



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

## ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *SOLANUM INCANUM* E *CROTON GRATISSIMUS*



Ana Rita Castro Estebainha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciência Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Dina Mendonça

Covilhã, Junho de 2012

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS APRESENTADA  
À UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Trabalho realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais,  
do Departamento de Química, da Faculdade de Ciências.  
Orientado pela Prof. Doutora Dina Mendonça

# AGRADECIMENTOS

À Professora Dina, obrigado pelo seu conhecimento e dedicação pelas horas dispensadas a esclarecer-me as dúvidas. Obrigado pelo seu apoio e sorriso.

À Laura, obrigado pelas explicações, por me ensinar tudo o que não sabia. Apesar do nosso feito muitas vezes entrar em conflito, gostei de trabalhar em conjunto.

À professora Lúcia, obrigado por nunca dizer não ao material que precisei. Obrigado pela sua simpatia e por ser uma pessoa tão agradável.

Ao professor Rodilla, obrigado pelo seu sorriso e por todo o material que me disponibilizou.

À professora Ismael pela sua simpatia, boa disposição e preocupação.

Aos meus pais, obrigado por me darem mais esta oportunidade. Sem eles não seria possível chegar a esta etapa. Obrigado pelo apoio, pelos gastos e por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, obrigado por me apoiarem. Sinto muito a vossa falta e gosto muito de vocês. Espero que olhem para mim, como um exemplo a seguir.

Aos meus avós, meus segundos pais, obrigado pelos ensinamentos, pela educação e por tudo que fez de mim a pessoa que sou. Em especial, ao meu avô que já não está connosco mas que tenho a certeza que está a olhar por mim e teria muito orgulho pela neta mais velha.

À Tó obrigado pelo apoio e pela preocupação em saber se eu estava bem.

Aos amigos do laboratório, às Sofias, à Maria, à Patrícia e à Rita, obrigado pelos bons e divertidos momentos passados juntas. Foram momentos fantásticos para relaxar nas horas que o trabalho era bastante. Ao Rafael, obrigado pela disponibilidade e pelo esclarecimento das dúvidas de informática.

À Andrea, minha melhor amiga e companheira. Obrigado pelos bons momentos que passamos juntas, pelas horas passadas em minha e tua casa. Obrigado por seres minha confidente e por me apoiares em tudo. Sem ti estes dois anos passados na Covilhã não seriam tão bons. Obrigado a ti, ao Zé e ao Jorge por me acompanharem nas viagens até á terrinha.

Às colegas e amigas, da Universidade, Filipa, Vânia e Tânia, pelos bons momentos que passamos. Os jantares divertidos que me proporcionaram. Obrigado por tudo e ainda por me fazerem sentir mais jovem. Estarão sempre no meu pensamento.

Às amigas de Amarante, Magui, Tânia, Rosinha, Ana e Fatinha. Obrigado pelo apoio nos bons momentos como nos momentos mais tristes. Adoro-vos.

Aos funcionários, D. Isabel e Sr. João, por todo o trabalho que tiveram comigo. Em especial às senhoras do bar, D. Maria José e à D. Olinda, que são pessoas cinco estrelas. Muito simpáticas, muito divertidas e acima de tudo, obrigado pelos elogios e apoio quando as coisas não corriam da melhor maneira.

À universidade por dispensar todo o material e instalações necessário ao meu trabalho, sem isto não seria possível.

A todos um obrigado muito especial. Sem todos vocês não conseguiria alcançar esta nova etapa da minha vida. Estarão para sempre no meu coração.

# Índice

Lista de abreviaturas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas .....	ix
Resumo .....	x
Abstract.....	xi
Capítulo I - Introdução .....	1
1.1. Introdução .....	1
1.3. A família <i>Euphorbiaceae</i> .....	5
1.3.1. O género <i>Croton</i> .....	5
Capítulo II - Parte experimental.....	11
2.1. Instrumentação.....	11
2.2. Técnicas.....	11
2.3. Extracção e fraccionamento .....	12
2.4. <i>Solanum incanum</i> .....	14
2.4.1. Fracionamento do extracto de acetato de etilo.....	14
2.4.2. Fracionamento do extracto de hexano.....	18
2.4.3. Fracionamento do extracto de clorofórmio.....	19
2.5. <i>Croton gratissimus</i> .....	20
2.5.1. Fracionamento do extrato de clorofórmio.....	20
Capítulo III - Resultados e discussão .....	27
3.1. Identificação dos produtos .....	27
3.2.1. P <sub>1</sub> : Ácido cafeico.....	27
3.2.2. P <sub>2</sub> : 7-B-metóxiopposit-4(15)-en-1-β-ol .....	28
Capítulo IV - Conclusão .....	31
Bibliografia .....	32
Anexos .....	36

# Lista de abreviaturas

AcOEt - acetato de etilo

c.d.o. - comprimento de onda

c.c.f. - cromatografia em camada fina

COSY - Correlation Spectroscopy

d - duplete

dd - duplo duplete

ddd - duplo duplo duplete

$\delta$  - desvio químico (ppm)

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hex - hexano

IV - infravermelho

$J$  - constante de acoplamento

m - multiplete

MeOH - metanol

NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ppm - partes por milhão

RMN de  $^1\text{H}$  - Ressonância Magnética Nuclear de próton

RMN de  $^{13}\text{C}$  - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

s - singuleto

sl - singuleto largo

t - tripleto

td - triplo duplete

Tol - tolueno

# Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura química da solamargina.	4
Figura 2 - Estrutura química do ácido 3-O-malonil-5-O-(E)-caffeoilquinico do ácido 4-O-(E)-caffeoil-5-O-malonilquinico.	4
Figura 3 - Estrutura química do pimarano e kaurano.	9
Figura 4 - Estrutura química de quatro cembranolidas	9
Figura 5 - Estrutura química de seis cembranolidas	10
Figura 6 - Estrutura química do ácido cafeico	28
Figura 7 - 7- $\beta$ -metóxiopposit-4(15)-en-1- $\beta$ -ol	29
Figura 8 - Espetro de Infravermelho do composto P <sub>1</sub> .	36
Figura 9 - Espetro RMN <sup>1</sup> H do composto P <sub>1</sub>	36
Figura 10 - Espetro RMN <sup>13</sup> C do composto P <sub>1</sub> .	37
Figura 11 - Espetro DEPT-135 do composto P <sub>1</sub> .	37
Figura 12 - Espetro de DEPT-90 do composto P <sub>1</sub> .	38
Figura 13 - Espetro de correlação bidimensional <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C (HSQC) do composto P <sub>1</sub> .	38
Figura 14 - Espetro de correlação bidimensional <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C (HMBC) do composto P <sub>1</sub> .	39
Figura 15 - Espetro de Infravermelho do composto P <sub>2</sub> .	39
Figura 16 - Espetro RMN <sup>1</sup> H do composto P <sub>2</sub> .	40
Figura 17 - Espetro RMN <sup>13</sup> C do composto P <sub>2</sub> .	40
Figura 18 - Espetro DEPT-135 do composto P <sub>2</sub> .	41
Figura 19 - Espetro DEPT-90 do composto P <sub>2</sub> .	41
Figura 20 - Espetro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do composto P <sub>2</sub> .	42
Figura 21 - Espetro de correlação bidimensional <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C (HSQC) do composto P <sub>2</sub> .	43

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, MeOH) do composto P <sub>1</sub> .	28
Tabela 2 - Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do composto P <sub>2</sub> .	30

# Resumo

Este trabalho teve como objectivo estudar duas espécies de plantas usadas na medicina tradicional angolana: *Solanum incanum* e *Croton gratissimus*.

Os frutos maduros de *Solanum incanum* foram macerados em metanol, o extracto metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido em hexano, clorofórmio e acetato de etilo tendo-se obtido, respectivamente, os extractos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo.

Do extracto de acetato de etilo da *Solanum incanum* foi isolado o ácido cafeico.

A parte aérea da *Croton gratissimus* foi triturada e de seguida macerada em metanol, o extracto metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido em hexano, clorofórmio e acetato de etilo tendo-se obtido, respectivamente, os extractos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo.

Foi estudado o extracto de clorofórmio da *Croton gratissimus* tendo-se isolado o 7-B-metóxiopposit-4(15)-en-1-B-ol.

Os compostos isolados foram completamente elucidados por técnicas de espectroscopia de IV, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e RMN bidimensional  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC e NOESY. Os compostos identificados nunca tinham sido isolados nestas espécies.

## Palavras-chave:

Plantas medicinais, *Croton gratissimus*, ácido cafeico, oppositano

# Abstract

This work aimed to study two species of plants used in traditional medicine in Angola: *Solanum incanum* and *Croton gratissimus*.

The ripe fruits of *Solanum incanum* were macerated in methanol; the methanol extract was fractionated by liquid-liquid partition in hexane, chloroform and ethyl acetate yielding, respectively, hexane, chloroform and ethyl acetate extracts.

Caffeic acid was isolated in the ethyl acetate extract of *Solanum incanum*.

Aerial parts of *Croton gratissimus* were triturated and then macerated in methanol; the methanol extract was fractionated by liquid-liquid partition in hexane, chloroform and ethyl acetate yielding, respectively, hexane, chloroform and ethyl acetate extracts.

Chloroform extract of *Croton gratissimus* was studied having allowing the isolation of 7- $\beta$ -methoxyopposit-4(15)-en-1- $\beta$ -ol.

All compounds were fully elucidated by IR spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  and 2D-NMR:  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC and NOESY. The identified compounds have never been isolated in these species.

## Keywords:

Medicinal plants, *Croton gratissimus*, caffeic acid, oppositane

# Capítulo I - Introdução

## 1.1. Introdução

A medicina tradicional é considerada, segundo a Organização Mundial de Saúde, como os conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, utilizados na manutenção da saúde e na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais.

A medicina tradicional abrange uma ampla variedade de terapias e práticas que variam de país para país e de região para região. Em alguns países, ela é referida como "alternativa" ou "medicina complementar". A medicina tradicional tem sido utilizada há milhares de anos, com grandes contribuições para a saúde humana, permitindo a existência de prestadores de cuidados de saúde primários ao nível de comunidades pobres em países do terceiro mundo. Desde os anos 90 do século passado o seu uso tem crescido em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Desde sempre que a medicina tradicional é usada pelos povos fazendo parte da cultura de cada país e de todo o mundo, as mezinhas são um método de tratar sintomas, prevenir ou curar doenças quando nenhum outro tipo de cuidados de saúde está disponível. (Cheikhoussef *et al.*, 2011)

Os produtos naturais são compostos orgânicos derivados de fontes naturais, como plantas, organismos terrestres ou aquáticos e microorganismos. Estes compostos têm sido utilizados tanto no passado como no presente, de forma extensiva, no tratamento de muitas doenças e, servem como modelos tanto na sua forma natural como modelos para modificação sintética. (Chin *et al.*, 2006) Ao longo da nossa evolução, a importância dos produtos naturais para a medicina e saúde tem sido enorme; desde os nossos ancestrais que mastigavam certas ervas para aliviar a dor, ou aplicavam certas folhas enroladas para melhorar a cicatrização das feridas, os produtos naturais têm sido muitas vezes o único meio para tratar doenças.

Na verdade, foi apenas durante as últimas décadas que os produtos naturais têm tido um papel secundário na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Após o advento da biologia molecular e química foi possível o planeamento racional de compostos químicos tendo como alvo moléculas biológicas específicas. Nos últimos anos, assistimos a um crescente interesse no uso de compostos naturais no desenvolvimento de novos fármacos. (Fang-Ji *et al.*, 2009)

O estudo e pesquisa de novos fármacos, cada vez mais potentes, são feitos mais aprofundadamente hoje em dia, com o intuito de descobrir produtos naturais existentes nas plantas, capazes de provar que possuem actividades no organismo com elevada eficácia e com menos efeitos colaterais que os produtos sintéticos similares. (Hung *et al.*, 2012)

## 1.2. A família *Solanaceae*

*Solanaceae* é uma família representada por aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 95 géneros. É uma família de grande importância para a alimentação humana, fazem parte desta família: a batata (*Solanum tuberosum*), o tomate (*Solanum lycopersicum*) e a beringela (*Solanum melongena*). (Poczai *et al.*, 2010)

A família *Solanaceae* é de porte médio e extremamente diversificada, variando de ervas para pequenas árvores, de habitat, de desertos a florestas tropicais, e na morfologia, com uma variação impressionante de flores e frutos. Quase metade das espécies incluídas nesta família pertence ao género *Solanum*.

Esta família é, também, uma importante fonte de alcalóides para medicamentos como, por exemplo, *Nicotiana tabacum* L. e *Atropa belladonna* L. (Knapp *et al.*, 2004). Ésteres de ácido monocateoilquinico são geralmente predominantes nos frutos e tubérculos, em particular o ácido 5-O-(E)-cateoilquinico. (Ma *et al.*, 2011)

### 1.2.1. O género *Solanum*

A *Solanum nigrum* é conhecida como “qumqam”. É usada, tradicionalmente, como antisséptico da pele e feridas, expectorante e em problemas intestinais (como diarreia e prisão de ventre). O fruto possui atividade anti-tumoral. (Al-Fatimi *et al.*, 2007)

A *Solanum melongena* é mais conhecida pelo seu fruto, a beringela; é amplamente cultivada e faz parte da alimentação humana, tal como a *Solanum aethiopicum* e a *Solanum macrocarpon*. Compostos fenólicos extraídos a partir da beringela foram administrados oralmente a ratos e provocaram um efeito hipolipidémico significativo, além disso são capazes de inibir o receptor da inflamação associado com a aterosclerose. (Ma *et al.*, 2010)

No extracto metanólico do fruto de *Solanum viarum* foram isolados e identificados quatro ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico: ácido 1 $\beta$ ,4 $\beta$ -di-hidroxi-3 $\beta$ -carboxiacetoxi-5R-[[3-[4-[1 $\beta$  - (6 - O - (E) - sinapoil -  $\beta$  - D - glucopiranosil) - oxi] - 3 - hidroxifenil] - (E) - 1 - oxo - 2-

propenil]oxi]ciclohexanocarboxílico; ácido 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-4 $\beta$ -carboxiacetoxi-5R-[[3-[4-[1 $\beta$ -(6-O-(E)-sinapoil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-oxi]-3-hidroxifenil]-(E)-1-oxo-2-propenil]oxi]ciclohexanocarboxílico; ácido 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ -tri-hidroxi-5R-[[3-[4-[1 $\beta$ -(6-O-(E)-sinapoil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3-hidroxifenil]-(E)-1-oxo-2-propenil]oxi]ciclohexanocarboxílico e 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ -tri-hidroxi-5R-[[3-[4-[1 $\beta$ -(6-O-(E)-sinapoil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3-hidroxifenil]-(E)-1-oxo-2-propenil]oxi] ciclohexanocarboxilato de metilo. (Ma *et al.*, 2010)

### 1.2.2. A espécie *Solanum incanum*

A *Solanum incanum* é uma planta do reino das plantas, do filo *Magnoliophyta*, da ordem *Solanales*, da família *Solanaceae* e do género *Solanum*.

*Solanum incanum* é uma espécie selvagem (Ma *et al.*, 2010), vulgarmente conhecida no lémen como “nuqum”. O fruto é, tradicionalmente, usado para doenças da pele, antisséptico e analgésico para os dentes (Al-Fatimi *et al.*, 2007). Apresenta cor verde com riscas verde-escuras e pesa entre 4 a 8 gramas. *Solanum incanum* é o suposto ancestral da beringela que apresenta algumas características de interesse para o melhoramento da espécie, como tolerância à seca e um elevado teor em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. (Salas *et al.*, 2011)

A *Solanum incanum* demonstrou ter atividade antifúngica de amplo espectro contra *Candida maltosa*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* e *Trichophyton mentagrophytes*. Apresenta também atividade citotóxica elevada contra células do linfoma folicular. (Al-Fatimi *et al.*, 2007)

Do fruto da *Solanum incanum* foi isolado um esteróide glicosídeo alcalóide, a solamargina (Figura 1). Este composto apresenta um efeito protetor contra danos hepáticos induzidos por tetracloreto de metilo, provoca a apoptose celular (Hsu *et al.*, 1996), inibe o crescimento de células do hepatoma humano (Al-Fatimi *et al.*, 2007), do adenocarcinoma do pulmão. (Liang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004) e do cancro da mama, com uma actividade idêntica ao neoplásico cisplatina. (Shiu *et al.*, 2008)

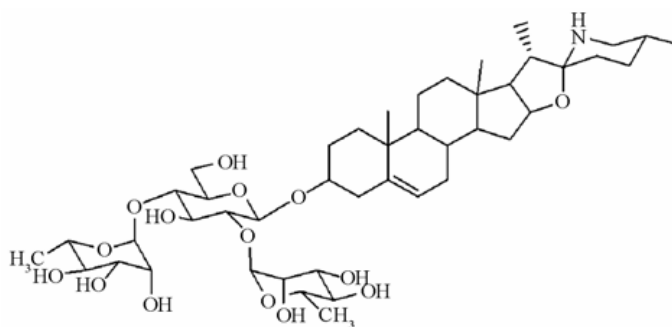


Figura 1 - Estrutura química da solamargina

Um estudo realizado no distrito de Guruve, no Zimbabwe, descreveu 6 espécies de plantas sendo as mais utilizadas por curandeiros tradicionais, no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis como: gonorreia, herpes genitais, sífilis e hepatite. Uma das descritas nesta investigação foi o fruto do *Solanum incanum*, o qual foi cortado e o suco ou seiva aplicado directamente nas partes afectadas. O estudo consistiu em testar em bactérias, os extractos de metanol, acetona e aquoso. Em conclusão, *Solanum incanum* comprovou eficácia em bactérias gram-positivas para os extractos analisados, à exceção do aquoso. (Kambizi *et al.*, 2001)

*Solanum incanum* é uma espécie similar à *Solanum melongena* e *Solanum viarum*, mas cresce como uma espécie selvagem. Tanto as espécies cultivadas como as selvagens são conhecidas pelo seu alto teor em ácido hidroxicinâmico. O fruto de *Solanum incanum* possui também 3-O malonil-5-O-(E)-cafeoilquinico do ácido 4-O-(E)-cafeoil-5-O-malonilquinico (Ma *et al.*, 2010) e flavonóides. (Figura 2)(Al-Fatimi *et al.*, 2007)

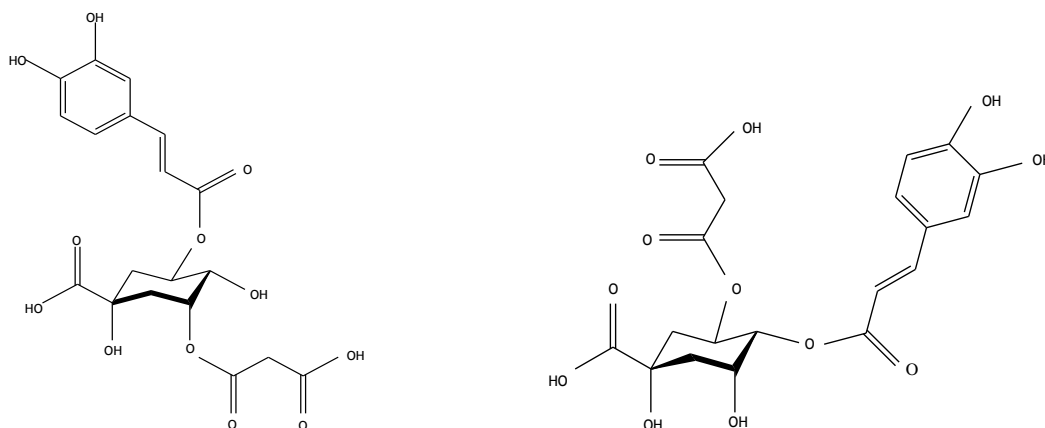


Figura 2 - Estrutura química do ácido 3-O-malonil-5-O-(E)-cafeoilquinico do ácido 4-O-(E)-cafeoil-5-O-malonilquinico

### 1.3. A família *Euphorbiaceae*

*Euphorbiaceae* é o nome dado a uma das maiores famílias de plantas do mundo. As *Euphorbiaceae* são principalmente ervas monóicas, arbustos e árvores, às vezes suculentas e cactos, compreendendo cerca de 300 géneros e 7500 espécies. (Oliveira *et al.*, 2011)

*Croton* é um género de *Euphorbiaceae* contendo cerca de 1300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais do Mundo. Várias espécies têm um vasto papel na medicina tradicional em África, Ásia e América do Sul. (Mota *et al.*, 2011)

A família *Euphorbiaceae* tem uma grande importância económica à escala mundial pois é a partir desta família que se obtém a borracha (*Hévea*), o óleo de tung (*Aleurites fordii*). O óleo de rícino (*Ricinus*) e a tapioca (*Manihot*). Outros membros da família são utilizados como plantas ornamentais (Webster *et al.*, 1994), nomeadamente da *Euphorbia milli*, *Euphorbia tirucalli* e *Breynia nívosa*.

#### 1.3.1. O género *Croton*

*Croton* é o segundo maior género e mais diversificado, com cerca de 1300 espécies. No Brasil existem mais de 300 espécies. (Filho *et al.*, 2012) Das cerca de 1300 espécies de *Croton* L. (*Euphorbiaceae*) distribuídos ao longo dos trópicos, cerca de 50 são encontradas em África (Mabberley *et al.*, 2008) e apenas 10 espécies são nativas da flora do sul de África.

As plantas pertencentes ao género *Croton* (*Euphorbiaceae*) são conhecidas pela sua grande variedade de diterpenos incluindo pimarano, kaurano, labdano, cembrano, cleistanano e clerodano, com uma vasta gama de actividades biológicas. (Pudhom *et al.*, 2011)

A *Croton lechleri*, vulgarmente conhecida como “Sangue do dragão”, é uma árvore que cresce na Venezuela, Equador, Peru, Brasil e México. Na América latina a *Croton lechleri* é utilizada para o tratamento empírico do cancro. Estudos fitoquímicos com esta espécie revelaram a presença de flavonóides como rutina (vitamina P) e vitexina. (Alonso-Castro *et al.*, 2012) Estudos fitoquímicos revelaram grande complexidade, caracterizada por proantocianidinas, flavonóides, esteróides e alcalóides. É usada na medicina tradicional contra uma série de disfunções e patologias (úlceras gástricas, diarreia, infecções microbianas e virais, feridas, picadas de insectos, inflamações e artrite). (Rossi *et al.*, 2011) Esta espécie mostra também ter actividade antitumoral. (Mota *et al.*, 2011)

A resina da casca de *Croton urucurana* tem efeito antibacteriano, anti-hemorrágico, antiviral e antioxidante. (Scalon *et al.*, 2011)

A *Croton zambezicus* é um arbusto ou árvore pequena, cultivada na África Tropical (Bolck *et al.*, 2004) e na Nigéria, atingindo 10 m de altura. (Okokon *et al.*, 2010) A folha de *Croton zambezicus* é usada como anti-hipertensor, antimicrobiano em infecções urinárias e para tratar a febre associada à malária. Este género é bem conhecido por conter diferentes tipos de diterpenos (ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, kauranos, traquilobânicos, pimaranos). (Bolck *et al.*, 2004).

No Sudão, a folha de *Croton zambezicus* é usada, tradicionalmente, para dor menstrual e constipação. Na Nigéria, a decocção da folha de *Croton zambezicus* é usada para tratamentos da hipertensão e de infecções urinárias. (Okokon *et al.*, 2010) O extracto etanólico de folha possui atividade antimalárica e antidiabética. Poucos estudos farmacológicos foram realizados em *Croton zambezicus*. No entanto, a atividade antimalárica foi observada em extratos da casca do caule e das sementes. O caule apresenta ainda atividade antimicrobiana. (Robert *et al.*, 2010) Na Nigéria é também utilizada para tratar a hipertensão e a diabetes mellitus tipo 2, com uma actividade antidiabética comparável à do clorpropamida. O extracto etanólico da raiz possui atividade antiplasmódica e vasorrelaxante. (Aderogba *et al.*, 2011)

Óleos essenciais extraídos das folhas e raízes de *Croton zambezicus* mostraram ser semelhantes em composição. No entanto, as folhas são ricas em monoterpenos e a raiz rica em sesquiterpenos. A raiz e o caule possuem em maior quantidade espatulenol e linalol. (Okokon *et al.*, 2010) A folha contém: crotonadiol; crotozambefuranos; crotoacorilifurano; ácido acetoxitrachiloban-18-óico; traquilobânico-7-18-diol; lupeol; betulinol; sitosterol e seu derivado 3-glicopiranosil (Robert *et al.*, 2010) O extrato de diclorometano das folhas contém: *ent*-traquilobânico-3-ol que apresenta atividade citotóxica em células HeLa e induz apoptose em células humanas de leucemia promeolítica; *ent*-18-hidroxitrachiloban-3-ol; *ent*-18-hidroxitrachiloban-3-ona-*ent*-traquilobânico-3-ona; *ent*-18-hidroxisopimara-7-15-dieno-3-ol possuindo os últimos quatro atividade vasorrelaxante. E ainda transfitol; B-sitosterol; amirina e estigmaterol. (Robert *et al.*, 2010) O extracto diclorometano das folhas mostrou citotoxicidade *in vitro* contra células de carcinoma humano do cólon. (Mota *et al.*, 2011) Outro estudo revelou que a folha de *Croton zambezicus* contém flavonas-C-glicosadas e diterpenos, também existentes no caule. (Aderogba *et al.*, 2011)

Nas Caraíbas, a *Croton asiatica tiglium* e a *Croton flavens* têm sido estudadas pela sua quantidade de diterpenos que se encontram implicados na carcinogénese indirecta (cancro esofágico) através da activação do vírus de Epstein-Barr. (Mulholland *et al.*, 2010)

*Croton tonkinensis* é uma planta medicinal do Vietname que contém esteróides, alcalóides e diterpenóides; no extrato metanólico das folhas foram encontrados quatro kauranos. Faltam,

no entanto, estudos faltam para comprovar a sua eficácia na diferenciação dos osteoblastos *in vitro*. (Dao *et al.*, 2011)

*Croton pullei* contém julocrotino, alcalóides crotonimidas A e B, terpenóides, lupeol, ribenona, sitosterol, ácido caurenóico e estigmasterol (Silva *et al.*, 2011)

As atividades antioxidantes têm sido menos investigadas nesta espécie, mas alguns resultados foram positivos. Efeitos de repelência foram testadas para *Croton pseudopulchellus*. Resultados interessantes surgiram para o potencial de *Croton cajucara* no tratamento de alguns parasitas como leishmaniose, nemátodes gastrintestinais (*Croton zehntneri*) e tripanossomas (*Croton draco*). Evidências farmacológicas *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial antiespasmódico (*Croton nepetaefolius*), antinociceptivo - diminuição dos estímulos da dor (*C. sonderianus*), antiulceroso (*Croton cajucara*) e cardiovascular (*Croton zehntneri*). (Rossi *et al.*, 2011)

Na Índia, a *Croton roxburghii* é uma planta medicinal que tem sido utilizada pelos povos no tratamento de várias doenças e sintomas como febre, infertilidade e feridas. (Rath *et al.*, 2011)

*Croton argyrophyllus* é um arbusto que cresce em abundância na região nordeste do Brasil e é usado popularmente em doenças cardíacas e como calmante. (Silva-Filho *et al.*, 2011)

Caules de *Croton hieronymi* demonstraram forte actividade contra células A-549 do carcinoma do pulmão, linfoma do rato e carcinoma do cólon humano. (Mota *et al.*, 2011)

Na Costa Rica, 41 espécies foram identificadas, algumas das quais têm sido utilizadas na medicina popular, por exemplo, *Croton gossypifolius* é usada como estimulante do apetite e antiespasmódica, a *Croton tonduzii* para tratar febre associada à malária. (Mora *et al.*, 2011)

*Croton antisiphiliticus* é um subarbusto conhecido como pé-de-perdiz e alcanforeira. Segundo dados etnofarmacológicos, o extracto hidroalcoólico das raízes é utilizado no tratamento de algumas doenças sexualmente transmissíveis e de infecções do sistema reprodutor feminino e masculino (Oliveira *et al.*, 2011)

### **1.3.2. A espécie *Croton gratissimus***

*Croton gratissimus* é uma espécie que pertence ao reino das Plantas, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae* e género *Croton*.

Esta espécie que cresce em encostas pedregosas como um tipo de árvore, em grande parte nas regiões mais quentes e secas da África do Sul. (Langat *et al.*, 2011), e usada tradicionalmente para fins medicinais e todas as partes da planta têm valor.

Decocções de raízes têm sido usadas para tratar queixas no peito, tosse, febre e doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis. A casca é, frequentemente, mais utilizada para tratar distúrbios abdominais, inflamação da pele e ouvidos.

Combinações das raízes e casca têm sido relatadas para tratar distúrbios respiratórios. O uso em co-administração com outras espécies é também observado. No tratamento de inchaços, a casca de *Croton gratissimus* é combinada com a raiz de espécies de *Amaryllidaceae*. E, juntamente com casca de *Ocotea bullata* é usada para tratar distúrbios uterinos. (Vuuren *et al.*, 2008)

*Croton gratissimus* é usada no tratamento da insônia: as folhas são trituradas e a pasta resultante é aquecida em brasas, os vapores são inalados. No Botswana, o chá feito das folhas é utilizado para a tosse. As folhas são secas e fumadas para a gripe, constipações e febre. Esta é também usada no tratamento do sangramento gengival e distúrbios oculares. (Langat *et al.*, 2011) A planta apresenta um aroma a lavanda, o pó das folhas quando secas e trituradas é utilizado como fragância de perfumes. Infusões do leite da casca são usadas como calmante para o estômago e laxante intestinal. (Mulholland *et al.*, 2010)

Na África do Sul, a maioria dos pacientes infetados com doenças sexualmente transmissíveis procuram a ajuda da medicina tradicional. Estudos *in vitro* demonstraram que *Croton gratissimus* possui eficácia notável contra agentes patogênicos associados a doença sexualmente transmissíveis, como *Neisseria gonorrhoeae* e *Gardnerella vaginalis*, no entanto, faltam estudos científicos para comprovar a eficácia em humanos. (Vuuren *et al.*, 2010)

*Croton gratissimus* possuiu na sua composição diterpenos como pimaranos, kauranos (Figura3) labdanos, clerodanos, cembranos, alcalóides isoquinolínicos e triterpenóides (Mulholland *et al.*, 2010). Já foram isolados vários cembranólidas, incluindo os quatro representados na figura 4 (Mulholland *et al.*, 2010) e seis que estão indicados na figura 5. (Langat *et al.*, 2011)

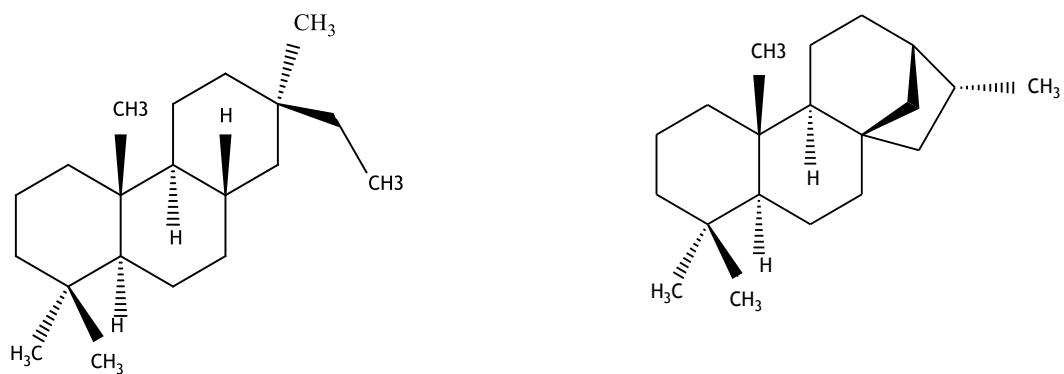


Figura 3 - Estrutura química do pimarano e kaurano

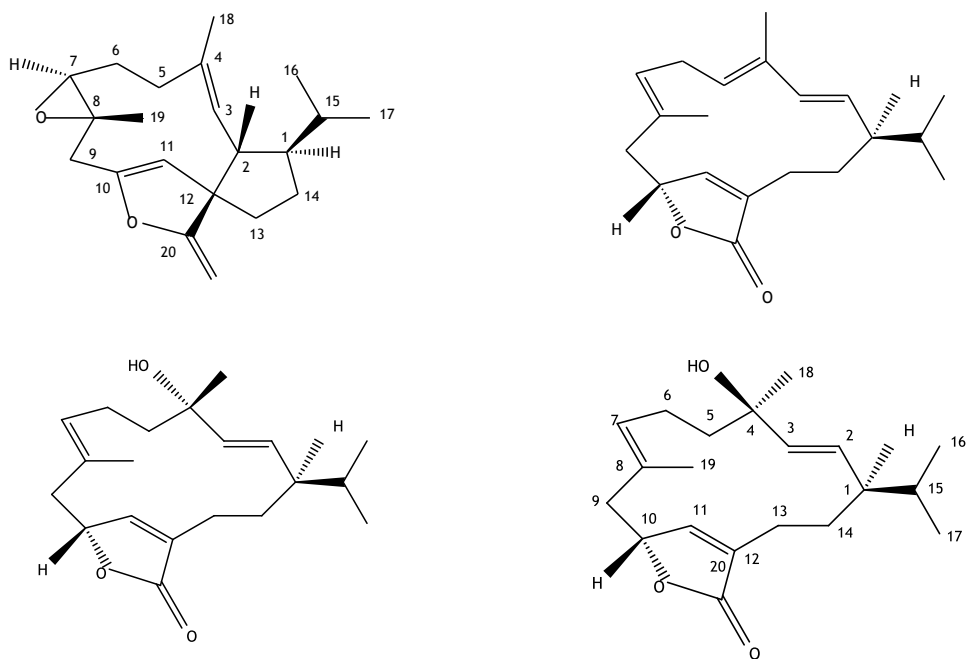


Figura 4 - Estrutura química de 4 cembranolidas

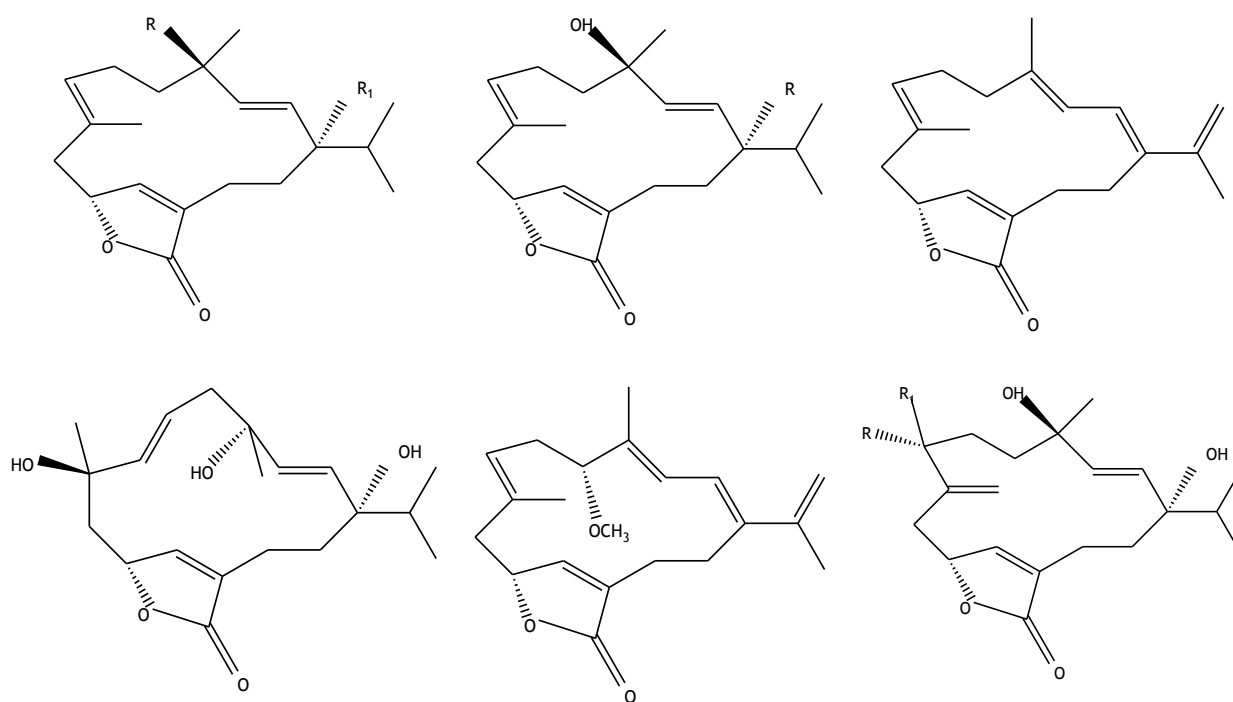


Figura 5 - Estrutura química de 6 cembranolidas

*Croton gratissimus* provou ter actividades de analgesia, antipirética, afrodisíaca, purgativa, anti-emética, sedativa, antiviral e antibacteriana. (Mulholland *et al.*, 2010)

## Capítulo II - Parte experimental

### 2.1. Instrumentação

#### Espetros de IV

Realizaram-se num espectrofotómetro FTIR Thermo Scientific Nicolet iS10, 2011, em filme capilar em janelas de NaCl.

#### Espetros de RMN ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )

Os espetros de RMN foram realizados num espectrómetro Brucker Avance III 400 MHz (400 MHz -  $^1\text{H}$  e 100,6 MHz -  $^{13}\text{C}$ ). Os desvios químicos,  $\delta$ , são expressos em p.p.m. utilizando como referência o  $\text{CHCl}_3$  do  $\text{CDCl}_3$ , 7,25 ppm para o  $^1\text{H}$  e 77,0 ppm para o  $^{13}\text{C}$ . As constantes de acoplamento,  $J$ , são apresentadas em Hz. Os solventes utilizados foram o  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### 2.2. Técnicas

#### Cromatografia em camada fina (c.c.f.)

As c.c.f. foram efectuadas em placas de sílica gel da ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>. As placas foram visualizadas por irradiação com luz ultravioleta de c.d.o.  $\lambda=254$  nm, para visualizar as substâncias fluorescentes, após o que foram reveladas. A revelação consistiu na imersão da placa com uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 5%, seguida de aquecimento em estufa, a 120° C, durante alguns minutos.

## Cromatografia em coluna húmida

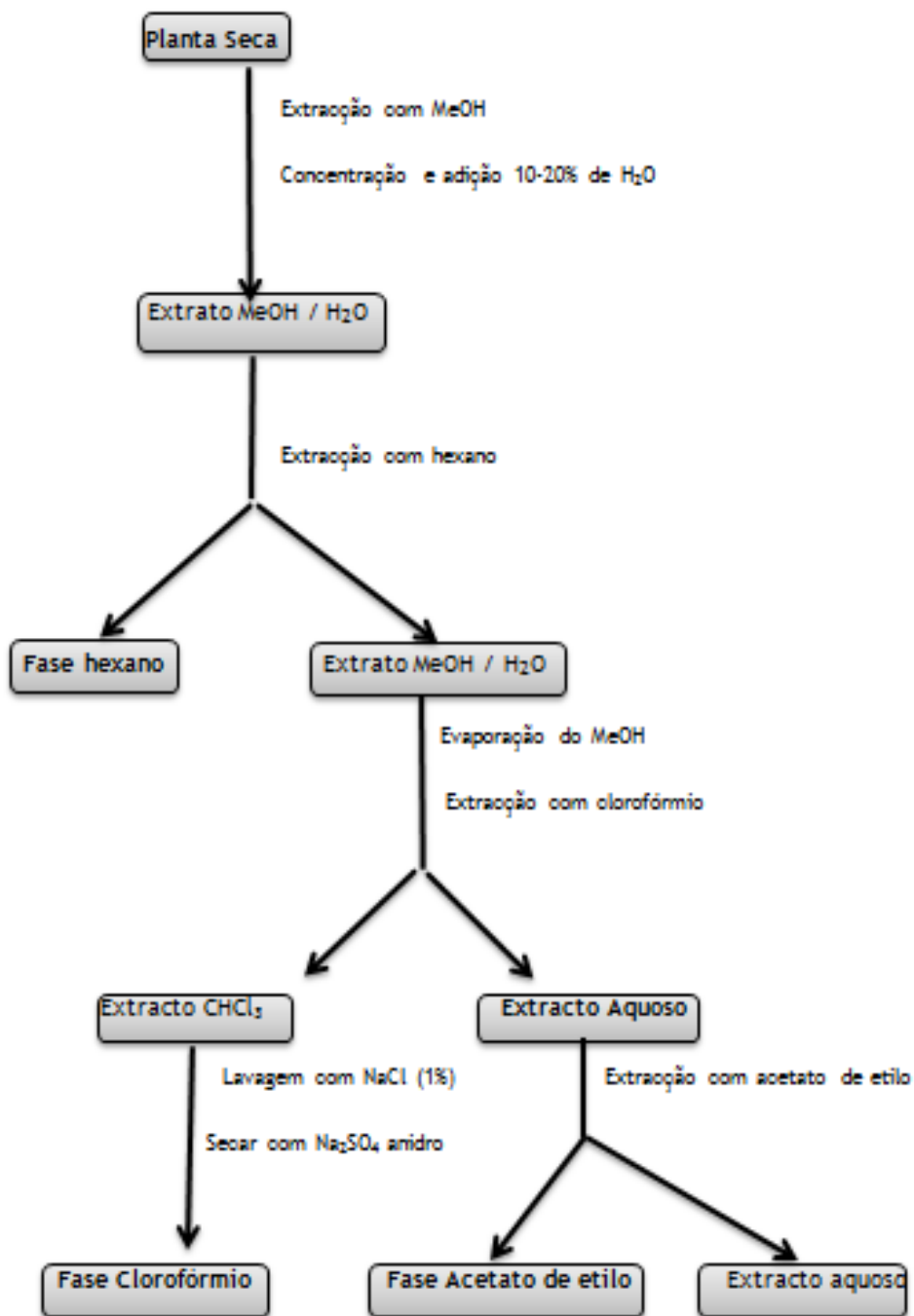
As várias cromatografias foram realizadas em coluna de vidro utilizando como adsorvente sílica gel flash de espessura 0,04-0,06 mm. Numa proporção de 1:100 com a substância a cromatografar.

## 2.3. Extracção e fraccionamento

O fruto da *Solanum incanum* e a parte aérea de *Croton gratissimus* foram colhidos na Quihita, na província de Huíla, em Angola, no dia 26 de Julho de 2011.

Os frutos de *Solanum incanum*, 1 Kg, foram cortados em pedaços e macerados em metanol durante uma semana. Os ramos, folhas e inflorescências, de *Croton gratissimus*, depois de secas foram trituradas (797 g) e maceradas em metanol durante 6 semanas, tendo-se obtido 142 g de extracto de metanol.

Para se obter os extractos de hexano, acetato de etilo e clorofórmio executaram-se consecutivas extrações, em ampola de decantação, segundo o esquema abaixo:



Inicialmente foram estudados os extractos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo do fruto do *Solanum incanum*. Durante esse estudo verificou-se que a composição química dos mesmos era pobre em compostos químicos pelo que o seu estudo foi abandonado. Realizou-se então o estudo do extracto de clorofórmio da *Croton gratissimus*.

## 2.4. *Solanum incanum*

### 2.4.1. Fracionamento do extracto de acetato de etilo

#### *Cromatografia 1*

Foram cromatografadas 1,8 g do extracto de acetato de etilo sobre aproximadamente 50 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1	Clorofórmio/MeOH 95:5	140,0	8,2
2	Clorofórmio/MeOH 9:1	355,2	20,9
3	Clorofórmio/MeOH 7:3	210,6	12,4
4	Clorofórmio/MeOH 1:1	342,2	20,1
5	Clorofórmio/MeOH 3:7	280,0	16,4
6	Clorofórmio/MeOH 1:9	315,2	18,5
7	MeOH	60,0	3,5

#### *Cromatografia 2*

A fracção 1 (140 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-5	Clorofórmio	7,6	5,5
6-10	Clorofórmio/MeOH 99:1	5	3,6
11-15	Clorofórmio/MeOH 98:2	17	12,3
16-24	Clorofórmio/MeOH 95:5	19,2	13,9
25-34	Clorofórmio/MeOH 9:1	38	27,4
35-40	Clorofórmio/MeOH 8:2	44	31,8
41-45	Clorofórmio/MeOH 7:3	3,4	2,4
46-51	Clorofórmio/MeOH 6:4	1,7	1,2
52-53	Clorofórmio/MeOH 1:1	1,5	1,1
54	MeOH	1,1	0,8

### **Cromatografia 3**

A fracção 2 (355 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-4	Clorofórmio	7,2	2,1
5-8	Clorofórmio/MeOH 98:2	58,2	16,6
9-14	Clorofórmio/MeOH 95:5	121,3	34,6
15-21	Clorofórmio/MeOH 9:1	93,3	26,6
22-27	Clorofórmio/MeOH 8:2	28,7	8,2
28-33	Clorofórmio/MeOH 7:3	30	8,5
34-38	Clorofórmio/MeOH 6:4	6,1	1,7
39-43	Clorofórmio/MeOH 1:1	6,1	1,7
44	MeOH	2,1	0,6

### **Cromatografia 4**

A fracção 3 (211 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fracção	Eluente	Peso (mg)	%
1-5	Clorofórmio	5,6	2,7
6-14	Clorofórmio/MeOH 95:5	111,1	53,2
15-20	Clorofórmio/MeOH 9:1	19,8	9,5
21-25	Clorofórmio/MeOH 8:2	23,2	11,1
26-30	Clorofórmio/MeOH 7:3	25,7	12,3
31-37	Clorofórmio/MeOH 6:4	14,8	7,1
38-44	Clorofórmio/MeOH 1:1	7	3,4
45	MeOH	1,4	0,7

### **Cromatografia 5**

A fracção 4 (342 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%	Composição
1-5	Clorofórmio	77	22,9	---
6-12	Clorofórmio/MeOH 95:5	103,6	31,0	---
13-17	Clorofórmio/MeOH 9:1	26,2	7,8	---
18-20	Clorofórmio/MeOH 8:2	22,4	6,7	Misturas+P1
21	Clorofórmio/MeOH 8:2	5,4	1,7	Composto P1
22	Clorofórmio/MeOH 7:3	15	4,5	Composto P1
23-26	Clorofórmio/MeOH 7:3	48,8	14,6	---
27-32	Clorofórmio/MeOH 6:4	15,6	4,7	---
33-36	Clorofórmio/MeOH 1:1	19	5,7	---
37	MeOH	1,2	0,4	---

### Cromatografia 6

A fração 5 (280 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-4	Clorofórmio	2,1	0,8
5-8	Clorofórmio/MeOH 95:5	11,2	4,1
9-15	Clorofórmio/MeOH 9:1	70,8	26,0
16-21	Clorofórmio/MeOH 8:2	70,6	25,9
22-26	Clorofórmio/MeOH 7:3	49,7	18,2
27-31	Clorofórmio/MeOH 6:4	15,2	5,6
32-34	Clorofórmio/MeOH 1:1	0,6	0,2
35-39	Clorofórmio/MeOH 3:7	32,4	11,8
40-42	Clorofórmio/MeOH 1:9	17,5	6,4
43	MeOH	2,3	0,8

**Cromatografia 7**

A fracção 6 (315 mg) da cromatografia 1 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio/metanol e metanol por ordem crescente de polaridades.

Fracção	Eluente	Peso (mg)	%
1-6	Clorofórmio/MeOH 95:5	34,6	11,0
7-14	Clorofórmio/MeOH 9:1	45,8	14,6
15-20	Clorofórmio/MeOH 8:2	42,6	13,6
21-25	Clorofórmio/MeOH 7:3	68,2	21,7
26-30	Clorofórmio/MeOH 6:4	18,1	5,8
31-35	Clorofórmio/MeOH 1:1	41,1	13,1
36-39	Clorofórmio/MeOH 3:7	38,2	12,2
40-43	Clorofórmio/MeOH 1:9	22,8	7,3
44	MeOH	2,1	0,7

**2.4.2. Fracionamento do extracto de hexano****Cromatografia 8**

Foram cromatografadas 230 mg do extracto de hexano sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano, hexano/acetato de etilo e metanol por, ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-6	Hexano	6,8	3,0
7-14	Hex/AcOEt 99:1	35,5	15,7
15-20	Hex/AcOEt 98:2	4,2	1,9
21-25	Hex/AcOEt 95:5	4,3	1,9
26-30	Hex/AcOEt 9:1	7,7	3,4
31-35	Hex/AcOEt 8:2	12,4	5,5
36-39	Hex/AcOEt 7:3	8,4	3,7
40-43	Hex/AcOEt 6:4	11,5	5,1
44-47	Hex/AcOEt 1:1	34	15,1
48	MeOH	100,9	44,7

### 2.4.3. Fracionamento do extracto de clorofórmio

#### *Cromatografia 9*

Foram cromatografadas 250 mg do extracto de clorofórmio sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano, hexano/acetato de etilo e metanol, por ordem crescente de polaridades

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-7	Hex/AcOEt 95:5	146,9	59,0
8-12	Hex/AcOEt 9:1	0,8	0,3
13-16	Hex/AcOEt 8:2	3,6	1,4
17-23	Hex/AcOEt 7:3	4	1,6
24-31	Hex/AcOEt 6:4	8,3	3,3
32-37	Hex/AcOEt 1:1	2,5	1,0
38	MeOH	83,2	33,4

### **Cromatografia 10**

A fracção 1 (81,1 mg) da cromatografia 9 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como hexano, hexano/acetato de etilo e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-10	Hexano	8	10,1
11-20	Hex/AcOEt 99:1	16,2	20,4
21-30	Hex/AcOEt 98:2	3	3,8
31-39	Hex/AcOEt 95:5	4,4	5,5
40-41	Hex/AcOEt 9:1	3,4	4,3
42-43	Hex/AcOEt 8:2	7,7	9,7
44-45	Hex/AcOEt 7:3	12,3	15,5
46-47	Hex/AcOEt 6:4	5,2	6,5
48-49	Hex/AcOEt 1:1	3,6	4,5
50	MeOH	15,7	19,7

## **2.5. *Croton gratissimus***

### **2.5.1. Fracionamento do extrato de clorofórmio**

#### **Cromatografia 11**

Foram cromatografadas 13 g do extracto de clorofórmio sobre aproximadamente 150 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano, hexano/acetato de etilo e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%	Composição
1	Hexano	0	0	---
2	Hex/ AcOEt 9:1	10	0,1	---
3	Hex/ AcOEt 8:2	120	0,9	Misturas + P2
4	Hex/ AcOEt 7:3	595	4,7	Misturas + P2
5	Hex/ AcOEt 6:4	300	2,4	---
6	AcOEt	1900	15,0	---
7	AcOEt /MeOH 95:5	6790	53,7	---
8	AcOEt /MeOH 9:1	670	5,3	---
9	MeOH	2255	17,8	---

### ***Cromatografia 12***

A fração 4 (595 mg) da cromatografia 11 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo, acetato de etilo e acetato de etilo/metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%	Composição
1-9	Hex/AcOEt 95:5	5,8	1,0	---
10-12	Hex/AcOEt 95:5	0,8	0,1	Composto P2
13-16	Hex/AcOEt 95:5	1,2	0,2	---
17-23	Hex/AcOEt 9:1	7,5	1,3	---
24-30	Hex/AcOEt 8:2	179,4	30,4	---
31-36	Hex/AcOEt 7:3	192,2	32,6	---
37-42	Hex/AcOEt 6:4	33,0	5,6	---
43-58	Hex/AcOEt 1:1	103,4	17,5	---
59-65	AcOEt	36,8	6,2	---
66-70	AcOEt/MeOH 95:5	20,4	3,5	---
71-75	AcOEt/MeOH 9:1	7,7	1,3	---
76	MeOH	2,2	0,4	---

### Cromatografia 13

A fracção 25-28 (150 mg) da cromatografia 12 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo e acetato de etilo, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-11	Hex/AcOEt 95:5	15,0	10,0
12-69	Hex/AcOEt 9:1	76,0	51,2
70-93	Hex/AcOEt 8:2	29,0	19,5
94-107	Hex/AcOEt 7:3	20,9	14,1
108-112	Hex/AcOEt 6:4	3,8	2,6
113-114	AcOEt	3,8	2,6

**Cromatografia 14**

A fração 33-35 (69 mg) da cromatografia 12 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo e acetato de etilo, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-17	Hex/AcOEt 8:2	10,1	14,9
18-29	Hex/AcOEt 7:3	46,3	68,1
30-43	Hex/AcOEt 1:1	7,3	10,8
44-47	AcOEt	4,2	6,2

**Cromatografia 15**

A fração 46-49 (101 mg) da cromatografia 12 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo e acetato de etilo, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-11	Hex/AcOEt 7:3	6,3	6,3
12-23	Hex/AcOEt 6:4	3,2	3,2
24-36	Hex/AcOEt 1:1	3,5	3,5
37-56	Hex/AcOEt 4:6	34,7	34,4
57-69	Hex/AcOEt 3:7	53	52,6
70-73	AcOEt	0	0

**Cromatografia 16**

A fração 5 (300 mg) da cromatografia 11 foi cromatografada sobre aproximadamente 10 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-23	Hex/AcOEt 9:1	11,1	3,7
24-65	Hex/AcOEt 8:2	220,9	73,8
66-76	Hex/AcOEt 7:3	14,8	4,9
77-90	Hex/AcOEt 6:4	11,8	3,9
91-100	Hex/AcOEt 1:1	7,4	2,5
101-110	AcOEt/MeOH 95:5	14,8	4,9
111-120	AcOEt/MeOH 9:1	16,9	5,6
121-125	MeOH	2,2	0,7

**Cromatografia 17**

A fração 6 (1,9 g) da cromatografia 11 foi cromatografada sobre aproximadamente 200 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1	Hex/AcOEt 1:1	1360,0	71,8
2	Hex/AcOEt 3:7	220,0	11,6
3	AcOEt	190,0	10,0
4	AcOEt/MeOH 95:5	80,0	4,2
5	AcOEt/MeOH 8:2	45,0	2,4
6	MeOH	0	0

### **Cromatografia 18**

A fracção 3 (190 mg) da cromatografia 17 foi cromatografada sobre aproximadamente 15 g de sílica gel, utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-8	Clorofórmio	16,2	8,5
9-15	Clorofórmio/MeOH 98:2	36,0	19,0
16-26	Clorofórmio/MeOH 95:5	102,1	53,8
27-35	Clorofórmio/MeOH 9:1	8,8	4,6
36-43	Clorofórmio/MeOH 8:2	0	0
44-51	Clorofórmio/MeOH 7:3	8,6	4,5
52-59	Clorofórmio/MeOH 6:4	10,1	5,3
60-68	Clorofórmio/MeOH 1:1	4,9	2,6
69-76	Clorofórmio/MeOH 4:6	2,8	1,5
77-79	MeOH	0,3	0,2

**Cromatografia 19**

A fração 1 (1360 mg) da cromatografia 17 foi cromatografada sobre aproximadamente 50 g de sílica gel, utilizando como eluentes hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol e metanol, por ordem crescente de polaridades.

Fração	Eluente	Peso (mg)	%
1-27	Hex/AcOEt 8:2	330,0	24,5
28-45	Hex/AcOEt 7:3	721,0	53,5
46-60	Hex/AcOEt 6:4	133,2	9,9
61-72	Hex/AcOEt 1:1	45,6	3,4
73-83	Hex/AcOEt 2:8	34,8	2,6
84-89	AcOEt/MeOH 95:5	22,1	1,6
90-99	AcOEt/MeOH 9:1	20,4	1,5
100-104	MeOH	41,1	3,0

## Capítulo III - Resultados e discussão

### 3.1. Identificação dos produtos

#### 3.2.1. P<sub>1</sub>: Ácido cafeico

O composto P1 foi identificado na fracção 21/22 da coluna 5 com uma massa de 20,4 mg e apresenta-se como um semi-sólido.

O espectro de IV apresenta bandas de grupo hidroxilo ( $3359\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação OH de ácidos carboxílicos ( $3667\text{-}2392\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação C=C ( $1693\text{ cm}^{-1}$ ), das ligações C=C aromáticas ( $1633$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) e de um fenilo 1,3,5-trissubstituído ( $855$ ,  $813\text{ cm}^{-1}$ ). (Figura 8)

No seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9) observam-se os seguintes sinais a  $\delta$  (ppm):

- 7,47 e 6,18 (1H; d;  $J = 15,9\text{ Hz}$ , cd) característicos de hidrogénio sobre ligação dupla com acoplamento trans
- 6,95 (1H; d;  $J = 2,0\text{ Hz}$ ) característico de um anel aromático
- 6,84 (1H; dd;  $J_1 = 8,2\text{ Hz}$  e  $J_2 = 2,0\text{ Hz}$ ) característico de um anel aromático
- 6,68 (1H; d;  $J = 8,2\text{ Hz}$ ) característico de um anel aromático

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 10), verifica-se a presença de sinais de 9 carbonos, que pela análise do espectro DEPT correspondem a cinco metinos (três aromáticos e dois de ligação dupla) e quatro carbonos quaternários (um de um ácido carboxílico e três aromáticos (dois deles ligados a oxigénio)).

Pela análise dos quatro espectros anteriores pode-se concluir que a molécula apresenta um anel aromático trissubstituído com uma substituição será 1,3,5-, pois é o único tipo de substituição que justifica o desdobramento dos sinais dos prótons aromáticos em duplete, duplo duplete e duplete com as constantes de acoplamento respetivas. Verifica-se, ainda, a presença de sinais de dois hidrogénios de uma ligação dupla, não aromática, na molécula ( $\delta$  7,47 e 7,18 ppm 1H, d, cd) que pela sua constante de acoplamento de 15,9 Hz demonstram encontrar-se na forma *E*. Finalmente o carbono quaternário a 169,1 ppm conjugado com a banda de IV de OH de ácido carboxilo ( $3667\text{-}2392\text{ cm}^{-1}$ ) indicam a presença de um grupo carboxilo na molécula.

Por análise dos espectros de RMN bidimensionais de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY, HSQC e HMBC (Tabela 1) e por comparação com os dados bibliográficos (Maas *et al.*, 2009; Honeisein *et al.*, 2003) verificou-se que o composto isolado era o ácido cafeico.

Tabela 1 - Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, MeOH) do composto P<sub>1</sub>.

Posição	$^{13}\text{C}$	Multiplicidade	$^1\text{H}$	HMBC
1	128,0	C		
2	115,3	CH	6,95 (d; 2,0)	3, 4, 6
3	147,0	C		
4	149,7	C		
5	116,6	CH	6,68 (d; 8,2)	1, 3, 4, 6
6	123,1	CH	6,84 (dd; 8,2; 2,0)	2, 4, 7
7	147,2	CH	7,47 (d; 15,9)	1, 6, 8, 9
8	115,5	CH	6,18 (d; 15,9)	1, 9
9	169,1	C		

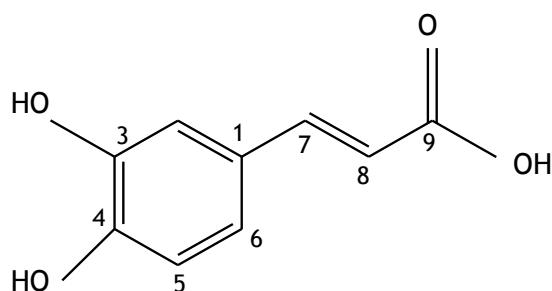


Figura 6 - Estrutura química do ácido cafeico

### 3.2.2. P<sub>2</sub>: 7- $\beta$ -metóxiopposit-4(15)-en-1- $\beta$ -ol

O composto P2 foi identificado na fracção 10/12 da coluna 12 com uma massa de 0,8 mg. É um óleo incolor.

O seu espectro de IV apresenta bandas de grupo hidroxilo ( $3428\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação CH de alenos ( $3090\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação C=C ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), de um grupo metoxilo ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ). (Figura 15)

Os seguintes sinais a  $\delta$  (ppm) observam-se no seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16):

- 4,85 e 4,95 (1H; sl; cd) característicos de um grupo metileno terminal

- 3,55 (1H; t; J = 10,6 Hz) característico de um hidrogénio geminal a uma função oxigenada
- 3,40 (1H; dd; J<sub>1</sub> = 11,7 Hz e J<sub>2</sub> = 4,7 Hz) característico de um hidrogénio geminal a uma função oxigenada
- 3,17 (3H,s) característico de um metilo de um metoxilo
- 0,94 e 0,86 (3H; d; J = 7,0 Hz, cd) característico de dois metilos de um grupo isopropilo
- 0,71 (3H; s) característico de um grupo metilo.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C apresenta sinais de 16 carbonos, que pela análise do espectro DEPT correspondem a quatro metilos (um metoxilo), cinco metilenos (um terminal), cinco metinos (dois ligados a oxigénio) e dois carbonos quaternários (um de uma ligação dupla). O que corresponde a um sesquiterpeno em que um dos quatro grupos metilos se encontra sob a forma de um metileno terminal; apresenta ainda como funcionalização um grupo hidroxilo que se encontra em posição β devido as constantes de acoplamento que apresenta (J<sub>1</sub> = 11,7 Hz e J<sub>2</sub> = 4,7 Hz) (Wang *et al.*, 2011) e um grupo metoxilo. Este sesquiterpeno apresenta no seu esqueleto um grupo isopropilo e o seu terceiro metilo apresenta-se bastante desblindado (11,7 ppm).

A completa elucidação estrutural deste composto foi conseguida através dos espectros de RMN bidimensionais de <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC e NOESY (Tabela 2) e por comparação com os dados bibliográficos (Al-Rehaitly *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011) verificou-se que o composto apresentava um esqueleto oppositano ou axano. Uma vez que o metilo 14 se encontra bastante desblindado (11,7 ppm) o composto só pode ser um oppositano (Al-Rehaitly *et al.*, 2002). Por comparação entre os dados espectroscópicos e a bibliografia (Xie *et al.*, 2010) verificou-se que o composto isolado era o 7-β-metóxiopposit-4(15)-en-1-β-ol.

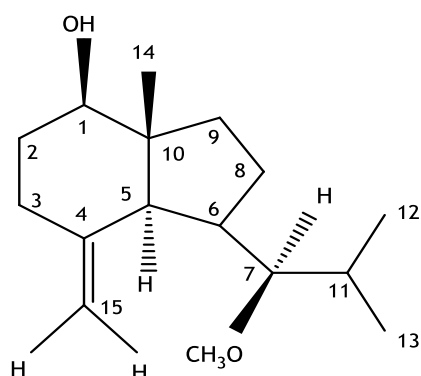


Figura 7 - 7-β-metóxiopposit-4(15)-en-1-β-ol

Tabela 2 - Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto P<sub>2</sub>.

Posição	<sup>13</sup> C	Multiplicidade	<sup>1</sup> H	HMBC
1	79,5	CH	3,40 (dd; 11,7; 4,7)	9,14
2	32,1	CH <sub>2</sub>	1,50; m; 1,83, m	1,3,10
3	35,1	CH <sub>2</sub>	2,07 (dl; 5,1) 2,29 (ddd;13,2; 5,1; 2,3)	2,4,15
4	144,6	C		
5	51,2	CH	1,90; m	4,6,7,10,14,15
6	46,3	CH	1,48; m	7
7	74,9	CH	3,55; t; 10,6	5,6
8	18,4	CH <sub>2</sub>	1,54; m	7,9,10
9	36,2	CH <sub>2</sub>	1,08; td; 12,9; 3,4; 1,89; m	1,5,6,8,10,14
10	42,0	C		
11	25,7	CH	2,12; m	12,13
12	15,9	CH <sub>3</sub>	0,86; d; 7,0	6,11,13
13	21,1	CH <sub>3</sub>	0,94;d; 7,0	6,11,12
14	11,7	CH <sub>3</sub>	0,71; s	1,5,9,10
15	109,0	CH <sub>2</sub>	4,85; sl; 4,95; sl	3,5
16	52,6	CH <sub>3</sub>	3,17; s	7

## Capítulo IV - Conclusão

Este trabalho incidiu no estudo da composição química dos frutos da *Solanum incanum* e da parte aérea de *Croton gratissimus*, colhidos na província de Huíla em Angola.

Foram identificados, mas não isolados, no extracto de clorofórmio da *Solanum incanum* o composto:

- Ácido cafeico

E do extrato de clorofórmio da *Croton gratissimus*:

- 7-B-metóxiopposit-4(15)-en-1-β-ol

Ambos os compostos são conhecidos, já foram isolados e identificados como produtos naturais. No entanto, nunca foram identificados nestas espécies.

O objectivo deste trabalho era estudar os extractos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo das duas espécies mas, no horizonte de tempo disponível, não foi possível concluir o estudo.

Os compostos isolados foram completamente elucidados por técnicas de espectroscopia de IV, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e RMN bidimensional  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC e NOESY.

## Bibliografia

- Aderogba, M.A., McGaw L. J.; Bezabih, M; Abegaz, B.M. Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1224-1233.
- Al-Fatimi, M., Wurste, M.; Schroder, G.; Lindequist, U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 657-666.
- Alonso-Castro, A. J.; Ortiz-Sánchez, E.; Domínguez, F., López-Toledo, G.; Ortiz-Tello, M. C.; de Jesús, A.; García-Carrancá, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140*, 438-442.
- Al-Rehaily, A.J.; Ahmad, M. S.; Mossa; J. S.; Muhammad, I. New axane and oppositade sesquiterpenes from *Teclea nobilis*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1374-1376.
- Block, S., Baccelli, C.; Tinant, B.; Meervelt, L. V.; Rozenberg, R.; Jiwan, J.-L. H.; Llabrès G.; De Pauw-Gillet, M. C.; Quetin-Leclercq, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1165-1171.
- Cheikhoussef, A.; Shapi, M.; Matengu, Kenneth; Ashekele, H. M. Ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plant use by traditional healers in Oshikoto region, Namibia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2011**, *7*, 10.
- Chin, Y.-W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. *AAPS J.* **2006**, *8*, E239-E253
- Ji, H.-F.; Li, X.-J; Zhang, H.-Y. Natural products and drug discovery. *EMBO Rep.*, **2009**, *10*, 194-200.
- Dao, T.-T.; Lee, K.-Y.; Jeong, H-M; Nguyen, P-H; Tran, T. L. ent-Kaurane Diterpenoids from *Croton tonkinensis* Stimulate Osteoblast Differentiation. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 2526-2531.
- Filho, L. O. C.; Silva, M. H. M.; de Almeida-Cortez, J. S.; da Silva, S. I.; de Oliveira, A. F. M. Foliar cuticular n-alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid vegetation. *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *41*, 13-15.
- Hoeneisen, M.; Alarcón, J.; Aqueveque, P.; Bittner, M.; Becerra, J.; Silva, M.; Jakupovic, J. New caffeic acid esters from *Plazia daphnoides*. *Z. Naturforsch. C.* **2003**, *58*, 39-41.

Hung, H-Y; Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Hsueh, C.-S.; Lee, K.-H. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 580.

Hsu, S-H.; Tsai, T-R.; Lin, C-N.; Yen, M.-H.; Kuo, K-W. Solamargine Purified from *Solanum incanum* Chinese Herb Triggers Gene Expression of Human TNFR I Which May Lead to Cell Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *229*, 1-5.

Knapp, S.; Bohs, L.; Nee, M.; Spooner, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. *Comp. Funct. Genom.* **2004**, *5*, 285-291.

Langat, M. K.; Crouch N. R; Smith, P. J.; Mulholland, D. A. Cembranolides from the Leaves of *Croton gratissimus*. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 2349-2355.

Ma, C.; Whitaker, B. D.; Kennelly, E. J. New 5-O-Caffeoylquinic Acid Derivatives in Fruit of the Wild Eggplant Relative *Solanum viarum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11036-11042.

Ma, C; Dastmalchi, K.; Whitaker, B. D.; Kennelly, E. J. Two New Antioxidant Malonated Caffeoylquinic Acid Isomers in Fruits of Wild Eggplant Relatives. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9645-9651

Maas, M.; Petereit, F.; Hensel, A. Caffeic acid derivatives *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*, **2009**, *14*, 36-45.

Kambizi, L.; Afolayan, A.J. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njohera) in Guruve District, Zimbabwe. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *77*, 5-9.

Li, X.; Ying, Z.; Mei, J.; Shan-shan, L.; Min, C.; Hong-xiang, L. Induction of actin disruption and downregulation of P-glycoprotein expression by solamargine in multidrug-resistant K562/A02 cells. *Chinese Med. J-Peking*, **2011**, *124*, 2038-2044.

Liang, C-H.; Liub, L-F.; Shiu, L-Y.; Huang, Y-S.; Changa, L-C.; Kuo, K.-W. Action of solamargine on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 751-758

Liu, L-F.; Liang, C-H.; Shiu, L-Y.; Lin, W.-L.; Lin, C-C; Kuo, K-W. Action of solamargine on human lung cancer cells - enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. *FEBS Letters*, **2004**, *577*, 67-74.

Mollick, A. S.; Shimojia, H.; Dendab, T.; Yokotab, M.; Yamasakia, H. *Croton Codiaeum variegatum* (L.) Blume cultivars characterized by leaf phenotypic parameters. *Sci. Horticult.-Amsterdam* **2011**, *132*, 71-79.

Mora, S.; Castro, V.; Poveda, L.; Chavarria, M., Murillo R. Two New 3,4-Seco-ent-kaurenes and Other Constituents from the Costa Rican Endemic Species *Croton megistocarpus*. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 1888-1892.

Mota, L. B.; Furlan, C. M.; Santos, D. Y. A. C.; Salatino, M. L. F.; Duarte-Almeida, J. M.; Negri, G.; de Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Cordeiro, I., Salatino, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 972-977.

Mulholland, D. A.; Langat, M. K.; Crouch, N. R.; Coley, H. M.; Mutambi, E. M.; Nuzillard, J.-M. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1381-1386.

Okokon, J. E.; Nwafor, P. A. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *121*, 74-78.

Oliveira, T. G. de; Pina, P. S. S.; Bertoni, B. W.; França, S. de C.; Pereiral, A. M. S. Micropropagation of *Croton antisiphiliticus* Mart. *Cienc. Rural* **2011**, *41*, 1712-1718.

Poczai, P.; Cernák, I.; Gorji, A. M.; Nagy, S.; Taller, J.; Polgár, Z. Development of intron targeting (it) markers for potato and cross-species amplification in *Solanum nigrum* (solanaceae). *Am. J. Bot.*, **2010** e142-e145

Pudhom, K.; Sommit, D. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius*. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 147-150.

Rath, S.; Patra, J. K.; Mohapatra, N.; Mohanty, G.; Dutta, S.; Thatoi H. In Vitro Antibacterial and Antioxidant Studies of *Croton roxburghii* L., from Similipal Biosphere Reserve. *Indian J. Microbiol.* **2011**, *51*, 363-368.

Riina, R.; Berry, P.E. *Croton maasii* (Euphorbiaceae), a new species from the western Amazon region. *Blumea* **2011**, *56*, 146-148.

Robert, S.; Baccelli, C.; Devel, P.; Dogné, J.-M.; Quetin-Leclercq, J. Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 641-648.

Rossi, D.; Guerrini, A.; Maietti, S.; Bruni, R.; Paganetto, G.; Poli, F.; Scalvenzi, L.; Radice, M.; Saro, K.; Sacchetti, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chem.* **2011**, *126*, 837-848.

Salas, P.; Rivas-Sendra, A.; Prohens, J.; Seguí-Simarro, J. M. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica* **2012**, *184*, 235-250

Scalon, S. P.Q.; Mussury, R. M.; Lima, A. A. Germination of *Croton urucurana* L. seeds exposed to different storage temperatures and pre-germinative treatments. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2012**, *84*, 191-200.

Shiu, L.Y.; Chang, L.C.; Liang, C.H.; Huang, Y.S.; Sheu, H.M.; Kuo, K.W. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 2155-2164

Silva, S de O.; Peixoto, R. N.S.; Silva, J. R. A.; Alves, C. N.; Guilhon, G. M.S.P.; Santos, L. S.; Brasil, D. do S.B. Identification of (-) (E)-N-[2 (S) -Hydroxy-2- (4-hydroxyphenyl)ethyl] ferulamide, a Natural Product Isolated from *Croton Pullei*: Theoretical and Experimental Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 9389-9403.

Silva-Filho, F. A.; Braz-Filho, R.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S. Structure elucidation of casbane diterpenes from *Croton argyrophyllus*. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 370-373.

Vuuren, S.F. van; Viljoen, A.M. In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 700-704.

Vuuren, S.F. van; Naidoo, D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *J. Ethnopharmacol.* **130**, 552-558.

Wang, W.-X.; Cao, L.; Xiong, J.; Xia, G.; Hu, J.-F. 2011 Constituents from *Chimonanthus praecox* (wintersweet). *Phytochem. Lett.* **2010**, *4*, 271-274.

Webster, L. Grady Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Mo Bot. Gard.* **1994**, *81*, 33-144.

Xie, W.-D.; Niu, Y.-F.; Lai, P.-X.; Row, K.-H. Sesquiterpenoids and other constituents from *Senecio argunensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 991-994.

Huang, C.-Y. ; Su, J.-H ; Liu, Y.-C. ; Wen, Z.-H. ; Hsu, C.-H. ; Chiang, M. Y. ; Sheu, J.-H. Oppositane-type sesquiterpenoids from the Formosan. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83*, 678-682.

## Anexos

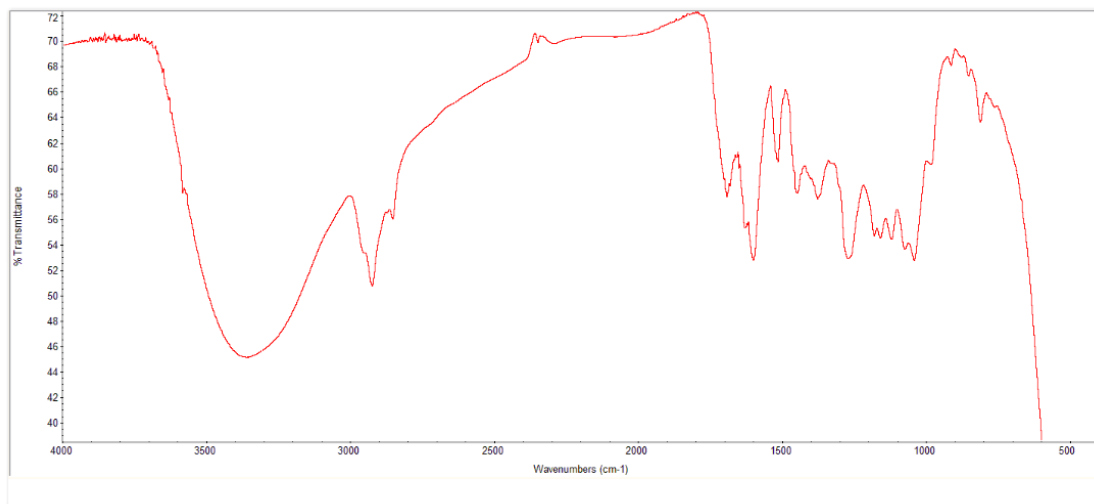


Figura 8 - Espetro de infravermelho do composto P<sub>1</sub>.

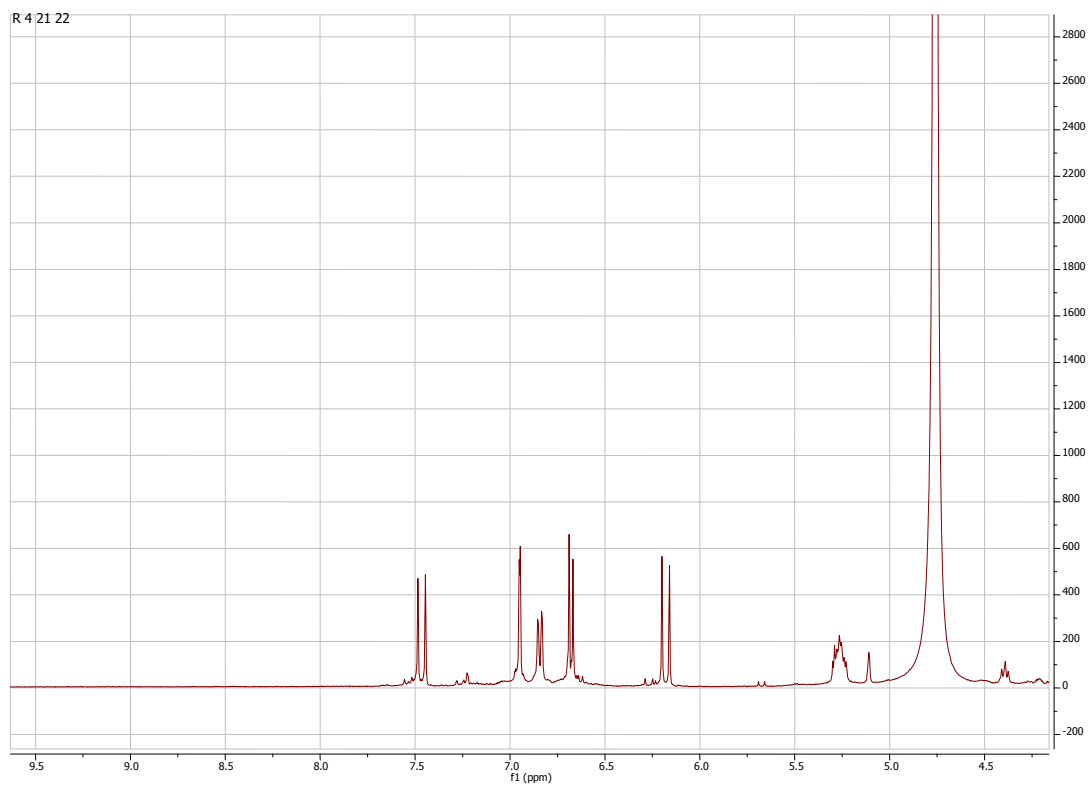


Figura 9 - Espetro RMN <sup>1</sup>H do composto P<sub>1</sub>

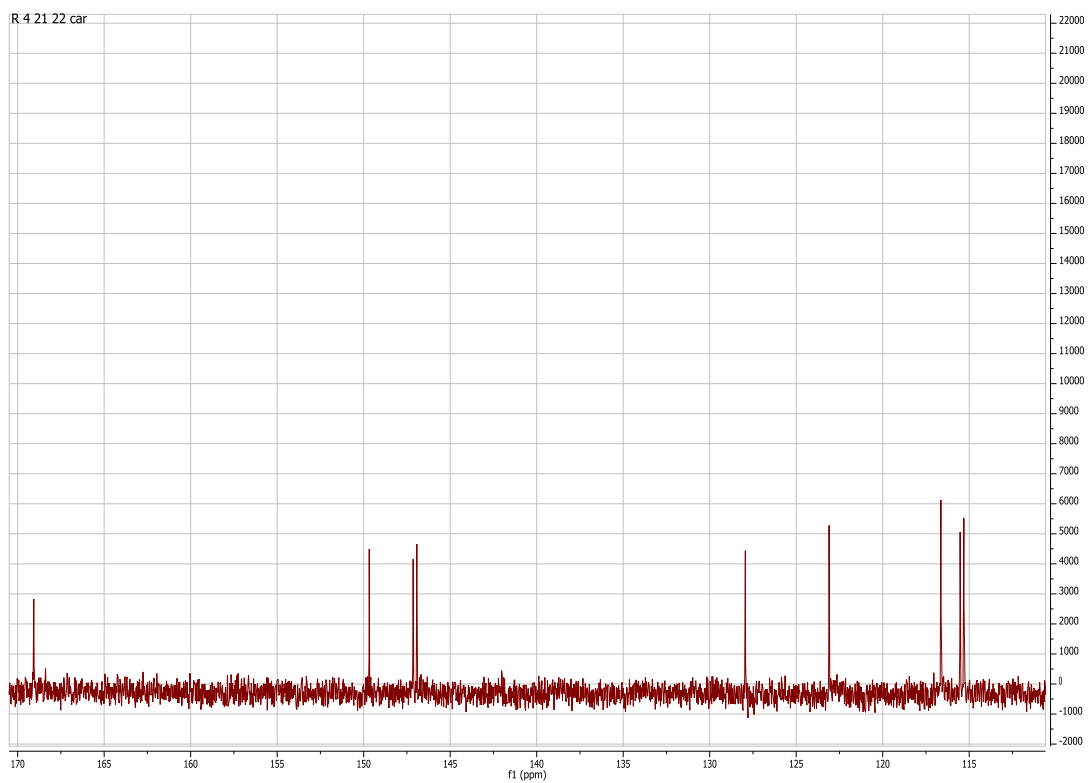


Figura 10 - Espetro RMN  $^{13}\text{C}$  do composto  $\text{P}_1$ .

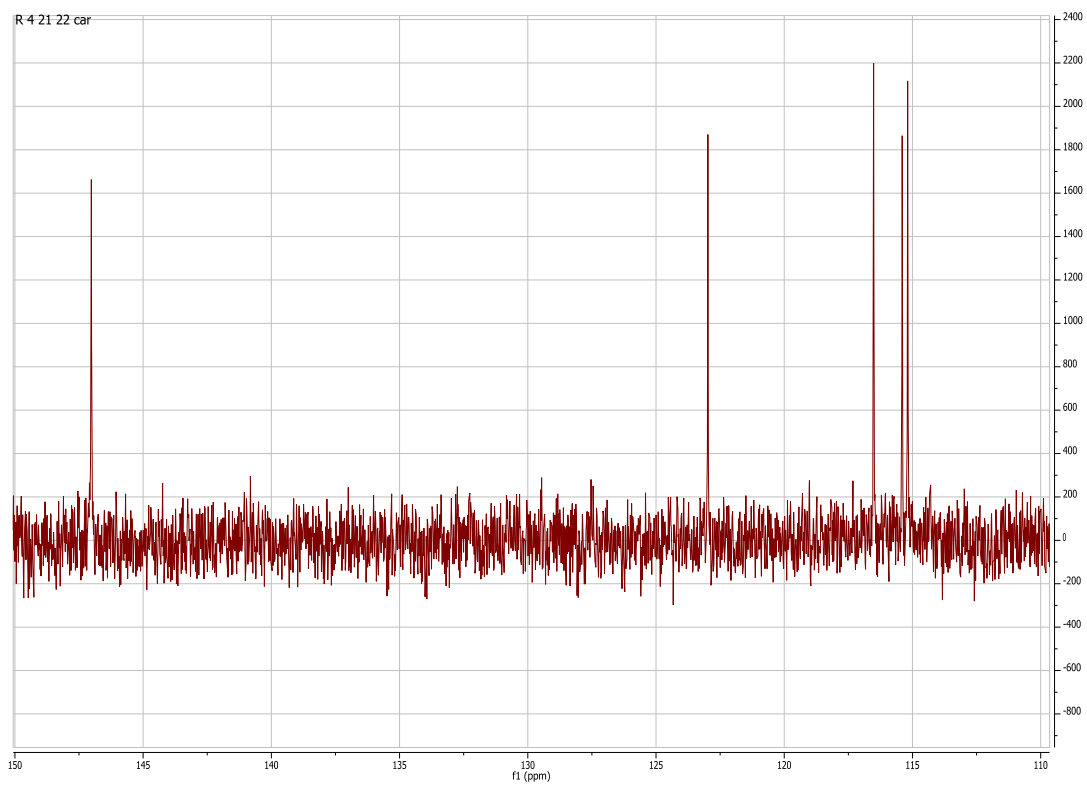


Figura 11 - Espetro DEPT-135 do composto  $\text{P}_1$ .

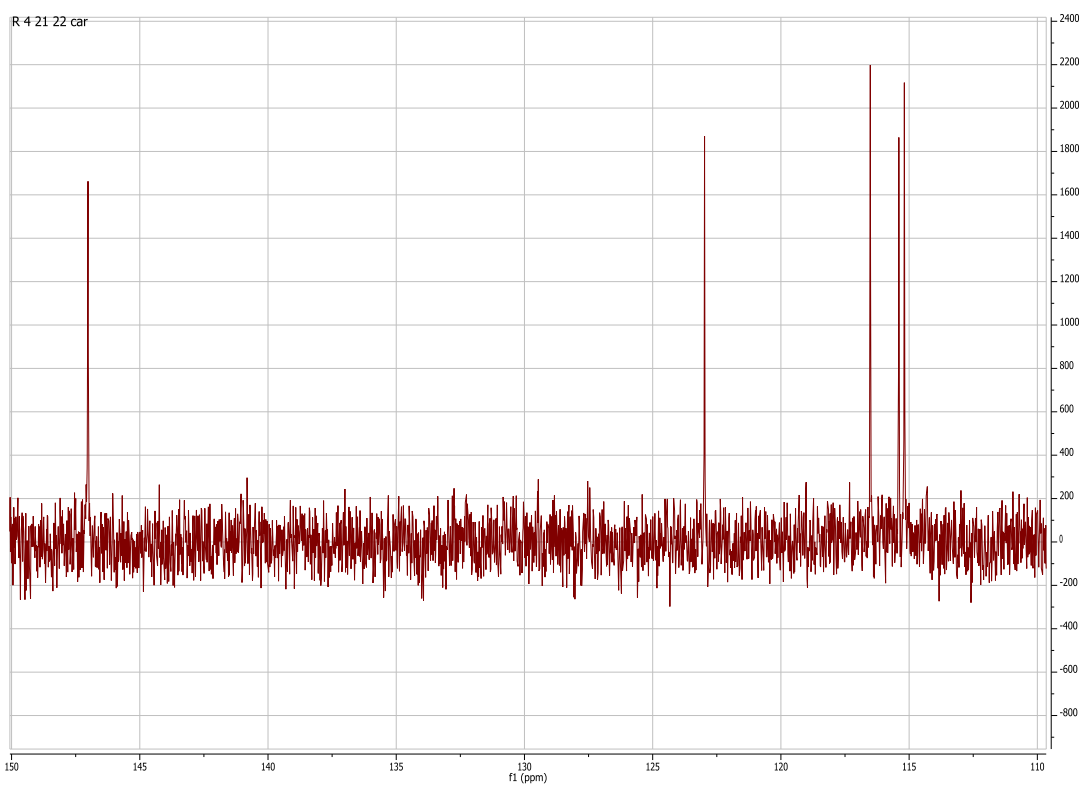


Figura 12 - Espectro de DEPT-90 do composto P<sub>1</sub>.

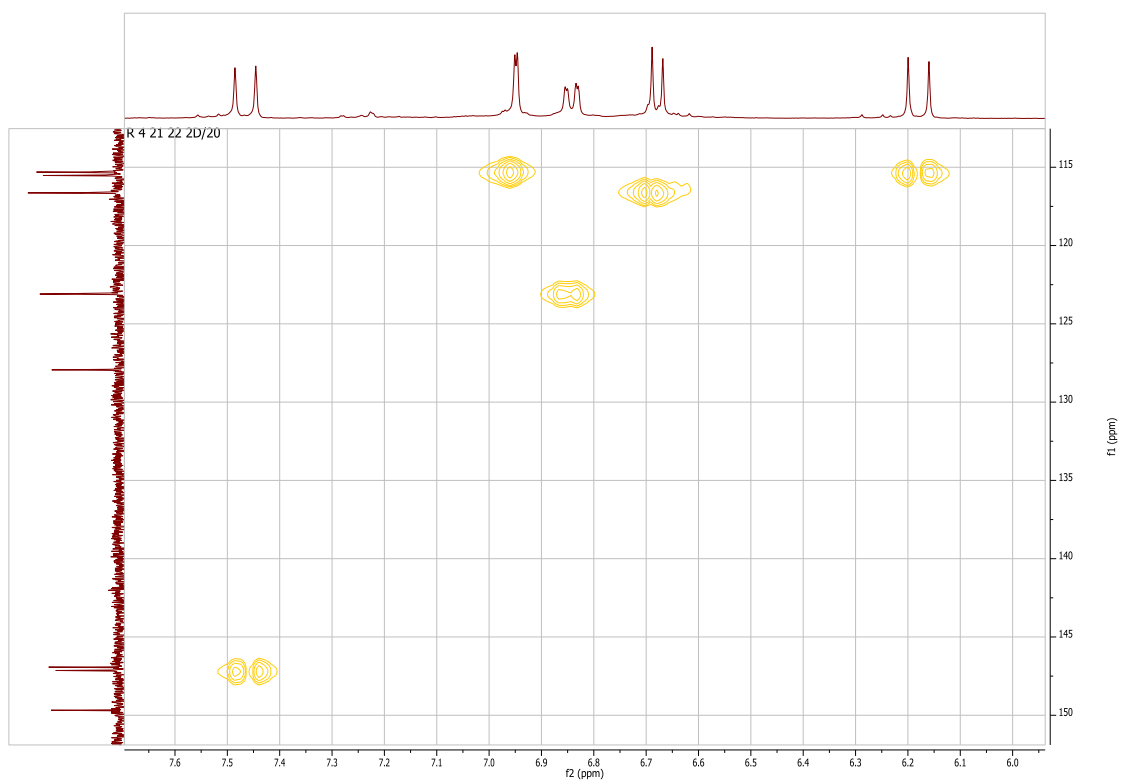


Figura 13 - Espectro de correlação bidimensional <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C (HSQC) do composto P<sub>1</sub>.

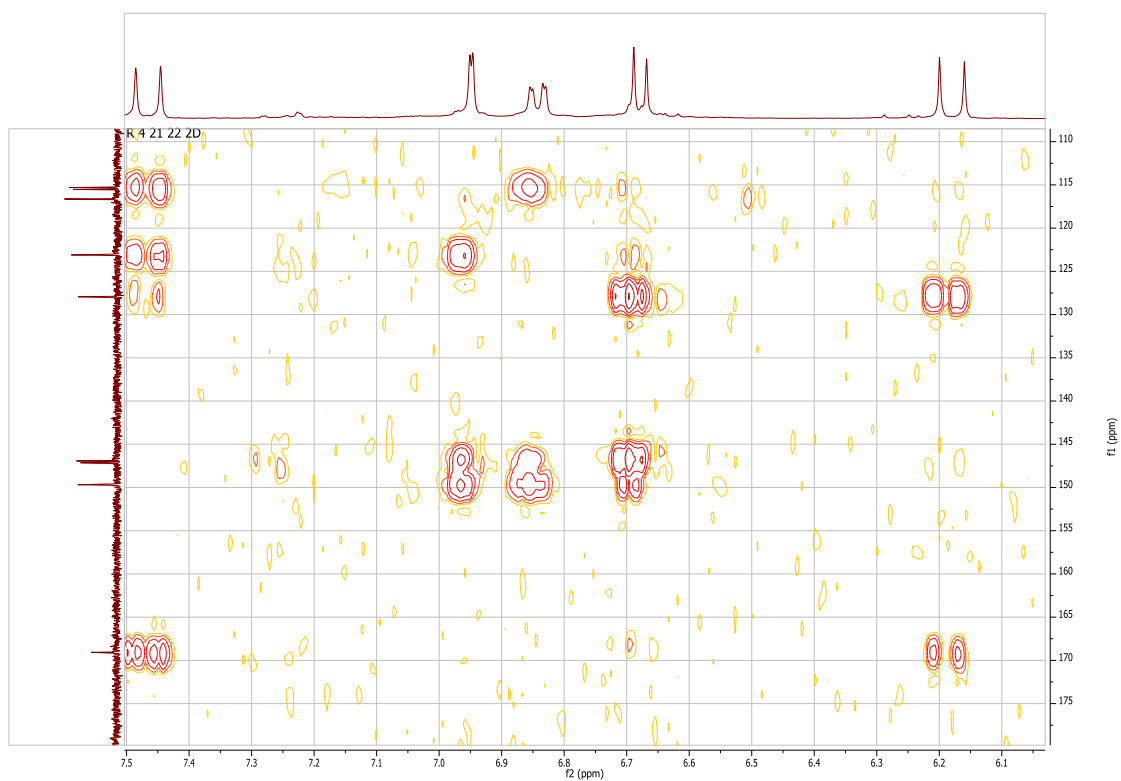


Figura 14 - Espectro de correlação bidimensional  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HMBC) do produto  $\text{P}_1$ .

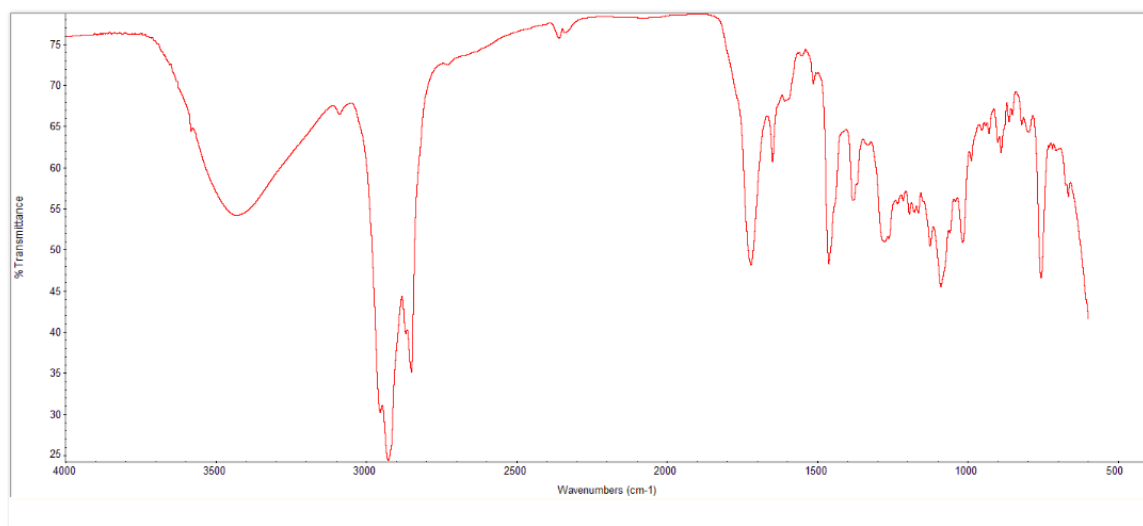


Figura 15 - Espectro de infravermelho do composto  $\text{P}_2$ .

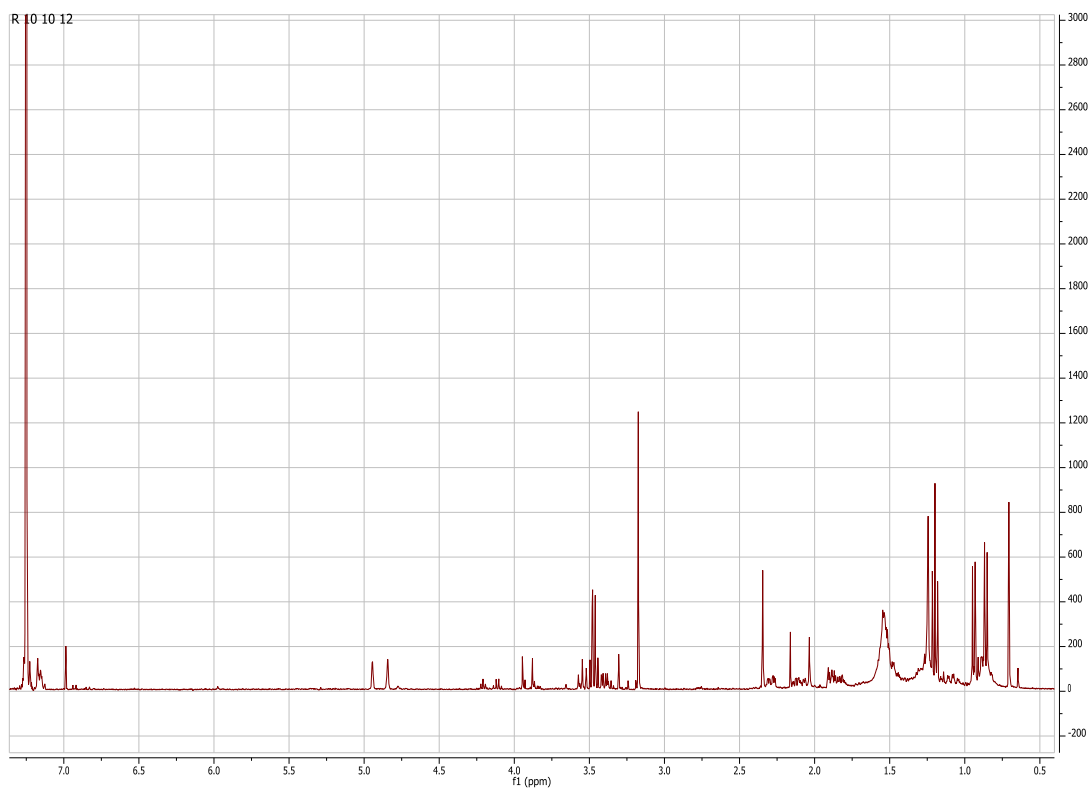


Figura 16 - Espetro RMN  $^1\text{H}$  do composto  $\text{P}_2$ .

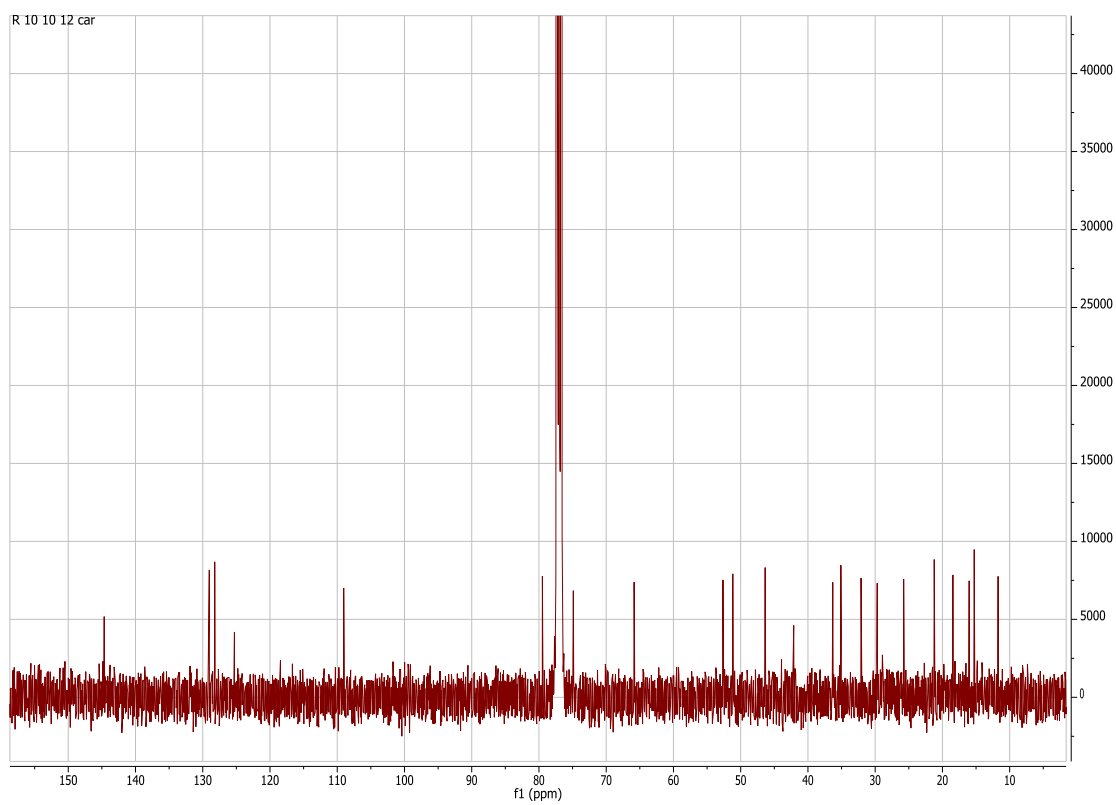


Figura 17 - Espetro RMN  $^{13}\text{C}$  do composto  $\text{P}_2$ .

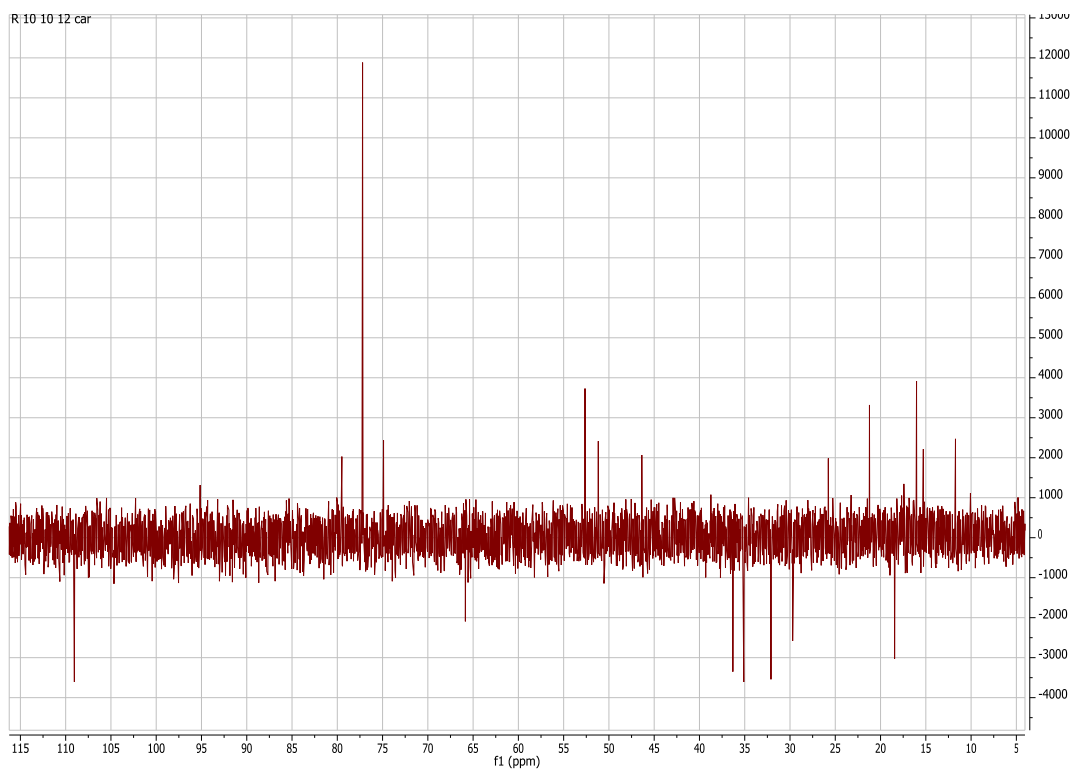


Figura 18 - Espectro DEPT-135 do composto P<sub>2</sub>.

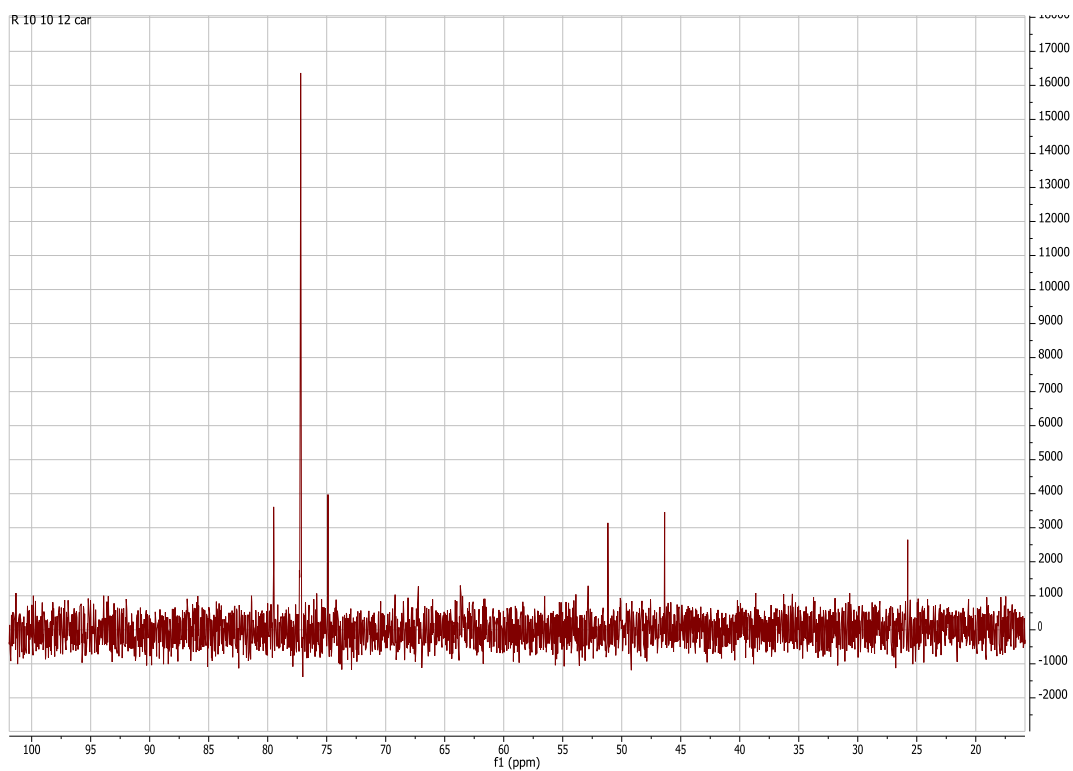


Figura 19 - Espectro DEPT-90 do composto P<sub>2</sub>.

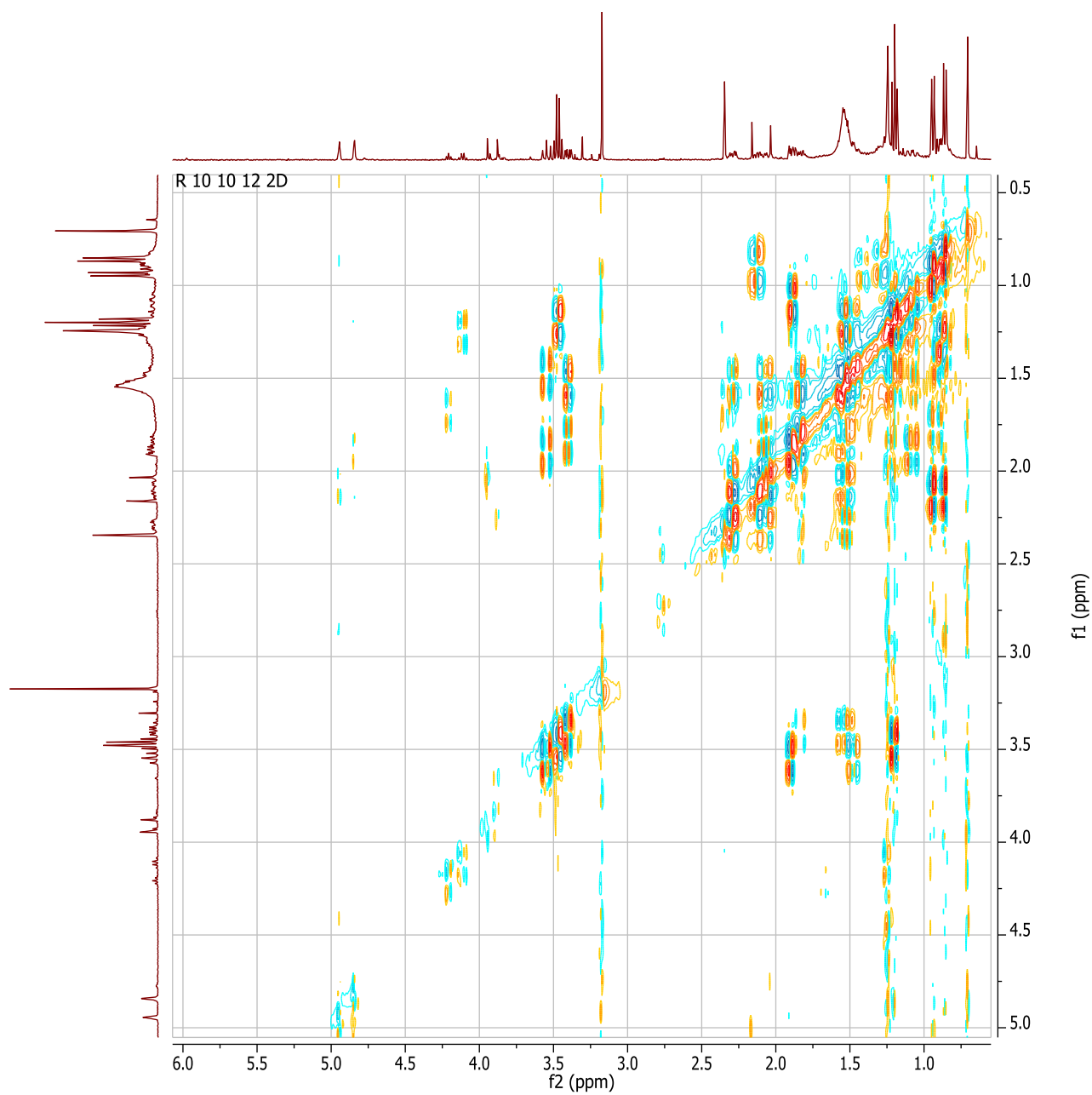


Figura 20 - Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto  $\text{P}_2$ .

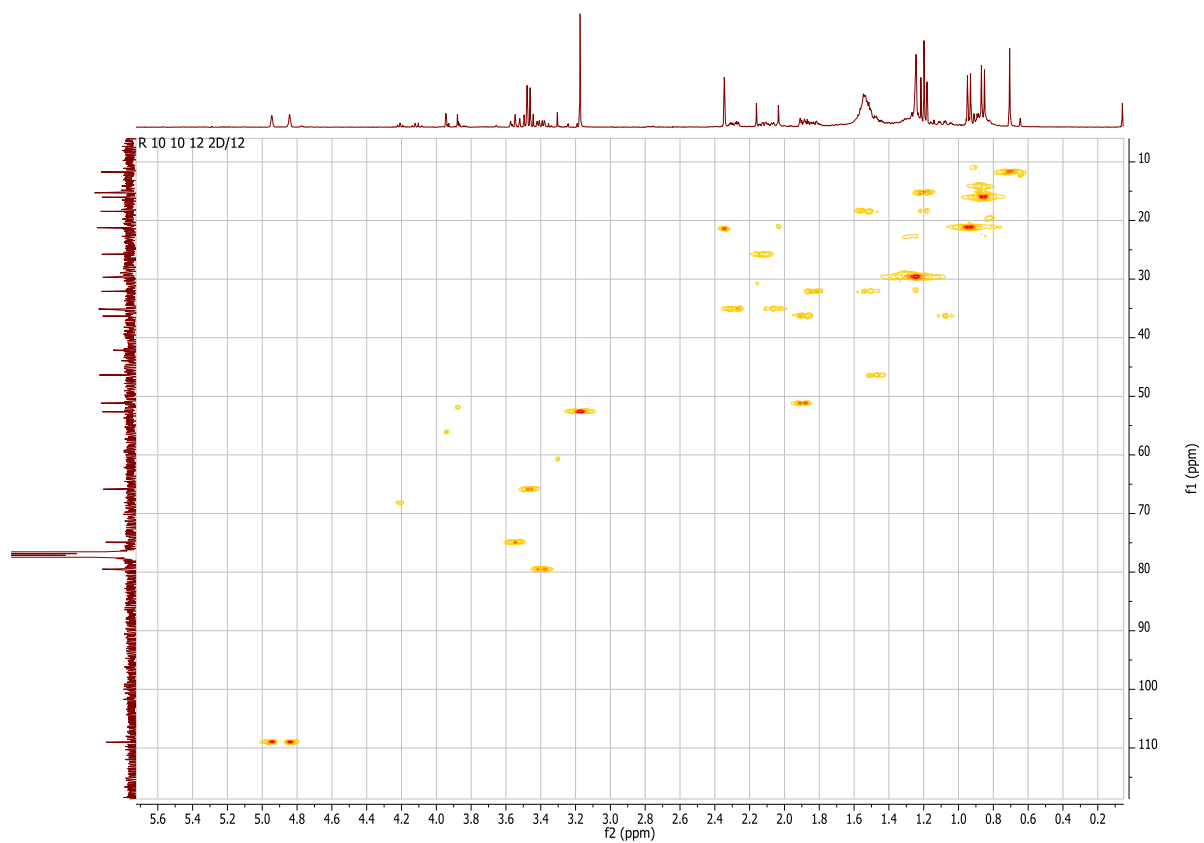


Figura 21 - Espectro de correlação bidimensional  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC) do composto  $\text{P}_2$ .

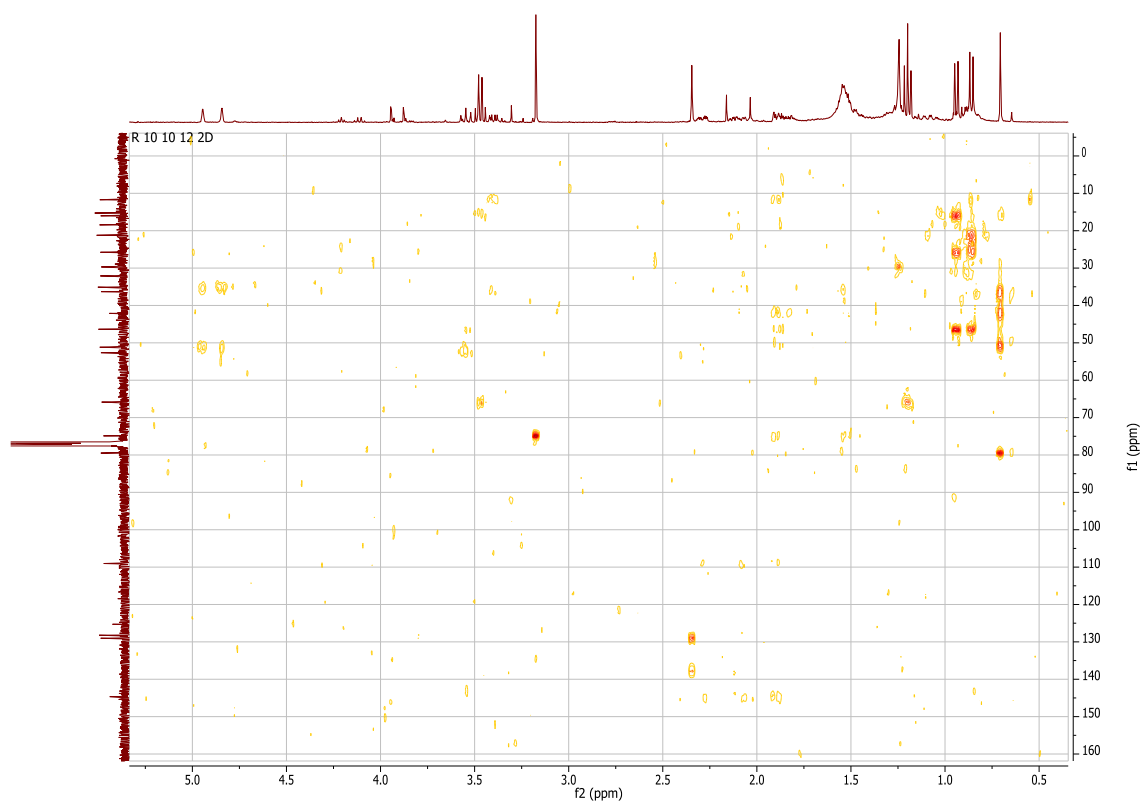


Figura 22 - Espectro de correlação bidimensional  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HMBC) do produto  $\text{P}_2$ .