

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL**

*Croton urucurana*

**ALUNA: ANALICE ZUCHINALLI**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MOACIR G. PIZZOLATTI**

Trabalho de conclusão de curso –  
Bacharelado em Química, referente  
à disciplina QMC 5510 – Estágio  
Supervisionado.

**FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2007.**

**Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC**  
**Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CFM**  
**Departamento de Química**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *Croton urucurana***

Trabalho de conclusão de curso –  
Bacharelado em Química, referente à  
disciplina QMC 5510 – Estágio  
Supervisionado.

---

**Analice Zuchinalli**

Aluna

---

**Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti**

Orientador

*“Você não sabe o quanto*

*Eu caminhei*

*Pra chegar até aqui*

*Percorri milhas e milhas*

*Antes de dormir*

*Eu não cochilei...”*

*(A estrada - Toni Garrido, Lazão, Da Gama e Bino)*

***Dedicatória***

*Aos meus pais, os maiores  
mestres da minha vida!*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, sou grata a Deus: pelo dom da vida e por todas as graças que recebi até hoje.

Minha profunda gratidão aos meus pais, Marilú e Claudemir, que sempre estiveram ao meu lado, me fortalecendo, possibilitando que eu viesse a alcançar meus objetivos; e ao meu irmão Junior, que é um grande motivo de felicidade na minha vida.

Agradeço ao Rodolfo, hoje meu noivo, mas há muitos anos meu grande amigo e companheiro, por todo o apoio. Falando em amigos, não poderia deixar de agradecer a Joyce “Maricota”, a melhor amiga que fiz durante esta jornada, sempre disposta a me ouvir.

Por toda ajuda no laboratório, sempre muito prestativo: Cristian, valeu! Não obstante, dedico minha gratidão a todo grupo do LQPN (Andressa, Aline, Beatriz, Fabiana, professora Inês, Henrique, Heros, Michele, Munique e Roberta), em especial ao professor Moacir, pela oportunidade e pelos ensinamentos. Da mesma forma, agradeço à UFSC e CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Também gostaria de agradecer a todos os professores que tive o privilégio de conhecer durante minha vida acadêmica e aos colegas de classe, por terem compartilhado comigo grandes momentos de aprendizado e diversão.

## SUMÁRIO

<b>1 RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
2.1 Produtos Naturais .....	2
2.2 Referências Bibliográficas .....	3
2.2.1 Gênero <i>Croton</i> .....	3
2.2.2 Espécie <i>Croton urucurana</i> .....	4
2.2.3 Diterpenos .....	5
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	8
3.2 Objetivos Específicos .....	8
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
4.1 Substâncias utilizadas.....	9
4.2 Equipamentos.....	9
4.3 Preparação dos extratos de <i>Croton urucurana</i> .....	10
4.4 Fracionamento do extrato acetato de etila.....	11
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>14</b>
5.1 Extratos .....	14
5.2 Caracterização e identificação do composto Cr-1.....	14
5.3 Caracterização do composto Cr-2 .....	16
5.4 Caracterização e identificação do composto Cr-3.....	17
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>27</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sistema de eluição empregado na cromatografia em coluna 1.....	<b>11</b>
<b>Tabela 2:</b> Esquema de reunião das frações .....	<b>12</b>
<b>Tabela 3:</b> Sistema de eluição empregado na cromatografia em coluna 2.....	<b>13</b>
<b>Tabela 4:</b> Valores de comparativos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para Cr-3.....	<b>20</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do geranylgeranyl pirofosfato .....	<b>5</b>
<b>Figura 2:</b> Exemplos de esqueletos de diterpenos.....	<b>6</b>
<b>Figura 3:</b> Esqueletos labdano e clerodano.....	<b>6</b>
<b>Figura 4:</b> Estrutura do taxol .....	<b>7</b>
<b>Figura 5:</b> Fluxograma de preparação dos extratos.....	<b>10</b>
<b>Figura 6:</b> Diterpenos previamente isolados das cascas de <i>C. urucurana</i> <sup>[7]</sup> .....	<b>14</b>
<b>Figura 7:</b> Estruturas do campesterol, stigmasterol e $\beta$ -sitosterol .....	<b>15</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema da CCD Cr-3 .....	<b>18</b>
<b>Figura 9:</b> Estruturas parciais .....	<b>21</b>
<b>Figura 10:</b> Proposta estrutural .....	<b>21</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>C. urucurana</i></b>	:	<i>Croton urucurana</i>
<b>n-Hex</b>	:	n-Hexano
<b>AcOEt</b>	:	Acetato de Etila
<b>EtOH</b>	:	Etanol
<b>E-H</b>	:	Extrato Hexânico
<b>E-AcOEt</b>	:	Extrato Acetato de Etila
<b>E-EtOH</b>	:	Extrato Hidroalcoólico
<b>Fr</b>	:	Fração
<b>RF</b>	:	Fator de Retenção
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	:	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	:	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>DEPT</b>	:	<b>D</b> istortionless <b>E</b> nhancement of <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfer
<b>COSY</b>	:	<b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscopy
<b>HMQC</b>	:	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence
<b>HMBC</b>	:	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>B</b> ond <b>C</b> oherence
<b>δ</b>	:	Deslocamento Químico
<b>J</b>	:	Constante de Acomplamento
<b>s</b>	:	Singleto
<b>d</b>	:	Dubleto
<b>t</b>	:	Tripleto
<b>m</b>	:	Multiplete
<b>CCD</b>	:	Cromatografia de Camada Delgada
<b>CC</b>	:	Cromatografia em Coluna
<b>CG</b>	:	Cromatografia Gasosa
<b>UV</b>	:	Ultravioleta
<b>IV</b>	:	Infravermelho
<b>PF</b>	:	Ponto de Fusão
<b>KBr</b>	:	Brometo de Potássio
<b>NaCl</b>	:	Cloreto de Sódio

## 1 RESUMO

*Croton urucurana* Baillon é uma árvore encontrada no Brasil nos estados da Bahia, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Preparações desta planta são usadas comumente como agentes anti-inflamatório, cicatrizantes e antireumático.

Estudos fitoquímicos realizados com *C. urucurana* revelaram a presença dos esteróis campesterol, beta-sitosterol, stigmasterol, do ácido acetil-areulítico, catequina, galocatequina e de três diterpenos do tipo clerodano. Neste trabalho objetivou-se realizar um novo estudo fitoquímico desta espécie, com orientação para o isolamento de diterpenos.

Como material vegetal, utilizou-se as cascas do *Croton urucurana*, que foram submetidas a macerações exaustivas com n-hexano, acetato de etila e etanol, resultando em três extratos: hexânico, acetato de etila e hidroalcoólico.

O extrato acetato de etila foi submetido a um fracionamento cromatográfico, resultando em 31 novas frações. Destas, três frações foram estudadas mais profundamente.

Da primeira fração, foi isolado uma mistura de esteróis, os quais foram identificados por cromatografia gasosa como sendo campesterol, stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

A segunda fração, que apresentava perfil em CCD compatível ao dos diterpenos, foi submetida a análises de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , que mostraram a necessidade de melhorar a purificação da amostra. Sendo assim, realizou-se um novo fracionamento cromatográfico, que não forneceu o isolamento do diterpeno procurado. Contudo, para a terceira fração, os resultados espectroscópicos de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram bastante satisfatórios, permitindo a identificação de um novo diterpeno na espécie. A elucidação estrutural foi realizada com auxílio dos espectros COSY, HMQC e HMBC.

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 Produtos Naturais**

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Analisando a história do desenvolvimento das civilizações, Oriental e Ocidental, inúmeros exemplos da utilização de recursos naturais são encontrados, tanto na medicina, como no controle de pragas e em mecanismos de defesa. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos pode ser considerado fator fundamental para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo <sup>[1]</sup>.

A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais-planta <sup>[1]</sup>.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouco ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes estas plantas são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. A toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial quando comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais. Isto, entretanto, não é verdade. Esta toxicidade é um problema sério e os efeitos adversos dos fitomedicamentos, as possíveis adulterações, a toxidez e as interações com outras drogas devem ser tratados com cautela. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da sua comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais <sup>[22]</sup>.

O uso potencial das plantas medicinais no combate a doenças, há muito vem sendo um desafio aos pesquisadores. As plantas são uma importante fonte de constituintes biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para desenvolvimento de fármacos. Apesar do aumento de estudos nesta área, dados de 1996 revelam que apenas 15 a 17% das plantas tiveram seus potenciais biológicos estudados<sup>[23]</sup>.

## 2.2 Referências Bibliográficas

### 2.2.1 Gênero *Croton*

*Croton* (Euphorbiaceae) é um dos maiores gêneros do reino vegetal, com quase 1300 espécies de ervas, arbustos e árvores que são elementos ecologicamente proeminentes e freqüentemente importantes na vegetação secundária nos trópicos e nos sub-trópicos em todo mundo<sup>[2]</sup>.

Muitas destas espécies são descritas como plantas medicinais, significando que as mesmas tiveram suas atividades biológicas avaliadas<sup>[3]</sup>. Realizando uma breve revisão a respeito do potencial biológico e terapêutico de diversas espécies de *Croton*, observa-se, como destaque, efeitos de relaxação de anéis da veia aorta para o *Croton schiedeanus*, principalmente relacionado à presença de diterpenos do tipo clerodano<sup>[4]</sup>. Outro estudo de atividade biológica bastante interessante foi o da avaliação da atividade moluscicida, realizado com a espécie *C. campestris*, que apresentou bons resultados no combate aos moluscos que atuam como intermediários do *Schistosoma haematobium*, causadores da esquistossomose<sup>[5]</sup>.

Estudando a espécie *C. celtidifolius*, nosso grupo encontrou resultados promissores para as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, com frações ricas em flavonóides e proantocianidinas<sup>[3][13][14]</sup>.

Atividades biológicas de grande relevância são também descritas nas pesquisas realizadas com óleos essenciais de diversas espécies de *Croton*. Como exemplos, encontram-se a atividade anticancerígena apresentada pelo

óleo extraído das folhas *C. flavens*<sup>[15]</sup>, antinociceptiva do *Croton sonderianus*<sup>[16]</sup> e efeitos cardiovasculares no óleo de *Croton zehntneri*<sup>[17]</sup>.

Além dos potenciais biológicos já citados, também são relatadas outras atividades como inseticida, antimicrobiana, antihelmíntica, antimalárica e leishmanicida. Vários tipos de venenos, usados por sociedades primitivas, também são atribuídos ao gênero *Croton*.<sup>[5]</sup>

Do ponto de vista fitoquímico, vários são os compostos ativos conhecidos nas plantas deste gênero; com destaque para os alcalóides, compostos fenólicos, esteróis, flavonas, proantocianidinas, taninos e terpenos<sup>[6]</sup>. Dentro desta última classe de compostos, os mais freqüentemente encontrados no gênero *Croton* aqueles terpenos do tipo diterpeno clerodano<sup>[7] [11] [20] [21]</sup>.

### 2.2.2 Espécie *Croton urucurana*

*Croton urucurana* Baillon é uma árvore encontrada no Brasil nos estados da Bahia, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Além do potencial biológico, a planta possui grande aproveitamento comercial visto que sua madeira é muito apreciada na fabricação de móveis e nas construções civil e naval<sup>[7]</sup>.

Suas cascas, quando cortadas, produzem uma seiva, de cor vermelho-sangue, muito intensa. É a esta característica peculiar da planta que o nome popular Sangra D'água faz referência<sup>[8]</sup>.

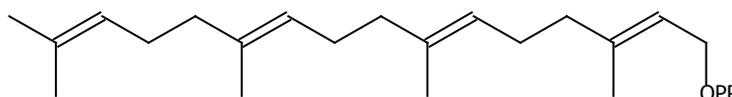
Preparações desta planta são comumente usadas como agentes anti-inflamatório, cicatrizantes e antireumático<sup>[7]</sup>. Existem também estudos relatando efeitos antihemorrágicos do *C. urucurana*<sup>[9]</sup>. Com o intuito de avaliar algum destes usos, a literatura relata que ensaios de atividade analgésica e antimicrobiana foram realizados, com resultados muito incentivadores<sup>[8]</sup>.

Estudos fitoquímicos realizados com *C. urucurana* revelaram a presença dos esteróis campesterol, beta-sitosterol, stigmasterol, do ácido acetil-areulítico, catequina, galocatequina e de três diterpenos do tipo clerodano<sup>[7]</sup>.

A significância biológica, relatada na literatura e o fato de que poucos estudos químicos e/ou biológicos terem sido reportados sobre esta espécie, justificam o interesse sobre esta planta [8].

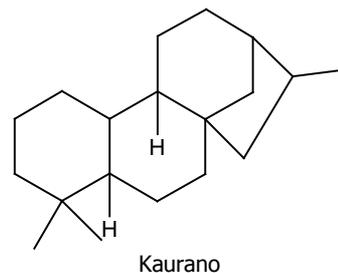
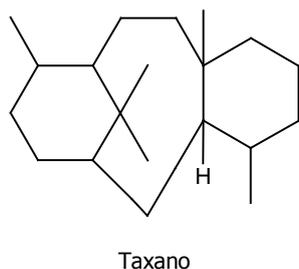
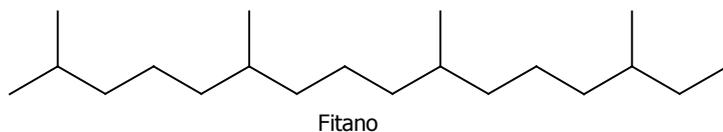
### 2.2.3 Diterpenos

Diterpenos são, dentro da classe dos terpenos, compostos  $C_{20}$ , cuja forma estrutural é bastante diversificada, sendo derivados do geranylgeranyl pirofosfato<sup>[18]</sup> (Figura 1).



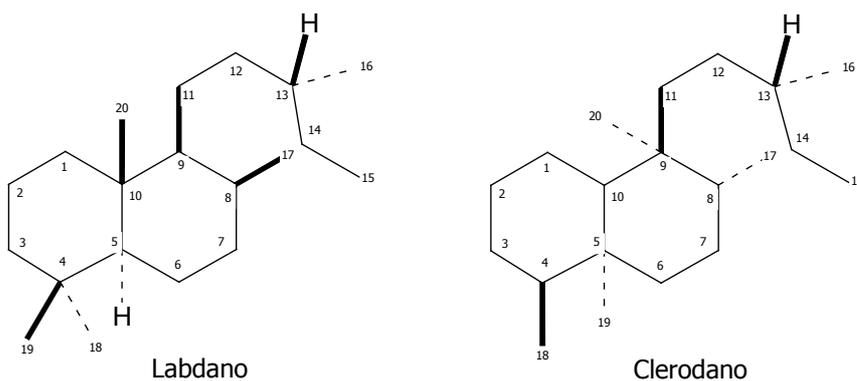
**Figura 1:** Estrutura do geranylgeranyl pirofosfato

Existem, basicamente, sob a forma de dois grupos, diterpenos acíclicos e cíclicos, os quais possuem muitas variações na estrutura (Figura 2) e são classificados de acordo com sua origem biogenética<sup>[18]</sup>. Uma forma de investigar a estrutura dos diterpenos é através da regra do isopreno, que diz que os esqueletos estruturais dos terpenos são formalmente divisíveis em “unidades de isopreno”, agrupadas de maneira a formar diterpenos com diversas estruturas<sup>[19]</sup>. Esta possibilidade produz inúmeros tipos de esqueletos, sendo que a literatura relata 22 tipos como sendo os mais importantes<sup>[19]</sup>.



**Figura 2:** Exemplos de esqueletos de diterpenos

Em termos de números, os labdanos (Figura 3) constituem o maior grupo de diterpenos, somando cerca de 16% de todos os diterpenos conhecidos. A partir do rearranjo dos labdanos surgem novos esqueletos diterpênicos, sendo que os esqueletos clerodanos são os de maior importância <sup>[19]</sup> (Figura 3).

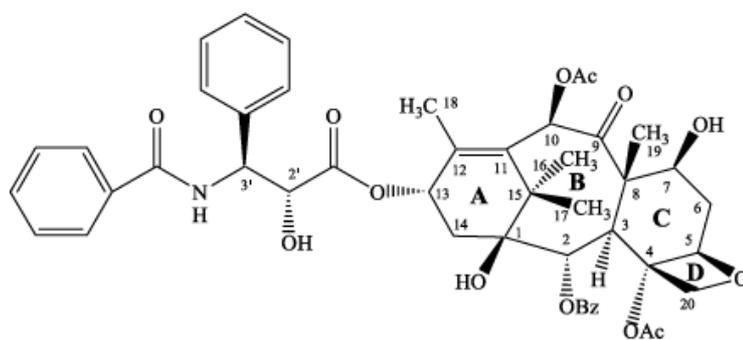


**Figura 3:** Esqueletos labdano e clerodano

Os diterpenos são amplamente distribuídos nos reinos animal e vegetal, tanto em ambientes terrestres quanto marinhos. No reino vegetal, eles ocorrem em muitas famílias de plantas superiores. Resinas de coníferas (*Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Taxodiaceae* e *Podocarpaceae*) são especialmente ricas em

diterpenos. Igualmente ricas são as resinas de angiospermas, assim como aquelas obtidas das famílias *Cistaceae*, *Leguminosae* e *Burseraceae*. Diterpenos também são largamente difundidos nas famílias *Labiatae* e *Euphorbiaceae* [19].

Figuram, dentro dos diterpenos, inúmeros compostos naturais de aplicação terapêutica. Um exemplo é o taxol (Figura 4), também conhecido como paclitaxel, composto obtido a partir do *Taxus brevifolia* Nutt (Taxodiaceae), que apresenta uma elevada eficácia no tratamento de alguns tipos de câncer [12].



**Figura 4:** Estrutura do taxol

Como ocorre em outras classes de produtos naturais, normalmente um nome trivial baseado em pesquisas biológicas é designado a um novo diterpeno. Este nome também pode ser derivado da família, gênero, espécie ou nome popular da planta. É sugerido, entretanto, que nomes semi-sistemáticos baseados em estruturas similares já conhecidas, sejam utilizados [19].

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- ❖ O presente trabalho tem como objetivo a avaliação fitoquímica da espécie vegetal *Croton urucurana*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Isolar compostos, com enfoque em diterpenos, a partir dos extratos obtidos das cascas da planta *Croton urucurana*;
- ❖ Identificar e caracterizar estruturalmente os diterpenos isolados, através de ensaios espectroscópicos, como análise de IV, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C;
- ❖ Dominar e aprimorar os conhecimentos das técnicas de isolamento, purificação e identificação de compostos de origem vegetal, assim como interpretar os resultados obtidos.

## **4 MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 Substâncias utilizadas**

O material vegetal utilizado neste trabalho foi coletado no município de Dourados, MS, em fevereiro de 2005. A planta foi identificada por comparação com uma exsicata que está depositada no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com o código 5009.

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).

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna, utilizou-se sílica gel como superfície adsorvente, na granulometria de 0,063-0,200mm. O sistema de eluentes utilizado foram misturas de n-hexano e acetato de etila, com aumento gradual da polaridade (0 a 100% AcOEt).

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram usadas cromatoplasmas de alumínio revestidas com gel de sílica de 0,2mm de espessura. Todas as placas cromatográficas foram visualizadas, primeiramente, com lâmpada de UV (comprimento de onda de 250 e 366nm), com posterior revelação em anisaldeído-sulfúrico, seguido de aquecimento.

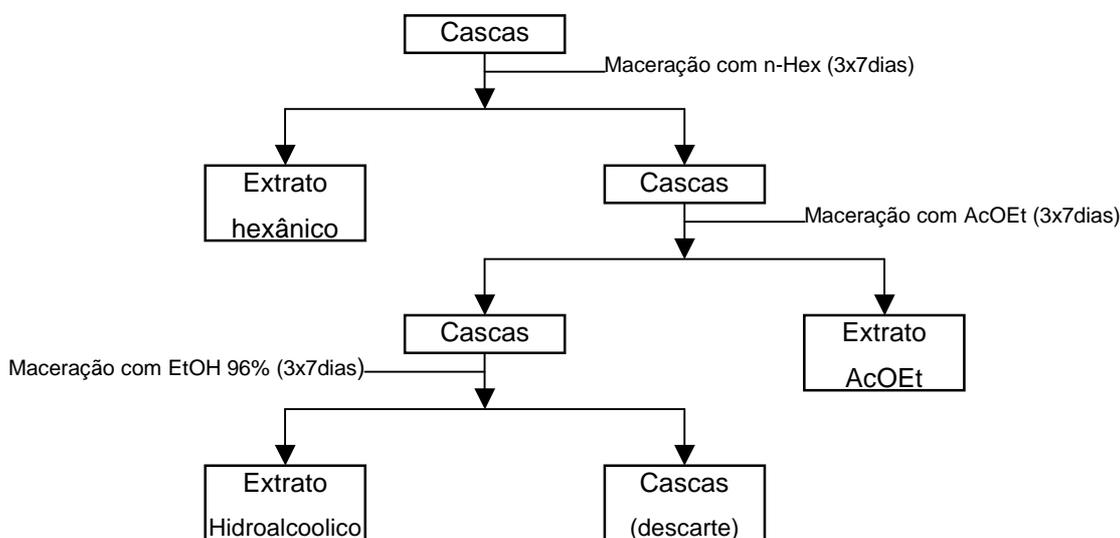
### **4.2 Equipamentos**

A análise de cromatografia gasosa (CG) foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 14B, com coluna LM-5 (5% fenil). Os pontos de fusão (PF) foram determinados em aparelho da Microquímica APF-301, sendo que não sofreram nenhum tipo de correção. Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr anidro de grau espectroscópico e em filme sobre janela de NaCl, com leituras na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Perkin Elmer FT 16PC.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em aparelho Varian, operando em 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais  $\delta$  (ppm), utilizando tetrametilsilano como referencial interno. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singleto), d (duplete), t (tripleto) e m (multiplete).

#### 4.3 Preparação dos extratos de *Croton urucurana*

As cascas de *C. urucurana* (1,20 kg) foram trituradas e submetidas sucessivas macerações exaustivas com n-hexano, acetato de etila e álcool etílico hidratado, conforme o fluxograma abaixo (Figura 5), obedecendo ao princípio de ordem crescente de polaridade do solvente.



**Figura 5:** Fluxograma de preparação dos extratos

Após o período de maceração, os extratos foram concentrados através da evaporação dos solventes em rota evaporador.

#### 4.4 Fracionamento do extrato acetato de etila

Parte do extrato AcOEt (10,01g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) empacotada com uma camada de 15,0cm de altura por 4,5cm de diâmetro de sílica gel, como fase estacionária. Ao topo desta coluna a amostra foi aplicada sob a forma de uma pastilha de sílica de 2,0cm de altura (Tabela 1).

**Tabela 1:** Sistema de eluição empregado na cromatografia em coluna 1

Fração	Eluente (%)		Fração	Eluente (%)	
	n-Hex	AcOEt		n-Hex	AcOEt
<b>0</b>	98	2	<b>8</b>	84	16
<b>1</b>	97	3	<b>9</b>	80	20
<b>2</b>	96	4	<b>10 - 12</b>	76	24
<b>3</b>	95	5	<b>13 - 18</b>	73	27
<b>4</b>	93	7	<b>19 - 24</b>	70	30
<b>5</b>	91	9	<b>25 - 28</b>	65	35
<b>6</b>	89	11	<b>29</b>	50	50
<b>7</b>	87	13	<b>30</b>	0	100

Deste fracionamento cromatográfico, foram obtidas 31 frações de 100 mL, as quais foram analisadas por CCD. As frações que tiveram seus perfis cromatográficos semelhantes foram, então, reunidas.

Com a reunião das frações semelhantes, restaram quinze frações, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2:** Esquema de reunião das frações

Fração	Nova fração	Fração	Nova fração	Fração	Nova fração
0	0	11	11	22	22
1	1-2	12	12	23	23-24
2		13	13-16		
3	14				
4	15				
5	16				
6	6-7	17	17-21		
7		18			
8	19				
9	20				
10	21	22		22	
					23
				24	23-24
				25	25
				26	26
				27	27-28
				28	
				29	29-30
				30	

Após a reunião das frações 13, 14, 15 e 16 (Fr 13-16), procedeu-se a tentativa de purificação por recristalização em n-hexano, resultando na obtenção de um composto cristalino (0,13g), denominado de Cr-1. O mesmo foi submetido as análises de ponto de fusão, infravermelho e cromatografia gasosa.

As frações 23 e 24 foram reunidas, visto que, após a realização de cromatografia de camada delgada, com revelação em anisaldeído sulfúrico, ambas apresentavam o mesmo perfil. A nova fração 23-24 (0,68g) apresentou-se na forma de um óleo amarelo, sendo nomeada de Cr-2. Foi submetida à análise de espectroscopia de infravermelho e RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT. A partir dos resultados espectroscópicos do Cr-2, verificou-se que se tratava de uma mistura. Na tentativa de isolar o composto de interesse, esta fração foi submetida a um segundo fracionamento cromatográfico (CC 2), em coluna de sílica gel de 2,5 x 15,0 cm. Este segundo fracionamento resultou em 18 frações (Tabela 3). Foram obtidos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da quarta fração (38,1mg), nomeada de Cr-2.1.

**Tabela 3:** Sistema de eluição empregado na cromatografia em coluna 2

Fração	Eluente (%)	
	n-Hex	AcOEt
<b>1</b>	90	10
<b>2</b>	90	10
<b>3 – 6</b>	85	15
<b>7 – 9</b>	83	17
<b>10 – 11</b>	80	20

Fração	Eluente (%)	
	n-Hex	AcOEt
<b>12 - 14</b>	76	24
<b>15</b>	72	28
<b>16</b>	68	32
<b>17</b>	60	40
<b>18</b>	0	100

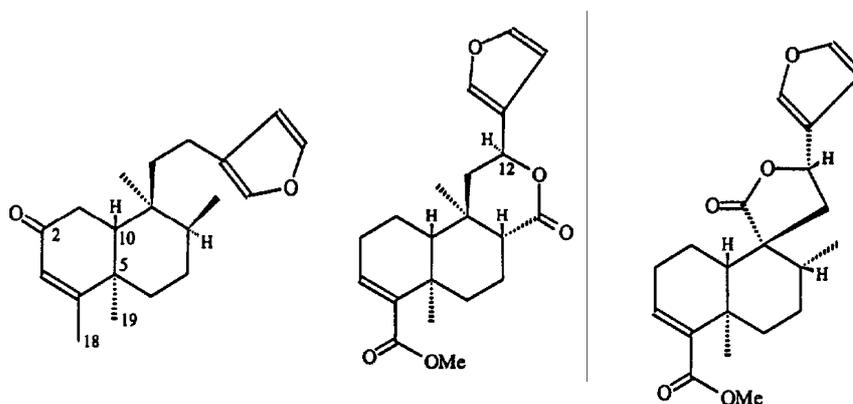
As frações 27 e 28 foram reunidas (0,12g) com base na análise por CCD. A nova fração foi purificada através de sucessivas lavagens com acetona, até que se observou a formação de um precipitado sólido incolor (30,0mg), nomeado de Cr-3. Este teve seu ponto de fusão determinado e foi submetido às análises de infravermelho, cromatografia gasosa e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extratos

Após a concentração dos extratos o rendimento obtido para o extrato hexânico (E-H) foi de 6,88g (0,60%). Já para o extrato obtido da maceração com acetato de etila (E-AcOEt), obteve-se 19,44g (1,62%) de rendimento. O extrato hidroalcolico (E-EtOH) forneceu 14,81g (1,23%) de rendimento.

Ao realizar uma CCD comparando os extratos brutos (E-H, E-AcOEt e E-EtOH) com os padrões dos diterpenos 15,16-epoxy-3,13(16)-clerodatrieno-2-one, 12-epi-metil-barbascoato e sonderianino <sup>[7]</sup> (Figura 6) anteriormente isolados e identificados do *C. urucurana*, por nosso grupo de pesquisa, observou-se que o E-AcOEt era o que oferecia a maior perspectiva de isolamento e purificação dos compostos de interesse ou de outros bastante semelhantes. Assim sendo, selecionou-se este extrato para realização deste trabalho.



**Figura 6:** Diterpenos previamente isolados das cascas de *C. urucurana*<sup>[7]</sup>

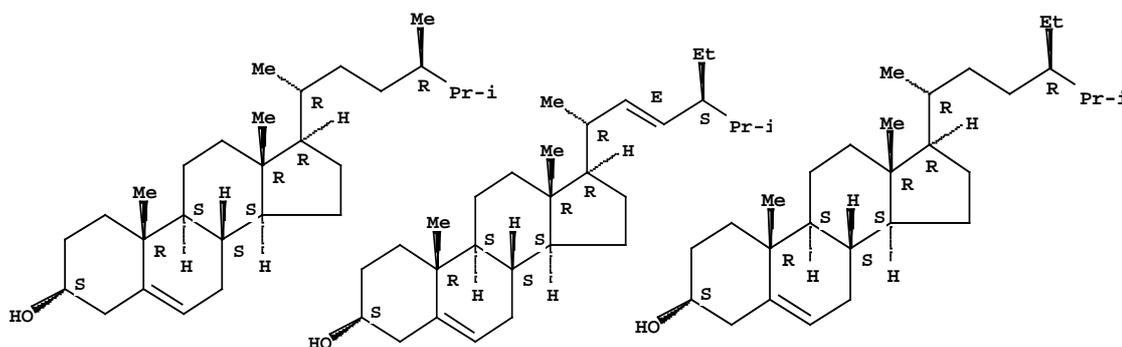
### 5.2 Caracterização e identificação do composto Cr-1

O composto Cr-1 (0,13g), resultante da recristalização das subfrações 13-16 da CC 1, foi obtido na forma de cristais incolores do tipo agulha, com ponto

de fusão entre 132 e 138 °C. Este intervalo de 6°C na temperatura sugere uma possível contaminação do composto ou uma mistura de compostos, o que vai de contra a forma cristalina bem definida do composto.

No espectro de infravermelho (Anexo 1) observa-se uma banda de absorção em 3427 cm<sup>-1</sup>, dentro da região de estiramento de ligações O-H (3550 – 3200 cm<sup>-1</sup>) [10]. A presença de um pico intenso em 2936 cm<sup>-1</sup> indica a existência de muitas ligações C-H, visto que esta é uma região característica de deformações axiais deste tipo de ligação. Estas duas bandas, somadas a ausência de bandas de carbonila em 1800 – 1600 cm<sup>-1</sup> [10], e um perfil bem familiar indicam que o composto Cr-1 deva se tratar de uma estrutura esteroidal. A presença de compostos desta classe já era descrita na literatura, tanto no gênero [3] [6] [11] quanto na espécie [7] [8].

A fim de avaliar se Cr-1 é realmente um esteróide ou uma mistura deles, a fração foi submetida a análise por cromatografia gasosa (Anexo 2). No cromatograma de Cr-1 se observam três picos, com tempos de retenção de 29,923 minutos, 30,650 minutos e 31,952 minutos, compatíveis com os índices de retenção de esteróides. Segundo Peres e colaboradores [7], um estudo fitoquímico da espécie *Croton urucurana* revelou a presença dos esteróis campesterol, stigmasterol e β-sitosterol (Figura 7) que geralmente são isolados sob a forma desta mistura. A co-injeção da fração Cr-1 com uma mistura dos padrões de campesterol, stigmasterol e β-sitosterol resultou na obtenção de uma cromatograma onde se observa a perfeita co-eluição dos três padrões com os picos da amostra, confirmando assim que Cr-1 se trata da mistura destes três esteróides, nas proporções de 6,668%, 34,360% e 58,971%, respectivamente.



**Figura 7:** Estruturas do campesterol, stigmasterol e β-sitosterol

### 5.3 Caracterização do composto Cr-2

A fração Cr-2 foi obtida sob a forma de um óleo amarelo escuro (0,68g), sendo analisada através das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Devido ao estado físico da amostra, não foi possível determinar o seu ponto de fusão e o espectro de infravermelho, diferente dos outros compostos, foi realizado em filme sobre janela de NaCl.

No espectro de infravermelho (Anexo 3), observa-se a presença de uma banda de intensidade média em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao estiramento de ligação O-H e um forte pico de absorção em  $2946\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de ligação C-H. Na região de absorção das carbonilas, aparece uma única banda ( $1717\text{ cm}^{-1}$ ), bastante intensa e larga. As características desta banda não permitem afirmar a existência de uma única carbonila no composto, bem como, não possibilitam a distinção do grupo funcional que ela pertence. No entanto, ao analisar o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Anexo 5) observou-se a presença de três carbonilas: uma em 205,807 ppm, sinal característico de carbonila pertencente a um sistema ciclohexanona, e as outras duas em 172,253 e 169,402 ppm, características de carbonila de éster.

A análise conjunta da cromatografia de camada delgada e dos espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 4) e RMN  $^{13}\text{C}$  sugere que o composto Cr-2 seja um diterpeno do tipo clerodano contendo um anel furano, já que, além da semelhança na CCD comparativa com os padrões, se observa a existência de diversos carbonos abaixo de 50 ppm, região característica de carbonos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  ( $\text{Csp}^3$ ). Esses dados somados aos outros que serão apresentados a seguir, estão de acordo com o perfil da estrutura dos diterpenos furânicos, porém, devido à impureza da amostra, um detalhamento estrutural mais avançado fica comprometido.

Os sinais 7,343 e 7,391 ppm do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (expansão) indicam a presença de dois hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  vizinhos a um átomo bastante eletronegativo. O sinal em 6,369 indica um outro H também ligado ao um carbono  $\text{sp}^2$ , porém menos desblindado. Analisando estes sinais, observa-se a existência de um sistema onde dois átomos de carbonos  $\text{sp}^2$  estão ligados a

um heteroátomo eletronegativo, por exemplo, oxigênio, sugerindo a existência de um anel furânico monossustituído.

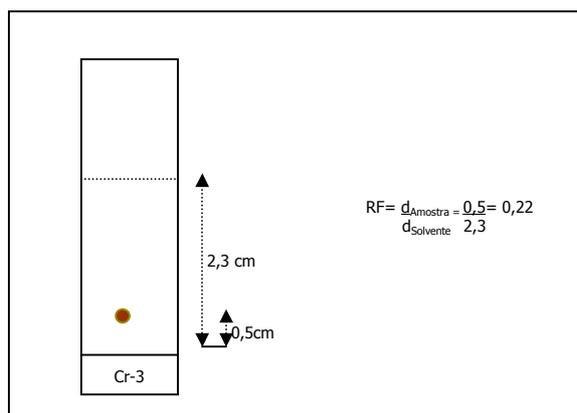
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com DEPT (Anexo 6) apresenta sinais em 139,739 e 143,978 ppm relativos a dois C-H  $\text{sp}^2$  ligados ao oxigênio. Um segundo tipo de C-H  $\text{sp}^2$  aparece absorvendo em 108,771 ppm. Também se observa a existência de um carbono quaternário em 125,692 ppm. Considerando os resultados apresentados e sabendo da existência de furano-clerodanos no *C. urucurana*, realizou-se uma comparação dos dados da literatura<sup>[7]</sup> com os do Cr-2, confirmando-se a hipótese da existência de um anel furano no composto.

Na tentativa de purificar Cr-2 para obter resultados mais claros, foi realizada uma segunda cromatografia em coluna (CC 2). As frações da CC 2 foram submetidas ao mesmo procedimento de comparação via CCD, realizado com a CC1. Observou-se que apenas a quarta fração (38,1mg), sob a forma de um óleo amarelado, apresentava uma única mancha em cromatografia de camada delgada.

Comparando os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para Cr-2.1 (Anexo 7 e 8) com os do composto de origem (Cr-2) observa-se que os sinais referentes ao anel furano desapareceram. Isto nos leva a acreditar que o Cr-2.1 não é o diterpeno cujo anel furano foi identificado nos espectros do Cr-2.

#### **5.4 Caracterização e identificação do composto Cr-3**

O composto Cr-3, obtido na forma de cristais incolores (30,0mg), apresenta ponto de fusão de 156 °C. A CCD do mesmo apresenta apenas uma mancha, de  $\text{RF} = 0,22$  sendo o eluente uma mistura de n-hexano e acetato de etila na proporção de 7:3, respectivamente (Figura 8), indicando que se trata de um composto puro. A confirmação deste indício veio com o resultado da cromatografia gasosa (Anexo 9), visto a existência de um único pico, com tempo de retenção de 25,112 minutos.



**Figura 8:** Esquema da CCD Cr-3

Analisando o resultado da espectroscopia de infravermelho (Anexo 10) observa-se a uma banda pequena na região de  $3441\text{ cm}^{-1}$ , relativo ao estiramento da ligação O-H. Na região referente aos estiramentos da ligação C-H visualizam-se duas bandas, sendo que a mais intensa, em  $2952\text{ cm}^{-1}$ , indica ligação C-H de sistemas não aromáticos e a outra, menos intensa, em  $3151\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao estiramento C-H de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^2$ .

Na região de absorção de carbonilas, observa-se dois máximos de absorção; um em  $1736\text{ cm}^{-1}$ , de maior intensidade e outro em aproximadamente  $1700\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídos a presença de carbonilas de ésteres e cetona exocíclica, respectivamente.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 11) aparecem dois sinais em 7,415 e 7,441 ppm que indicam a presença de dois átomos de hidrogênio ligados a dois carbonos  $\text{sp}^2$  de anel aromático ou carbonos  $\text{sp}^2$  vizinhos a um átomo eletronegativo, como oxigênio, por exemplo. Estes sinais, juntamente ao sinal em 6,410 ppm, indicam a presença de um anel furano (sistema aromático). No espectro aparecem ainda vários outros sinais entre 1,0 e 2,0 ppm sugerindo a presença de grupos CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, e um sinal em aproximadamente 5,49 ppm relativo a um hidrogênio de um CH endocíclico ligado a oxigênio e vizinho a um CH<sub>2</sub>.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Anexo 12), aparecem 21 carbonos e com a ajuda do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT (Anexo 13) consegue-se contar 24 hidrogênios

ligados nos carbonos, de onde se deduz a seguinte fórmula molecular expandida:  $2\text{CH}_35\text{CH}_28\text{CH}6\text{C}6\text{O}$ . O cálculo do índice de deficiência de hidrogênios<sup>[10]</sup> deste composto indica a existência de 9 insaturações.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  confirma a existência do anel furano devido a presença dos sinais em 139,648, 144,145 e 108,650 ppm, além do sinal em 125,789 ppm referente a um carbono  $\text{sp}^2$  quaternário. O sinal para CH em 108,650 ppm, por estar mais blindado, deve estar em uma posição com alta densidade eletrônica.

Além destes sinais, neste espectro, aparecem outros três de carbono quaternário, provavelmente de carbonila de ácido carboxílico ou éster em 163,264 e 171,867 ppm e carbonila de cetona em 204,268 ppm.

Outras absorções de destaque foram o sinal referente a CH oxigenado em 71,888 ppm que, juntamente com a carbonila em 171,867 ppm, indicam a presença de um anel  $\delta$ -lactona e a metoxila em 69,643 ppm, que juntamente com a carbonila em 168,264 ppm, indicam a presença de um éster metílico na estrutura.

Considerando os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que Peres e colaboradores<sup>[7]</sup> relataram e comparando estas informações com os resultados do Cr-3 (Tabela 4), partiu-se para a elucidação estrutural, com orientação para uma estrutura diterpênica do tipo clerodano, contendo um sistema constituído por anel furano e uma  $\delta$ -lactona, denominado de 5-(3-furil)-  $\delta$ -valerolactona, além de um éster metílico e uma ciclohexanona.

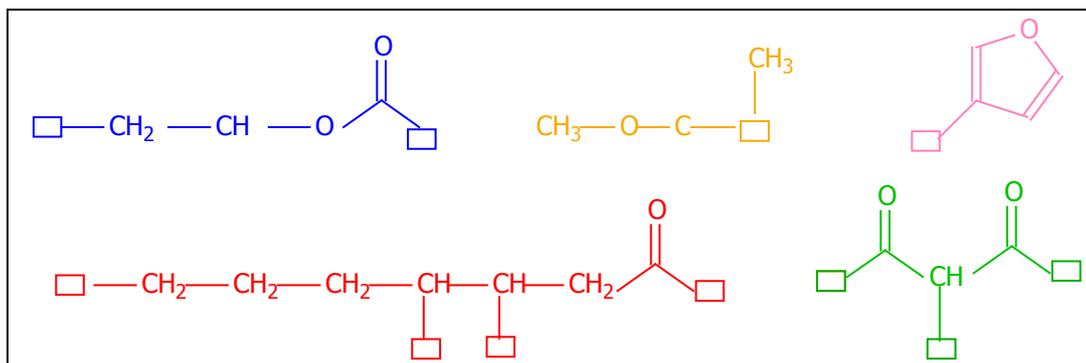
**Tabela 4:** Valores de comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para Cr-3

Posição	Literatura		Cr-3	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>1</b>	17,4	1,65 m	18,4	2,10 m
<b>2</b>	26,8	2,35 m	22,4	2,00 dd (J= 2,8 e 14,4)
<b>3</b>	137,1	6,63 m		
<b>4</b>	141,2			
<b>5</b>	36,7		37,7	1,34 td (J=13,4 e 5,0) e 1,90 m
<b>6</b>	34,8	2,55 m e 1,17 dd (J= 13,0 e 6,0)		
<b>7</b>	18,3	1,75 m		
<b>8</b>	51,2	2,16 m	51,6	2,23 dd (J= 12,0 e 2,0)
<b>9</b>	37,0		37,3	-
<b>10</b>	52,5	1,28 dd (J= 13,0 e 6,0)	54,2	1,60 dd (J= 12,4 e 10,4)
<b>11</b>	44,0	2,40 d (J=6,0) e 1,60 m	44,6	1,75 t (J= 12,4) e 2,36 dd (J= 13,2 e 5,6)
<b>12</b>	71,8	5,53 dd (J=11,0 e 6,0)	71,8	5,49 dd (J= 10,8 e 5,2)
<b>13</b>	125,9		125,8	-
<b>14</b>	108,5	6,42 s (largo)	108,6	6,41 s
<b>15</b>	143,8	7,42 t (J=1,7)	144,1	7,44 s
<b>16</b>	139,3	7,45 s (largo)	139,6	4,41 s
<b>17</b>	172,4		171,9	-
<b>18</b>	167,3		168,3	-
<b>19</b>	20,9	1,33 s		
<b>20</b>	15,5	1,10 s	15,1	1,11 s
<b>OMe</b>	51,3	3,70 s	51,9	3,68 s

No intuito de possibilitar a completa elucidação da estrutura deste diterpeno, foram obtidos os espectros bidimensionais COSY, HMQC e HMBC (Anexos 14, 15 e 16).

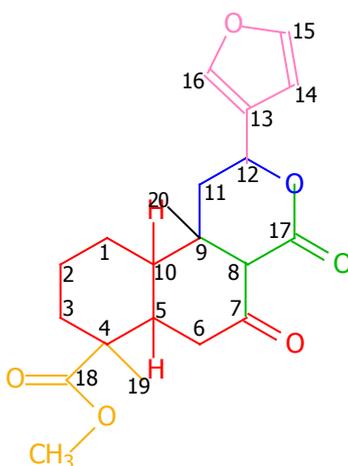
O espectro HMQC possibilitou fazer a atribuição de todos os deslocamentos químicos do hidrogênios e dos carbonos, conforme explicitado na tabela 4. Estas informações juntamente com o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , permitiram a identificação de todos dos hidrogênios e o cálculo de suas constantes de acoplamento (J).

Com a análise das conectividades H-H obtidas no espectro COSY e com os dados já mencionados, foi possível desenhar várias estruturas parciais, conforme ilustrado na figura 9.



**Figura 9:** Estruturas parciais

Com a análise das conectividades C-H a longa distância, obtidas do espectro de HMBC, foi possível, então, realizar a união de todas as estruturas parciais compondo a estrutura diterpênica da figura 10.



**Figura 10:** Proposta estrutural

Esta é a proposta estrutural para o diterpeno isolado da fração 27-28. 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*.

## 6 CONCLUSÃO

Tendo em vista que os objetivos deste trabalho eram isolar, caracterizar e identificar metabólitos secundários, priorizando a busca por diterpenos, na espécie *Croton urucurana* é possível concluir que os mesmos foram alcançados.

Com a realização deste trabalho ficou comprovado que procedimentos cromatográficos simples e outras técnicas que avaliam as propriedades físicas, são de grande valia para a caracterização e identificação de compostos, principalmente daqueles que já são bastante difundidos na literatura, como foi o caso da misturas de esteróis.

Também se observou que para compostos desconhecidos estas técnicas são apenas ferramentas de apoio, tendo em vista o ocorrido com o composto Cr-2. Ou seja, fez-se uma purificação por cromatografia em coluna, resultando numa fração (Cr-2.1) que pela cromatografia de camada delgada, aparentava ser que o diterpeno furânico procurado nas frações 23-24, porém utilizando técnicas mais sofisticadas, como RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , observou-se que não se tratava do mesmo. Desta forma, deve-se seguir com os estudos destas frações a fim de isolar o diterpeno.

Conclui-se também, que para uma completa elucidação estrutural de compostos novos ou pouco conhecidos é necessário que se faça uso de técnicas mais elaboradas, como RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e suas correlações (COSY, HMQC e HMBQ), como ocorreu para o diterpeno isolado das frações 27-28. Como não há relatos deste composto na literatura, conclui-se que o mesmo trata de um composto inédito na espécie.

Cabe ressaltar que deve ser incentivada a continuação dos estudos com os outros extratos preparados e com as demais frações do extrato AcOEt, a fim de tornar a avaliação fitoquímica desta espécie mais rica em informações. Da mesma forma, deve investir na realização de um *screening* das propriedades farmacológicas do *Croton urucurana* em busca de suas potencialidades.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova, Vol. 29, Nº 2, 326-337, 2006.
2. Radulovic, N.; Mananjarsoa, E.; Harinantenaina, L.; Yoshinori, A. Essential oil composition of four Croton species from Madagascar and their chemotaxonomy. Biochemical Systematics and Ecology, Vol.34, 648-653, 2006.
3. Nardi, G. M.; DalBó, S.; Monache, F. D.; Pizzolatti, M. G.; Ribeiro-do-Valle, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). Journal of Ethnopharmacology, Vol. 107, 73-78, 2006.
4. Guerrero, M. F.; Puebla, P.; Carron, R.; Martin, M. L.; Roman, L. Vasorelaxant effect of new *neo*-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 94, 185 - 189, 2004.
5. Babili, F. El.; Fabre, N.; Moulis, C.; Fouraste, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncates* of *Croton campestris*. Fitoterapia, Vol. 77, 384-387, 2006.
6. Gupta, M.; Mazumder, U. K.; Vamsi, M. L. M.; Sivakumar, T.; Kandar, C. C.; Anti-steroidogenic activity of the two Indian medicinal plants in mice. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 90, 21-25, 2004.
7. Peres, M. T. L. P.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Monache, F. D. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. Phytochemistry, Vol. 29, Nº 1, 171-174, 1998.
8. Peres, M. T. L. P.; Monache, F. D.; Cruz, A. B.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana*

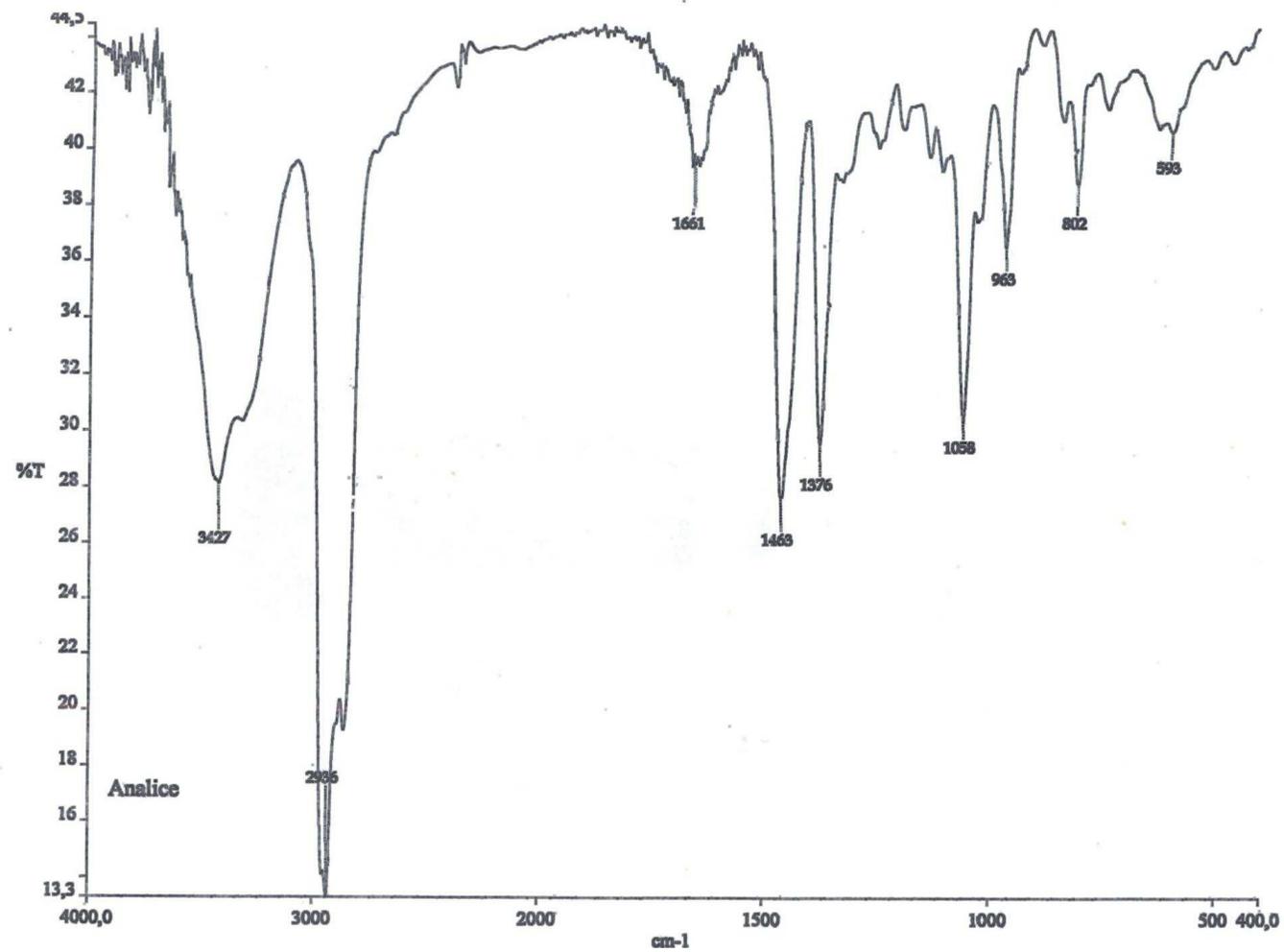
- Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 56, 223-226, 1997.
9. Esmeraldino, L. E.; Souza, A. M.; Sampaio, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine*, Vol. 12, 570–576, 2005.
  10. Silverstein, R. M.; Webster, F. X. Identificação espectrométrica de composto orgânicos. Editora LCT, 6ª edição, Rio de Janeiro, 2000.
  11. Ngadjui, B. T.; Folefoc, G. G.; Keumedjio, F.; Dongo, E.; Sondengam, B. L.; Connolly, J. D. Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, Vol. 51, 171-174, 1999.
  12. [www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/web\\_terpenos.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_terpenos.htm)  
Acessado em 12/12/2006
  13. DalBo, S.; Jürgensen, S.; Horst, H.; Soethe, D. N.; Santos, A. R. S.; Pizzolatti, M. G.; Ribeiro-Do-Valle, R. M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Vol. 85, 317–323, 2006.
  14. Nardi, G. M.; Siqueira Jr, J. M.; Monache, F. D.; Pizzolatti, M. G.; Ckless, K.; Ribeiro-do-Valle, R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Baillon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine*, Vol. 14, Issues 2-3, 115 – 122, 2007.

- 15.** Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F.; Legault, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 103, 99–102, 2006.
- 16.** Santos, F. A.; Jeferson, F. A.; Santos, C. C.; Silveira, E. R.; Rao, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. Life Sciences, Vol. 77, 2953–2963, 2005.
- 17.** Siqueira, R. J. B.; Magalhaes, P. J. C.; Cardoso, J. H. L.; Duarte, G. P.; Lahlou, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. Life Sciences, Vol. 78, 2365 – 2372, 2006.
- 18.** Nualkaew, N.; De-Eknamkul, W.; Kutchan, T. M.; Zenk, M. Geranylgeraniol formation in *Croton stellatopilosus* proceeds via successive monodephosphorylations of geranylgeranyl diphosphate. Tetrahedron Letters, Vol. 46, 8727 – 8731, 2005.
- 19.** Dev, S.; Misra, R. CRC handbook of Terpenoids – Diterpenoids. Volume II, CRC Press, 1985.
- 20.** Tane, P.; Tatsino, S.; Connolly, J. D. Crotomacrine, a new clerodane diterpene from the fruits of *Croton macrostachyus*. Tetrahedron Letters, Vol. 45, 6997 – 6998, 2004.
- 21.** Puebla, P.; Lopez, J. L.; Guerrero, M.; Carron, R.; Martin, M. L.; Roman, L. S.; Feliciano, A. S. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. Phytochemistry, Vol. 62, 551 – 555, 2003.
- 22.** Veiga, V. F. J.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, Vol. 28, Nº 3, 519-528, 2005.

- 23.** Soejarto, D. D. Biodiversity prospecting and Benefit sharing: perspectives from the field. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 51, 1-15, 1996.

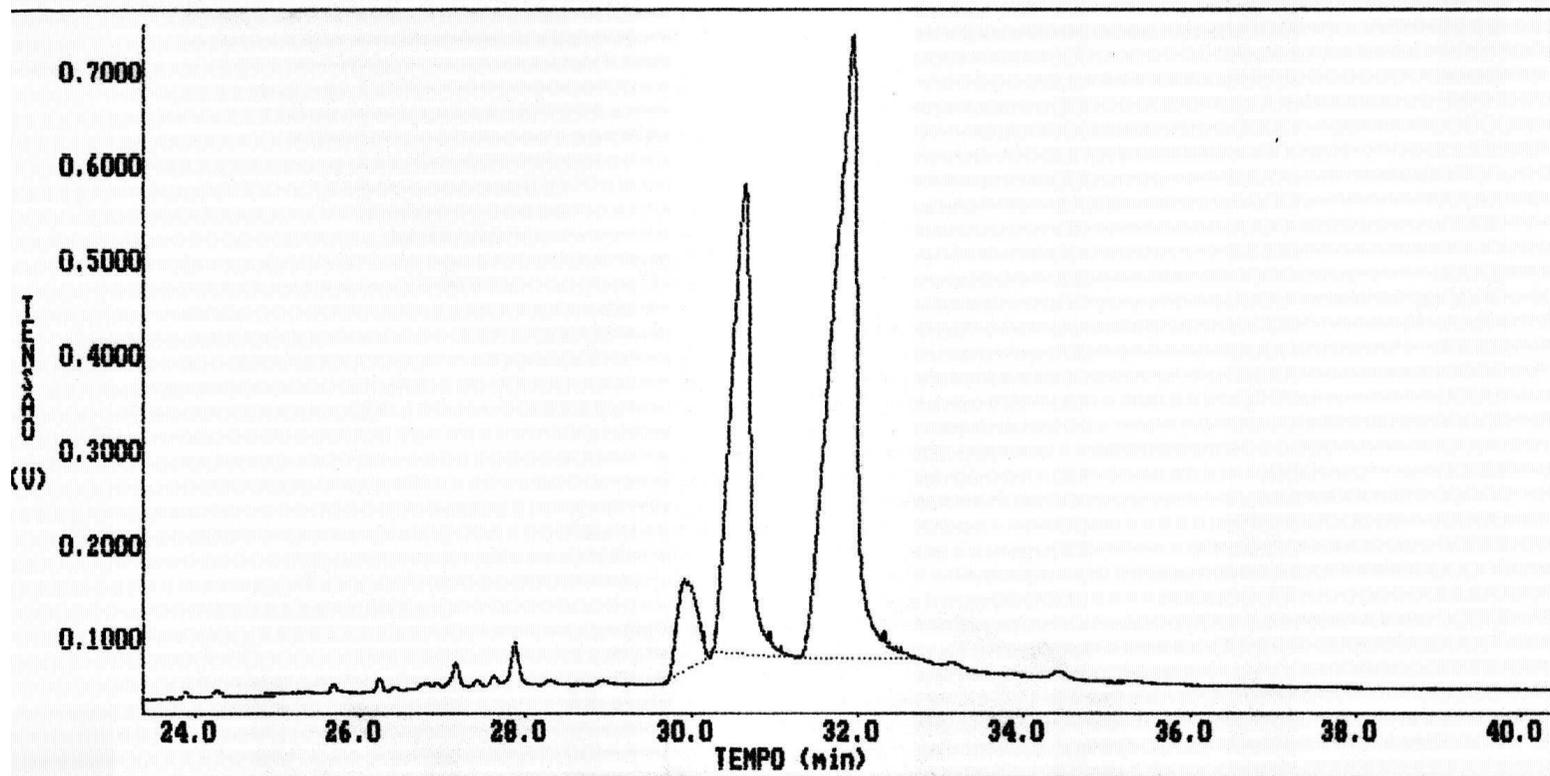
## 8 ANEXOS

### Anexo 1 – Espectro de Infravermelho do Cr-1

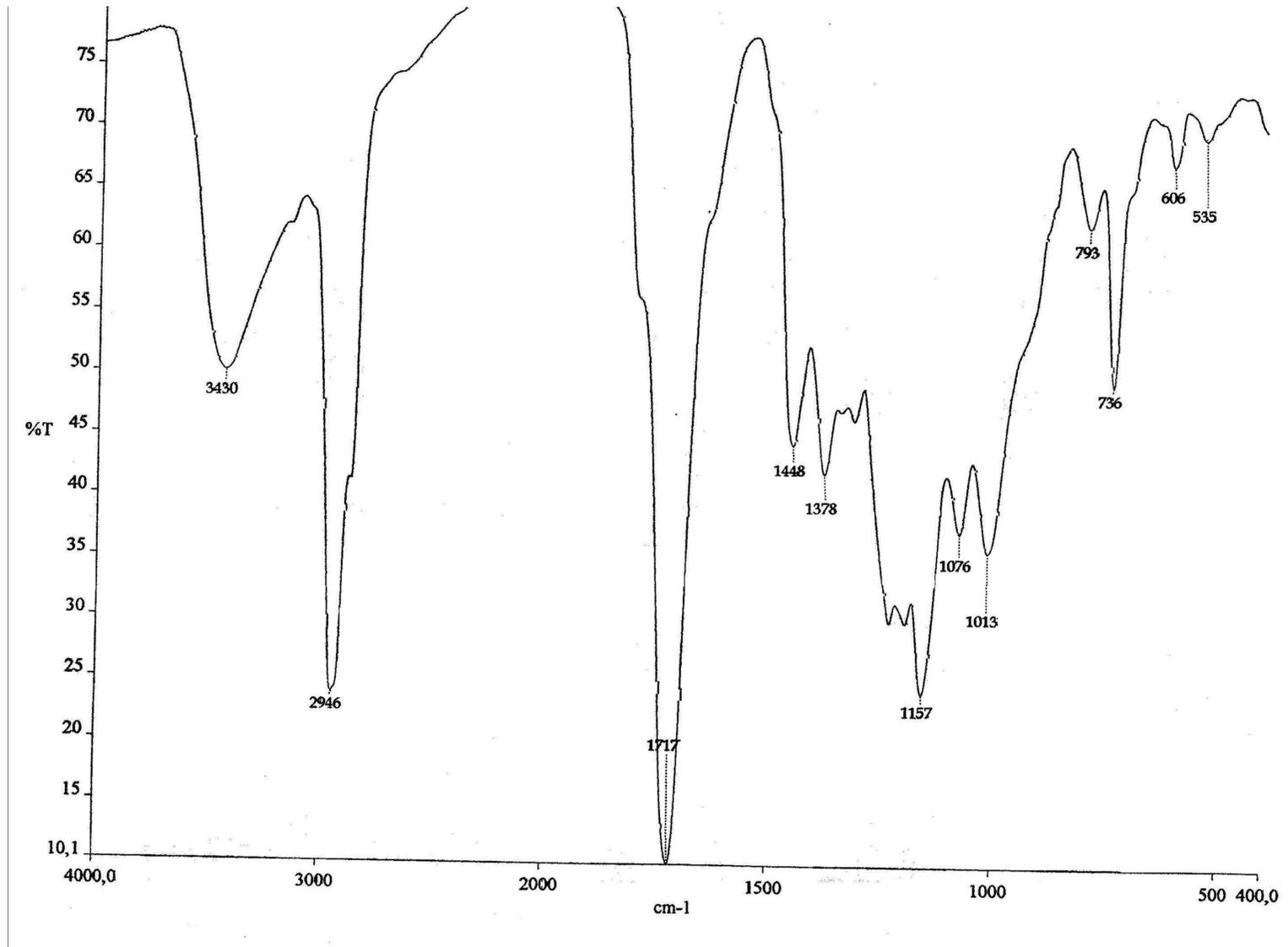


## Anexo 2 – Cromatograma do Cr-1

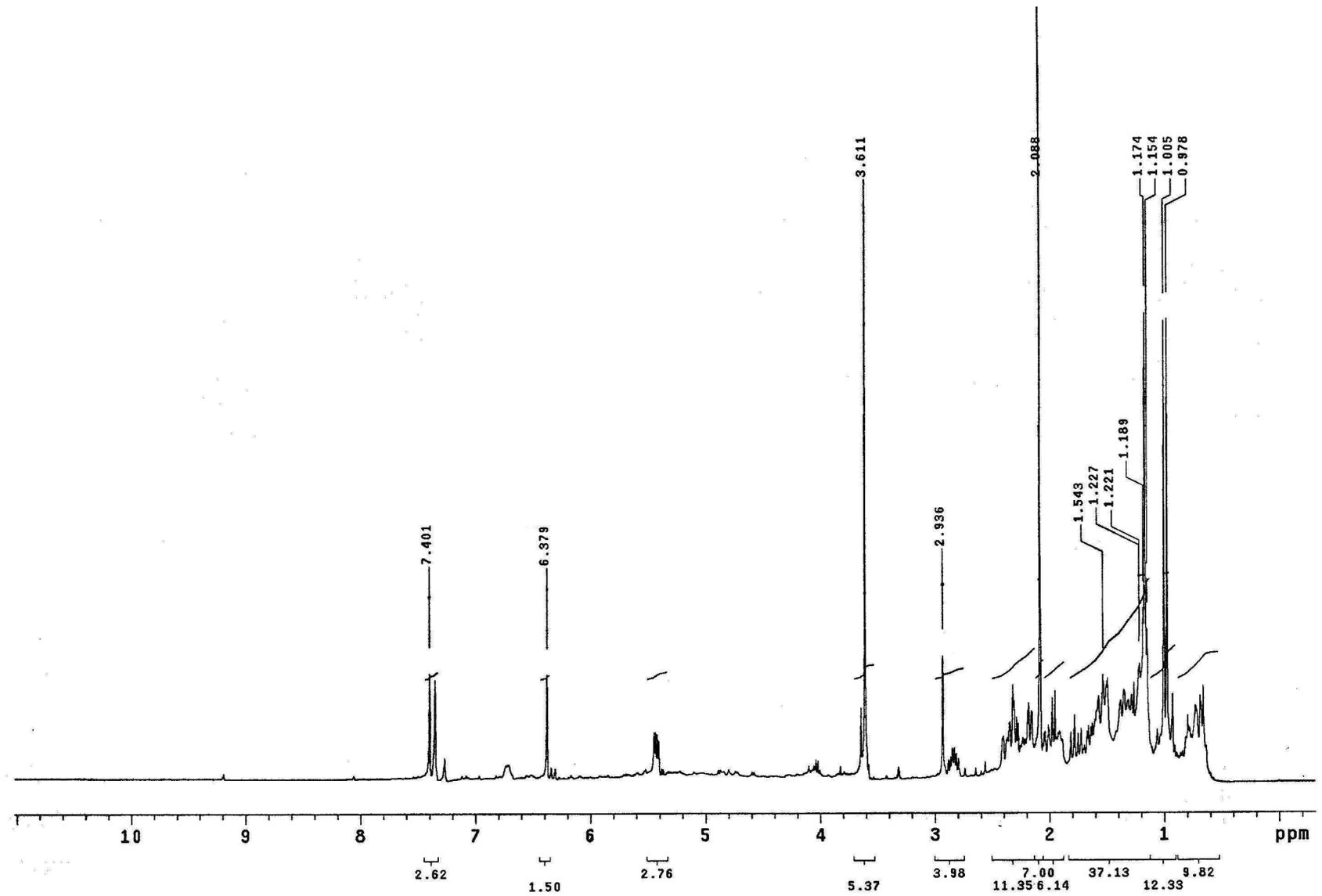
Nº	Nome	Tempo	Area	Area%	Altura	Altura%
1	SEM NOME	29.923	15.697	6.668	0.0969	7.73
2	SEM NOME	30.650	80.885	34.360	0.4981	39.73
3	SEM NOME	31.952	138.820	58.971	0.6587	52.54



### Anexo 3 – Espectro de Infravermelho do Cr-2

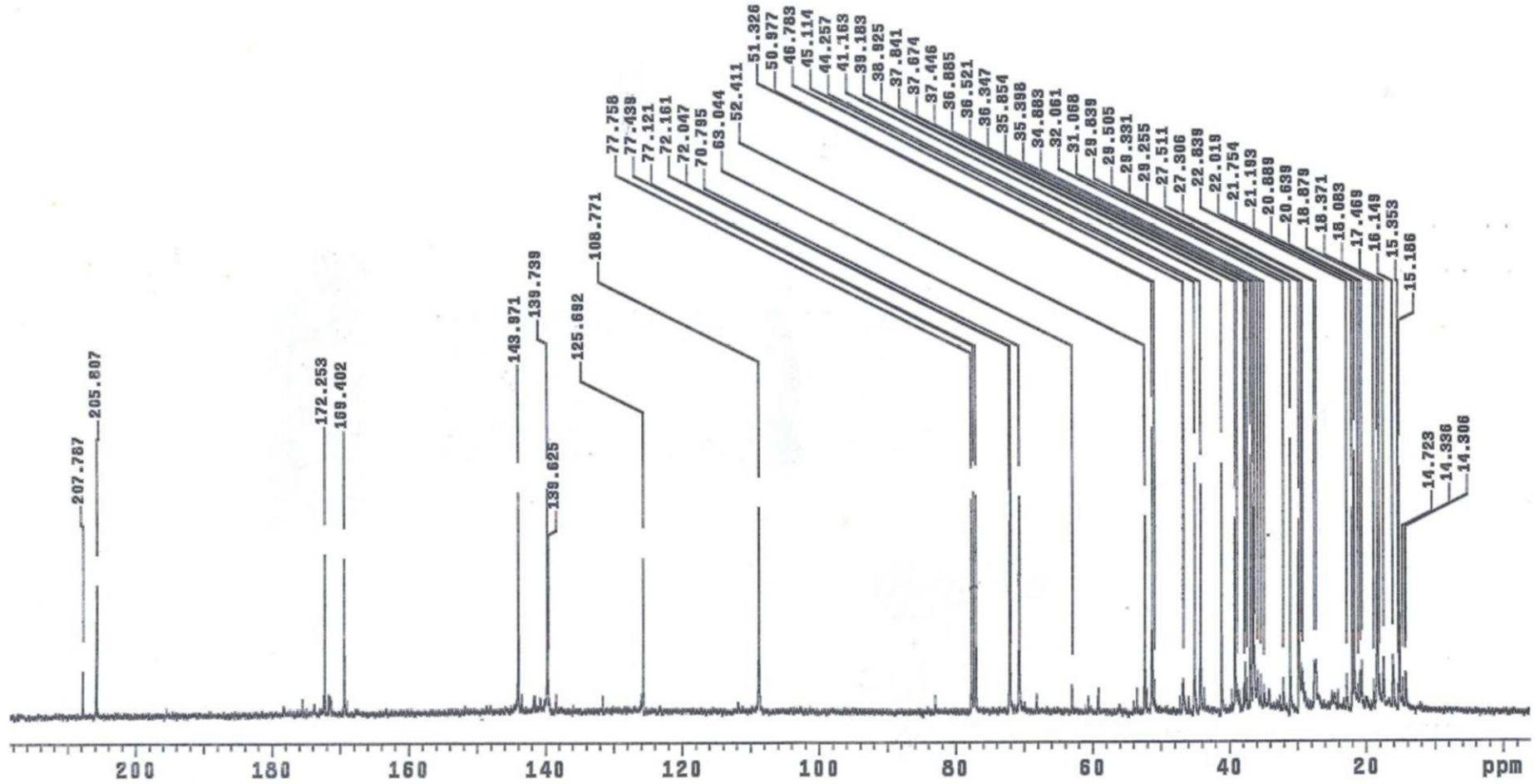


### Anexo 4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cr-2

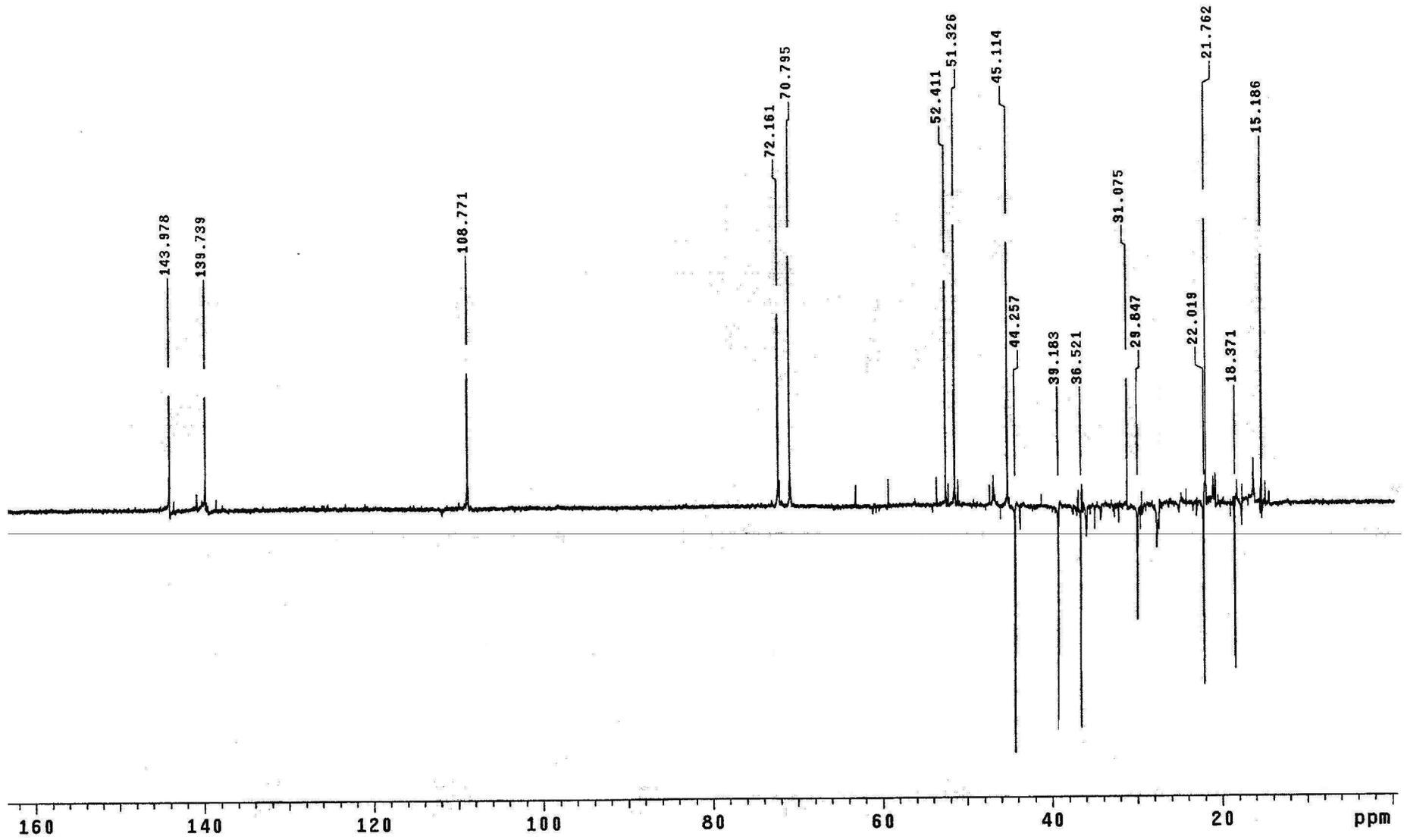


## Anexo 4 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Cr-2 - Expansão

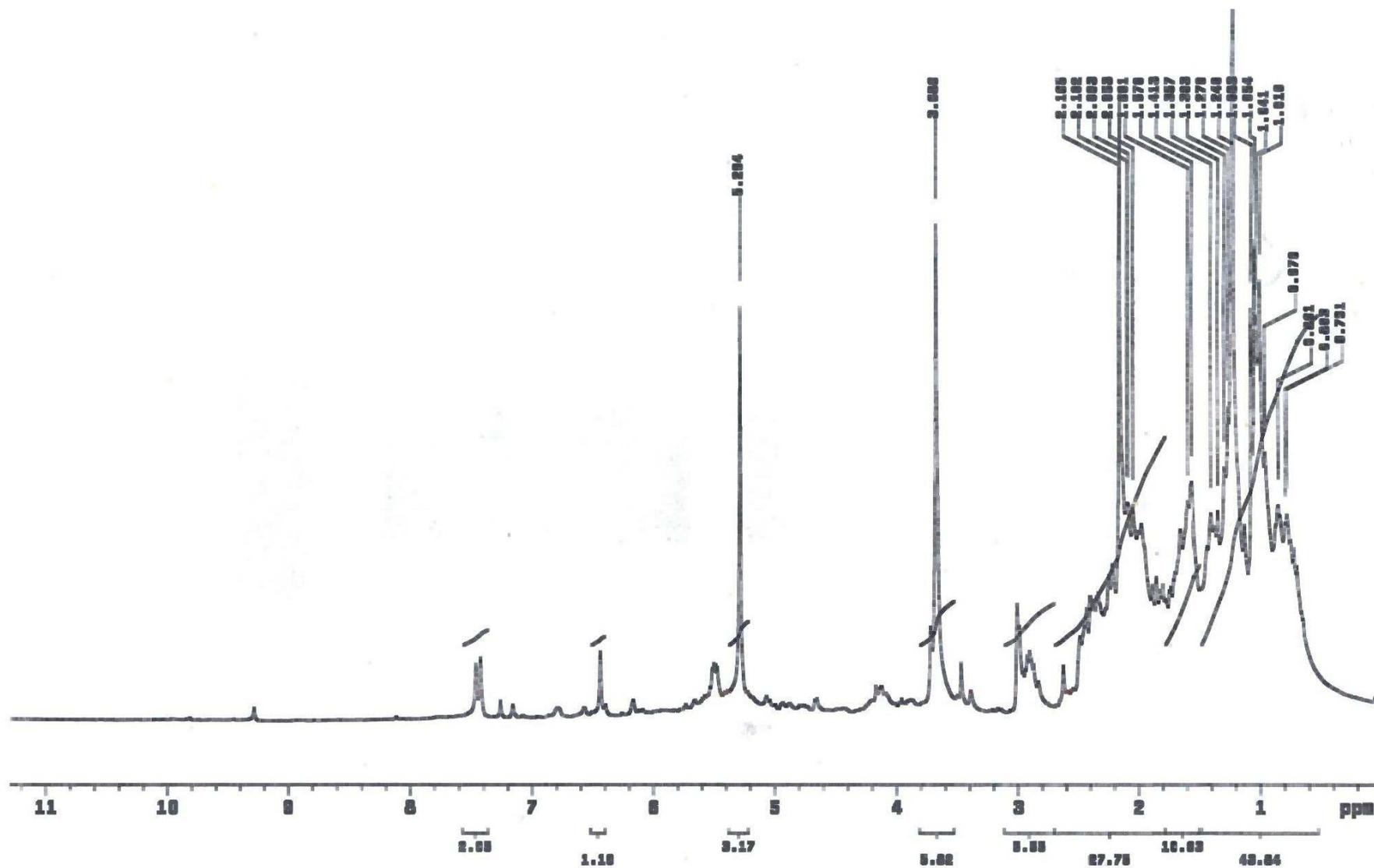
### Anexo 5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Cr-2



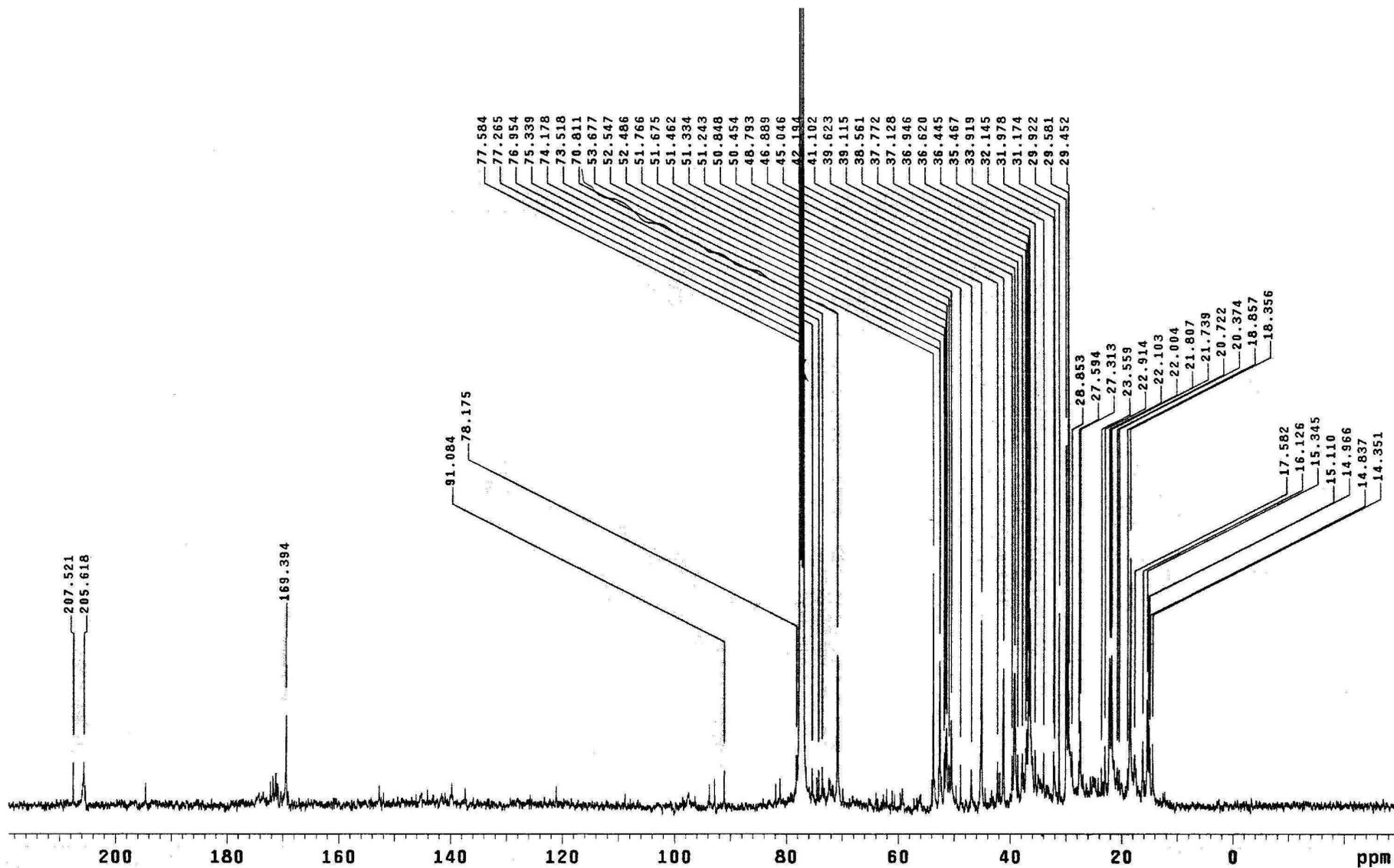
Anexo 6 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com DEPT do Cr-2



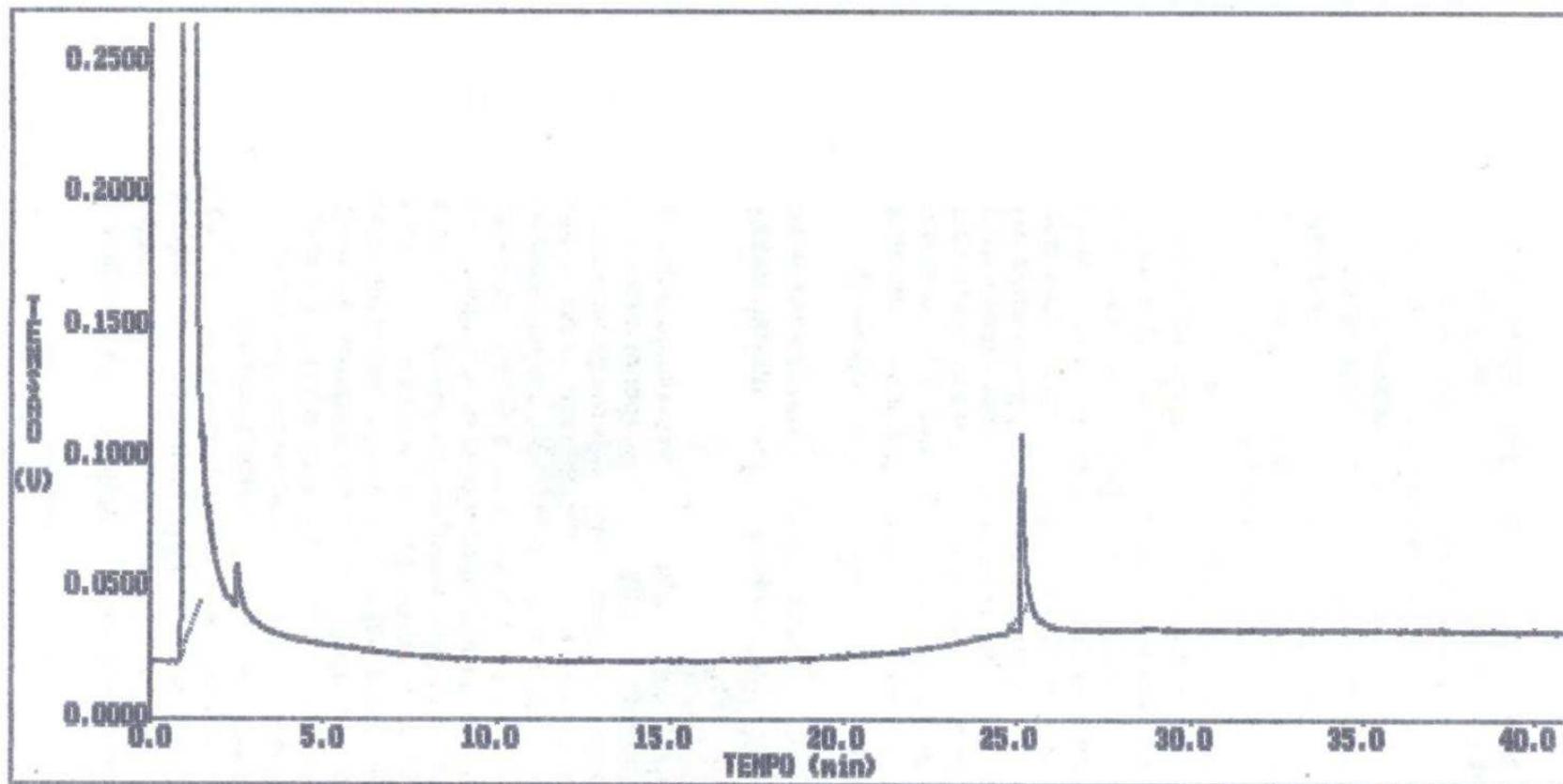
Anexo 7 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cr-2.1



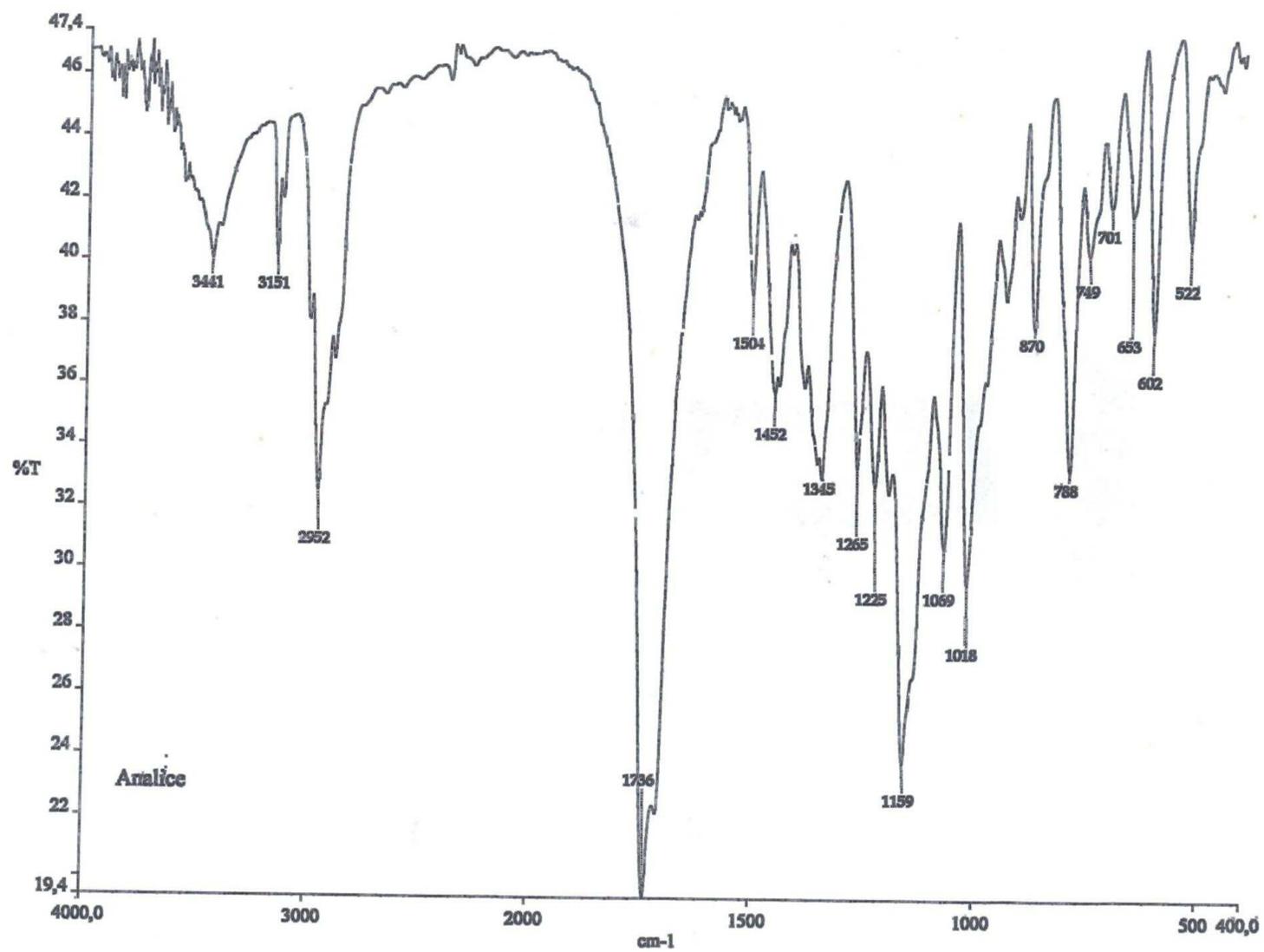
# Anexo 8 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Cr-2.1



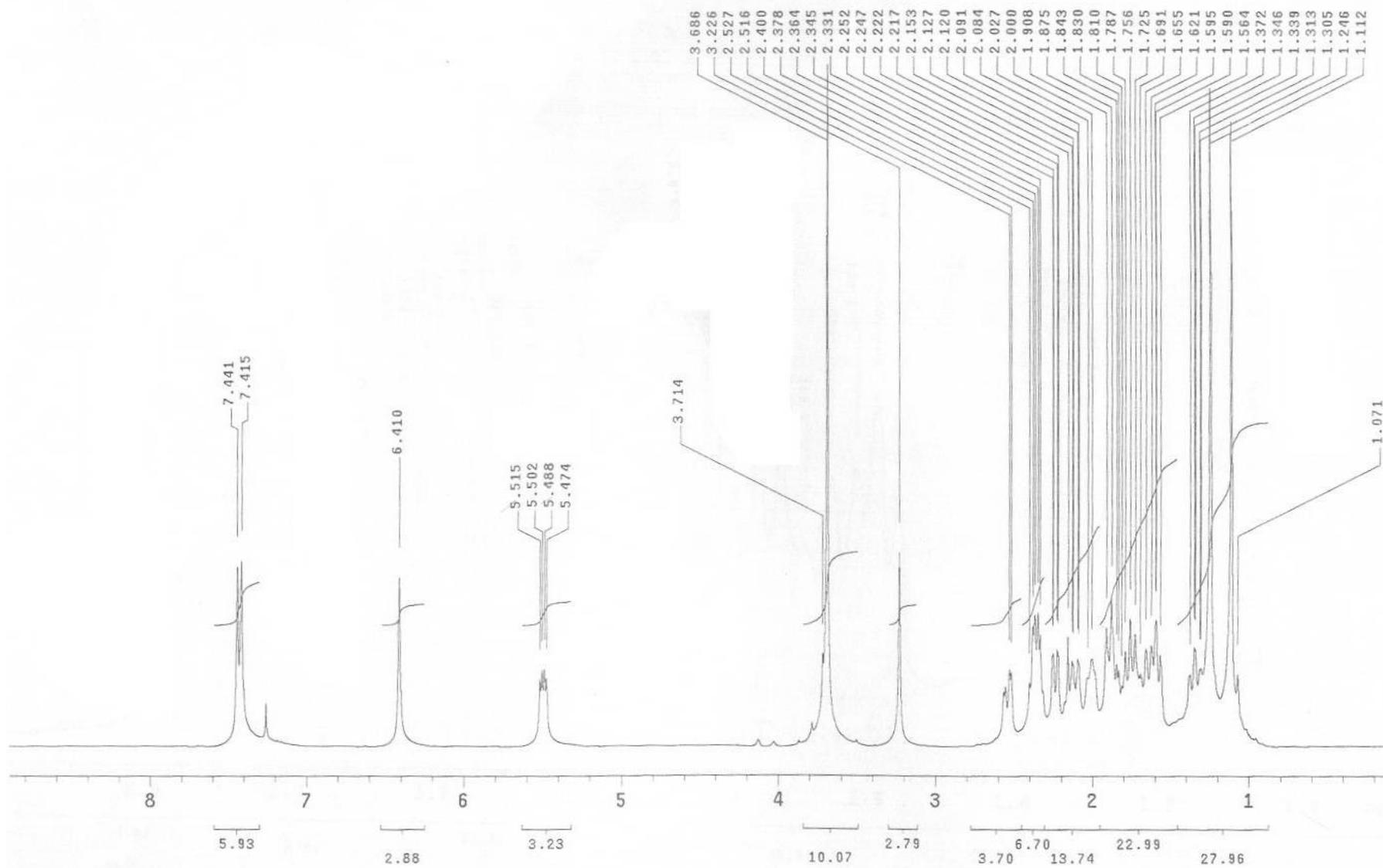
### Anexo 9 – Cromatograma do Cr-3



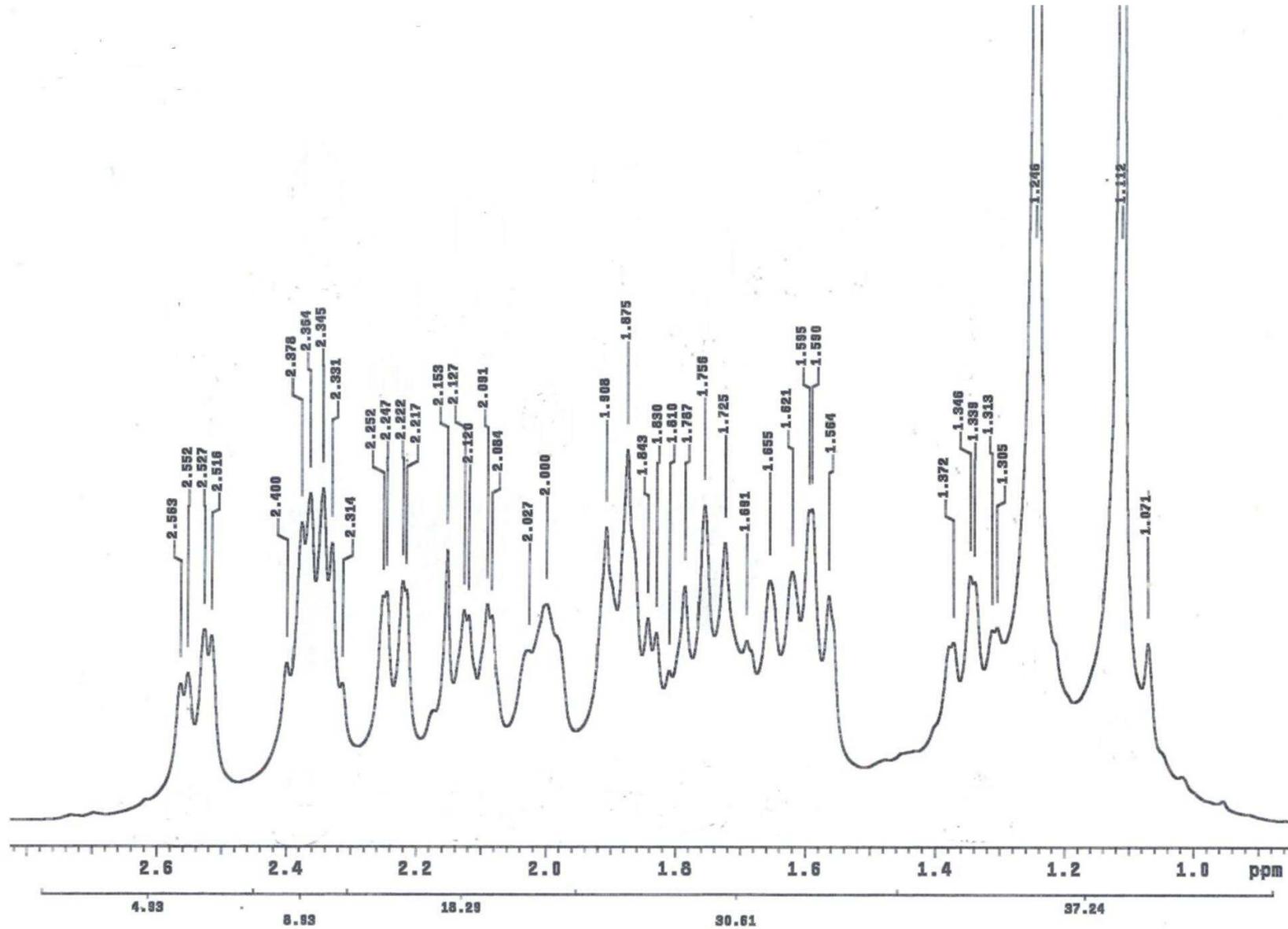
### Anexo 10 – Espectro de Infravermelho do Cr-3



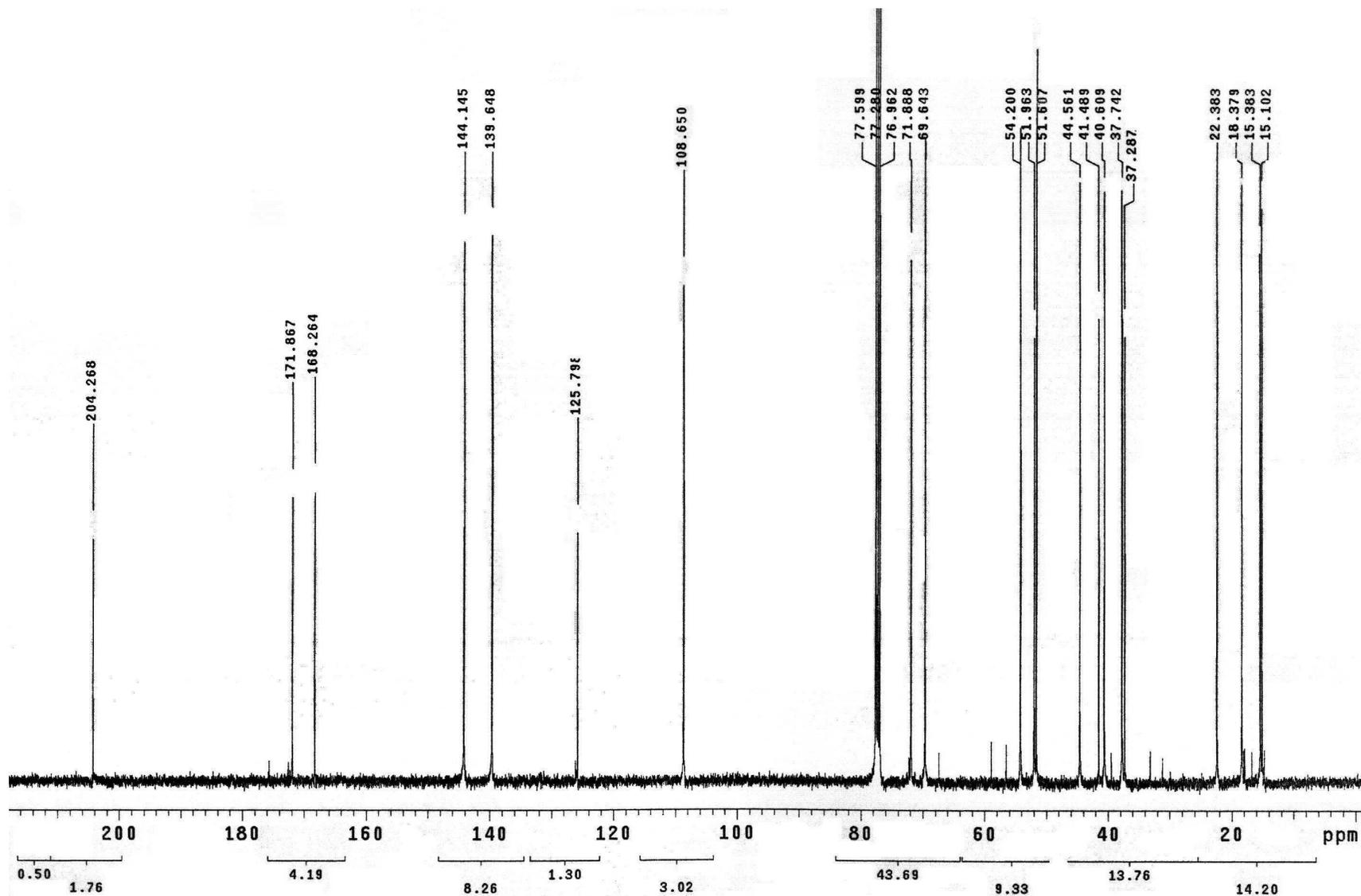
# Anexo 11 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cr-3



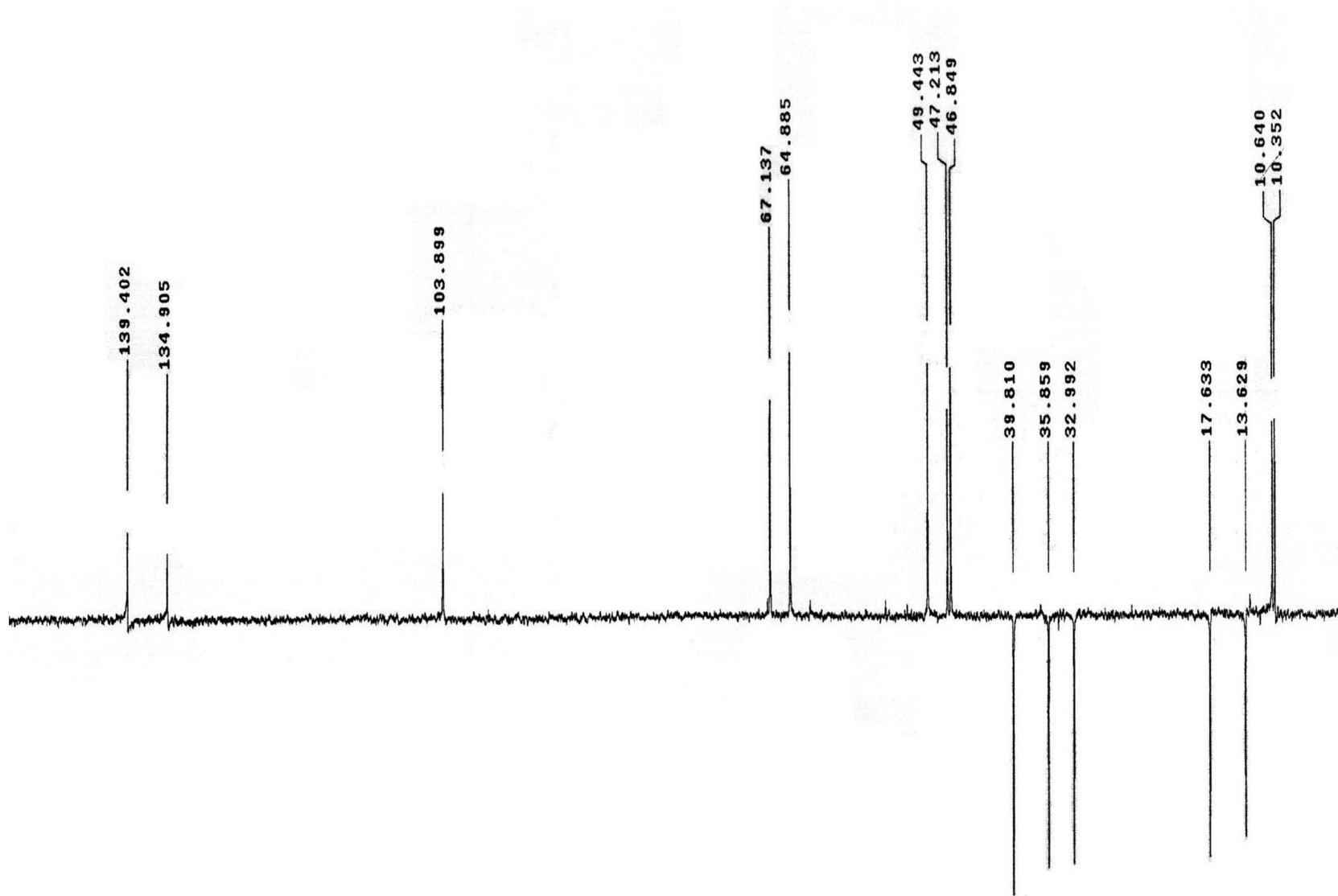
# Anexo 11 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cr-3 - Expansão



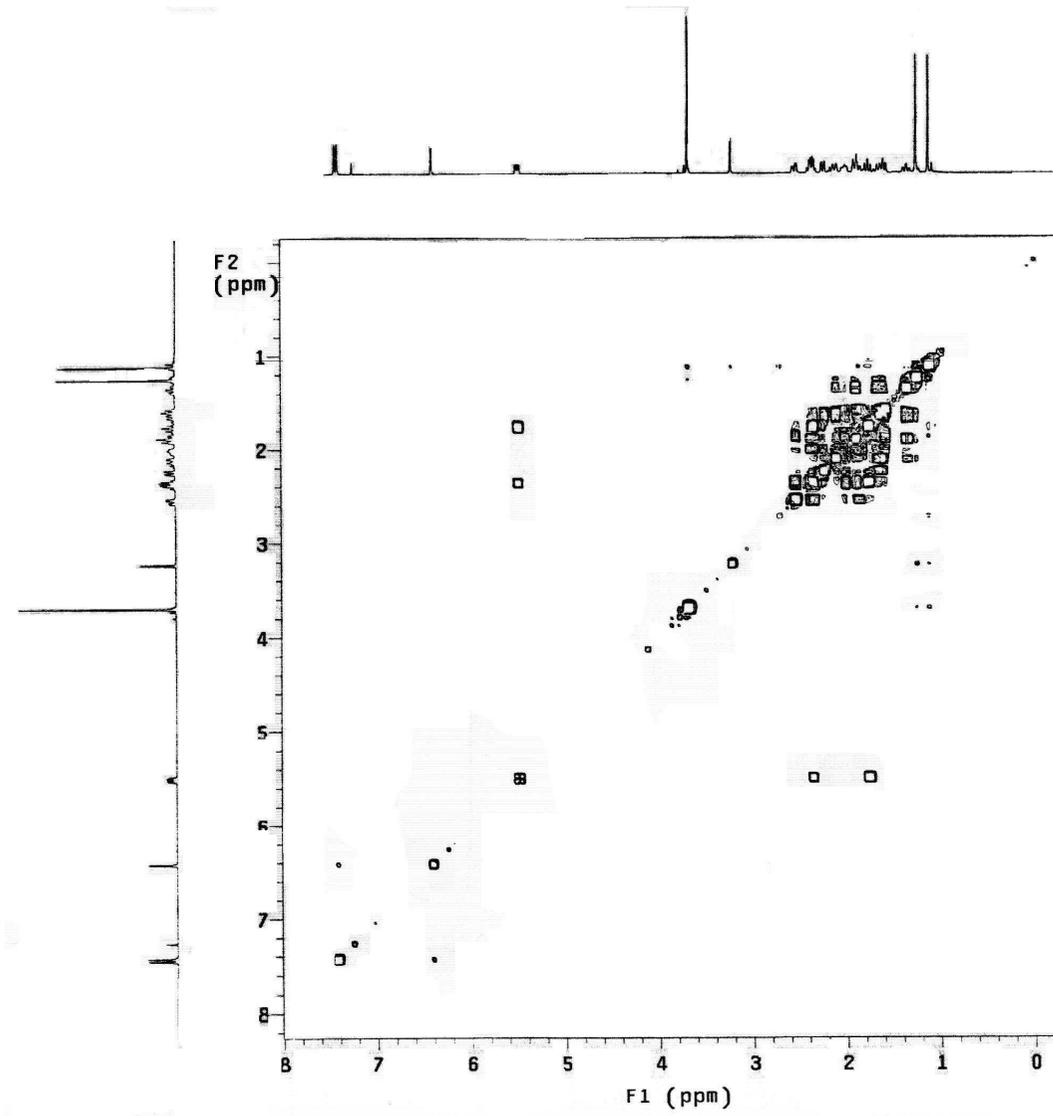
### Anexo 12 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Cr-3



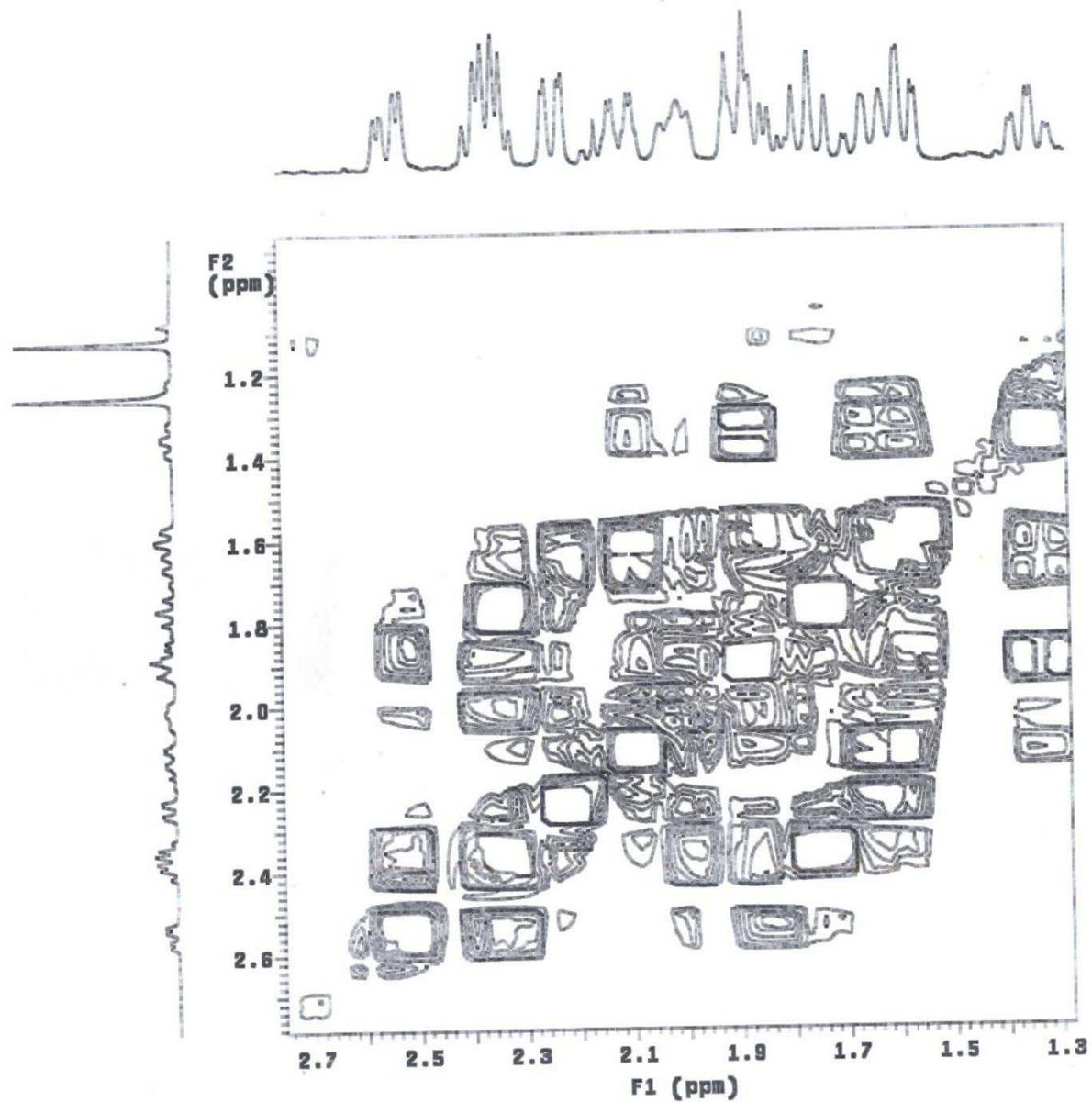
Anexo 13 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com DEPT do Cr-3



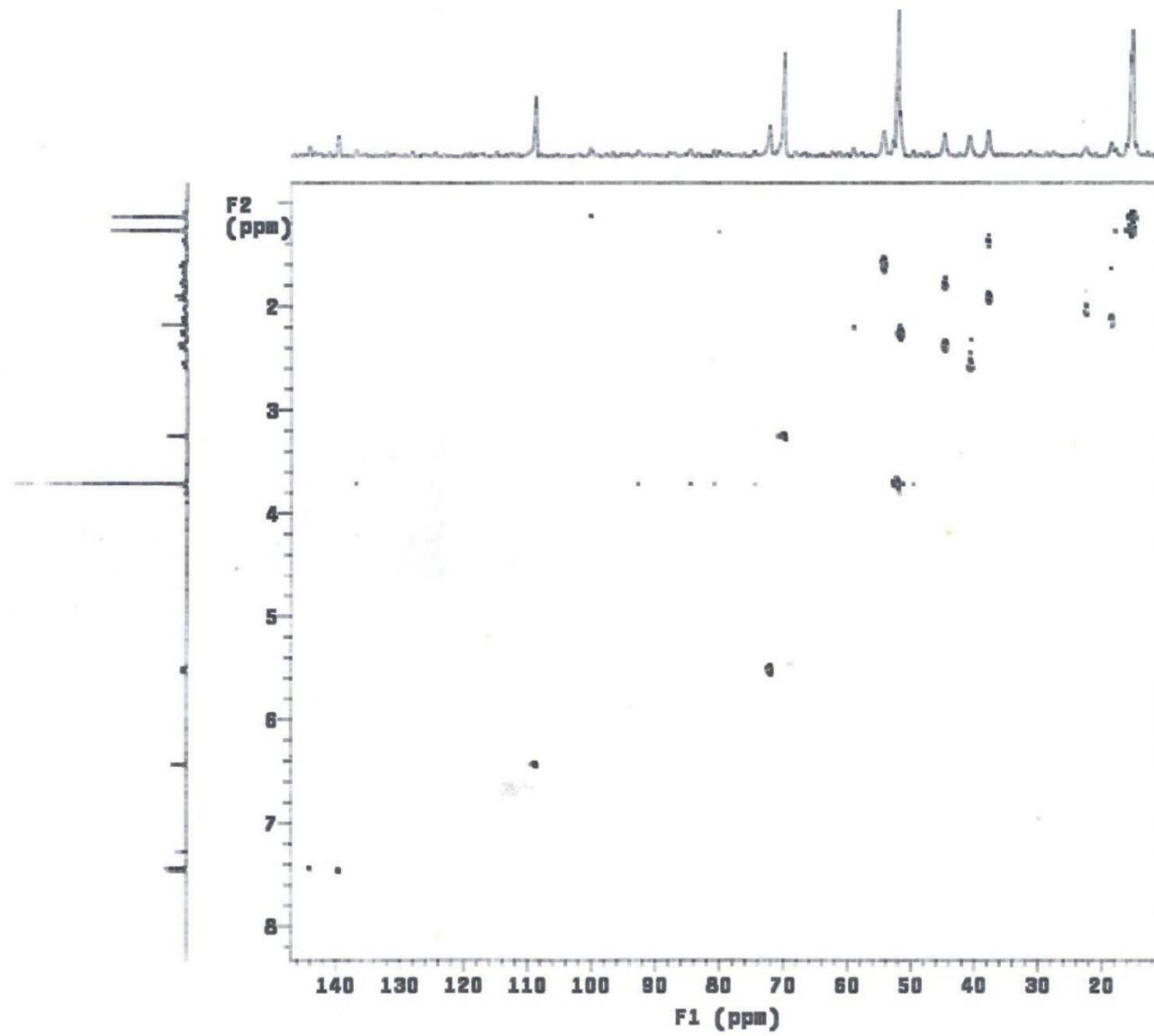
### Anexo 14 – COSY do Cr-2



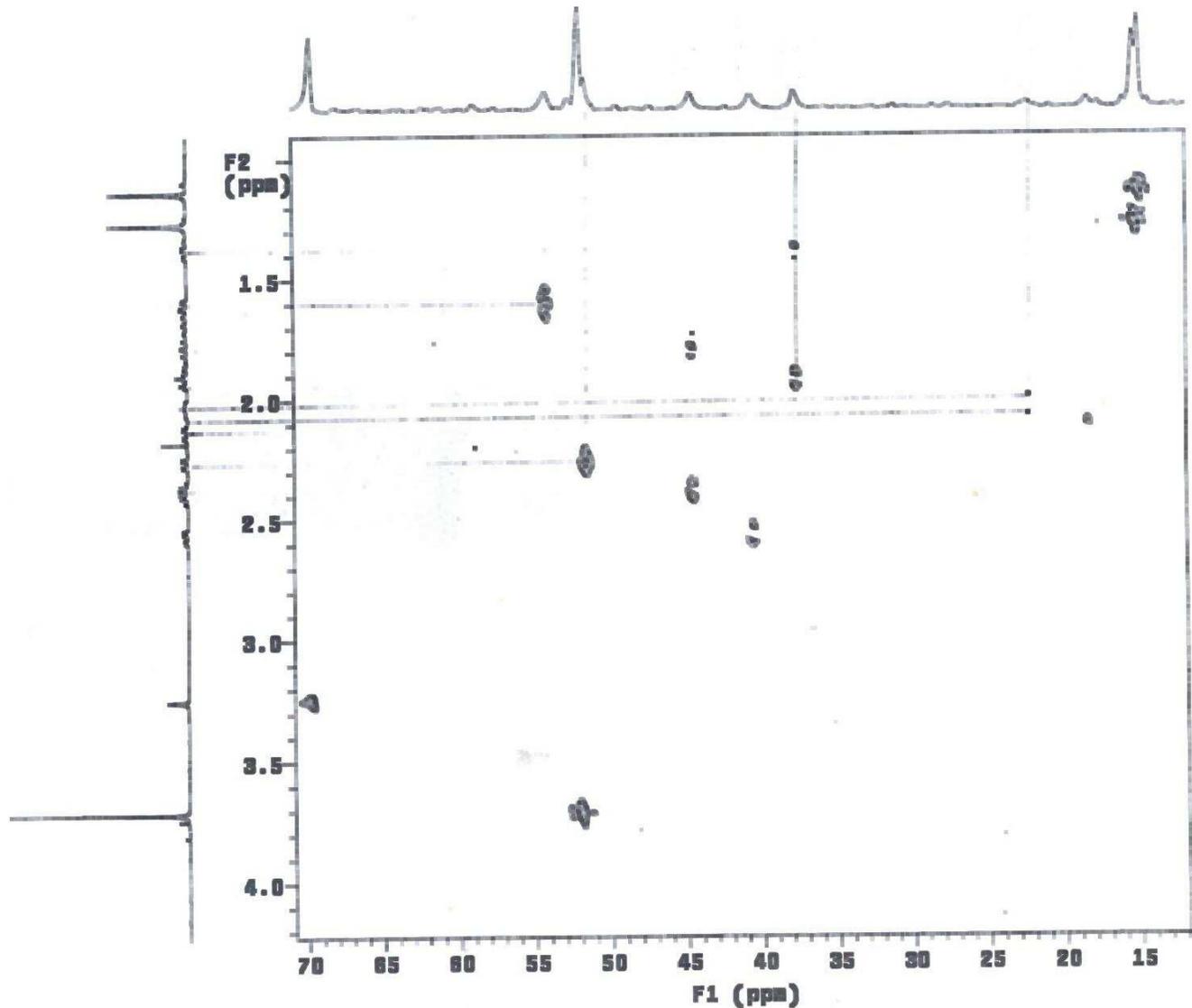
Anexo 14 – COSY do Cr-2 - Expansão



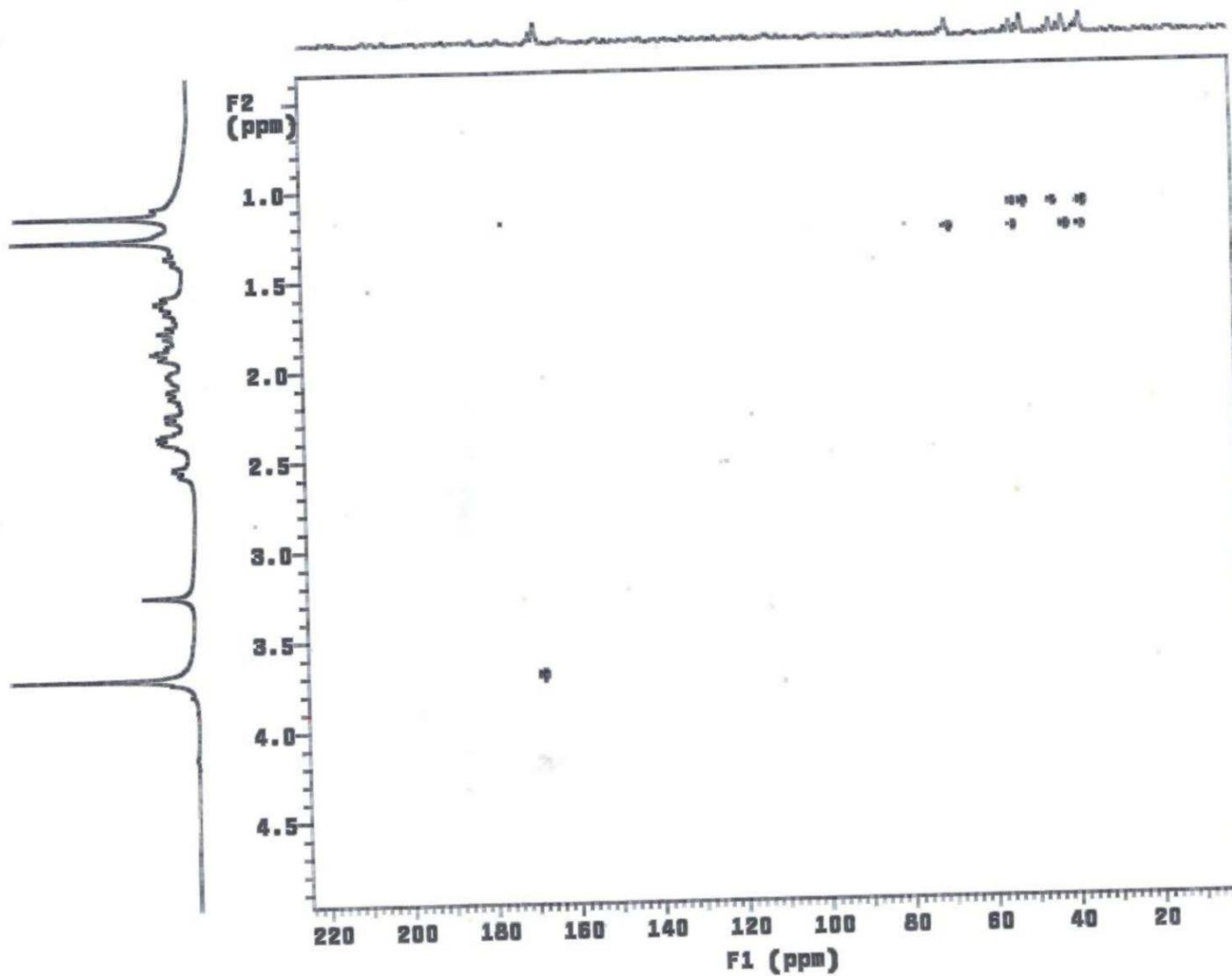
Anexo 15 – HMQC do Cr-3



### Anexo 15 – HMQC do Cr-3 - Expansão



### Anexo 16 – HMBC do Cr-3



### Anexo 16 – HMBC do Cr-3 - Expansão

