

SUZANA APARECIDA SILVA QUEIROZ

**Busca por orbitídeos em espécies do gênero
Croton (Euphorbiaceae) oriundas da Mata
Atlântica**

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanderlan da Silva Bolzani

**Araraquara
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

- Q3b Queiroz, Suzana Aparecida Silva
 Busca por orbitídeos em espécies do gênero *Croton*
(Euphorbiaceae) oriundas da Mata Atlântica / Suzana
Aparecida Silva Queiroz. – Araraquara : [s.n.], 2019
 139 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
 Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
1. Peptídeos cíclicos. 2. Diterpenos. 3. *Croton* (Botânica).
 4. Mata Atlântica. 5. Agentes anti-inflamatórios. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Busca por orbitídeos em espécies do gênero *Croton* (Euphorbiaceae) oriundas da Mata Atlântica"

AUTORA: SUZANA APARECIDA SILVA QUEIROZ

ORIENTADORA: VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a VANDERLAN DA SILVA BOLZANI
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 30 de abril de 2019

DADOS CURRÍCULO LATTES

Suzana Aparecida Silva Queiroz

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 06-12-1993

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Miracema/RJ

Profissão: Química

E-mail: suzana.a.s.queiroz@gmail.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação Química Licenciatura (Graduação Sanduíche).

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências Tecnológicas. Campos dos Goytacazes/RJ. Período: 2012-2016

Universidade de Coimbra, Instituto de Química. Coimbra/PT. Período: 2013-2015.

Mestrado em Química.

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 2017-2019

Área de concentração: Química Orgânica

ESTÁGIOS REALIZADOS

Iniciação à pesquisa científica

- Bolsista CAPES:

Projeto de Estímulo à Docência – PIBID

Natureza: Extensão

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rosana Giacominni

Período: 2015 – 2016

PRODUÇÕES

- Participação em Congressos

QUEIROZ, S. A. S.; BOBEY, A. F.; PINTO, M. E. F.; BOLZANI, V. S. Novel clerodane diterpenoid from *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017.

Aos meus pais, irmãos e esposo pelo amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Aos meus pais e irmãos, por terem me apoiado a seguir meus sonhos e por cada lágrima derramada de preocupação e saudade. Agradeço especialmente à minha mãe, Luzia Queiroz que confiou na minha capacidade e me deu forças para trilhar esse caminho cheio de obstáculos.

Ao meu esposo Guilherme, meu eterno companheiro, por ter caminhado ao meu lado todo esse tempo, me dando força, apoio e conselhos. Obrigada por confiar em mim e pela compreensão. Se hoje estou aonde cheguei, foi graças a você.

À Profa. Vanderlan, pela oportunidade concedida e confiança depositada. Por ter apresentado essa linha de pesquisa fascinante e por ser uma inspiração para todas as mulheres que queiram se aventurar por esse caminho chamado ciência.

Ao Tony que me acompanhou de perto por esses dois anos, ajudando e aconselhando em todos os momentos que precisei desde o início. Obrigada por todos os ensinamentos e dedicação durante essa trajetória acadêmica. Por fim, obrigada pela amizade. Serei eternamente grata.

Esse agradecimento se expande a Meri que mesmo estando longe nunca deixou de me ajudar e orientar quando precisei. Obrigada por todo ensinamento e amizade.

À equipe Bolzani: Helena Russo, Marlon de Oliveira, Karol e Marília Valli pelo companheirismo e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (IQ-UNESP), ao Prof. Dr. Marcelo Trovó (UFRJ), a Profa. Dra. Maria Beatriz Rossi Caruzo (UNIFESP), a Profa. Dra. Alexandra Ivo Medeiros e a Ana Codo pelas contribuições neste trabalho.

As agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq. À CAPES por financiar minha bolsa de mestrado.

Agradeço a todos os professores, professoras, funcionários e funcionárias do IQ, pela atenção, acolhimento, troca de experiências e atendimento.

A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a formação desse trabalho.

“Se deseja ver um arco-íris, antes terá de aguentar a chuva.”
Dolly Parton

RESUMO

O gênero *Croton*, um dos maiores da família Euphorbiaceae, é conhecido pela sua riqueza de metabólitos secundários de origem terpênica, como os clerodânicos. No entanto, estudos recentes apontam para a presença de uma classe de compostos que vem ganhando visibilidade e interesse dos cientistas e de indústrias farmacêuticas, os peptídeos cíclicos. Os peptídeos naturais, especialmente aqueles de natureza cíclica e de baixo peso molecular (orbitídeos), constituem uma classe de moléculas promissoras para a identificação de novos *hits* e *leads* de fármacos. Nessa perspectiva, esse trabalho trata do estudo de duas espécies da Mata Atlântica: *Croton floribundus* e *Croton campanulatus* na busca por peptídeos cíclicos, mais precisamente por orbitídeos. Assim sendo, inicialmente investigou-se em pequena escala folhas e caules de ambas as espécies, raiz da espécie *C. floribundus* e látex da espécie *C. campanulatus* e após essas análises preliminares selecionou-se a raiz da de *C. floribundus* e o látex de *C. campanulatus* para dar continuidade com os estudos. O processo de extração das substâncias de interesse da raiz foi feito por maceração hidroetanólica e do látex, por partição líquido-líquido com acetato de etila. Em seguida esses extratos foram submetidos à cromatografia em coluna, empregando octadecilsilano (C18) como fase estacionária para a obtenção das frações contendo peptídeos. O processo de purificação dessas frações foi feito por HPLC em modo analítico e preparativo que permitiu o isolamento de 2 substâncias da espécie *C. campanulatus* e 4 substâncias da espécie *C. floribundus*. Após serem caracterizadas por HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS/MS e RMN 1D e 2D observou-se que as substâncias isoladas da espécie *C. campanulatus* correspondem a 2 novos orbitídeos que foram denominados [1-7NaC] crocaorb A₁ com *m/z* 827,4538 [M + H]⁺ de sequência ciclo(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met⁵-Ser⁶-Trp⁷-), e [1-7NaC] crocaorb A₂ com *m/z* 843,4441 [M + H]⁺ de sequência ciclo(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met[O]⁵-Ser⁶-Trp⁷-). Com relação à espécie *C. floribundus* não foi possível identificar e nem isolar peptídeos e as 4 substâncias então obtidas foram caracterizadas por LC-ESI-(+)-IT-MS e RMN 1D e 2D como sendo 3 novos diterpenos clerodânicos denominados cascarillina J com *m/z* 431,16 [M + Na]⁺, croflorin A com *m/z* 349,15 [M + H]⁺ e croflorin B com *m/z* 331,46 [M + H]⁺. Também foi isolado o diterpeno da classe dos halimanos conhecido como 3β-hidroxi-5,10-didehidrociliolida, reportado pela primeira vez como um produto natural. A fração 80% da raiz de *C. floribundus* e a croflorin A isolada dessa fração foram submetidas a avaliação da atividade antiinflamatória e ambas as amostras apresentaram potencial anti-inflamatório.

Palavras-chave: Orbitídeos, Diterpenos, Euphorbiaceae, *Croton campanulatus*, *Croton floribundus*, Peptídeos cíclicos, Potencial anti-inflamatório.

ABSTRACT

The *Croton* genus, the largest of the Euphorbiaceae family, is known for its richness of secondary metabolites of terpenic origin, such as the clerodanic ones. However, recent studies point to the presence of a class of compounds that has gained visibility and interest from scientists and pharmaceutical industries, the cyclic peptides. Natural peptides, especially those of a cyclic and low molecular weight nature (orbitides), represent a class of promising molecules for identification of hits and leads in drug discovery. In this perspective, this research deals with the study of two species from the Atlantic Forest: *Croton floribundus* and *Croton campanulatus* in the search for cyclic peptides, more precisely for orbitides. Thus, leaves and stems of both species, root from *C. floribundus* and latex from *C. campanulatus* were investigated in a small scale, and after these preliminary analyzes, the *C. floribundus*' root and the latex from *C. campanulatus* were selected to continue the studies. The extraction process of the root's compounds of interest was performed by hydroethanolic maceration, while the latex extraction consisted by liquid-liquid partition with ethyl acetate. Then, these extracts were submitted to a chromatographic column using octadecylsilane (C18) as a stationary phase to obtain fractions containing peptides. The fractions purification process was carried out by analytical and preparative HPLC, which allowed the isolation of 2 compounds from *C. campanulatus* and 4 compounds from *C. floribundus*. After being characterized by HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS/MS and 1D and 2D NMR, it was observed that the compounds isolated from the *C. campanulatus* species correspond to 2 new orbitides that were named [1-7N α C] crocaorb A1 with m/z 827.4538 [M+H]⁺ and cyclo (-Pro1-Val2-Leu3-Ile4-Met5-Ser6-Trp7-) sequence, and [1-7 N α C] crocaorb A2 with m/z 843.4441 [M+H]⁺ and cyclo (-Pro1-Val2-Leu3-Ile4-Met [O] 5-Ser6-Trp7-) sequence. With respect to the *C. floribundus* species, it was not possible to identify or isolate the expected peptides, and the 4 compounds obtained were characterized by LC-ESI-(+)-IT-MS and 1D and 2D NMR as 3 new clerodanic diterpenes called cascarillin J with m/z 431.16 [M+Na]⁺, croflorin A with m/z 349.15 [M+H]⁺ and croflorin B with m/z 331.46 [M+H]⁺. A diterpene of the halimane class, known as 3 β -hydroxy-5,10-didehydrociliolide, first reported as a natural product, was also isolated. The 80% fraction of the *C. floribundus* root and the croflorin A isolated from this fraction were evaluated for antiinflammatory activity and both samples presented interesting anti-inflammatory potential.

Keywords: Orbitides, Diterpenes, Euphorbiaceae, *Croton campanulatus*, *Croton floribundus*, Cyclic Peptides, Anti-inflammatory potential.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>C. campanulatus</i>	20
FIGURA 2. <i>C. floribundus</i>	21
FIGURA 3. Estrutura dos esqueletos básicos dos sete tipos de diterpenos clerodânicos classificados por Li (2016) e colaboradores, tendo como base a natureza dos substituintes em C-9	25
FIGURA 4. Estrutura de alguns orbitídeos isolados no gênero <i>Croton</i>	27
FIGURA 5. Orbitídeos isolados do gênero <i>Jatropha</i> pelo grupo de pesquisa NuBBE: jatroidina I (Figura 5a) (ALTEI et al., 2014) e ribifolina (Figura 5b) (PINTO et al., 2015)	28
FIGURA 6. Esquema do processo de fracionamento do extrato	32
FIGURA 7. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (azul) e raiz (vermelho) de <i>C. campanulatus</i>	39
FIGURA 8. Espectros de massa LC-ESI-IT-MS-(+) dos compostos com tempos de retenção entre 20-27 minutos da fração 80% do látex de <i>C. campanulatus</i>	41
FIGURA 9. Espectros de massa LC-ESI-IT-(+)-MS/MS, com fragmentação do íon $(M + H)^+$ 827,46 (a) e 843,42 (b)	42
FIGURA 10. Espectro de RMN 1H da fração 80% do látex da espécie <i>C. campanulatus</i>	43
FIGURA 11. Comparação dos cromatogramas da fração 80 % do látex de <i>C. campanulatus</i> (preto) com os das frações isoladas Fr.2 (verde) e Fr.4 (azul). Em destaque, as regiões coletadas em HPLC preparativo	44
FIGURA 12. Espectros de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[M + H]^+$ 827,4538	45
FIGURA 13. Ampliação da região mais baixa do espectro de massa HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS/MS obtido da fração Fr.4 isolada do látex de <i>C. campanulatus</i>	45
FIGURA 14. Ampliação do mapa de contorno de TOCSY 2D evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos pertencentes ao peptídeo da fração Fr. 4 ..	46
FIGURA 15. Ampliação do mapa de contorno TOCSY 2D evidenciando o sistema de spin do resíduo de aminoácido prolina pertencente ao peptídeo da fração Fr. 4	47
FIGURA 16. Representação esquemática tridimensional dos resíduos dos aminoácidos de leucina (a) e isoleucina (b) mostrando os acoplamentos β - γ visualizados no espectro de COSY	48
FIGURA 17. Sequenciamento do peptídeo presente em Fr.4 pela ampliação da sobreposição dos mapas de contorno de TOCSY (preto) e ROESY (rosa) evidenciando a região dos hidrogênios amídicos e dos hidrogênios alfas. Os triângulos representam algumas das interações observadas por NOESY 1D	49
FIGURA 18. Espectro de NOESY 1D do NH-Leu	50
FIGURA 19. Espectro de NOESY 1D do NH-Ile	51
FIGURA 20. Espectro de NOESY 1D do NH-Ser	51
FIGURA 21. Espectro de NOESY 1D do NH-Trp	52
FIGURA 22. Peptídeo $[1-7NaC]$ crocaorb A_1 evidenciando as correlações observadas por ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada)	53

FIGURA 23. Espectro de DOSY da fração Fr.2 isolado da fração 80% do látex de <i>C. campanulatus</i>	55
FIGURA 24. Espectros de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[M+H]^+$ 843,4436.....	56
FIGURA 25. Ampliação do mapa de contorno de TOCSY 2D evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos pertencentes ao peptídeo da fração Fr. 2 .	57
FIGURA 26. Ampliação do mapa de contorno TOCSY 2D evidenciando o sistema de spin do resíduo de aminoácido prolina pertencente ao peptídeo da fração Fr. 2	57
FIGURA 27. Sequenciamento do peptídeo presente em Fr.2 pela ampliação da sobreposição dos mapas de contorno de TOCSY (preto) e ROESY (rosa) evidenciando a região dos hidrogênios amídicos e dos hidrogênios alfas. Os triângulos representam algumas das correlações observadas por NOESY 1D..	59
FIGURA 28. Espectro de NOESY 1D do NH-Leu	60
FIGURA 29. Espectro de NOESY 1D do NH-Ile	60
FIGURA 30. Espectro de NOESY 1D do NH-Ser	61
FIGURA 31. Espectro de NOESY 1D do NH-Trp	61
FIGURA 32. Peptídeo $[1-7NaC]$ crocaorb A_2 evidenciando as correlações observadas por ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada)	62
FIGURA 33. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (vermelho) e raiz (azul) de <i>C. floribundus</i>	65
FIGURA 34. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (azul) e raiz (verde) de <i>C. floribundus</i>	66
FIGURA 35. Espectros de massa obtidos por LC-MS dos compostos com tempo de retenção entre 25-37 minutos da fração 80% da raiz de <i>C. floribundus</i>	67
FIGURA 36. Comparação dos perfis cromatográficos da fração 80% (preto) com aquelas obtidas por HPLC preparativo: Fr.1 (azul); Fr.2 (verde); Fr.3 (vermelho)	64
FIGURA 37. Comparação dos espectros de ^{13}C e DEPT-135° da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de <i>C. floribundus</i>	68
FIGURA 38. a) Espectro de 1H da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i> e comparação dos espectros de 1H (ampliado) e dos espectros obtidos através da irradiação seletiva dos H-11 (b)	69
FIGURA 39. Espectro de IR-ATR da substância isolada na fração Fr.3 da fração 80% da raiz de <i>C. floribundus</i>	70
FIGURA 40. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios diasterotópicos H-11 com os carbonos 12, 13 e 20 da substância isolada na fração Fr.3, isolado da raiz de <i>C. floribundus</i>	71
FIGURA 41. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios diasterotópicos H-11 com os carbonos 9, 10, 12, 13 e 20 da substância isolada na fração Fr.3, isolado da raiz de <i>C. floribundus</i>	72
FIGURA 42. Espectro de TOCSY 1D dos hidrogênios metílicos H-17 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	72

FIGURA 43. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios metílicos H-17, H-18 e H19 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	73
FIGURA 44. Esqueleto básico de um diterpeno clerodânico classificado por Rongtão e colaboradores como do subtipo V	73
FIGURA 45. Ampliação do espectro de ^1H evidenciando a região dos hidrogênios metílicos, obtido da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	74
FIGURA 46. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios H-3 com os carbonos 3, 4 e 5 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	75
FIGURA 47. Estrutura da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	75
FIGURA 48. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs 1D obtido da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	76
FIGURA 49 Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-19 (1) e ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-12 (2) (Ampliação) obtidos da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de <i>C. floribundus</i>	77
FIGURA 50. Configuração relativa da substância presente na fração Fr.3 (isolado da fração 80% da raiz de <i>C. floribundus</i>	77
FIGURA 51. Espectro de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ 349,2000	78
FIGURA 52. Estrutura da substância isolada na fração Fr.1, isolada da raiz de <i>C. floribundus</i> , destacando as correlações observadas por HMBC entre o H-20 e C-9,11 e 12.....	80
FIGURA 53. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e de TOCSY 1D dos hidrogênios metílicos H-17 (vermelho) da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de <i>C. floribundus</i>	80
FIGURA 54. Mapa de contorno HMBC da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de <i>C. floribundus</i> . Em destaque esta a correlação observada entre H-7 e o carbono metílico do grupo acetato (COOCH_3)	81
FIGURA 55. Em azul destaca-se o sistema de spin H-17 e em vermelho mostra a correlação observada por HMBC entre H-7 e o carbono da carbonila da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de <i>C. floribundus</i>	81
FIGURA 56. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-3 obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-3 e H-1 β , H-2 β e H-18.....	84
FIGURA 57. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-7 obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-7 e H-6 α , H-8, H-10, H-17 e H-20	85
FIGURA 58. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-17 obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-17 e H-7, H-8, H-11b, H-14, H-15 e H-20.....	85
FIGURA 59. Configurações relativas da cascarillina F e da cascarillina J, isolada da raiz de <i>C. floribundus</i>	86
FIGURA 60. Espectro de DEPTq da fração Fr.2, isolada da raiz de <i>C. floribundus</i>	87
FIGURA 61. Perfil cromatográfico da fração 80% da raiz de <i>C. floribundus</i> ...	89

FIGURA 62. Comparação dos perfis cromatográficos da fração 80% (preto) com aquelas obtidas por PLC preparativo: Fr.4 (rosa); Fr.5 (azul).....	89
FIGURA 63. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância da substância isolada na fração Fr.5 da raiz de <i>C. floribundus</i>	91
FIGURA 64. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs obtidos da fração Fr.4, isolada da raiz de <i>C. floribundus</i>	92
FIGURA 65. Diterpenos da classe dos halimanos que foram obtidos como intermediários sintéticos por Bohlmann e Harde e colaboradores e em destaque (na cor verde) se encontra o isômero que foi obtido de fonte natural	93
FIGURA 66. a) Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D dos hidrogênios H-3 (roxo), H-17 (verde) e H-12 (vermelho) obtidos para a fração Fr.4. da raiz de <i>C. floribundus</i> . b) Ampliação evidenciando a região dos hidrogênios metílicos.....	94
FIGURA 67. Substância isolada na fração Fr.4 da raiz de <i>C. floribundus</i> em sua configuração relativa	95
FIGURA 68. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância dos hidrogênios metílicos da substância isolada na fração Fr.5 da raiz de <i>C. floribundus</i>	96
FIGURA 69. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs obtidos da fração Fr.5, isolada da raiz de <i>C. floribundus</i>	97
FIGURA 70. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância da substância isolada na fração Fr.5 da raiz de <i>C. floribundus</i>	97
FIGURA 71. a) Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D dos hidrogênios H-12 (verde) e H-17 (vermelho) obtidos para a fração Fr.5 da raiz de <i>C. floribundus</i> . b) Espectro de NOESY 1D do hidrogênio metílico H-18... ..	99
FIGURA 72. Substância isolada na fração Fr.5 da raiz de <i>C. floribundus</i> em sua configuração relativa	100
FIGURA 73. Avaliação da citotoxicidade da fração 80% (C.F.R.Fr80%) da raiz de <i>C. floribundus</i> e o composto croflorin A, isolado dessa fração. As células foram pré-tratadas com os extratos brutos por 90 min utilizando diferentes concentrações (25 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$). Após esse período as mesmas foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 18h. Após tal tratamento foram submetidas a teste de viabilidade por MTT. Sua viabilidade foi calculada tomando como 100% a viabilidade encontrada nas células tratadas apenas com LPS – controle positivo. A linha vermelha indica 90% de viabilidade celular calculada a partir dos 100% do controle positivo	100
FIGURA 74. Avaliação da inibição de NO por tratamento com a fração 80% (C.F.R.Fr80%) da raiz de <i>C. floribundus</i> e o composto croflorin A, isolado da mesma. As células foram pré-incubadas com os extratos por um período de 90 min e em seguida estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 18hs. A concentração de nitrito foi determinada através do reagente de Greiss. Os resultados correspondem à média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes realizados em quadruplicatas. * $P < 0,05$ vs meio (controle) # $P < 0,05$ vs LPS. (ANOVA)	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Triterpenos identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em <i>C. campanulatus</i>	20
TABELA 2. . Diterpenos do tipo traquilobanos isolados de <i>C. floribundus</i> . Ref.: (1) UCHÔA, et al., 2013;	21
TABELA 3. Diterpenos do tipo caurânico isolados de <i>C. floribundus</i> . Ref.: (1) MEDINA, et al., 2009; (2) UCHÔA, et al., 2013; (3) PEIXOTO, 2013.....	22
TABELA 4. Orbídeos isolados do gênero <i>Croton</i>	27
TABELA 5. Equipamentos utilizados para análises	30
TABELA 6. Relação das massas de material vegetal obtidas após a pulverização de diferentes órgãos das espécies <i>C. floribundus</i> e <i>C. campanulatus</i> e o volume de solução extratora utilizado	31
TABELA 7. Alguns dados utilizados no fracionamento em “maior escala” para os extratos de <i>C. floribundus</i> e <i>C. campanulatus</i>	33
TABELA 8. Dados de colunas e métodos utilizados em escala analítica para as análises das espécies <i>C. floribundus</i> e <i>C. campanulatus</i>	33
TABELA 9. Dados utilizados em escala preparativa para as análises das espécies <i>C. floribundus</i> e <i>C. campanulatus</i>	34
TABELA 10. Experimentos realizados para as frações obtidas das espécies <i>C. floribundus</i> e <i>C. campanulatus</i> , e os solventes utilizados para solubilização de cada fração	35
TABELA 11. Dados do espectro de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por RMN bidimensionais do orbitídeo [1-7NaC] crocaorb A ₁ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz, respectivamente	54
TABELA 12. Dados do espectro de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por RMN bidimensionais do orbitídeo [1-7NaC] crocaorb A ₂ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz, respectivamente	63
TABELA 13. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da substância isolada na fração Fr.3, CDCl ₃ - <i>d</i> , 600 e 150 MHz, respectivamente	76
TABELA 14. Comparação dos dados do espectro de RMN ^1H e ^{13}C da substância isolada em Fr.1 (600 e 150 MHz, respectivamente) e da cascarillina F (400 e 100 MHz, respectivamente) CD ₃ OD- <i>d</i> ₄ , 600 e 150 MHz, respectivamente	83
TABELA 15. Dados do espectro de RMN ^{13}C da fração Fr.2, DMSO- <i>d</i> ₆ , 150MHz	88
TABELA 16. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da isolada na fração Fr.4, CDCl ₃ - <i>d</i> ₄ , 600 e 150 MHz, respectivamente	92
TABELA 17. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da isolada na fração Fr.4, CDCl ₃ - <i>d</i> ₄ , 600 e 150 MHz, respectivamente	98

TABELA 18. Porcentagem de inibição do crescimento celular (GI) e a média $\pm$ desvio padrão da média (SD) das amostras.....	101
TABELA 19. Concentração inibitória de 50% (IC50) contra <i>P. falciparum</i> , cepa 3d7, sensível a cloroquina.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

PDPs	<i>PawS-derived peptides</i>
ác.	ácido
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
C18	Octadecilsilano
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CIBFar	Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos
CO ₂	Dióxido de Carbono
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPTq	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with quaternary carbon detection</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
EtOH	Etanol
FBS	Soro Bovino Fetal
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) acoplada ao detector de Diode Array
HUNI	Herbário da Universidade Federal do Estado do Rio e Janeiro
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria e Massas (<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) tetrazólio
NEED	<i>Naftiletilenodiamino dihidroclorídrico</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Nitrito
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TFA	Ácido Trifluoracético
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UV	Ultravioleta
Δ	Deslocamento químico
δ_C	Deslocamento químico de carbono
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio

LISTA E ABREVEATURAS DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS

NOME	ABREVIÇÃO		MASSA MOLECULAR DO RESÍDUO (Da)
Alanina	Ala	A	71.079
Arginina	Arg	R	156.88
Asparagina	Asn	N	114.04
Aspartato	Asp	D	115.089
Cisteína	Cys	C	103.145
Fenilalanina	Phe	F	147.177
Glicina	Gly	G	57.05
Glutamato	Glu	E	129.116
Glutamina	Gln	Q	128.131
Histidina	His	H	137.141
Isoleucina	Ile	I	113,160
Leucina	Leu	L	113.160
Lisina	Lys	K	128.174
Metionina	Met	M	131.199
Polina	Pro	P	97.117
Serina	Ser	S	87.078
Tirosina	Tyr	Y	163.176
Treonina	Thr	T	101.105
Triptofano	Trp	W	186.213
Valina	Val	V	99.133

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Família Euphorbiaceae e o gênero <i>Croton</i>	19
1.1.1 <i>C. campanulatus</i>	19
1.1.2 <i>C. floribundus</i>	20
1.2 Metabólitos secundários do gênero <i>Croton</i>	23
1.2.1 Terpenóides	23
1.2.2 Peptídeos cíclicos vegetais	26
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos:	28
3. Parte Experimental	29
3.1 Materiais	29
3.1.1 Material Vegetal	29
3.1.2 Solventes, Reagentes e Equipamentos	29
3.2.2 Extração do látex de <i>C. campanulatus</i>	31
3.2.3 Fracionamento dos extratos em C ₁₈	31
3.2.3.1 Fracionamento em cartucho de extração em fase sólida C ₁₈	31
3.2.3.2 Fracionamento em maior escala	32
3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i> - HPLC)	33
3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (<i>High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometric</i> - LC-MS)	34
3.2.7 Espectrometria de Massa (Mass spectrometry - MS)	34
3.2.9. Espectroscopia de Infravermelho	35
3.2.10 Avaliação da atividade antiplasmodial	37
3.2.10.1 Preparo das amostras	36
3.2.10.2 Ensaio de avaliação da atividade antiplasmodial	36
3.2.11 Avaliação da atividade anti-inflamatória	37
3.2.11.1 Cultura de células	37
3.2.11.2 Ensaio MTT	37
3.2.11.3 Detecção de nitrito	37
3.2.12 Avaliação da atividade citotóxica	37
3.2.12.1 Preparo das amostras	37
3.2.12.2 Avaliação da atividade citotóxica	37
4. Resultados e discussão:	39
4.1 <i>C. campanulatus</i>	39
4.1.1 Obtenção da fração rica em peptídeos	39
4.1.2 Purificação do Látex	43
4.1.3 Caracterização da fração Fr.4	44
4.1.4 Caracterização da fração Fr.2	55
4.2 <i>C. floribundus</i>	64
4.2.1 Obtenção da fração 80%	64
4.2.2. Purificação da Fração 80% da raiz e caracterização estrutural das substâncias obtidas	66
4.2.2.1 Primeira purificação	67

4.2.2.1.1	Caracterização da substância presente na fração Fr. 3	68
4.2.2.1.2	Caracterização da substância presente na Fração Fr. 1	79
4.2.2.1.3	Caracterização das substâncias presentes na fração Fr. 2.....	86
4.3.	Atividades Biológicas	100
4.3.1	Avaliação da atividade antiplasmodial.....	100
4.3.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória	101
4.3.3	Avaliação da atividade citotóxica	86
5.	Conclusão	104
6.	Referências	106
Apêndice A		111
Apêndice B		106
Apêndice C		106
Apêndice D		106
Apêndice E		106
Apêndice F		106
Apêndice G		106
Apêndice H		106
Apêndice I		106
Apêndice J		106
Apêndice K		106
Apêndice L		106
Apêndice M		106
Apêndice N		106
Apêndice O		106
Apêndice P		106
Apêndice Q		106
Apêndice R		106
Apêndice S		106
Apêndice T		106
Apêndice U		106
Apêndice V		106
Apêndice W		106
Apêndice X		106
Apêndice Y		106
Apêndice Z		106
Apêndice AA		106
Apêndice BA		106
Apêndice CA		106

1. Introdução

1.1 Família Euphorbiaceae e o gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae é uma das mais complexas e diversificadas famílias de angiospermas, com cerca de 300 gêneros e 8.000 espécies (MWINE; DAMME, 2011) que estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Possui uma composição química variada que resulta numa grande diversidade de metabólitos secundários como alcaloides, terpenos, flavonoides, lignanas, cumarinas e outras classes de produtos naturais (AMINAH; KRISTANTI; TANJUNG, 2014; SABANDAR et al., 2013).

Um dos maiores gêneros dessa família é o gênero *Croton* o qual possui aproximadamente 312 espécies catalogadas no Brasil, sendo 249 endêmicas. Encontra-se em todas as regiões brasileiras e abrangem os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (REFLORA).

Esse gênero possui um papel fundamental na medicina tradicional sendo algumas espécies usadas popularmente para o tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, malária, úlcera e obesidade (SALATINO et al., 2007).

1.1.1 *C. campanulatus*

A espécie *C. campanulatus* Caruzo & Cordeiro (FIGURA 1) é uma planta nativa e endêmica do Brasil encontrada apenas nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Possui como habitat as áreas montanhosas da Serra da Mantiqueira e da Floresta Tropical Atlântica (CARUZO, 2008). Um estudo feito por Pimentel e colaboradores para analisar a composição e a morfologia das ceras cuticulares de 13 espécies do gênero *Croton* conseguiu identificar, através da cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa, 4 triterpenos na espécie *C. campanulatus* (TABELA 1). Dentre esses, o triterpeno denominado friedelan-3-ona (fridelina) foi encontrado apenas nessa espécie (PIMENTEL, 2014).

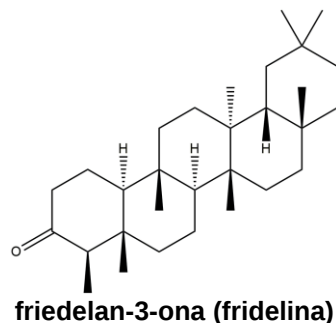
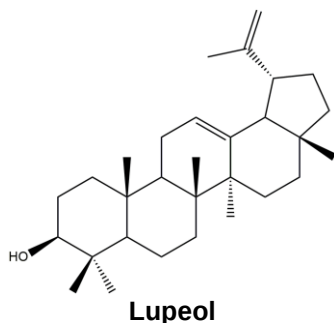
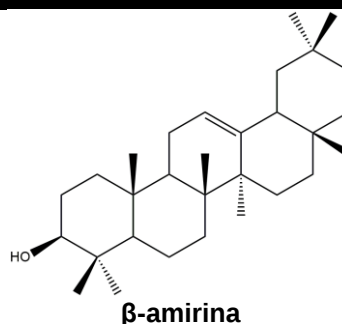
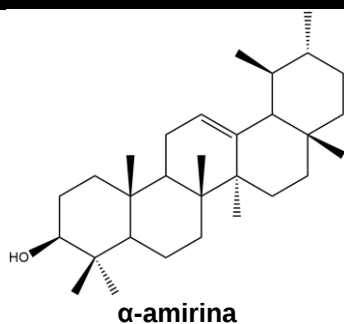
FIGURA 1. Espécie *C. campanulatus*



Fonte. CARUZO, 2009

TABELA 1. Triterpenos identificados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa em *C. campanulatus*

Triterpenos



1.1.2 *C. floribundus*

A espécie *C. floribundus* Spreng. (FIGURA 2) é uma planta nativa da Mata Atlântica encontrada em todos os estados brasileiros (REFLORA). É conhecida popularmente como capixinguí (UNICENTRO, 2012) Epode atingir até 10 m de altura, sendo muito utilizada para reflorestamentos de áreas degradadas (CORRÊA, 2003). Sua casca é fortemente purgativa (USEFUL TROPICAL PLANTS), e é usada na medicina popular na cicatrização de feridas (PEREIRA; FELCMAN, 1998), no combate à sífilis e hemorroidas (CORRÊA, 2003). Relatos indicam que a decocção é usada também para tratar doenças dos olhos, incluindo tracoma, ou conjuntivite granulomatosa (USEFUL TROPICAL PLANTS). As folhas são usadas contra úlceras

tanto na medicina humana quanto na veterinária (CORRÊA, 2003).

FIGURA 2. Espécie *C. floribundus*



Fonte. UNICENTRO, 2012

Estudos fitoquímicos com esta espécie revelaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos (SILVA et al., 2013), diterpenos traquilobânicos e caurânicos (UCHÔA et al., 2013; PEIXOTO, 2013), e esteróide (PEIXOTO, 2013). Na tabela 2 encontra-se as estruturas dos diterpenos isolados dessa espécie.

TABELA 2. Diterpenos do tipo traquilobano isolados de *C. floribundus*. Ref.: (1) UCHÔA, et al., 2013.

Traquilobânicos					
	R ₁	R ₂	R ₃	Nome	Ref.
1	CH ₂ OH	CH ₂ OH	H	ent-traquilobano-18,19-diol	(1)
2	COOH	CH ₃	H	ácido ent- traquiloban -19-oico	(1)
3	COOH	CH ₃	OH	Ácido 15β-hidroxi-ent- traquiloban-19-oico	(1)
4	CH ₂ OH	CH ₃	H	ent- traquiloban -19-ol	(1)

TABELA 2. Diterpenos do tipo caurânico isolados de *C. floribundus*. Ref.: (1) MEDINA, et al., 2009; (2) UCHÔA, et al., 2013; (3) PEIXOTO, 2013.

Caurânicos

ácido kauranico (1)

	R₁	R₂	R₃		Ref.
1	COOH	CH ₃	H	ácido ent-kaur-16-an19-ico	(2); (3)
2	CH ₂ OH	CH ₃	OH	ent-kaur-16-ano-6α,19-diol	(2); (3)
3	CH ₂ OH	CH ₃	H		(3)

	R₁	R₂	R₃	R₄		Ref.
1	COOH	CH ₃	α OH	CH ₃	ácido ent-16α-hidroxikaura-11-en-19-ico	(2)
2	CH ₃	COOCH ₃	β OH	CH ₃	ácido 16 α hidroxido 19 kauranico	(3)
3	CH ₃	COOH	CH ₂ OH	OH	16β,17-diidroxi-19-kauranico	(3)

Entre os compostos listados na tabela 2 e 3, o ent-kaur-16-en-6α, 19-diol isolado do extrato de hexano da casca da raiz (UCHÔA et al., 2013) mostrou efeito moderado contra três linhagens celulares de câncer: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (adenocarcinoma colorretal) e HCT-116

(adenocarcinoma colorrectal). Já os extratos alcoólicos de folhas e cascas e o composto isolado, ácido caurenóico (Medina et al. 2009), apresentaram atividades moluscicidas e ercaricidas significativas contra os caramujos *Biomphalaria glabrata* adultos e as cercárias de *Schistosoma mansoni*, respectivamente.

Por fim, o estudo recente feito por Barth e colaboradores (2018) demonstra também que os extratos metanólicos de folhas e cascas do caule apresentam atividades cercaricida, antimicrobiana, antioxidante, anticolinesterásica e apenas a casca do caule apresentou citotoxicidade significativa.

1.2 Metabólitos secundários do gênero *Croton*

Metabólitos secundários ou produtos naturais são substâncias que despertam grande interesse da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas, devido às atividades biológicas que exercem nas plantas como respostas aos estímulos do meio ambiente, assim como no processo de regulação, defesa e adaptação, importantes para estudos de ecologia química e ecofisiologia. Também merecem especial atenção devido a inúmeras atividades farmacológicas já descobertas para muitas substâncias naturais (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Devido ao seu papel fundamental na regulação e equilíbrio das espécies onde ocorrem, produtos naturais foram conceituados por Gottlieb (1998) como metabólitos especiais.

Uma classe de substâncias naturais que vêm apresentando atividades biológicas promissoras e despertando o interesse dos pesquisadores, são os peptídeos. No Brasil, as pesquisas por essa classe de substâncias vegetais vêm crescendo nos últimos anos (PICCHI et al., 2009), e o Instituto de Química da UNESP tem sido responsável pela grande contribuição dos trabalhos com tais direcionamentos.

Estudos mostraram que as plantas previamente investigadas do gênero *Croton* são ricas em produtos naturais, tais como alcalóides, várias classes de substâncias fenólicas e terpênicas, os mais abundantes (SALANTINO et al., 2007). Entretanto, existem ainda poucos relatos na literatura de peptídeos cíclicos isolados desse gênero.

1.2.1 Terpenóides

Encontrados em todo reino vegetal, os terpenos são definidos

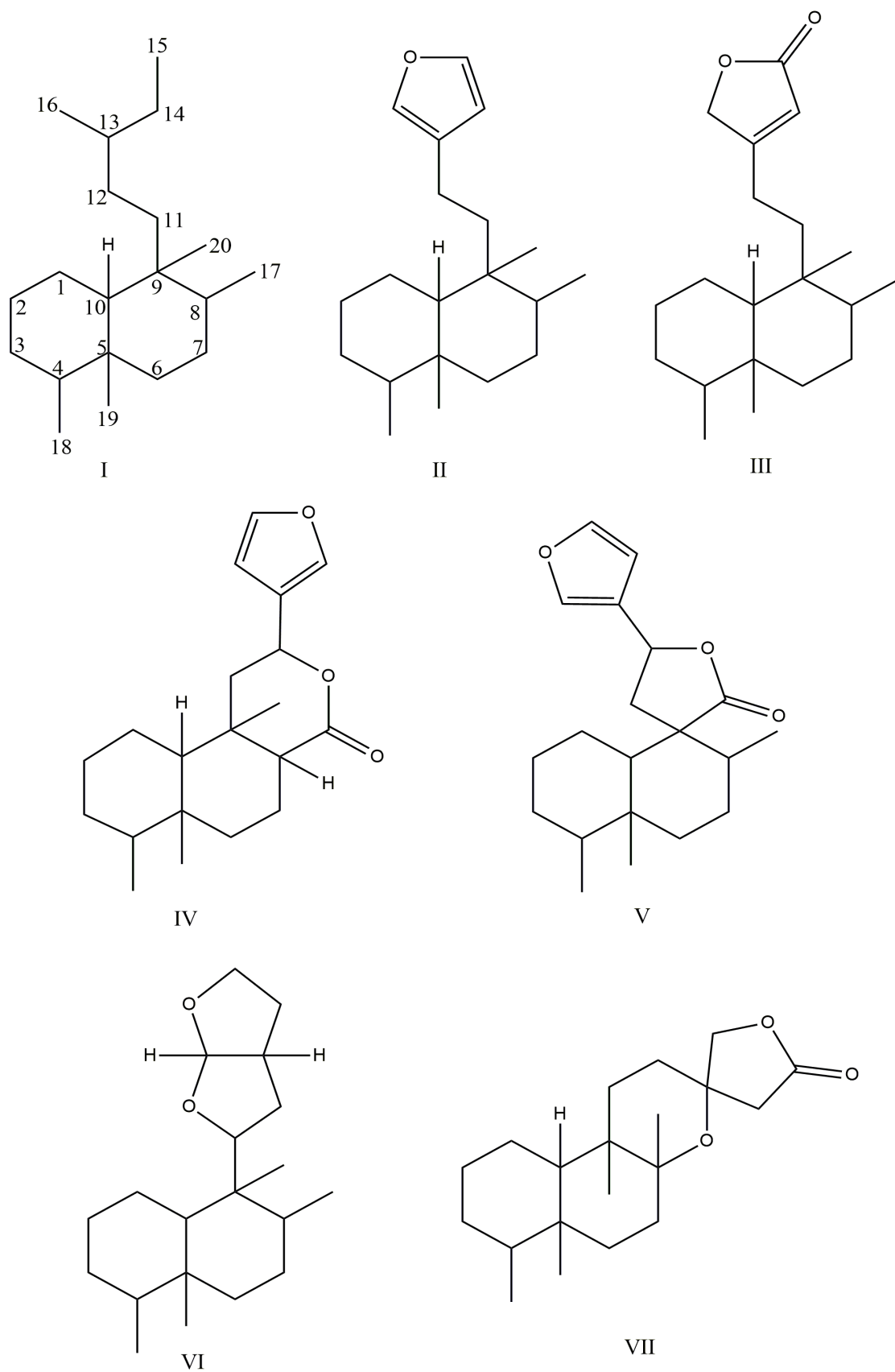
quimicamente como hidrocarbonetos insaturados que são formados por duas ou mais unidades isoprênicas (cadeia de 5 átomos de carbono). Biossinteticamente, o encadeamento por cabeça-cauda de quatro dessas unidades origina o esqueleto básico dos terpenos da classe dos diterpenos. Constituídos por 20 átomos de carbono, os diterpenos podem se apresentar de forma acíclica ou cíclica e através de rearranjos no esqueleto básico, unidade labdânica, dão origem a diversas subclasses, como labdânicos, caurânicos, abientânicos, pimarânicos, clerodânicos, entre outros (DEWICK, 2009).

Os diterpenos clerodânicos são formados por meio de consecutivas migrações de hidretos e grupos metílicos, via rearranjo da estrutura carbônica, do tipo concertado no esqueleto original terpênico (tipo labdânico) (BOONYARATHANAKORNKIT et al., 1988). Os anéis que fazem parte de sua estrutura podem estar unidos de forma *cis* ou *trans*. Se a migração é feita pelo grupo metílico C-18, origina-se o *cis*-clerodânico e se é feita pelo grupo metílico C-19 resulta-se no *trans*-clerodânico (AKHILA et al., 1991).

Li e colaboradores (2016) classifica os diterpenos clerodânicos de acordo com seu esqueleto básico em 7 tipos (FIGURA 3). A diferença entre essas estruturas se encontra na cadeia lateral que se liga ao carbono 9, onde no tipo I é uma cadeia acíclica, no tipo II é baseado no substituinte 2-etilfurano e no tipo III possui 3-etil-2-butenolida como alicerce. Já os esqueletos do tipo IV se assemelha com os do tipo II, pela presença do furano, mas a discrepância principal é a ausência do grupo metil livre na posição 17 uma vez que este agora faz parte do anel δ lactônico. Portanto, nesse tipo, o substituinte em C-9 é assentado no 5-(3-furil)- δ -valerolactona (LI, et al., 2016).

No tipo V a delta lactona é substituída por uma lactona de 5 membros (gama), mas precisamente pela butirolactona e a cadeia lateral em C-9 é então baseada no 4-(3-furil)- γ -butirolactona. Já no tipo VI essa cadeia possui um sistema bicíclico do tipo furofurano e a principal diferença entre os compostos monocíclicos do tipo II e os bicíclicos do tipo IV é a ponte de oxigênio entre C-11 e C-16. Por fim, no tipo VII existe a presença de um tetraidropirano entre o grupo γ -lactona e a decalina (LI, et al., 2016).

FIGURA 3. Estrutura dos esqueletos básicos dos sete tipos de diterpenos clerodânicos classificados por Li e colaboradores (2016), tendo como base a natureza dos substituintes em C-9



Essa classe de metabólitos secundários é importante no processo de defesa das espécies de plantas por atuarem como inseticidas e fungicidas naturais. Com relação às atividades farmacológicas, os diterpenos clerodânicos apresentam propriedades anti-úlceras, citotóxicas, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antibacterianas, potenciadores de NGF. Outra propriedade farmacológica importante desta classe de substâncias são os efeitos nos receptores de opioides (LI, et al., 2016).

Uma fonte rica de diterpenos clerodânicos são as plantas do gênero *Croton*, principalmente das espécies *C. cajucara*, *C. sonderianus* e *C. schiedeianus* (MACIEL et al., 2006). Outras espécies desse gênero também possuem outros grupos de terpenos, o que consolida esse metabólito secundário como uma marca desse gênero.

1.2.2 Peptídeos cíclicos vegetais

Peptídeos são sequências de até 100 aminoácidos aproximadamente, e podem ser classificados como lineares e cíclicos (CLAYDEN et al., 2001). Por possuírem pobre farmacocinética, pouca disponibilidade e estarem susceptíveis à clivagem proteolítica, a aplicação de peptídeos lineares como fármacos é potencialmente limitada (CRAIK et al., 2002). Tais limitações não são observadas nos peptídeos cíclicos, uma vez que a ciclização permite à classe um requerimento fundamental para a atividade biológica (interação ligante-receptor) dessas macromoléculas, reduzindo a flexibilidade e aumentando a afinidade com receptores (MULVENNA et al., 2006).

Os peptídeos cíclicos vegetais são sintetizados via ribossomal e são divididos em ciclotídeos, peptídeos tipo “PawS” derivados (PDPs) e orbitídeos (CRAIK, 2018). Os peptídeos de alto peso molecular são denominados ciclotídeos e possuem em média 30 unidades de aminoácidos com três ligações de dissulfeto (CRAIK, et al.: 1999). São encontrados em 6 famílias de Angiospermas: Cucurbitaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Poaceae, Solanaceae e Violaceae (POTH et al., 2011; BURMAN et al., 2014). Já os PDPs possuem aproximadamente 14 resíduos de aminoácidos com uma ligação de dissulfeto (MYLNE, et al., 2011) e na literatura existe apenas relato dessa substância na espécie *Helianthus annuus*, pertencente à família Asteraceae (CRAIK, 2018).

Os de baixo peso molecular - orbitídeos - possuem estrutura N-C ciclizados via cabeça-cauda e não apresentam pontes de dissulfeto. São formados por sequências de 5 a 12 aminoácidos, sendo a maioria deles L-aminoácido não modificados e de natureza hidrofóbica (ARNISON, et. al., 2013). Os orbitídeos são conhecidos como citotóxicos, antibacterianos, antifúngicos,

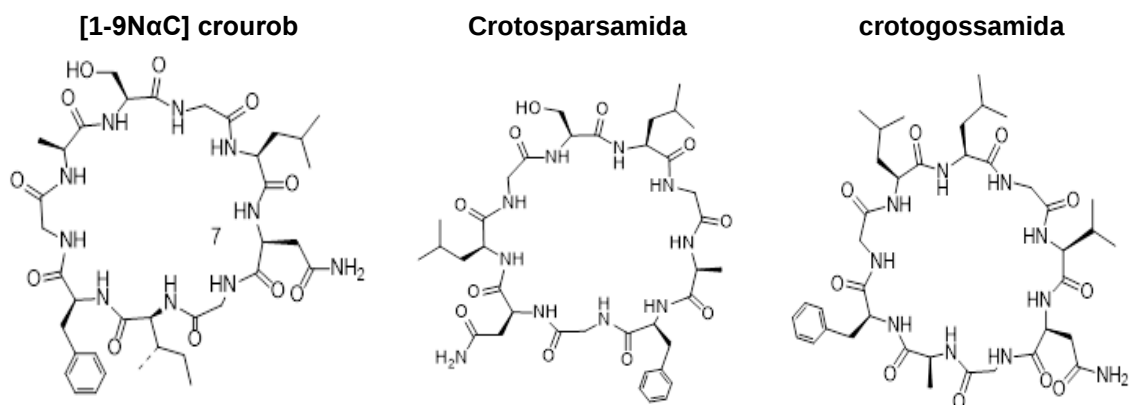
antimaláricos, imunossupressores e inibidores de proteases (RAMALHO et al., 2017).

Os orbitídeos são encontrados nas famílias Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Linaceae, Phytolaccaceae, Rutaceae, Schisandraceae e Verbenaceae (ARNISON et. al., 2013). Da família Euphorbiaceae, apenas dois gêneros até agora possuem relatos dessas substâncias: o gênero *Jatropha*, com 20 estruturas relatadas, e o gênero *Croton* com apenas 3 (RAMALHO et al., 2017). Na tabela 4 estão listados os orbitídeos isolados do gênero *Croton* e na figura 4 estão suas estruturas.

TABELA 4. Orbitídeos isolados do gênero *Croton*

Nome	Espécie	Sequência	Referencia
[1-9NaC] crourob	<i>C. urucurana</i>	ciclo(-Ser-Leu-Gli-Ala-Phe-Gly-Asn-Leu-Gly-)	CANDIDO-BACANI et al.,2015
Crotosparsamida	<i>C. sparsifolius</i>	ciclo(-Ser-Ala-Gly-Phe-Ile-Gly-Asn-Leu-Gly-)	MEHMOOD; MALIK, 2010
Crotogossamida	<i>C. gossypifolius</i>	ciclo(-Val-Asn-Gly-Ala-Phe-Gly-Leu-Leu-Gly-)	WALCOOT et al., 2007

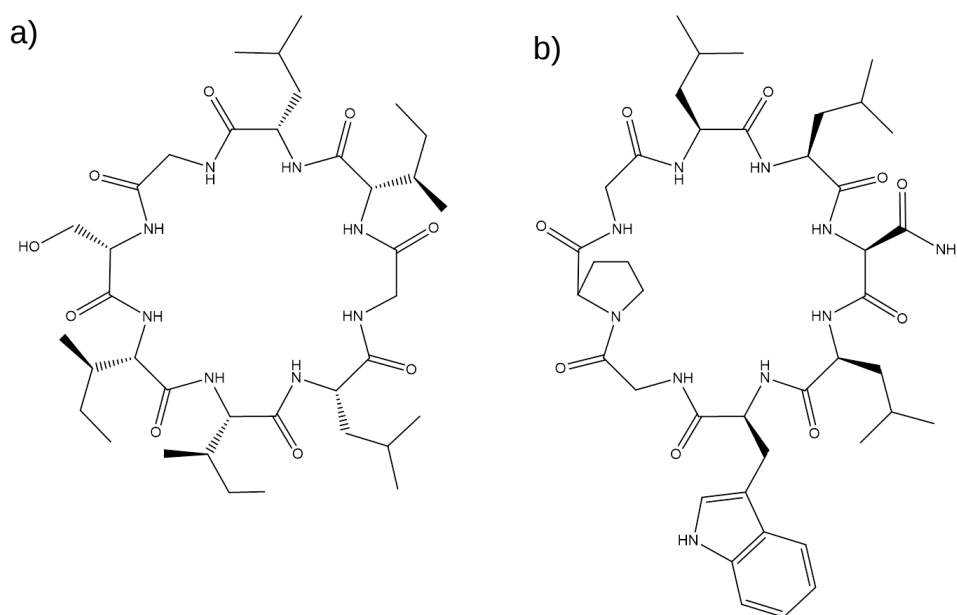
FIGURA 4. Estrutura de alguns orbitídeos isolados no gênero *Croton*.



O NuBBE é hoje um laboratório de pesquisa reconhecido por centenas de metabólitos secundários isolados de espécies da biodiversidade brasileira. Mais recentemente vem estudando peptídeos de espécies de plantas, constituindo-se um tema de pesquisa importante devido aos poucos estudos registrados e sua importância para a bioeconomia (ALTEI et al., 2014; PINTO et al., 2015; RAMALHO et al., 2017, 2018). Dentre esses estudos, dois novos orbídeos foram isolados do gênero *Jatropha*: jatroidina I (Figura 5a) obtido da

espécie *Jatropha curcas* apresentou potencial atividade inibitória de protease aspártica (ALTEI et al., 2014) e ribifolina (Figura 5b) isolado da *Jatropha ribifolia* com moderada atividade antiplasmodial (PINTO et al., 2015). Portanto, a presente pesquisa está inserida na linha de peptídeos de espécies da biodiversidade brasileira.

FIGURA 5. Orbitídeos isolados do gênero *Jatropha* pelo grupo de pesquisa NuBBE: jatroidina I (Figura 5a) (ALTEI et al., 2014) e ribifolina (Figura 5b) (PINTO et al., 2015).



2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral: Busca por orbitídeos em diferentes tecidos das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus*.

2.2 Objetivos específicos:

- i) Identificar quais tecidos vegetais das espécies escolhidas são promissores para obtenção de orbitídeos;
- ii) Fracionamento, purificação e caracterização química dos orbitídeos presentes nas espécies *C. campanulatus* e *C. floribundus* por meio das técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas;
- iii) Avaliação de atividade biológica;

3. Parte Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Material Vegetal

Caule, folha e látex da espécie *C. campanulatus* foram coletados no Parque Nacional do Itatiaia localizado na Serra da Mantiqueira, RJ e depositadas no herbário HUNI, da UniRio com número de Tombo HUNI5779 sob a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Trovó Lopes de Oliveira da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Raiz, caule e folha da espécie *C. floribundus* foram provenientes de mudas fornecidas pela empresa Ambiental Mudas Nativas e Exóticas LTDA de CNPJ: 11.344.632/0001-99 localizada na Rodovia Victor Maida, Km 2 do município de Araraquara. Sob a colaboração da Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz Rossi Caruzo essa espécie foi depositada no herbário da Universidade de São Paulo com número de Tombo HUFSP 000079.

3.1.2 Solventes, Reagentes e Equipamentos

Os solventes utilizados para realizar as extrações das espécies estudadas, bem como o fracionamento, foram etanol e acetato de etila. Para a purificação em coluna cromatográfica foram utilizados acetonitrila, água deionizada e ácido trifluoracético (TFA) e para os preparos dos solventes para as corridas cromatográficas utilizou-se acetonitrila e ácido fórmico.

Os equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 5.

TABELA 5. Equipamentos utilizados para análises.

Equipamento/Marca	Módulo
Cromatógrafo Líquido Shimadzu Prominence analítico	Bombas: LC-20AT; Degasser: DGU-20A3; Autosampler: SIL-20A; Forno de coluna: CTO-20A; Detector: SPD-M20A; Controladora: CBM-20 ^a
Cromatógrafo Líquido Shimadzu analítico-preparativo	Bombas: LC-6AD; Degasser: DGU-20A 5R; Autosampler: SIL-10AF; Injetor manual: Reodyne 7725i; Detector: SPD-M20A; Controladora: CBM-20 ^a
Espectrômetro Bruker [®] Avance III HD 600 (14, 1T)	Sonda de 5 mm com detecção direta e dois ¹ H e BBF (¹⁵ N, ³¹ P e ¹⁹ F) Bobina de gradiente em z (55 G/m) Temperatura de análise de -150°C a -180°C Sistema ATMA para ambos os canais
Espectrômetro de Massas (Waters)	XEVO-G2XSQTOF#YEA1129
Liofilizador	Christ, Alpha 2-4 LD plus
Rotaevaporador	Banho Ultratermostatizado MA- 184 Rotaevaporador Buchi R-215 Bomba
LC-MS:	Bomba: LC-20AD Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A Forno de coluna: CTO-20A Injetor automático: SIL-20AHT Módulo de Comunicação: CBM-20A
Espectrômetro de Massas	Amazon SL Bruker [®] Fonte de ionização: eletrospray (ESI) Analisador: ionTrap
Espectrofotômetro de absorção na região do Infravermelho Médio com transformada de Fourier (Bruker [®])	Vertex 70 Bruker Tipo de detector: DLaTGS Faixa de leitura: 400 a 4000 cm ⁻¹

3.2 Metodologia

3.2.1 Obtenção dos extratos de folhas e caules da *C. campanulatus* e de raízes, folhas e caules da *C. floribundus*.

O material vegetal foi seco em estufa a uma temperatura de 40°C durante três dias (72 horas). Posteriormente, o material seco foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico. As massas dos materiais vegetais obtidos bem como o volume de etanol utilizado para a extração estão listadas na tabela 6.

TABELA 6. Relação das massas de material vegetal obtidas após a pulverização de diferentes órgãos das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus* e o volume de solução extratora utilizado.

	Massa de material vegetal/ g	Volume de solução extratora (EtOH) / mL
<i>C. campanulatus:</i>		
Caule	50,0	500,0
Folha	50,0	500,0
<i>C. floribundus:</i>		
Raiz (pequena escala)	31,9	320,0
Raiz (grande escala)	267,1	
Caule	10,8	108,0
Folha	4,9	50,0

A extração foi feita por maceração e o processo foi repetido três vezes, com intervalos de 24 horas. A solução extraída foi então filtrada e concentrada, sob pressão reduzida em evaporador rotativo a uma temperatura de banho de 40°C e posteriormente congelada com nitrogênio líquido e liofilizada (APÊNDICE A)

3.2.2 Extração do látex de *C. campanulatus*

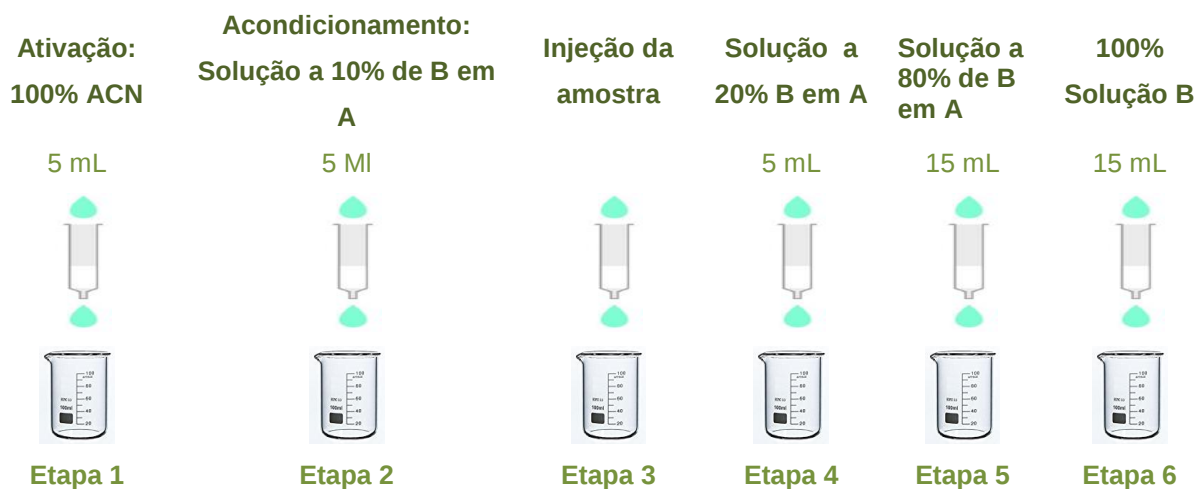
A extração do látex (15,0 mL) consistiu em uma partição líquido-líquido, no qual utilizou-se uma solução aquosa. Inicialmente, o látex foi solubilizado em 90,0 mL de água ($6 \times V_{\text{Látex}}$), transferido para um funil de separação e, seguidamente, feita a adição de 225,0 mL de acetato de etila ($15 \times V_{\text{Látex}}$). Após branda agitação e formação das fases imiscíveis, a fase orgânica extraída e concentrada em evaporador rotativo. Tal procedimento foi repetido por três vezes, reutilizando a fase aquosa, e deu-se origem à fração acetato.

3.2.3 Fracionamento dos extratos em C_{18}

3.2.3.1 Fracionamento em cartucho de extração em fase sólida C_{18}

Foi realizado triagem para os extratos dos diferentes tecidos das duas espécies, antes de partir para uma escala maior. Para isso, 50,0 mg dos extratos brutos (raiz, caule, folha e látex) foram solubilizados em 3,0 mL de solução a 15% de ACN/ H_2O . O cartucho utilizado continha como fase estacionária C_{18} , marca Strata C_{18} – Phenomenex – 500,0 mg. As eluições foram feitas utilizando-se solventes em misturas com percentuais de: A (95% ACN/ H_2O /0,045% TFA) e B (H_2O /0,045% TFA), nas proporções de 10%, 20%, 80% e 100% de B em A conforme o esquema da figura 6.

FIGURA 6. Esquema do processo de fracionamento do extrato.



As etapas 1 e 2 foram as de condicionamento e equilíbrio da fase móvel. Na etapa 4 há eluição de alguns compostos não peptídicos, e portanto, não interessantes neste estudo. É na fração 80% (etapa 5) obtida que os peptídeos eluem e, portanto, é a fração de interesse. A fração 80% foi liofilizada e analisada por HPLC analítico.

3.2.3.2 Fracionamento em maior escala.

O mesmo procedimento foi realizado para o fracionamento em maior escala da fração acetato de etila de *C. campanulatus* e do extrato hidroetanólico da raiz da espécie *C. florifundus*, porém fez-se o empacotamento de um funil sinterizado com C₁₈ no lugar do cartucho de C₁₈. A eluição se deu com os mesmos solventes e conforme a sequência de etapas descritas no esquema anterior. Na tabela 7 encontram-se alguns dados utilizados.

TABELA 7. Alguns dados utilizados no fracionamento em “maior escala” para os extratos de *C. floribundus* e *C. campanulatus*.

		Látex de <i>C. campanulatus</i>	Raiz de <i>C. floribundus</i>
Funil Sinterizado	Altura	40,0 cm	
	Diâmetro	24,0 cm	4 cm
Fase Estacionária	Altura	30,0 cm	5 cm
	Massa C18		36 g
Amostra	Massa	2,97 g	403,0 mg
Etapa 1	Ativação 100% ACN	200 mL	96 mL
Etapa 2	Solução a 10% de B/A	150 mL	64 mL
Etapa 4	Solução a 20% B em A	150 mL	96 mL
Etapa 5	Solução a 80% B em A	400 mL	160 mL
Etapa 6	Solução a 100% B	250 mL	128 mL

3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High performance liquid chromatography* - HPLC)

Os perfis cromatográficos das amostras foram obtidos utilizando-se HPLC-DAD em escala analítica e o sistema de solvente utilizado foi: H₂O/0,10% ácido fórmico (solvente A) e solução de ACN/0,10% ác. fórmico (solvente B). Os cromatogramas foram monitorados pelo detector de UV a 220 nm, absorção característica de ligação peptídica. Os dados da coluna e os métodos utilizados estão listados na tabela 8.

TABELA 8. Dados de colunas e métodos utilizados em escala analítica para as análises das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus*.

		Látex de <i>C. campanulatus</i>	Raiz de <i>C. floribundus</i>
Coluna	Tipo	Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna	Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna
	Altura (cm)	250,0	250,0
	Diâmetro (nm)	4,6	4,6
	Partícula (µm)	5,0	5,0
	Poros (Å)	100,0	100,0
Vazão (mL min ⁻¹)		1,0	1,0
Volume de injeção (µL)		50,0	50,0
Método exploratório		5-100%, 45 min	5-100%, 45 min
Método otimizado		15-60%, 45 min	15-60%, 45 min

A purificação dos compostos foi feita utilizando o HPLC-DAD em escala preparativa. O sistema de solvente e o comprimento de onda foram os mesmos

utilizados em escala analítica. Na tabela 9 encontram-se alguns dados utilizados para este procedimento.

TABELA 9. Dados utilizados em escala preparativa para as análises das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus*.

		Látex de <i>C. campanulatus</i>	Raiz de <i>C. floribundus</i>
Coluna	Tipo	Phenomenex® C ₁₈ -Luna	Kromasil® C ₁₈
	Altura (cm)	150,0	250,0
	Diâmetro (mm)	21,2	10,0
	Partícula (µm)	5,0	5,0
	Poros (Å)	100,0	300,0
Amostra	Massa (mg)	190,0	392,3
	Volume (50% ACN/H ₂ O)		30,0 ml
Vazão (mL min ⁻¹)		4,0	10,0
Método (Primeira purificação)		15-50%, 45 min	15-60%, 45 min
Método (Segunda purificação)		-	25-85%, 45 min

Os processos descritos até agora para a raiz (grande escala) de *C. floribundus* e o látex de *C. campanulatus* estão exemplificados no Esquema 1 (APÊNDICE A) e 2 (APÊNDICE B), respectivamente.

3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (*High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry* - LC-MS).

As análises por LC-MS foram obtidas utilizando HPLC-DAD acoplado a um espectrômetro de massas ESI-Ion Trap. A coluna analítica utilizada para a análise foi do modelo Phenomenex® C₁₈-Luna (25,0 x 4,6 mm d.i.; 5,0 µm), tamanho do poro de 100,0 Å e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de solventes utilizado foi: H₂O/0,1% ác. fórmico (solvente A) e solução de ACN/0,1% ác. fórmico (solvente B) e as amostras foram submetidas a um gradiente exploratório 5-100% de solventes B em A em 45 minutos. Os cromatogramas foram monitorados pelo detector de UV à 220 nm e os experimentos foram realizados no modo positivo.

3.2.7 Espectrometria de Massa (*Mass spectrometry* - MS).

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas no laboratório do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos

Naturais do Instituto de Química da UNESP-Araraquara sob a supervisão do técnico Me. João Luiz Bronzel Junior. Utilizou-se um espectrômetro de massas XEVO-G2-XS Q-TOF- ESI (Waters) para a análise das frações Fr.2 e Fr.4 isoladas do látex de *C. campanulatus*. Os experimentos foram realizados no modo positivo e as temperaturas da fonte e do gás de desolvatação foram respectivamente, 100 e 200°C. Já as vazões, do gás no cone e de desolvatação foram, respectivamente 50 e 450L/Hr, e a voltagem do capilar utilizado foi de 1600 kV. Para as análises de MS² utilizou-se uma energia de colisão de 6000.

3.2.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UNESP-Araraquara sob supervisão do Dr. Nivaldo Boralle, sendo utilizado o equipamento Bruker Avance III HD 600 operando com um criossonda de 3 mm, para o núcleo de ¹H. As amostras submetidas (3 mg de cada fração) foram solubilizadas em 200 µL, com resolução de 512 pontos e “mixing time” de 0,30 e 0,08 segundos para as técnicas unidimensionais NOESY e TOCSY, respectivamente. Para plotagem dos dados foi empregado o software TOPSpin 6.5. Na tabela 10 encontram-se os tipos de experimentos realizados para cada fração obtida das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus*, bem como os solventes usados para solubilização das amostras.

TABELA 10. Experimentos realizados para as frações obtidas das espécies *C. floribundus* e *C. campanulatus*, e os solventes utilizados para solubilização de cada fração.

	Solvente	Experimentos
<i>C. campanulatus</i>		
Fração Fr.2	DMSO	¹ H, DEPTq, NOESY 1D, TOCSY 2D, HSQC, HMBC, DOSY e ROESY
Fração Fr.4	DMSO	¹ H, DEPTq, NOESY 1D, TOCSY 2D, HSQC, HMBC, DOSY e ROESY
<i>C. floribundus</i>		
Fração Fr. 1	CDCl ₃	¹ H, DEPT 135°, TOCSY 1D , NOESY 1D, HSQC e HMBC
Fração Fr. 2	CD ₃ OD	¹ H, DEPTq, TOCSY 1D, NOESY 1D, HSQC e HMBC
Fração Fr. 3	CD ₃ OD	¹ H, DEPTq, TOCSY 1D, NOESY 1D, HSQC e HMBC
Fração Fr. 4	CD ₃ OD	¹ H, DEPTq, TOCSY 1D, NOESY 1D, HSQC e HMBC

3.2.9. Espectroscopia de Infravermelho

A análise de espectroscopia de infravermelho foi feita em um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier utilizando a técnica de refletância total atenuada. O experimento foi

realizado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Os parâmetros do método utilizado foram: intervalo de comprimento de onda de 400-4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e números de scans (amostras e background) de 64. Os dados foram registrados no programa Origin versão 8.

3.2.10 Avaliação da atividade antiplasmodial

Esse ensaio foi realizado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo sob a responsabilidade da Prof. Rafael V. C. Guido e Dra. Anna Caroline C. Aguiar. As amostras testadas foram a fração 80% do látex de *C. campanulatus* e o peptídeo impuro, [1-7N α C] crocaorb A₁.

3.2.10.1 Preparo das amostras

As amostras foram recebidas em forma sólida e diluídas em DMSO para o preparo das soluções estoque a 20 mg/mL (para as frações de peptídeos) ou 20 mM (para os peptídeos puros), que foram armazenadas a -20°C.

3.2.10.2 Ensaio de avaliação da atividade antiplasmodial

Os compostos foram avaliados quanto à atividade antiplasmodial contra a cepa de *P. falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina), utilizando a técnica de SYBR Green I. Foram testadas em diluições seriadas de fator 2 as doses de 10 - 0,152 μM . Neste ensaio, as diluições dos compostos são incubadas com o parasito por 72 h, e em seguida é adicionado o reagente de SYBR green e ocorre a marcação do DNA dos parasitos viáveis. A redução de parasitemia em cada concentração é calculada em relação a controles de crescimento positivo (sem adição de compostos, 100% de viabilidade) e negativo (hemácias não-parasitadas, 0% de viabilidade). Gráficos dose-resposta desses dados são usados para determinar a concentração inibitória média (IC₅₀) de cada composto.

Primeiramente, a porcentagem de inibição de cada composto foi determinada a uma concentração fixa de 50 $\mu\text{g/mL}$ (para as frações de peptídeos) ou μM (para os peptídeos puros).

3.2.11 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Esse ensaio foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, campus de Araraquara, sob a responsabilidade da Profa. Alexandra Ivo Medeiros e Ana C. Codo. As amostras testadas foram à fração 80% da raiz de *C. floribundus* e o composto majoritário, cloflorina A.

3.2.11.1 Cultura de células

A linhagem RAW 264-7 foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) derivada de uma linha de monócitos-macrófagos leucêmicos de rato ATCC/TIB-71. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS) e gentamicina (0,1% - Gibco), a 37°C numa incubadora umidificada com 5% de CO₂.

3.2.11.2 Ensaio MTT

As células RAW 264-7 foram cultivadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço, volume final de 200 µL. Após 18h, o sobrenadante foi removido, e então adicionada os compostos/extratos de interesse, por 90min. Em seguida, os macrófagos foram tratados com LPS (100ng/mL - Sigma), por subsequentes 18h a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após esse período, o novo sobrenadante foi coletado para determinação do NO, e os macrófagos foram incubados com 5mg/mL de MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) tetrazólio) em PBS durante 3h a 37°C numa incubadora umidificada com 5% de CO₂. Foi adicionado a SDS 20% para dissolver os cristais e a placa foi lida a 595 nm (BioTek - Synergy H1).

3.2.11.3 Detecção de Nitrito

Após 18h, o sobrenadante resultante da segunda incubação descrita anteriormente permitiu a detecção de nitrito, conforme Griess (1879). Resumidamente, 100 µL de solução de NEED 0,1% e sulfanilamida 1% em H₃PO₄ (v/v) foram adicionados a 100 µL de sobrenadante de cultura. A absorbância foi detectada a 540 nm (BioTek - Synergy H1).

3.2.12 Avaliação da atividade citotóxica

Esse ensaio foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo sob a responsabilidade da Profa Letícia Veras Costa Lotufo. As amostras testadas foram os extratos de raiz, caule e folha, as frações 20 e 80% da raiz de *C. floribundus* e o composto majoritário, cloflorina A. As linhagens de células tumorais utilizadas neste trabalho foram o HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

3.2.12.1 Preparo das amostras

As substâncias foram diluídas em DMSO na concentração de 10 mg/mL.

3.2.12.2 Ensaio de avaliação da atividade citotóxica

Foram plaqueadas 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células/ml em 200 μ L de meio). Após 24 horas, as substâncias (diluídas em DMSO na concentração de 10 mg/mL) foram adicionadas em concentrações de 5 μ M e 50 μ M, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 μ L de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). Foram realizados dois experimentos independentes em HCT 116 e MCF-7 em duplicata.

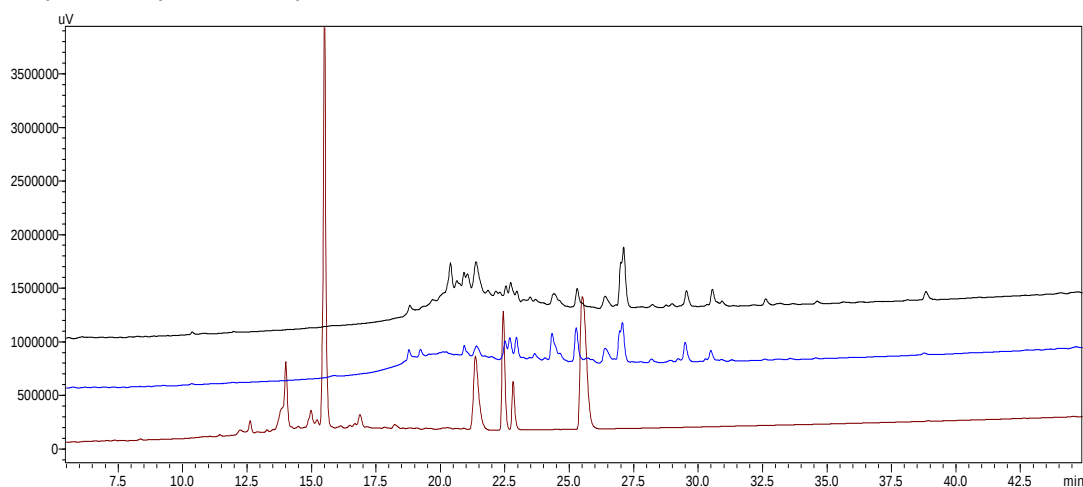
4. Resultados e discussão:

4.1 *C. campanulatus*

4.1.1 Obtenção da fração rica em peptídeos

Após o processo de extração de acordo com a metodologia descrita em 3.2.1, foram obtidos o extrato hidroetanólico bruto de folha (180 mg) e de caule (100 mg). Já a extração do látex consistiu numa partição líquido-líquido (item 3.2.2) na qual se obteve 403 mg da fração acetato (extrato bruto). Com o intuito de obter a fração rica em peptídeos cíclicos (fração C₁₈-80%), um fracionamento em pequena escala desses extratos foi realizado, de acordo com o item 3.2.3.1. Essas frações foram previamente analisadas com o intuito de se verificar o perfil das amostras; para tanto utilizou-se HPLC em modo analítico, com programa gradiente exploratório (FIGURA 7).

FIGURA 7. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (azul) e látex (vermelho) de *C. campanulatus*.



Observação: Programa de 15 a 60 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

Os peptídeos cíclicos de baixo peso molecular – orbitídeos - são moléculas que eluem numa faixa de tempo compreendida, aproximadamente, entre 50-70% de B para o gradiente utilizado (5-95% de B em A em 45 minutos). Se existirem sinais nessa faixa e, adicionalmente, houver boa absorção pelo detector no comprimento de onda de 220 nm (comprimento no qual absorve a ligação peptídica), existem

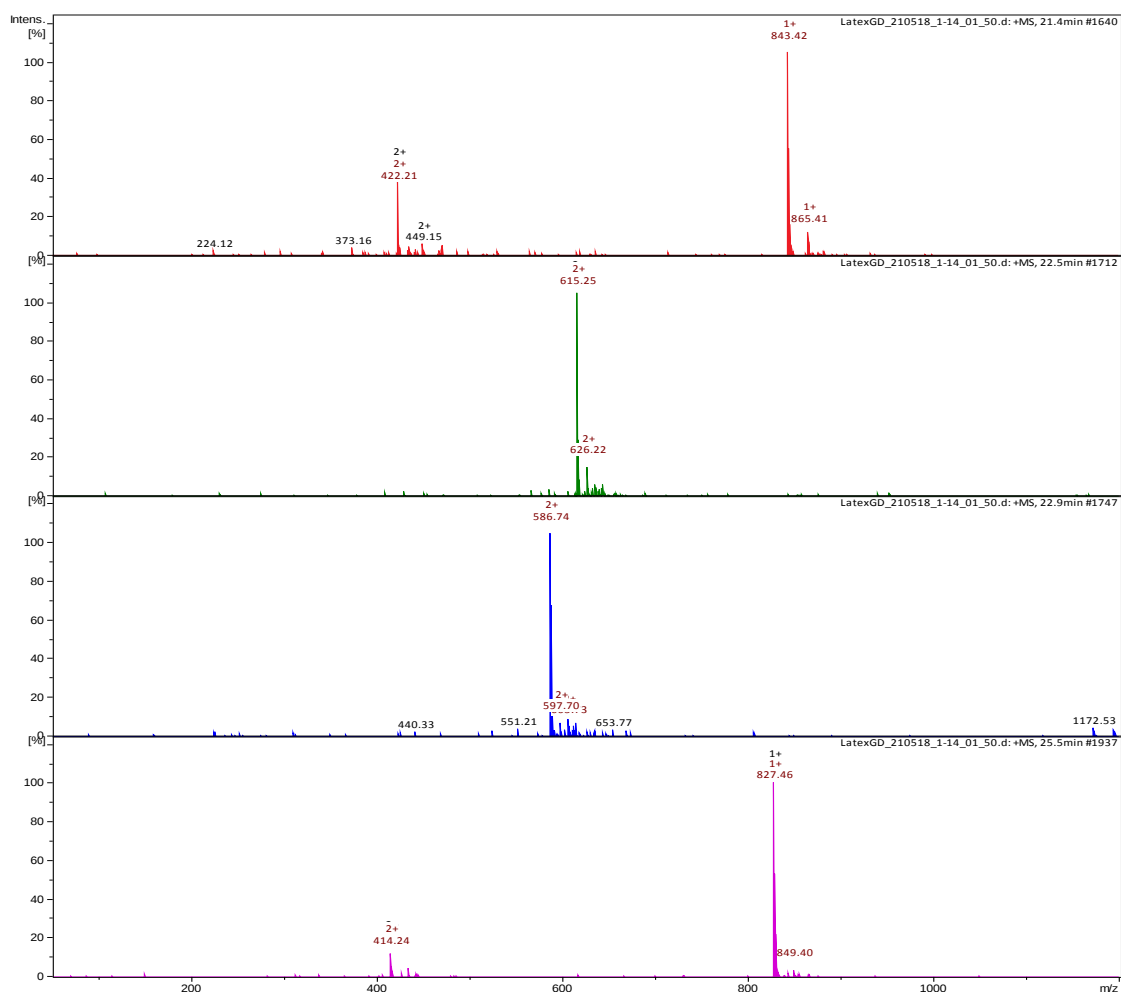
indícios de que tais moléculas são peptídeos. Esse foi o critério utilizado na análise dos perfis.

Diante dos perfis obtidos na figura 8, verificou-se que todas as frações apresentam picos na faixa de eluição de orbitídeos, de 50-70% de solvente B. Assim, os cromatogramas de folha e caule apresentaram-se complexos com vários picos eluindo nesta faixa, porém o látex apresentou apenas 4 picos.

Para aferir as massas correspondentes a cada pico e assim obter mais um indício da presença de peptídeos, as frações 80% de folha, caule e látex, foram encaminhadas para o LC-MS. Uma vez que os orbitídeos mais comuns possuem de 6 a 9 aminoácidos, esperava-se que as massas moleculares das substâncias correspondentes a esses tempos de retenção compreendessem numa faixa, aproximadamente, de 600 a 1000 Da.

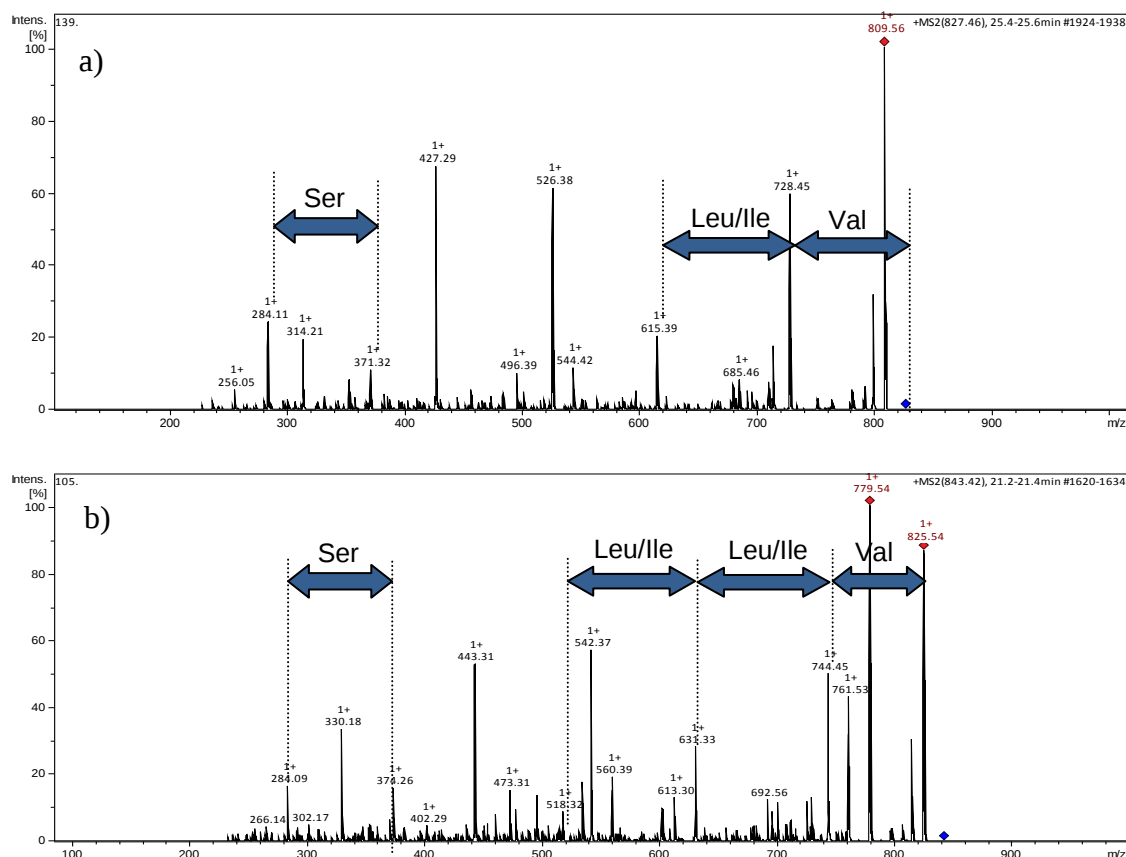
Após a análise dos resultados, apenas o látex apresentou substâncias com íons característicos de peptídeos cíclicos, os quais foram eluídos na região de 20-27 minutos, conforme figura 8. Dentre elas, somente as substâncias com tempos de eluição na faixa de 21,2-21,4 e 25,4-25,6 minutos apresentaram fragmentações referentes a aminoácidos, segundo análise MS². A figura 9 elenca os espectros de massas MS² correspondentes a cada pico e neles são atribuídas as perdas de valina, leucina e/ou isoleucina e serina.

FIGURA 8. Espectros de massa LC-ESI-IT-MS(+) dos compostos com tempos de retenção entre 20-27 minutos da fração 80% do látexde *C. campanulatus*.



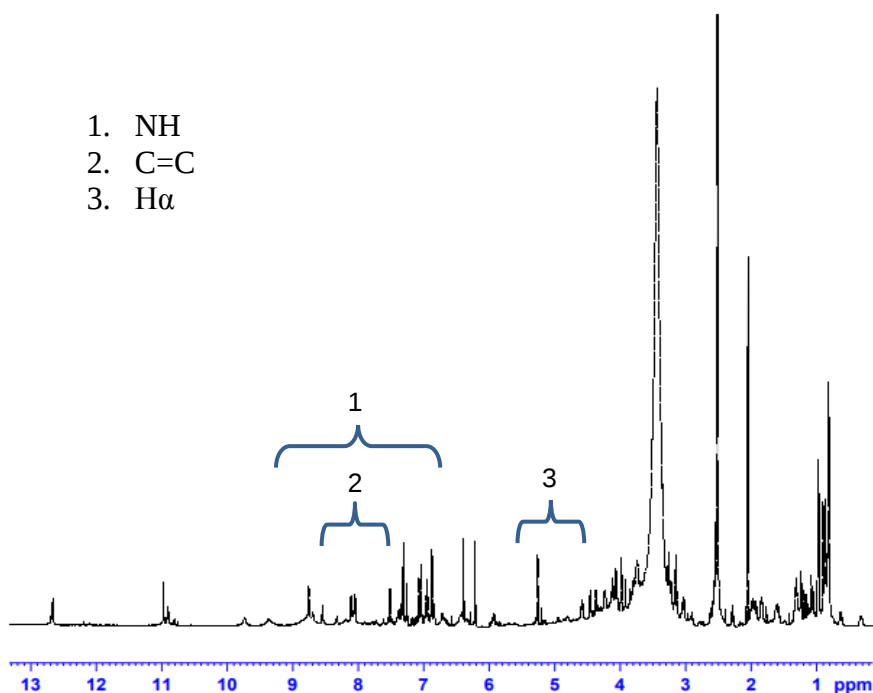
As substâncias com tempos de retenção de 22,5 e 22,9 minutos apresentam íons com m/z 615,25 e m/z 586,7, respectivamente. Estes não apresentaram fragmentações características a resíduos de aminoácidos e, portanto, não foram prioridade neste estudo.

FIGURA 9. Espectros de massa LC-ESI-IT-(+)-MS/MS, com fragmentação do íon $(M+H)^+$ 827,46 (a) e 843,42 (b).



As frações também foram analisadas por RMN, o que permitiu observar sinais na região de 6,5 a 10,0 ppm, o que corresponde a sinais de hidrogênios amídicos. Também, foi observado, outros sinais característicos de peptídeos, como os sinais referentes aos hidrogênios α na região de 4 ppm (FIGURA 10).

FIGURA 10. Espectro de RMN ^1H da fração 80% do látex da espécie *C. campanulatus*.

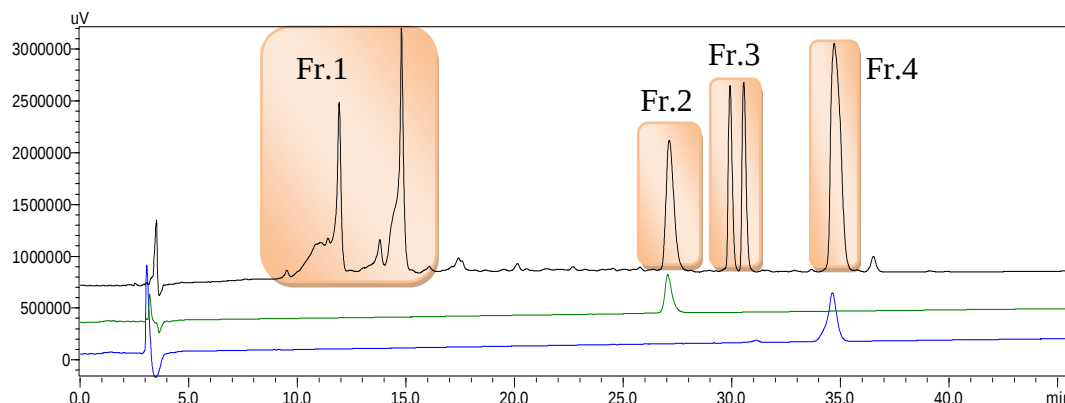


Mediante o exposto, deu-se continuidade com o processo de purificação do látex e posterior isolamento das substâncias m/z 827,46 e 843,42.

4.1.2 Purificação do Látex

Inicialmente, foi feito a otimização do método em escala analítica, para se obter uma melhor resolução dos picos. Assim, a fração 80% do látex (190 mg) foi injetada em HPLC modo preparativo, utilizando-se gradiente de 15-60% de B em A em 45 minutos, conforme item 3.2.4. Os picos foram coletados manualmente, obtendo-se 4 frações (FIGURA 11). As frações Fr.2 (4,0 mg) e Fr.4 (7,4 mg) eluídas nas faixas de tempos 27,5 e 35,8 minutos, foram liofilizadas e, após análise em HPLC modo analítico, verificou-se que as mesmas apresentavam os peptídeos de interesse.

FIGURA 11. Comparação dos cromatogramas da fração 80 % do látex de *C. campanulatus* (preto) com os das frações isoladas Fr.2 (verde) e Fr.4 (azul). Em destaque, as regiões coletadas em HPLC preparativo.



Observação: Programa de 15 a 60 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

Essas frações foram analisadas por espectrometria de massa de alta resolução, que permitiu observar o padrão de fragmentação dos resíduos de aminoácidos que compõem os peptídeos em questão, bem como, um breve sequenciamento. E com os experimentos de RMN 1D e 2D foi possível estabelecer e corroborar o sequenciamento proposto.

Assim sendo, inicialmente será discutida os resultados que permitiram a caracterização da substância isolada na fração Fr.4, a qual foi obtida em maior quantidade. Por sua vez, a substância isolada na fração Fr.2 foi analisada de forma análoga e seus resultados são discutidos posteriormente. Vale ressaltar que as frações Fr.1 e Fr.3 por não apresentarem *m/z* características de peptídeos cíclicos não serão discutidas nesse trabalho.

4.1.3 Caracterização da fração Fr.4

O Espectro de Massas HRESI-MS dessa amostra apresentou *m/z* 827,4538 (APÊNDICE C) e a fragmentação desse peptídeo por essa técnica mostrou perdas características aos aminoácidos valina, leucina e/ou isoleucina, metionina e serina (FIGURA 12). Ainda, foi possível observar o íon *m/z* 284, equivalente ao dipeptídeo composto pelos resíduos dos aminoácidos prolina e triptofano (CANTÚ, et al., 2008). A presença dos íons imônios com *m/z* 70, 104 e 159, na região mais baixa do espectro, permitiu confirmar a existência dos resíduos prolina, metionina e triptofano,

respectivamente (FIGURA 13). Esses íons são formados quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido (CANTÚ, et al., 2008). A soma dos resíduos de aminoácidos encontrados, Val, Ile/Leu, Ile/Leu, Met, Ser, Pro e Trp equivale a razão massa-carga obtida para esse peptídeo, o que corrobora sua natureza cíclica.

FIGURA 12. Espectros de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[M+H]^+$ 827,4538.

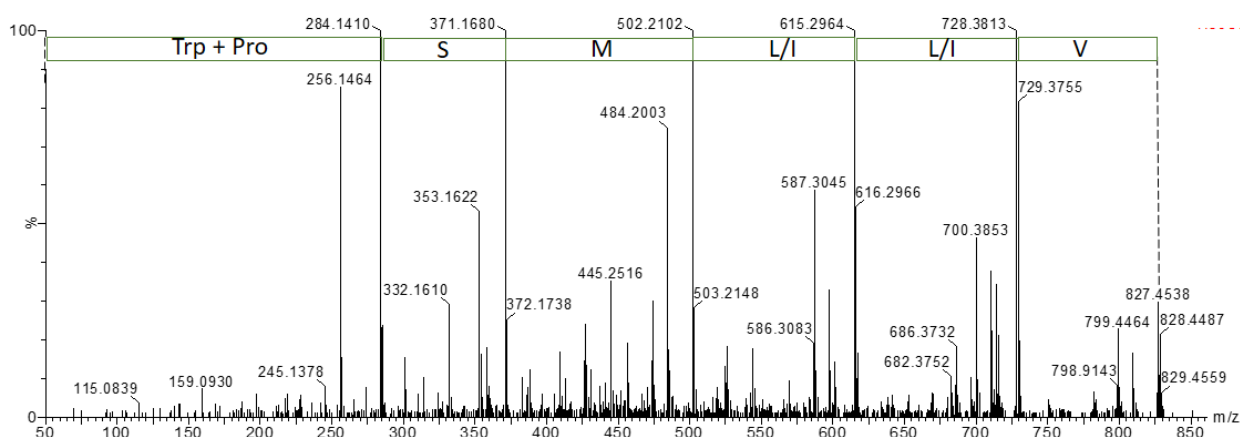
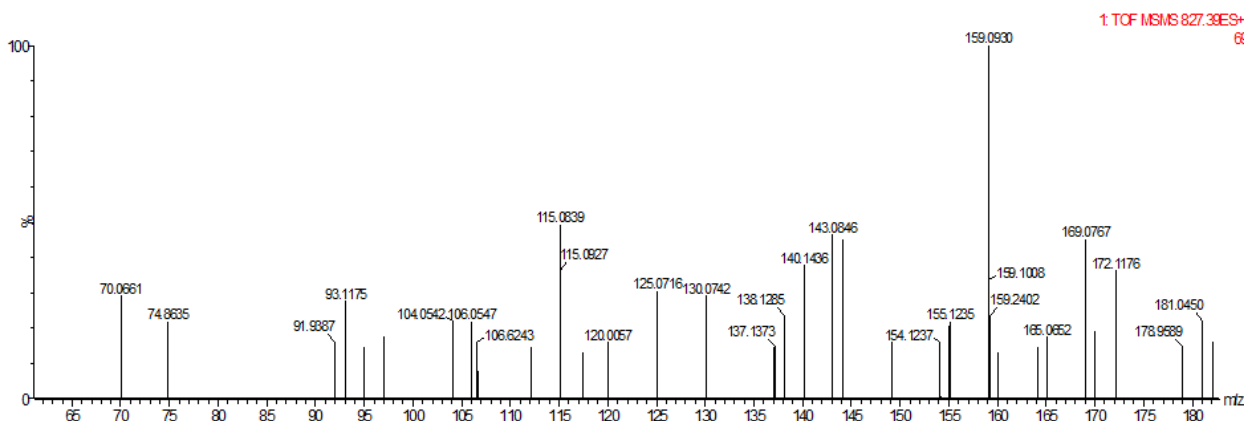


FIGURA 13. Ampliação da região mais baixa do espectro de massa HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS/MS obtido da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.

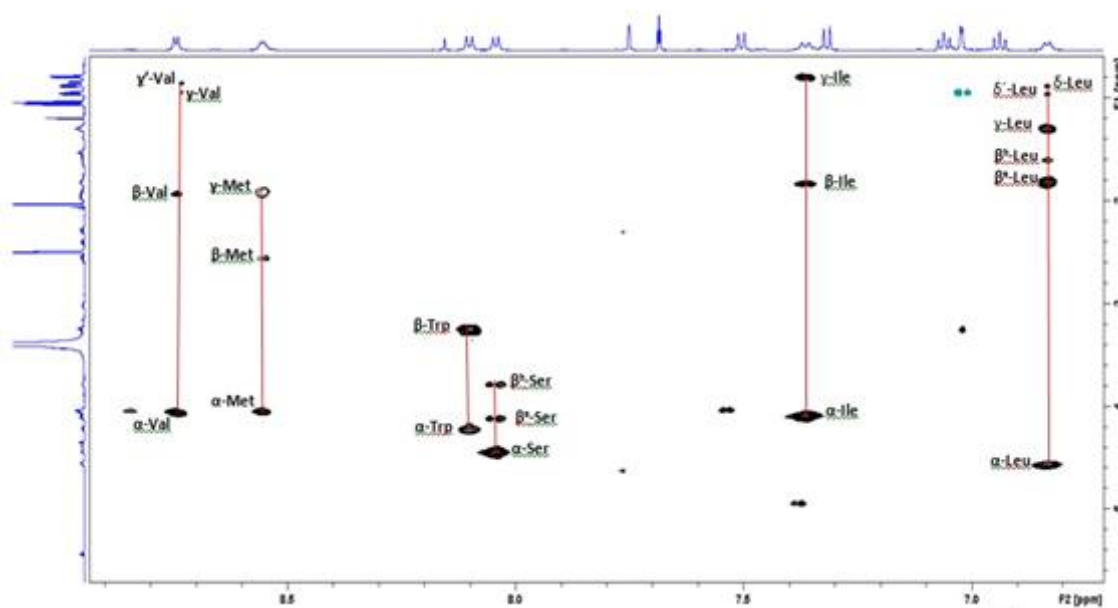


Portanto, além de fornecer a composição dos aminoácidos que contempla esse peptídeo, esta técnica permitiu propor as sequências para a substância em estudo: -Val-Leu/Ile-Leu/Ile-Met-Ser-Pro-Trp- ou -Val-Leu/Ile-Leu/Ile-Met-Ser-Trp-Pro-, ou seja, por essa técnica não foi possível estabelecer a ordem dos dois últimos resíduos nem a diferenciação dos resíduos isobáricos Leucina e Isoleucina. A confirmação do sequenciamento foi determinada pelas técnicas de RMN uni e

bidimensionais: ^1H (APÊNDICE D), DEPTq (APÊNDICE E), NOESY 1D, TOCSY 2D (APÊNDICE F), COSY (APÊNDICE G) , ROESY, HSQC (APÊNDICE H) e HMBC (APÊNDICE I).

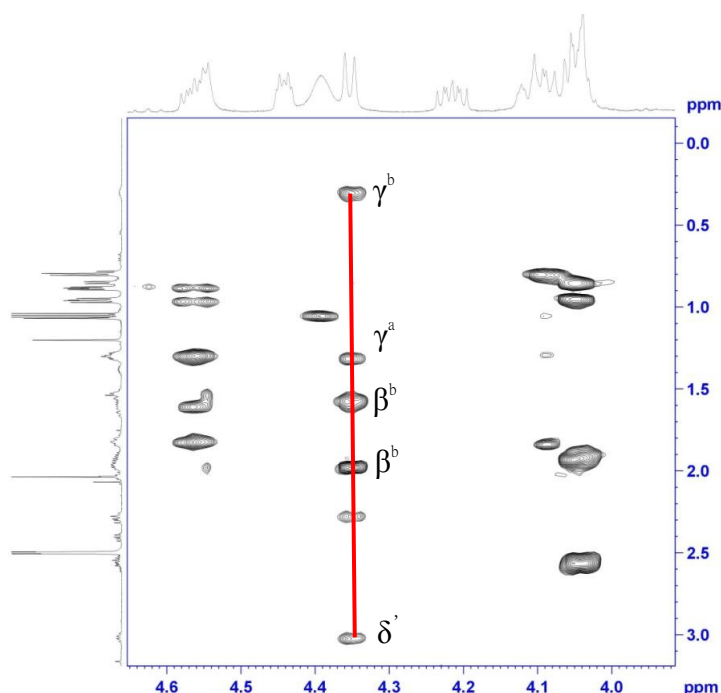
Por meio da técnica TOCSY 2D (APÊNDICE F) foi possível determinar o sistema de spin dos aminoácidos que compõe esse peptídeo. Essa técnica revelou 6 correlações entre os hidrogênios NH, compreendidos entre 6,85 e 8,75 ppm, com os demais H do resíduo (α , β , γ , δ , pertencentes a cadeia lateral). Na figura 14 encontra-se o espectro obtido por esta técnica evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos presentes.

FIGURA 14. Ampliação do mapa de contorno de TOCSY 2D evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos pertencentes ao peptídeo da fração Fr. 4



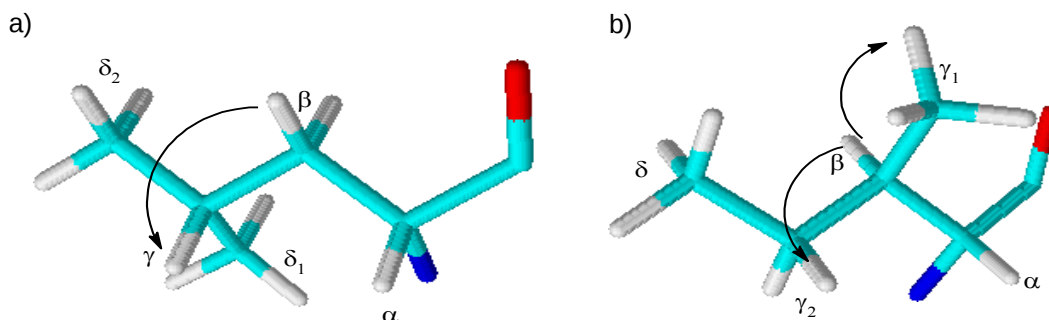
O sistema de spin do resíduo prolina não foi determinado do mesmo modo, já que esta não possui hidrogênio amídico e por isso não apresenta correlações nessa região. Desta forma, na figura 15 encontra-se em destaque o sistema de spin desse resíduo.

FIGURA 15. Ampliação do mapa de contorno TOCSY 2D evidenciando o sistema de spin do resíduo de aminoácido prolina pertencente ao peptídeo da fração Fr. 4.



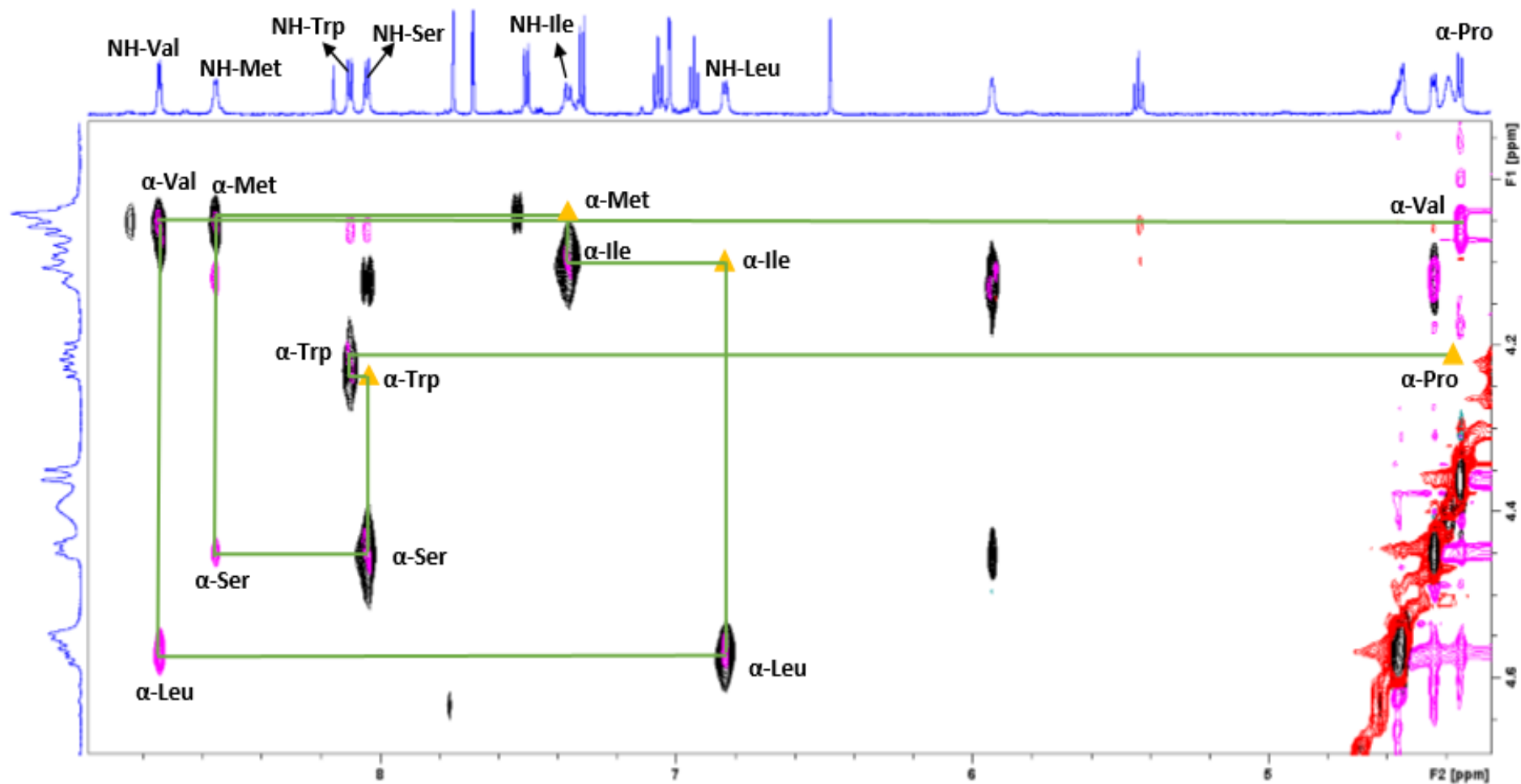
Os isômeros leucina e isoleucina foram diferenciadas pela técnica de COSY (APÊNDICE G) na qual observou-se o acoplamento entre os hidrogênios γ metílicos e/ou metínicos e os hidrogênios β . Sendo assim, o aminoácido que possui o NH com deslocamento químico de 6,85 ppm foi identificado como leucina, uma vez que foi observado o acoplamento entre os hidrogênios β (1,30; 1,82 ppm) com apenas o hidrogênio metínico em 1,61 ppm (H- γ). Já o aminoácido com NH em 7,37 ppm possui acoplamento de seu H- β (1,84) com hidrogênio metínico H- γ_1 (1,29 ppm), mas também com os hidrogênios metílicos em 0,80 ppm (γ_2). Portanto, esse resíduo de aminoácido foi identificado como isoleucina. Na Figura 16 apresenta a visualização dos acoplamentos descritos para os aminoácidos leucina e isoleucina.

FIGURA 16. Representação esquemática tridimensional dos resíduos dos aminoácidos de leucina (a) e isoleucina (b) mostrando os acoplamentos β - γ visualizados no espectro de COSY.



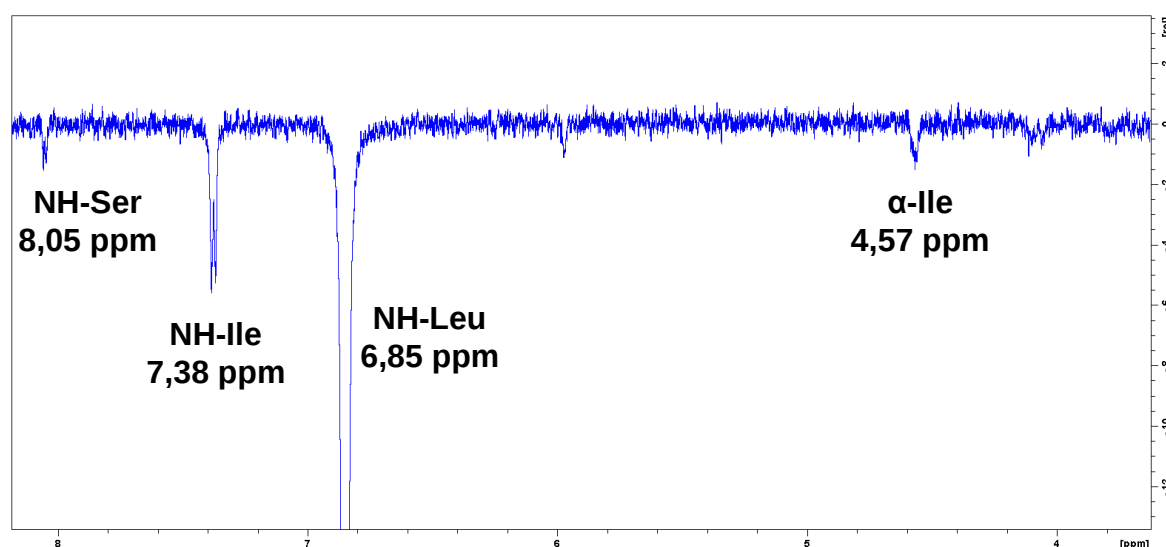
Uma vez feito as atribuições dos sinais de cada resíduo de aminoácido pertencente ao peptídeo, foi realizado o sequenciamento da cadeia peptídica utilizando-se interações do tipo $\text{NH}_i\text{-}\alpha\text{H}_{i+1}$ que foram observadas pelo espectro de ROESY. Na figura 17 encontra-se a sobreposição dos espectros de TOCSY 2D (em preto) e ROESY (em rosa). Os sinais justapostos compreendem aqueles que pertencem ao mesmo resíduo de aminoácido. Deste modo, o espectro de ROESY correlaciona os hidrogênios amídicos com seus próprios hidrogênios alfas e com os hidrogênios alfa do resíduo de aminoácido que o sucede, permitindo assim o sequenciamento.

FIGURA 17. Sequenciamento do peptídeo presente em Fr.4 pela ampliação da sobreposição dos mapas de contorno de TOCSY (preto) e ROESY (rosa) evidenciando a região dos hidrogênios amídicos e dos hidrogênios alfas. Os triângulos representam algumas das correlações observadas por NOESY 1D.



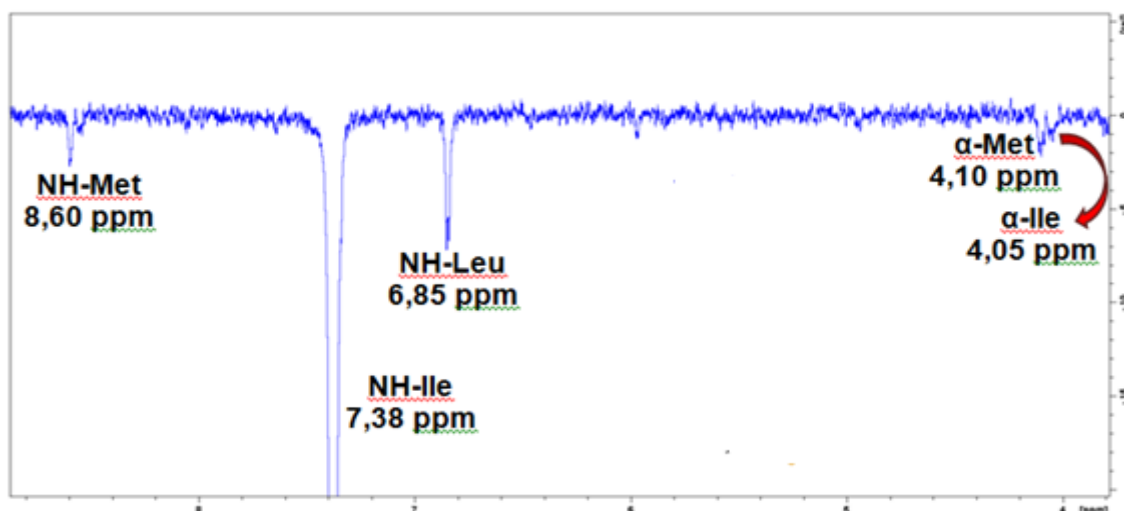
Os triângulos no espectro são indicativos de sinais que representam as interações que foram observadas por NOESY 1D, uma vez que não foi possível verificar no ROESY. O NOESY 1D também evidencia as interações inter-residuais. Na figura 18 encontra-se o espectro de NOESY 1D, no qual foi irradiado o hidrogênio amídico da leucina em 6,85 ppm. Neste espectro é possível conferir a interação entre o hidrogênio amídico da leucina e o hidrogênio α da isoleucina. Com isso, pode-se inferir que a isoleucina é o resíduo que sucede o resíduo de leucina. Nota-se também a interação entre NH desses aminoácidos, o que corrobora a sequência proposta.

FIGURA 18. Espectro de NOESY 1D do NH-Leu.



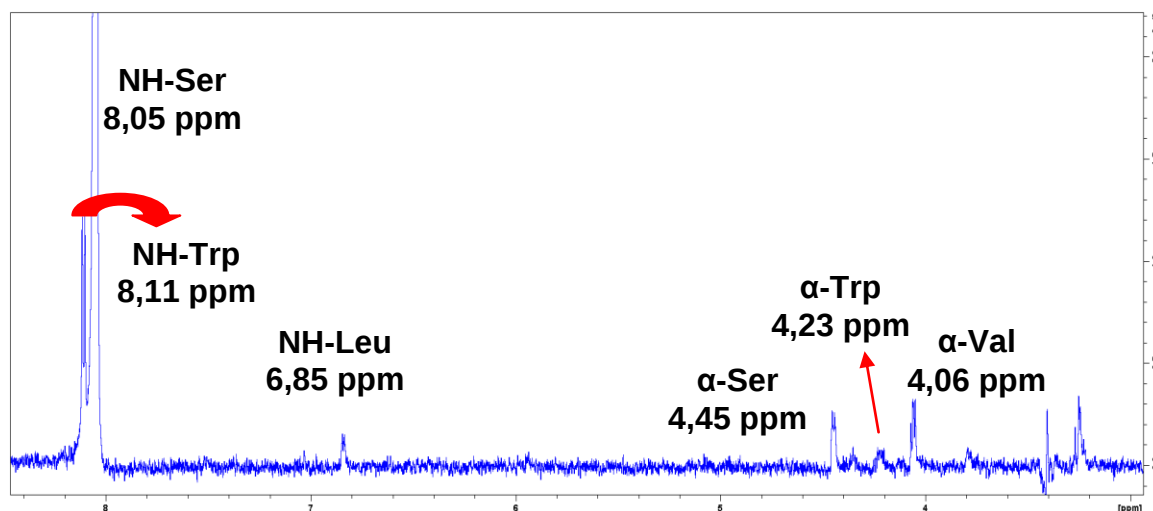
Do mesmo modo, ao irradiar o hidrogênio amídico da isoleucina obtemos um espectro de NOESY 1D na qual destaca-se a interação desse NH com o hidrogênio α e o hidrogênio amídico do resíduo de metionina (FIGURA 19), validando assim a proposta sugerida pela análise do perfil de fragmentação obtido pelo espectro de massas. Esse espectro também mostrou a interação do NH-Ile com NH-Leu.

FIGURA 19. Espectro de NOESY 1D do NH-Ile



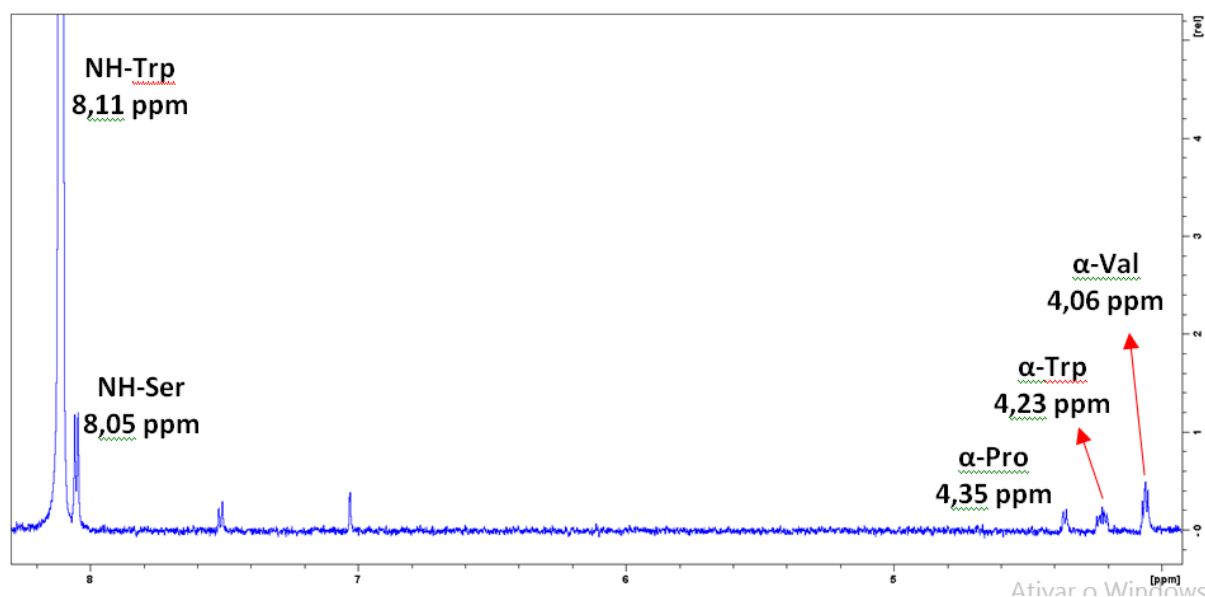
O aminoácido que o sucede a serina não foi possível determinar por ROESY, uma vez que a única interação observada foi entre seu hidrogênio amídico e o hidrogênio α do seu sistema de spin. Assim, foi realizado o experimento de NOESY 1D (FIGURA 20) para esse resíduo, afim de se obter mais informações. Este, mostrou interações entre o seus NH e H α , bem como, NH e o H α do triptofano.

FIGURA 20. Espectro de NOESY 1D do NH-Ser.



Ao irradiar o NH do triptofano em 8,11 ppm pode-se observar a interação entre ele e o H α da prolina (FIGURA 21). Logo, foi possível concluir que a prolina presente neste peptídeo apresenta configuração *cis*. Esse acoplamento também é fundamental, uma vez que demonstra a natureza cíclica do peptídeo. Além dessa interação, observa-se a relação entre o NH do triptofano com o NH do resíduo do aminoácido que o antecede, ou seja, a serina.

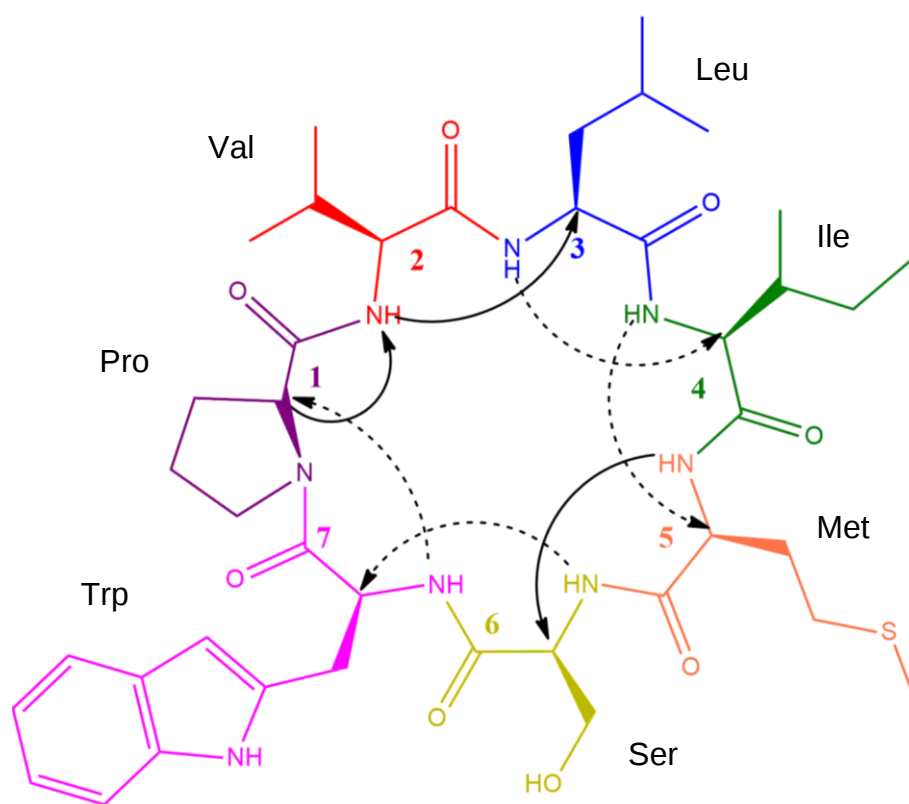
FIGURA 21. Espectro de NOESY 1D do NH-Trp



Apesar de não ter sido possível determinar a ordem da sequência dos dois últimos resíduos de aminoácido (Val e Trp) e diferenciar os resíduos da leucina e isoleucina por espectro de massas, por NOESY e ROESY, aponta que o orbitídeo em estudo apresenta um sequenciamento de seus resíduos de aminoácidos de acordo com a segunda sequência proposta pela análise do EM, ou seja, -Val-Leu/Ile-Leu/Ile-Met-Ser-Trp-Pro-.

O orbitídeo com as correlações encontradas no experimento de ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada) está representado na Figura 22. Portanto, o conjunto de dados obtidos por EM e RMN bidimensionais permitiram concluir que o orbitídeo isolado do látex de *C. campanulatus* na fração Fr.4 de m/z 827,4538 $[M+H]^+$ é compatível com a fórmula molecular $C_{41}H_{62}N_8O_8S$ e possui uma sequência peptídica ainda não reportada na literatura, *ciclo*(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met⁵-Ser⁶-Trp⁷). Essa estrutura foi denominada como [1-7N α C] crocaorb A₁, de acordo com Shim e colaboradores (2015) e os resíduos de aminoácidos que compõe esse peptídeo cíclico foram numerados de acordo com a regra CIP (CRAIK, et al., 2017).

FIGURA 22. Peptídeo [1-7NaC] crocaorb A₁ evidenciando as correlações observadas por ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada).



Fonte: Autor

Na tabela 11 encontram-se os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C e algumas correlações obtidas pelos experimentos bidimensionais do orbitídeo isolado.

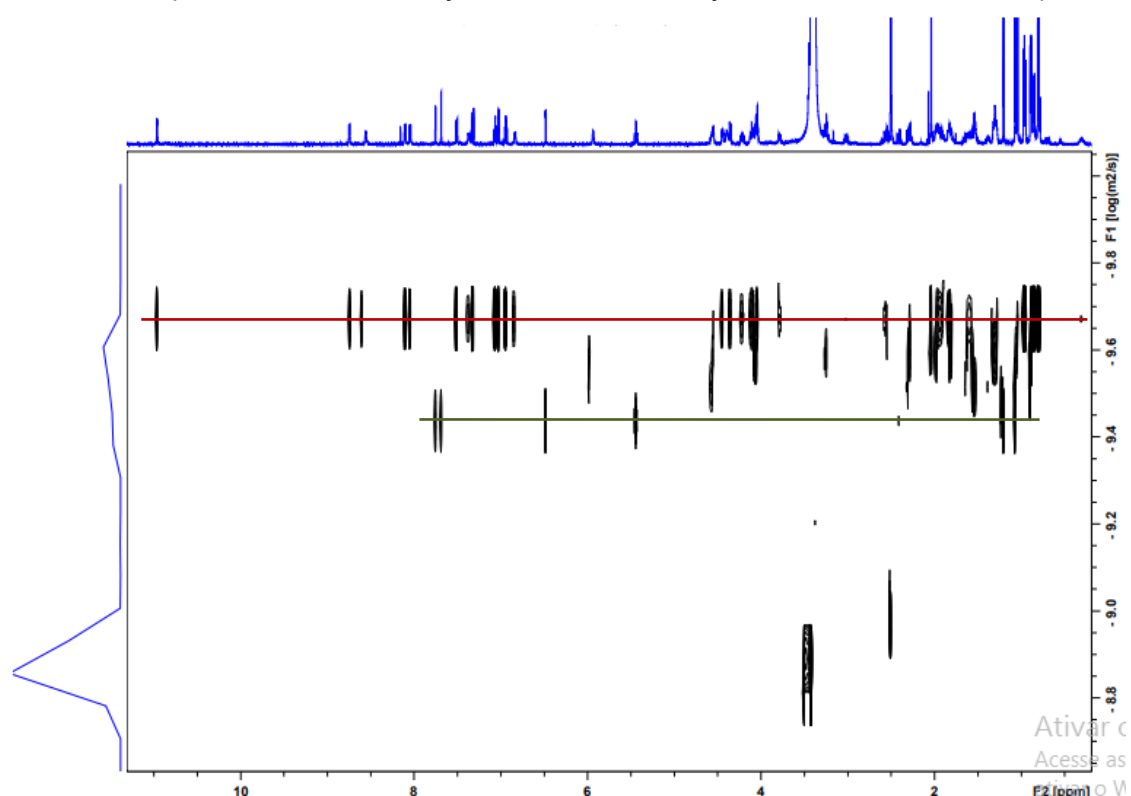
TABELA 11. Dados do espectro de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por RMN bidimensionais do orbitóide [1-7NaC] crocaorb A_1 , DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz, respectivamente.

			δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm	ROESY	HMBC
Pro	1	N	-	-		
	2	CO	170,37	-		
	3	α	60,25	4,33	12	4, 6, 8
	4	β^{a}	30,75	1,59		
	5	β^{b}		1,98		
	6	γ^{a}	20,65	1,31		
	7	γ^{b}		0,32		
	8	δ^{a}	45,40	2,29		
	9	δ^{b}		3,04		
Val	10	N	-	8,75	12, 18	
	11	CO	172,29	-		
	12	α	58,25	4,06		
	13	β	29,08	1,95		
	14	γ	18,66	0,96		
	15	γ'	18,71	0,86		
Leu	16	N	-	6,85	24, 26*	
	17	CO	170,62	-		
	18	α	50,95	4,57		
	19	β^{a}	40,49	1,83		
	20	β^{b}		1,30		
	21	γ	24,59	1,61		
	22	δ	23,88	0,89		
	23	δ'	22,13	0,98		
Ile	24	N	-	7,38	16, 26, 31, 33*	
	25	CO	171,66	-		
	26	α	57,92	4,10		27, 28, 29,
	27	β	35,54	1,85		
	28	γ	15,82	0,82		
	29	γ'	24,62	1,29		
	30	δ	21,04	1,06		
Met	1	N	-	8,60	33, 39	
	32	CO	170,99	-		
	33	α	54,25	4,05		
	34	β	30,74	1,94		
	35	γ'	44,39	2,45		
	36	CH3 (δ)	47,58	2,02		
Ser	37	N	-	8,05	16, 39, 43, 45	
	38	CO	171,62	-		
	39	α	53,77	4,45		
	40	β^{a}	62,67	3,80		
	41	β^{b}		4,13		
	42	OH	-	5,95		
Trp	43	N	-	8,11	3, 37, 45*	
	44	CO	170,31	-		
	45	α	56,93	4,23		44,46, 50
	46	β	27,28	3,28		45, 50, 49, 55
	47	β				
	48	1'(NH)	-	10,96		
	49	2'	123,77	7,03		50, 55, 56
	50	3'	110,52	-		
	51	4'	111,9	7,33		52, 55
	52	5'	118,81	6,95		52, 53, 55, 56
	53	6'	121,5	7,07		52
	54	7'	117,90	7,51		49, 50, 53, 55, 56
	55	3a'	127,6	-		
	56	7a'	136,9	-		

*Interações observadas por NOESY 1D.

Ao se atentar para os espectros de ^1H e DEPTq nota-se a presença de sinais além daqueles que já foram atribuídos ao orbitídeo. O espectro de DEPTq mostra que a fração isolada como Fr.4 apresenta 61 carbonos porém, apenas 45 pertence ao peptídeo cíclico ($\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$) logo, a impureza presente contém em sua composição 20 átomos de carbono. Para obter maiores informações sobre a impureza realizou-se o experimento de RMN denominado DOSY (FIGURA 22).

FIGURA 22. Espectro de DOSY da fração Fr.2 isolado da fração 80% do látex de *C. campanulatus*.



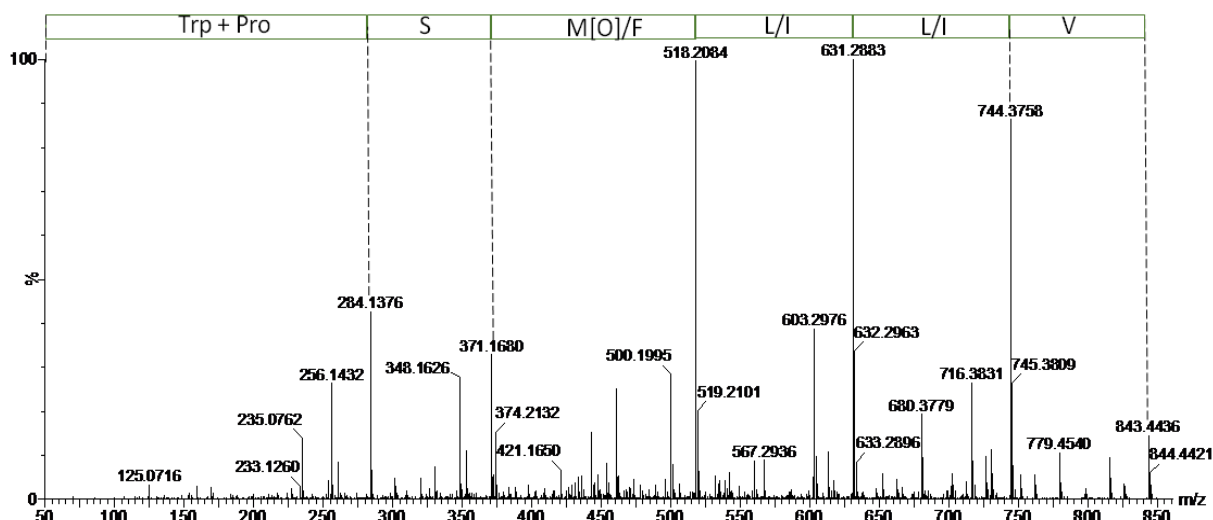
Este experimento é baseado no coeficiente de autodifusão translacional da molécula e, se as substâncias que compõem a mistura possuírem valores de difusão distintos, é possível determinar quais são os sinais do espectro de ^1H que pertencem a cada uma das substâncias (VIZZOTTO, 2004). Essa situação pode ser notada na fração em estudo, como esta destacado na imagem acima, onde em vermelho têm-se os sinais que pertencem ao orbitídeo caracterizado e em verde, os da impureza.

4.1.4 Caracterização da fração Fr.2

O Espectro de massa HRESI-MS da fração Fr.2 apresentou m/z 843,4436 (APÊNDICE J) e seu perfil de fragmentação foi semelhante à do peptídeo isolado na fração Fr.4, evidenciando perdas características dos aminoácidos valina, leucina e/ou isoleucina e serina. Também foi possível observar o íon m/z 284, equivalente

ao dipeptídeo composto pelos resíduos dos aminoácidos prolina e triptofano (CANTÚ et al., 2008). Comparando as fragmentações encontradas para o peptídeo elucidado na seção anterior 4.2.3 (Fr4) e o descrito nesta seção (Fr2), verificou-se diferença em apenas uma quebra, com perda de 147 Da, peculiar dos resíduos de aminoácidos fenilalanina ou metionina oxidada (FIGURA 24).

FIGURA 24. Espectros de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[M+H]^+$ 843,4436.



Portanto, por essa técnica foi possível obter informações sobre as algumas das quebras de aminoácidos que compõe o peptídeo em questão. Também foi possível apontar a natureza cíclica do peptídeo, uma vez que a soma dos resíduos de aminoácidos encontrados equivale à razão massa-carga obtida para ele. Apesar disso, não foi possível determinar quais dos aminoácidos, fenilalanina ou metionina oxidada, pertence a essa substância, tão pouco diferenciar os resíduos isobáricos de leucina e isoleucina. Para sanar essas questões e estabelecer o sequenciamento desses resíduos, foi realizado os experimentos de RMN 1D e 2D: ^1H (APÊNDICE K), DEPTq (APÊNDICE L), NOESY 1D, TOCSY 2D (apêndice M), COSY (APÊNDICE N), ROESY, HSQC (APÊNDICE O) e HMBC (APÊNDICE P).

Assim, os dados de RMN foram tratados inicialmente, estabelecendo-se o sistema de spin dos aminoácidos que compõe o peptídeo pela técnica de TOCSY 2D. Nela se pode observar 6 correlações entre os hidrogênios NH, compreendidos entre 6,83 e 8,74 ppm, com os demais H do resíduo (α , β , γ , δ , pertencentes a cadeia lateral). Já o sistema de spin da prolina foi determinado através da correlação entre seu hidrogênio α e os demais resíduos. Na figura 25 encontra-se o espectro obtido

por esta técnica evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos que apresentam hidrogênios amídicos e na figura 26 localiza-se o sistema de spin do resíduo de aminoácido prolina.

FIGURA 25. Ampliação do mapa de contorno de TOCSY 2D evidenciando os sistemas de spin dos aminoácidos pertencentes ao peptídeo da fração Fr. 2.

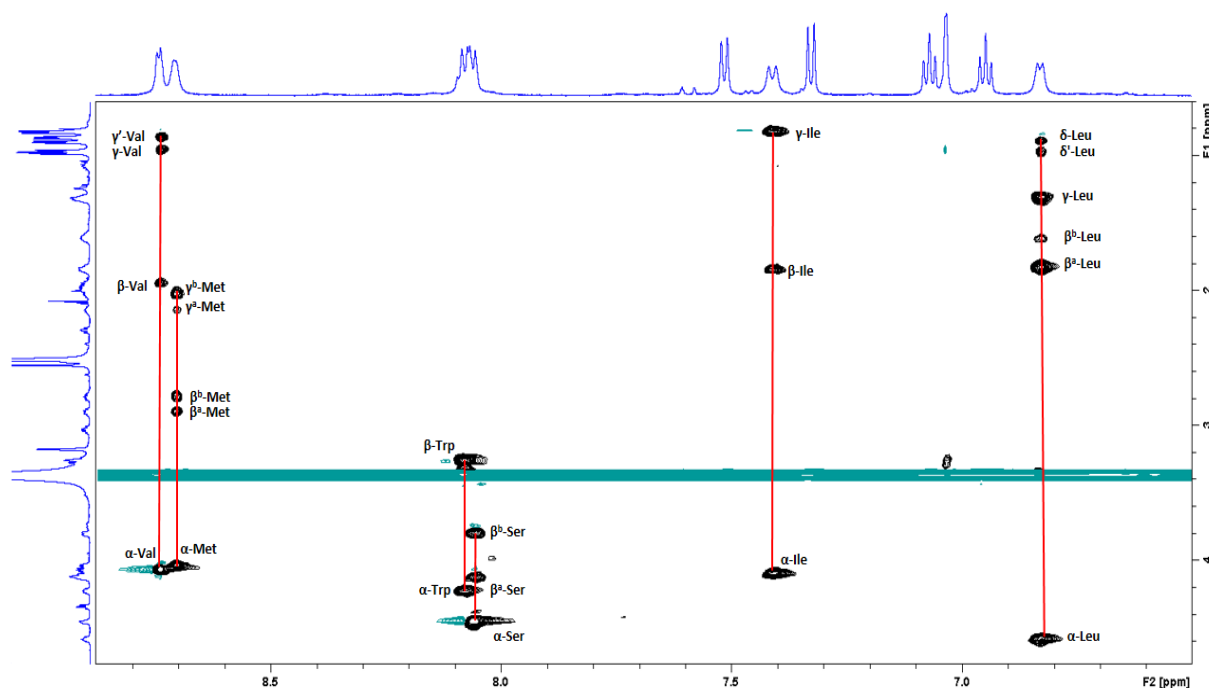
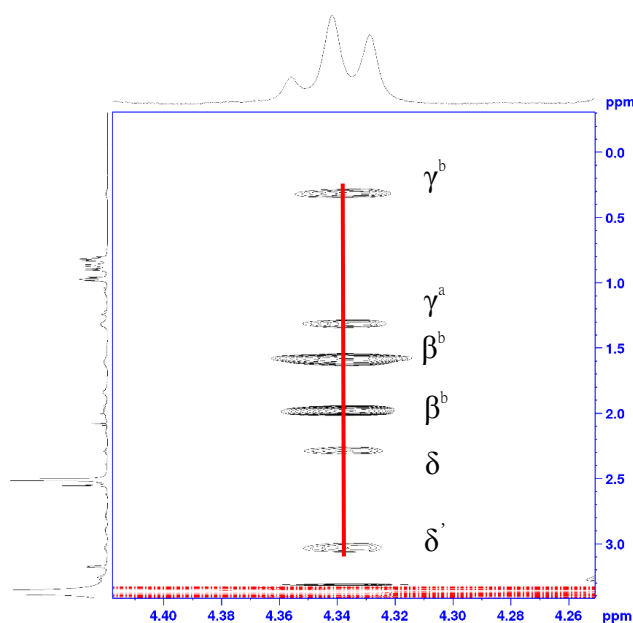


FIGURA 26. Ampliação do mapa de contorno TOCSY 2D evidenciando o sistema de spin do resíduo de aminoácido prolina pertencente ao peptídeo da fração Fr. 2.

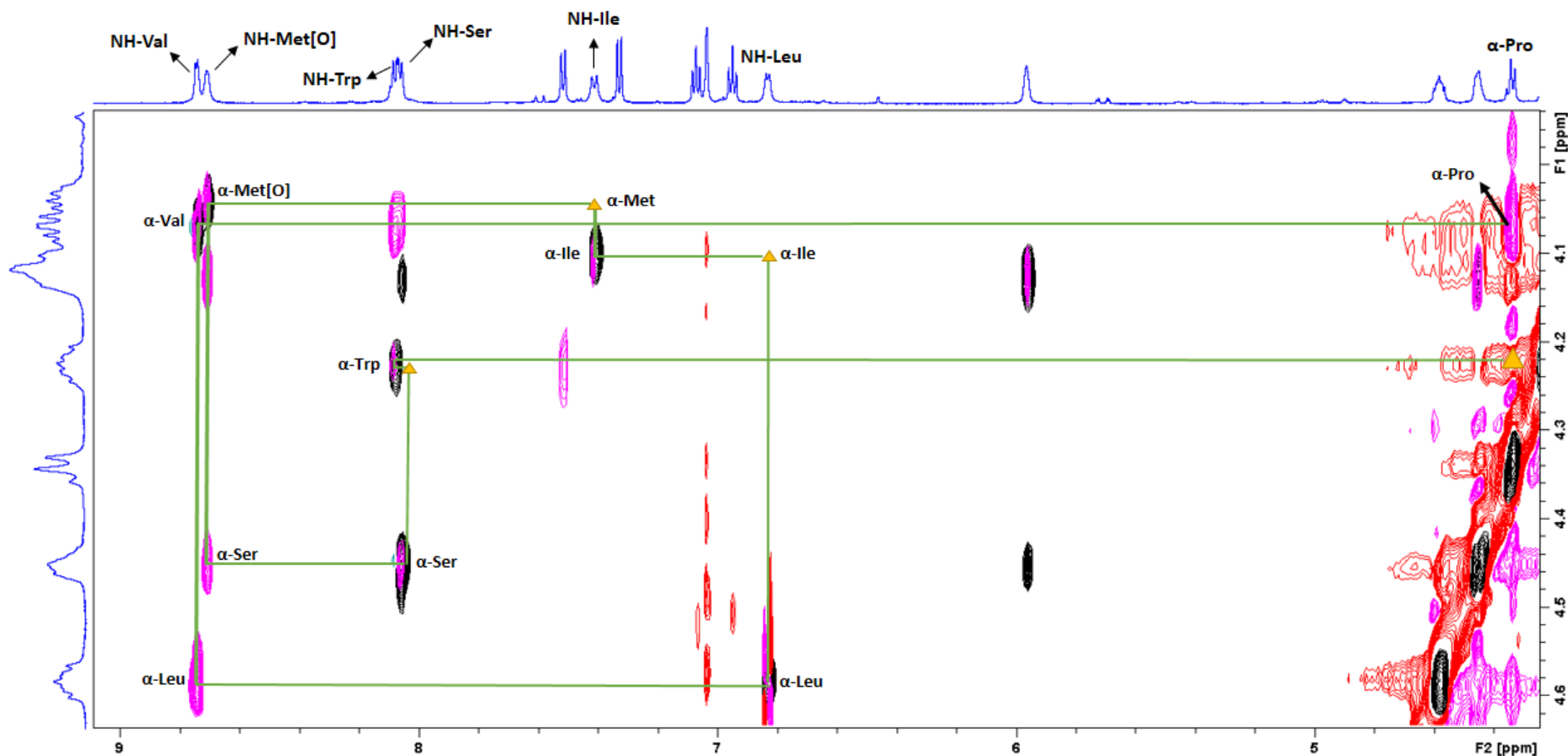


O sistema de spin que engloba o hidrogênio amídico com deslocamento químico de 8,72 ppm é característico do resíduo de aminoácido metionina. No entanto, a presença dos hidrogênios metílicos terminais de sua cadeia lateral na região mais blindada do espectro (2,45 ppm) ao do resíduo que constitui o peptídeo elucidado anteriormente (2,02 ppm), indica a presença de uma oxidação no seu átomo de enxofre. Além disso, a ausência de sinais aromáticos, a não ser daqueles atribuídos ao aminoácido triptofano, descarta a possibilidade do resíduo de fenilalanina fazer parte da composição desse peptídeo. Logo, o íon com m/z 147 foi atribuído ao aminoácido metionina oxidada.

Para definir a composição dos resíduos de aminoácidos do peptídeo em questão, os resíduos isobáricos de leucina e isoleucina foram diferenciados e atribuídos através do experimento COSY. Assim sendo, o aminoácido com NH em 6,83 ppm foi identificado como leucina, uma vez que seus hidrogênios β (1,30; 1,83 ppm) acoplam apenas com o hidrogênio metínico em 1,60 ppm (H- γ). Já o aminoácido com o prótom amídico em 7,37 ppm possui acoplamento de seu H- β (1,84) com hidrogênio metínico H- γ_1 (1,29 ppm), mas também com os hidrogênios metílicos em 0,81 ppm (γ_2). Logo, esse resíduo de aminoácido foi identificado como isoleucina.

Assim, após a atribuição de todos os sinais aos resíduos de aminoácidos, procedeu-se com o sequenciamento da cadeia peptídica utilizando-se interações do tipo $\text{NH}_i\text{-}\alpha\text{H}_{i+1}$ observadas pelo mapa de contorno ROESY. Na figura 27 encontra-se a sobreposição dos espectros de TOCSY 2D (em preto) e ROESY (em rosa).

FIGURA 27. Sequenciamento do peptídeo presente em Fr.2 pela ampliação da sobreposição dos mapas de contorno de TOCSY (preto) e ROESY (rosa) evidenciando a região dos hidrogênios amídicos e dos hidrogênios alfas. Os triângulos representam algumas das correlações observadas por NOESY 1D.



Através do mapa de contorno ROESY, não foi possível observar as correlações $\text{NH}_i\text{-}\alpha\text{H}_{i+1}$ dos aminoácidos leucina, isoleucina e serina e, portanto, os triângulos no espectro são indicativos de sinais que representam as interações observadas por NOESY 1D. Nas figuras 28, 29 e 30 encontram-se os espectros obtidos por NOESY 1D quando irradiados os hidrogênios amídicos dos aminoácidos leucina, isoleucina e serina, respectivamente.

FIGURA 28. Espectro de NOESY 1D do NH-Leu

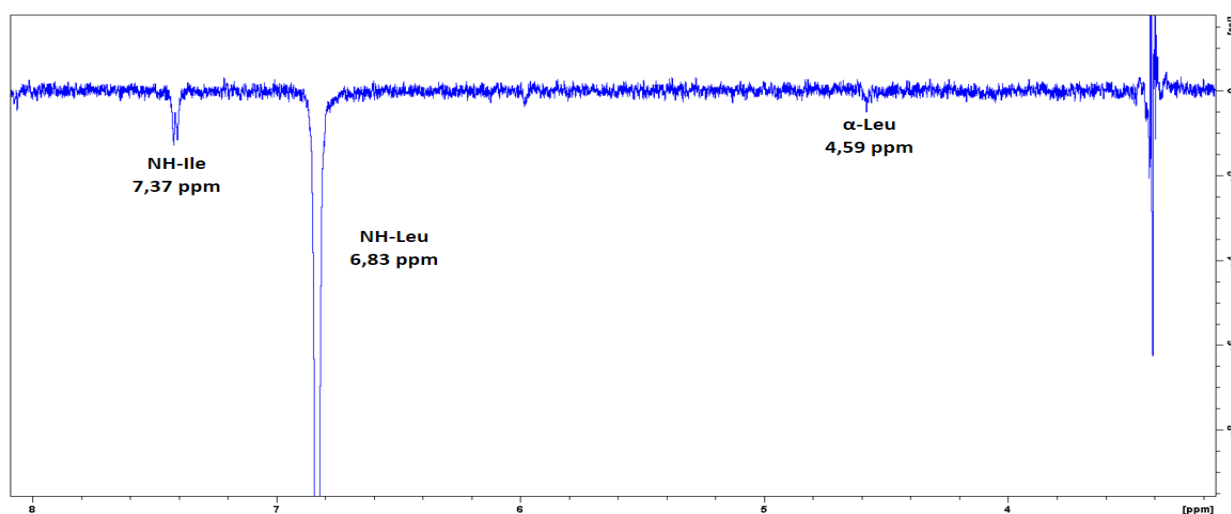


FIGURA 29. Espectro de NOESY 1D do NH-Ile

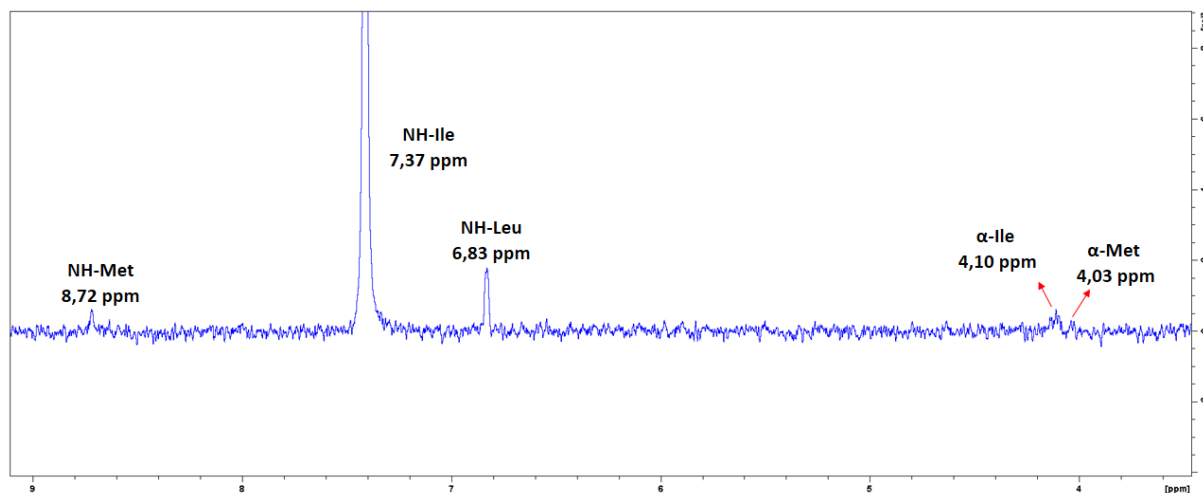
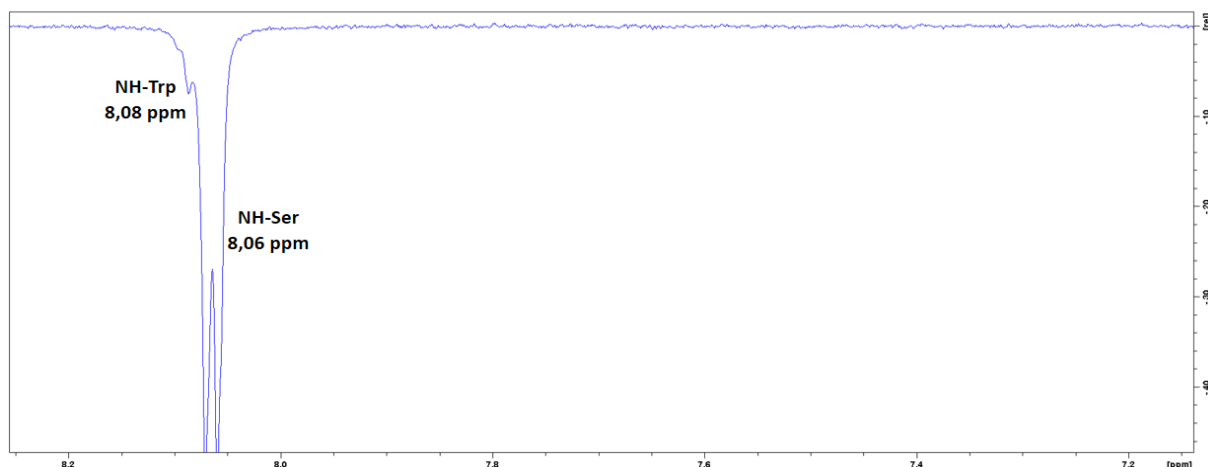
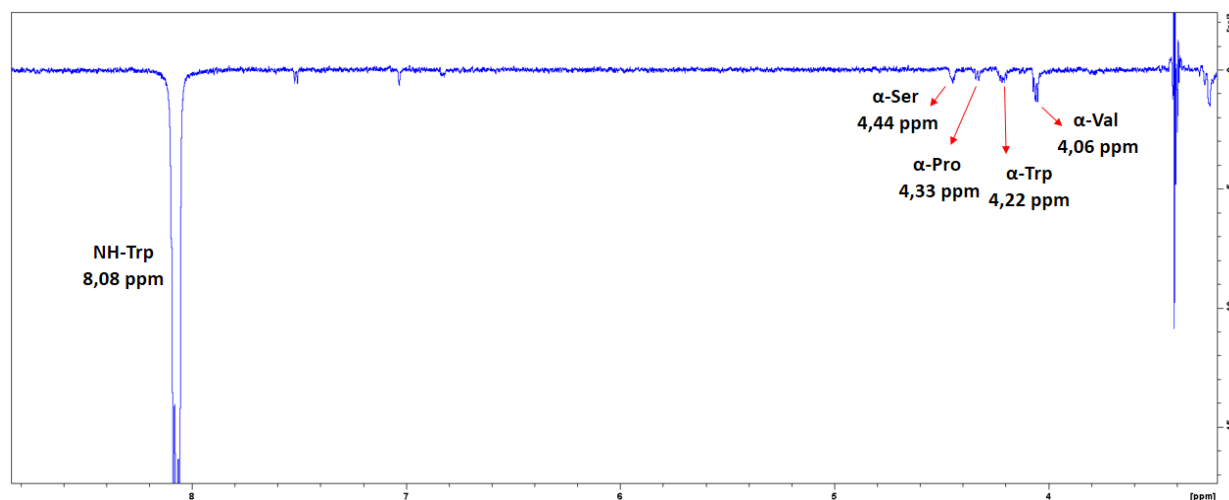


FIGURA 30. Espectro de NOESY 1D do NH-Ser



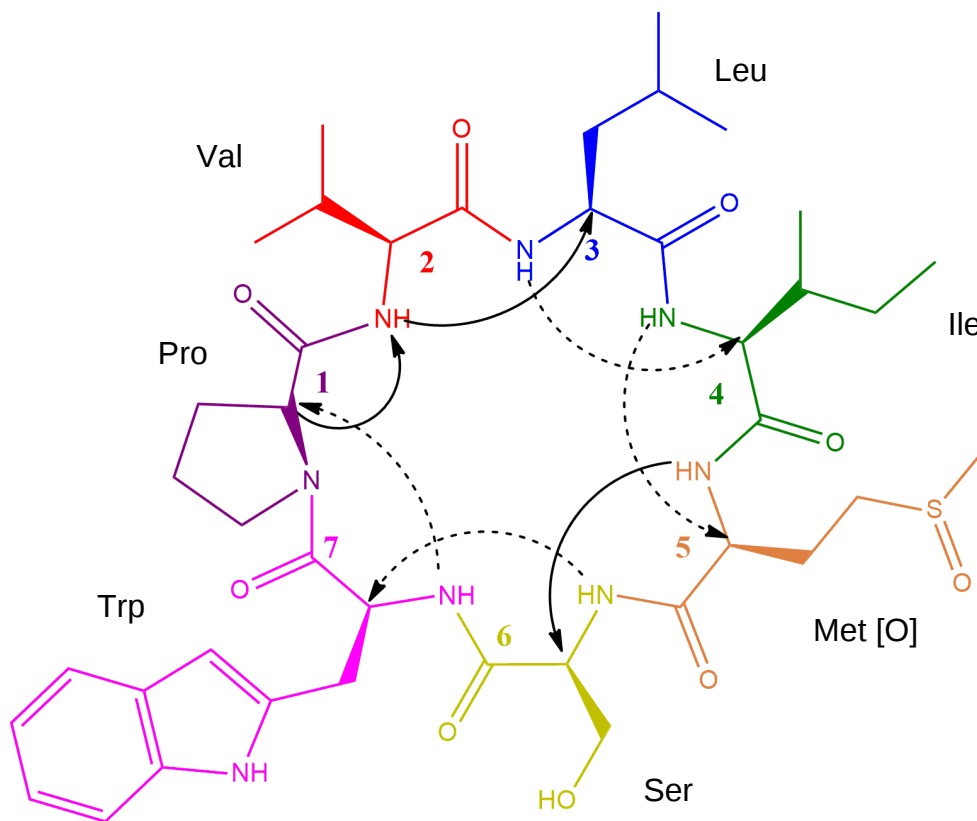
Foi possível observar por NOESY 1D a interação entre o hidrogênio amídico do triptofano em 8,08 ppm e o H α da prolina (FIGURA 31), sugerindo que a prolina presente nesse peptídeo apresenta configuração *cis*.

FIGURA 31. Espectro de NOESY 1D do NH-Trp



Contudo, da fração Fr.2, obtida do látex da *C. campanulatus*, foi possível isolar o orbitídeo com m/z 843,4536 $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{41}H_{62}N_8O_9S$. O composto possui uma sequência peptídica ainda não reportada na literatura, *ciclo*(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met[O]⁵-Ser⁶-Trp⁷), sendo descrita aqui pela primeira vez na literatura. Essa estrutura foi denominada como [1-7N α C] crocaorb A₂. O orbitídeo com as correlações encontradas no experimento de ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada) está representado na Figura 32.

FIGURA 32. Peptídeo [1-7NaC] crocaorb A₂ evidenciando as correlações observadas por ROESY (seta preenchida) e NOESY 1D (seta tracejada).



Na tabela 12 encontram-se os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C e algumas correlações obtidas pelos experimentos bidimensionais do orbitídeo isolado.

TABELA 12. Dados do espectro de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por RMN bidimensionais do orbitídeo [1-7NaC] crocaorb A₂, DMSO- d₆, 600 e 150 MHz, respectivamente.

			δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm	ROESY	HMBC
Pro	1	N	-	-		
	2	CO	170,37	-		
	3	α	60,25	4,33	12	4, 6, 8
	4	β^{a}	30,75	1,59		
	5	β^{b}		1,98		
	6	γ^{a}	20,65	1,31		
	7	γ^{b}		0,32		
	8	δ^{a}	45,40	2,29		
	9	δ^{b}		3,04		
Val	0	N	-	8,74	12, 18	
	11	CO	172,29	-		
	12	α	58,25	4,06	3	
	13	β	29,08	1,94		
	14	γ	18,66	0,95		
	15	γ'	18,71	0,85		
Leu	16	N	-	6,83	18, 24*	
	17	CO	170,62	-		
	18	α	50,95	4,59		
	19	β^{a}	40,49	1,83		
	20	β^{b}		1,30		
	21	γ	24,59	1,60		
	22	δ	23,88	0,88		
	23	δ'	22,13	0,97		
Ile	24	N	-	7,41	16, 26, 31, 33*	
	25	CO	171,66	-		
	26	α	57,92	4,10		27, 28, 29,
	27	β	35,54	1,85		
	28	γ	15,82	0,81		
	29	γ'	24,62	1,29		
	30	δ	21,04	1,06		
Met	31	N	-	8,72	33, 41, 44	
	32	CO	170,99	-		
	33	α	54,25	4,00		
	34	β^{a}	30,74	2,01		
	35	β^{b}		2,14		
	36	γ^{a}	44,39	2,78		
	37	γ^{b}		2,89		
	38	CH ₃ (δ)	47,58	2,53		
Ser	39	N	-	8,06	45*	
	40	CO	171,62	-		
	41	α	53,77	4,44		
	42	β^{a}	62,67	3,78		
	43	β^{b}		4,12		
	44	OH	-	5,98		
Trp	45	N	-	8,08	3, 41, 47*	
	46	CO	170,31	-		
	47	α	56,93	4,22	3	46,48, 52
	48	β	27,28	3,24		47, 52, 51, 57
	49	β				
	50	1'(NH)	-	10,96		
	51	2'	123,77	7,03		52, 57, 58
	52	3'	110,52	-		
	53	4'	111,9	7,33		54, 57
	54	5'	118,81	6,95		54, 55, 57, 58
	55	6'	121,5	7,07		54
	56	7'	117,90	7,51		51, 52, 55, 57, 58
	57	3a'	127,6	-		
	58	7a'	136,9	-		

Os orbitídeos isolados dessa espécie não foram obtidos em quantidades suficientes para a realização da atividade biológica. Com o intuito então de explorar novos orbitídeos e obter massa o suficiente para a realização de tais testes, estudou-se a espécie *C. floribundus*.

4.2 *C. floribundus*

Diante dos resultados obtidos e discutidos para a espécie *C. campanulatus* a mesma metodologia foi empregada para a espécie *C. floribundus* com o objetivo de se identificar novos peptídeos. Assim sendo, são discutidos na sequência os dados oriundos da busca desse metabólito para essa espécie.

4.2.1 Obtenção da fração 80%

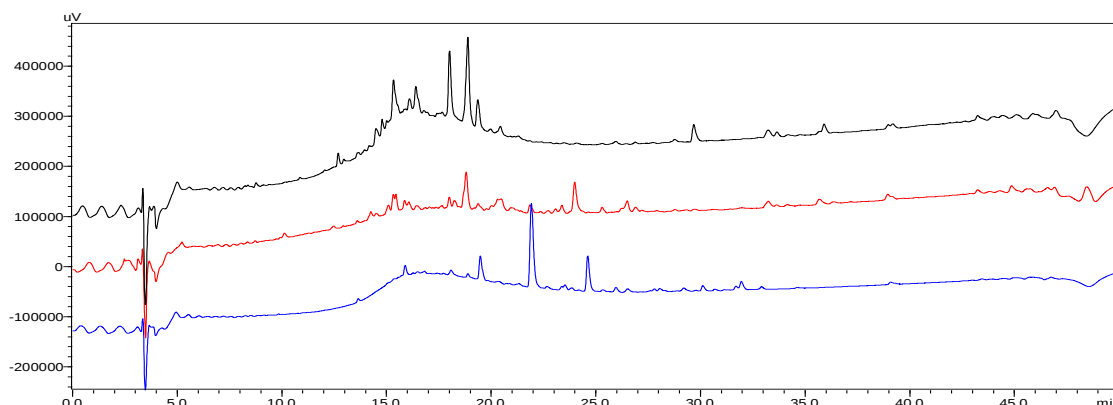
Os extratos hidroetanólicos foram obtidos seguindo a metodologia descrita no item 3.2.1. Na tabela 13 estão as massas obtidas.

TABELA 13. Massas de extratos obtidos de folha, caule e raiz de *C.floribundus*.

Órgão Vegetal	Extrato bruto (g)
Folha	0,4
Caule	0,8
Raiz (pequena escala)	2,5
Raiz (grande escala)	9,3

Para obter a fração de interesse, 50 mg desses extratos de folha, caule e raiz foram então submetidos a um fracionamento em pequena escala, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.3.1. Assim, as frações com peptídeos (fração C₁₈-80%), possivelmente presentes em cada um desses órgãos, foram previamente analisadas em HPLC analítico por gradiente exploratório, de modo a averiguar o perfil das amostras. Na figura 33 se encontra uma comparação dos cromatogramas obtidos por HPLC das frações 80% da raiz, caule e folha dessa espécie.

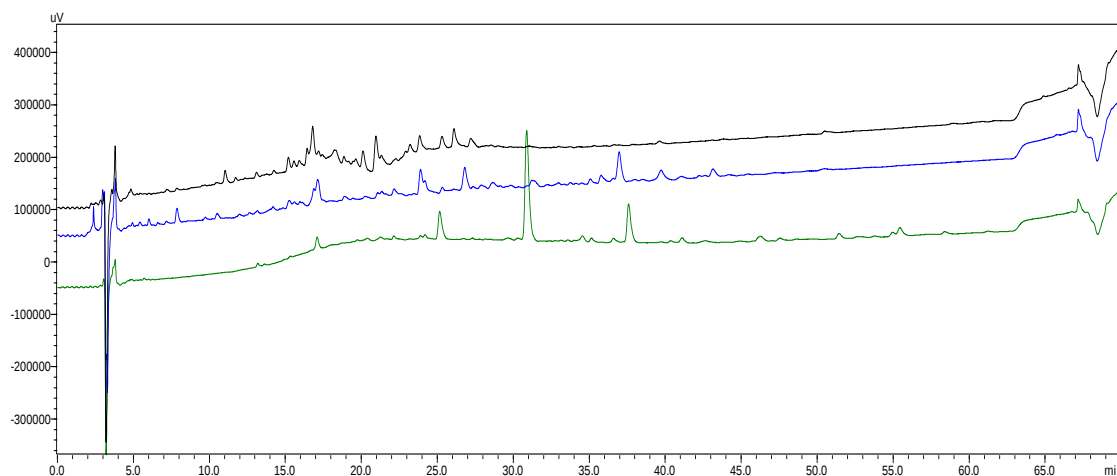
FIGURA 33. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (vermelho) e raiz (azul) de *C. floribundus*.



Observação: Programa de 5 a 95 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C18-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

Diante dos perfis obtidos, verificou-se que todas as frações apresentam sinais com tempos de retenção característicos de orbitídeos. Com o objetivo então de melhorar a resolução dos cromatogramas, as amostras foram submetidas a um gradiente de 15-60% de B em A em 60 min. Observou-se uma expressiva melhora na resolução dos picos e, portanto, da separação dos compostos. Na figura 34 encontram-se os cromatogramas obtidos.

FIGURA 34. Comparação dos perfis cromatográficos das frações 80% de folha (preto), caule (azul) e raiz (verde) de *C. floribundus*.

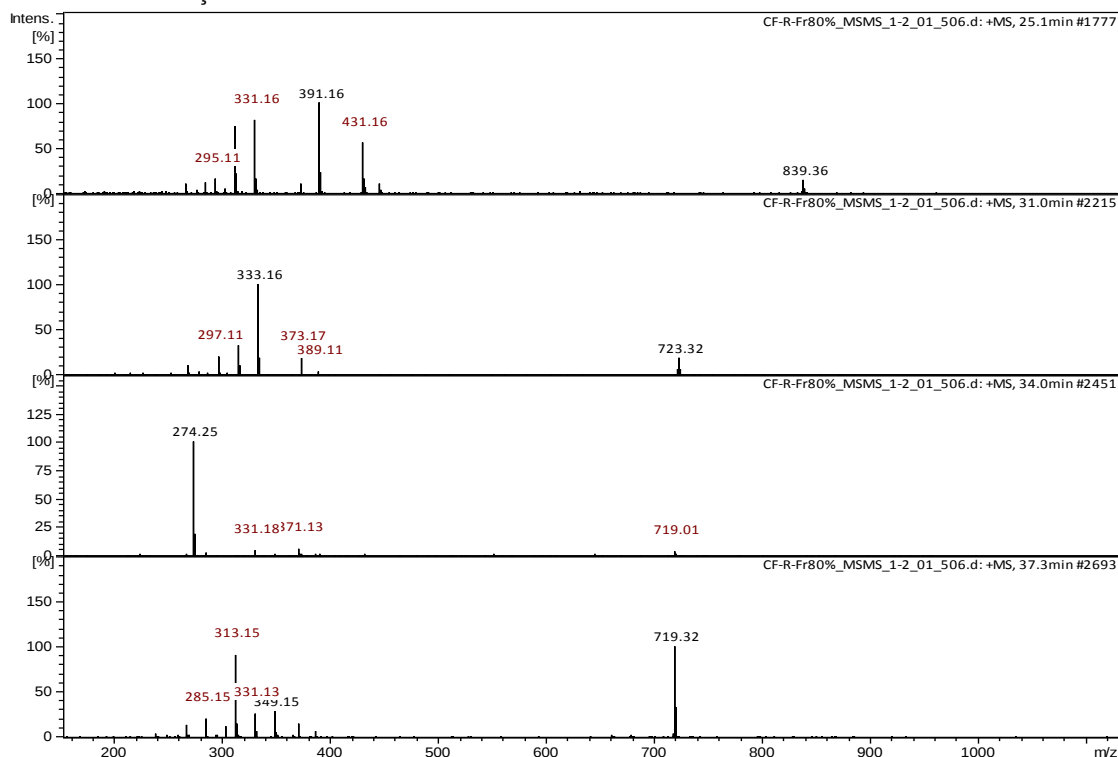


Observação: Programa de 15 a 60 % de B em A em 60 minutos (A: H₂O/0,1% ác. Fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C18-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

Com o objetivo de se aferir as massas correspondentes a cada pico e verificar se as massas moleculares dessas substâncias compreendiam a faixa de 600 a 1000 Da, foram realizadas as análises por LC-MS para as 3 frações. Apenas a fração 80%

da raiz apresentou compostos com massas características de orbídeos. Na figura 35 encontram-se algumas massas correspondentes aos picos na faixa de 25-37 minutos da fração 80% da raiz obtidos por LC-MS.

FIGURA 35. Espectros de massa obtidos por LC-MS dos compostos com tempos de retenção entre 25-37 minutos da fração 80% da raiz de *C. floribundus*.



Observação: Programa de 15 a 50 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å.

Diante do exposto, optou-se em primeiro instante a dar continuidade ao estudo com a fração 80% da raiz de *C. floribundus*. Foi feito então, o extrato hidroetanólico bruto e o fracionamento desse órgão em grande escala e posteriormente, a fração 80% foi encaminhada para purificação.

4.2.2. Purificação da Fração 80% da raiz e caracterização estrutural das substâncias obtidas.

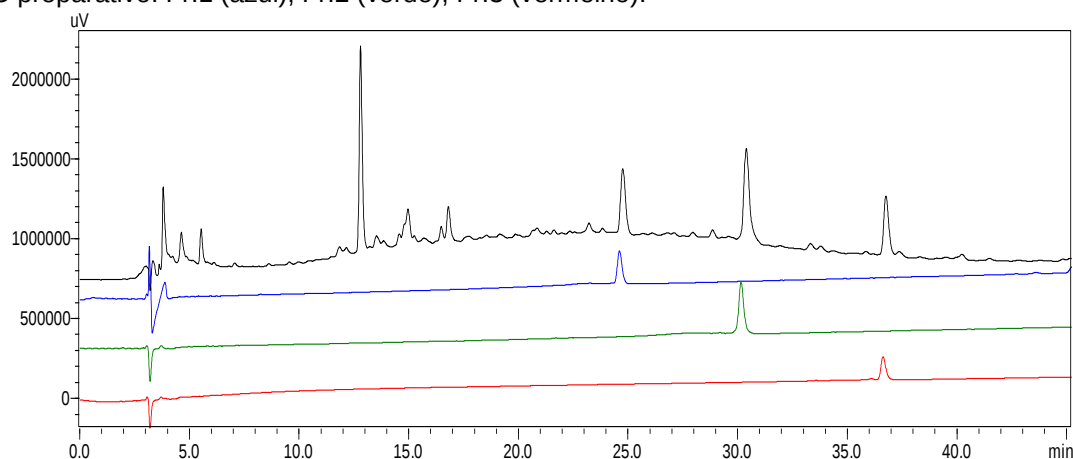
Como mencionado anteriormente, o objetivo principal desse trabalho é a obtenção de peptídeos cíclicos e assim, utilizando o gradiente otimizado na seção anterior, procedeu-se com a primeira purificação dando prioridades para as substâncias que eluíssem numa porcentagem de solvente B entre 50-70%,

característico da classe de metabólito de interesse. No entanto, uma segunda purificação também foi realizada, como será discutida posteriormente, visando à obtenção de outras substâncias.

4.2.2.1 Primeira purificação

Uma massa correspondente 392,30 mg da fração 80% de raiz foi injetada no HPLC preparativo e submetida a um gradiente de 15-60% de B em A em 45 minutos, conforme item 3.2.4. Os picos foram coletados manualmente, obtendo-se 3 frações eluídas nas faixas de tempos 24,5 e 37,0 minutos: Fr.1 (3,5 mg), Fr.2 (7,3 mg) e Fr.3 (5,8 mg). Antes de ser liofilizada, uma alíquota 50 μ L de cada fração foi injetada no HPLC analítico para analisar o grau de pureza das frações coletadas (FIGURA 36).

FIGURA 36. Comparação dos perfis cromatográficos da fração 80% (preto) com aquelas obtidas por HPLC preparativo: Fr.1 (azul); Fr.2 (verde); Fr.3 (vermelho).



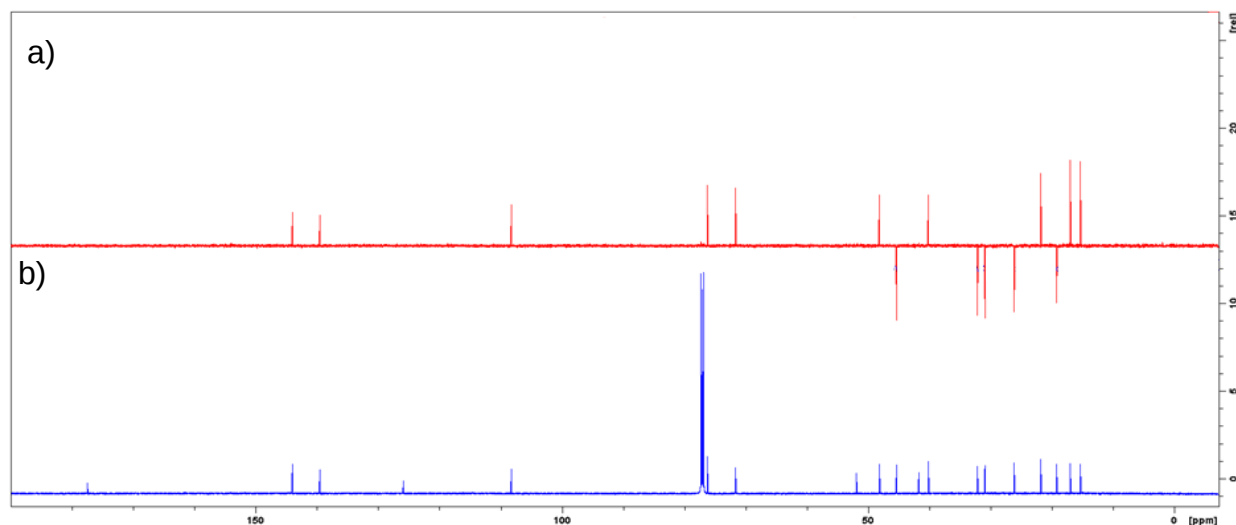
Observação: Programa de 15 a 60 % de B em A em 50 minutos (A: H₂O/0,1% ác. fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex[®] C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 μ m e poro de 100 Å, 220 nm.

Todas as 3 frações foram então encaminhadas para o RMN afim de obter os espectros necessários para a elucidação desses compostos. Em primeiro instante será discutida a caracterização estrutural da substância isolada na fração Fr.3 uma vez que esta apresentou em maior quantidade, e em seguida, da substância presente em Fr.1. Devido à complexidade da fração Fr.2, a análise dos resultados obtidos serão discutidas no final desta secção.

4.2.2.1.1 Caracterização da substância presente na fração Fr. 3

A fração Fr.3, isolada da fração 80% da raiz de *C. floribundus*, foi obtida como um pó amorfo de coloração branca e seu espectro de ^{13}C (FIGURA 37b) apresentou 20 sinais dos quais 5 são carbonos sp^2 (δ 144,00 C-15, δ 139,70 C-16, 125,90 C-13 e δ 108,40 C-14) e 3 possuem deslocamentos químicos característicos de carbonos carbinólicos (δ 71,40 C-12, δ 76,18 C-3, δ 76,22 C-4). Outra informação importante fornecida por esse espectro é a presença de um sinal com deslocamento químico de 177,50 ppm que é típico de uma carbonila de éster. Com ajuda do DEPT 135° (FIGURA 37a) foi possível também determinar que desses sinais, 5 são carbonos metilênicos, 10 são carbonos metínicos ou metílicos e, pela subtração dos dois espectros obtém-se 5 carbonos quaternários.

FIGURA 37. Comparação dos espectros de ^{13}C e DEPT-135° da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de *C. floribundus*

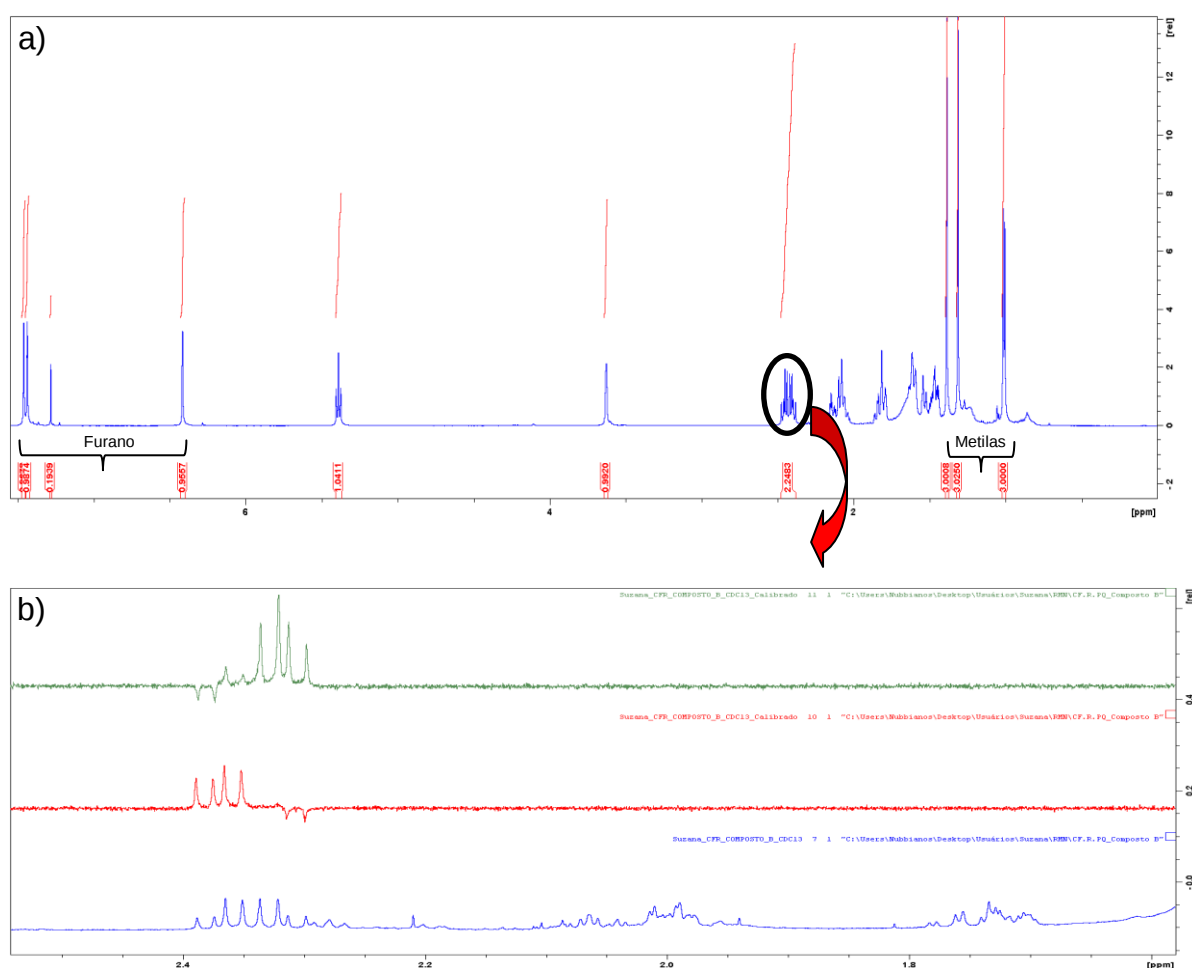


Com a técnica de RMN bidimensional HSQC (APÊNDICE Q) foi possível correlacionar os hidrogênios ligados diretamente a cada carbono e assim permitiu também identificar os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários: 41,7 (C-5), 76,22 (C-4), 51,80 (C-9), 125,9 (C-13) e 177,50 (C-20) ppm.

Já o RMN de ^1H (APÊNDICE R) indica a presença de 3 metilas com deslocamentos químicos de δ 0,93 (d, H-17, xx), δ 1,30 (s, H-18) e δ 1,23 (s, H-19) e, portanto, o número de carbonos metínicos são 7. Nesse espectro destaca-se a presença de um duplo dubleto (H-11, 13,96; 8,47) com δ 2,30 (dd) e 2,23 (dd)

indicando a presença de hidrogênios diasterotópicos (FIGURA 38b). Na zona de alto campo existem 3 sinais dos quais 2 estão mais desblindados (δ 7.35, t, 1.72, H-15; δ 7.38, sl, H-14) e outro um pouco mais blindado (δ 6.33, s, H-14), mas todos com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^2 (FIGURA 38a). Logo, essas últimas informações, apontam para a presença de anel furânico na estrutura terpênica (VIGOR, et al., 2002).

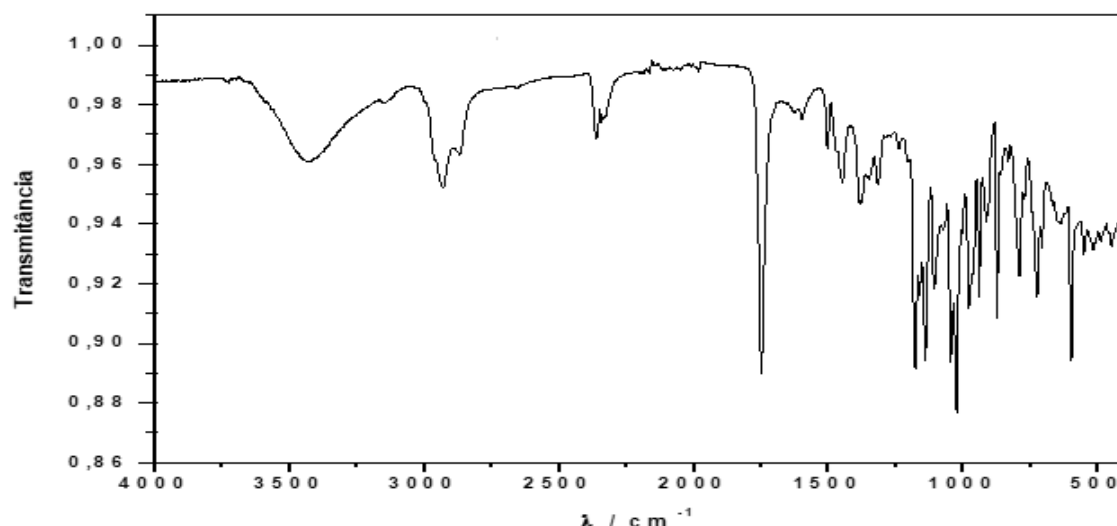
FIGURA 38. a) Espectro de 1H da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de *C. floribundus* e comparação dos espectros de 1H (ampliado) e dos espectros obtidos através da irradiação seletiva dos H-11 (b)



Com a finalidade de atingir resultados mais concretos, relacionou-se esses dados até agora descritos com o espectro obtido por infravermelho (FIGURA 39). Esse espectro apresenta uma banda em 1749 cm^{-1} característica de um grupo γ -lactônico (JAKUPOVIC et al., 1986) e, portanto, está em consonância com os dados observados no espectro de RMN de ^{13}C que indicava a existência de uma carbonila de éster. Outra informação que o IR-ATR forneceu, essencial para a elucidação

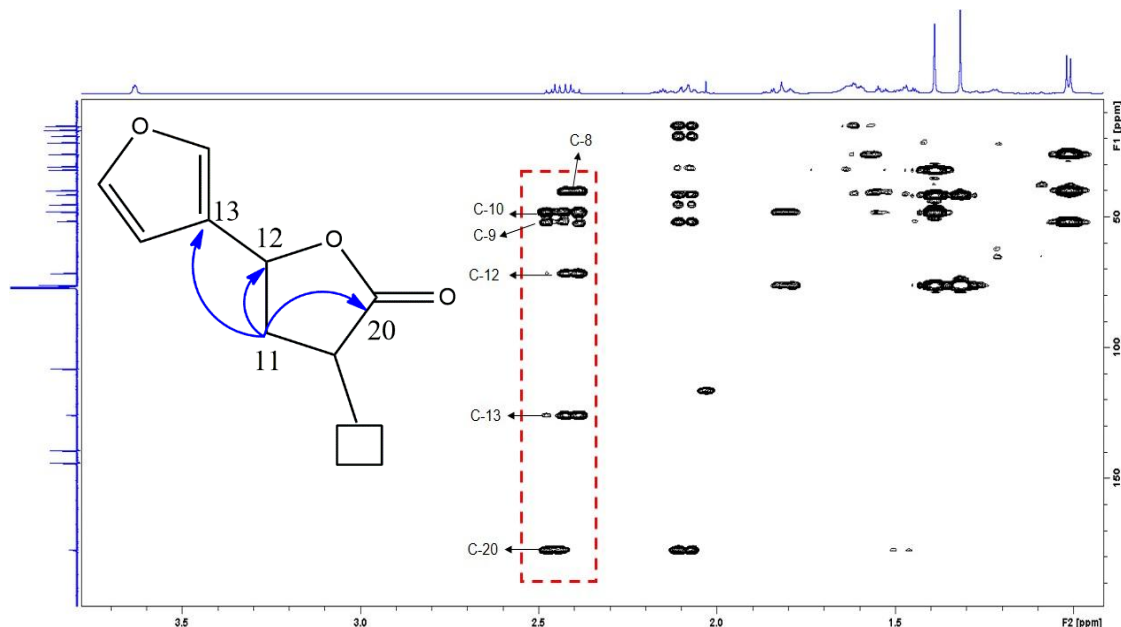
dessa substância, foi à presença de banda em 3390 cm^{-1} típica do estiramento da ligação O-H. Desse modo, dos 3 carbonos carbinólicos observados no RMN ^{13}C , supõem-se que dois deles estão ligados a hidroxilas e o outro faz parte do éster pentacíclico.

FIGURA 39. Espectro de IR-ATR obtido para a substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*



Com a análise das conectividades C-H à longa distância, obtidas do pelo mapa de contorno HMBC (APÊNDICE S), foi possível conectar as duas estruturas até aqui já elucidadas (lactona e anel furânico). Partiu-se então dos hidrogênios diastereotópicos (H-11) e observou-se que eles se correlacionam com o carbono carbonílico (δ 177,5 C-20) e com o carbono carbinólico (δ 71,4 C-12), ambos compatíveis para o esqueleto de um anel lactônico. Notou-se também a correlação com o carbono quartenário sp^2 (δ 125,9 C-13) do anel furânico. Na figura 40 estão representadas essas correlações.

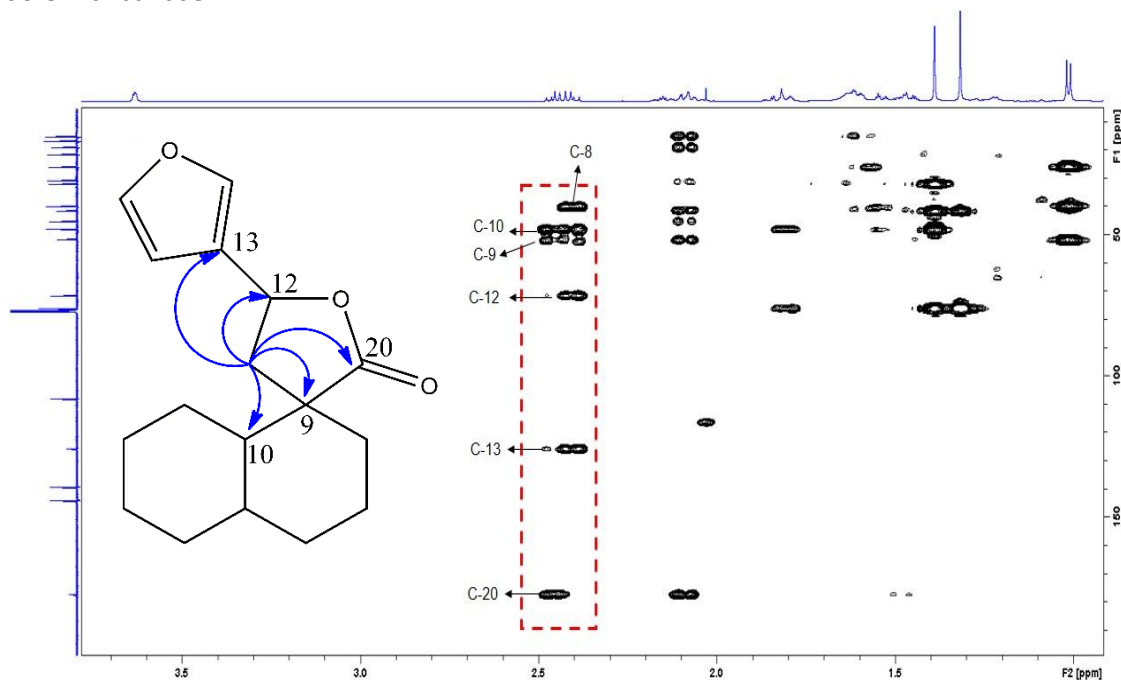
FIGURA 40. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios diasterotópicos H-11 com os carbonos 12, 13 e 20 da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de *C. floribundus*.



Tendo em vista que a substância até aqui elucidada não apresenta nenhuma semelhança estrutural com orbitídeos, buscou-se na literatura esqueletos que possuíssem alguma analogia com a estrutura que está sendo proposta.

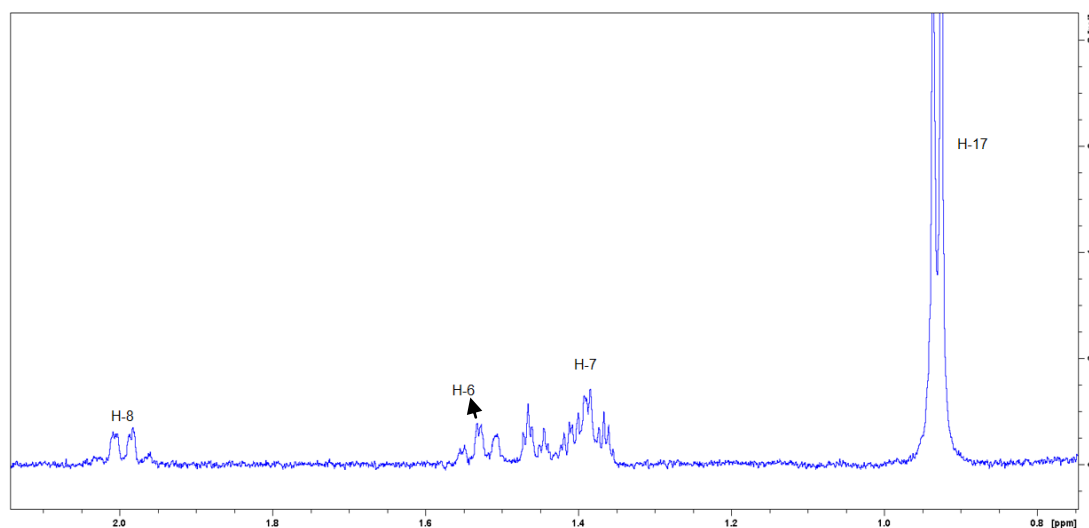
Levando então em consideração que a substância em processo de elucidação apresenta 20 carbonos e sendo esta isolada do gênero *Croton*, em que os terpenos são marcadores quimiotaxonômicos, pressupôs-se tratar-se de um composto do tipo diterpênico. Logo, na estrutura parcial montada até agora com base nos dados analisados falta à presença de mais um núcleo, e no caso, o decalínico mostrou-se compatível com o modelo proposto para a estrutura em discussão, acrescida ainda dos substituintes correspondentes as metilas e as hidroxilas. Esse grupo foi então conectado com a estrutura até então elucidada, através da correlação a longa distância dos hidrogênios H-11 (FIGURA 41).

FIGURA 41. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios diasterotópicos H-11 com os carbonos 9, 10, 12, 13 e 20 da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de *C. floribundus*.



As posições das metilas foram determinadas por HMBC, no qual as correlações a longa distância entre os hidrogênios metílicos H-17 (δ_H , 0,93, 3H, s) e os carbonos C-7, C-8 e C-9, em conjunto com a literatura (VIGOR, et al., 2002), permitiram apontar que esta se encontra na posição 8. Esta afirmação foi corroborada com o TOCSY 1D o qual revelou que H-17 pertence ao mesmo sistema de spin dos hidrogênios H-6, H-7 e H-8 (FIGURA 42).

FIGURA 42. Espectro de TOCSY 1D dos hidrogênios metílicos H-17 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*.



Devido às correlações a longa distância dos hidrogênios metílicos H-19 (δ_H 1,30; 3H; s) com os carbonos C-4, C-5, C-6, C-10 foi possível determinar que a metila em questão se encontra na posição 5. Analogamente, a localização da metila 18 (δ_H 1,23; 3H; s) foi designada através da correlação entre seus hidrogênios com os carbonos C-4 e C-5 (FIGURA 43). Portanto, essas últimas informações apontam que o diterpeno em estudo é do tipo clerodânico subtipo V (RONGTÃO, et al., 2016) (FIGURA 44).

FIGURA 43. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações dos hidrogênios metílicos H-17, H-18 e H-19 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*.

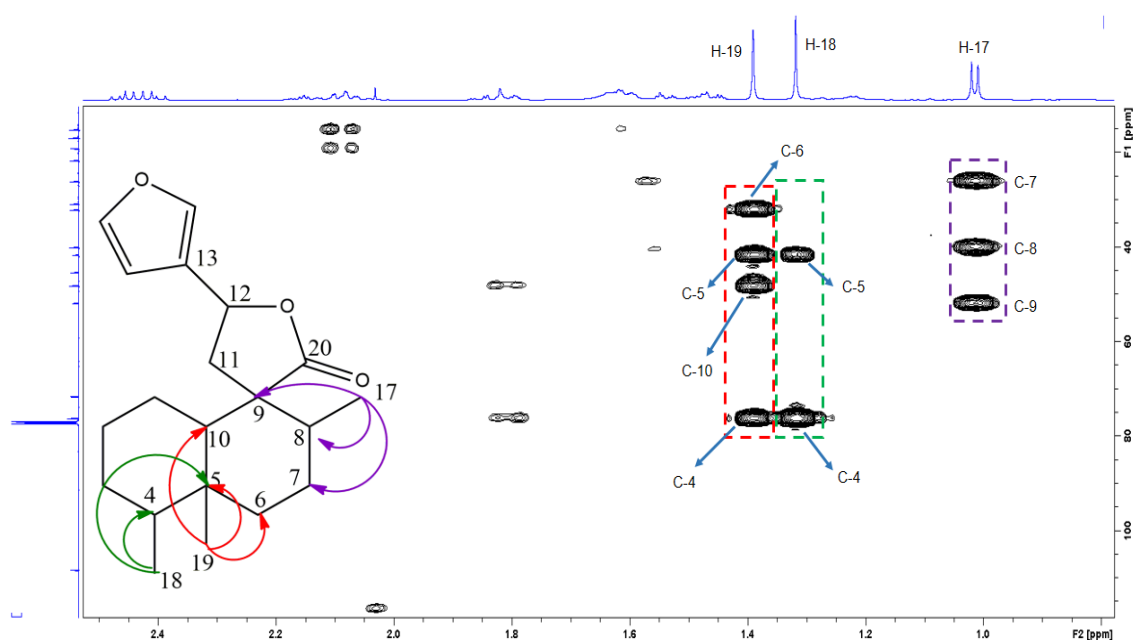
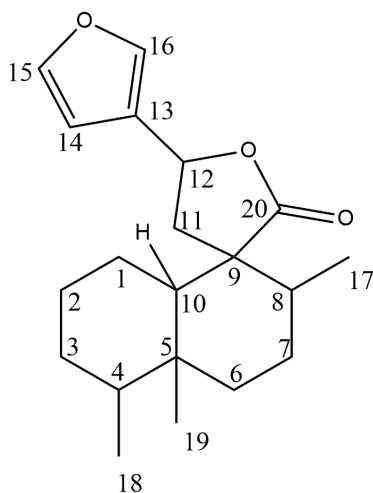
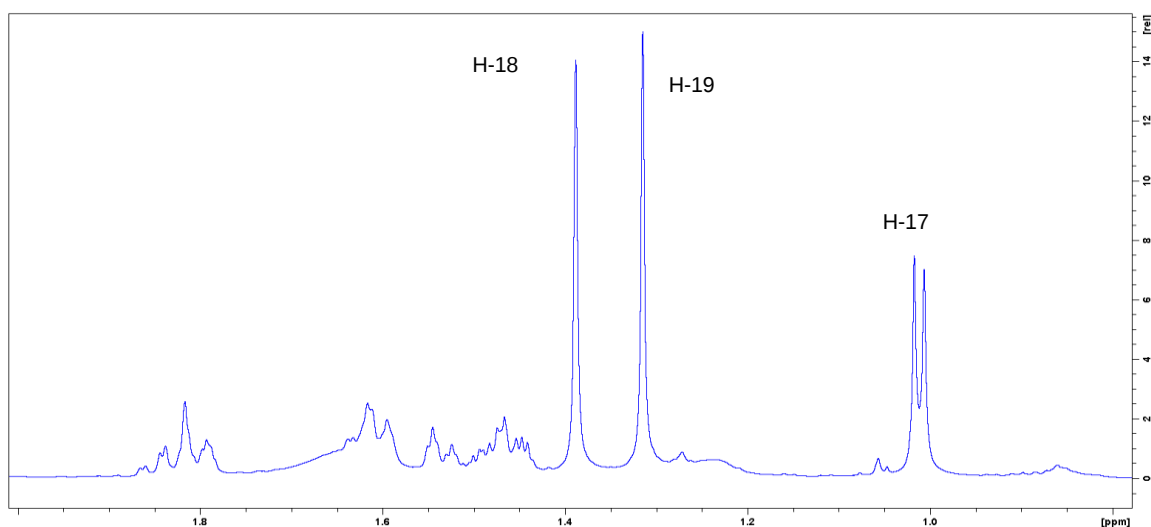


FIGURA 44. Esqueleto básico de um diterpeno clerodânico classificado por Rongtão e colaboradores como do subtipo V.



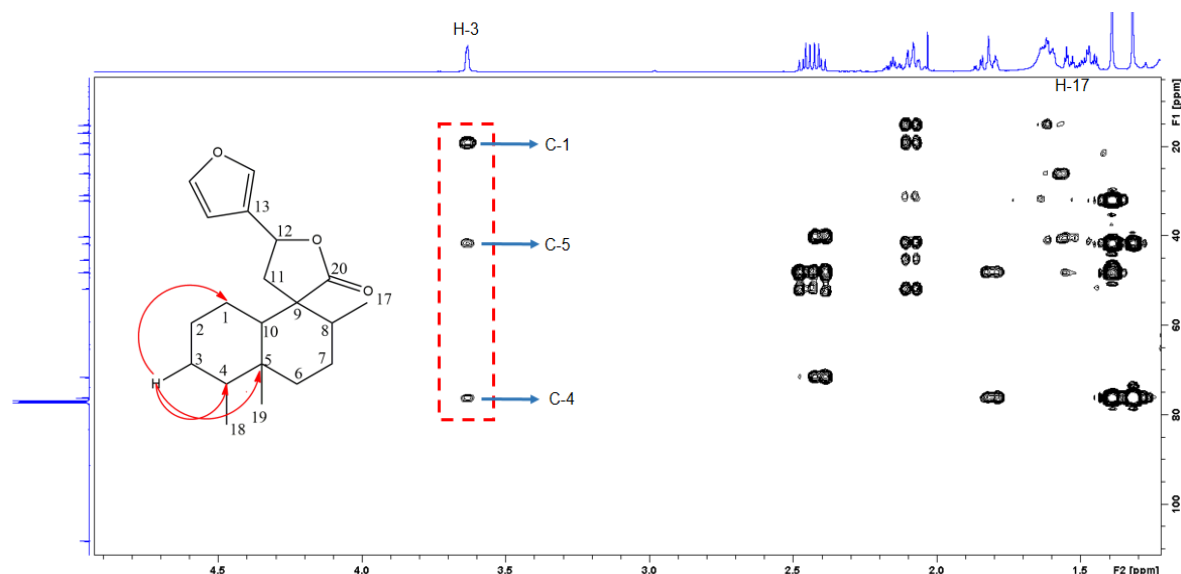
Como demonstrado na figura 45, os grupos metílicos nas posições C-4 e C-8 apresentam multiplicidade de dubletos, porém, no espectro de RMN de ^1H da molécula em estudo observa-se que apenas os hidrogênios de um grupo metílico, com deslocamento químico de 0,93 (H-17) é um duplete (FIGURA 45). Logo, para que os hidrogênios H-19 sejam um simpleto é necessário que uma das hidroxilas esteja ligada ao carbono 4.

FIGURA 45. Ampliação do espectro de ^1H evidenciando a região dos hidrogênios metílicos, obtido para fração Fr.3 isolada da raiz de *C. floribundus*.



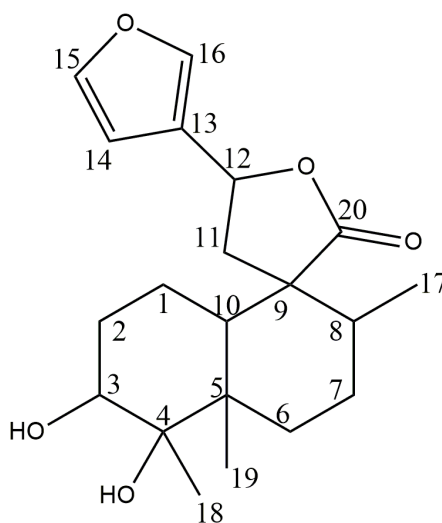
Através do TOCSY 1D foi possível determinar que a segunda hidroxila pertence ao anel A do núcleo decalínico, uma vez que um dos hidrogênios pertencente a esse sistema está ligado a um carbono metínico com deslocamento químico de 76,18 ppm, característico de um carbono carbinólico. Por meio então do acoplamento a longa distância entre o hidrogênio H-3 e os carbonos C-1, C-4, C-5 (FIGURA 46), pode-se concluir que em C-3 está ligada a outra hidroxila.

FIGURA 46. Ampliação do mapa de contorno HMBC evidenciando as correlações do hidrogênio H-3 com os carbonos 1, 4 e 5 da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*.



Logo, na figura 47 encontra a estrutura elucidada da substância em estudo.

FIGURA 46. Estrutura da substância, isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*.



Os deslocamentos químicos dos hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema de spin (H-10, H-1, H-2, H-3 e H-6, H-7, H-8, H-17) foram determinados através do TOCSY 1D (FIGURA 48). A tabela 13 apresenta os dados obtidos pelas técnicas unidimensionais e bidimensionais de RMN para a substância isolada na fração Fr.3.

FIGURA 48. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs 1D obtido da substância isolada na fração Fr.3, da raiz de *C. floribundus*.

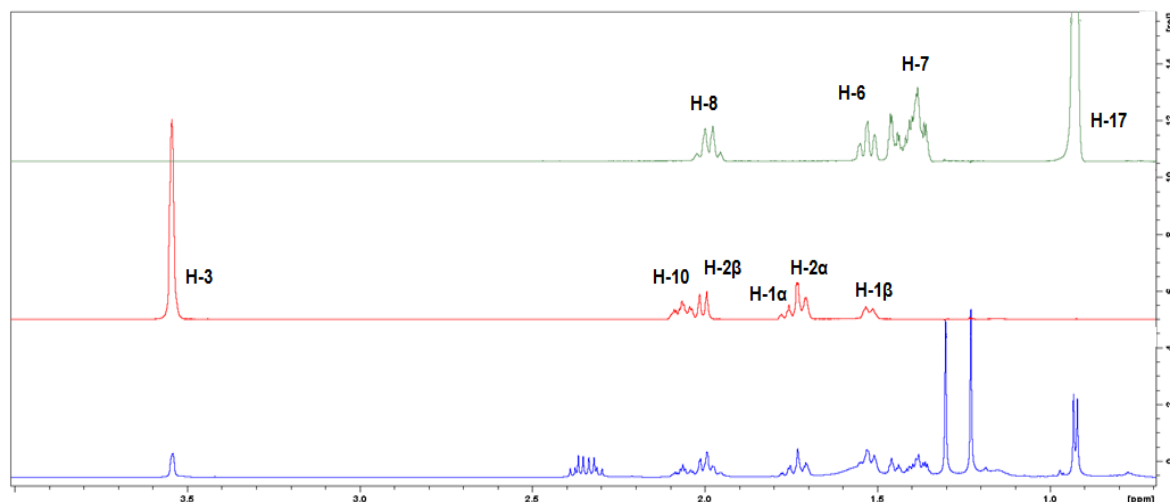


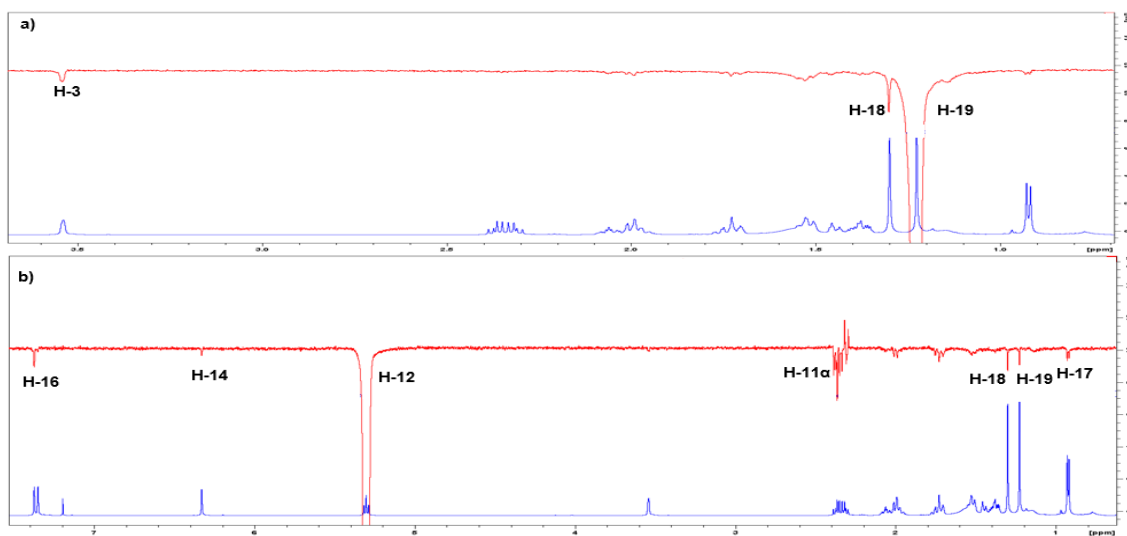
TABELA 13. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da substância isolada em Fr.3, CDCl_3 -d, 600 e 150 MHz, respectivamente.

	δ_{C} , ppm.	δ_{H} , mult., (J em Hz)	HMBC
1 α ; 1 β	19,25	1,75; m; 1,52; m	-
2 α ; 2 β	30,89	1,72; m; 2,00; m	-
3	76,18	3,54; sl	1, 4, 5
4	76,20	-	-
5	41,70	-	-
6	32,16	1,53; m	-
7	26,05	1,41; m	-
8	40,20	1,99; m	-
9	51,80	-	-
10	48,10	2,07; m	1, 19, 11
11a; 11b	45,50	2,30; dd; 2,23; dd (13,96; 8,47)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	71,40	5,30; t (8,70)	11, 13, 14, 16
13	125,90	-	-
14	108,40	6,33; s	13, 15, 16
15	144,00	7,35; t (1,72)	13, 14, 16
16	139,70	7,38; sl	13, 14, 15
17	17,01	0,93; d (7,12)	7, 8, 9
18	15,37	1,30; s	4,5
19	21,80	1,23; s	4, 5, 6, 10
20	177,50	-	-

A configuração relativa foi determinada levando primeiro em consideração o deslocamento do hidrogênio metínico H-3, uma vez que é característico da posição β (SOARES et al.; 2016). Sendo assim, a posição espacial dos outros grupos foram estabelecidos por NOESY 1D tendo como base esse hidrogênio. Logo, as interações presentes no espectro de NOESY 1D entre os hidrogênios H-3 - H-18 - H-19 (FIGURA 49a), evidenciam que as metilas 18 e 19 também se encontram no mesmo lado do plano traçado que o hidrogênio H-3 e, portanto, as hidroxilas estariam em

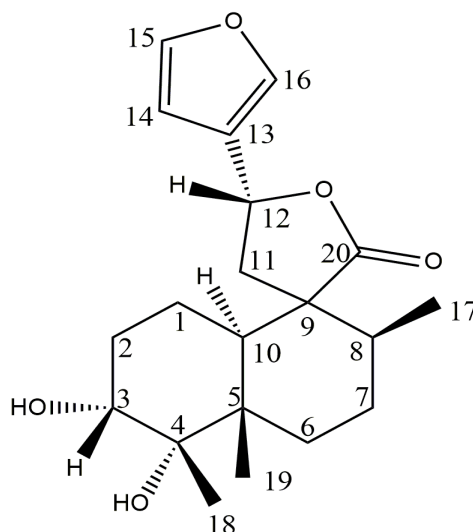
posições opostas. Do mesmo modo, a interação existente entre as metilas 17, 18 e 19 e o hidrogênio metínico H-12 (FIGURA 49b) mostra que o grupo furânico também está do lado oposto as metilas.

FIGURA 49. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-19 (1) e ^1H (azul) e NOESY 1D (vermelho) de H-12 (2) (Ampliação) obtidos da substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus*.



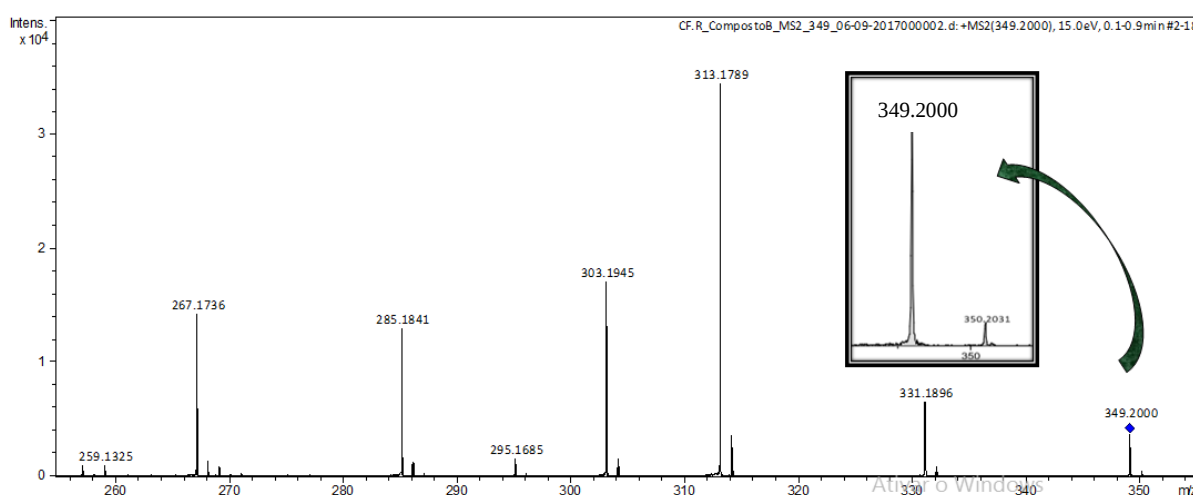
Por fim, a junção *trans* do anel A e B da decalina foi definida considerando o deslocamento químico da metila 19 (MANABE; NISHINO, 1986). Na figura 50 está representado a estrutura da substância, isolada na fração Fr.3, em sua configuração relativa.

FIGURA 50. Configuração relativa da substância presente na fração Fr.3 (isolado da fração 80% da raiz de *C. floribundus*).



Portanto, com todas as técnicas descritas até agora foi possível obter da fração 80% da raiz de *C. floribundus* uma substância pertencente à classe dos diterpenos clerodânicos de fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$ e m/z $[M + H]^+$ 349.2000 (FIGURA 51). No entanto, ainda era necessário reanalisar o LC-MS, uma vez que a interpretação dos dados obtidos por essa técnica não entrava em consonância com os espectros de RMN.

FIGURA 51. Espectro de massa HR-ESI-(+)-QTOF-MS/MS com fragmentação do íon $[M+H]^+$ 349,2000.



Dessa forma, observou-se pelo LC-MS que o íon molecular com tempo de retenção de 37,3 minutos (Fr.3) e razão m/z de 719,32, que antes acreditava-se ser um orbitídeo, corresponde na verdade a um dímero do composto $[2M + Na]^+$, ou seja, a substância isolada na fração Fr.3 apresenta razão m/z 349,15 $[M + H]^+$. Portanto, esta constatação reafirma a estrutura proposta para essa substância pela técnica de RMN.

A busca de informações sobre a presente estrutura na literatura não identificou nenhum diterpeno com essa massa molecular e com essa estrutura, sugerindo que esta substância tenha uma estrutura ainda não descrita na literatura. A substância isolada na fração Fr.3 da raiz de *C. floribundus* foi denominada croflorin A.

Apesar da substância isolada não pertencer à classe dos peptídeos cíclicos de baixo peso molecular, mas sim aos terpenos da classe dos clerodânicos, esse resultado é coerente com os dados da literatura e importante, uma vez que os diterpenos são estruturalmente relacionados ao isolado neste estudo ocorrem com

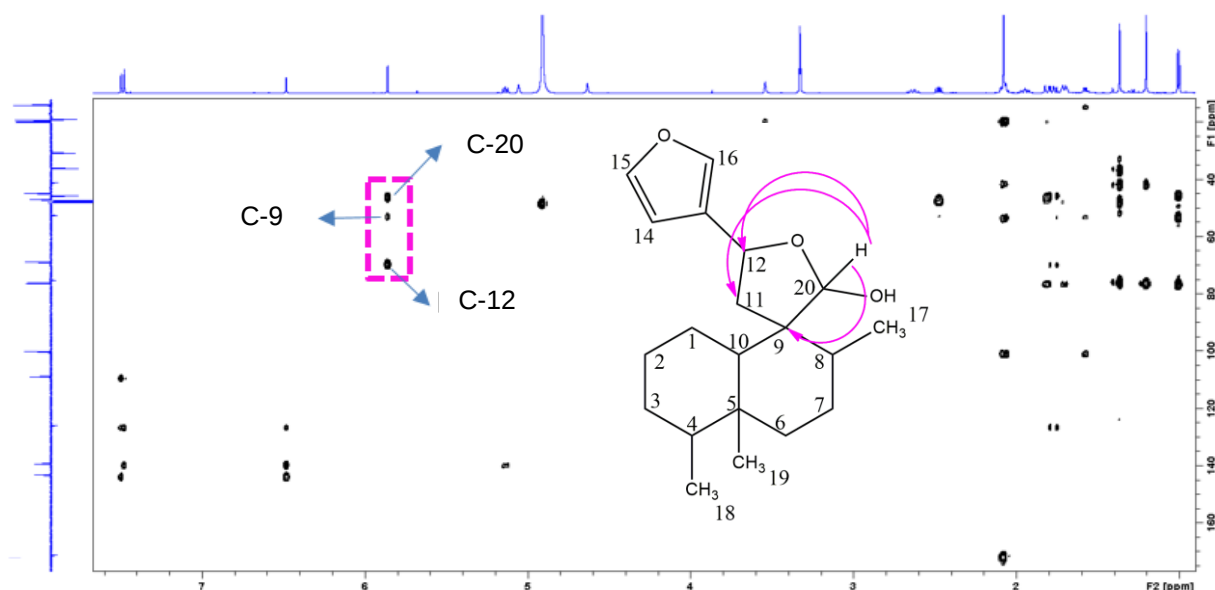
frequência nas espécies desse gênero, constituindo-se os marcadores quimiotaxonômicos do gênero e família.

4.2.2.1.2 Caracterização da substância presente na Fração Fr. 1

A fração Fr. 1, isolada da fração 80% da raiz de *C. floribundus*, também foi obtida como um pó amorfo de coloração branca e seus espectros de RMN apresentaram algumas semelhanças com a substância croflorin A, como a presença de 20 sinais no espectro de DEPTq, a existência de 3 metilas (C-17: δ_H 1,00, d, δ_C 14,1; C-18: δ_H 1,37, s, δ_C 19,3; C-19: δ_H 1,21, s, δ_C 20,0) e sinais característicos da decalina e do anel furânico (C-13: δ_C 126,1; C-14: δ_H 6,48, t, δ_C 108,8; C-15: δ_H 7,48, s, δ_C 143,0; C-16: δ_H 7,49, s, δ_C 139,2). Esses grupos de sinais já evidenciam que a substância aqui isolada também pertence à classe dos diterpenos, e não dos orbitídeos, como era esperado.

Porém, alguns grupos de sinais evidenciam as diferenças entre essa substância e aquela elucidada anteriormente, como aqueles característicos de um grupo acetato (δ_H 2,00 s, δ_C 20,1; δ_C 171,3) e de um hemiacetal (C-12: δ_H 5,14, t, δ_C 68,9; C-20: δ_H 5,86, s, δ_C 100,2) (APÊNDICE T-V) (VIGOR, et al., 2012). A posição deste último grupo foi determinada através das correlações a longa distância observada no HMBC entre o H-20 e os carbonos das posições 9, 11 e 12 (FIGURA 52). Portanto, diferentemente da substância croflorin A que apresenta uma lactona, a substância em questão apresenta um anel de 5 membros que contempla um grupo hemiacetal.

FIGURA 52. Estrutura da substância isolada na fração Fr.1, da raiz de *C. floribundus*, destacando as correlações observadas por HMBC entre o H-20 e C-9,11 e 12.



Por meio do espectro de DEPTq foi possível observar a presença de mais um carbono carbinólico e através do espectro HSQC determinou-se que o hidrogênio a ele ligado possuía δ 5,05 ppm. A posição desse átomo foi então definida por meio do espectro de TOCSY 1D que aponta que ele se encontra no mesmo sistema de spin dos hidrogênios da metila (H-17). Somado a isso, o acoplamento entre o H-7 e a carbonila presente no mapa de contorno HMBC indica a localização do grupo acetato em C-7 (FIGURAS 53, 54 e 55).

FIGURA 53. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e de TOCSY 1D dos hidrogênios metílicos H-17 (vermelho) da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de *C. floribundus*.

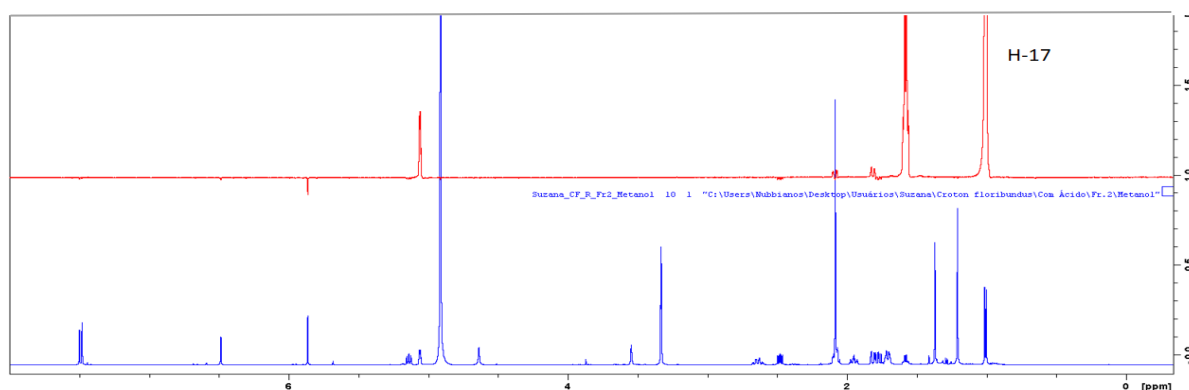


FIGURA 54. Mapa de contorno HMBC da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de *C. floribundus*. Em destaque esta a correlação observada entre H-7 e o carbono metílico do grupo acetato (COOCH_3).

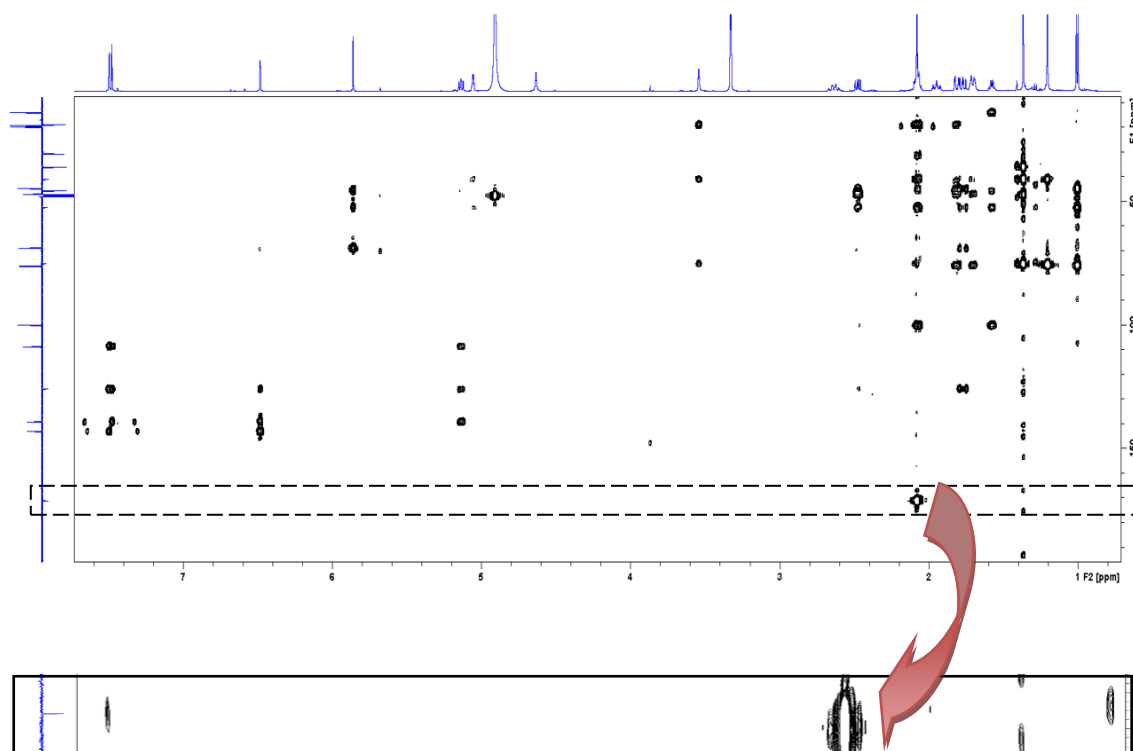
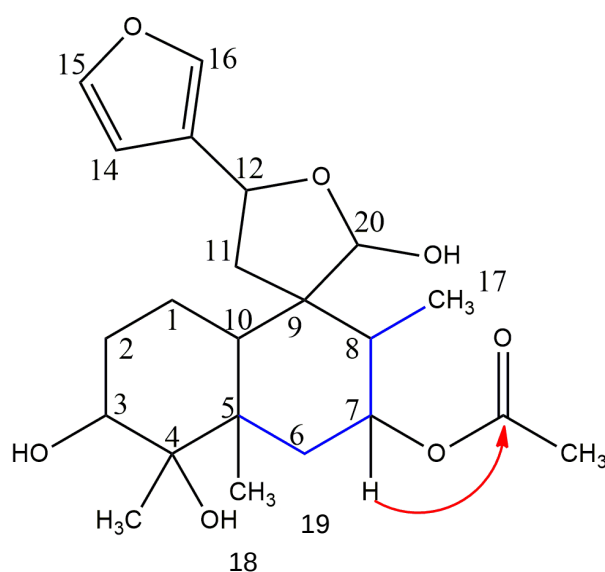


FIGURA 55. Em azul destaca-se o sistema de spin H-17 e em vermelho mostra a correlação observada por HMBC entre H-7 e o carbono da carbonila da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de *C. floribundus*.



A comparação dos dados de deslocamento químico de ^{13}C e ^1H com os da literatura permitiram apontar a grande semelhança dessa substância com a cascarillina F (VIGOR, et al. 2002). A Tabela 14 apresenta uma comparação entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância isolada nessa fração com os da literatura (cascarillina F).

A cascarillina foi o primeiro composto isolado dessa série da raiz de *Croton eluteria*, uma planta nativa do Equador (DUVAL, 1845) e desde então, essa espécie veio se mostrando como uma fonte rica de diterpenos clerodânicos que contém em sua estrutura o grupo furano. Outra característica dessas substâncias é a presença de um grupo acetato na posição 7. Até o momento foram isolados 11 derivados da cascarillina: cascarillina A (HALSALL, 1965), cascarilona (HAGEDORN; BROWN, 1991), cascarillina B, C e D (VIGOR, et al. 2001) e cascarillina E, F, G, H e I (VIGOR, et al. 2002).

TABELA 14. Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância isolada na fração Fr.1 da raiz de *C. floribundus* (600 e 150 MHz, respectivamente) e da Cascarillina F (400 e 100 MHz, respectivamente) $\text{CD}_3\text{OD}-d$.

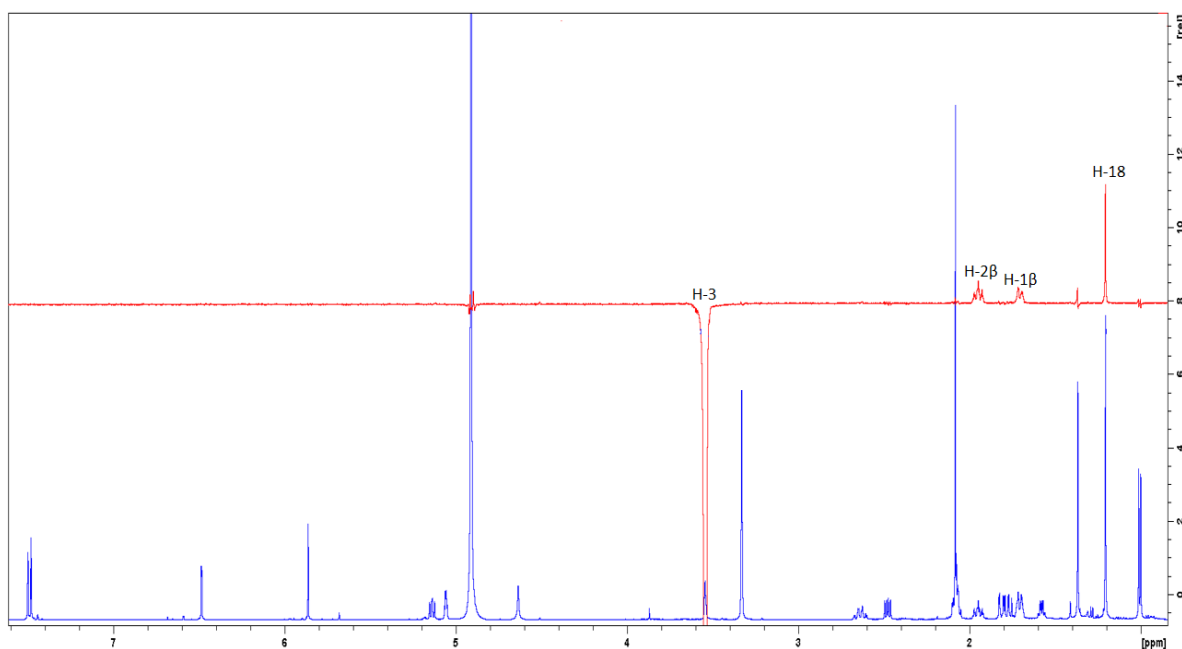
Substância isolada na fração Fr.1			Cascarillina F	
	δ_{H} (ppm), mult., (J em Hz)	δ_{C} , (ppm)	δ_{H} (ppm), mult., (J em Hz)	δ_{C} , (ppm)
1 α ;	1,73; m	19,0	2,47; ddl (12,2, 2,7)	19,5
1 β	2,63; m		1,73; m	
2 α	1,70; dd	30,8	1,65; ddl (13,7, 2,7)	30,8
2 β	1,96; m		1,92; m	
3	3,54; t (2,66)	77,3	3,50; t (2,7)	77,9
4	-	75,2	-	75,4
5	-	41,25	-	41,4
6 α	1,82; dd, (14,76, 2,56)	36,2	1,80; dd (14,8; 2,5)	36,6
6 β	2,10; dd (14,76; 2,56)		2,10; dd (14,8; 2,5)	
7	5,05; m	76,1	5,04; m	76,3
8	1,58; t (2,92)	45,0	1,58; qd (7,3; 2,8)	45,3
9	-	52,6	-	54,0
10	2,08; m	47,2	1,96; dd (12,2; 1,6)	45,3
11a	2,48; dd (13,0; 7,5)	45,8	2,62; dd (13,2; 7,1)	44,5
11b	1,77 m		1,92; m	
12	5,14; m	68,9	5,02; m	71,6
13	-	126,1	-	130,6
14	6,48; dd (1,75; 0,73)	108,8	6,63; dd (1,7; 0,7)	109,9
15	7,48; d (1,74)	143,0	7,39; t (1,7)	143,0
16	7,49; sl (0,72)	139,2	7,44; t (0,7)	139,7
17	1,00; d, (7,23)	14,1	1,11; d (7,3)	14,6
18	1,37; s	19,3	1,36; s	19,4
19	1,21; s	20,0	1,19; s	20,0
20	5,86; s	100,2	5, 29; s	100,7
OCOCH ₃	2,00; s	20,1	2,04; s	20,3
O $\underline{\text{C}}$ OCH ₃	-	171,3	-	171,3

Apesar da substância em estudo apresentar a mesma estrutura que a cascarillina F, elas se diferem na estereoquímica. Portanto, a seguir serão discutidas as semelhanças e diferenças espaciais entre essas substâncias.

Os centros estereogênicos do anel A da decalina apresentam a mesma configuração em ambas as substâncias, uma vez que H-3 expressa uma constante de 2,7 Hz, característica da posição equatorial. O que corrobora esse resultado é o espectro de NOESY 1D desse hidrogênio (FIGURA 56), uma vez que esse

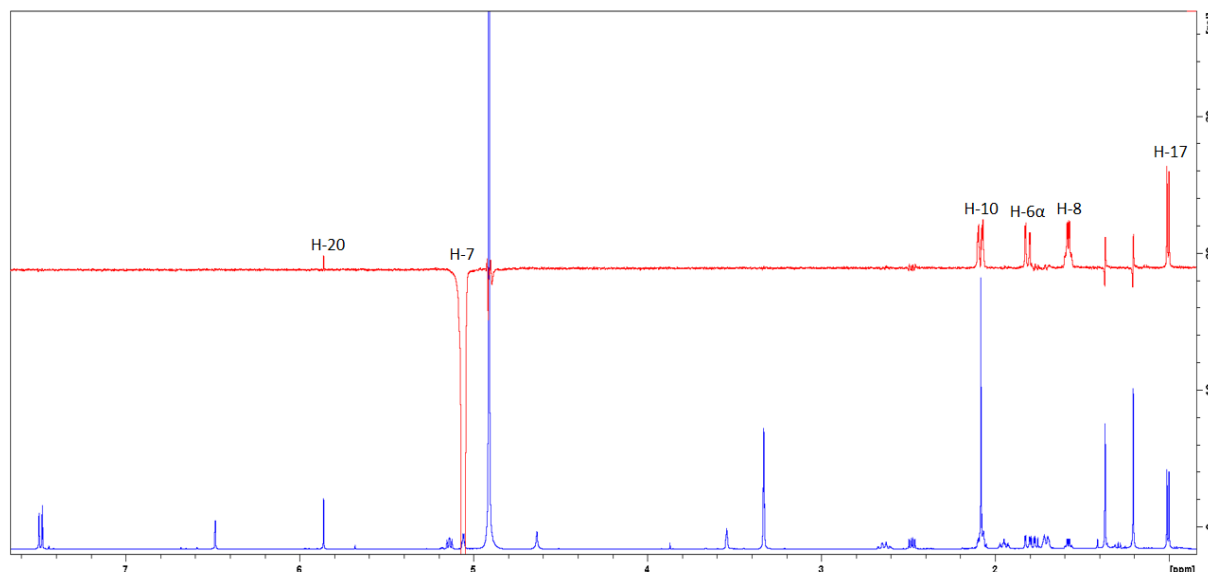
apresenta interação com H-18, H-1 β e H-2 β . Logo, para que H-3 possa ter apenas interação com H-18, a metila 19 que se encontra na junção dos anéis, precisa estar para trás do plano, ou seja, em α .

FIGURA 56. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D de H-3 (vermelho) obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-3 e H-1 β , H-2 β e H-18.



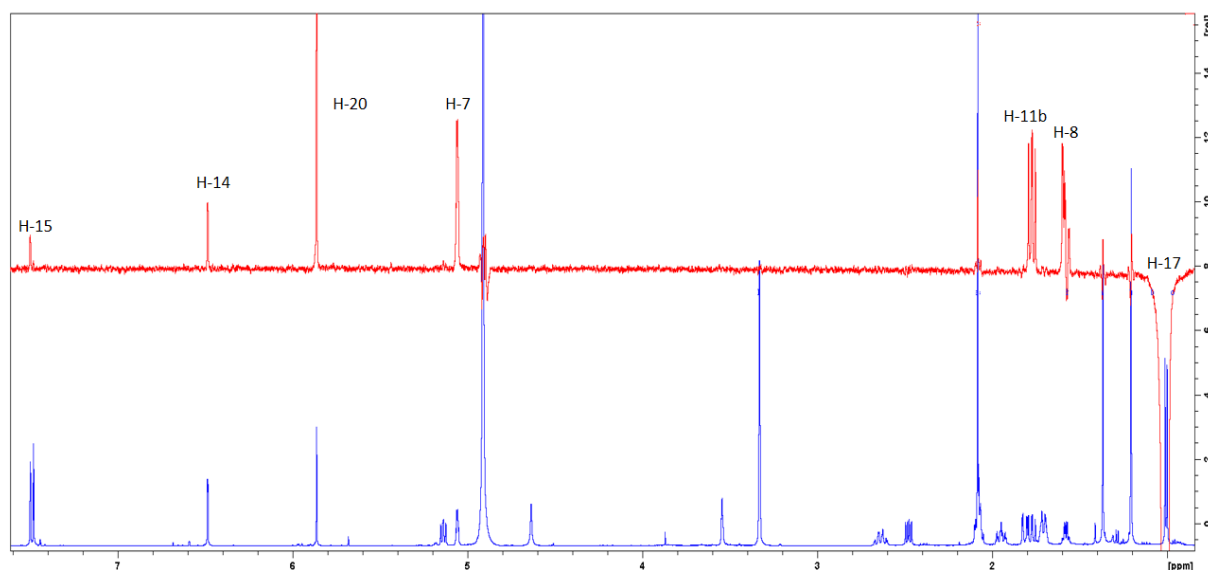
Já a posição espacial dos grupos do anel B da decalina foram determinados levando primeiro em consideração a constante de acoplamento entre H-8 e H-7 uma vez que é do tipo: $J_{8\alpha x - 7\beta eq} = 2,8 \text{ Hz}$. A β -configuração de H-7 foi corroborada com a interação presente entre esse hidrogênio e H-6 α – H-10 – H-17 – H-20 no espectro de NOESY 1D (FIGURA 57).

FIGURA 57. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D de H-7 (vermelho) obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-7 e H-6 α , H-8, H-10, H-17 e H-20.



Já a posição beta da metila 17 foi definida tendo como base a interação presente entre H-7, H-11b e H-17 (FIGURA 58) e corroborada com a ausência de interação entre H-17 e H-18. Portanto, diferentemente da cascarillina F que apresenta a metila 17 na posição axial, a substância em processo de elucidação sinaliza que esse grupo se encontra em equatorial e para frente do plano.

FIGURA 58. Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D de H-17 (vermelho) obtidos para a fração Fr.2 evidenciando as interações entre H-17 e H-7, H-8, H-11b, H-14, H-15 e H-20.

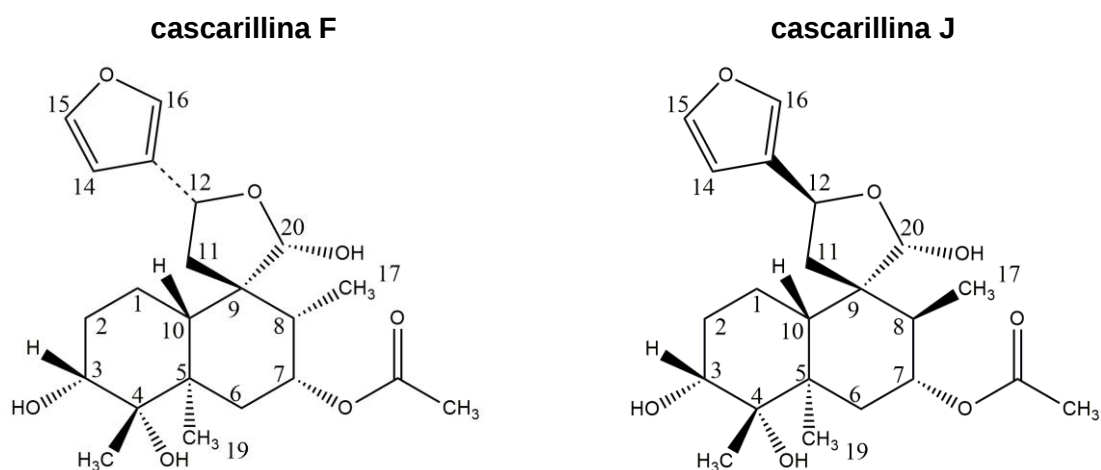


No espectro de NOESY 1D proveniente da irradiação seletiva nos hidrogênios metílicos H-17 (FIGURA 59) mostra interação entre esses hidrogênios e H-20, H-14, H-15 sinalizando que esses se encontram na posição β (para frente do plano). Logo,

para que H-17 possua interação com os hidrogênios do grupo furano é necessário que esse grupo se encontra para frente do plano, o que corrobora a ausência de interação entre H-17 e H-12. Por fim, a junção *trans* do anel A e B da decalina foi definida considerando o deslocamento químico da metila 19 (MANABE; NISHINO, 1986).

Portanto, a substância isolada na fração Fr.1 da raiz de *C. floribundus* possui fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_7$ e m/z $[M + Na]^+$ 431,16. Uma busca na literatura apontou que nenhuma das substâncias já reportadas apresenta essa estrutura com a estereoquímica aqui proposta. Porém, a substância isolada neste trabalho é um derivado da cascarillina e foi denominada como cascarillina J. Na figura 58 estão as cascarillinas J e F nas suas configurações relativas.

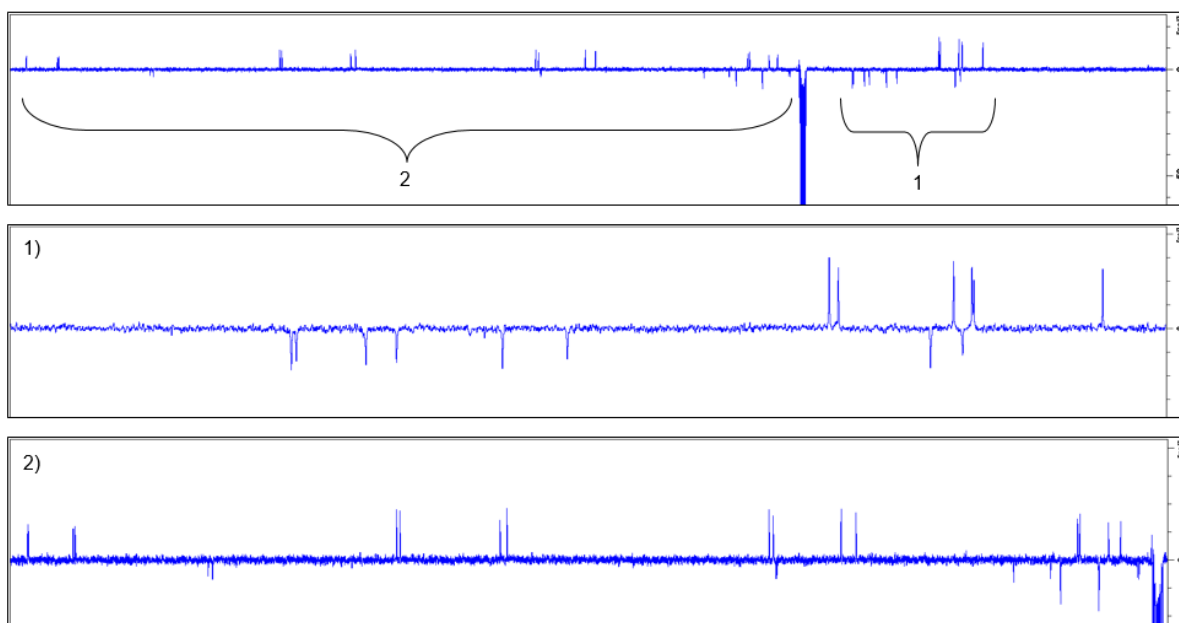
FIGURA 59. Configurações relativas da cascarillina F e da cascarillina J, isolada da raiz de *C. floribundus*.



4.2.2.1.3 Caracterização das substâncias presentes na fração Fr. 2

A fração Fr. 2 foi obtida como um pó branco e seu espectro de RMN de DEPTq (FIGURA 60) apresenta 40 carbonos, os quais 18 são metilênicos ou quaternários, 16 são metínicos e 6 metilínicos. Observa-se também que esses sinais estão divididos em 20 pares, nos quais a maioria apresenta deslocamento químico próximos, variando de 0,1 a 0,7 ppm.

FIGURA 60. Espectro de DEPTq da fração Fr.2, isolada da raiz de *C. floribundus*.



Para a análise de RMN a fração Fr.2 precisou ser solubilizada em DMSO, uma vez que em nenhum dos dois solventes usados anteriormente foi solúvel. Na tabela 15 encontram-se os valores de deslocamentos químicos obtidos em pares, bem como sua classificação e a diferença em ppm entre os valores de deslocamentos químicos dos carbonos que constituem o par.

Apesar das análises terem sido em solventes distintos, uma comparação superficial já é o suficiente para notar algumas semelhanças entre a substância da fração em estudo e a cascarillina J (Fr.1), como a presença dos sinais característicos da decalina, do anel furânico e do grupo hemiacetálico (APÊNDICE W). Para cada grupo desses, observam-se dois grupamentos de sinais característicos. Portanto, a fração em estudo trata-se de duas substâncias que estão em mistura e a ausência dos sinais referentes ao grupo acetato mostra a diferença estrutural entre essas substâncias e a cascarillina J.

TABELA 15. Dados do espectro de RMN ^{13}C da fração Fr₂, DMSO- *d*6, 150MHz.

δ_{C} , ppm	Designação	Diferença em ppm
15,88; 19,10	CH ₃	3,22
18,68; 18,70	CH ₃	0,02
21,60; 21,79	CH ₃	0,19
18,90; 19,60	C ou CH ₂	0,70
27,40; 27,28	C ou CH ₂	1, 40
31,08; 31,74	C ou CH ₂	0,66
33,24; 33,35	C ou CH ₂	0,11
41,68; 41,83	C ou CH ₂	0,15
43,36; 44,49	CH	1,13
45,87; 48,89	C ou CH ₂	3,02
47,11; 47,31	CH	0,20
49,82; 53,18	C ou CH ₂	3,36
67,70; 69,07	CH	1,37
74,93; 75,03	C ou CH ₂	0,10
75,33; 75,70	CH	0,37
99,80; 100,43	CH	0,63
109,65; 109,95	CH	0,30
126,86; 127,29	C ou CH ₂	0,43
139,50; 139,68	CH	0,18
143,80; 143,89	CH	0,09

Em verde e em vermelho destacam-se, respectivamente, os carbonos característicos do grupo hemiacetálico e furânico. Em azul evidencia os carbonos carbinólicos.

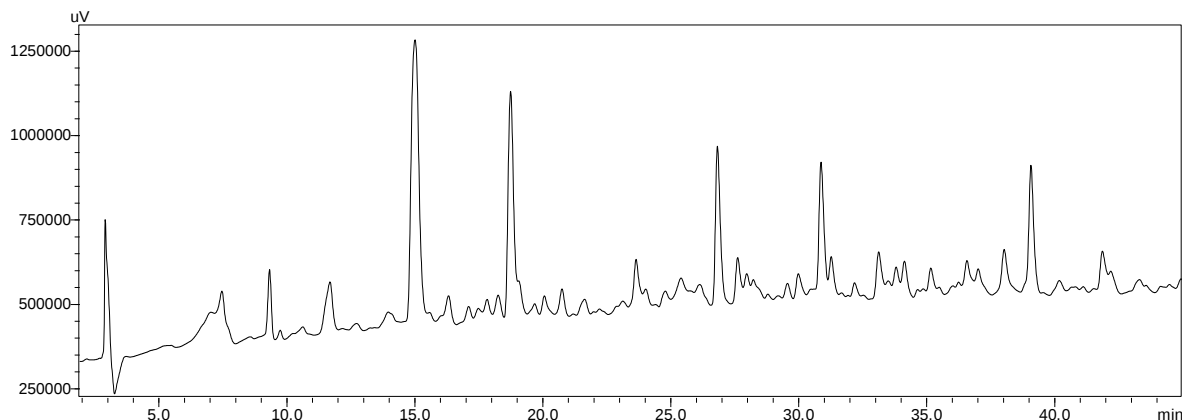
Como no processo de extração foi utilizado ácido (fracionamento e purificação) e tendo os presentes compostos um grupo hemiacetálico surgiu a dúvida se ambos eram de origem natural ou um deles artefato do processo, uma vez que este grupo em meio ácido pode ser hidrolisado e por se tratar de um equilíbrio, quando ciclizado novamente poderia ter invertido a conformação espacial de sua hidroxila, originando uma substância distinta. Para sanar esse problema, realizou-se o mesmo procedimento empregado no isolamento da fração Fr.3 descrito anteriormente, porém, na ausência de ácido. Contudo, o mesmo resultado foi obtido, ou seja, os sinais também se mostraram duplicados.

4.2.2.2 Segunda purificação

Uma vez que não foi possível identificar e nem isolar peptídeos na espécie *C. floribundus* e uma vez que a raiz demonstrou promissora para a obtenção de novos diterpenos, deu-se continuidade aos estudos com esse órgão vegetal. Desse modo, a fração 80% da raiz também foi analisada por HPLC-DAD em modo analítico com um gradiente de 25-85% de B em A, em 45 min para investigar a presença de substâncias que eluissem numa porcentagem de solvente B superior aquela

característica de peptídeo cíclico (50-70% de B). A figura 61 apresenta o cromatograma obtido.

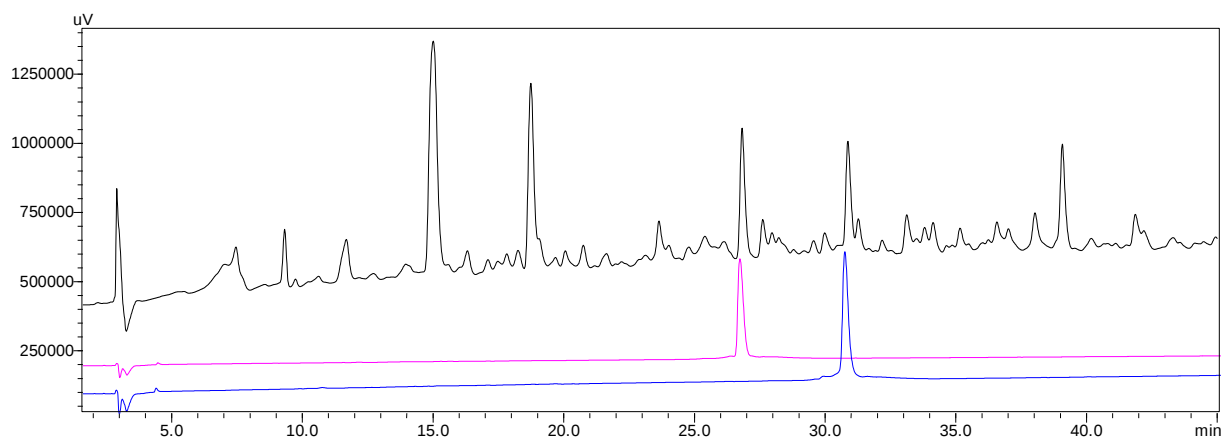
FIGURA 61. Perfil cromatográfico da fração 80% da raiz de *C. floribundus*.



Observação: Programa de 25 a 85 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. Fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

Como demonstrado na figura 63, à fração 80% da raiz de *C. floribundus* ainda é um potencial para a obtenção de novas substâncias. Sendo assim, essa fração foi encaminhada para o HPLC em modo preparativo onde foi possível obter mais duas frações eluídas nas faixas de tempos 26,5 e 31,3 minutos: Fr.4 (3,0 mg) e Fr.5 (3,7 mg). Antes de ser liofilizada, uma alíquota 50 µL de cada fração também foi injetada no HPLC analítico para, analisar o grau de pureza das frações coletadas (FIGURA 62).

FIGURA 62. Comparação dos perfis cromatográficos da fração 80% (preto) com aquelas obtidas por PLC preparativo: Fr.4 (rosa); Fr.5 (azul).



Observação: Programa de 25 a 85 % de B em A em 45 minutos (A: H₂O/0,1% ác. Fórmico e B: ACN/0,1% ác. fórmico), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex® C₁₈-Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å, 220 nm.

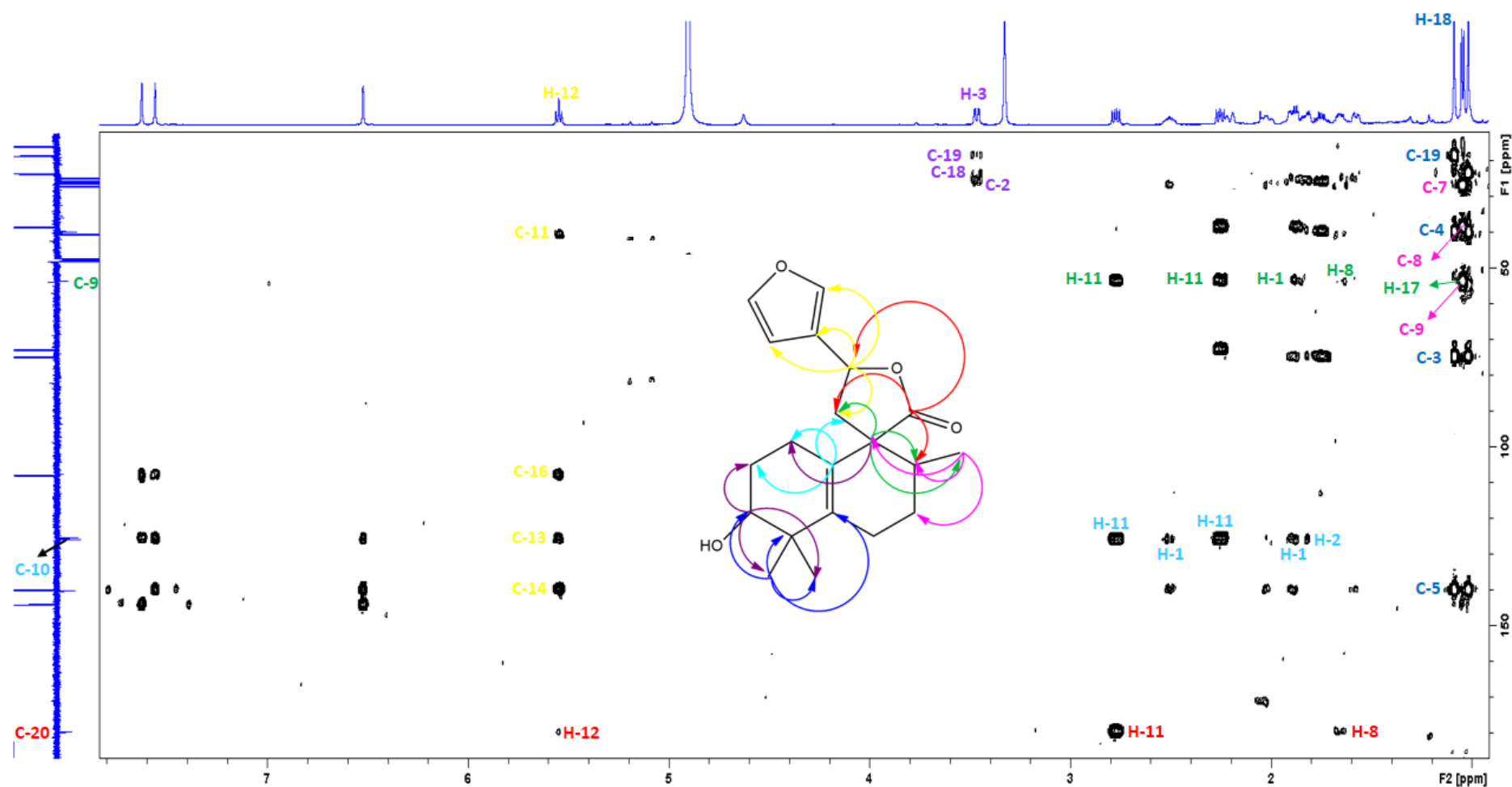
4.2.2.2.1 Caracterização da substância obtida em Fr.4

A fração Fr. 4, isolada da fração 80% da raiz de *C. floribundus*, também foi obtida como um pó amorfo de coloração branca. Seus espectros de RMN apresentam algumas semelhanças com a substância croflorin A, como a presença de 20 sinais no espectro de DEPTq, (APÊNDICE X) e a existência de sinais característicos da decalina e do anel furânico (C-13: δ_C 125,33; C-14: δ_H 6,56, t, δ_C 107,96; C-15: δ_H 7,62, s, δ_C 144,00; C-16: δ_H , 7,56, s, δ_C 139,90) (APÊNDICES Y e Z).

Apesar de essa substância apresentar 3 metilas (C-17: δ_H 1,05, d, δ_C 15,87; C-18: δ_H , 1,09, s, δ_C 23,57; C-18: δ_H 1,02, s, δ_C 18,65), os deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos H-18 e H-19 diferem significativamente daqueles encontrados nas substâncias croflorin A e cascarillina J. Além disso, o espectro de DEPTq apresenta apenas um carbono com deslocamento químico de carbono carbinólico. Por fim, a presença de carbonos quaternários com deslocamentos químicos característicos de dupla ligação (C-5: δ_C 125,33; C-10: δ_C 140,05), sinalizam as diferenças entre a substância em processo de elucidação e as elucidadas anteriormente neste estudo para esta espécie. A posição dessa insaturação foi determinada através das correlações a longa distância observadas no HMBC entre o H-18 e o carbono da posição 5 e entre o C-10 e os hidrogênios H-1, H-2 e H-11.

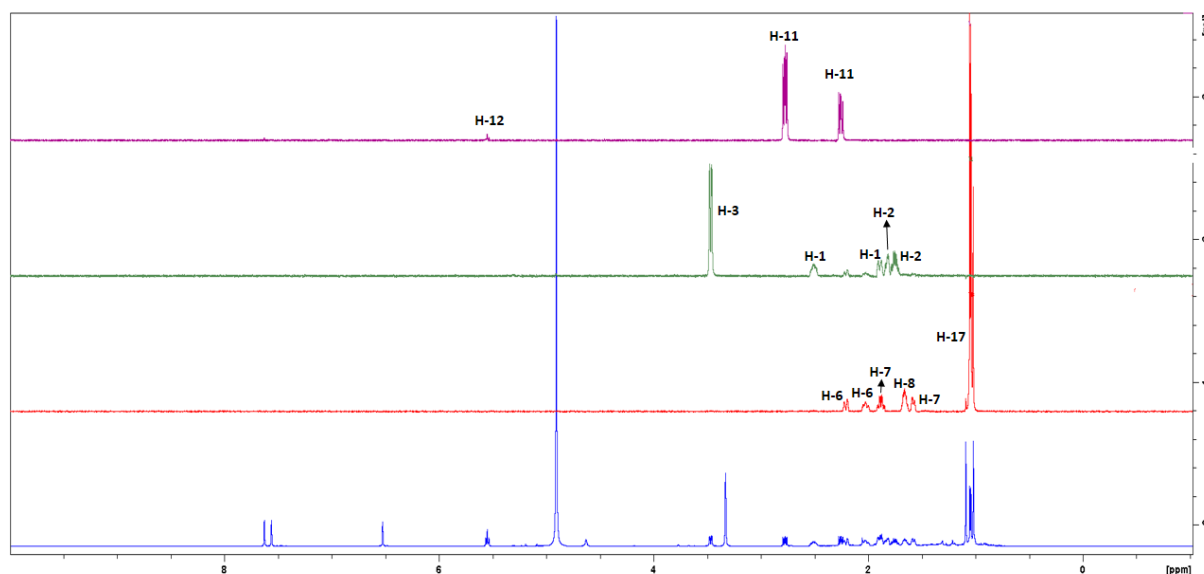
Tais correlações, bem como outras constatadas (FIGURA 63), indicam que a substância isolada na fração Fr.4 é um diterpeno pertencente à classe dos halimanos, denominado 3-hidroxi-5,10-didehidrociliolida. Esse diterpeno foi obtido como intermediário na síntese de 3 α -hidroxi-5 β , 10 β -epoxiciliolida (Bohlmann, 1988) e foi relatado como um produto natural em 2003 quando foi isolado de partes aéreas de *Nardophyllum bryoides* (SÁNCHEZ et al. 2010).

FIGURA 63. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância da substância isolada na fração Fr.4 da raiz de *C. floribundus*.



Através dos espectros de TOCSY 1D foi possível sinalizar os hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema de spin (FIGURA 64).

FIGURA 64. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs obtidos da fração Fr.4, isolada da raiz de *C. floribundus*.



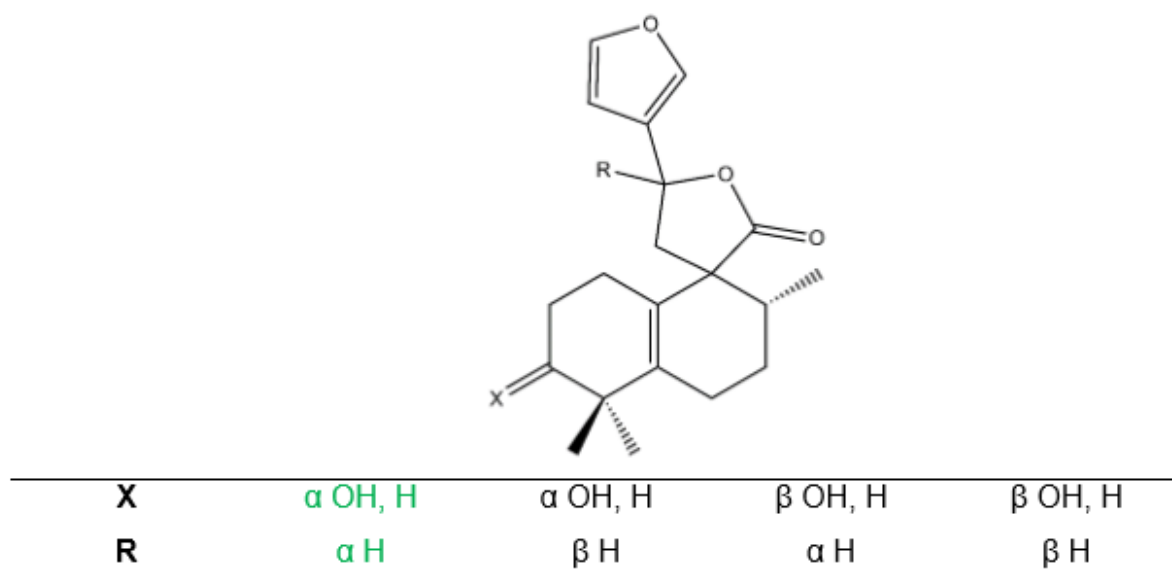
A tabela 16 apresenta os dados obtidos pelas técnicas unidimensionais e bidimensionais de RMN para a substância isolada na fração Fr.4.

TABELA 16. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da substância isolada na fração Fr.4 da raiz de *C. floribundus*, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 600 e 150 MHz, respectivamente.

	δ_{C} , ppm.	δ_{H} , mult., (J em Hz)	HMBC
1 α ; 1 β	25,76	2,50; m; 1,89; m	-
2 α ; 2 β	26,35	1,82; m; 1,75; m	-
3	74,85	3,46; dd (11,76; 3,38)	2, 4, 18
4	39,82	-	-
5	140,05	-	-
6	24,75	2,20; m; 2,00; m	-
7	26,96	1,58; m;	-
8	38,43	1,66; m	-
9	53,79	-	-
10	125,88	2,11; m	1, 9
11a; 11b	44,45	2,76; dd; 2,26; dd (13,96; 8,47)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	72,80	5,55; t (8,65)	11, 13, 14, 16
13	125,33	-	-
14	107,96	6,52; s	13, 15, 16
15	144,00	7,62; t (1,46)	13, 14, 16
16	139,90	7,56; sl	13, 14, 15
17	15,87	1,05; d (6,78)	7, 8, 9
18	23,57	1,09; s	4,5
19	18,65	1,02; s	4, 5, 6, 10
20	179,70	-	-

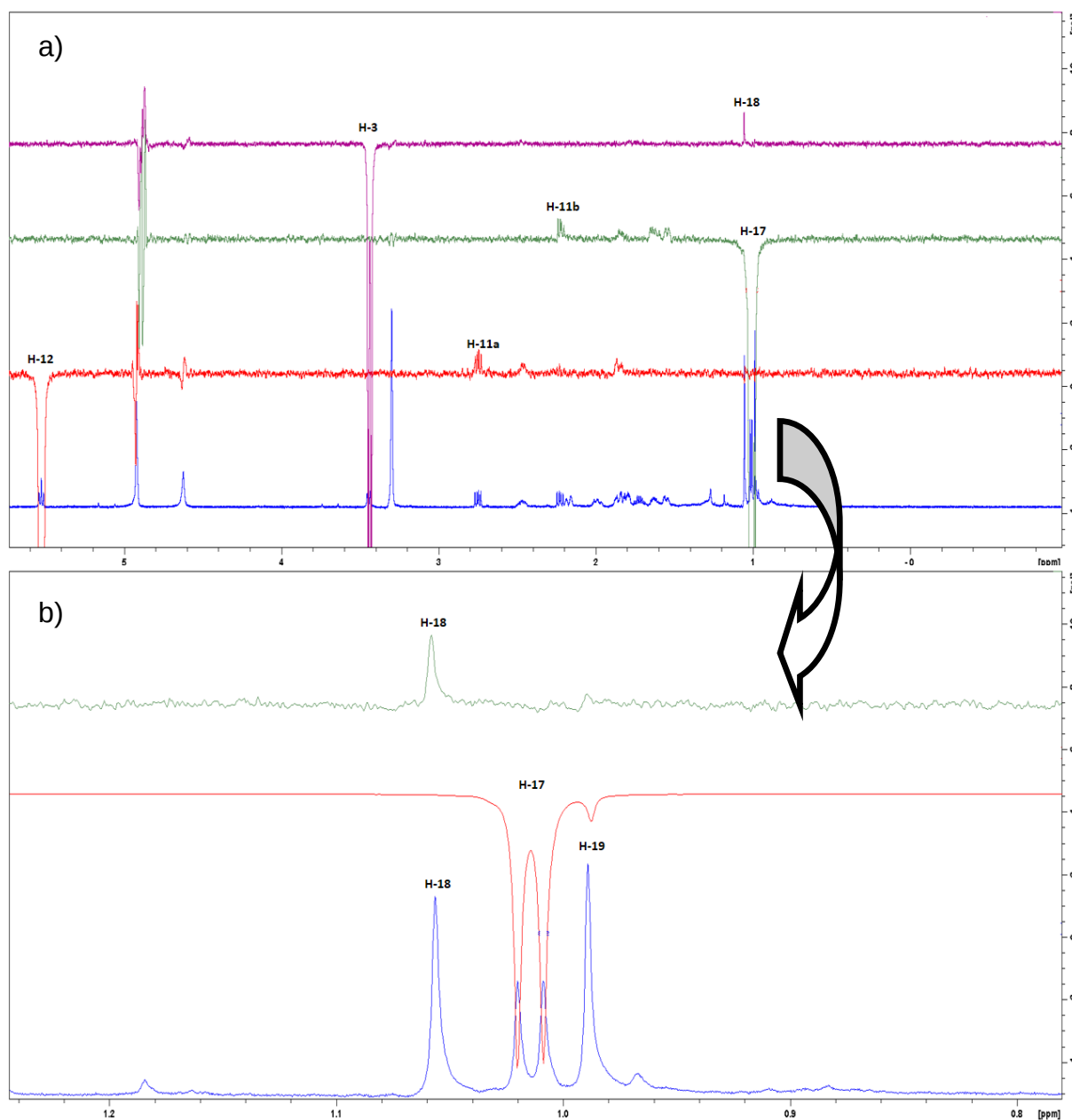
A comparação dos dados de deslocamento químico de ^{13}C e ^1H com os da literatura permitiram apontar a grande semelhança dessa substância com a série de diterpenos da classe dos halimanos que foram obtidos como intermediários na síntese do 3-hidroxi-5, 10-epoxiciliolida (Bohlmann e Harde, 1988). Dentre esses isômeros, o 3 α -hidroxi-5,10-didehidrochiliolida foi relatado como um produto natural em 2003 quando foi isolado de partes aéreas de *Nardophyllum bryoides*. Na figura 65 estão os diterpenos obtidos como intermediários sintéticos por Bohlmann e Harde e em destaque (na cor verde) se encontra o isômero que foi obtido de fonte natural.

FIGURA 65. Diterpenos da classe dos halimanos que foram obtidos como intermediários sintéticos por Bohlmann e Harde e colaboradores e em destaque (na cor verde) se encontra o isômero que foi obtido de fonte natural.



Para definir qual desses diterpenos foi isolado na fração Fr.4 da raiz de *C. floribundus*, foi determinado a configuração relativa. O primeiro centro estereogênico definido foi do carbono 3 uma vez que H-3 apresenta uma constante de acoplamento com H-2 do tipo $J_{3\alpha\text{ax} - 2\alpha\text{ax}} = 11,76$ Hz. Portanto, H-3 se encontra em pseudo-axial e para trás do plano da molécula. Tendo então como base esse centro, determinou-se a configuração relativa dos demais centros pelos espectros de NOESY 1D. Os espectros obtidos estão apresentados na figura 66.

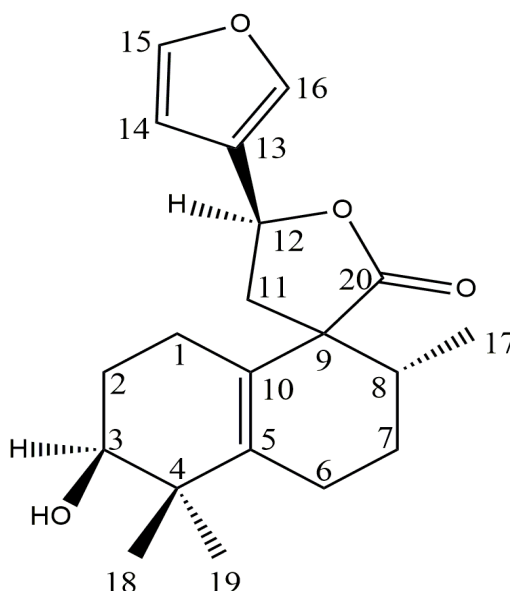
FIGURA 66. a) Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D dos hidrogênios H-3 (roxo), H-17 (verde) e H-12 (vermelho) obtidos para a fração Fr.4. da raiz de *C. floribundus*. b) Ampliação evidenciando a região dos hidrogênios metílicos.



Como demonstrado no espectro acima, o hidrogênio metínico H-3 apresenta apenas interação com a metila H-19, sinalizando que estão no mesmo plano da molécula, ou seja, pra frente do plano ou na posição equatorial. Já a metila 17 também se encontra para trás do plano, uma vez que há interação entre seus hidrogênios metílicos e H-19. No entanto, para que essa interação possa existir, a metila 17 precisa estar em axial.

No espectro de irradiação dos hidrogênios metílicos H-17 também foi possível constatar a interação presente entre esses e o hidrogênio diastereotópico H-11a e não foi possível observar interação com H-12, podendo indicar que o anel furânico se encontra em plano oposto ao da metila 17. Essa suposição foi corroborada pela interação existente no NOESY 1D entre H-12 e H-11b, apontando que estes se apresentam do mesmo lado da molécula, mas em plano oposto ao da metila 17. Na figura 67 se encontra a substância isolada na fração Fr.4 na sua configuração relativa.

FIGURA 67. Substância isolada na fração Fr.4 da raiz de *C. floribundus* em sua configuração relativa.



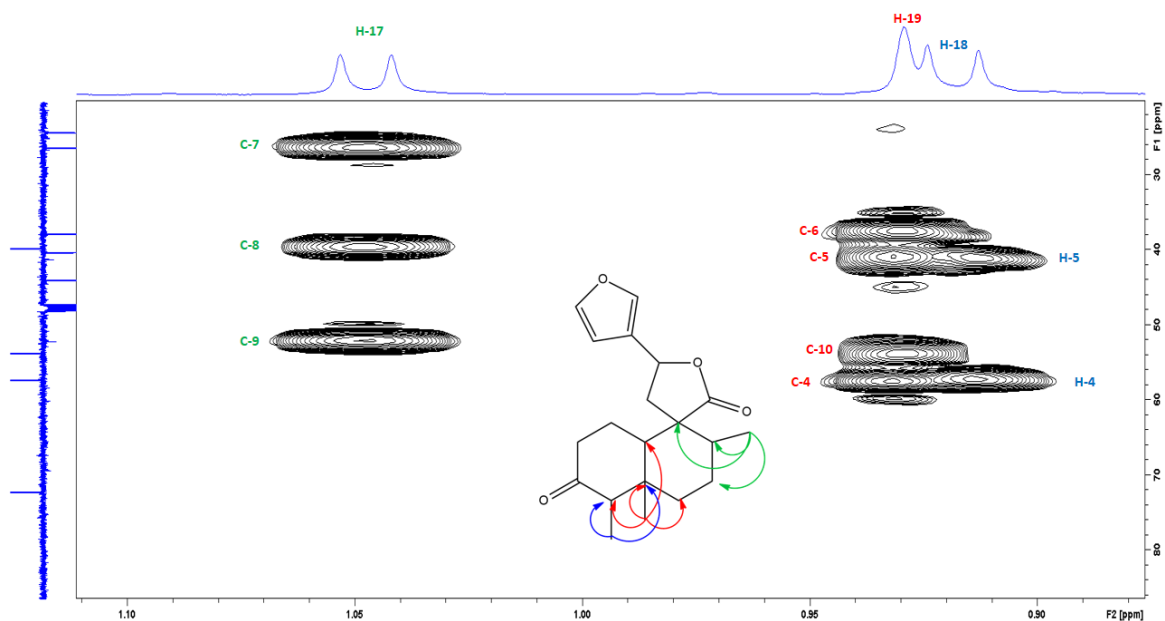
Portanto, a substância isolada na fração Fr.4 da raiz de *C. floribundus* corresponde a substância 3β-hidroxi-5,10-epoxicilolida, um dos diterpenos halimanos obtidos como intermediários sintéticos por Bohlmann e Harde. Vale destacar que essa substância está sendo reportada pela primeira vez como produto natural e possui fórmula molecular $C_{20}H_{26}O_4$ com m/z 331,46 $[M + H]^+$.

4.2.2.2 Caracterização da fração obtida em Fr.5

A fração Fr. 5, isolada da fração 80% da raiz de *C. floribundus*, foi obtida como um pó amorfo de coloração branca e seus espectros de RMN apresentam algumas semelhanças com a substância croflorin A, como a presença de 20 sinais no espectro de DEPTq (ANEXO AA) e a existência de sinais característicos da decalina e do anel furânico (C-13: δ_C 125,6; C-14: δ_H 6,56, t, δ_C 107,96; C-15: δ_H 7,62, s, δ_C

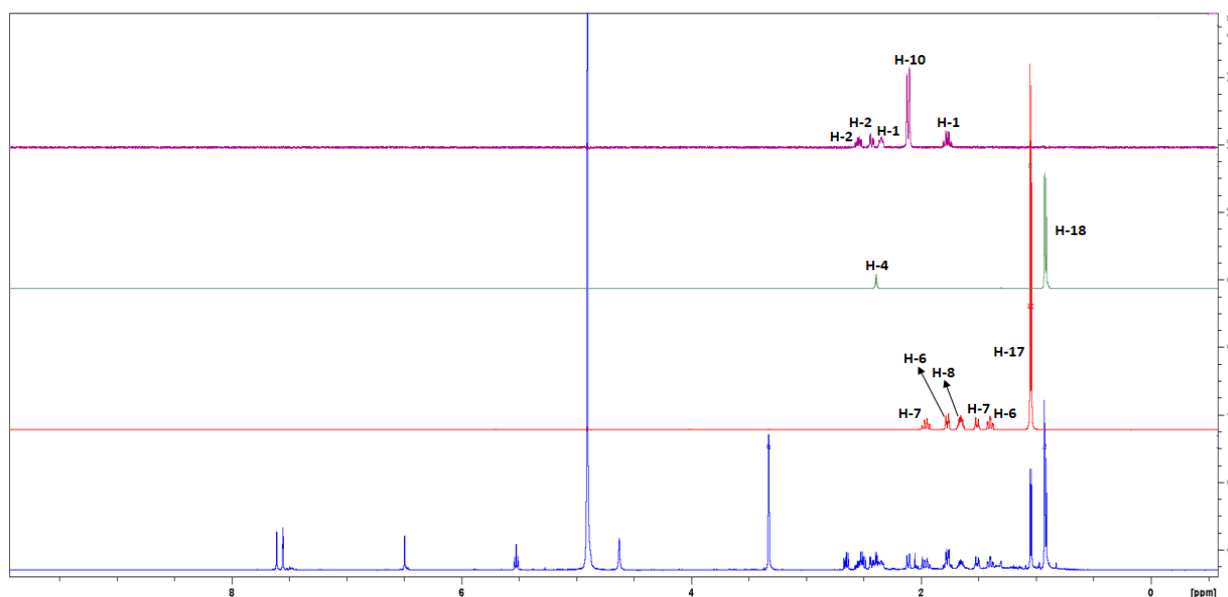
144,08; C-16: δ_H , 7,56, s, δ_C 139,97) (APÊNDICES BA e CA). Outra analogia é a presença de 3 metilas com a mesma multiplicidade daquelas presentes em croflorin A e as correlações a longa distância observadas por HMBC (FIGURA 68) mostram que essa substância também é pertencente a classe dos diterpenos clerodânicos.

FIGURA 68. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância dos hidrogênios metílicos da substância isolada na fração Fr.5 da raiz de *C. floribundus*.



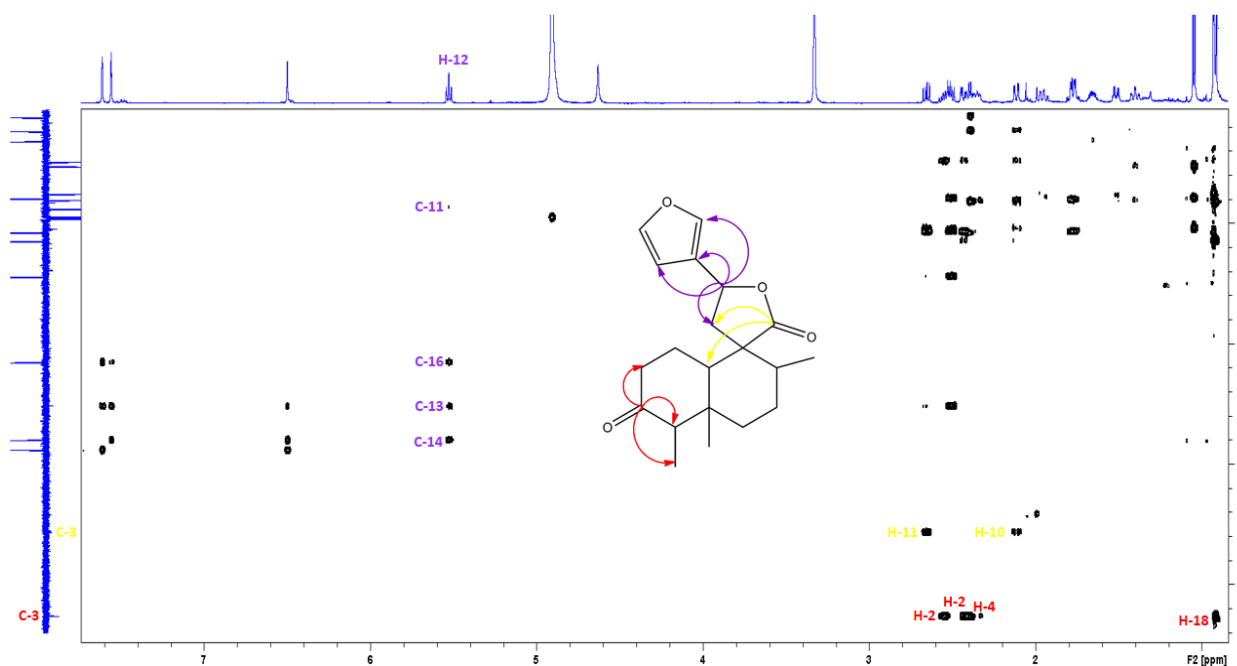
No entanto, a dessemelhança entre essa substância e croflorin A é a presença de mais uma carbonila que se encontra no anel A da decalina, uma vez que já foi possível sinalizar todos os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes ao seu anel B por meio dos espectros de TOCSY 1D (FIGURA 69). Na figura 67 encontram-se também os outros sistemas de spin dessa substância.

FIGURA 69. Comparação dos espectros de ^1H (azul) com os TOCSYs obtidos da fração Fr.5, isolada da raiz de *C. floribundus*



Para determinar a posição exata dessa carbonila observou-se as correlações a longa distância no espectro de HMBC com os hidrogênios 2, 4 e 18, indicando sua localização no carbono 3. Além dessa correlação, a figura 70 apresenta também outras que foram observadas nesse mapa de contorno que corroboram a estrutura proposta.

FIGURA 70. Mapa de contorno HMBC evidenciado algumas correlações a longa distância da substância isolada na fração Fr.5 da raiz de *C. floribundus*.



A tabela 17 apresenta os dados obtidos pelas técnicas unidimensionais e bidimensionais de RMN para a substância isolada na fração Fr.4 (3 α -hidroxi-5 β , 10 β -epoxiciliolida).

TABELA 17. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlações observadas por HMBC da substância isolada na fração Fr.5, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 600 e 150 MHz, respectivamente.

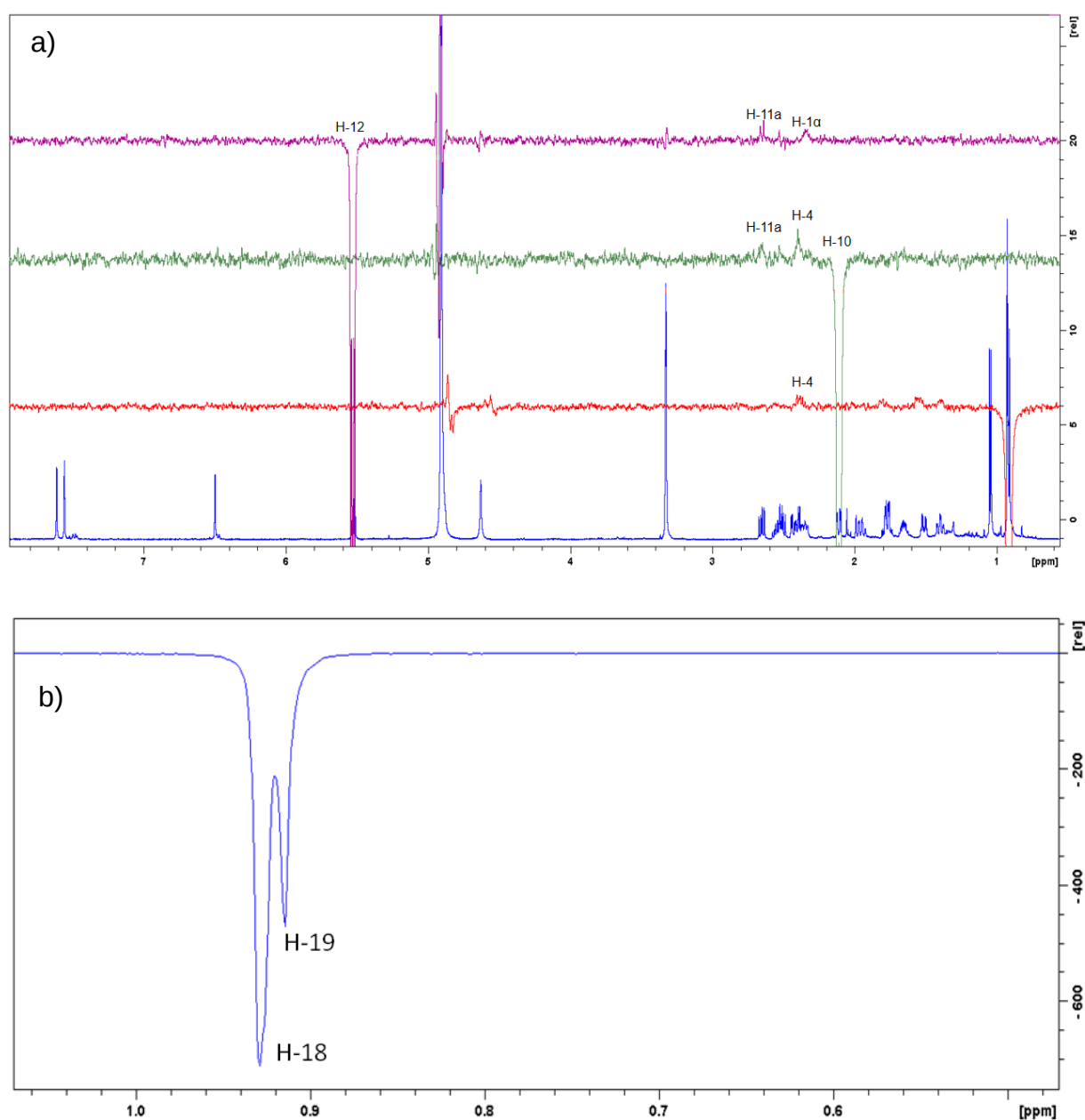
	δ_{C} , ppm.	δ_{H} , mult., (J em Hz)	HMBC
1 α ; 1 β	24,10	2,34; m; 1,77; m	-
2 α ; 2 β	40,27	2,54; m; 2,43; m	-
3	213,30	-	2, 4, 18
4	57,20	2,39	-
5	41,30	-	-
6	37,73	1,78; m; 1,38; dd (10,10;3,40)	-
7	26,50	1,96; m; 1,51; m	-
8	39,80	1,66; m	-
9	52,20	-	-
10	53,71	2,11; dd (13,22; 3,06)	1, 9
11a; 11b	44,00	2,66; dd; 2,50; dd (14,09; 8,36)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	72,26	5,52; t (8,76)	11, 13, 14, 16
13	125,70	-	-
14	107,80	6,50; s	13, 15, 16
15	144,00	7,56; t (1,66)	13, 14, 16
16	139,90	7,61; sl	13, 14, 15
17	15,95	1,05; d (6,75)	7, 8, 9
18	5,84	0,92; d (6,73)	4,5
19	11,77	0,93; s	4, 5, 6, 10
20	178,00	-	-

Como ponta de partida para a determinação da configuração relativa dessa substância, teve-se como base a constante de acoplamento entre H-10 e H-1, uma vez que é do tipo: $J_{10\beta\text{ax} - 1\alpha\text{ax}} = 13,22$, ou seja, H-10 se encontra na posição axial e para frente do plano. Já a posição da metila 19, que se encontra também na junção dos anéis da decalina, foi definida através do deslocamento químico do carbono metílico 19 uma vez que esse apresenta δ característico da junção *trans* dos anéis A e B do grupo decalínico (MANABE; NISHINO, 1986). Logo, H-19 se encontram na posição axial.

Os outros centros estereogênicos foram então estabelecidos a partir dessa determinação *trans* da decalina pelo espectro de NOESY 1D (FIGURA 71). Esse espectro mostra a interação existente entre os hidrogênios metílicos H-18 e H-19 sinalizando disposição da metila 18 para trás do plano. A posição α dessa metila foi corroborada pela interação presente entre H-10 e H-4 em outro espectro de NOESY.

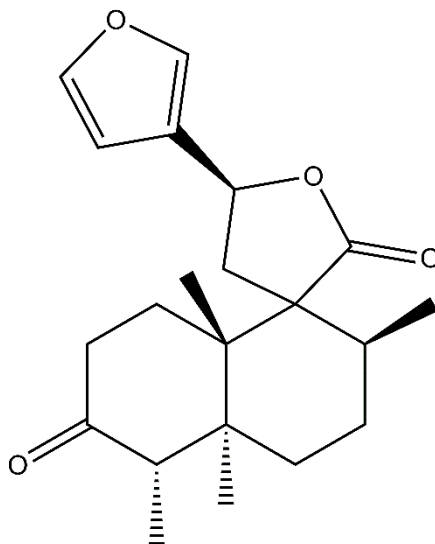
Já a metila 17 se encontra na posição beta, uma vez que há interação de seus hidrogênios metílicos com o hidrogênio metínico H-4. Nesse espectro também não foi possível observar interação com H-12, podendo indicar que o anel furânico se encontra no mesmo plano que a metila 17. A configuração 12S foi confirmada através da interação existente no espectro de NOESY entre H-12 e H-1 α (NDUNDA et al., 2016).

FIGURA 71. a) Comparação dos espectros de ^1H (azul) e NOESY 1D dos hidrogênios H-12 (verde) e H-17 (vermelho) obtidos para a fração Fr.5 da raiz de *C. floribundus*. b) Espectro de NOESY 1D do hidrogênio metílico H-18.



. A figura 72 apresenta a substância isolada na fração Fr.5 em sua configuração relativa.

FIGURA 72. Substância isolada na fração Fr.5 da raiz de *C. floribundus* em sua configuração relativa.



Logo, a substância isolada na fração Fr.5 da raiz de *C. floribundus* condiz com a fórmula molecular $C_{20}H_{26}O_4$ e é um isômero da substância isolada em Fr.4, com m/z $[M + H]^+$ 331,46. A busca de informações sobre a presente estrutura na literatura não identificou nenhum diterpeno com essa massa molecular e com essa estrutura, sugerindo que esta substância tenha uma estrutura ainda não descrita na literatura, ou inédita.

Como o diterpeno croflorin A é a substância majoritária isolada, encaminhou-se para a avaliação da atividade anti-inflamatória juntamente com a fração 80% da raiz de *C. floribundus*.

4.3 Atividade Biológica

4.3.1. Avaliação da atividade antiplasmodial

Alguns orbitídeos de *Jatropha* apresentam de moderada à forte atividade antimalárica (AUVIN et al. 1997, 1999; AUVIN-GUETTE et al. 1999; BARAGUEY et al. 1998, 2000, 2001), inclusive o orbitídeo ribifolina isolado por nosso grupo de pesquisa (PINTO et al. 2015). Diante disso, realizou-se a avaliação da atividade antiplasmodial frente ao *Plasmodium falciparum* 3D7 da fração rica em peptídeos (fração 80%) e do peptídeo [1-7NαC] crocaorb A₁ de acordo com a metodologia

descrita em 3.2.10. Vale ressaltar que o peptídeo isolado estava impuro, como foi discutido. No entanto, nenhuma das duas amostras apresentaram uma concentração inibitória acima de 50% (IC50) contra esse plasmódio (TABELA 18).

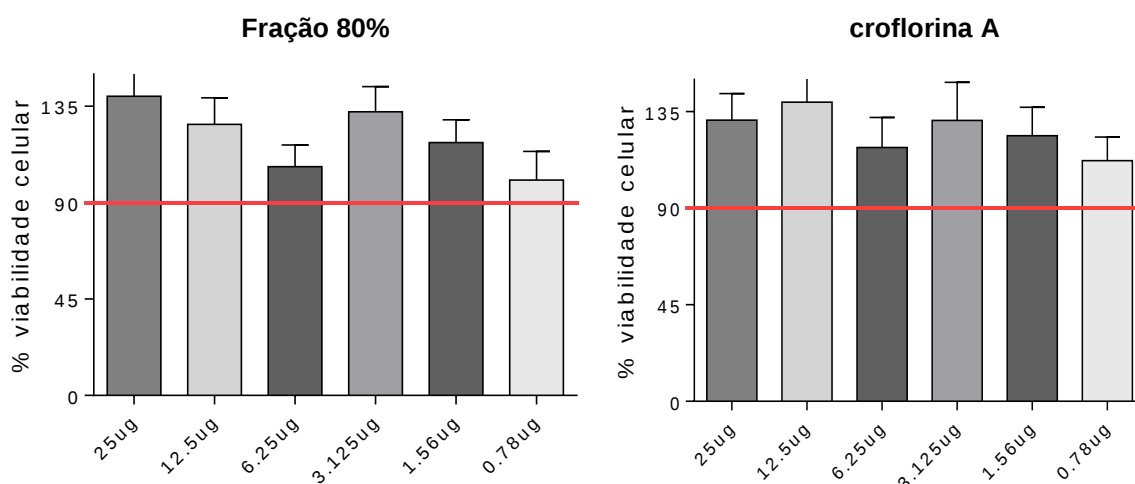
Tabela 18. Concentração inibitória de 50% (IC50) contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina.

Amostra	% de Inibição
Fração 80%	45
[1-7NaC] crocaorb A ₁ (impuro)	5

4.3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

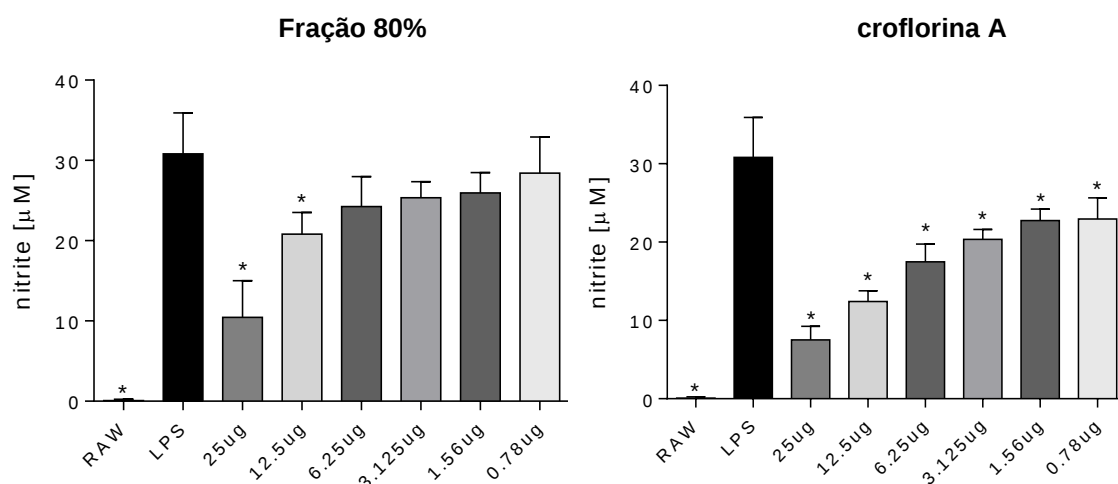
A avaliação da atividade anti-inflamatória da fração 80% (C.F.R.Fr80%) da raiz de *C. floribundus* e o composto croflorin A, isolado dessa fração, foram considerados promissores por apresentarem viabilidade celular superior a 90% (FIGURA 73). Concentrações acima de 25 µg/mL exibiram viabilidade inferior e, portanto, foram descartadas devido à sua citotoxicidade evitando assim, falsos positivos.

FIGURA 73. Avaliação da citotoxicidade da fração 80% (C.F.R.Fr80%) da raiz de *C. floribundus* e o composto croflorina A, isolado dessa fração. As células foram pré-tratadas com os extratos brutos por 90 min utilizando diferentes concentrações (25 a 0,78 µg/mL). Após esse período as mesmas foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 18h. Após tal tratamento foram submetidas a teste de viabilidade por MTT. Sua viabilidade foi calculada tomando como 100% a viabilidade encontrada nas células tratadas apenas com LPS – controle positivo. A linha vermelha indica 90% de viabilidade celular calculada a partir dos 100% do controle positivo.



Devido à baixa toxicidade apresentada por essas amostras determinou-se a concentração de nitrito através do reagente de Griess no sobrenadante celular (FIGURA 74).

FIGURA 74. Avaliação da inibição de NO por tratamento com a fração 80% (C.F.R.Fr80%) da raiz de *C. Floribundus* e o composto croflorin A, isolado da mesma. As células foram pré-incubadas com os extratos por um período de 90 min e em seguida estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 18hs. A concentração de nitrito foi determinada através do reagente de Greiss. Os resultados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em quadruplicatas. * P < 0,05 vs meio (controle) # P < 0,05 vs LPS. (ANOVA).



Como demonstrado na Figura 73 a incubação de LPS resultou em um aumento na síntese de NO quando comparado com células cultivadas apenas com meio – controle negativo. No entanto, o pré-tratamento das células na presença de diferentes concentrações das amostras promoveu a inibição na produção de nitrito quando comparadas com as células tratadas apenas com LPS. Dentre as amostras testadas, o composto isolado da fração 80% da raiz de *C. floribundus* croflorin A) mostrou-se mais potente em inibir a síntese de NO em células previamente tratadas com LPS quando comparado com essa fração. Em concentrações mais altas ambas as amostras foram capazes de inibir a síntese de NO em níveis semelhantes aos obtidos com células estimuladas apenas com meio. Porém, apenas no composto isolado concentrações mais baixas foram capazes de inibir a síntese de NO.

4.3.3 Avaliação da atividade citotóxica

Em colaboração com o Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo foi possível a realização do teste de citotoxicidade para os extratos de raiz, caule e folha da espécie *C. floribundus*, bem como das frações 20 e 80% da raiz e do diterpeno clerodânico croflorina A. O estudo citotóxico pelo método de MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). Portanto, o objetivo deste ensaio foi realizar um *screening* inicial para determinação do potencial citotóxico e antitumoral dessas amostras e para tanto foram utilizadas 2 linhagens de células tumorais cultivadas: HCT-116 (carcinoma cólon-retal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

Após a preparação das placas conforme o item 4.10, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 570nm. Os experimentos foram analisados segundo porcentagem de inibição do crescimento celular (GI), média $\pm$ desvio padrão da média (SD) através do programa *GraphPad Prism*, resultando nos dados da tabela 19. Analisando os dados, infere-se que nenhuma das amostras testadas foram consideradas ativas ao teste.

Tabela 19. Porcentagem de inibição do crescimento celular (GI) e a média $\pm$ desvio padrão da média (SD) das amostras.

MCF-7						
Amostra	GI (%) 5 ug/mL			GI (%) 50 ug/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
Extrato de folha	-31,13	21,80	2	-9,29	18,79	2
Extrato de caule	-18,29	8,00	2	-5,42	12,72	2
Extrato de raiz	-23,01	10,64	2	30,22	13,69	2
Frção 80% da raiz	-27,16	9,98	2	-14,50	11,87	2
Fração 20% da raiz	-30,37	23,03	2	26,35	4,01	2
croflorina A	-15,23	10,45	2	-11,88	18,74	2
HCT-116						
Amostra	GI (%) 5 ug/mL			GI (%) 50 ug/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
Extrato de folha	-32,94	8,32	2	30,84	10,14	2
Extrato de caule	-16,01	4,11	2	-13,40	16,17	2
Extrato de raiz	-1,99	12,61	2	27,03	6,25	2
Frção 80% da raiz	-4,81	9,50	2	25,40	6,29	2
Fração 20% da raiz	-32,55	13,08	2	15,23	14,24	2
croflorina A	-12,12	9,58	2	-15,70	9,55	2

5. Conclusão

Face o número incipiente de estudos direcionados a busca por peptídeos cíclicos no gênero *Croton*, o trabalho desenvolvido permitiu obter maior conhecimento sobre a presença dessa classe de compostos em duas espécies desse gênero: *C. floribundus* que possui um papel importante na medicina tradicional e *C. campanulatus* que é recém descoberta e possui apenas um relato na literatura de estudo de investigação de metabólitos secundários.

Os métodos de extração e purificação voltados a peptídeos cíclicos, mais precisamente aos orbitídeos, permitiu isolar do látex da espécie *C. campanulatus* dois novos peptídeos que foram caracterizados por HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS/MS e RMN 1D e 2D como sendo *ciclo*(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met⁵-Ser⁶-Trp⁷) na qual foi denominado [1-7NαC] crocaorb A₁ e *ciclo*(-Pro¹-Val²-Leu³-Ile⁴-Met[O]⁵-Ser⁶-Trp⁷) nomeado [1-7NαC] crocaorb A₂. Porém, não foi possível testar a atividade biológica, uma vez que a concentração de massa dos peptídeos isolados foram insuficientes.

Com relação a *C. floribundus*, essa mesma metodologia não permitiu a identificação de orbitídeos nessa espécie. No entanto, três novos diterpenos clerodânicos foram isolados e caracterizados pelas técnicas LC-ESI-(+)-IT-MS e RMN 1D e 2D e nomeados como cascarillina F, croflorlina A e croflorlina B. O diterpeno halimanico conhecido como 3β-hidroxi-5β, 10β-epoxiciliolida também foi isolado, sendo a primeira vez relatado como produto natural. Já os diterpenos presentes na mistura não foram possíveis de serem isolados. Embora nenhum peptídeo cíclico tenha sido constatado nessa espécie, esse trabalho permitiu caracterizar três novos diterpenos clerodânicos em um gênero que é conhecido pela sua riqueza de metabolitos secundários com esqueleto terpênico.

A fração rica em peptídeos (Fr.80%) bem como o peptídeo impuro [1-7NαC] crocaorb A₁ foram avaliados quanto atividade antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum* 3D7. No entanto, nenhuma das amostras apresentaram uma concentração inibitória maior que 50%.

O terpeno majoritário obtido, croflorlina A e a fração 80% foram testadas frente ao potencial anti-inflamatório. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a fração 80% da raiz de *C. floribundus* e o composto croflorlina A possui um efeito inibidor na produção de nitrito, e, portanto, um possível efeito anti-inflamatório profilático. No entanto, novos experimentos são necessários, como a quantificações

de citocinas e mediadores lipídicos, para comprovar seu efeito anti-inflamatório. Essas amostras bem como os extratos de raiz, caule e folha e a fração 20% obtidos dessa espécie também foram avaliados quanto a citotoxicidade em 2 linhagens de células tumorais cultivadas: HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Porém, nenhuma das amostras testadas foram consideradas ativas ao teste.

6. Referências

- AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*. v.6, p. 274-281, 2011.
- AKHILA, A.; RANI, K.; THAKUR, R.S. Biosynthesis of the clerodane furano-diterpene lactone skeleton in *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, v.30, p.2573-2576, 1991.
- AMINAH, N. S.; KRISTANTI, A. N.; TANJUNG, M. Antioxidant activity of flavonoid compounds from the leaves of *Macaranga gigantea*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 688- 692, 2014.
- ARNISON, P. G.; BIBB, M. J.; BIERBAUM, G.; BOWERS, A. A.; BUGNI, T. S.; BULAJ, G.; CAMARERO, J. A.; CAMPOPIANO, D. J.; CHALLIS, G. L.; CLARDY, J.; COTTER, P. D.; CRAIK, D. J.; DAWSON, M.; DITTMANN, E.; DONADIO, S.; DORRESTEIN, P. C.; ENTIAN, K. D.; FISCHBACH, M. A.; GARAVELLI, J. S.; GÖRANSSON, U.; GRUBER, C. W.; HAFT, D. H.; HEMSCHEIDT, T. K.; HERTWECK, C.; HILL, C.; HORSWILL, A. R.; JASPAR, M.; KELLY, W. L.; KLINMAN, J. P.; KUIPERS, O. P.; LINK, A. J.; LIU, W.; MARAHIEL, M. A.; MITCHELL, D. A.; MOLL, G. N.; MOORE, B. S.; MÜLLER, R.; NAIR, S. K.; NES, I. F.; NORRIS, G. E.; OLIVERA, B. M.; ONAKA, H.; PATCHETT, M. L.; PIEL, J.; REANEY, M. J. T.; REBUFFAT, S.; ROSS, R. P.; SAHL, H.G.; SCHMIDT, E. W.; SELSTED, M. E.; SEVERINOV, K.; SHEN, B.; SIVONEN, K.; SMITH, L.; STEIN, T.; SÜSSMUTH, R. D.; TAGG, J. R.; TANG, G. L.; TRUMAN, A. W.; VEDERAS, J. C.; WALSH, C. T.; WALTON, J. D.; WENZEL, S. C.; WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Natural Products Report**, v. 30, p. 108-160, 2013.
- AUVIN, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; LEZENVEN, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Curcacycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 2845-2848, 1997.
- AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; XAVIER, H. S.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Pohnianins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha pohniana* ssp. *molissima*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 11495-11510, 1999.
- BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. **Journal of Chemical Society**, v. 18, p. 3033-3039, 1998.
- BARTH, E. F., PINTO, L. S., DILELI, P., BIAVATTI, D. C., SILVA, Y. L., BORTOLUCCI, W., GAZIM, Z. C., TAKEMURA, O. S., ROMAGNOLO, M. B., LAVERDE-JUNIOR, A. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal Biology**, v. 78, p. 601-608, 2018.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BOONYARATHANAKORNKIT, L.; CHE, C.T.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R. Constituents of *Croton crassifolius* roots. **Planta Médica**, v.54, p.61-63, 1988.

BURMAN, R.; GUNASEKERA, S.; STROMSTEDT, A. A.; GORANSSON, U. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 724-736, 2014.

CÂNDIDO-BACANI, P.M.; FIQUEREDO, P. O.; MATOS, M.F.C.; GASCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S. Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2754-2760, 2015.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massa: Um Guia Prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

CARUZO, M. B. R.; RIINA, R.; CORDEIRO, BERRY, P.E.; *Croton campanulatus* (Euphorbiaceae s.s.), a new species from the Brazilian Atlantic rain Forest. **Brittonia**, v. 60, p. 261-264, 2008.

CARUZO, M. B. R.; RIINA, R.; CORDEIRO, I.; Arborescent species of the genus *Croton* (Euphorbiaceae), Eastern Brazil. *CROTON Trees of the Atlantic Rain Forest*, 2009. Disponível em: <http://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guidespdfs/255_Mat_At-CROTON_1_1.pdf<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/61162/>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol 1, p.503-504, 1984. In.: PEIXOTO, J .L. B. Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

CRAIK D. J.; DALY N. L.; BOND T.; WAINE C. "Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v.294, p. 1327-36, 1999.

CRAIK, D. J.; SIMONSEN, S.; DALY, N. L. The cyclotides: novel macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 5, p. 251-260, 2002.

CRAIK, J. D.; LEE, M. H.; REHM, F. B. H.; TOMBLING, B.; DOFFEK, B.; PEACOCK, H. Ribosomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and

pharmaceutical scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 2727-2737, 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.

DUVAL, J. J. Pharm. 1845, 8, 91 -94. Quoted in Tschirch, A. Handbuch der Pharmacognosie, 2nd ed., Verlag B. v. Tauchnitz: Leipzig, 1930,; Vol. 3, pp 797-804

GOTTLIEB, O. R., KAPLAN, M. A.; BORIN, M. R.; Biodiversidade, um Enfoque Quimiobiológico; **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, p. 97-102, 1998.

GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "uber einige Azovernindungen";. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, vol. 12, p. 426-428, 1879.

HAGEDORN, M. L.; BROWN, S. M. The Constituents of Cascarilla Oil (*Croton eluteria* Bennett). **Flavour and Fragrance journal**, v. 6, p.193-204, 1991.

HALSALL, T. G., The Structure of Cascarillin A, an Epoxy-furanoid Diterpene. **Chemical Commnications**, v. 11, p. 218-219, 1965.

JAKUPOVIC, J., BANERJEE, S., BOHLMANN, F., KING, R. M., ROBINSON, H. New diterpenes from *chiliotrichium rosmarinifolium* and *nardophyllum lanatum*, **Tetrahedron**, vol. 42, p. 1305-1313, 1986.

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

MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de Diterpenos Clerodânicos. **Revista Fitos**, v. 2, p. 54-73, 2006.

MANABE, S.; NISHINO, C. Stereochemistry of *cis*-clerodane diterpenes **Tetrahedron**, v. 42, p. 3461-3470, 1986.

MEDINA, J. M.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, A. A.; HARAGUCHII, S. K.; FALAVIGNA, D. L. M.; ZAMUNER, M. L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 207-211, 2009.

MEHMOOD, R.; MALIK, A. Isolation and Characterization of Crotosparsamide, a New Cyclic Nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1885-1888, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULVENNA, J. P.; MYLNE, J. S.; BHARATHI, R.; BURTON, R. A.; SHIRLEY, N. J.; FINCHER, G. B.; ANDERSON M. A.; CRAIK D. J. Discovery of Cyclotide-Like

Protein Sequences in Graminaceous Crop Plants: Ancestral Precursors of Circular Proteins? **Plant Cell**, v. 18, p. 2134-2144, 2006.

MWINE, J. T.; DAMME, P. V.; Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 652-662, 2011.

MYLNE, J. S.; COLGRAVE, M. L.; DALY, N. L.; CHANSON, A. H.; ELLIOTT, A. G.; McCALLUM, E. J.; JONES, A. G.; CRAIK, D. J. Albumins and their processing machinery are hijacked for cyclic peptides in sunflower. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 257-259, 2011.

PEIXOTO, J. L. B. Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). **Dissertação de Mestrado**, Maringá, 2003.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 146-152, 2012.

PICCHI D. G.; ALTEI W. F.; SAITO M. S.; BOLZANI V. Da S.; CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1262-1277, 2009.

PIMENTEL, B. S. Constituintes de ceras cuticulares de espécies de *Croton* L. **Dissertação Mestrado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

POTH, A. G. et al. Discovery of cyclotides in the Fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins. **ACS Chemical Biology**, v. 6, p. 345-355, Jan. 2011.

RAMALHO, S. D.; WANG, C. K.; KING, G. J.; BYRIEL, K. A.; HUANG, Y. H.; BOLZANI, V. S.; CRAIK, D. J. Synthesis, Racemic X-ray Crystallographic, and Permeability Studies of Bioactive Orbitides from Species. **Journal of Natural Products**, v. 81, p. 2436-2445, 2018.

RAMALHO, S.D.; PINTO, M. E. F.; FERREIRA, D; BOLZANI, V. S.; Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Médica**, v. 84, p. 558-567, 2017.

REFLORA. Flora Brasil 2020 em Construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Croton in Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M.; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha species* (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

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

SÁNCHEZ, M.; MAZZUCA, M.; VELOSO, M. J.; FERNÁNDEZ, L. R.; SILESS, G.; PURICELLI, L.; PALERMO, J. A. Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*. **Phytochemistry**, vol. 71, p.1395-1399, 2010.

SHIM, Y. Y.; YOUNG, L. W.; ARNISON, P. G.; GILDING, E.; RRANEY, M. J. T. Proposed Systematic Nomenclature for Orbitides **Journal Natural Products**, v. 78, p. 645-652, 2015.

SILVA, B. O.; AMARAL, A. C. F.; FERREIRA, J. L.P; SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P. Micropropagation and in vitro production of secondary metabolites of *Croton floribundus*. **In Vitro Cellular & Developmental. Biology-Plant**, v. 49, p. 366-372, 2013.

SOARES, B. A.; MACIEL, M. A. M. CASTRO, R. N.; KAISER, C. R.; FIRME. C. L. Synthesis, NMR data and theoretical study of semi-synthetic derivatives from trans-dehydrocrotonin. **Journal of Molecular Structure**, vol. 15, p. 533-541, 2016.

UCHÔA, P. K. S.; SILVA, J. N.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* SPRENG. **Química Nova**, Vol, v. 36, p. 778-782, 2013.

UNICENTRO. Departamento de Engenharia Florestal. Laboratório de Manejo Florestal. **Compêndio Online Gerson Luiz Lopes**. Irati, 2012. Disponível em: <<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6116-2/>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

USEFUL TROPICAL PLANTS. **Database**. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Croton+floribundus>>. Acesso em: 17 Jun. 2017.

VIGOR, C. et al., Neoclerodane Diterpenoids from *Croton eluteria*, **Journal Natural Products**, v. 65, p. 1180-1182, 2002.

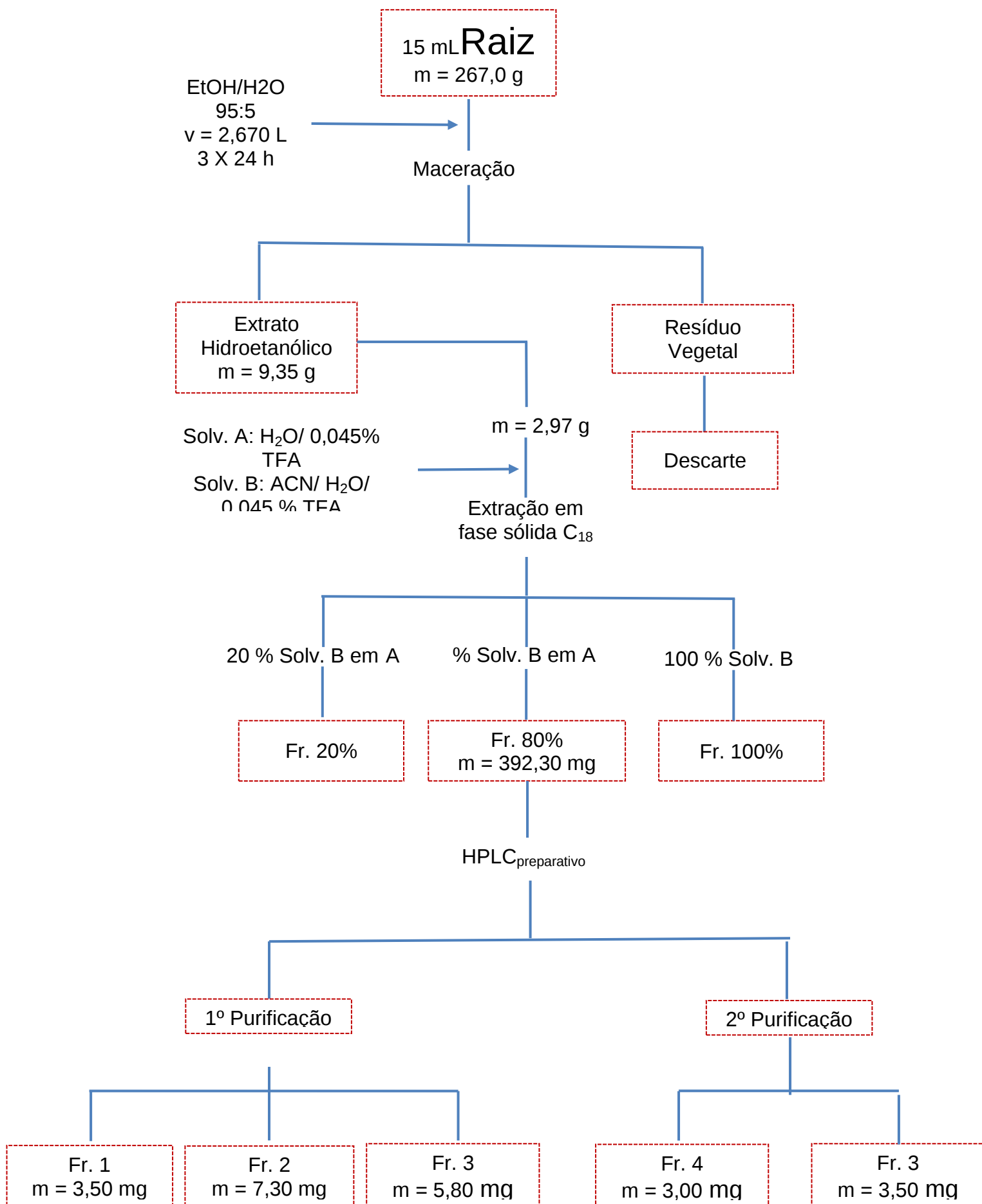
VIGOR, C. et al., Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1209-1212, 2001.

VIZZOTTO, L. Estudo e aplicação de técnica de RMN HS-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas de ordem rutales. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

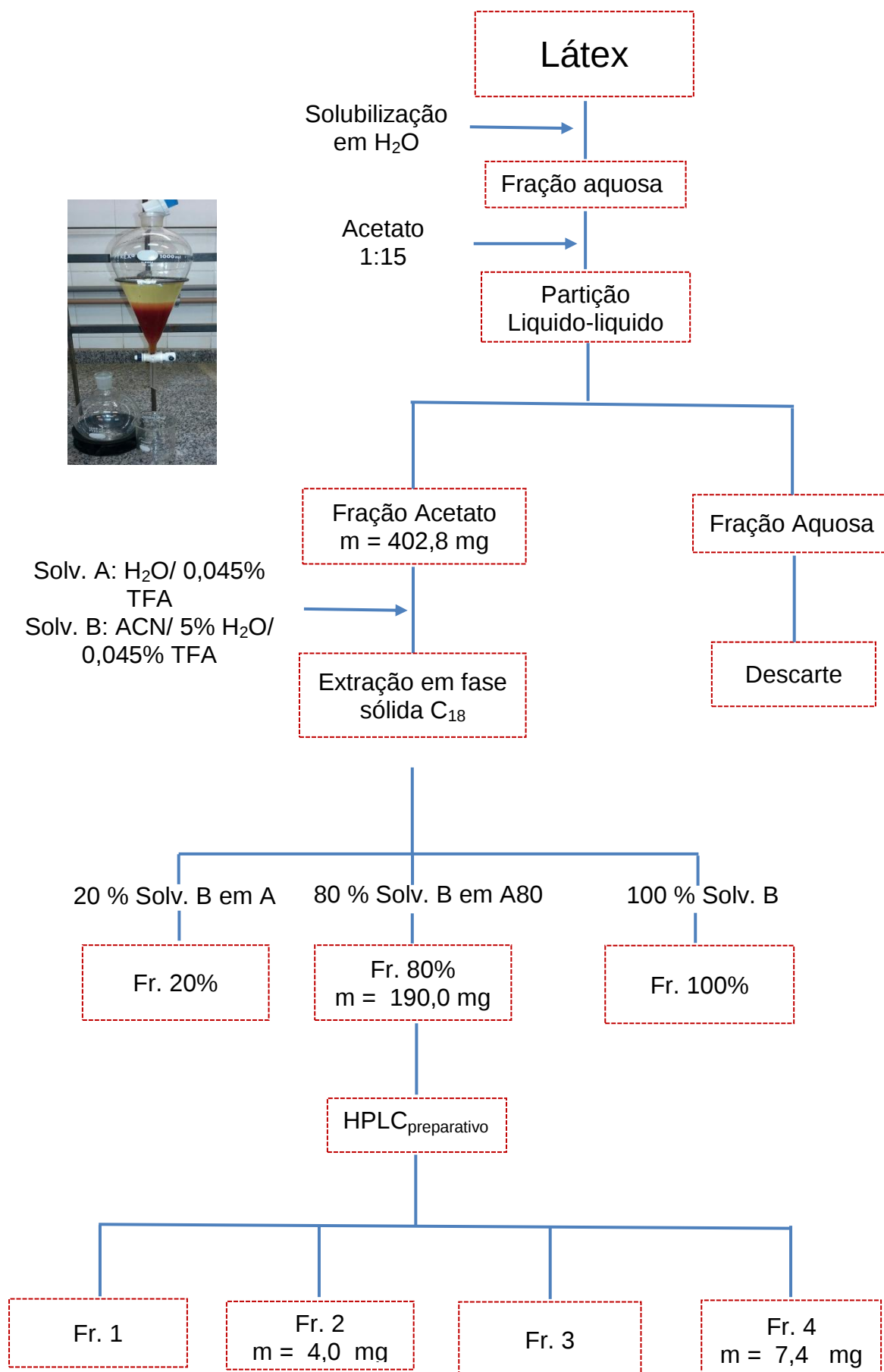
WALCOOT, S. Q.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the látex *Croton gossypifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1374-1376, 2007.

Zhang, J-S., Tang, Y-Q., Huang, J-L., Li, W., Zou, Y-H., Tang, G-H., Liu, B., Yin, S., 2017. Bioactive diterpenoids from *Croton laevigatus*. *Phytochemistry*, 144, 151-158.

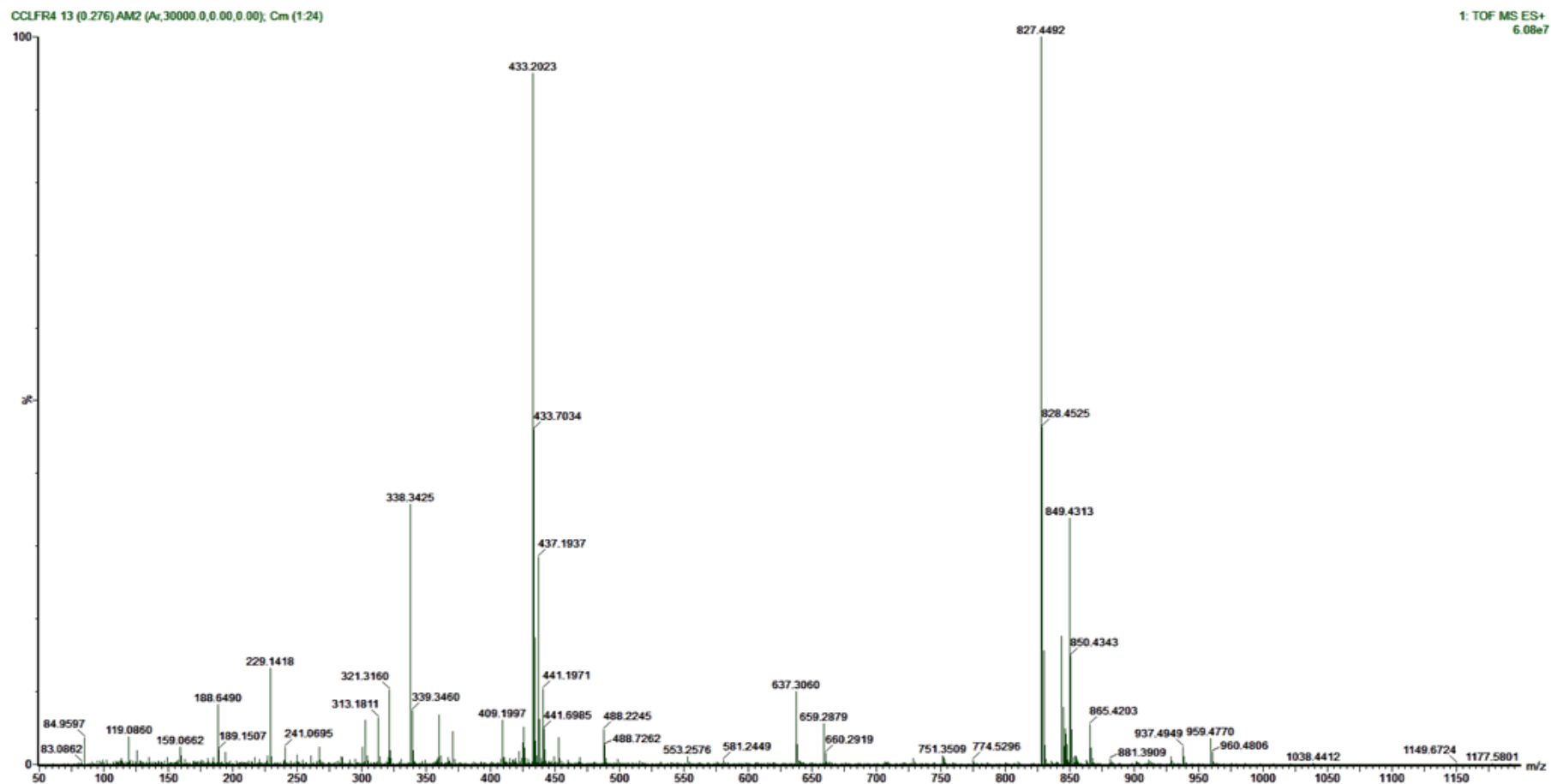
APÊNDICE A: Esquema 1. Metodologia usada no processo em grande escala para a raiz de *C. floribundus*.



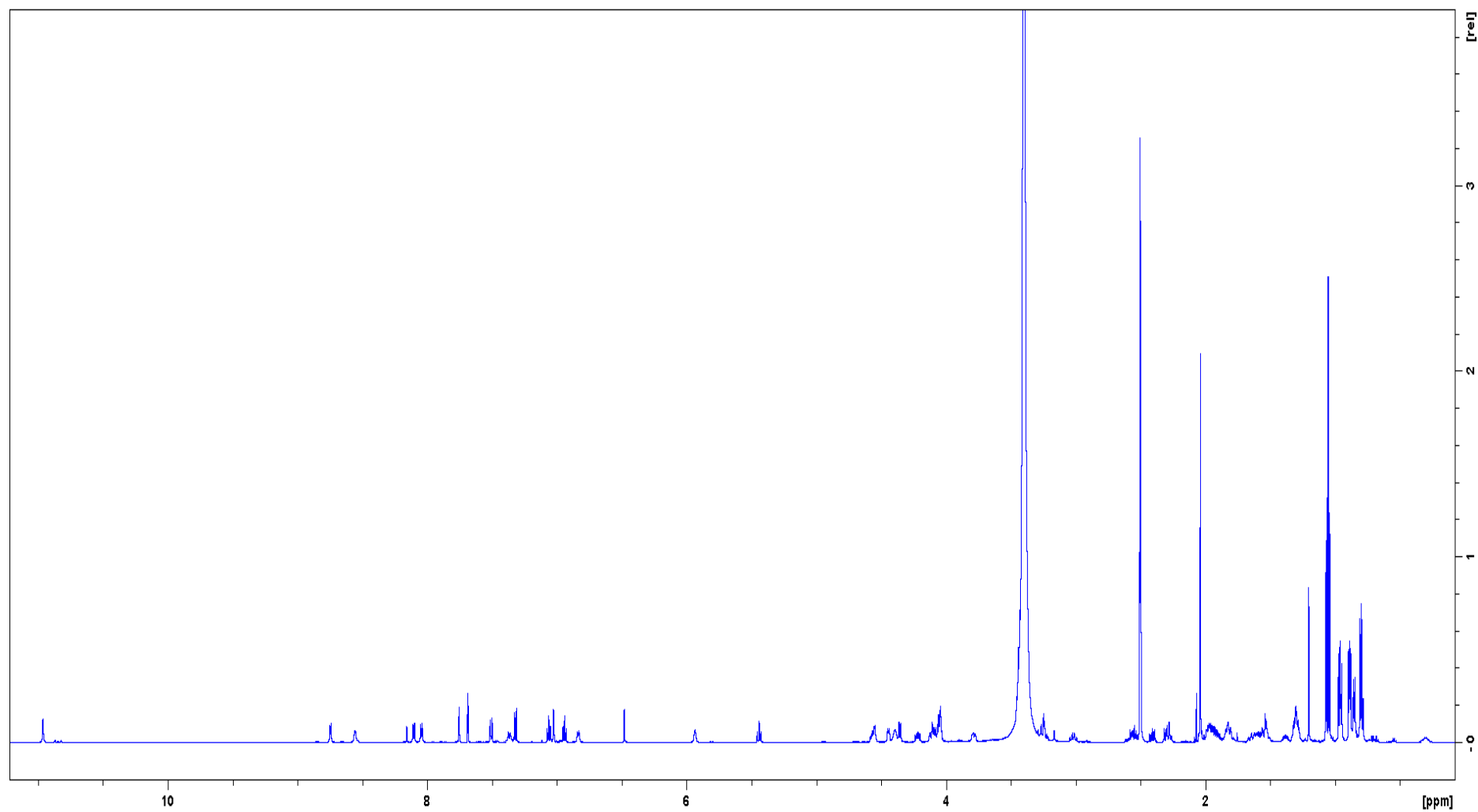
APÊNDICE B: Esquema 2. Metodologia usada no processo em grande escala para a raiz de *C. campanulatus*.



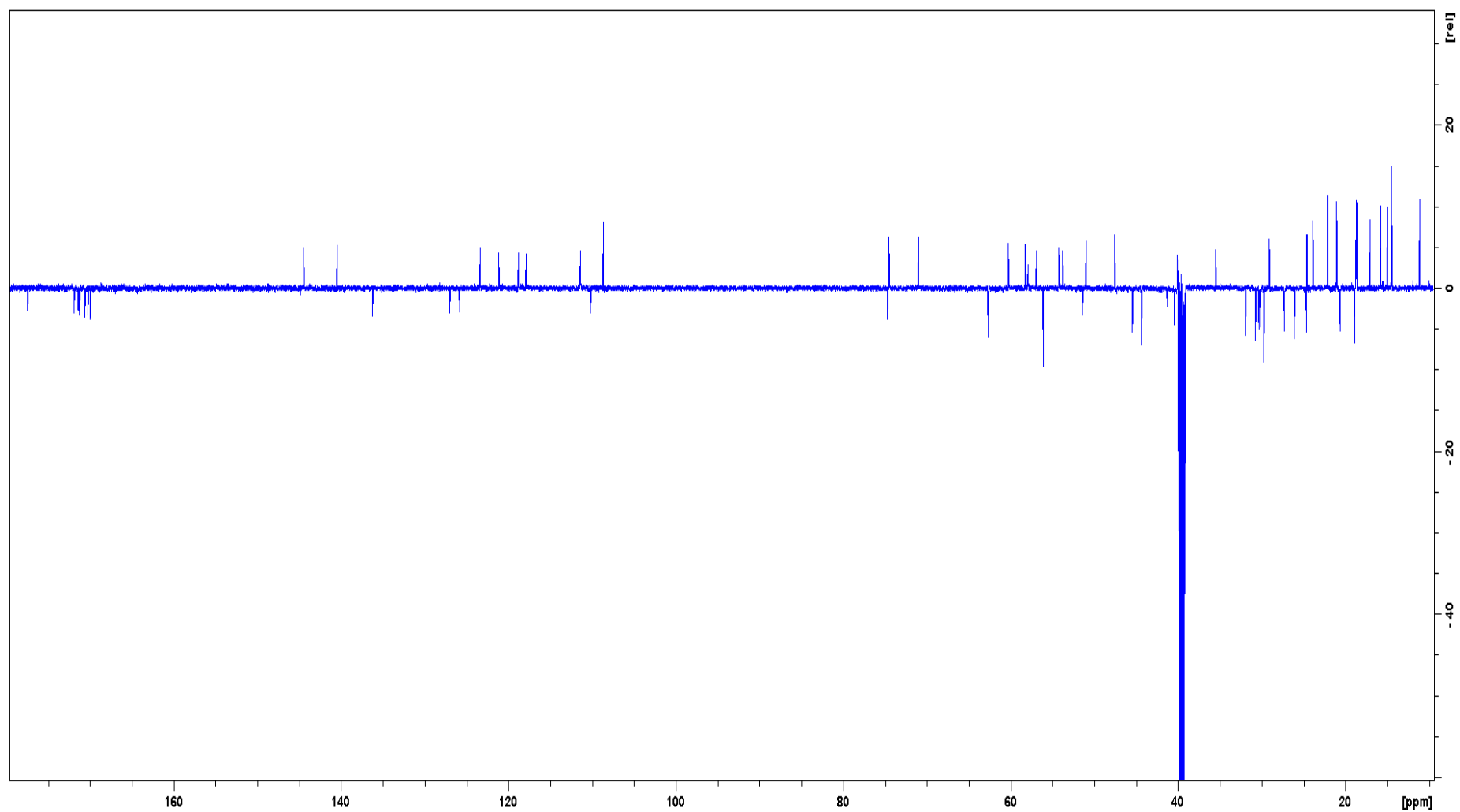
APÊNDICE C: Espectro de massa HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS obtido da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



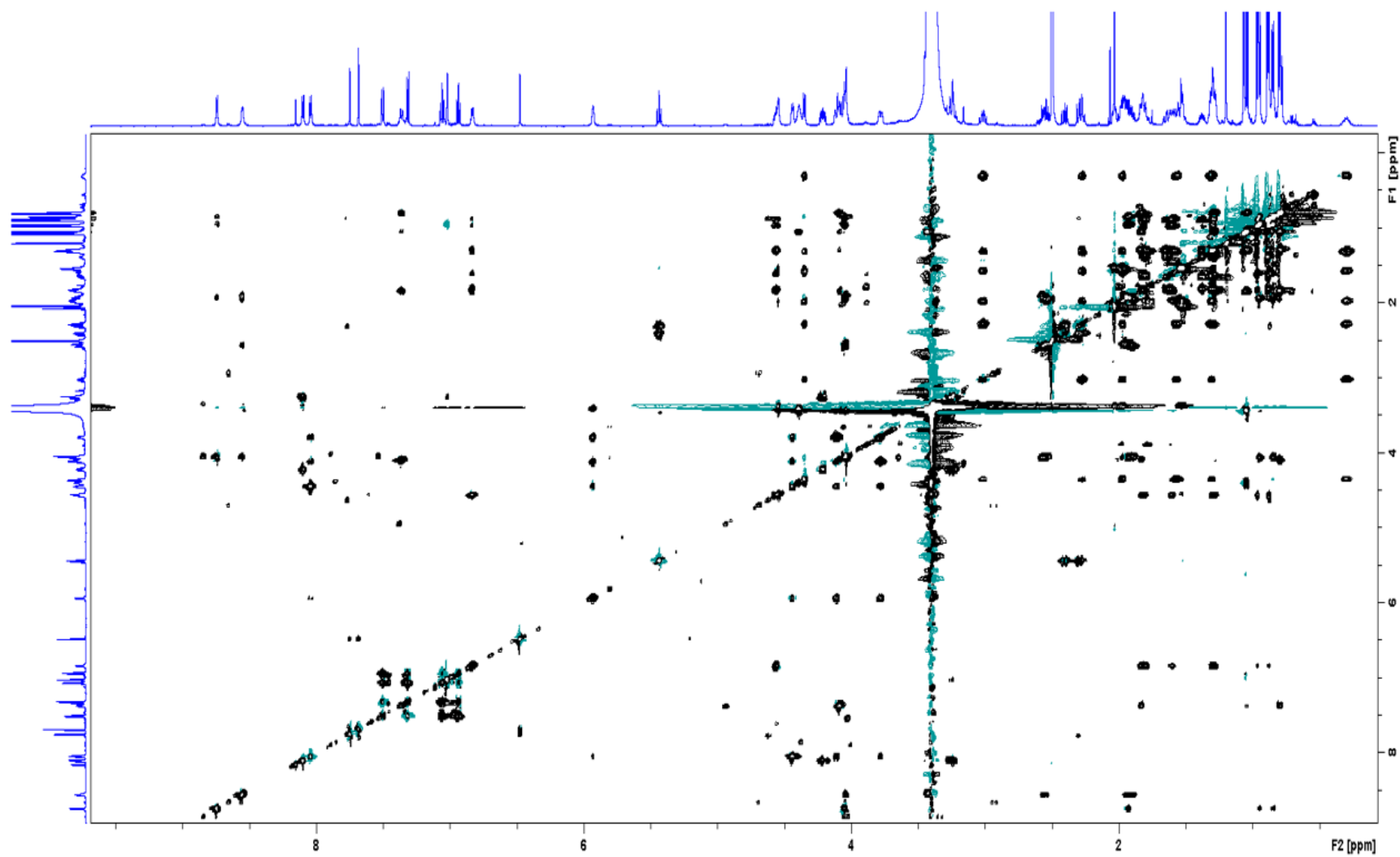
APÊNDICE D:Espectro de ^1H da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



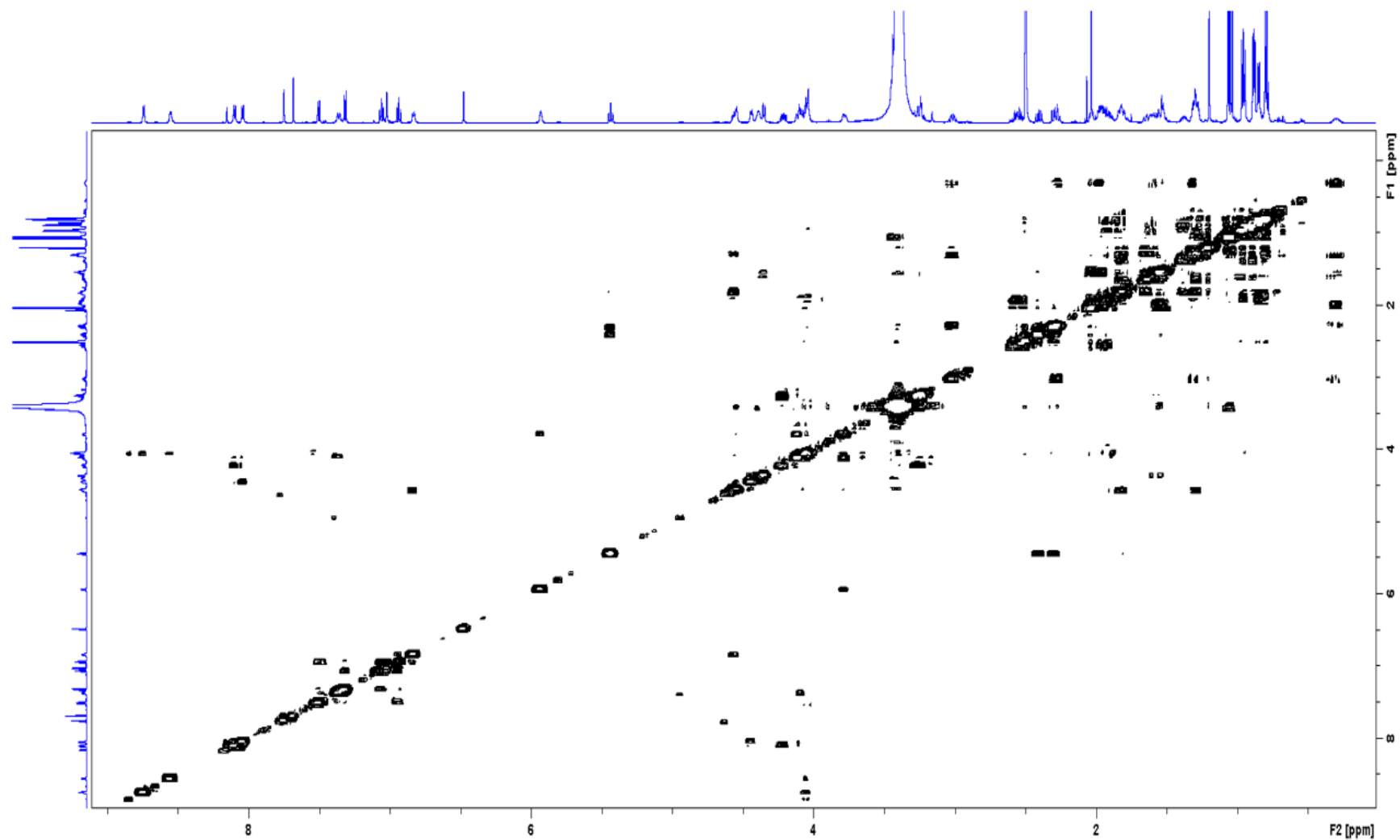
APÊNDICE E: Espectro de DEPTq da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



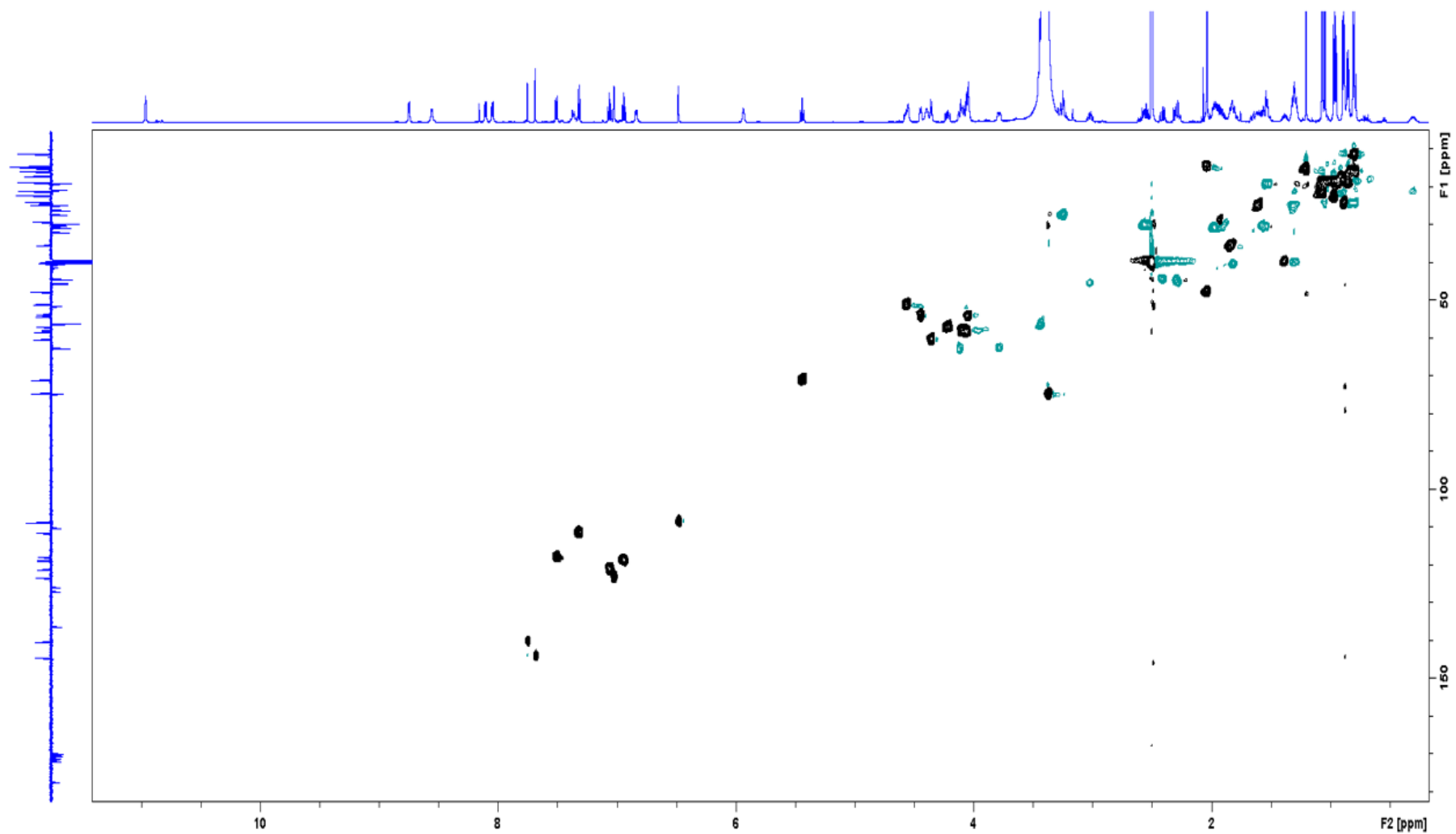
APÊNDICE F: Mapa de contorno TOCSY 2D da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



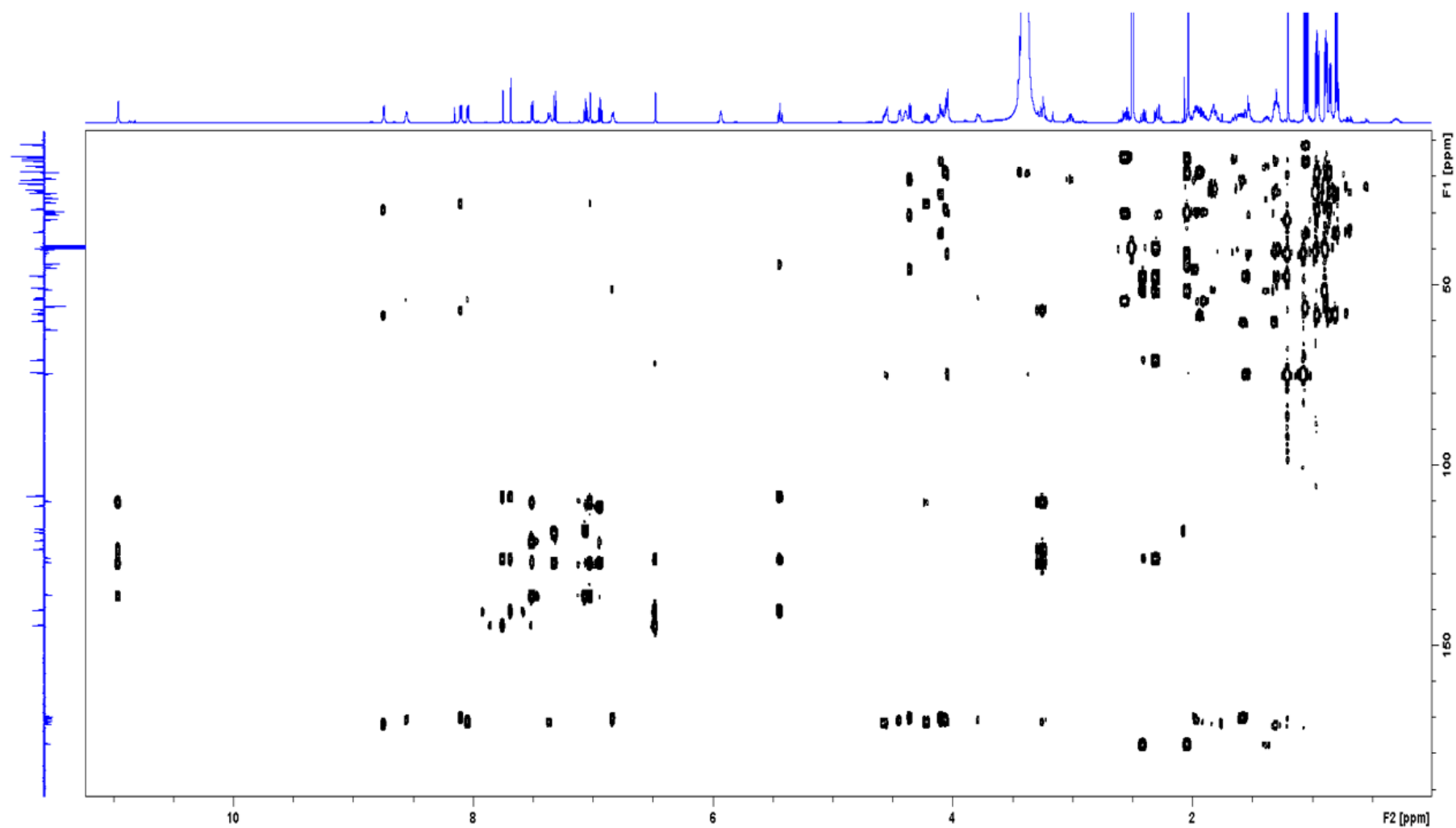
APÊNDICE G: Mapa de contorno COSY da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



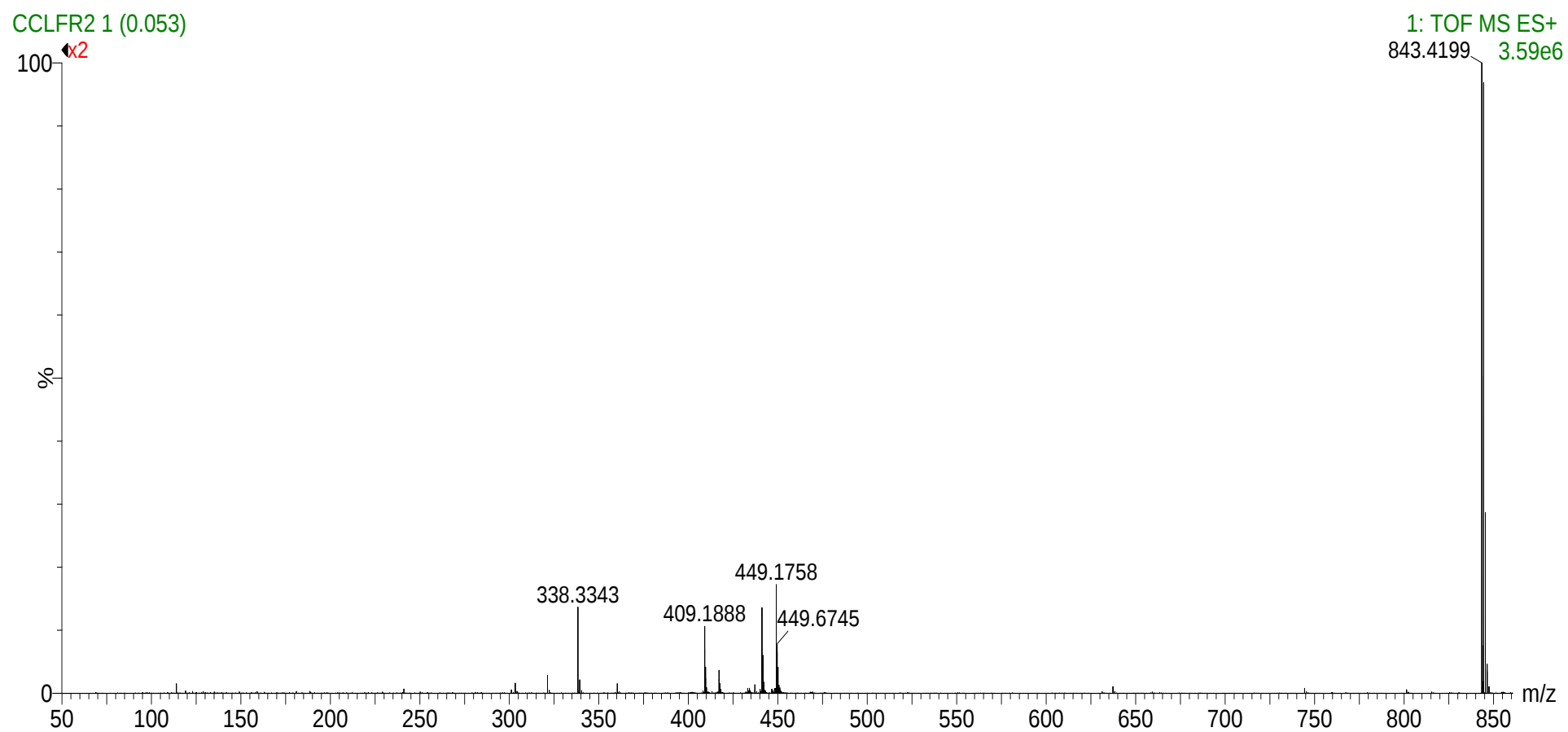
APÊNDICE H: Mapa de contorno HSQC da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



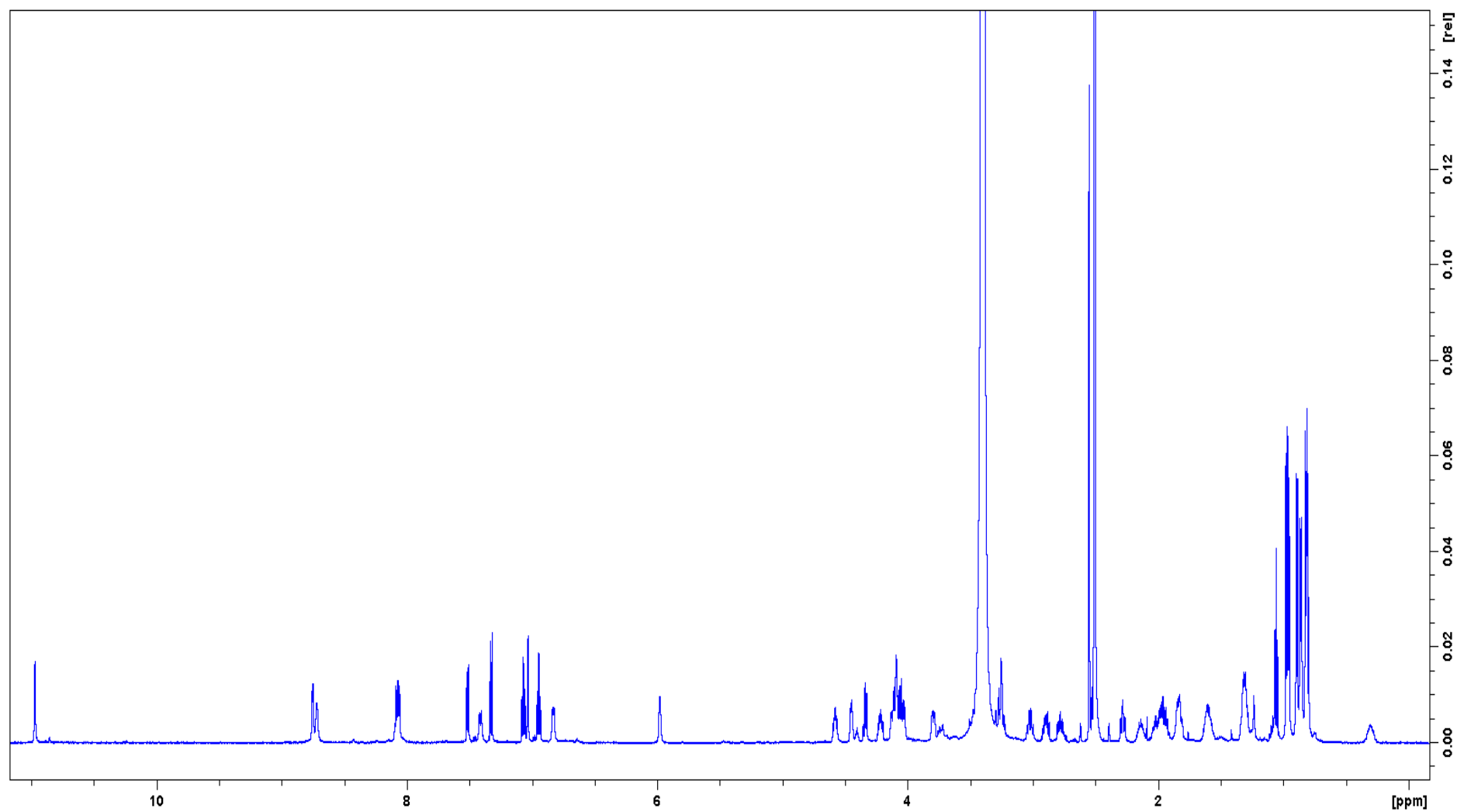
APÊNDICE I: Mapa de contorno HMBC da fração Fr.4 isolada do látex de *C. campanulatus*.



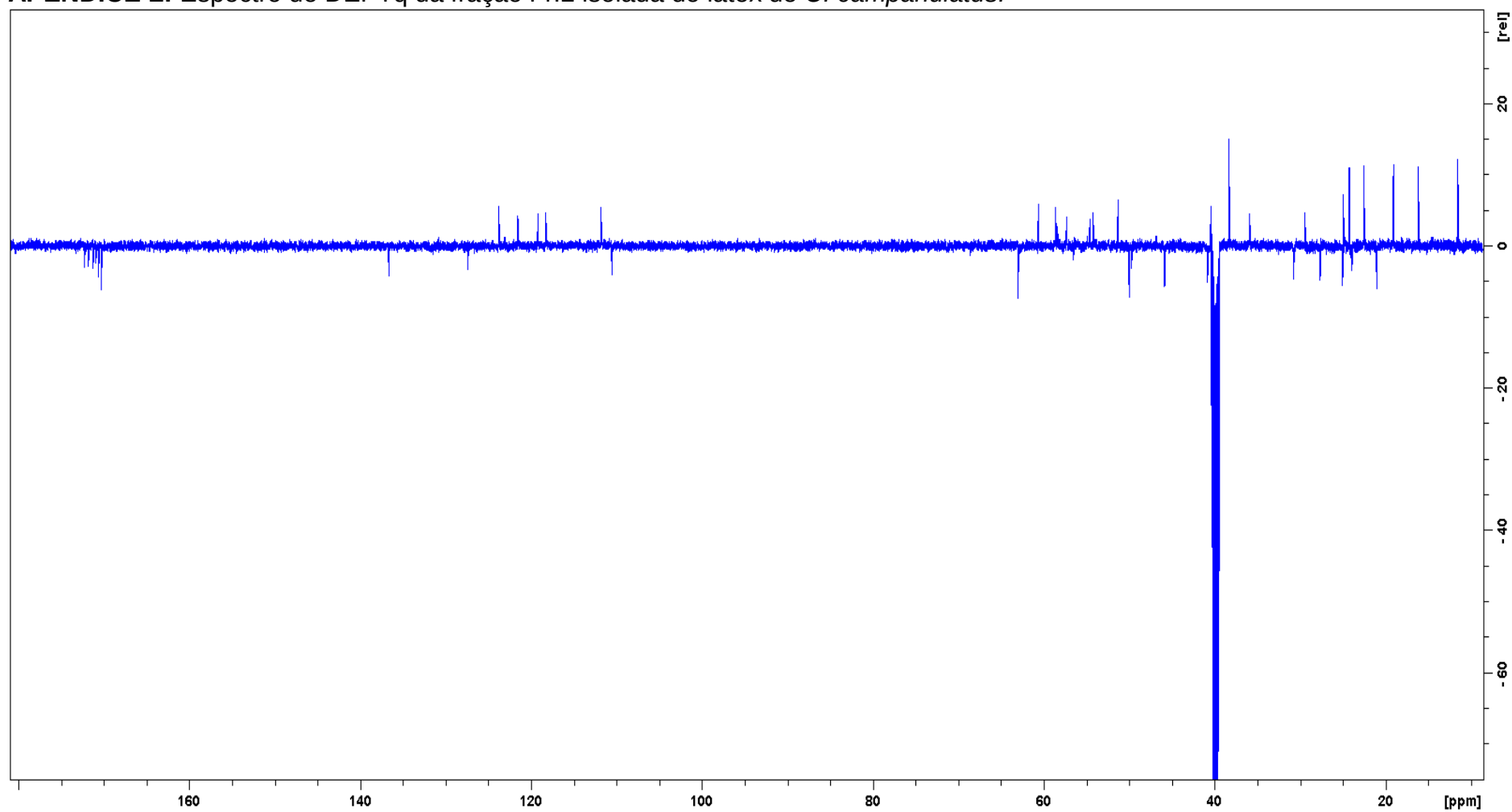
APÊNDICE J: Espectro de massa HR-ESI-(+)-Q-TOF-MS obtido da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*.



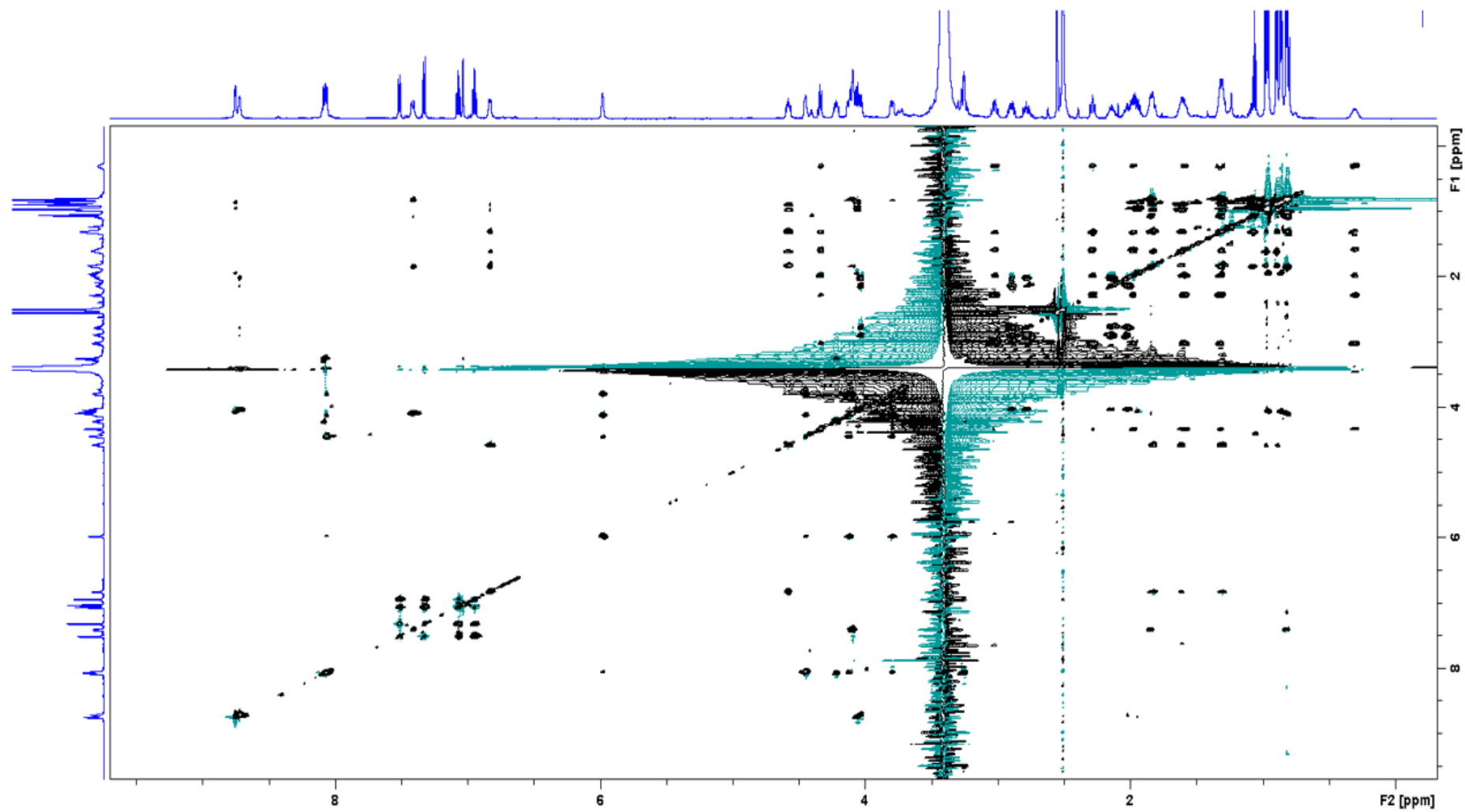
APÊNDICE K:Espectro de ^1H da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*.



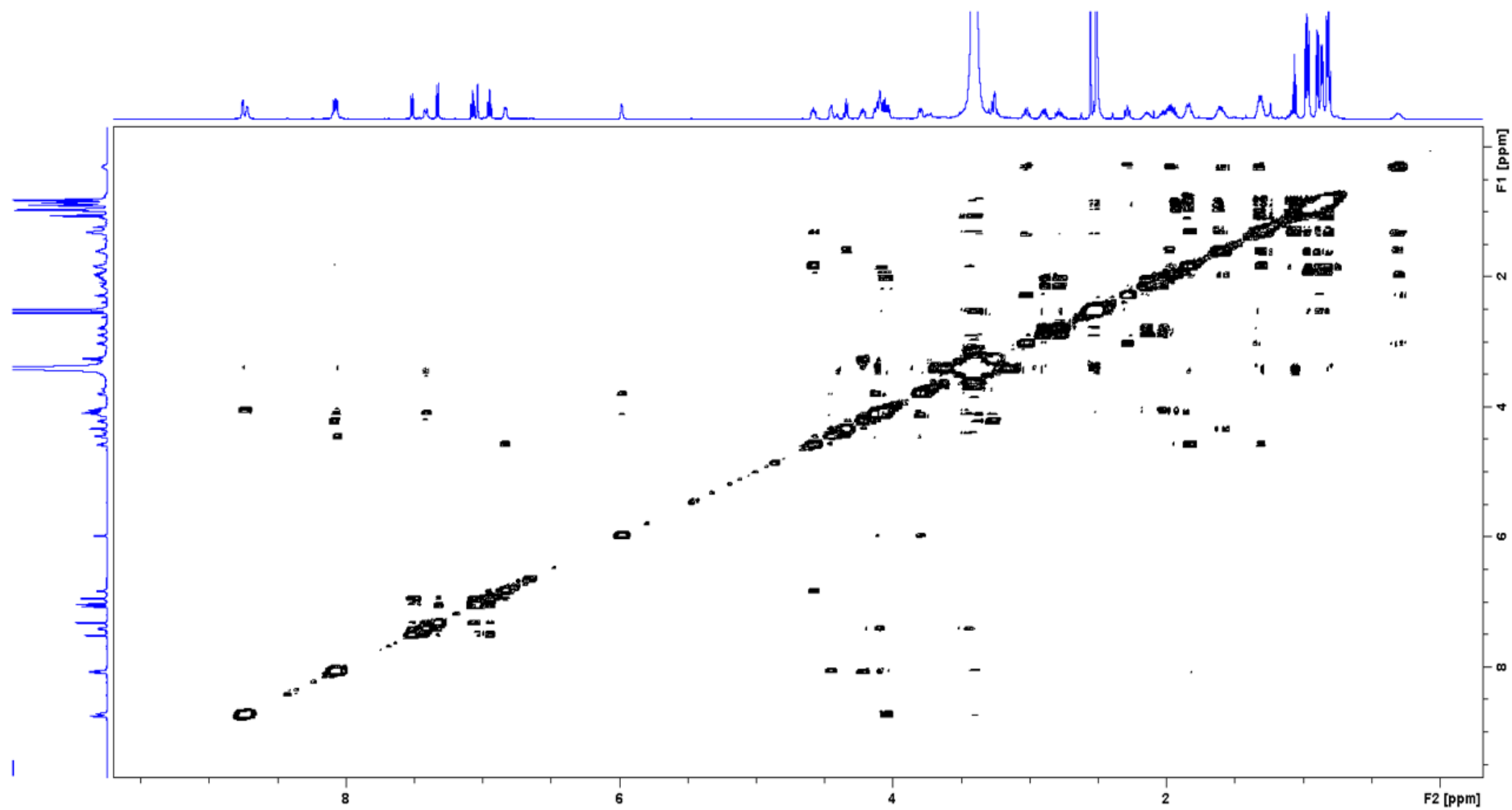
APÊNDICE L: Espectro de DEPTq da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*.



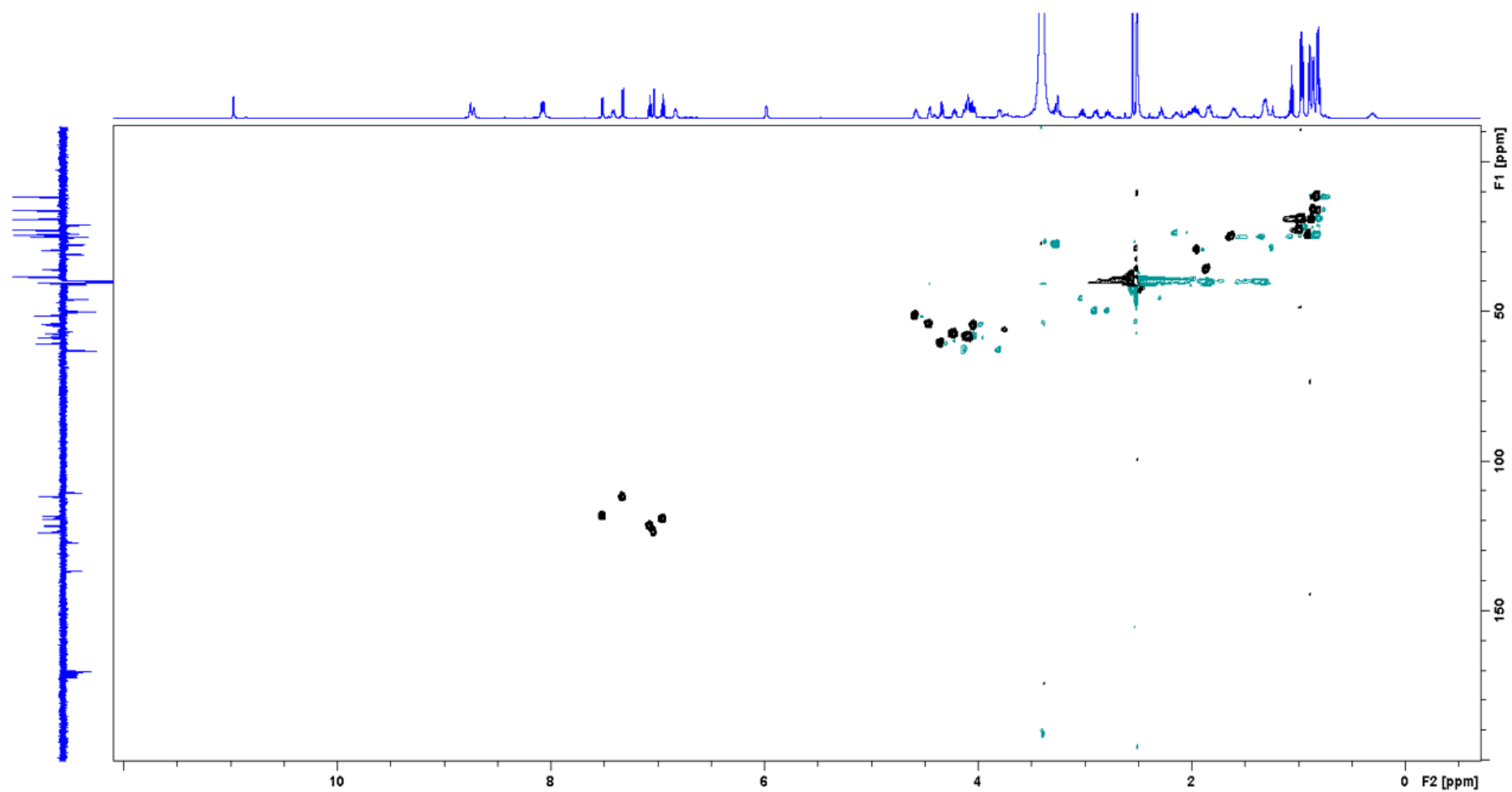
APÊNDICE M: Mapa de contorno TOCSY 2D da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*.



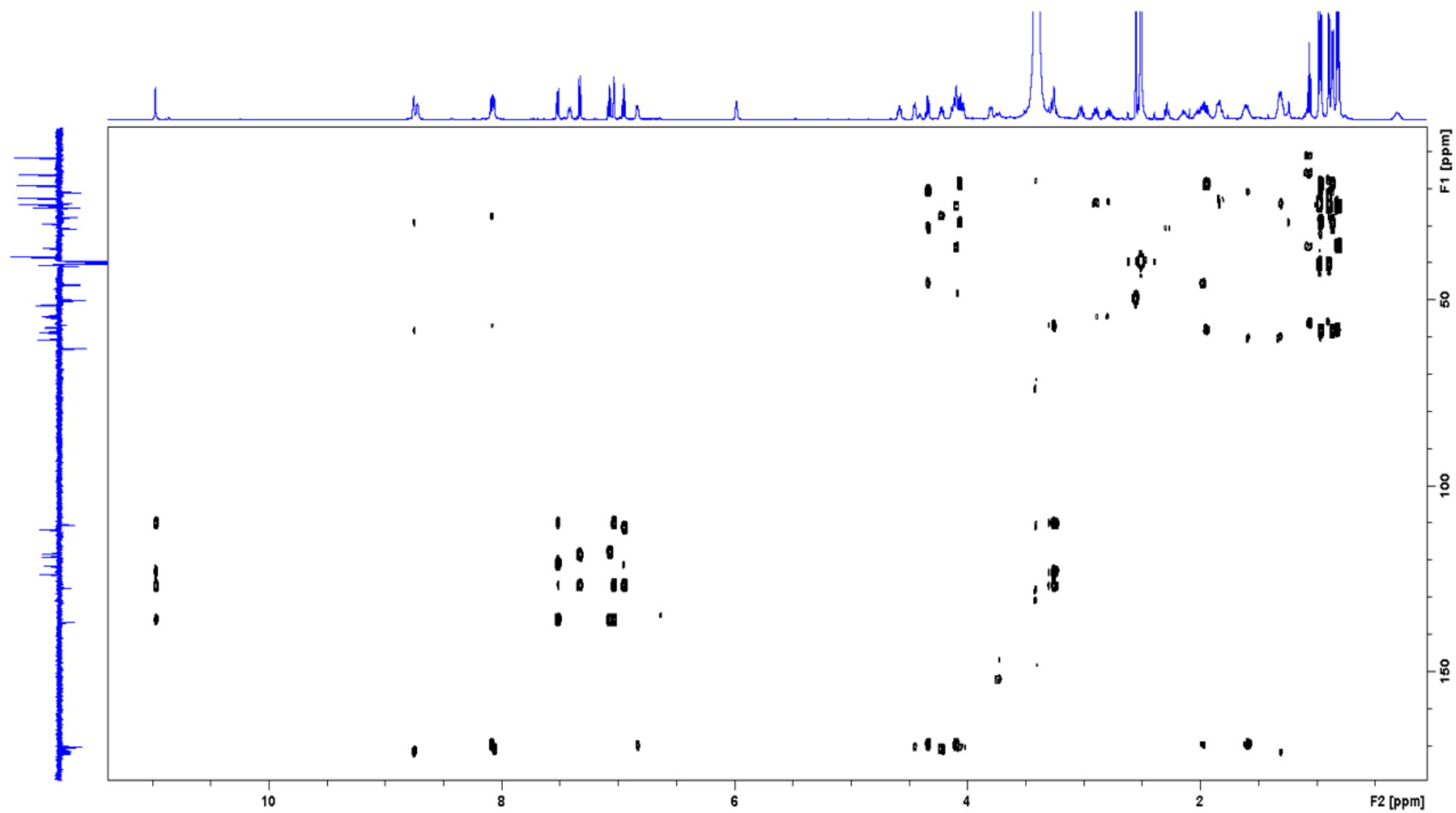
APÊNDICE N: Mapa de contorno COSY da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*



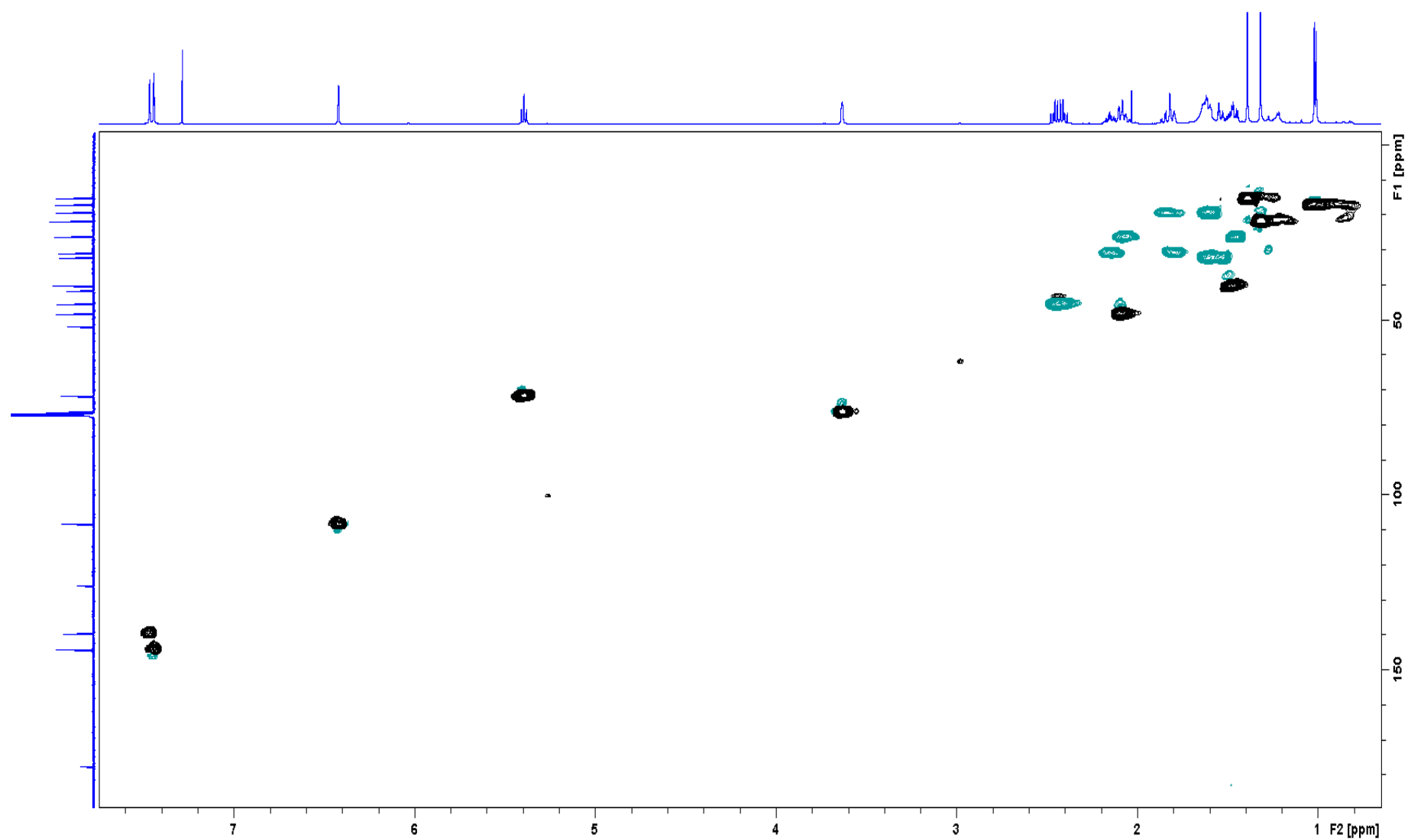
APÊNDICE O: Mapa de contorno HSQC da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*



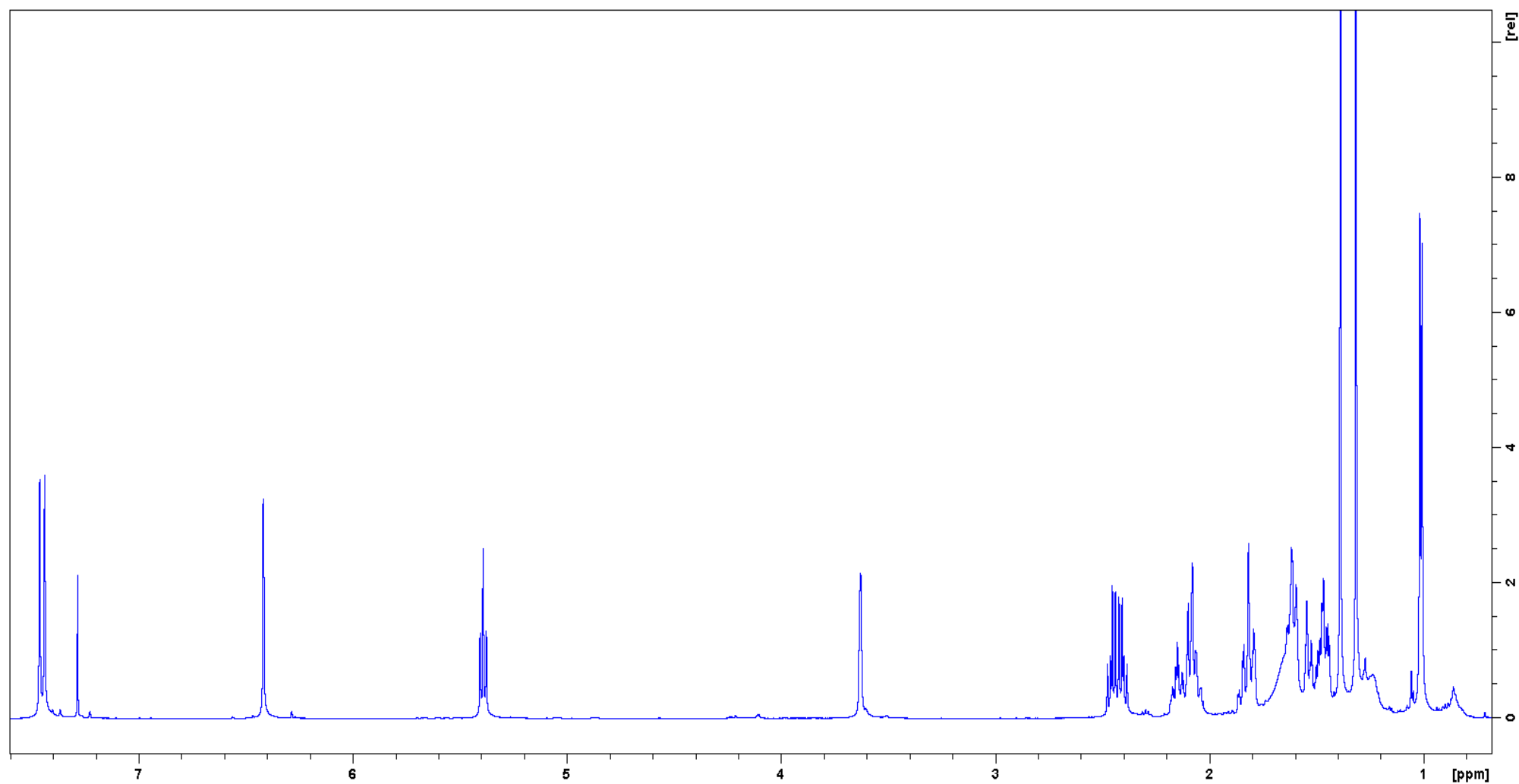
APÊNDICE P: Mapa de contorno HMBC da fração Fr.2 isolada do látex de *C. campanulatus*.



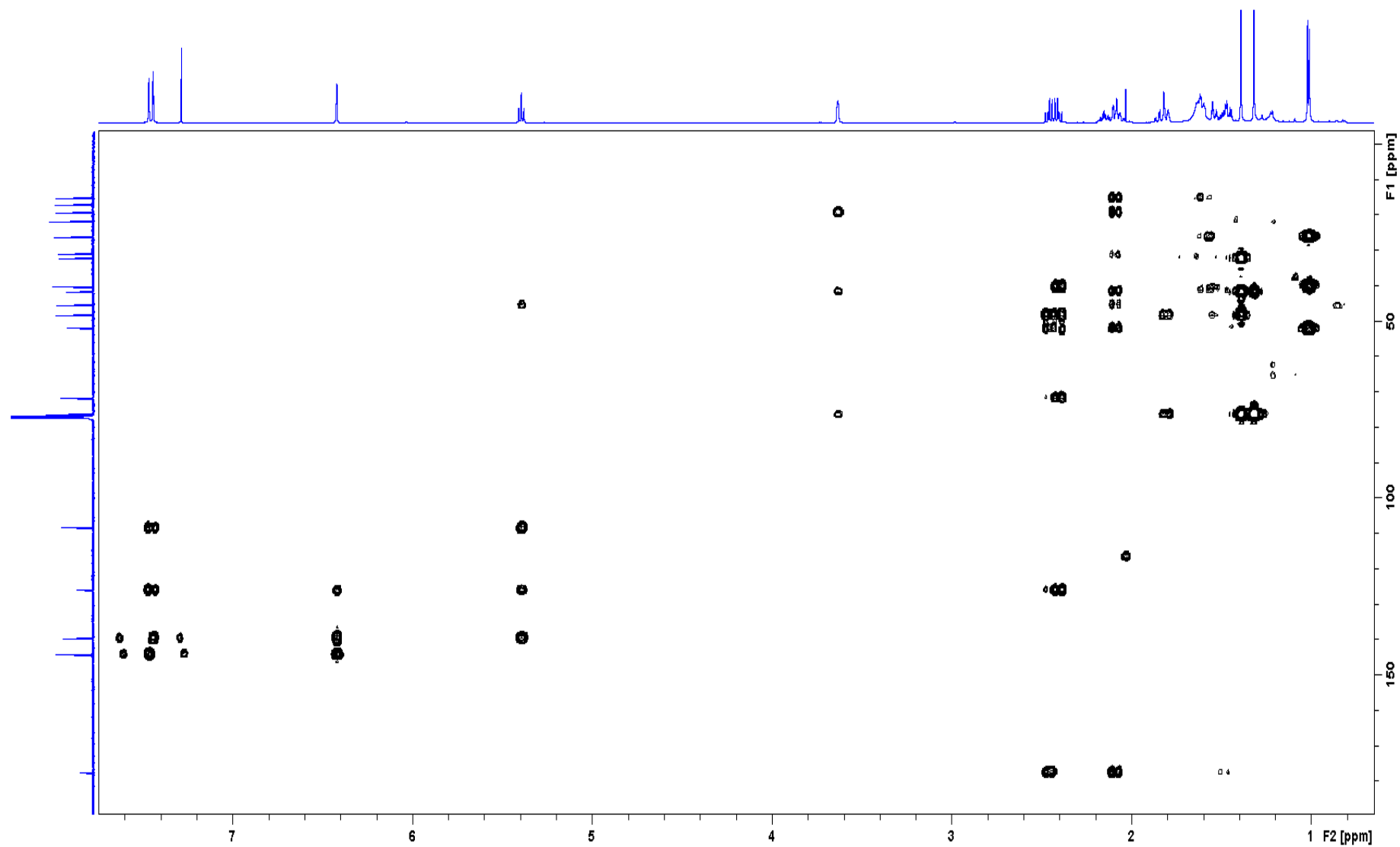
APÊNDICE Q: Mapa de contorno HSQC da substância Fr.3 isolada da raiz de *C. floribundus*.



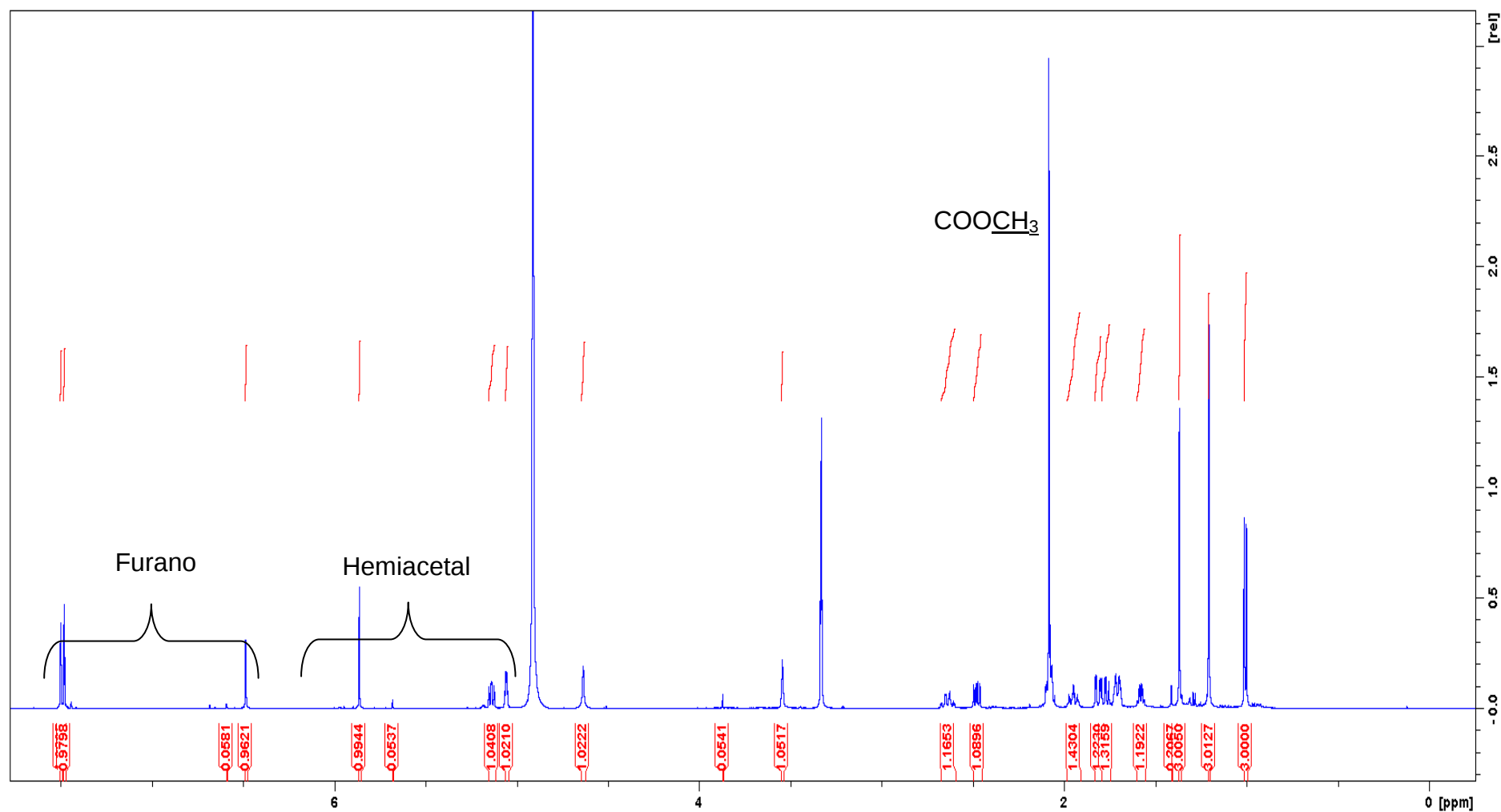
APÊNDICE R: Espectro de ^1H da substância Fr.3 isolada da raiz de *C. floribundus*.



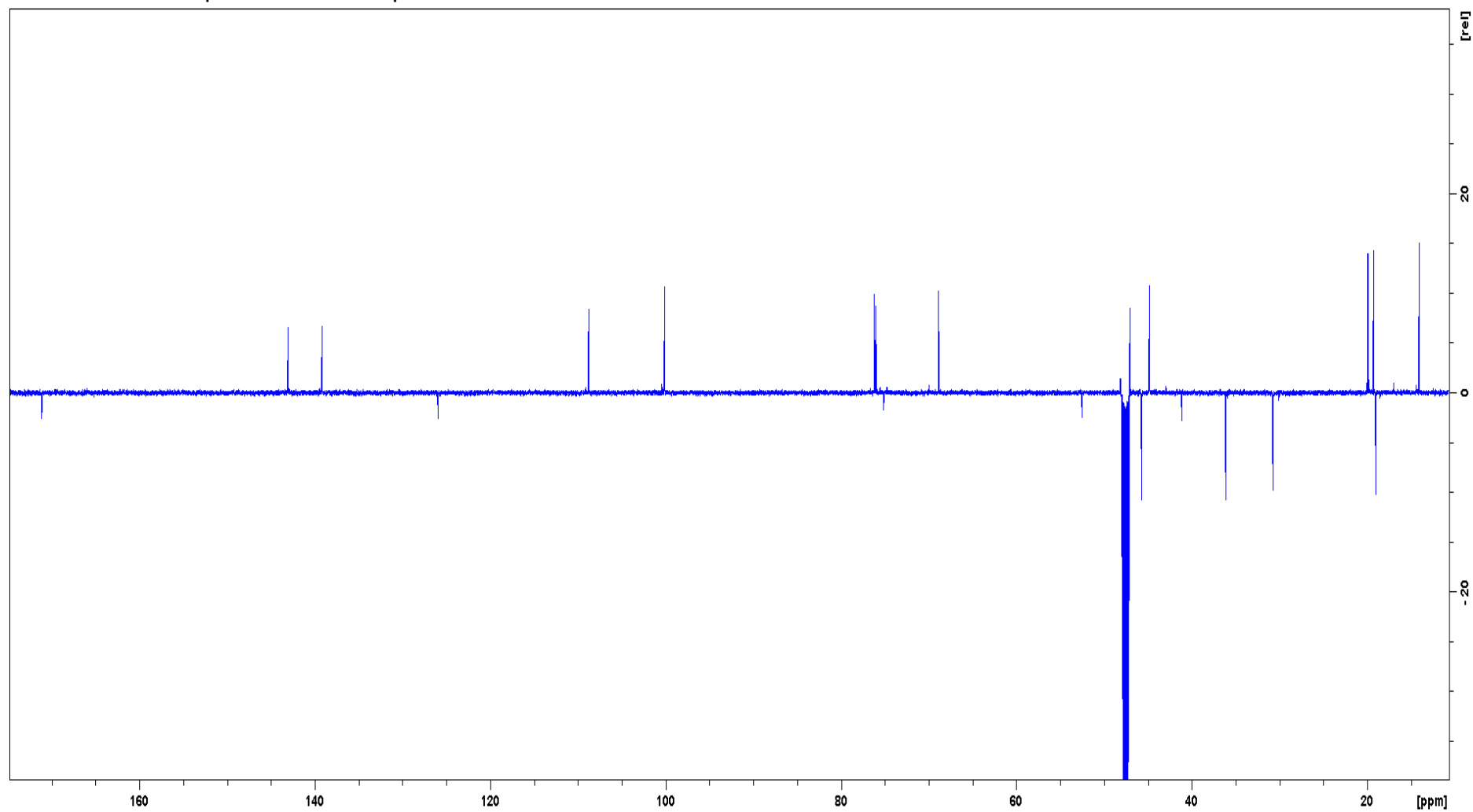
APÊNDICE S: Mapa de contorno HMBC obtido da fração Fr.3, isolada da raiz de *C. floribundus*.



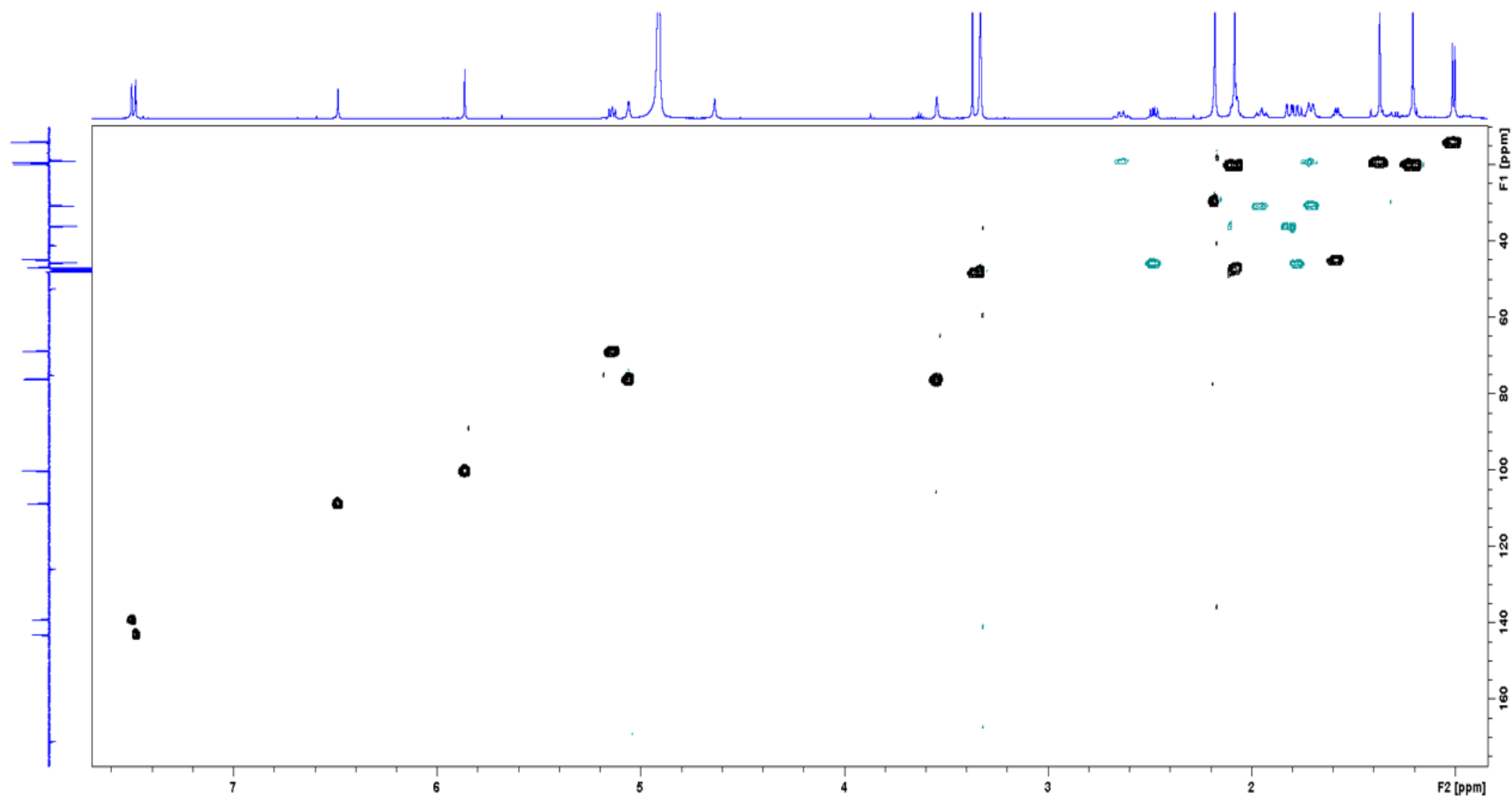
APÊNDICE T: Espectro de ^1H da substância Fr.1, isolada da raiz de *C. floribundus*.



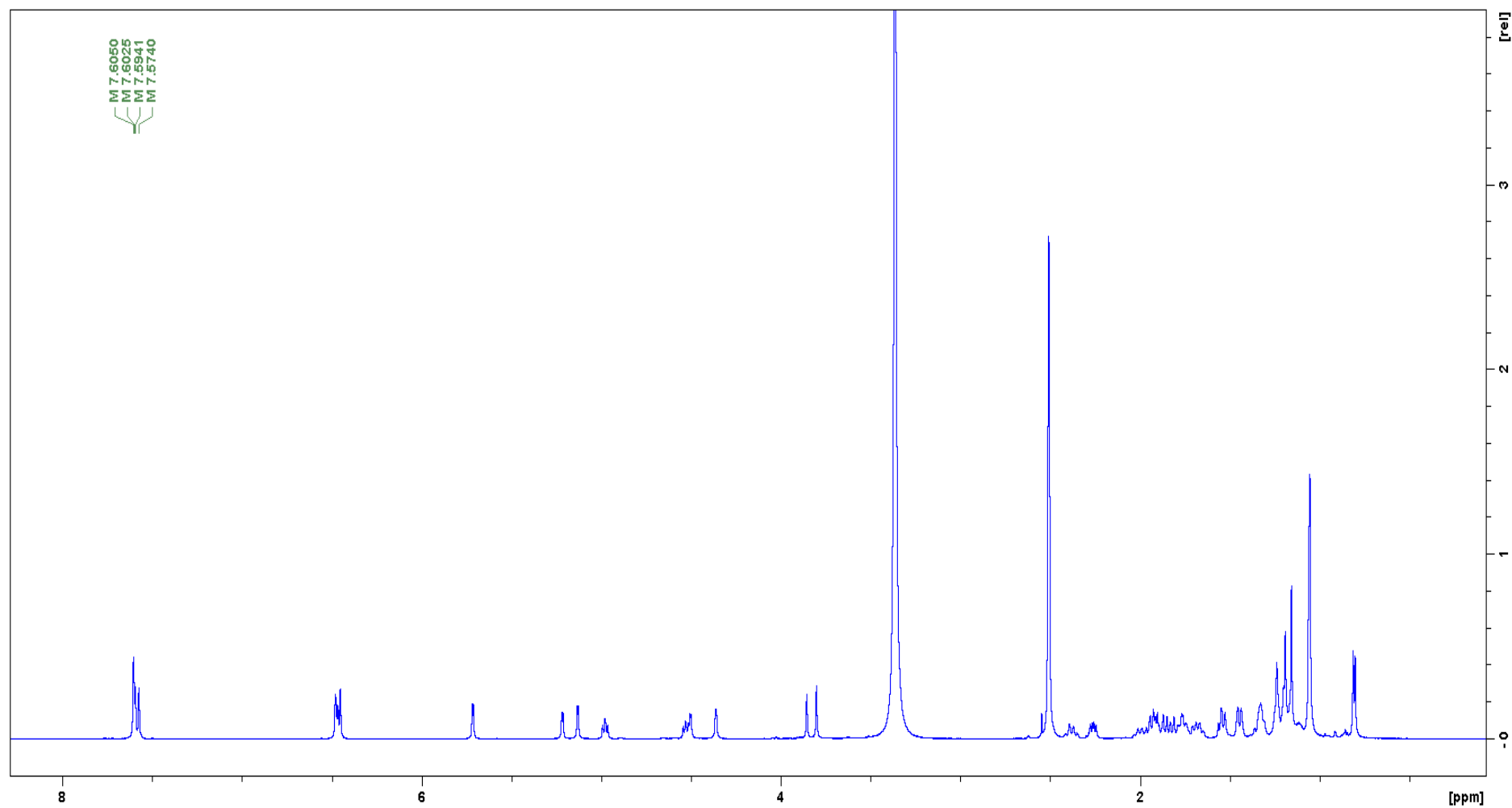
APÊNDICE U: Espectro de DEPTq da Substância A, isolada da raiz de *C. floribundus*



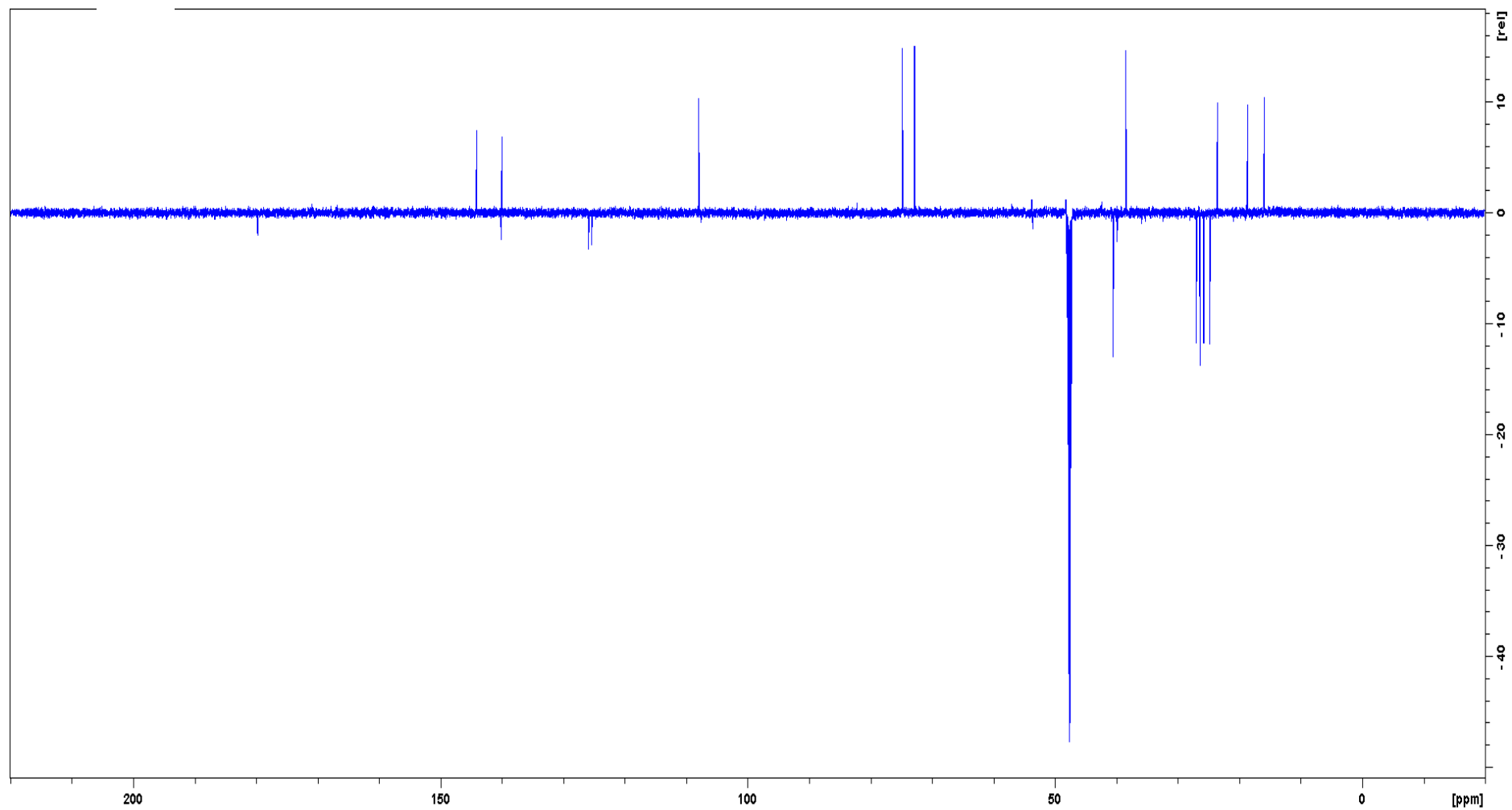
APÊNDICE V: Mapa de contorno HSQC da Substância A, isolada da raiz de *C. floribundus*.



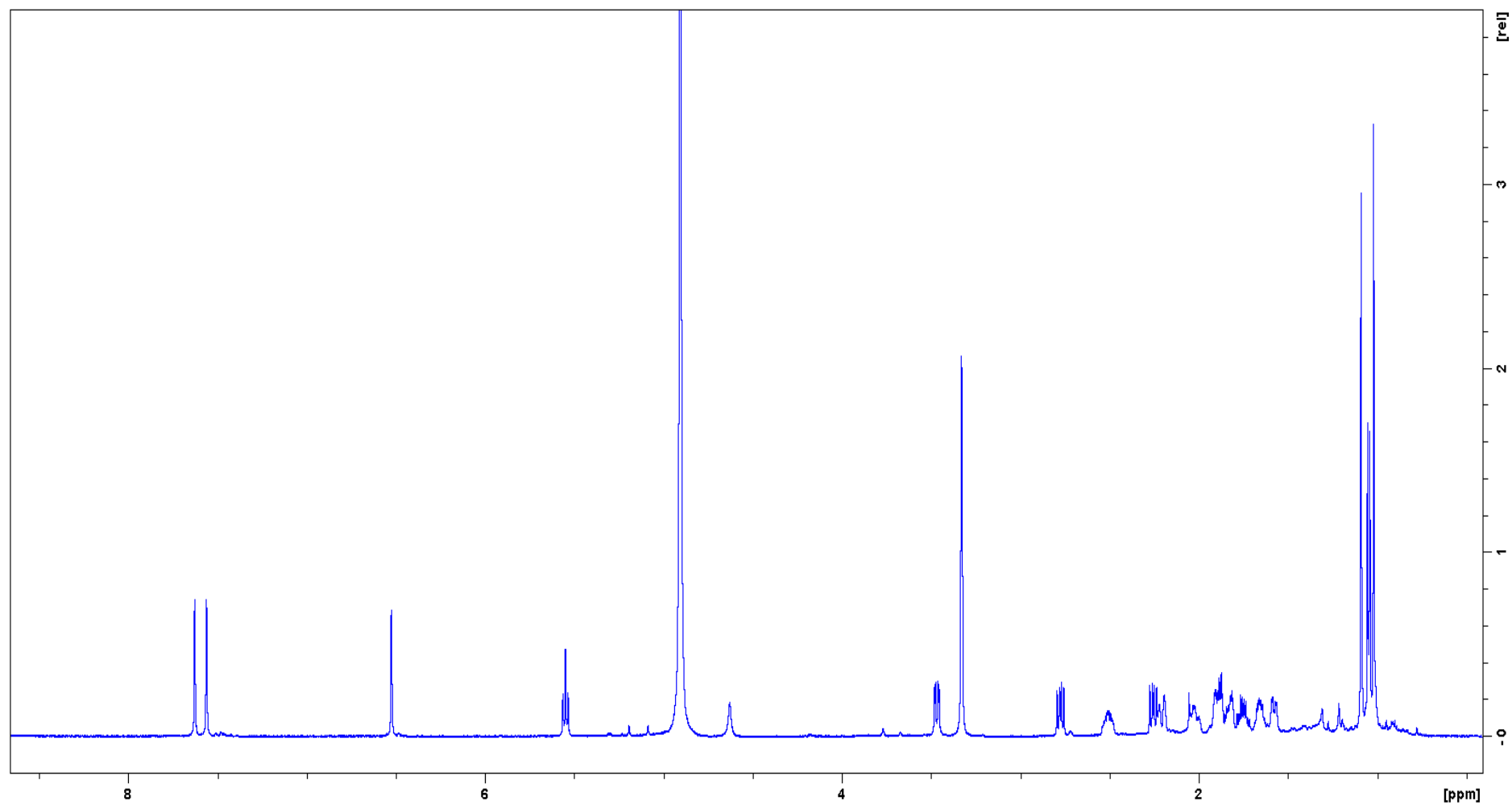
.APÊNDICE W: Espectro de ^1H da fração Fr.2, isolada da raiz de *C. floribundus*.



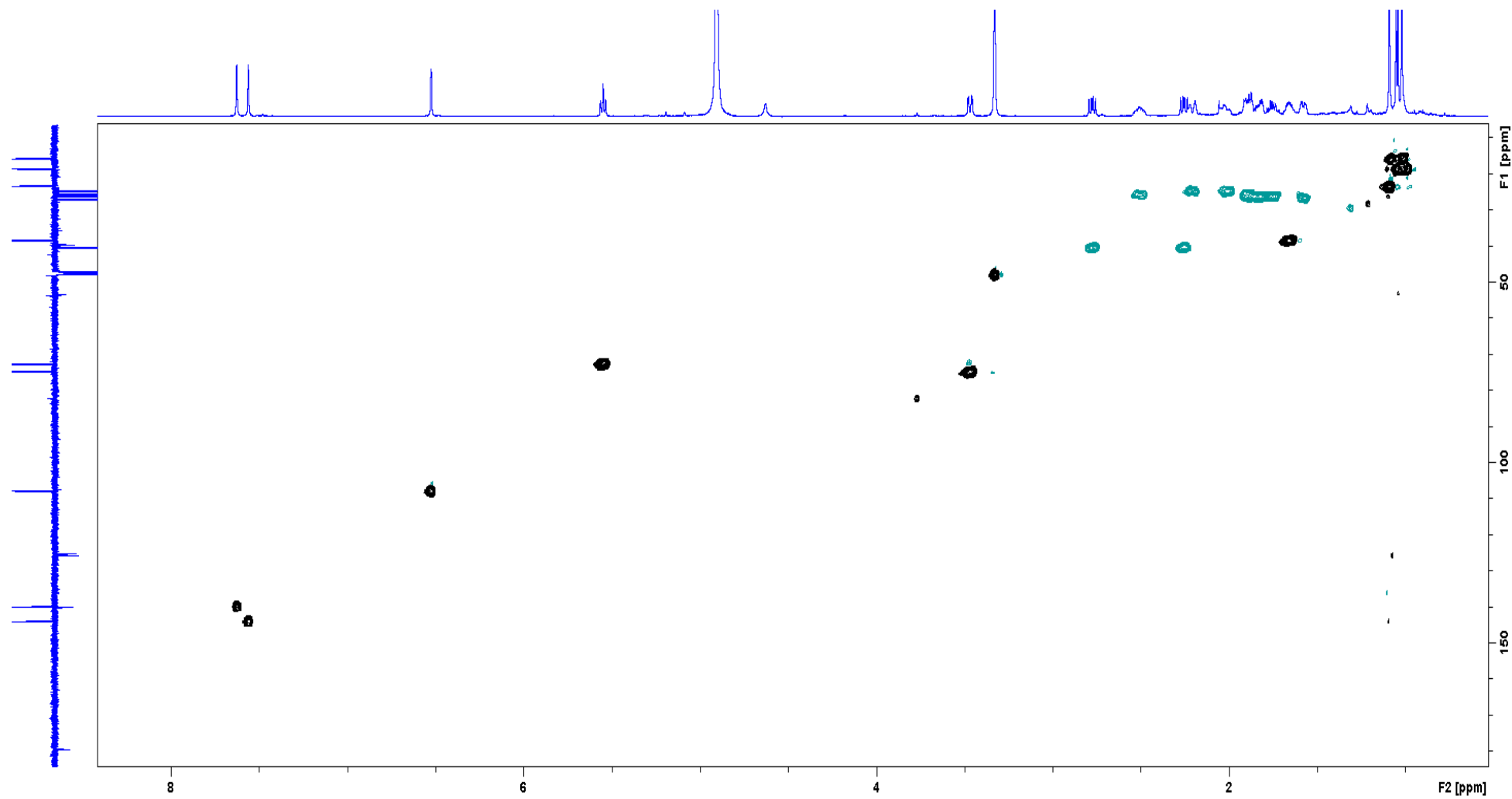
APÊNDICE X • Espectro de DEPTq da fração Fr.4 isolada do látex de *C. floribundus*.



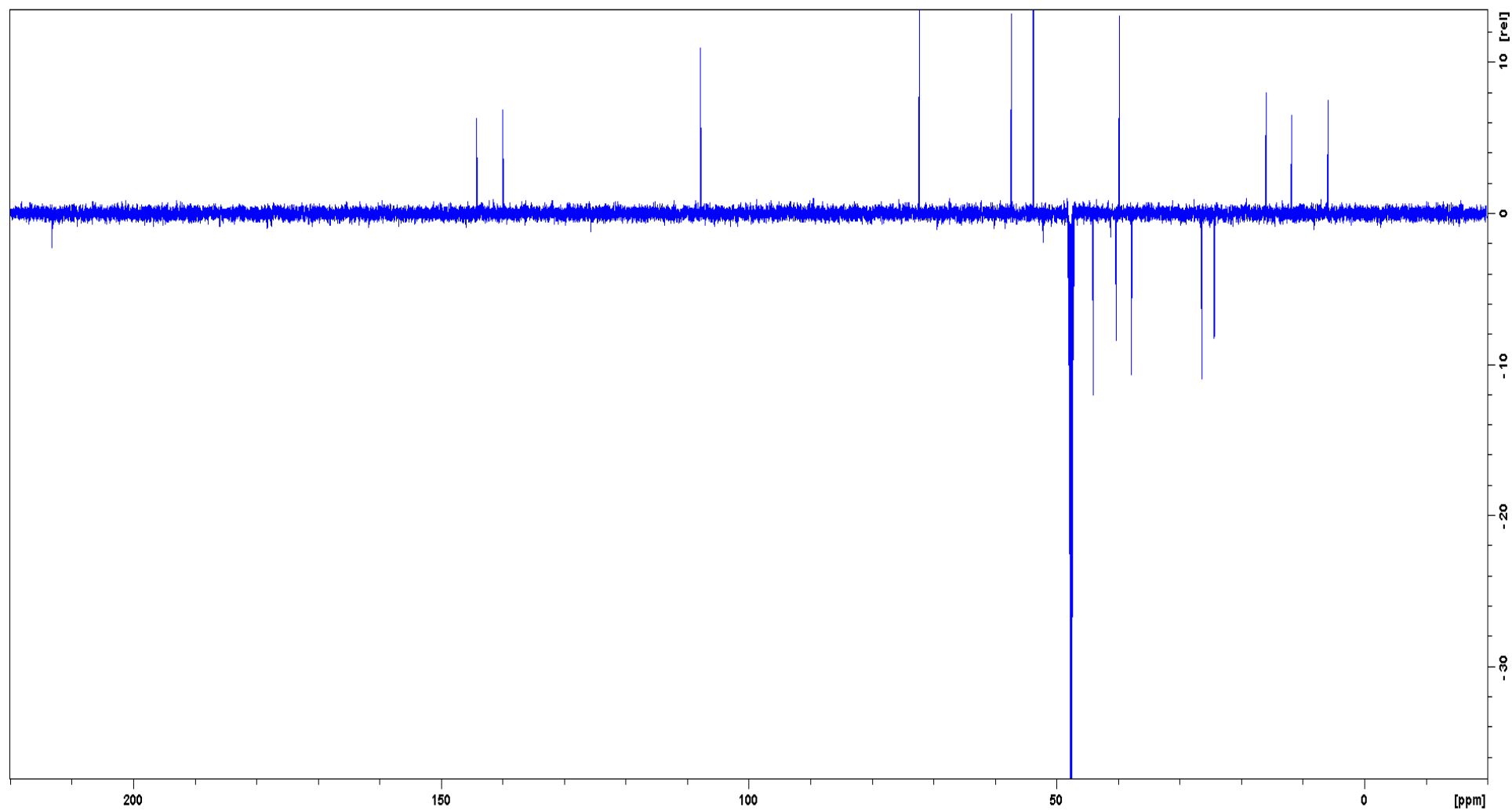
APÊNDICE Y: Espectro de ^1H da fração Fr.4 isolada da raiz de *C. floribundus*.



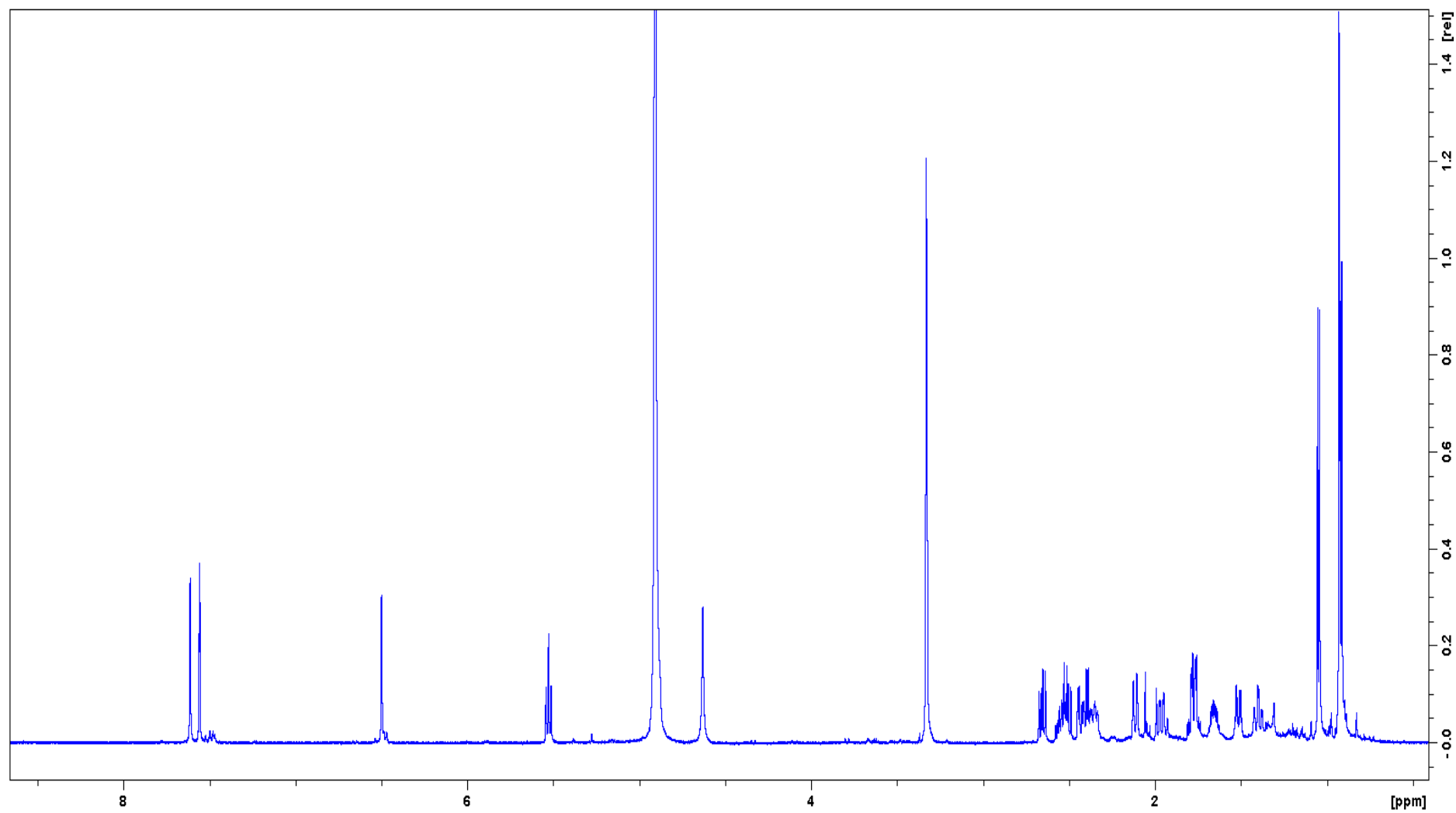
APÊNDICE Z: Espectro de HSQC da fração Fr.4 isolada da raiz de *C. floribundus*.



APÊNDICE AA: Espectro de DEPTq da fração Fr.5 isolada da raiz de *C. floribundus*.



APÊNDICE BA: Espectro de ^1H da fração Fr.5 isolada da raiz de *C. floribundus*.



APÊNDICE CA: Espectro de HSQC da fração Fr.5 isolada da raiz de *C. floribundus*.

