



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Croton argyrophyllus* Müll**

**Francisco Artur e Silva Filho**

**FORTALEZA**  
**2010**

S580c Silva Filho, Francisco Arthur e  
Contribuição ao conhecimento químico de *Cróton argyrophyllus* Mull /  
Francisco Arthur e Silva Filho, 2010.  
219 f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima  
Área de concentração: Química orgânica  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.  
Depto. de Química, Fortaleza, 2010.

1. Cróton (Biologia) 2. Diterpenos 3. Ressonância magnética nuclear  
I. Lima, Mary Anne Sousa (orient.) II. Universidade Federal do Ceará –  
Pós-Graduação em Química III. Título

CDD 540

**Francisco Artur e Silva Filho**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Croton argyrophyllus* Müll**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

**FORTALEZA  
2010**

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

---

Francisco Artur e Silva Filho

TESE APROVADA EM:

EXAMINADORES:

---

Profa. ~~Dra.~~ Mary Anne Sousa Lima (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Prof. Dr. Adão Aparecido Sabino  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

**Em memória aos meus pais Francisco  
Artur e Rosineuda Valdivino que em  
suas simplicidades me ensinaram o valor  
da vida. A minha família, pelo apoio e  
incentivo a este trabalho.**

**AGRADECIMENTOS**

À minha família, a quem também dedico esta tese, pelo apoio e compreensão incondicionais.

À professora Mary Anne Sousa Lima, pelo zelo e dedicação aplicados a este trabalho e, principalmente, pela paciência e carinho que teve para conosco.

A Kelly Sivocy, pelo apoio incondicional nessa jornada e pelo seu amor e companheirismo nos momentos difíceis.

Ao professor Raimundo Braz Filho, a quem não tenho palavras para agradecer, pelo empenho em nos transformar em pesquisadores, e pela sua paixão que deve ser seguida e admirada por todos aqueles que amam os produtos naturais.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química (UFC), pela contribuição indispensável à minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, especialmente à Lana, Mundinha, Sr. Paulo e Célia, pela forma dedicada com a qual realizam seu trabalho.

Aos grandes amigos do laboratório (LAFIPLAM) e dos demais laboratórios do Curso Pós-Graduação em Química (UFC). Também dedico este trabalho a todos eles.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, PADCT, PRONEX e FUNCAP, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FLUXOGRAMA .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Referências Bibliográficas .....	2
<b>2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Considerações Botânicas Sobre a Família Euphorbiaceae.....	3
2.2 Considerações Botânicas Sobre o Gênero <i>Croton</i> .....	4
2.3 Descrição Botânica de <i>Croton argyrophyllus</i> .....	5
2.4 Referências Bibliográficas .....	8
<b>3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>9</b>
3.1 Ocorrência de Diterpenos no Gênero <i>Croton</i> .....	9
3.1.1 Informações relevantes .....	9
3.1.2 Biossíntese dos esqueletos de diterpenos.....	11
3.1.3 Estado da arte dos diterpenos casbano e crotofolano .....	15
I. Ocorrência de Diterpenos Casbanos.....	15
II. Ocorrência de Diterpenos Crotofolanos.....	22
3.2 Referências Bibliográficas .....	23
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
4.1 Material Botânico .....	28
4.2 Métodos de Análise.....	28
4.2.1 Métodos Cromatográficos.....	28
4.2.2 Métodos Espectrométricos .....	29
4.2.3 Rotação Óptica .....	31
4.2.4 Ponto de Fusão.....	31
4.3 Isolamento dos Metabólitos Secundários dos Talos de <i>C. argyrophyllus</i> .....	31
4.3.1 Tratamento Cromatográfico do Extrato Etanólico dos Talos de <i>C. argyrophyllus</i> (CAE).....	32

I.	Tratamento Cromatográfico de CAE/C .....	32
II.	Isolamento de CA-2 .....	33
III.	Tratamento Cromatográfico de CAE/H .....	34
IV.	Isolamento de CA-3 .....	34
V.	Isolamento de CA-4 .....	36
VI.	Isolamento de CA-5 .....	37
VII.	Isolamento de CA-6 e CA-7 .....	38
4.4	Estudos dos Constituintes Químicos Não-Voláteis da Raiz de <i>C. argyrophyllus</i> .....	39
4.4.1	Tratamento Cromatográfico do Extrato Hexânico das Raízes de <i>C. argyrophyllus</i> (CARH).....	39
I.	Isolamento de CA-8 .....	40
II.	Isolamento de CA-9 .....	41
4.4.2	Tratamento Cromatográfico do Extrato Etanólico das Raízes de <i>C. argyrophyllus</i> (CARE).....	41
I.	Isolamento de CA-10 .....	42
II.	Isolamento de CA-11 e CA-12 .....	44
<b>5</b>	<b>DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL .....</b>	<b>48</b>
5.1	Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados dos Talos de <i>C. argyrophyllus</i> .....	48
5.1.1	Determinação Estrutural de CA-2 .....	48
5.1.2	Determinação Estrutural de CA-3 .....	60
5.1.3	Determinação Estrutural de CA-4 .....	74
5.1.4	Determinação Estrutural de CA-6 .....	88
5.1.5	Determinação Estrutural de CA-7 .....	100
5.1.6	Determinação Estrutural de CA-5 .....	110
5.2	Determinação Estrutural dos Compostos Isolados das raízes de <i>C. argyrophyllus</i> . .....	114
5.2.1	Determinação Estrutural de CA-1 .....	114
5.2.2	Determinação Estrutural de CA-10.....	127
5.2.3	Determinação Estrutural de CA-11.....	137
5.2.4	Determinação Estrutural de CA-12.....	149
5.2.5	Determinação Estrutural de CA-8 .....	160
5.2.6	Determinação Estrutural de CA-9 .....	171
5.3	Referencias Bibliográficas .....	177
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>178</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>C. argyrophyllus</i> destacando os aspectos gerais dos talos, folhas, frutos e inflorescências...	6
Figura 2 – Foto de <i>C. argyrophyllus</i> em seu habitat natural com destaque para folhas, talos e inflorescências.....	7
Figura 3 – Raízes de <i>C. argyrophyllus</i> .....	7
Figura 4 - Cromatograma de CLAE da fração CAE/HC <sub>1</sub> (116-148).....	38
Figura 5 - Cromatograma de CLAE da fração CARE/S (20-28) (27-32).....	45
Figura 6 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-2 com pastilhas de KBr.....	54
Figura 7 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) de CA-2.....	54
Figura 8 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) de CA-2.....	55
Figura 9 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) de CA-2.....	55
Figura 10 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-2.....	56
Figura 11 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-2.....	57
Figura 12 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-2.....	58
Figura 13 – Espectro de massa de CA-2 (ionização eletrônico a 70 eV).....	59
Figura 14 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-3 com pastilhas de KBr.....	67
Figura 15 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-3.....	67
Figura 16 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-3.....	68
Figura 17 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-3.....	68
Figura 18 – Espectro de RMN bidimensional COSY de CA-3.....	69
Figura 19 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-3.....	70
Figura 20 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-3.....	71
Figura 21 – Espectro de RMN bidimensional NOESY de CA-3.....	72
Figura 22 – Espectro de massa de CA-3 (ionização eletrônico a 70 eV).....	73
Figura 23 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-3.....	73
Figura 24 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-4 com pastilhas de KBr.....	81
Figura 25 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-4.....	81
Figura 26 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-4.....	82
Figura 27 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-4.....	82
Figura 28 – Espectro de RMN bidimensional COSY de CA-4.....	83
Figura 29 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-4.....	84
Figura 30 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-4.....	85
Figura 31 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-4.....	86
Figura 32 – Espectro de massa de CA-4 (ionização eletrônico a 70 eV).....	87
Figura 33 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-4.....	87
Figura 34 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-6 com pastilhas de KBr.....	94
Figura 35 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-6.....	94
Figura 36 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-6.....	95
Figura 37 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-6.....	96
Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-6.....	96
Figura 39 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-6.....	97
Figura 40 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-6.....	98

Figura 41 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-6. ....	99
Figura 42 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-7 com pastilhas de KBr.....	104
Figura 43 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7. ....	104
Figura 44 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7.....	105
Figura 45 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7. ....	105
Figura 46 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-7.....	106
Figura 47 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-7.....	107
Figura 48 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-7. ....	108
Figura 49 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-7.....	109
Figura 50 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-5 com pastilhas de KBr.....	112
Figura 51 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-5. ....	112
Figura 52 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-5. ....	113
Figura 53 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-5. ....	113
Figura 54 – Estrutura determinada pela análise de cristalografia de raio-X de CA-1.....	118
Figura 55 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1. ....	121
Figura 56 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.....	121
Figura 57 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.....	122
Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-1.....	122
Figura 59 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-1.....	123
Figura 60 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-1.....	124
Figura 61 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-1. ....	125
Figura 62 – Espectro de massa de CA-1 (ionização eletrônico a 70 eV). ....	126
Figura 63 – Compressão estérica sobre C-19 (CA-1), e H-2 (CA-10), respectivamente. ....	127
Figura 64 - CCD de CA-1 e CA-10 em hexano/clorofórmio (4:1). ....	129
Figura 65 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-10.....	132
Figura 66 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.....	132
Figura 67 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-10.....	133
Figura 68 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.....	133
Figura 69 – Espectro de RMN bidimensional NOESY de CA-10.....	134
Figura 70 - Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-10. ....	135
Figura 71 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-10.....	136
Figura 72 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-11 com pastilhas de KBr.....	143
Figura 73 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.....	143
Figura 74 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.....	144
Figura 75 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11. ....	144
Figura 76 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-11.....	145
Figura 77 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-11.....	146
Figura 78 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-11.....	146
Figura 79 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-11.....	147
Figura 80 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-11.....	148
Figura 81 – Compressão estérica sobre C-19 (CA-12), e sobre H-2 (CA-11), respectivamente. ....	150
Figura 82 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12, ....	154
Figura 83 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11. ....	154
Figura 84 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12.....	155
Figura 85 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.....	155

Figura 86 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-12.....	156
Figura 87 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-12.....	157
Figura 88 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-12.....	158
Figura 89 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-12.....	159
Figura 90 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.....	166
Figura 91 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.....	166
Figura 92 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.....	167
Figura 93 – Espectro de massa de CA-8 (ionização eletrônico a 70 eV). ....	167
Figura 94 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-8.....	168
Figura 95 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-8.....	169
Figura 96 – Expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-11.....	170
Figura 97 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-9 com pastilhas de KBr.....	174
Figura 98 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-9.....	174
Figura 99 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.....	175
Figura 100 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.....	175
Figura 101 – Espectro de massa de CA-9 (ionização eletrônico a 70 eV).....	176

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes tipos de esqueletos de diterpenos isolados do gênero <i>Croton</i> .....	9
Tabela 2 – Levantamento dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de diterpenos casbanos.....	16
Tabela 3 – Levantamento dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de diterpenos crotofolanos.....	22
Tabela 4- Fracionamento preliminar da CAE/C.....	32
Tabela 5 - Fracionamento cromatográfico da CAE/CC <sub>2</sub> .....	33
Tabela 6 - Fracionamento cromatográfico da CAE/CC <sub>3</sub> .....	33
Tabela 7 - Fracionamento preliminar da CAE/H.....	34
Tabela 8 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC <sub>4</sub> .....	35
Tabela 9 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC <sub>4</sub> (3-9).....	35
Tabela 10 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC <sub>1</sub> .....	36
Tabela 11 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC <sub>1</sub> (103-115).....	37
Tabela 12 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC <sub>4</sub> (14-18).....	38
Tabela 13 - Fracionamento preliminar da CARHs.....	39
Tabela 14 - Fracionamento cromatográfico da CARHs/D.....	40
Tabela 15 - Fracionamento cromatográfico da CARHs/D (49-67).....	41
Tabela 16 - Fracionamento cromatográfico por exclusão molecular de CARE.....	41
Tabela 17 - Fracionamento preliminar da CARE/S (20-28).....	42
Tabela 18 - Fracionamento cromatográfico da CARE/S (20-28) (5-11).....	43
Tabela 19 - Fracionamento cromatográfico da CARE/S (20-28) (5-11) (28-67).....	44
Tabela 20 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> , 125 MHz) de CA-2 por padrão de hidrogenação.....	49
Tabela 21 – Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) e <sup>13</sup> C (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) de CA-2 dispostos segundo as correlações obtidas nos espectros HSQC e HMBC.....	52
Tabela 22 – Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C de CA-2 como dados da literatura [MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990], δ (ppm).....	53
Tabela 23 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de CA-3 por padrão de hidrogenação.....	61
Tabela 24 – Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-3 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	65
Tabela 25 – Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C de CA-3 como os do composto CA-2, δ (ppm).....	66
Tabela 26 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de CA-4 por padrão de hidrogenação.....	75
Tabela 27 – Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	79
Tabela 28 – Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C de CA-4 e de CA-2. δ(ppm).....	80
Tabela 29 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de CA-6 por padrão de hidrogenação.....	89
Tabela 30 – Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CA-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	92
Tabela 31 – Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C de CA-6 com o composto Depressin [LI <i>et al.</i> , 2010], δ (ppm).....	93

Tabela 32 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (125, MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC. ....	102
Tabela 33 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-7 e de CA-2, ( $\delta$ ppm). ....	103
Tabela 34 – Comparação dos dados de deslocamentos químicos $\delta$ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-5 com os descritos na literatura para os esteróides $\beta$ -sitosterol e estigmasterol [ALMEIDA et al, 2005]. ....	111
Tabela 35 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 125 MHz) de CA-3 por padrão de hidrogenação. ....	115
Tabela 36 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC. ....	120
Tabela 37 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) e $^{13}\text{C}$ de CA-10 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC. ....	130
Tabela 38 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-10 como os do composto CA-1, $\delta$ (ppm). .	131
Tabela 39 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 125 MHz) de CA-11 por padrão de hidrogenação. ....	138
Tabela 40 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC. ....	141
Tabela 41 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-11 como CA-10. ....	142
Tabela 42 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC. ....	152
Tabela 43 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-12 com os do composto CA-11 e CA-1, $\delta$ (ppm). ....	153
Tabela 44 - Deslocamentos Químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-8 por Padrão de Hidrogenação. ....	160
Tabela 45 – Dados de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC e HMBC. ....	164
Tabela 46 - Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-8 com os dados descritos na literatura para o ácido acetil aleuritólico [MCCLEAN; DUMONT; REYNOLDS, 1987]. ....	165
Tabela 47 – Deslocamento químico RMN $^{13}\text{C}$ -BB de CA-9 com padrão de hidrogenação. ....	172
Tabela 48 – Análise comparativa dos deslocamentos químicos $\delta$ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}$ de CA-9 com o espinasterol. ....	173

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estruturas de diferentes esqueletos diterpênicos isolados do gênero <i>Croton</i> . .....	10
Quadro 2 - Ciclização do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) na formação de diterpenos que apresentam a unidade deca-hidro-naftaleno em sua estrutura.....	12
Quadro 3 - Ciclização do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) na formação dos diterpenos de esqueleto casbano. ....	12
Quadro 4 – Esqueletos de diterpenos que podem ser gerados pela ciclização dos precursores geranyl. ....	13
Quadro 5 – Rota biossintética de esqueletos da classe de diterpenos derivados da segunda rota de ciclização. ....	14
Quadro 6 – Oxidação do grupo hidroxila da posição C-4 de CA-2 .....	60
Quadro 7 – Proposta de ciclização intramolecular de CA-2 e formação do anel furânico de CA-4. ....	77
Quadro 8 – Metabólitos essenciais isolados do talos de <i>Croton argyrophyllus</i> .....	178
Quadro 9 – Metabólitos essenciais isolados das raízes de <i>Croton argyrophyllus</i> .....	179

## LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 - Isolamento dos metabólitos secundários talos de <i>C. argyrophyllus</i> . ....	46
Fluxograma 2 - Isolamento dos metabólicos secundários das raízes de <i>C. argyrophyllus</i> . ....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

**CAH** – Extrato Hexânico dos Talos de *Croton argyrophyllus*

**CAE** – Extrato Etanólico dos Talos de *Croton argyrophyllus*

**CARH** – Extrato Hexânico das Raízes de *Croton argyrophyllus*

**CARE** – Extrato Etanólico das Raízes de *Croton argyrophyllus*

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada

**P.f.** – ponto de fusão

**$\delta$**  – Deslocamento Químico

***J*** – Constante de Acoplamento

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RMN <sup>13</sup>C** – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

**CPD** – Composite Pulse Decoupling

**DEPT** – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**HSQC** – Heteronuclear Single Quantum Coherence

**HMBC** – Heteronuclear Multiple Band Correlation

**NOESY** – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**NOE Diff** - Nuclear Overhauser Effect NOE difference

**IV** – Infravermelho

**EM-IE** – Espectrometria de Massa de Ionização Eletrônico

**HRESIMS** - High Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry

**FM** – Fórmula Molecular

**MM** – Massa Molar

**CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**IDH** – Índice de Deficiência de Hidrogênio

## RESUMO

Este trabalho relata a investigação fitoquímica dos talos e raízes de *Croton argyrophyllus* Müll (Euphorbiaceae), nativa do município de Jacobina-BA. O estudo químico a partir do extrato hexânico dos talos levou ao isolamento de um diterpeno de esqueleto crotofolano inédito na literatura, denominado de  $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (crotomicansin). A partir do extrato etanólico foram isolados a mistura dos fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, além de cinco diterpenos de esqueleto casbano, crotonepetin, depressin e três outros de caráter inédito na literatura, 5-hidroxi-2*Z*,6*E*,12*Z*-trien-4-ona-casbano, 6*E*,12*E*-dien-[(1,2,3,4)-3-hidrofurano]-5-ona-casbano e 1-hidroxi-2*E*,6*Z*,12*E*-trien-4,5-diona-casbano. A prospecção química do extrato hexânico das raízes resultou no isolamento do triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA), do esteróide espinasterol, e do diterpeno crotomicansin. Do extrato etanólico das raízes foi possível isolar o epímero do crotomicansin, 2-*epi*- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano e dois outros diterpenos de esqueleto crotofolano inéditos na literatura, denominados de 16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano e seu epímero 2-*epi*-16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano. Os metabólitos secundários foram isolados através do uso de métodos cromatográficos convencionais como: cromatografia flash, cromatografia em coluna filtrante, partição líquido-líquido, cromatografia de exclusão e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A caracterização estrutural foi possível através do uso de métodos espectroscópicos na região do I.V., espectros de massas de baixa (EM-IE) e de alta resolução (HRESIMS) e de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo técnicas uni e bidimensionais (HMBC, HSQC, NOESY, NOE Sel. e COSY), além de comparação com dados descritos na literatura.

## ABSTRACT

This work reports the phytochemical investigation of the stems and roots of *Croton argyrophyllus* Müll (Euphorbiaceae), native from Jacobina County-BA. The chemical study of the hexane extract from the stems led to the isolation of a new crotofolane diterpene named  $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -diene-5,6-oxy-[(13,14,15,16)-16-hydrofuran]-1-one-crotofolane (crotoomicansin). From the ethanol extract, it was were isolated  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol as mixture, besides five casbane diterpenes: crotonepetin, depressin and the three new compounds, 5-hydroxy-2Z,6E,12E-trien-4-one-casbene, 6E,12E-dien-[(1,2,3,4)-3-hydrofuran]-5-one-casbene e 1-hydroxy-2E,6Z,12E-trien-4,5-dione-casbene. The chemical prospection of the hexane extract from the roots resulted on the isolation of the triterpene acetyl aleuritolic acid (AAA), the phytosteroid spinasterol and the diterpene crotoomicansin. From the ethanol extract of the roots it was possible to isolate crotoomicansin epimer, 2-*epi*- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -diene-5,6-oxy-[(13,14,15,16)-16-hydrofuran]-1-one-crotofolane and two new crotofolane diterpenes named 16-hydroxy- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -diene-5,6-oxy-[(13,14,15,16)-16-hydrofuran]-1-one-crotofolane and its epimer 2-*epi*-16-hydroxy- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -diene-5,6-oxy-[(13,14,15,16)-16-hydrofuran]-1-one-crotofolane. The secondary metabolites were isolated by using conventional chromatographic methods such as: flash chromatography, filtration column chromatography, liquid-liquid partition, exclusion chromatography and high performance liquid chromatography (CLAE). Structural characterization was possible by use of spectroscopic methods including IR,  $^1\text{H}$  NMR and, mass spectrometry (EIMS and HRESIMS)  $^{13}\text{C}$  NMR, uni and bidimensional (HMBC, HSQC, NOESY, Sel. NOE and COSY) and comparison with literature data.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO



*Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: Croton argyrophyllus Müll.*

| Francisco Artur

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Entre estes constituintes, podem ser destacados os metabólitos secundários (conhecidos também por “micromoléculas”), que, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Desta forma o uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo [SIMÕES *et al*, 2004].

Dentre todas as famílias pertencentes à flora mundial, a família Euphorbiaceae, destaca-se por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, sendo dividida em quatro subfamílias (Phyllanthoideae, Crotoideae, Porantheroideae e Ricinocarpoideae). No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 3100 espécies em todos os tipos de vegetação. Dentre os gêneros nativos destacam-se *Croton*, *Phyllanthus*, *Euphorbia* e *Jatropha* [GEMTCHÚJNICOV, 1976; QUER, 1980; EVANS TAYLOR, 1983].

O Gênero *Croton* é dos maiores gêneros de plantas floridas com cerca de 1200 espécies incluindo arbustos, árvores, e ocasionalmente cipós que são importantes elementos da vegetação secundária nos trópicos e subtropicais no mundo. Várias espécies, há muito tempo, desempenham um tradicional uso medicinal em continentes como África, Ásia e América do sul. Tais usos incluem tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, malária, úlceras e obesidade [QUER, 1980]. Estudos fitoquímicos realizados com espécies deste gênero revelam a presença de alcalóides, flavonóides, e principalmente terpenóides [CESPEDES; CHACON; MORA, 1992]. Em particular, várias espécies de *Croton* têm um látex vermelho que sempre são associados a espécies que contem alcalóides [SALATINO; FARIAS; NEGRI, 2007].

A espécie *Croton argyrophyllus* Müll. Arg. L. C é denominada popularmente de “Alecrim-de-Vaqueiro”. Sabe-se da sua importância através de conhecimentos populares que utilizam a planta na cura de enfermidades como problemas cardíacos e calmantes [ALBUQUERQUE *et al*, 2007]. A total ausência de relato na literatura acerca de trabalhos

fitoquímicos relacionados ao isolamento e caracterização estrutural dos constituintes fixos da espécie motivou a realização deste trabalho, através da investigação dos talos e raízes,

### 1.1 Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; FREITAS, E. M. L.; GOMES, J. M.; SANTOS, J. P. Medicinal Plants of the Caatinga (Semi-Arid) Vegetation of NE Brazil: A Quantitative Approach. **J. Ethnopharmacol.**, n. 114, p. 325-328, 2007.

CESPEDES, R.; CHACON, S.; MORA, A. L. Study of the Content of Tannin Extracts of Some Plants in Costa Rica. **Ing. Cienc. Quim.**, v. 21, n. 4, p 439-454, 1992.

EVANS, F. J.; TAYLOR, S. E. Pro-Inflamatory, Tumor-Promoting and Anti-tumor Diterpenes of Plants Families Euphorbiaceae and Thymelaceae. **Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 1, n. 44, p.1112-1115, 1983.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de taxonomia vegetal. Plantas de interesse econômico, agrícola, ornamentais e medicinais**, 186. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1976.

QUER, P. F. **Plant. Medicinal**. 180. Barcelona: Editora Labor S. A. 1980.

SALATINO, A.; FARIAS, M. L.; NEGRI, G. Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

## CAPÍTULO II

## CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS



***Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: Croton argyrophyllus Müll.***

| Francisco Artur

## 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1 Considerações Botânicas Sobre a Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é complexa e diversificada com aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies distribuídas principalmente na região dos trópicos [WEBSTER, 1994]. Os gêneros mais representativos são *Euphorbia* (1600 espécies), *Croton* (1200 espécies) e *Phyllanthus* (400 espécies).

“Essa família apresenta plantas bastante variadas, existindo como ervas, árvores, sub-arbustos e também trepadeiras, com folhas alternadas internas ou partidas, em geral estipuladas, latentes ou não. Flores sempre de sexo separado, em geral com monoclamídeas, ocorrendo também, diclamídeas, em plantas monóicas, reunidas em inflorescência muito variadas, em geral tipo cacho. À vezes com flores femininas acima (*Ricinus*) ou em geral embaixo (*Croton*) ou inflorescência de sexo separado (*Euphorbia*). No gênero *Euphorbia* se apresentam reunidas em inflorescência especiais denominadas ciátio, sempre com uma flor feminina central e muitos grupos (em geral 5) de flores masculinas, com apenas de um único estame. No ciátio muitas vezes há protogenia. As flores masculinas em geral são monoclamídeas, de simetria radial com pétalas em número de 5-6. Os estames às vezes são muito numerosos por desdobramento (*Ricinus*). O pistilódio às vezes é desenvolvido nas flores masculinas. A flor feminina é mono ou diclamídea, em geral pentâmera; o ovário é sempre súpero, caracteristicamente tricarpelar e triocular, cada lóculo contendo 1 ou 2 óvulos (*Phyllanthus*). O fruto seco esquizocarpo, separando-se elasticamente em 3 cocos e as sementes ricas em endosperma, muitas vezes oleaginoso (*Ricinus*, *Aleurites*), providas de grande carúnculos” [JOLY, 1998].

## 2.2 Considerações Botânicas Sobre o Gênero *Croton*

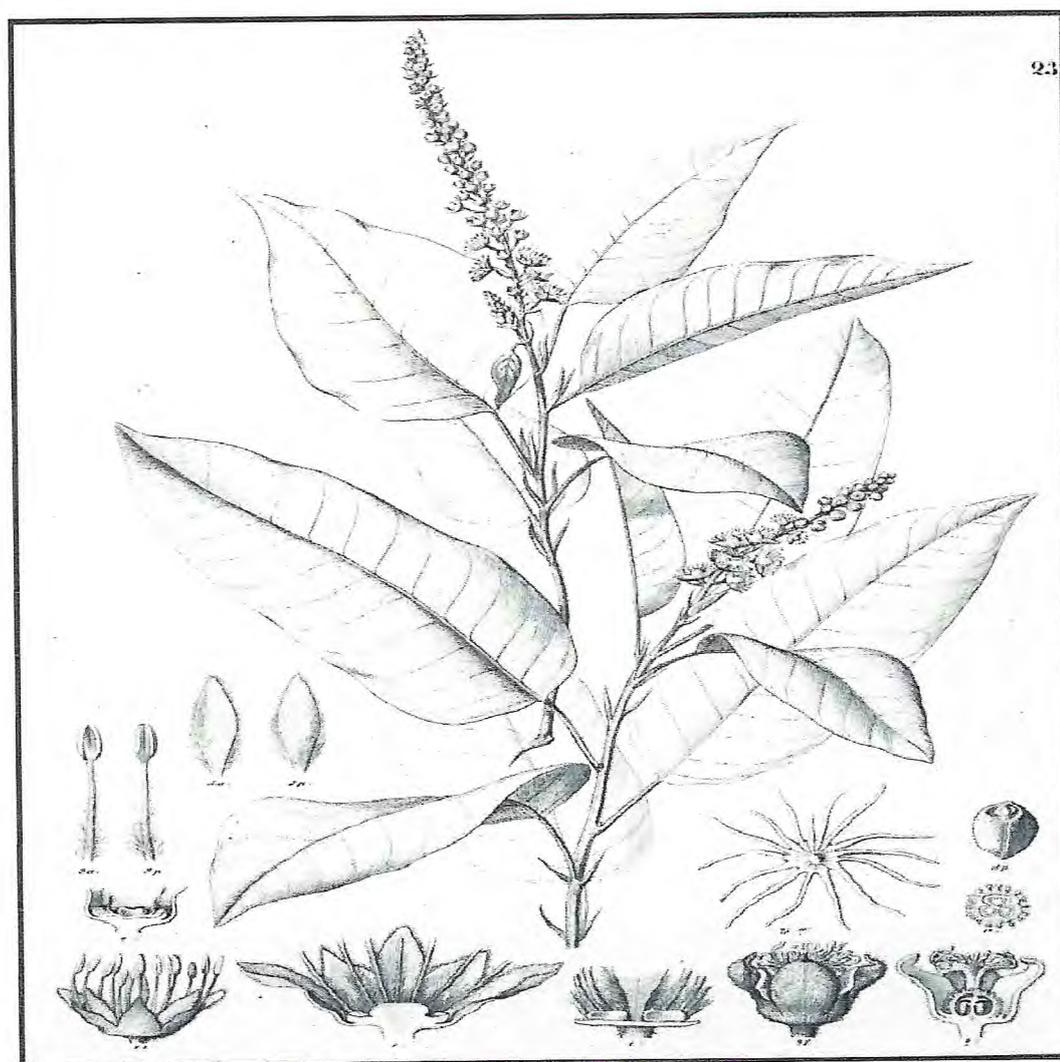
O gênero *Croton* é o segundo em número da família Euphorbiaceae compreendendo árvores, arbustos e ervas, distribuídos nos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios [SALANTINO; SALANTINO; NEGRI, 2007]. Aproximadamente 300 espécies de *Croton* encontram-se no Brasil, muitas das quais são utilizadas na medicina popular, para os mais diversos fins.

“Espécies de *Croton* são árvores, arbustos, ervas ou lianas, monóicos, mas raramente dióicos. Ramos geralmente com resina, indumento de tricomas simples, estrelados ou escamosos (lepidotos). As folhas são alternadas, penínervia ou palmatinérveas, pecioladas geralmente com glândulas no ápice; estípulas presentes, às vezes inconspícuas, limbo inteiro ou lobado, margens inteiras ou às vezes serrilhadas. As inflorescências são unissexuadas em racemos ou racemos espiciformes, às vezes em tirso ou panículas terminais ou auxiliares; inflorescências bissexuadas (raramente unissexuadas), em racemos, com as flores pistiladas na base, geralmente solitárias, em menor quantidade, às vezes reunidas com estaminadas, as estaminadas geralmente agrupadas, em maior quantidade, no restante da raque. As flores são estaminadas diclamídeas com cálice 4-6 lobado, lobos valvares, ou cálice livre, pétalas geralmente 5 (raramente ausentes); estames livres, filamentos dobrados no botão; flores pistiladas geralmente com cálice 5-7 lobado, lobos valvares ou cálice livre, pétalas 5, geralmente reduzidas ou ausentes, ovário 3-carpelar, óvulo 1 por lóculo, estiletos geralmente livres, bifidos ou multifidos. O fruto é capsulado, e as sementes carunculadas ou ecarunculadas” [JOLY, 1998].

### 2.3 Descrição Botânica de *Croton argyrophyllus*

Segundo a Flora Brasiliensis de Martius (1873), a espécie *C. argyrophyllus* Müll, Ag. L. C. é descrito como:

“*Croton argyrophyllus* Müll. Arg. L. C., arbusto de 1m de altura, ereto, com caule, folhas jovens e inflorescência bastante viscosa. Folhas com 6-10 cm de comprimento, limbo com pecíolo curto, limbo peninérveo sem glândulas na base, revestimento de pêlos sedosos e delicados de coloração prateado suborbicular brilhante, estípulas linearmente eriçadas, pouco flácidas e longas; formando racemos curtos e finos, brácteas lanceolado-lineares e não sésseis; cálice feminino é brevemente peciolado em ângulo obtuso e lacínia triangular-oval ereto; petalada masculina é estreita espatulado-lanceolada com dorso não revestido, o interior e margens revestidos por pêlos, 14 estames circulares, filamentos todos longitudinais e pilosos, ovários revestidos, estiles profundo e bipartites, lacínia integra ou bifurcada.”



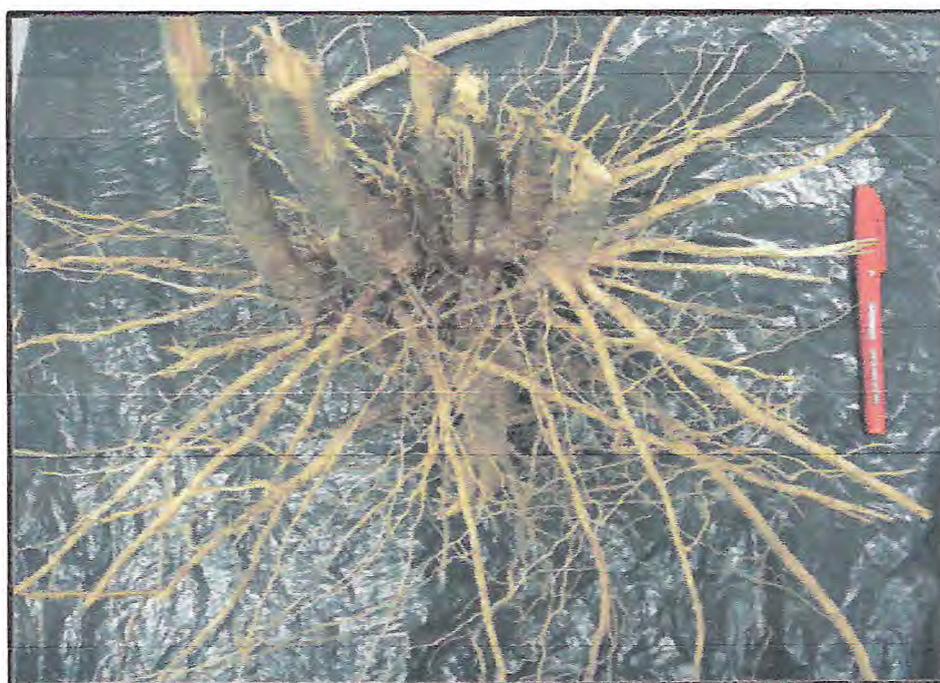
(Fonte: Flora Brasiliensis)

Figura 1 – *C. argyrophyllus* destacando os aspectos gerais dos talos, folhas, frutos e inflorescências



(foto: E. R. Silveira)

**Figura 2** – Foto de *C. argyrophyllus* em seu habitat natural com destaque para folhas, talos e inflorescências.



(Foto: F. A. Silva-Filho)

**Figura 3** – Raízes de *C. argyrophyllus*.

## 2.4 Referências Bibliográficas

MARTIUS, C. F. P. **Flora Brasiliensis**. Vol. XI, Part II, Fasc. 61 Coluna 121 - 122  
Publicado em 01-Fev-1873.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12º Ed. São Paulo, Editora Nacional, 1998.

PALMEIRAS-JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes Químicos da Folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 3, p. 397-402, 2006.

\_\_\_; CONSERVA, L. M.; SILVEIRA, E. R. Two Clerodane Diterpenes and Flavonoids form *Croton brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, n. 6B, p. 1420-1423, 2005.

SALANTINO, A.; SALANTINO, M. L. F.; NEGRI, G. Tradicional Uses Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

WEBSTER, G. L. **Systematics of the Euphorbiaceae**. **Annals of the Missorine Botanical Garden**. v. 1, n. 81, p 144, 1994.

## CAPÍTULO III

## LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO



*Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: Croton argyrophyllus Müll.*

| Francisco Artur

### 3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

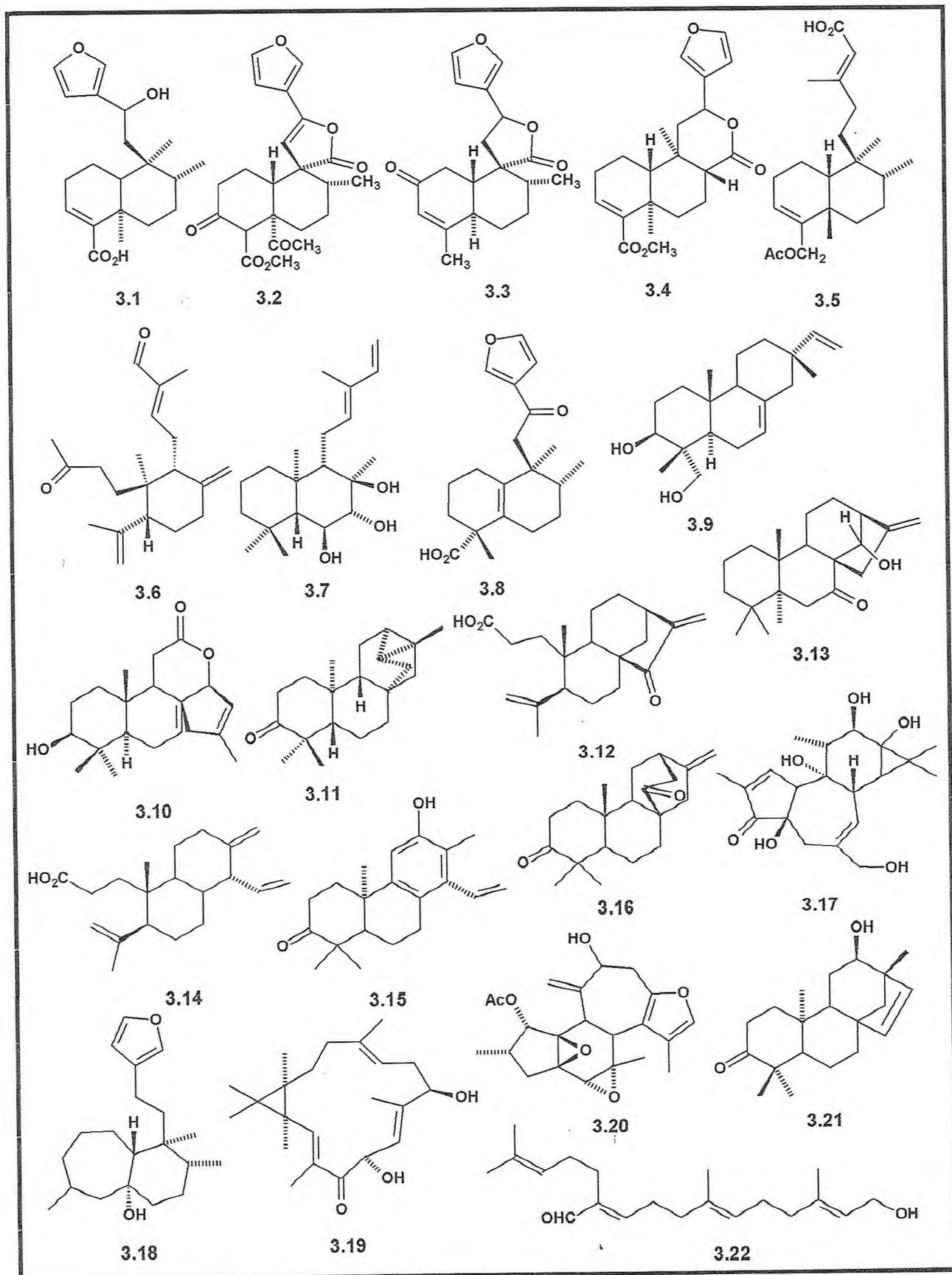
#### 3.1 Ocorrência de Diterpenos no Gênero *Croton*

##### 3.1.1 Informações relevantes

Estudos realizados com espécies do gênero *Croton* relatam a presença de alcalóides, flavonóides, esteróides, triterpenóides, saponinas e taninos [SANTOS, 2008]. No entanto os diterpenos são os principais constituintes do gênero, alguns dos quais apresentam importantes atividades biológicas, funções ecológicas e constituem protótipos para a síntese de substâncias bioativas [HANSON, 1998]. Dentre os diferentes tipos estruturais, podemos destacar o isolamento de diterpenos com variados esqueletos (Tab. 1).

Tabela 1 – Diferentes tipos de esqueletos de diterpenos isolados do gênero *Croton*.

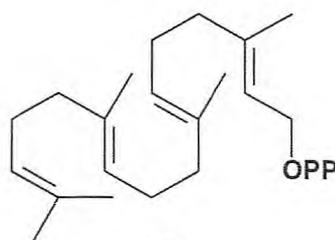
Composto	Esqueleto	Espécime	Parte da Planta	Ref.
3.1	Clerodano	<i>Croton sonderianus</i>	Raízes	[MCCHESENEY; SILVEIRA, 1989]
3.2	Clerodano Ia	<i>Croton haumanianus</i>	Folhas	[TCHISSAMBOU, 1990]
3.3	<i>nor</i> -Clerodano	<i>Croton cajucara</i>	Casca	[CARVALHO <i>et al</i> 1996]
3.4	Clerodano Ib	<i>Croton urucurana</i>	Partes aéreas	[PERES, <i>et al</i> , 1998]
3.5	Clerodano Ic	<i>Croton chilensis</i>	Partes aéreas	[BORQUEZ <i>et al</i> , 1995]
3.6	<i>seco</i> -Labdano	<i>Croton stipuliformis</i>	Folhas	[RAMOS <i>et al</i> , 2008]
3.7	Labdano	<i>Croton stipuliformis</i>	Folhas	[RAMOS <i>et al</i> , 2008]
3.8	Halimano	<i>Croton oblongifolius</i>	Casca	[ROENGSUMRAN <i>et al</i> , 2004]
3.9	Pimarano	<i>Croton zambesicus</i>	Folhas	[BACCELLI <i>et al</i> , 2005]
3.10	Sacopetalano	<i>Croton sarcopetalus</i>	Raízes	[DE HELUANI <i>et al</i> , 2000]
3.11	Traquilobano	<i>Croton zambesicus</i>	Folhas	[BLOCK <i>et al</i> , 2004]
3.12	<i>seco</i> -Caurano	<i>Croton caracasana</i>	Flores	[SUAREZ <i>et al</i> , 2008]
3.13	Caurano	<i>Croton tonkinensis</i>	Partes aéreas	[KUO <i>et al</i> , 2007]
3.14	<i>seco</i> -Cleistantano	<i>Croton oblongifolius</i>	Cascas	[ROENGSUMRAN <i>et al</i> , 2009]
3.15	Cleistantano	<i>Croton sonderianus</i>	Lenho	[CRAVEIRO; SILVEIRO, 1982]
3.16	Atisano	<i>Croton zambesicus</i>	Folhas	[BACCELLI <i>et al</i> , 2007]
3.17	Tigliano	<i>Croton tiglium</i>	Folhas	[HECKER <i>et al</i> , 1967]
3.18	Printziano	<i>Croton cortesianus</i>	Partes aéreas	[SIEMS; DOMINGUEZ; JAKUPOVIC, 1992]
3.19	Casbano	<i>Croton nepetaefolius</i>	Raízes	[MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990]
3.20	Crotofolano	<i>Croton dichogamus</i>	Partes aéreas	[JOGIA <i>et al</i> , 1989]
3.21	Beiereneno	<i>Croton rhamnifolius</i>	Raízes	
3.22	Fitano	<i>Croton kerrii</i>	Partes aéreas	[SATO; OGISO; KUWANO, 1980]



Quadro 1 – Estruturas de diferentes esqueletos diterpênicos isolados do gênero *Croton*.

### 3.1.2 Biossíntese dos esqueletos de diterpenos

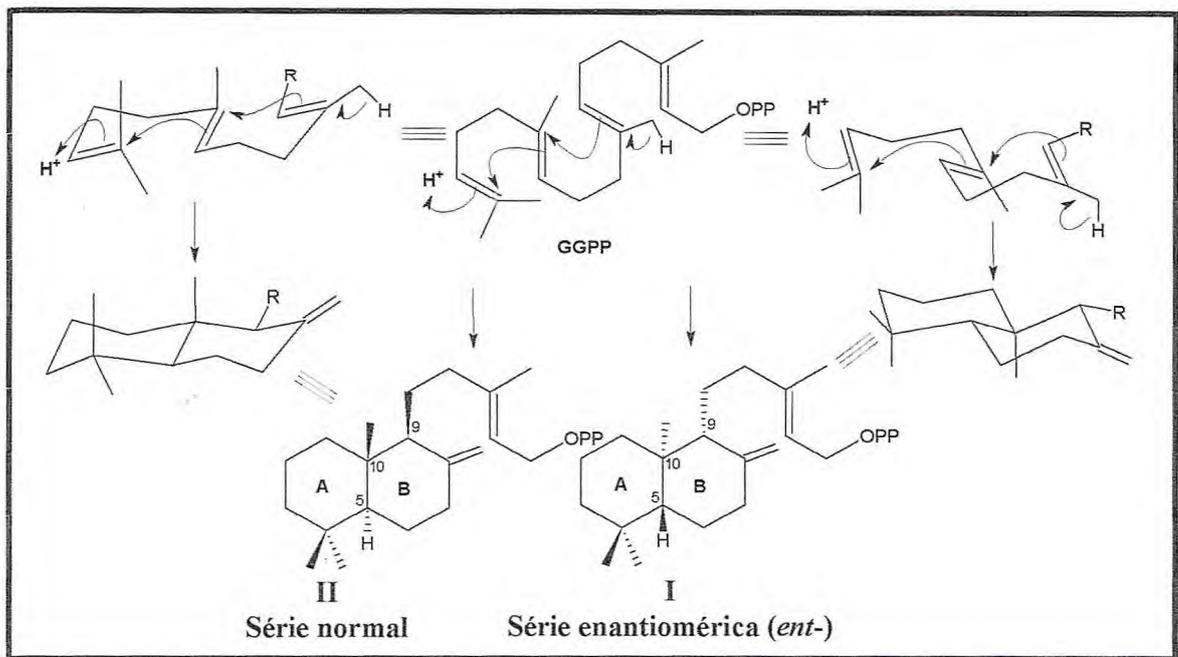
Diterpenos são uma vasta classe de produtos naturais, biossintetizados a partir do ácido mevalônico através do *2E,6E,10E*-geranil-geranil pirofosfato (GGPP) [ROBINSON; WEST, 1970a] (3.23), Esta classe de compostos é subdividida em acíclicos (fitanos), bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (trachilobanos, cauranos, apidicolanos, estemodanos, estemaranos, beiranos, atisanos, giberelanos) e macrocíclicos (casbanos, taxanos, cembranos, dafinanos, tiglianos, ingenanos) [GUTIÉRREZ *et al*, 2005].



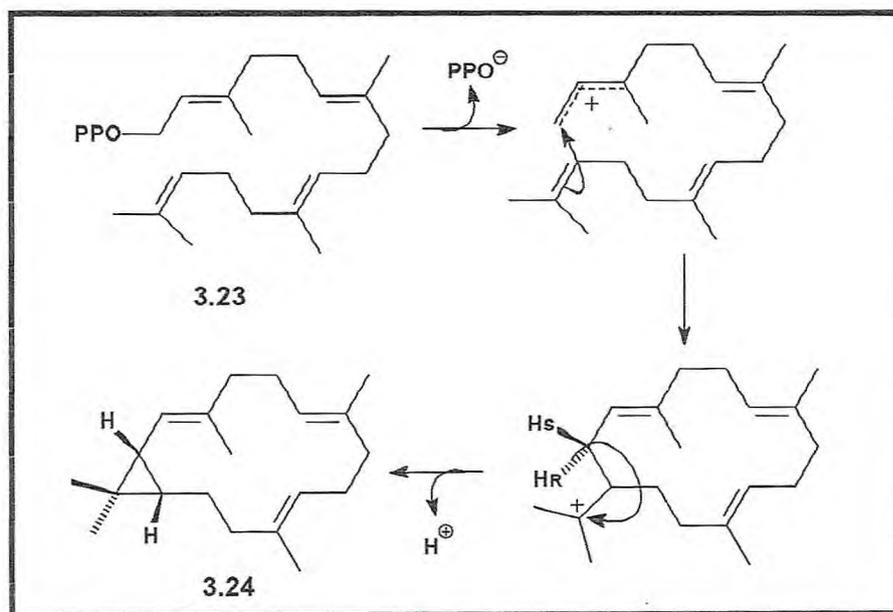
3.23

Diterpenos cíclicos tem origem em dois diferentes processos biossintéticos de ciclização a partir do GGPP. A primeira e principal rota de ciclização ocorre sob catálise ácida. No caso dos diterpenos, a ocorrência da protonação na ligação dupla da unidade isopropilideno da cadeia GGPP, leva a dois intermediários decahidronaftalenos bicíclicos (Quadro 2, pág. 12) estruturas I e II, resultando em duas séries enantioméricas que diferem pela configuração invertida nos carbonos C-5, C-9 e C-10. A série conhecida como “normal”, consiste de estruturas formadas pela fusão dos anéis A e B, enquanto as estruturas da série enantiomérica (denominadas como “*ent-*”) são as correspondentes imagens especulares das estruturas da série normal [DEWICK, 1999].

No segundo processo de ciclização, a ligação dupla na extremidade da cadeia do GGPP atua como nucleófilo atacando o carbono eletrofílico ligado ao grupo pirofosfato terminal (-OPP) que atua como grupo abandonador, gerando desta maneira um carbocátion alílico, o qual através de uma reação de substituição nucleofílica intramolecular conduz à formação de diterpenos bicíclicos do tipo casbano (3.24) [DEWICK, 1999] (Quadro 3, pág. 12).

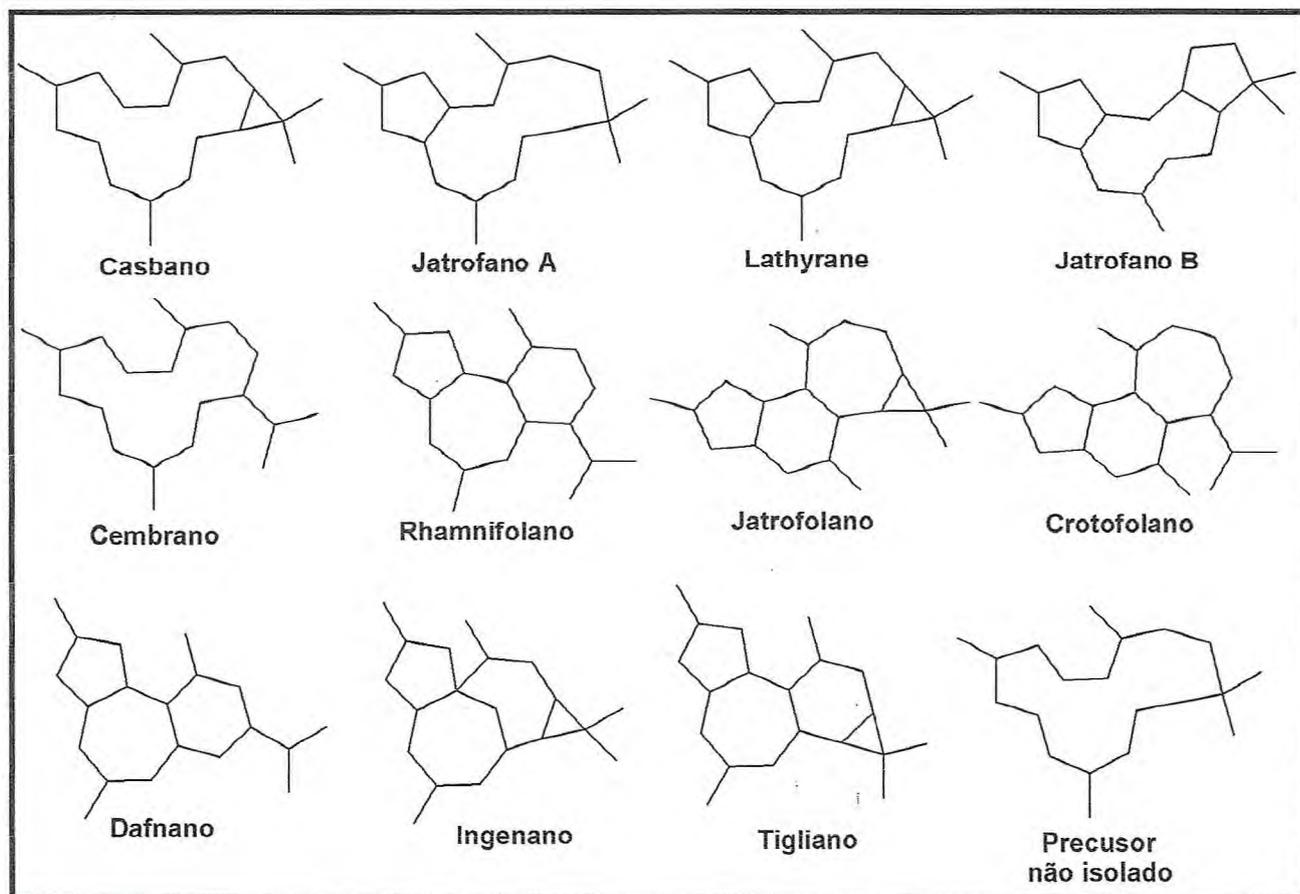


Quadro 2 - Ciclização do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) na formação de diterpenos que apresentam a unidade deca-hidro-naftaleno em sua estrutura.



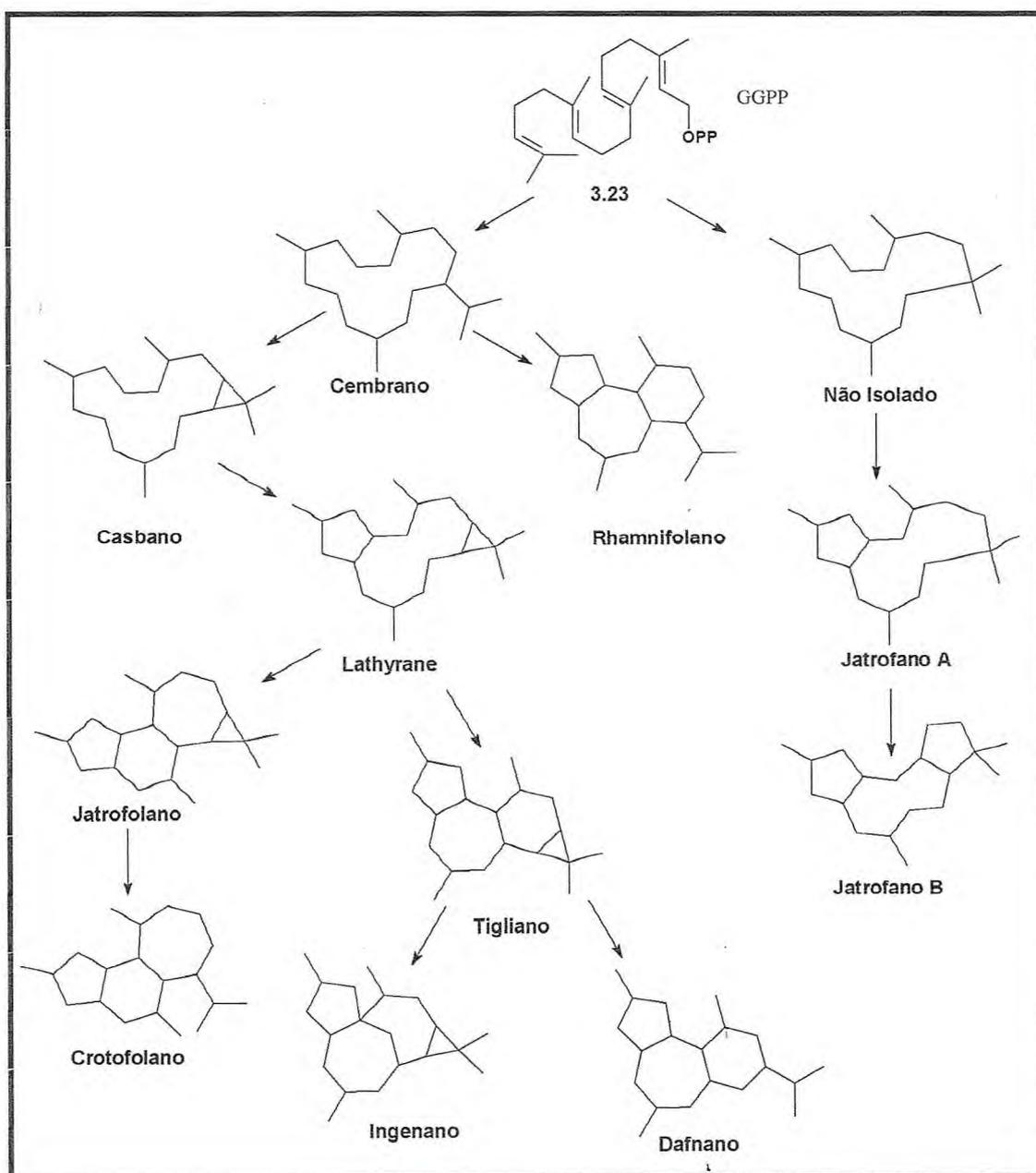
Quadro 3 - Ciclização do geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP) na formação dos diterpenos de esqueleto casbano.

Os diterpenos (Quadro 4, Pág. 13) originalmente obtidos a partir do segundo processo de ciclização são raramente relatados em estudos fitoquímicos possuindo distribuição restrita no reino vegetal. São frequentemente usados como marcadores quimiotaxonômicos, sendo encontrados apenas nas plantas das famílias Euphorbiaceae e Thymelaceae [EVANS; TAYLOR, 1983], e alguns organismos marinhos [LI *et al*, 2010]. Devido à sua natureza rara, esses diterpenos apresentam poucos relatos sobre a biossíntese de seus esqueletos, tornando-os marginalizados em comparação aos outros esqueletos da classe de terpenos. Richard & Schmidt relatam em seu trabalho uma nova proposta da rota biossintética desses diterpenos, onde a primeira etapa envolve a formação do precursor geranyl-geranyl pirofosfato apropriado, não sendo necessariamente sempre *2E,6E,10E*-geranyl-geranyl pirofosfato, uma vez que as unidades isoprênicas que formam o geranyl, também podem sofrer isomerização, com isso o processo de polimerização enzimática dessas unidades pode levar a formação de outros isômeros do geranyl-geranyl pirofosfato.



**Quadro 4** – Esqueletos de diterpenos que podem ser gerados pela ciclização dos precursores geranyl.

Na segunda etapa ocorre a ciclização através da ligação dupla da extremidade da cadeia, com o carbono ligado ao pirofosfato no precursor (ver Quadro 5), nesse processo de ciclização são geradas duas famílias de compostos para cada precursor geranylgeranyl. Cada um dos esqueletos de diterpenos produzido é obtido separadamente por um sistema de enzimas, com pouca ou nenhuma formação de intermediários. Richard & Schmidt (1987) cogitam a possibilidade de que a funcionalização dos precursores pós-ciclização, permitem a formação dos demais esqueletos (Quadro 5, Pág. 14).



**Quadro 5** – Rota biossintética de esqueletos da classe de diterpenos derivados da segunda rota de ciclização.

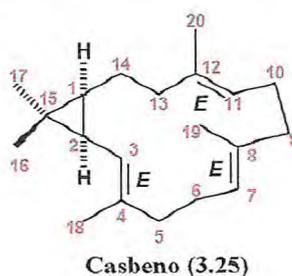
### 3.1.3 Estado da arte dos diterpenos casbano e crotofolano

O estudo fitoquímico de *C. argyrophyllus*, possibilitou o isolamento de diterpenos, exclusivamente, de esqueleto casbano e crotofolano. A baixa ocorrência destes compostos na natureza aliada à falta de um trabalho de revisão dos mesmos nos levou a realizar o estudo da arte para estes diterpenos.

Diterpenos casbanos foram descritos até agora, apenas nos gêneros *Agrostistachys*, *Maprounea*, *Simularia*, *Croton*, *Euphorbia* e *Mallotus*, todos pertencentes à família Euphorbiaceae, no entanto, recentemente foi relatado o isolamento desta classe de diterpenos em organismos marinhos, em particular no coral *Simularia depressa* [LI *et al*, 2010]. Por outro lado, os diterpenos crotofolanos possuem ocorrência exclusiva no gênero *Croton*.

#### I. Ocorrência de Diterpenos Casbanos

Diterpenos casbanos são compostos bicíclicos formados por uma unidade dimetil-ciclopropil fundida a um anel de 14 membros. O primeiro diterpeno casbano relatado foi o casbano (3.25), que foi isolado de uma preparação enzimática de mudas de mamona [ROBINSON; WEST, 1970]. Por ser o mais simples dos casbanos, o casbano passou a ser estruturalmente usado como referência para os demais diterpenos de mesmo esqueleto.

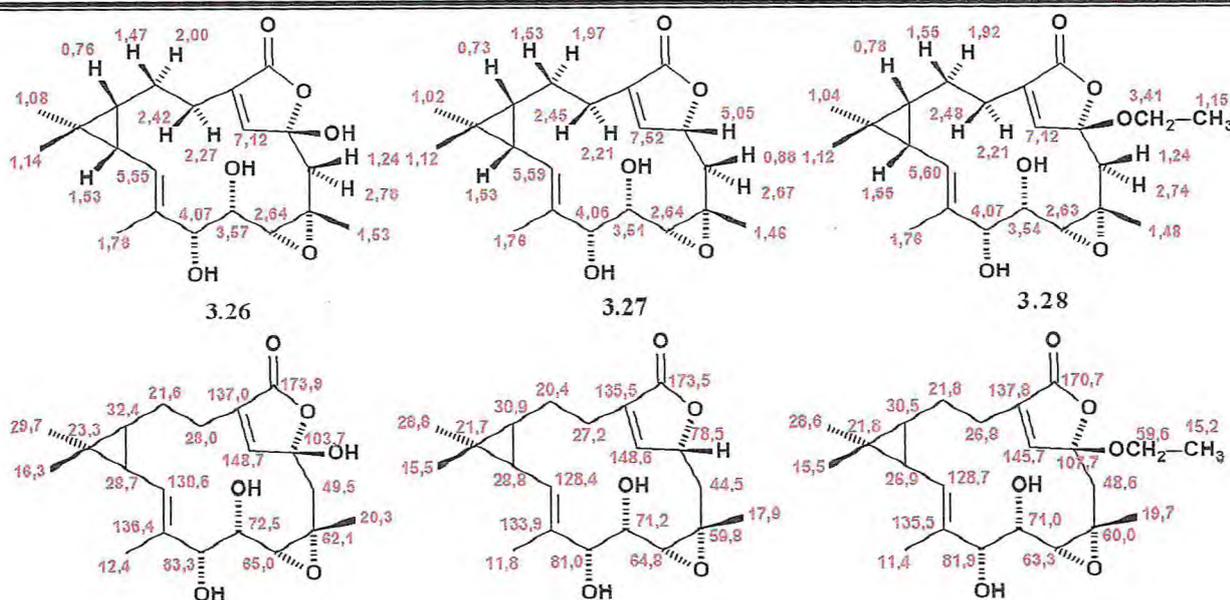


Levantamento bibliográfico sobre dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de diterpenos casbanos, utilizando SciFinder Scholar<sup>TM</sup> 2007 (Tab. 2, pág. 16), revelou que o processo de ciclização do precursor geranyl-geranyl pirofosfato durante a formação da estrutura bicíclica do esqueleto casbano, pode promover uma fusão entre os dois anéis com estereoquímica *cis* ou *trans*. Em particular, as estruturas com fusão *cis* apresentam deslocamento químico entre  $\delta$  15 e 17 ppm para o carbono C-16, enquanto que as estruturas com fusão *trans* apresentam deslocamento químico entre  $\delta$  22 e 24 ppm para o mesmo carbono. Este fato pode ser explicado pela compressão estérica sofrida pelo grupamento metila (C-16), provocado pela presença do hidrogênio H-1 ou H-2 na estereoquímica *trans*. A estereoquímica dos carbonos C-3, C-7 e C-

11 nos esqueletos casbânicos sugerem a presença dos possíveis precursores (2*E*,6*E*,10*E*), (2*Z*,6*E*,10*E*) e (2*E*,6*E*,10*Z*)-geranil-geranil pirofosfato na biossíntese desses compostos. Como já discutido anteriormente, esses isômeros são formados pela isomerização das unidades isoprênicas, bem como os diferentes sistemas de enzimas envolvidas no processo de formação do geranil, o que pode variar de espécimes para espécimes. A funcionalização do hidrocarboneto do esqueleto casbano ocorre, quase que exclusivamente, pelo processo de oxidação alílica ou ainda através de formação e abertura de epóxidos nas duplas ligações.

Os dados apresentados a seguir, relatam a ocorrência de 26 diterpenos casbanos em espécies da família Euphorbiaceae (*Agrostistachys*, *Maprounea*, *Simularia*, *Croton*, *Euphorbia* e *Mallotus*) e do coral *Simularia depressa*, com a apresentação de seus dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$ .

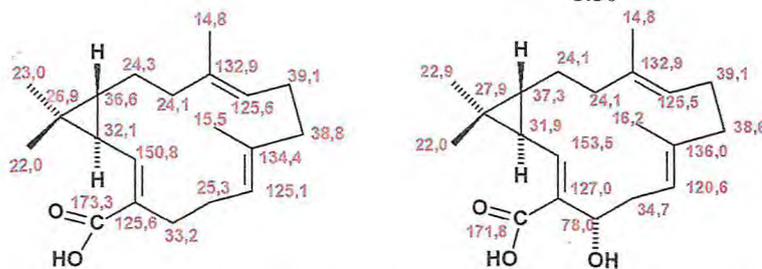
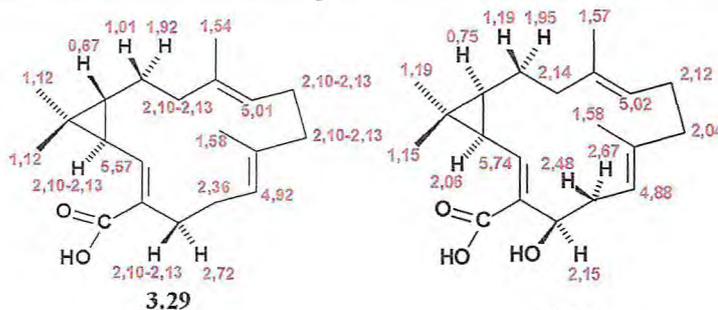
**Tabela 2** – Levantamento dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de diterpenos casbanos.



**Espécie:** *Mallotus hookerianus* [BAI; YANG; YE, 2006]

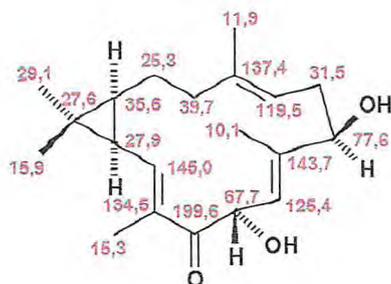
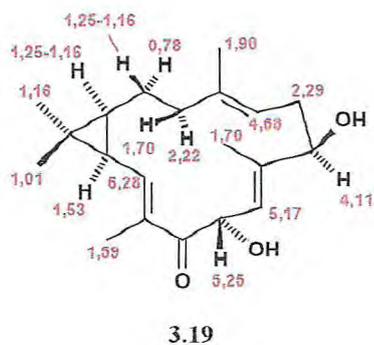
**Parte utilizada:** Parte aérea

[RMN  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz, **3.26** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), **3.27** ( $\text{DMSO-d}_6$ ), **3.28** ( $\text{CDCl}_3$ )]



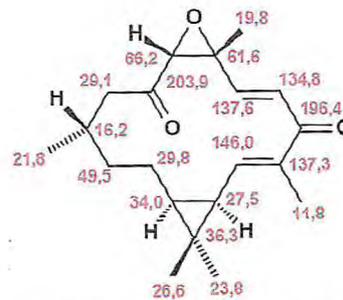
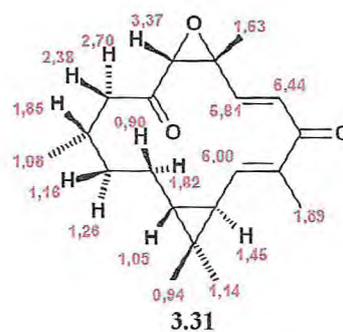
Espécie: *Euphorbia ebracteolata* [XU *et al*, 1998]

Parte utilizada: Parte aérea  
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]



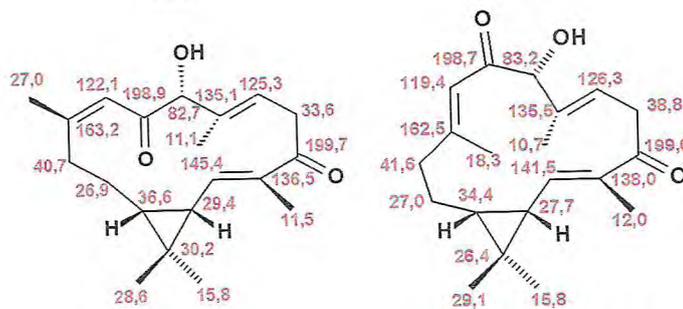
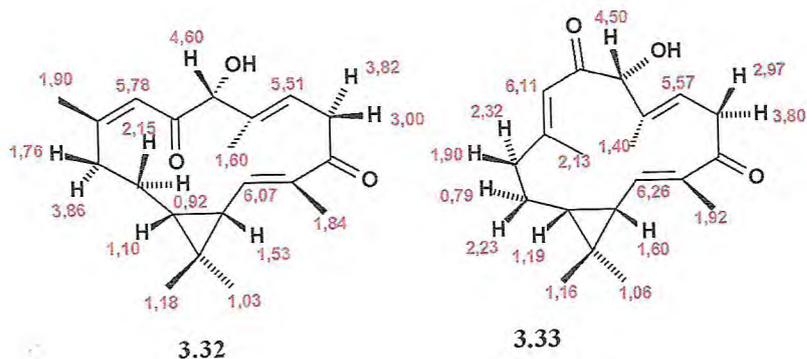
Espécie: *Croton nepetaefolius* [MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990]

Parte utilizada: Raízes  
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ]

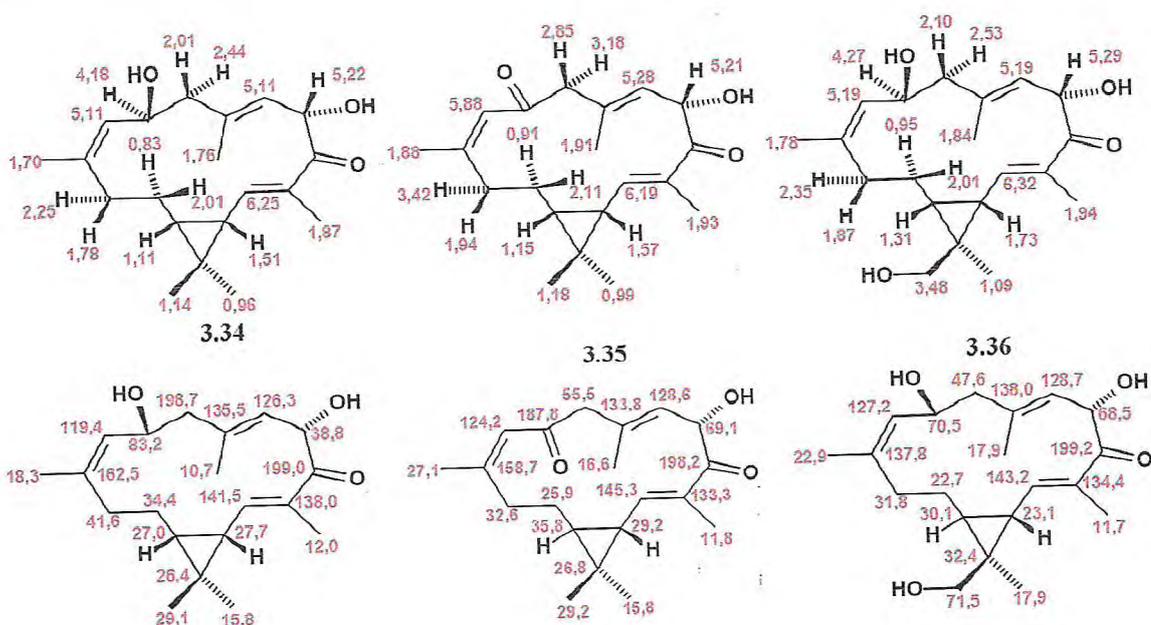


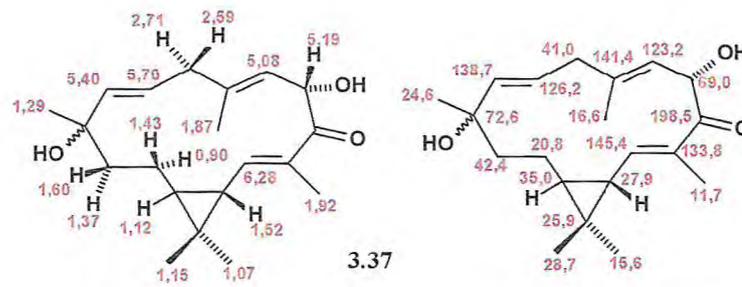
Espécie: *Simularia microclavata* [ZHANG *et al*, 2005]

Parte utilizada: Coral  
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]



Espécie: 3.32 *Maprounea Africana* [KASHMAN *et al*, 1994]  
 Parte utilizada: Raízes  
 [RMN <sup>13</sup>C, 125 MHz e RMN <sup>1</sup>H, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>]

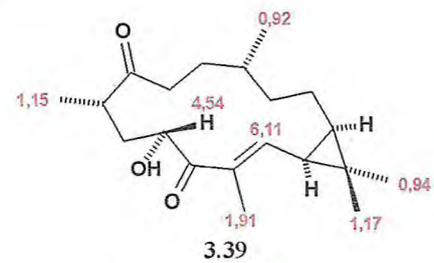
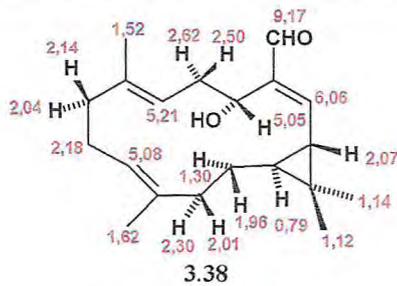




Espécie: *Agrostistachys hookeri* [CHOI *et al*, 1988]

Parte utilizada: Parte aérea

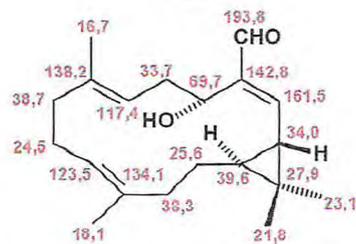
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]



Espécie: *Euphorbia pekinensis* [LIANG *et al*, 2009]

Parte utilizada: Raízes

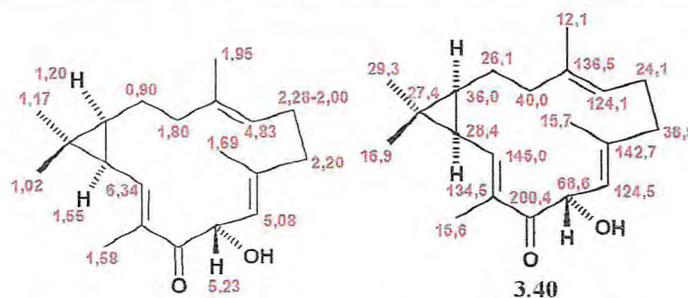
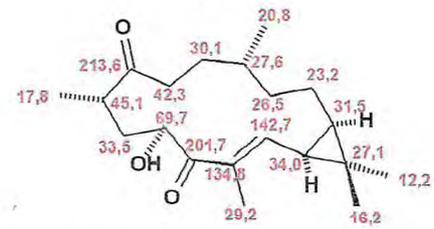
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]



Espécie: *Croton nitens* [BURKE *et al*, 1981]

Parte utilizada: Folhas

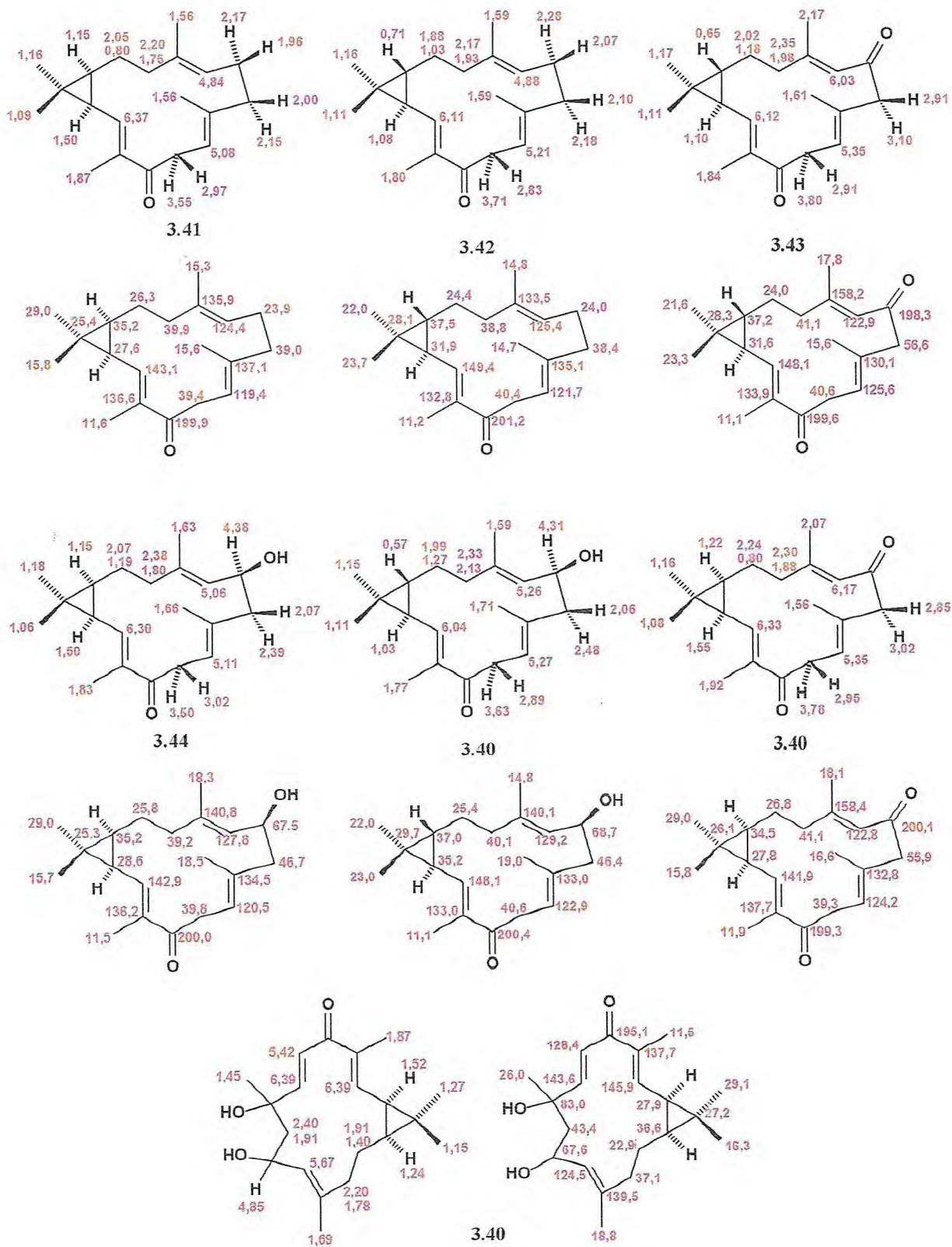
[RMN  $^{13}\text{C}$ , 25 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]

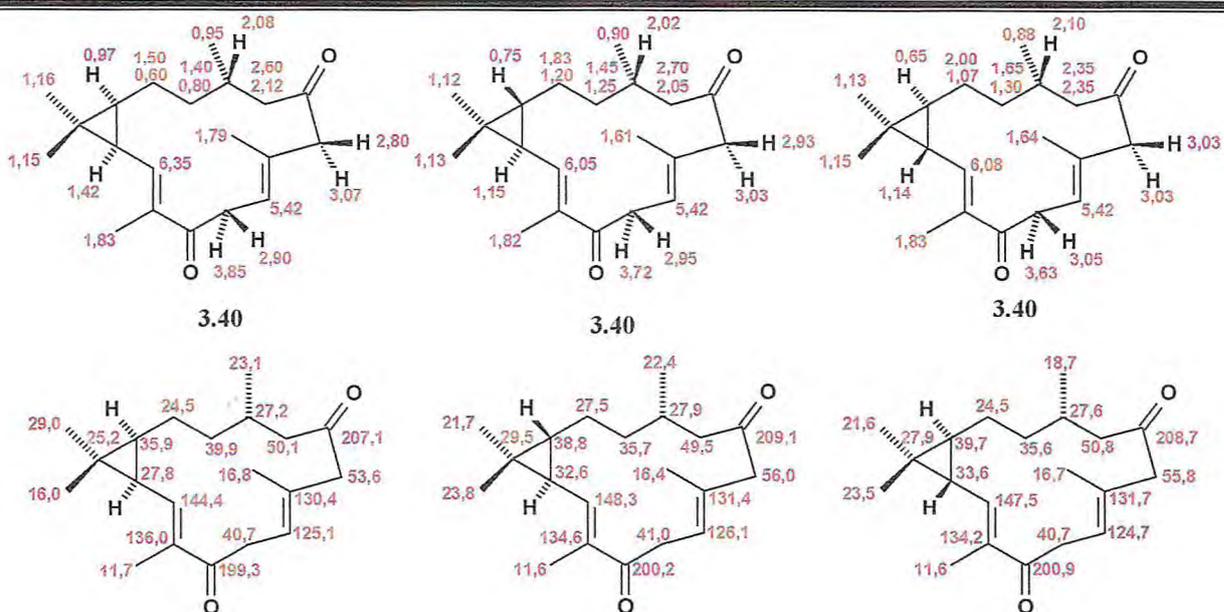


Espécie: *Croton nepetaefolius* [SANTOS, 2008]

Parte utilizada: Raízes

[RMN  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]





Espécie: *Simularia depressa* [LI et al, 2010]

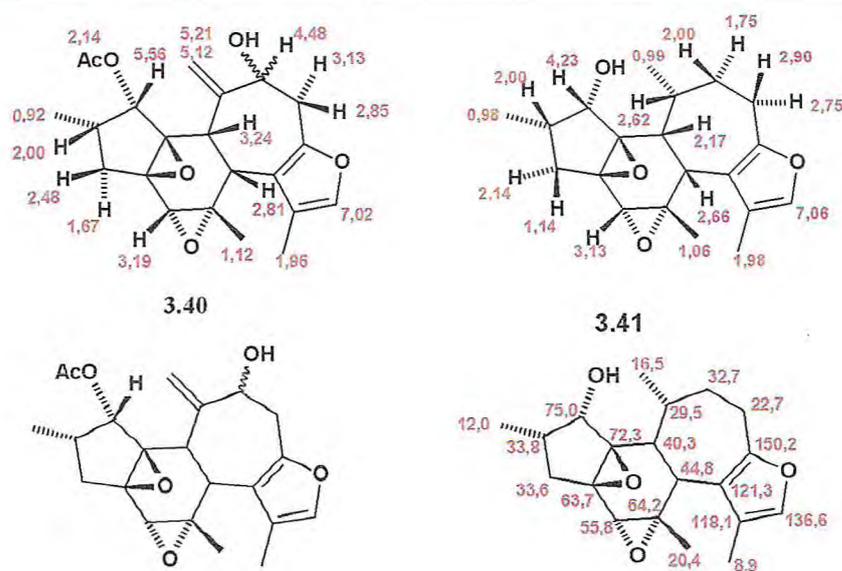
Parte utilizada: Coral

[RMN <sup>13</sup>C, 100 MHz e RMN <sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]

## II. Ocorrência de Diterpenos Crotofolanos

Os diterpenos crotofolanos, são compostos tricíclicos, originalmente obtidos a partir da abertura do anel dimetilciclopropil do esqueleto jatrofolano, muitas vezes conhecido como esqueleto *seco*-jatrofolano. Levantamento realizado no SciFinder Scholar™ 2007, mostrou que os diterpenos de esqueleto crotofolano, além de raros, são restritos ao gênero *Croton* da família Euphorbiaceae. A Tabela 3 apresenta os diferentes diterpenos crotofolanos isolados das espécies *C. corylifolius*, *C. tiglium*, *C. haumanianus* e *C. dichogamus* e seus respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

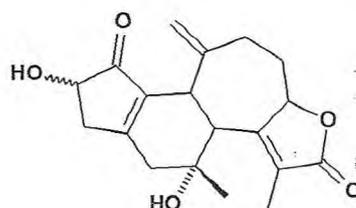
**Tabela 3** – Levantamento dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de diterpenos crotofolanos.



**Espécie:** *Croton dichogamus* [JOGIA *et al*, 1989]

**Parte utilizada:** Folhas

[RMN  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]

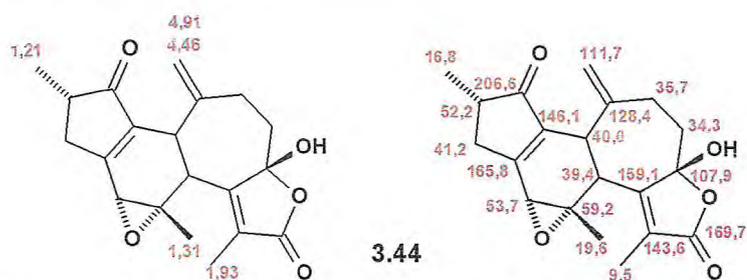


**3.42**

**Espécie:** *Croton tiglium* [EISCH; GALLE *et al*, 1975]

**Parte utilizada:** Partes aéreas

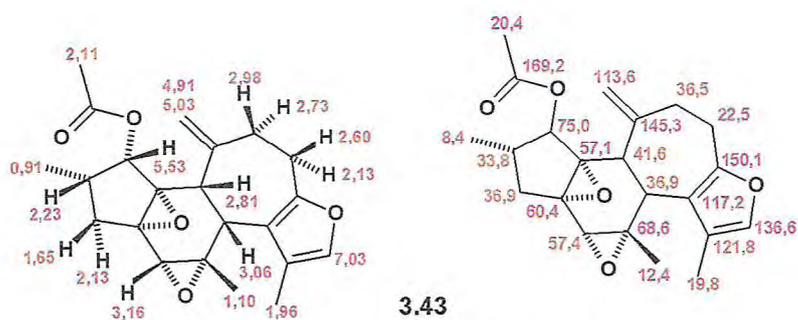
[RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  não informado, determinado por cristalografia de raio X]



Espécie: *Croton corylifolius* [BLOUT; MANCHAND, 1979]

Parte utilizada: Parte aérea

[RMN  $^{13}\text{C}$ , 25 MHz e RMN  $^1\text{H}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]



Espécie: *Croton haumanianus* [TCHISSAMBOU *et al*, 1990]

Parte utilizada: Parte aérea

[RMN  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]

### 3.2 Referências Bibliográficas

- BACCELLI, C.; BLOCK, S.; VAN HOLLE, B.; SCHANCK, A.; CHAPON, D.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; MOREL, N.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes Isolated from *Croton zambesicus* Inhibit KCl-induced Contraction. **Planta Med.**, v. 71, n. 11, p. 1036-39, 2005.
- BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; BLOCK, S.; ABAD, A.; MOREL, N.; QUETIN-LECLERCQ, J. Vasorelaxant Activity of Diterpenes from *Croton zambesicus* and Synthetic Trachylobanes and Their Structure-Activity Relationships. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 6, p. 910-917, 2007.
- BAI, Y.; YANG, Y.; YE, Y. Hookerianolides A–C: Three Novel Casbane-type Diterpenoid Lactones from *Mallotus hookerianus*. **Tetrahedron Lett.**, v. 47, p. 6637–6640, 2006.
- BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. H.; LLABRES, G.; PAUW-GILLET, M.-C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the Leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1165-1171, 2004.
- BLOUT, J. F.; MANCHAND, H. R. The Structure of Crotofolin E, a Novel Tricyclic Diterpene from *Croton carylifolius*. **Tetrahedron Lett.**, v. 20, n.36 p. 3345-3348, 1979.
- BORQUEZ, J.; MANCILLA, A.; PEDREROS, S.; LOYOLA, L. A.; MORALES, G.; WITTKE, O.; BRITO, I. Isolation and Structure of Crotonic acid, a Clerodane Diterpenoid from *Croton chilensis*. **Soc. Chil. de Quim.**, v. 40, n. 2, p. 157-162, 1995.
- BURKE, B. A.; CHAN, W. R.; PASCOE, K. O.; BLOUNT, J. F.; MANCHAND, P. S. The Structure of Crotonitenone, a Novel Casbane Diterpene from *Croton nitens* Sw. (Euphorbiaceae). **J. Chem. Soc. Perkin I**, p. 2666-2669, 1981.
- CARVALHO, J. C. T.; COSER, M. F. S.; MACIEL, M. A. M.; DA CUNHA, A. P.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of *trans*-Dehydrocrotonin, a 19-Nor-clerodane Diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 62, n. 5, p. 402-404 1996.
- CHOI, Y.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant Anticancer Agents of *Agrostistachys hookeri*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, n.1, p. 110-116, 1988.
- CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two Cleistanthane-type Diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.
- DE HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N.; HERNANDEZ, L. R.; BURGUEÑO-TAPIA, E.; JOSEPH-NATHAN, P. Three New Diterpenoids Based on the Novel Sarcopetalane Skeleton from *Croton sarcopetalus*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 2, p. 222-225, 2000.

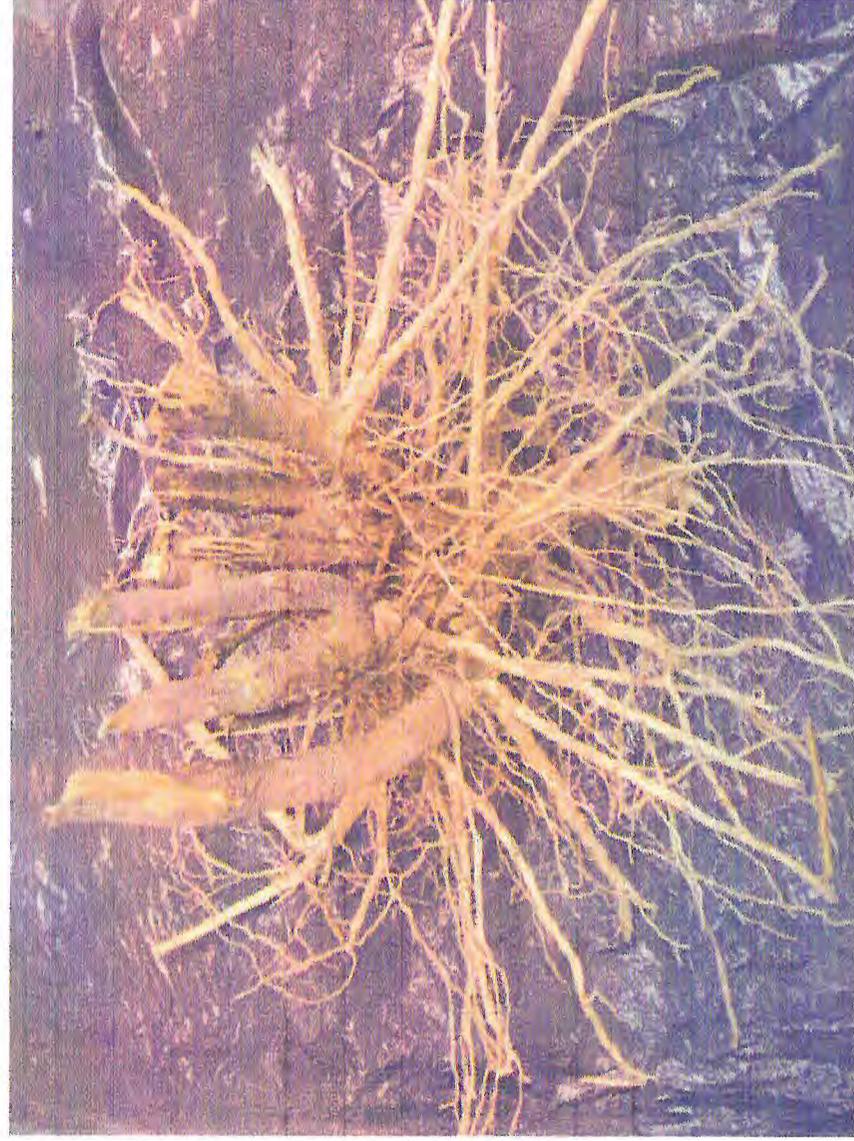
- DEWICK, P. M. The Biosynthesis of C-5-C-25 Terpenoid Compounds. **Nat. Prod. Rep.**, v. 16, n. 11, p. 97-9-101, 1999.
- EISCH, J. J.; GALLE, J. E. The Structure of Crotofolin A, a Diterpene with a New Skeleton. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, n. 15, p. 4437-4439 1975.
- EVANS, F. J.; TAYLOR, S. E. Pro-inflammatory, Tumour-promoting and Anti-tumour diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 44, p. 91-99, 1983
- GUTIÉRREZ, M.; CAPSON, T.; GUZMÁN, H. M.; GONZÁLEZ, J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. Leptolide, a New Furanocembranolide Diterpene from *Leptogorgia Alba*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 4, p. 614-616, 2005.
- HANSON, J. R. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 15, p. 93-96, 1998.
- HECKER, E.; BARTSCH, H.; BRESCH, H.; GSCHWENDT, M.; HAERLE, E.; KUBINYI, H.; SCHAIRER, H. U.; SZCEPANSKI, C. V.; THIELMANN, H. W.; KREIBICH, G. Structure and Stereochemistry of the Tetracyclic Diterpene Phorbol from *Croton tiglium*. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, p. 3165-3170, 1967.
- JOGIA, M. K.; ANDERSEN, R. J.; PÁRKÁNYI, L.; CLARDY, J.; DUBLIN, H. T.; SINCLAIR, A. R. E. Crotofolane Diterpenoids from the African Shrub *Croton dichogamus* Pax. **J. Org. Chem.**, v. 54, n. 7, p. 1654-1657, 1989.
- JOGIA, M. K.; ANDERSEN, R. J.; PARKANYI, L.; CLARDY, J.; DUBLIN, H. T.; SINCLAIR, A. R. E. Crotofolane Diterpenoids from the African Shrub *Croton dichogamus* Pax. **J. Org. Chem.**, v. 57, n. 7, p. 1654-1657, 1989.
- KASHMAN, Y.; BERNART, M. W.; TISCHLER, M.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. Kaoumbalones A and B, New Casbane Diterpenes from *Maprounea Africana*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 3, p. 426-430, 1994
- KUO, P.-C.; SHEN, Y.-C.; YANG, M.-L.; WANG, S.-H.; THANG, T. D.; DUNG, N. X.; CHIANG, P.-C.; LEE, K.-H.; LEE, E.-J.; WU, T.-S. Crotonkinins A and B and Related Diterpenoids from *Croton tonkinensis* as Anti-inflammatory and Antitumor Agents. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 12, p. 1906-1909, 2007.
- LI, Y.; CARBONE, M.; VITALE, R. M.; AMODEO, P.; CASTELLUCCIO, F.; SICILIA, G.; MOLLO, E.; NAPPO, M.; CIMINO, G.; GUO, Y.; GAVAGNIN, M. Rare Casbane Diterpenoids from the Hainan Soft Coral *Simularia depressa*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 133-138, 2010.
- LIANG, Q.; DAI, C.; JIANG, J.; TANG, Y.; DUAN, J. A New Cytotoxic Casbane Diterpene from *Euphorbia pekinensis*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 514-516, 2009.
- MCCHESENEY, J. D.; SILVEIRA, E. R. 12-Hydroxyhardwickic Acid and Sonderianial, neo-clerodanes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 12, p. 3411-14, 1989.

- MOURA, V. L. A.; MONTE, F. J. O.; BRAZ FILHO, R. A New Casbane-type Diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **J. Nat. Prod.**, v. 53, n. 6, p. 1566-1571, 1990.
- PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. Clerodane Diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 171-174, 1998.
- RAMOS, F.; TAKAISHI, Y.; KASHIWADA, Y.; OSORIO, C.; DUQUE, C.; ACUNA, R.; FUJIMOTO, Y. *ent*-3,4-*seco*-Labdane and *ent*-Labdane Diterpenoids from *Croton stipuliformis*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2406-2410, 2008.
- RICHARD, J.; SCHMIDT, F. L. S. The Biosynthesis of Tiglane and Related Diterpenoids; an Intriguing Problem. **Botanic. J. Lin. Soc.**, v. 94, p. 221-230, 1987.
- ROBINSON, D. R.; WEST, C. A. Biosynthesis of Cyclic Diterpenes in Extracts from Seedlings of *Ricinus communis*. I. Identification of Diterpene Hydrocarbons Formed from Mevalonate. **Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 70-79, 1970.
- ROENGSUMRAN, S.; PATA, P.; RUENGRAWEEWAT, N.; TUMMATORN, J.; PORNPAAKAKUL, S.; SANGVANICH, P.; PUTHONG, S.; PETSOM, A. New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-*seco*-cleistanthane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Chem. Nat. Comp.** v. 45, n. 5, p. 641-646, 2009.
- ROENGSUMRAN, S.; PORNPAAKAKUL, S.; MUANGSIN, N.; SANGVANICH, P.; NHUJAK, T.; SINGTOTHONG, P.; CHAICHIT, N.; PUTHONG, S.; PETSOM, A. New Halimane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Planta Med.**, v. 70, n. 1, p. 87-89, 2004.
- SANTOS, S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos Casbanos e Acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, V. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.
- SATO, A.; OGISO, A.; KUWANO, H. Acyclic Diterpenes from *Croton kerrii*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2207-2279, 1980.
- SIEMS, K.; DOMINGUEZ, X. A.; JAKUPOVIC, J. Diterpenes and Other Constituents from *Croton cortesianus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4363-4365, 1992.
- SUAREZ, A. I.; CHAVEZ, K.; MONACHE, F. D.; VASQUEZ, L.; DELANNOY, D. M.; ORSINI, G.; COMPAGNONE, R. S. New 3,4-*seco-ent*-kaurenes from *Croton caracasana* Flowers. **Nat. Prod. Comm.**, v. 3, n. 3, p. 319-322, 2008.
- TCHISSAMBOU, L.; CHIARONI, A.; RICHE, C.; KHUONG-HUU, F. Crotoacyliferan and Crotohaumanoxide, New Diterpenes from *Croton haumanianus* J. Leonard. **Tetrahedron**, v. 46, n. 15, p. 5199-5202, 1990.
- XU, Z.; SUN, J.; XU, R.; QIN, G. Casbane Diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 149-151, 1998.

ZHANG, C.; YAN, S.; ZHANG, G.; LU, W.; SU, J.; ZENG, L.; GU, L.; YANG, X.; LIAN, Y. Cytotoxic Diterpenoids from the Soft Coral *Simularia microclavata*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n.7, p. 1087-1089, 2005.

## CAPÍTULO IV

## PARTE EXPERIMENTAL



*Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: Croton argyrophyllus Müll.*

| Francisco Artur

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Material Botânico

Os talos e raízes de *Croton argyrophyllus* Müll, selecionados para este estudo, foram coletados no município de Jacobina-BA, em maio de 2006, pelos Professores Edilberto Rocha Silveira e Manuel de Andrade Neto, pertencentes ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica foi realizada pelo Professor Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, cuja exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra/UFC, sob n° 39.434.

### 4.2 Métodos de Análise

#### 4.2.1 Métodos Cromatográficos

Os processos cromatográficos de adsorção foram executados utilizando gel de sílica das marcas Merck® e Vetec® com granulometria de 63-200 µm para as cromatografias gravitacionais e de 40-63 µm para as cromatografias sob pressão – flash. O comprimento e diâmetro das colunas cromatográficas empregadas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. As colunas utilizadas nas cromatografias “flash” foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente.

Para as cromatografias de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de gel de sílica 60 ( $\varnothing$  µm 2-25) sobre alumínio da marca Merck® (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm).

Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade, todos de qualidade P.A. das marcas Synth® ou Vetec®. Os eluentes utilizados nos processo cromatográficos de adsorção sob média pressão foram escolhidos após análise prévia das frações por CCD, a fim de permitir ao constituinte desejado apresentar Rf próximo de 0,3.

A revelação das substâncias nas cromatoplacas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F; por contato com vapores de iodo (I<sub>2</sub>), e por aspersion com solução de vanilina

(C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) e ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) em etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), seguida de aquecimento em chapa aquecedora a 100°C por aproximadamente 5 minutos.

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals<sup>®</sup>, utilizando-se metanol puro como fase móvel.

Os fracionamentos por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizados em um equipamento Shimadzu modelo LC-20AT constituído de bombas ternárias e um detector Shimadzu SPD-M20A. As colunas utilizadas foram Phenomenex Sílica (2) (250 x 10 mm, 5 µ) (Ref. N° 00G-4247-N0) de fase normal. Os solventes empregados apresentaram grau de pureza CLAE (MeOH-Tedia<sup>®</sup>, Hexano-Merck<sup>®</sup>, AcOEt-Merck<sup>®</sup> e CHCl<sub>3</sub>-Merck<sup>®</sup>) e foram filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomex). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise, e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 µm (Waters).

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes dos procedimentos cromatográficos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório Büchi<sup>®</sup> de modelo R-220.

#### **4.2.2 Métodos Espectrométricos**

##### **I. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo FT-IR Spectrum 1000 da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando KBr para preparação de pastilhas para amostras sólidas ou em forma de filme para as amostras líquidas análises das amostras.

##### **II. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C)**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker<sup>®</sup>, modelo Advance DPX-300 e/ou modelo Advance DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do

hidrogênio a 300,13 MHz e a 500,13 MHz, e a frequência do carbono a 75,47 MHz e a 125,75 MHz.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), acetona deuterada ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) e benzeno deuterado ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ), comercializados pela Merck® e Aldrich®.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (7,27 ppm), metanol (3,31), acetona (2,05) e benzeno (7,16). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (77,23), metanol (49,15), acetona (206,68; 29,92) e benzeno (128,39)

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete), td (triplo dupletos) e m (multiplete).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$ , aplicando ângulo de nutação de  $135^\circ$  (CH e  $\text{CH}_3$  com amplitude em oposição aos  $\text{CH}_2$ ). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro CPD (Composite Pulse Decoupling) e DEPT  $135^\circ$ . A descrição dos carbonos pelo padrão de hidrogenação seguiu a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

### III. Espectrometria de massa

Os espectros de massa de baixa resolução dos constituintes não-voláteis foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu®, modelo QP 5000, DI-50, por ionização eletrônico a 70 eV. Pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

Os espectros de massa de alta resolução (HRESIMS) foram obtidos em espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) – SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC).

### 4.2.3 Rotação Óptica

As rotações ópticas foram determinadas em um polarímetro Perkin Elmer modelo 341 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As medidas foram expressas utilizando a notação  $[\alpha]_D^T$  onde “D” é a raia D da luz monocromática de sódio de comprimento de onda igual a 589,3 nm, e T a temperatura que foi realizada a medida em °C. Para dissolução das amostras utilizou-se clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), Acetona ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) e metanol (CH<sub>3</sub>OH).

### 4.2.4 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2°C/min e não foram corrigidas.

## 4.3 Isolamento dos Metabólitos Secundários dos Talos de *C. argyrophyllus*

Os talos de *C. argyrophyllus* (2,800 Kg) foram secos, triturados e extraídos exaustivamente (72 horas) com hexano a temperatura ambiente. Após evaporação do solvente por destilação sob pressão reduzida, obteve-se 12,96 g de um material oleoso amarelado, o qual foi denominado CAH (*Croton argyrophyllus* Hexano). O extrato hexânico dos talos de *C. argyrophyllus* apresentou um precipitado branco, que pós filtração e recristalização com hexano, levou à obtenção de um cristal homogêneo em cromatografia em camada delgada (CCD), o qual foi denominado CA-1 (572,1 mg). A análise por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (uni e bidimensionais) de CA-1, revelou a estrutura de um diterpeno furânico de esqueleto do tipo crotofolano e de caráter inédito na literatura, denominado crotomicansin. Posterior análise espectrométrica da solução sobrenadante de CAH revelou somente presença de ácidos graxos, os quais não apresentavam interesse para nosso estudo.

A partir da “torta” remanescente, após a obtenção do extrato hexânico, efetuou-se uma extração exaustiva (72 horas) com etanol, também à temperatura ambiente. Este solvente foi evaporado por destilação sob pressão reduzida, fornecendo 98,26 g de um extrato oleoso de coloração marrom escura, denominado CAE (*Croton argyrophyllus* Etanólico).

O Fluxograma 1 (Pág. 46) contém a síntese do fracionamento do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*. As frações submetidas a tratamento cromatográfico, descritas a seguir, foram escolhidas por apresentarem manchas definidas e homogêneas na análise em CCD.

#### 4.3.1 Tratamento Cromatográfico do Extrato Etanólico dos Talos de *C. argyrophyllus* (CAE)

40,0 g do extrato etanólico de *C. argyrophyllus* (CAE) foram submetidos a uma partição líquido/líquido, utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Após este procedimento obteve-se as frações: hexânica – CAE/H (5,76 g), clorofórmica – CAE/C (21,38 g); acetato de etila – CAE/A (1,76 g) e metanólica CAE/M (6,39 g).

##### I. Tratamento Cromatográfico de CAE/C

21,38 g da fração clorofórmica (CAE/C) foi cromatografada em uma coluna filtrante, CAE/C foi acondicionada sobre 105,04 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 63-200) em coluna cromatográfica de 4,5 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, segundo a tabela a seguir (Tab. 4).

**Tabela 4-** Fracionamento preliminar da CAE/C

SOLVENTE	ASPECTO	VOLUME (ml)	MASSA (g)
Hexano (CAE/CH)	Óleo amarelo	200	0,028
Clorofórmio (CAE/CC <sub>1</sub> )	Óleo laranja	300	2,54
Clorofórmio (CAE/CC <sub>2</sub> )	Óleo laranja	350	3,30
Clorofórmio (CAE/CC <sub>3</sub> )	Óleo laranja	350	1,92
Acetato de etila (CAE/CA)	Óleo castanho	200	5,94
Metanol (CAE/CM)	Óleo escuro	100	7,40

## II. Isolamento de CA-2

Uma alíquota de 1,10 g da fração CAE/CC<sub>2</sub> foi recromatografada em aproximadamente 47,50 g de gel de sílica 60 (Ø µm 40-63) em uma coluna de 3,5 cm de diâmetro. Foram utilizados como eluentes uma mistura dos solventes hexano (H) e acetato de etila (A) (4:1) de forma isocrática, para obtenção de 106 frações. A análise em CCD permitiu a reunião de frações semelhantes como detalhado a seguir (Tab. 5).

**Tabela 5** - Fracionamento cromatográfico da CAE/CC<sub>2</sub>

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/CC <sub>2</sub> (1-10)	Óleo amarelo	17,2
CAE/CC <sub>2</sub> (11-16)	Óleo amarelo	22,1
CAE/CC <sub>2</sub> (17-22)	Óleo castanho	29,3
CAE/CC <sub>2</sub> (23-28)	Óleo castanho	38,4
CAE/CC <sub>2</sub> (29-38)	Óleo castanho	52,6
CAE/CC <sub>2</sub> (39-78)	Óleo castanho	186,8
CAE/CC <sub>2</sub> (79-106)	Óleo castanho	177,5

A fração CAE/CC<sub>2</sub> (79-106) (177,5 mg) foi adsorvida em aproximadamente 200,0 mg de gel de sílica 60 (Ø µm 40-63), pulverizado em gral de porcelana e acondicionada sobre 12,0 g de gel de sílica 60 (Ø µm 40-63) em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro. Foi utilizado como eluente uma mistura binária de clorofórmio (C) e acetato de etila (A) (4:1) de forma isocrática, para a obtenção de 31 frações. A posterior análise em CCD permitiu a reunião de frações iguais em cinco frações resultantes, como descritas a seguir (Tab. 6).

**Tabela 6** - Fracionamento cromatográfico da CAE/CC<sub>3</sub>

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/CC <sub>2</sub> (79-106) (1-13)	Óleo amarelo	23,7
CAE/CC <sub>2</sub> (79-106) (14-15)	Óleo amarelo	34,4
CAE/CC <sub>2</sub> (79-106) (16-23)	Óleo incolor	39,6

CAE/CC <sub>2</sub> (79-106) (24-30)	Óleo amarelo	9,4
CAE/CC <sub>2</sub> (79-106) M	Óleo amarelo	12,0

A fração CAE/CC<sub>2</sub> (79-106) (16-23) (39,6 mg) mostrou-se homogênea em CCD, a qual foi denominada CA-2. A análise espectroscópica (RMN uni e bidimensionais, IV e EM/IE) permitiu caracterizar CA-2 como sendo um diterpeno de esqueleto casbano conhecido como crotonepetin.

### III. Tratamento Cromatográfico de CAE/H

O fracionamento cromatográfico preliminar em coluna filtrante de 5,50 g de CAE/H foi realizado com a adsorção da amostra em aproximadamente 2,87 g de gel de sílica 60 ( $\emptyset$   $\mu$ m 63-200), pulverização em gral de porcelana e acondicionamento da sobre 26,0 g de gel de sílica 60 ( $\emptyset$   $\mu$ m 63-200) em coluna de 5,0 cm de diâmetro. Foram utilizados como eluentes os solventes: hexano (H), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M), em ordem crescente de polaridade, segundo a Tabela 7.

**Tabela 7** - Fracionamento preliminar da CAE/H

SOLVENTE	FRAÇÕES	ASPECTO	VOLUME (ml)	MASSA (g)
Hexano	CAE/HH	Óleo incolor	400	1,03
	CAE/HC <sub>1</sub>	Óleo amarelo	100	1,29
Clorofórmio	CAE/HC <sub>2</sub>	Óleo amarelo	100	0,52
	CAE/HC <sub>3</sub>	Óleo amarelo	100	0,64
	CAE/HC <sub>4</sub>	Óleo amarelo	100	0,27
	CAE/HA	Óleo amarelo	200	0,94
Metanol	CAE/HM	Óleo escuro	80	0,15

### IV. Isolamento de CA-3

A fração CAE/HC<sub>4</sub> (275,2 g) foi recromatografada em 20,86 g de gel de sílica 60 ( $\emptyset$   $\mu$ m 40-63) em coluna de 2,0 cm de diâmetro. Foram utilizados como eluentes os solventes: hexano (H), acetato de etila (A) e metanol (M), puros ou em mistura binária, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Posterior análise em CCD permitiu a reunião das frações semelhantes, de acordo com a Tabela 8.

SOLVENTE	VOLUME (mL)	FRAÇÕES (≈ 8 mL)
H/A 10%	60	Volume morto
H/A 15%	100	1 a 12
H/A 20%	100	14 a 27
H/A 40%	100	28 a 40
H/A 60%	100	41 a 54
H/A 80%	100	55 a 67
A	50	68 a 72
M	50	Volume único

**Tabela 8** - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC<sub>4</sub>

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/HC <sub>4</sub> (1-2)	Óleo incolor	11,9
CAE/HC <sub>4</sub> (3-9)	Óleo amarelo	38,7
CAE/HC <sub>4</sub> (10-13)	Óleo amarelo	13,5
CAE/HC <sub>4</sub> (14-18)	Óleo amarelo	22,6
CAE/HC <sub>4</sub> (19-32)	Óleo amarelo	70,7
CAE/HC <sub>4</sub> (33-36)	Óleo amarelo	30,5
CAE/HC <sub>4</sub> (37-63)	Óleo amarelo	73,0
CAE/HC <sub>4</sub> (64-72)	Óleo amarelo	13,3
CAE/HC <sub>4</sub> M	Óleo escuro	7,4

38,7 mg da fração CAE/HC<sub>4</sub> (3-9) foi acondicionado sobre uma camada de 10,05 g de gel de sílica 60 (Ø µm 40-63), em uma coluna cromatográfica de 1,5 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluente uma mistura binária de clorofórmio (C) e acetato de etila (A) (4:1) de modo isocrática, levando à obtenção de 70 frações. A análise por CCD permitiu a reunião das frações semelhante em quatro frações resultantes (Tab. 9).

**Tabela 9** - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC<sub>4</sub> (3-9)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/HC <sub>4</sub> (3-9) (1-10)	Óleo amarelo	5,3
CAE/HC <sub>4</sub> (3-9) (11-32)	Óleo amarelo	5,7

CAE/HC <sub>4</sub> (3-9) (33-63)	Óleo amarelo	12,5
CAE/HC <sub>4</sub> (3-9) (64-70)	Óleo amarelo	6,7

A fração CAE/HC<sub>4</sub> (3-9) (33-63) (12,5 mg), apresentou-se homogênea em CCD e foi denominada CA-3. Após análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais foi caracterizada como um diterpeno de esqueleto casbano inédito na literatura.

#### V. Isolamento de CA-4

1.29 g da fração CAE/HC<sub>1</sub> (Pág. 34) foram dissolvidos em hexano e acondicionado sobre uma coluna (2,5 cm de diâmetro) contendo 68,0 g de gel de sílica 60 (Ø µm 63-200). O material foi cromatografado utilizando mistura binárias dos solventes hexano (H), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M), seguindo uma ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 148 frações que após a análise por CCD permitiu a reunião de frações semelhantes em seis frações resultantes.

SOLVENTE	VOLUME (mL)	FRAÇÕES (≈ 8 mL)
H/C 20%	50	Volume morto
H/C 20%	400	1 a 54
H/C 50%	300	55 a 91
C	300	92 a 127
A	100	128 a 148
M	50	Volume único

**Tabela 10** - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC<sub>1</sub>

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/HC <sub>1</sub> (1-9)	Óleo amarelo	47,9
CAE/HC <sub>1</sub> (10-27)	Óleo amarelo	28,0
CAE/HC <sub>1</sub> (28-37)	Óleo amarelo	23,9
CAE/HC <sub>1</sub> (38-51)	Óleo amarelo	23,1
CAE/HC <sub>1</sub> (52-76)	Óleo amarelo	20,2
CAE/HC <sub>1</sub> (77-89)	Óleo amarelo	11,8
CAE/HC <sub>1</sub> (90-102)	Óleo amarelo	55,3
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115)	Óleo amarelo	319,1

CAE/HC <sub>1</sub> (116-148)	Óleo amarelo	365,8
CAE/HC <sub>1</sub> M	Óleo escuro	107,0

A fração CAE/HC<sub>1</sub> (103-115) (319,1 mg) foi adsorvida em aproximadamente 230,7 mg de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 40-63), pulverizado em gral de porcelana e acondicionada sobre 53,2 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 40-63) em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro. A coluna foi eluída com uma mistura binária de hexano (H) e acetato de etila (A) (9:1) de forma isocrática, levando a obtenção de 70 frações, as quais foram reunidas segundo suas semelhanças em CCD (Tab. 11).

**Tabela 11** - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC<sub>1</sub> (103-115)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) (1-7)	Óleo amarelo	38,9
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) (8-10)	Óleo amarelo	53,2
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) (11-25)	Óleo amarelo	48,7
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) (26-32)	Óleo amarelo	16,9
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) (33-70)	Óleo amarelo	47,2
CAE/HC <sub>1</sub> (103-115) M	Óleo amarelo	112,2

A fração CAE/HC<sub>1</sub> (103-115) (26-32) (16,9 mg), se mostrou homogênea em CCD e foi denominada CA-4. Após análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais, IV e Massa de alta resolução, CA-4 foi caracterizado como um diterpeno casbano furânico de caráter inédito na literatura.

## VI. Isolamento de CA-5

22,6 mg da fração CAE/HC<sub>4</sub> (14-18) (Pág 36) foi adsorvida em aproximadamente 30,0 mg de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 40-63), pulverizado em gral de porcelana e acondicionada sobre 8,09 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 40-63) em uma coluna de 1,5 cm de diâmetro. Para eluição foi utilizada uma mistura dos solventes clorofórmio (C) e acetato de etila (A) (3:2), de forma isocrática, levando à obtenção de 40 frações. A posterior análise em CCD permitiu a reunião das frações semelhantes em três frações resultantes (Tab. 12).

Tabela 12 - Fracionamento cromatográfico da CAE/HC<sub>4</sub> (14-18)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CAE/HC <sub>4</sub> (14-18) (1-19)	Óleo amarelo	3,2
CAE/HC <sub>4</sub> (14-18) (20-40)	Óleo amarelo	11,3
CAE/HC <sub>4</sub> (14-18) (41-56)	Óleo amarelo	8,2

A fração CAE/HC<sub>4</sub> (14-18) (20-40) (11,3 mg) foi denominada CA-5, e foi identificada como sendo a mistura dos fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol após análise do seu espectro de RMN <sup>1</sup>H.

#### VII. Isolamento de CA-6 e CA-7

A fração CAE/HC<sub>1</sub> (116-148) (365,8) foi purificada por CLAE preparativa, utilizando-se uma coluna de fase normal e uma fase móvel composta por hexano/clorofórmio (9,5:0,5), de modo isocrática, empregando-se um fluxo de 3,0 mL/min. O cromatograma (Fig. 4) exibiu quatro picos a 284 nm. O pico 1 (14,9 mg; t<sub>R</sub> = 4,90) e o pico 3 (21,5 mg; t<sub>R</sub> = 6,13), foram denominados de CA-6 (12,8 mg) e CA-7 (10,5 mg), respectivamente. Estes compostos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas como diterpenos casbanos inéditos na literatura. Os picos 2 (t<sub>R</sub> = 5,35) e pico 4 (t<sub>R</sub> = 6,88), foram caracterizados por comparação em CCD como sendo os diterpenos CA-2 e CA-1, respectivamente.

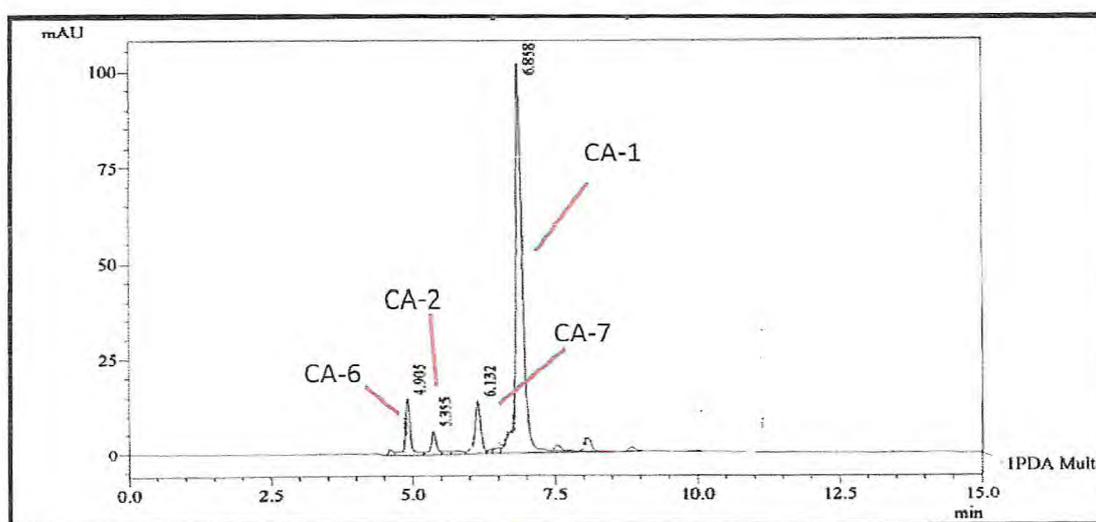


Figura 4 - Cromatograma de CLAE da fração CAE/HC<sub>1</sub> (116-148)

#### 4.4 Estudos dos Constituintes Químicos Não-Voláteis da Raiz de *C. argyrophyllus*

830,0 g das raízes de *C. argyrophyllus* foram trituradas e secas, e posteriormente submetidas a uma extração exaustiva (72 horas) a frio com hexano. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se um extrato de aspecto oleoso amarelado que foi denominado de CARH (7,2 g). A torta resultante foi submetida a uma extração exaustiva com etanol, para a obtenção de um extrato escuro denominado de CARE (12,21 g), após a destilação do solvente.

Os fluxogramas 2 (Pág. 47) contêm uma síntese do fracionamento dos extratos das raízes de *C. argyrophyllus*, e conseqüente isolamento dos constituintes químicos desses extratos. As frações submetidas a tratamento cromatográfico, descritas a seguir, foram escolhidas por apresentarem manchas definidas e homogêneas na análise em CCD.

##### 4.4.1 Tratamento Cromatográfico do Extrato Hexânico das Raízes de *C. argyrophyllus* (CARH)

Semelhantemente ao extrato hexânico dos talos de *C. argyrophyllus*, o extrato CARH apresentou uma grande quantidade de um sólido branco. A filtração e posterior recristalização em hexano, levou à obtenção de um cristal que após comparação em CCD, pôde-se caracterizar como sendo CA-1 (524,5 mg), já isolado anteriormente dos talos (pág. 31).

A solução sobrenadante foi denominada de CARHs (6,05 g). O fracionamento cromatográfico preliminar em coluna filtrante de 7,19 g de CARHs foi realizado através da adição sobre 27,6 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$  63 – 200  $\mu$ m) em uma coluna aberta de 6,5 cm de diâmetro previamente empacotada. Para eluição foram utilizados os solvente hexano (550 ml), diclorometano (700 ml), acetato de etila (400 ml) e metanol (24 ml), respectivamente.

**Tabela 13** - Fracionamento preliminar da CARHs

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARHs/H	Óleo Esverdeado	1,30
CARHs/D	Óleo Amarelado	2,88
CARHs/A	Óleo Amarelado	1,70
CARHs/M	Óleo Amarelado	0,18

### I. Isolamento de CA-8

A fração CARHs/D (2,88 g) foi acondicionada em uma coluna flash de 2,0 cm de diâmetro, previamente empacotada com 53,60 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$  40 - 63  $\mu$ m). Utilizou-se como solvente uma mistura binária de hexano/acetato de etila (4:1) de forma isocrática. Foram coletadas 168 frações, que foram reunidas em 12 frações resultantes de acordo com suas semelhanças, após análise em CCD.

**Tabela 14** - Fracionamento cromatográfico da CARHs/D

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARHs/D (1-10)	Óleo Amarelado	585,0
CARHs/D (11-16)	Óleo Amarelado	60,6
CARHs/D (17-19)	Óleo Amarelado	109,6
CARHs/D (20-25)	Óleo Amarelado	252,6
CARHs/D (26-42)	Óleo Amarelado	134,2
CARHs/D (43-48)	Óleo Amarelado	31,0
CARHs/D (49-67)	Óleo Amarelado	80,7
CARHs/D (68-72)	Óleo Amarelado	159,7
CARHs/D (73-105)	Óleo Amarelado	587,2
CARHs/D (106-125)	Óleo Amarelado	205,4
CARHs/D (126-168)	Óleo Amarelado	79,4
CARHs/D M	Óleo Amarelado	437,8

A fração CARHs/D (1-10) (585,0 mg) apresentou-se como um sólido que foi recristalizado em uma mistura binária de diclorometano/metanol (1:1), levando à obtenção de um sólido cristalino branco denominado de CA-8 (34,1 mg). Após análise espectrométrica CA-8 foi caracterizada como triterpeno de esqueleto oleonano, ácido acetil aleuritólico (AAA).

## II. Isolamento de CA-9

A fração CARHs/D (49-67) (80,7 mg) foi acondicionada em uma coluna flash de 2,0 cm de diâmetro previamente empacotada com 12,3 g de sílica 60 ( $\emptyset$  40 – 63  $\mu$ m). A eluição foi realizada de forma isocrática utilizando a mistura de solventes hexano/acetato de etila (4:1). Ao final do procedimento, foram coletadas 95 frações, que foram posteriormente reunidas em seis frações resultantes de acordo com suas semelhanças, após análise comparativa em CCD (Tab 15).

**Tabela 15** - Fracionamento cromatográfico da CARHs/D (49-67)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARHs/D (49-67) (1-17)	Óleo amarelo	3,0
CARHs/D (49-67) (18-22)	Óleo amarelo	5,3
CARHs/D (49-67) (23-37)	Óleo amarelo	30,3
CARHs/D (49-67) (38-60)	Óleo amarelo	7,8
CARHs/D (49-67) (61-95)	Óleo amarelo	12,8
CARHs/D (49-67) M	Óleo amarelo	19,3

A fração CMRHs/D (49-67) (18-22) (5,3 mg) apresentou-se como cristais em forma de agulhas e foi denominada de CA-9. CA-9 foi caracterizada como sendo o esteróide de esqueleto estigmastano espinasterol, após análise espectroscópica e comparação com dados da literatura.

### 4.4.2 Tratamento Cromatográfico do Extrato Etanólico das Raízes de *C. argyrophyllus* (CARE)

5,0 g de CARE foram dissolvidas em metanol e acondicionadas sobre uma coluna (3,5 cm de diâmetro) contendo 35,0 g de Sephadex LH-20. O material foi cromatografado utilizando metanol como fase móvel, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Foram coletados 35 frações, que após a análise por CCD foram reunidas em sete frações semelhantes de acordo com a Tabela 16, denominada de CARE/S

**Tabela 16** - Fracionamento cromatográfico por exclusão molecular de CARE

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARE/S (1-5)	Pasta escura	253,9
CARE/S (6-9)	Pasta escura	283,3
CARE/S (10-13)	Pasta escura	488,4
CARE/S (14-19)	Pasta escura	933,8
CARE/S (20-28)	Pasta escura	1612,2
CARE/S (29-32)	Pasta escura	489,1
CARE/S (33-35)	Pasta escura	912,6

### I. Isolamento de CA-10

O fracionamento cromatográfico preliminar de 1,61 g de CARE/S (20-28) foi realizado com o acondicionamento sobre 41,32 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 63-200) em coluna de 8,0 cm de diâmetro. Foram utilizados como eluentes misturas binárias dos solventes hexano (A), acetato de etila (A) e metanol (M), seguindo uma ordem crescente de polaridade.

SOLVENTE	VOLUME (mL)	FRAÇÕES ( $\approx$ 50 mL)
H	200	1 a 4
H/A 20%	350	5 a 11
H/A 40%	300	12 a 17
H/A 60%	450	18 a 26
H/A 80%	300	27 a 32
A	350	33 a 39
M	150	40 a 42

**Tabela 17** - Fracionamento preliminar da CARE/S (20-28)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARE/S (20-28) (1-4)	Óleo amarelado	128,4
CARE/S (20-28) (5-11)	Óleo escuro	301,9
CARE/S (20-28) (12-17)	Pasta escura	667,2
CARE/S (20-28) (18-26)	Pasta escura	109,1
CARE/S (20-28) (27-32)	Pasta escura	249,0

CARE/S (20-28) (33-39)	Pasta escura	118,4
CARE/S (20-28) (40-42)	Pasta escura	107,4

301,9 mg da fração CARE/S (20-28) (5-11) foram adsorvidas em 18,43 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 63-200) em coluna de 2,0 cm de diâmetro. Os solventes hexano (H), acetato de etila (A) puros ou em mistura binária, seguindo uma ordem crescente de polaridade, foram utilizados como eluentes levando à obtenção de 92 frações. A posterior análise em CCD permitiu a reunião das frações semelhantes em quatro frações resultantes (Tab. 18).

SOLVENTE	VOLUME (mL)	FRAÇÕES ( $\approx$ 10 mL)
H/A 10%	60	Volume morto
H/A 10%	300	1 a 38
H/A 20%	100	39 a 48
H/A 30%	200	49 a 65
H/A 40%	100	66 a 75
H/A 50%	100	76 a 86
A	50	87 a 92

**Tabela 18** - Fracionamento cromatográfico da CARE/S (20-28) (5-11)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARE/S (20-28) (5-11) (1-27)	Óleo castanho	39,3
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67)	Óleo castanho	119,8
CARE/S (20-28) (5-11) (68-74)	Óleo castanho	32,4
CARE/S (20-28) (5-11) (75-92)	Pasta escura	208,3

A fração CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (119,0 mg) foi acondicionada sobre 16,8 g de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 40-63) em uma coluna de 1,5 cm de diâmetro, e a mistura binária de hexano/acetato de etila 15% foi utilizada para a eluição isocrática. Este procedimento levou à obtenção de 63 frações, que foram reunidas em cinco frações resultantes, segundo suas semelhanças em CCD (Tab. 19).

Tabela 19 - Fracionamento cromatográfico da CARE/S (20-28) (5-11) (28-67)

FRAÇÕES REUNIDAS	ASPECTO	MASSA (mg)
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (1-5)	Óleo amarelado	6,1
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (6-11)	Óleo amarelado	26,5
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (12-15)	Óleo amarelado	35,6
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (16-25)	Óleo castanho	25,8
CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (26-63)	Óleo castanho	17,4

A fração CARE/S (20-28) (5-11) (28-67) (6-11) (26,5 mg), homogênea em CCD e denominada CA-10, foi caracterizada como, epímero de CA-1, após análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais.

## II. Isolamento de CA-11 e CA-12

Através de um *loop* de 200  $\mu$ L, a fração CARE/S (20-28) (27-32) (249,0 mg) (pág. 43) foi submetida a sucessivas cromatografias utilizando um aparelho de CLAE, equipado de coluna de fase normal. A mostra foi eluída com uma mistura binária de clorofórmio/metanol (7,4:2,6), empregando-se uma corrida isocrática de 15 min com fluxo de 2,5 ml/min. O cromatograma (Fig. 5), visualizado a 254 nm, mostrou a separação de cinco picos, dos quais dois picos, cujos tempo de retenção foram 9,31 min (pico 1) e 10,86 min (pico 2), apresentaram-se majoritários. Os picos 1 e 2 foram denominados de CA-11 (16,7 mg) e CA-12 (23,7 mg), respectivamente. Após análise dos espectros de RMN (uni e bidimensionais), CA-11 foi caracterizado como um diterpeno crotofolano inédito na literatura e CA-12 como um epímero de CA-11, também de caráter inédito.

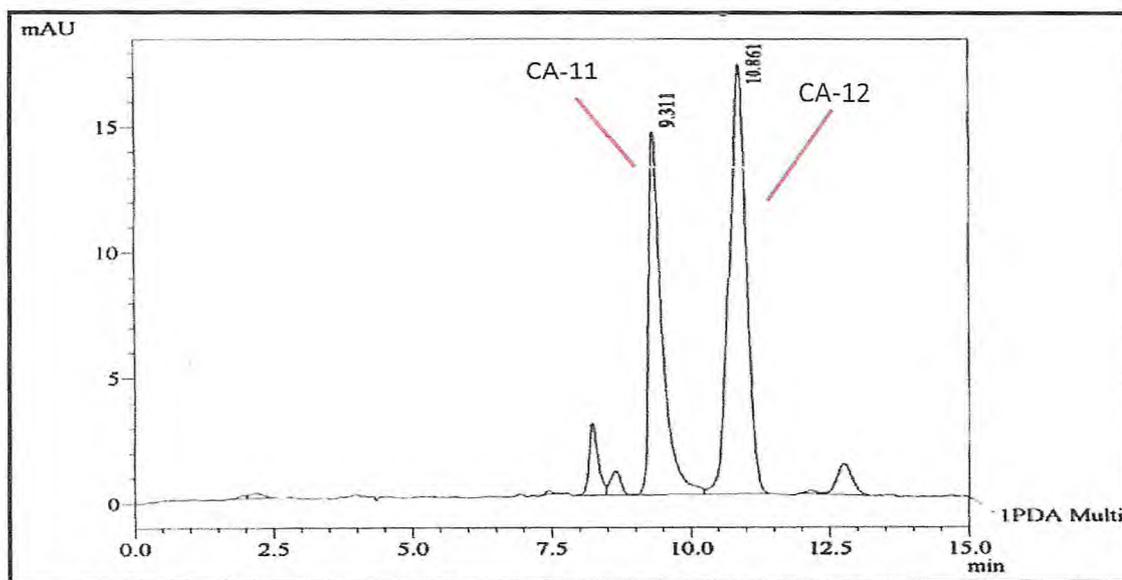
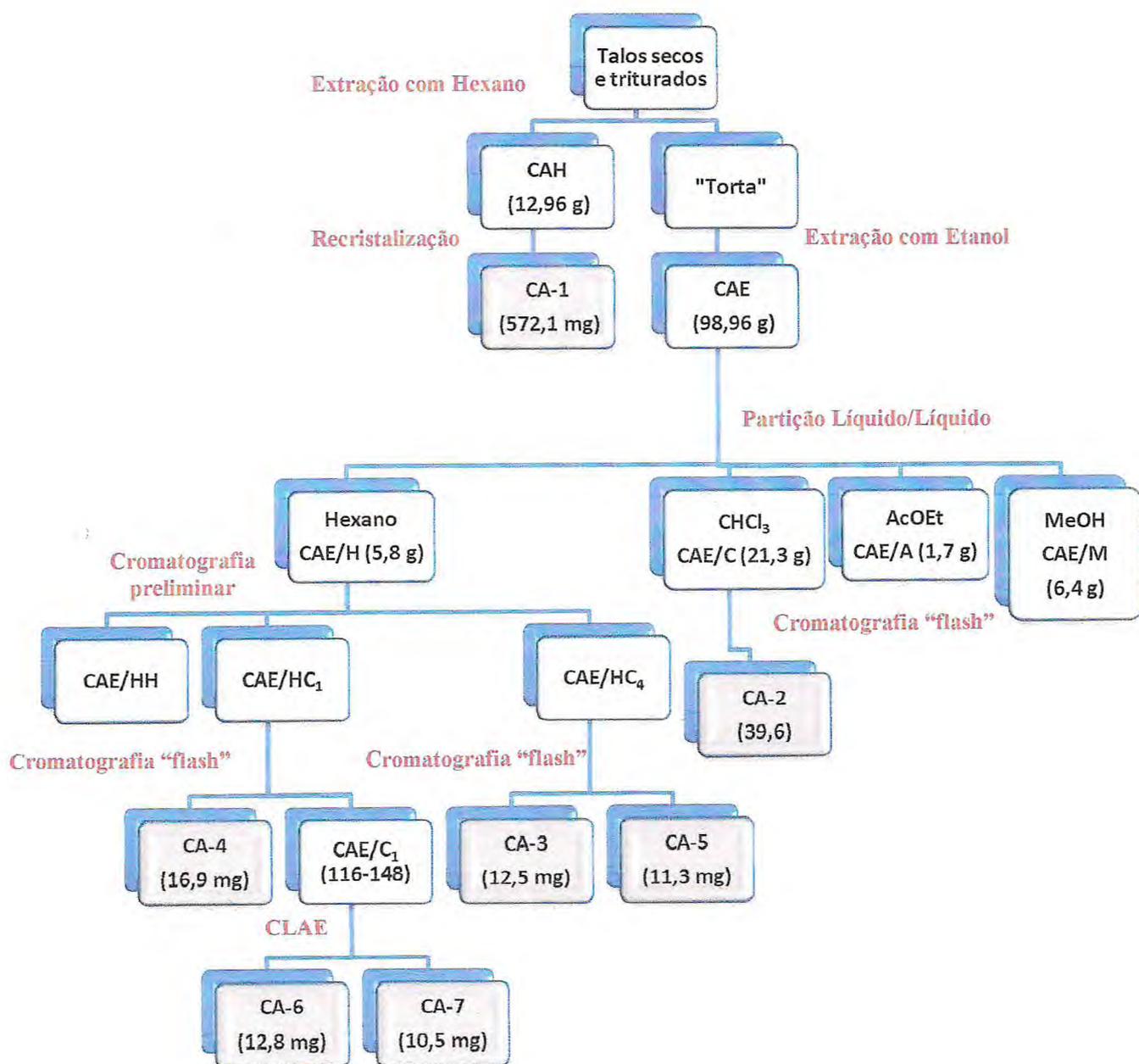
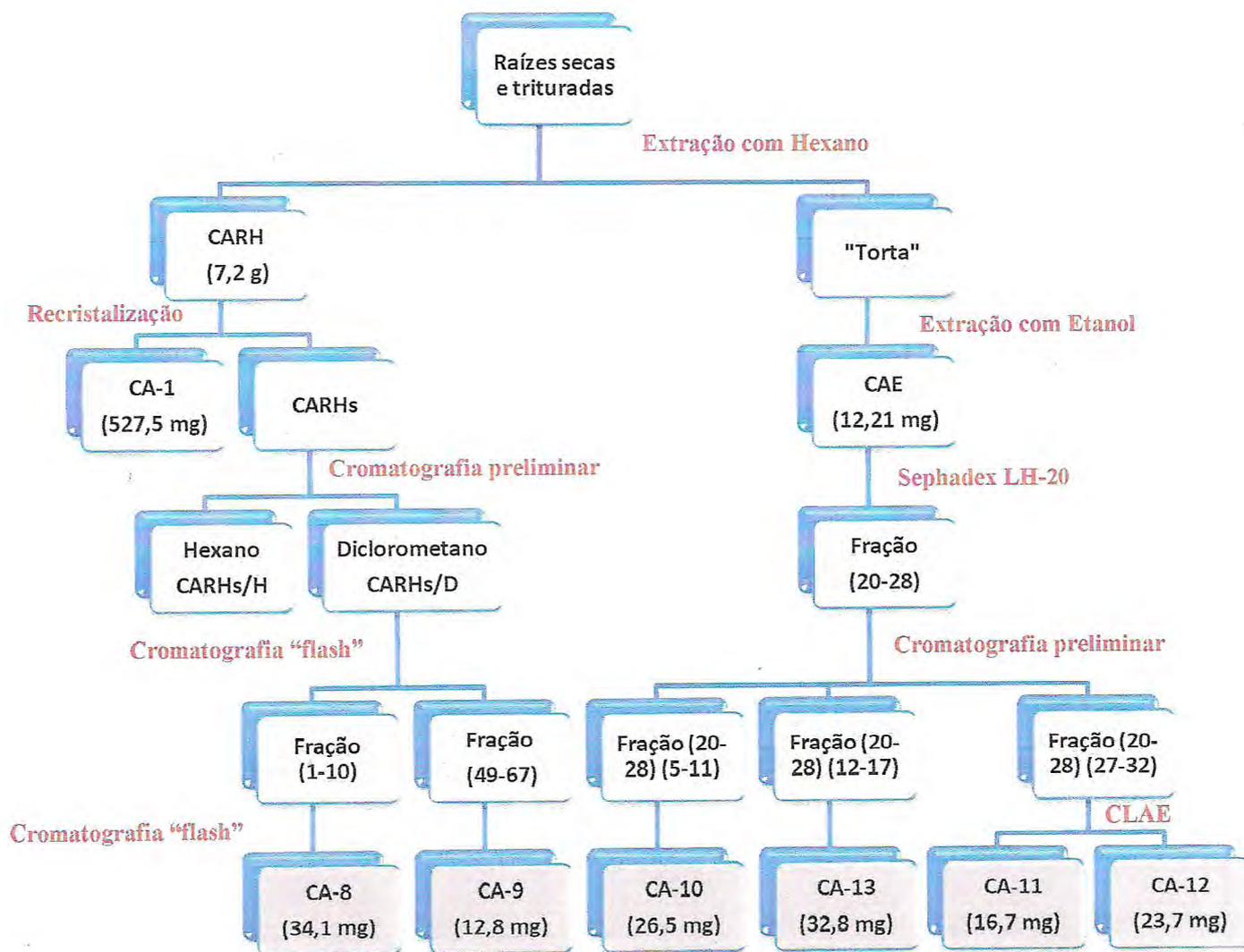


Figura 5 - Cromatograma de CLAE da fração CARE/S (20-28) (27-32)

Fluxograma 1 - Isolamento dos metabólitos secundários dos talos de *C. argyrophyllus*.



Fluxograma 2 - Isolamento dos metabólicos secundários das raízes de *C. argyrophyllus*.



## CAPÍTULO V

## DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL



*Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: Croton argyrophyllus Mill.*

| Francisco Artur

## 5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 5.1 Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados dos Talos de *C. argyrophyllus*

#### 5.1.1 Determinação Estrutural de CA-2

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração clorofórmica, obtida através da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, permitiu o isolamento de um óleo amarelado com  $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ$  ( $c$  0,12,  $\text{CHCl}_3$ ) denominado de CA-2.

Análise do espectro de absorção na região do infravermelho de CA-2 (Fig. 6, pág. 54) mostrou uma banda larga em  $3409\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à deformação axial de ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila ( $\nu_{\text{O-H}}$ ); absorções em  $2925$  e  $2859\text{ cm}^{-1}$  correlacionadas a deformação axial das ligações C-H de alcanos ( $\nu_{\text{C-H}}$ ); bem como uma banda intensa em  $1651\text{ cm}^{-1}$  atribuída a um estiramento axial de ligação C=O de carbonila conjugada. Observou-se também, uma banda intensa em  $1620\text{ cm}^{-1}$  típica de estiramento axial assimétrico de ligação C=C de carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), e absorção em  $1020\text{ cm}^{-1}$  correlacionada a estiramento axial de ligação C-O ( $\nu_{\text{C-O}}$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 7, pág. 54) apresentou uma variedade de sinais com diferentes multiplicidades, dos quais se pôde destacar dupletos em  $\delta$  6,23 (H-7; d;  $J=10,3\text{ Hz}$ ) e 5,23 (H-3; d;  $J=9,3\text{ Hz}$ ) associados a hidrogênios de olefinas trissubstituídas, e um tripleto em  $\delta$  4,70 (H-13; t;  $J=6,1\text{ Hz}$ ). Os sinais em  $\delta$  5,39 (H-4; d;  $J=9,3\text{ Hz}$ ) e 4,01 (H-1; t;  $J=8,5\text{ Hz}$ ) foram caracterizados como hidrogênios de carbonos oximetínicos, enquanto os simpletos em  $\delta$  1,98 (3H-20); 1,73 (3H-19); 1,44 (3H-18); 0,91 (3H-17) e 0,78 (3H-16) foram relacionados a cinco grupos metilas.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 8, pág. 55) foram observadas 20 linhas espectrais, seis das quais, em  $\delta$  144,48 (C-2), 144,36 (C-7), 137,18 (C-12), 135,50 (C-6), 126,15 (C-3) e 121,02 (C-13) foram associados a carbonos  $\text{sp}^2$ , revelando a presença de três duplas ligações; além de um sinal em  $\delta$  200,40 (C-5) atribuído a uma carbonila conjugada. Foram observados ainda dois sinais em  $\delta$  78,07 (C-1) e 68,70 (C-4) atribuídos a carbonos oxigenados, corroborando com os dados observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 9, pág. 55) revelou a presença de três carbonos metilênicos em  $\delta$  25,86 (C-10); 32,54 (C-14) e 40,53 (C-11), além de sete absorções de carbonos mono-hidrogenados em  $\delta$  144,36 (C-7), 126,15 (C-3), 121,02 (C-13), 78,07 (C-1), 68,70 (C-4), 35,72 (C-9) e 28,31 (C-8), que em conjunto com os

carbonos não-hidrogenados em  $\delta$  144,48 (C-2), 137,18 (C-12) e 135,50 (C-6) confirmaram a presença de três duplas ligações trissubstituídas (Tabela 20, pág 49).

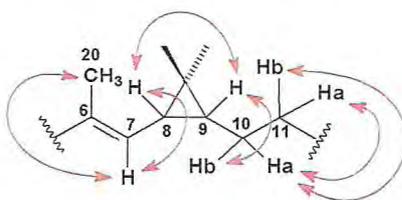
**Tabela 20** – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 125 MHz) de CA-2 por padrão de hidrogenação.

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$	Total
29,31	40,53	144,36 (C=C)	200,04 (C=O)	
16,23	32,54	126,15 (C=C)	144,48 (C=C)	
15,69	25,86	121,01 (C=C)	137,18 (C=C)	
12,61		78,07 (OH)	135,50 (C=C)	
10,72		68,70 (OH)	27,32	
		35,72		
		28,31		
$\text{C}_5\text{H}_{15}$	$\text{C}_3\text{H}_6$	$\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_2$	$\text{C}_5\text{O}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$

CA-2 apresentou fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$  com massa molar de 318 Da, em acordo com o espectro de massas obtido por ionização eletrônica (IE) (Fig. 13, pág. 59) que apresentou o pico com  $m/z$  300 Da, justificado pela perda de uma molécula de água  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]$ . Desta forma apresentou IDH = 6, das quais três insaturações foram atribuídas a três duplas ligações, uma a uma carbonila, e as duas insaturações restantes foram atribuídas a estrutura de um diterpeno bicíclico que pode ser associado ao tipo casbano.

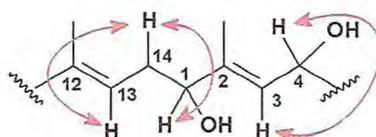
O espectro  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 x 500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 10, pág. 56) mostrou as correlações homonuclear do hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,23 (H-7) com o hidrogênio metínico em  $\delta$  1,27 (H-8), e com os hidrogênios da metila em  $\delta$  1,98 (H-20). Por outro lado, o hidrogênio em  $\delta$  0,79 (H-9) apresentou correlação com os hidrogênios em  $\delta$  1,27 (H-8) e  $\delta$  0,65 (H-10b). Foi possível ainda observar a presença de dois carbonos metilênicos vicinais através da correlação entre os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  1,75 (H-10a) com 0,65 (H-

10b), e de  $\delta$  2,03 (H-11a) com 1,66 (H-11b), bem como a correlação do hidrogênio em  $\delta$  1,75 (H-10a) com os hidrogênios  $\delta$  2,03 (H-11a) e 1,66 (H-11b) (Frag. 5.1).



**Fragmento 5.1**

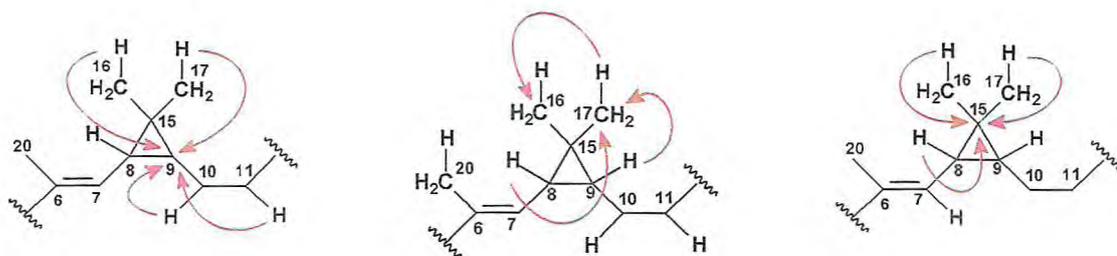
Este espectro ainda revelou a correlação do hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,70 (H-13) com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,36 (2H-14), que por sua vez, apresentaram correlação com o hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,01 (H-1). Em adição, foi também observada a correlação do hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,23 (H-3) com o hidrogênio oximetínico em  $\delta$  5,39 (H-4) (Frag. 5.2)



**Fragmento 5.2**

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio HSQC (500 x 125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 11, pág. 57) permitiu associar inequivocamente os sinais dos hidrogênios a seus respectivos carbonos (ver Tabela 21, pág. 52).

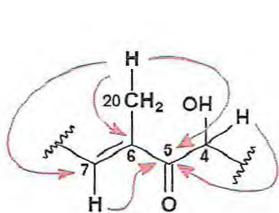
Por outro lado, o espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (500 x 125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , Fig. 12, pág. 58) mostrou as correlações à longa distância entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). A confirmação do esqueleto casbano foi confirmada através das correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,74 (H-10a), 0,65 (H-10b), 0,78 (3H-16), 0,91 (3H-17), 1,66 (H-11b) com o carbono em  $\delta$  35,72 (C-9); e dos hidrogênios em  $\delta$  1,27 (H-8), 0,78 (3H-16), 0,91 (3H-17) com o carbono em  $\delta$  27,32 (C-15), bem como a correlação do hidrogênio em  $\delta$  1,27 (H-8) com o carbono em  $\delta$  29,31 (C-17); e dos hidrogênios da metila em  $\delta$  0,91 (3H-17) com o carbono em  $\delta$  16,23 (C-16). Estes dados corroboraram a presença do anel dimetilciclopropano característico dos diterpenos casbanos (Frag. 5.3).



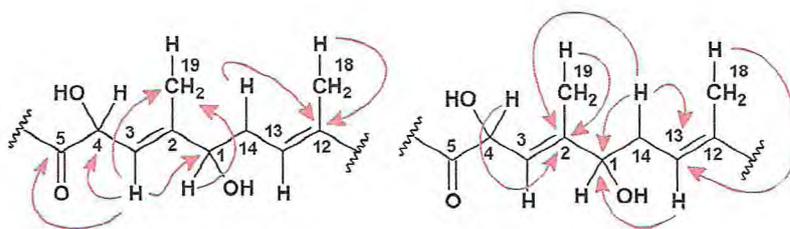
Fragmentos 5.3

Esta técnica revelou ainda a localização exata da carbonila cetônica  $\alpha,\beta$ -insaturada em C-6 e C-7, e da hidroxilada em C-4, em acordo com as correlações dos hidrogênios da metila em  $\delta$  1,98 (H-20) com os carbonos em  $\delta$  135,50 (C-6), 144,16 (C-7) e 200,04 (C-5). Assim como a correlação do hidrogênio carbinólico em  $\delta$  5,39 (H-4) e do hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,23 (H-7) com o carbono  $\delta$  200,04 (C-5) (Frag. 5.4).

As ligações duplas tiveram suas localizações definidas através das correlações do hidrogênio em  $\delta$  5,23 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  68,70 (C-4), 200,04 (C-5), 10,72 (C-19), 78,07 (C-1), bem como do hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,70 (H-13) e dos metilênicos em  $\delta$  2,36 (2H-14) com o carbono em  $\delta$  78,07 (C-1); e dos hidrogênios em  $\delta$  15,69 (3H-18) com os carbonos em  $\delta$  137,18 (C-12) em  $\delta$  121,01 (C-13) (Frag. 5.5). As demais correlações estão representadas na Tabela 21, pág 52.

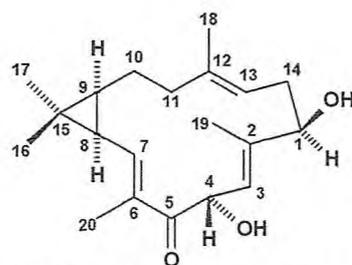


Fragmento 5.4



Fragmento 5.5

A análise minuciosa dos dados físicos, espectrométricos e espectroscópicos de CA-2, bem como comparação destes dados com aqueles descritos na literatura para diterpenos casbano, levou à identificação de CA-2 como sendo o diterpeno crotonepetin (1,4-diidroxii-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano) (5.1), isolado anteriormente das folhas e talos de *Croton nepetaefolius* [MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990] (Tab. 22, pág 53).



1,4-Diidroxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbeno (5.1)

Tabela 21 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de CA-2 dispostos segundo as correlações obtidas nos espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	78,07	4,01 (t; $J = 8,5$ Hz; 1H)	2H-14	H-3; H-13; 3H-19
2	144,48	-	3H-19	H-4; 2H-14
3	126,15	5,23 (d; $J = 9,3$ Hz; 1H)	H-4	H-1; 3H-19
4	68,70	5,39 (d; $J = 9,3$ Hz; 1H)	H-3	-
5	200,04	-	H-4	H-3; H-7; 3H-20
6	135,50	-	3H-20	H-8
7	144,36	6,23 (d; $J = 10,3$ Hz; 1H)	-	3H-20
8	28,31	1,27 (dd; $J = 6,1$ e $10,3$ Hz; 1H)	-	-
9	35,72	0,79 (m; 1H)	2H-10	H-11b; 3H-16; 3H-17
10	25,86	1,74 (m; 1Ha) e 0,65 (m; 1Hb)	H-11b	-
11	40,53	2,03 (m; 1Ha) e 1,66 (m; 1Hb)	2H-10	H-13; 3H-18
12	137,18	-	2H-11; 3H-18	H-10b; 2H-14
13	121,01	4,70 (t; $J = 8,5$ Hz; 1H)	2H-14	H-1; H-11b; 3H-18
14	32,54	2,36 (t; $J = 8,5$ Hz; 2H)	H-1	-
15	27,32	-	H-8; 3H-16; 3H-17	-
16	16,23	0,78 (s; 3H)	-	3H-17
17	29,31	0,91 (s; 3H)	-	H-8; 3H-16
18	15,69	1,44 (s; 3H)	-	H-11b; H-13
19	10,72	1,73 (s; 3H)	-	H-1; H-3
20	12,61	1,98 (s; 3H)	-	H-7

**Tabela 22** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-2 como dados da literatura [MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990],  $\delta$  (ppm).

#C	CA-2	[MOURA; MONTE; BRAZ-FILHO, 1990]
	(125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ )	(75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	78,07	77,62
2	144,48	143,76
3	126,15	125,49
4	68,70	67,71
5	200,04	199,61
6	135,50	134,51
7	144,36	145,01
8	28,31	27,98
9	35,72	35,61
10	25,86	25,31
11	40,53	39,77
12	137,18	137,45
13	121,01	119,51
14	32,54	31,55
15	27,32	27,60
16	16,23	15,99
17	29,31	29,13
18	15,69	15,32
19	10,72	10,10
20	12,61	11,97

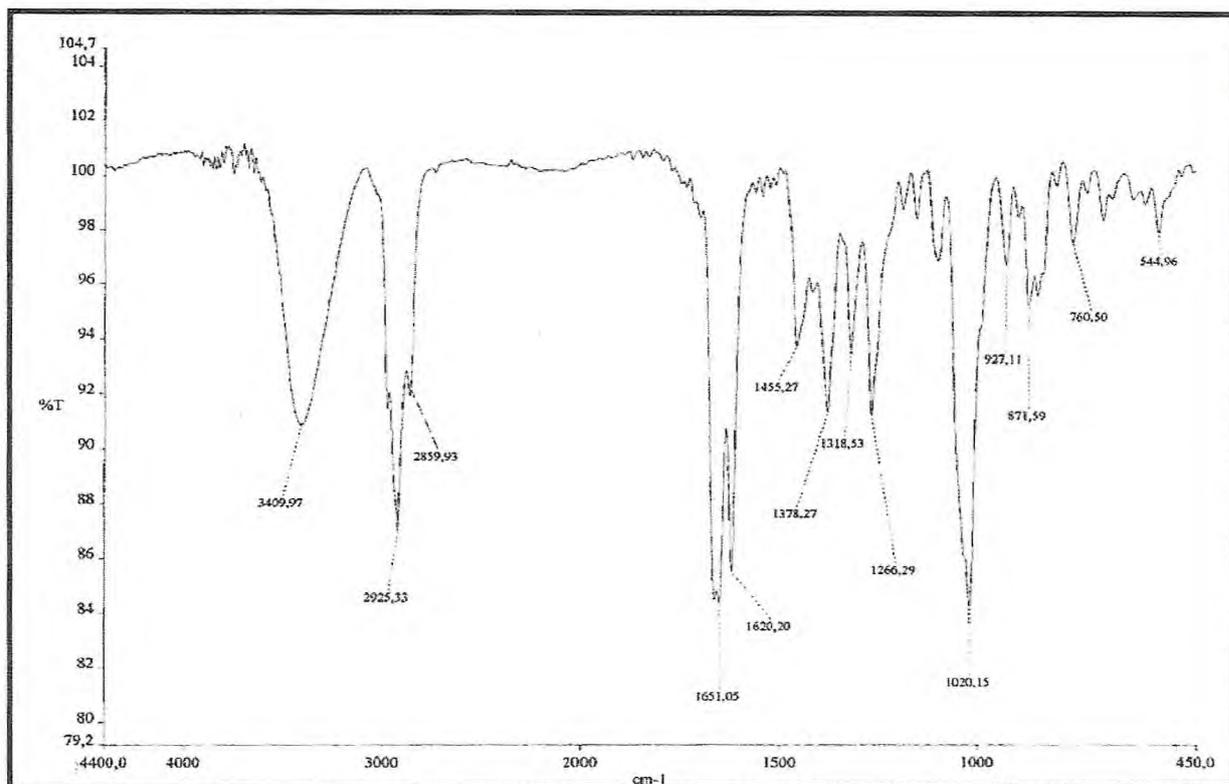


Figura 6 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-2 com pastilhas de KBr

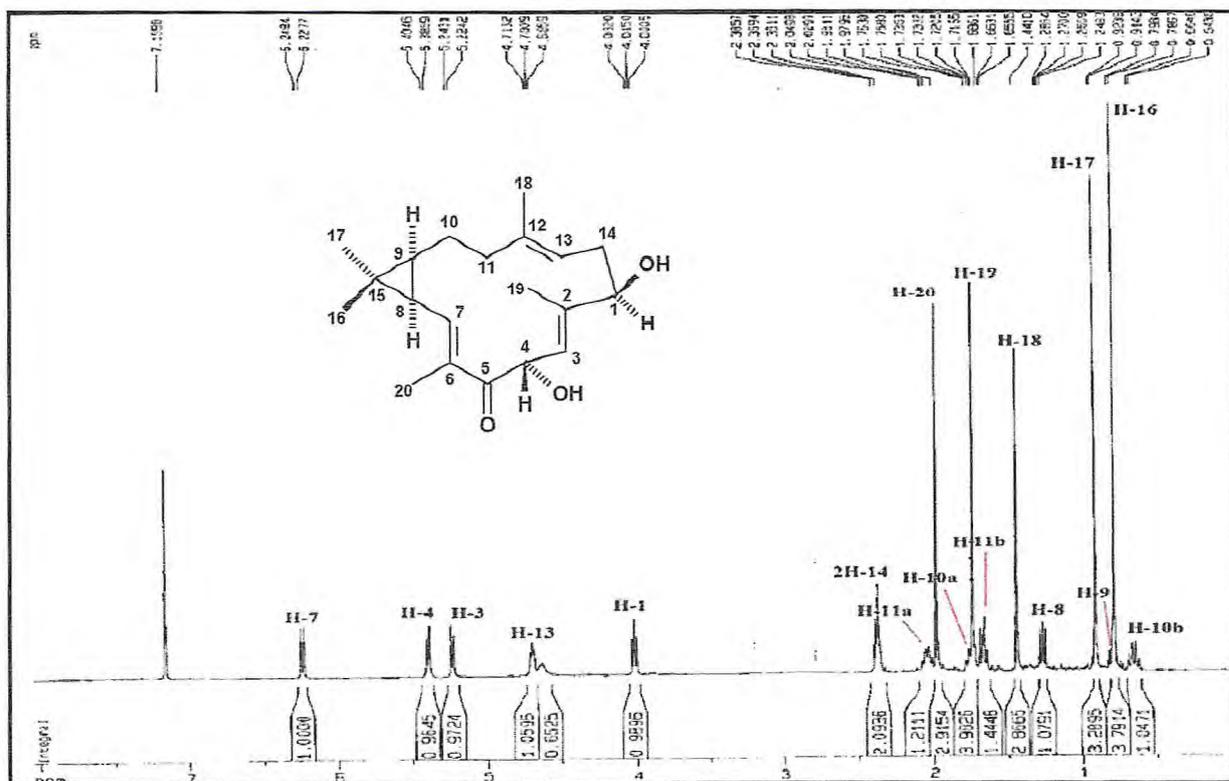


Figura 7 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de CA-2

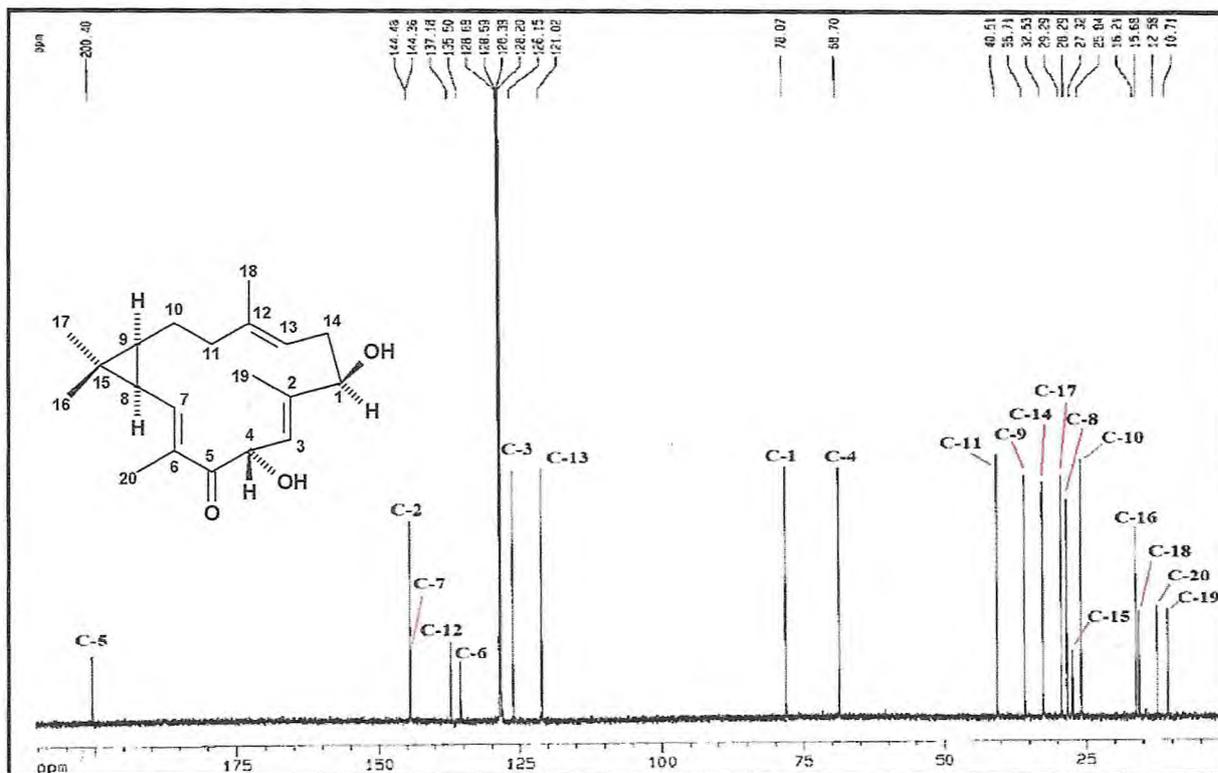


Figura 8 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de CA-2

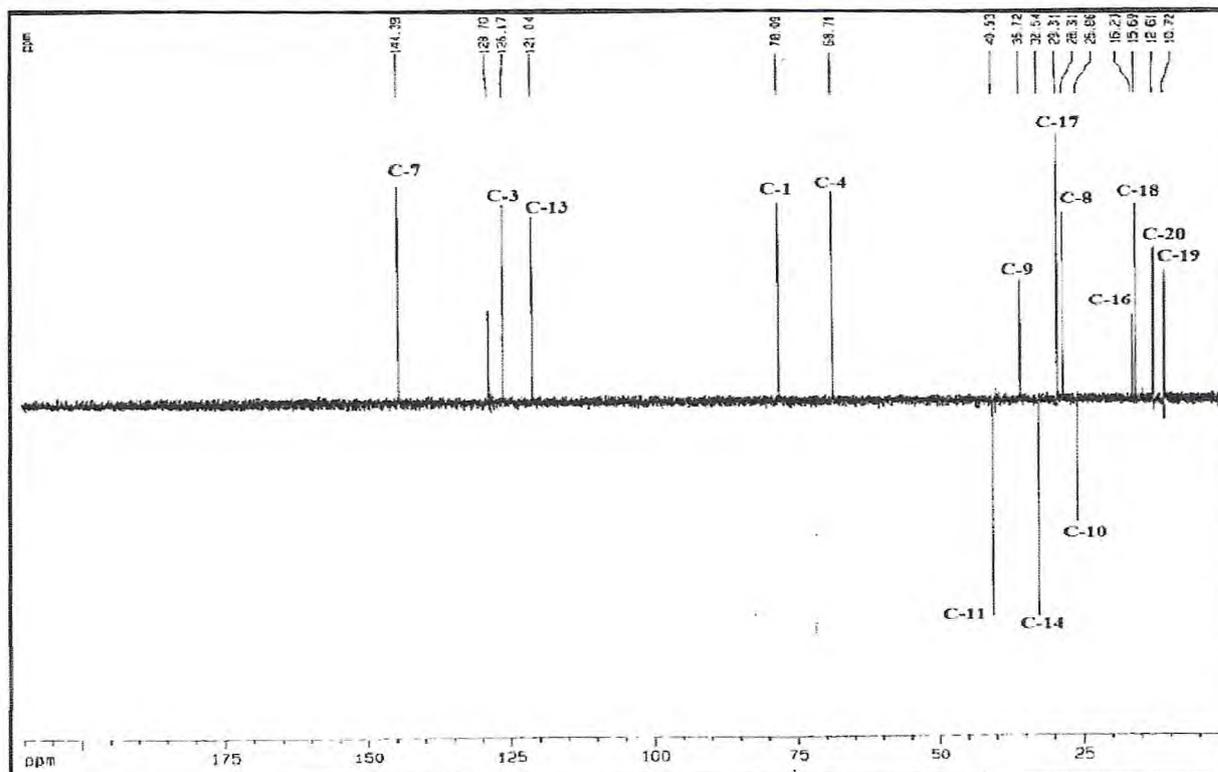


Figura 9 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) de CA-2

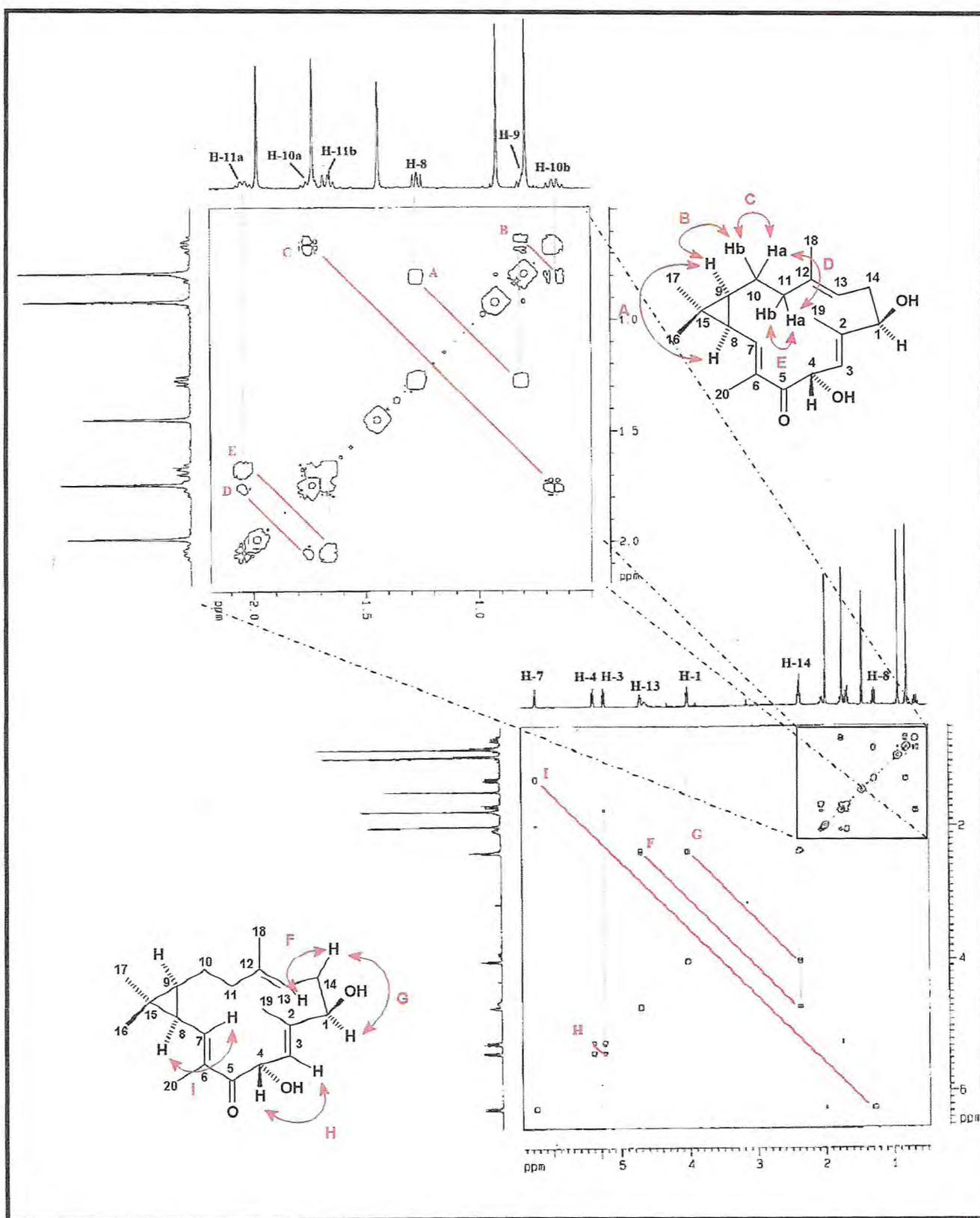


Figura 10 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-2

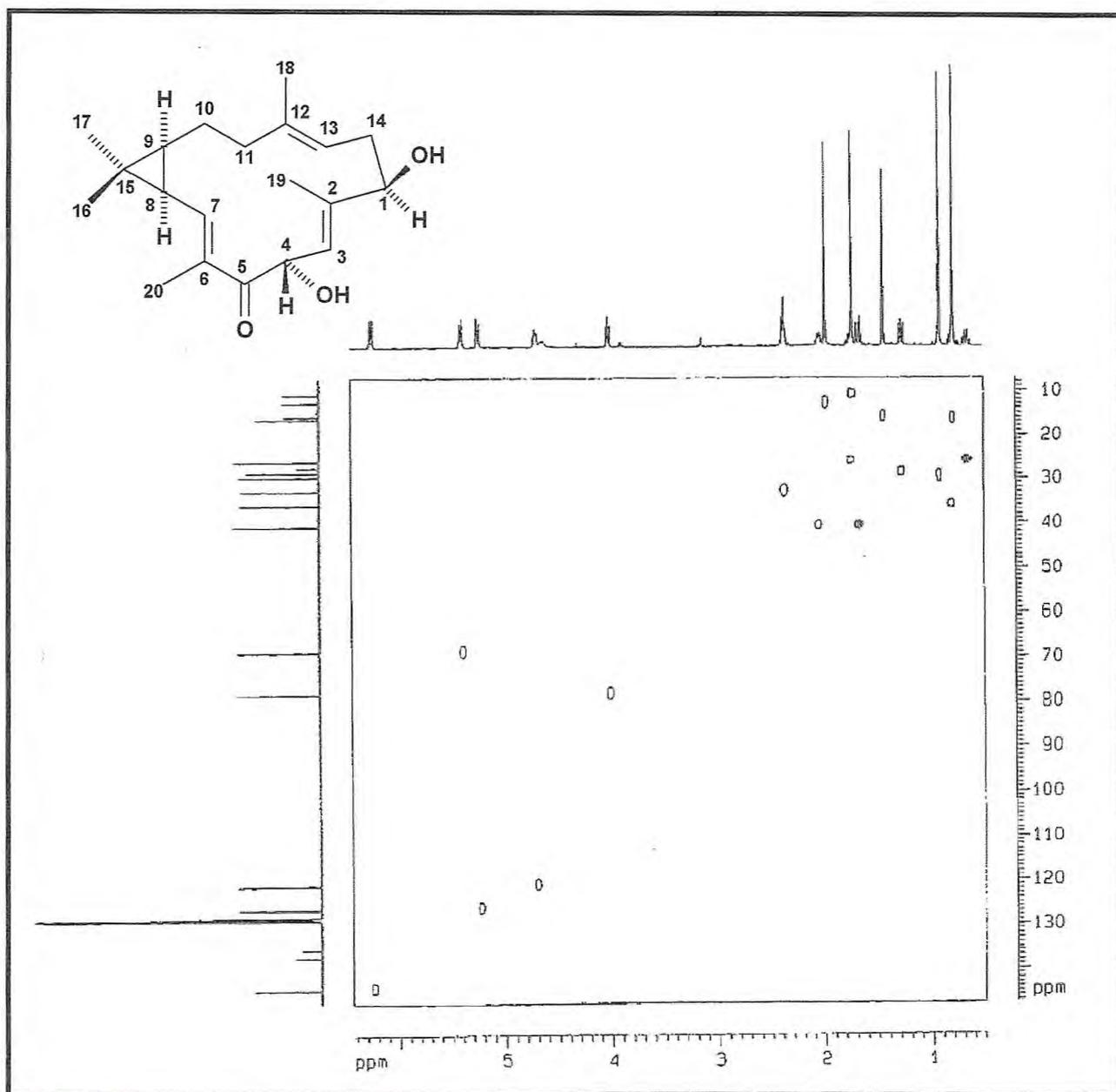


Figura 11 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-2

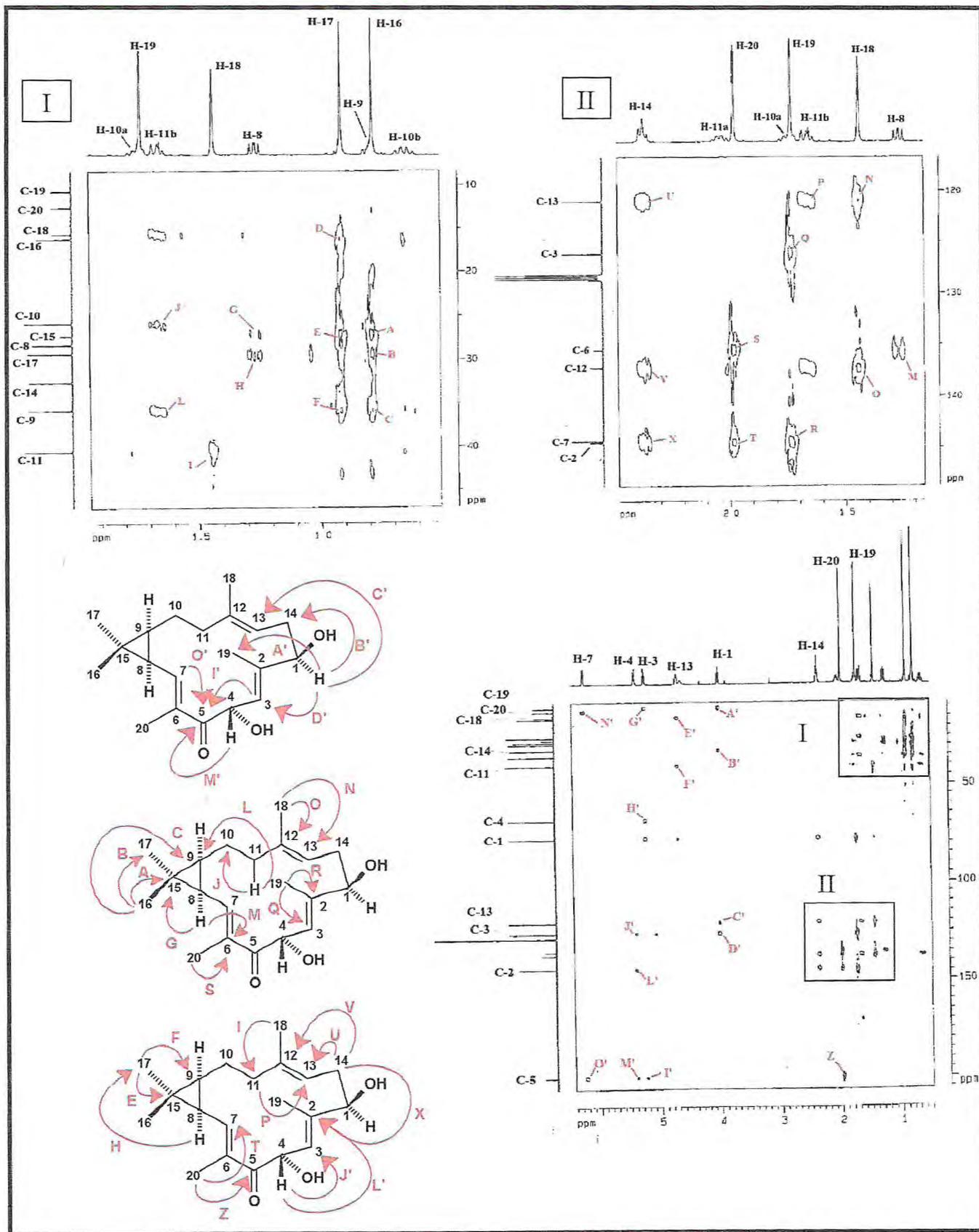


Figura 12 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-2

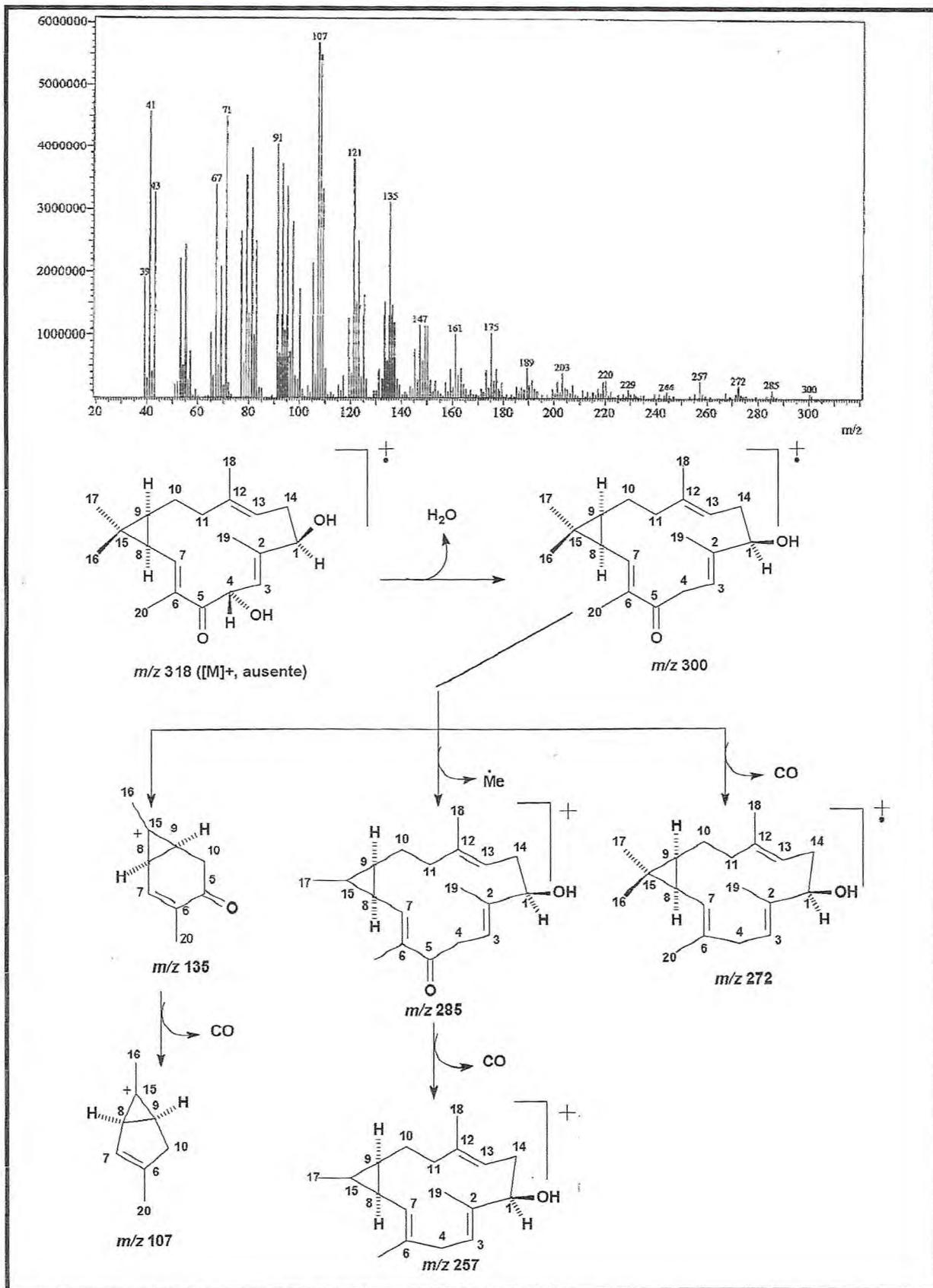


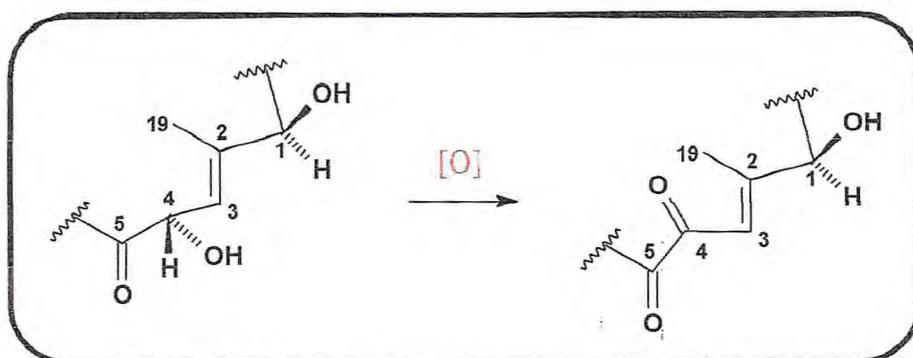
Figura 13 – Espectro de massa de CA-2 (ionização eletrônica a 70 eV)

### 5.1.2 Determinação Estrutural de CA-3

Sucessivas cromatografias “flash” da fração hexânica, obtida a partir da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, permitiu o isolamento de um óleo incolor e denominado de CA-3, com  $[\alpha]_D^{20} = +80$  ( $c$  0,194,  $\text{CHCl}_3$ ).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 14, pág. 67) de CA-3 revelou uma banda larga em  $3431\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramento axial de ligação O-H de hidroxila ( $\nu_{\text{O-H}}$ ); bandas em  $2926$  e  $2867\text{ cm}^{-1}$  relacionadas a estiramento axial de ligação C-H de carbonos  $\text{sp}^3$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ); bem como bandas intensas em  $1620$  e  $1658\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a estiramentos axiais de ligação C=O de carbonila ( $\nu_{\text{C=O}}$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 15, pág. 67) de CA-3 apresentou-se bastante semelhante ao espectro de CA-2 (Fig. 7, pág. 54). As diferenças observadas foram relacionadas à ausência do hidrogênio oximetínico em  $\delta$  5,39 (d;  $J=9,3$  Hz; H-4), e pela desproteção e mudança de multiplicidade do hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,23 (d;  $J=9,3$  Hz; H-3) em CA-2, que passou a absorver como um sinpleto em  $\delta$  6,24 (s; H-3) em CA-3. Estes dados sugeriram uma possível oxidação do grupo hidroxila C-4 de CA-2 (Quadro 6, pág. 60). Neste espectro foram observados ainda sinais em  $\delta$  5,87 (d;  $J=10$  Hz; H-7) e 4,81 (t;  $J=5,4$  Hz; H-13), característicos de hidrogênios de sistema olefínico trissubstituído, além de um sinal típico de grupamento hidroxila em  $\delta$  4,22 (dd;  $J=6,4$  e  $8,8$  Hz; H-1), assim como a presença dos sinais em  $\delta$  1,11 (m; H-8) e 0,71 (m; H-9) atribuídos a hidrogênios de um anel ciclopropânico. Os sinais simples em  $\delta$  1,06 (s; 3H-17); 1,17 (s; 3H-16); 1,59 (s; 3H-18); 1,87 (s; 3H-20) e 1,99 (s; 3H-20), foram associados a cinco metilas.



Quadro 6 – Oxidação do grupo hidroxila da posição C-4 de CA-2

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 16, pág. 68) foram observadas 20 linhas espectrais, onde os sinais em  $\delta$  198,03 (C-5) e 198,60 (C-4) foram atribuídos a duas

carbonilas conjugadas de cetona, que juntamente com a presença de apenas um sinal na região de carbonos oxigenados em  $\delta$  77,37 (C-1), corroboram com a hipótese de oxidação do carbono C-4 na estrutura de CA-2. Em adição, também foram observados sinais em  $\delta$  158,03 (C-7), 156,35 (C-2), 136,18 (C-12), 131,62 (C-6), 124,23 (C-3) e 120,91 (C-13) associados a seis carbonos olefínicos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 17, pág. 68) revelou a presença de três carbonos metilênicos em  $\delta$  24,37 (C-10); 32,84 (C-14) e 39,27 (C-11), bem como seis linhas espectrais de carbonos mono-hidrogenados em  $\delta$  158,03 (C-7), 124,41 (C-3), 120,21 (C-13), 77,37 (C-1), 39,84 (C-9) e 33,39 (C-8), conseqüentemente, as outras seis absorções foram atribuídas a carbonos não-hidrogenados em  $\delta$  198,03 (C-5), 198,60 (C-4), 156,35 (C-2), 136,35 (C-12), 131,62 (C-6) e 30,28 (C-15). Estes dados confirmaram a presença de três insaturações olefínicas trissubstituídas e um carbono oximetínico (Tabela 23).

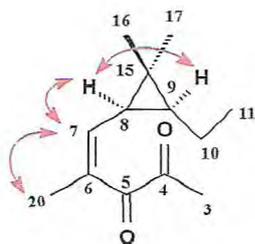
**Tabela 23** – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de CA-3 por padrão de hidrogenação.

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$	Total
29,91	39,27	158,03 (C=C)	198,60 (C=O)	
22,12	32,84	124,41 (C=C)	198,03 (C=O)	
15,25	24,37	120,21 (C=C)	156,35 (C=C)	
12,77		77,37 (OH)	136,35 (C=C)	
10,14		39,84	131,62 (C=C)	
		33,39	30,28	
$\text{C}_5\text{H}_{15}$	$\text{C}_3\text{H}_6$	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$	$\text{C}_6\text{O}_2$	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$

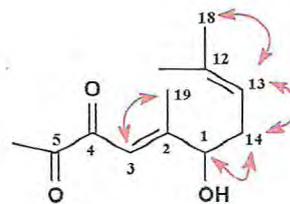
A partir dos dados obtidos pôde-se propor para CA-3 a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ , corroborado pelo espectro de EM-IE que mostrou o pico íon molecular com  $m/z$  igual a 316

Da, e com espectro de massas de alta resolução HRESIMS (Fig. 23, pág. 73) que forneceu a massa do aduto de sódio  $[M+Na]$  339,1918 Da, com um erro de 5,3 ppm. De acordo com estes dados CA-3 apresentou um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 7, dos quais três foram atribuídos a três duplas ligações, e duas relacionadas a duas carbonilas de cetona, confirmando uma estrutura diterpênica de esqueleto casbano, semelhante ao composto CA-2.

O espectro  $^1H$ ,  $^1H$ -COSY (500 x 500 MHz,  $CDCl_3$ , Fig. 18, pág. 69) de CA-3 permitiu observar as correlações homonucleares entre o hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,87 (H-7) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,87 (H-20), de forma alílica, e com o hidrogênio metínico em  $\delta$  1,11 (H-8). O hidrogênio em  $\delta$  1,11 (H-8), por sua vez, apresentou correlação com o hidrogênio em  $\delta$  0,71 (H-9) (Frag. 5.6). O hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,81 (H-13) correlacionou-se com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,47 (H-14) e de forma alílica com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,59 (H-18). Foram ainda observadas as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  2,47 (H-14) com o hidrogênio em  $\delta$  4,22 (H-1), e do hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,24 (H-3) com os hidrogênios da metila em  $\delta$  1,99 (H-19) (Frag. 5.7).



Fragmento 5.6

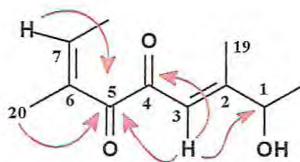


Fragmento 5.7

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio HMQC (500 x 125 MHz,  $CDCl_3$ , Fig. 19, pág. 70) permitiu associar inequivocamente os sinais de hidrogênio a seus respectivos carbonos (Tabela 24, pág. 65).

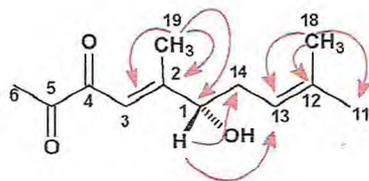
Análise do espectro de  $^1H$ ,  $^{13}C$ -HMBC (500 x 125 MHz,  $CDCl_3$ , Fig. 20, pág. 71) revelou as correlações a longa distância entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ). Neste espectro observou-se as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  5,87 (H-7), 6,24 (H-3) e 1,87 (H-20) com o carbono em  $\delta$  198,03 (C-5), bem como a correlações do hidrogênio em  $\delta$  6,24 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  198,60 (C-4) e 77,37 (C-1). Estes dados permitiram localizar de

forma inequívoca a posição das duas carbonilas vicinais em C-4 e C-5, respectivamente. (Frag. 5.8).



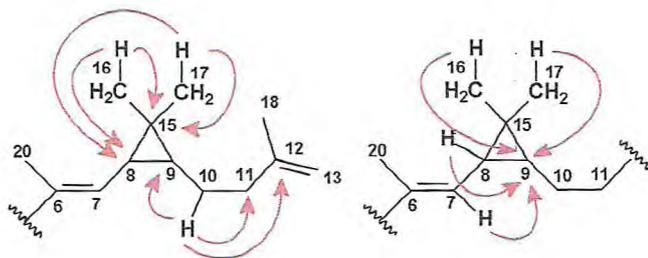
Fragmento 5.8

Continuando a análise neste espectro foi possível observar as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,99 (3H-19) com os carbonos em  $\delta$  77,37 (C-1), 124,41 (C-3) e 156,35 (C-2), além dos hidrogênios em  $\delta$  1,59 (3H-18) com os carbonos em  $\delta$  39,26 (C-11), 120,20 (C-13), 136,18 (C-12), e do hidrogênio em  $\delta$  4,22 (H-1) com os carbonos em  $\delta$  32,84 (C-14) e 120,20 (C-13) (Frag. 5.9), estes dados, associados com as correlações do fragmento 5.8, confirmaram o posicionamento das duplas ligações em  $\Delta^{2,3}$ ,  $\Delta^{6,7}$  e  $\Delta^{12,13}$ , bem como o posicionamento da hidroxila em C-1.



Fragmento 5.9

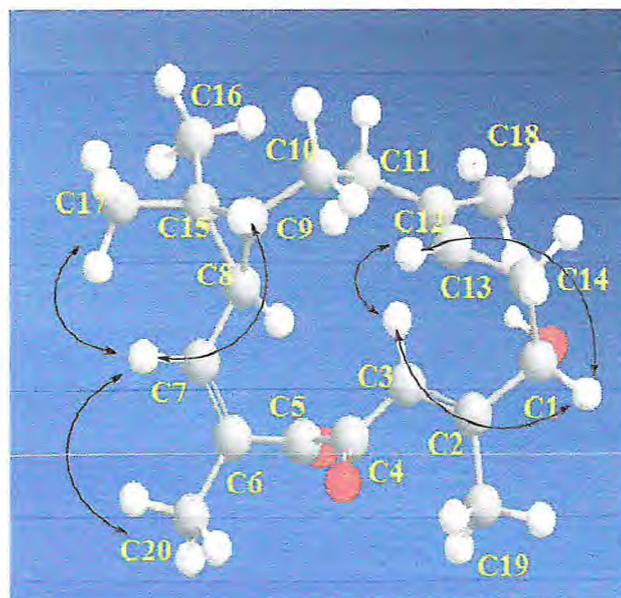
Em adição, foram observadas as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,11 (H-8), 5,87 (H-7), 1,17 (H-16) e 1,06 (H-17) com o carbono em  $\delta$  39,07 (C-9), bem como as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,17 (H-16) e 1,06 (H-17) com os carbonos em  $\delta$  33,39 (C-8) e 30,28 (C-15), e dos hidrogênios em  $\delta$  19,5 e 0,70 (2H-10) com os carbonos em  $\delta$  39,07 (C-9), 39,26 (C-10) e 136,18 (C-12), respectivamente.



Fragmento 5.10

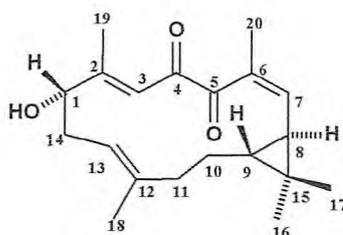
A análise do espectro de RMN bidimensional NOESY (Fig. 21, Pág.72), bem como o uso de modelos moleculares, revelou a orientação de H-8 e H-9 em sentidos opostos e de acordo com um anel de fusão *trans*. Esta observação foi confirmada pela análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , onde os deslocamentos químicos dos grupos metilas geminados em  $\delta$  22,14 (C-16) e 24,02 (C-17) estão em acordo com aqueles reportados para a fusão *trans* de diterpenos casbanos [LI *et al.*, 2010].

O experimento de NOESY mostrou as correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  4,22 (H-1) com os hidrogênios em  $\delta$  6,24 (H-3) e  $\delta$  4,81 (H-13), bem como a correlação entre os hidrogênios em  $\delta$  6,24 (H-3) e  $\delta$  4,81 (H-13). Estes dados confirmaram o posicionamento  $\alpha$  para a hidroxila e a estereoquímica *E* para as duplas ligações  $\Delta^{2,3}$ , e  $\Delta^{12,13}$ . As correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  1,06 (3H-17) com os hidrogênios em  $\delta$  5,87 (H-7), 1,87 (3H-20) e 0,71 (H-9), confirmam que estes grupos estão localizados do mesmo lado e justificando a estereoquímica *Z* para a ligação dupla  $\Delta^{6,7}$ .



Modelo estrutural de CA-3

A análise dos dados físicos, espectrométricos e espectroscópicos de CA-3, bem como um estudo comparativo desses dados com aqueles descritos na literatura para diterpenos casbanos, permitiu caracterizá-lo como sendo 1-hidroxi-2*E*,6*Z*,12*E*-trien-4,5-diona-casbano (5.2), de caráter inédito na literatura.



1-Hidroxi-2*E*,6*Z*,12*E*-trien-4,5-diona-casbeno (5.2)

Tabela 24 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-3 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	77,37	4,22 (dd; $J = 8,1$ e $5,9$ Hz; 1H)	2H-14	H-3; 3H-19
2	156,35	-	3H-19	2H-14
3	124,41	6,24 (s; 3H)	-	H-1; 3H-19
4	198,60	-	H-3	-
5	198,03	-	-	H-3; H-7; 3H-20
6	131,62	-	3H-20	H-8
7	158,03	5,87 (d; $J = 10,3$ Hz; 1H)	-	3H-20
8	33,39	1,11 (m; 1H)	-	3H-16; 3H-17
9	39,84	0,71 (m; 1H)	2H-10	3H-16; 3H-17; H-7
10	24,37	1,95 (m; 1Ha) e 0,70 (m; 1Hb)	H-9	H-8
11	39,26	2,23 (m; 1Ha) e 1,98 (m; 1Hb)	2H-10	H-13; 3H-18
12	136,18	-	2H-11; 3H-18	2H-14
13	120,20	4,81 (t; $J = 8,1$ Hz; 1H)	2H-14	H-1; H-11b; 3H-18
14	32,84	2,47 (t; $J = 8,1$ Hz; 2H)	H-1	-
15	30,28	-	3H-16; 3H-17	-
16	22,14	1,17 (s; 3H)	-	3H-17; H-8; H-9
17	24,02	1,06 (s; 3H)	-	3H-16; H-8; H-9
18	15,25	1,59 (s; 3H)	-	H-11b; H-13
19	12,77	1,99 (s; 3H)	-	H-1; H-3
20	10,14	1,87 (s; 3H)	-	H-7

**Tabela 25** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-3 como os do composto CA-2,  $\delta$  (ppm).

#C	CA-3 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	CA-2 (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ )
1	77,37	78,07
2	156,35	144,48
3	124,41	126,15
4	198,60	68,70
5	198,03	200,04
6	131,62	135,50
7	158,03	144,36
8	33,39	28,31
9	39,84	35,72
10	24,37	25,86
11	39,26	40,53
12	136,18	137,18
13	120,20	121,01
14	32,84	32,54
15	30,28	27,32
16	22,14	16,23
17	24,02	29,31
18	15,25	15,69
19	12,77	10,72
20	10,14	12,61

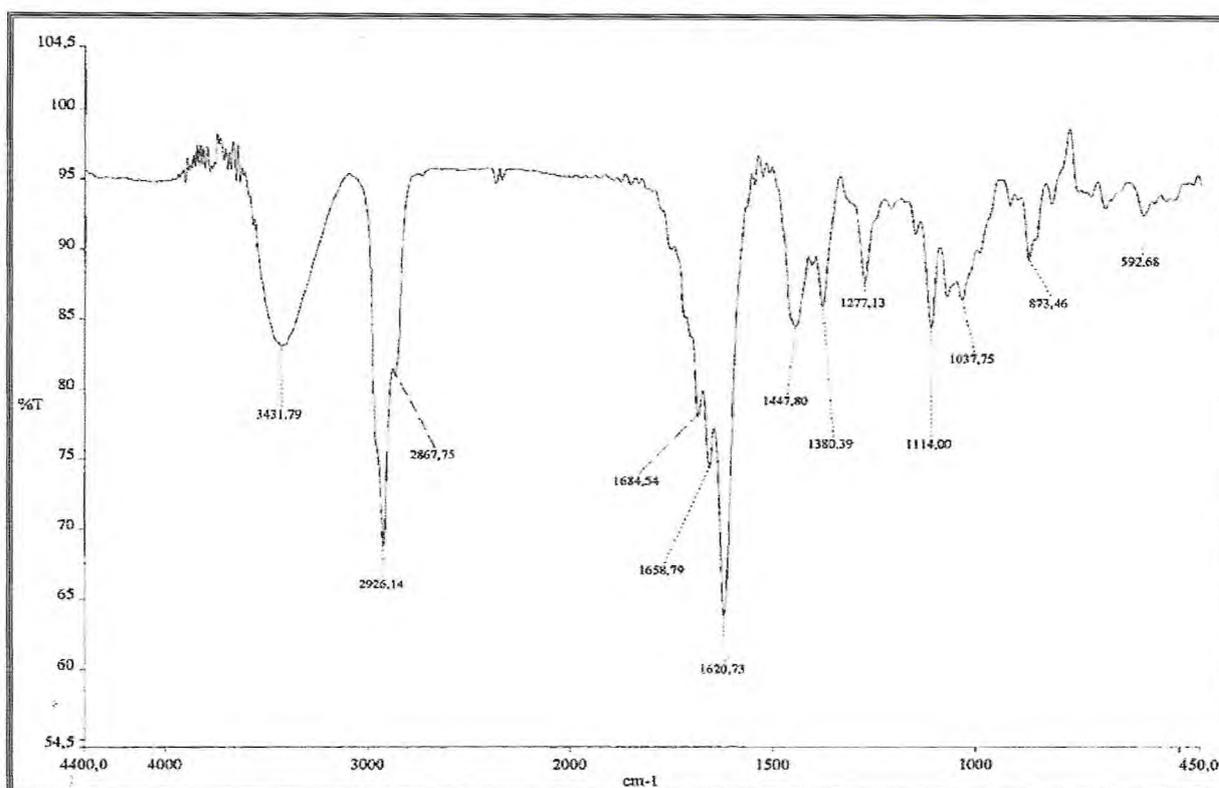


Figura 14 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-3 com pastilhas de KBr

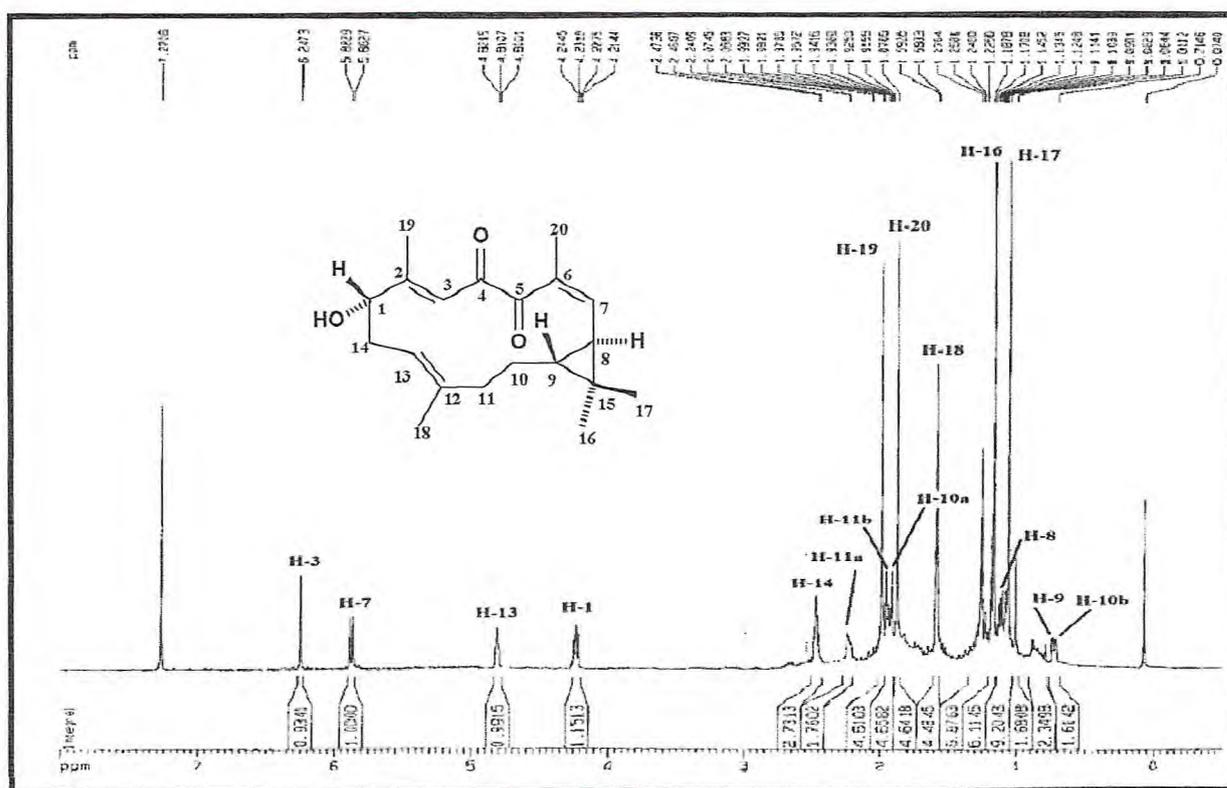


Figura 15 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-3

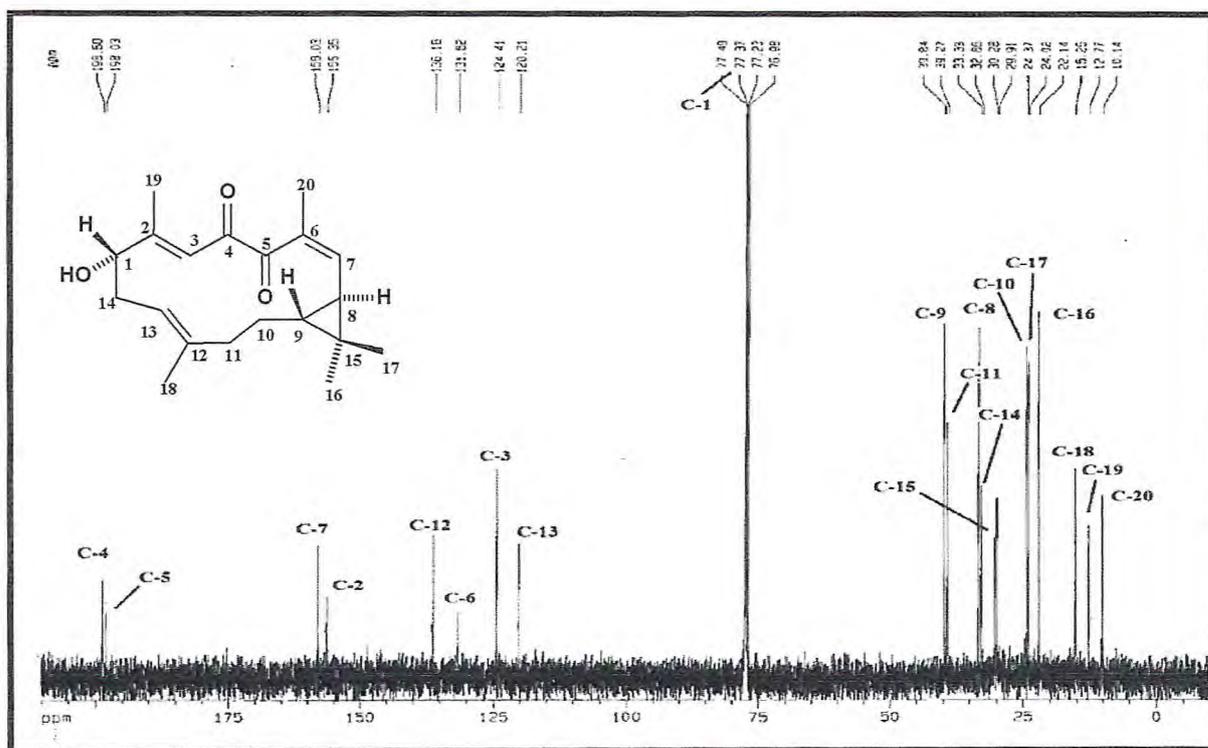


Figura 16 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-3.

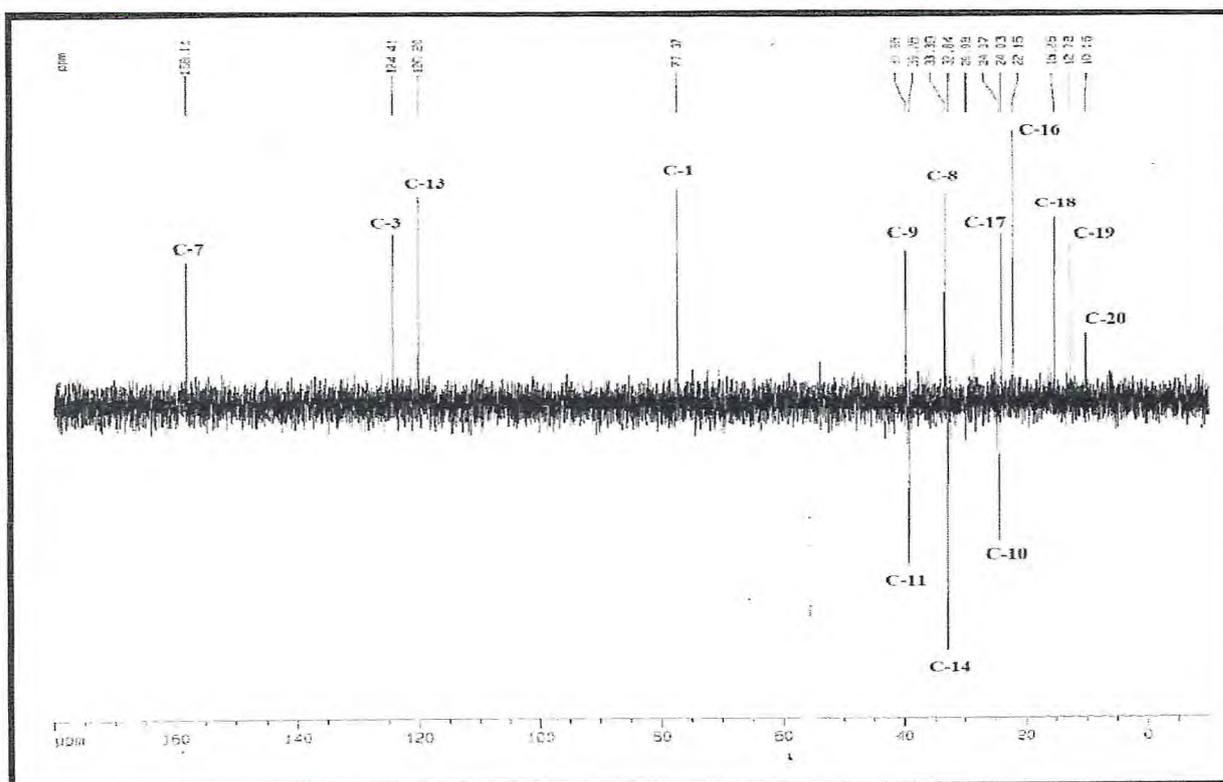


Figura 17 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-3.

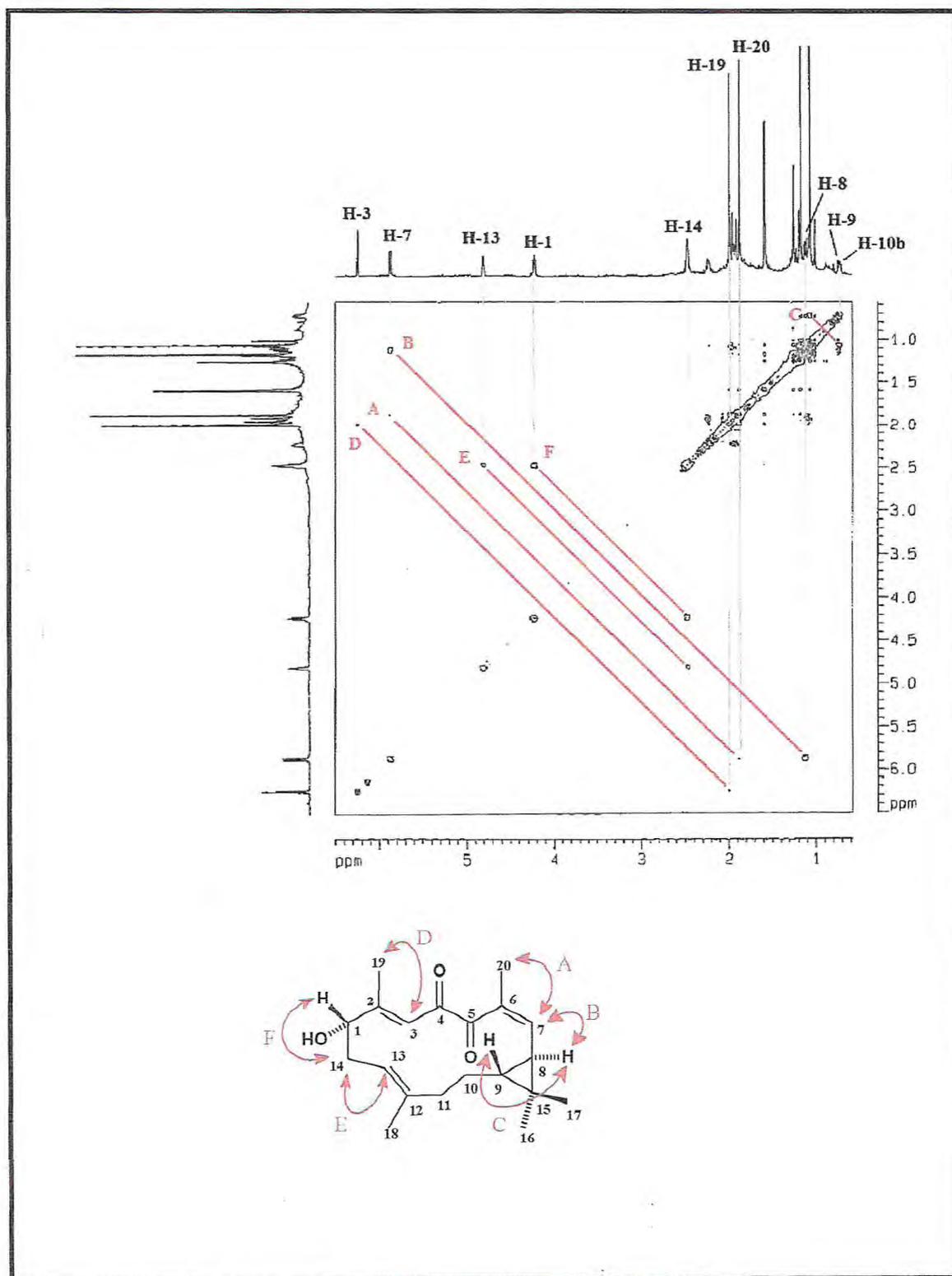


Figura 18 – Espectro de RMN bidimensional COSY de CA-3.

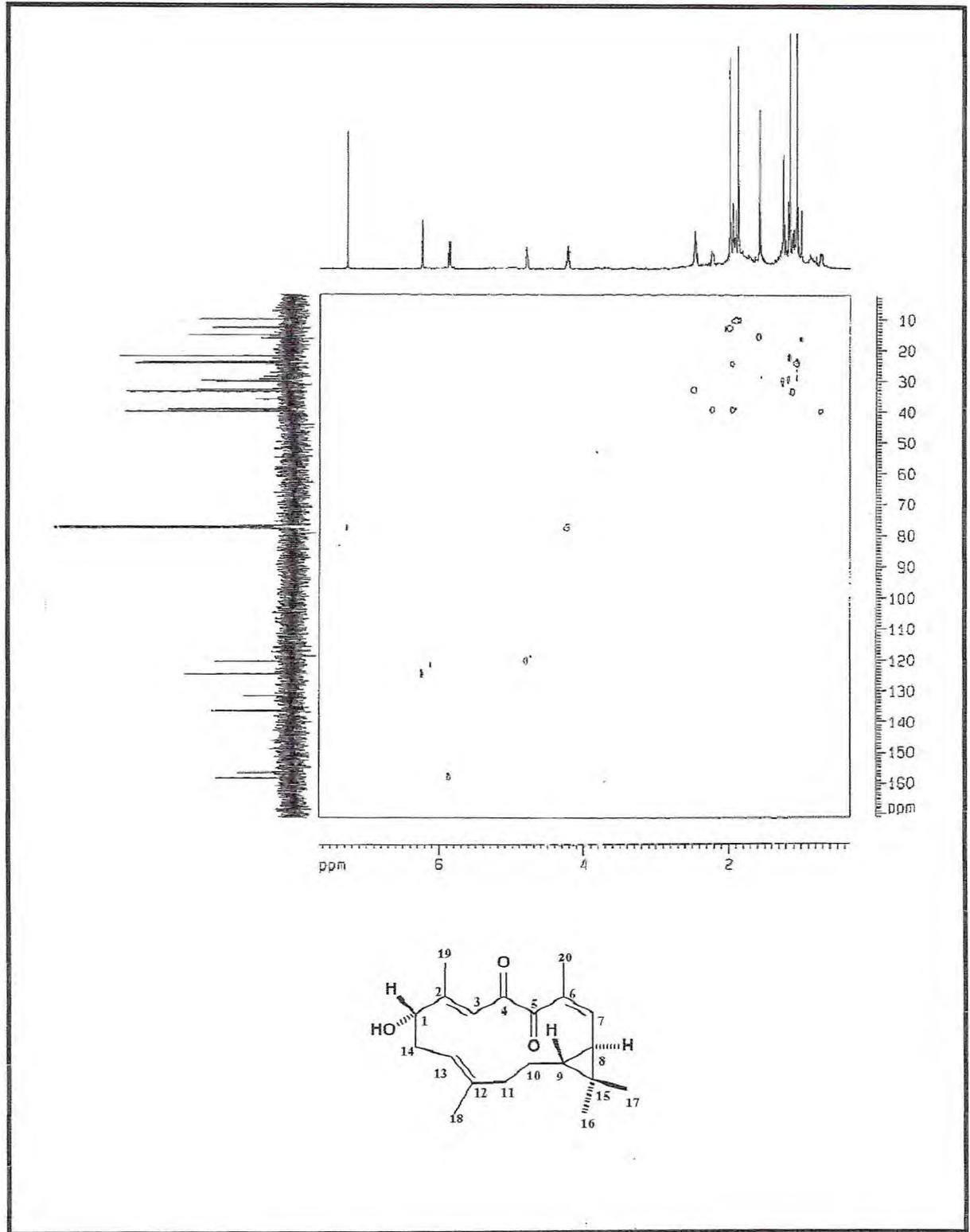


Figura 19 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-3.

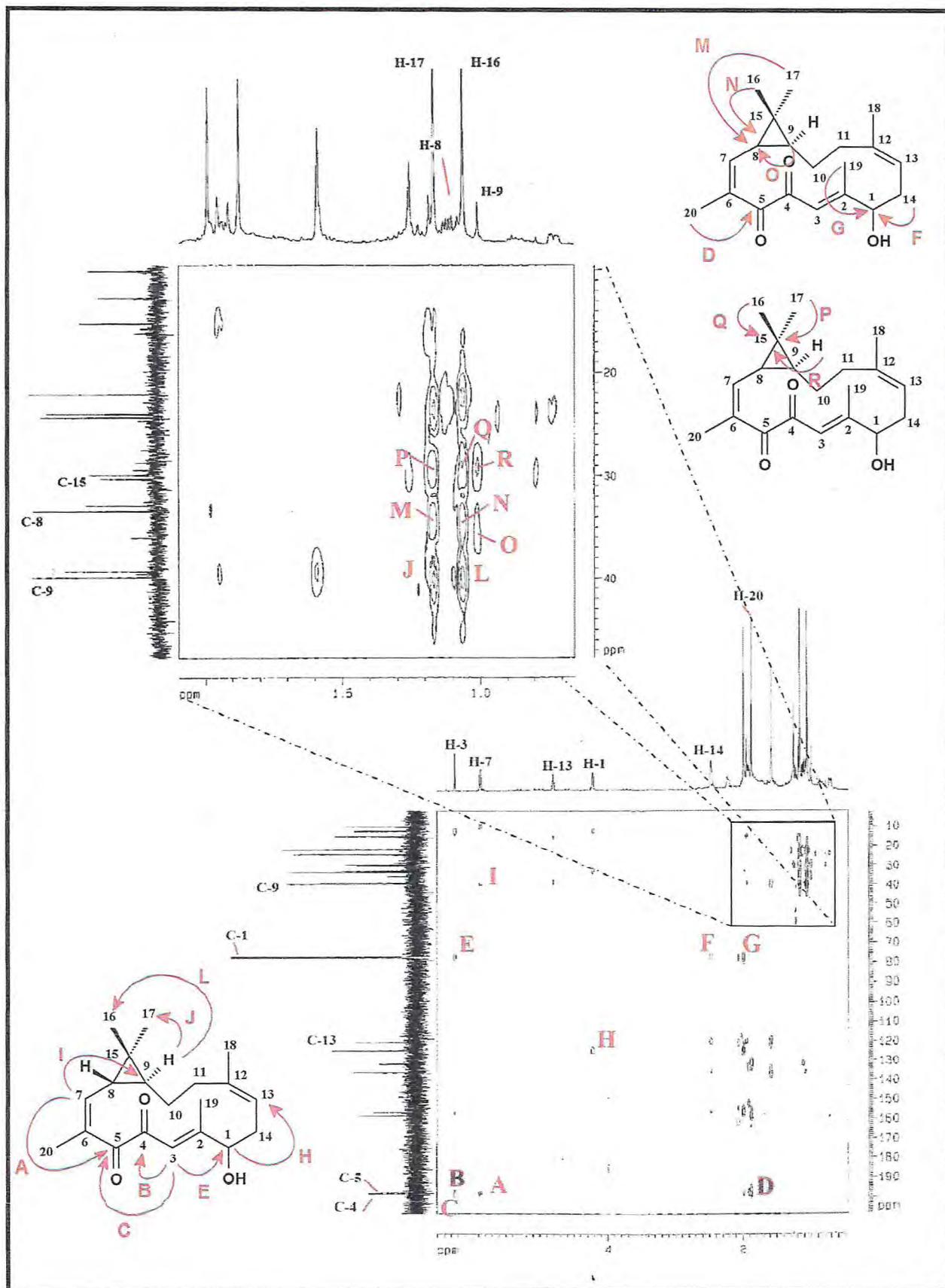


Figura 20 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-3.

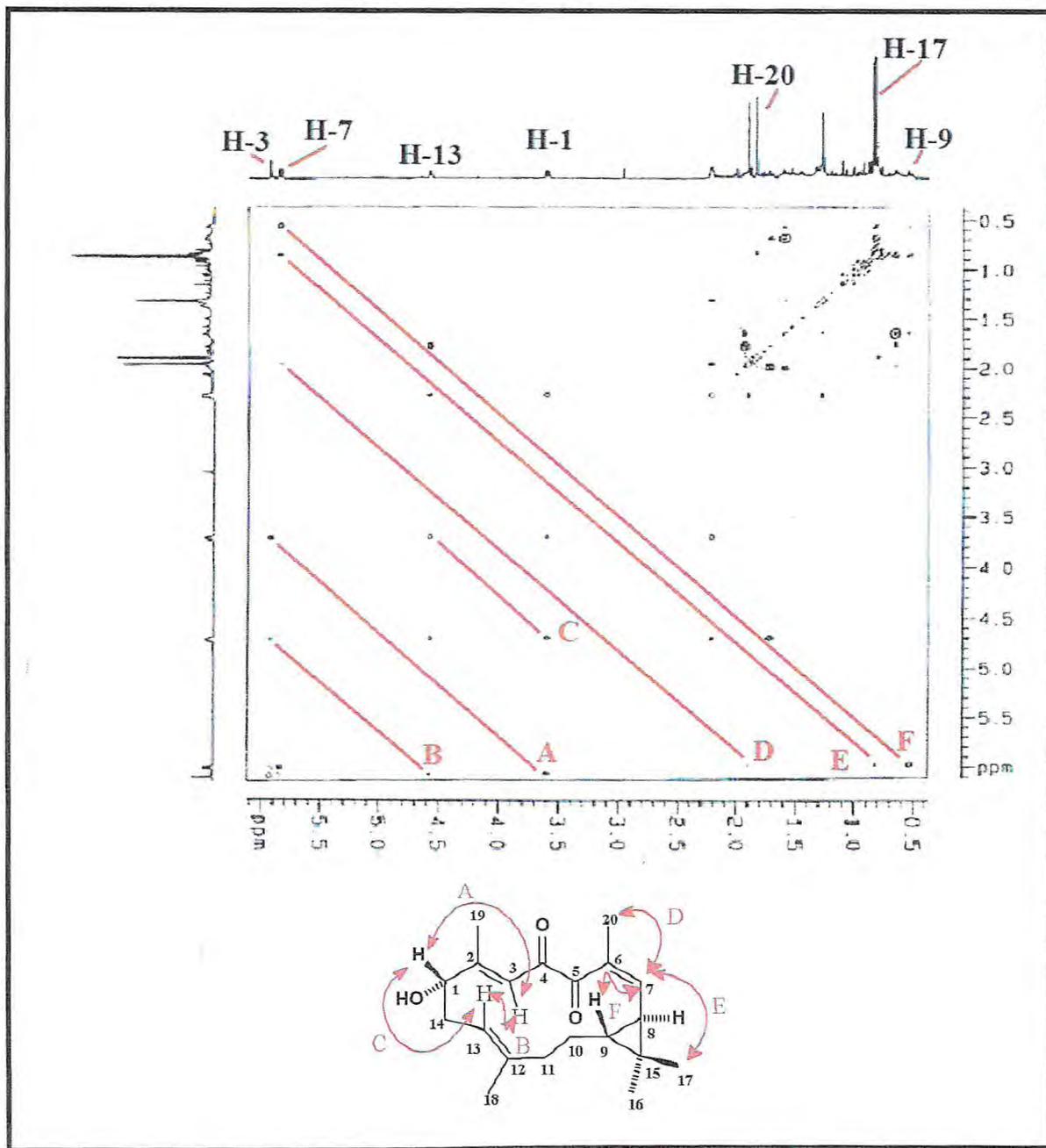


Figura 21 – Espectro de RMN bidimensional NOESY de CA-3.

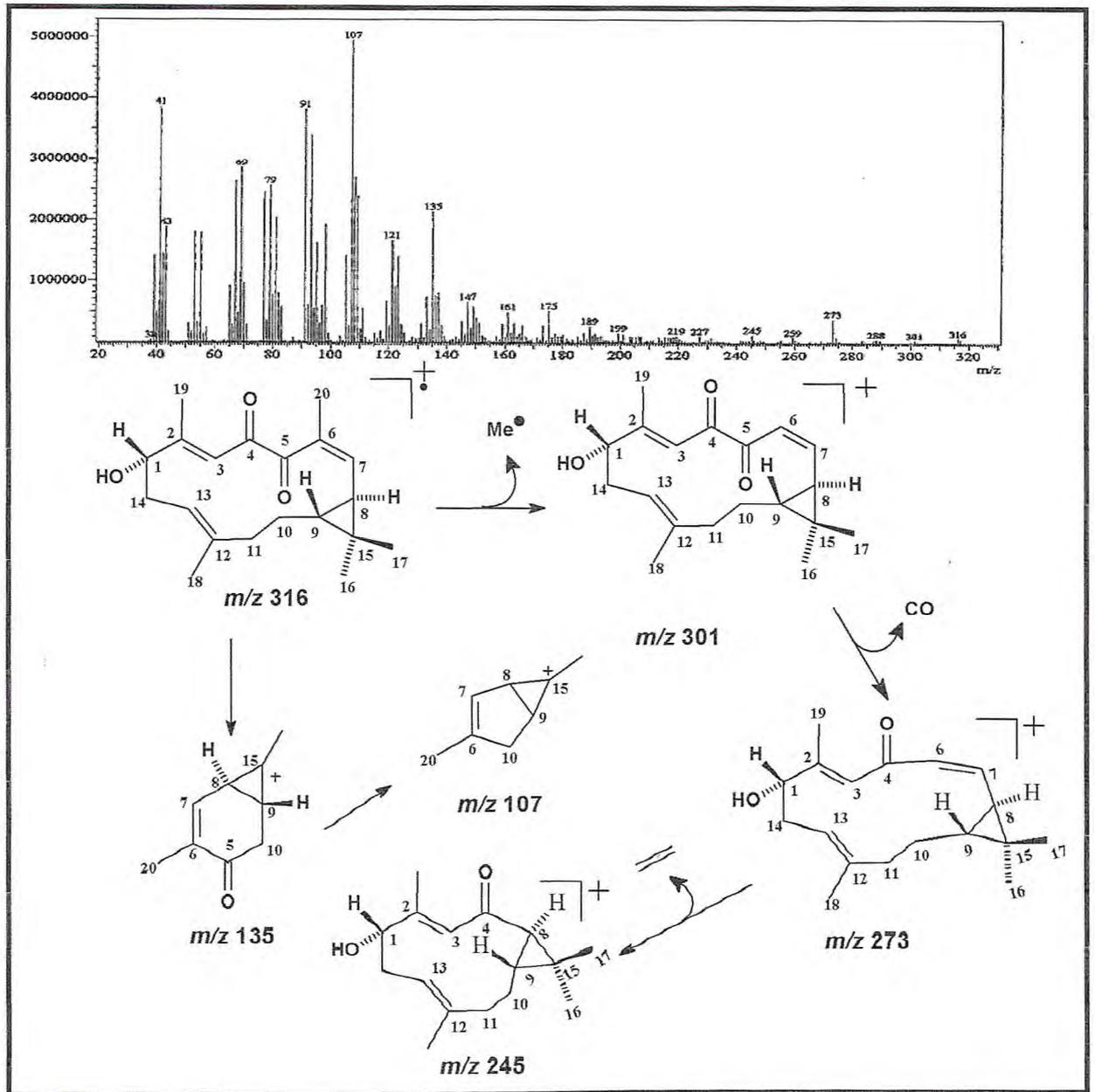


Figura 22 – Espectro de massa de CA-3 (ionização eletrônica a 70 eV).

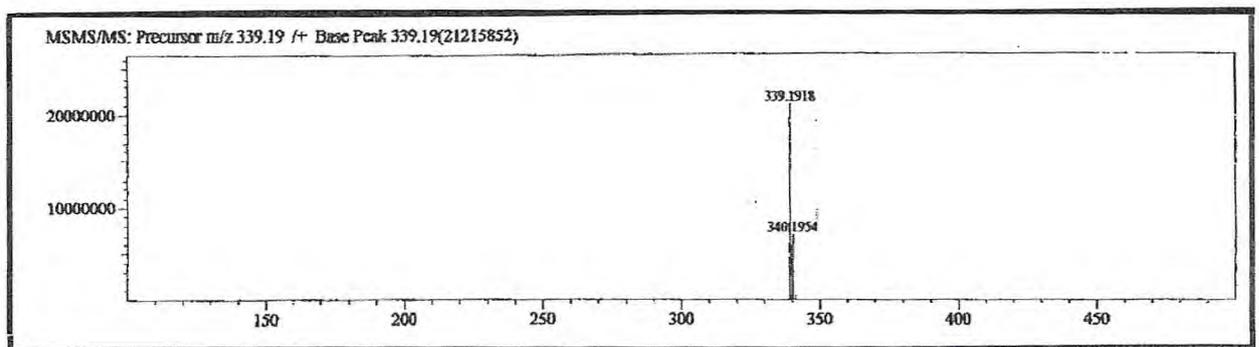


Figura 23 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-3.

### 5.1.3 Determinação Estrutural de CA-4

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração hexânica, obtida através de partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, permitiu o isolamento de um óleo amarelado de  $[\alpha]_D^{20} = +26$  (c 0,17,  $\text{CHCl}_3$ ) e denominado de CA-4.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 25, pág. 81) de CA-4 apresentou semelhança com o espectro de CA-2, diferenciando-se pela ausência dos hidrogênios oximetínicos. Neste espectro observou-se a presença de um sinal de hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,95 (s; H-3), característico de sistema furânico trissubstituído; além de outros dois sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,32 (dd;  $J = 8,6$  e  $0,8$  Hz; H-7) e 5,31 (t;  $J = 7,7$  Hz; H-13). Também foram observados os simpletos em  $\delta$  2,01 (3H-19), 1,96 (3H-20), 1,94 (3H-18), 1,19 (3H-17) e 0,79 (3H-16) associados a cinco metilas, além de outros sinais na faixa de deslocamento químico de  $\delta$  1,05-3,41 atribuídos a hidrogênios de carbonos alifáticos.

A semelhança entre os compostos CA-4 e CA-2, previstas pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , foi corroborada pelo espectro de IV de CA-4 (Fig. 24, pág. 81), que revelou bandas de estiramento axial de ligação C=O de carbonila conjugada em  $1623\text{ cm}^{-1}$ , estiramentos assimétricos de ligação olefínica C=C em  $1774$  e  $1704\text{ cm}^{-1}$ , e estiramento axial de ligação C-O ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) em  $1055\text{ cm}^{-1}$ .

Através da análise de espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 26, pág. 82) de CA-4 foram observados 20 linhas espectrais, dentre os quais oito foram identificadas como carbonos insaturados  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  153,45 (C-1), 150,93 (C-4), 144,16 (C-7), 143,22 (C-12), 135,54 (C-6), 119,62 (C-13), 119,25 (C-3) e 117,04 (C-2). Comparação com dados da literatura pode associar os carbonos  $\delta$  153,45 (C-1), 150,93 (C-4), 119,25 (C-3) e 117,04 (C-2) a um sistema furânico trissubstituído, enquanto o carbono em  $\delta$  185,67 foi atribuído a uma carbonila de cetona conjugada.

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 27, pág. 82), determinou a existência de cinco carbonos metínicos, três carbonos metilênicos, cinco carbonos metílicos e sete carbonos não-hidrogenados, como mostrado na Tabela 26, Pág. 75.

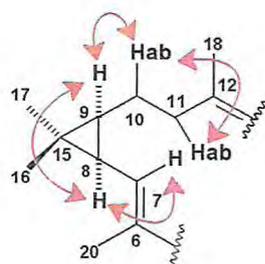
**Tabela 26** – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de CA-4 por padrão de hidrogenação.

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$	Total
29,13	39,40	144,16 (C=C)	185,67 (C=O)	
19,22	27,45	119,62 (C=C)	153,45 (C=C-O)	
16,32	24,80	119,25 (C=C)	150,93 (C=C-O)	
12,98		33,09	143,22 (C=C)	
9,69		29,34	135,54 (C=C)	
			117,04 (C=C)	
			24,04	
$\text{C}_5\text{H}_{15}$	$\text{C}_3\text{H}_6$	$\text{C}_5\text{H}_5$	$\text{C}_7\text{O}_2$	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$

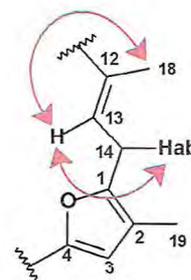
A partir dos dados obtidos pôde-se propor para CA-4 a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3$ , confirmada pelo espectro de massas de alta resolução HRESIMS (Fig. 33, pág. 87) que forneceu a massa do aduto de sódio  $[\text{M}+\text{H}]$  299.2005 Da, com um erro de 2,0 ppm. Diante destes dados CA-4 apresentou um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito, com duas insaturações a mais do que a calculada para CA-2. As duas insaturações adicionais foram atribuídas à presença de um anel furânico na estrutura de CA-4, como sugerido através dos dados de RMN.

O espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 28, pág. 83), permitiu confirmar a presença do anel ciclopropano e dos carbonos metilênicos vicinais, característicos dos diterpenos casbanos, através das correlação do hidrogênio em  $\delta$  1,53 (H-8) com os hidrogênios em  $\delta$  6,32 (H-7) e 1,08 (H-9); e dos hidrogênios em  $\delta$  2,16 (H-10a) e  $\delta$  1,43 (H-10b) com os hidrogênios  $\delta$  2,47 (H-11a); 2,13' (H-11b) e 1,08 (H-9). Outras

correlações de interesse foram observadas entre o hidrogênio em  $\delta$  5,31 (H-13) com os hidrogênios em  $\delta$  1,94 (H-18), 3,37 (H-14a) e 3,12 (H-14b) (Frag. 5.11 e 5.12).

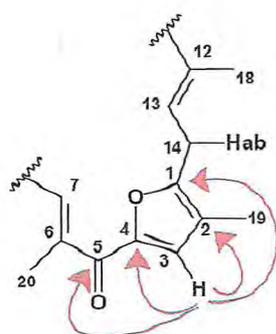


Fragmento 5.11

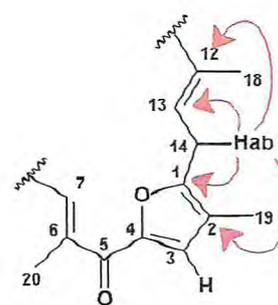


Fragmento 5.12

Analisando o espectro de correlação heteronuclear à longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ) de RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$  HMBC (500 MHz,  $CDCl_3$ , Fig. 30, pág. 85), pôde-se observar a correlação entre o hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,95 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  150,93 (C-4), 117,04 (C-2), 153,45 (C-1) e 185,67 (C-5); bem como a correlação dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  3,37 (H-14a) e 3,12 (H-14b) com os carbonos  $\delta$  153,45 (C-1), 119,62 (C-13), 117,04 (C-2) e 143,22 (C-12). Estes dados determinaram o posicionamento do anel furânico na estrutura de CA-4 (Frag. 5.13 e 5.14).

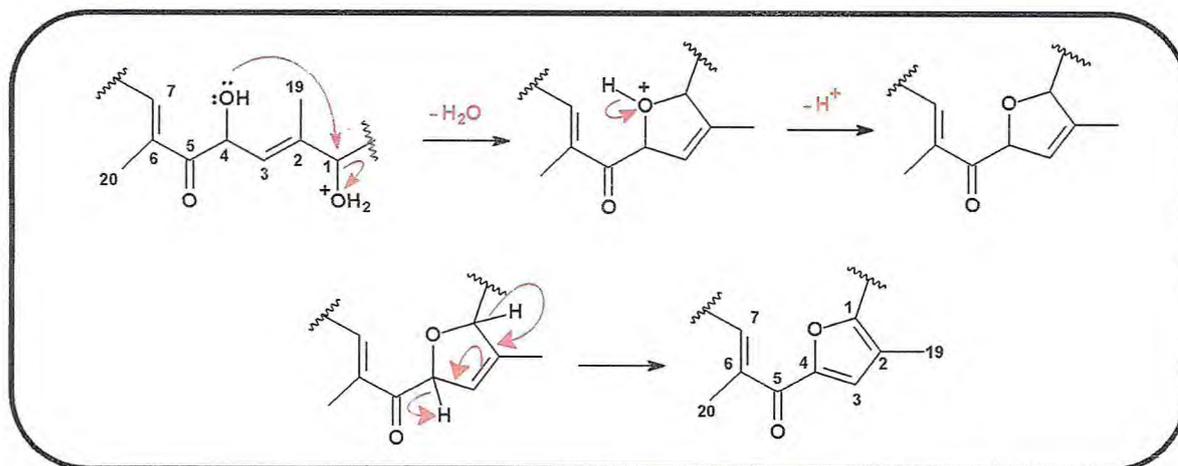


Fragmento 5.13



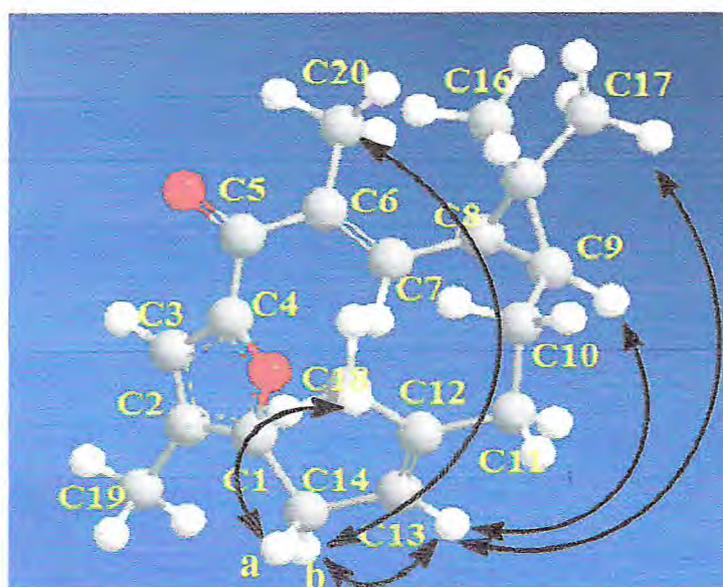
Fragmento 5.14

Tendo em vista que as diferenças estruturais entre CA-4 e CA-2 foram resultantes da presença do anel furânico, a estrutura proposta pôde ser justificada através de uma ciclização intramolecular da hidroxila em C-4 ao carbono hidroxilado em C-1 na estrutura de CA-2, seguida por desidratação e aromatização do sistema (Quadro.7, Pág 77).



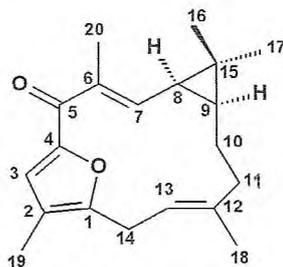
**Quadro 7** – Proposta de ciclização intramolecular de CA-2 e formação do anel furânico

A análise do espectro de RMN unidimensional NOE seletivo (Fig. 31, Pág. 86), com irradiação na frequência do hidrogênio em  $\delta$  5,31 (H-13), mostrou acréscimo nos sinais em  $\delta$  3,12 (H-14b), 2,47 (H-11a) e 1,08 (H-9), revelando uma aproximação espacial entre esses hidrogênios. A irradiação seletiva sobre a frequência hidrogênio em 3,37 (H-14a) levou ao acréscimo do sinal em  $\delta$  1,94 (3H-18), bem como a irradiação do hidrogênio em  $\delta$  3,12 (H-14b) acrescentou o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  1,96 (3H-20), e pela ausência das correlações entre o hidrogênio H-7 com os hidrogênios H-13 e H-14b possibilitou determinar a estereoquímica *E* para as ligações duplas  $\Delta^{6,7}$  e  $\Delta^{12,13}$ . Em adição, o deslocamento químico do carbono C-16 em  $\delta$  16,36 revelou uma fusão *cis*, para o anel ciclopropano [LI *et al*, 2010].



**Modelo molecular de CA-4, mostrando as correlações espaciais observadas no espectro de NOE Seletivo**

A junção de todos os dados apresentados possibilitou caracterizar CA-4 com sendo o diterpeno de esqueleto casbano denominado de *6E,12E*-dien-[(1,2,3,4)-3-hidrofurano]-5-ona-casbeno (**5.3**), de caráter inédito na literatura.



***6E,12E*-Dien-[(1,2,3,4)-3-hidrofurano]-5-ona-casbeno (**5.3**)**

Tabela 27 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	153,45	-	2H-14	H-3; 3H-19
2	117,04	-	1H-7; 3H-19	1H-14 <sup>a</sup>
3	119,25	6,95 (s; 1H)	-	3H-19
4	150,93	-	1H-3	-
5	185,67	-	-	1H-7; 3H-20
6	135,54	-	3H-20	-
7	144,16	6,32 (dd; $J = 8,6$ e $0,8$ Hz; 1H)	-	3H-20
8	29,34	1,53 (dd; $J = 8,6$ e $7,6$ Hz 1H)	-	2H-10; 3H-16; 3H-17
9	33,09	1,08 (m; 1H)	2H-10	2H-11; 3H-16; 3H-17
10	27,45	2,16 (m; 1Ha) e 1,23 (m; 1Hb)	2H-11	-
11	39,40	2,47 (dd; $J = 12,9$ e $6,2$ Hz; 1Ha) e 2,14 (m; 1Hb)	2H-10	3H-18
12	143,22	-	2H-11; 3H-18	2H-10; 2H-14
13	119,62	5,31 (t; $J = 7,7$ Hz; 1H)	2H-14	3H-18
14	24,80	3,37 (dd; $J = 15,0$ e $5,5$ Hz; 1Ha) e 3,12 (dd; $J = 15,0$ e $5,5$ Hz 1Hb)	-	-
15	24,04	-	3H-16; 3H-17	-
16	16,36	0,79 (s; 3H)	-	3H-17
17	29,13	1,19 (s; 3H)	-	3H-16
18	19,22	1,94 (s; 3H)	-	-
19	9,69	2,01 (s; 3H)	-	-
20	12,98	1,96 (s; 3H)	-	-

**Tabela 28** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-4 e de CA-2.  $\delta(\text{ppm})$ .

#C	CA-7	CA-2
	(125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ )
1	153,45	78,07
2	117,04	144,48
3	119,25	126,15
4	150,93	68,70
5	185,67	200,04
6	135,54	135,50
7	144,16	144,36
8	29,34	28,31
9	33,09	35,72
10	27,45	25,86
11	39,40	40,53
12	143,22	137,18
13	119,62	121,01
14	24,80	32,54
15	24,04	27,32
16	16,36	16,23
17	29,13	29,31
18	19,22	15,69
19	9,69	10,72
20	12,98	12,61

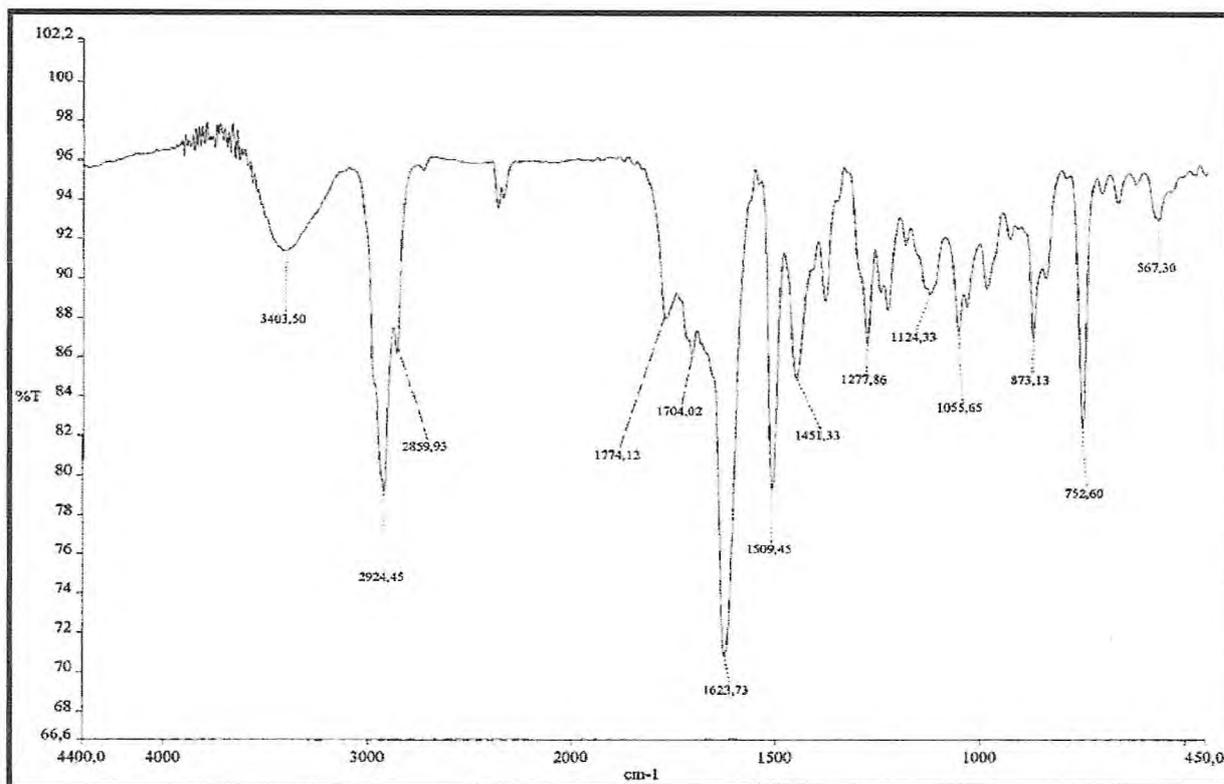


Figura 24 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-4 com pastilhas de KBr.

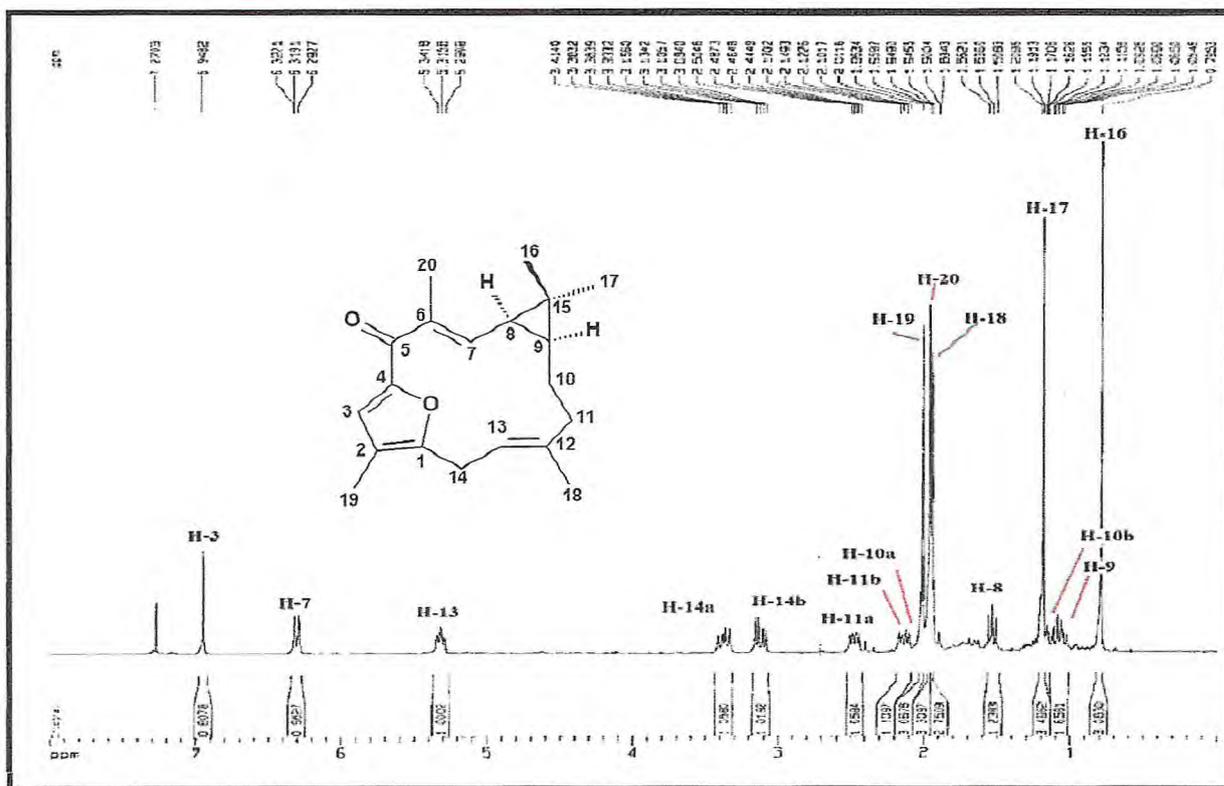


Figura 25 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-4.

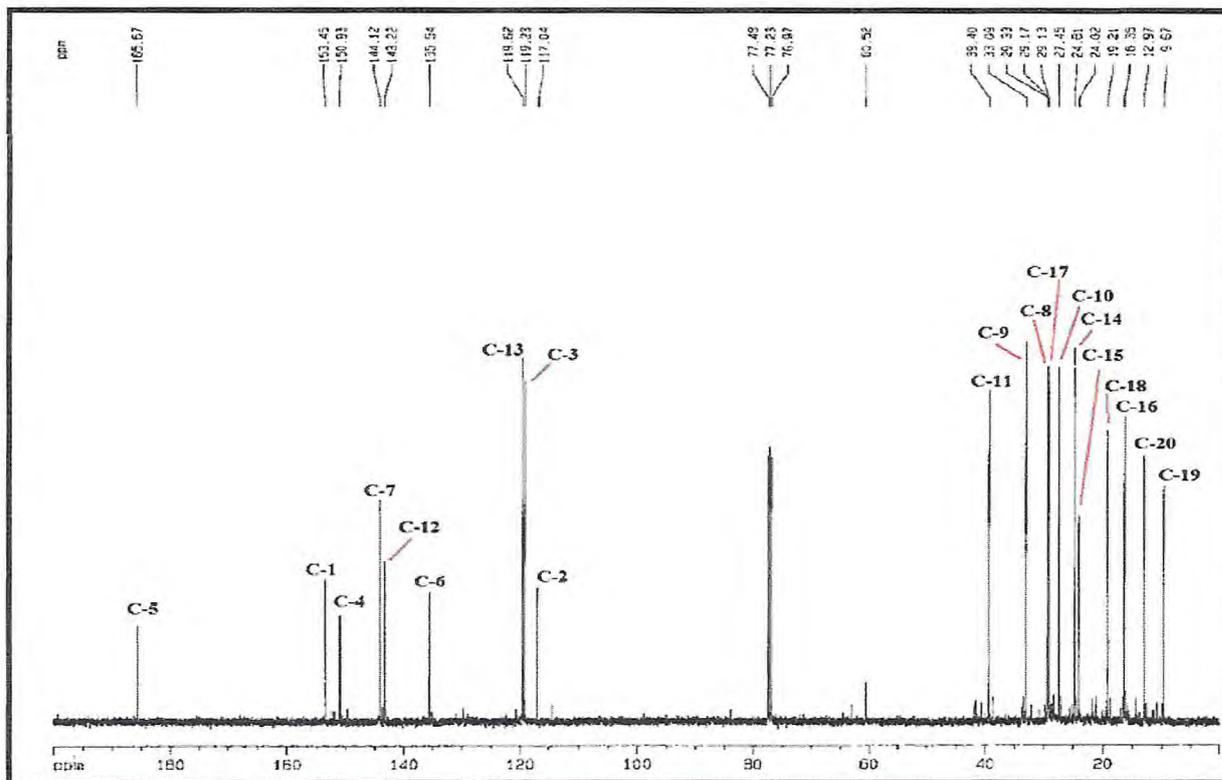


Figura 26 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-4.

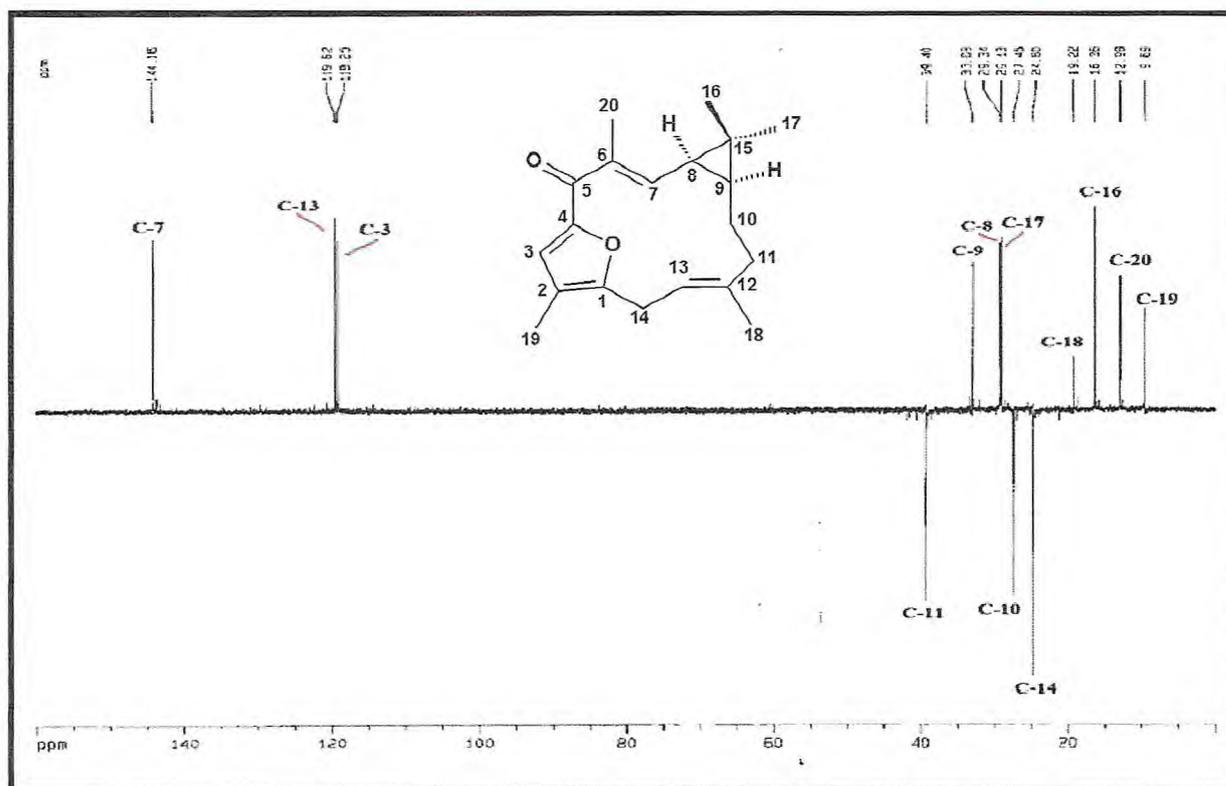


Figura 27 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-4.

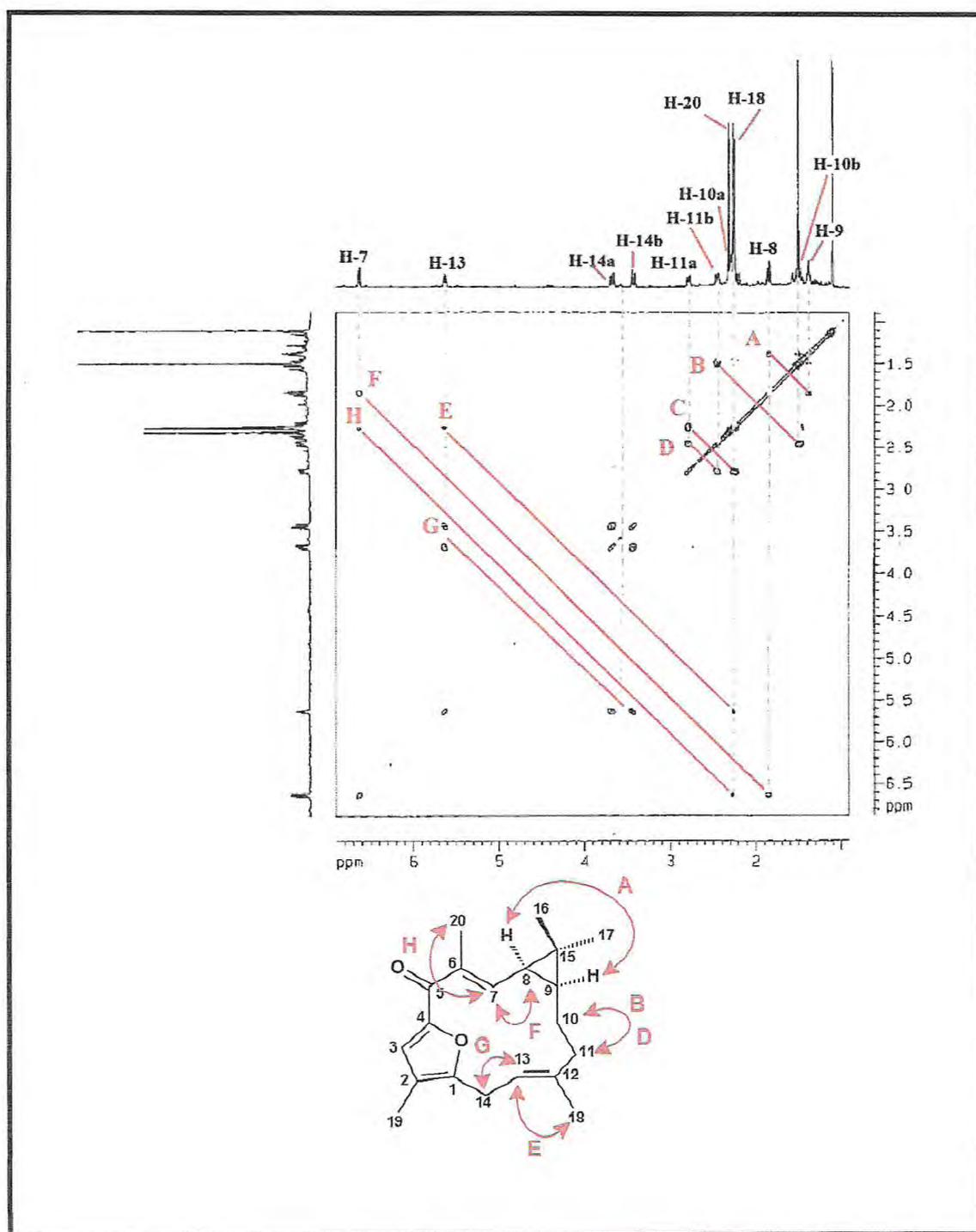


Figura 28 – Espectro de RMN bidimensional COSY de CA-4.

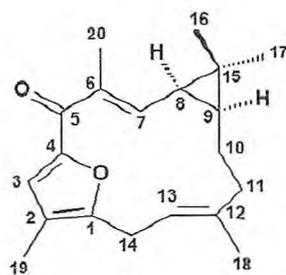
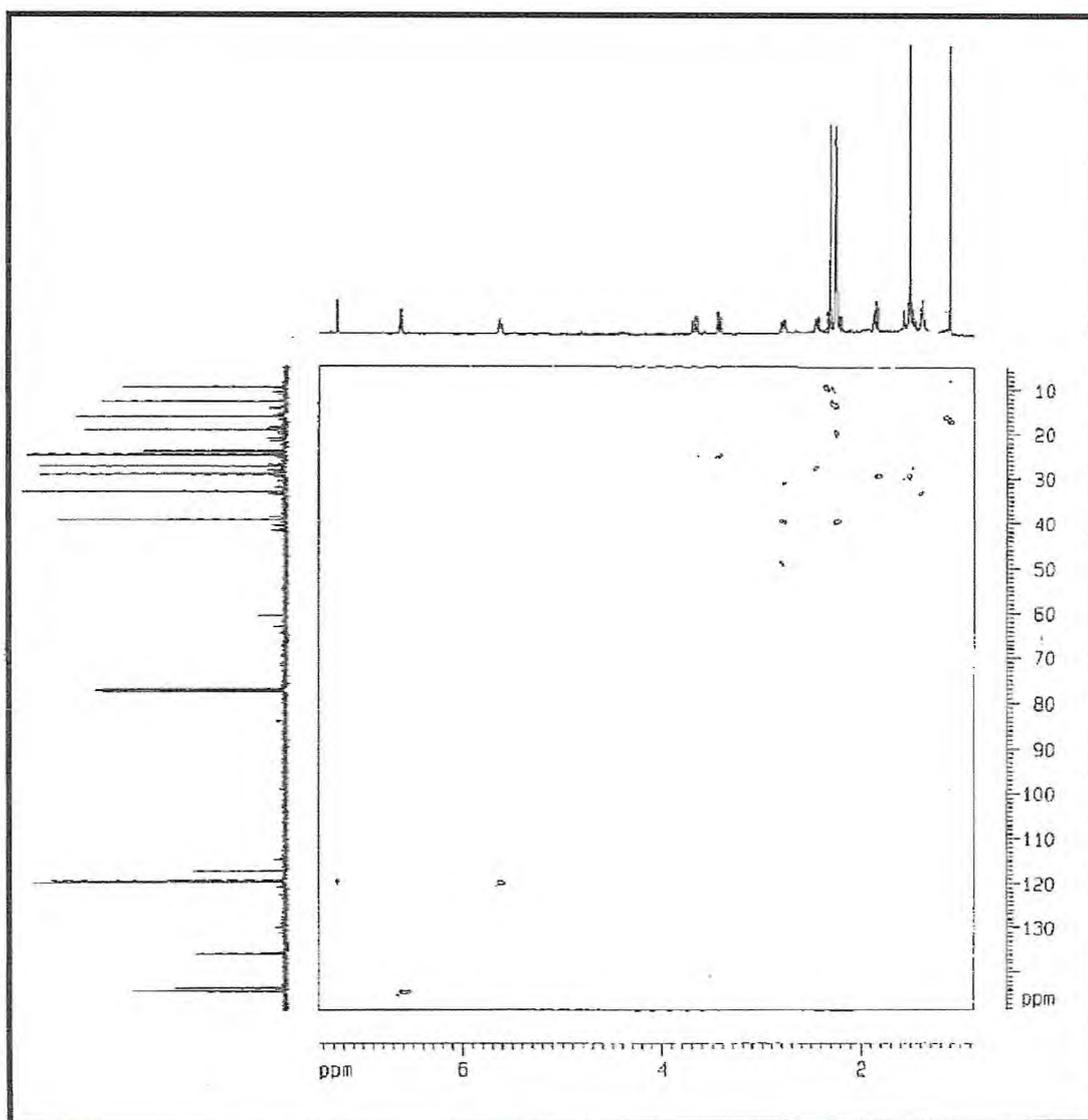


Figura 29 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-4.

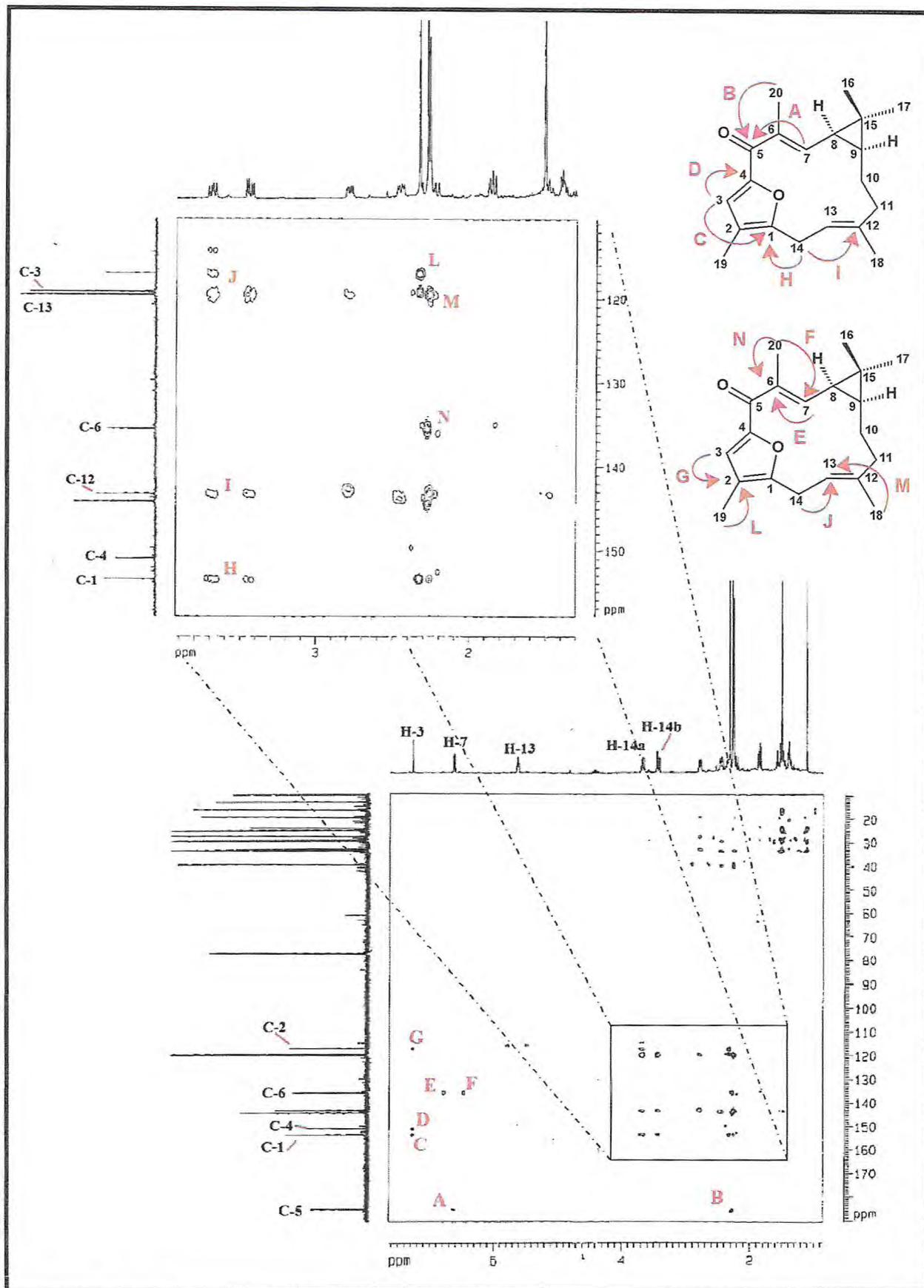


Figura 30 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-4.

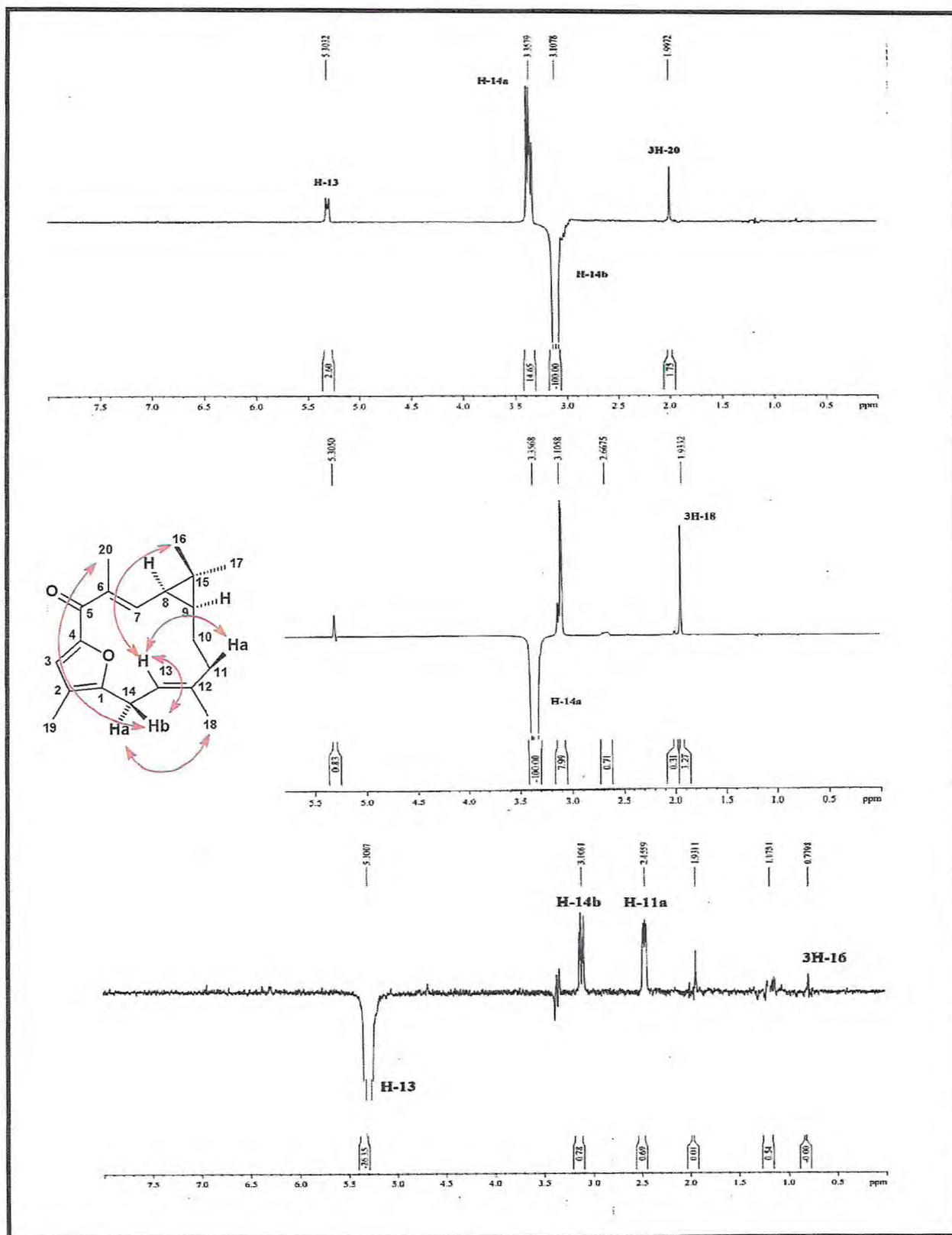


Figura 31 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-4.

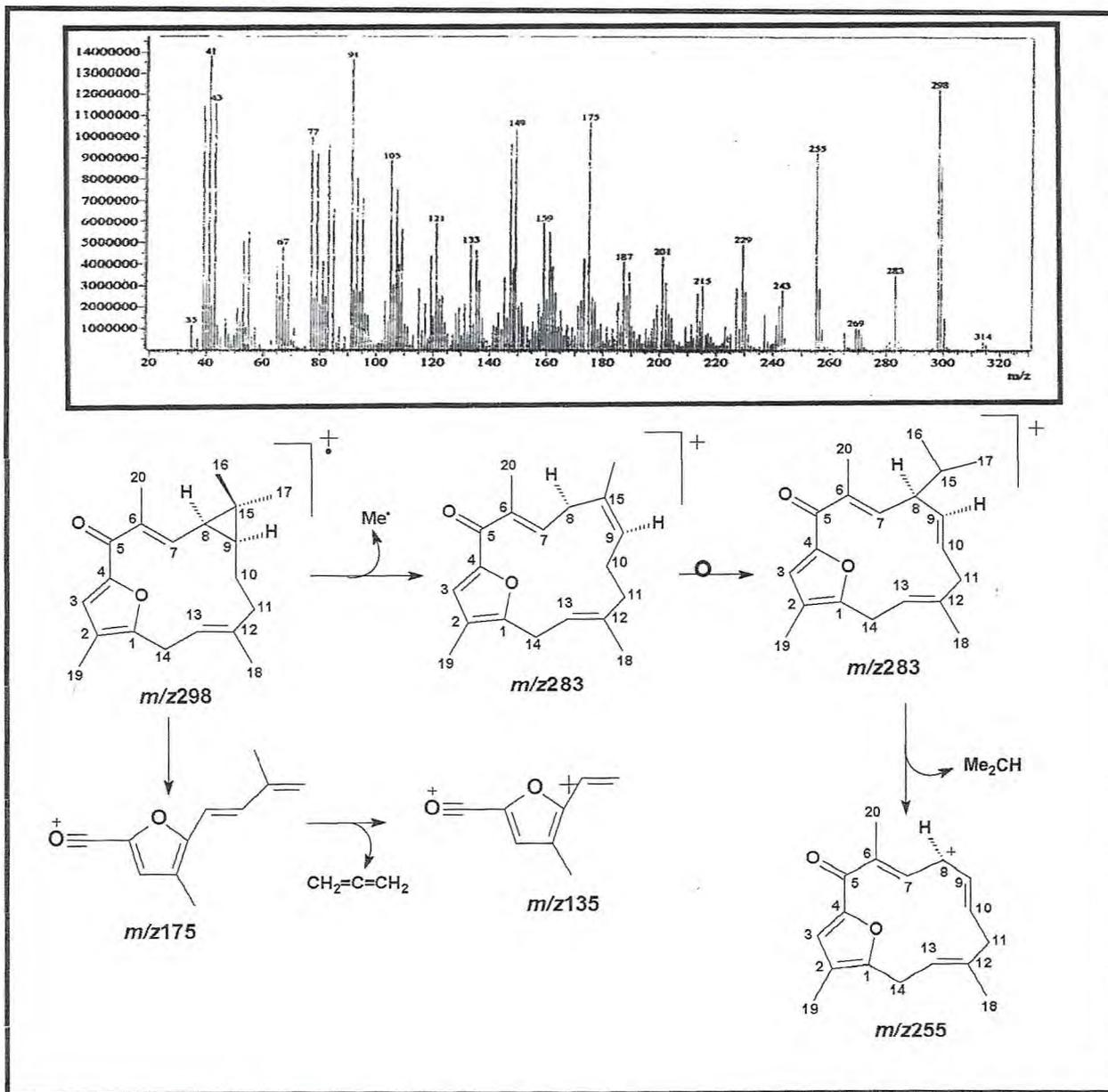


Figura 32 – Espectro de massa de CA-4 (ionização eletrônico a 70 eV).

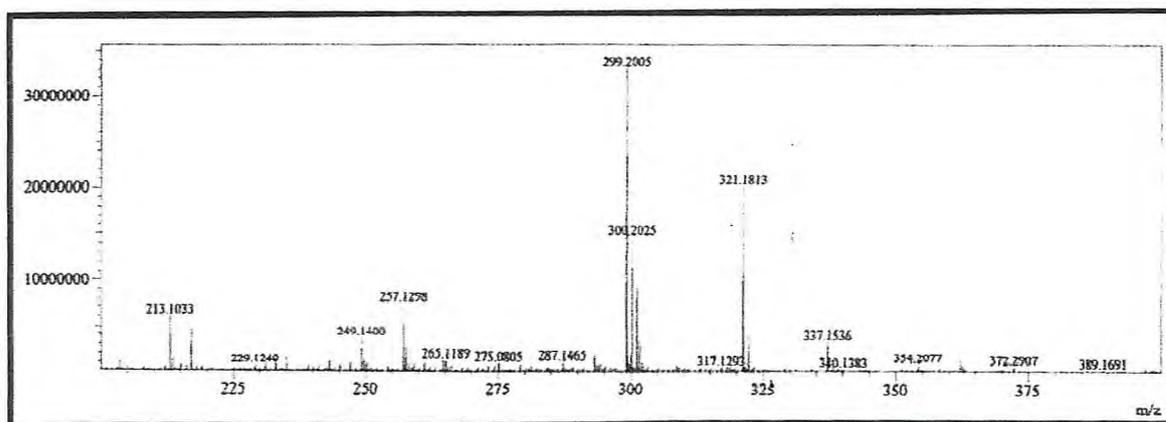


Figura 33 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-4.

#### 5.1.4 Determinação Estrutural de CA-6

Tratamento cromatográfico utilizando CLAE da fração hexano/clorofórmio, obtida a partir da cromatografia filtrante da fração hexânica, proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, foi obtido um óleo incolor, com  $[\alpha]_D^{25} = -76.0$  ( $c$  0.26,  $\text{CHCl}_3$ ) e denominado de CA-6.

O espectro de infravermelho (Fig. 34, pág. 94) de CA-6 apresentou deformações axiais de ligação C=C em 1622 e 1649  $\text{cm}^{-1}$ , bem como deformação angular fora do plano de ligação do tipo =CH<sub>2</sub> em 756  $\text{cm}^{-1}$ . Foi observada também uma banda centrada em 1708  $\text{cm}^{-1}$  característica de deformação axial de ligação C=O conjugada, além de bandas em 2928 e 2859  $\text{cm}^{-1}$  referentes à formação axial de ligações C-H de grupamentos alifáticos.

De forma análoga aos compostos CA-2, CA-4 e C-1, o espectro de RMN <sup>13</sup>C-CPD (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Fig. 36, pág. 95) de CA-6 apresentou vinte linhas espectrais. De acordo com a teoria de deslocamento químico, observou-se que os sinais de carbonos em  $\delta$  137,35 (C-2), 136,88 (C-6), 136,12 (C-12), 143,32 (C-7), 124,41 (C-13) e 119,44 (C-3) foram compatíveis com carbonos olefinicos, justificando a presença de três duplas ligações trissubstituídas. A absorção em  $\delta$  200,07 (C-5) indicou a presença de uma carbonila de cetona conjugada, enquanto as absorções na faixa de  $\delta$  39,61 – 15,32 foram associados a carbonos sp<sup>3</sup> com diversos padrões de hidrogenação.

Análise comparativa do espectro de RMN <sup>13</sup>C com o espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Fig. 37, pág. 96) de CA-6, permitiu identificar cinco carbonos metínicos, cinco carbonos metilênicos, cinco carbonos metílicos, e em comparação com o espectro de RMN <sup>13</sup>C-CPD pode-se observa a ausência de quatro absorções que foram atribuídas a carbonos não-hidrogenados. (Tab. 29).

**Tabela 29** – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de CA-6 por padrão de hidrogenação.

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$	Total
28,99	39,92	1143,32 (C=C)	200,07 (C=O)	
15,85	39,61	124,41 (C=C)	137,35 (C=C)	
15,63	39,04	119,44 (C=C)	136,88 (C=C)	
15,32	26,19	35,25	136,12 (C=C)	
11,66	23,93	27,68	26,50	
$\text{C}_5\text{H}_{15}$	$\text{C}_5\text{H}_{10}$	$\text{C}_5\text{H}_5$	$\text{C}_5\text{O}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$

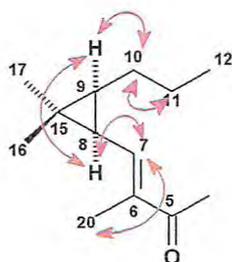
De acordo com os dados apresentados, pôde-se sugerir para CA-6 a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ , em acordo com o espectro de massas de alta resolução HRESIMS (Fig. 38, pág. 96) que forneceu a massa do aduto de potásio  $[\text{M}+\text{K}]$  325,2000 Da. O cálculo do IDH forneceu 6 lacunas de insaturação, dos quais quatro insaturações foram relacionadas a três duplas ligações, e uma carbonila de cetona, as outras duas insaturações restantes foram relacionadas a um esqueleto diterpênico casbânico.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 35, pág. 94) de CA-6, mostrou semelhança com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CA-2, diferenciada apenas pela ausência dos sinais em  $\delta$  5,39 (H-4) e 4,01 (H-1) referentes a hidrogênios de carbonos oximetínicos, e pela presença de sinais adicionais em  $\delta$  3,55 (Ha-4), 2,99 (Hb-4), 2,12 (Ha-1) e 2,03 (Hb-1), característicos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos. Também foram observados sinais típicos de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,38 (d;  $J = 10$ ; H-7), 5,08 (m; H-3) e 4,85 (m, H-13) todos com integração para um hidrogênio, corroborando a presença de três insaturações olefínicas trissubstituídas, como previstas no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Em adição os cinco sinpletos em  $\delta$  1,82 (3H-20), 1,58 (3H-19), 1,57 (3H-18), 1,17 (3H-17) e 1,10 (3H-16) foram atribuídos a grupos metilas.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio HSQC (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 40, pág.98 )

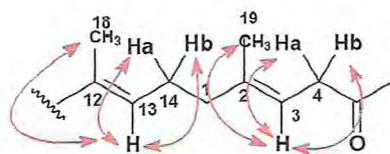
permitiu associar corretamente os sinais dos hidrogênios de forma inequívoca com seus respectivos carbonos (Tabela 30, pág. 92).

O espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (500 x 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 39, pág. 97) mostrou a correlação homonuclear do hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,38 (H-7) com o hidrogênio metínico em  $\delta$  1,51 (H-8), além de correlação do tipo alílica com os hidrogênios da metila em  $\delta$  1,82 (H-20). Por outro lado, o hidrogênio em  $\delta$  1,14 (H-9) apresentou correlação com os hidrogênios em  $\delta$  1,51 (H-8),  $\delta$  2,09 (H-10a) e 0,91 (H-10b). Foi possível ainda observar a presença de carbonos metilênicos vicinais pelas correlações entre os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  2,09 (H-10a) com o hidrogênio em  $\delta$  0,91 (H-10b), do hidrogênio em  $\delta$  2,22 (H-11a) com o sinal  $\delta$  1,78 (H-11b), bem como a correlação do hidrogênio em  $\delta$  2,09 (H-10a) com os hidrogênios em  $\delta$  2,22 (H-11a) e 0,91 (H-11b) (Frag. 5.15).



**Fragmento 5.15**

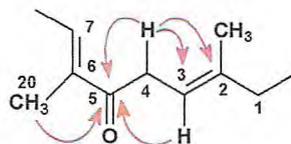
O espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ainda revelou a correlação do hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,08 (H-3) com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,55 (H-4a) e 2,99 (H-4b), e correlação alílica com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,58 (3H-19). Além disso foram observadas a correlação do hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,85 (H-13) com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,18 (H-14a) e 2,02 (H-14b), e correlação alílica com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,57 (H-18) (Frag. 5.16).



**Fragmento 5.16**

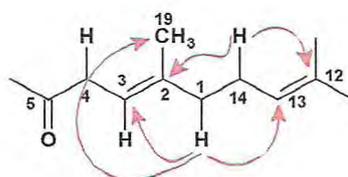
O espectro de  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 41, pág. 99) mostrou as correlações dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,55 (H-4a) e 2,99 (H-4b) com os carbonos em  $\delta$  200,07 (C-5), 119,44 (C-3) e 137,35 (C-2). Em adição, foram visualizados as correlações

dos hidrogênios em  $\delta$  6,38 (H-3) e 1,82 (3H-20) com o carbono em  $\delta$  200,07 (C-5), permitindo, dessa forma, confirmar a presença de um carbono metilênico  $\alpha$ -carbonílico (Frag. 5.17).



**Fragmento 5.17**

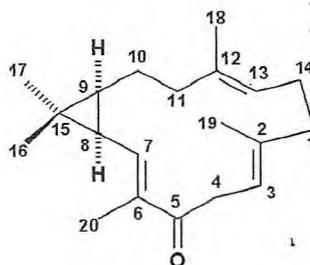
Este espectro revelou ainda as correlações dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,12 (H-1a) e 2,03 (H-1b) com os carbonos em  $\delta$  119,44 (C-3), 124,41 (C-13) e  $\delta$  15,63 (C-19), assim como a correlação dos hidrogênios metilênicos  $\delta$  2,18 (H-14a) e 2,02 (H-14b) com os carbonos em  $\delta$  137,35 (C-2) e 136,12 (C-12), o que determinou a posição relativa das duplas ligações em C-2 e C-12 (Frag.5.18).



**Fragmento 5.18**

As análises dos dados descritos sugeriram para CA-6 uma estrutura diterpênica de esqueleto casbano semelhante ao composto CA-2, diferenciando-os pelos carbonos C-1 e C-4, que se apresentaram hidroxilados em CA-2, e como carbonos metilênicos em CA-6 (Tab. 31, pág. 93).

Com base nestes dados CA-6 foi determinado como sendo o diterpeno *2E,6E,12E*-trien-5-ona-casbano (5.4) (Depressin), já isolado anteriormente do coral *Simularia depressa* [LI *et al*, 2010].



***2E,6E,12E*-trien-5-ona-casbano (5.4)**

**Tabela 30** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	39,04	2,12 (m; 1H) e 2,03 (m; 1H)	-	3H-19
2	137,35	-	-	2H-4; 2H-14; 3H-19
3	119,44	5,08 (m; 1H)	2H-4	2H-1; 3H-19
4	39,61	3,55 (dd; $J = 13,7$ e $8,5$ Hz; 1Ha) 2,99 (dd; $J = 13,7$ e $5,2$ Hz; 1Hb)	-	-
5	200,07	-	2H-4	1H-3; 3H-20
6	136,88	-	-	-
7	143,32	6,38 (d; $J = 10,1$ Hz; 1H)	-	3H-20
8	29,68	1,51 (m; 1H)	-	3H-16; 3H-17
9	35,25	1,14 (m; 1H)	-	3H-16; 3H-17
10	26,19	2,09 (m; 1Ha) e 0,91 (m; 1Hb)	-	-
11	39,92	2,22 (m; 1Ha) e 1,78 (m; 1Hb)	-	3H-18
12	136,12	-	3H-18	H-10b; 2H-14
13	124,41	4,85 (m; 1H)	2H-14	3H-18
14	23,93	2,18 (m; 1Ha) e 2,02 (m; 1Hb)	-	-
15	26,50	-	3H-16; 3H-17	-
16	15,85	1,10 (s; 3H)	-	3H-17
17	28,99	1,17 (s; 3H)	-	3H-16
18	15,32	1,57 (s; 3H)	-	2H-11
19	15,63	1,58 (s; 3H)	-	2H-1; 1H-3
20	11,66	1,82 (s; 3H)	-	H-7

**Tabela 31** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-6 com o composto Depressin [LI *et al.*, 2010],  $\delta$  (ppm).

#C	CA-6 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	[LI <i>et al.</i> , 2010] (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	39,0	39,0
2	137,3	137,1
3	119,4	119,4
4	39,6	39,4
5	200,0	199,9
6	136,8	136,6
7	143,3	143,1
8	29,6	27,6
9	35,2	35,2
10	26,1	26,3
11	39,9	39,9
12	136,1	135,9
13	124,4	124,4
14	23,9	23,9
15	26,5	25,4
16	15,8	15,8
17	28,9	29,0
18	15,3	15,3
19	15,6	15,6
20	11,6	11,6

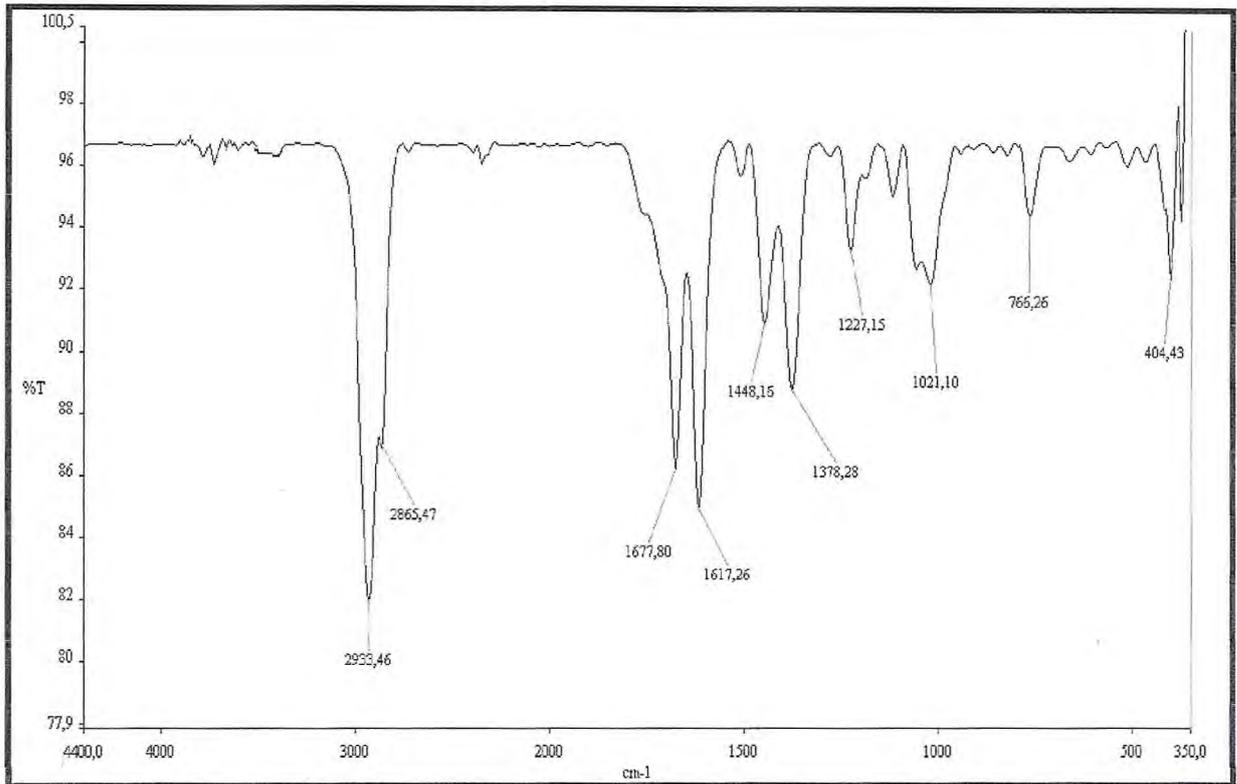


Figura 34 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-6 com pastilhas de KBr.

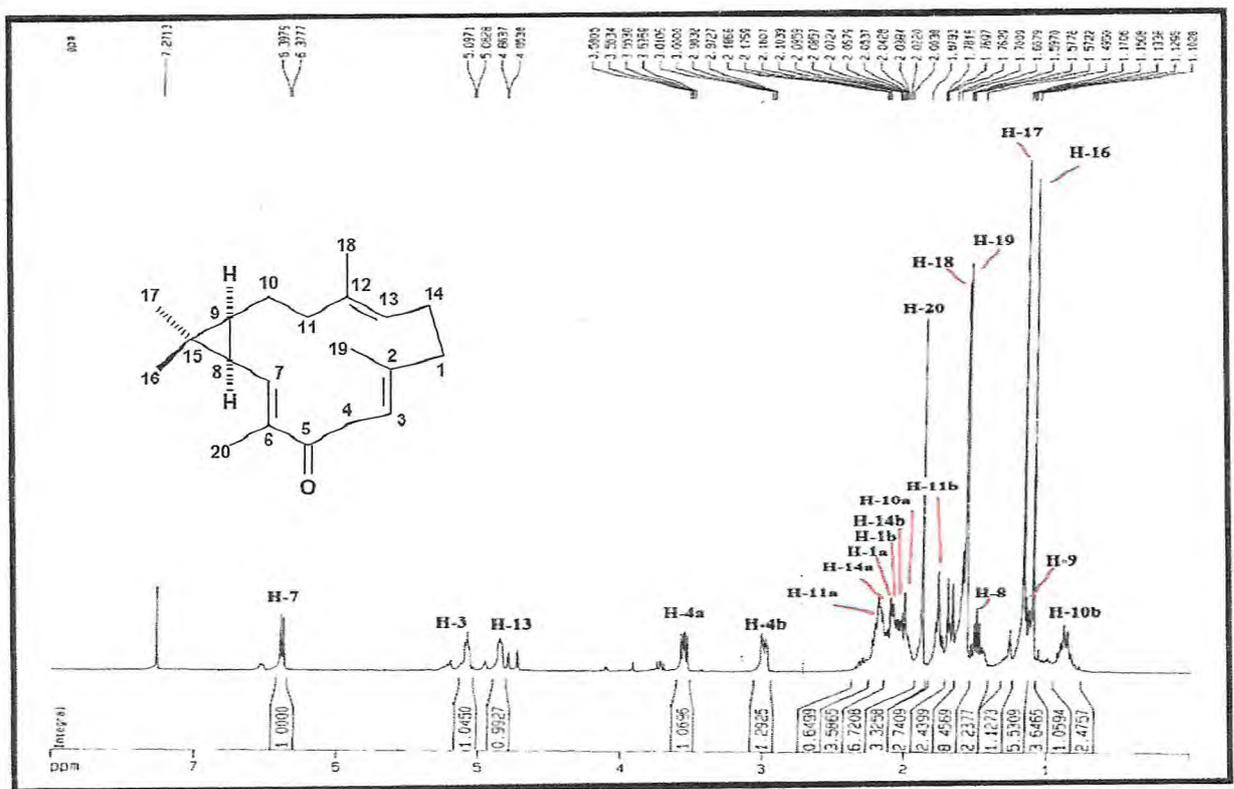


Figura 35 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-6.

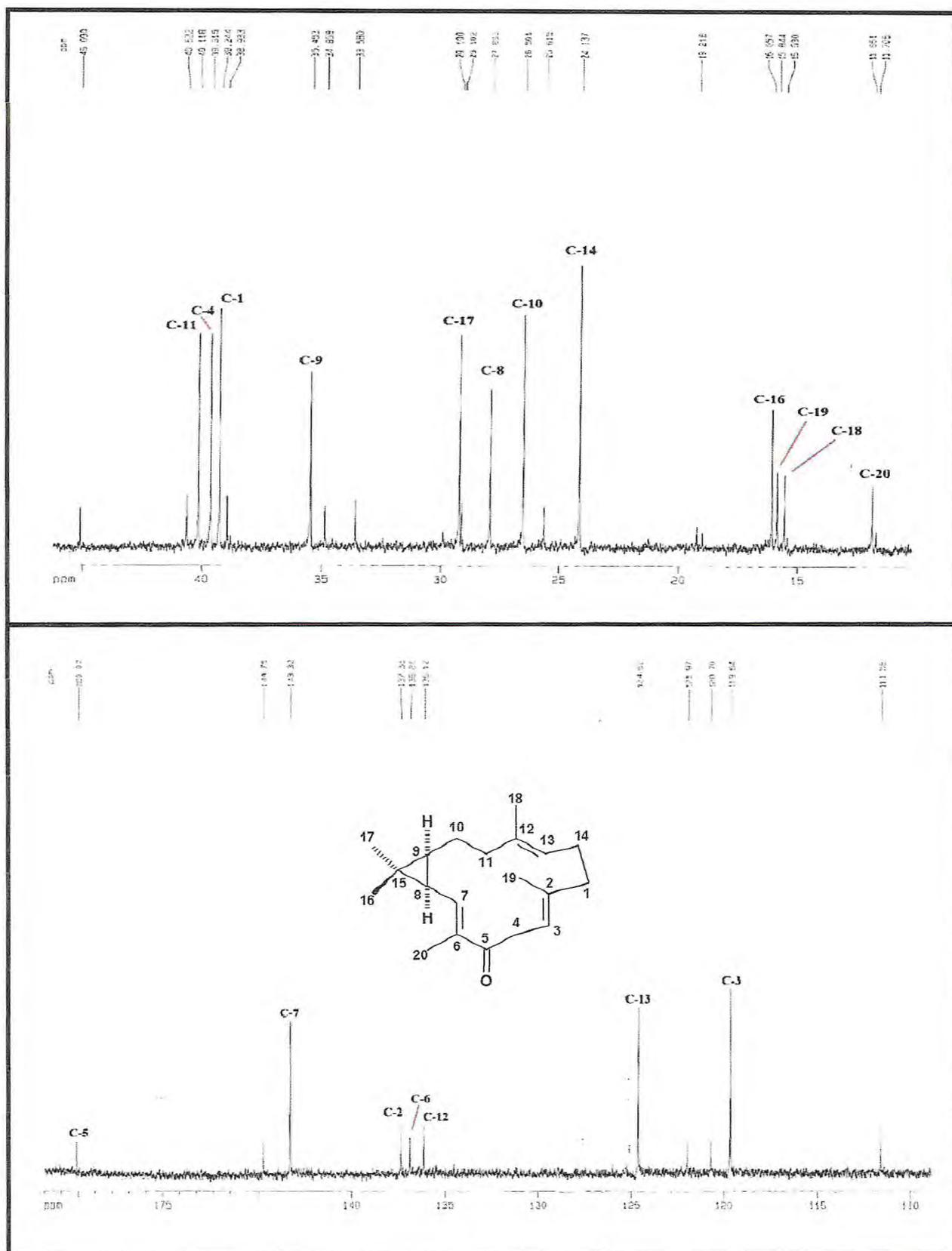


Figura 36 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-6.

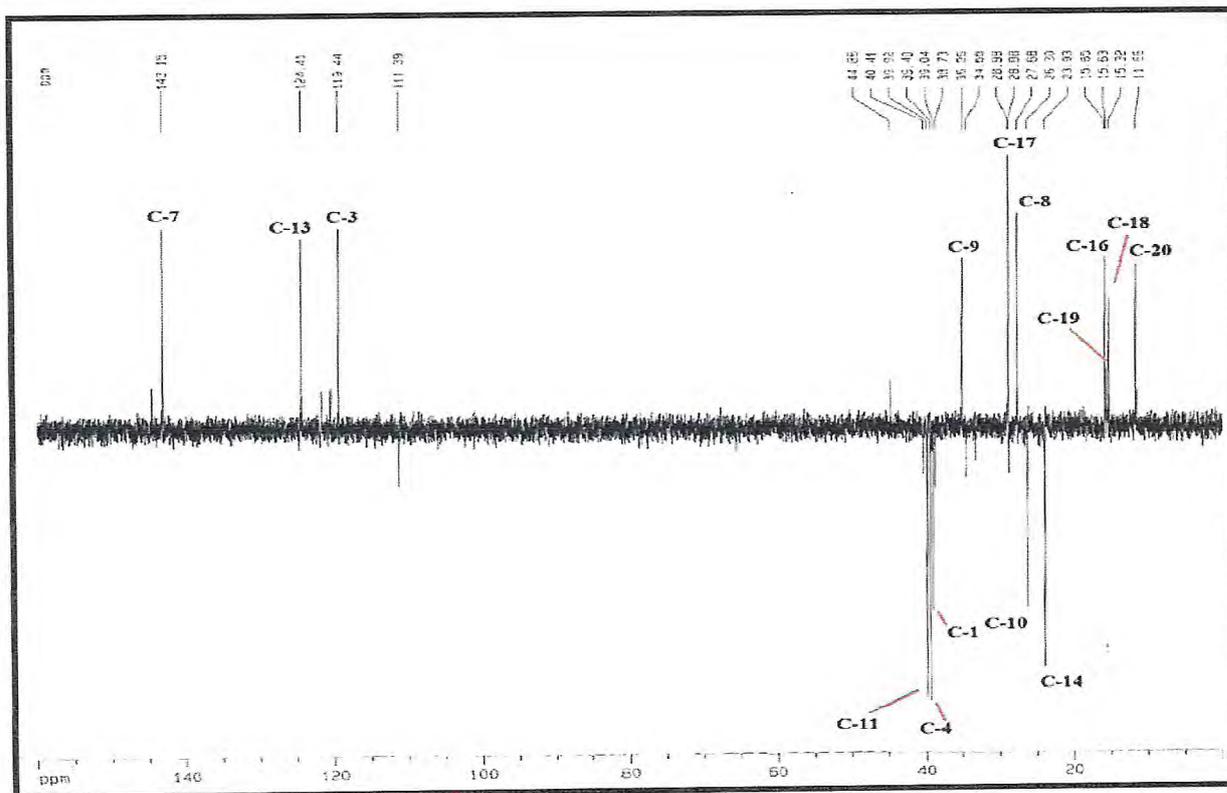


Figura 37 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-6.

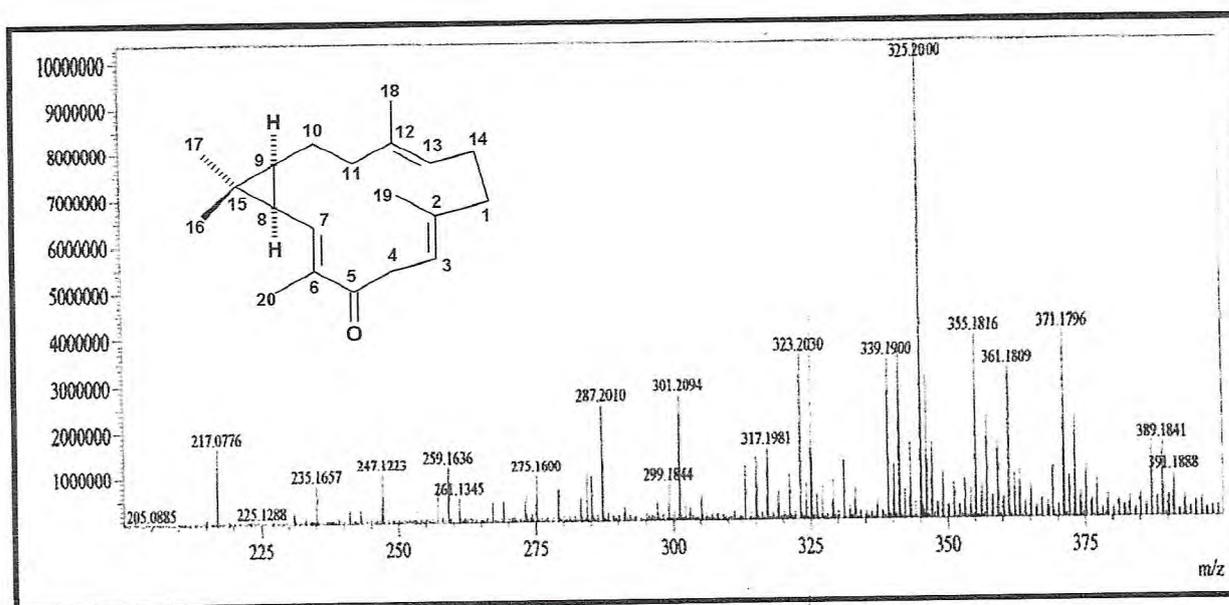


Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-6.

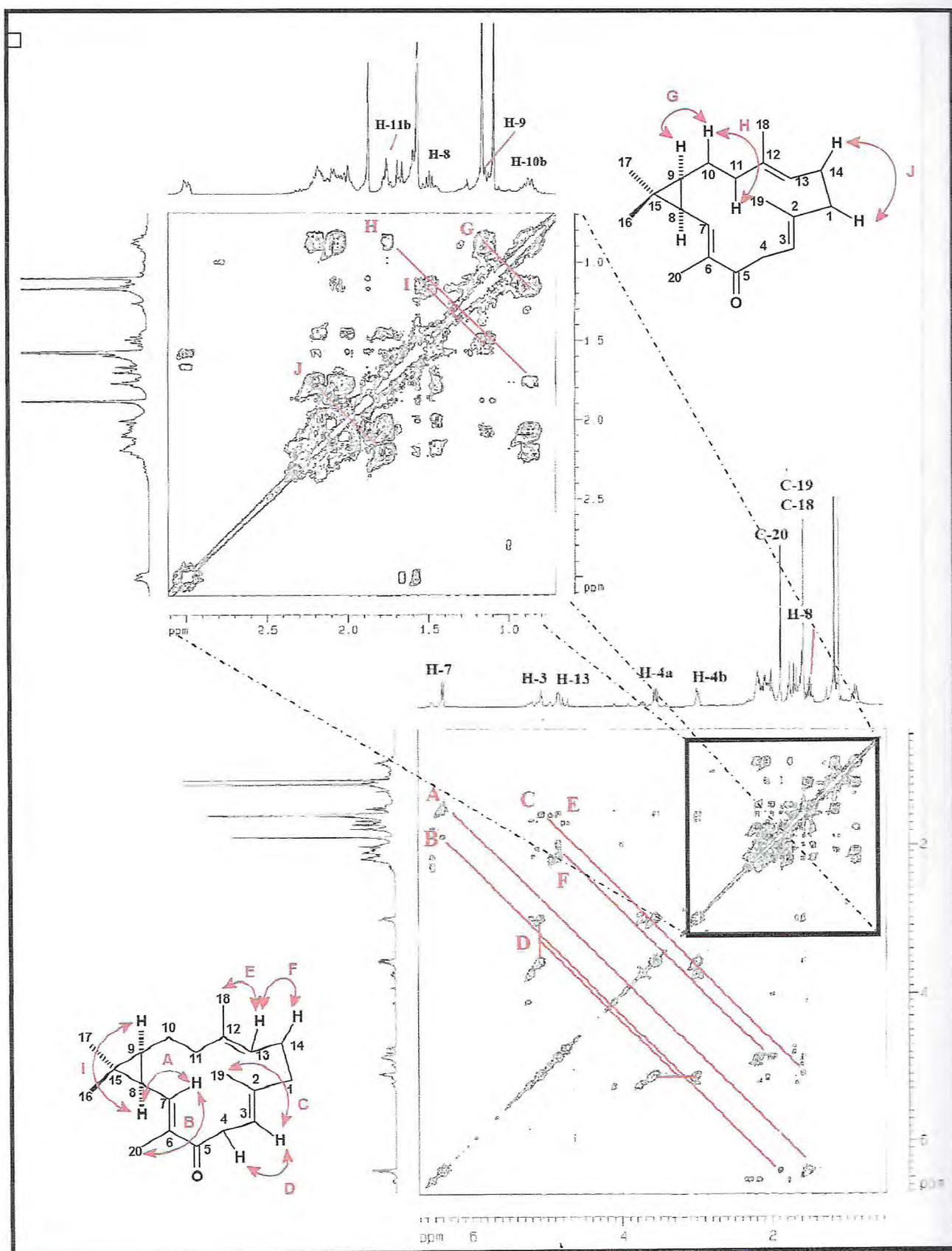


Figura 39 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-6.

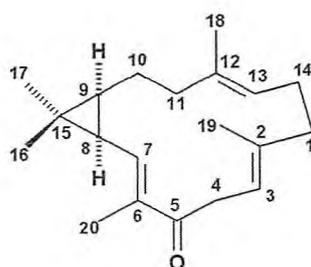
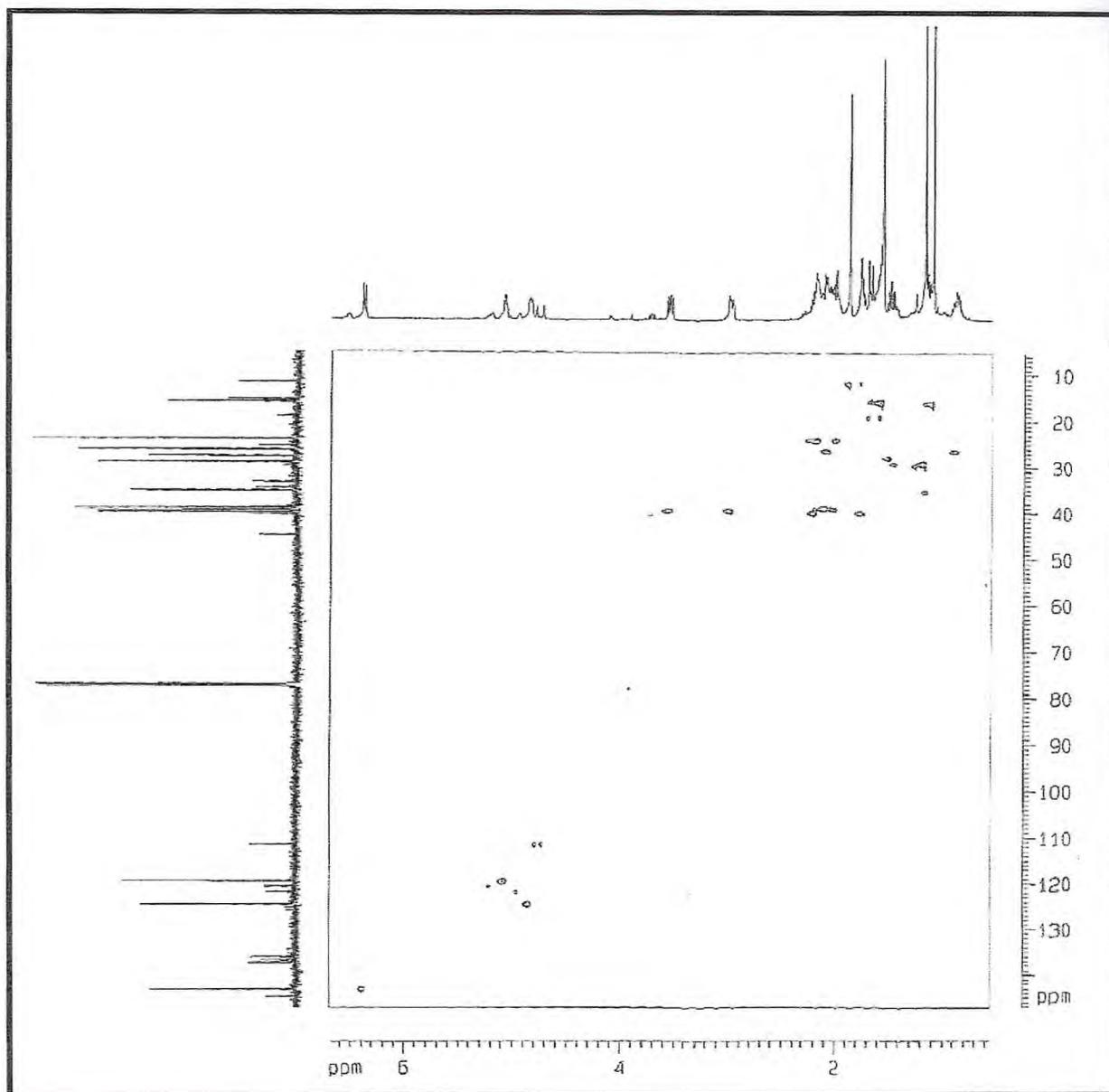


Figura 40 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-6.

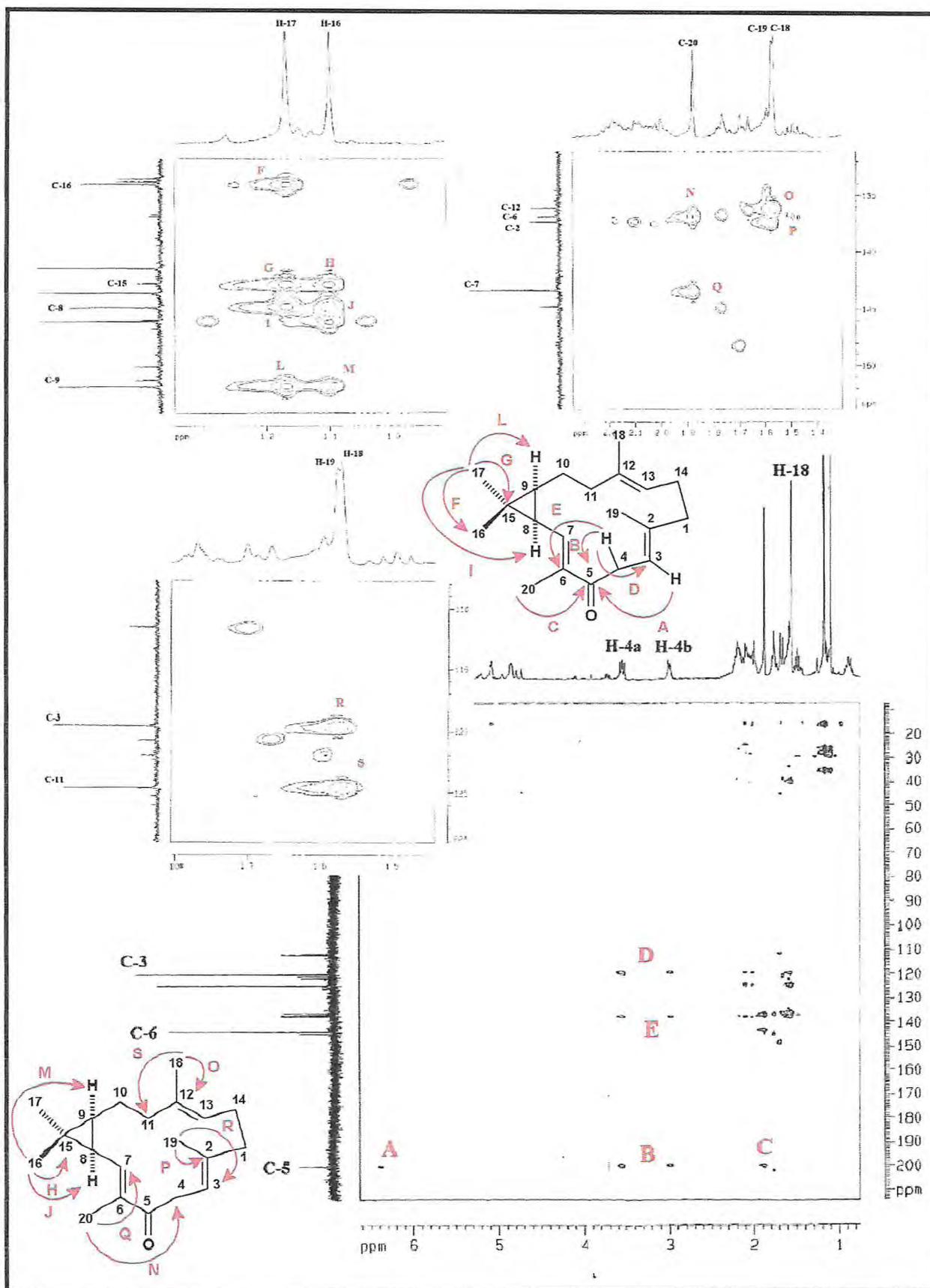


Figura 41 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-6.

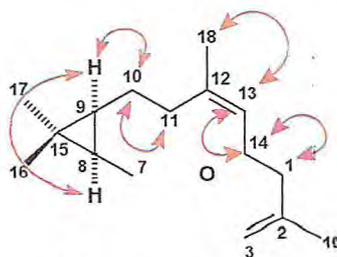
### 5.1.5 Determinação Estrutural de CA-7

Cromatografia utilizando CLAE da fração hexano/clorofórmio, obtida a partir da cromatografia filtrante da fração hexânica, proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, foi isolado um óleo incolor com  $[\alpha]_D^{25} = + 13,5^\circ$  ( $c$  0,150,  $\text{CHCl}_3$ ) e denominado de CA-7.

A notória similaridade observada entre os espectros de IV (Fig. 42, pág. 104) de CA-7 e CA-2 sinalizou uma estreita semelhança estrutural entre os dois compostos, confirmada pela identificação dos mesmos grupos funcionais, através da deformação axial de ligação O-H em  $3377\text{ cm}^{-1}$ , estiramento axial de ligação C=O carbonílico ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) conjugado em  $1677\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de ligação C=C em  $1620\text{ cm}^{-1}$ , e estiramento de ligação C-O em  $1020\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CA-7 demonstrou uma visível semelhança com os dados obtidos para CA-2, exceto pela ausência do hidrogênio oximetínico em  $\delta$  4,10 (H-1), e pela mudança da multiplicidade do hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,23 (d;  $J = 9,3$ ; H-3). Este espectro apresentou sinais de hidrogênios de carbonos olefínicos em  $\delta$  5,42 (d;  $J = 7,7\text{ Hz}$ ; H-7), 5,95 (s; H-3) e 4,92 (t;  $J = 6,8\text{ Hz}$ ; H-13). O sinpleto em  $\delta$  4,50 (s; H-5) foi atribuído a um hidrogênio de um carbono oximetínico, enquanto que os outros sinais simples em  $\delta$  2,20 (3H-19), 1,58 (3H-20), 1,54 (3H-18), 1,08 (3H-17) e 1,07 (H-16) foram associados a cinco metilas.

O espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (Fig. 46, pág. 106) mostrou as correlações dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,22 (H-14a) e 2,04 (H-14b) com o hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,92 (H-13) e com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,32 (H-1a) e 2,04 (H-1b). Foram ainda observadas as correlações do hidrogênio em  $\delta$  1,29 (H-8) com os hidrogênios em  $\delta$  5,42 (H-7) e 0,74 (H-9), e dos hidrogênios em  $\delta$  1,84 e 0,81 (2H-10) com os hidrogênios em  $\delta$  0,74 (H-9), 2,20 e 1,82 (2H-11) (Frag. 19).



Fragmento 5.19

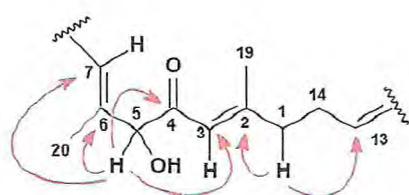
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 44, pág. 105) de CA-7 também exibiu 20 linhas espectrais, sendo seis delas associados a carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  161,69 (C-2),

137,68 (C-12), 135,13 (C-6), 129,86 (C-7), 122,53 (C-13) e 120,87 (C-3). Em adição foi ainda observado um carbono oxigenado em  $\delta$  83,99 e uma carbonila de cetona conjugada em  $\delta$  199,36, enquanto que as 12 linhas espectrais restantes em  $\delta$  15,72-42,10 foram associadas a carbonos alifáticos.

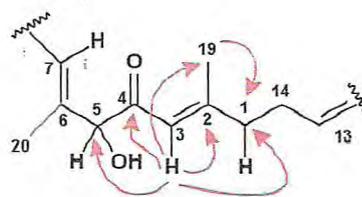
A posterior comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 45, pág. 105) revelou a presença de quatro carbonos metilênicos ( $\delta$  42,10, 40,82, 25,04 e 24,13), um carbono a mais que o composto CA-2, além de seis carbonos metínicos ( $\delta$  129,86, 122,53, 120,87, 83,99, 32,23 e 25,66), cinco carbonos metílicos ( $\delta$  28,78, 19,98, 15,95, 15,72 e 11,47), e por exclusão cinco carbonos não-hidrogenados ( $\delta$  199,36, 161,69, 137,68, 135,13 e 20,37).

A fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$  para CA-7 foi obtida a partir do espectro de massas de alta resolução HRESIMS (Fig. 49, pág. 109), que forneceu a massa do aduto de sódio em  $[\text{M}+\text{Na}]$  325.21222 Da, com erro de 6,6 ppm. Este dado revelou um IDH igual a 6 e uma diferença de 16 Da em relação à massa molecular de CA-2, correspondendo à ausência de um átomo de oxigênio.

O espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 48, pág. 108) de CA-7 mostrou a correlação do hidrogênio em  $\delta$  4,50 (H-5) com os carbonos em  $\delta$  199,36 (C-4), 135,13 (C-6), 129,86 (C-7) e 120,87 (C-3). Também foi observado neste espectro a correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,95 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  199,36 (C-4), 161,69 (C-2), 83,99 (C-5), 42,10 (C-1) e 19,98 (C-19). Em adição, outras correlações importantes foram observadas para os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  2,32 (H-1a) e 2,04 (H-1b) com os carbonos em  $\delta$  161,69 (C-2) e 122,53 (C-13), bem como a correlação dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  2,20 (3H-19) com o carbono em  $\delta$  42,10 (C-1). Estes dados permitiram localizar de forma inequívoca as posições do grupamento hidroxila e da carbonila de cetona em C-5 e C-4, respectivamente, além de confirmar a posição do carbono metilênico adicional em CA-7 (Frag. 5.20 e 5.21).

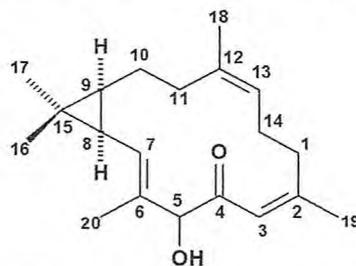


**Fragmento 5.20**



**Fragmento 5.21**

Com base nos dados analisados, pôde-se propor para CA-7 uma estrutura diterpênica a qual foi denominada como sendo o 5-hidroxi-2*Z*,6*E*,12*Z*-trien-4-ona-casbeno (5.5), de caráter inédito na literatura.



5-hidroxi-2*Z*,6*E*,12*Z*-trien-4-ona-casbeno (5.5)

Tabela 32 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125, MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	42,10	2,32 (m; 1Ha) e 2,04 (m; 1Hb)	-	1H-3; 3H-19
2	161,69	-	1H-3; 2H-1; 3H-19	-
3	120,87	5,95 (s; 1H)	-	3H-19; 1H-5
4	199,36	-	1H-5; 1H-3	-
5	83,99	4,50 (s; 1H)	-	1H-3; 3H-20
6	135,13	-	1H-5; 3H-20	1H-8
7	129,86	5,42 (d; $J = 7,7$ Hz; 1H)	-	1H-5; 3H-20
8	25,66	1,29 (m; 1H)	1H-7	3H-16; 3H-17
9	32,23	0,74 (m; 1H)	1H-8; 1H-10b	2H-11; 3H-16; 3H-17
10	25,04	1,84 (m; 1Ha) e 0,81 (m; 1Hb)	2H-11	-
11	40,82	2,20 (m; 1Ha) e 1,82 (m; 1Hb)	-	1H-13; 3H-18
12	137,68	-	2H-11; 3H-18	2H-10; 2H-14
13	122,53	4,92 (t; $J = 6,8$ Hz; 1H)	-	3H-18; 2H-1
14	24,13	2,23 (m; 1Ha) e 2,04 (m; 1Hb)	1H-11	-
15	20,37	-	3H-16; 3H-17	1H-7
16	15,95	1,07 (s; 3H)	-	3H-17
17	28,78	1,08 (s; 3H)	-	3H-16
18	15,72	1,58 (s; 3H)	-	1H-13
19	19,98	2,20 (s; 3H)	-	1H-3
20	11,47	1,54 (s; 3H)	-	1H-7; 1H-5

Tabela 33 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-7 e de CA-2, ( $\delta$  ppm).

#C	CA-7 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	CA-2 (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6$ )
1	42,10	78,07
2	161,69	144,48
3	120,87	126,15
4	199,36	68,70
5	83,99	200,04
6	135,13	135,50
7	129,86	144,36
8	25,66	28,31
9	32,23	35,72
10	25,04	25,86
11	40,82	40,53
12	137,68	137,18
13	122,53	121,01
14	24,13	32,54
15	20,37	27,32
16	15,95	16,23
17	28,78	29,31
18	15,72	15,69
19	19,98	10,72
20	11,47	12,61

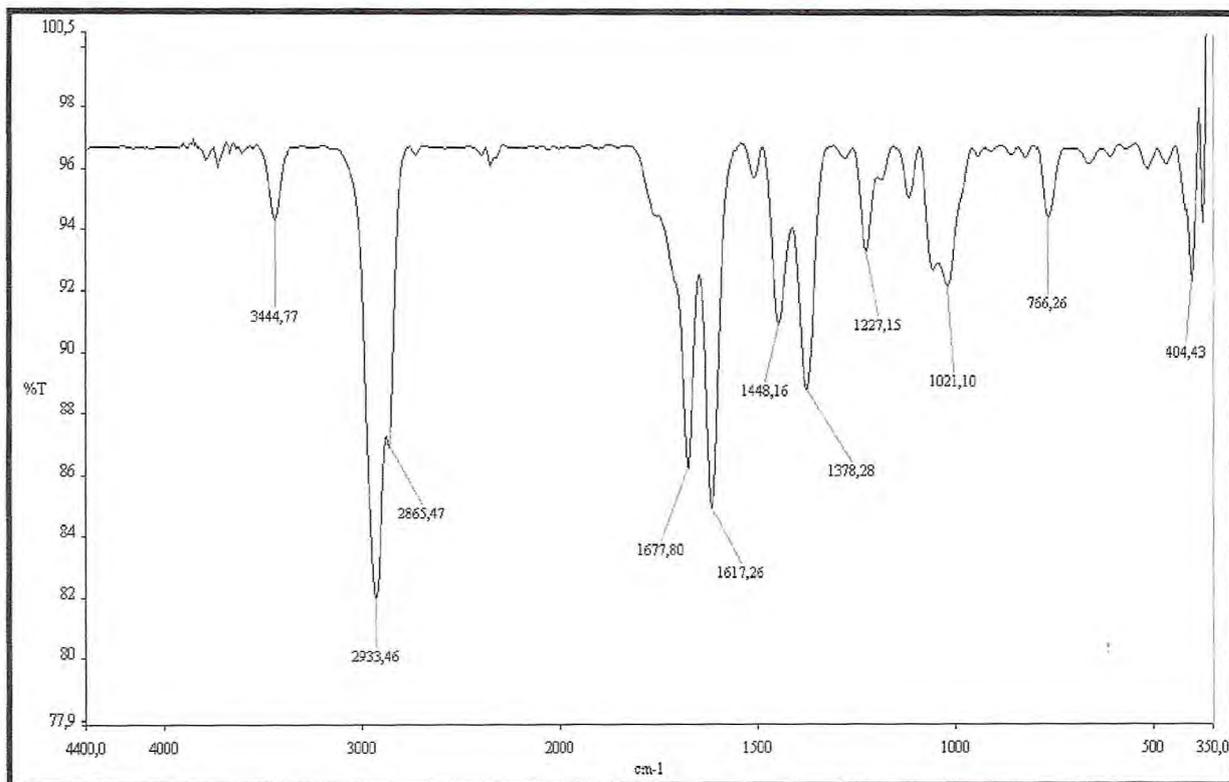


Figura 42 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-7 com pastilhas de KBr.

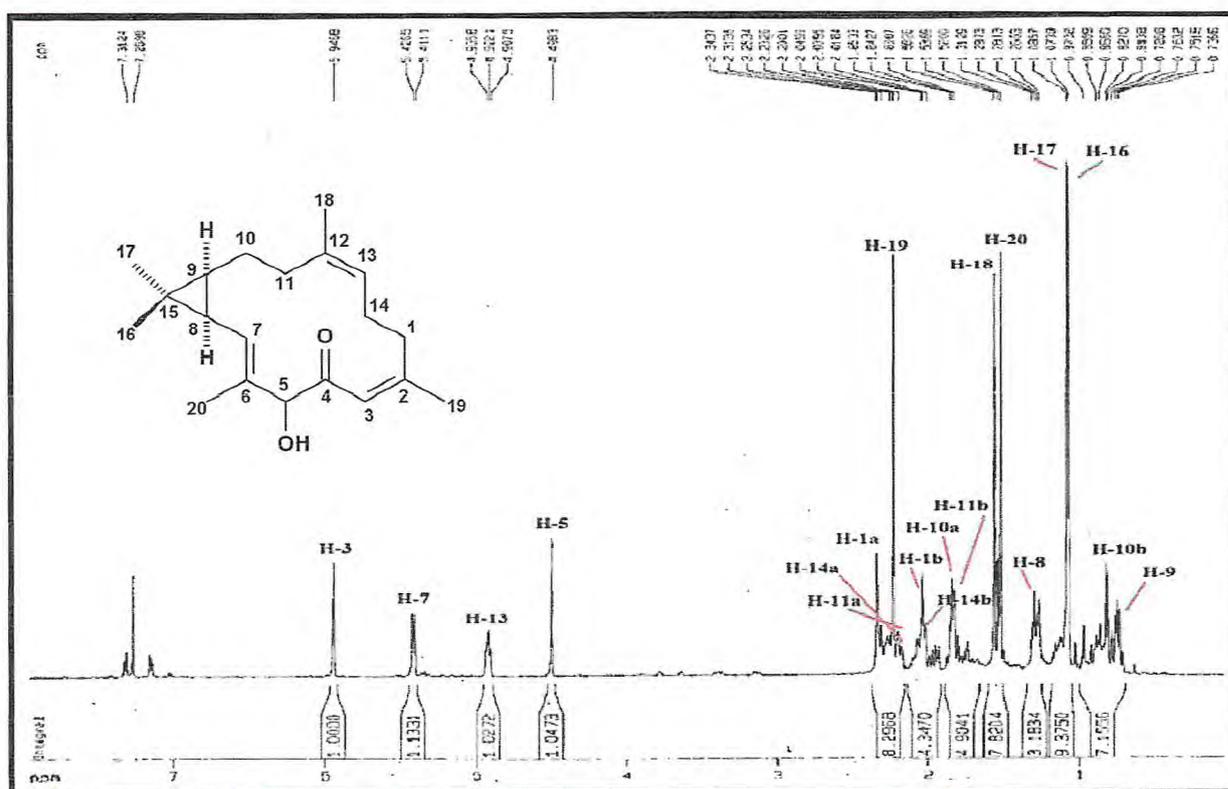


Figura 43 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7.

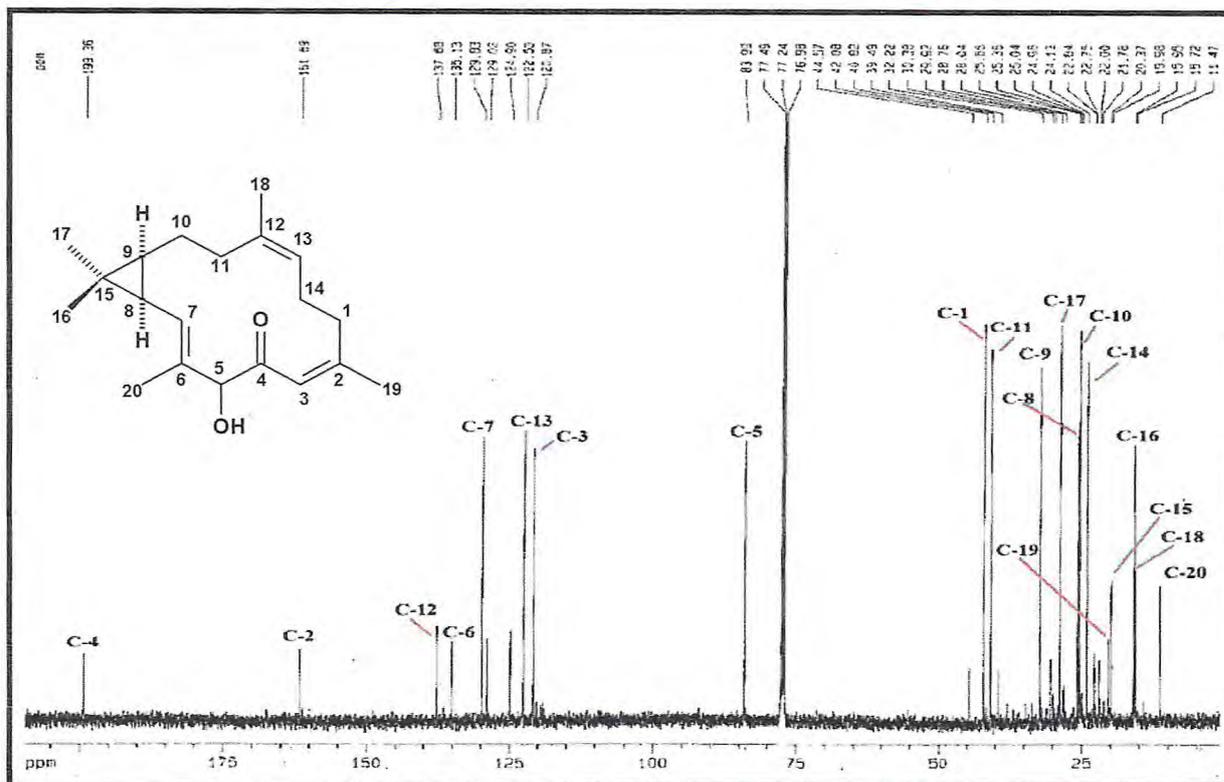


Figura 44 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7.

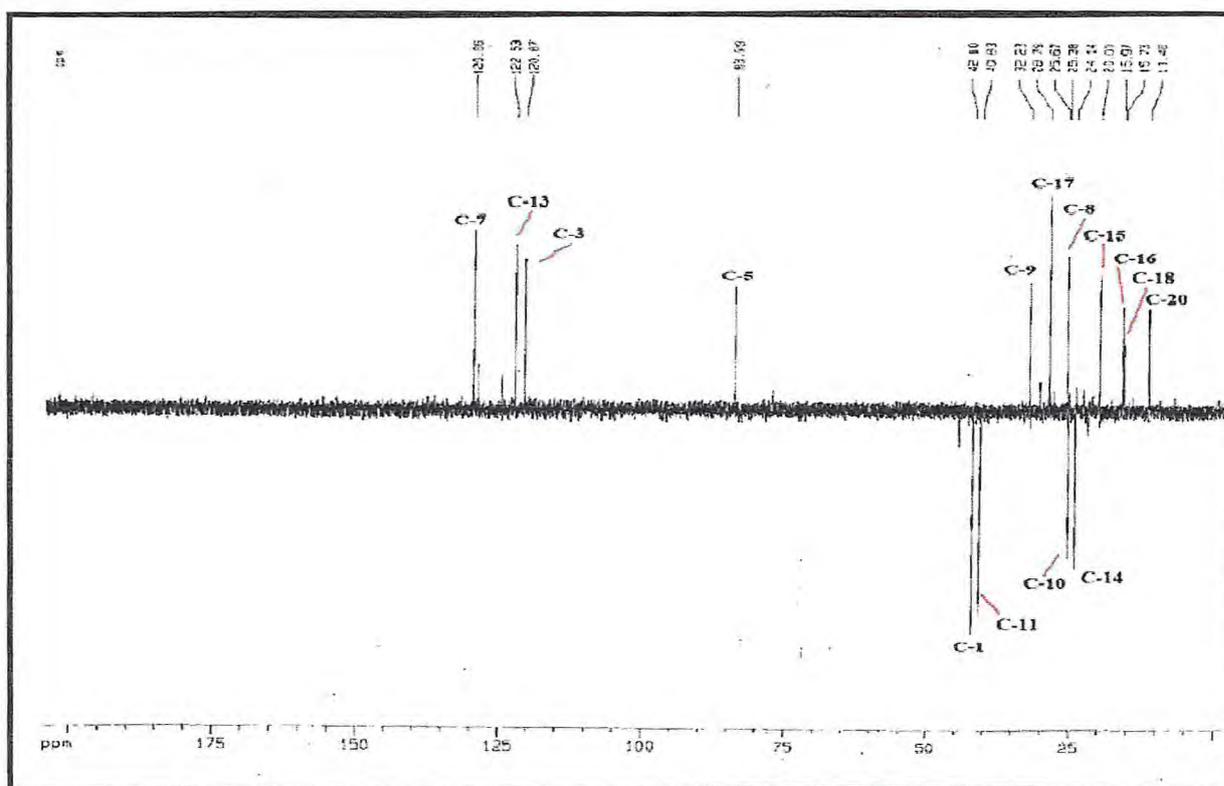


Figura 45 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-7.

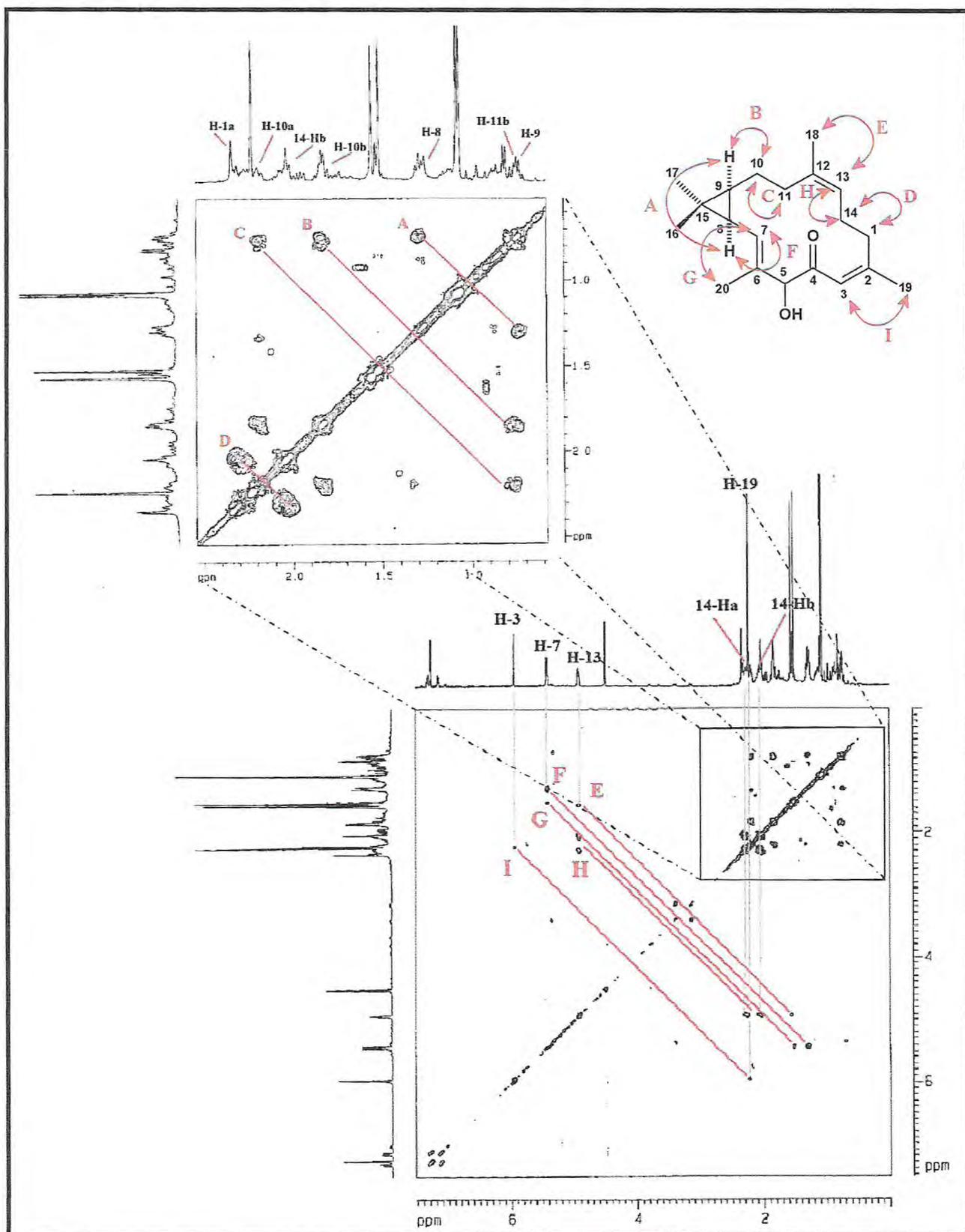


Figura 46 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-7.

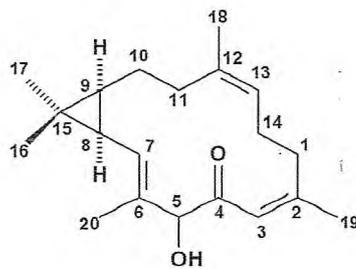
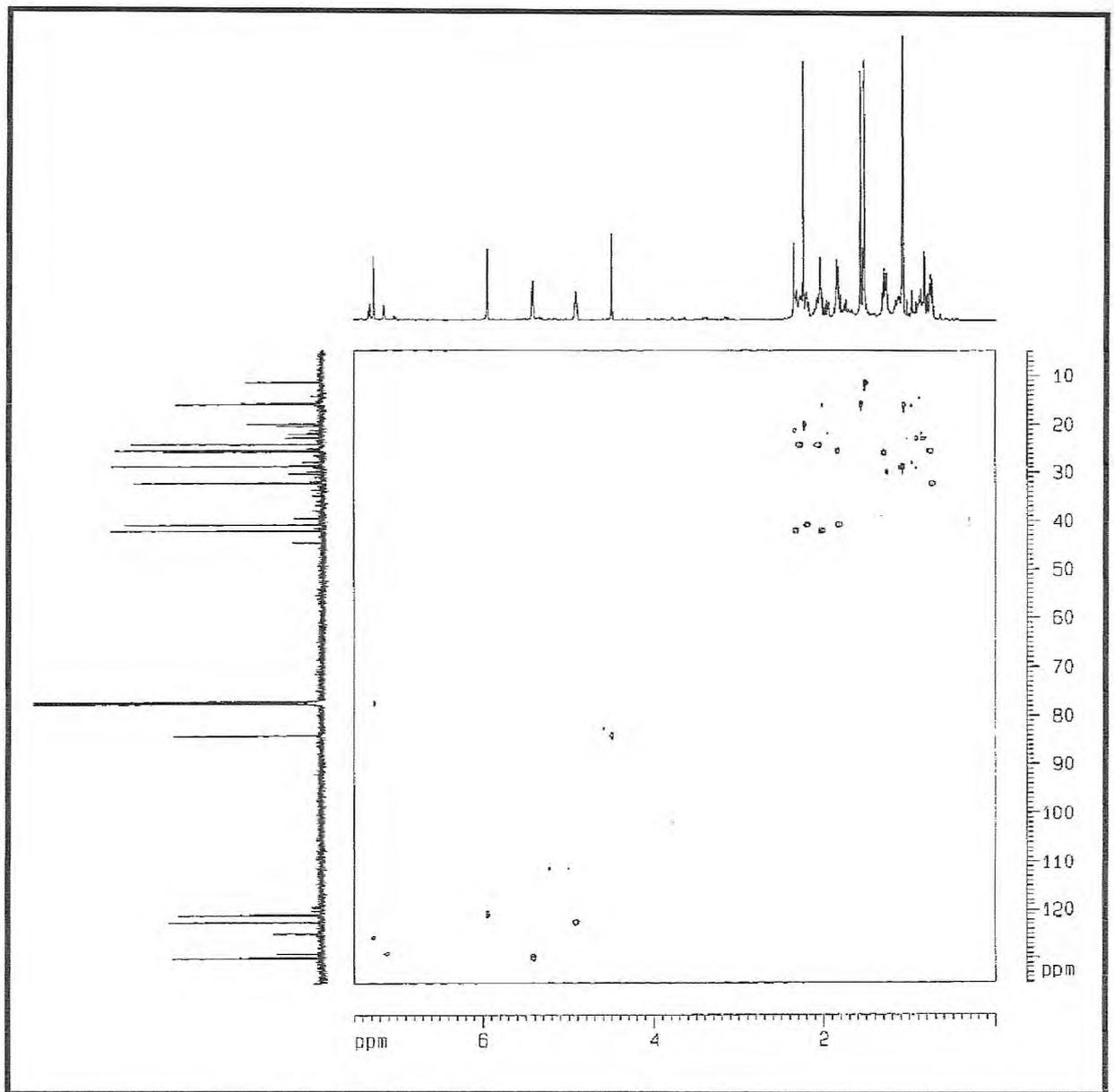


Figura 47 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-7.

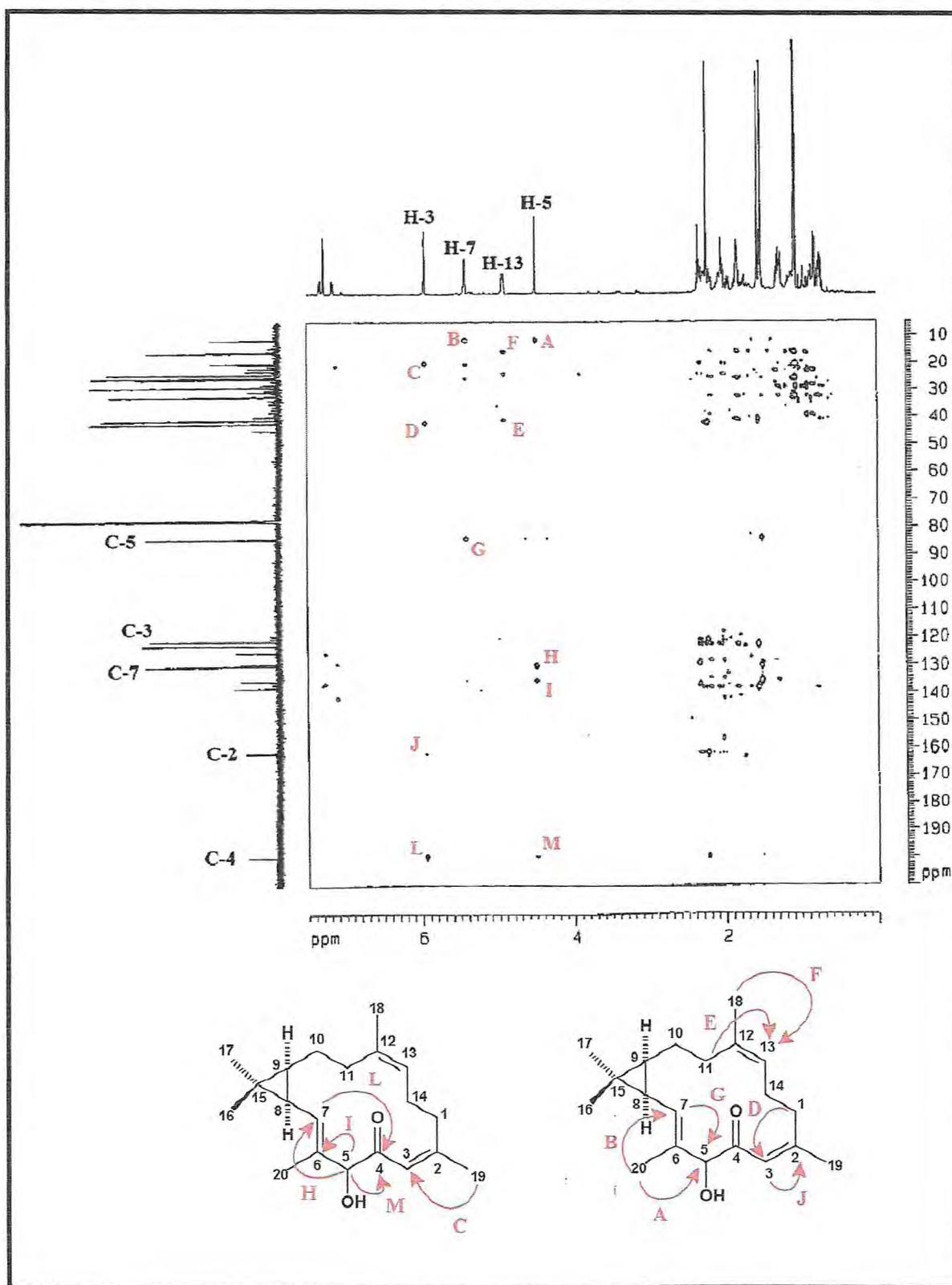


Figura 48 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-7.

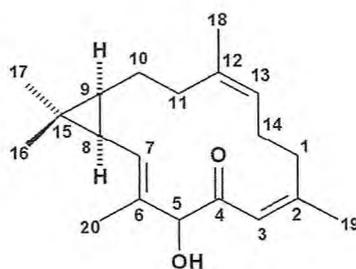
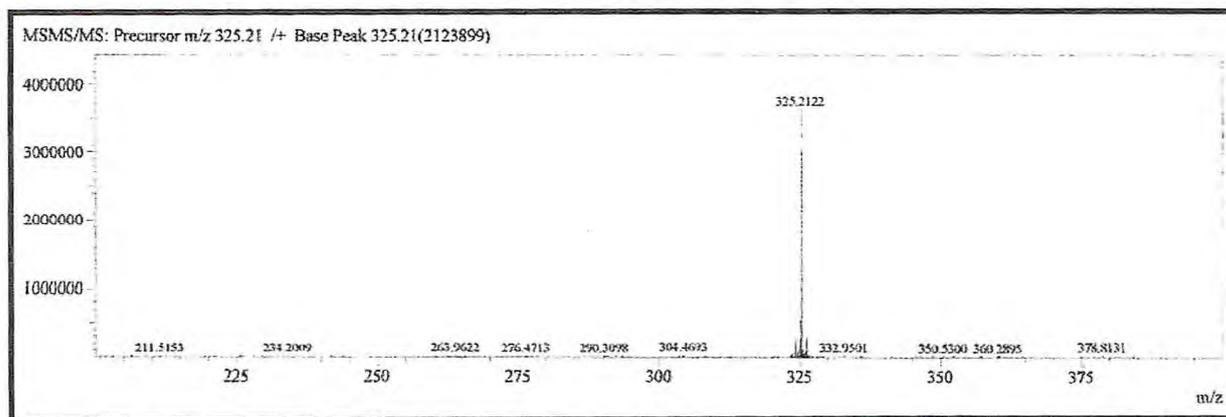


Figura 49 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-7.

### 5.1.6 Determinação Estrutural de CA-5

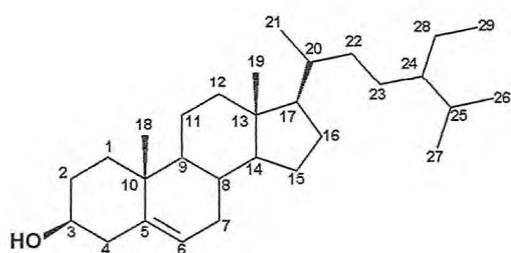
O tratamento cromatográfico da fração hexânica, obtida após partição líquido/líquido do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, resultou no isolamento de um sólido branco em forma de agulhas, com faixa de fusão 156-159 °C e denominado CA-5.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  CA-5 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 51, Pág.112) indicou sinais característicos de hidrogênios olefinicos em  $\delta$  5,35 (d,  $J = 8,4$  Hz; H-6), 5,15 (dd,  $J = 15,1$  e 8,4 Hz; H-22) e 5,01 (dd,  $J = 15,1$  e 8,4 Hz; H-23), além de hidrogênio carbinólico em  $\delta$  3,52 (m; H-3), e de sinais situados na região entre  $\delta$  0,69 e 2,29 que foram relacionados aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

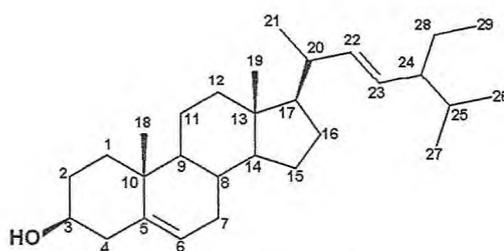
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Fig. 52, Pág. 113) apresentou vinte e nove linhas espectrais, das quais, quatro encontram-se na região de desblindagem. De acordo com o espectro DEPT 135° (Fig. 53, Pág. 113), os sinais em  $\delta$  140,9 (C-5) e 121,9 (CH-6) caracterizam uma dupla ligação trissubstituída, enquanto que os sinais em  $\delta$  138,5 (CH-22) e 129,5 (CH-23) foram associados a uma dupla ligação dissustituída. Em adição, o sinal em  $\delta$  72,0 indicou a presença de um carbono metínico carbinólico. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelou que CA-5 tratava-se de uma mistura esteroideal binária.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 50, Pág. 112) apresentou uma banda em  $3434\text{ cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H, absorções em 2943 e  $2862\text{ cm}^{-1}$  características de deformações axiais de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ , banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$  associada à deformação axial C=C de alcenos, além da banda em  $1241\text{ cm}^{-1}$  associada à deformação axial da ligação C-O.

A reunião destes dados e posterior comparação com os dados da literatura [ALMEIDA *et al*, 2005], permitiram propor que CA-5 tratava-se da mistura de esteróides  $\beta$ -sitosterol (5.5) e estigmasterol (5.6), de larga ocorrência no reino vegetal.



$\beta$ -sitosterol (5.6)



Estigmasterol (5.7)

Tabela 34 – Comparação dos dados de deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-5 com os descritos na literatura para os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol [ALMEIDA et al, 2005].

#C	CA-5*	$\beta$ -sitosterol**	CA-5*	Estigmasterol**
1	37,50	37,2	37,59	37,4
2	29,13	31,6	29,15	31,7
3	72,05	71,8	72,05	74,1
4	42,54	42,3	42,56	38,3
5	140,94	140,7	140,99	139,8
6	121,95	121,7	121,97	122,8
7	31,97	31,9	31,96	32,0
8	32,18	31,9	32,16	32,0
9	50,42	50,1	50,47	50,3
10	36,75	36,5	36,72	36,7
11	21,34	21,1	21,32	21,1
12	39,96	39,8	39,91	39,8
13	42,57	42,3	42,51	42,3
14	57,14	56,7	57,16	56,9
15	24,63	24,3	24,67	24,5
16	29,18	28,2	29,18	28,9
17	56,27	56,0	56,29	56,1
18	12,07	11,8	12,33	12,1
19	19,60	19,4	19,65	19,3
20	36,76	36,1	40,78	40,6
21	19,36	19,0	19,39	21,1
22	32,13	33,9	138,59	138,5
23	25,62	26,1	129,56	129,5
24	46,16	45,8	51,57	51,4
25	29,18	29,1	29,16	32,0
26	19,29	18,7	19,27	19,0
27	21,35	19,8	21,44	21,1
28	23,31	22,0	25,62	25,5
29	12,22	11,9	12,42	12,2

\*75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , \*\*25 MHz,  $\text{CDCl}_3$

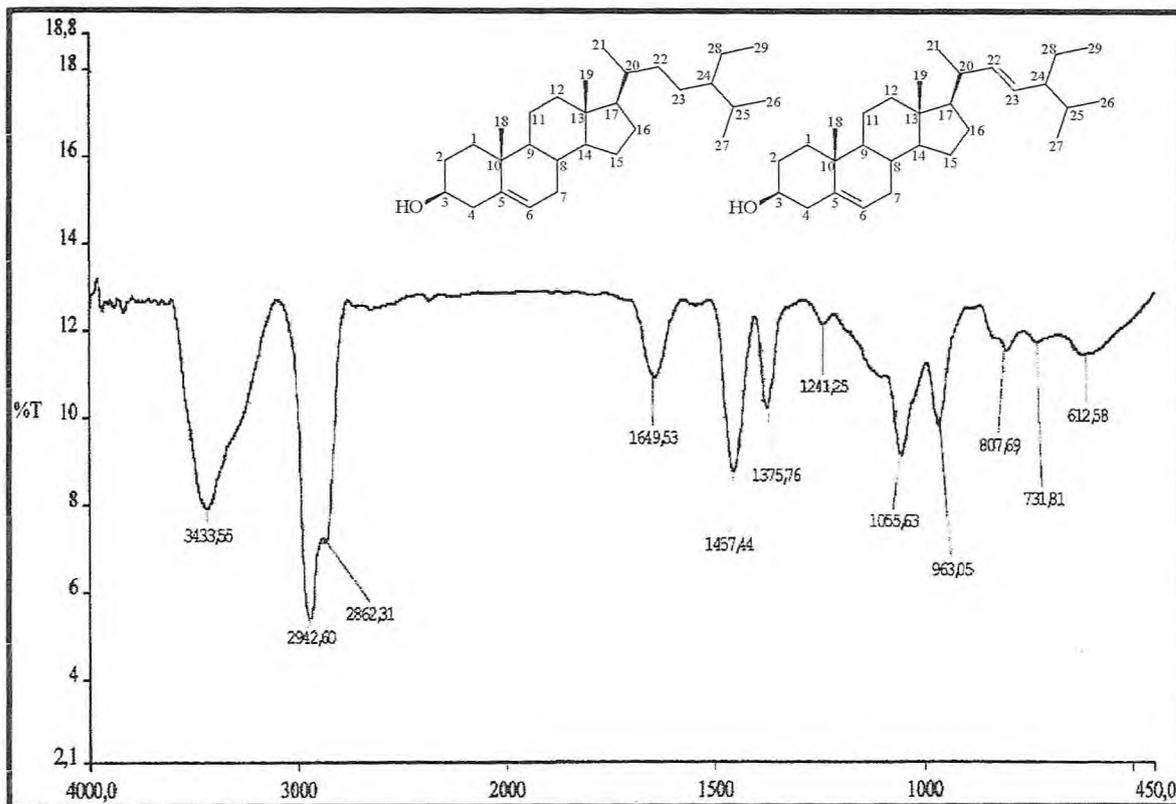


Figura 50 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-5 com pastilhas de KBr.

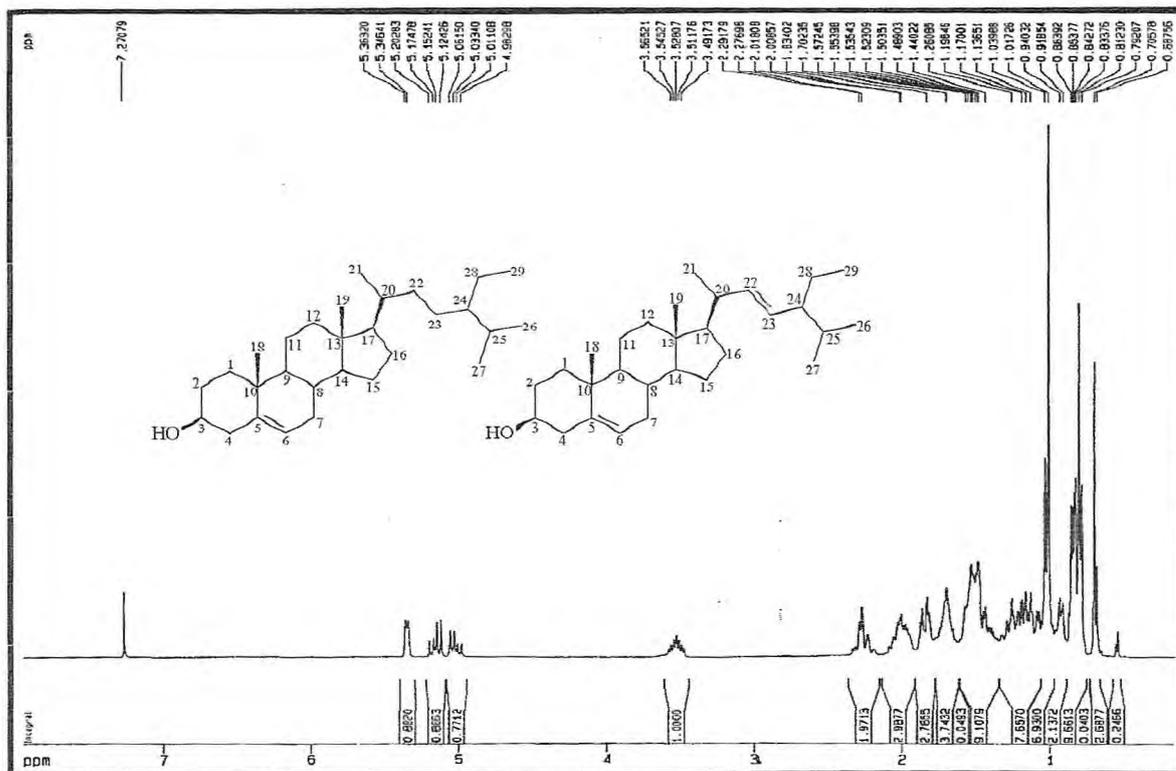


Figura 51 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-5.

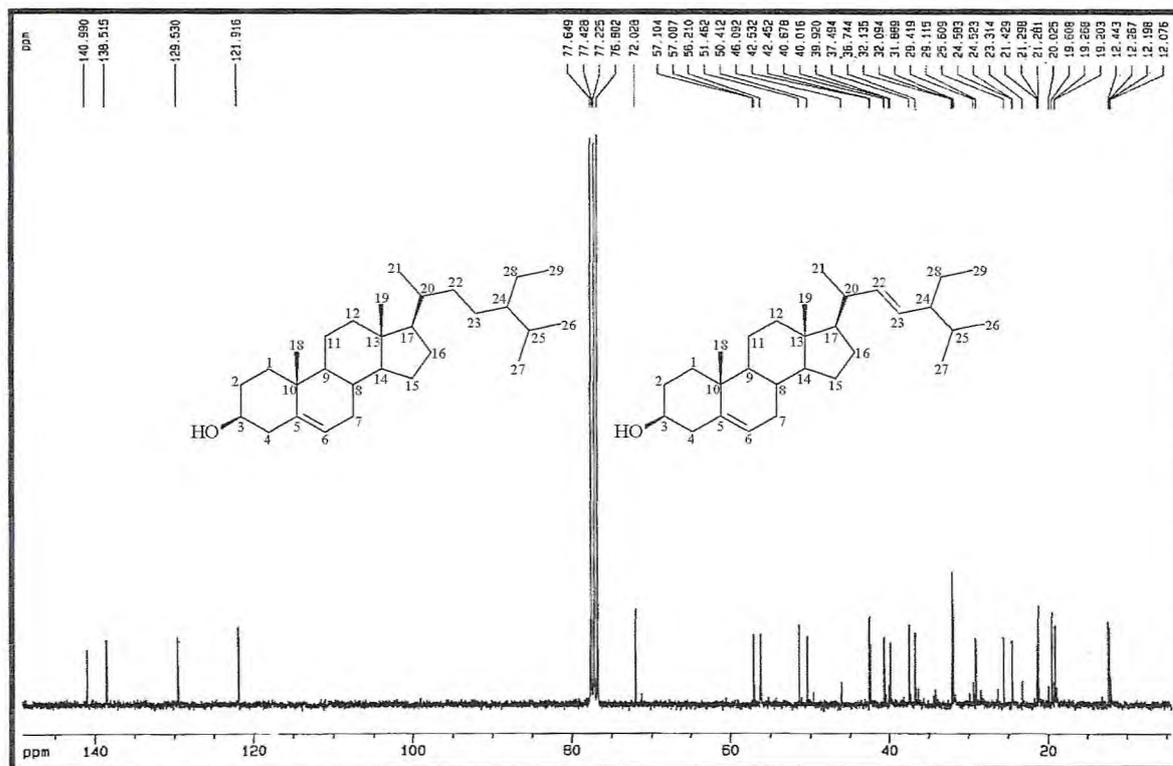


Figura 52 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-5.

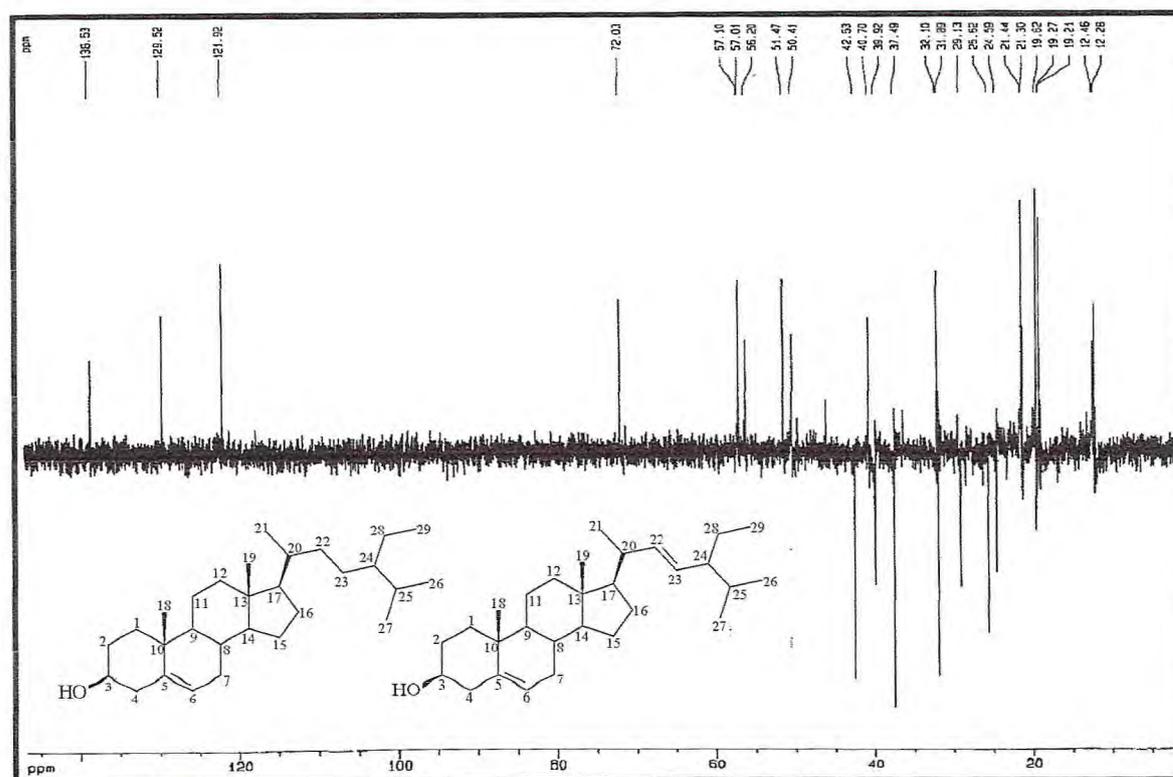


Figura 53 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-5.

## 5.2 Determinação Estrutural dos Compostos Isolados das raízes de *C. argyrophyllus*

### 5.2.1 Determinação Estrutural de CA-1

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica, obtida da partição do extrato hexânico das raízes de *C. argyrophyllus*, permitiu o isolamento de um sólido branco com  $[\alpha]_D^{20} = -70$  ( $c$  0,214,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ), denominado de CA-1.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig. 55, Pág.121) de CA-1 revelou a presença de três metilas em  $\delta$  1,21 (s; 3H-20), 1,96 (d;  $J = 1,3$  Hz; 3H-17), e 1,14 (d;  $J = 6,5$  Hz; 3H-19), além de sinais em  $\delta$  4,68 (d;  $J = 1,3$  Hz; 1H-18a) e 4.40 (d;  $J = 1,3$  Hz; 1H-18b) característicos de hidrogênios olefínicos diastereotópicos, e típico de dupla terminal. Foi observado ainda um sinpleto em  $\delta$  3,23 (s; 1H-5) atribuído a um hidrogênio carbinólico, e outro em  $\delta$  7,14 (s; 3H-16) associado a um hidrogênio aromático.

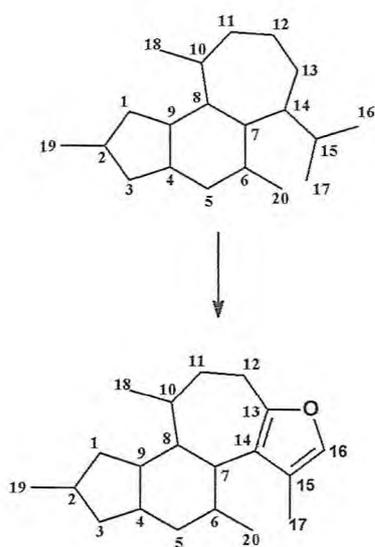
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig. 56, Pág. 121) de CA-1 observou-se a presença de 20 sinais espectrais. Utilizando o conceito de deslocamento químico foi possível identificar sinais característicos de carbonos saturados oxigenados em  $\delta$  54,87 (C-5) e 60,69 (C-6), oito sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  111,79 (C-18), 118,11 (C-14), 122,58 (C-15), 137,84 (C-16), 146,27 (C-10), 146,72 (C-9), 151,88 (C-13) e 167,51 (C-4), dos quais, os quatro sinais em  $\delta$  151,88 (C-13), 137,84 (C-16), 122,58 (C-15), 118,11 (C-14) foram associados a quatro carbonos de um sistema furânico trissubstituído, corroborado pela presença do hidrogênio aromático em  $\delta$  7.14 no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , além de um sinal característico de carbonila conjugada em  $\delta$  207,49.

A análise comparativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Fig. 57, Pág.122) permitiu identificar a presença de três carbonos metílicos, quatro carbonos metilênicos sendo um olefínico, cinco carbonos metínicos, e oito carbonos não-hidrogenados. Tabela 5.16, pág 115.

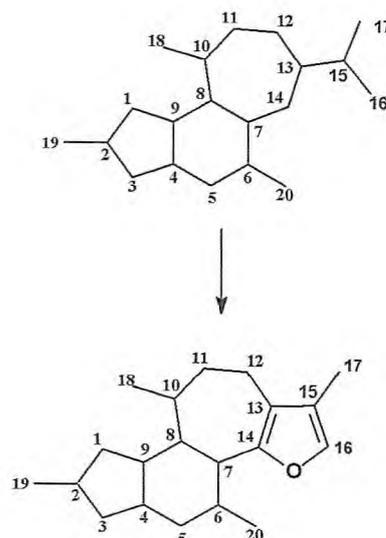
**Tabela 35** – Deslocamentos químicos de RMN<sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 125 MHz) de CA-3 por padrão de hidrogenação.

CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	C	Total
20,03	111,79 (C=C)	137,84 (C=C)	207,49 (C=O)	
17,57	37,26	54,87 (C-O)	167,51 (C=C)	
9,02	36,84	53,10	151,88 (C=C)	
	23,19	41,47	146,72 (C=C)	
		37,89	146,27 (C=C)	
			122,58 (C=C)	
			118,11 (C=C)	
			60,69(C-O)	
C <sub>3</sub> H <sub>9</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>

A partir dos dados obtidos pôde-se propor para CA-1 a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, com IDH igual a 10, em acordo com o sinal do íon molecular no espectro de massa (EM-IE, Fig. 62, pág. 126) em *m/z* 310 Da e corroborado pelo espectro de massa de alta resolução que apresentou o pico [M+H] 311,1621 Da, com erro de 8,4 ppm (Fig. 58, pág 122). A confirmação da presença de quatro ligações duplas e de uma carbonila no espectro de RMN<sup>13</sup>C-CPD, e a hipótese da presença de anel furânico, nos levou a sugerir em uma estrutura diterpênica tetracíclica. Comparando os dados acima, com dados descritos na literatura para diterpenos, pôde-se sugerir a CA-1 uma estrutura de um diterpeno de esqueleto crotofolano (5.8) ou isocrotofolano (5.9).

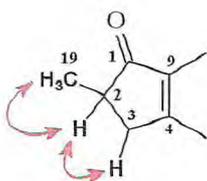


Esqueleto crotofolano 5.8

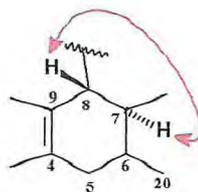


Esqueleto isocrotofolano 5.9

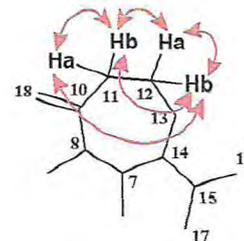
O espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 x 500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig. 59, pág. 123) de CA-1 revelou as correlações homonucleares do hidrogênio metínico em  $\delta$  2,39 (H-2) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,14 (3H-19) e com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,02 (H-3a) e 2,32 (H-3b). Neste espectro foi também observado a correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,63 (H-8) com o hidrogênio em  $\delta$  2,48 (H-7), que baseado no valor de  $J = 11,5$  Hz sugeriu-se uma interação axial-axial entre eles. Neste espectro foram ainda observadas as correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  2,71 (H-11a) com o hidrogênio em  $\delta$  2,56 (H-11b), e com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,21 (H-12a) e 2,72 (H-12b), bem como o acoplamento alílico do hidrogênio olefínico em  $\delta$  7,14 (H-16) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,96 (3H-16) (Frag. 5.22-5.24).



Fragmento 5.22



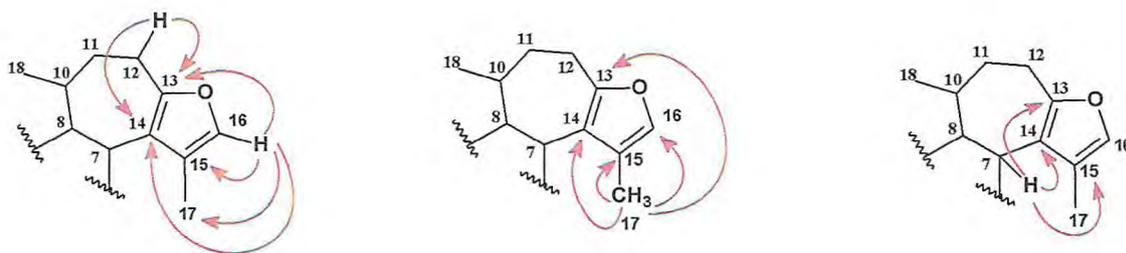
Fragmento 5.23



Fragmento 5.24

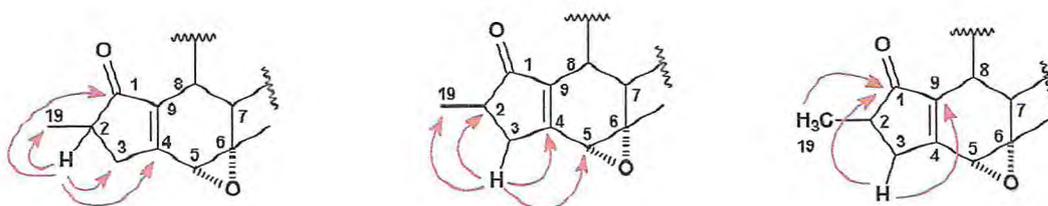
Através da análise do espectro de HMBC (Fig. 61, Pág.125) observou-se a correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,48 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  118,11 (C-14), 151,88 (C-13) e 122,58 (C-15), bem como dos hidrogênios em  $\delta$  3,21 (H-12a) e 2,72 (H-12b) com os carbonos em  $\delta$

118,11 (C-14) e 151,88 (C-13), e dos hidrogênios da metila em  $\delta$  1,96 (H-17) com os carbonos em  $\delta$  118,11 (C-14), 122,58 (C-15), 137,84 (C-16) e 151,88 (C-13). Outras correlações observadas foram do hidrogênio em  $\delta$  7,14 (H-16) com os carbonos em  $\delta$  9,02 (C-17), 118,11 (C-14), 122,58 (C-15) e 151,88 (C-13). As análises das correlações anteriores corroboraram com a presença de um anel aromático do tipo furânico trissubstituído, como também o esqueleto do tipo crotofolano para o composto CA-1 (Frag. 5.25).



Fragmento 5.25

Através das correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,39 (H-2) com os carbonos em  $\delta$  207,49 (C-1), 36,84 (C-3), 167,51 (C-4) e 17,57 (C-19), e dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,02 (H-3a) e 2,32 (H-3b) com os carbonos em  $\delta$  207,49 (C-1), 146,72 (C-9), 54,87 (C-5), 41,47 (C-2), 167,51 (C-4) e 17,57 (C-19), bem como dos hidrogênios da metila em  $\delta$  1,14 (3H-19) com o carbono em  $\delta$  207,49 (C-1), foi possível determinar a localização do grupamento carbonílico em C-1 no anel ciclopenteno do esqueleto crotofolano (Frag. 5.26).

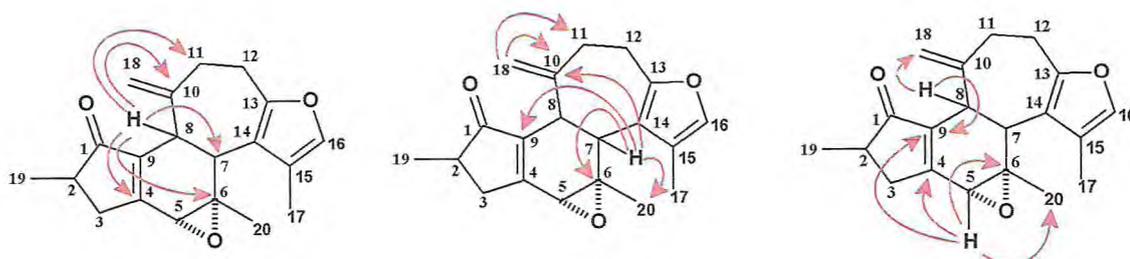


Fragmento 5.26

As correlações do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,63 (H-8) com os carbonos em  $\delta$  146,27 (C-10), 146,72 (C-9), 53,10 (C-7), 111,79 (C-18), 37,26 (C-11), 167,51 (C-4) e 60,69 (C-6), bem como as correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,48 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  60,69 (C-6), 146,27 (C-10); 146,72 (C-9); 20,03 (C-20), além das correlações desse mesmo hidrogênio com os carbonos em  $\delta$  118,11 (C-14); 122,58 (C-15) e 151,88 (C-13), anteriormente

relatados, permitiram a confirmação inequívoca do esqueleto crotofolano para o composto CA-1.

Ainda foi possível observar as correlações do hidrogênio em  $\delta$  3,23 (H-5) com os carbonos em  $\delta$  60,69 (C-6), 167,51 (C-4), 146,72 (C-9) e 20,03 (C-20) e dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  4,68 (H-18a) e 4,40 (H-18b) com os carbonos em  $\delta$  146,27 (C-10) e 37,84 (C-11), possibilitando a localização correta do anel oxirano e da dupla exocíclica  $\Delta^{10,18}$ .



Fragmento 5.27

A estereoquímica relativa CA-1 foi determinada pela análise de cristalografia de raio-X (Fig. 54, Pág. 118), que permitiu identificar o posicionamento da metila C-19 no mesmo plano do oxigênio do sistema oxirano (C5-O-C6), bem como a estereoquímica *trans* entre os hidrogênios H-7 e H-8.

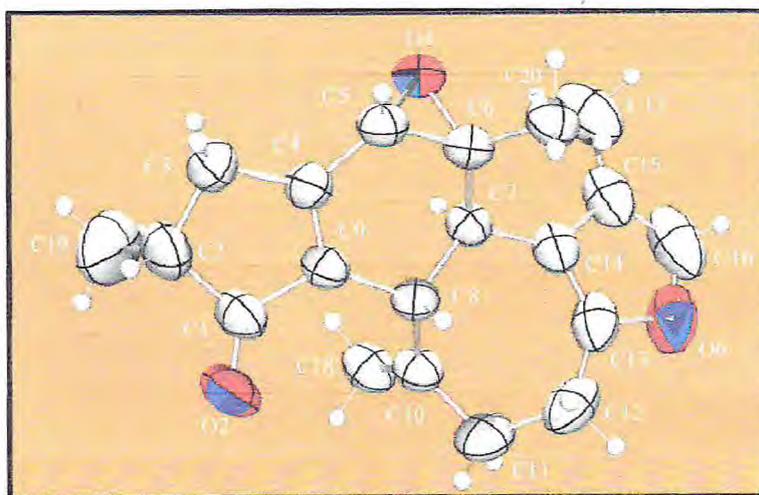
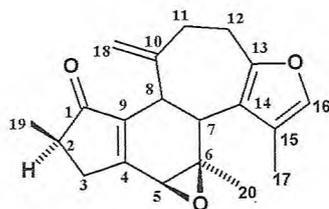


Figura 54 – Estrutura determinada pela análise de cristalografia de raio-X de CA-1.

Desta forma, a junção de todos os dados espectroscópicos permitiu caracterizar CA-1 como sendo o diterpeno crotofolano denominado de  $\Delta^{3,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (crotomicansin) (5.10), de caráter inédito na literatura.



$\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -Dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (5.10)

Tabela 36 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	207,49	-	H-2	2H-3; 3H-19
2	41,47	2,39 (m; 1H)	2H-3; 3H-19	-
3	36,84	3,02 (ddd; $J = 3,5; 6,5$ e $17,5$ Hz; 1Ha) 2,32 (ddd; $J = 1,75; 3,5$ e $17,5$ Hz; 1Hb)	H-2	H-5; 3H-19
4	167,51	-	2H-3; H-5	H-2; H-8
5	54,87	3,23 (s; 1H)	-	H-3a; 3H-20
6	60,69	-	H-5; H-7; 3H-20	H-8
7	53,10	2,48 (dd; $J = 3,5$ e $11,5$ Hz; 1H)	H-8	3H-20
8	37,98	3,63 (td; $J = 1,3$ e $11,5$ Hz; 1H)	H-7	2H-18
9	146,72	-	H-8	2H-3; H-5; H-7
10	146,27	-	H-8; 2H11; 2H-18	H-7
11	37,26	2,71 (m; 1Ha) e 2,56 (m; 1Hb)	2H-12	H-8; 2H-18
12	23,19	3,21 (m; 1Ha) e 2,72 (m; 1Hb)	2H-11	-
13	151,88	-	2H-12	H-7; H-16; 3H-17( $^4J_{\text{CH}}$ )
14	118,11	-	H-7	2H-12; H-16; 3H-17
15	122,58	-	3H-17	H-7; H-12a; H-16
16	137,84	7,14 (s; 1H)	-	3H-17
17	9,02	1,96 (d; $J = 1,3$ Hz; 3H)	-	-
18	111,79	4,68 (d; $J = 1,3$ Hz; 1Ha) 4,40 (d; $J = 1,3$ Hz; 1Hb)	-	H-8; 2H-11
19	17,57	1,14 (d; $J = 6,5$ Hz; 3H)	H-2	2 H-3
20	20,03	1,21 (s; 3H)	-	H-5; H-7

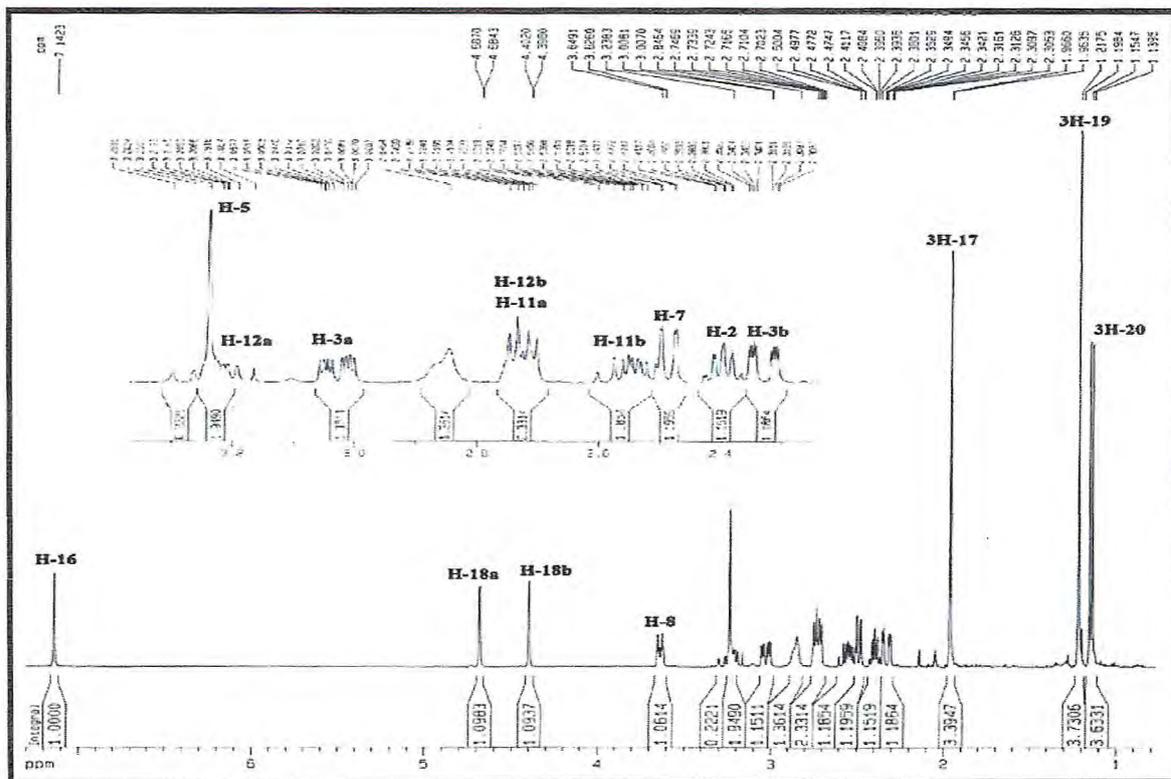


Figura 55 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.

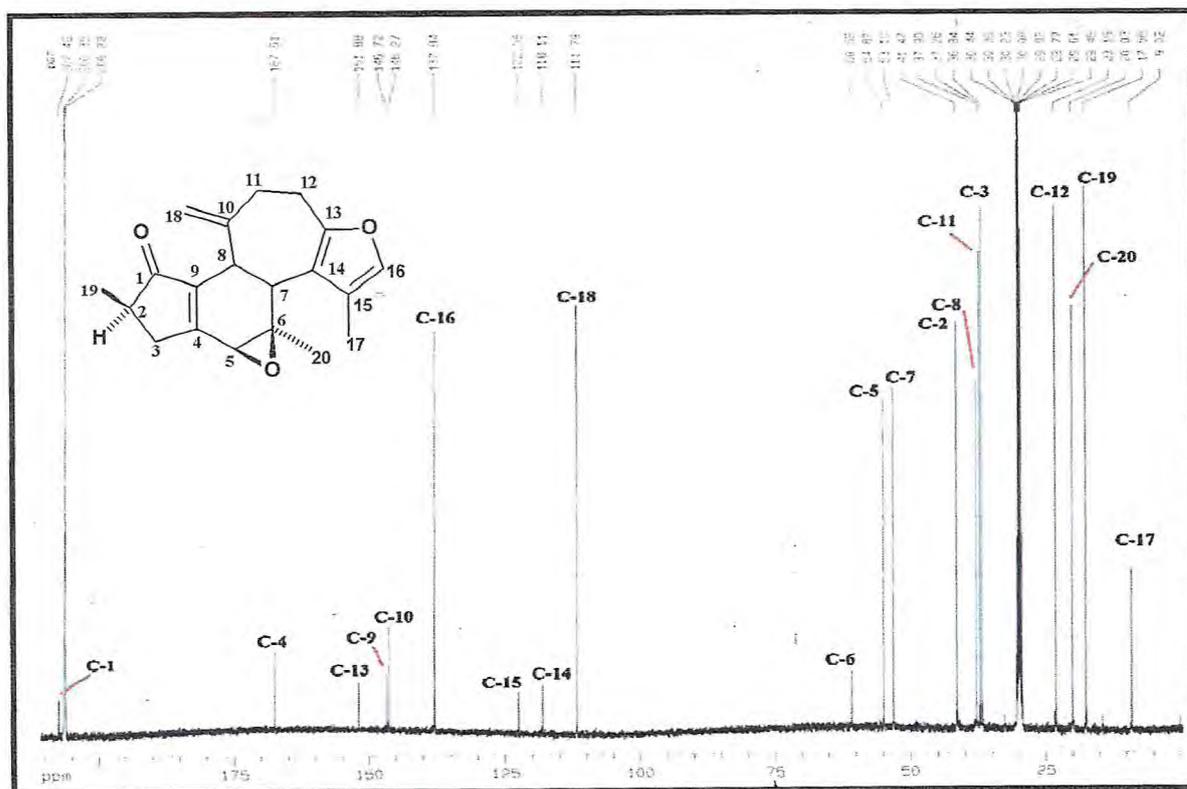


Figura 56 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.

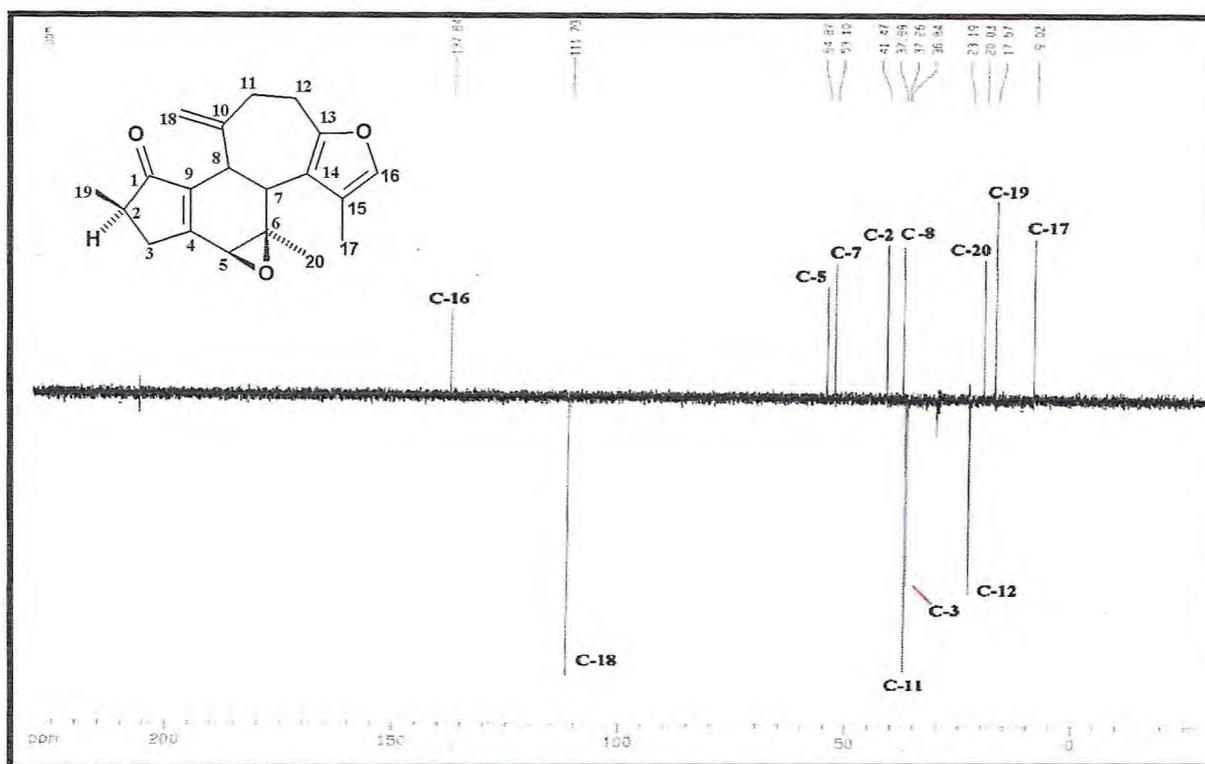


Figura 57 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135° (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) de CA-1.

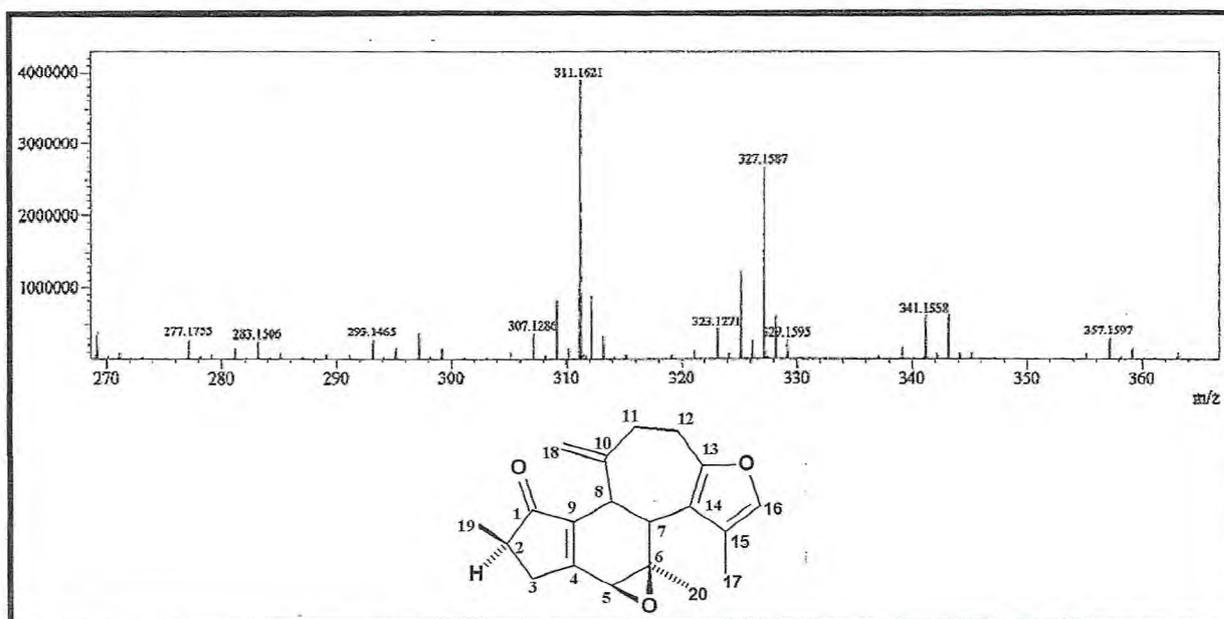


Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-1.

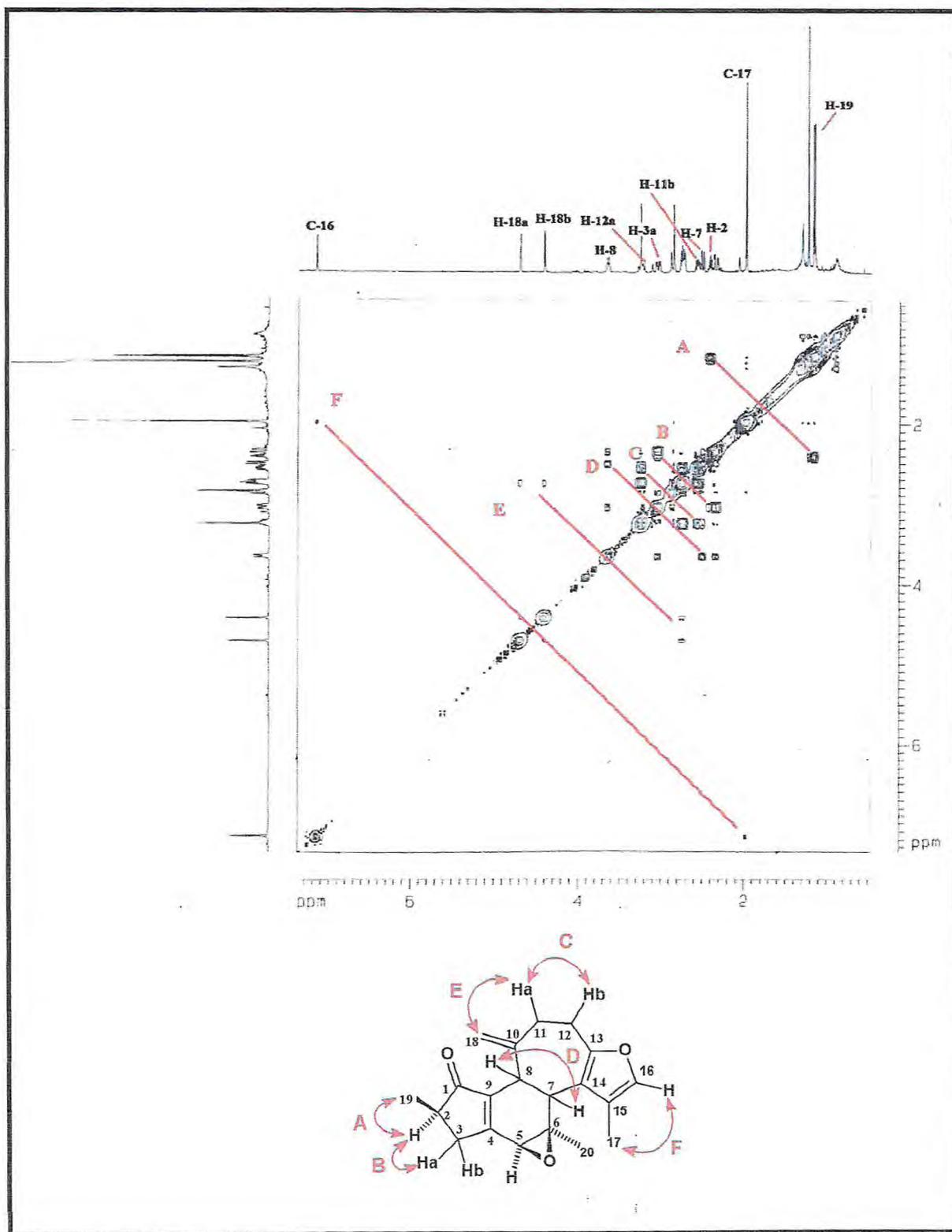


Figura 59 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-1.

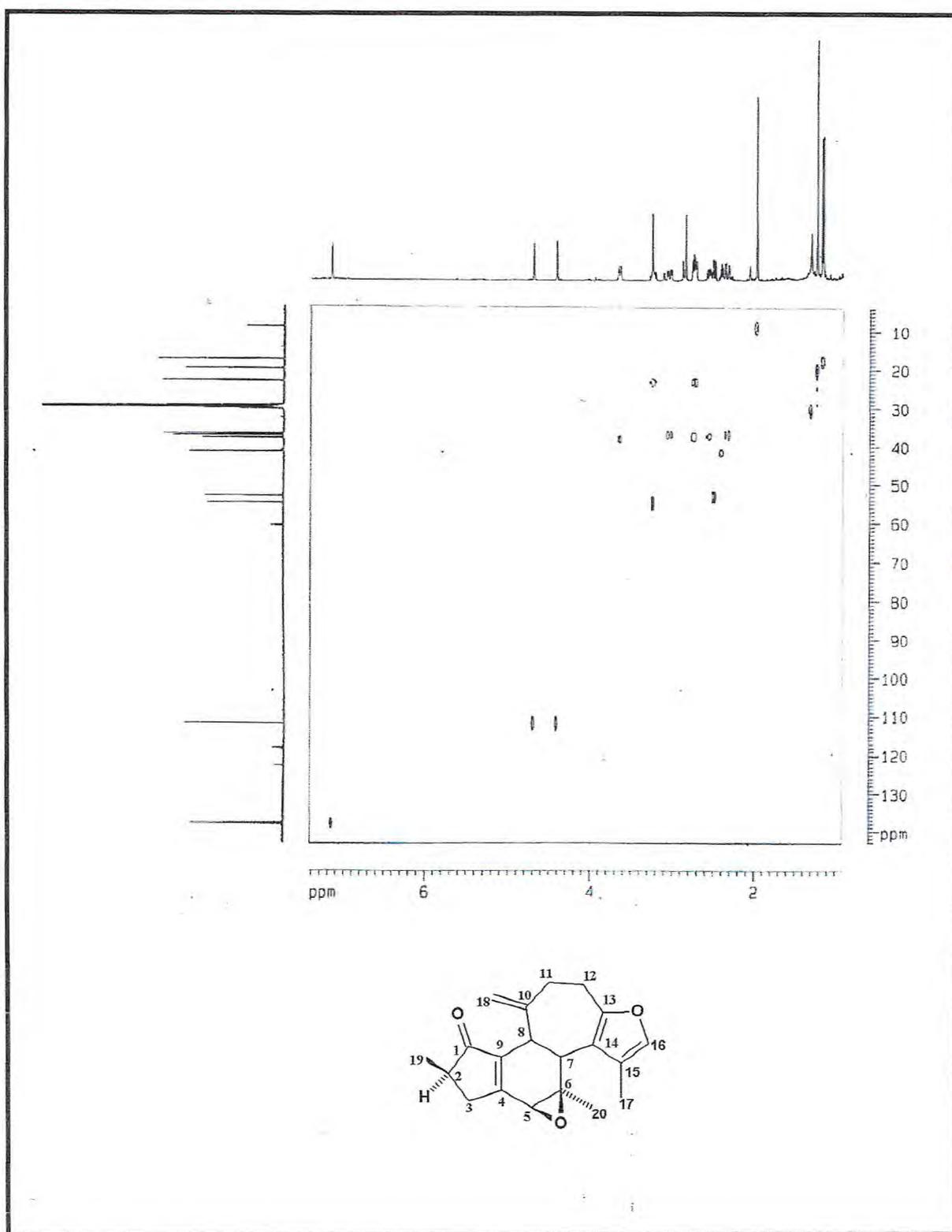


Figura 60 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-1.

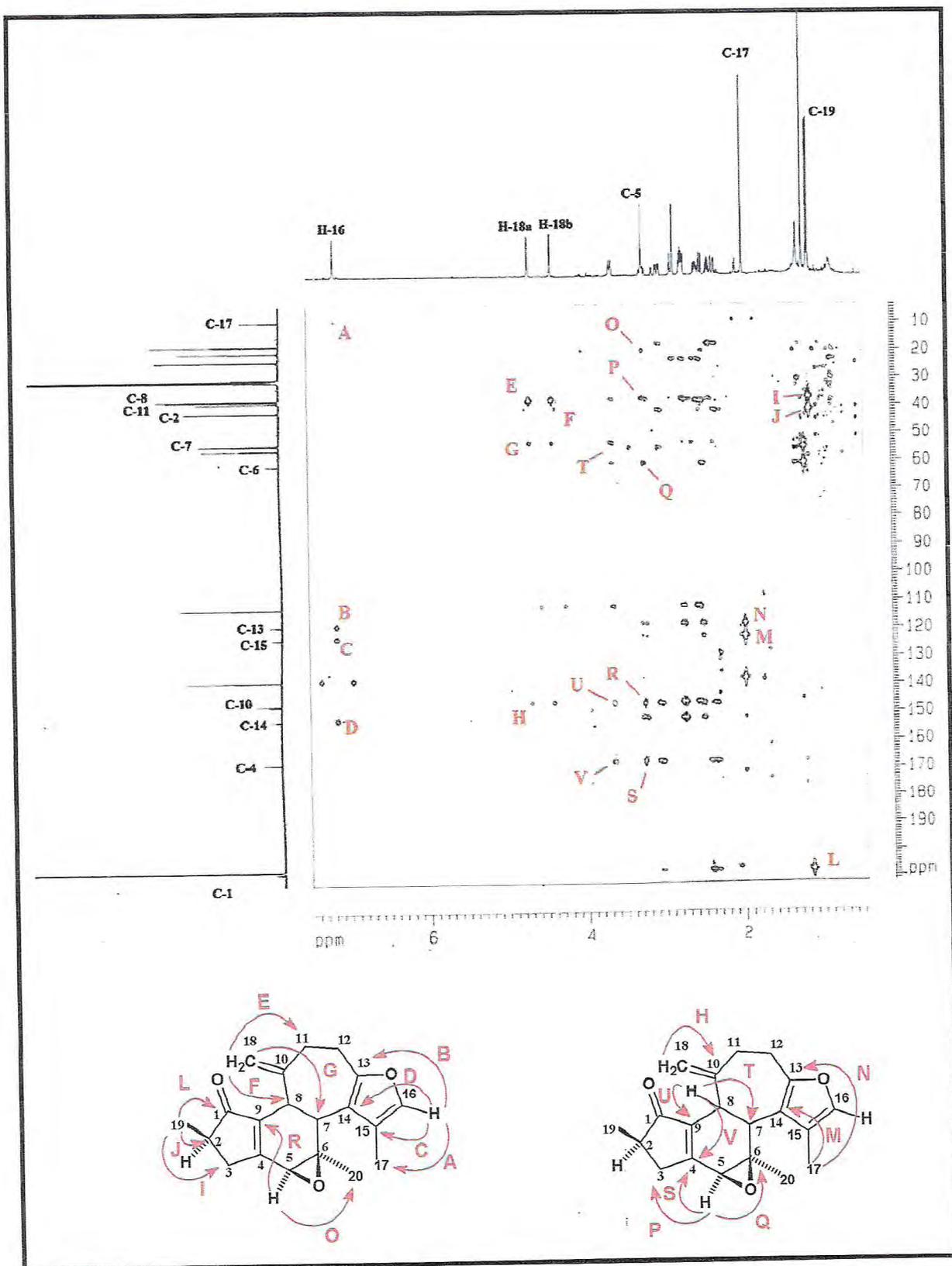


Figura 61 – Espectro e expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-1.

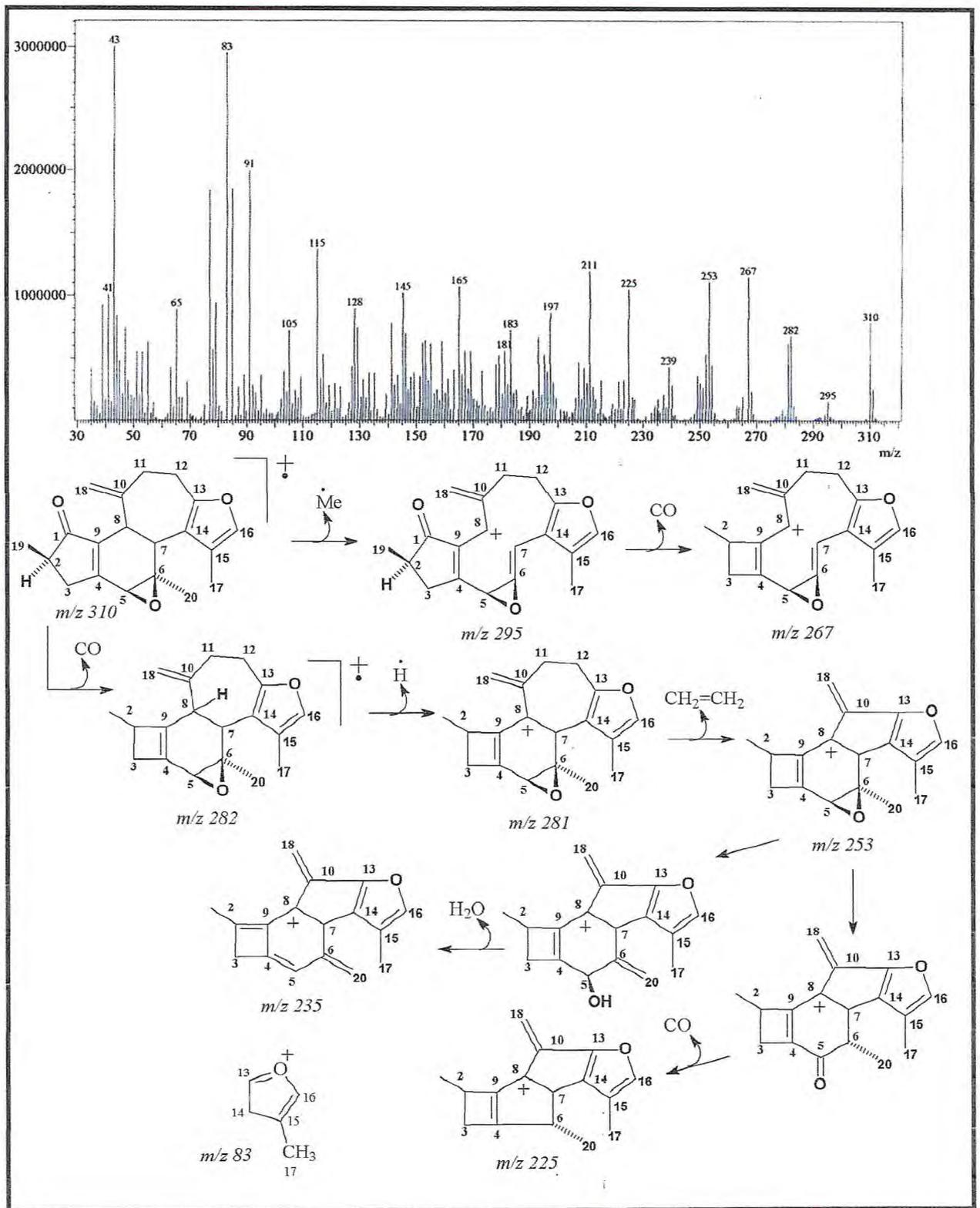


Figura 62 – Espectro de massa de CA-1 (ionização eletrônica a 70 eV).

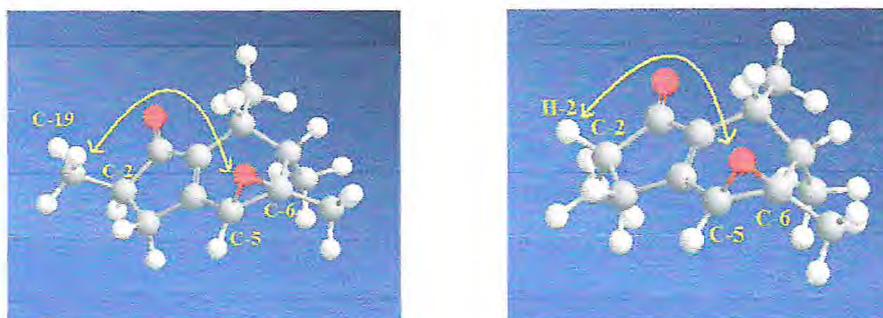
### 5.2.2 Determinação Estrutural de CA-10

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica, obtida a partir da cromatografia filtrante do extrato etanólica das raízes de *C. argyrophyllus*, resultou no isolamento de um líquido incolor, com  $[\alpha]_D^{25} = + 50,3$  ( $c$  0,408,  $\text{CHCl}_3$ ), e denominado de CA-10.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig. 67, pág. 133) de CA-10 mostrou-se bastante semelhante ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig. 68, pág. 133) de CA-1. A única diferença observada foi relacionada ao sinal referente ao carbono C-19 em CA-1 ( $\delta$  17,57), que se encontrava mais protegido em CA-10 ( $\delta$  15,48) (Tab. 38, pág. 131).

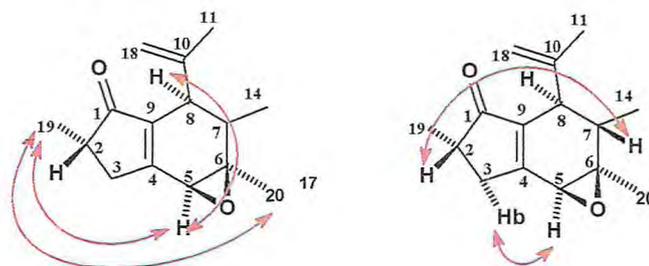
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Fig 65 pág. 132) Também se mostrou bastante semelhante ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 66 pág 132) de CA-1, exceto pelos valores relacionados aos hidrogênios metínico H-2 e metílicos 3H-19 de CA-1 em  $\delta$  2,39 (H-2) e 1,14 (H-19), que passaram a absorver em  $\delta$  2,55 (H-2) e 0,98 (H-19) no espectro de CA-10. Foi observado também a diferença de multiplicidade do hidrogênio em  $\delta$  2,32 (ddd;  $J = 1,75; 3,5$  e  $17,5$  Hz; 1Hb) que passou para 2,37 (dt;  $J = 3,5$  e  $18,0$  Hz; 1Hb) em CA-10. Estes fatos puderam ser explicados pela possível inversão de configuração do carbono carbinólico C-2 na estrutura de CA-10.

Desta forma, o maior deslocamento químico do carbono metílico C-19 ( $\delta$  17,57) em posição pseudoaxial, e menor deslocamento do hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,39) em posição pseudoequatorial de CA-1, quando comparados com os correspondentes observados em CA-10, C-19 ( $\delta$  15,48) na posição pseudoequatorial e o hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,55) em posição pseudoaxial, poderia ser justificado pelo efeito de compressão estérica do oxigênio do óxido de etileno (C-5 e C-6) sobre a metila C-19 de CA-1 e sobre o H-2 de CA-10 (Fig. 5.58, pág. 127).



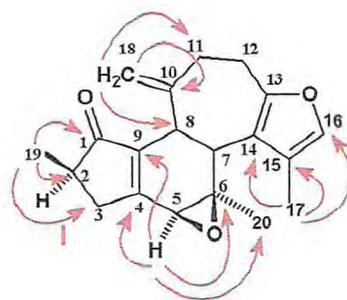
**Figura 63** – Compressão estérica sobre C-19 (CA-1), e H-2 (CA-10), respectivamente.

O espectro bidimensional de NOESY de CA-10 (Fig. 69, pág. 134) apresentou correlações espaciais entre o hidrogênio H-5 ( $\delta$  3,26) com os hidrogênios 3H-19 ( $\delta$  1,15), H-3b ( $\delta$  2,38) e H-8 ( $\delta$  3,63); bem como a correlação dos hidrogênios 3H-19 ( $\delta$  1,15) com os hidrogênios 3H-20 ( $\delta$  1,22), e do hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,55) com o hidrogênio H-7 ( $\delta$  3,56), corroborando, desta forma, com a sugestão de inversão da estereoquímica do carbono C-2, em comparação com a estrutura de CA-1.



**Fragmento 5.28**

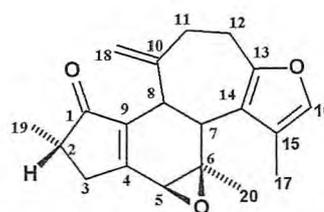
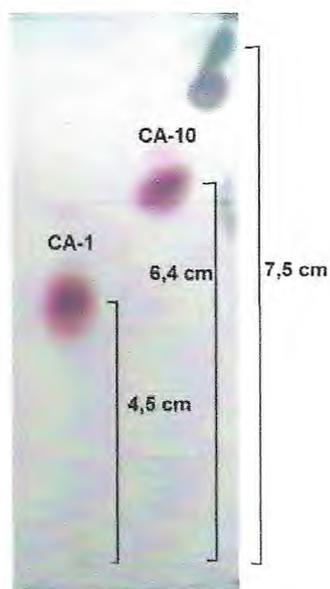
A análise do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC (Fig. 71, pág. 135) apresentou a correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,23 (H-5) com os carbonos em  $\delta$  20,07 (C-20), 60,77 (C-6), 166,36 (C-4) e 147,71 (C-9); além das correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,15 (3H-19) com os carbonos em  $\delta$  37,24 (C-3), 41,54 (C-2) e 207,15 (C-1). As correlações dos hidrogênios olefinicos diastereotópicos em  $\delta$  4,69 e 4,46 (2H-18) com os carbonos em  $\delta$  37,24 (C-11), 38,19 (C-8) e 146,57 (C-10); em adição às correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,97 (3H-17) com os carbonos em  $\delta$  118,13 (C-14), 122,57 (C-15), 137,83 (C-16), confirmaram para CA-10 a estrutura diterpênica de um esqueleto crotofolano semelhante a CA-1.



**Fragmento 5.29**

Uma análise comparativa em CCD de gel de sílica (Fig. 64, pág. 129) entre CA-1 e CA-10, nos permitiu confirmar que se tratava de substâncias distintas, com base nos seus valores de  $R_f$ , onde CA-1 e CA-10 apresentaram  $R_f = 0,85$  e  $0,60$ , respectivamente.

Com base nos dados obtidos e por comparação com os dados de CA-1 permitiu identificar CA-10 como sendo um diterpeno de esqueleto crotofolano epímero de CA-1, denominado de *2-epi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (2-epi-crotomicansin) (5.8)* e de caráter inédito na literatura.



***2-Epi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (5.8)***

**Figura 64** - CCD de CA-1 e CA-10 em hexano/clorofórmio (4:1).

**Tabela 37** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) e  $^{13}\text{C}$  de CA-10 (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC.

#C	HSQC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	207,15	-
2	41,54	2,55 (m; 1H)
3	37,24	3,03 (ddd; $J = 3,5; 6,5$ e $17,5$ Hz; 1Ha) 2,38 (ddd; $J = 1,75; 3,5$ e $17,5$ Hz; 1Hb)
4	166,36	-
5	54,80	3,23 (s; 1H)
6	60,77	-
7	52,90	2,55 (m; 1H)
8	38,19	3,63 (dt; $J = 3,5$ e $11,5$ Hz; 1H)
9	147,71	-
10	146,57	-
11	37,24	2,72 (m; 1Ha) e 2,55 (m; 1Hb)
12	23,22	3,21 (m; 1Ha) e 2,73 (m; 1Hb)
13	151,89	-
14	118,14	-
15	122,57	-
16	137,83	7,14 (s; 1H)
17	9,01	1,97 (d; $J = 1,3$ Hz; 3H)
18	111,79	4,69 (d; $J = 1,3$ Hz; 1Ha) 4,46 (d; $J = 1,3$ Hz; 1Hb)
19	15,48	1,15 (d; $J = 6,5$ Hz; 3H)
20	20,07	1,22 (s; 3H)

**Tabela 38** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-10 como os do composto CA-1,  $\delta$  (ppm).

#C	CA-10 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )	CA-1 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )
1	207,15	207,49
2	41,54	41,47
3	37,24	36,84
4	166,36	167,51
5	54,80	54,87
6	60,77	60,69
7	52,90	53,10
8	38,19	37,98
9	147,71	146,72
10	146,57	146,27
11	37,24	37,26
12	23,22	23,19
13	151,89	151,88
14	118,14	118,11
15	122,57	122,58
16	137,83	137,84
17	9,01	9,02
18	111,79	111,79
19	15,48	17,57
20	20,07	20,03

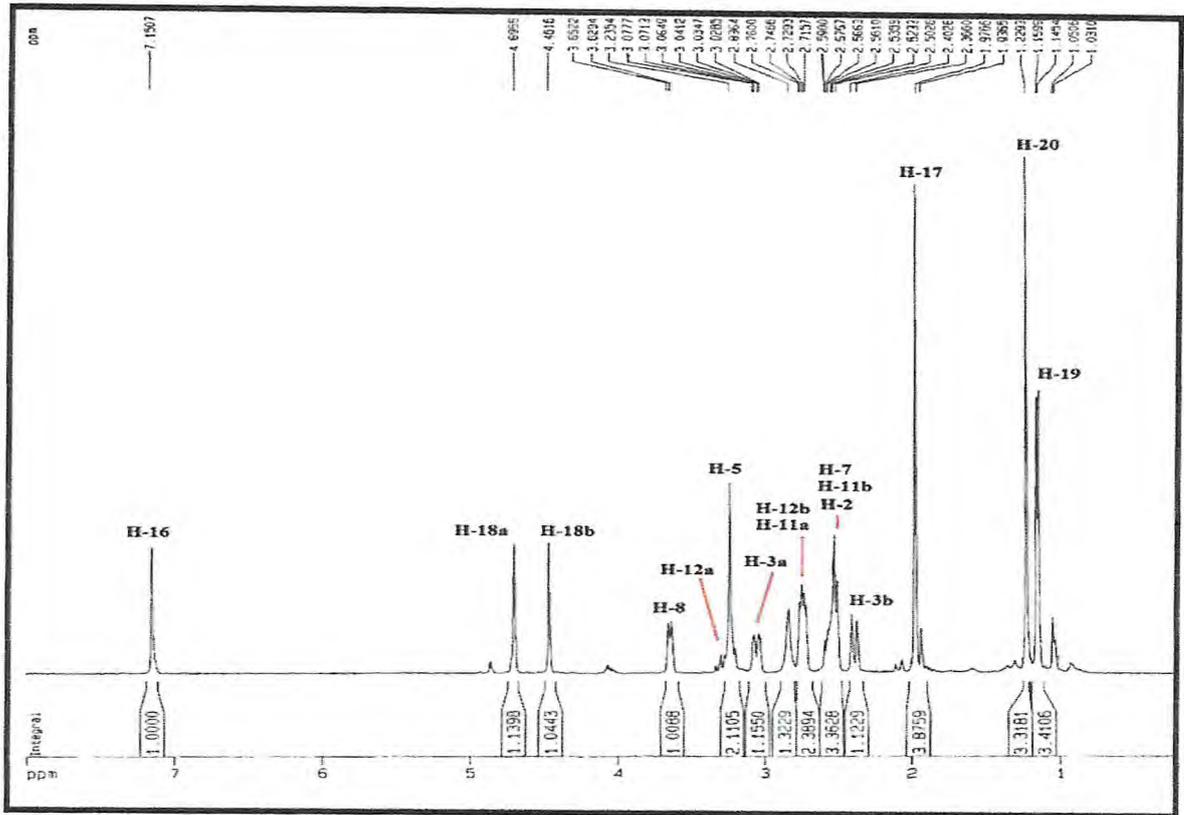


Figura 65 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) de CA-10.

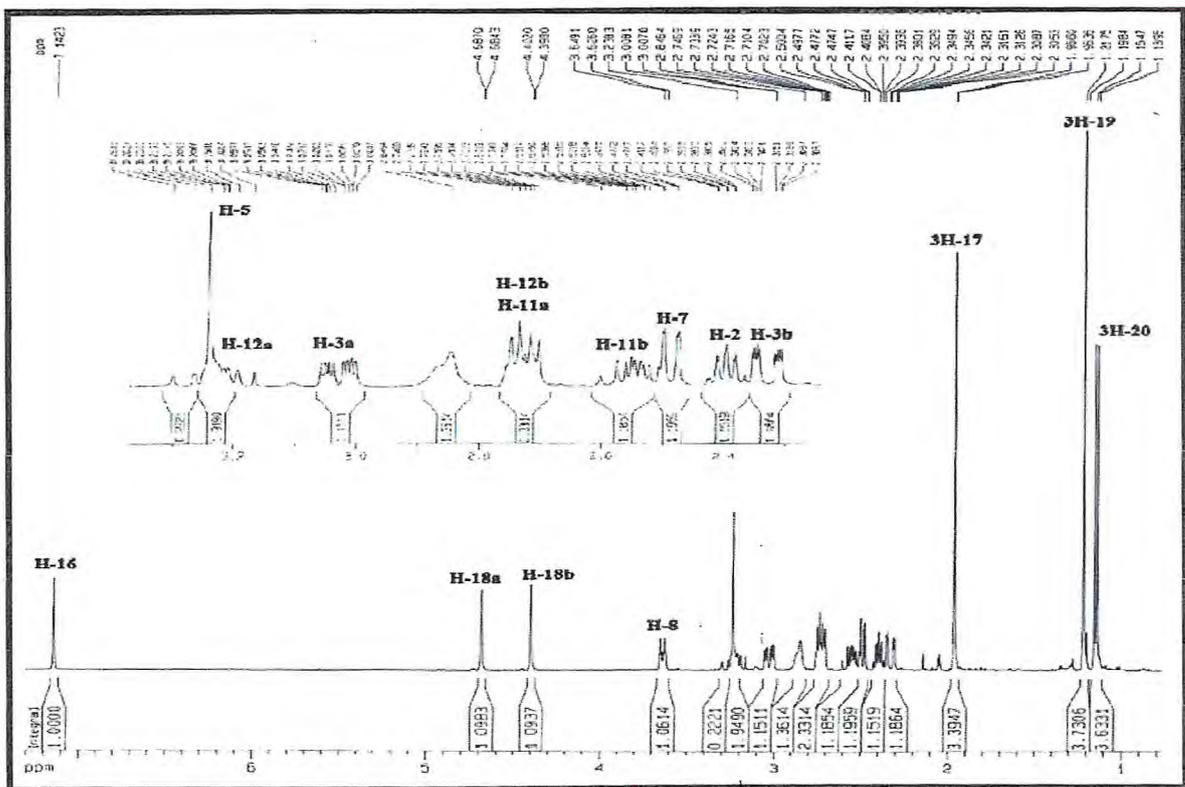


Figura 66 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) de CA-1.

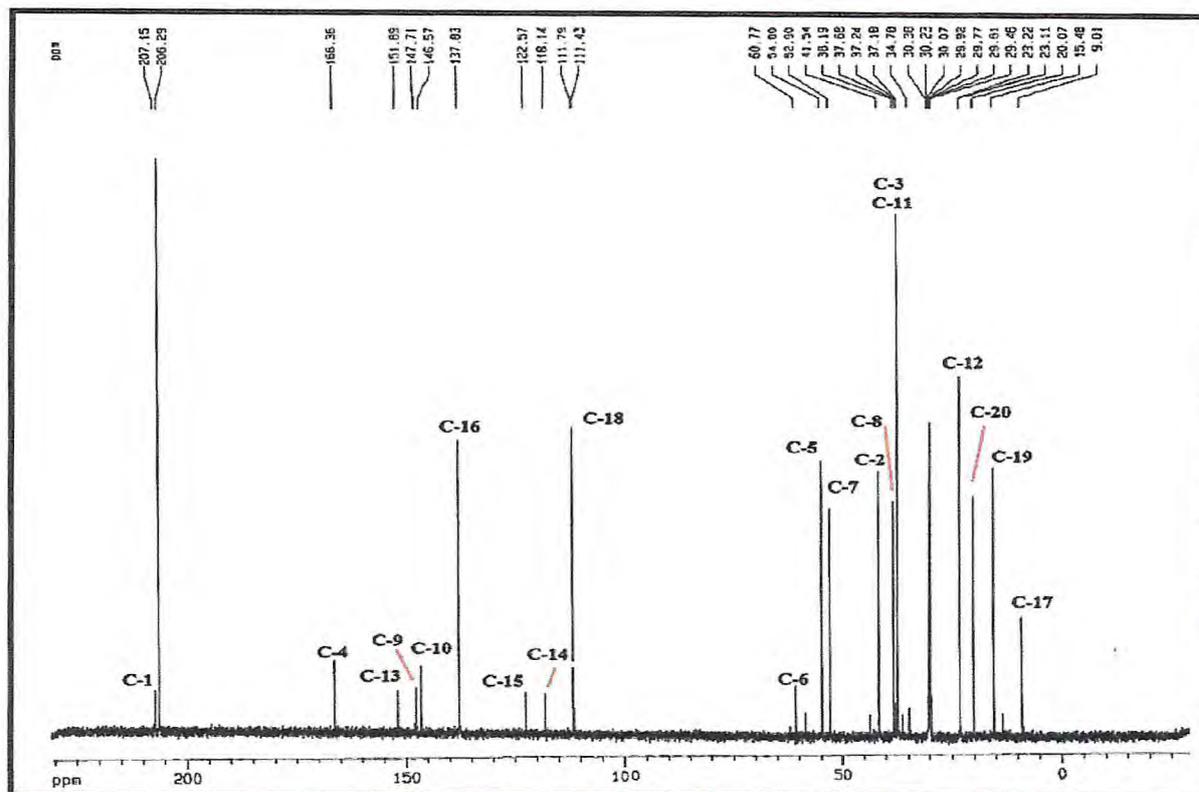


Figura 67 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-10.

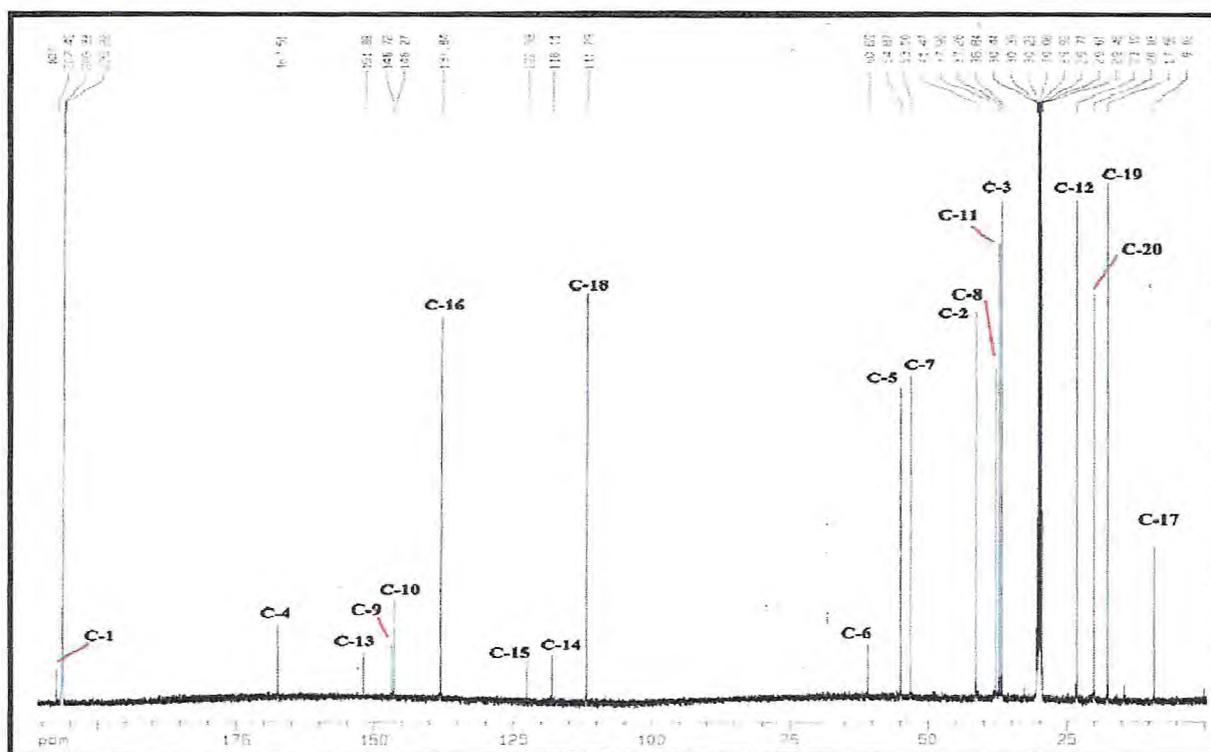


Figura 68 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) de CA-1.

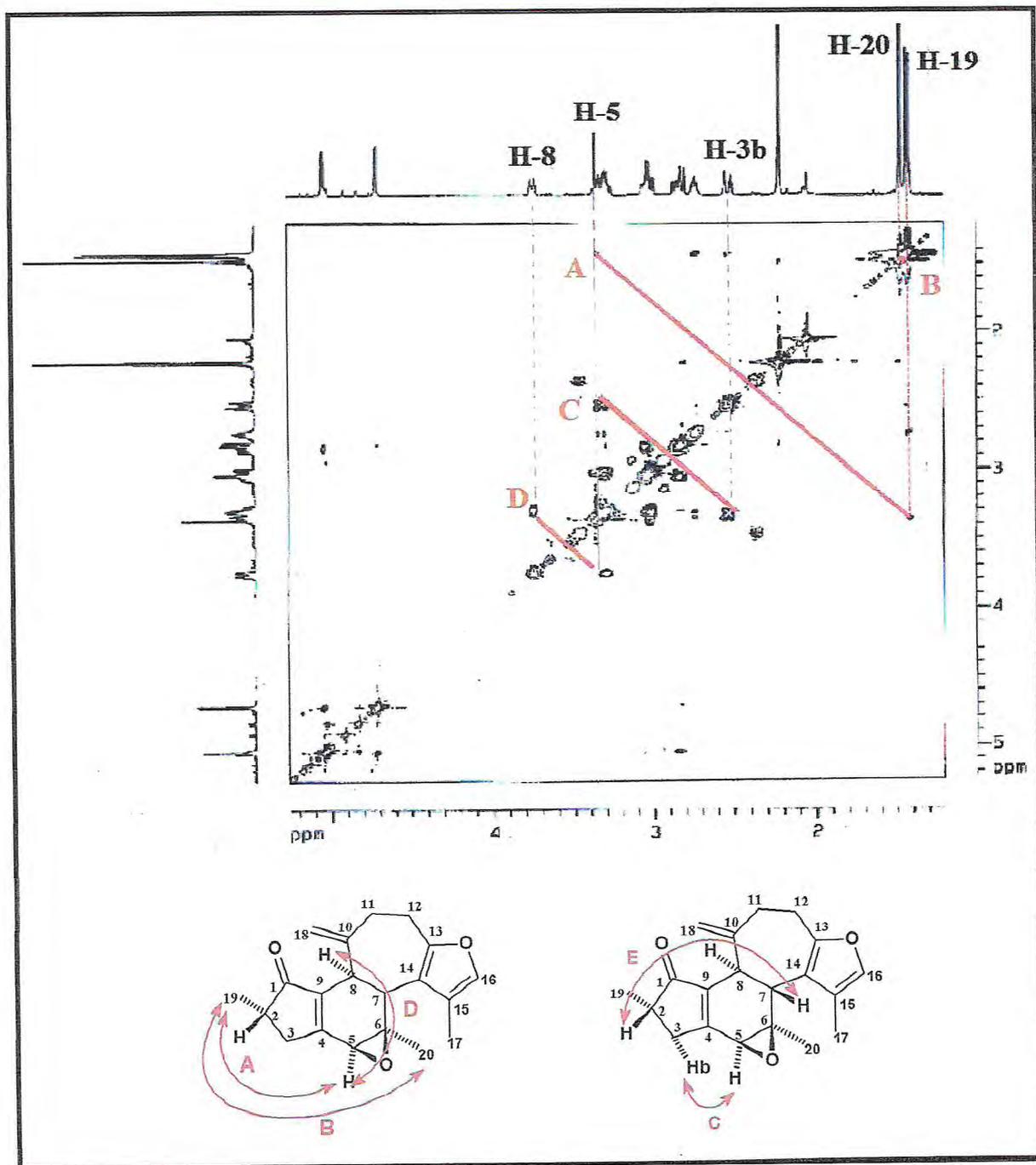


Figura 69 – Espectro de RMN bidimensional NOESY de CA-10.

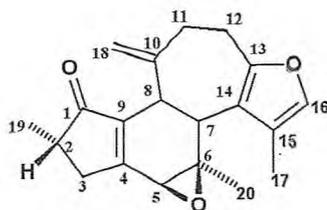
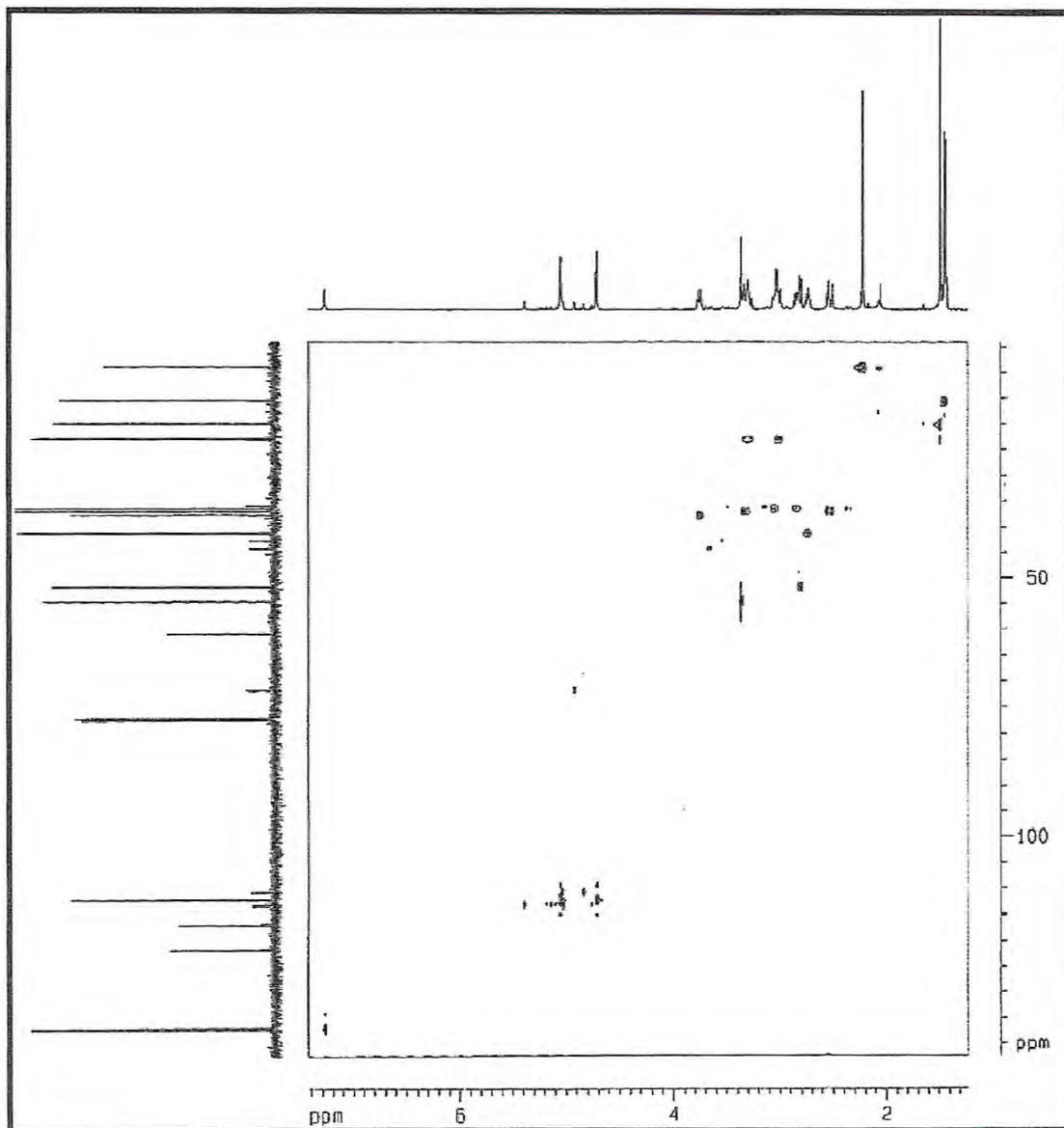


Figura 70 - Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-10.

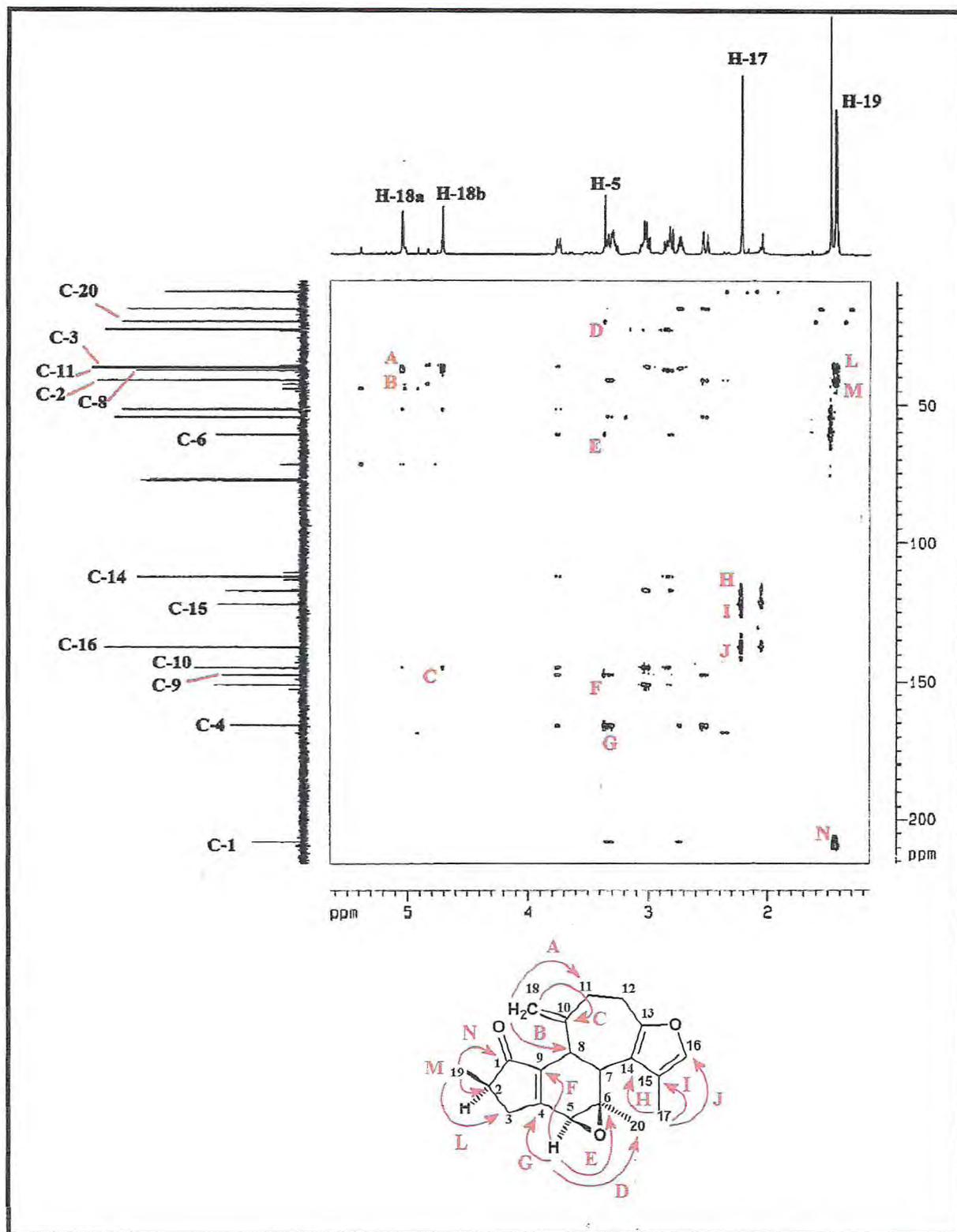


Figura 71 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-10.

### 5.2.3 Determinação Estrutural de CA-11

Cromatografia utilizando CLAE da fração acetato de etila, obtida da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de *C. argyrophyllus*, resultou no isolamento de um líquido castanho, com  $[\alpha]_D^{25} = +66,4^\circ$  (*c*, 2,14; MeOH) e denominado de CA-11.

Análise do espectro de infravermelho de CA-11 (Fig. 72, pág. 143) mostrou uma banda larga em  $3513\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à deformação axial de ligação O-H, de hidroxila ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), uma absorção em  $2975\text{ cm}^{-1}$  correlacionada à deformação axial das ligações C-H de alcanos ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), bem como bandas bastante intensas em  $1699\text{ cm}^{-1}$  que foram atribuídas a estiramento axial de ligação C=O de carbonila conjugada ( $\nu_{\text{C=O}}$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Fig 73 pág. 143) de CA-11 revelou a presença de simpletos em  $\delta$  4,91 (H-18a) e 4,52 (H-18b), atribuídos a hidrogênios diastereotópicos de dupla exocíclica, um sinal em  $\delta$  3,31 (s, H-5) característico de hidrogênio carbinólico, bem como a presença de três sinais de hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,18 (d;  $J = 7,5$ ; 3H-19), 1,86 (s, 3H-17) e 1,33 (s, 3H-20). Estes dados nos levaram a sugerir a estrutura de um composto semelhante a CA-10, entretanto, apresentou um anel furânico tetrasubstituído já que não observado nenhum sinal na região de aromáticos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Fig. 74, pág. 144) revelou vinte sinais, dos quais, oito sinais de carbonos olefinicos, um sinal em  $\delta$  210,57 (C-1) atribuído a uma carbonila conjugada de cetona, bem como três carbonos metílicos em  $\delta$  20,38 (C-20), 15,45 (C-19) e 10,08 (C-17). Comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-11 com os de CA-10 (Fig 5.62, pág. 131) permitiu observar grande similaridade entre os compostos, diferenciando-se somente a presença do carbono em  $\delta$  173,00 (C-16) de CA-11, bem mais desprotegido que o seu correspondente no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-10 em  $\delta$  137,83 (C-16).

A ausência do hidrogênio aromático em  $\delta$  7,14 e a desblindagem do carbono C-16 em CA-11, nos levou a propor um sistema furânico tetrassubstituído, corroborado pela análise comparativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (Fig 75, pág. 144) de CA-11, que revelou o carbono  $\delta$  173,00 (C-16) como um carbono não-hidrogenado (Tab. 39, pág. 138).

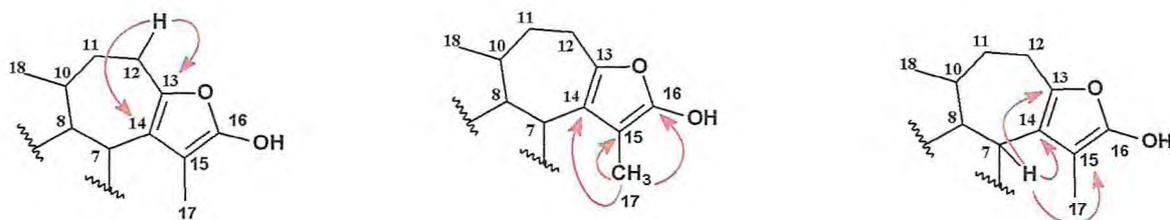
A partir dos dados obtidos pôde-se propor para CA-11 a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , de massa molar igual a 326 Da, em acordo com espectro de massas de alta resolução

HRESIMS (Fig. 78, pág. 146) que forneceu a massa do aduto de potássio [M+K] 365,1360 Da, com erro de 6,5 ppm. Uma massa adicional de 16 Da em comparação com o composto de CA-11, pôde ser justificado pela substituição de um hidrogênio por um grupamento hidroxila (-OH) no carbono C-16, corroborando os dados observados anteriormente.

**Tabela 39** – Deslocamentos químicos de RMN<sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 125 MHz) de CA-11 por padrão de hidrogenação.

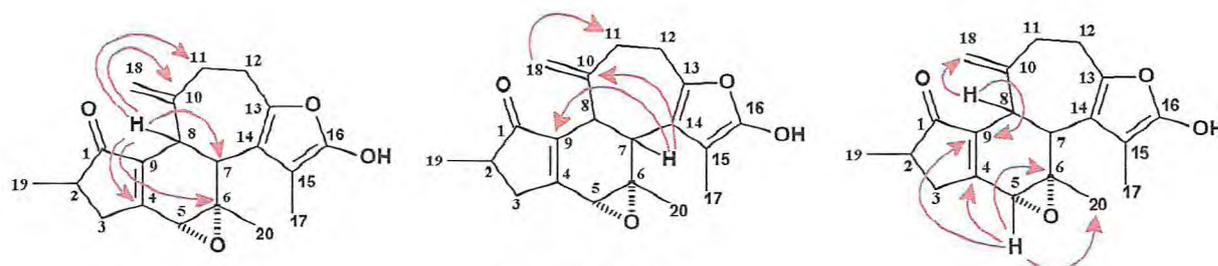
CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	C	Total
20,38	113,08 (C=C)	55,77 (C-O)	210,57 (C=O)	
15,45	42,89	54,33	173,03 (=C-O)	
10,08	37,70	42,51	168,21 (C=C)	
	36,00	41,61	161,63 (=C-OH)	
			148,70 (C=C)	
			146,78 (C=C)	
			130,85 (C=C)	
			110,11 (C=C)	
			61,19(C-O)	
C <sub>3</sub> H <sub>9</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>O<sub>4</sub></sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>

No espectro de HMBC (Fig. 79, pág.147) foi observado a correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,76 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  110.11 (C-14), 161,63 (C-13) e 130,85 (C-15); bem como dos hidrogênios em  $\delta$  3,21 (H-12a) e 2,72 (H-12b) com os carbonos em  $\delta$  110,11 (C-14) e 161,63 (C-13), e dos hidrogênios da metila em  $\delta$  10,08 (H-17) com os carbonos em  $\delta$  110.11 (C-14), 130,85 (C-15) e 173,03 (C-16). Estes dados corroboraram a presença do anel furânico tetrassubstituído (Frag. 30).



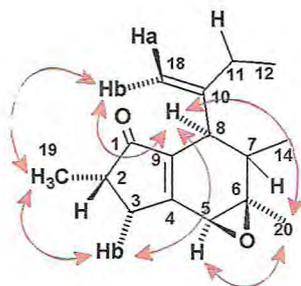
Fragmento 5.30

Por outro lado, o esqueleto crotofolano foi confirmado pelas correlações do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,59 (H-8) com os carbonos em  $\delta$  148,51 (C-10), 145,85 (C-9), 54,54 (C-7), 113,02 (C-18), 36,02 (C-11), 169,36 (C-4) e 61,21 (C-6); bem como as correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,75 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  148,51 (C-10), 145,85 (C-9), 110,11 (C-14), 130,85 (C-15) e 161,63 (C-13). Outras correlações importantes foram observadas entre o hidrogênio em  $\delta$  3,31 (H-5) com os carbonos em  $\delta$  169,36 (C-4), 145,85 (C-9), 61,19 (C-6) e 20,36 (C-20); e dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  4,91 (H-18a) e 4,45 (H-18b) com o carbono em  $\delta$  36,03 (C-11) (Frag. 5.31).



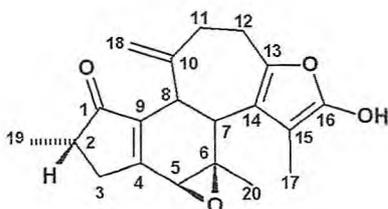
Fragmento 5.31

O experimento de RMN unidimensional de NOEDiff (Fig. 80, Pág. 148) possibilitou a determinação da estereoquímica relativa de CA-11, onde a radiação seletiva nos hidrogênios da metila em  $\delta$  1,18 (3H-19) levou a um acréscimo na intensidade dos sinais por efeito Overhauser, dos hidrogênios em  $\delta$  4,52 (H-18b), 2,61 (H-2) e 2,38 (H-3b). Em adição, a radiação seletiva sobre o hidrogênio  $\delta$  3,57 (H-8) aumentou a intensidade dos hidrogênios em  $\delta$  4,52 (H-18b), 2,38 (H-3b) e 1,33 (3H-20); e por fim a radiação sobre o hidrogênio  $\delta$  3,31 (H-5) elevou o sinal dos hidrogênios em  $\delta$  1,33 (3H-20). Essas observações foram justificadas pela posição desses hidrogênios que se encontram em proximidade espacial, de acordo com o fragmento 5.32.



**Fragmento 5.32**

A partir dos dados analisados pôde-se propor para CA-11 a estrutura de um diterpeno crotofolano derivado de CA-10 pela oxidação do carbono C-16 no anel furânico, denominado 2-*epi*-16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano, (2-*epi*-16-hidroxi-crotomicansin) (5.12) e de caráter inédito na literatura.



**2-*Epi*-16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (5.12)**

Tabela 40 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	210,57	-	H-2	2H-3; 3H-19
2	42,51	2,61 (m; 1H)	2H-3; 3H-19	-
3	37,70	3,08 (ddd; $J = 3,5; 8,5$ e $18,5$ Hz; 1Ha) 2,38 (td; $J = 3,5$ e $18,5$ Hz; 1Hb)	H-2	H-5; 3H-19
4	168,21	-	2H-3; H-5	H-8
5	55,77	3,31 (s; 1H)	-	2H-3; 3H-20
6	61,19	-	H-5; 3H-20	H-8
7	54,33	2,76 (d; $J = 11,5$ Hz; 1H)	H-8	-
8	41,61	3,57 (td; $J = 11,5$ Hz; 1H)	H-7	2H-11; 2H-18
9	146,78	-	H-8	2H-3; H-5; H-7
10	148,70	-	H-8; 2H-18; 2H-11	-
11	36,00	2,49 (ddd; $J = 2,5; 5,0$ e $13,0$ Hz; 1Ha) e 2,37 (dt; $J = 5,0$ e $13,0$ Hz 1Hb)	-	H-8; 2H-18
12	42,89	2,65 (m; 1Ha) e 1,42 (dt; $J = 5,0$ e $14,0$ Hz 1Hb)	2H-11	-
13	161,63	-	2H-12	H-7
14	110,11	-	H-7	2H-12; 3H-17
15	130,85	-	3H-17	H-7
16	173,03	-	-	3H-17
17	10,08	1,86 (s; 3H)	-	-
18	113,08	4,91 (s; 1Ha) e 4,52 (s; 1Hb)	-	H-8; 2H-11
19	15,45	1,18 (d; $J = 7,5$ Hz; 3H)	H-2	2 H-3
20	20,38	1,33 (s; 3H)	-	H-5

**Tabela 41** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-11 como CA-10.

#C	CA-11 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	CA-10 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )
1	210,57	207,15
2	42,51	41,54
3	37,70	37,24
4	168,21	166,36
5	55,77	54,80
6	61,19	60,77
7	54,33	52,90
8	41,61	38,19
9	146,78	147,71
10	148,70	146,57
11	36,03	37,24
12	42,19	23,22
13	161,63	151,89
14	110,11	118,14
15	130,85	122,57
16	173,03	137,83
17	10,08	9,01
18	113,08	111,79
19	15,45	15,48
20	20,38	20,07

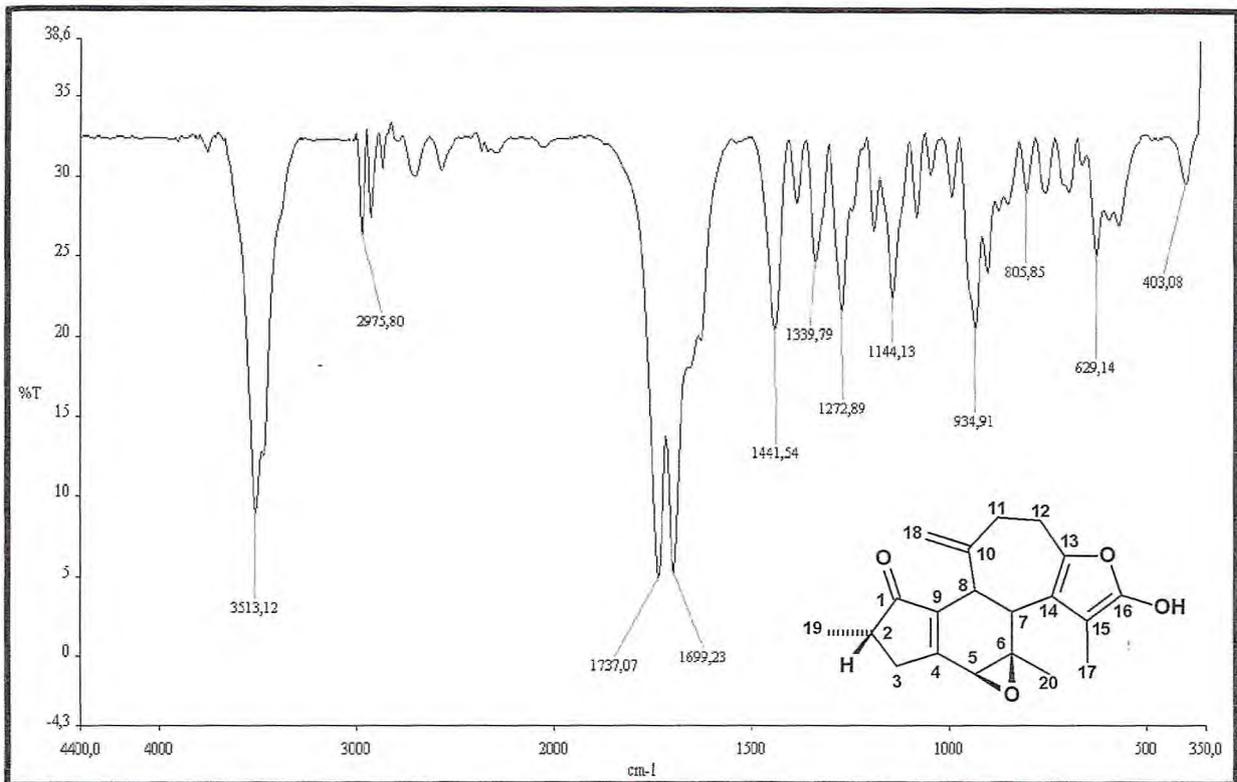


Figura 72 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-11 com pastilhas de KBr.

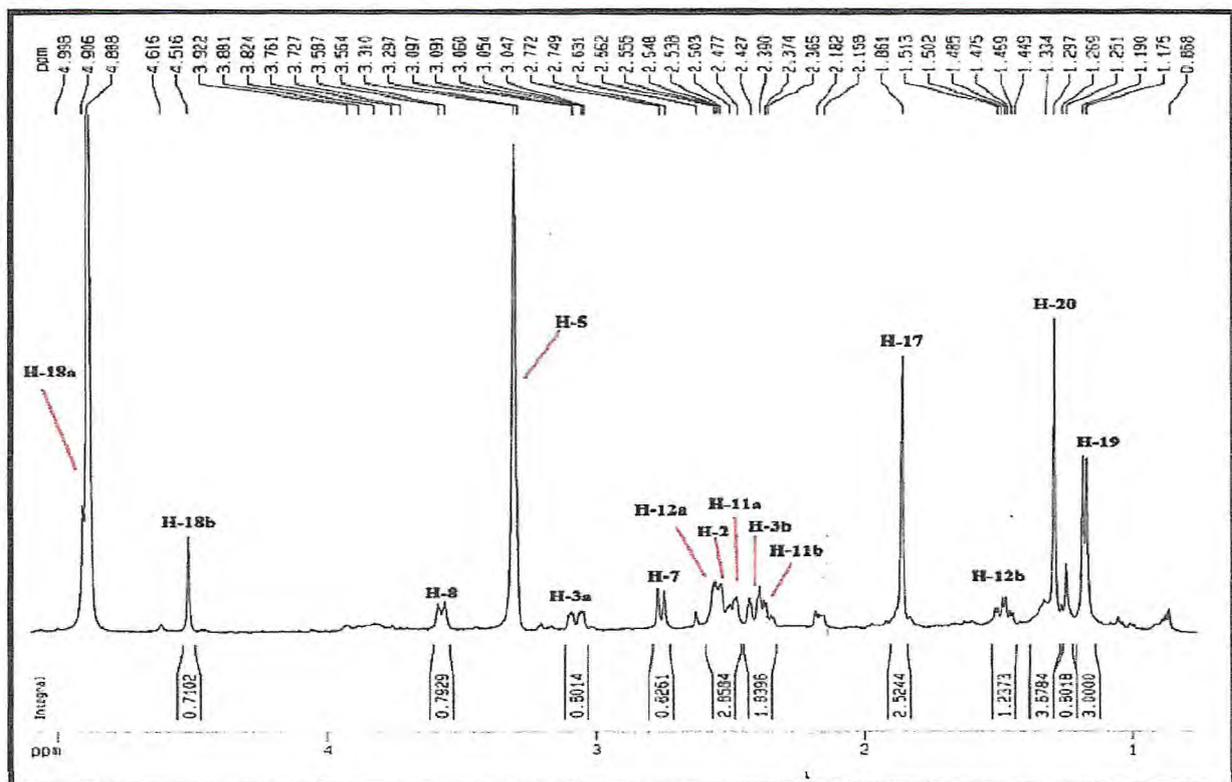


Figura 73 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.

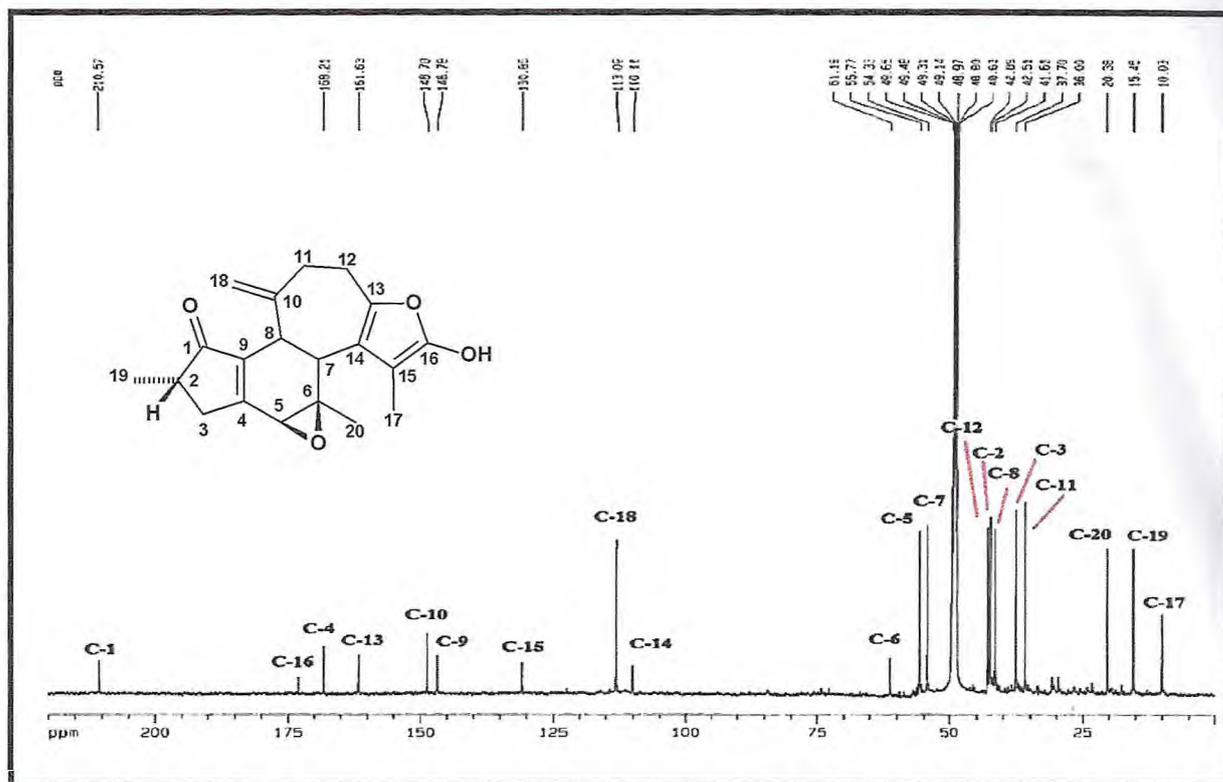


Figura 74 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.

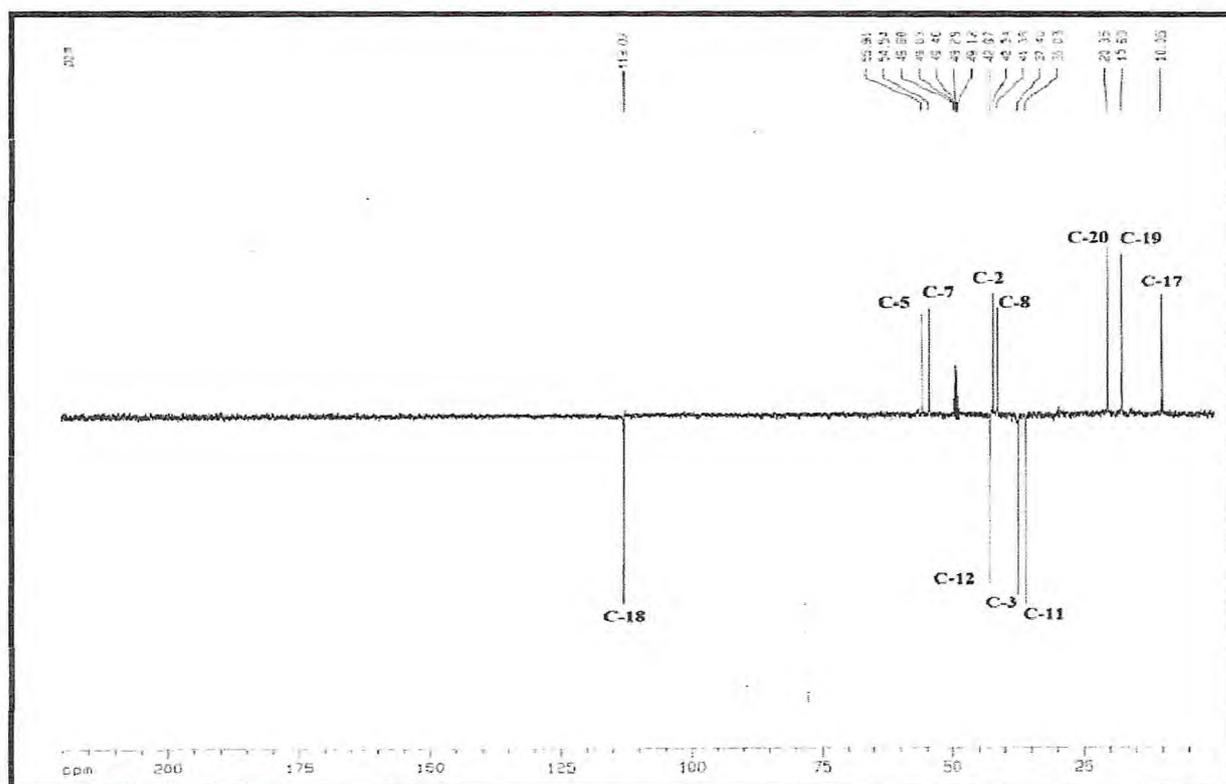


Figura 75 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.

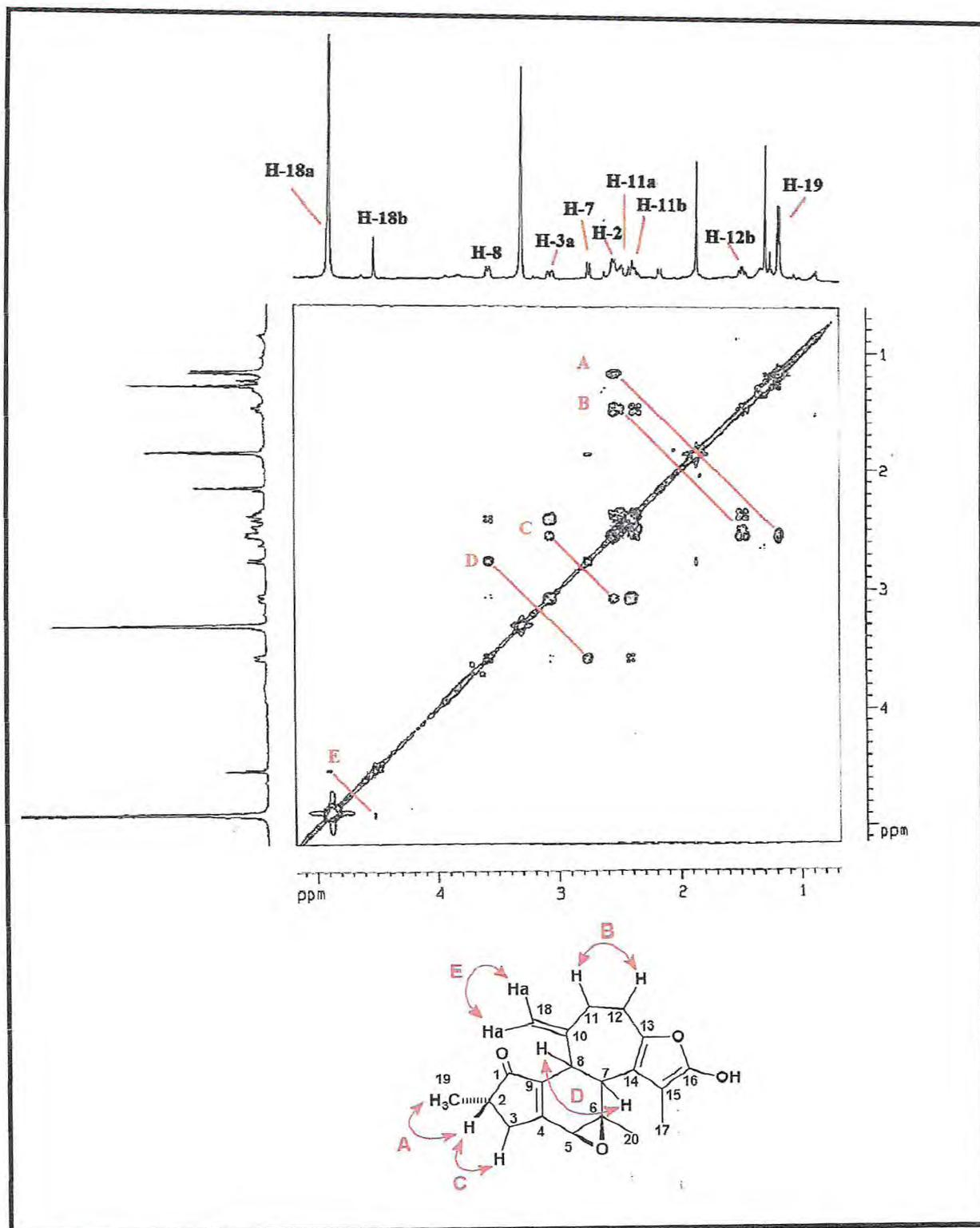


Figura 76 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-11.

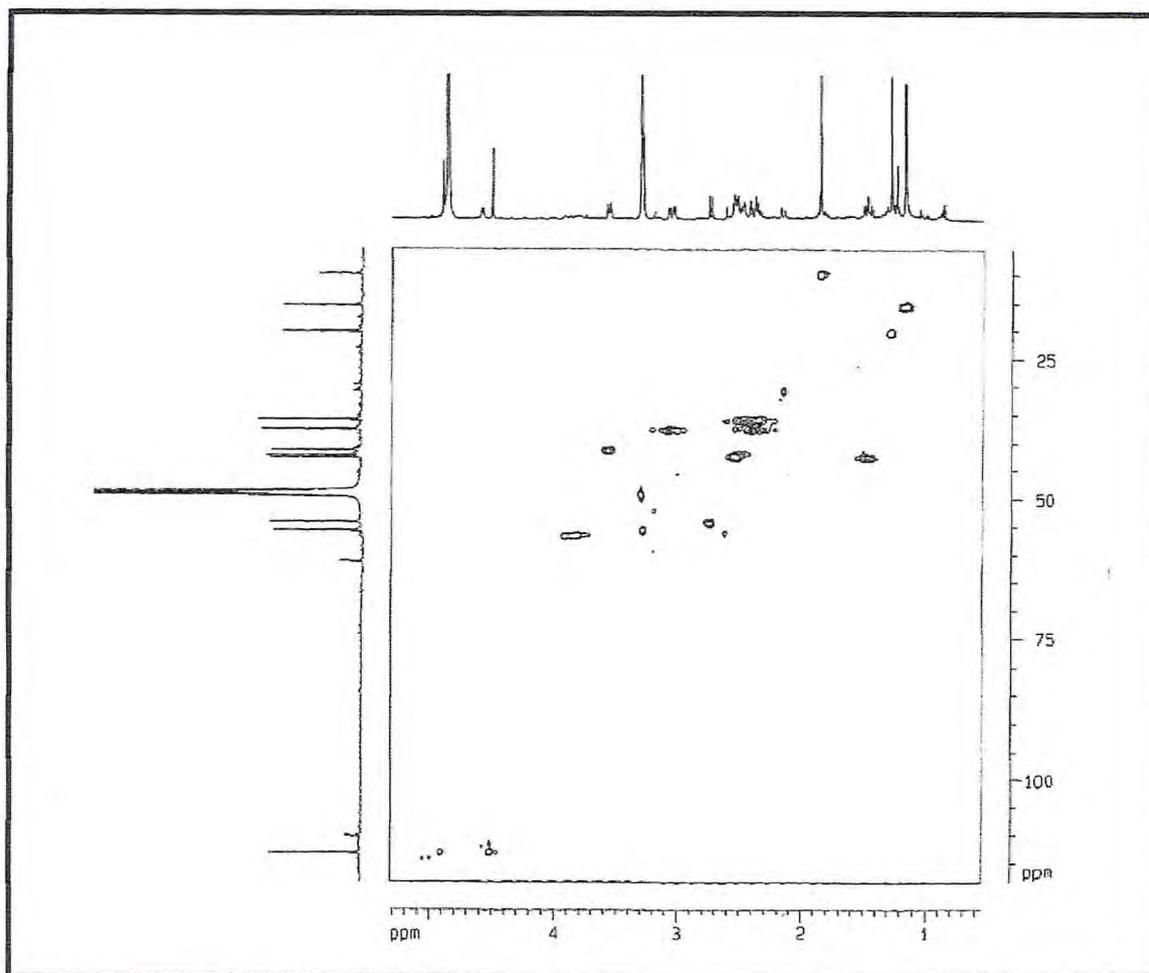


Figura 77 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-11.

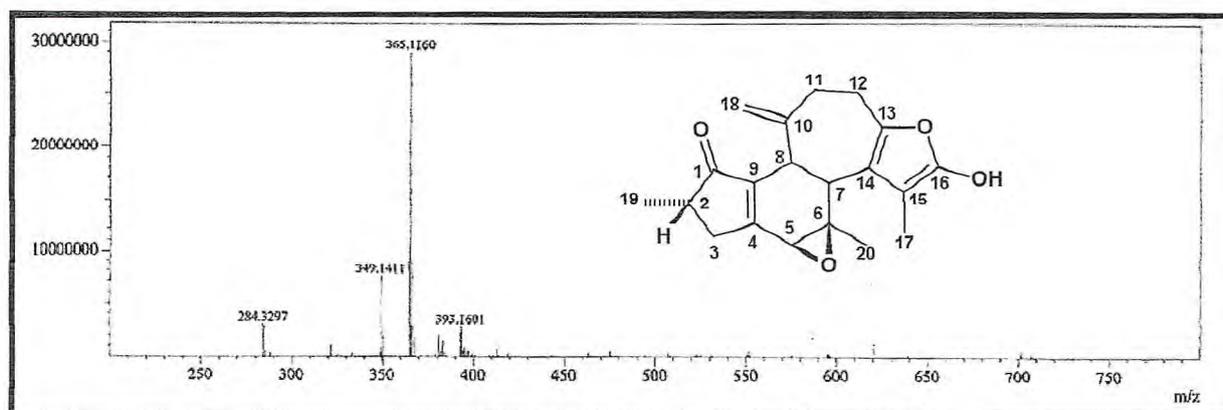


Figura 78 - Espectro de massas de alta resolução HRESIMS de CA-11.

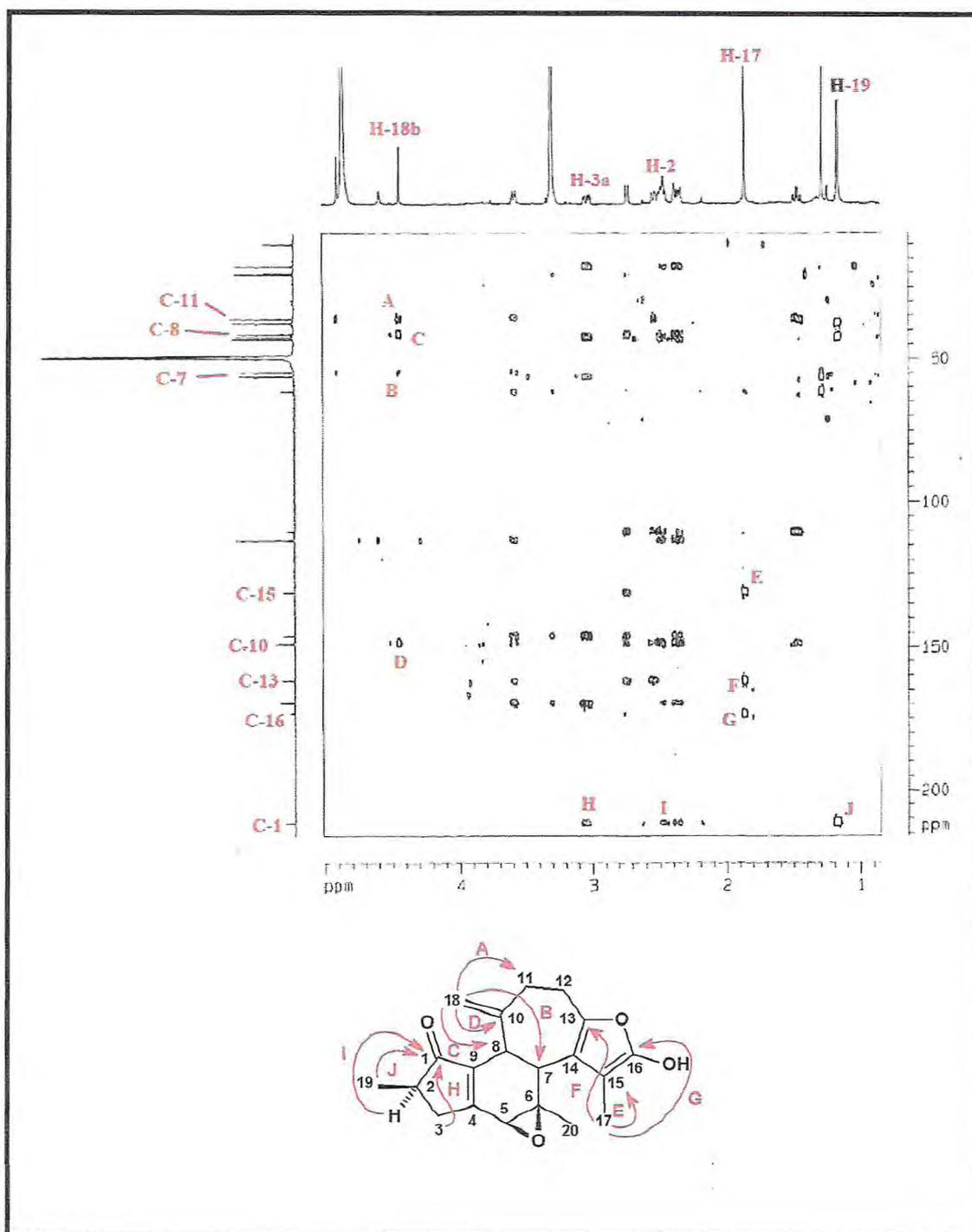


Figura 79 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-11.

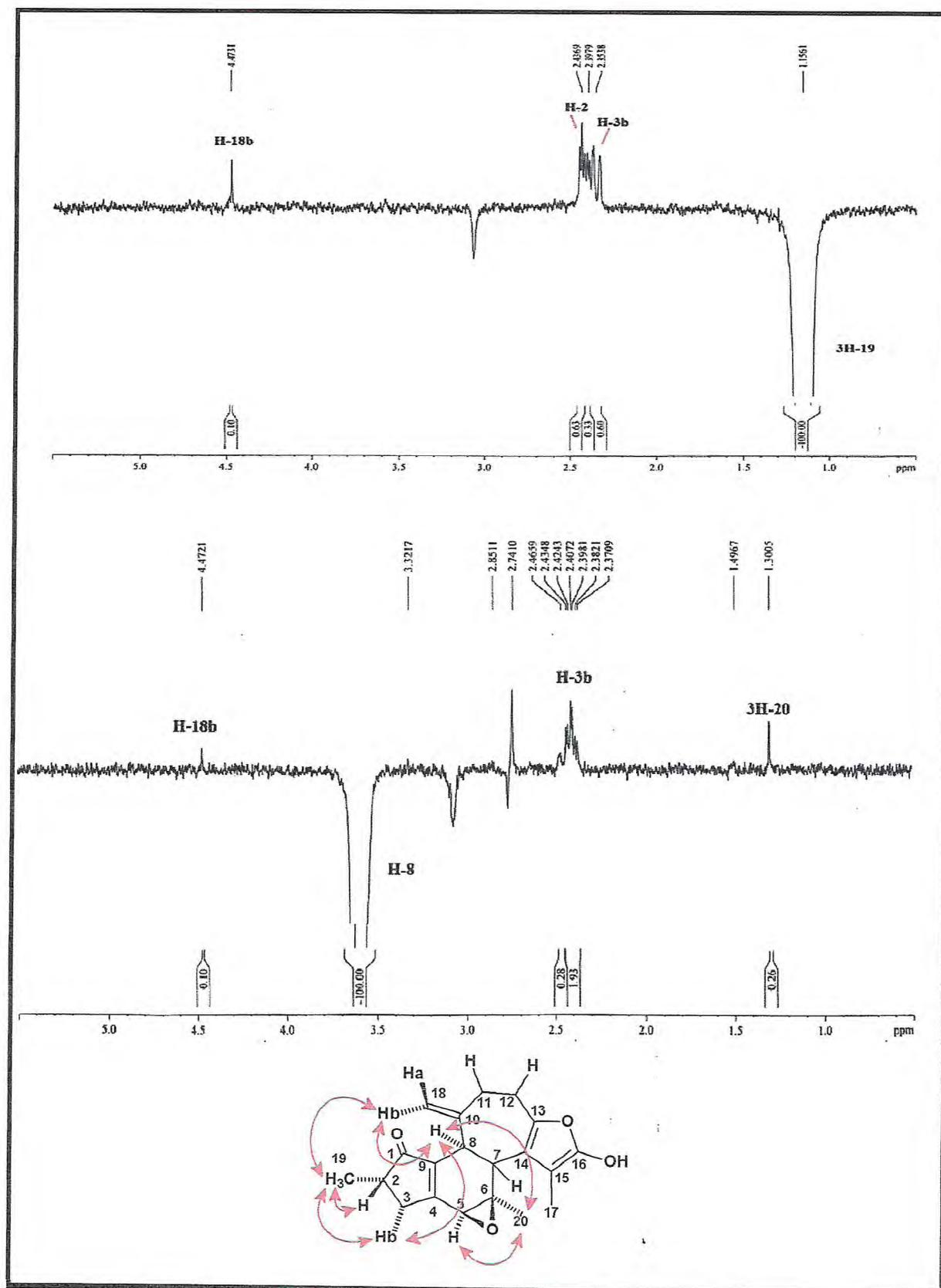


Figura 80 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-11.

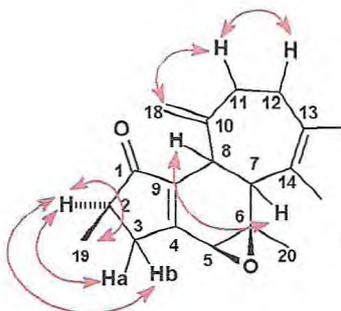
#### 5.2.4 Determinação Estrutural de CA-12

Cromatografia utilizando CLAE da fração acetato de etila, obtida da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de *C. argyrophyllus*, levou à obtenção de um líquido amarelado, com  $[\alpha]_D^{25} = -83,4^\circ$  (c 0,314, MeOH), e denominado de CA-12.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOH, Fig. 82, pág. 153) de CA-12, mostrou grande similaridade ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 83, pág. 153) de CA-11. As diferenças observadas no deslocamento químico no hidrogênio H-2 em  $\delta$  2,47 (m; H-2) de CA-12 para  $\delta$  2,61 (m; H-2) em CA-11; e a multiplicidade do hidrogênio H-3b em  $\delta$  2,42 (ddd;  $J = 1,75; 3,5$  e 17,5 Hz; H-3b) no composto CA-11, para  $\delta$  2,42 (m, H-3b) no composto CA-12, nos levou à sugestão que os compostos são epímeros.

A comparação entre os seus espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, MeOH, Fig. 84, pág. 154 e 125 MHz, MeOH, Fig. 85, pág. 154) apresentaram diferença no deslocamento químico dos carbonos C-4, C-3 e C-19. O carbono C-9 apresentou-se mais protegido em CA-12, passando de  $\delta$  146,78 em CA-11 para  $\delta$  145,85 em C-12. Por outro lado, os carbonos C-4 e C-19 apresentaram-se mais desprotegidos em CA-12, mudando seus deslocamentos de  $\delta$  168,21 (C-4) e 15,45 (C-19) em CA-11, para  $\delta$  169,36 (C-4) e 17,68 (C-19) em CA-12, respectivamente.

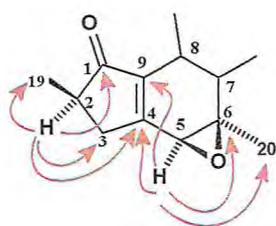
O espectro  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 x 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Fig. 88, pág. 157) revelou as correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,47 (H-2) com os hidrogênios em  $\delta$  1,17 (3H-19), 3,02 (H-3a) e 2,32 (H-3b); e as correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  41,39 (H-8) com o hidrogênio em  $\delta$  2,75 (H-7); bem como a correlação dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  2,51 e 2,38 (2H-11) com os hidrogênios em  $\delta$  2,55, 1,48 (2H-12) e 4,91 e 4,45 (2H-18).



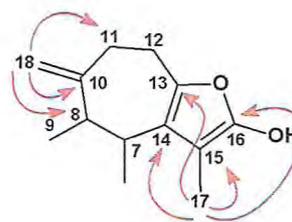
**Fragmento 5.34**

Através da análise no espectro de HMBC (Fig. 89, pág. 158) observou-se a correlação dos hidrogênios da metila em  $\delta$  1,86 (H-17) com os carbonos em  $\delta$  110,15 (C-14), 130,93 (C-

15), 173,03 (C-16) e 161,63 (C-13); bem como as correlações do hidrogênio  $\delta$  2,47 (H-2) com os carbonos em  $\delta$  210,97 (C-1), 37,45 (C-3), 169,36 (C-4) e 17,68 (C-19). Ainda foi possível observar as correlações do hidrogênio em  $\delta$  3,31 (H-5) com os carbonos em  $\delta$  61,21 (C-6); 169,36 (C-4); 145,85 (C-9) e 20,36 (C-20), e dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  4,91 (H-18a) e 4,45 (H-18b) com os carbonos em  $\delta$  148,51 (C-10), 41,39 (C-8) e 36,03 (C-11). Os dados obtidos a partir do HMBC, em conjunto com outras técnicas, permitiu a caracterização do esqueleto crotofolano para CA-12, bem como o posicionamento inequívoco dos grupos oxirano, furano e da dupla exocíclica. (Frag. 5.35 e 5.36).



Fragmento 5.35



Fragmento 5.36

Desta forma, semelhantemente aos compostos CA-1 e C-10, pôde-se propor para CA-12 uma estrutura epímera de CA-11, através da mudança da estereoquímica do carbono C-2, justificado pelos valores do deslocamento químico mais desprotegido para o carbono C-19 em  $\delta$  17,68 (C-19) no composto CA-12 e para o hidrogênio H-2 em  $\delta$  2,47 (H-2) no composto CA-11, ambos em posição pseudoaxial sofrendo efeito de compressão estérica do oxigênio do óxido de etileno nas posições C-5 e C-6 (Fig. 81).

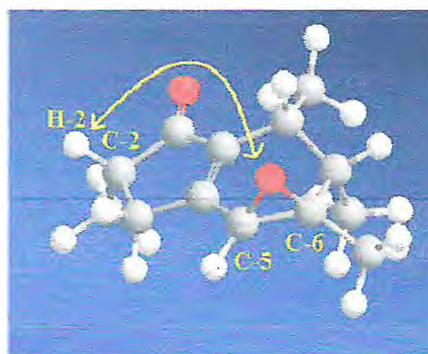
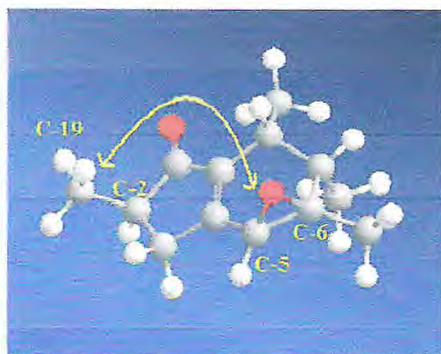
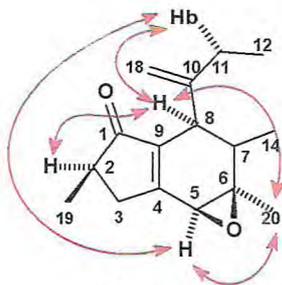


Figura 81 – Compressão estérica sobre C-19 (CA-12), e sobre H-2 (CA-11), respectivamente.

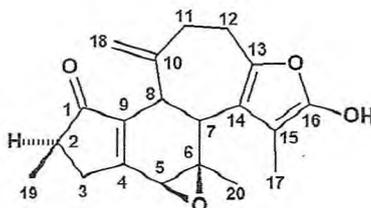
A inversão do centro estereogênico C-2 do composto CA-11, foi ainda comprovada pelo experimento de RMN unidimensional NOEDiff (Fig. 86, pág. 155). A irradiação seletiva na frequência do hidrogênio H-5 ( $\delta$  3,31) apresentou acréscimo nos sinais dos

hidrogênios H-11b ( $\delta$  2,38) e 3H-20 ( $\delta$  1,30), bem como a irradiação seletiva na frequência do hidrogênio H-8 ( $\delta$  3,59) mostrou um aumento de intensidade nos sinais dos hidrogênios H-2 ( $\delta$  2,48), H-11b ( $\delta$  2,38), 3H-20 ( $\delta$  1,30) e H-18b ( $\delta$  4,45), respectivamente.



Fragmento 5.33

Os dados obtidos confirmam para CA-12 uma estrutura diterpênica de esqueleto crotofolano de caráter inédito na literatura, proveniente da hidroxilação do carbono C-16 de CA-1, portanto, epímero de CA-11 (Tab. 5.24, pág. 178), denominado de 16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano (16-hidroxi-crotomicansin) (5.13).



16-Hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano  
(5.13)

**Tabela 42** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

#C	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	210,97	-	H-2	2H-3; 3H-19
2	42,15	2,47 (m; 1H)	2H-3; 3H-19	-
3	37,45	3,05 (ddd; $J = 3,5; 6,5$ e $17,5$ Hz; 1Ha) 2,38 (ddd; $J = 1,75; 3,5$ e $17,5$ Hz; 1Hb)	-	3H-19
4	169,36	-	2H-3; H-5	H-2; H-8
5	55,91	3,31 (s; 1H)	-	2H-3; 3H-20
6	61,21	-	3H-20	H-8
7	54,54	2,75 (dd; $J = 1,3$ e $12,0$ Hz; 1H)	H-8	-
8	41,39	3,59 (td; $J = 3,5$ e $12,0$ Hz; 1H)	H-7	2H-18
9	145,85	-	H-8	2H-3; H-5; H-7
10	148,51	-	H-8; 2H11;	H-7; 2H-12
11	36,03	2,51 (m; 1Ha) e 2,38 (m; 1Hb)	2H-12	H-8; 2H-18
12	42,98	2,55 (ddd; $J = 3,0; 4,5$ e $13,5$ Hz; 1Ha) 1,48 (dt; $J = 8,5$ e $13,5$ Hz; 1Hb)	2H-11	-
13	161,63	-	2H-12	H-7
14	110,15	-	H-7	2H-12
15	130,93	-	3H-17	H-7
16	173,03	-	-	3H-17
17	10,05	1,86 (d; $J = 1,0$ Hz; 3H)	-	-
18	113,02	4,91 (s; 1Ha) e 4,45 (s; 1Hb)	-	H-8; 2H-11
19	17,68	1,17 (d; $J = 8,0$ Hz; 3H)	H-2	2 H-3
20	20,36	1,30 (s; 3H)	-	H-5

**Tabela 43** – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-12 com os do composto CA-11 e CA-1,  $\delta$  (ppm).

#C	CA-12 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	CA-11 (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	CA-1 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )
1	210,97	210,57	207,49
2	42,15	42,51	41,47
3	37,45	37,70	36,84
4	169,36	168,21	167,51
5	55,91	55,77	54,87
6	61,21	61,19	60,69
7	54,54	54,33	53,10
8	41,39	41,61	37,98
9	145,85	146,78	146,72
10	148,51	148,70	146,27
11	36,03	36,03	37,26
12	42,98	42,19	23,19
13	161,63	161,63	151,88
14	110,15	110,11	118,11
15	130,93	130,85	122,58
16	173,03	173,03	137,84
17	10,05	10,08	9,02
18	113,02	113,08	111,79
19	17,68	15,45	17,57
20	20,36	20,38	20,03

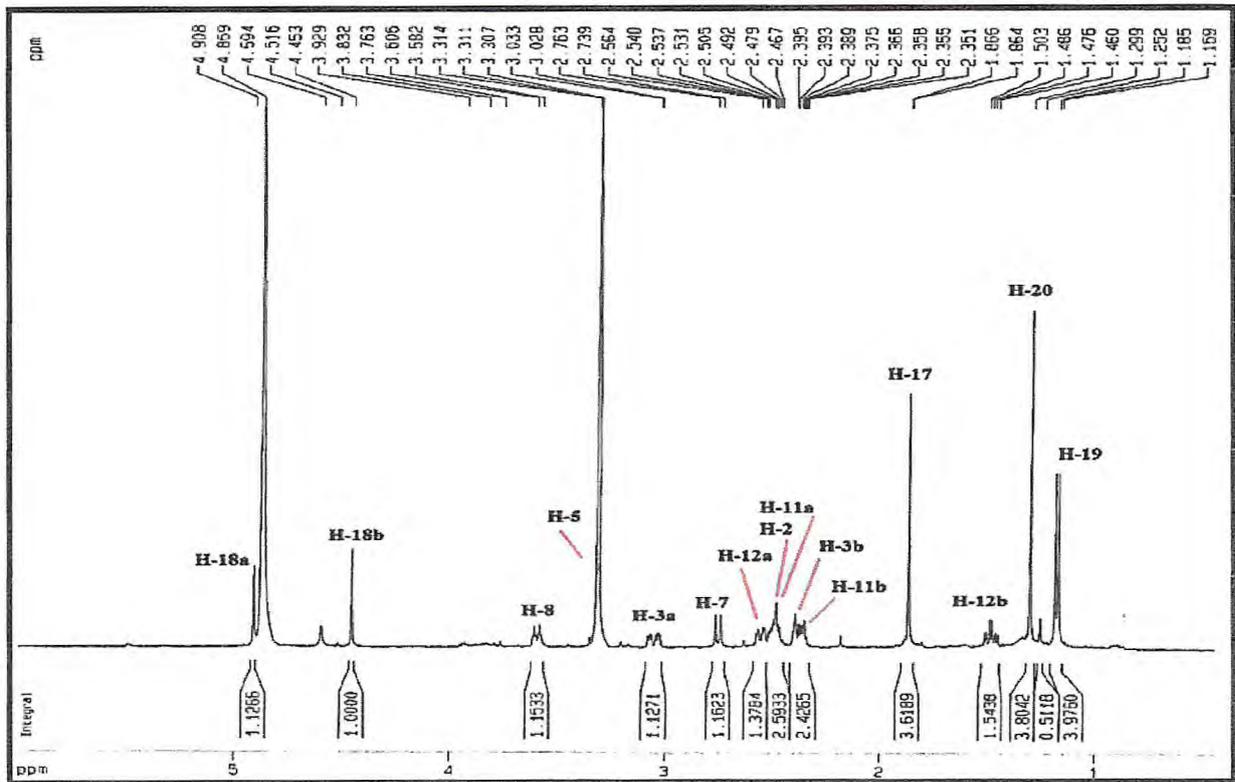


Figura 82 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12.

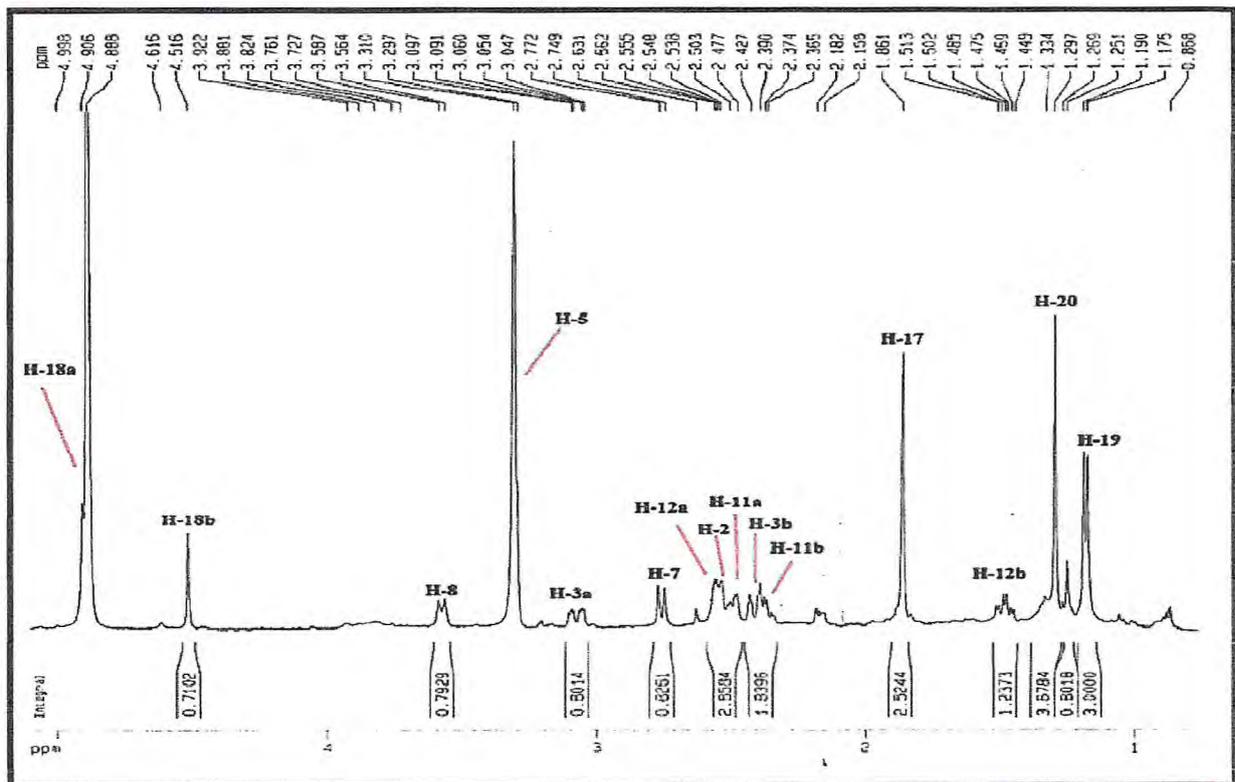


Figura 83 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.

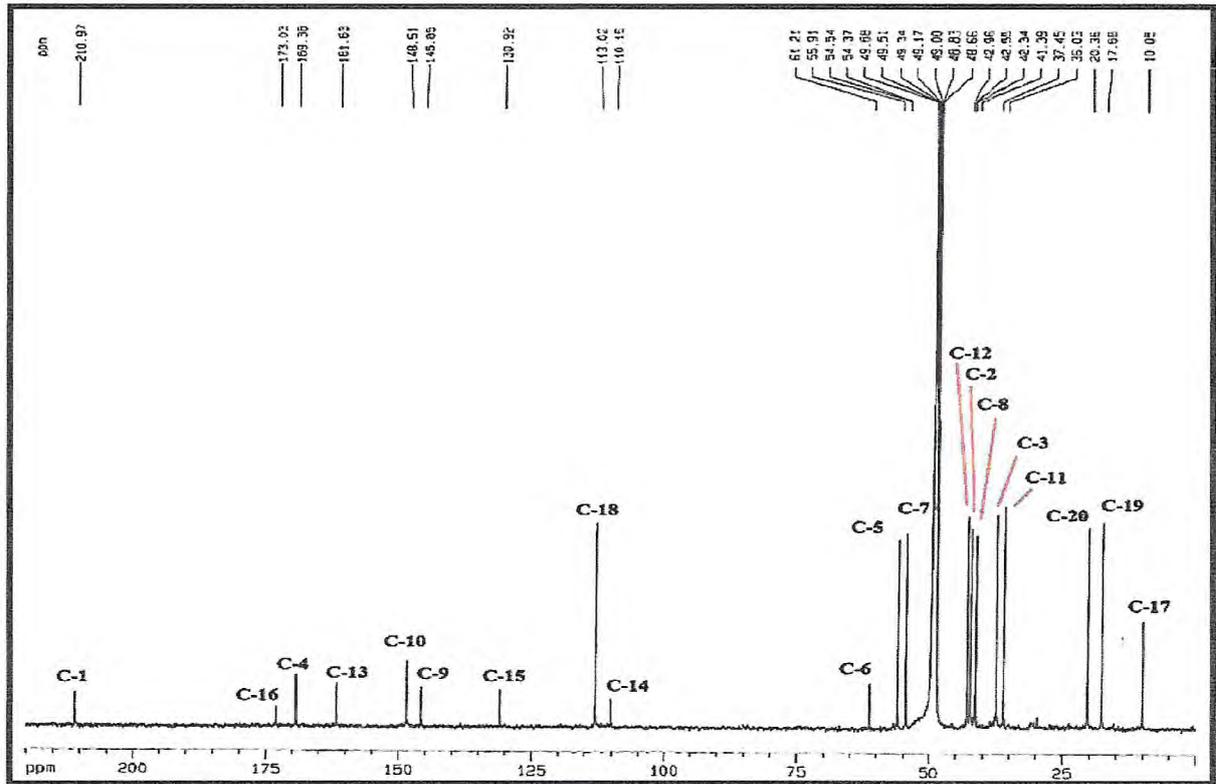


Figura 84 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-12.

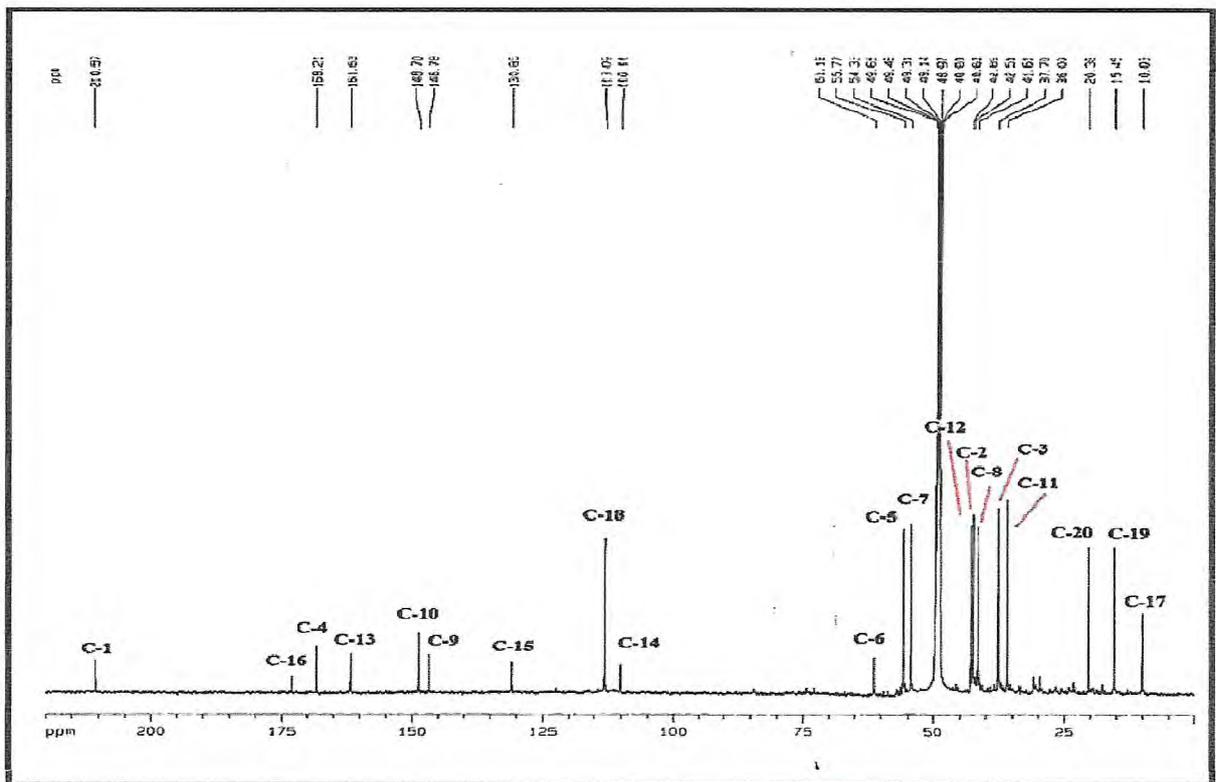


Figura 85 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de CA-11.

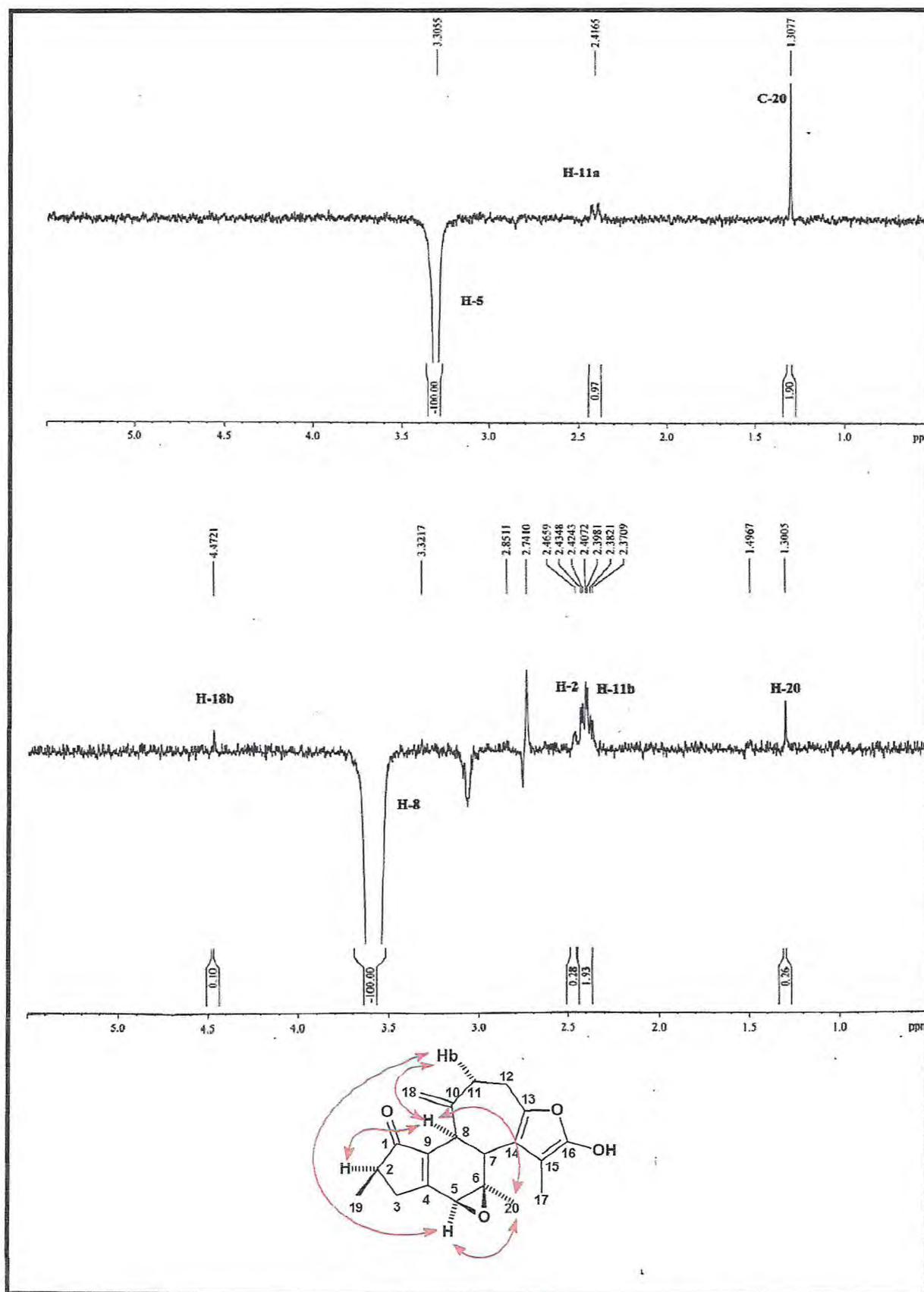


Figura 86 – Espectro de RMN unidimensional NOEDiff de CA-12.

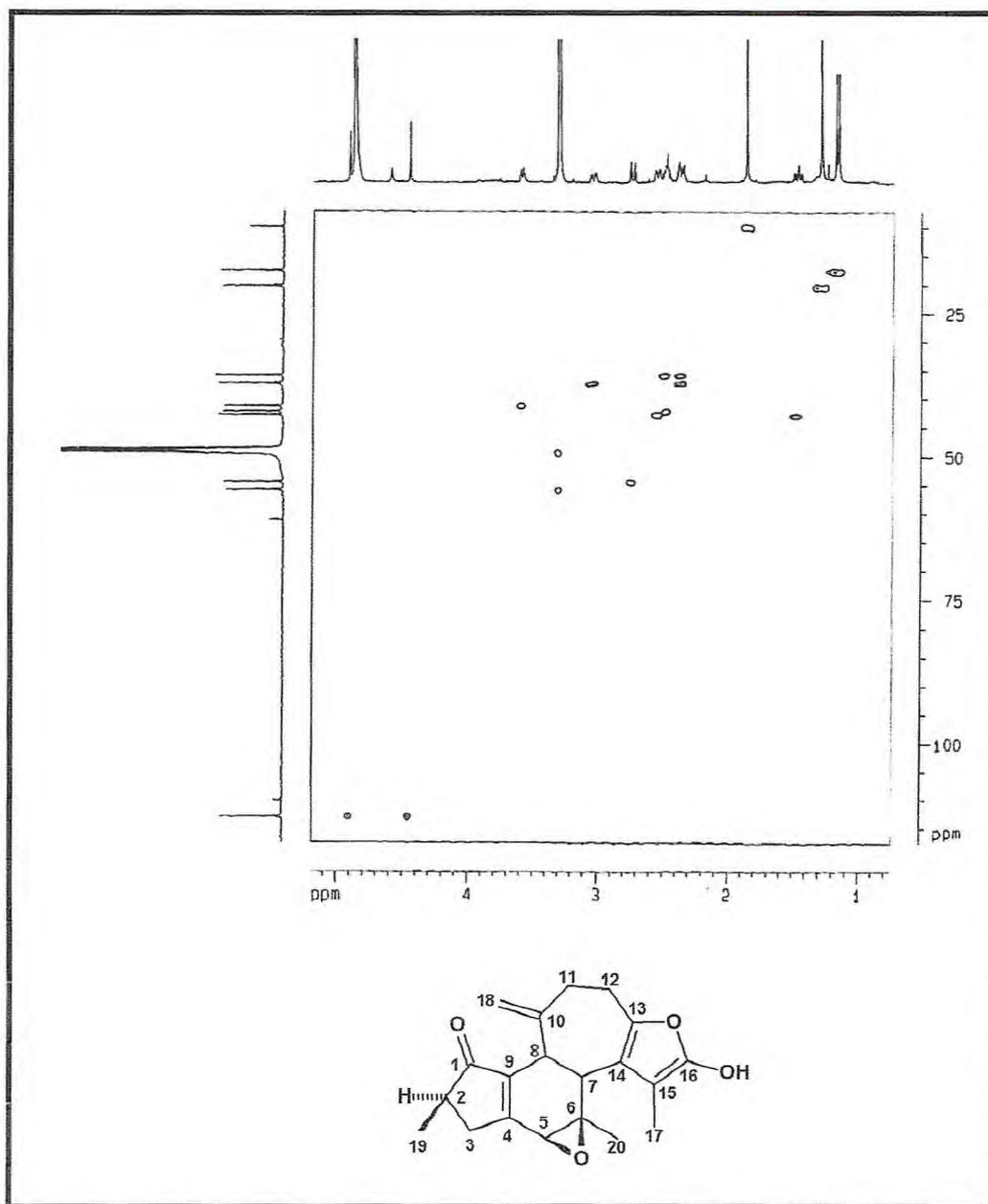


Figura 87 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-12.

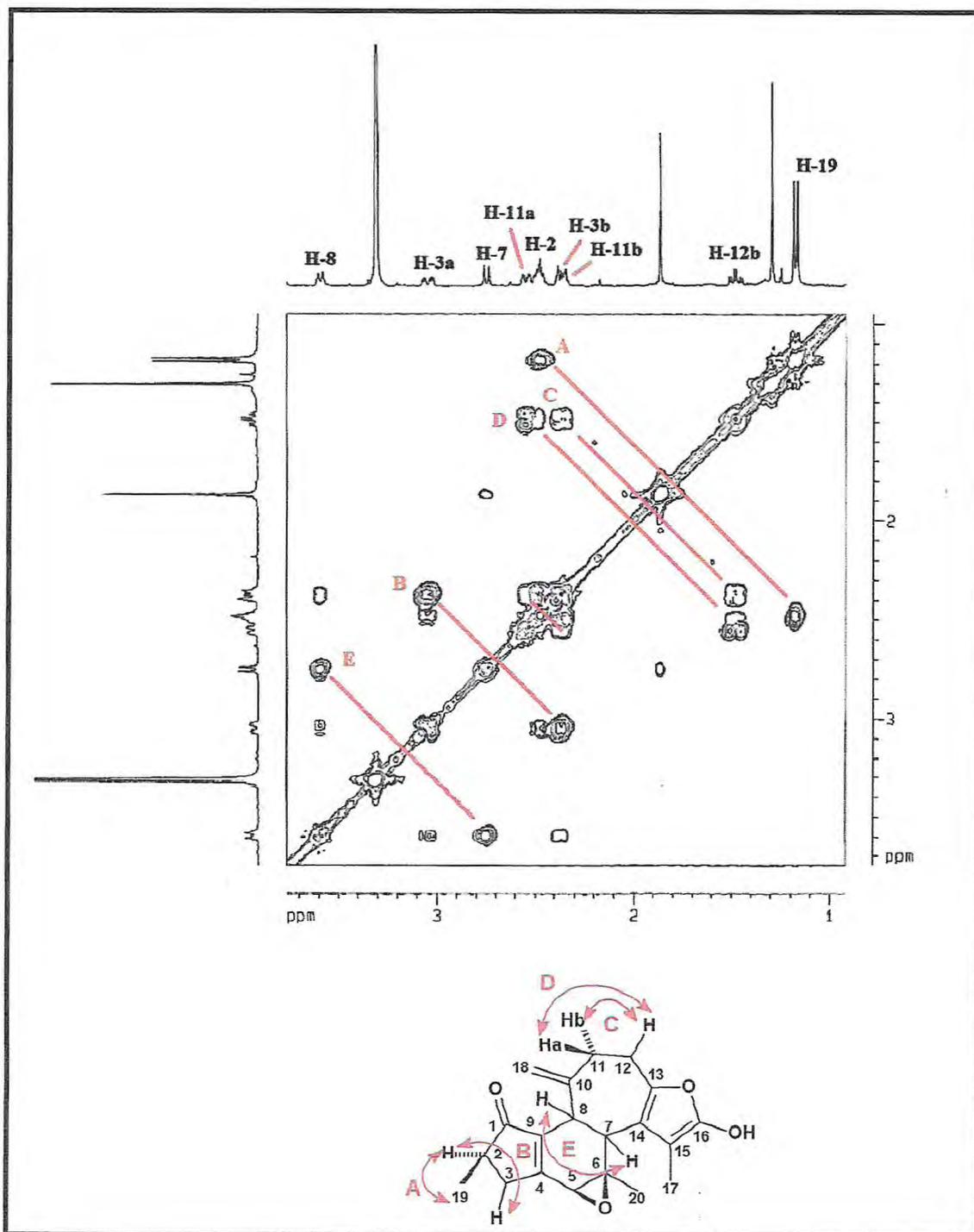


Figura 88 – Espectro e expansão de RMN bidimensional COSY de CA-12.

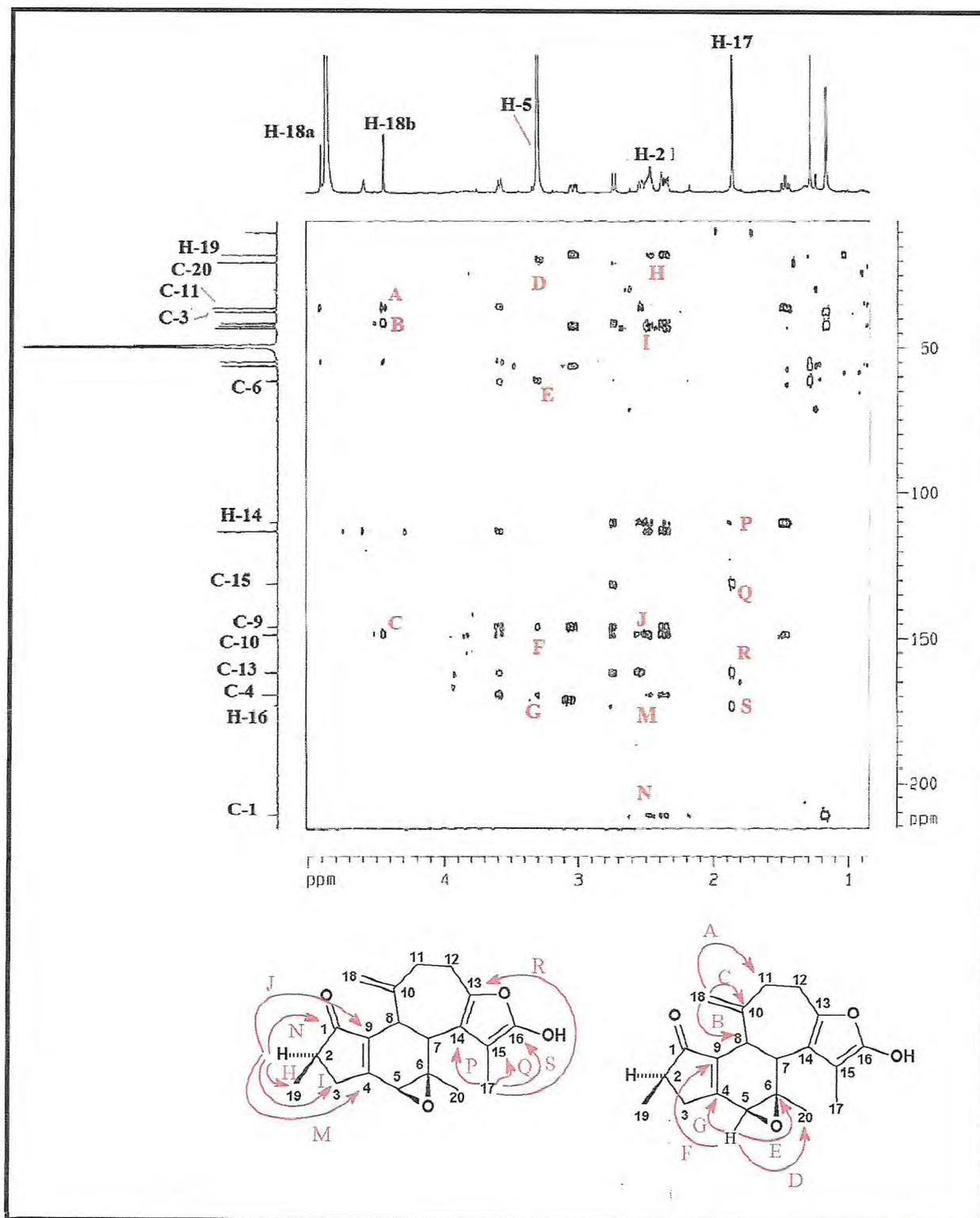


Figura 89 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-12.

### 5.2.5 Determinação Estrutural de CA-8

Tratamento cromatográfico da fração diclorometano, obtido a partir da coluna filtrante do extrato hexânico da raiz de *C. argyrophyllus*, resultou no isolamento de cristais em forma de agulhas, com ponto de fusão na faixa de 284,3 – 286,1 °C, que foi denominada de CA-8.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Fig. 90, pág. 166) de CA-8 revelou seis sinais relacionados a sete grupamentos metilas em δ 0,86 (s, 3H-23), 0,89 (s, 3H-24), 0,96 (s, 3H-25), 0,96 (s, 3H-26), 0,93 (s, 3H-27), 0,95 (s, 3H-29), 0,92 (s, 3H-30), além do sinal em δ 2,0 (s, 3H-32) relativo a uma metila de um grupamento acetila. Além disso, foram ainda visualizados sinais característicos de hidrogênio ligado a carbonos olefinico em δ 5,53 (dd, J = 3,2; 7,8 Hz, H-15), e um hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ 4,47 (dd, J = 5,7; 10,6 Hz, H-3).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-CPD (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-8 (Fig. 91, pág. 166) apresentou trinta e duas linhas espectrais. Dentre os sinais observados, foram identificados dois carbonos insaturados, um não-hidrogenado e outro mono-hidrogenado (δ 160,79 e 117,09), respectivamente, além de um carbono oximetínico (δ 81,13), e sinais referentes a duas carbonilas, (δ 184,46 e 171,24). A análise comparativa dos espectros de RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>13</sup>C- DEPT 135 permitiu identificar a presença de oito carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e nove carbonos não-hidrogenados (Tab 44, pág. 161).

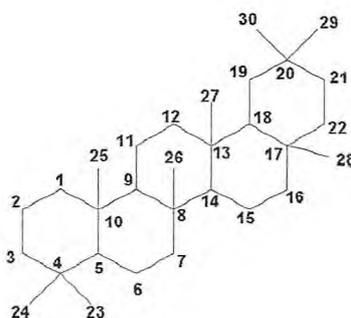
A partir dos dados obtidos pôde-se propor a fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>, com IDH igual a oito, em acordo com o sinal do íon molecular observado no espectro de massa em *m/z* 498 Da (Fig. 93, pág. 167).

Comparação com os dados da literatura para classes de triterpenos pôde-se sugerir para CA-8 uma estrutura de triterpeno pentacíclico do tipo oleanano (5.14).

**Tabela 44** - Deslocamentos Químicos de RMN <sup>13</sup>C de CA-8 por Padrão de Hidrogenação.

CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	C	Total
32,10	41,01	117,09 (C=C)	184,46 (COOH)	
28,88	37,64	81,13 (C-O)	171,20 (C=O)	
28,19	35,59	55,85	160,79 (C=C)	

26,43	33,92	49,33	51,73	
22,70	33,57	41,65	39,27	
21,50	31,56		38,19	
16,82	30,97		37,92	
15,87	27,70		37,56	
	18,98		29,53	
	17,55			
<b>C<sub>8</sub>H<sub>24</sub></b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub></b>	<b>C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O</b>	<b>C<sub>9</sub>HO<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub></b>



#### 5.14

Analisando a correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio HSQC pôde-se associar todos os sinais dos hidrogênios a seus respectivos carbonos, de modo inequívoco (Fig. 5.87, pág. 168).

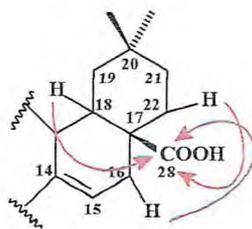
Através do espectro de HMBC (Fig. 95, pág. 169) foi possível identificar a exata posição do grupamento éster metílico foi determinada, através da concomitante correlação dos sinais do hidrogênio em  $\delta$  4,47 (1H-3), e da metila em  $\delta$  2,04 (3H-32) com o sinal do carbono carbonílico em  $\delta$  171,20. Outras importantes correlações foram observadas entre o hidrogênio metínico em  $\delta$  0,86 (1H-5), dos grupos metilas em  $\delta$  0,86 (3H-23) e 0,89 (3H-24), e dos hidrogênios metilênico em  $\delta$  1,60 (2H-1) e  $\delta$  1,63 (2H-2) com o carbono oxigenado em  $\delta$

81,13 (C-3), o que confirmou a posição do grupo éster ligado a C-3 do esqueleto oleanano (Frag. 5.37).



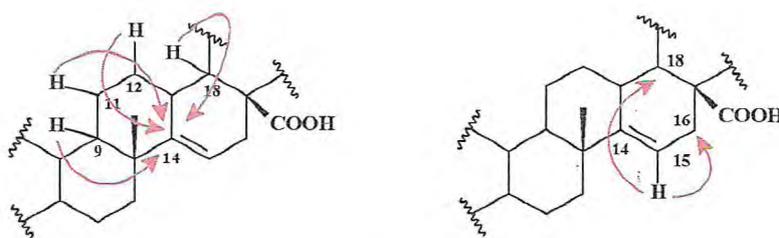
**Fragmento 5.37**

As correlações dos hidrogênios em  $\delta$  1,44 (2H-22), 2,26 (1H-18) e 2,38 (2H-16) com a carbonila em  $\delta$  184,46 (C-28), possibilitaram identificar a localização da carbonila do ácido carboxílico ligado ao carbono C-17 (Frag. 5.38).



**Fragmento 5.38**

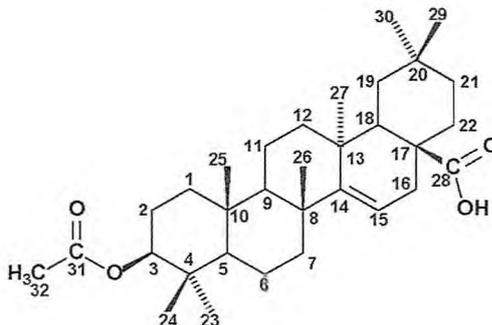
A posição da dupla ligação trissubstituída foi determinada através da correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,53 (H-15) com os carbonos em  $\delta$  41,65 (C-18), 31,56 (C-16) e dos hidrogênios  $\delta$  2,26 (H-18), 1,63 (H-12), 1,63 (H-11) e 1,41 (H-9) com o carbono  $\delta$  160,79 (C-14) (Frag. 5.39), respectivamente.



**Fragmento 5.39**

Analisando todos os dados espectroscópicos obtidos e comparando-os com dados descritos na literatura para triterpenos oleananos [MCCLEAN, S. *et al*, 1987], pôde-se

determinar que CA-8 se trata do ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico, também denominado de ácido acetil aleuritólico (AAA) (5.15). Este composto já possui ocorrência no gênero *Croton*, nas espécies *Croton cajucara* e *Croton urucurana* [SALATINO; FARIAS; NEGRI, 2007].



Ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico (5.15)

**Tabela 45** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC e HMBC.

#C	HSQC*		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	37,64	1,60 (t; 2H)		
2	23,71	1,63 (t; 2H)	2H-1	1H-3
3	81,13	4,47 (dd; 1H)	2H-2	1Hb-6, 2H-1, 3H-5, 3H-24
4	37,56	-	H-3, 3H-24, 3H-23	1H-6B, 3H-25
5	55,85	0,86(s; 1H)	Hb-6, Ha-6	1H-3, 3H-24, 3H-23
6	18,98	1,65 (m; 1Ha); 1,50 (m; 1Hb)	H-5	-
7	41,01	1,96 (d; 1Ha); 1,30 (m; 1Hb)	Ha-6	1H-15, 2H-11, H-9, 1H-5
8	39,28	-	Ha-7, 3H-26	1Hb-12, 3H-25,
9	49,33	1,41(d; 1H)	Ha-11, Hb-11	2H-12, Ha-6, 2H-2, 2H-1
10	37,64	-	H-5	2H-2, 2H-12, 2H-1
11	17,55	1,63 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	1Ha e b-12, 1H-9	3H-25, 3H-26, 1H-5
12	33,57	1,78 (d; 1Ha); 1,63 (m; 1Hb)	Hb-11	1H-18, 1Ha-19, H-9, 3H-29
13	38,19	-	1H-18, 1Hb-12, 3H-27	1H-15, 1Ha-11, 1H-9, 3H-26
14	160,79	-	-	1H-18, 1Ha-11, 1Hb-12, 1H-9
15	117,09	5,53 (m; 1H)	1Hb-16	1H-18
16	31,56	2,38 (m; 1Hb); 1,92 (m; 1Ha)	1H-15	1Hb-22, 2H-19, 2H-21
17	51,73	-	1Hb-16, 1Hb-22	1Ha-19
18	41,65	2,26(d; 1H)	1Hb-19, 1Ha-19	2H-16, Ha-22, 3H-29, 3H-30
19	35,59	1,25 (t; 1Ha), 1,14 (m; 1Hb)	1H-18	1Ha-21, 3H-29, 3H-30
20	29,53	-	Ha e b-19, 1Ha-21	1H-18, Ha-22
21	33,92	1,18 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	1Ha e b-22	1Ha-19, 3H-29, 3H-30
22	30,95	1,69 (m; 1Ha); 1,44 (m; 1Hb)	Ha e b-21	2H-16, 2H-19, 3H-29, 3H-30
23	28,19	0,86 (s; 3H)	3H-24, 1H-5	1H-3
24	16,82	0,89 (s; 3H)	3H-23, 1H-5	1H-3, 2H-2
25	15,87	0,96 (s; 3H)	-	1H-9, 1H-5
26	26,43	0,96 (s; 3H)	-	1Ha-7, 1Ha-11, 1H-9
27	22,70	0,93 (s; 3H)	-	1H-18, 1Ha-12, 1Hb-19
28	184,46	-	-	1Ha-16, 1H-18, 1Hb-22
29	32,10	0,95 (s; 3H)	3H-30	1Hb-22, 1Hb-19, 2H-21
30	28,88	0,92 (s; 3H)	3H-29	1H-18, 2H-22, Hb-19, Hb-21
31	171,20	-	3H-32	1H-3
32	21,50	2,04 (s; 3H)	-	-

**Tabela 46** - Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-8 com os dados descritos na literatura para o ácido acetil aleuritólico [MCCLEAN; DUMONT; REYNOLDS, 1987].

#C	CA-8 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Ácido Acetil Aleuritólico (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	37,6	37,3
2	23,7	23,3
3	81,1	80,7
4	37,5	37,6
5	55,8	55,5
6	18,9	18,7
7	41,0	40,6
8	38,1	38,9
9	49,3	48,9
10	37,6	37,8
11	17,5	17,2
12	33,5	33,2
13	38,1	37,2
14	160,7	160,5
15	117,0	116,8
16	31,5	31,2
17	51,7	51,4
18	41,6	41,3
19	35,5	35,2
20	29,5	29,2
21	33,9	33,6
22	30,9	30,6
23	28,1	27,8
24	16,8	16,5
25	15,8	15,6
26	26,4	26,1
27	22,7	22,4
28	184,4	184,2
29	32,1	31,8
30	28,8	28,6
31	171,2	170,9
32	21,5	21,2

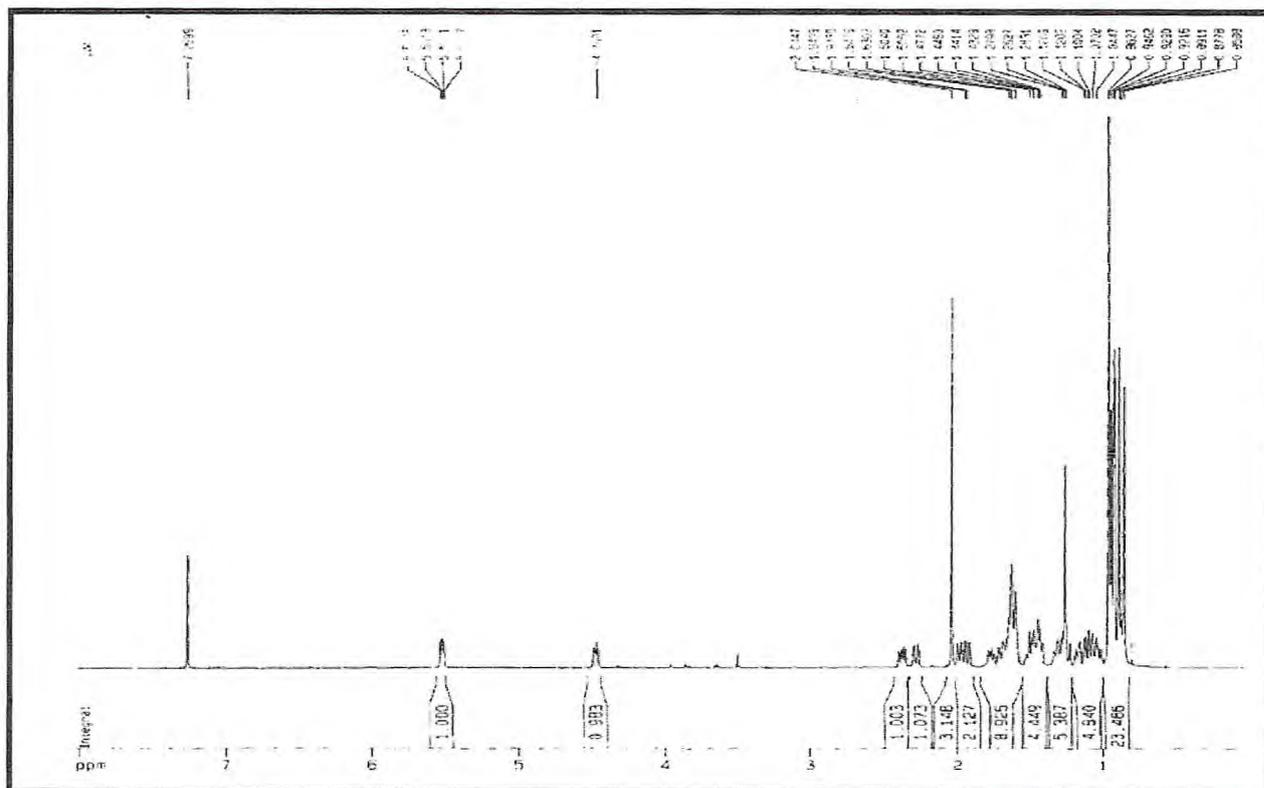


Figura 90 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8

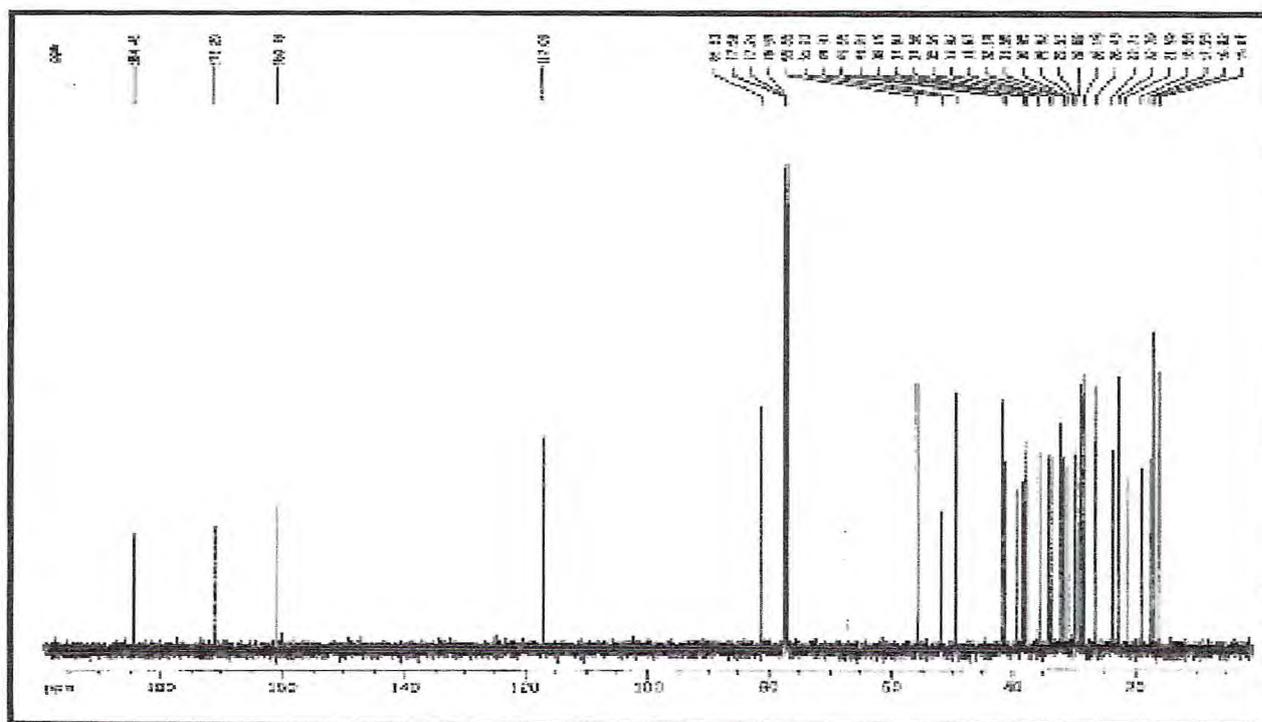


Figura 91 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.

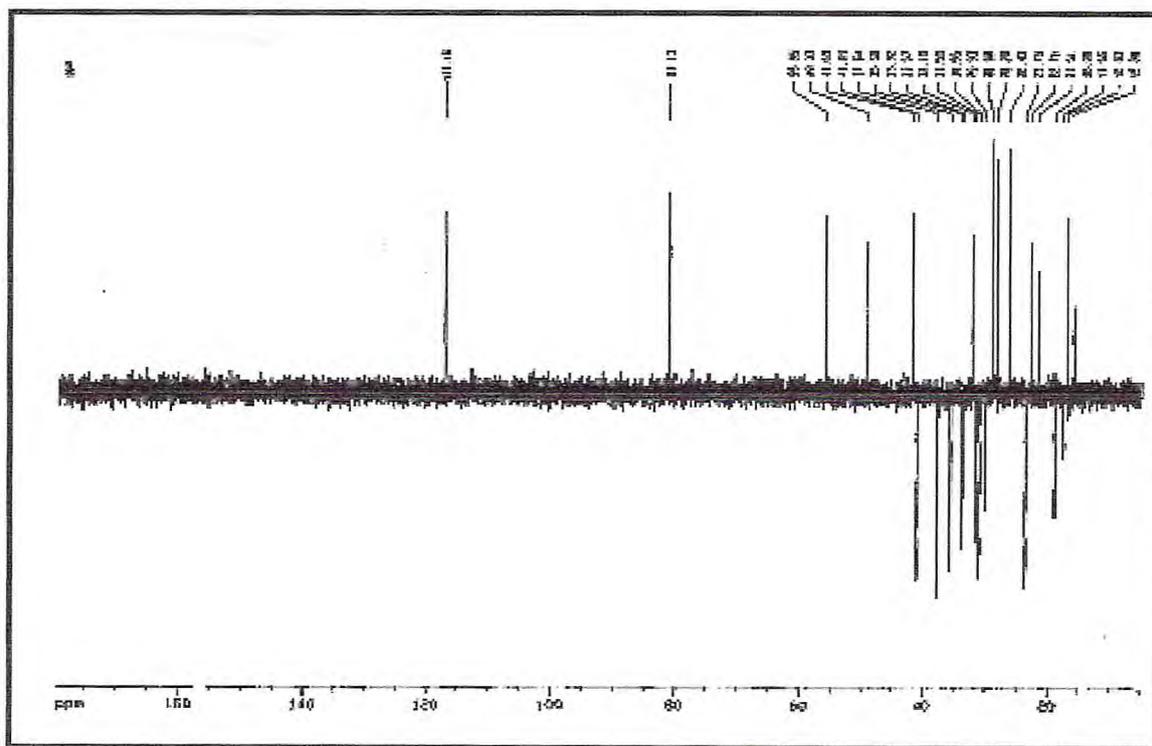


Figura 92 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-8.

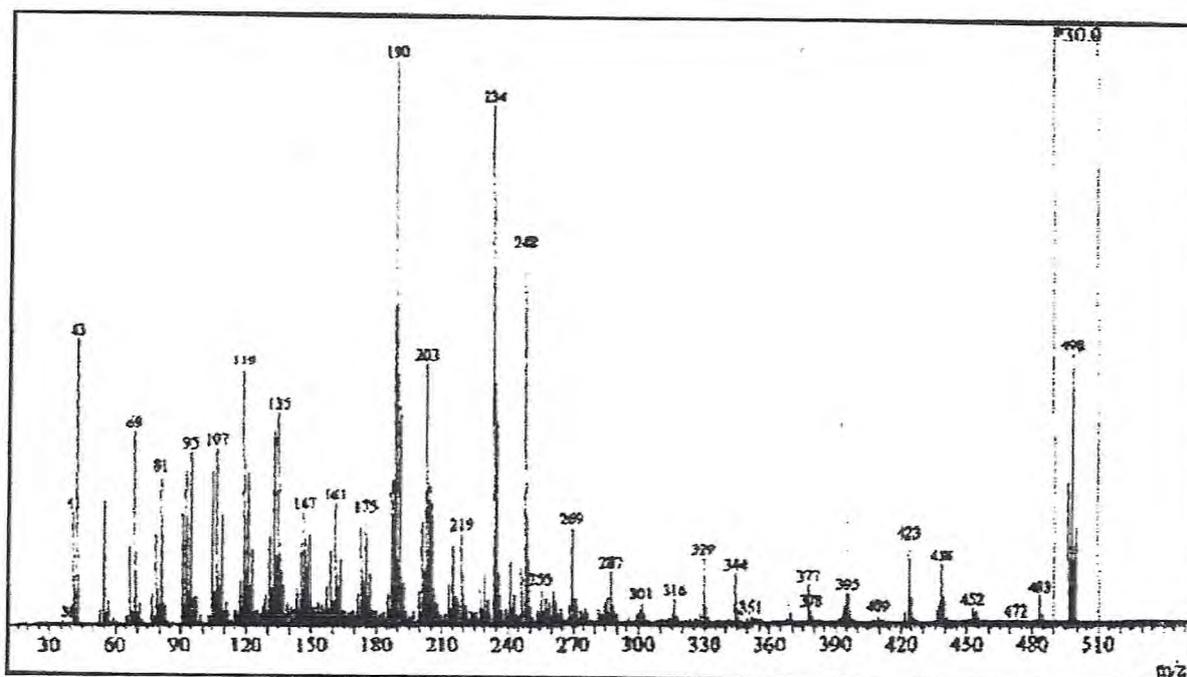


Figura 93 – Espectro de massa de CA-8 (ionização eletrônico a 70 eV).

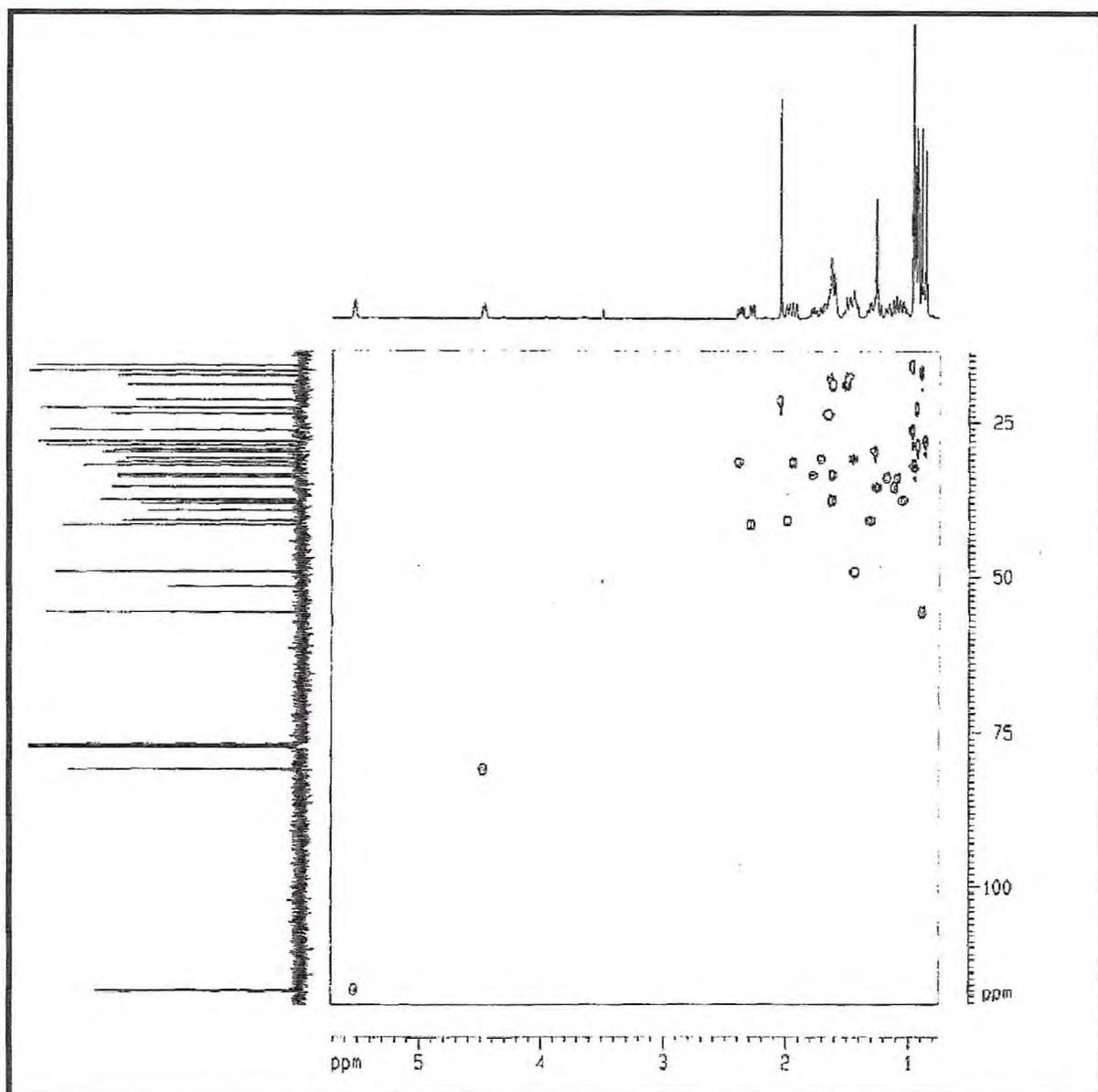


Figura 94 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de CA-8.

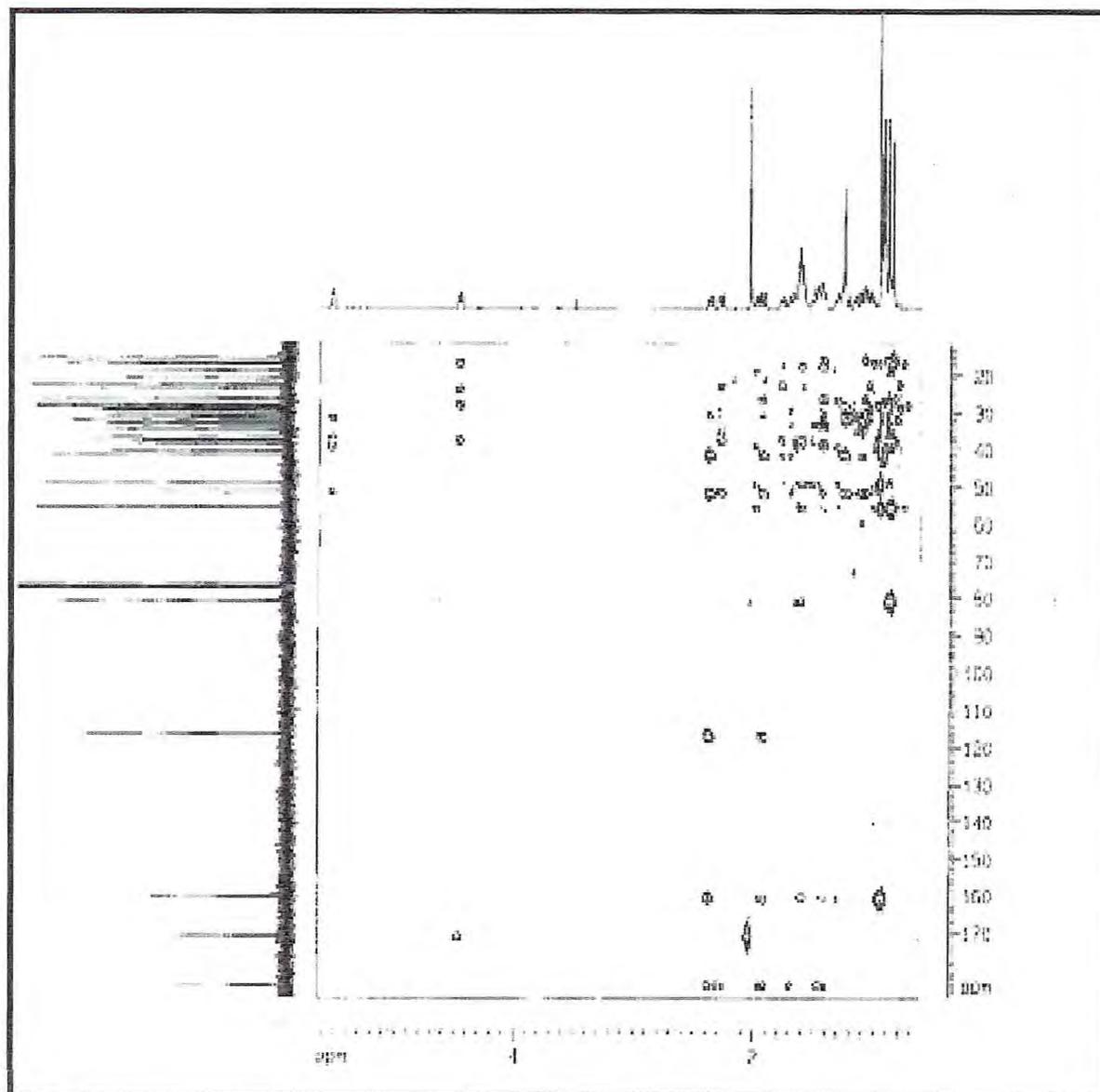
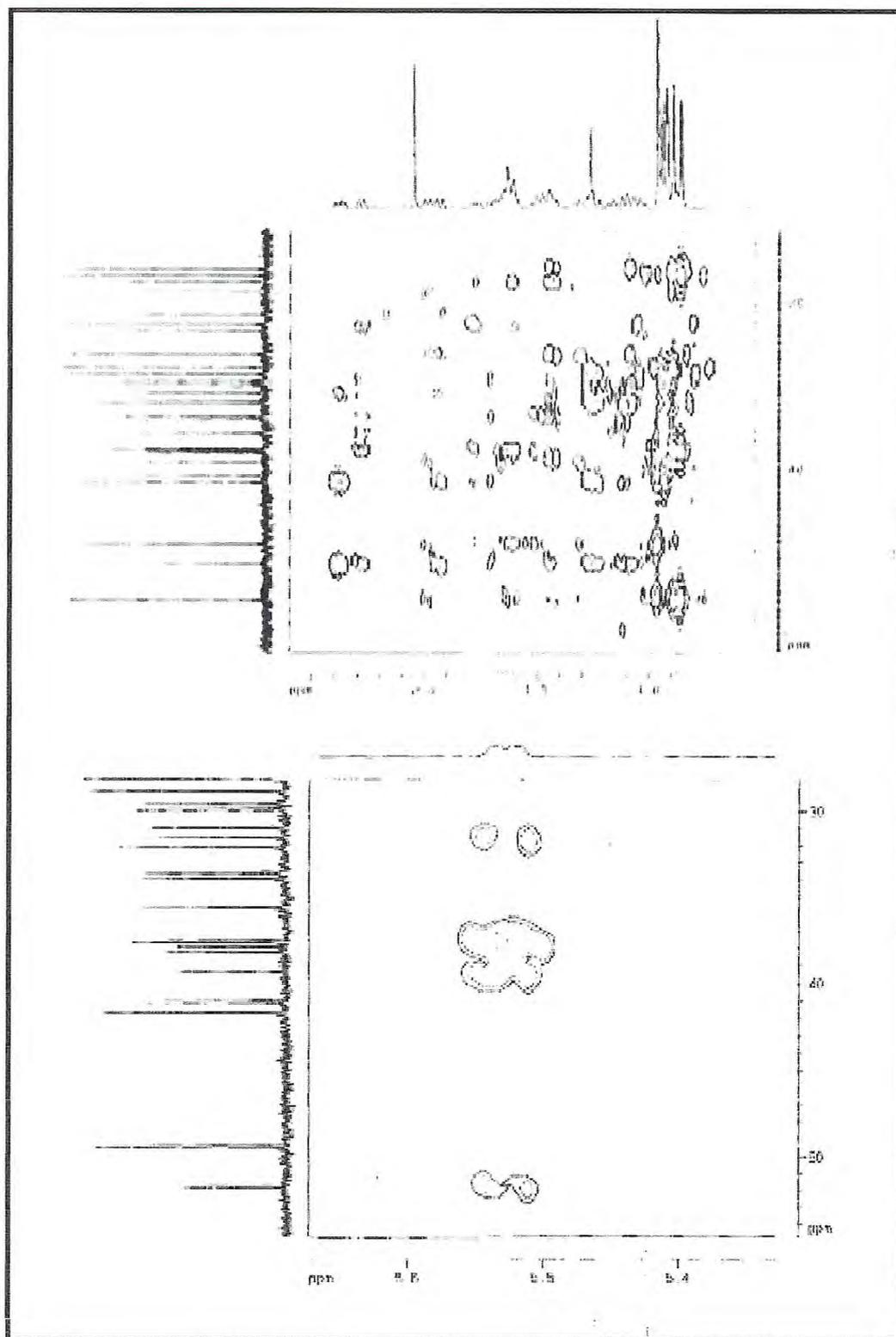


Figura 95 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de CA-8.



**Figura 96** – Expansões de RMN bidimensional HMBC de CA-11.

### 5.2.6 Determinação Estrutural de CA-9

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano, resultante da coluna filtrante do extrato etanólico dos talos de *C. argyrophyllus*, forneceu cristais em forma de agulhas, com ponto de fusão 150,2 – 151,7 °C e  $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ$  (c, 0,02 CHCl<sub>3</sub>), denominado de CA-9.

O espectro na região do infravermelho de CA-9 (Fig. 97, pág. 175) mostrou uma banda intensa em 3448 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação axial da ligação O-H de álcool ( $\nu_{O-H}$ ), além de bandas em 2945, 1459 e 1380 cm<sup>-1</sup> relacionadas a deformações axiais da ligação C-H de carbonos alifáticos ( $\nu_{C-H}$ ). Também foi observada uma banda em 1654 cm<sup>-1</sup> referente à deformação axial de ligação C=C típicas de ligações olefinicas ( $\nu_{C=C}$ ), e outra banda em 1065 cm<sup>-1</sup> representando uma deformação axial de ligação C-O.

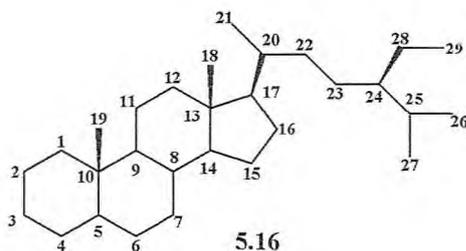
Através da análise de espectro de RMN <sup>13</sup>C-CPD (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-9 (Fig. 99, pág. 176) verificou-se a presença de 29 linhas espectrais. Comparando-se os espectros de RMN <sup>13</sup>C-CPD e RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CA-9 (Fig. 100, pág.176), pôde-se deduzir a presença de onze absorções correspondentes a carbonos metínicos, nove absorções de carbonos metilênicos e seis absorções de carbonos metílicos. Por diferença de espectros, constatou-se a ausência de três absorções relativas aos carbonos não-hidrogenados, como apresentados na Tabela 47, pág. 172.

Utilizando-se da teoria do deslocamento químico, pôde-se inferir na estrutura de CA-9, a presença de um carbono oxigenado em  $\delta$  71,27 (C-3), e quatro carbonos olefinicos em  $\delta$  139,76 (C-8); 138,36 (C-22); 129,67 (C-23) e 117,67 (C-7), corroborando a análise feita no espectro de IV.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Fig. 98, pág.175) mostrou uma absorção em  $\delta$  3,60 (m, 1H-3) atribuída a hidrogênio de carbono carbinólico. Foram observadas também absorções em região de desproteção em  $\delta$  5,15 (dd, J = 8,7; 14,7 Hz; 1H-7); 5,05 (dd, J = 8,4 Hz; 14,3 Hz; 1H-22) e 5,00 (dd, J = 8,1 Hz; 13,9 Hz; 1H-23) referentes a hidrogênios de carbonos olefinicos, e dois sinais em  $\delta$  0,55 (s, 3H-18) e 0,80 (s, 3H-19) características de grupamentos metilas ligadas a carbonos não-hidrogenados.

De acordo com os dados apresentados nestes espectros, pôde-se sugerir para CA-9 a fórmula molecular C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O, tendo, portanto, seis lacunas de insaturação. Como duas insaturações estão relacionadas a duas duplas ligações, as outras quatro restantes devem ser

atribuídas a uma estrutura tetracíclica. A presença de carbonos olefinicos, dois grupamentos metila ligados a carbonos não-hidrogenados, e nove carbonos metilênicos e um carbono carbinólico, possibilitaram deduzir que CA-9 trata-se de um esteróide de esqueleto do tipo estigmastano (5.16).



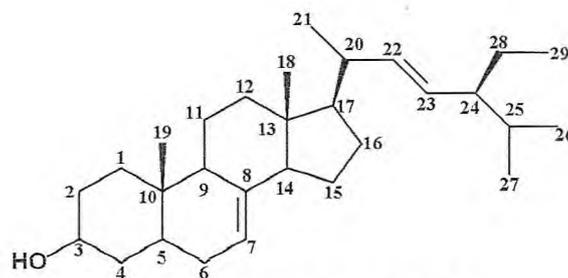
**Tabela 47** – Deslocamento químico RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de CA-9 com padrão de hidrogenação.

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$	Total
12,43	39,69	138,36 (C=C)	139,76 (C=C)	
13,24	38,22	129,67 (C=C)	43,50	
21,58	29,86	117,67 (C=C)	34,44	
21,27	37,37	71,27 (OH)		
19,20	31,70	56,14		
12,25	29,69	55,34		
	25,59	51,46		
	23,23	49,68		
	21,76	41,00		
		40,49		
		32,08		
$\text{C}_6\text{H}_{18}$	$\text{C}_9\text{H}_{18}$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}$	$\text{C}_3$	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

A comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-9, com os dados descritos na literatura [CARVALHO *et al*, 2001] para esteróides da série estigmastano (Tab.5.29, pág. 173), aliado à comparação dos dados físicos como ponto de fusão (148,2 – 149,7 °C) do esteróide estigmast-7,22-dien-3-ol (espinasterol), confirmaram a identidade deste composto.

**Tabela 48** – Análise comparativa dos deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  de CA-9 com o espinasterol.

#C	CA-9 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Espinasterol (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	38,2	38,1
2	29,8	29,8
3	71,2	71,4
4	37,3	38,1
5	40,4	40,4
6	31,7	31,6
7	117,6	117,8
8	139,7	139,6
9	49,6	49,8
10	34,4	34,3
11	21,7	21,7
12	39,6	39,6
13	43,5	43,6
14	55,3	56,1
15	23,2	23,1
16	28,6	28,9
17	56,1	56,3
18	12,4	12,4
19	13,2	13,4
20	41,0	40,6
21	21,5	21,7
22	138,3	138,2
23	129,6	129,6
24	51,4	51,6
25	32,0	32,0
26	21,2	21,5
27	19,2	19,1
28	25,5	25,5
29	12,2	12,4



Estigmast-7,22-dien-3-ol (5.17)

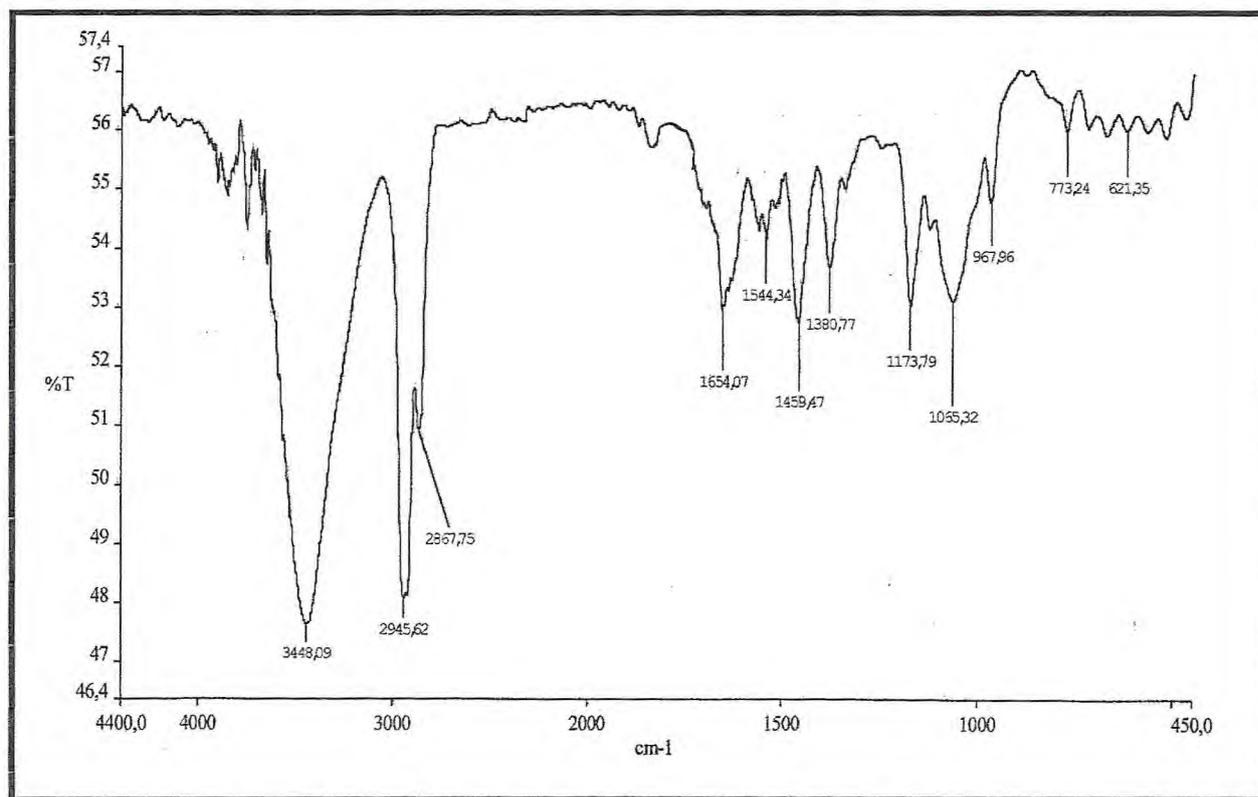


Figura 97 – Espectro de absorção na região do I.V. de CA-9 com pastilhas de KBr.

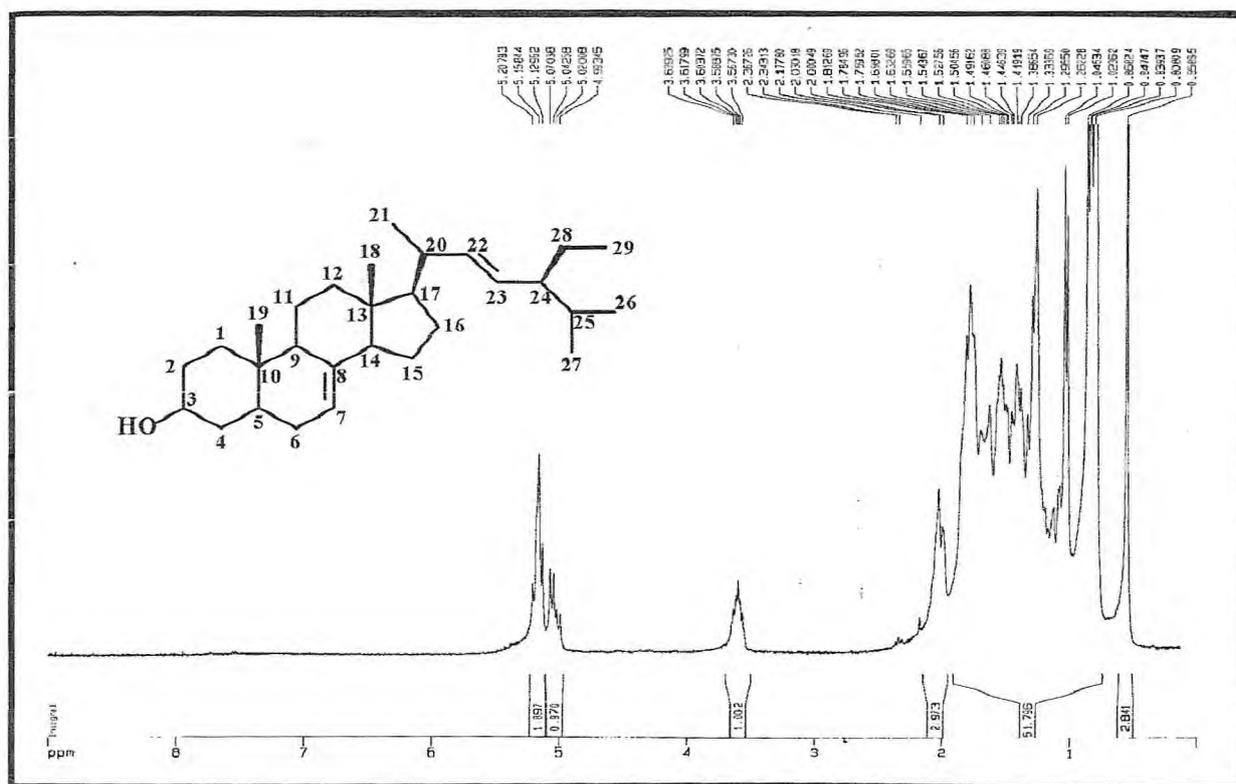


Figura 98 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-9

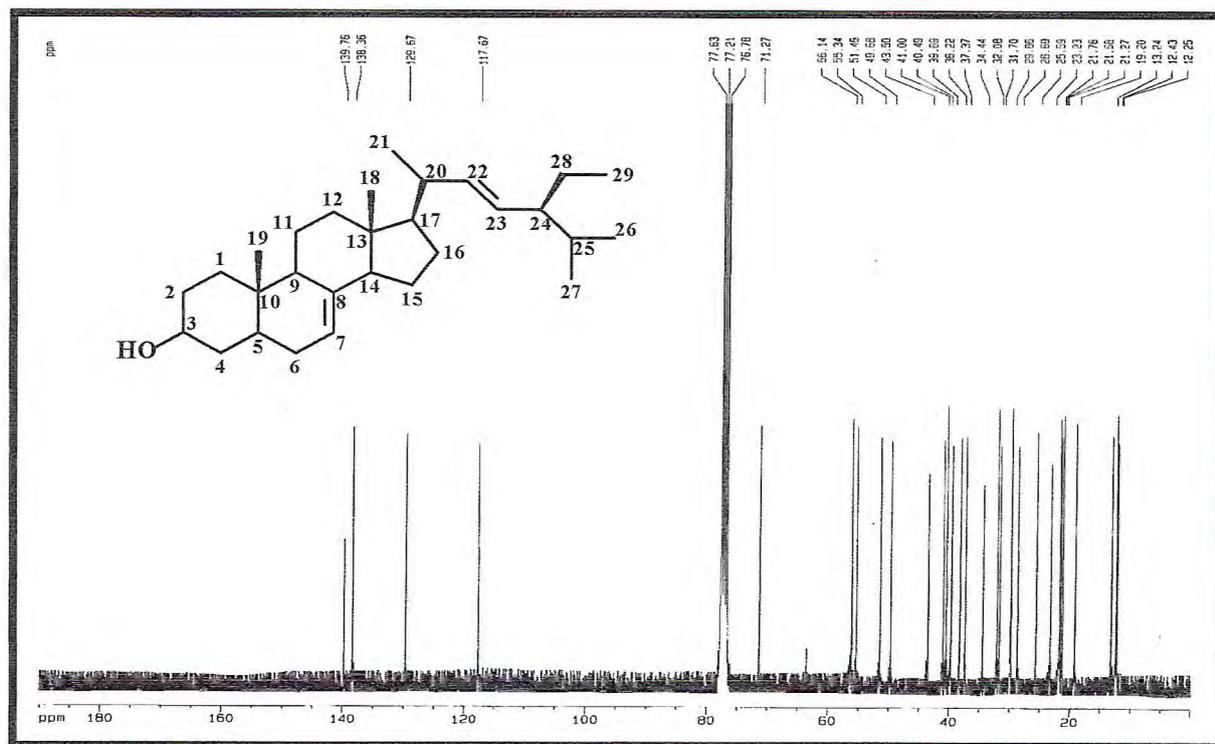


Figura 99 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.

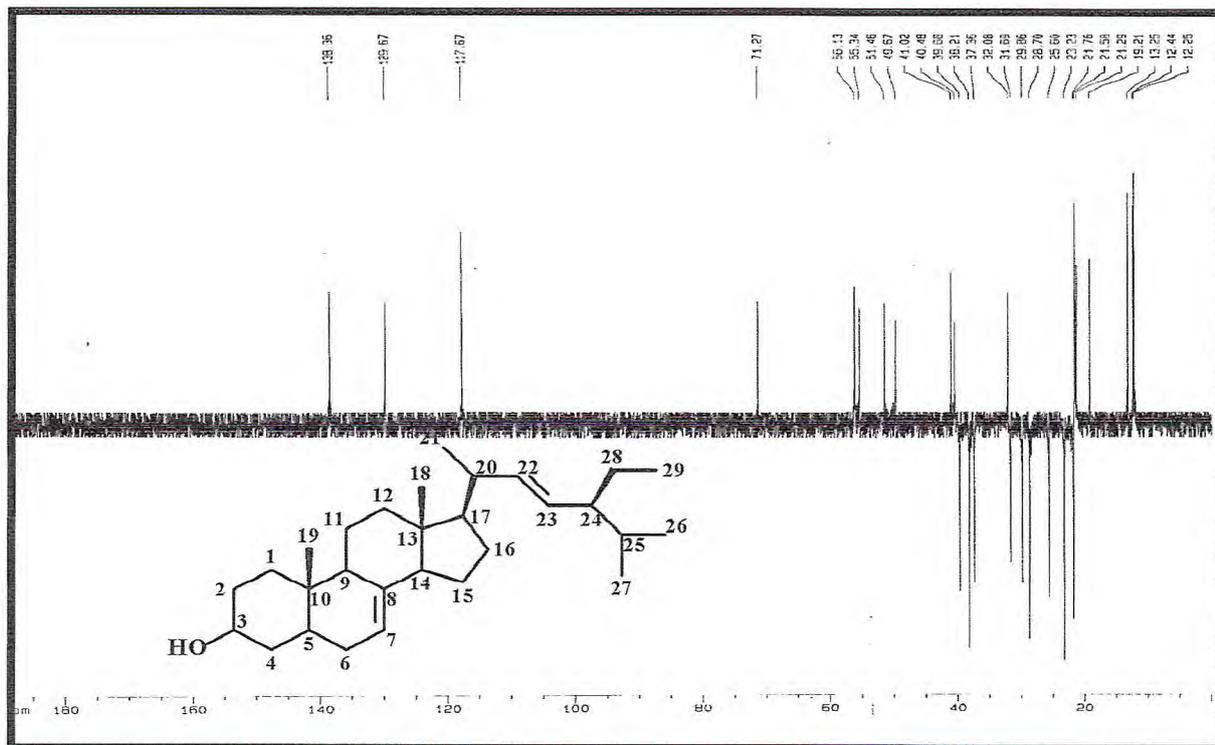


Figura 100 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CA-8.

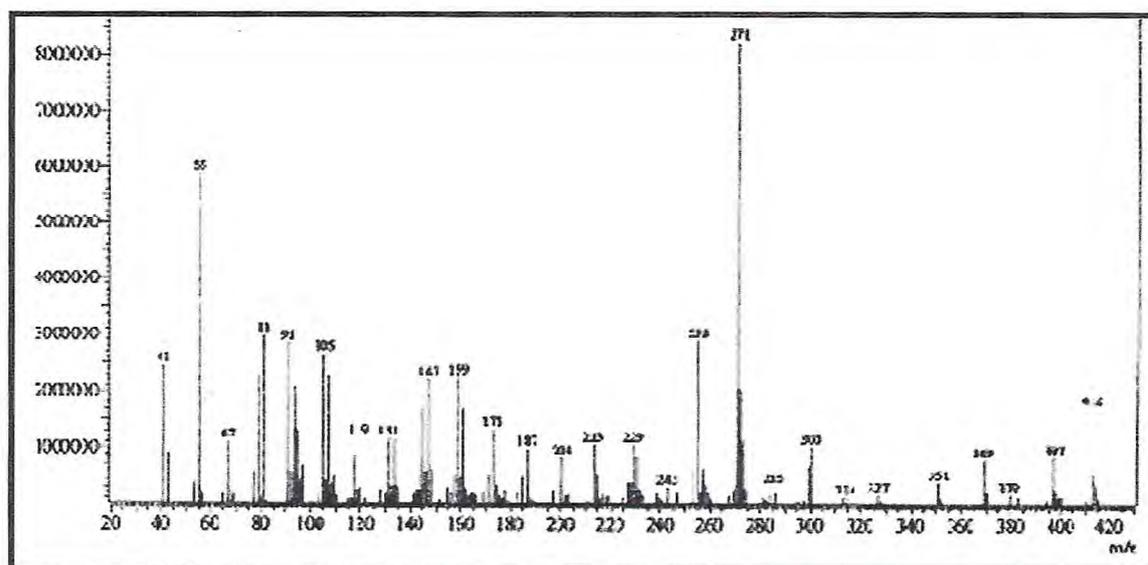
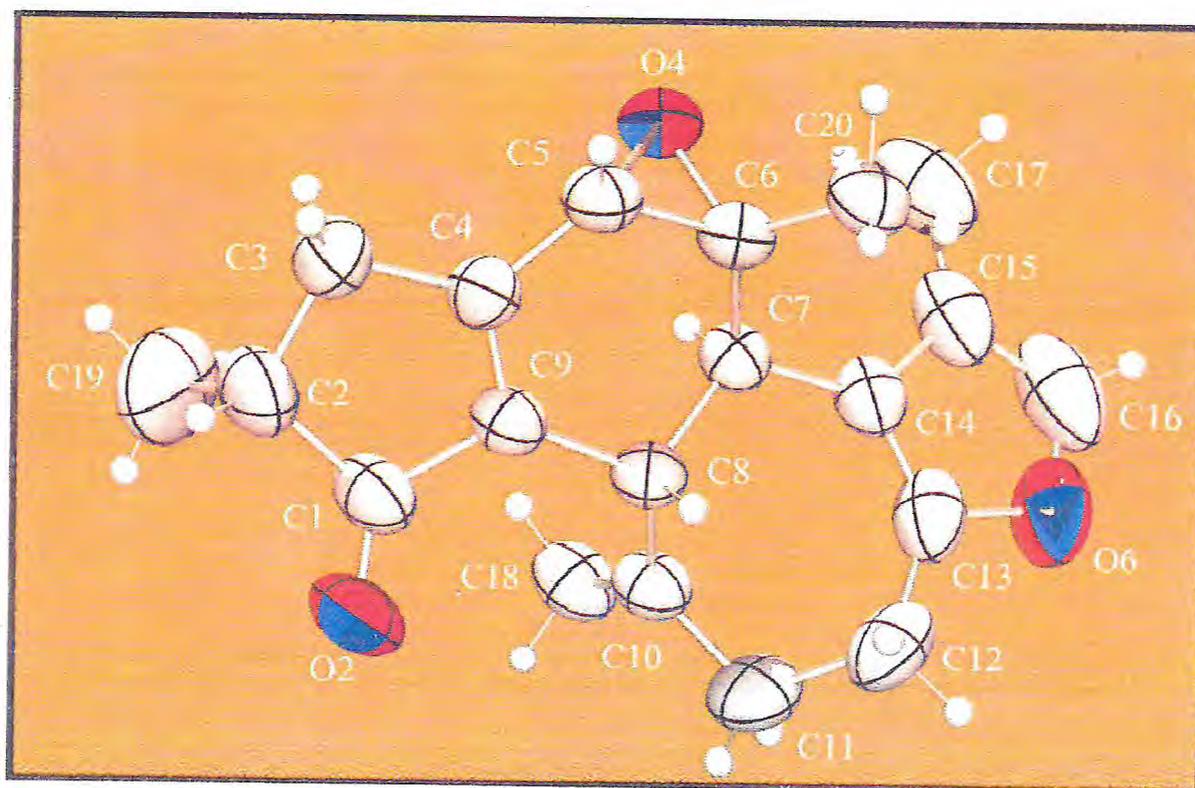


Figura 101 – Espectro de massa de CA-9 (ionização eletrônico a 70 eV).

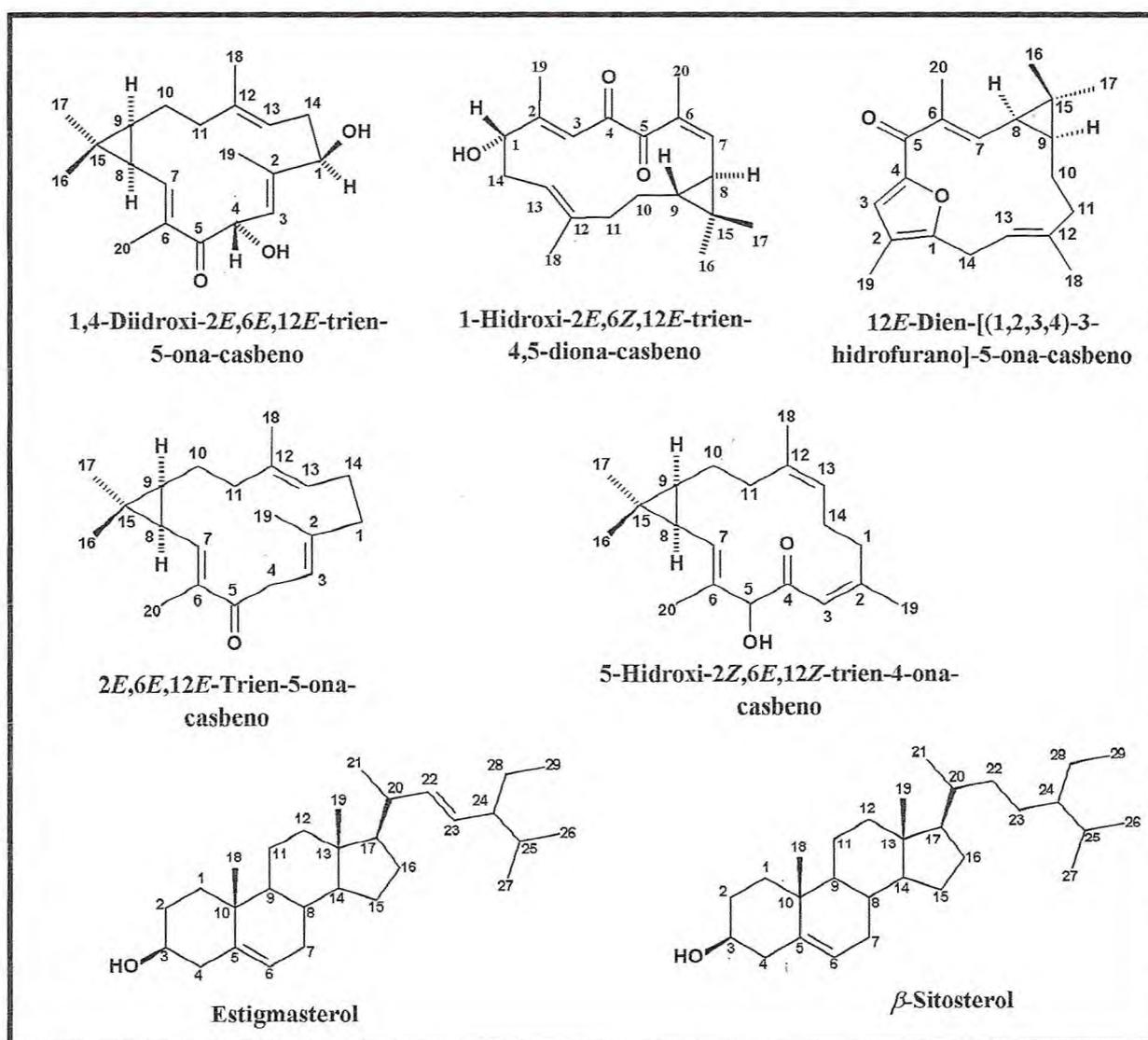
### 5.3 Referencias Bibliográficas

- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásticos Ciclo-celular Específicos e Ciclo-celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quím. Nova.**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- CARVALHO, G. J. A.; CARVALHO, M. G.; FERREIRA, D. T.; FARIA, T. J.; BRAZ FILHO, R. Diterpenos, Triterpenos e Esteróides das Flores de *Wedelia paludosa*. **Quím. Nova**, v. 24, p. 24-26, 2001.
- LI, Y.; CARBONE, M.; VITALE, R. M.; AMODEO, P.; CASTELLUCCIO, F.; SICILIA, G.; MOLLO, E.; NAPPO, M.; CIMINO, G.; GUO, Y.; GAVAGNIN, M. Rare Casbane Diterpenoids from the Hainan Soft Coral *Simularia depressa*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 133-138, 2010.
- MCCLEAN, S.; DUMONT, M. P.; REYNOLDS, W. F. Unambios Structural and Nuclear Magnetic resonance Spectral Characterization of Two Triterpenoides of *Maprounea guianensis* by Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Can. J. Chem.**, v. 65, p. 2519-2522, 1987.
- MOURA, V. L. A.; MONTE, F. J. O.; BRAZ FILHO, R. A. New Casbane-type Diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **J. Nat. Prod.**, v. 53, n. 6, p. 1566-1571, 1990.
- SALATINO, A.; FARIAS, M. L.; NEGRI, G. Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.



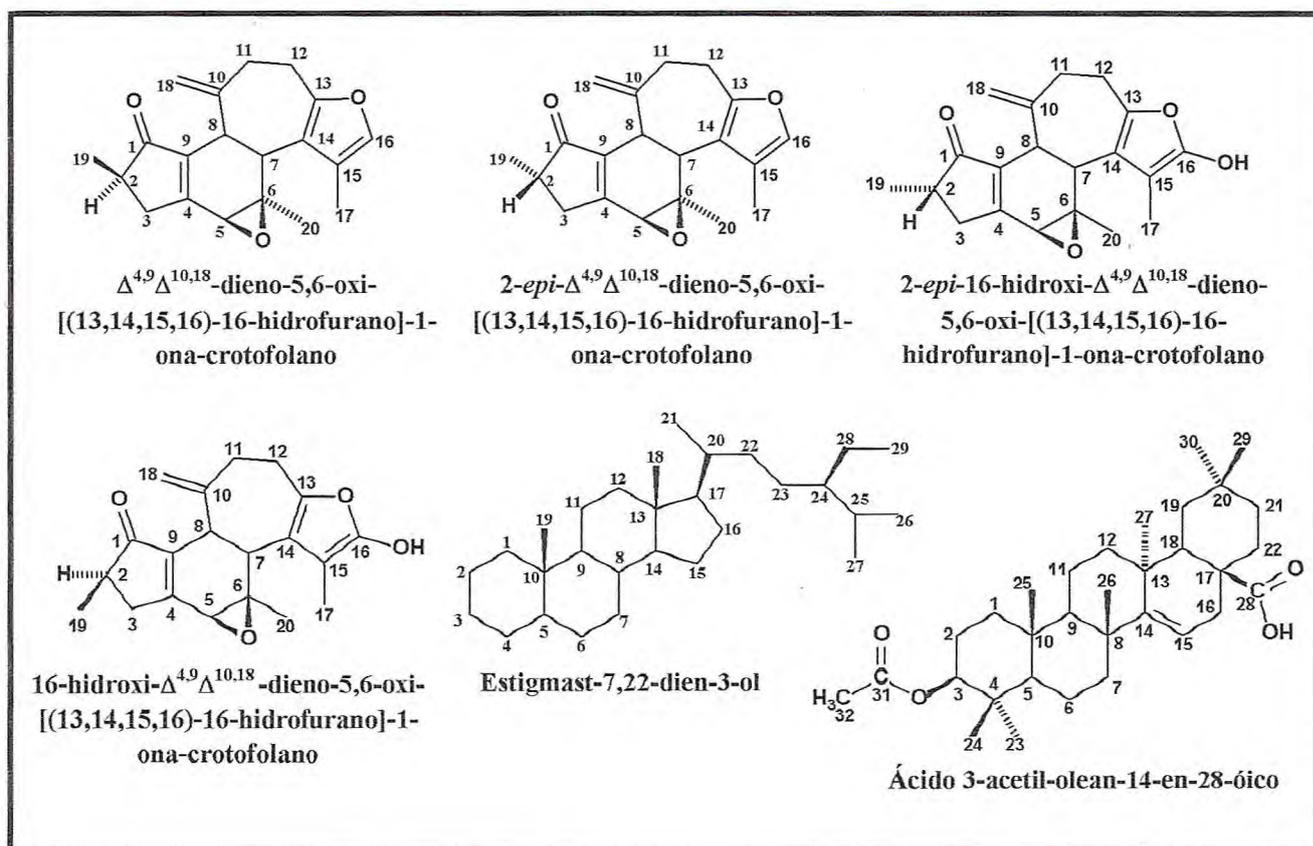
## 6 CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato hexânico dos talos de *Croton argyrophyllus* resultou no isolamento do diterpeno  $\Delta^{3,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano. Do extrato etanólico foram obtidos os diterpenos 1,4-diidroxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbeno, 1-hidroxi-2*E*,6*Z*,12*E*-trien-4,5-diona-casbeno, 12*E*-dien-[(1,2,3,4)-3-hidrofurano]-5-ona-casbeno, 2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbeno, 5-hidroxi-2*Z*,6*E*,12*Z*-trien-4-ona-casbeno, e a mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, ver Quadro 8.



Quadro 8 – Metabólitos essenciais isolados do talos de *Croton argyrophyllus*.

A partir da investigação química do extrato hexânico das raízes foi possível o isolamento do diterpeno  $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano, do triterpeno ácido 3-acetil-olean-14-en-28-óico e do esteróide estigmast-7,22-dien-3-ol. Do extrato etanólico foram isolados os diterpenos 2-*epi*- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano, 2-*epi*-16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano e 16-hidroxi- $\Delta^{4,9}\Delta^{10,18}$ -dieno-5,6-oxi-[(13,14,15,16)-16-hidrofurano]-1-ona-crotofolano, ver Quadro 9.



Quadro 9 – Metabólitos essenciais isolados das raízes de *Croton argyrophyllus*.

A presença de diterpenos de esqueleto casbano e crotofolano em *C. argyrophyllus* está de acordo com o perfil químico do gênero *Croton*, porém, este é o primeiro relato dos diterpenos crotofolano, crotomicansin, 2-*epi*-crotomicansin, 16-hidroxicrotomicansin e 2-*epi*-16-hidroxicrotomicansin, na literatura. Com exceção do crotonepetin, já isolado anteriormente do *C. nepetaefolius*, os outros quatro diterpenos casbanos, 1-hidroxi-2*E*,6*Z*,12*Z*-trien-4,5-diona-casbano, 12*E*-dien-[(1,2,3,4)-3-hidrofurano]-5-ona-casbeho, 2*E*,6*E*, 12*E*-trien-5-ona-

casbeno, 5-hidroxi-2Z,6E,12Z-trien-4-ona-casbeno, também possuem caráter inédito na literatura.

Crotomicansin, crotonepetin e 16-hidroxi-crotomicansin foram testados contra *Leishmania amazonensis* e para atividade citotóxica, não obtendo resultados promissores. Até o presente momento, não foram realizados testes com as demais amostras.

Os resultados obtidos através da investigação química de *C. argyrophyllus* confirmam o grande potencial químico-botânico de espécies de *Croton*, e justificam a continuidade da investigação fitoquímica de outras espécies do gênero.