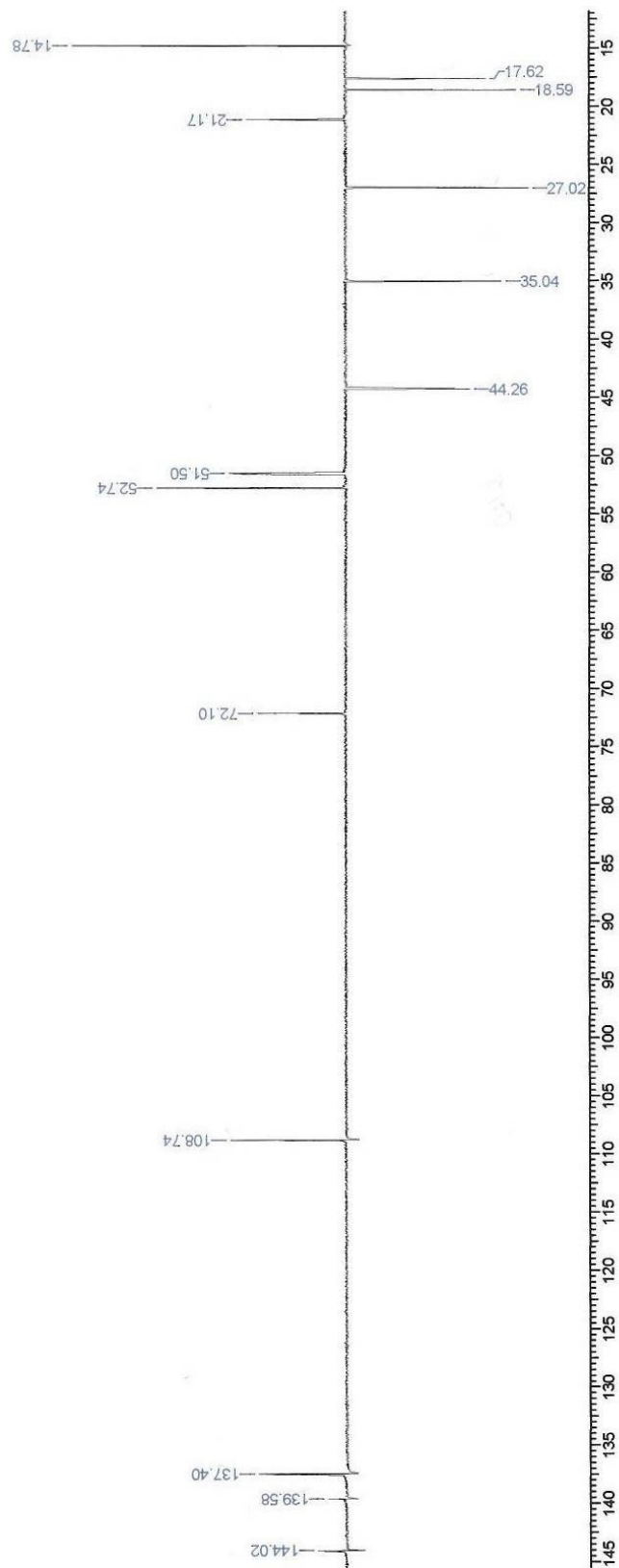


8.4 Espectro de RMN ^1H – Composto 2

8.5 Espectro de RMN ^{13}C – Composto 2



8.6 Espectro de RMN ^{13}C DEPT – Composto 2



8.7 Dados de cristalografia de raios-X

Table 1. Crystal data and structure refinement for compound **2**

Empirical formula	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
Formula weight	358.42
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71069 Å
Crystal system	Orthorhombic
Space group	P 21 21 21
Unit cell dimensions	a = 7.536(1) Å b = 11.043(2) Å c = 22.576(3) Å
Volume	1878.8(5) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.267 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.089 mm ⁻¹
F(000)	768
Crystal size	0.50 x 0.33 x 0.13 mm ³
Theta range for data collection	1.80 to 25.97°
Index ranges	-9<=h<=3, -13<=k<=3, -27<=l<=0
Reflections collected	3925
Independent reflections	2129 [R(int) = 0.0247]
Completeness to theta = 25.97°	100.0 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2129 / 0 / 239
Goodness-of-fit on F ²	1.033
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0409, wR2 = 0.0997
R indices (all data)	R1 = 0.0806, wR2 = 0.1156
Absolute structure parameter	0(2)
Extinction coefficient	0.004(1)
Largest diff. peak and hole	0.153 and -0.197 e.Å ⁻³

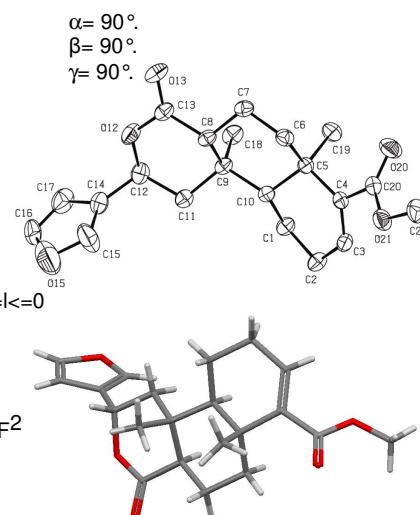


Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^3$) for compound **2**. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

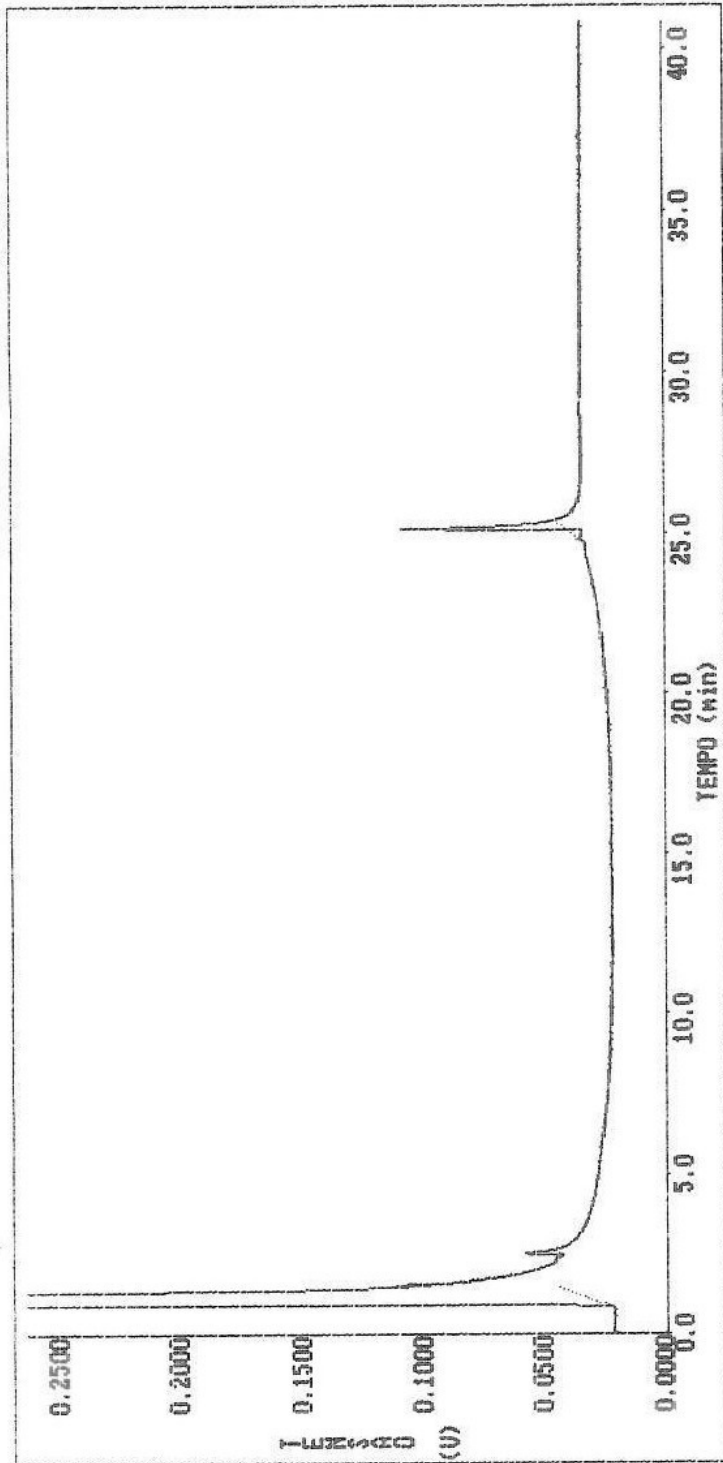
	x	y	z	U(eq)
C(1)	1657(4)	499(3)	8363(1)	48(1)
C(2)	917(5)	-275(3)	7863(1)	53(1)
C(3)	1659(4)	53(3)	7272(1)	48(1)
C(4)	2948(4)	855(3)	7176(1)	45(1)
C(5)	3853(4)	1554(3)	7678(1)	41(1)
C(6)	5864(4)	1680(3)	7555(1)	47(1)
C(7)	6889(4)	2162(3)	8083(1)	48(1)
C(8)	6624(4)	1367(3)	8623(1)	41(1)
C(9)	4658(4)	1221(3)	8806(1)	40(1)
C(10)	3623(4)	774(3)	8250(1)	38(1)
C(11)	4687(4)	234(3)	9279(1)	45(1)
C(12)	5795(5)	576(3)	9814(1)	54(1)
C(13)	7762(4)	1739(3)	9142(2)	47(1)
C(14)	6180(5)	-445(3)	10216(1)	59(1)
C(15)	6581(9)	-1607(4)	10073(2)	113(2)
C(16)	6555(7)	-1458(5)	11052(2)	83(1)
C(17)	6206(6)	-411(5)	10836(2)	81(1)
C(18)	3884(5)	2398(3)	9073(2)	54(1)
C(19)	2998(5)	2837(3)	7694(2)	61(1)
C(20)	3440(5)	1133(3)	6550(1)	54(1)
C(21)	3726(7)	321(4)	5586(1)	73(1)
O(12)	7499(3)	1151(2)	9657(1)	63(1)
O(15)	6787(8)	-2279(4)	10582(2)	162(2)
O(20)	3797(5)	2123(2)	6360(1)	83(1)
O(21)	3422(4)	147(2)	6212(1)	62(1)
O(13)	8950(3)	2463(2)	9117(1)	64(1)

Table 3. Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for compound 2.

C(1)-C(2)	1.522(4)	C(4)-C(5)-C(10)	106.5(2)
C(1)-C(10)	1.534(4)	C(6)-C(5)-C(10)	107.8(2)
C(2)-C(3)	1.492(4)	C(19)-C(5)-C(10)	115.9(3)
C(3)-C(4)	1.332(4)	C(7)-C(6)-C(5)	113.0(3)
C(4)-C(20)	1.493(5)	C(8)-C(7)-C(6)	111.2(2)
C(4)-C(5)	1.530(4)	C(13)-C(8)-C(7)	113.1(3)
C(5)-C(6)	1.547(4)	C(13)-C(8)-C(9)	111.4(2)
C(5)-C(19)	1.557(4)	C(7)-C(8)-C(9)	113.7(3)
C(5)-C(10)	1.561(4)	C(11)-C(9)-C(8)	104.4(2)
C(6)-C(7)	1.516(4)	C(11)-C(9)-C(18)	109.5(2)
C(7)-C(8)	1.515(4)	C(8)-C(9)-C(18)	112.2(3)
C(8)-C(13)	1.508(4)	C(11)-C(9)-C(10)	110.1(2)
C(8)-C(9)	1.547(4)	C(8)-C(9)-C(10)	107.3(2)
C(9)-C(11)	1.526(4)	C(18)-C(9)-C(10)	113.0(3)
C(9)-C(18)	1.547(4)	C(1)-C(10)-C(9)	114.3(2)
C(9)-C(10)	1.559(4)	C(1)-C(10)-C(5)	110.7(2)
C(11)-C(12)	1.517(4)	C(9)-C(10)-C(5)	115.8(2)
C(12)-O(12)	1.476(4)	C(12)-C(11)-C(9)	112.7(3)
C(12)-C(14)	1.477(5)	O(12)-C(12)-C(14)	107.8(3)
C(13)-O(13)	1.202(4)	O(12)-C(12)-C(11)	113.3(3)
C(13)-O(12)	1.347(4)	C(14)-C(12)-C(11)	114.1(3)
C(14)-C(15)	1.357(6)	O(13)-C(13)-O(12)	118.1(3)
C(14)-C(17)	1.399(5)	O(13)-C(13)-C(8)	124.6(3)
C(15)-O(15)	1.378(5)	O(12)-C(13)-C(8)	117.2(3)
C(16)-C(17)	1.283(6)	C(15)-C(14)-C(17)	105.1(4)
C(16)-O(15)	1.406(6)	C(15)-C(14)-C(12)	128.2(3)
C(20)-O(20)	1.205(4)	C(17)-C(14)-C(12)	126.6(4)
C(20)-O(21)	1.330(4)	C(14)-C(15)-O(15)	109.6(4)
C(21)-O(21)	1.445(4)	C(17)-C(16)-O(15)	108.6(4)
C(2)-C(1)-C(10)	110.0(3)	C(16)-C(17)-C(14)	111.1(4)
C(3)-C(2)-C(1)	113.0(3)	O(20)-C(20)-O(21)	122.7(3)
C(4)-C(3)-C(2)	125.4(3)	O(20)-C(20)-C(4)	125.4(3)
C(20)-C(4)-C(5)	119.1(3)	O(21)-C(20)-C(4)	111.9(3)
C(4)-C(5)-C(6)	110.5(3)	C(13)-O(12)-C(12)	122.8(3)
C(4)-C(5)-C(19)	107.0(3)	C(15)-O(15)-C(16)	105.6(4)
C(6)-C(5)-C(19)	109.1(3)	C(20)-O(21)-C(21)	116.8(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

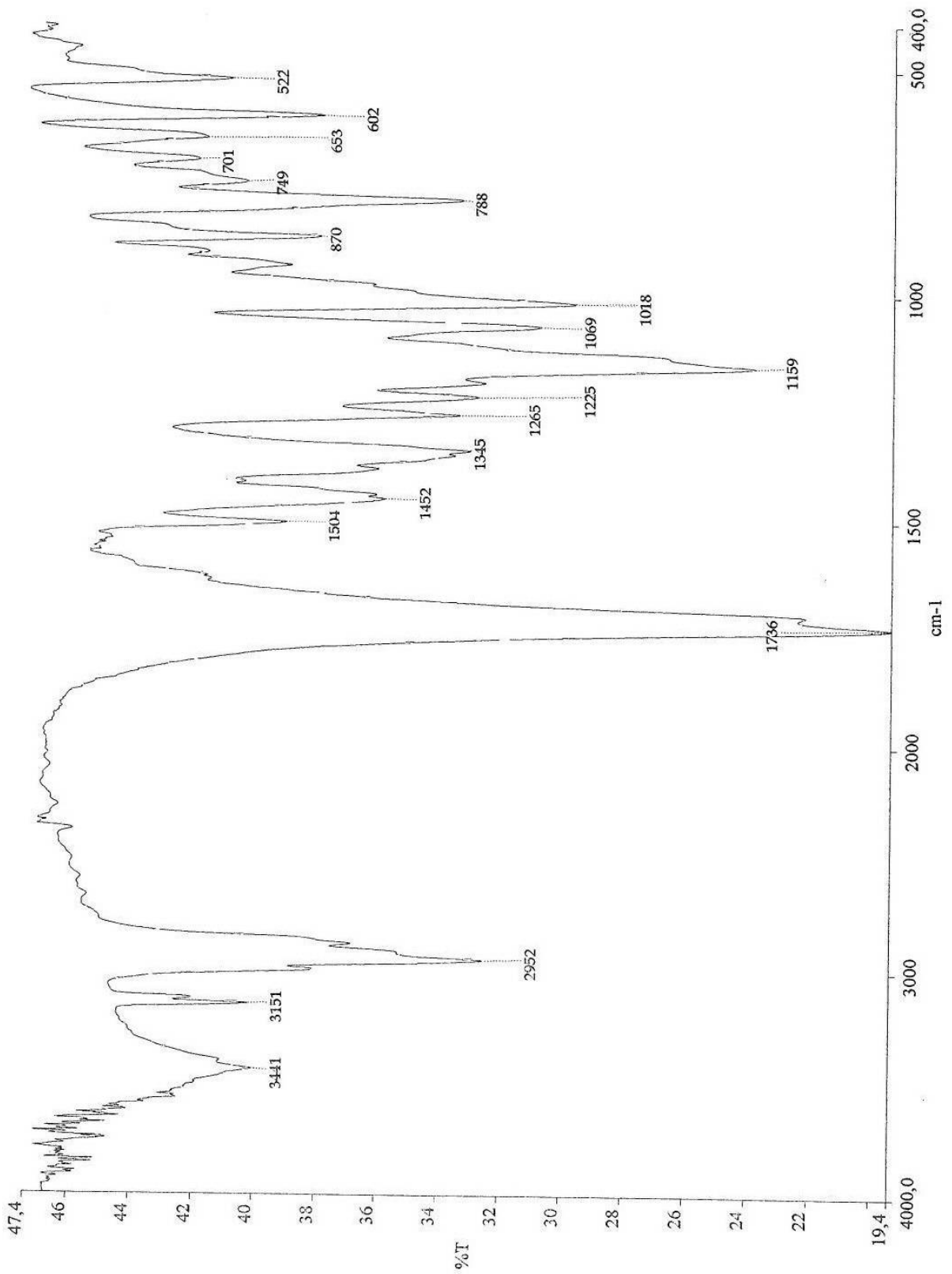
8.8 Cromatograma – Composto 3

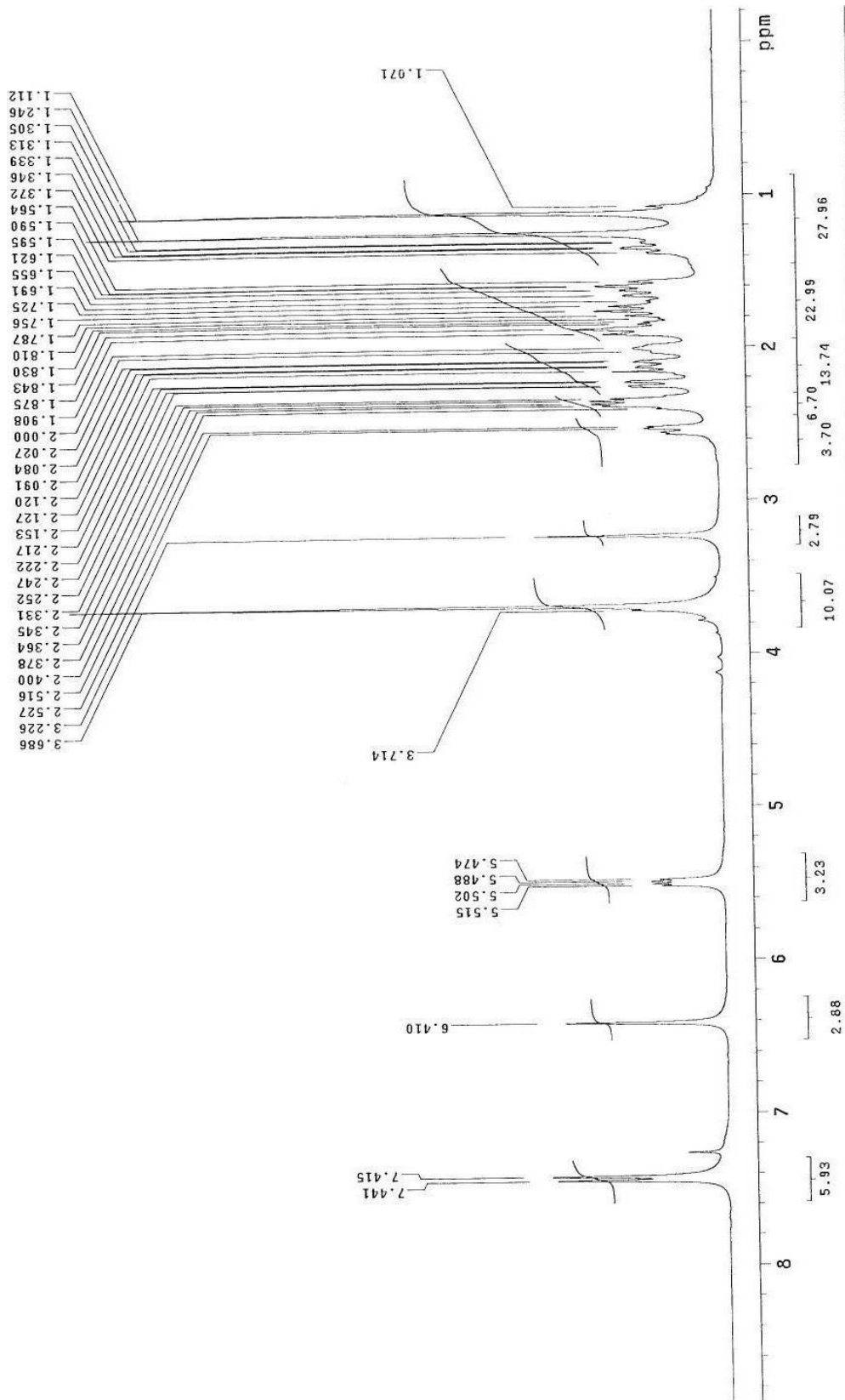


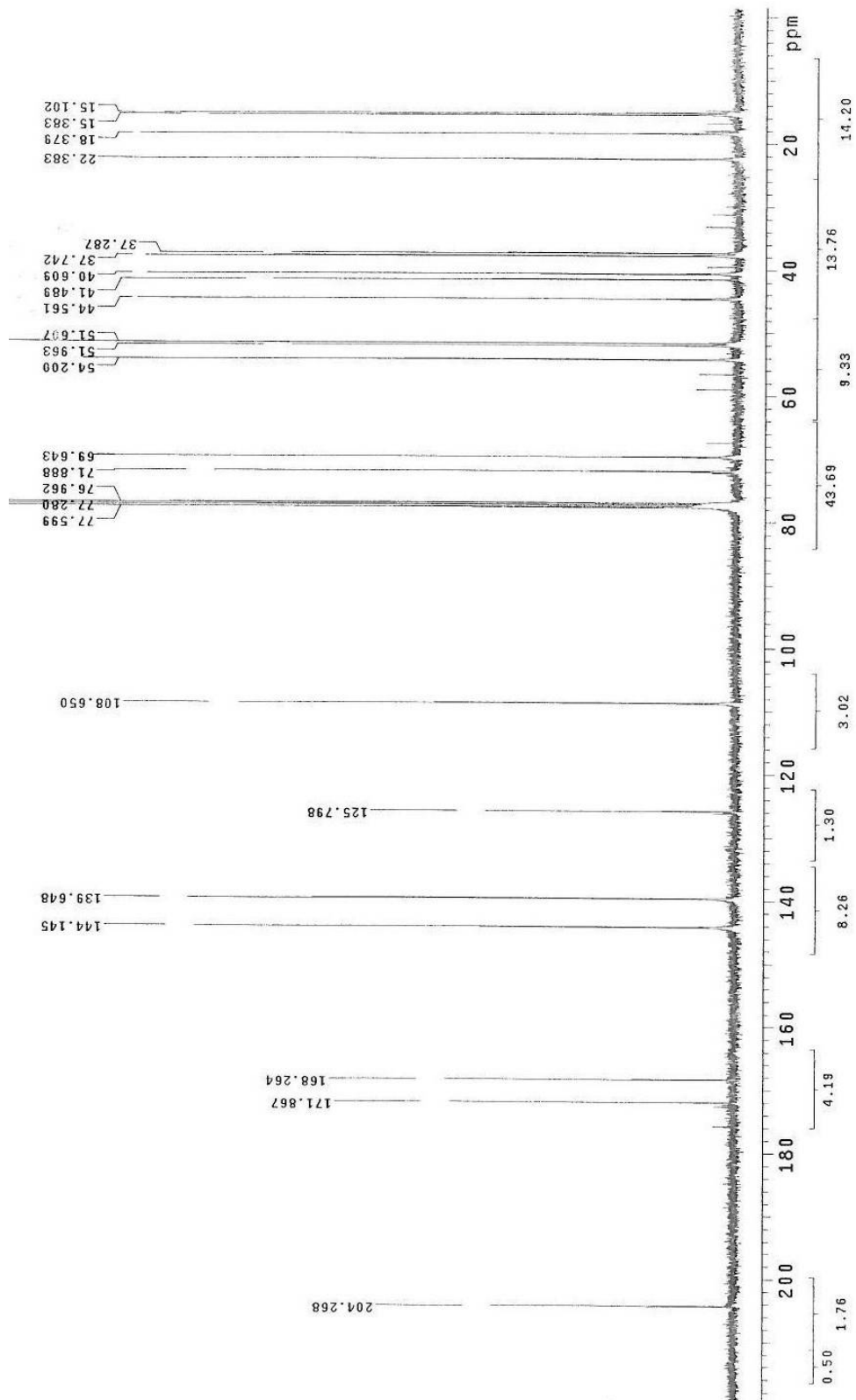
Tipo de coluna: CBP20
 Temperatura da coluna: 200
 Temperatura do detector: 235
 Temperatura do injetor: 235
 Quantidade de amostra: 1.000
 Taxa de compressao de dados ..: 20

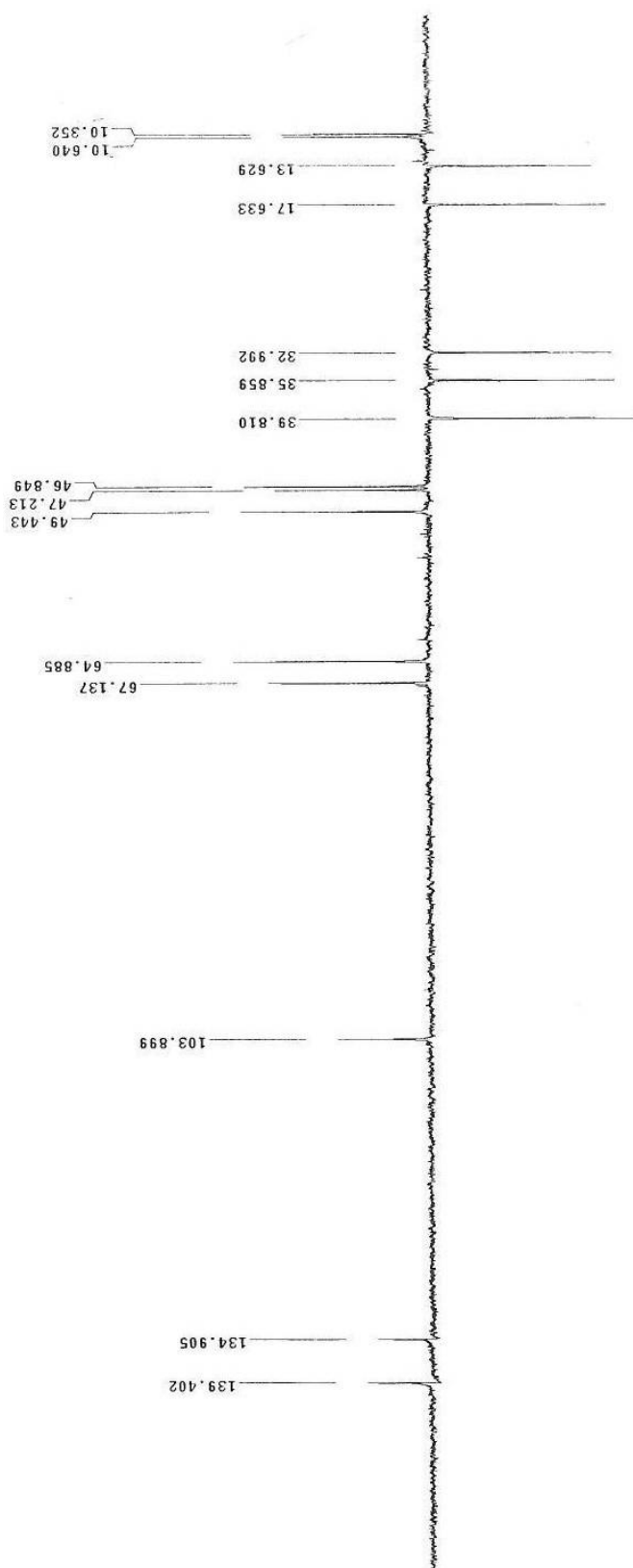
Nº Nome	Tempo	Area	Area%	Altura	Altura%
1 SEMNOME	25.112	6.458	100.000	0.0734	100.00

8.9 Espectro de infravermelho – Composto 3

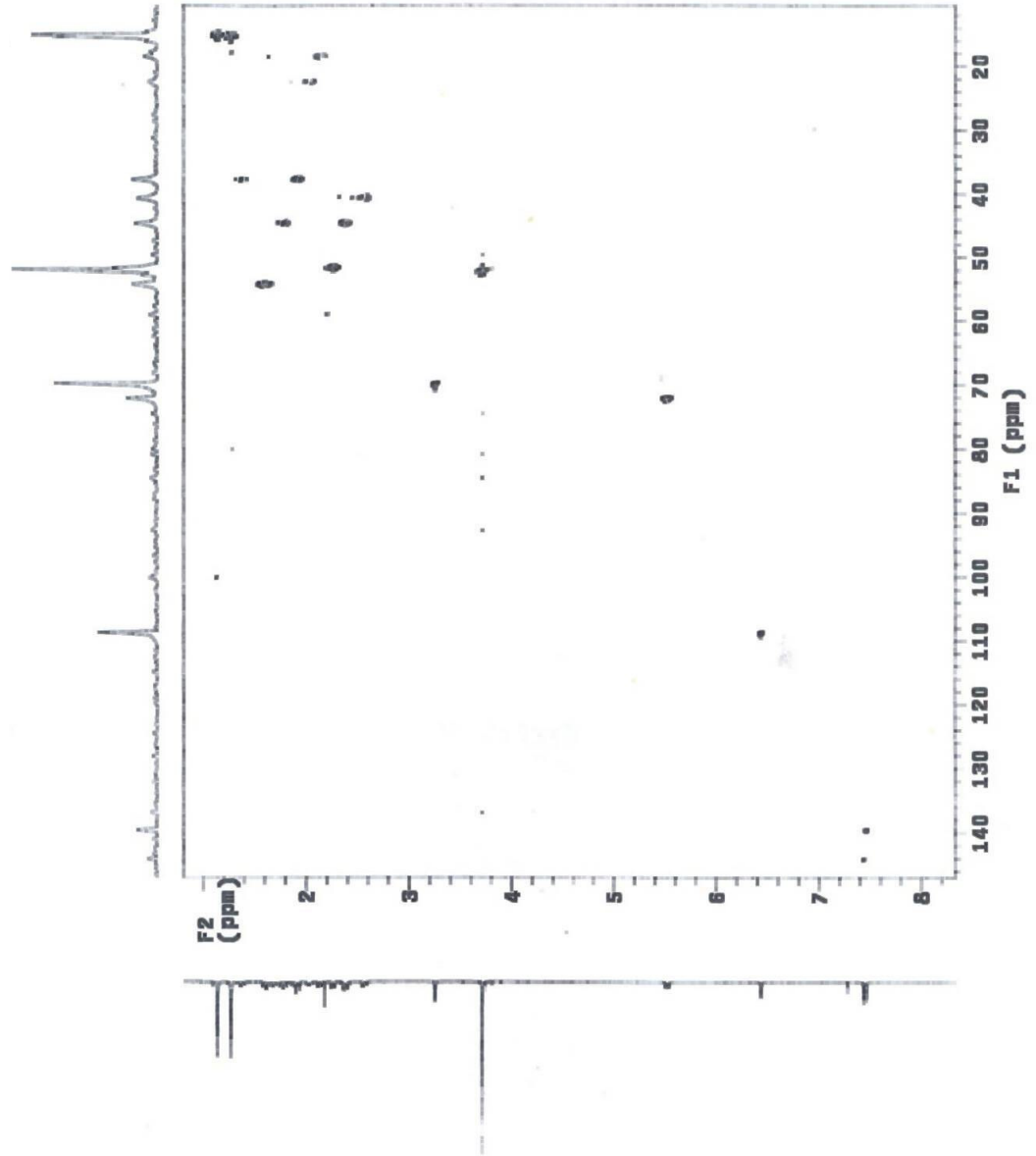


8.10 Espectro de RMN ^1H – Composto 3

8.11 Espectro de RMN ^{13}C – Composto 3

8.12 Espectro de RMN ^{13}C DEPT – Composto 3

8.12 Espectro de HMQC – Composto 3



8.14 Dados de cristalografia de raios-X

Table 1. Crystal data and structure refinement for compound 3

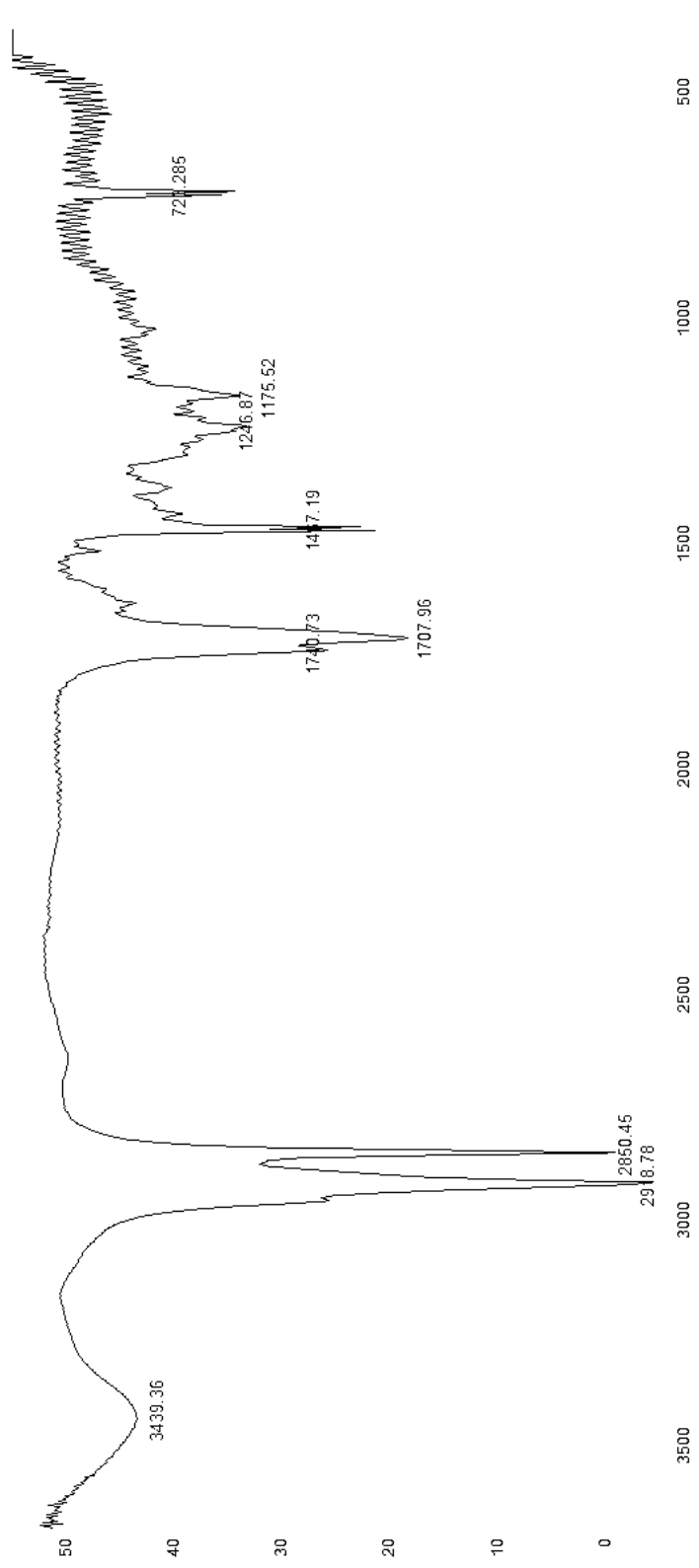
Empirical formula	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	
Formula weight	374.42	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71069 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21	
Unit cell dimensions	a = 9.1547(8) Å b = 11.160(2) Å c = 9.2186(4) Å	α = 90° β = 99.109(5)° γ = 90°
Volume	929.9(2) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.337 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.097 mm ⁻¹	
F(000)	400	
Crystal size	0.50 x 0.26 x 0.20 mm ³	
Theta range for data collection	2.24 to 26.97°	
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -14 ≤ k ≤ 5, -11 ≤ l ≤ 5	
Reflections collected	5104	
Independent reflections	2141 [R(int) = 0.0201]	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2141 / 1 / 247	
Goodness-of-fit on F ²	1.023	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0348, wR2 = 0.0893	
R indices (all data)	R1 = 0.0498, wR2 = 0.0967	
Absolute structure parameter	10(10)	
Largest diff. peak and hole	0.191 and -0.153 e.Å ⁻³	

Table 2. Bond lengths [Å] and angles [°] for compound 3.

C(1)-C(10)	1.531(3)	C(6)-C(5)-C(4)	109.01(19)
C(1)-C(2)	1.532(4)	C(19)-C(5)-C(4)	109.33(18)
C(2)-C(3)	1.498(4)	C(6)-C(5)-C(10)	109.69(17)
C(3)-O(3)	1.208(3)	C(19)-C(5)-C(10)	113.95(19)
C(3)-C(4)	1.531(4)	C(4)-C(5)-C(10)	104.99(18)
C(4)-C(18)	1.523(4)	C(7)-C(6)-C(5)	113.4(2)
C(4)-C(5)	1.566(3)	C(8)-C(7)-C(6)	109.3(2)
C(5)-C(6)	1.535(3)	C(17)-C(8)-C(7)	112.9(2)
C(5)-C(19)	1.548(3)	C(17)-C(8)-C(9)	111.07(18)
C(5)-C(10)	1.569(3)	C(7)-C(8)-C(9)	113.16(19)
C(6)-C(7)	1.526(4)	C(11)-C(9)-C(20)	109.6(2)
C(7)-C(8)	1.517(4)	C(11)-C(9)-C(8)	104.03(18)
C(8)-C(17)	1.511(3)	C(20)-C(9)-C(8)	111.4(2)
C(8)-C(9)	1.547(3)	C(11)-C(9)-C(10)	108.49(18)
C(9)-C(11)	1.538(3)	C(20)-C(9)-C(10)	114.09(19)
C(9)-C(20)	1.543(3)	C(8)-C(9)-C(10)	108.70(17)
C(9)-C(10)	1.557(3)	C(1)-C(10)-C(9)	113.59(18)
C(11)-C(12)	1.523(3)	C(1)-C(10)-C(5)	110.40(17)
C(12)-O(12)	1.467(3)	C(9)-C(10)-C(5)	116.72(17)
C(12)-C(13)	1.498(4)	C(12)-C(11)-C(9)	113.2(2)
C(13)-C(16)	1.352(4)	O(12)-C(12)-C(13)	106.9(2)
C(13)-C(14)	1.434(4)	O(12)-C(12)-C(11)	115.5(2)
C(14)-C(15)	1.336(6)	C(13)-C(12)-C(11)	113.1(2)
C(15)-O(16)	1.365(5)	C(16)-C(13)-C(14)	105.0(3)
C(16)-O(16)	1.369(3)	C(16)-C(13)-C(12)	127.7(2)
C(17)-O(17)	1.208(3)	C(14)-C(13)-C(12)	127.1(3)
C(17)-O(12)	1.351(3)	C(15)-C(14)-C(13)	106.8(3)
C(18)-O(18)	1.195(4)	C(14)-C(15)-O(16)	111.4(3)
C(18)-O(21)	1.344(4)	C(13)-C(16)-O(16)	111.7(3)
C(21)-O(21)	1.450(3)	O(17)-C(17)-O(12)	117.7(2)
C(10)-C(1)-C(2)	111.3(2)	O(17)-C(17)-C(8)	124.8(3)
C(3)-C(2)-C(1)	113.6(2)	O(12)-C(17)-C(8)	117.5(2)
O(3)-C(3)-C(2)	123.3(2)	O(18)-C(18)-O(21)	122.7(3)
O(3)-C(3)-C(4)	122.1(2)	O(18)-C(18)-C(4)	127.6(3)
C(2)-C(3)-C(4)	114.6(2)	O(21)-C(18)-C(4)	109.7(2)
C(18)-C(4)-C(3)	109.67(19)	C(17)-O(12)-C(12)	122.83(19)
C(18)-C(4)-C(5)	116.8(2)	C(15)-O(16)-C(16)	105.1(3)
C(3)-C(4)-C(5)	109.8(2)	C(18)-O(21)-C(21)	116.7(3)
C(6)-C(5)-C(19)	109.7(2)		

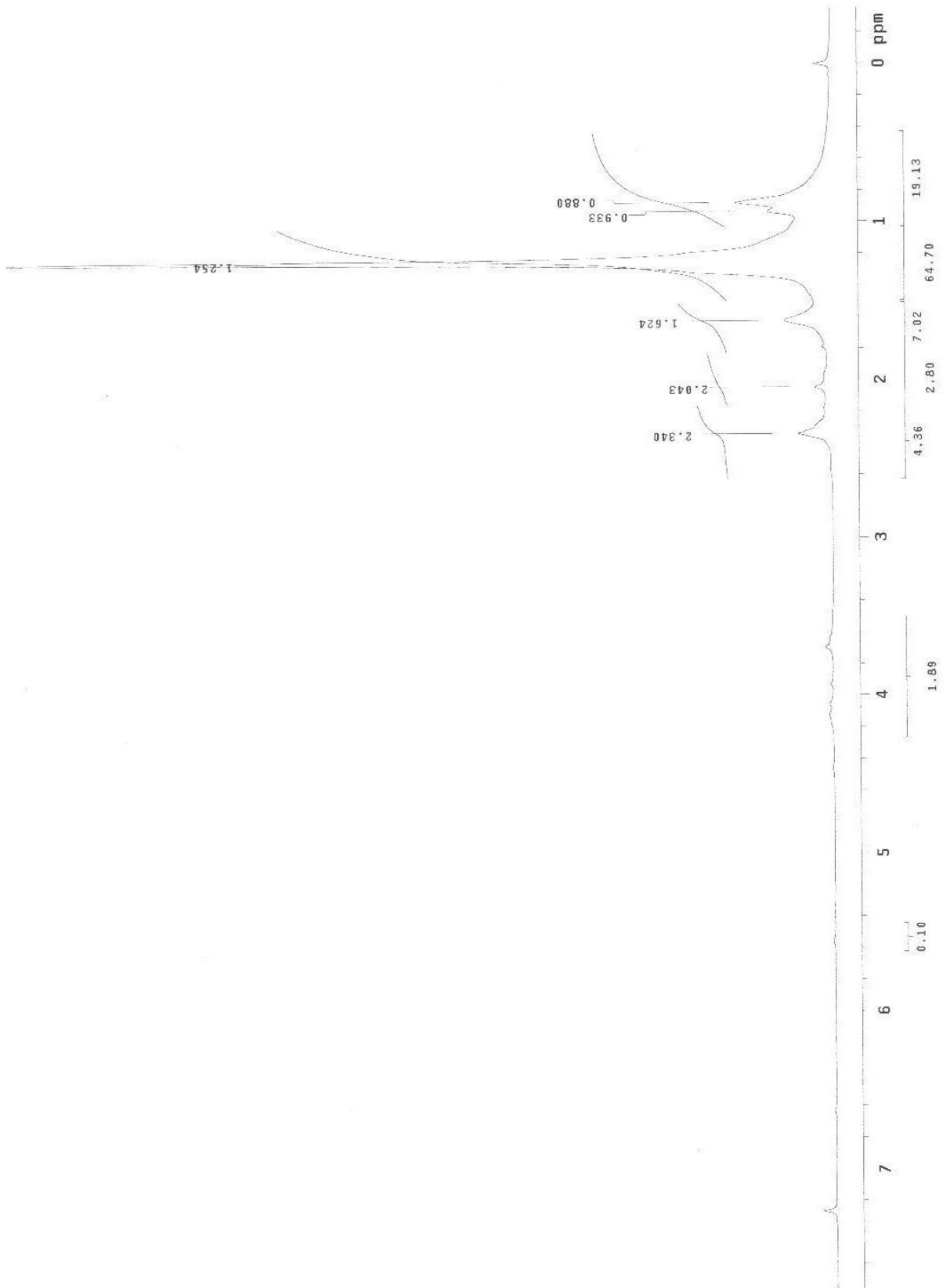
Symmetry transformations used to generate equivalent atoms

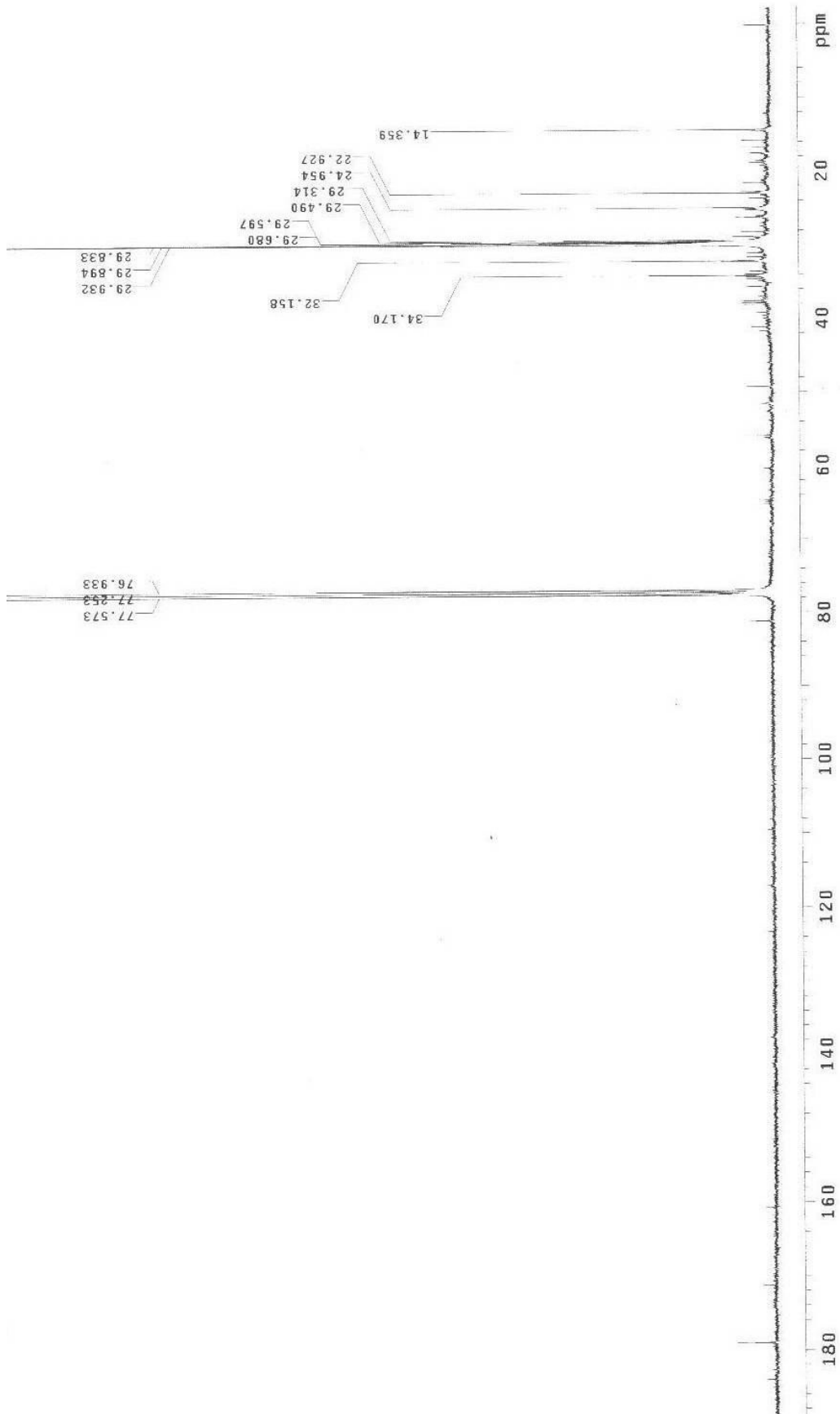
8.15 Espectro de infravermelho – Composto 4



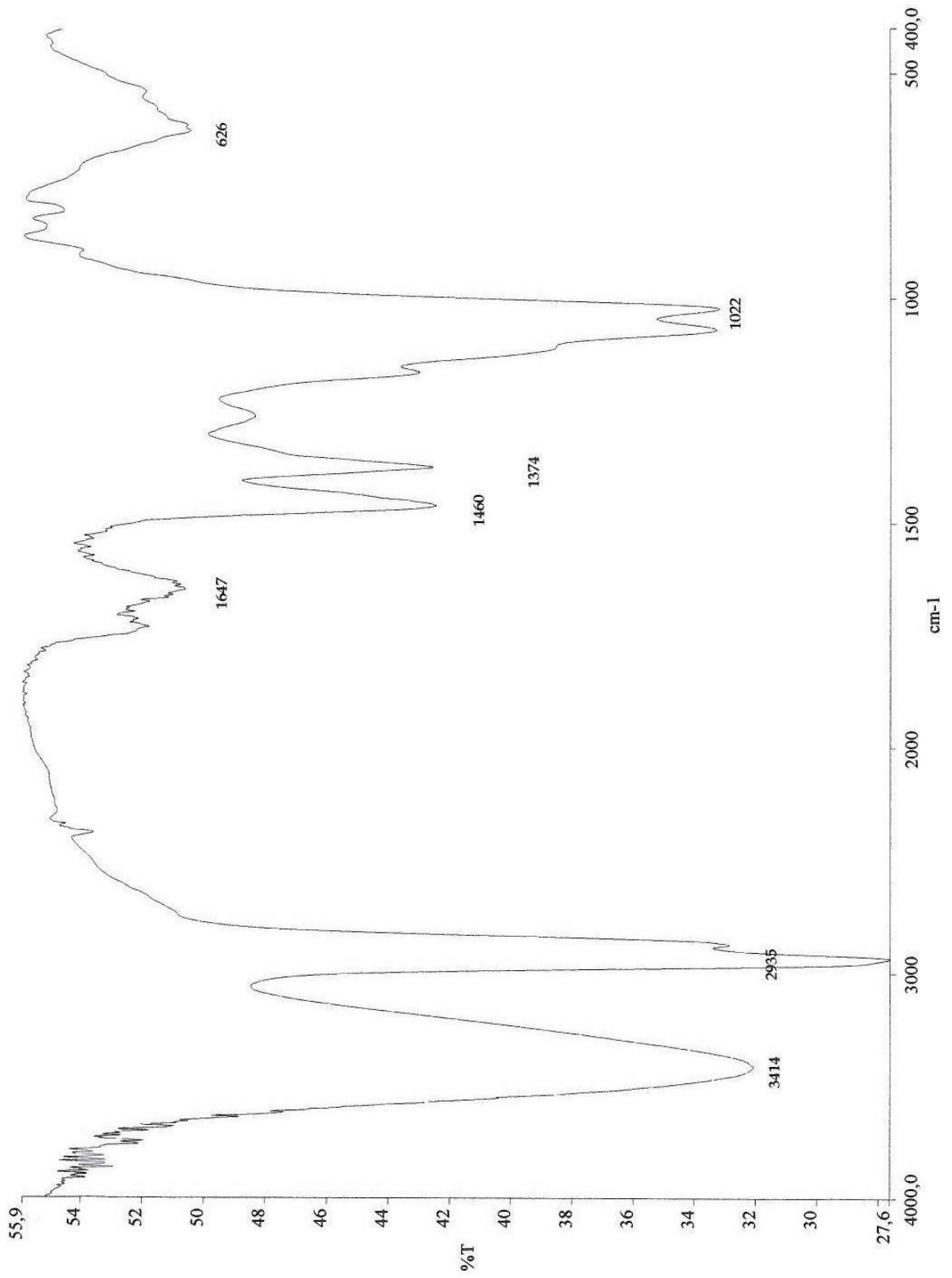
Paged Y-Zoom SCROLL
05/09/2008 10:57 Res=2

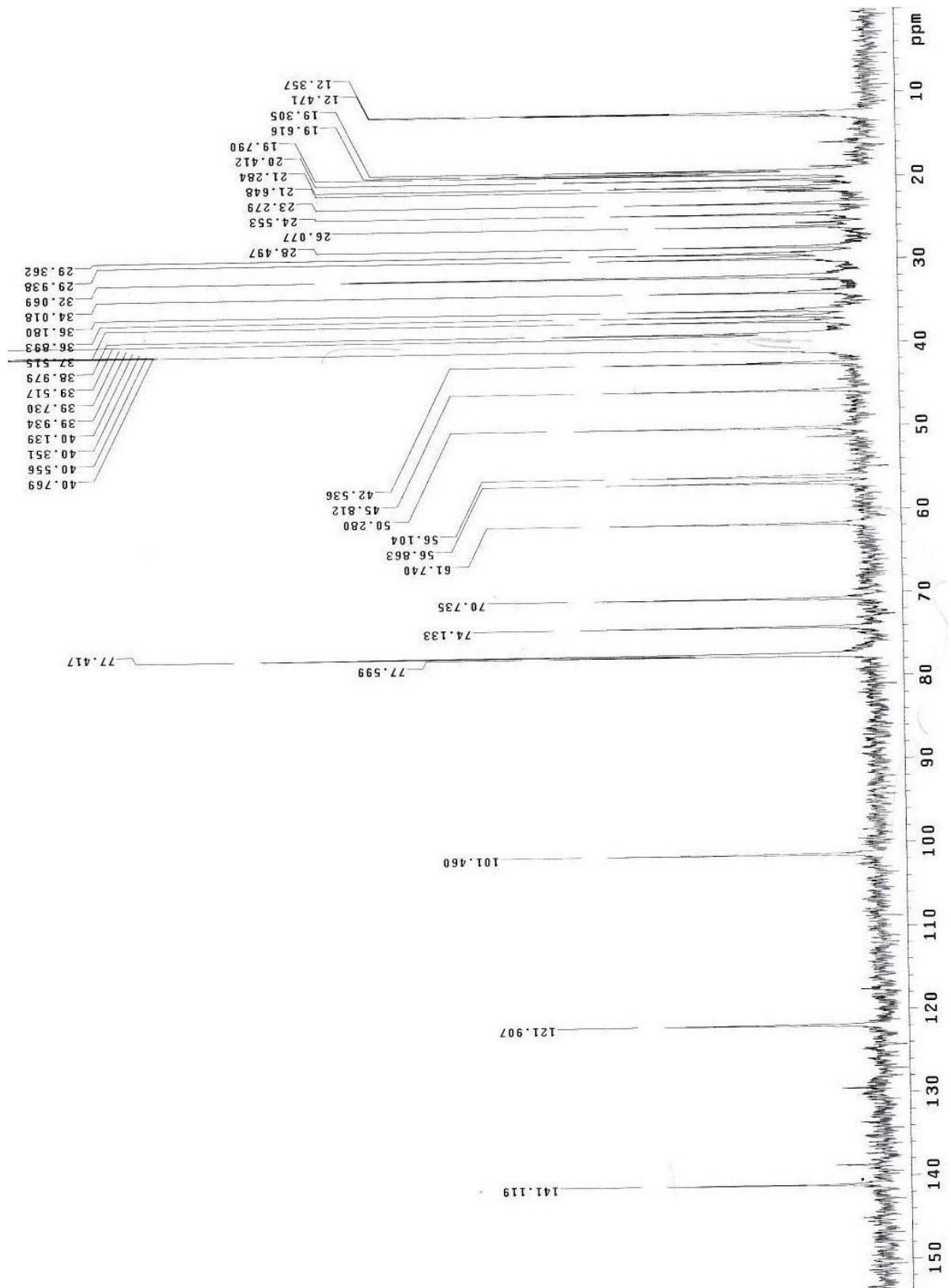
Transmittance / Wavenumber (cm-1)
File # 1 : EFR_1T~1

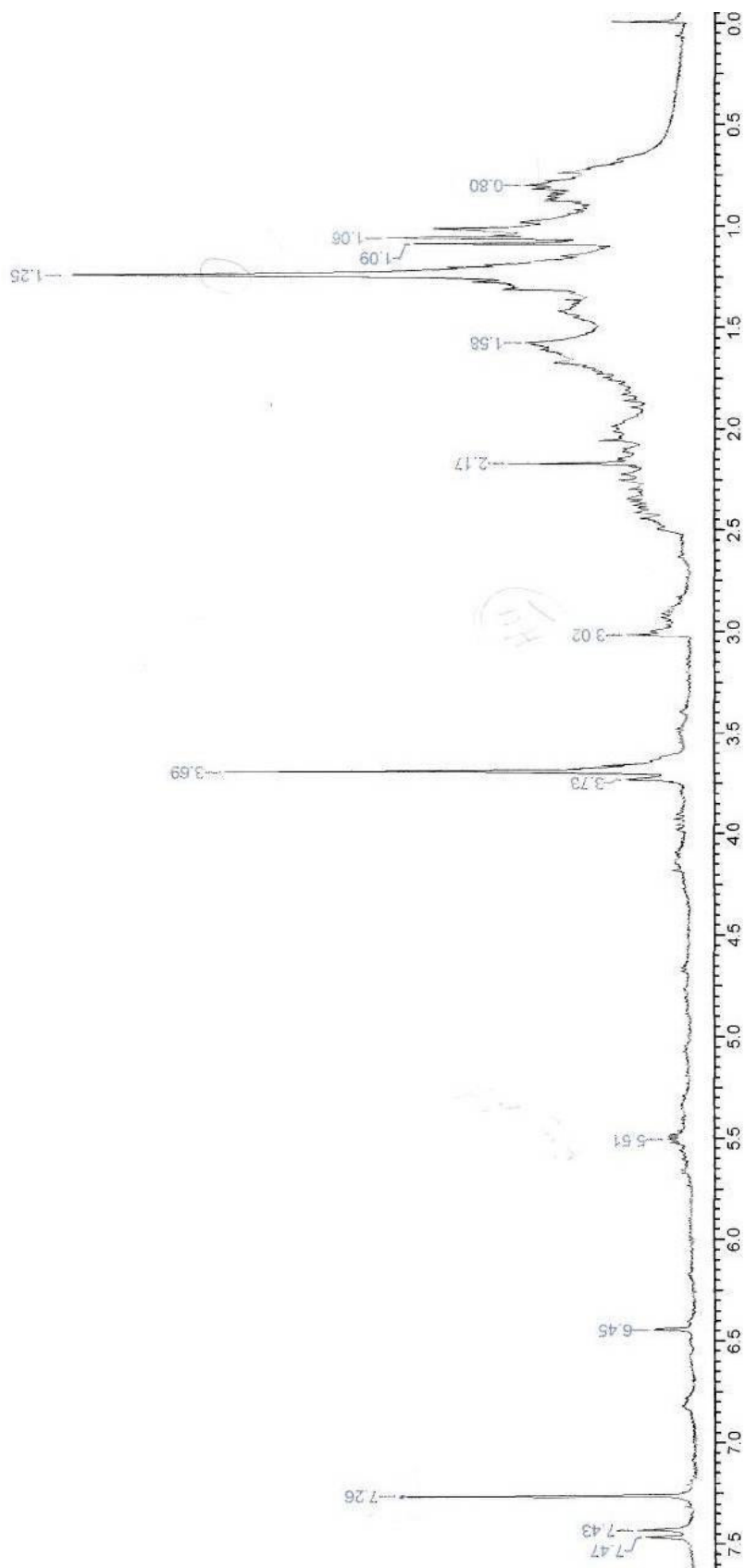
8.16 Espectro de RMN ^1H – Composto 4

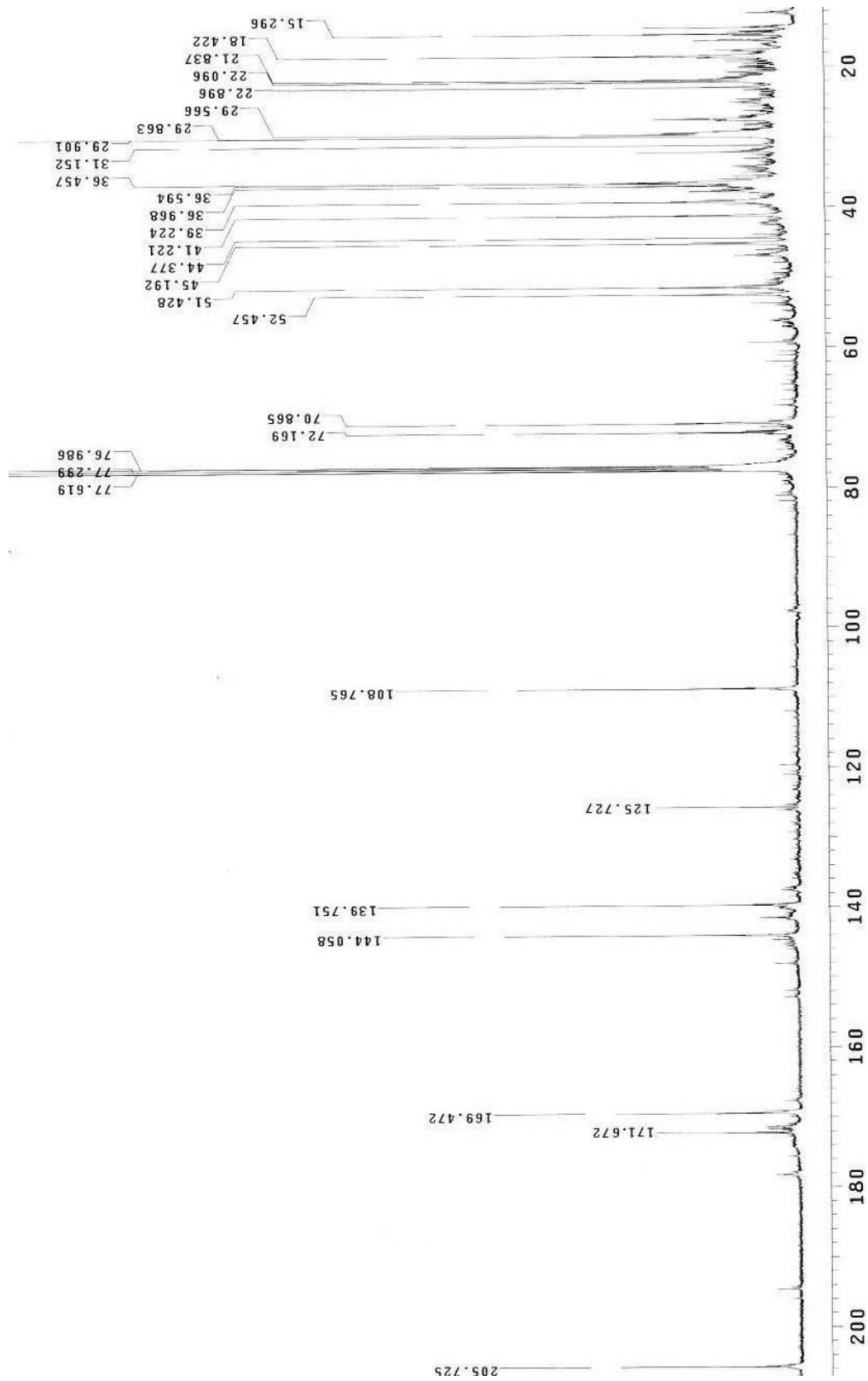
8.17 Espectro de RMN ^{13}C – Composto 4

8.18 Espectro de infravermelho – Composto 5



8.19 Espectro de RMN ^{13}C – Composto 5

8.20 Espectro de RMN ^1H – Composto 6

8.21 Espectro de RMN ^{13}C – Composto 6

8.22 Espectro de RMN ^{13}C DEPT – Composto 6