



Flavonóides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)

Paula M.L. dos Santos^{1*}, Jan Schripsema², Ricardo M. Kuster¹

¹Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Bloco H, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil

RESUMO: Do extrato butanólico de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae) foram isolados quatro flavonóides, todos *O*-glicosídeos da quercetina. Estas substâncias foram identificadas como 3-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina (**1**), 3-*O*-β-D-galactopiranosil quercetina (hiperina) (**2**), 3-*O*-α-L-arabinopiranosil quercetina (guaijaverina) (**3**) e 3-*O*-α-L-ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (**4**). O presente trabalho relata a presença destas substâncias pela primeira vez para esta espécie de *Croton*, cuja elucidação estrutural deu-se por espectroscopia em UV, EM e RMN, incluindo as técnicas bidimensionais: ¹H-¹H (2D NOESY, 2D COSY), ¹H-¹³C (2D HETCOR) e ¹³C (APT), além de comparações com os dados da literatura.

Unitermos: *Croton campestris*, Euphorbiaceae, flavonóides *O*-glicosilados, quercetina.

ABSTRACT: "Glycosyl flavonoids from *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)". Four flavonoids were isolated from the butanolic extract of the aerial parts of *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). These compounds were identified as 3-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-galactopyranoside quercetin (**1**), 3-*O*-β-D-galactopyranoside quercetin (hyperin) (**2**), 3-*O*-α-L-arabinopyranoside quercetin (guaijaverin) (**3**) and 3-*O*-α-L-ramnopyranoside quercetin (quercitrin) (**4**). They have been isolated for the first time from *Croton campestris*. Their structures were elucidated by UV, MS and NMR experiments including ¹H-¹H (2D NOESY, 2D COSY), ¹H-¹³C (2D HETCOR), ¹³C (APT) and by comparison of the spectral data with those reported in the literature.

Keywords: *Croton campestris*, Euphorbiaceae, flavonoids, quercetin glycosides.

INTRODUÇÃO

A família Euforbiácea possui cerca de 317 gêneros e 7500 espécies. O gênero *Croton*, que possui 700 espécies, é largamente distribuído em regiões quentes da Terra, menos freqüentemente em regiões temperadas e raramente em regiões frias (Heluani et al., 2000). A espécie *Croton campestris*, popularmente conhecida como velame-do-campo, é um arbusto de 1-2 metros de altura originário do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste (Corrêa, 1975), possuindo largo emprego popular como poderoso depurativo, usado no combate à escrofulose, doenças venéreas, impingens, tumores, moléstias de pele, reumatismo, úlcera do útero, diarreia e artrite (Cruz, 1982).

O gênero *Croton* é uma fonte rica em diterpenos, principalmente os do tipo clerodano (Puebla et al., 2002). Das raízes desta espécie foram isolados anteriormente três diterpenos: velamolona, velamona e acetato de velamolona (Babili et al., 1998). Entretanto, alguns trabalhos relatam a presença de flavonóides em algumas espécies do gênero como em *Croton zambezicus* onde cinco flavonóides *C*-glicosilados foram isolados (Wagner

et al., 1970), dois derivados de quercetina eterificados isolados de *Croton schiedeana* (Guerrero et al., 2002) e tilirosídeo de *Croton gnaphalii* (Lencina et al., 2001).

Este artigo descreve a identificação de quatro flavonóides *O*-glicosilados encontrados em *Croton campestris*, todos descritos pela primeira vez para esta espécie vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro JEOL Eclipse a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C), sendo as amostras solubilizadas em DMSO-*d*₆. Os espectros de massas foram obtidos por inserção direta em aparelho CLAE/EM Micromass ZMD pela técnica electrospray ionization-ESI. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatofolhas de gel de sílica 60F₂₅₄ (Merck), utilizando-se como reagentes cromogênicos o NP (diphenylboric acid 2-aminoethyl ester) da Spectrum e PEG (poliethylenoglycol) da Vetec. A cromatografia em coluna de média pressão (CLMP)

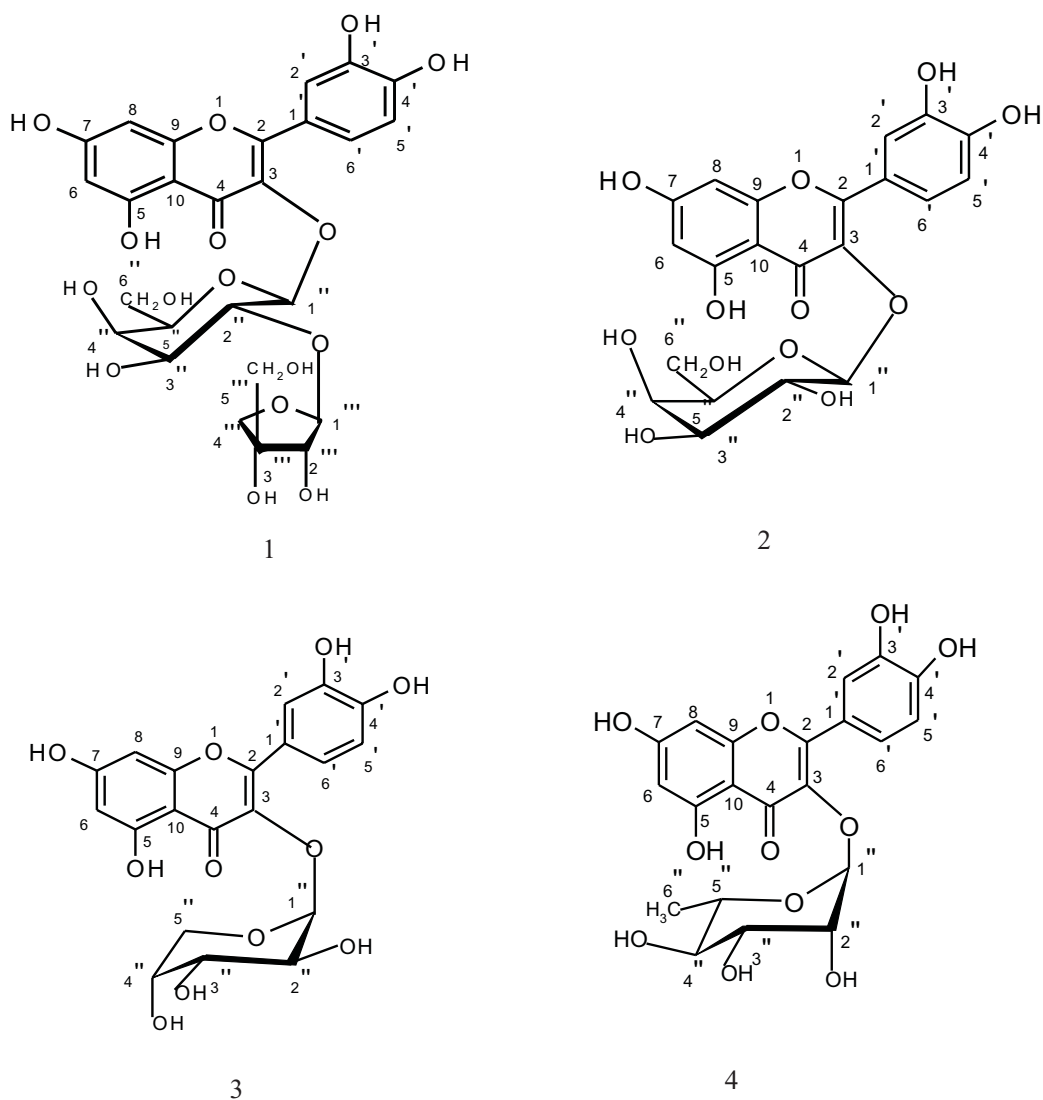


Figura 1. Flavonóides *O*-glicosilados de *Croton campestris*: 3-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)-galactopiranosil quercetina (1), 3-*O*- β -D-galactopiranosil quercetina (hyperina) (2), 3-*O*- α -L-arabinopiranosil quercetina (guaijaverina) (3) e 3-*O*- α -L-ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (4).

foi feita em coluna SR 10/50 utilizando-se como fase estacionária a resina Toyopearl HW-40C. A cromatografia líquida de alta eficiência (CALAE) foi feita em aparelho Shimadzu CBN 10 A com bomba LC-10 e detector Diodearray SPD-M10A, coluna Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) – Merck.

Material vegetal

As partes aéreas de *Croton campestris* (1 Kg) foram fornecidas pela empresa Flora Medicinal J. Monteiro da Silva Ltda, cuja identificação foi realizada pelo Dr. Ricardo Lainetti do Laboratório de Farmacobotânica, Faculdade de Farmácia, UFRJ, RJ. O referencial da espécie encontra-se depositado no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (n° 208978).

Extração, purificação e identificação das substâncias

O material já seco e moído (1 Kg), foi macerado em metanol por uma semana. O filtrado foi concentrado à pressão reduzida obtendo-se 22,7 g do extrato bruto (EB). O EB foi submetido à partição em hexano, diclorometano, acetato de etila e água em funil de separação. O fracionamento foi direcionado para o isolamento de flavonóides glicosilados, portanto, as frações em acetato de etila e em água foram submetidas à CCD analítica em gel de sílica e reveladas com uma solução de aminoetilfenilborato a 1% em etanol (NP) e polietilenoglicol a 5% em etanol (PEG) para a detecção de flavonóides. A fração aquosa apresentou grande concentração de flavonóides e foi novamente particionada em butanol. A fração butanólica foi analisada por CCD de gel de sílica onde foi detectada a presença de flavonóides.

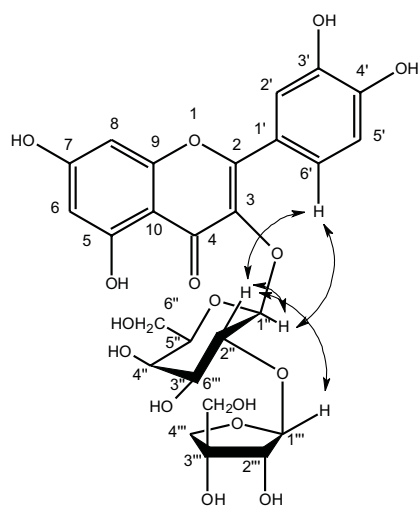


Figura 2. Correlações H-H pela técnica NOESY para a substância **1**.

O solvente foi evaporado à pressão reduzida, obtendo-se 4,12 g de extrato. O concentrado foi dissolvido em metanol:água (3:7) e filtrado. O filtrado foi concentrado à pressão reduzida, resultando em 3,15 g de extrato que foi aplicado em coluna de média pressão (CLMP), utilizando-se como fase móvel MeOH:H₂O (3:7), MeOH:H₂O (1:1), MeOH:H₂O (7:3) e MeOH puro. As 87 frações recolhidas da coluna foram cromatografadas em CCD de gel de sílica para serem reunidas por semelhança, utilizando-se como eluente o sistema AcOEt:AcOH:HCOOH:H₂O (100:11:11:27) para a eluição de 1-25 e AcOEt:MeOH:H₂O (8:1,5:0,5) de 26 em diante. Das frações 30-31 isolou-se a substância **1** (33,4 mg), de 44-48 a substância **2** (87,7 mg) e de 54-55 a mistura de **3** e **4** (25 mg). As substâncias isoladas assim como as frações acetato de etila e butanólica, foram analisadas por CLAE acoplada a detector de UV em soluções de 1 mg/mL preparadas antes da análise. Os dados cromatográficos foram obtidos em aparelho Shimadzu CBN 10 A com bomba LC-10 AD a um fluxo de 1 mL/min em coluna Lichrosper 100 RP-18 (5µm) Merck. A análise cromatográfica deu-se em gradiente decrescente de polaridade na seguinte programação: ácido trifluoroacético 0,05% em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B): 1-10 min, 10% B linear; 10-40 min 70% B linear. Os dados de UV foram obtidos pelo detector Diodearray SPD-M10A. Para a determinação do peso molecular das substâncias utilizou-se a técnica electrospray ionization (EM-ESI), adequada para substâncias não-voláteis (Crews et al., 1988). Por tratar-se de polifenóis, a obtenção do íon molecular deu-se sob condições de íon negativo (M-H)⁻.

Dados espectroscópicos das substâncias

3-O-β-D-Apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina (**1**). Pó amarelo. UV λ_{max} 354, 259. RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 2). RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 1). EM m/z

(%): [M-H]⁻ 595 (100).

3-O-β-D-Galactopiranosil quercetina (hiperina) (**2**). Pó amarelo. UV λ_{max}/nm 354, 259. RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 2). RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 1). EM m/z (%): [M-H]⁻ 463 (100).

3-O-α-L-Arabinopiranosil quercetina (guaijaverina) (**3**). Pó amarelo. UV λ_{max}/nm 354, 256. RMN¹H (400 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) (ver Tabela 2). RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 1). EM m/z (%): 300 (96), 301 (92), [M-H]⁻ 433 (29).

3-O-α-L-Ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (**4**). Pó amarelo. UV λ_{max}/nm 348, 259. RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 2). RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (ver Tabela 1). EM m/z (%): 300 (96), 301 (92), [M-H]⁻ 447 (100).

RESULTADOS

As substâncias **1-4** (Figura 1) foram identificadas pela análise dos espectros de UV, EM e RMN (incluindo as técnicas APT, COSY, HETCOR e NOESY) e em comparação com os dados da literatura como 3-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina (**1**) (Hamburger e Hostettmann, 1985; Takahashi et al., 2001), 3-*O*-β-D-galactopiranosil quercetina (hyperina) (**2**) (Yasukawa e Takido, 1987), 3-*O*-α-L-arabinopiranosil quercetina (guaijaverina) (**3**) (Webby e Markhan, 1994; Fraisse et al., 2000) e 3-*O*-α-L-ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (**4**) (Markhan et al., 1978; Mendez et al., 1995).

DISCUSSÃO

O espectro de UV de cada uma das substâncias mostrou-se característico para flavonóis, apresentando dois máximos de absorção, um entre 256-259 nm relativo ao anel A e outro entre 348-354 nm relativo ao anel B, onde este último, pela substituição em C-3 (na quercetina a absorção é de 370 nm), sofre efeito hipsocrômico (Zuanazzi, 2000).

Dos espectros de massas de **1** e **2** obteve-se os íons a *m/z* 595 (100%) e *m/z* 463 (100%) respectivamente, fornecendo um peso molecular de 596 u para a substância **1** e 464 u para a substância **2**. Do espectro de massas da mistura **3** e **4** obteve-se os íons a *m/z* 433 (29%) e 447 (100%) respectivamente, fornecendo um peso molecular de 434 u para a substância **3** e 478 u para a substância **4**. O espectro de **3** e **4** apresentou duas fragmentações, *m/z* 300 (96%) e *m/z* 301 (92%), que podem ser atribuídas a fragmentações da ligação acetal entre a quercetina (*m/z* 301) e o açúcar.

Através dos dados de RMN foi possível definir a configuração dos H anoméricos, onde, para a substância **1**, H-H vicinal $J_{1''-2''} = 7,6$ Hz, indicou a configuração β para o carbono anomérico C-1'' (Wald et al., 1986), como é comum aos flavonóides ligados a glicose e galactose

Tabela 1. Dados de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) das substâncias **1**, **2**, **3** e **4**

C	1	2	3	4
2	156,73	156,86	156,78	156,84
3	133,69	134,01	134,29	134,72
4	177,86	178,00	178,01	178,24
5	161,80	161,74	161,72	161,81
6	99,20	99,28	99,30	99,30
7	164,84	164,88	164,94	164,94
8	93,96	94,09	94,11	94,23
9	156,08	156,75	157,82	157,01
10	104,34	104,34	104,37	104,54
1'	121,68	121,61	121,41	121,25
2'	116,05	116,50	116,20	116,16
3'	145,48	145,38	145,52	145,74
4'	149,03	149,03	149,16	149,00
5'	115,73	115,63	115,91	116,00
6'	122,91	122,50	122,56	121,66
1''	99,48	102,37	101,96	102,35
2''	75,34	71,75	72,20	70,59
3''	74,33	73,73	71,27	71,71
4''	68,85	68,46	66,65	71,12
5''	76,21	76,27	64,88	70,88
6''	60,59	60,46		18,02
1'''	109,29			
2'''	76,69			
3'''	79,78			
4'''	74,46			
5'''	64,91			

(Markhan et al., 1978). Através da técnica NOESY foi possível correlacionar as interações entre os hidrogênios espacialmente próximos (Figura 2), definindo a seqüência da ligação entre os açúcares e a aglicona. A ligação entre a quercetina e a galactose foi observada pela interação de H-6' da aglicona com os hidrogênios H-1'' e H-2'' da galactose, além da interação de H-2' com H-2''. A ligação da galactose na posição 2'' com a apiose na posição 1''', foi evidenciada pela interação entre H-1''', H-2'' e H-1''. As correlações C-H foram obtidas pela técnica HETCOR onde foi possível confirmar a região dos hidrogênios dos açúcares entre δ 5,6 e δ 3,3. Para a substância **2**, $J = 7,5$ Hz indicou a configuração β para o carbono anomérico C-1'' (Yasukawa e Takido, 1987), para a ligação α seria em torno de 3 Hz (Rocha, 1995). O espectro de HETCOR mostrou a região dos hidrogênios dos açúcares entre δ 5,4 e δ 3,2 através da correlação com os respectivos carbonos. A análise do espectro da mistura de **3** e **4** foi possível com o uso da técnica NOESY onde diferenciou-se o H-5' da arabinose em **3** do H-5' da ramnose em **4**. Para a substância **3**, a constante de acoplamento $J = 5,1$ Hz e δ 5,26 para H-1'', indicou a configuração α para o carbono anomérico C-1'' (Mendez et al., Rocha, 1995; Fraisse et

al., 2000), para a ligação β teria $J = 3,4$ Hz e δ em torno de 3,98 (Bergeron et al., 1998). O espectro de HETCOR mostrou a região dos hidrogênios dos açúcares entre δ 5,3 e δ 3,2 através da correlação com os respectivos carbonos. Os dados da literatura para C-3'' (δ 70,8) e C-5'' (δ 64) (Markhan et al., 1978; Rocha, 1995), indicam a forma piranosídica para a arabinose. Por último, a substância **4**, apresentou $J = 1,4$ Hz para H-1'' e δ 5,28 em DMSO- d_6 , que também foi obtida em metanol- d_3 δ 5,37, correspondendo à configuração α para o carbono anomérico (Azen e Horowitz, 1977; Mendez et al., 1995; Rocha, 1995). O espectro de NOESY contribuiu para estabelecer a correlação entre os hidrogênios aromáticos H-6' e H-5' da aglicona e entre os hidrogênios H-6'' e H-4'' da ramnose.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de P.M.L.S., à Dr^a Ana Cláudia Amaral (FIOCRUZ) pelos espectros de massas e ao Prof. Dr. José Paz Parente (NPPN/UFRJ) pelas valiosas sugestões.

Tabela 2. Dados de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) das substâncias **1**, **2**, **3** e **4**

H	1	2	3	4
6	6,17 d (1,8)	6,20 d (1,8)	6,20 d (1,8)	6,20 d (2,2)
8	6,38 d (1,8)	6,41 d (1,8)	6,40 d (1,8)	6,38 d (2,2)
2'	7,49 d (2,2)	7,54 d (2,2)	7,52 d (2,2)	7,29 d (2,2)
5'	6,79 d (8,4)	6,82 d (8,4)	6,89 d (8,4)	6,88 d (8,0)
6'	7,78 dd (2,2;8,4)	7,66 dd (2,2;8,8)	7,60 dd (2,2;8,4)	7,25 dd (2,2;8,0)
1''	5,58 d (7,6)	5,37 d (7,5)	5,26 d (5,1)	5,28 d (1,4)
2''	3,83 m	3,57 m	3,52 m	3,98 m
3''	3,53 m	3,38 m	3,77 m	3,75 m
4''	3,65 m	3,66 m	3,67 m	3,21 m
5''	3,33 m	3,34 m	3,24 e 3,58 m	3,50 m
6''	3,43 e 3,47 m	3,31 e 3,46 m		0,80 s
1'''	5,31 s			
2'''	3,80 m			
4'''	3,79 m			
5'''	3,37 m			

REFERÊNCIAS

- Asen S, Horowitz RM 1977. 2''-O-acetylquercitrin from azalea flowers. *Phytochemistry* 16: 147-148.
- Babili FE, Moulis C, Bom M, Respaud MJ, Fourasté I 1998. Three furano diterpenes from the bark of *Croton campestris*. *Phytochemistry* 48: 165-169.
- Bergeron C, Martson A, Antus S, Gauthier R, Hostettmann K 1998. Flavonoids from *Pyrola elliptica*. *Phytochemistry* 49: 233-236.
- Corrêa MP 1975. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Crews P, Rodriguez J, Jaspars M 1988. Core techniques of mass spectrometry: interpretation and use of data. In: *Organic structure Analysis*. New York: Oxford University Press, p. 281-315.
- Cruz GL 1982. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. EDEL.
- Fraisse D, Heitz A, Carnat A, Carnat AP, Lamaison JL 2000. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* 71: 463-464.
- Guerrero MF, Puebla P, Carrón R, Martín ML, Román LS 2002. Quercetin 3,4-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeianus* Schleacht. *J Pharm Pharmacol* 54: 1373-1378.
- Hamburger M, Gupta M, Hostettmann K 1985. Flavonol glycosides from *Securidaca diversifolia*. *Phytochemistry* 24: 2689-2692.
- Heluani CS, Catalan CAN, Hernández LR, Tapia EB, Natan PJ 2000. Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. *J Nat Prod* 63: 222-225.
- Lencina C, Pires VS, Gosmann G, Taketa ATC, Schenkel EP 2001. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Bail. *Rev Bras Farmacogn* 11: 89-94.
- Markhan KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III naturally occurring flavonoid glycosides and their acetylated derivatives. *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- Mendez J, Bilia AR, Morelli I 1995. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70: 223-226.
- Puebla P, López JL, Guerrero M, Carrón R, Martín ML, Román LS, Feliciano AS 2003. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeianus*. *Phytochemistry* 62: 551-555.
- Rocha LM 1995. *Investigation phytochimique de Hypericum brasiliense (Gutiferae)*. Lausanne, 220 p. These de Doctorat de Phytochemie, Institut de Pharmacognosie et Phytochemie, Université de Lausanne.
- Takahashi H, Hirata S, Minami H, Fukuyama Y 2001. Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry* 56: 875-879.
- Wagner H, Hörhammer L, Kiraly IC 1970. Flavon-C-glycoside in *Croton zambezicus*. *Phytochemistry* 9: 897.
- Wald B, Galensa R, Herman C, Grotjahn L, Wray V, 1986. Quercetin 3-O-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-galactoside] from blackberries. *Phytochemistry* 25: 2904-2905.
- Webby RF, Markhan KR 1994. Isoswertiajaponin 2''-O-β-arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the antarctic grass *Deschampsia Antarctica*. *Phytochemistry* 36: 1323-1326.
- Yazukawa K, Takido M 1987. A flavonol glycoside from *Lysimanchia mauritana*. *Phytochemistry* 26: 1224-1226.
- Zuanazzi JAS 2000. Flavonóides. In: Simões CMA, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 489-516.