

DITERPENOS CASBANOS E ACETOFENONAS DE *Croton nepetaefolius* (EUPHORBIACEAE)

Hélcio Silva Santos e Francisca Maria Rodrigues Mesquita

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, 62040-370 Sobral - CE, Brasil

Telma Leda G. Lemos* e Francisco Jose Queiroz Monte

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza - CE, Brasil

Raimundo Braz-Filho

Setor de Química de Produtos Naturais, LCQUI, CCT, Universidade Estadual Norte Fluminense, 28015-620 Campos - RJ, Brasil

Recebido em 4/6/07; aceito em 6/9/07; publicado na web em 26/2/08

CASBANE DITERPENES AND ACETOPHENONES OF *Croton nepetaefolius* (EUPHORBIACEAE). *Croton nepetaefolius* is an aromatic plant native to the northeast of Brazil where it is extensively used in folk medicine as a sedative, orexigen and antispasmodic agent. The present work deals with the chromatographic analysis of the ethanolic extract of *Croton nepetaefolius* stalk. It allowed the isolation and characterization of two diterpenoids named 1,4-dihydroxy-2E,6E,12E-trien-5-one-casbane and 4-hydroxy-2E,6E,12E-5-one-casbane, two acetophenones named 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone and 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone and the steroids 3-O- β -D-glucopiranosylsitosterol and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol. Structural elucidation was done on the basis of spectral data, mainly high field NMR and EIMS.

Keywords: casbane diterpenoid; acetophenones; *Croton nepetaefolius*.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação, não somente nos centros urbanos, mas sobretudo nas pequenas comunidades rurais. Este comportamento vem chamando a atenção da comunidade científica no sentido de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais.¹ Vale ressaltar que as plantas são fontes naturais de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas com várias finalidades, entre elas, protegê-las contra predadores ou atrair polinizadores.²

Estudos realizados com espécies de *Croton* relatam a presença de alcalóides,³⁻¹¹ flavonóides,¹² esteróides e triterpenóides,^{12,13} saponinas^{14,15} e taninos.¹⁶ Os diterpenos, principais constituintes do gênero, possuem atividades biológicas, funções ecológicas e constituem protótipos na síntese de substâncias bioativas.¹⁷⁻²⁰ Dentre os diferentes tipos estruturais, os diterpenos casbanos são encontrados em apenas seis espécies da família Euphorbiaceae e merecem destaque por apresentarem atividades anticancerígena e bactericida.²¹⁻²⁴

Croton nepetaefolius é uma planta aromática endêmica do nordeste brasileiro conhecida popularmente como “marmeleiro sabiá”, “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”. Esta espécie é largamente utilizada na medicina popular como estomáquico, carminativo e no tratamento de cólicas intestinais, sendo esta última ação cientificamente comprovada.²⁵ Estudos fitoquímicos anteriores relatam a presença de terpenóides²⁶ nesta espécie. Neste trabalho, foi realizada uma reinvestigação fitoquímica de *Croton nepetaefolius*, que resultou no isolamento dos diterpenos casbeno 1,4-diidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (**1**) e 4-hidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (**2**), sendo o segundo inédito na literatura. Em adição também foram isolados as acetofenonas 2-

hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona (**3**), 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (**4**) e os esteróides 3-O- β -D-glico-piranosilsitosterol (**5**), β -sitosterol (**6**) e estigmasterol (**7**).

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas em gel de sílica 60 (63-200 μ m, 70-230 mesh, Vetec). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia. Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20 x 20 cm com gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Merck). As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas, através da exposição destas, com solução de vanilina, seguida de aquecimento. O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da Mettler Toledo. Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-300 e DPX-500 (¹H: 300 e 500 MHz; ¹³C: 75 e 125 MHz), utilizando CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas, aparelho Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV.

Material vegetal

O material vegetal (caule) de *Croton nepetaefolius* foi coletado no município de Caucaia-Ceará, em maio de 2004. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. E. Nunes, da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra-UFC sob número 33.582.

*e-mail: tlemos@dqi.ufc.br

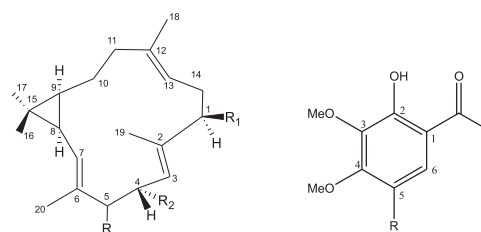
Extração e isolamento

O caule (5 kg), seco à temperatura ambiente, foi triturado e submetido à extração a frio por 3 dias com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo o extrato etanólico (58,2 g), que foi adsorvido em gel de sílica e submetido à coluna cromatográfica, utilizando-se eluentes: hexano (F 1-15), hexano/acetato de etila (1:1 F 16-25), acetato de etila (F 26-40) e etanol (F 41-48), obtendo-se um total de 48 frações, de 100 mL cada. As frações hexânicas (F 1-15) 22,5 g foram reagrupadas e recromatografadas com hexano (F' 1-10), hexano/acetato de etila (1:1 F' 11-16), acetato de etila (F' 17-21) e etanol (F' 22-25), obtendo-se um total de 25 frações, de 50 mL cada. As frações (F' 11-16) 14,0 g foram reagrupadas e submetidas a novo tratamento cromatográfico com hexano (F'' 1), hexano/acetato de etila (9:1 F'' 2-5; 8:2 F'' 6-15; 7:3 F'' 16-32) e acetato de etila (F'' 33) obtendo-se um total de 33 frações, de 25 mL cada. As frações (F'' 10-13), obtidas com hexano/acetato de etila (8:2), reunidas forneceram o diterpeno 1,4-diidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (3,0 g). As frações (F'' 7-8) 7,0 g foram reunidas e recromatografadas com hexano (F''' 1-2), hexano/acetato de etila (8:2 F''' 3-4), acetato de etila (F''' 5-10) e etanol (F''' 11) obtendo-se um total de 11 frações, de 50 mL cada. As frações (F''' 5-10) 4,0 g foram reagrupadas e recromatografadas com hexano/acetato de etila (9:1 F'''' 1-2; 8:2 F'''' 3-7; 6:4 F'''' 8-14; 4:6 F'''' 15-22) e acetato de etila (F'''' 23) obtendo-se um total de 23 frações, de 25 mL cada. As frações (F'''' 11-12), obtidas com hexano/acetato de etila (6:4), reunidas forneceram o diterpeno 4-hidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (70,0 mg). As frações hexano/acetato de etila (1:1 F 16-25) 10,8 g foram reagrupadas e recromatografadas com hexano (F' 1), hexano/acetato de etila (9:1 F' 2-10; 7:3 F' 11-13; 1:1 F' 14-15) e acetato de etila (F' 16), obtendo-se um total de 16 frações, de 100 mL cada. As frações (F' 10-13) e (F' 16) obtidas com hexano/acetato de etila (7:3) e acetato de etila, respectivamente, reunidas forneceram a acetofenona 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona (4,0 g, p.f 77-78,5 °C) e o esteróide 3-O- β -D-glicopiranosilsterol (80,0 mg, p.f 285-287 °C). As Frações (F' 14-15) 4,8 g foram submetidas a novo tratamento cromatográfico com hexano (F'' 1-5), hexano/acetato de etila (8:2 F'' 6-10; 1:1 F'' 11-15; 2:8 F'' 16-30) e acetato de etila (F'' 31-40) obtendo-se um total de 40 frações, de 50 mL cada. As frações (F'' 6-10), obtidas com hexano/acetato de etila (8:2), reunidas forneceram a acetofenona 2-hidroxi-3,4,6-dime-toxiacetofenona (100 mg, p.f 108 - 110,6 °C). As frações (F'' 14-15) 2,5 g foram reunidas e recromatografadas com hexano (F''' 1), hexano/acetato de etila (9:1 F''' 2-20; 8:2 F''' 21-45; 7:3 F''' 46-70; 1:1 F''' 71-80; 4:6 F''' 81-100; 2:8 F''' 101-110) e acetato de etila (F''' 111-121) obtendo-se um total de 121 frações, de 25 mL cada. As frações (F''' 81-90), obtidas com hexano/acetato de etila (4:6), reunidas forneceram os esteróides β -sitosterol e estigmasterol (40,0 mg).

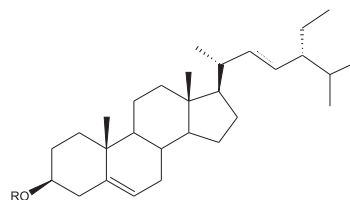
Propriedades físicas e espectroscópicas

1,4-diidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (**1**): óleo verde, I.V. (KBr, ν_{\max} cm^{-1}): 3400, 2920, 1660, 1618, 1020, 756; EMIE m/z (%) 318 ($[\text{M}]^+$, ausente), 300 (2), 282 (2), 150 (14), 135 (30), 121 (22), 107 (44). RMN ^1H ^{13}C , Tabela 1.

4-hidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno (**2**): óleo verde, I.V. (KBr, ν_{\max} cm^{-1}): 3508, 2916, 1697, 1649, 1455, 1116, 753; EMIE m/z (%) 302 ($[\text{M}]^+$, 2), 149(18), 135 (15), 121 (22), 107 (24). RMN ^1H ^{13}C , Tabela 1.



- (1) R = O ; R₁ = R₂ = OH (3) R = H
 (2) R = O ; R₁ = H ; R₂ = OH (4) R = OMe



- (5) R = 3-O- β -D-glicopiranosil
 (6) R = H, 22, 23-diidro
 (7) R = H, Δ^{22-23}

Figura 1. Substâncias isoladas do extrato etanólico do caule de *Croton nepetaefolius* 1-7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos **1** e **2** foram isolados a partir da fração hexânica do extrato etanólico de *C. nepetaefolius* como óleos densos esverdeados. Por intermédio dos espectros de RMN ^{13}C (HBBT e DEPT 135) verificou-se a presença de 20 sinais de carbonos para ambos. O composto **1**, isolado anteriormente dessa espécie, foi identificado como sendo o diterpeno 1,4-diidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno cujos dados espectrais de RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV estão em acordo com valores da literatura.²⁶ Por outro lado, a comparação dos deslocamentos químicos (Tabela 1) dos átomos de hidrogênio e carbono de **2** com os do composto **1** indicou a existência de um sistema casbânico similar. Vale destacar nos espectros de RMN ^{13}C (HBBT e DEPT) de **2**, os sinais em δ_{C} 142,71 (C), 125,54 (CH), 134,56 (C), 145,06 (CH), 136,50 (C), 124,10 (CH) indicando três ligações olefínicas trissubstituídas, compatível com os sinais no espectro de RMN ^1H para três hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,08 (d, 9,1), 6,34 (d, 10,5) e 4,83 (d, 8,2), condição semelhante à observada em **1** (Tabela 1). A conectividade dos carbonos metílicos com seus respectivos hidrogênios foi claramente observada no espectro ^1H - ^{13}C HMQC. Vale também ressaltar no espectro de RMN ^{13}C HBBT o sinal compatível com cetona α,β -insaturada em δ_{C} 200,40 (δ_{C} 199,74 em **1**) e no experimento HMBC, as correlações heteronuclear de hidrogênio e carbono a longa distância entre os carbonos C-2 (δ_{C} 142,71), C-6 (δ_{C} 134,56) e C-12 (δ_{C} 136,50) e os hidrogênios 3H-19 (δ_{H} 1,69), 3H-20 (δ_{H} 1,95) e 3H-18 (δ_{H} 1,58), respectivamente, indicando que três grupos metílicos se encontravam ligados a carbonos olefínicos. Paralelamente, as correlações do carbono quaternário C-15 (δ_{C} 27,44) com os hidrogênios metílicos 3H-16 (δ_{H} 1,02) e 3H-17 (δ_{H} 1,17) e destes com os carbonos C-8 (δ_{C} 28,45) e C-9 (δ_{C} 36,01) revelaram que esses dois grupos metílicos encontravam-se ligados ao carbono quaternário C-15 do anel ciclopila. Todos esses sinais são característicos de diterpenos com esqueleto casbano com anel macrocíclico de

Tabela 1. Dados de RMN¹H e ¹³C de **1** e **2** (CDCl₃), incluindo-se resultados de correlação heteronuclear ¹H-¹³C-COSY-¹J_{CH} (HMQC) e ¹H-¹³C-COSY-²J_{CH} (HMBC). Deslocamentos químicos em δ_C e δ_H (ppm) e constantes de acoplamento (*J*, entre parênteses) em Hz

	1		HMQC		2	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}
1	77,64	4,09 (dd, 9,6, 6,2)	38,91	2,20 (m)		
2	144,02		142,71		3H-19	
3	125,48	5,14 (d, 9,4)	124,54	5,08 (d, 9,1)		3H-19
4	67,82	5,24 (d, 9,4)	68,63	5,23 (d, 9,1)		
5	199,74		200,40			
6	134,61		134,56		3H-20	
7	145,11	6,25 (d, 10,4)	145,06	6,34 (d,10,5)		
8	28,08	1,50 (dd, 10,4, 8,3)	28,45	1,55 (m)		3H-16; 3H-17
9	35,67	1,23 - 1,15 (m)	36,01	1,20 (m)		3H-16; 3H-17
10	25,36	1,23 - 1,15 (m) 0,79 - 0,72 (m)	26,13	0,90 (m)		
11	39,85	2,27 - 2,03 (m) 1,71 - 1,68 (m)	40,02	1,80 (m)		
12	137,39		136,50		3H-18	
13	119,72	4,66 (dd, 6,3)	124,10	4,83 (dl, 8,2)		3H-18
14	31,66	2,27 (m)	24,14	2,28 - 2,00 (m)		
15	27,73		27,44		3H-16; 3H-17	
16	16,12	0,99 (s)	16,16	1,02 (s)		3H-17
17	29,25	1,13 (s)	29,38	1,17 (s)		3H-16
18	15,43	1,56 (s)	15,69	1,58 (sl)		
19	10,15	1,66 (s)	15,78	1,69 (sl)		
20	12,08	1,90 (s)	12,16	1,95 (sl)		

quatorze membros.^{27,28} Porém, os espectros de RMN ¹³C e DEPT 135 mostraram a presença de um grupo metilênico a mais na estrutura de **2** através do sinal em δ_C 38,91. Adicionalmente, os espectros de RMN ¹H e ¹³C de **2** não exibem os sinais em δ_H 4,09 (H-1) e δ_C 77,64 (C-1), respectivamente, registrados nos espectros de **1**. Estas observações mostraram que o carbono metínico carbinólico C-1 em **1** se encontra na forma reduzida em **2**, ou seja, como carbono metilênico (δ_C 38,91), sendo esta a única diferença entre as estruturas **1** e **2**. As atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono foram efetuadas de modo inequívoco pela utilização das técnicas de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C e DEPT) e bidimensionais (¹H-¹³C HMQC e ¹H-¹³C HMBC) (Tabela 1). As configurações relativas dos carbonos quirais C-4, C-8 e C-9 de **2** foram determinadas com base na comparação dos dados espectrais de RMN (¹H e ¹³C) de **2** com dados do composto **1** tomado como modelo. Assim, os deslocamentos químicos e os valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-3, H-4, H-7, H-8 e H-9 de **2** e **1** são muito próximos (Tabela 1) e consistentes com a mesma estereoquímica dos carbonos quirais correspondentes (C-4, C-8 e C-9) e das ligações duplas (Δ²-E e Δ⁶-E) nesses compostos. A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos C-13-C-12, C-15-C-18 e C-20 de **2** com os respectivos carbonos de **1** revelou, praticamente, os mesmos valores, e amparou esta dedução (Tabela 1). As exceções (C-1, C-2, C-13, C-14 e C-19) são justificadas pelos efeitos (α, β e γ) do grupo hidroxila (ausente em **2**) no carbono C-1 de **1**. Assim, **2** foi identificado como o diterpeno 4-hidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno, um metabólito secundário inédito na literatura.

O composto **3** tem fórmula molecular C₁₀H₁₂O₄, determinada através do espectro de massas (*m/z* 196) e dos espectros de RMN ¹³C (BB e DEPT 135). A análise dos espectros de RMN (¹H e ¹³C), IV e EM, assim como a comparação com os dados dos espectros de RMN ¹H e IV de **3** publicados na literatura²⁹ permitiram identificar a estrutura como 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona. O composto **4** com fórmula molecular C₁₁H₁₄O₅ (*m/z* 226) tem 30 u.m.a. a mais que **3**,

sugerindo a presença de um terceiro grupo metoxílico em sua estrutura. Esta dedução é comprovada nos espectros de RMN ¹H (δ_H 3,96, 3,91 e 3,83) e ¹³C (δ_C 60,86, 56,11 e 55,74). Finalmente, a análise dos espectros (RMN ¹H e ¹³C, IV e EM) e a comparação com dados da literatura³⁰ permitiram identificar **4** como 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona. Os esteróides 3-O-β-D-glicopiranisilosterol (**5**) β-sitosterol (**6**) e estigmasterol (**7**) foram caracterizadas com base nos dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C, envolvendo principalmente a comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono com valores descritos na literatura.³¹

AGRADECIMENTOS

Às instituições financiadoras CNPq, CAPES, FUNCAP e FAPERJ pelas bolsas e auxílios concedidos, ao CENAUREM-UFC pela obtenção dos espectros de RMN e ao Prof. E. R. Silveira DQOI-UFC pela coleta do material botânico.

REFERÊNCIAS

- Fennell, C. W.; Lindsey, K. L.; McGraw, L.; Sparg, S. G.; Stafford, G. I.; Elgorashi, E. E.; Grace, O. M.; Staden, J.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 205.
- Stepp, J. R.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *92*, 163.
- Sanchez, V.; Sandoval, D.; Herrera, P.; Oquedo, M.; *Rev. Cubana Farm.* **1982b**, *16*, 39.
- Smolenski, S. J.; Silinis, H.; Farnsworth, N. R.; *Lloydia* **1975**, *38*, 479.
- Bandoni, A. L.; Mendiando, M. E.; Rondina, R. V. D.; Coussio, J. D.; *II Econ. Bot.* **1976**, *30*, 161.
- Sanchez, V.; Sandoval, D.; *Rev. Cubana Farm.* **1982a**, *16*, 45.
- Nakanishi, K.; Sasaki, S. I.; Kiang, A. K.; Goh, J.; Kakisawa, H.; Ohashi, M.; Goto, M.; Watanabe, J. M.; Yokotami, H.; Matsumura, C.; Togashi, M.; *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 882.
- Gunatilaka, A. A. L.; Sultanbawa, M. U. S.; Balasubramaniam, S.; *J. Natl. Sci. Counc.* **1980**, *8*, 187.
- Collin, M. C. L. A.; Levy, J.; *Bull. Soc. Pharma.* **1976**, *32*, 267.
- Nimmanhemmin, S.; Apisariyakul, A.; *Bull. Chiang Mai Ass. Med. Sci.* **1979**, *12*, 125.

11. Arseculeratne, S. N.; Gunatilaka, A. A. L.; Panabokke, R. G.; *J. Ethnopharmacol.* **1981**, *4*, 159.
12. Shetty, S. N.; Anika, S. M.; Asuzu, U. I.; *Int. J. Crude Drug Res.* **1983**, *21*, 49.
13. Khier, Y. M.; Salih, A. M.; *J. Afr. Med. Pl.* **1979**, *2*, 55.
14. Vera, R.; Smadja, J.; Conan, J. Y.; *Plant Med. Phytother.* **1990**, *24*, 50.
15. Sinha, S. K. P.; Dogra, J. V. V.; *J. Crude Drug Res.* **1985**, *23*, 77.
16. Cespedes, R.; Chacon, S.; Mora, A. L.; *Ing. Cienc. Quim.* **1992**, *14*, 6.
17. Hanson, J. R.; *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 207.
18. Hanson, J. R.; *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 59.
19. Hanson, J. R.; *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 245.
20. Hanson, J. R.; *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 93.
21. Choi, Y. H.; Kim, J.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5795.
22. Choi, Y. H.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 110.
23. Burke, B. A.; Chan, W. R.; Pascoe, K. O.; Blount, J. F.; Manchand, P. S.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1981**, *10*, 2666.
24. Xu, Z. H.; Sun, J.; Xu, R. S.; Qin, G. W.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 149.
25. Abdon, A. P. V.; Leal-Cardoso, J. H.; Coelho-de-Souza, A. N.; Morais, S. M.; Santos, C. F.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 1215.
26. Vera, L. A.; Monte, F. J. Q.; Braz Filho, R.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1566.
27. Bai, Y.; Yang, Y. P.; Ye, Y.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6637.
28. Kashman, Y.; Bernart, M. W.; Tischler, M.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 426.
29. Soares, M. G.; Felipe, A. P. V.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J.; Ellena, J.; Doriguetto, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1205.
30. Patra, A.; Ghosh, G.; *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25*, 734.
31. Macari, P. T. A.; Emerenciano, V. P.; Ferreira, Z. M. G. S.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 260.