

CONSTITUINTES DE Gnaphalium spathulatum L.
E ANÁLISES ESPECTRAIS DE DERIVADOS
DO GLUTINANO

Lúcia Helena Brito Baptistella ~

TESE DE MESTRADO

Orientadora: Profa.Dra. Eva Gonçalves Magalhães ~

CAMPINAS

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

A Maria Helena e Angela

Ao Paulo.

AGRADECIMENTOS

A autora deseja expressar seu reconhecimento:

À Profa.Dra. Eva Goncalves Magalhães pela orientação;

À direção do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas pelas facilidades que me proporcionou na realização deste trabalho;

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas durante a execução deste trabalho;

Ao Prof.Dr. Hermógenes F. Leitão Filho pela coleta e identificação das plantas Pterocaulon alopecuróides e Gnaphalium spathulatum;

Ao Prof.Dr. Fred Y. Fujiwara pelos espectros de ressonância magnética nuclear de próton em 100 MHz, e pelas experiências com reagentes lantanídicos e de INDOR;

Aos Profs. Lawrence T. Nielsen, Roberto Siqueira Camargo, Dra. Concetta Kascheres e ao Eduardo Moreno pela obtenção dos espectros de massa. Ao Prof. Nielsen em especial pela obtenção dos espectros MIKE;

Ao Prof. José Wilson de Alencar, do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, pela aplicação da técnica de CG/EM na análise dos ésteres alifáticos da planta;

À Profa.Dra. Anita J. Marsaioli pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 e pelos inestimáveis apoio e incentivo recebidos;

Às Profas. Adilma R.P. Scamparini e Florinda O. Bobbio, da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, pelas facilidades

concedidas na realização das cromatografias em papel dos açúcares;

À Dirce Koga pela obtenção de alguns espectros de infra
vermelho;

Ao Lourival e à Angélica pelo auxílio valioso durante o
trabalho experimental;

Aos funcionários, em especial ao Fontana e à Dna. Nena, pe
la colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Marilza pela dedicação e esmero no trabalho datilográfi
CO;

À Graça, Siani, Pilli e Maricilda, pelo incentivo de tan
tos anos;

Finalmente, aos colegas de trabalho Rosa, Roberto, Marçal,
Simone, Candida, Domingos (Mineiro), Gian, Antonio, Raquel, Luzia,
Herrera, Domingos, Carmem, Mirtes, pelo apoio e convivência agra
dável.

ÍNDICE GERAL

	página
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
CAPÍTULO 2 - ESTUDO FITOQUÍMICO DO <u>Gnaphalium</u> <u>spathu-</u> <u>lathum</u>	
I - Descrição Botânica.....	12
II - Métodos de extrações, tratamentos dos extratos e isolamento dos compostos..	13
III - Métodos de identificações e considera ções estruturais das substâncias iso ladas e derivados.....	25
CAPÍTULO 3 - ESTUDOS DE RMN ¹ H, de RMN ¹³ C E DE ESPECTRO METRIA DE MASSA DE ALGUNS DERIVADOS DE GLUTINANO	
I - Isolamento do composto.....	85
II - Considerações estruturais. Técnicas utilizadas para atribuições de sinais em RMN ¹ H.....	85
III - Obtenção dos derivados.....	96
IV - Aplicação de reagentes de deslocamento no estudo de RMN ¹ H dos derivados do glutinano.....	99
V - Análise dos espectros de RMN ¹³ C de de rivados glutinânicos.....	109
VI - Análise dos espectros de massa de de	

rivados glutinânicos.....	120
CAPÍTULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL	
I - Materiais e métodos.....	124
II - Coleta do material.....	127
III - Obtenção dos extratos.....	128
1 - Material da 1a. coleta.....	128
2 - Material da 2a. coleta.....	128
IV - Tratamento dos extratos e isolamento dos constituintes.....	131
V - Constituintes da parte aérea de <u>Gnaphalium</u> <u>spathulatum</u> e seus derivados.....	159
VI - Os-3 e derivados. Reações, propriedades fí- sicas e dados espectroscópicos.....	167
CONCLUSÕES.....	173
BIBLIOGRAFIA.....	174
ESPECTROS.....	192

ÍNDICE DE TABELAS, ESQUEMAS E ESPECTROS

<u>TABELAS</u>	página
Tabela I.....	11
Tabela II.....	38
Tabela III.....	55
Tabela IV.....	58
Tabela V.....	62
Tabela VI.....	72
Tabela VII.....	82
Tabela VIII.....	90
Tabela IX.....	92
Tabela X.....	104
Tabela XI.....	109
Tabela XII.....	113
Tabela XIII.....	116
Tabela XIV.....	117
Tabela XV.....	118
Tabela XVI.....	132
Tabela XVII.....	155

ESQUEMAS

Esquema I.....	45
Esquema II.....	56
Esquema III.....	69
Esquema IV.....	123
Esquema V.....	129

Esquema VI.....	130
Esquema VII.....	143
Esquema VIII.....	152

ESPECTROS

E.01 - Espectro de massa da mistura de hidrocarbonetos...	192
E.02 - Espectro de UV do esqualeno <u>25</u>	192
E.03 - Espectro de IV do esqualeno <u>25</u>	193
E.04 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) do esqualeno <u>25</u>	194
E.05 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) da mistura de ésteres Gs 2 a Gs 8.....	194
E.06 - Espectro de massa do laurato de etila <u>26</u>	195
E.07 - Espectro de massa do tetradecanoato de metila <u>27</u> ..	195
E.08 - Espectro de massa do miristato de etila <u>28</u>	195
E.09 - Espectro de massa do composto com <u>m/e</u> 110.....	195
E.10 - Espectro de massa do pentadecanoato de etila <u>31</u> ...	195
E.11 - Espectro de massa do palmitato de metila <u>32</u>	195
E.12 - Espectro de massa do palmitato de etila <u>29</u>	196
E.13 - Espectro de massa do composto com <u>m/e</u> 294.....	196
E.14 - Espectro de massa do linoleato de metila <u>33</u>	196
E.15 - Espectro de massa do composto com <u>m/e</u> 308.....	196
E.16 - Espectro de massa do n-octadecanoato de etila <u>30</u> ..	196
E.17 - Espectro de IV da mistura de esteróides.....	197
E.18 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) da mistura de esteróides	198
E.19 - Espectro de massa da mistura de esteróides.....	198
E.20 - Espectro de IV da mistura de ácidos graxos.....	199
E.21 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) dos ácidos graxos.....	200
E.22 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) da mistura de ésteres...	200

E.23 - Espectro de IV dos ácidos triterpênicos Gs 17.18..	201
E.24 - Espectro de massa dos ácidos triterpênicos Gs 17.18.....	202
E.25 - Espectro de IV do Gs 17,18-Me.....	203
E.26 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) de Gs 17.18-Me.....	202
E.27 - Espectro de massa de Gs 17,18-Me.....	204
E.28 - Espectro de IV de Ac- Gs 17,18-Me.....	205
E.29 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) de Ac- Gs 17.18-Me.....	206
E.30 - Espectro de massa de Ac-Gs 17,18-Me.....	204
E.31 - Espectro de UV do $\Delta^{11,13(18)}$ -dieneo <u>44</u>	206
E.32 - Espectro de UV do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieneo-12.19-dione <u>45</u>	207
E.33 - Espectro de IV do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieneo-12.19-dione <u>45</u>	208
E.34 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieneo- 12,19-dione <u>45</u>	207
E.35 - Espectro de massa do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieneo-12,19-dio na <u>45</u>	209
E.36 - Espectro de IV de Gs 9.....	210
E.37 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) de Gs 9.....	211
E.38 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) da porção ácida de Gs 9 - Produto de hidrólise.....	211
E.39 - Espectro de UV de Gs 19.....	212
E.40 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) de Gs 19.....	212
E.41 - Espectro de UV de Gs 20.....	213
E.42 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) de Gs 20.....	213
E.43 - Espectro de UV do tereftalato de dimetila <u>49</u>	214
E.44 - Espectro de IV do tereftalato de dimetila <u>49</u>	215
E.45 - Espectro de RMN ¹ (60 MHz) do tereftalato de dimeti- la <u>49</u>	214

E.46 - Espectro de massa do tereftalato de dimetila <u>49</u>	216
E.47 - Espectro de IV do fitol <u>50</u>	217
E.48 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) do fitol <u>50</u>	218
E.49 - Espectro de RMN ¹ H (60 MHz) do acetato de fitila <u>51</u> .	218
E.50 - Espectro de IV do acetato de glutinol <u>59</u>	219
E.51 - Espectro de massa do acetato de glutinol <u>59</u>	220
E.52 - Espectro de IV do glutinol <u>58</u>	221
E.53 - Espectro de massa do glutinol <u>58</u>	220
E.54 - Espectro de IV da glutinona <u>60</u>	222
E.55 - Espectro de massa da glutinona <u>60</u>	223
E.56 - Espectro de IV do epiglutinol <u>61</u>	224
E.58 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do acetato de glutinol <u>59</u>	225
E.59 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do acetato de glutinol <u>59</u> na presença de Pr(FOD) ₃	225
E.60 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do glutinol <u>58</u>	226
E.61 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do glutinol <u>58</u> na pre- sença de Eu (FOD) ₃	226
E.62 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) da glutinona <u>60</u>	227
E.63 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) da glutinona <u>60</u> na pre- sença de Pr(FOD) ₃	227
E.64 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do epiglutinol <u>61</u>	228
E.65 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do acetato de enigluti- nol <u>62</u>	229
E.66 - Espectro de RMN ¹ H (100 MHz) do acetato de epiglutinol <u>62</u> na presença de Pr (FOD) ₃	229
E.67 - Espectro de RMN ¹³ C da glutinona <u>60</u>	230
E.68 - Espectro de RMN ¹³ C do acetato de glutinol <u>59</u>	231
E.69 - Espectro de RMN ¹³ C do acetato de glutinol <u>69</u> (a)normal b) inversão-recuperação.....	232
E.70 - Espectro de RMN ¹³ C do acetato de epiglutinol <u>62</u>	233

RESUMO

Gnaphalium spathulatum L, família Compositae, é considerada uma planta invasora de culturas e ocorre em todo o Estado de São Paulo. Os extratos da parte aérea foram preparados e analisados através das técnicas cromatográficas comumente utilizadas para tal fim. Assim, pudemos detectar as seguintes classes de compostos: hidrocarbonetos, ésteres e ácidos graxos de cadeia longa, isoprenóides, esteróides, ácidos triterpênicos, açúcares livres, um polissacarídeo, sais inorgânicos e tereftalato de dimetila.

Os hidrocarbonetos de cadeia longa não foram identificados. Os ésteres de cadeia longa foram analisados pelo emprego da técnica de CG/EM acoplada a um computador, indicando a presença de: n-tetradecanoato e palmitato de metila, laurato, miristato, n-pentadecanoato, palmitato e n-octadecanoato de etila, além de 3 outros compostos não identificados. Entre os ácidos graxos de cadeia longa, foram identificados os ácidos palmítico, esteárico, oleico e/ou linoleico através de cromatografia gás-líquido dos respectivos ésteres metílicos. Esqualeno, fitol e tereftalato de dimetila foram determinados através de seus dados espectrais. Os esteróides foram analisados por MIKES e somente β -sitosterol, estigmasterol e campesterol puderam ser identificados. Reações tais como metilação, acetilação e oxidação foram particularmente úteis para a elucidação estrutural precisa dos ácidos triterpênicos oleanólico e ursólico. Os açúcares livres foram identificados como glicose e frutose. Através da hidrólise ácida do polissacarídeo, foram separadas glucose, galactose e xilose. Os sais inorgânicos foram compostos predominantemente por nitrato de potássio.

A segunda parte deste trabalho consta de estudos de RMN¹H, RMN¹³C e espectrometria de massa de alguns derivados glutinicos.

ABSTRACT

Gnaphalium spathulatum L., Compositae, is considered to be a culture invasive and occurs all over the State of São Paulo. Extracts of the aerial parts of the plant were prepared and analysed by the currently used chromatographic techniques. We were able to detect the following classes of compounds: long chain hydrocarbons, long chain esters, long chain fatty acids, isoprenoids, steroids, triterpene acids, free sugars, a polysacharide, inorganic salts and dimethyl terephthalate.

Long chain hydrocarbons were not identified. Long chain esters were analysed by means of CG/MS system coupled with a computer indicating the presence of: methyl n-tetradecanoate and pamitate, ethyl laurate, myristate, n-pentadecanoate, palmitate and n-octadecanoate, and three other compounds not identified. Long chain fatty acids were identified as palmitic, stearic, oleic and/or linoleic acids through gas chromatography of their corresponding methyl esters. Squalene, phytol and dimethyl terephthalate were identified through their spectral data. Steroids were analysed by MIKES and only β -sitosterol, stigmasterol and campesterol could be identified. Reactions such as methylation, acetylation and oxidation were particularly useful for the accurate identification of oleanolic and ursolic acids. Free sugars were identified as glucose and fructose. Acidic hydrolysis of the polisacharide yielded glucose, galactose and xylose. Inorganic salts are mainly composed by potassium nitrate.

The second part of this thesis deals with ^1H NMR, ^{13}C NMR and mass spectra studies of some glutinane derivatives.

INTRODUÇÃO

Apesar de Compositae ser uma das maiores famílias de plantas, compreendendo 1000 gêneros e 15000 espécies, é ainda relativamente fonte de poucos produtos de importância econômica ou medicinal. Somente cerca de 30 espécies são empregadas em bruto como drogas, e não mais que 20 substâncias puras bem definidas são comercialmente disponíveis, ou usadas em terapêutica. Algumas dessas plantas, como Chamomilla, Arnica, Cynara, Echinacea e Silybum são bem conhecidas, e tradicionalmente utilizadas na "medicina caseira"/1/.

As técnicas cromatográficas modernas, aliadas aos métodos físicos atualmente disponíveis, tornam os pesquisadores do campo da fitoquímica potencialmente aptos para fazerem uma análise cada vez mais refinada e precisa sobre a composição de uma dada espécie vegetal. Considerando este presente estado de conhecimento, o evidente potencial científico e medicinal da família Compositae renova dia a dia o interesse pelo seu estudo fitoquímico.

Há tempos vem se acumulando uma grande quantidade de dados, que constituem a base fundamental no desenvolvimento de sua quimiotaxonomia, mesmo assim ainda restam inúmeras espécies inexploradas. Há sempre a possibilidade de se isolar uma substância original que apresente atividade biológica nova e interessante.

Estamos realizando um estudo químico sistemático das espécies vegetais Pterocaulon e Gnaphalium, ambas da tribo Inuleae, família Compositae, comuns na região sudeste do Brasil. Todos os compostos mais característicos das plantas são de interesse, mas especial atenção é dedicada à detecção de substâncias poliacetilê

nicas. São de distribuição limitada na natureza, mas sua presença é bem documentada na família/2/. São interessantes não só pela química envolvida nos processos de isolamento, identificação e determinação estrutural, como também pelas atividades biológicas que muitas delas têm apresentado /2'/.

Iniciamos nossos estudos com a espécie Pterocaulon alopecuróides. Sabe-se muito pouco quimicamente acerca deste gênero, mas a grande dificuldade encontrada na época para se obter quantidade suficiente desta planta nos levou a abandoná-la temporariamente e iniciar estudos com outra espécie. A escolha de Gnaphalium spathulatum L., então inédita sob o ponto de vista químico, deveu-se em parte ao fato de se ter informações acerca da ocorrência de acetilenos em algumas espécies do gênero.

O estudo fitoquímico deste Gnaphalium, que consiste na primeira parte deste trabalho, visa a aquisição de um treinamento básico em isolamento, identificação e química de substâncias naturais, e ainda serve como uma contribuição com alguns dados e informações para a catalogação de compostos característicos destas plantas.

Considerando ainda o aspecto educativo e com o objetivo primordial de criar um arquivo de dados espectrais de substâncias triterpênicas, outra classe de compostos de grande interesse e que ocorrem em Compositae /3/, incluímos em nosso trabalho um pequeno estudo sobre RMN¹H e ¹³C e espectrometria de massa de um triterpeno pentacíclico isolado de Olmediopereba schlerophylla e alguns de seus derivados. Esta substância, que ainda não tinha sido identificada, nos foi disponível em forma puríssima e em quantidade suficiente para todo nosso estudo, que consiste na segunda parte desta dissertação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma pesquisa em herbários antigos revelou que um número surpreendentemente grande de plantas da família Compositae foram usadas pelas suas propriedades curativas. Sem dúvida, este amplo uso medicinal inspirou os químicos orgânicos do início do século a explorarem sua química, a fim de identificar os constituintes ativos. Desde aqueles dias, a química da família vem sendo investigada por várias razões, resultando numa quantidade enorme de informações acerca dos constituintes químicos presentes /4/.

Várias classes de compostos são comuns nesta família, embora nenhuma delas seja exclusiva. Flavonóides, óleos essenciais, ciclitóis, derivados de ácido cafeico, di- e triterpenos aparecem em muitos de seus membros, mas é a presença de tipos estruturais de três classes de produtos naturais que a caracterizam: as sesquiterpeno lactonas, os poliacetilenos e os polissacarídeos tipo frutanas. As compostas são de fato excepcionalmente ricas, tanto na variedade de compostos secundários presentes, como no número de estruturas complexas conhecidas dentro de uma classe /3,4/.

A nível das tribos dentro da família, MABRY e BOHLMANN /5/ enfatizam que, apesar de não haver muita uniformidade química entre elas, estão muito mais relacionadas entre si que quaisquer outras tribos de famílias correlacionadas. Também sugerem uma "classificação" destas tribos de acordo com sua complexidade química. Assim, dentre as Compositae, a Senecioneae (114 gêneros, 3000 espécies) é distinta quimicamente de outras tribos. Entre as não-Senecioneae, a Heliantheae (211 gêneros, 2600 espécies) é a

mais complexa quimicamente, sendo intermediárias as tribos Heleneae (40 gêneros, 370 espécies), Inuleae (193 gêneros, 2100 espécies), Anthemideae (102 gêneros, 1400 espécies), Eupatorieae (159 gêneros, 2000 espécies), Vernonieae (70 gêneros, 1456 espécies) e Cynareae (79 gêneros, 2725 espécies), e quimicamente mais depauperadas as tribos Cichorieae (80 gêneros, 2413 espécies), Astereae (133 gêneros, 2500 espécies), Arctoteae (16 gêneros, 200 espécies), Mutiseae (89 gêneros, 974 espécies) e Tageteae (16 gêneros, 237 espécies).

A tribo Inuleae, à qual pertence o gênero Gnaphalium, foi muito pouco estudada quimicamente. Uma investigação detalhada limita-se a poucas espécies pertencentes principalmente aos gêneros Blumea, Gnaphalium, Helichrysum e Inula /6/. A contribuição mais representativa parece ser de BOHLMANN /7/, com o estudo de poliacetilenos em raízes e folhas. As sesquiterpeno lactonas, que têm sido exaustivamente exploradas em outras tribos, foram identificadas somente em alguns de seus membros. Os pigmentos flavonoides têm sido estudados com bastante atenção em Helichrysum por HANSEL e colaboradores, mas fora isto muito pouco tem sido feito com eles. Dispõe-se de informação fragmentária acerca dos outros constituintes /8/, mas sem dúvida a interessante química destas plantas merece uma investigação mais detalhada.

Através de uma revisão bibliográfica exaustiva sobre os estudos feitos com Gnaphalium, constatamos que existe algum tipo de informação química referente a 23 espécies, que estão listadas na Tabela I.

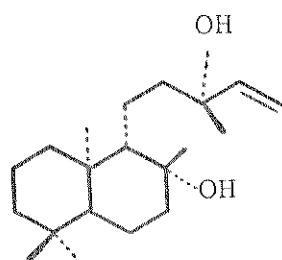
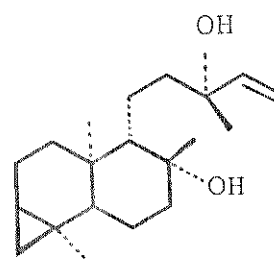
A seguir comentaremos os aspectos relevantes da constituição química destas espécies, de acordo com a classe de substâncias isoladas.

Terpenóides

Em relação à classe dos terpenóides, não se dispõe de quase nenhuma informação. Frações contendo óleos essenciais foram apenas detectadas em algumas espécies /9 a 12/, sem nenhuma referência específica quanto aos compostos isolados.

As sesquiterpeno lactonas, consideradas como características da família, ainda não foram encontradas neste gênero, apesar de aparecerem em gêneros correlatos.

Apenas recentemente se tem notícias do isolamento de diterpenos em Gnaphalium. A investigação de G. undulatum/13/ conduziu a dois novos derivados labdanos 1 e 2, além de uma diterpeno lactona, cuja estrutura não foi elucidada.

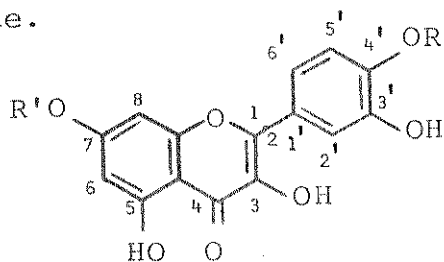
12

Não se têm indicações de nenhum triterpenóide isolado, a não ser β -sitosterol /14/. Saponinas foram detectadas /12,15/, mas não identificadas.

Flavonóides

Os flavonóides podem ser considerados, sem dúvida alguma, como a classe de compostos mais característica do gênero Gnaphalium. São amplamente distribuídos entre as espécies, mas não apresentam grandes variedades estruturais. Os mais comuns

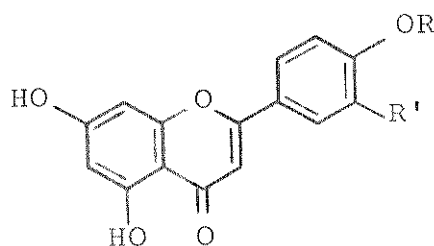
são os chamados co-pigmentos das antocianinas, a saber, flavonóis e flavonas. Os compostos mais representativos destes dois grupos são a quercetina 3 /16,17,18/ e a luteolina 4 /16,17,19/, respectivamente.



3 - R = R' = H

5 - R = glucose, R' = H

9 - R = H, R' = Me



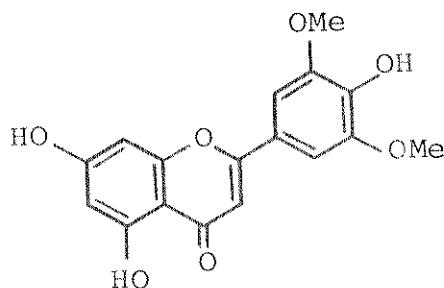
4 - R = H, R' = OH

6 - R = glucose, R' = OH

7 - R = R' = H

Ocorrem frequentemente em combinação glicosídica na posição 4', como quercetina-4'-β-D-glucósido 5 /16/ e luteolina-4'-β-D-glucósido 6 /16,19,20/. Dois glicosídeos ligados em outras posições foram isolados de G. sylvaticum /21/, isoquercitrina (quercetina 3-O-β-D-glucopiranosídeo) e quercimeritrina (quercetina-7-O-β-D-glucopiranosídeo).

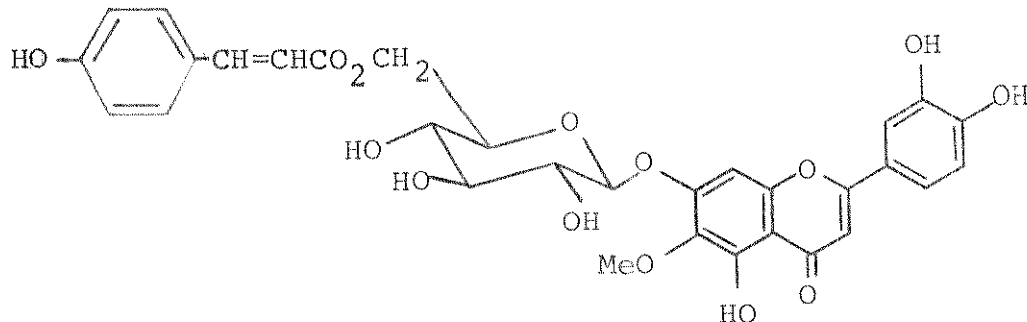
Os outros flavonóis e flavonas encontrados são, salvo poucas exceções, simples variações estruturais dos mais comuns 3 e 4, como por exemplo apigenina 7 /16,21/, tricina 8 /21/ e rhamnetina 9 /18/.



8

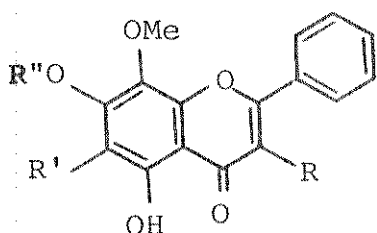
A estrutura 10, proposta para o glicosídeo isolado de G. uliginosum /22,23/, apresenta uma interessante união entre dois fragmentos fenólicos comuns em Compositae: ácido cafeico e 6-meto

xiluteolina.



10

Finalmente, entre flavonóis e flavonas tem-se também encontrado alguns compostos sem substituição no anel B, como 3, 5,7-tri-hidroxi-6,8-dimetoxiflavona 11 em *G. obtusifolium* /24/ , 5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona 12 em *G. pellitum* /15/, 5,7-di-hidroxi-3,8-dimetoxiflavona 13 em *G. lanuginosum* /25/ e 5-hidroxi-3,6, 7,8-tetrametoxiflavona 14 em *G. undulatum* /13/.



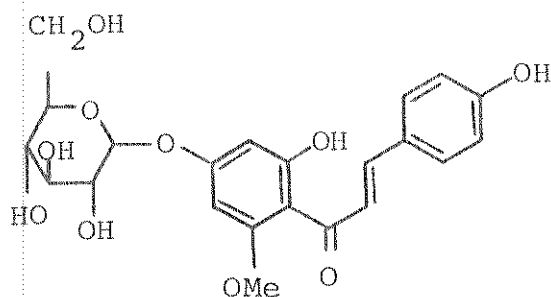
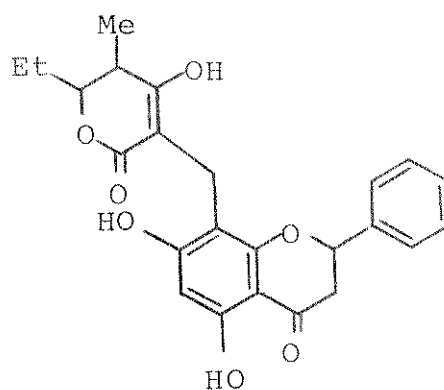
11 - R = OH, R' = OMe, R'' = H

12 - R = R' = H, R'' = Me

13 - R = OMe, R' = R'' = H

14 - R = R' = OMe, R'' = Me

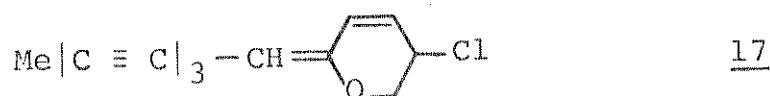
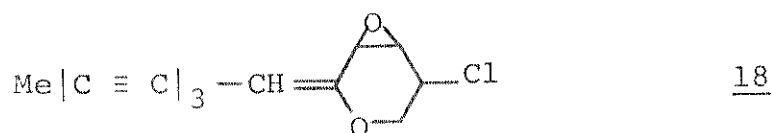
Outros flavonóides de distribuição natural mais limitada, como chalconas e flavanonas, foram encontrados em poucas espécies. Chalconas ocorrem caracteristicamente em Compositae, especialmente em *Coreopsis*, e em *Gnaphalium* isolou-se o glicosídeo deidro-p-Casebotina (2',4,4'-tri-hidroxi-6'-O metoxichalcona-4' - -glucósido) 15 de duas espécies: *G. affine* /19/ e *G. multiceps* /26/, cuja estrutura foi comprovada por síntese /27/. *Obtusifolia* 16, uma flavanona com uma incomum unidade C 9, foi isolada de *G. obtusifolium* /28/.

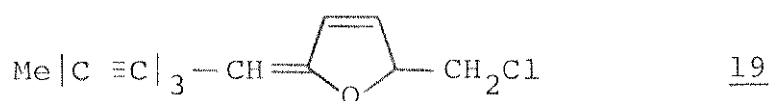
1516

Taninos condensados, formados pela polimerização oxidativa, não-enzimática, de unidades de flavonóides simples, foram detectados em algumas espécies /29/, entre elas G. suaveoleus /9/ e G. remyanum /12/.

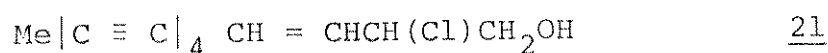
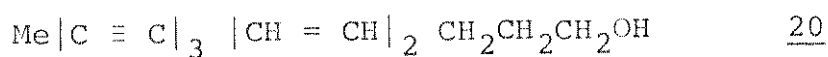
Lipídios e compostos relacionados

Apenas alguns trabalhos fazem vagas referências à detecção de hidrocarbonetos insaturados /29/ e ácidos graxos /10/, mas por outro lado é bastante ressaltada a ocorrência de poliacetilenos. São característicos da família, e em membros de Gnaphalium foram isolados por BOHLMANN e colaboradores a partir de raízes e folhas. De G. obtusifolium obteve-se pequenas quantidades dos compostos triacetilênicos biogeneticamente interessantes 17, 18 e 19 /30/, cujas estruturas foram confirmadas por sínteses posteriores /31,32/.

1718



Recentemente, tem-se registro do isolamento dos isômeros-trans de 20, 21, 22 e 23 /13/, considerados como precursores dos éteres cloroenol acetilênicos 17, 18 e 19. Foram encontrados em espécies americanas de Gnaphalium: G. declinatum (20 e 23), G. pellitum (23), G. undulatum (23) e G. wrightii (21 e 22). O composto 23, um dos primeiros pigmentos poliacetilênicos observados na natureza, já tinha sido anteriormente detectado em G. luteo-album /33/.



Outros constituintes secundários

Compostos nitrogenados não são característicos das Compositae, e registros de alcalóides são esparsos, com exceção daqueles tipo pirrolizidínicos encontrados em membros da tribo Senecioneae. Em Gnaphalium foi detectada a presença de alcalóide em G. remyanum /12/, sem referências quanto à sua identificação.

A presença de traços de nicotina em algumas plantas do gênero conduziu a um estudo mais detalhado do material. G. poly-

cephalum, G. macounii e G. obtusifolium /34/ foram coletados já secos, tostados e processados. Os produtos da combustão do material apresentaram sabor e aroma como os do tabaco, mas continham quantidades mínimas de nicotina. Sugeriu-se que poderiam ser utilizados como substitutos do tabaco natural.

A maior parte dos carboidratos ocorrem atados a uma variedade de diferentes aglicons, como glicosídeos. A análise dos açúcares livres encontrados /12,29/ conduziu à identificação dos monossacarídeos glucose e frutose.

A ocorrência de frutanas tipo inulina e a acumulação conjunta dos ciclitóis isoméricos L-inositol e escilitol constituem uma peculiaridade da família /4/. Entretanto, no gênero Gnaphalium não se encontrou nenhuma indicação relativa ao estudo de polissacarídeos e os ciclitóis são representados por apenas um composto, (+)-pinitol 24, isolado de G. pellitum /14/.

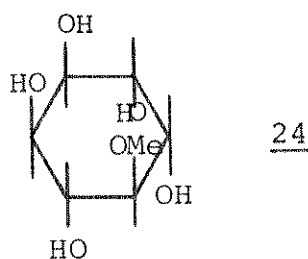


Tabela I - Índice de plantas do gênero Gnaphalium submetidas
a estudo fitoquímico

<u>Espécie</u>	<u>Referência</u>
G. affine	16,19,20
G. alatum	15
G. citrinum	10,11
G. declinatum	13
G. dioicum	98
G. elegans	25
G. lanuginosum	25
G. luteum album	7,33,98
G. macounii	34
G. multiceps	26,27
G. obtusifolium	24,28,30,34
G. oligandrum	13
G. pellitum	13,14,18
G. polycephalum	34
G. purpureum	7
G. remyamim	12
G. sprengellii	7
G. suaveoleus	9
G. sylvaticum	17,21
G. uliginosum	7,22,23
G. undulatum	7,13
G. vaticum	7
G. wrightii	13

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Gnaphalium spathulatum*

- I - Descrição botânica
- II - Métodos de extrações, tratamento dos extratos e isolamento dos compostos
- III- Métodos de identificação e considerações estruturais das substâncias isoladas e derivados

I - Descrição botânica /35, 36/

A planta estudada, *Gnaphalium spathulatum*, pode ser classificada como segue:

Divisão : Angiospermae
Classe : Dicotyledoneae
Ordem : Campanulales
Família : Compositae
Tribo : Inuleae
Gênero : *Gnaphalium*
Espécie : *spathulatum*

As plantas do gênero *Gnaphalium* são herbáceas, anuais ou perenes, em geral eretas. *Gnaphalium spathulatum*, conhecida vulgarmente como macela, macio ou meloso, é anual, herbácea, ereta, com 30-60 cm de altura. Possui caule simples, em geral não ramificado, revestido em toda sua extensão por densa pilosidade branco-lanuginosa. As folhas são alternas, sésseis, espatuladas, de ápice arredondado e bordos íntegros, membranáceas, na face superior verde-clara e com pelos simples, curtos e brancos, e na inferior com densa e compacta pilosidade branco-lanuginosa.

A inflorescência é axilar e terminal, formada por capítulos sésseis e muito próximos uns dos outros, dando ao conjunto aspecto espiciforme.

A reprodução se dá por sementes, com ciclo de 100-120 dias e florescimento nos meses de julho-outubro. Ocorre comumente em todo Estado, tendo preferência por solos argilosos.

Gnaphalium spathulatum e mais duas espécies do gênero, G. spicatum e G. purpureum ocorrem no Estado de São Paulo como plantas invasoras de culturas.

II - Métodos de extrações, tratamentos dos extratos e isolamento dos compostos

O método de extração e de tratamento dos extratos de uma planta naturalmente depende do tipo de substâncias que estão sendo isoladas. No presente trabalho, nosso grande interesse se dirigia ao isolamento e estudo dos poliacetilenos. Muitos destes compostos podem ser obtidos em forma razoavelmente estável, mas outros, entretanto, são muito instáveis /37/. Visando evitar perdas ou modificações químicas que podem ocorrer durante o processamento de um material, o trabalho foi conduzido sob condições bastante controladas. Assim, a secagem e obtenção dos primeiros extratos do G. spathulatum foram feitas cuidadosamente, evitando em particular aquecimento e exposição à luz.

A primeira coleta foi feita em novembro, época de fim de safra, e a parte aérea da planta foi seca ao ar e em estufa a 40°C por uma noite.

1 - EXTRATO HEXANO: ÉTER I

O material moído foi submetido primeiramente a repetidas extrações, à temperatura ambiente e no escuro, com hexano: éter etílico 1:1.

Uma amostra de cada extrato foi retirada e submetida diretamente à análise no ultra violeta, para se verificar a possível existência de poliacetilenos.

A propriedade mais característica destes compostos é o espectro de UV. Quase todos mostram uma série de 3 ou mais picos muito intensos na região de 200-320 nm (ex. fig. 1), e a espectroscopia de UV é largamente utilizada como um meio de detecção preliminar. Infelizmente, este não é um teste conclusivo, considerando que uns poucos compostos não dão a série de picos intensos, mostrando somente uma única banda larga. Em tais casos, o espectro de IV também pode ser utilizado, desde que existe uma banda característica em aproximadamente 2200 cm^{-1} para a ligação acetilênica /37/.

Em nosso caso, nem o espectro de UV (fig. 2), nem o de IV mostraram qualquer banda indicativa de tal grupo.

Continuando o processamento, todos extratos foram reunidos e o solvente devidamente evaporado. O material resultante (extrato bruto HEX: ÉTER I) foi submetido diretamente à cromatografia em coluna sílica-gel. Desta coluna separamos vários compostos, recromatografados até serem obtidos puros ou em misturas não separáveis pelas técnicas cromatográficas mais comuns.

Para identificação dos componentes da planta utilizamos os métodos correntemente empregados para tal fim /37/, inclu-

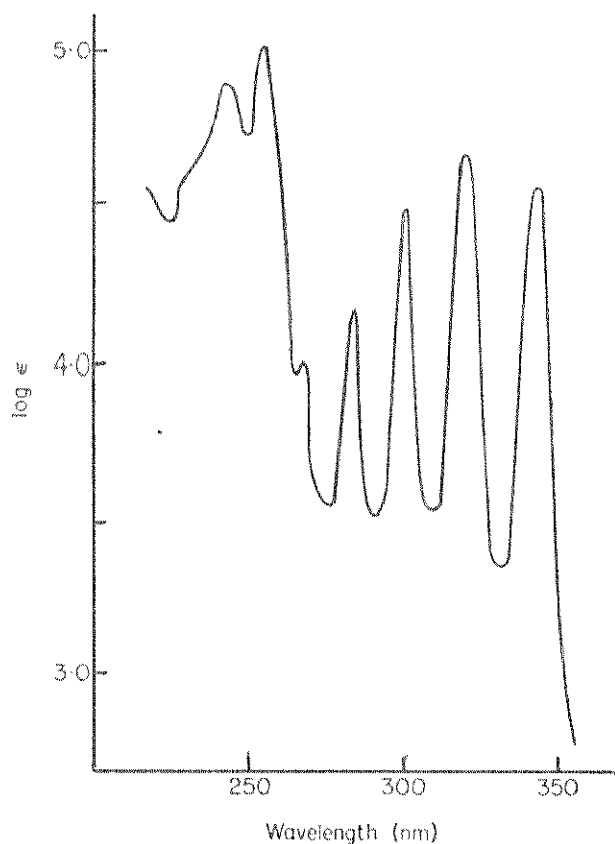


fig. 1 - Espectro de UV de
 $\text{CH}_3-(\text{C}\equiv\text{C})_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$ /37/

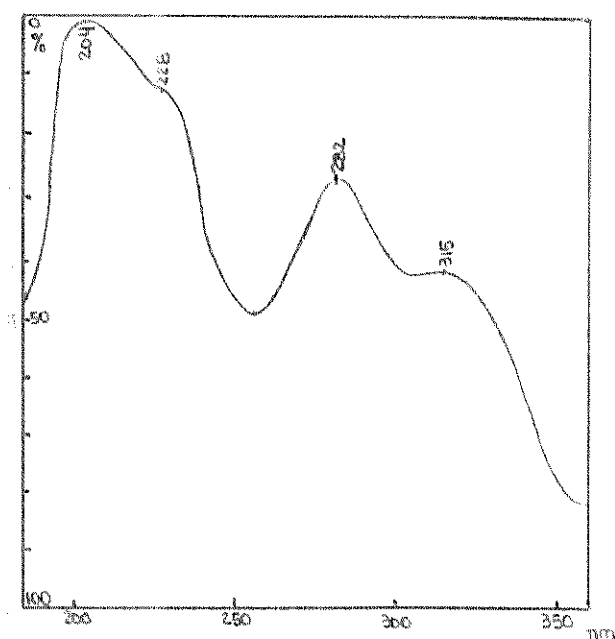


fig. 2 - Espectro de UV do
 extrato HEX:ÉTER I

sive de algumas técnicas especiais, como MIKES. Assim, identificamos neste extrato 18 compostos (Gs 1 a Gs 18) de várias classes, como hidrocarbonetos, ácidos graxos livres e esterificados e terpenóides como esteróis e triterpenos. Os métodos utilizados para elucidação de suas estruturas serão discutidos adiante.

2 - EXTRATO METANÓLICO I

Para se separar também os componentes mais polares,

como carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, entre os quais se incluem os flavonóides, optamos por uma segunda extração da mesma torta, desta vez com metanol, com extrator do tipo Soxhlet por 48 h. Por evaporação do solvente à pressão reduzida obtivemos um material denominado EXTRATO METANÓLICO I.

Este apresentou grande quantidade de sólido, mistura do com muita clorofila e seus produtos de decomposição, com certa remanescentes do extrato anterior.

O sólido escuro, insolúvel em solventes orgânicos comuns, foi lavado repetidas vezes com clorofórmio (F_{CHCl_3}) e posteriormente com metanol (F_{MeOH}). Após repetidas purificações, obtivemos cristais incolores, com p.f. acima de 300°C , alta insolubilidade em solventes orgânicos e não detectável em CCD com vários reveladores utilizados /37-p . 216, 38 a, b, c/. O espectro de RMN^1H em D_2O não apresentou nenhum sinal.

Estas características nos levaram a crer que se tratava de sal inorgânico, o que foi confirmado por testes qualitativos sistemáticos para cátions e ânions /39,40,41/.

A ocorrência de sais inorgânicos em plantas é bem documentada. PLOUVIER /42,43/ observou, incidentalmente, a presença constante de grandes quantidades de nitrato de potássio em *Compositae*, dificultando inclusive o isolamento e purificação dos compostos de interesse, no caso ciclitóis. HARBORNE, numa revisão publicada em 1975 /44/, se refere a uma nova classe de compostos de enxofre em plantas, os sulfatos de flavonóides. Indica que muitas flavonas e flavonóis comuns ocorrem distribuídos em plantas em uma nova forma conjugada, covalentemente ligados a bissulfatos inorgânicos. Uma pesquisa sobre a distribuição natural destes sulfatos mostrou que eles têm sido encontrados em cerca de

160 espécies pertencentes a várias famílias, entre elas a Compositae. É sugerido que os flavonóides têm uma função ativa no balanceamento de íons, na incorporação do sulfato inorgânico e na transferência deste para o estado orgânico, de tal modo que os sulfatos conjugados somente se acumulam em plantas que possuem em suas vizinhanças altas concentrações do íon SO_4^{--} . Estes são normalmente isolados como sais de potássio, presumivelmente porque o potássio é o principal cátion encontrado nos tecidos vegetais e a co-ocorrência de K^+HSO_4^- livre é bastante provável.

Pelos resultados dos testes identificamos nosso sal como uma mistura de nitrato, cloreto e sulfato de potássio. Não foram feitos testes quantitativos, mas temos grande predominância de nitrato de potássio. O IV de nossa mistura foi superponível ao de uma amostra autêntica de KNO_3 .

Além desta grande quantidade de sais de potássio (4,530 g após purificações), o extrato metanólico apresentou-se rico em açúcares livres e polissacarídeos. Estes foram detectados na F_{MeOH} , juntamente com pigmentos, resinas e sais inorgânicos arrastados pelo metanol. A presença de açúcares livres foi confirmada por revelação característica das placas de sílica e celulose com reagentes específicos/37-p . 216 e 230, 38 c/ e por formação de espelho de prata com reagente de Tollens /45/.

Os polissacarídeos precipitam por adição de grande excesso de etanol, mas pela pequena quantidade obtida, não foram estudados no presente extrato.

A separação dos açúcares naturais livres foi conseguida utilizando técnicas de cromatografia em camada delgada de sílica com diferentes impregnantes e de cromatografia em papel. A identificação foi feita por comparação com padrões e será discuti

da adiante.

Finalmente, a análise da F_{CHCl_3} deste extrato não nos conduziu ao isolamento de nenhum composto puro. Esta fração era constituída em sua quase totalidade por matéria corante e material lipídico remanescente do extrato anterior (HEX: ÉTER I), dificultando sobremaneira na detecção de outras substâncias. Submetemos o material a uma purificação prévia através de partição com solventes de várias polaridades. Nos referiremos apenas à fração eluída com clorofórmio. As demais ou se encontravam muito impurificadas, ou em quantidades muito pequenas. Por CCD em vários sistemas de solventes observamos uma série de manchas visíveis (azuis) sob irradiação com lâmpada UV, mas nenhuma muito nítida nem com reveladores comuns (H_2SO_4 :MeOH, iodo), nem com reveladores específicos (para terpenóides, alcalóides).

Pequena porção do material foi submetida à cromatografia em camada espessa de sílica, e 4 faixas azuis sob irradiação foram extraídas e analisadas no UV. Apresentaram espectros muito semelhantes, com λ max em 225 nm e pequenas absorções em 275 e 340 nm (fig. 3).

Considerando a possibilidade de termos flavonóides, temos de lembrar que eles, contendo sistemas conjugados aromáticos, mostram intensas bandas de absorção nas regiões UV e visíveis do espectro. As principais classes de flavonóides apresentam bandas de absorção máxima acima de 300 nm /37/, com exceção das flavanonas e flavanonóis (λ max 275-290 e 225 nm, com banda menor em 310-330 nm) e das isoflavonas (λ max 255-265 nm, com banda menor em 310-330 nm). Para as flavanonas, um importante teste de cor em solução alcoólica é a redução com magnésio em pó e HCl concentrado: somente as flavanonas entre os flavonóides dão cor vermelha intensa /37,45'/. No nosso caso, apesar dos espectros apresentarem bandas

características de uma flavanona, o teste de cor foi negativo.

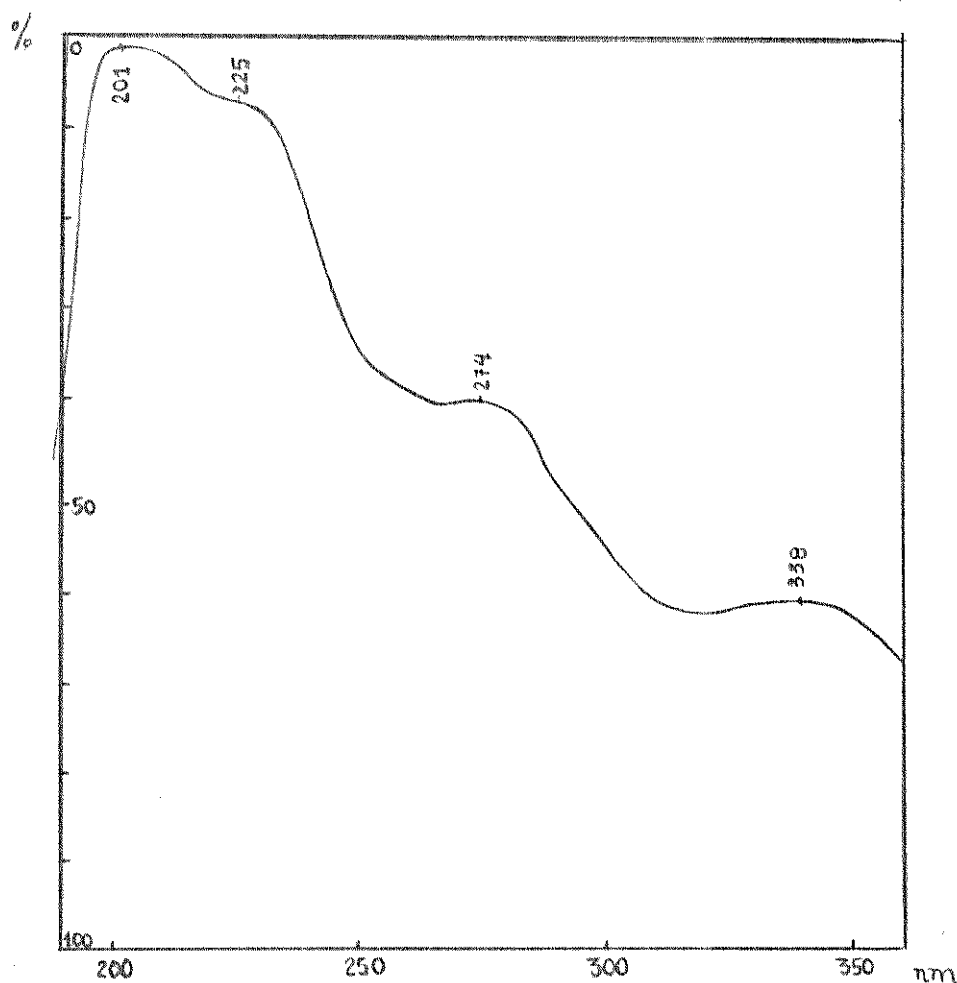


fig. 3 - Espectro de UV dos compostos isolados por CCE da F_{CHCl_3}

A detecção de flavonóides por CCD também é bastante utilizada. Eles são fenólicos e portanto mudam de cor quando tratados com base ou com amônia. Testes em CCD tanto com o material da F_{CHCl_3} bruto quanto com aqueles isolados por CCE, utilizando vapor de amônia e revelador específico de $AlCl_3$ /38 f/ não deram resultados conclusivos.

Em resumo, todas as nossas tentativas de detectar flavonóides neste extrato não forneceram nada que pudesse ser utilizado como evidência.

Por outro lado, em nossos testes com CCD observamos manchas bastante polares, fluorescentes com luz UV e apresentando

coloração característica com reagente de Dragendorff /38 e/. Teste com reagente de Mayer na F_{CHCl_3} também deu resultado positivo.

A ocorrência de alcalóides em Compositae é bastante limitada, principalmente em Gnaphalium, como já indicado anteriormente (revisão bibliográfica), portanto, não podemos descartar a possibilidade de uma falsa reação positiva para alcalóides /46/. Esta ocorre com muitos compostos não nitrogenados comuns em plantas, tais como monoterpenos, esteróis, triterpenos, cumarinas, etc., bastando que se tenha uma função oxigenada e um carbono β ao oxigênio com alta densidade eletrônica.

Como esta fração era constituída por compostos bastante hidroxilados (verificado pelas manchas alongadas em CCD e comprovado pelo IV), uma separação mais nítida só foi conseguida quando trabalhamos com o material acetilado. Por cromatografia em coluna de sílica obtivemos pequenas quantidades de 3 compostos com R_f muito próximos, que coram caracteristicamente com Dragendorff. Foram purificados por CCE de sílica até apresentarem aparentemente apenas uma mancha em placa com vários sistemas de solventes.

As análises espectroscópicas, no entanto, não forneceram dados coerentes que nos conduzissem a conclusões satisfatórias. Tentativas de isolar mais destes compostos de outras frações foram infrutíferas. Portanto, a baixa quantidade de material isolado, aliada à complexidade dos espectros e a falta de maiores informações acerca de possíveis estruturas alcaloídicas não nos permitiram a identificação dos compostos.

Como descrito, o estudo detalhado da parte aérea do G. spathulatum coletado em novembro não levou ao isolamento de certos compostos considerados como característicos do gênero, co

mo poliacetilenos e flavonóides. Este fato pode ser atribuído a época da coleta, ineficiência dos métodos utilizados, quantidade relativa destas substâncias frente a outras encontradas ou ainda, ausência destas na espécie analisada.

Assim sendo, resolvemos reestudar a planta, utilizando um novo material coletado em agosto, época de início de safra, quando estas se encontram bastante viçosas, em período de floração.

A parte aérea, sem secagem prévia, foi picada em pequenos pedaços e separada em 2 partes (parte a e parte b).

Parte a

3-EXTRATO METANOL: ÁGUA

Açúcares são compostos bastante sensíveis, que podem facilmente sofrer isomerização e/ou decomposição durante as várias etapas que precedem seus isolamentos /37/. Até a obtenção da F_{MeOH} (EXTRATO METANÓLICO I); onde estes foram anteriormente detectados e identificados, o material passou por diversos estágios do processamento que poderiam levar a tais perdas. Além disso, a pequena quantidade de polissacarídeos obtida naquele extrato não permitiu uma análise mais completa. Assim, parte da planta da segunda coleta foi utilizada em uma nova extração, visando apenas os açúcares livres e os polissacarídeos.

O material fresco foi extraído com metanol: água 1:1 a frio e o solvente foi concentrado à baixa temperatura (inferior a 40°C), sob pressão reduzida (bomba de vácuo). Teste com reagente de Fehling /45/ resultou na formação imediata e abundante de ppt

vermelho tijolo, evidenciando a presença de grande quantidade de açúcares redutores.

A separação dos polissacarídeos dos demais açúcares de baixo peso molecular requereu uma série de reprecipitações em água-etanol: estes ficam em solução, enquanto aqueles precipitam. Para garantir a separação, fizemos ainda diálise contra água destilada, acompanhando por testes com reagente de Fehling /45/, que deram negativos.

Para caracterização do polissacarídeo, a análise mais importante e mais facilmente realizada é a hidrólise e a detecção dos açúcares constituintes. A hidrólise total foi conduzida em HCl aquoso 1N por 5 h a 100°C. Acompanhando a reação por teste de Fehling, observamos resultados positivos após 2 h.

Os açúcares naturais livres e os obtidos pela hidrólise ácida dos polissacarídeos foram identificados utilizando as mesmas técnicas anteriormente empregadas, através da comparação com padrões. Os açúcares livres detectados neste extrato foram idênticos aos do EXTRATO METANÓLICO I, e assim descartamos a possibilidade de perdas ou alterações devidas ao processamento.

Parte b

4 - EXTRATO HEXANO: ÉTER II

A outra parte do material fresco foi extraída exaustivamente por percolações com hexano: éter etílico 1:2, com cuidados especiais relativos à exposição à luz. Como para o EXTRATO HEX: ÉTER I, várias amostras foram retiradas e submetidas direta

mente à análise no ultra violeta. Novamente, nenhuma banda característica foi observada (λ max 200 nm).

Pequena porção do extrato concentrado (HEXANO:ÉTER II) foi cromatografada em placa de sílica gel com indicador fluorescente, separando-se assim 5 faixas visíveis sob irradiação no ultra violeta. No entanto, os espectros no UV não forneceram nenhum dado característico (λ max 200-205 nm, com pequenos ombros em 220-225 nm).

Portanto, nesta triagem prévia não verificamos neste extrato nenhuma evidência de poliacetilenos ou de qualquer outro composto com cromóforos característicos.

Não obstante, o extrato concentrado foi submetido a um tratamento químico para se separar os compostos ácidos dos neutros, considerando dois fatores: em primeiro lugar a planta demonstrou, pelo estudo anterior, conter grande quantidade de ácidos de cadeia longa, e em segundo lugar muitos compostos acetilênicos conhecidos foram isolados como ácidos /7/. O tratamento escolhido já foi, inclusive, utilizado para tal fim /47/.

O método consiste no fracionamento do extrato bruto (partição, fase aquosa/fase orgânica), levando em conta que os diversos componentes apresentam comportamentos distintos a diferentes pH.

As frações neutras (N_1 e N_2) (parte experimental - cap. 4) foram submetidas à análise no ultra violeta, apresentando λ max 202 nm e banda menor em 260 nm. Por serem idênticas por CCD, foram reunidas uma única fração N.

A separação total dos ácidos de cadeia longa dos demais compostos não foi conseguida, nem pelo tratamento acima, nem através de uma reação de saponificação testada com pequena quanti

dade de material (fração A).

As frações N e A foram submetidas a comparação cuidadosa por CCD de seus componentes com aqueles já estudados no EXTRATO HEX: ÉTER I, e por não apresentarem nenhuma diferença evidente na composição, não foram levadas a fracionamentos posteriores.

5 - EXTRATO BENZÊNICO

A mesma torta foi submetida a uma nova extração, desta vez com benzeno em extrator do tipo Soxhlet.

Cromatografias em colunas de sílica gel do material obtido por evaporação do solvente (EXTRATO BENZÊNICO) resultaram no isolamento de um composto idêntico em CCD e por comparações espectrais, com o Gs 9 isolado do EXTRATO HEX: ÉTER I.

6 - EXTRATO METANÓLICO II

Visando os compostos mais polares mas tentando evitar o arraste de grandes quantidades de sais e açúcares, como ocorrido anteriormente, fizemos uma terceira extração do mesmo material, agora com metanol a frio. O extrato obtido por evaporação do solvente, denominado METANÓLICO II, foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, resultando no isolamento de 4 compostos, de Gs 19 a Gs 22, não encontrados nos extratos precedentes. Além destes, isolamos também esteróides e ácidos gra

xos idênticos aos estudados previamente. Gs 19 e Gs 20 não foram identificados, mas seus dados físicos e espectrais serão discutidos adiante, juntamente com os outros compostos.

III - Métodos de identificação e considerações estruturais das substâncias isoladas e derivados

Mistura de hidrocarbonetos (F 4-6 - EXTR. HEX:ÉTER I)

Sólido amorfo, com p.f. 59-66°C.

O espectro no IV apresenta bandas em 2950-2840, 1470, 1380, 730 e 720 cm^{-1} , devidas a estiramentos e deformações C-H, sendo as duas últimas características para hidrocarbonetos de cadeia longa com no mínimo 4 grupos CH_2 consecutivos. Uma banda larga em 1620 cm^{-1} sugere estiramento $\text{C} = \text{C}$ /48/.

O espectro de RMN^1H apresenta um único sinal em δ 1,25(s), devido aos prótons metilênicos $(\text{CH}_2)_n$.

A larga faixa de p.f. foi indicativa de mistura, com provada por CG, conduzida em coluna OV-17 3% a 270°C. O cromatograma apresenta 9 picos principais (fig. 4).

O espectro de massa da mistura (E. 01) apresenta grupos de picos espaçados de 14 u.m.a. (íons $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$) com gradual decréscimo de intensidade, característico de hidrocarbonetos saturados normais, correspondendo à perda de CH_2 . A massa máxima (m/e 492) nos sugere $\text{C}_{35}\text{H}_{72}$, e pelo grande número de picos observados pela CG, é bem provável termos uma série de hidrocarbone

tos homólogos.

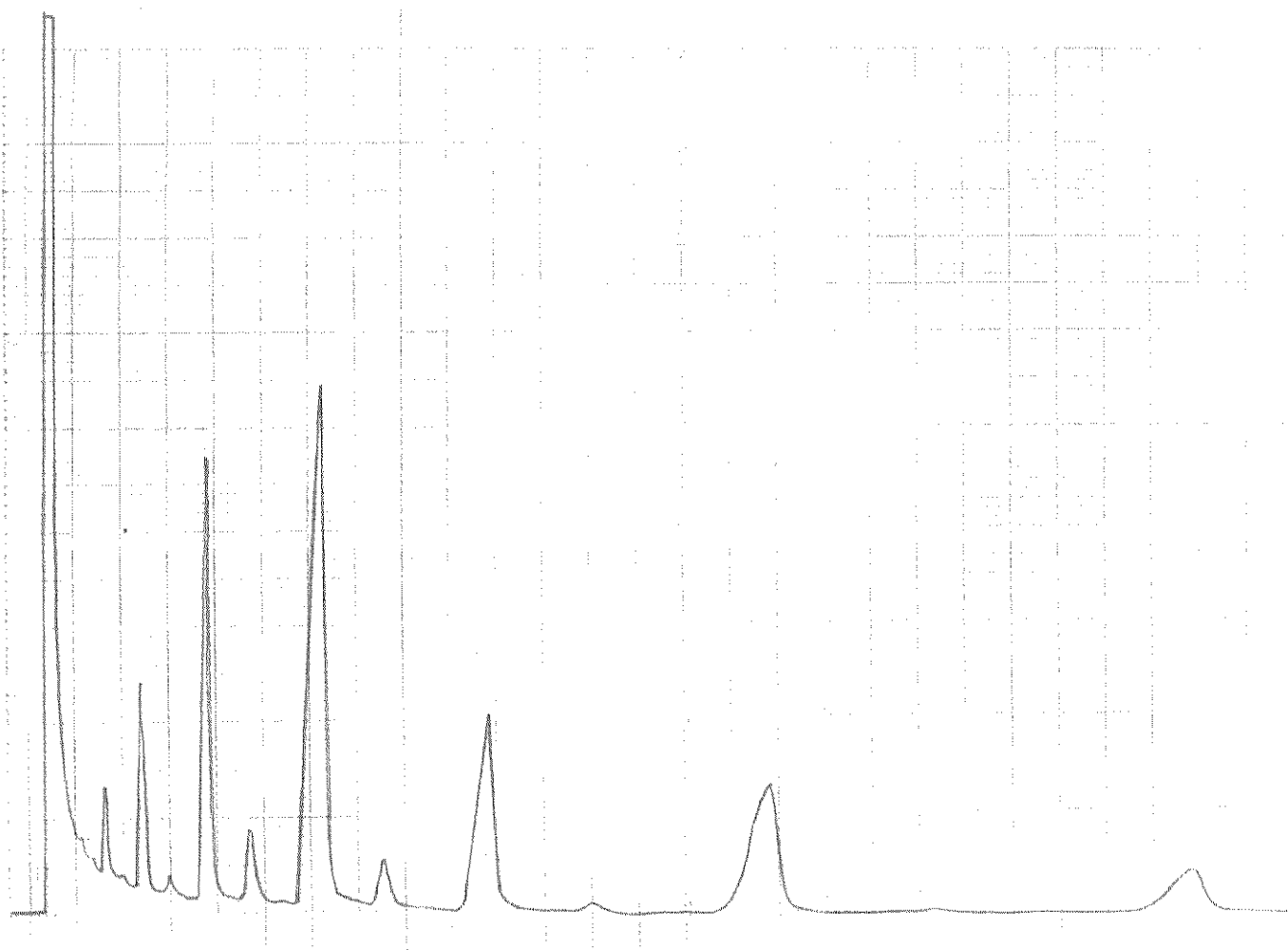


fig. 4 - Cromatograma mistura de hidrocarbonetos

Assim, por exemplo, os picos em m/e 464 e em m/e 436 podem ser devidos aos íons moleculares dos hidrocarbonetos $C_{33}H_{68}$ e $C_{31}H_{64}$, respectivamente, e assim por diante.

O espectro de IV nos indica a existência de hidrocarboneto(s) insaturado(s) na mistura, o que é confirmado pelo EM. A adição de uma dupla ligação em um alcano aumenta a abundância da série de íons $C_nH_{2n-1}^+$ e $C_nH_{2n}^+$, especialmente em íons de massas mais baixas. Isto pode ser perfeitamente notado no E. 01 para os picos m/e 41, 55, 69, 83, 97 ($C_nH_{2n-1}^+$), que em espectros de hidrocarbonetos saturados são muito menos intensos relativamente a $C_nH_{2n+1}^+$ /49/.

Gs 1

Esqualeno 25 (F 8-14-EXTR. HEX: ÉTER I)

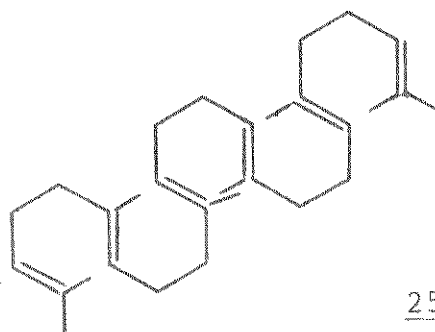
Este composto foi isolado como um óleo incolor.

O espectro de UV (E. 02) apresenta uma absorção máxima em 244 nm.

O espectro de IV (E. 03) apresenta bandas típicas de estiramento e deformação C-H (2910, 2870, 2800, 1460 e 1400 cm^{-1}), além de uma banda em 1660 cm^{-1} , própria de $\nu\text{C} = \text{C}$. Um sinal fraco em 830 cm^{-1} sugere ligação dupla trisubstituída, mas não pode servir como diagnóstico /48/.

O espectro de RMN^1H (E. 04) apresenta sinais caracteristicos para prótons de um hidrocarboneto insaturado acíclico. Os prótons olefínicos são evidentes pelo sinal largo em δ 5.15. Os sinais em δ 1.62(s), 1.68(s) e 2.00(sl) caracterizam grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$ ligados a C-sp^2 /50/.

Uma revisão na literatura nos levou a verificar que os dados espectrais obtidos para Gs 1 coincidem com aqueles registrados para o esqualeno 25 /51/, hidrocarboneto acíclico com 30 C ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$), conhecido precursor biossintético de triterpenóides.



25

O espectro de massa seria muito útil para confirmação da identidade, mas não nos foi possível devido a fácil alteração

do composto. Ele absorve oxigênio e se torna viscoso como óleo de linhaça. No entanto, a integração no espectro de RMN^1H é proporcional a 50 prótons, como para o esqualeno.

Gs 2 a Gs 8

Êsteres alifáticos (F 59-65- EXTR. HEX: ÉTER I)

Estes compostos eluíram juntos da coluna, como uma mistura de sólido e óleo amarelados. Por CCD verificamos tratar-se de uma mistura complexa de substâncias. Tentativas de purificação através de técnicas cromatográficas comumente empregadas para tal fim foram insatisfatórias.

Os dados espectrais de IV e RMN^1H do material em bruto nos levaram a supor que temos êsteres alifáticos na mistura. O espectro de IV apresenta, além das bandas típicas de estiramentos e deformações C-H em compostos de cadeia longa, absorções em 1740 e 1180 cm^{-1} , características de $\nu\text{C}=\text{O}$ e $\nu\text{C}-\text{O}$ de ésteres, respectivamente. A insaturação é evidenciada por uma absorção fraca em 1650 cm^{-1} /48/.

Algumas outras informações estruturais acerca dos constituintes destas frações foram obtidas analisando seu espectro de RMN^1H (E. 05). Dois grupos de sinais, um multiplete em δ 5.30 e um sinal largo em δ 5.12 são indicativos de prótons olefínicos em duplas di- e trissubstituídas, respectivamente. Um quarteto em δ 4.08 ($J = 7\text{Hz}$) e um singlete em δ 3.62 nos sugerem dois tipos de ésteres: éster etílico ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) e éster metílico ($-\text{OCH}_3$). O tri

plete devido ao $-\text{CH}_3$ etílico ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) estaria encoberto por outros picos observados na região ($\sim\delta$ 1.3). Em δ 2.77 um triplete mal resolvido pode ser devido a um grupo $-\text{CH}_2-$ bastante desprotegido, como $=\text{HC} - \text{CH}_2 - \text{HC} =$. Na região entre δ 1.0 e 2.3 temos vários picos, com predominância de um singlete largo em δ 1.25 devido aos prótons metilênicos $(\text{CH}_2)_n$.

Para separação destes componentes, o método mais efetivo foi cromatografia gás-líquido, conduzida em coluna de OV-17 3% com temperatura isotérmica de 225°C , ou com programação linear numa faixa de $205-250^\circ\text{C}$, com variação de $8^\circ\text{C}/\text{min}$. O cromatograma (fig. 5) mostrou nitidamente a predominância de 5 compostos, num total de 10 picos. Pela ausência de padrões adequados, afastamos a possibilidade de usar o tempo de retenção como elemento auxiliar nas identificações dos compostos separados por CG.

Restou-nos portanto a alternativa de tentar identificar as substâncias da mistura através de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa. Esta técnica está sendo utilizada na Universidade Federal do Ceará pelo Prof. Dr. José Wilson Alencar na análise dos óleos essenciais de plantas do Nordeste /52/. Neste processo de análise ele elaborou um programa de computação eletrônica para comparar os dados de espectros de massa obtidos com aqueles de uma coleção de referências.

Em seguida discutiremos alguns aspectos fundamentais relacionados com as vantagens e limitações do método.

Os espectros de referência são normalizados, tabulados numa grade com os valores m/e diferindo de 14 u.m.a. situados numa mesma coluna e simplificados pela seleção dos picos interpretativos visuais (PIV), definidos como sendo os mais intensos de cada grupo de picos do espectro, devido aos íons $(m-14)$, $(m-1)$,



fig. 5 - Cromatograma mistura de ésteres

(m), (m + 1) e (m + 14). Os dados de cada espectro, selecionados em forma de PIV, foram armazenados em disco e incorporados à memória de um computador através de um programa escrito em linguagem BASIC, que é detalhadamente descrito na ref. 52. Constituiu-se assim a chamada biblioteca de padrões.

O processo de comparação consiste no confronto de ambos os espectros, desconhecido e referência, feita automaticamente PIV a PIV, e no cálculo de um parâmetro denominado grau de identidade (GI) que varia entre os limites de 0 a 1, os quais correspondem a ausência de identidade e identidade completa.

Este programa se mostrou superior a outros, que também utilizam computador num processo de identificação automática, pelo menos no caso da análise de óleos essenciais. Entretanto, os resultados apresentados não podem ser encarados com total confiabilidade, devendo-se considerar certos aspectos com bastante atenção, principalmente no que diz respeito à eficiência do processo de simplificação usado para codificar os espectros, e à eficiência do parâmetro de comparação (GI).

No processo de simplificação utilizado (PIV), vários requisitos foram atendidos de modo a torná-lo válido. A retenção máxima do padrão de fragmentação da substância foi cuidada, não excluindo sistematicamente os picos de pequena intensidade presentes no espectro, porque alguns deles podem ter valor diagnóstico, e nem excluindo aquele correspondente ao íon molecular, quando presente.

GI é uma função linear da posição e das intensidades dos picos envolvidos. Um inconveniente é que o número de picos relacionados em cada comparação é atribuído ao número de PIV do composto de referência, e isto pode conduzir a erros. Desde que o número de PIV da substância desconhecida não é considerado, pode ocorrer que identificações com alto GI não sejam conclusivas, enquanto outras de baixo GI sejam consideradas corretas.

Para maior segurança nas identificações feitas, os resultados devem ser confirmados pela análise visual dos espectros da literatura.

Uma amostra de nossa mistura foi analisada por CG/EM usando coluna capilar e condições que são descritas na parte experimental do trabalho.

O resultado da análise feita com programa BUSC 6 é

apresentado na fig. 6, com 10 constituintes analisados, 5 dos quais identificados corretamente, e dois incorretamente.

O índice de acerto do programa nas identificações feitas foi de 72%

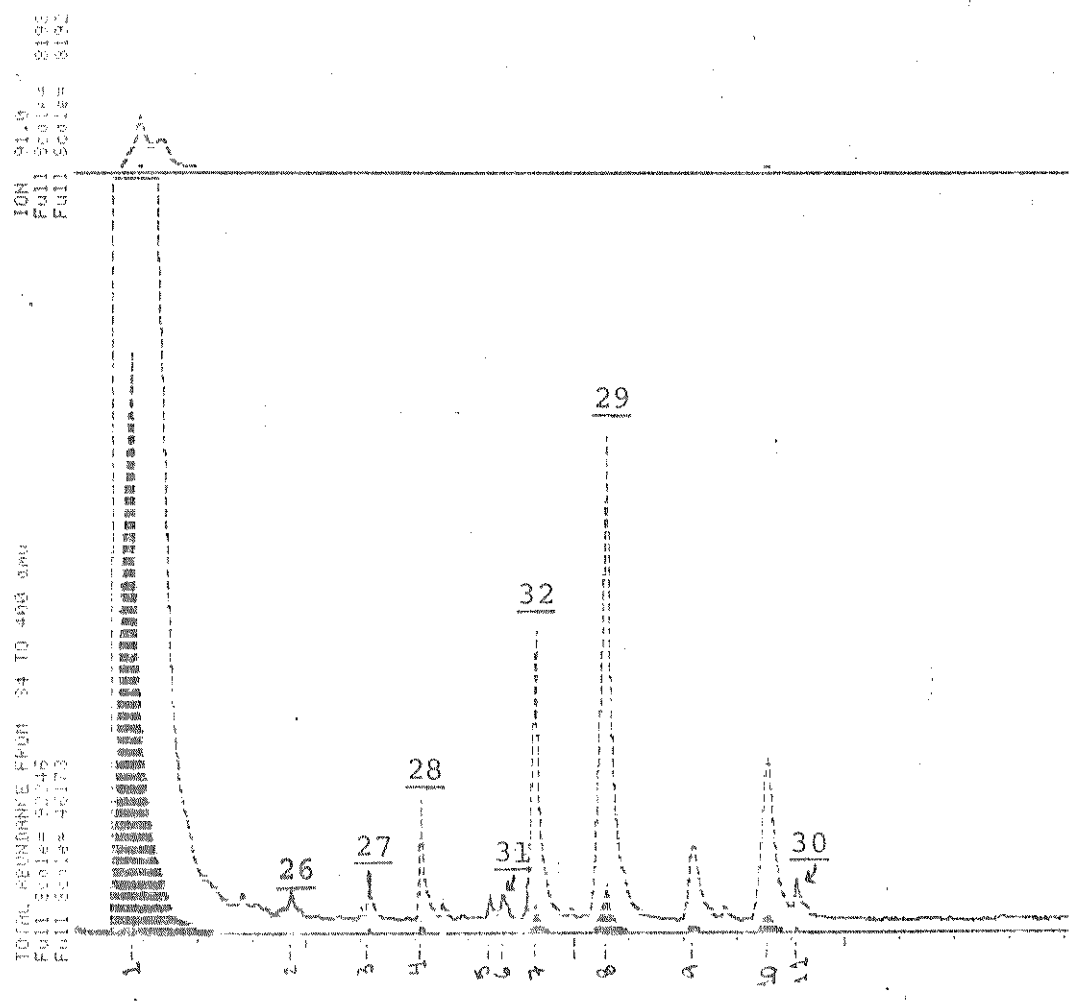
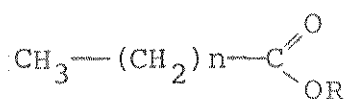


fig. 6 - Cromatograma da mistura de ésteres

<u>Espectro</u>	<u>Composto</u>	<u>Nome</u>	<u>GI</u>
E.06	Gs 2	laurato de etila <u>26</u>	não indicado
E. 07	Gs 3	tetradecanoato de me tila <u>27</u>	0,98
E. 08	Gs 4	miristato de etila <u>28</u>	não indicado
E. 09	<u>m/e</u> 110 - não identificado		

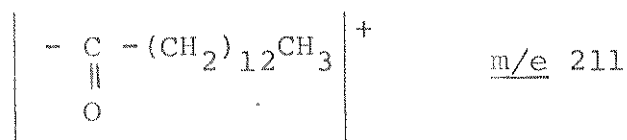
<u>Espectro</u>	<u>Composto</u>	<u>Nome</u>	<u>GI</u>
E.10	Gs 5	palmitato de metila*	não indicado
E.11	Gs 6	metil-pentadecanoato de metila*	0,96
E.12	Gs 7	palmitato de etila <u>29</u>	0,92
E.13	<u>m/e</u> 294	- não identificado	
E.15	<u>m/e</u> 308	- não identificado	
E.16	Gs 8	octadecanoato de etila <u>30</u>	0,93

* Identificações incorretas



<u>26</u>	n = 10	R = Et
<u>27</u>	n = 12	R = Me
<u>28</u>	n = 12	R = Et
<u>29</u>	n = 14	R = Et
<u>30</u>	n = 16	R = Et
<u>31</u>	n = 13	R = Et
<u>32</u>	n = 14	R = Me

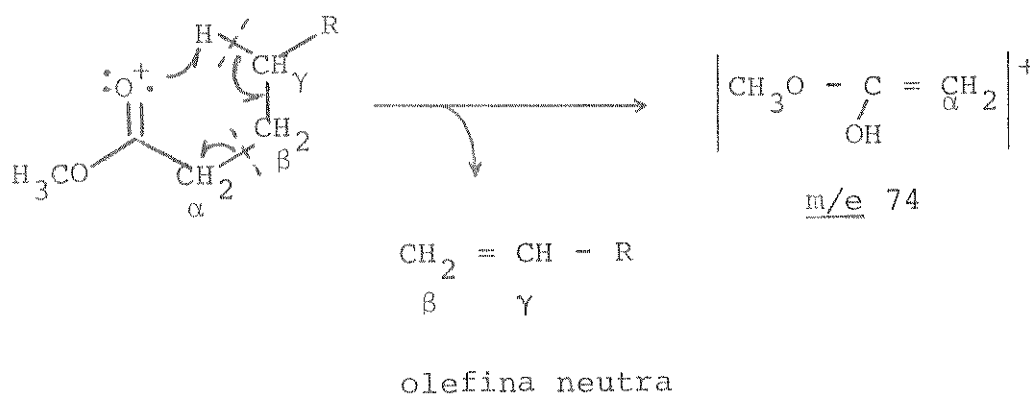
Nos espectros de massa de um éster metílico de cadeia longa, tal como o tetradecanoato (miristato) de metila (E.07) os picos mais proeminentes são devidos aos íons contendo oxigênio. Estes são o íon molecular (m/e 242 = M^+), o íon acila, formado pela perda do grupo alcóxi ($M-31$), no caso



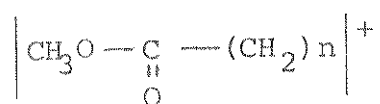
e o íon rearranjado de m/e 74 /53/.

O íon molecular tende a aumentar de intensidade conforme se aumenta o comprimento da cadeia, como pode ser notado para o outro éster metílico (m/e 270, E. 11).

O pico base do EM de um éster metílico na faixa de $C_6 - C_{26}$ corresponde ao fragmento com m/e 74 originado de um rearranjo do tipo McLafferty. Propõe-se /53/ a clivagem da ligação $C_\alpha - C_\beta$ e a transferência de um átomo de hidrogênio do C_γ para o fragmento ionizado.



A maioria dos outros íons pertencem a uma série com fórmula geral

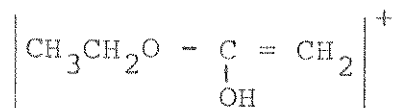


como m/e 87, 101, 115, 129, 143, 157, etc.

Os ésteres etílicos de cadeia longa apresentam EM bastante semelhantes aos dos ésteres metílicos, sendo que a principal diferença está no aumento por 14 u.m.a. no valor de m/e dos íons que contêm o grupo éster intacto.

Assim, como por exemplo para o palmitato de etila Gs 7 (E. 12) temos o íon molecular M^+ m/e 284, o íon acila, correspon-

dente à perda do grupo alcóxi (M-43), no caso m/e 241 e o pico base, também originado do rearranjo tipo McLafferty com m/e 88

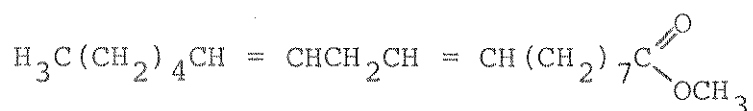


Através destas considerações podemos confirmar as identidades dos compostos Gs 2, Gs 3, Gs 4, Gs 7 e Gs 8. Os compostos Gs 5 e Gs 6, ambos com m/e 270, foram erroneamente identificados. Gs 5 possui EM análogo ao de um éster etílico, diferindo do EM do miristato de etila apenas por um grupo CH_2 , portanto, certamente trata-se do pentadecanoato de etila 31. O composto Gs 6, por sua vez, apresenta EM com características de éster metílico de cadeia normal. Qualquer ramificação mudaria sensivelmente o espectro. Por comparações com os demais, concluímos tratar-se do palmitato de metila 32.

Análise do EM dos tres compostos de m/e 110, 294 e 308, não identificados pela comparação com a coleção de referências, nos possibilitam algumas considerações. O espectro com pico máximo em m/e 110 (E. 09) não aparenta ser de um éster homólogo àqueles já identificados. Perdas de 14 u.m.a. sugerem um hidrocarboneto, e a massa máxima é compatível para 8 C com 2 instaurações. Por outro lado, os espectros com picos máximos em 294 e 308 são característicos de ésteres metílico e etílico, respectivamente, com instaurações.

Por comparações com dados da literatura /53/ encontramos muitas semelhanças entre o E. 13 (m/e 294) e o EM do linoleato de metila 33 (E. 14), no entanto variações nas intensidades relativas dos picos, especialmente os de m/e 67, 79 e 81 sugerem isomero posicional da ligação dupla.

Estes compostos insaturados vêm justificar certas bandas observadas nos espectros de RMN^1H (E. 05) e de IV da mistura original, já comentadas.



33

Gs 9

Ester não metílico (F 105-108 - EXTR. HEX: ÉTER I)
(F 5-8 - EXTR. BENZÊNICO)

ver p. 75

Gs 10 a Gs 12

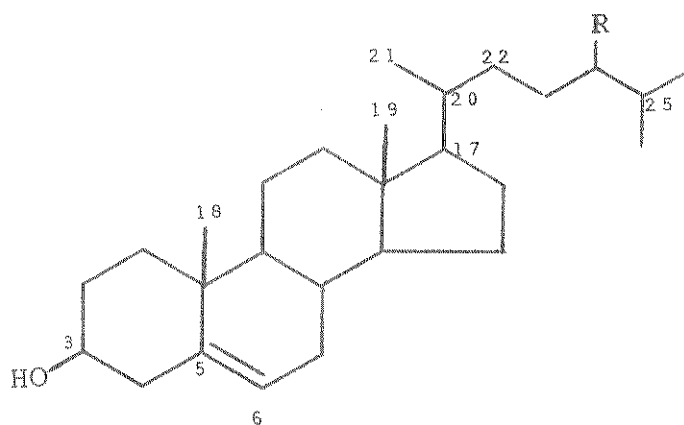
Esteróides (F 143-156- EXTR. HEX: ÉTER I)
(F 131-145 - EXTR. METANÓLICO II)

Estes compostos eluíram juntos da coluna e após purificações, mostraram apenas uma mancha em CCD com vários sistemas de solventes. Entretanto, uma larga faixa no p.f. foi indicativa de mistura ($130-135^\circ\text{C}$ e $160-170^\circ\text{C}$).

O espectro de IV da mistura (E. 17) apresenta bandas em 3400, 1640 e $1060-1050\text{ cm}^{-1}$ devidas a $\nu\text{O-H}$, $\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C-O}$, respectivamente, além das bandas normais de estiramento e deformação C-H em grupos metila e metileno ($2960-2860$, 1460 , 1380 cm^{-1}). Uma banda relativamente intensa em aproximadamente 965 cm^{-1} sugere de formação CH para duplas ligações com substituição em trans /48/.

O espectro de RMN¹H (E. 18) apresenta um grande envelope de CH₂ e vários picos correspondentes a metilas, além de dois sinais largos em δ 5.13 e 5.32, característicos de prótons olefínicos.

Espectros como esses aliados aos dados do EM (massas máximas em m/e 412 e 414), sugerem compostos com esqueleto esteroidal. Um número cada vez maior de tais substâncias têm sido detectadas em plantas, mas existe um esteróide, o β -sitosterol 34, que provavelmente ocorre em todas as espécies superiores.



34 - R=CH₂CH₃

35 - Δ^{22} , R=CH₂CH₃

36 - R = CH₃

O composto 35, estigmasterol, também é bastante comum, e difere do β -sitosterol apenas por uma ligação dupla exocíclica. Comparações entre os dados desses dois esteróides e os de nossa amostra evidenciam muitas semelhanças (Tabela II).

Para uma melhor elucidação dos constituintes da mistura, o material foi acetilado, purificado e submetido à cromatografia gasosa, conduzida em coluna OV-17 3% a 280°C. O cromatograma (fig. 7) acusou no mínimo 8 compostos, sendo que β -sitosterol (Gs 10) e estigmasterol (Gs 11), os 2 constituintes em maior proporção, foram confirmados por coinjeção com os respectivos padrões acetilados.

Tabela II - Dados de p.f. e RMN¹H de alguns esteróides

	β -sitosterol /54/ $C_{29}H_{50}O$ - PM 414	AMOSTRA	ESTIGMASTEROL/54/ $C_{29}H_{48}O$ - PM 412
p.f.	139-140°C	130-135°C 160-170°C	169-170°C
RMN ¹ H(δ)	0.68 (H-C ₁₈)	0.72 (3H)	0.70 (H-C ₁₈)
60 MHz	1.01 (H-C ₁₉)	1.03 (3H)	1.06 (H-C ₁₉)
	3.53 (1H-OH)	3.50 (1H) 4.67 (1H, W 1/2=18Hz) 5.13 (2H)	
	5.40 (1H, H-C ₆)	5.32 (1H)	

Técnicas de separação e identificação altamente eficientes têm sido desenvolvidas para a análise de mistura de esteróides, sendo CG/EM a mais popular, onde se reúne o conhecido desempenho da CG com a alta sensibilidade da EM /55/.

Um método clássico consiste em efetuar as etapas de separação e identificação em um espectrometro de massa clássico com geometria reversa /56/. Nesta técnica, após a ionização dos componentes da mistura, qualquer íon, que pode ou não ser o molecular, é selecionado em valor apropriado do campo magnético, e caracterizado sucessivamente por sua fragmentação unimolecular na segunda região livre do campo (field free region - FFR) do espectrometro. Esta fragmentação pode ser registrada variando-se o campo eletrostático da voltagem inicial até zero. Na posição normal, o potencial E_1 do campo elétrico, o íon precursor m_1^+ passa pelo campo com energia cinética $m_1 v^2/2$. Quando a decomposição

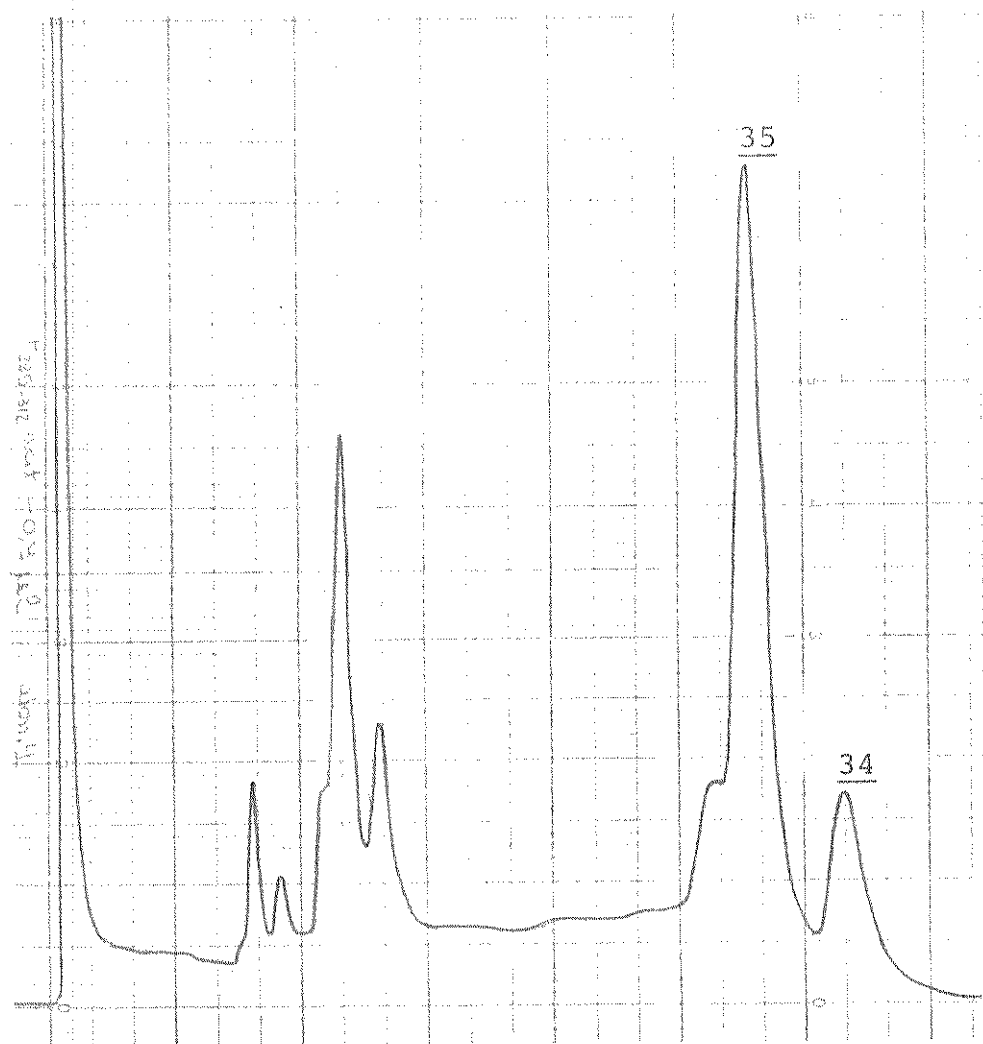


fig. 7 - Separação dos esteróides por CG

ocorre, a energia cinética divide-se entre o íon produto m_2^+ e a partícula neutra. Portanto, o íon produto passa pelo campo elétrico num campo mais fraco E_2 e pela relação abaixo, tem-se

$$m_2 = m_1 \frac{E_2}{E_1}$$

Varrendo-se a região inteira de energia, possibilita-se a determinação de todos íons produtos formados pelo precursor, e desta maneira obtém-se um espectro da energia cinética dos íons já analisados por massa, MIKES ("Mass - Analyzed Ion Kinetic

Energy Spectra") /57/.

A região de massa alta do EM convencional (E. 19) dos esteróides é mostrada na fig. 8. Os picos a m/e 414, 412, 400 e 398 são atribuídos a íons moleculares. Os picos a m/e 396 e 394 resultam da superposição de íon molecular e de íon fragmento (perda de água de m/e 414 e de m/e 412, respectivamente). Mesmo considerando que íons moleculares são facilmente detectáveis, a complexidade da mistura pode causar muitas superposições, de modo que a atribuição de um pico a um determinado esteróide poderia ser ambígua. Portanto, resolvemos utilizar espectros de MIKE (fig. 9), visando obter informações acerca de cada componente da mistura. Em cada caso, observamos um número de fragmentações, sempre maior que 10, suficiente para permitir o uso de suas abundâncias relativas como um diagnóstico para cada íon molecular.

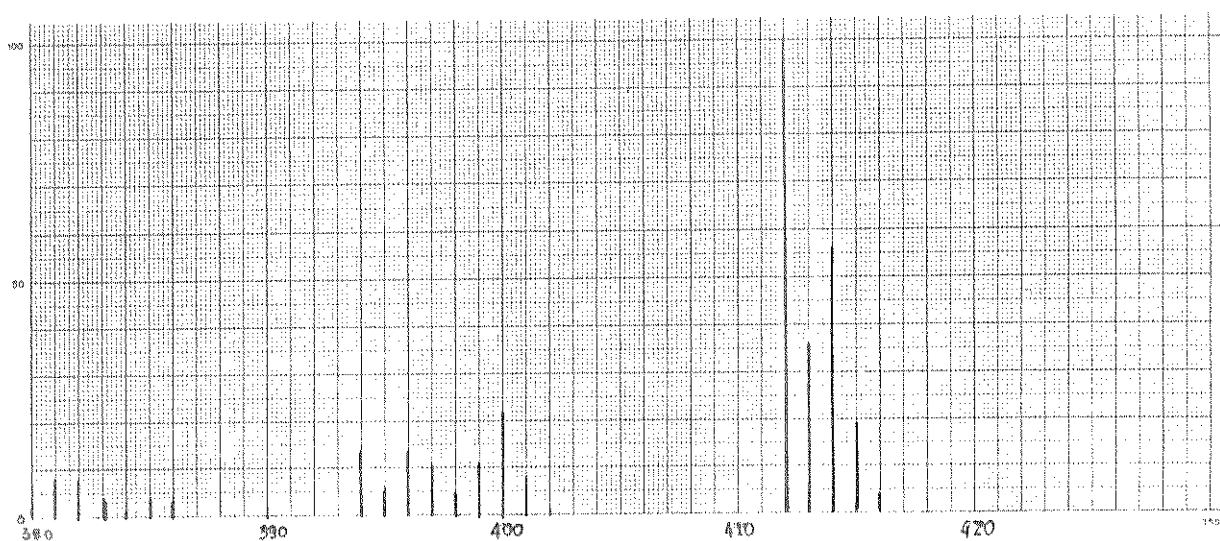
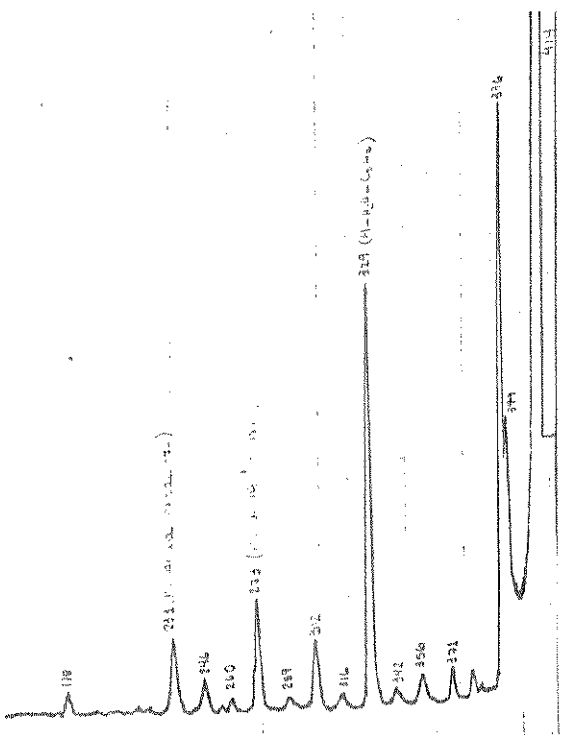
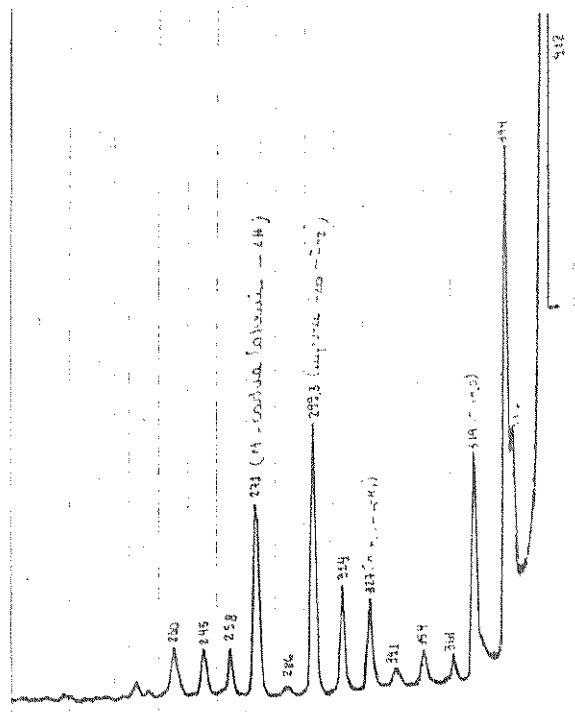


fig.8 - Região de massa alta - EM da mistura de esteroides

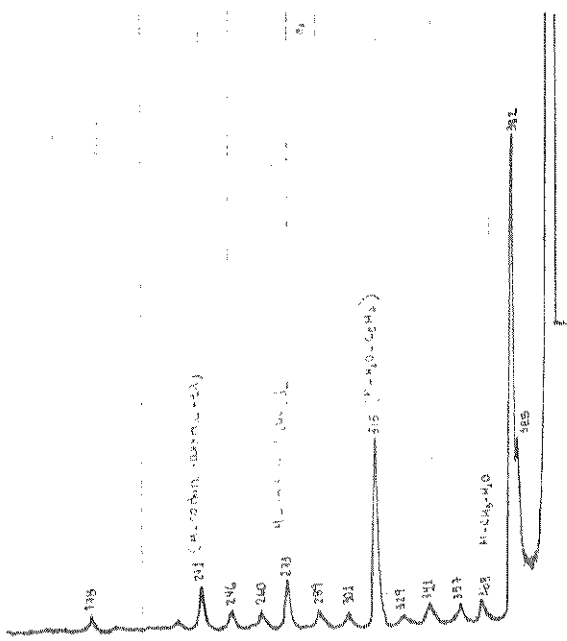
fig.9 - Espectros de MIKE dos picos a m/e 414, 412, 400, 398, 396, 394 e 380



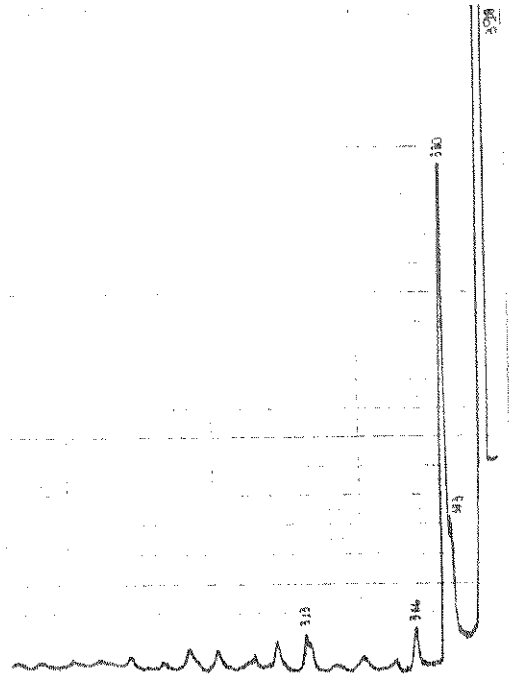
a) M⁺ 414, β -sitosterol 34



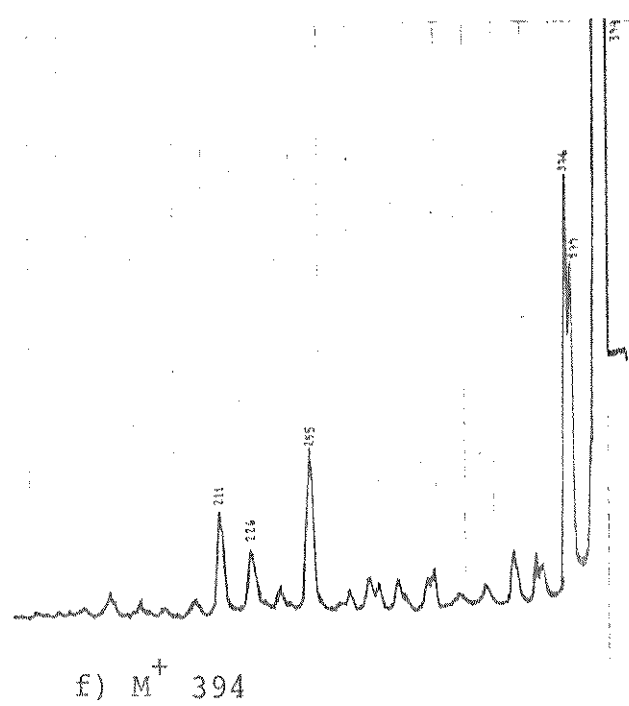
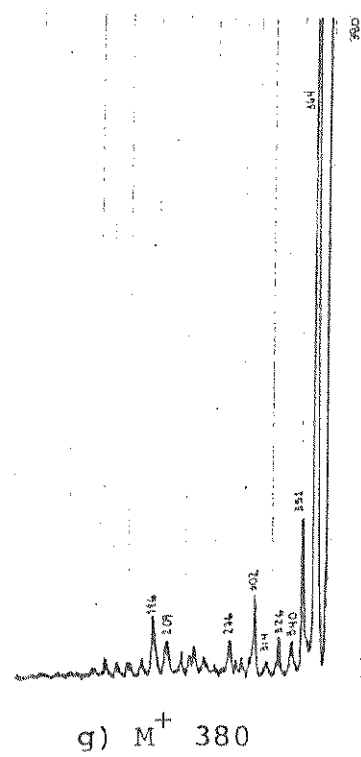
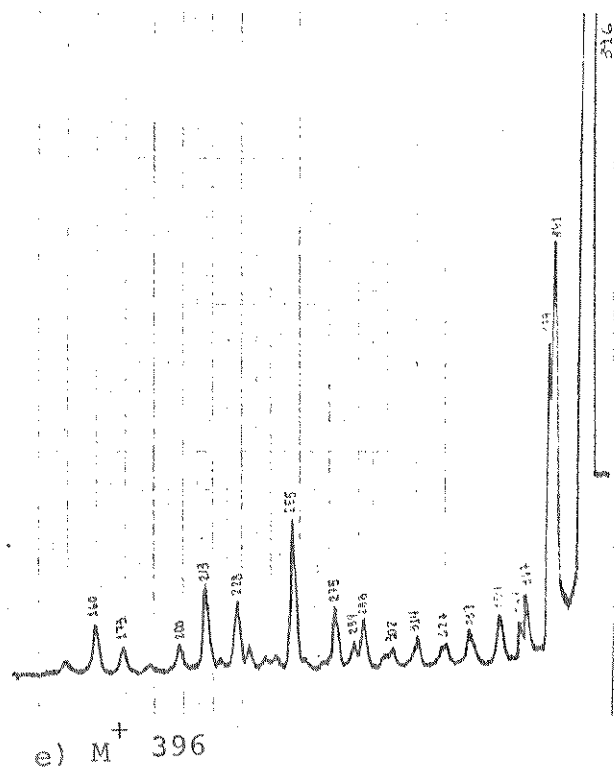
b) M⁺ 412, estigmasterol 35



c) M⁺ 400, campesterol 36



d) M⁺ 398



A comparação dos espectros de MIKE com aqueles da literatura /58/ comprovou as identidades de β -sitosterol 34 (Gs 10), estigmasterol 35 (Gs 11) e nos permitiu a identificação de campesterol 36 (Gs 12) como o componente com m/e 400. Os demais espectros (m/e 398, 396, 394, 386 e 380) não conferem exatamente com os dados disponíveis e serão discutidos abaixo.

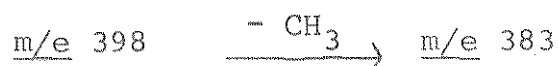
Algumas fragmentações características num EM clássico (ESQUEMA I /59/), coincidem com as principais clivagens observadas nos espectros de MIKE /58/. Estas últimas são:

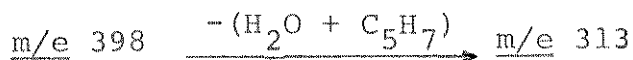
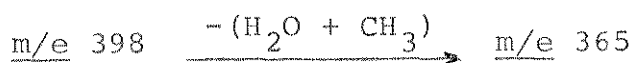
- As perdas mais intensas de água que de radicais metila para Δ^5 - esteróides

- Íons M-85 intensos ($H_2O + C_5H_7$) para Δ^5 -esteróides monoinsaturados, e eliminação clássica da cadeia lateral dando um íon a m/e 273.

- Íon intenso a m/e 271 para esteróides com insaturação na cadeia lateral correspondente à perda desta cadeia junto a 2H do núcleo. Estes compostos também mostram um intenso pico entre 299 e 300, provavelmente devido a clivagem da ligação C20-C22 com e sem transferência de hidrogênio. O poder de resolução de energia do espectrometro MIKE pode ser insuficiente para separar os íons com m/e 300 e 299, resultando massas não integrais, como no caso do estigmasterol (m/e 299.3).

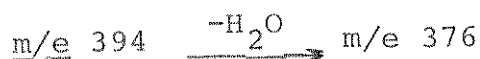
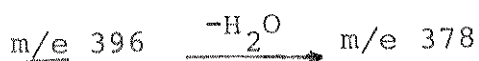
O espectro de MIKE do íon com m/e 398 mostra picos em 0.962 E_1 , 0.955 E_1 , 0.918 E_1 e 0.787 E_1 para as transições





Essas fragmentações ocorrem caracteristicamente em esteróides hidroxilados com insaturação nuclear. A falta de outros picos diagnósticos, como aquele devido à perda da cadeia lateral, não nos permite uma maior elucidação de sua estrutura.

Os espectros de MIKE com m/e 396 e 394 demonstram claramente que esses picos são superposição dos íons fragmentos devidos à perda de água dos compostos com m/e 414 e 412, respectivamente, e de íons moleculares de esteróides isoméricos. Os picos intensos, nos dois casos, em $0.961 E_1$ e $0.956 E_1$ são devidos às transições

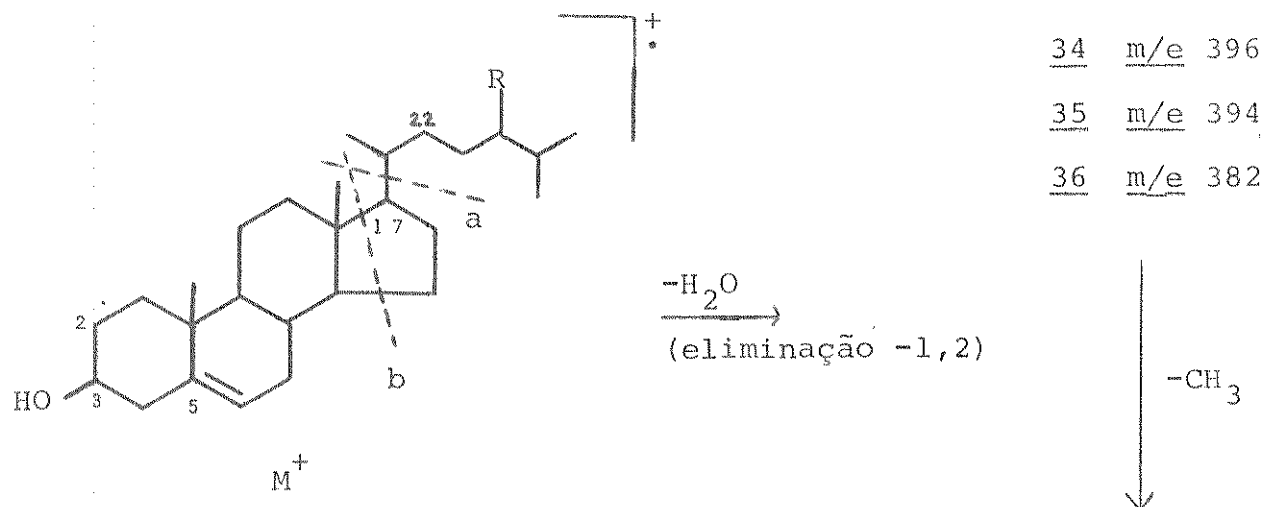


indicando um esteróide hidroxilado

Para o composto com m/e 396, um pico mais intenso corrrespondente à perda de 15 u.m.a. (CH_3), em m/e 381, não sugere insaturação no C 5. Os sinais em $0.643 E_1$ e $0.538 E_1$, a m/e 255 e m/e 213, são devidos à perda de cadeia lateral ($C_{10}H_{21}$) e cadeia lateral + 42 u.m.a., respectivamente (ver esquema I).

Para o composto com m/e 394, estas últimas perdas também são observadas, a m/e 255 e m/e 211. Apenas a fragmentação dando m/e 211 parece envolver a transferência de mais 2H, devido possivelmente à existência de uma insaturação na cadeia lateral. Para este composto, o sinal em $0.956 E_1$ (m/e 376) mais intenso suu

ESQUEMA I - Principais fragmentações em Δ^5 -3 β -ol-esteróides
num EM clássico



34 - R = Et m/e 414
35 - Δ^{22} , R = Et m/e 412
36 - R = Me m/e 400

34 m/e 381
35 m/e 379
36 m/e 367

clivagem a

34 m/e 273 (- cadeia lateral)
35 m/e 271 (- cadeia lateral - 2H)
36 m/e 273 (- cadeia lateral)

clivagem b

- 42

34 m/e 231
35 m/e 229
36 m/e 231

gere insaturação no C 5.

O espectro de MIKE do pico em m/e 416 demonstrou ser o isótopo ($M + 2$) de m/e 414. A baixa concentração relativa do íon com m/e 386 não nos permitiu maiores elucidações de sua estrutura.

A principal vantagem de aplicarmos esta técnica para a análise de esteróides é que ela fornece resultados rápidos acerca da mistura, sem a necessidade de difíceis isolamentos preliminares, desde que a separação molecular é trocada por uma clara seleção de íons. Entretanto, a situação pode ser complicada se a fragmentação de componentes com alto peso molecular fornece um íon de mesma massa que outro íon molecular, como foi observado em nossa mistura. Mesmo assim, pudemos ter alguma informação acerca de 6 compostos, sendo 3 totalmente identificados.

Gs 13 a Gs 16

Ácidos de cadeia longa (F 173-180- EXTR.HEX: ÊTER I)

(F 151-175-EXTR.METANÓLICO II)

Estes compostos eluíram juntos da coluna, e após purificações se apresentaram como um óleo amarelado que por CCD mostra uma mancha alongada característica de ácidos.

Pelo espectro de IV (E. 20), verifica-se uma banda bastante larga entre 3300 e 2500 cm^{-1} e outra intensa em 1710 cm^{-1} , próprias de estiramento O-H e C = O, respectivamente, em ácidos carboxílicos diméricos /50/. Além dessas, tem-se bandas devidas a estiramento e deformação C-H (2950, 2920, 2850, 1470, 720 cm^{-1}),

$\nu_{\text{C}} = \text{C}$ (1620 cm^{-1}) e $\nu_{\text{C-O}}$ (1280 cm^{-1}).

O espectro de RMN^1H (E. 21) é típico de ácidos de cadeia longa insaturados, caracterizados pelo sinal largo em $\delta 10.63$ devido ao próton carboxílico e pelo intenso pico em $\delta 1.27$ devido aos prótons metilênicos. Um sinal em $\delta 5.33$ indica prótons olefínicos em duplas dissubstituídas, e um triplete mal resolvido em $\delta 2.77$ pode ser devido a um metileno duplamente alílico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) /50/.

Através das análises dos espectros de IV e RMN^1H constatamos a presença de ácido graxo, mas ainda não podíamos afirmar com segurança se tínhamos uma substância pura ou uma mistura. A fim de uma melhor elucidação, a amostra foi esterificada com diazometano (RMN^1H - E.22) e submetida à cromatografia gasosa. Utilizamos uma coluna com silicone SE-30 5%, considerada satisfatória para separações de ésteres metílicos de ácidos graxos /60/, com programação linear de temperatura. O cromatograma (fig. 10) revela no mínimo 11 compostos, alguns dos quais pudemos identificar através da técnica de coinjeção com ácidos graxos padrões metilados.

Os ésteres oleato e linoleato de metila não separam por CG em coluna de silicone SE-30. Uma fase estacionária mais adequada para esses dois compostos seria PEGA (polyethylene glycol adipate) /37 - p . 148/, mas não nos foi disponível.

Com programação multilinear de temperatura (parte experimental) obtivemos uma melhor separação entre os picos correspondentes a estearato e a oleato (e/ou linoleato) de metila (fig. 11).

Deste modo, identificamos palmitato, estearato, oleato e/ou linoleato de metila como componentes de nossa mistura. Os

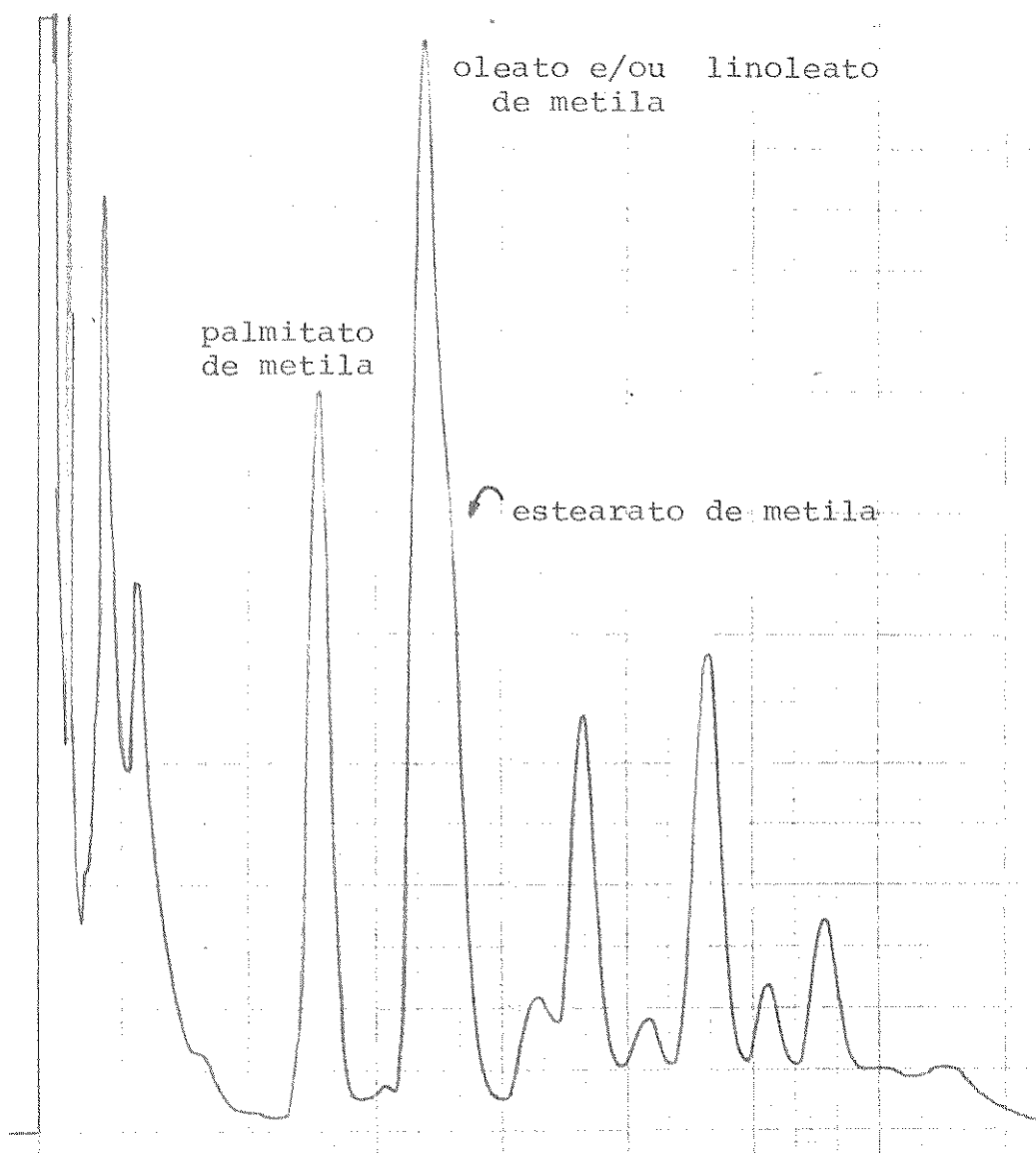


fig. 10 - Cromatograma dos ácidos graxos metilados com programação linear de temperatura



fig. 11 - Cromatograma do estearato e oleato(e/ou linoleato) de metila com programação multilinear de temperatura

ácidos originais foram denominados Gs 13, Gs 14, Gs 15 e Gs 16.

Gs 17 e Gs 18

Ácidos triterpênicos (F 189-206 - EXTR.HEX: ÉTER I)

Estes compostos eluíram da coluna bastante impurificados por pigmentos e por ácidos de cadeia longa, como os já isolados nas frações anteriores. Purificação de pequena quantidade resultou em cristais incolores, com p.f. 277-280,6°C (etanol), 286,5-288,5°C (metanol) e $[\alpha]_D + 68^\circ$ (c = 0,8, MeOH).

O espectro de IV (E. 23) foi muito importante no diagnóstico dos grupos funcionais. Uma banda, bastante pronunciada em 3400 cm^{-1} é característica de $\nu\text{O-H}$ de alcôois, mas podemos notar sua parcial superposição a uma banda muito larga entre 3300 e 2500 cm^{-1} , sugerindo, por sua vez, $\nu\text{O-H}$ em ácidos carboxílicos. Uma absorção intensa em 1700 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) reforça a suposição de um grupamento ácido. Além destas, temos bandas relativas a estiramentos e deformações C-H (2920, 2870, 1470, 1390 e 1370 cm^{-1}) e relativas a $\nu\text{C-O}$ (1280 e 1030 cm^{-1}). Os dois sinais em 1390 e

1370 cm^{-1} sugerem metilas geminadas /50/.

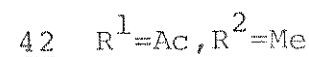
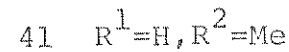
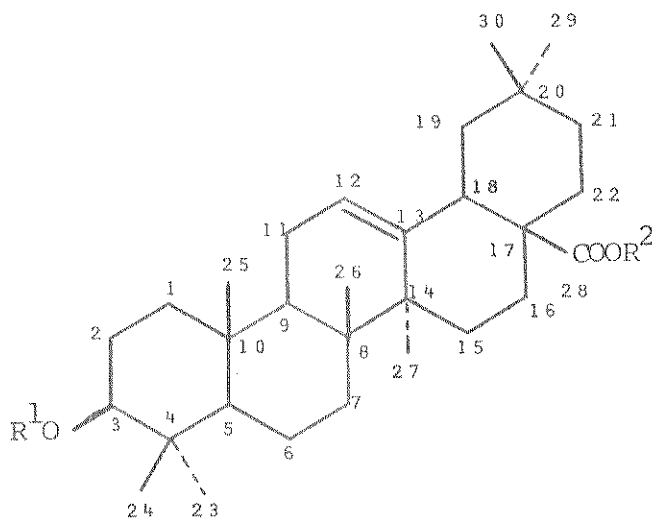
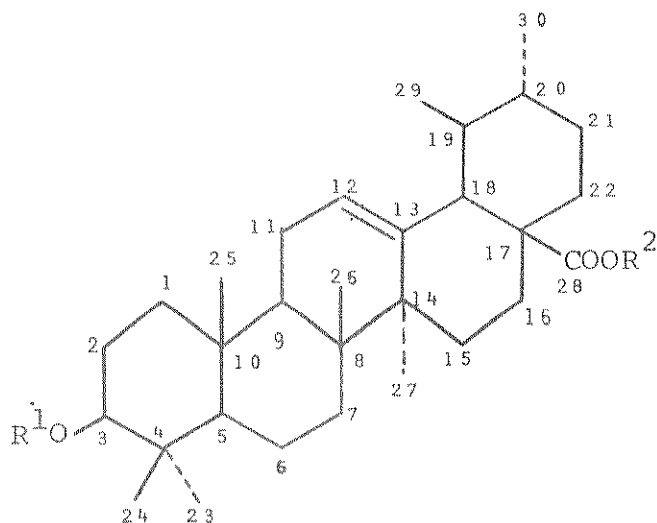
Devido à baixa solubilidade da amostra, não foi possível a obtenção de um espectro de RMN¹H que nos permitisse maiores informações estruturais. No entanto, uma banda larga entre δ 1.0 e 2.0, vários picos agudos em torno de δ 1.0, relativos a prótons metilênicos em sistema cíclico e a prótons em metilas terciárias, respectivamente, caracterizam os espectros típicos de triterpenos.

A espectrometria de massa constitui um método físico extremamente útil na elucidação estrutural dos triterpenos. Cada classe principal destes compostos possui um comportamento de fragmentação bem característico que é controlado, em geral, pela presença de uma ligação dupla nuclear. Assim, as informações fornecidas pela análise do espectro de massa podem ser utilizadas, inclusive, como critério para se designar a classe a qual essas substâncias pertencem. Uma discussão detalhada do EM de triterpenos pentacíclicos saturados e insaturados é feita por BUDZIKIEWICZ e colaboradores /61/, apontando as possibilidades e limitações deste método, como um instrumento diagnóstico na elucidação de estruturas.

Considerando que temos os 2 grupos funcionais já indicados (-COOH e -OH), a massa máxima e o pico base registrados no espectro de nossa amostra (E. 24), em m/e 456 e 248, respectivamente, sugerem um triterpeno pentacíclico com uma insaturação nuclear, possivelmente nos anéis C ou D, pois o pico base sugere uma fragmentação da molécula em 2 partes com massas próximas.

Os compostos naturais deste tipo mais comumente encontrados são membros das séries da α - e β -amirina, como o ácido ursólico 37 (derivado da α -amirina) e o ácido oleanólico 40 (derivado da β -amirina), mas não descartamos inicialmente a possibilidade

desses grupos funcionais estarem em outras posições, inclusive por que uma comparação entre nossos dados e os desses 2 compostos (Tabela III) mostram algumas diferenças.



Para melhorarmos a pureza e a solubilidade da amostra, esta foi submetida à esterificação com diazometano, resultando em cristais incolores com p.f. 198-202°C (EtOH) e $[\alpha]_D^{20} + 24^{\circ}$ (c=1.1, MeOH).

O espectro de IV do produto metilado (E. 25) agora mostra claramente uma banda larga em 1630 cm^{-1} , devida ao $\nu C=C$, visto que a absorção da carbonila foi deslocada para 1730 cm^{-1} ($\nu C=O$ em ésteres).

O espectro de RMN^1H (E. 26) apresenta um sinal largo em δ 5.28(1H) e um singlete em δ 3.62(3H), correspondentes a prótons olefínico e carbometoxílicos, respectivamente. Entre δ 0.73 e 1.15 verificamos 6 singletes, referentes a prótons metílicos (Tabela III). Esses dados nos permitiram concluir que a molécula possui uma ligação dupla trissubstituída e grupos metilas terciários, confirmando mais uma vez a sua natureza triterpênica.

De acordo com nossas verificações anteriores, teríamos algumas possibilidades de posicionamento da ligação dupla, como $\Delta^9(11)$, Δ^{12} , Δ^{18} (somente no caso da β -amirina). Os valores e intensidades dos picos do EM de cada caso sugerem um "modelo" de fragmentação, e para o composto metilado (E. 27), os dados são mais coerentes com a dupla na posição C12-C13 (vide esquema II) /61/. Isto, aliado aos resultados de RMN^1H (Tabela III), apoiam a suposição de termos ácido oleanólico, mas certas diferenças nos dados indicam alguma impurificação, provavelmente por ácido ursólico.

A distinção entre os compostos desses 2 grupos por análises espectrais às vezes se torna bastante difícil. Os EM são muito semelhantes, sendo que em muitos casos apenas as intensidades relativas de alguns fragmentos diferem levemente /61/.

Os dados de RMN^1H dos grupos metilas terciários de compostos das 2 séries são muito bem discutidos por TURSCH e colaboradores /62,63/. As atribuições das frequências de ressonância desses prótons foram feitas comparando-se os espectros de derivados homólogos, diversamente substituídos. Para isto, foram estudados 34 triterpenos Δ^{12} -oleanenicos e 6 triterpenos Δ^{12} -ursonicos. Em quase todos os casos, a única diferença evidente entre os sinais devido aos prótons metílicos terciários em membros des

As 2 classes estão na absorção relativa ao C 27: para os derivados ursólicos esta se apresenta em campo mais alto do que para os compostos oleanólicos correspondentes, numa base de 3 a 4 cps (δ 0.05 a 0.07), provavelmente devido a um efeito de anisotropia pela proximidade da ligação C19-C29). As absorções dos prótons das metilas secundárias 29 e 30 dos compostos ursólicos, que devem se apresentar sob a forma de dubletes, foram consideradas de difícil localização, podendo estar encobertas por outros picos.

Temos, em nosso espectro (E. 26) dois sinais: um em δ 1.15 e outro em menor proporção em δ 1.08, que poderiam ser atribuídos aos prótons metílicos da posição 27, respectivamente, para os derivados oleanólico e ursólico. Além disso, os dados de p.f. e rotação óptica do composto metilado não conferem muito bem com nenhum dos triterpenos individuais, reforçando novamente a suposição de uma mistura que na forma ácida recebeu a denominação de Gs 17, 18.

Técnicas cromatográficas de coluna ou de CCD são totalmente ineficazes para se resolver esta separação /64/. Por outro lado, a diferenciação entre compostos dessas 2 séries, assim como a detecção de um em presença do outro são bem conhecidas através de reações de oxidação com dióxido de selênio /64-67/.

Para esta reação, a quantidade total da amostra foi metilada e posteriormente acetilada com anidrido acético/piridina. O produto da acetilação, Ac - Gs 17,18-Me, se apresentou como cristais incolores, p.f. 205-208°C (CHCl_3 :MeOH), $[\alpha]_D^{20} + 60^\circ$ (c=1.9, CHCl_3)

Pelo espectro de IV (E. 28) verificamos as bandas típicas do grupamento acetato: uma forte absorção em 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ de ésteres) e outra em 1240 cm^{-1} ($\nu\text{C-C(=O)-O}$ em acetatos de al

cóois secundários /50/.

No espectro de RMN^1H (E. 29) observamos absorções em δ 5.35 (l, 1H), 3.67 (s, 3H) e 2.07 (s, 3H), correspondentes aos prótons olefínico (H 12), carbometoxílicos e acetoxílicos, respectivamente. Os sinais devido aos grupos metilas aparecem praticamente no mesmo intervalo do derivado metilado, entre δ 0.76 e 1.16 (Tabela III). Novamente aqui, observamos uma absorção de pequena intensidade em δ 1.10 e outra em δ 1.16, que concordam muito bem com aquelas relativas aos prótons metílicos na posição 27 nos compostos 39 e 42, respectivamente.

Os dados do EM do Ac-Gs 17,18-Me (E. 30) conferem com a fragmentação proposta para o ursan-12-en-28-carbometóxi-3 β -acetóxi 39 e para o olean-12-en-28-carbometóxi-3 β -acetóxi 42 (esquema II) /61/.

Aqui vale ressaltar algumas considerações acerca das atribuições das bandas de absorções dos prótons metílicos, nos espectros de RMN^1H desta classe de compostos. Nas comparações feitas entre compostos de uma mesma série, TURSCH et al /62/, consideraram que a mudança de substituintes numa dada posição não afeta o deslocamento químico dos prótons em grupos CH_3 que estivessem suficientemente afastados e fizeram a correlação: δ aproximadamente constante $\rightarrow$ grupos metilas distanciados.

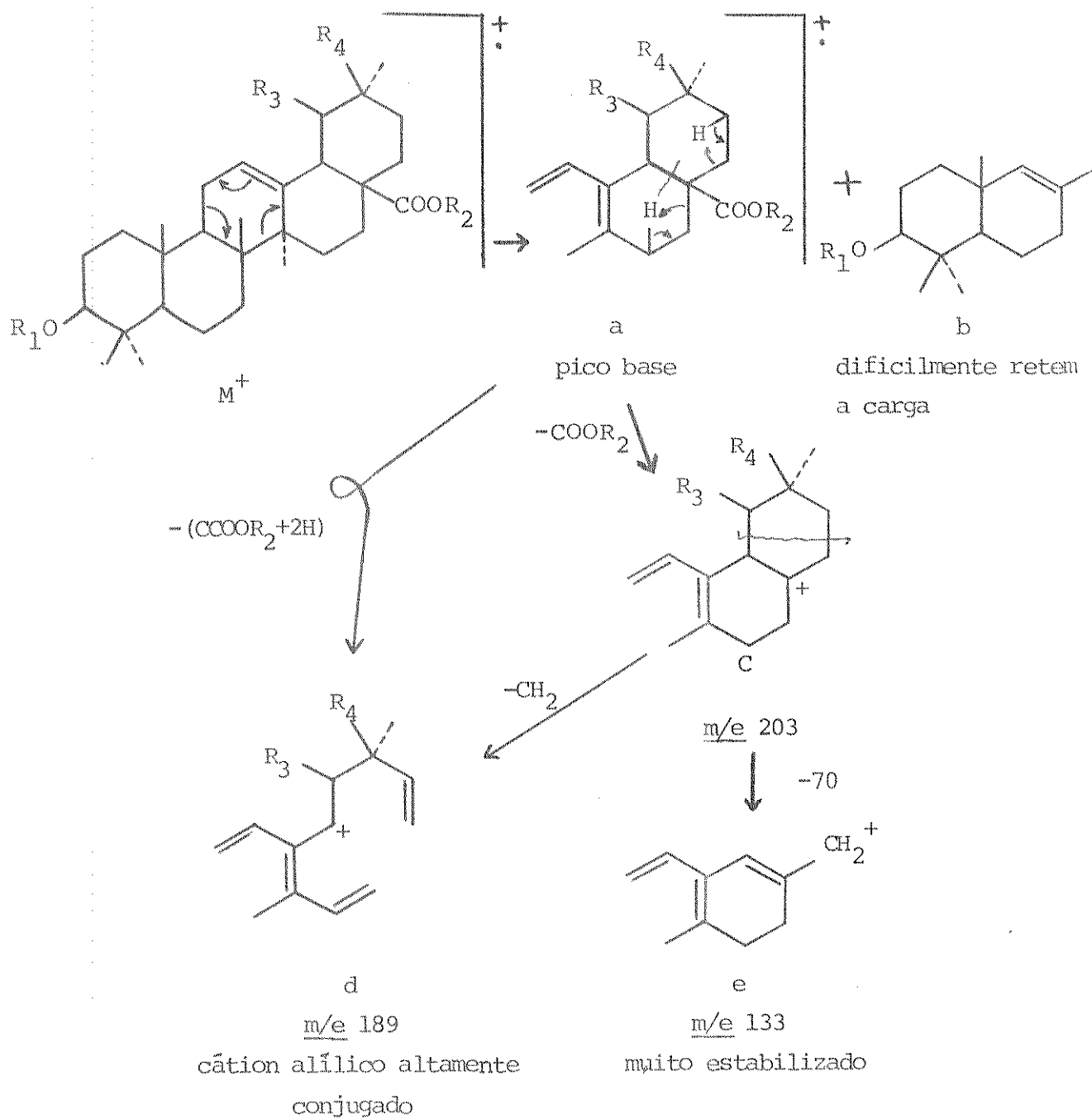
Por outro lado (apenas para os compostos oleanenicos) eles também calcularam os $\Delta\delta$ produzidos pela introdução ou modificação de um dado grupo funcional sobre os metilas mais próximos, entre compostos de séries análogas.

Assim, por esses dois caminhos, todas as atribuições foram feitas, e ainda foi construída uma tabela onde se relacionam incrementos correspondentes aos metilas vs substituintes, toman

TABELA III - Dados físicos e espectrais de Gs 17,18 e alguns derivados e comparações com compostos ursólicos e oleanólicos

	37	Gs 17,18	40	38	Gs 17,18-Me	41	39	Ac-Gs 17,18-Me	42
p.f. (°C)	/68/ 284.5-285 (EtOH)	277-280.6 (EtOH)	/68/ 306-308 (EtOH)	/68/ 169-170 (EtOH)	198-202 (EtOH)	/68/ 197-198 (MeOH)	/68/ 244-245 (EtOH)	205-208 (CHCl ₃ :MeOH)	/68/ 224-225 (MeOH)
α _D	/68/ + 72°	+ 68°	/68/ + 79°	/68/ + 66°	+ 24°	/68/ + 73°	/68/ + 63°	+ 60°	/68/ + 60°
RMN ¹ _H (δ)				/63/		/62/	/63/		/62/
Me-23				0.99	1.00	1.00	0.87	0.88	0.87
Me-24				0.78	0.78	0.79	0.87	0.88	0.87
Me-25				0.93	0.93	0.92-0.95	0.96	0.92	0.92-0.96
Me-26				0.75	0.73	0.74	0.76	0.76	0.74
Me-27				1.08	1.15	1.15	1.08	1.16	1.14
Me-29					1.08			1.10	
Me-30					0.93	0.92-0.95		0.95	0.92-0.96
					0.93	0.92-0.95		0.95	0.92-0.96
EM				/69/		/69/			
m/e M ⁺	456	456	456	470	470	470	512	512	512
m/e(100%)	248	248	248	262	262	262	262	262	262
				203	203	203			

ESQUEMA II - Fragmentações propostas para alguns derivados da série dos oleananos e ursanos Δ^{12} -insaturados /61/



$R_1=R_2=\text{H}$, $R_3=\text{CH}_3$ ou H , $R_4=\text{H}$ ou CH_3

$R_1=\text{H}$, $R_2=\text{CH}_3$, $R_3=\text{CH}_3$ ou H , $R_4=\text{H}$ ou CH_3

$R_1=\text{Ac}$, $R_2=\text{CH}_3$, $R_3=\text{CH}_3$ ou H , $R_4=\text{H}$ ou CH_3

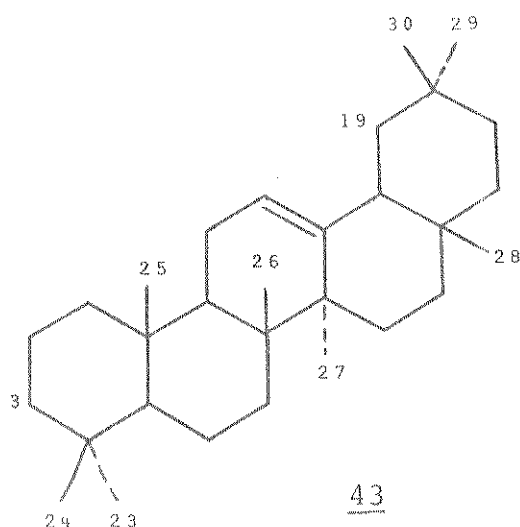
pico M^+	pico a	pico b
m/e	m/e	m/e

456 248 208

470 262 208

512 262 256

do-se por base os valores dos picos metílicos do 12-oleaneno 43.



Cálculos feitos a priori para vários derivados mostraram que a concordância entre os valores calculados e os observados é muito satisfatória, e isto pode ser bastante útil para as atribuições de metilas em compostos oleanenicos novos.

Por exemplo, temos dois derivados Gs 17,18-Me e Ac-Gs 17,18-Me, cuja única diferença é o tipo de grupo funcional na posição 3 (hidroxila e acetoxila, respectivamente). Considerando que a mistura tem predominância do triterpeno oleanenico, baseamos-nos nos dados da Tabela IV para calcular o deslocamento químico relativo aos prótons de metila, e verificamos a grande semelhança com os valores experimentais registrados na Tabela III.

OXIDAÇÃO COM DIÓXIDO DE SELÊNIO

As reações de oxidação com dióxido de selênio são de considerável interesse na química dos triterpenos. Além de servir como um instrumento valioso na determinação das estruturas das

Tabela IV - Efeito de alguns substituintes sobre o deslocamento químico dos grupos metila do 12-oleaneno

Substituintes	INCREMENTOS ($\Delta\delta$)							
	23	24	25	26	27	28	29 e/ou 30	
3 β -OH	+0.12	-0.03	+0.01	+0.02	0	+0.01	0	0
3 β -OAc	0	+0.05	+0.02	0	0	0	+0.01	+0.01
28-COOH	-0.03	-0.01	-0.03	-0.23	0		+0.04	+0.04
28-COOCH ₃	-0.02	-0.01	-0.02	-0.26	0		+0.04	+0.05
19-oxo	0	0	+0.03	+0.02	-0.14		+0.16	+0.26
	δ grupos metila							
12-oleaneno	0.88	0.84	0.94	0.98	1.15	0.84	0.88	0.88
41(calc.)	0.98	0.80	0.93	0.74	1.15		0.92	0.93
42(calc.)	0.86	0.88	0.94	0.72	1.15		0.93	0.94

amirinas, também são utilizadas como um meio de localização das funções sobre o esqueleto oleanenico /70/.

Sabe-se que com o dióxido de selênio em ácido acético glacial, todos os Δ^{12} -triterpenos conhecidos da série β -amirina são convertidos inicialmente a $\Delta^{11,13(18)}$ -dienos, passando posteriormente a $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieno-12,19-diona /65,66/. Em contraste, o centro insaturado da α -amirina não se mostra tão reativo, havendo também uma particular falta de participação do C18 adjacente. Tentativas de se efetuar a oxidação com compostos ursenicos foram todas infrutíferas. Estes foram recuperados essencialmente sem modificações /66/.

O dióxido de selênio promove oxidação suave C-H em po

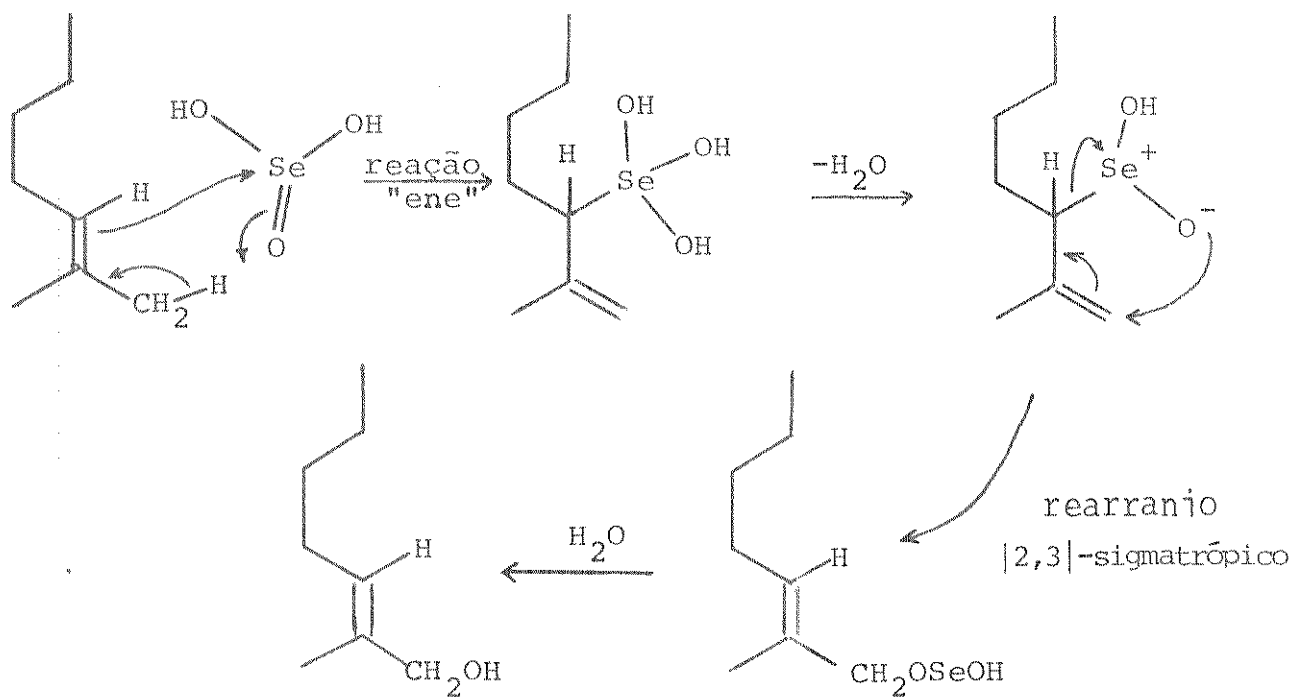
sições alílicas, sempre no lado mais substituído de uma olefina as simétrica /71/. O curso que esta reação toma é uma função de vá rios fatores, incluindo estrutura, estequiometria e solvente. No caso de ligações duplas trissubstituídas, que são as que nos interessam, podemos ressaltar algumas generalizações:

- a) A oxidação sempre ocorre no lado disubstituído da dupla, como já especificado acima.
- b) A ordem de reatividade preferida é $\text{CH}_2 > \text{CH}_3 > \text{CH}$ e a reação nunca ocorre em posições cabeça de ponte. Is to indica uma superposição de fatores estéricos e eletrônicos.
- c) Se a posição alílica preferida é a terciária, geralmente se obtém um dieno conjugado em lugar de um álcool terciário. Isto pode ser justificado, considerando-se a facilidade de desidratação de um carbinol terciário sob as condições ácidas da reação.

Existem várias proposições para o mecanismo da reação, de acordo com os produtos obtidos. Assim, intermediários oxaselenociclobutano, íon carbônio e estados de transição cíclicos parecem ser aplicáveis em diferentes circunstâncias /72 a,b/. A proposição esquematizada a seguir é amplamente aceita/73/.

Outra consideração de ordem geral é a de que não existe envolvimento de radical livre /72c/.

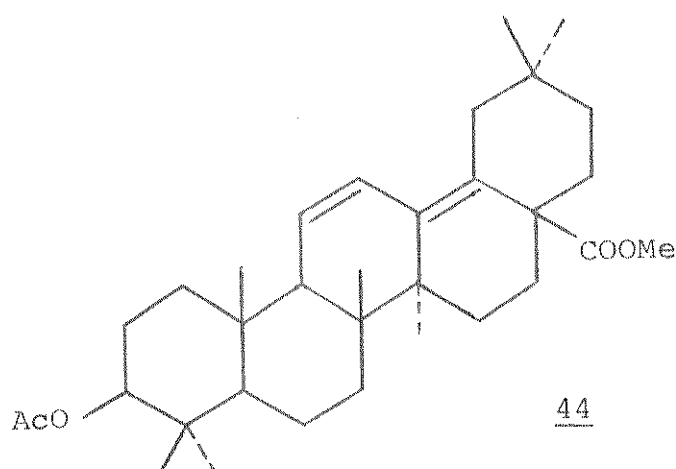
As condições experimentais que influenciam na obtenção dos produtos são bem discutidas na ref. 71. Utilizamos dióxido de selênio recém sublimado (método com ácido nítrico)/71,74/.



em excesso com relação à olefina.

Análise por CCD do produto da reação indicou 2 manchas principais, que foram totalmente separadas por cromatografia em coluna.

As primeiras frações cristalinas, p.f. 216-219°C, apresentaram espectro de UV (E. 31) com λ_{max} 258, 250 e 241 nm, que estão em total acordo com os valores correspondentes ao $\Delta^{11,13}$ -dieno do derivado oleanólico 44, a saber, λ_{max} 260, 252 e 243 nm /64/.

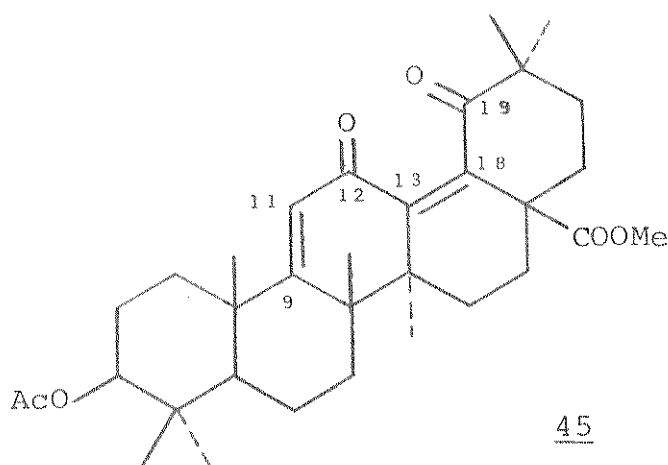


p.f. 232-4°C/76/

O espectro de IV não nos forneceu informações adicionais, sendo praticamente superponível ao do composto Ac-Gs 17,18-Me.

O espectro de massa não mostrou pico devido ao íon molecular do dieno. Apresentou massa máxima em m/e 512 e pico base em m/e 262, como o composto de partida, mas com pequenas variações nas intensidades relativas. De acordo com a ref. 64, o derivado ursólico sem modificações é recuperado juntamente com o $\Delta^{11,13(18)}$ -dieno, o qual por sua vez é detectado apenas pelas absorções características no UV. Nossos dados sugerem que temos essa mistura, mas a pequena quantidade isolada (0,006 g) não nos permitiu maiores informações dos constituintes.

Continuando a eluição da coluna, isolamos um segundo composto cristalino. Os dados apresentados na Tabela V mostram a perfeita correlação com aqueles da literatura para oleana-9(11), 13(18)-dien-28-carbometóxi-3 β -acetóxi-12,19-dioxo 45.



Não encontramos nenhuma referência na literatura sobre a análise do espectro de RMN^1H desta substância quanto às absorções dos prótons das metilas terciárias. Na fig.12 temos os sinais relativos a esses grupos num espectro de RMN^1H em 100 MHz.

TABELA V - Comparação dos dados entre o produto da oxidação com SeO_2 e o composto 45

	Produto da oxidação	<u>45</u> /64,75/
p.f. (EtOH)	243-245°C	244-246°C
$[\alpha]_D^{25}$ (CHCl ₃)	-148° (c = 0.4)	-152° (c = 0.36)
U.V. (E.32) λ_{max} , nm	276 (ϵ 11570)	278 (ϵ 10500)
I.V. (E. 33), cm^{-1}	$\left. \begin{array}{l} 1735 \\ 1705 \\ 1670 \end{array} \right\} \nu_{\text{C}=\text{O}}$ $\left. \begin{array}{l} 1630 \\ 1610 \end{array} \right\} \nu_{\text{C}=\text{C}}$ 1250 $\nu_{\text{C}-\text{O}}$	$\left. \begin{array}{l} 1735 \\ 1705 \\ 1670 \end{array} \right\} \nu_{\text{C}=\text{O}}$ 1630 $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ 1255 $\nu_{\text{C}-\text{O}}$
RMN ¹ H (E.34), δ	5.93(s, H-11)	5.92(s, 1H)
		4.50(1, 1H-W 1/2 15 cps)
	3.70(s, OMe)	3.67(s, 3H)
	2.05(s, OAc)	2.05(s, 3H)
	0.92-1.36(6s, 7 grupos Me)	

Com base no que foi discutido anteriormente comparando o composto 45 com o 42, podemos admitir que os grupos Me-23 e Me-24 em 45 estão suficientemente distanciados das posições afetadas pela reação de oxidação (9,11,12,13,18,19), logo, não devem sofrer grandes variações nos deslocamentos químicos, relativamente a 42. Portanto, podemos atribuir o sinal a δ 0.91(6H) a esses dois grupos, considerando que todos os demais estão mais próximos às insaturações e devem sofrer deslocamentos maiores.

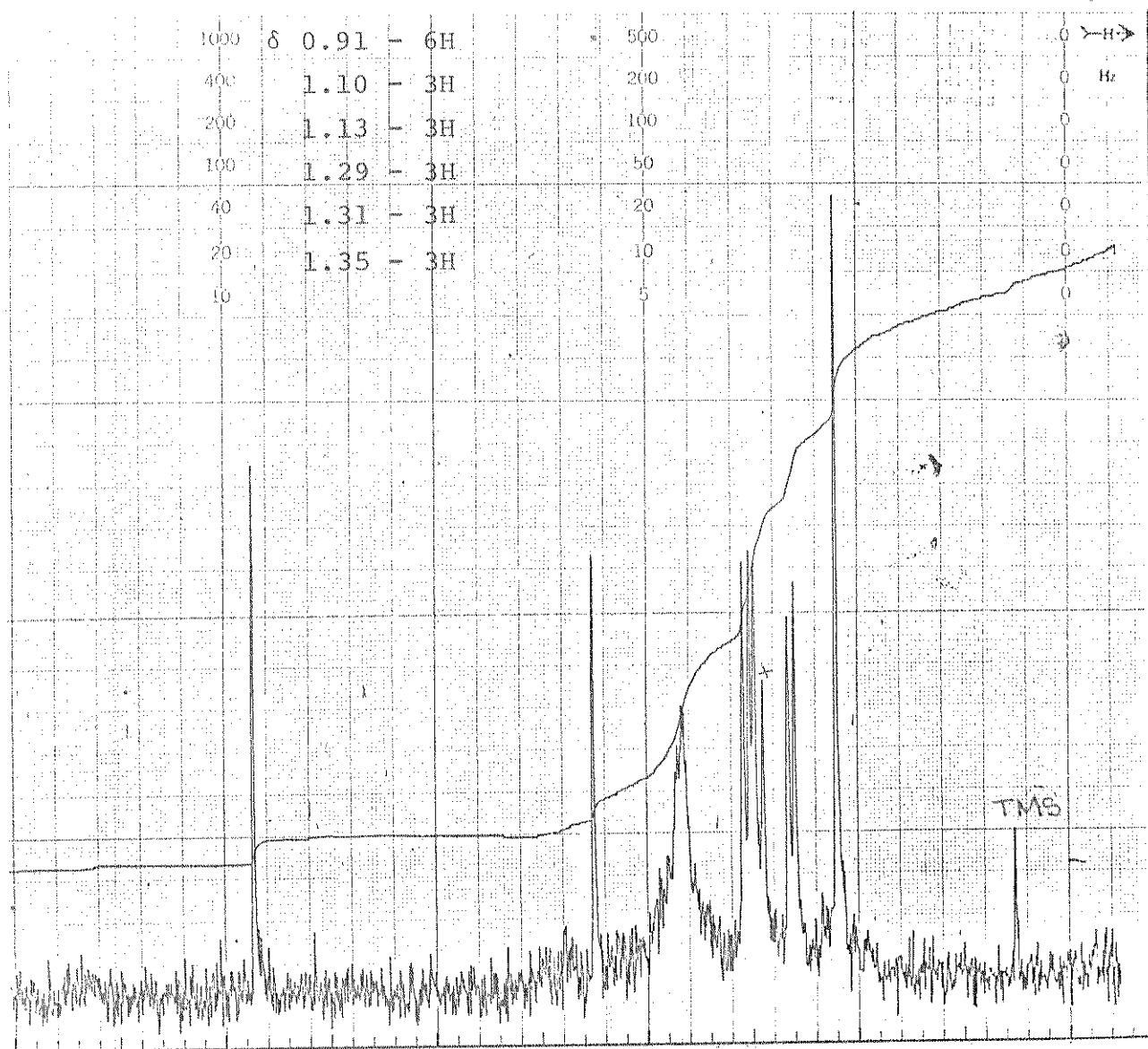
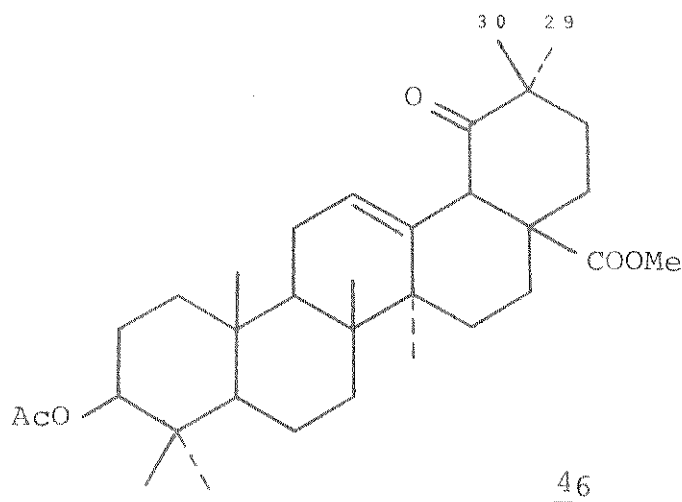


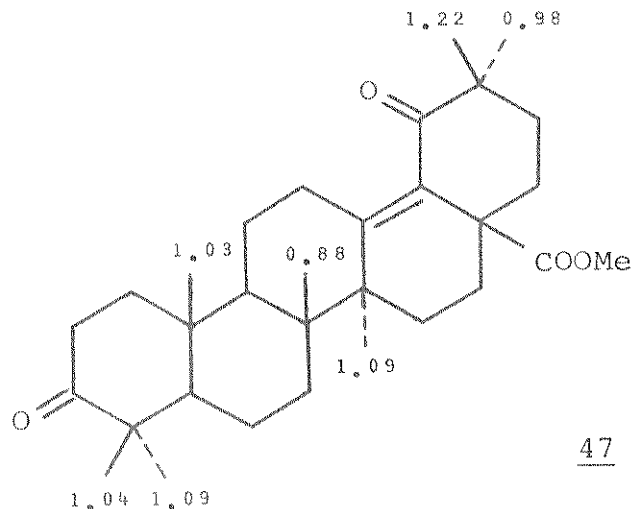
fig. 12 - Espectro de RMN ^1H (100 MHz) do composto 45

Uma função oxigenada ($\text{C} = \text{O}$) na posição 19 contribui com os incrementos mostrados na tabela IV, e podemos considerar que a maior influência será exercida sobre as metilas 27, 29 e 30. Para o composto 46, os cálculos fornecem δ 1.09 e 1.20 para os metilas 29 e 30, respectivamente (δ exp. /62/: 1.09 e 1.19)

A carbonila exerce sobre a metila axial 29(α) dois efeitos opostos: de desproteção indutiva e de proteção anisotrópica. Sobre o metila equatorial 30(β), por outro lado, esses 2 efeitos são de desproteção (ver zonas de proteção e desproteção anisotrópica na fig. 13), portanto, é coerente considerarmos o sinal em campo mais alto devido ao CH_3 -29, como indicamos acima.



O composto 47, olean-13(18)-en-28-carbometóxi-3,19-dioxo, idêntico ao composto 45 ao nível dos anéis D e E, mostra as seguintes absorções para os grupos metila /77/:



Para o composto 45, estes efeitos são bastante pronunciados devido à extensão das insaturações, e é razoável considerarmos os sinais em δ 1.10 e 1.29 como correspondentes aos metilas 29 e 30, respectivamente.

Restam as absorções em δ 1.13, 1.31 e 1.35 que devem ser atribuídas aos grupos 25, 26 e 27. Essas 3 metilas, todas axiais, se encontram acima (25 e 26) e abaixo (27) do "plano" formado pelo sistema de insaturações (fig. 13). Seus prótons, por

tanto, estão localizados na zona de proteção anisotrópica criada pela circulação de elétrons π .

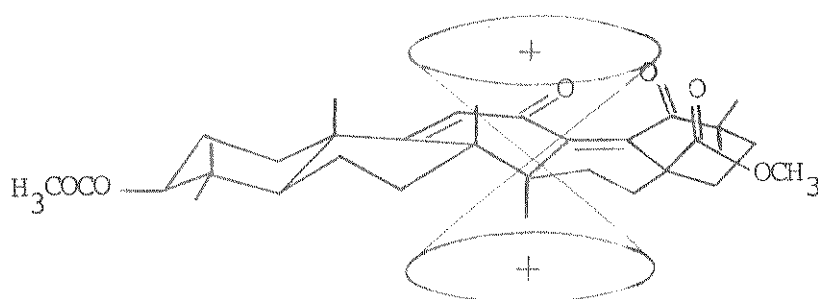
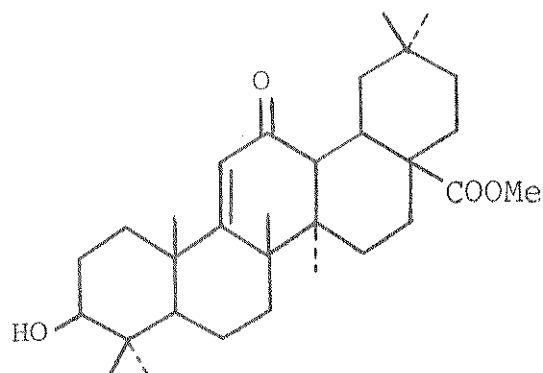


fig. 13 - Composto 45. Zonas de proteção anisotrópica

Comparando este efeito sobre os 3 grupos, podemos admitir que a maior influência será sobre os prótons do CH_3 -27, devido a sua maior proximidade dos centros insaturados. O CH_3 -26 se encontra em situação bastante semelhante, mas os efeitos de desproteção 1,3-diaxial /96,97/ devem deslocar a absorção dos prótons para campo mais baixo. Assim, é razoável sugerirmos que os sinais em δ 1.13 e 1.31 são devidos aos grupos 27 e 26, respectivamente, e por exclusão, δ 1.35 é atribuído ao grupo 25. Esta última designação é plenamente justificável, considerando os pronunciados efeitos de desproteção 1,3-diaxial exercidos pelos grupos 24 e 26 sobre o CH_3 -25.

De qualquer modo, o sistema dieno-diona cria uma situação muito peculiar, e uma atribuição mais segura deveria ser baseada em comparações com modelos adequados, o que não foi possível. Assim, por exemplo, verificamos, através de uma pesquisa na literatura, que estudos concernentes com os possíveis deslocamen

tos dos grupos metilas terciários em compostos 12-oxo deste tipo não têm sido publicados. Algumas informações disponíveis são referentes às substâncias indicadas abaixo, para as quais não são feitas atribuições.



0.83 (3H)

0.89 (3H)

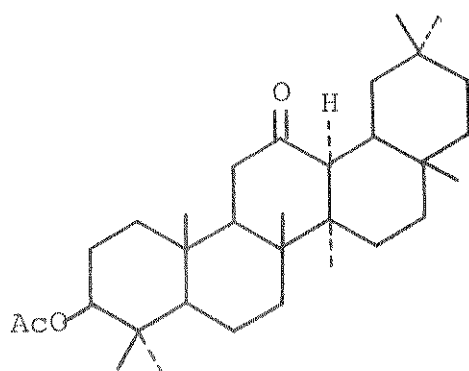
1.00 (6H)

1.04 (3H)

1.18 (3H)

1.24 (3H)

epitelantato de metila /78/



0.85 (3H)

0.90 (6H)

1.04 (9H)

1.09 (3H)

1.19 (3H)

3β-acetoxi-3α-oleanan-12-ona /79/

Também não foi encontrada na literatura nenhuma referência quanto ao processo de fragmentação do derivado dieno-diona 45 num espectrometro de massa.

O espectro de massa (E. 35) do compostos apresenta 3 picos de massa alta com intensidades significantes, a saber m/e 538(77%), 478 (49%), 437 (100%). A típica reação retro Diels-

-Alder, observada em compostos triterpênicos insaturados não deve ocorrer em substâncias como esta, considerando que o sistema de insaturações conjugado propicia uma maior estabilidade, desfavorecendo fragmentações deste tipo. De fato, a ausência de picos intensos de menor massa, e um íon molecular em m/e 538 com alta intensidade relativa (77%), o que não é muito comum em compostos triterpênicos, apoiam estas suposições.

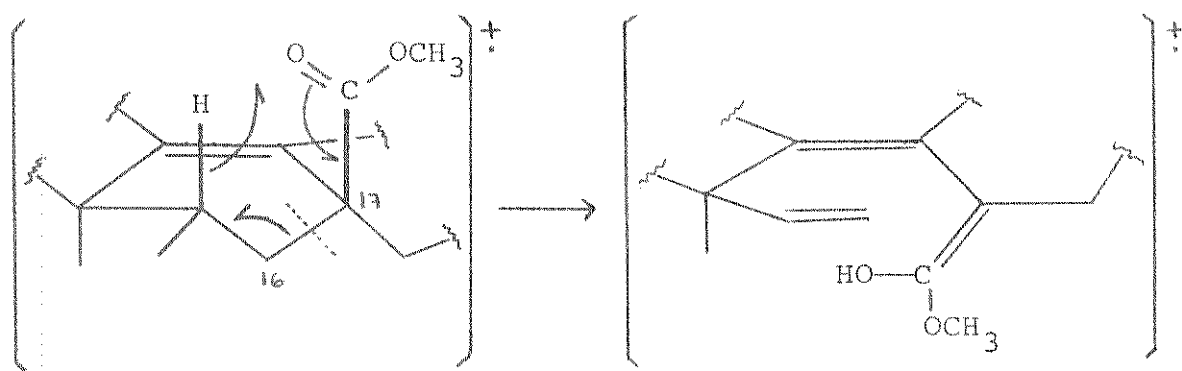
A perda de 60 u.m.a. pode ser relacionada à perda de ácido acético, produzindo o íon f, com m/e 478 (ESQUEMA III).

Para os derivados oleanenos Δ^{12} -insaturados, DJERASSI et al /61/ propõe que, após a reação retro Diels-Alder, que resulta na formação do principal fragmento a (ESQUEMA II, p 56), este pode perder o substituinte na posição 17, resultando na espécie c. Esta é sempre acompanhada por um intenso pico 14 u.m.a. mais baixo, e a presença de um íon metaestável em alguns casos indica que este fragmento é formado por um processo em uma etapa a partir da espécie a. Desde que esta fragmentação presumivelmente envolve a perda do substituinte do C 17, o átomo de carbono adicional perdido é muito provavelmente o próprio C 17. Esta clivagem necessita de uma dupla transferência de H, como a indicada no esquema II para a, dando um cátion alílico altamente conjugado d (73 u.m.a. mais baixo que a, no caso de um carbometóxi em 17).

No caso da diona 45, podemos supor a ocorrência de uma clivagem análoga, mas a perda de 101 u.m.a ($C_5H_9O_2$) sugere 2 grupos $-CH_2-$ a mais.

A migração de um H provocando a clivagem C16-C17 envolve certamente um rearranjo tipo MacLafferty com a carbonila do grupo carbometóxi.

A ruptura da ligação C20-C21 proposta no esquema III

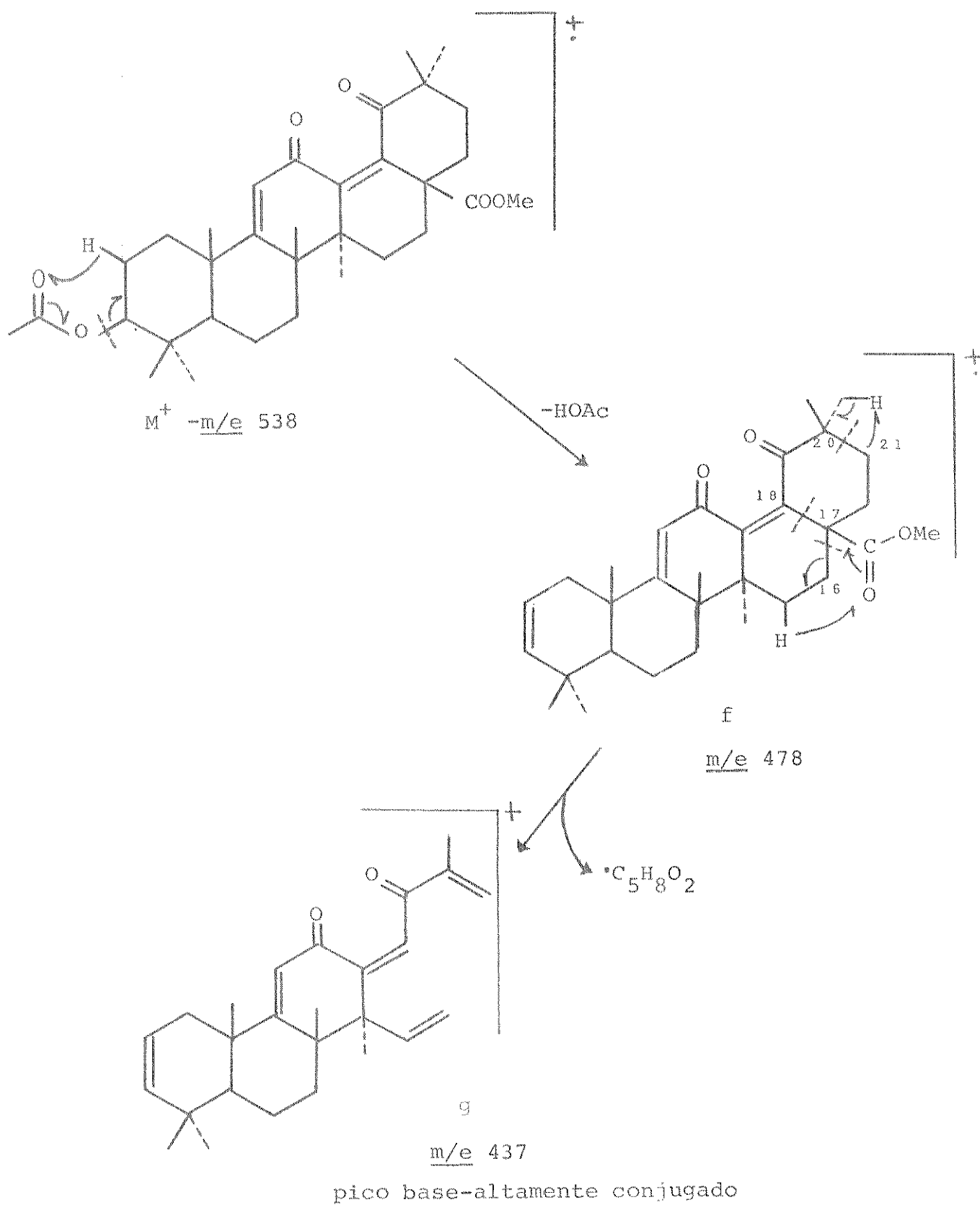


pode ser favorecida relativamente à da ligação C22-C17., considerando que a insaturação formada provoca uma extensão no sistema de elétrons π conjugados e, portanto, um aumento na estabilidade do produto.

A perda de um íon radicalar, com ruptura da ligação C18-C17, produz o cátion altamente estável g, em m/e 437, como pico base do espectro.

Esta oxidação com dióxido de selênio nos possibilitou a seguinte conclusão: o derivado do ácido ursólico, quando em quantidade considerável, é recuperado sem modificações juntamente com o dieno 44 /64/, e é separado deste por cristalização fracionada. No caso, não tivemos esta separação, mas os dados são indicativos dos dois compostos, portanto podemos sugerir que nossa mistura triterpênica original era constituída predominantemente por ácido oleanólico, junto a pequena quantidade de ácido ursólico.

Isto está bastante coerente com a divergência observada nos dados de p.f. e rotação óptica dos compostos individuais, assim como com os pequenos picos verificados nos espectros de RMN¹H dos derivados metilado e acetilado, atribuídos aos prótons do Me-27 em substâncias Δ^{12} -ursênicas.

ESQUEMA III - Fragmentação proposta para o composto 45

AÇÚCARES (F_{MeOH} - EXTR. METANÓLICO I)
(EXTR. METANOL - ÁGUA)

A separação de açúcares redutores em misturas é classicamente feita por cromatografia em papel e a identificação resulta da comparação com padrões adequados. Muitas tentativas de separar misturas de açúcares por CCD, um método mais prático e rápido, têm sido feitas desde os primeiros experimentos de STAHL /80/. Os resultados obtidos com todos adsorventes conhecidos e com muitos tipos diferentes de impregnantes e misturas de solventes, têm mostrado controvérsias, sendo altamente satisfatórios para alguns casos e totalmente inoperantes em outros /81-83/.

Em nosso estudo de açúcares livres da planta, fizemos uma série de cromatoplasmas, variando adsorventes, impregnantes, solventes e reveladores utilizados, e comparamos os resultados obtidos com aqueles provenientes da cromatografia de papel.

Num primeiro teste, utilizamos como adsorvente sílica gel ativada. Esta normalmente é imprópria para a separação de açúcares, mas já foi utilizada para a detecção de ciclitóis. Com os sistemas de solventes recomendados, n^o (1) /81, p. 307/ e n^o (2) /37, p. 230/ (Tabela VI) tivemos uma péssima resolução. Tanto reveladores mais específicos para compostos redutores, anisaldeído- H_2SO_4 /38 c/, e para compostos não redutores, tetraacetato de chumbo 1% em etanol /37, p. 230/, como os mais gerais, $AgNO_3$ amoniacal /38 g/, apresentaram os mesmos resultados.

Cromatografia em celulose monocristalina, considerada eficiente em muitos casos, revelou que temos no mínimo 2 compostos, mas a separação não foi nítida. Com o sistema n^o (3) e o

revelador hidrogeno-ftalato de anilina /37, p . 216/, obtivemos manchas marron-avermelhadas, com Rf muito próximos. Pela aplicação conjunta dos padrões glucose, galactose e frutose, os açúcares livres mais comuns em plantas, verificamos que a distinção entre eles numa mistura seria muito difícil.

Conseguimos melhores resultados com placas de sílica impregnadas com ácido bórico e com acetato de sódio. Uma investigação detalhada dos limites e possibilidades desses 2 impregnações em CCD foi feita por LATO e colaboradores /82,83/. Eles trabalharam com 20 açúcares, sendo 14 monossacarídeos e 6 oligossacarídeos, e testaram 42 sistemas de solventes em cromatografia mono- e bidimensional. Em todos os casos utilizaram reagente fenólico (nafto-resorcinol- H_2SO_4) como revelador, que desenvolve cores diferentes para vários açúcares.

Em nossos testes, usamos 7 padrões, sendo 6 monossacarídeos (glucose, frutose, galactose, xilose, manose e arabinose) e 1 dissacarídeo (sacarose). Entre os reveladores já indicados, a solução de anisaldeído - H_2SO_4 apresentou bons resultados, com o desenvolvimento de cores diferentes, de um modo bem característico para cada açúcar. Vale ressaltar que este reagente é muito sensível à ação do tempo e da temperatura. Cores vivas sobre um fundo claro somente são obtidas se a solução for recentemente preparada e se as placas não forem submetidas a superaquecimentos após a pulverização.

As cromatoplasmas de sílica impregnadas com acetato de sódio foram desenvolvidas em 8 sistemas de solventes: (1), (3), (4) /84/, (5) a (9).

Em todos os casos, a separação foi muito pequena. Os padrões individuais apresentam praticamente o mesmo Rf, evidenciando

TABELA VI - Sistemas de solventes utilizados para separação de açúcares /82/.

- (1) benzeno-metanol-ácido acético-acetona (65:15:10:10)
- (2) n-butanol-piridina-água (10:3:1)
- (3) n-butanol-ácido acético-água (3:2:6)
- (4) acetato de etila-acetona-i-propanol-água (6:3:2:1)
- (5) clorofórmio: metanol (6:4)
- (6) acetato de etila-i-propanol-n-butanol-ácido acético-água
(100:60:35:35:30)
- (7) i-propanol-água (4:1)
- (8) acetato de etila-piridina-água (3:3:2)
- (9) ácido acético-acetona-i-propanol-água (6:3:2:1)

do a dificuldade de identificação destes em uma mistura. Os açúcares glucose e frutose não são distinguidos por R_f em nenhum dos solventes testados, não obstante o fato de se tratar de uma dupla hexose-pentose. Estas cromatoplacas, no entanto, nos permitiram descartar a possibilidade de termos xilose e manose em nossa amostra. Estes monossacarídeos, além da pequena diferença em R_f , coram de modo muito peculiar: manchas avermelhada e amarela-clara, respectivamente, aparecem bem antes das demais.

Utilizando o impregnante ácido bórico em cromatografia unidimensional, LATO et al observaram consistentemente uma resolução bastante limitada /82/. No entanto, em nosso caso, esta foi superior à obtida com acetato de sódio. Solventes contendo piridina produziram manchas difusas e alongadas, o mesmo ocorrendo com metanol e/ou acetona. O melhor sistema de desenvolvimento foi o n^o (7), mostrando uma nítida separação em 2 grupos.

Galactose e glucose apresentam Rf muito próximos, mas por ponto misto são totalmente diferenciadas.

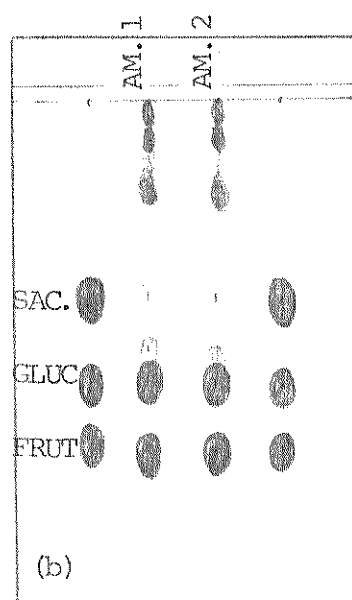
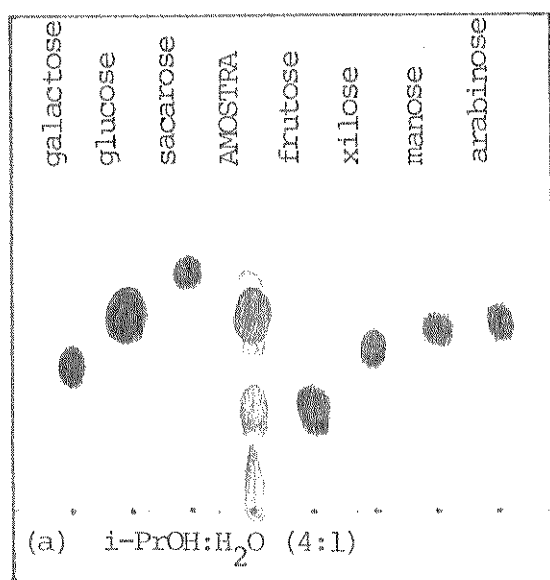
Por comparações das taxas de migração, das cores desenvolvidas no aquecimento e por ponto misto nos vários solventes, pudemos verificar:

- ausência de arabinose, manose, xilose e galactose
- existência de glucose, frutose e sacarose, além de um açúcar não identificado, com Rf inferior à glucose, presente em pequena quantidade.

A separação conseguida pode ser representada como abaixo (fig. 14 a)

fig. 14 - Separação dos açúcares

- a) CCD em sílica impregnada com ácido bórico
b) cromatografia em papel



AM.1 - EXTR. METANÓLICO I

AM.2 - EXTR. METANOL-ÁGUA

Alternativamente, fizemos cromatografia descendente em papel, segundo métodos clássicos (parte experimental).

A identidade dos açúcares já detectados foi confirmada, e pudemos visualizar claramente manchas próximas à origem, devidas provavelmente a oligo-e polissacarídeos. O reagente utilizado para revelação, solução alcalina de AgNO_3 , é bastante geral tanto para açúcares redutores como para não redutores.

Os carboidratos provenientes da hidrólise dos polissacarídeos foram analisados pelas mesmas técnicas.

Por cromatografia descendente em papel confirmamos a hidrólise total. Foram detectados 3 monossacarídeos predominantes, que por comparações com amostras autênticas (ponto misto) foram identificados como glucose, galactose e xilose. CCD em sílica impregnada com ácido bórico desenvolvida em dois sistemas de solventes, (6) e (7), confirmaram a identidade dos monconstituintes do polissacarídeo.

Através destes métodos detectamos apenas traços de frutose, descartando assim a possibilidade de termos frutana como o polissacarídeo característico da planta.

Este estudo nos permitiu verificar que CCD de sílica com impregnantes pode ser muito útil na análise de açúcares de plantas, aliando praticidade, rapidez e uma alta sensibilidade, mas pode ser um método ineficiente para separações e identificações mais complexas. Esta limitação, no entanto, é bastante dependente de fatores como espessura da sílica, concentração do impregnante, quantidade dos açúcares, sistemas de solventes, tempo de ativação, revelador e outros. Trabalhando sob as melhores condições, podemos obter resultados semelhantes aos da cromatografia em papel.

Gs 9

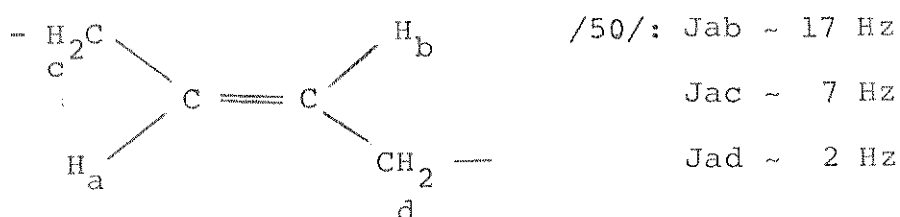
Éster não metílico (F 105-108-EXTR.HEX: ÉTER I)

(F 5-8 - EXTR. BENZÊNICO)

Os óleos amarelados obtidos após purificações das frações dos 2 extratos se mostraram idênticos, tanto por ponto misto em CCD, como por comparações dos dados espectrais de IV e RMN^1H .

O espectro de IV (E.36) apresenta além das bandas em 3000, 2920, 2850, 1460, 1380 e 720 cm^{-1} , devidas a estiramentos e deformações C-H em compostos de cadeia longa, outras em 1740 e 1160 cm^{-1} , características de $\nu\text{C=O}$ e $\nu\text{C-O}$ em ésteres.

O espectro de RMN^1H (E. 37) é típico de um éster não metílico insaturado. O sinal centrado em δ 5.37 evidencia próton olefínico em dupla dissubstituída, do tipo



O triplete mal resolvido em δ 2.77 sugere prótons metilênicos duplamente alílicos. Na região entre δ 0.93 e 2.40 temos vários sinais, com predominância de um singlete largo em δ 1.25 devido aos prótons metilênicos $(\text{CH}_2)_n$. Pelo multiplete centrado em δ 4.22, próprio de grupo metileno vizinho a oxigênio, parece não se tratar de um éster metílico ou etílico.

Submetendo-se o composto a cromatografia em fase gaso

sa conduzida em coluna de silicone SE 30, verificamos a predominância de um único pico (fig. 15).

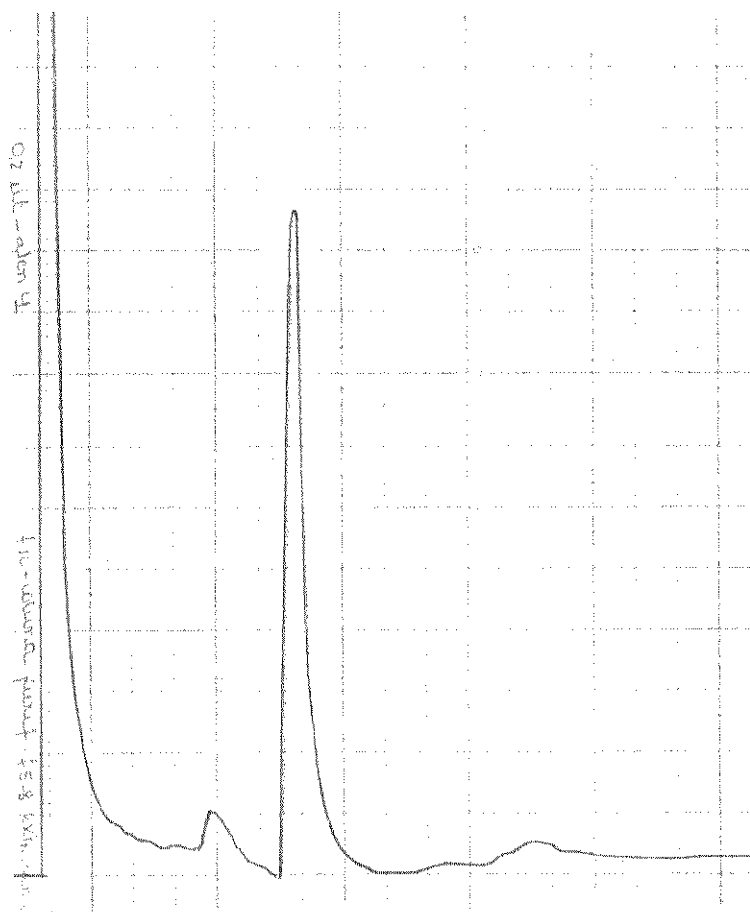


fig. 15 - CG do composto Gs 9 - coluna silicone SE-30

A identificação deste tipo de substância é geralmente facilitada pela análise individual das porções ácida e alcoólica, separadas por uma reação de hidrólise. No caso, os ácidos foram liberados através de uma hidrólise básica.

Os dados espectrais de RMN^1H (E. 38) e de IV dos áci dos purificados são muito semelhantes aos da mistura de ácidos iso lada no extrato HEX: ÉTER I.

Análise por cromatografia gasosa (coluna OV-17 3%) do produto esterificado com diazometano revelou 3 picos principais (fig.16), que foram identificados por coinjeção com padrões como

palmitato, oleato e estearato de metila.

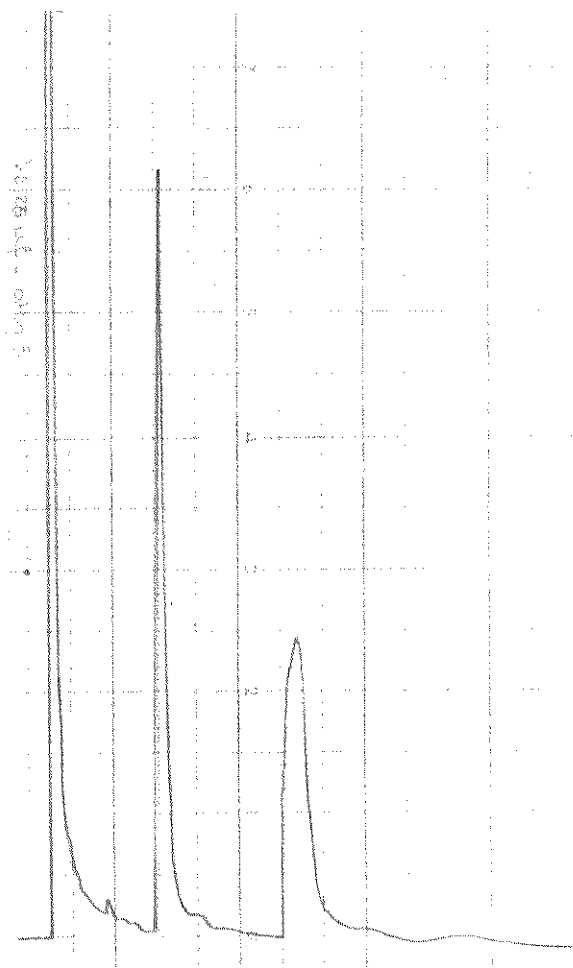


fig. 16 - CG - fração ácida proveniente da hidrólise de Gs 9-
ésteres metílicos

A obtenção de 3 ácidos após a hidrólise de um éster que apresenta apenas um pico em cromatografia gás-líquido nos sugere um composto triglicerídico, bastante comum em plantas. Neste caso, teríamos um triglicerídio misto, com tres porções ácidas diferentes.

Infelizmente, a análise da fração orgânica em pH básico não nos conduziu à identificação de nenhum composto. O álcool deve ter ficado na fase aquosa.

A análise do espectro de massa da substância Gs 9 seria de muita utilidade, mas não foi possível o registro de nenhum pico de massa alta.

A detecção dos íons moleculares neste tipo de composto, com m/e 800-900, é bastante difícil, exigindo condições de operação controladas e alta sensibilidade do aparelho /85/.

Gs 19 (F 26-37 - EXTR. METANÓLICO II)

Este composto, isolado como um óleo incolor, mostra muitas semelhanças com o esqualeno 25, isolado do extrato HEX: ÉTER I (Gs 1).

O espectro de UV (E. 39) apresenta λ max em 252 e 211 nm, sugerindo cromóforos conjugados.

Pelo espectro de IV observamos 2 bandas características de $\nu C=O$ em ésteres e $\nu C=C$, em 1735 e 1660 cm^{-1} , respectivamente, além de bandas devidas a estiramentos e deformações C-H.

O espectro de RMN¹H (E. 40) é superponível ao do composto 25 ao nível dos sinais devidos a prótons olefínicos (δ 5.12), metilênicos (δ 2.20) e metílicos (δ 1.63), estes dois últimos também sobre C_{sp}^2 . Adicionalmente, um multiplete em δ 3.95 pode ser devido a um grupo CH_2 vizinho a um oxigênio.

Podemos supor, baseado nestes dados, termos um éster alifático, não metílico, com porção da molécula análoga ao esqualeno, mas a pequena quantidade da amostra, assim como sua fácil decomposição, não nos permitiram obter maiores informações estruturais.

Gs 20

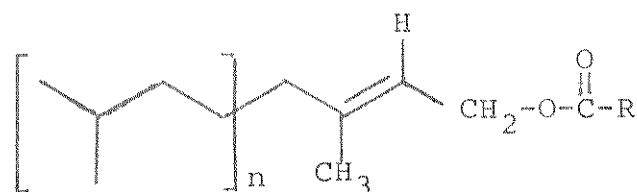
(F 62-68 - EXTR. METANÓLICO II)

Este composto foi isolado como um óleo amarelado.

O espectro de UV (E. 41) apresenta absorções em 203, 224, 255 e 355 nm, sugerindo novamente cromóforos conjugados. O espectro de IV apresenta bandas em $1730(\nu\text{C=O})$ e $1170\text{ cm}^{-1}(\nu\text{C-O})$, além de outras devidas a estiramentos e deformações C-H, que se assemelham àsquelas encontradas em ésteres de cadeia longa.

O espectro de RMN¹H (E. 42) apresenta sinais em δ 0.90(s), 0.93(s) e 1.27(s), correspondentes a grupos metilas e metilênicos, sendo este último bastante intenso, característico de compostos de cadeia longa. Dois singletes em δ 1.72 (3H) e 1.86 (3H), assim como sinais em δ 4.55 (d, 2H, $J = 7$ Hz) e δ 5.25 (t1, 1H, $J = 7$ Hz) sugerem grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{OR}$ e $-\text{H}$, respectivamente, ligados a C sp^2 . Finalmente, um dublete em δ 2.22 (2H, $J = 7$ Hz) pode ser devido a um grupo $-\text{CH}_2-$ vizinho a uma carbonila.

Com base nestes dados espectrais, propusemos a existência de um esqueleto terpenóide, do tipo



como integrante do composto Gs 20.

Comparações com amostra autêntica de acetato de fitila 51, derivado do produto natural fitol 50, também isolado da mesma planta (discutido adiante), reforçaram a suposição de termos um éster, onde o componente alcoólico é um terpenóide análogo ao fitol. CCD com ponto misto indicaram que estes compostos apresentam Rf muito próximos, com Gs 20 um pouco menos polar.

Uma melhor elucidação da estrutura não nos foi possível devido a fácil decomposição e pequena quantidade do composto isolado.

Gs 21

Tereftalato de dimetila 49 (F99-108-EXTR.METANÓLICOII)
(F109-120-EXTR.METANÓLICOID)

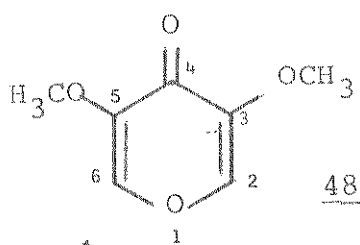
Após purificações, este composto foi isolado como um sólido cristalino incolor, p.f. 136-136,4°C, visível sob irradiação com lâmpada UV em placa de sílica fluorescente.

O espectro de UV (E. 43) apresenta absorções máximas em 282 (ε 2120) e 239 nm (ε 8790), duas bandas muito características de compostos aromáticos substituídos (banda K e banda B)/50/.

Os sinais em 3000, (1500, 1440), 1020, 815 e 725 cm⁻¹ no espectro de IV (E. 44) também sugerem composto aromático, sendo devidos a νC-H, νC-C do anel, dobramento C-H e C-C, respectivamente. Uma banda fraca em 2950 cm⁻¹ é própria de νC-H de grupo metila e absorções intensas em 1720, 1280 e 1120-1110 cm⁻¹ sugerem um grupo éster ligado a anel aromático (νC=O e νC-O, respectivamente) /50/.

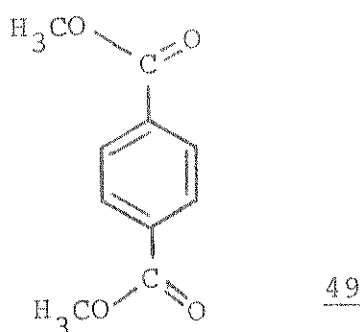
Pelo espectro de RMN¹H (E. 45) constatamos ser um composto extremamente simétrico, apresentando apenas dois singletes em δ 4.00 e δ 8.20, com integrações relativas de 1.5:1.0. O singlete em δ 4.00 é característico de prótons em grupo -OMe aromático ou em éster aromático, e aquele em δ 8.20 sugere prótons aromáticos bastante desprotegidos.

Compostos simétricos como γ-pironas já foram isolados de *Compositae* /86/, e poderíamos supor uma estrutura como 48 para Gs 21, mas uma pesquisa na literatura mostrou discordância nos dados.



O espectro de massa (E. 46) apresenta um pico correspondente ao íon molecular em m/e 194. Perdas de 15, 31 e 59 u.m. a., relativas a $M^+ - CH_3$, $M^+ - OCH_3$ (pico base) e $M^+ - COOCH_3$, respectivamente, evidenciam a presença de um grupo éster.

Uma revisão da literatura mostrou a perfeita concordância entre os dados de Gs 21 e aqueles registrados para o tereftalato de dimetila 49 (Tabela VII)



Ao identificarmos o composto Gs 21 como tereftalato de dimetila, aventou-se a possibilidade deste ser um plastificante extraído em alguma etapa do processamento. No entanto, vários fatores foram considerados, que nos fizeram descartar esta suposição.

Realmente, grande número de trabalhos na literatura indicam que o ácido tereftálico é largamente utilizado na indústria de plásticos, na forma de polímeros derivados de glicóis do tipo $HO(CH_2)_nOH$, onde o n varia de 2 a 10. Seu dimetil éster também é usado como plastificante, mas em menor escala. No entanto, a recuperação do ácido ou do dimetil éster a partir de um plástico exige condições drásticas, como refluxo com ácido mineral por

TABELA VII - Comparações entre os dados de Gs 21 e os do terefta
lato de dimetila 49

	Gs 21	Tereftalato de dimetila
p.f. (°C)	136-136.4	139-140 /87/
MeOH UV λ max (nm)	239	242 /88/
	282	286
RMN ¹ H (δ)	4.00 (s, 6H)	3.92 (s, 6H) /87/
	8.20 (s, 4H)	8.07 (s, 4H)
EM (m/e)	194 (M ⁺)	194 (M ⁺) /89/
	179 (M ⁺ - CH ₃)	
	163 (M ⁺ - OCH ₃ - 100%)	163 (100%)
	135 (M ⁺ - COOCH ₃)	135

2 h /90/.

Isto, aliado à grande quantidade de Gs 21 isolada e ao fato de não termos mantido o material em contato com plásticos em nenhuma etapa do processamento, apoiam a hipótese de que se trata de um produto natural.

Novamente, através de uma revisão na literatura, constatamos o isolamento de tereftalato de dimetila de 3 plantas, a saber, Aegle marmelos (fam. Rutaceae) /91/, Zizyphus sativa (fam. Rhamnaceae) /92/ e Uncaria gambier (fam. Rubiaceae) /93/.

Gs 22

Fitol 50 (F 99-108-EXTR. METANÓLICO II)

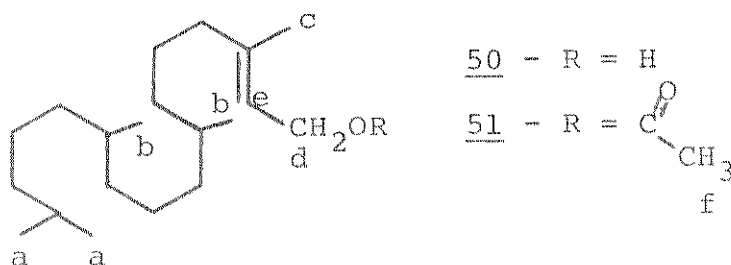
(F 109-120- EXTR. METANÓLICO II)

Este composto, isolado como um óleo incolor, mostra características espectrais de um terpenóide.

Seu espectro de IV (E. 47) apresenta bandas de absorção em 3340 e 1660 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$ e $\nu\text{C=C}$, respectivamente), além da aquelas referentes a estiramentos e deformações C-H em compostos de cadeia longa.

A presença de sinais em campo alto, δ 0.83(s), 0.93(s) e 1.22 (1) no espectro de RMN^1H (E. 48) indica prótons de grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$. Adicionalmente, observamos sinais em δ 1.65 (s, 3H), 4.04 (d, $J = 7\text{Hz}$, 2H) e 5.37 (t1, $J = 7\text{Hz}$, 1H), os quais caracterizam a presença de um metila, de um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ e de um próton, respectivamente, ligados a Csp^2 /50/.

Uma revisão na literatura nos levou a verificar que os dados espectrais de Gs 22 coincidem com aqueles registrados para o diterpeno acíclico fitol 50, como evidenciado na tabela VIII para os sinais em RMN^1H



Com a finalidade de obter dados de mais um derivado de Gs-22 para comprovação de identidade, e também de um modelo para comparação com o éster Gs 20, preparamos o acetato através de

TABELA VIII - Comparação dos dados de RMN^1H entre Gs 22 e fitol e Ac-Gs 22 e acetato de fitila

	Gs 22 (E.48)	FITOL <u>50</u> /94/	Ac-Gs 22 (E.49)	ACETATO DE FI TILA <u>51</u> /95/
$\text{RMN}^1\text{H}(\delta)$	0.83(s)	0.87 (Me, <u>a</u>)	0.81(s)	
	0.93(s)	0.97 (Me, <u>b</u>)	0.91(s)	
	1.22(l)		1.21(l)	
	1.65(s)	1.68 (Me, <u>c</u>)	1.70(s)	1.70 (Me, <u>c</u>)
	4.04 (d, J=7Hz)	4.13 (CH_2 , <u>d</u>)	1.97 (s)	1.92 (Me, <u>f</u>)
	5.37 (tl, J=7Hz)	5.42 (H, <u>e</u>)	4.51 (d, J=7Hz)	4.50 (CH_2 , <u>d</u>)
			5.31 (tl, J=7Hz)	5.32 (H, <u>e</u>)

reação com anidrido acético/piridina.

O produto Ac-Gs 22 se mostrou idêntico ao acetato de fitila 51 (Tabela VIII). Aqui verificamos claramente o deslocamento do sinal devido aos prótons do grupo $-\text{CH}_2\text{OR}$ para campo mais baixo ($\Delta\delta \sim 0.4$), que está de acordo com aquele obtido para o éster Gs 20 (δ 4.55). Podemos notar também a semelhança entre esses 2 espectros de RMN^1H (E. 42 e E. 49) ao nível dos outros sinais referentes às porções alcoólicas dos ésteres, reforçando assim a suposição de termos um derivado de fitol como Gs 20.

CAPÍTULO 3

ESTUDOS DE RMN¹H, DE RMN¹³C E DE ESPECTROMETRIA
DE MASSA DE ALGUNS DERIVADOS DO GLUTINANO

- I - Isolamento do composto
- II - Considerações estruturais. Técnicas utilizadas para atribuições de sinais em RMN¹H
- III - Obtenção dos derivados
- IV - Aplicação de reagentes de deslocamento no estudo de RMN¹H dos derivados do glutinano
- V - Análise dos espectros de RMN¹³C de derivados glutinânicos
- VI - Análise dos espectros de massa de derivados glutinânicos

I - Isolamento do composto

A substância escolhida para nossos estudos, denominada Os-3, foi isolada da parte solúvel em benzeno do extrato etanólico total do cerne de Olmediopereba schlerophylla, família Morácea (gênero até então totalmente desconhecido quanto à composição química), através de cromatografia em coluna.

Por recristalizações sucessivas em benzeno:metanol, foi obtido um sólido cristalino, p.f. 188,5-190,5°C $[\alpha]_D^{25} + 90^\circ$ (c = 0.66, CHCl₃) /99/.

II - Considerações estruturais. Técnicas utilizadas para atribuições de sinais em RMN¹H

O espectro de IV do composto (E.50) apresenta bandas

1740, 1240 e 1640 cm^{-1} , próprias de $\nu\text{C=O}$, $\nu\text{C-O}$ e $\nu\text{C=C}$, respectivamente, as duas primeiras sendo características de ésteres. Uma intensa absorção em 3420 cm^{-1} sugere $\nu\text{O-H}$ em alcóois, embora não observe $\nu\text{C-O}$ típico desta função entre $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. No entanto, isto não pode servir de diagnóstico numa primeira análise, desde que outras absorções também aparecem nesta região/48/. Entre as bandas de estiramento e deformação C-H, dois sinais em 1390 e 1370 cm^{-1} sugerem metilas geminados.

A natureza triterpênica da substância ficou evidenciada pela análise do espectro de RMN^1H (E.58 - 100 MHz). Uma banda larga entre $\delta 1.0$ e 2.0 e vários picos agudos em torno de $\delta 1.0$ caracterizam prótons metilênicos em sistemas cíclicos e prótons em metilas terciárias, respectivamente. A integração dos sinais em campo alto está coerente com 8 grupos CH_3 . Um singlete em $\delta 2.00$ (3H) confirma o grupamento acetato e dois multipletes em $\delta 5.62$ e 4.72 (1H cada) sugerem próton olefínico em dupla trisubstituída e próton sobre C ligado a grupo acetoxila, respectivamente.

O espectro de massa da substância (E.51) apresenta picos em m/e 468 (massa máxima), certamente devido ao íon molecular, em m/e 408 ($M^+ - 60$), devido à perda de ácido acético, e o pico base em m/e 274.

Com base nestes dados e pelo número de metilas terciárias envolvidas, sugerimos tratar-se de um triterpeno pentacíclico, com uma dupla ligação trisubstituída e uma função acetato secundária.

Com a finalidade de acumularmos dados para uma determinação estrutural mais segura, resolvemos utilizar pequena quantidade de Os-3 na preparação de um derivado.

Através de uma hidrólise básica, obtivemos o álcool secundário correspondente, que será denominado Os-3.1. Recristalização em metanol resultou em um sólido cristalino, p.f. 206-207.4°C, $[\alpha]_D + 57.8^\circ$ (c = 0.74, CHCl₃).

A reação é evidenciada no espectro de IV(E.52) pelo desaparecimento das bandas de absorção do grupo acetato ($\nu_{C=O}$ e ν_{C-O}) e pelo aparecimento das absorções características da função OH: 3440 cm⁻¹ (ν_{O-H}) e 1040 cm⁻¹ (ν_{C-O}). As demais bandas são idênticas às registradas no espectro do acetato.

O espectro de RMN¹H (E.60-100 MHz) apresenta 5 sinais agudos em campo alto, cuja integração corresponde a 8 grupos CH₃, um sinal largo em δ 5.67 e outro em δ 3.49, devidos aos prótons olefínico e carbinólico, respectivamente.

Uma informação adicional que podemos tirar dos espectros de RMN¹H de Os-3 e Os-3.1 (E.58 para Os-3 e E.60 para Os-3.1) é proveniente da largura da meia altura da banda devida aos prótons carbinólicos. Mesmo quando, por causa do acoplamento virtual, o sinal não é resolvido (como ocorre frequentemente em esteróides e terpenos), a largura do multiplete à meia altura ($W_{1/2}$) é efetivamente característica, sendo que em geral um próton axial tem $W_{1/2} > 15\text{Hz}$, enquanto que num equatorial $W_{1/2}$ é menor que 12 Hz /100/. No nosso caso, observamos $W_{1/2} \sim 8\text{ Hz}$, o que nos permite concluir que a função oxigenada do composto se encontra em posição axial.

O espectro de massa de Os-3.1 (E.53) mostra picos em m/e 426, devido ao íon molecular, em m/e 408, devido à perda de H₂O, e novamente o pico base em m/e 274. Para massas inferiores a 274, o EM do álcool é idêntico ao do acetato, evidenciando que o principal fragmento destas substâncias, responsável pelo pico

base, não carrega a função oxigenada.

Os espectros de RMN¹H em 100 MHz dos 2 compostos (E.58 para os Os-3 e E.60 para Os-3.1) mostram nitidamente 8 sinais agudos de intensidades semelhantes em campo alto, confirmando assim a suposição anterior de termos 8 grupos metilas terciários ligados ao núcleo pentacíclico.

Fizemos um levantamento dos principais esqueletos triterpênicos pentacíclicos que ocorrem em plantas e que apresentam derivados cujas características espectrais podem, numa primeira análise, ser condizentes com aquelas verificadas para nossos compostos.

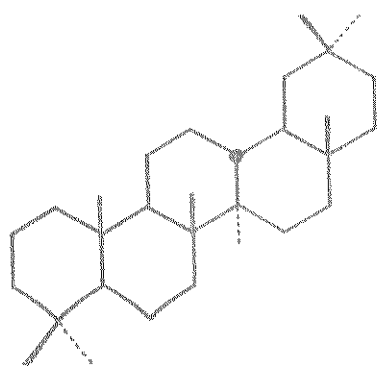
Assim, alguns esqueletos chaves /101/ são mostrados na página seguinte.

Entre os triterpenóides naturais, as funções hidroxila ou acétato se encontram comumente sobre o C 3. Compostos portadores de uma única função oxigenada em posição diferente são de ocorrência bastante rara /101/.

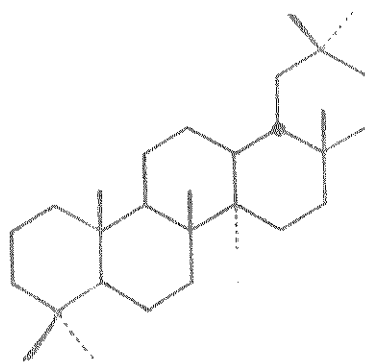
Considerando os derivados insaturados mais representativos dentro de cada classe, temos os Δ^{18} -germanicanos, germanicol 52, Δ^{12} -oleananos, β -amirina 54, Δ^{14} -taraxeranos, taraxerol 56 e Δ^5 -glutinanos, glutinol 58.

Como discutido anteriormente, a insaturação nuclear pode "dirigir" o processo de fragmentação destes compostos, portanto, a análise do EM pode ser de extrema utilidade na determinação estrutural. Na tabela VIII apresentamos os valores de p.f., rotação óptica e os picos mais significativos do EM destes compostos.

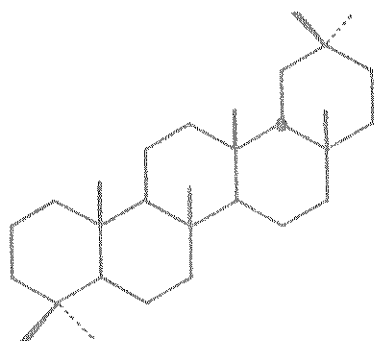
Os isômeros 3-epi foram incluídos porque os alcóois naturais germanicol, taraxerol e β -amirina apresentam a hidroxila no C 3 em configuração β -equatorial. Apenas no glutinol a hidroxila



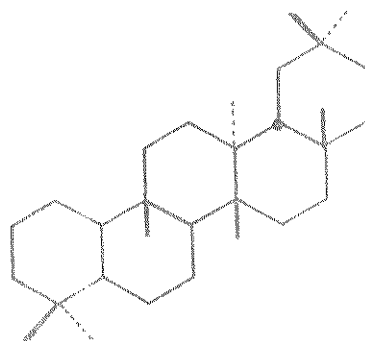
A - Germanicano

52 Δ^{18} , 3β -ol53 Δ^{18} , 3β -OAc

B-Oleanano

54 - Δ^{12} , 3β -ol55 - Δ^{12} , 3β -OAc

C-Taraxerano

56 Δ^{14} , 3β -ol57 Δ^{14} , 3β -OAc

D-Glutinano

57 Δ^5 , 3β -ol59 Δ^5 , 3β -OAc

é 3β -axial, e confirmadamente as funções acetato e hidroxila em Os-3 e Os-3.1, respectivamente, são axiais.

Por esta tabela podemos verificar a estreita correlação entre os dados dos compostos não identificados e aqueles registrados para o glutinol e seu acetato.

TABELA VIII - Comparações entre triterpenos pentacíclicos

	p.f./101,102/ (°C)	rotação óptica/101,102/ $[\alpha]_D$	EM/61,69/ m/e (%)
germanicol <u>52</u>	178	+ 6°	426 (M ⁺) 177,189,204 (100%)
acetato <u>53</u>	279-280	+ 18°	468 (M ⁺) 177,189,204 (100%)
germanicol,3-epi	221-222	- 35°	idem <u>52</u>
acetato	134-135	- 24°	idem <u>53</u>
β -amirina <u>54</u>	199	+ 88°	426 (M ⁺) 218 (100%), 203
acetato <u>55</u>	241	+ 81°	468 (M ⁺) 218 (100%), 203
β -amirina,3-epi	225	+ 73,3°	idem <u>54</u>
acetato	128		idem <u>55</u>
Taraxerol <u>56</u>	280	+ 3°	426 (M ⁺) 204 (100%)
acetato <u>57</u>	302-304	+ 11°	468 (M ⁺) 204 (100%)
Taraxerol,3-epi	267-269	- 11,6°	idem <u>56</u>
Glutinol <u>58</u>	210-212	+ 55° (+ 62°)	426 (M ⁺) 274 (100%)
acetato <u>59</u>	186-187	+ 80°	468 (M ⁺) 274 (100%)
Os-3.1 (alcôol)	206-207,4	+ 57,8°	426 (M ⁺) 274 (100%)
Os-3 (acetato)	188,5-190,2	+ 90°	468 (M ⁺) 274 (100%)

Aqui vale ressaltar que a análise detalhada do espectro de RMN¹³C do composto Os-3 e a comparação com os dados disponíveis de derivados friedelanos /128/ foi decisiva para a definição de sua estrutura. O fato de já ter sido isolada β -amirina da mesma planta, aliado à possibilidade de termos uma segunda função oxigenada no esqueleto, como sugerido pela banda em 3420 cm⁻¹ no espectro de IV de Os-3 (E.50) (ν O-H - apesar disto não estar coerente com outras análises), poderia nos conduzir a uma estrutura tipo amirina, ou outra bastante diferente. No entanto, estas duas vidas foram eliminadas pela análise do espectro de RMN¹³C, que mostrou apenas um carbono ligado a oxigênio, com exceção do carbono carbonílico, e foi muito semelhante ao dos compostos friedelanos. Esta será discutida adiante.

Através de uma pesquisa na literatura, verificamos que apesar de glutinol ocorrer comumente na natureza, esta é a primeira vez que se isola o seu acetato como produto natural. Também verificamos que triterpenos desta classe nunca foram encontrados em plantas Moráceas.

Nenhuma referência é feita quanto aos estudos dos dados espectrais destes compostos, especialmente quanto às atribuições dos prótons metílicos em RMN¹H.

Os deslocamentos químicos dos 2 derivados glutininos (*) são apresentados na tabela IX, juntamente com os obtidos para Os-3 e Os-3.1 (E. 58 e E. 60, respectivamente - RMN¹H em 100 MHz).

Para um estudo mais detalhado acerca da RMN¹H desses compostos, verificamos na literatura os métodos utilizados para

(*) glutinol=glut-5-en-3 β -ol=D:B-friedoolean-5-en-3 β -ol; acetato de glutinol=glut-5-en-3 β -acetôxi=D:B-friedoolean-5-en-3 β -acetôxi

TABELA IX - Comparações entre Os-3 e Os-3.1 e derivados de
glutinol - RMN¹H, δ (ppm)

Os - 3.1	Glutinol <u>58</u>	Os-3	acetato de glutinol <u>59</u>
0.85	0.85 (3H)	0.85	0.84 (3H)
0.95	0.97 (3H)	0.95	0.94 (3H)
0.99		0.99	0.98 (3H)
1.00	1.00 (6 H)	1.01	1.00 (3H)
1.04	1.04 (3H)	1.05	1.04 (3H)
1.09	1.10 (3H)	1.07	1.06 (3H)
1.14	1.14 (3H)	1.10	1.10 (3H)
1.16	1.16 (3H)	1.17	1.16 (3H)
3.49 (W 1/2 9.6Hz)	3.48 (W 1/2 8Hz) -C3 eq.	2.00	2.00 (3H, acetato)
	(próton carbinólico)	4.72 (W 1/2 8Hz)	4.70 (W 1/2 7Hz) -C 3
5.67	5.64 (próton		eq. (próton carbinólico)
	vinílico C 6)	5.62	5.56 (próton
			vinílico C 6)

tal fim.

O uso de reagentes paramagnéticos lantanídicos no estudo de RMN de moléculas complexas tem sido de muita utilidade na elucidação das estruturas de compostos naturais /103/. Complexos tais como tris(dipivalometanato) de európio ou de praseudímio-
-Eu(DPM)₃ ou Pr(DPM)₃ - têm a habilidade de induzir, no espectro de moléculas que carregam funções onde existem pares de elétrons livres, um considerável deslocamento químico nas posições de ressonância dos prótons, devido a formação de adutos entre o metal e

o elemento adequado do substrato /104/. Os processos pelos quais os elétrons desemparelhados do reagente de deslocamento podem afetar a posição de absorção de núcleos do substrato são bem discutidos na ref. 105.

Assim, esses reagentes podem ser extremamente úteis no estudo de triterpenóides que carregam funções oxigenadas (os quais podem atuar como bases de Lewis), especialmente na caracterização dos numerosos grupos CH_3 .

Num espectro normal, os oito sinais devidos aos prótons metílicos se situam numa estreita região em campo alto ($\sim 0.8 - 1.2$). A adição do complexo paramagnético resulta em um deslocamento desses sinais, que passam a cobrir uma faixa de até 5 ppm, sendo que a magnitude deste deslocamento é diretamente relacionada à proximidade espacial entre o grupo metila e o sítio de coordenação do metal /106,107/.

BUCKLEY e colaboradores /107/ utilizaram $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ em um estudo de RMN^1H com triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos, incluindo glutinol e 3-epiglutinol. Considerando que os prótons dos grupos metilas mais próximos da função 3-oxigenada (onde ocorrerá a formação do aduto com o metal) sofrerão os maiores deslocamentos, construíram uma tabela relacionando os grupos CH_3 com os respectivos valores "normalizados" de $\Delta\delta$. Nenhuma referência foi feita à atribuição das bandas de absorção nos compostos puros.

Trabalhos mais recentes sobre o estudo de RMN^1H em compostos triterpênicos têm aplicado o método de deslocamento por reagente lantanídico em combinação com o método de ressonância internuclear dupla INDOR /108,109/. Esta técnica de RMN dupla é um instrumento poderoso para a determinação precisa dos sinais de absorção de prótons encobertos em espectros de RMN complicados, e

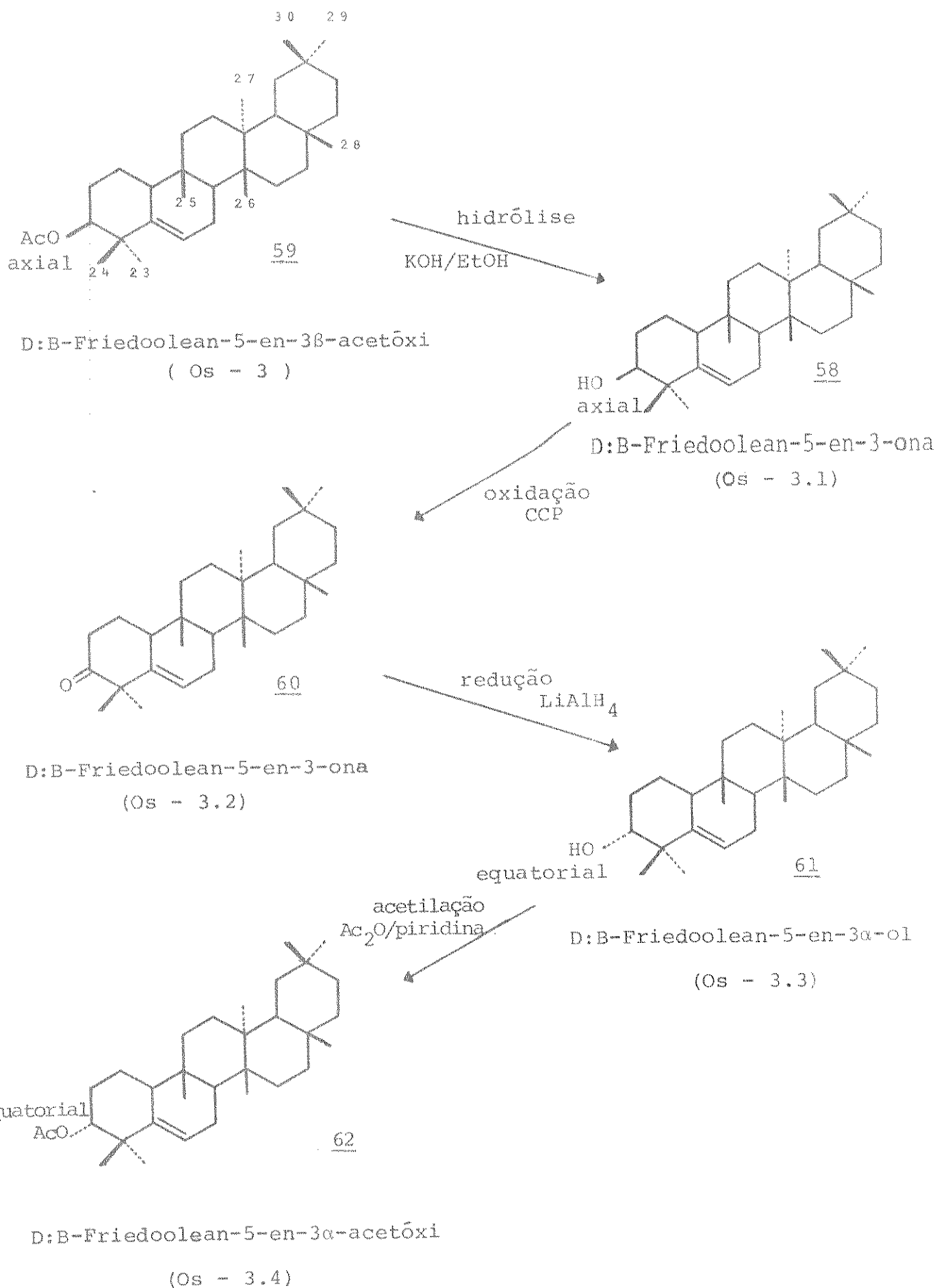
tem demonstrado ser muito eficiente na elucidação de moléculas orgânicas complexas /110/. Em especial, na classe dos triterpenos, a técnica de ressonância dupla internuclear (INDOR) homonuclear foi bastante efetiva para medidas qualitativas do efeito Overhauser nuclear (NOE) entre prótons de grupos metil-metil, o que pode ser resumidamente considerado como a seguir: frequentemente 2 núcleos que são mantidos em proximidade espacial possuem um mecanismo dominante para relaxação mútua, através de interações dipolo-dipolo. Se um desses núcleos é duplamente irradiado, a distribuição de Boltzmann de spins para o outro núcleo é alterada, e a intensidade de suas ressonâncias é perturbada. Este fenômeno foi primeiramente observado por Overhauser, e é por isso chamado de efeito Overhauser nuclear (NOE). É considerado de grande utilidade nas investigações estruturais porque o mecanismo dipolo-dipolo para relaxação diminui com o inverso da distância entre os 2 spins /111/.

Assim, o NOE pode ser operativo para triterpenos entre grupos CH_3 espacialmente próximos, mas os aumentos das intensidades dos sinais neste caso são usualmente muito pequenos para serem medidos diretamente pela técnica convencional.

Pela aplicação da técnica de INDOR, no entanto, tem-se conseguido resultados satisfatórios na atribuição dos picos de ressonância dos grupos metilas da β -amirina, friedelina e triterpenos relacionados /108,109/.

Com bases nestas referências, resolvemos aplicar os 2 métodos (deslocamento por pseudocontato e INDOR) na análise dos espectros de RMN^1H do produto natural Os-3 e derivados.

Utilizamos 5 compostos para nossos estudos, obtidos a partir do acetato de glutinol Os-3, pela seguinte série de reações.



III - Obtenção dos derivados

O composto cetônico Os-3.2, D:B-friedoolean-5-en-3-ona 60, também conhecido como alnusenona, foi o primeiro derivado glutinano isolado na natureza /112/ e é o mais comumente encontrado. A literatura cita sua preparação a partir do glutinol pela oxidação com o complexo CrO_3 /piridina /113/.

Em trabalhos mais recentes, encontramos referências à utilização de clorocromato de piridina (CCP), $\text{C}_5\text{H}_5\text{NHCrO}_3\text{Cl}$, como um reagente altamente eficiente para a oxidação de uma variedade de alcôois a compostos carbonílicos /114/. Sua preparação é muito fácil e segura e o produto é bastante estável ao ar. Os rendimentos alcançados com 1,5 equivalentes molares são iguais ou maiores que aqueles obtidos com o clássico reagente de Collins, que comumente é usado em excesso de 5 a 6 vezes. No entanto, a dificuldade em trabalhar a mistura de reação ainda persiste com o CCP. Este inconveniente foi contornado, e ótimos resultados foram consequidos pelo uso do reagente adsorvido em um suporte inorgânico inerte, no caso alumina /115/.

O reagente adsorvido proporciona um meio de reação particular, capaz de aumentar a reatividade de vários compostos. Assim, a oxidação do colesterol dá um rendimento de 80% em 2.5h, enquanto com CrO_3 /piridina dava somente 64%, juntamente com outros produtos secundários. Além disso, o método de isolamento do produto, antes trabalhoso e susceptível de perdas, se tornou reduzido a uma mera filtração. A reação, de um modo geral, é muito limpa e simples.

Fizemos um teste prévio com lanosterol, e obtivemos

oxidação total após 6h de reação com 75% de rendimento (produto purificado em coluna). Estes resultados foram excelentes, quando comparados a outros métodos de oxidação anteriormente testados /116/ - 24% de rendimento com reagente de Jones, 11% com DMSO/ $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$.

A oxidação do glutinol (Os-3.1) com CCP adsorvido em alumina foi completa após 7h de reação. Por purificação em coluna curta sob pressão, obtivemos o produto Os-3.2 em 74% de rendimento, identificado como D:B-friedoolean-5-en-3-ona 60 por comparação com os dados da literatura.

p.f. $241-241.5^\circ\text{C}$ (Bz:MeOH)

$[\alpha]_D + 31^\circ$ (c = 2.2, CHCl_3)

M^+ m/e 424 (E.55)

Lit/112/ p.f. $244-245^\circ\text{C}$ (CHCl_3 :MeOH)

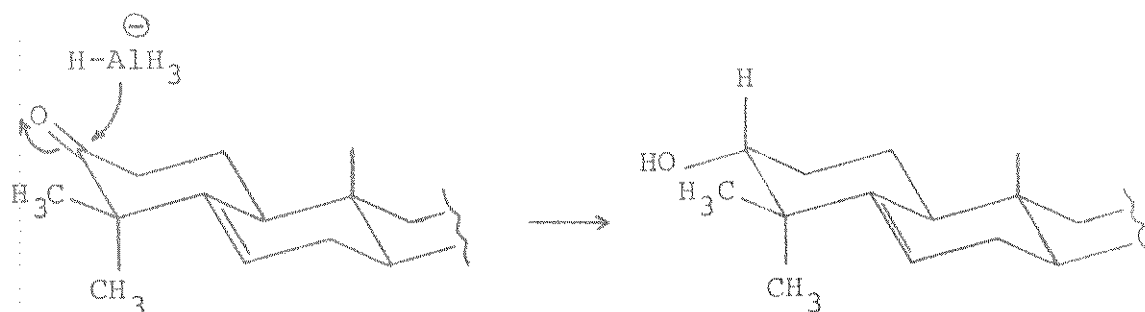
$[\alpha]_D + 31^\circ$ (c = 2.2, CHCl_3)

M^+ m/e 424

O álcool α -equatorial Os-3.3 foi obtido pela redução da cetona 60 com hidreto de lítio e alumínio /117,73/. Tanto a reação com esse reagente metálico quanto aquela com boro hidreto de sódio produzem predominantemente o álcool α , devido ao ataque preferencial do reagente pela face β menos impedida da molécula /73/.

No entanto, de acordo com a literatura, a proporção do álcool α obtida pela reação com LiAlH_4 /113/ é maior que a obtida com NaBH_4 /118/.

A reação com LiAlH_4 foi completa após 2h. O produto,



mostrado por CCD ser uma mistura de 2 álcoois, foi cuidadosamente cromatografado em coluna de sílica. Isolamos assim 2 álcoois, β e α (em ordem de eluição da coluna) na proporção de 0.3:1. As identificações foram feitas por comparações com os dados da literatura e com os do composto Os-3.1, obtido anteriormente.

álcool α - D:B-friedoolean-5-en-3 α -ol 61

p.f. 201-202°C (Bz: MeOH)

$[\alpha]_D + 58.4^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

M⁺ m/e 426

Lit /101/: p.f. 204°C

$[\alpha]_D + 61^\circ$

M⁺ m/e 426

Através de uma reação clássica de acetilação com anidrido acético/piridina, obtivemos o último composto da série, o acetato α Os-3.4, D:B-friedoolean-5-en-3 α -acetóxi 62,

p.f. 234-235°C (Bz: MeOH)

$$[\alpha]_D + 50^\circ \quad (c = 0.6, \text{CHCl}_3)$$

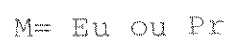
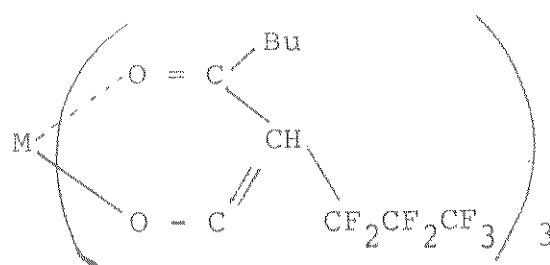
$$M^+ \quad \underline{m/e} \quad 468$$

$$\text{Lit /119/ p.f. } 235-236^\circ\text{C}$$

$$[\alpha]_D + 46^\circ$$

IV - Aplicação de reagentes de deslocamento no estudo de RMN¹H dos derivados do glutinano

Em nossas experiências com reagentes de deslocamento, utilizamos os complexos tris (1,1,1,2,2,3,3-heptafluor-7,7- dimetil-4,6-octadionato) de európio ($\text{Eu}(\text{FOD})_3$) e de praseudímio ($\text{Pr}(\text{FOD})_3$). O primeiro foi usado apenas com o glutinol (Os-3.1), e promove um deslocamento dos sinais de ressonância para campo baixo, enquanto o segundo, usado com os demais compostos, promove deslocamentos dos sinais para campo alto. Estes, principalmente o $\text{Pr}(\text{FOD})_3$, foram escolhidos por serem mais solúveis e mais estáveis em CDCl_3 que o complexo $\text{M}(\text{DPM})_3$ /109/.



Estes reagentes complexam reversivelmente com as funções oxigenadas (eq. 1)



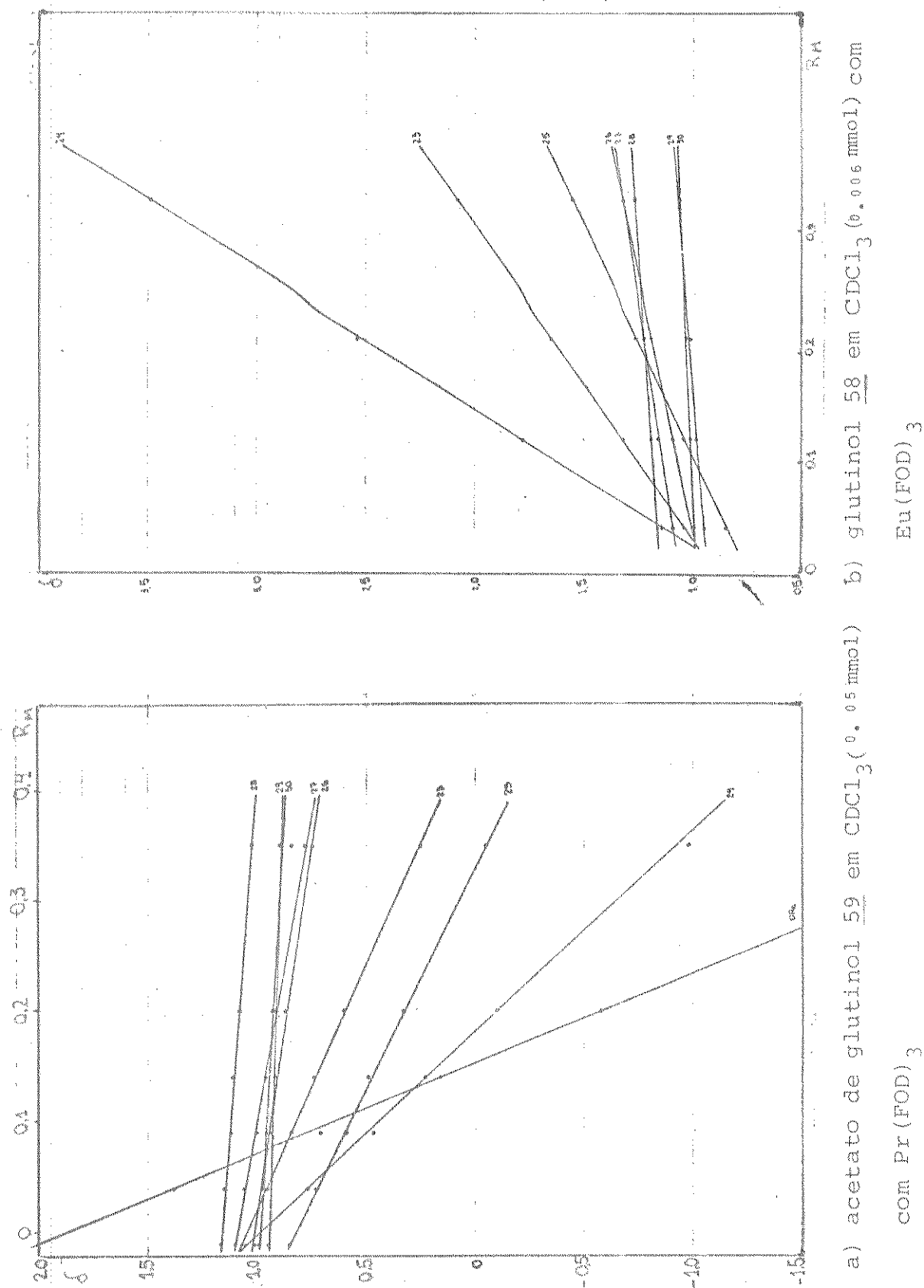
e, num espectro de RMN, nós observamos deslocamentos químicos que são a média entre os valores devidos ao composto livre e ao complexo composto-lantanídeo. Pela adição de maiores quantidades do reagente, o equilíbrio indicado é progressivamente deslocado para a direita, e os $\Delta\delta$ observados são proporcionais à razão molar do reagente para o substrato ($|L|/|S|$). Isto ocorre apenas até um valor limite (predito pela eq. (1)), a partir do qual o deslocamento do substrato independe do lantanídeo /105/.

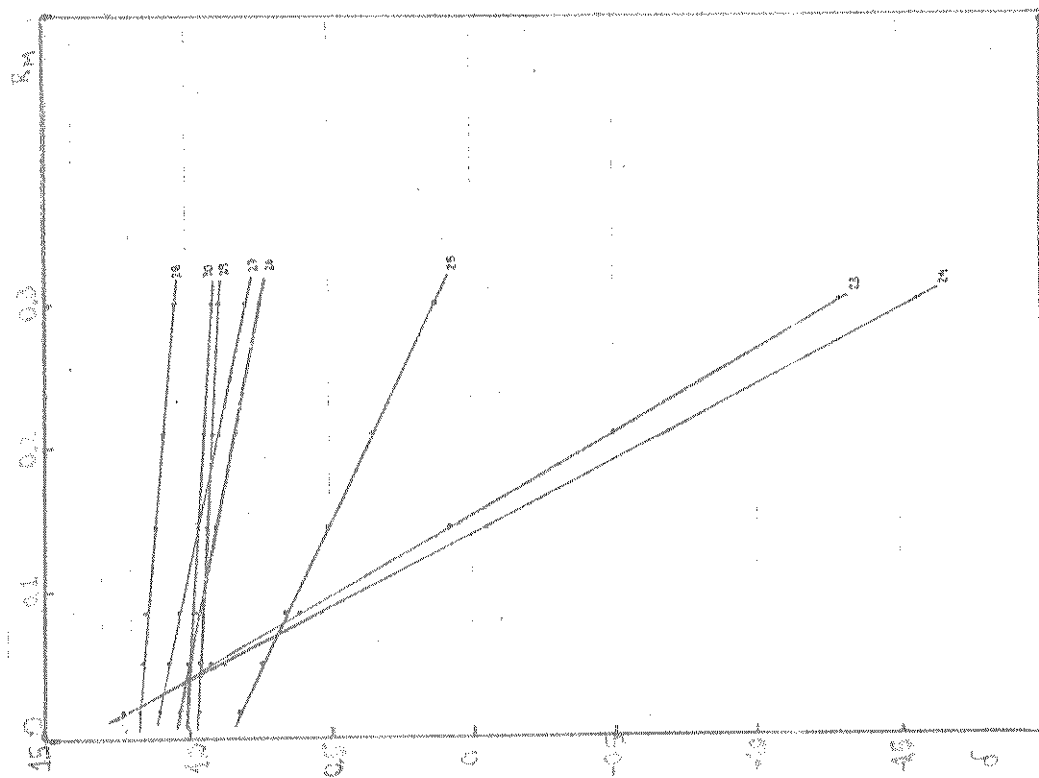
Os espectros de RMN¹H dos triterpenos 59, 60 e 62 foram medidos na presença de várias quantidades de Pr(FOD)₃ (para o composto 58 utilizamos Eu(FOD)₃), e os deslocamentos induzidos dos sinais devidos aos metilas são mostrados graficamente na fig. 17. De um modo geral, os reagentes foram adicionados em quantidades de 2-6 mg por vez, até uma relação molar limite de 0.3 ($|L|/|S|$). As concentrações dos substratos em CDCl₃ são indicadas nas figuras.

Usualmente os gráficos são construídos colocando os deslocamentos induzidos pelos lantanídeos vs a razão molar entre reagente e substrato $|L|/|S|$. Considerando as interações de pseudo-contato, as inclinações das "retas" são então usadas para estimar as posições relativas dos correspondentes prótons, e portanto, ajudar na elucidação das estruturas.

Na realidade, esses deslocamentos químicos observados não são diretamente proporcionais à simples relação $|L|/|S|$ experimental, primeiro porque estas concentrações não podem ser determinadas com tanta precisão quanto os deslocamentos induzidos, e

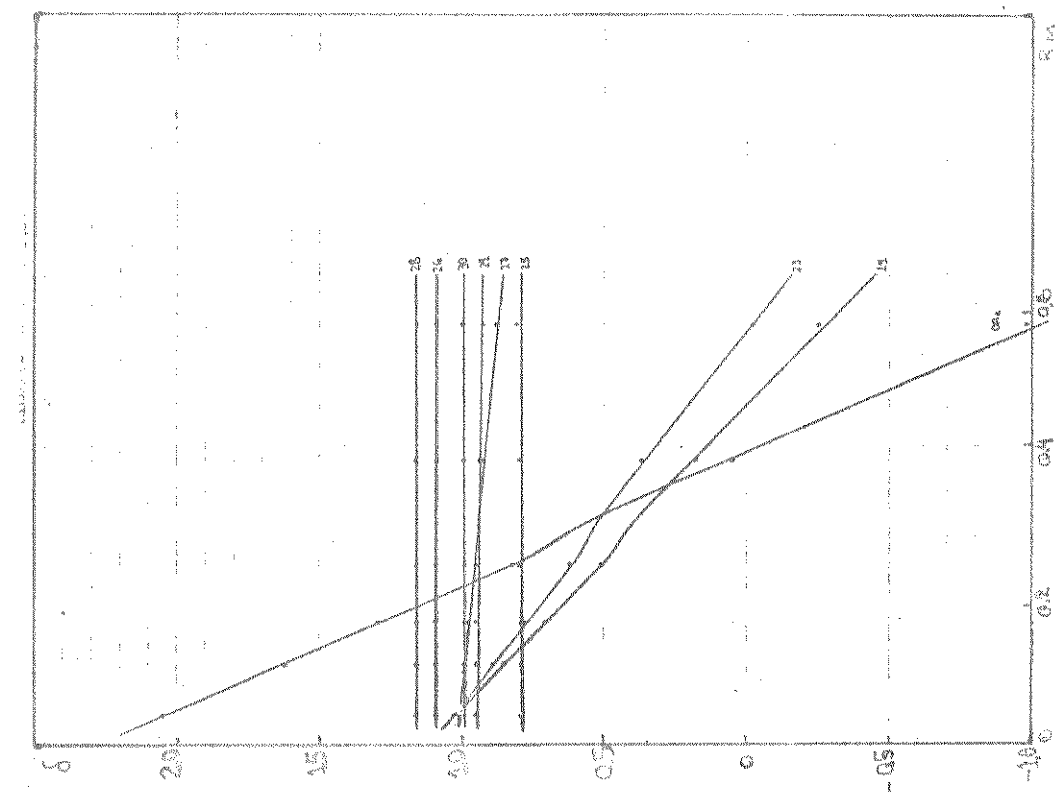
fig.17 - Deslocamentos induzidos pelos lantanídeos nos sinais metilicos de alguns derivados do glutinano.





c) glutinona 60 em CDCl_3 (0.06 mmol)

com $\text{Pr}(\text{FOD})_3$



d) acetato de epiglutinol 62 em CDCl_3 (0.02 mmol)

com $\text{Pr}(\text{FOD})_3$

segundo porque estes dependem também da fração $|LS|/|S|$ do substrato complexado ($|LS|$ é a concentração do substrato complexado LS da eq. 1). Isto acaba conduzindo a gráficos não lineares/120/. Estes e outros fatores foram considerados, resultando na elaboração de uma fórmula que fornece um valor "corrigido" de relação molar, o qual é proporcional à soma dos deslocamentos em cada espectro /120,121/.

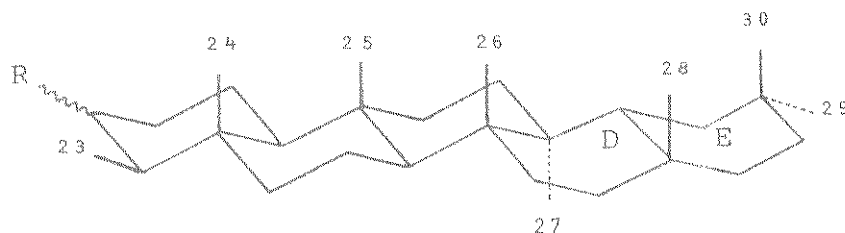
Estes valores "corrigidos" foram usados nos gráficos da fig. 17 e o procedimento para tal correção é detalhadamente descrito na ref. 121.

Nas tabelas X a e b indicamos os valores de deslocamentos químicos dos prótons metílicos dos compostos estudados (RMN¹H em 100 MHz)

- a) sem adição do reagente de deslocamento
- b) na presença deste reagente em relação molar máxima

Os compostos em questão são estruturalmente muito relacionados àqueles do grupo da friedelina, diferindo apenas nos anéis A e B. Estudos detalhados de RMN¹H dos friedelanos e relacionados /109,122,123/ evidenciaram que o íon do metal lantanídico está localizado próximo à face β da molécula, tanto nos casos da friedelina 63 e do acetato de epifriedelanol 64 (0 em β), quanto no caso do acetato de friedelanol 67 (0 em α). Baseados nas conformações dos complexos coordenados, e nos resultados dos experimentos com INDOR, mostraram que os sinais dos prótons metílicos que mais deslocavam eram devidos aos grupos 23,24 e 25 para 63 e

64, e 23, 24 e 27 para 67. Através desses estudos também ficou evidenciado que os compostos com esqueleto do friedelano possuem os anéis D e E em conformação bote-bote /109/.



63 R = =O

64 R = β -OAc (axial)

65 R = β -OH (axial)

66 R = α -OH (equatorial)

67 R = α -OAc (equatorial)

Para os derivados do glutinano, também é bastante coerente supormos que a coordenação do metal se dará sobre a face β , menos impedida, mesmo no caso dos substituintes OAc em α equatorial. Certamente o Me-24 será o mais deslocado.

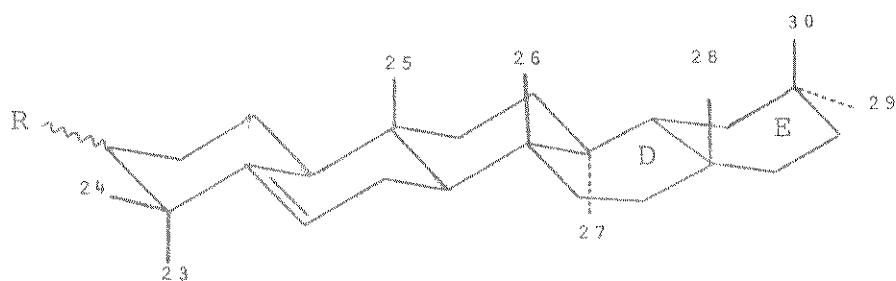
Os experimentos de INDOR, controlando cada um dos singletos na presença de $M(FOD)_3$ em relação molar máxima, não nos permitiram obter informações mais detalhadas.

Apenas com o acetato de glutinol Os-3 na presença de $Pr(FOD)_3$ (E.59 - $R_M = 0.35$) controlando o sinal a $\delta = 0.98$, obtivemos um pequeno pico a $\delta = 0.25$ e vice-versa. O sinal a $\delta = 0.98$, o mais deslocado do espectro (com exceção daquele devido ao metila acetoxílico), é certamente devido ao Me-24, e deve provocar um pico NOE com o grupo metila espacialmente mais próximo, no caso o Me-23. As

sim, o segundo sinal mais deslocado, em $\delta 0.05$, deve ser devido ao metila 25, evidenciando que o sítio de coordenação do metal está sobre a face β , e que os grupos mais afetados são o 24 e o 25.

Infelizmente, controlando os outros sinais, não observamos nenhum pico NOE.

Como vimos, se considerarmos os derivados do glutina no estreitamente relacionados aos friedelanos, inclusive na formação dos anéis D e E, esperaríamos picos NOE metil-metil en



tre os sinais devidos aos grupos 25, 26 e 28.

Vários fatores podem ter influenciado na não detecção desses, entre eles:

- diferenças muito pequenas nos deslocamentos químicos induzidos pelos grupos que apresentam NOE não propiciando condições favoráveis para a experiência de INDOR. Isto pode ser exemplificado para o caso dos friedelanos /109/, ou da β -amirina/108/, onde não se observam picos NOE devido às interações Me-28-30 (friedelanos), Me-23 - Me-24 (β -amirina) ou Me-29 - Me-30 (ambos).

- quantidade muito pequena da amostra. Um experimento com INDOR não é operativo nestas condições /109/. De acordo com a literatura /107/, a concentração ótima do substrato deve ser em torno de 0.1 M. Este foi, sem dúvida, um fator de grande importância no caso do acetato de epiglutanol (sol. 0,04 M).

- ruído do aparelho

De qualquer modo, mesmo não dispondo das informações do INDOR, efetuamos as designações dos sinais em RMN^1H com base nos experimentos com reagentes de pseudo-contato, por comparações com os derivados friedelanos e por comparações dos compostos entre si, como indicado abaixo:

a) Todos os compostos, de Os-3 a Os-3.4, apresentam 3 sinais, em δ 0.95-0.96, 0.99 -1.00 e 1.16-1.17, que praticamente não se alteram pelas adições do reagente $\text{M}(\text{FOD})_3$. Devem ser atribuídos, portanto, aos metilas 28, 29 e 30, que estão bastante distanciados do sítio de coordenação do complexo e não devem ser influenciados por ele. Por analogia aos dados dos friedelanos, relacionamos δ 1.16-1.17 ao Me-28, δ 0.95-0.96 ao Me-29 e δ 0.99-1.00 ao Me-30.

b) Para o caso dos derivados com substituinte em β e para a glutinona, o metal, sem dúvida alguma, coordenará pela face β , provocando maiores deslocamentos no sinal protônico do Me-24. Assim, teremos δ 1.05, 1.14 e 1.23 para esses grupos nos compostos Os-3, Os-3.1 e Os-3.2, respectivamente. Para o acetato em α , Os-3.4, também podemos supor que o metal coordena pela face β (analogia com o acetato de friedelanol/109/, onde se considera que o grupo acetoxila deve estar em β -axial). Portanto, o sinal δ 1.03, que sofre o maior deslocamento, pode ser atribuído ao Me-24. Este

grupo, no caso do álcool em α , Os-3.3, deve estar em situação muito semelhante àquela do álcool em β /62/, e podemos, portanto, considerar seu sinal protônico em δ 1.14.

c) Com base na experiência de INDOR com o acetato de glutinol Os-3, podemos considerar os sinais devidos aos grupos 25 e 23 como o segundo e o terceiro mais deslocados do espectro (E.59), respectivamente. Assim teríamos δ 1.07 para o CH_3 - 23 e δ 0.85 para o CH_3 -25. Com os demais compostos, é mais provável que o complexo induza um deslocamento maior no CH_3 -23 que no CH_3 -25 (proximidade relativa), e assim podemos atribuir os sinais em δ 1.04 e 0.85 (Os-3.1), δ 1.23 e 0.82 (Os-3.2), δ 1.00 e 0.79 (Os-3.3) e δ 1.03 e 0.79 (Os-3.4) para os metilas 23 e 25, respectivamente.

d) Os demais sinais devidos aos grupos 26 e 27 foram atribuídos com base nas distâncias relativas aos sítios de coordenação do metal, e por comparações com os dados registrados para a friedelina e derivados. Aqui, como foi observado para o acetato de friedelanol /109/, é coerente supormos que os prótons do Me-27 no acetato de epiglutinol devem ser mais deslocados que aqueles do Me-26.

Todos os dados são apresentados na Tabela XI, juntamente com os dos derivados friedelanos.

A semelhança dos dados dos grupos Me-28, 29 e 30 entre os derivados glutinanos e friedelanos apoiam a suposição de termos os anéis D e E em conformação bote-bote, mas maiores evidências podem ser dadas pela análise dos espectros de RMN¹³C, como mostrado adiante.

TABELA XI - Atribuições dos picos devidos aos grupos metilas nos compostos glutinênicos e comparação com os derivados dos análogos da friedelina

	Me-23	Me-24	Me-25	Me-26	Me-27	Me-28	Me-29	Me-30
Os-3(59)	1.07	1.05	0.85	1.01	1.10	1.17	0.95	0.99
64	0.81	0.93	0.86	1.00	1.00	1.17	0.94	1.00
Os-3.1(58)	1.04	1.14	0.85	1.00	1.09	1.16	0.95	0.99
Os-3.2(60)	1.23	1.23	0.82	1.03	1.10	1.17	0.96	1.00
63	0.88	0.73	0.88	1.01	1.05	1.18	0.97	1.01
Os-3.3(61)	1.00	1.14	0.79	1.09	0.95	1.16	0.95	0.99
Os-3.4(62)	1.03	1.03	0.79	1.09	1.01	1.17	0.95	0.99
67	0.75	0.83	0.83	0.99	1.01	1.17	0.94	0.99

V - Análise dos espectros de RMN¹³C de derivados glutinânicos

A utilidade da espectroscopia de RMN¹³C na caracterização de produtos naturais é amplamente reconhecida, não somente para a elucidação das estruturas de compostos novos, como também para a identificação de compostos conhecidos a partir de fontes novas /124,125/.

Um grande número de publicações recentes dão detalhes acerca dos espectros de RMN¹³C de várias classes de triterpenos /125,126/, no entanto nenhuma referência foi feita quanto a estes

estudos em derivados de glutinanos.

Dos friedelanos, que são estruturalmente relacionados aos glutinanos, temos registro da análise detalhada dos espectros de RMN¹³C da friedelina 63 /127,128,132/, de algumas friedelanonas /127/, e também dispomos dos dados para os acetatos de friedelanol 67 e de epifriedelanol 64, mas sem atribuições /128/. É interessante notar que para a friedelina existe uma grande divergência entre os dados apresentados por SULTANBAWA e colaboradores /127/ e os demais /128,132/. Usaremos aqui aqueles publicados por BEIERBECK /132/.

Utilizamos 3 compostos da série de derivados glutinanos para a análise dos espectros de RMN¹³C, a saber glutinona(alnusona) 60, e os acetatos de glutinol 59 e de epiglutinol 62.

As atribuições foram feitas através de comparações com os friedelanos relacionados 63, 64 e 67, e por aplicação dos parâmetros de adição semiempíricos formulados por BEIERBECK et al/129-132/.

Estes parâmetros de adição são discutidos brevemente a seguir:

Os deslocamentos químicos de ¹³C são uma função sensível da vizinhança química do núcleo de carbono, particularmente de sua relação estrutural com substituintes β - e γ -. Os efeitos desses substituintes são aproximadamente aditivos /130/, mas aqueles devidos ao carbono α são não aditivos, portanto é mais correto usar as ressonâncias dos carbonos primário no etano, secundário no propano, terciário no isobutano e quaternário no neopentano como referências para os carbonos 1°(P), 2°(S), 3°(T) e 4°(Q), respectivamente.

Como base para os parâmetros de proteção do carbono $-\beta$,

foi proposto o uso de interações "gauche", visto que elas representam a descrição mais simples da relação espacial entre o núcleo de carbono e seu carbono $-\beta$ /129/.

Assim, aos valores de referência foram adicionados incrementos associados às interações "gauche" hidrogênio-carbono (HC) e carbono-carbono (CC) exocíclicas, e às interações não ligantes " γ - gauche" e " δ syn" - axiais, γ (C) e δ (C) /130/. No entanto, foi verificado que o efeito " γ - gauche" não está associado ao grupo γ em si, mas sim com a eliminação do hidrogênio β e, consequentemente, com a eliminação de uma contribuição HC. Esta última, por sua vez, está diretamente relacionada às interações hidrogênio-hidrogênio 1,3-diaxiais /132/. Assim, os quatro parâmetros descritos acima foram redefinidos como sendo as contribuições a partir de interações hidrogênio-hidrogênio 1,3-diaxiais (HC), carbono-carbono "gauche" (CC) exocíclicas e " δ syn"-axiais /132/.

Por analogia, a derivação dos deslocamentos químicos dos carbonos heterosubstituídos podem ser baseadas nas ressonâncias dos substratos CH_3X , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{X}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHX}$ e $(\text{CH}_3)_3\text{CX}$, respectivamente (X = heterosubstituintes). Quanto aos efeitos $-\beta$ do heterosubstituinte, também podem ser considerados como dependentes do número de interações "gauche" hidrogênio-heterosubstituinte (HX) e carbono-heterosubstituinte (CX) /130,132/. Assim, para um grupo hidroxila terciário (T), os parâmetros OC, HO e CO são associados às interações "gauche" oxigênio-carbono, hidrogênio-oxigênio e carbono-oxigênio. O parâmetro γ é usado tanto para interações " γ - gauche" como para as " γ - anti" desde que o grupo hidroxila " γ - anti" seja equatorial. O parâmetro δ se refere às interações " δ - syn" - axiais /132/.

Os outros parâmetros de interesse para nossas análises

ses são aqueles referentes à carbonila e à ligação olefínica.

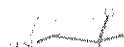
O parâmetro C é a referência para o carbono carbonílico. Existe somente um parâmetro β , mas 2 parâmetros γ , " γ - syn" e " γ - anti". Já que o carbono carbonílico não está ligado a hidrogênio, as únicas interações hidrocarboneto que podem ocorrer são as CC exocíclicas. O incremento β é adicionado à ressonância de todos os carbonos adjacentes, e as interações " γ anti" podem ocorrer tanto para os carbonos exocíclicos quanto para os endocíclicos /132/.

Os parâmetros T e Q são as referências para os carbonos sp^2 terciários e quaternários, respectivamente. Se a cada um deles estiver ligado um segundo C sp^2 quaternário, eles sofrerão um incremento nos valores das ressonâncias, indicado por R . Aqui, como para a carbonila, existe somente um parâmetro β e dois γ , devidos às interações " γ - syn" e " γ - anti". Neste caso, no entanto, os parâmetros β e γ não são aplicados a carbonos quaternários sp^3 e sp^2 /132/.

Todas as definições dos parâmetros de referências e estruturais, assim como seus valores numéricos, são apresentados na tabela XII.

Os parâmetros hidrocarboneto, hidroxila e carbonila foram elaborados a partir de anéis de seis membros na conformação em cadeira, e somente são válidos neste caso. Os parâmetros olefina são válidos apenas para anéis de 6 membros /132/. Como a ligação dupla provoca uma deformação no anel (semi-cadeira), temos que considerar a dependência geral dos parâmetros β do ângulo diedro ϕ , a saber $2 \times HC \times \cos \phi$ e $2 \times CC \times \cos \phi$ /130/. Assim, as interações "gauche" carbono-carbono exocíclicas em ângulos próximos a 0° entram com 2 contribuições CC, enquanto aquelas em ângu

TABELA XII - Definições de parâmetros e valores numéricos

HIDROCARB.	ALCOOL	AMINA	CETONA	OLEFINA
P 7.44 0.42 	T 60.99 0.72 	P 28.82 0.63 	U 212.19 0.54 	T 125.99 0.93 
S 17.62 0.32 	OC 1.97 0.34 	S 38.29 0.56 	B 14.70 0.41 	Q 137.80 0.59 
T 24.17 0.47 	HO 4.41 0.18 	T 43.89 0.40 	Y₁ -0.22 0.73 	R -8.47 0.97 
Q 26.53 0.86 	CO 2.28 0.22 	Q 45.67 0.96 	Y₂ 5.16 0.42 	B 3.86 0.47 
HC 4.55 0.10 	γ -1.28 0.23 	HN 4.01 0.26 		γ₂ 1.41 0.53 
CC 1.35 0.14 	δ 2.86 0.53 	CN 1.21 0.48 		γ₃ 5.23 0.49 
δ 2.56 0.39 		HNC -0.80 0.45 		
		γ -2.04 0.33 		

los $\phi \geq 90^\circ$ são ignoradas.

Nas tabelas XIII, XIV e XV apresentamos os parâmetros de referência, os de hidrocarbonetos e os dos grupos funcionais para cada carbono dos compostos estudados 60, 59 e 62, respectivamente. Ao lado temos o δ calculados, os δ experimentais e os $\Delta\delta$ observados. Também incluímos os dados registrados para os respec

TABELA X - Deslocamentos químicos em RMN¹H dos grupos metílicos nos compostos 59 a 62 (δ , ppm)

a)	β -OAc Os-3 <u>59</u>	β -OH Os-3.1 <u>58</u>	cetona Os-3.2 <u>60</u>	α -OH Os-3.3 <u>61</u>	α -OAc Os-3.4 <u>62</u>
	(E.58)	(E.60)	(E.62)	(E.64)	(E.65)
	0.85	0.85	0.82	0.79	0.79
	0.95	0.95	0.96	0.95(2)	0.95
	0.99	0.99		0.99	0.99
	1.01	1.00	1.00	1.00	1.01
	1.05	1.04	1.03		1.03(2)
	1.07	1.09	1.10	1.09	1.09
	1.10	1.14		1.14	
	1.17	1.16	1.17	1.16	1.16
	2.00		1.23(2)		2.05
b)	(E. <u>59</u>)	(E.61)	(E.63)		(E.66)
	-2.57	1.06(2)	-1.56		-0.98
	-0.98	1.27	-1.29		-0.25
	-0.05	1.32(2)	0.13		-0.02
	0.25	1.55	0.74		0.81
	0.78	2.08	0.79		0.88
	0.84	3.49	0.89		0.93
	0.89(2)		0.91		1.00
	1.02		1.04		1.09
					1.16
	$R_M = 0.35^+$	$R_M = 0.33^{++}$	$R_M = 0.30^+$		$R_M = 0.57^+$

 $^+ |Pr(FOD)_3| / |S|$
 $^{++} |Eu(FOD)_3| / |S|$

tivos derivados friedelanos, para comparações.

O uso desses parâmetros para o cálculo dos deslocamentos químicos de ^{13}C pode ser demonstrado através de alguns exemplos.

O C 11 em qualquer um desses compostos estará envolvido apenas com os parâmetros de hidrocarbonetos, já que está suficientemente distanciado da insaturação C 5 - C 6 e dos heterosubstituintes para ser influenciado por eles. É um carbono secundário, portanto o parâmetro de referência é S (17.62 ppm). A esse valor se somam 3 contribuições HC, provenientes das interações hidrogênio-hidrogênio 1,3-diaxiais, a saber $\text{H}_a - \text{C} 11 - \text{C} 9 - \text{C} 8 - \text{H}_a$, $\text{H}_a - \text{C} 11 - \text{C} 9 - \text{C} 10 - \text{H}_a$ e $\text{H}_e - \text{C} 11 - \text{C} 9 - \text{C} 25 - \text{H}$, e uma contribuição CC, devido à interação "gauche" carbono-carbono exocíclica C 12 - C 11 - C 9 - C 25. Portanto, temos $17.62 + (3 \times 4.55) + 1.85 = 33.12$ ppm como δ calc. O cálculo do deslocamento para o C 25 exemplifica o uso do parâmetro δ para hidrocarboneto. Este carbono sofre uma desproteção adicional de 2.56 ppm devido à interação " δ -syn"-axial C 25 - C 9 - C 8 - C 14 - C 26.

O deslocamento do C 1 no caso da glutinona 60 não sofre nenhuma contribuição dos parâmetros de hidrocarboneto, mas é afetado por contribuições γ tanto da carbonila em C 3 quanto da olefina em C 5 - C 6. Assim, o δ calc. será 17.62 (S) + 5.16 (γ carbonila) + 5.23 (γ olefina) = 28.01 ppm. Este carbono no acetato de epiglutinol 62 (3α -OAc, eq.) sofrerá o mesmo efeito da insaturação C5-C6, mas será protegido em 1.28 ppm pela insaturação γ com o oxigênio em C 3. Também sofrerá uma desproteção adicional devida à interação hidrogênio-hidrogênio 1,3-diaxial $\text{H}_a - \text{C} 1 - \text{C} 2 - \text{C} 3 - \text{H}_a$.

Para o cálculo do deslocamento químico de ^{13}C do C

primário 24 na glutinona 60, devemos considerar 2 contribuições HC, provenientes das interações hidrogênio-hidrogênio 1,3-diaxiais H-C 23 - C 4 - C 24 - H, e duas contribuições γ_s , devidas às interações " γ - syn" da carbonila e da insaturação C 5 - C 6. Assim, teremos um δ calc. = $7,44 + (2 \times 4.55) + (-0.22) + 1.41 = 17.73$ ppm. Para os acetatos de glutinol 59 e de epiglutinol 62, a contribuição dos parâmetros hidroxila será de -1.28 ppm devida à interação " γ -gauche" com o oxigênio.

O cálculo do deslocamento de ^{13}C para o carbono 2 no acetato de glutinol 59 exemplifica a utilização dos parâmetros hidroxila HO e CO. Assim, as interações "gauche" $\text{H}_e - \text{C } 2 - \text{C } 3 - \text{O}_a$ e $\text{C } 1 - \text{C } 2 - \text{C } 3 - \text{O}_a$ contribuem com 4.41 ppm (HO) e 2.28 ppm (CO), respectivamente, no valor de δ C 2. Para o carbono 4 neste mesmo composto temos, além das 4 contribuições CC indicadas, devidas às interações "gauche" carbono-carbono exocíclicos C 24 - C 4 - C 5 - C 6 (contada 2 x porque o ângulo é próximo a 0°), C 23 - C 4 - C 5 - C 10 e C 24 - C 4 - C 3 - C 2, 2 interações "gauche" CO, C 24 - C 4 - C 3 - O_a e C 5 - C 4 - C 3 - O_a , que contribuem com um incremento de (2×2.28) ppm.

É importante salientar aqui que os deslocamentos calculados para os acetatos 59 e 62 foram primeiramente baseados nos parâmetros para hidroxila, e os valores obtidos foram depois corrigidos para acetato, com base nos dados δ OH - δ OAc fornecidos por WEHRLI et al /125,133/.

A aplicação dos parâmetros de adição formulados por BEIERBECK /132/, juntamente com as outras informações provenientes dos espectros, nos permitiram a atribuição de todos os carbonos dos anéis A, B e C dos 3 compostos.

Certas divergências entre os deslocamentos químicos

Tabela XIII - Deslocamentos químicos de ^{13}C e parâmetros estruturais da glutinona 60. Comparações com friedelina 63

Carbono	Parâmetros hidrocarboneto			Outros		$\delta_{\text{calc.}}$	$\delta_{\text{exp.}}$ (E.67)	$\Delta\delta$ $\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp.}}$	$\delta_{\text{friedelina}}$ (ppm)
	HC	CC	δ	C=O	C=C				
1 S	0	0	0	$\gamma\alpha$	$\gamma\alpha$	28.0	28.2	- 0.2	22.3
2 S	1	0	0	β	-	36.9	34.5	2.4	42.2
3 C	0	1	0	-	-	214.0	215.1	- 1.1	213.0
4 Q	0	4	0	β	-	48.6	49.9	- 1.3	58.2
5 Qsp ²	0	3	0	-	-	143.4	142.2	1.2	41.5
6 Tsp ²	0	0	0	-	R	117.5	121.2	- 3.7	41.3
7 S	0	0	0	-	β	21.5	23.6	- 2.1	18.3
8 T	2	5	0	-	γS	43.9	46.9	- 3.0	53.1
9 Q	0	6	0	-	γS	39.0	38.0	1.0	37.5
10 T	3	3	0	-	β	47.2	50.6	- 3.4	59.5
11 S	3	1	0	-	-	33.1	34.1	- 1.0	35.6
12 S	2	1	0	-	-	28.6	30.3	- 1.7	30.5
13 Q	0	8	0	-	-	41.3	38.9	2.4	39.7
14 Q	0	7	0	-	-	39.5	37.9	1.6	38.3
15 S							31.9		32.5
16 S							35.9		36.0
17 Q							30.1		30.0
18 T							43.1		42.8
19 S							35.0		35.4
20 Q							28.5		28.2
21 S							39.3		39.3
22 S							33.1		32.8
23 P	2	0	0	$\gamma\alpha$	$\gamma\alpha$	26.9	24.4	2.5	6.9
24 P	2	0	0	γS	γS	17.7	18.3	- 0.6	14.7
25 P	1	0	1	-	-	14.6	15.6	- 1.0	18.0
26 P							19.3		18.7
27 P							21.5		20.3
28 P							32.3		32.1
29 P							31.9		31.8
30 P							35.0		35.0

TABELA XIV - Deslocamentos químicos de ^{13}C e parâmetros estruturais do acetato de glutinol 59. Comparações com o acetato de epifriedelanol 64

Carbono	Parametros hidrocarboneto			Outros		$\delta_{\text{calc.}}$	$\delta_{\text{exp.}}$ (E.68)	$\Delta\delta$ ($\delta_{\text{calc.}} - \delta_{\text{exp.}}$)	$\delta_{\text{acetato de epifriedelanol}}$
	HC	CC	δ	C=C	OH				
1 S	0	0	0	γ_a	γ	22.6	25.0	-2.4	74.5
2 S	1	0	0	-	HO, CO	26.9	28.2	-1.3	
3 T-OH	2	1	0	γ_a	OC(3)	86.1	78.3	7.8	
4 Q	0	4	0	-	CO(2)	36.5	34.4	2.1	
5 Qsp ²	0	3	0	-	γ	143.1	141.5	1.6	
6 Tsp ²	0	0	0	R	-	117.5	119.7	-2.2	
7 S	0	0	0	β	-	21.5	23.3	-1.8	
8 T	2	5	0	γ_s	-	43.9	47.1	-3.2	
9 Q	0	6	0	γ_s	-	39.0	38.8	0.2	
10 T	3	3	0	β	-	47.2	49.6	-2.4	
11 S	3	1	0	-	-	33.1	30.9	2.2	39.7
12 S	2	1	0	-	-	28.6	28.9	-0.3	
13 Q	0	8	0	-	-	41.3	38.8	2.5	
14 Q	0	7	0	-	-	39.5	37.7	1.8	
15 S							31.9		
16 S							35.8		
17 Q							30.1		
18 T							42.9		
19 S							34.4		
20 Q							28.0		
21 S							37.9		39.3
22 S							32.9		32.9
23 P	3	0	0	γ_a	-	26.3	24.9	1.4	11.3
24 P	3	0	0	γ_s	γ	22.2	19.3	2.9	15.8
25 P	1	0	1	-	-	14.6	15.8	-1.2	18.3
26 P							18.3		18.6
27 P							20.9		20.1
28 P							31.9		32.1
29 P							31.9		31.8
30 P							34.4		35.0
OCOCH ₃							21.1		21.3
OCOCH ₃							170.6		170.4

TABELA XV - Deslocamentos químicos de ^{13}C e parâmetros estruturais do acetato de epiglutinol 62. Comparações com o acetato de friedelanol 67

Carbono	Parâmetro hidrocarboneto			Outros		$\delta_{\text{calc.}}$	$\delta_{\text{exp.}}$ (E.70)	$\Delta\delta$ ($\delta_{\text{calc.}} - \delta_{\text{exp.}}$)	$\delta_{\text{acetato de friedelanol}}$
	HC	CC	δ	C=C	OH				
1 S	1	0	0	$\gamma\alpha$	$\gamma\alpha$	33.6	29.9	3.7	75.1
2 S	1	0	0	-	HO(2)	28.0	26.5	1.5	
3 T-OH	2	1	0	$\gamma\alpha$	OC(2)	84.1	78.7	5.4	
4 Q	0	4	0	-	CO(2)	35.5	34.6	0.9	
5 Qsp ²	0	3	0	-	$\gamma\alpha$	143.1	143.3	-0.2	
6 Tsp ²	0	0	0	R	-	117.5	120.1	-2.6	
7 S	0	0	0	β	-	21.5	23.4	-1.9	39.8
8 T	2	5	0	γS	-	43.9	47.1	-3.2	
9 Q	0	6	0	γS	-	39.0	40.1	-1.1	
10 T	3	3	0	β	-	47.2	49.8	-2.6	
11 S	3	1	0	-	-	33.1	34.6	-1.5	
12 S	2	1	0	-	-	28.6	29.6	-1.0	
13 Q	0	8	0	-	-	41.3	38.8	2.5	
14 Q	0	7	0	-	-	39.5	37.7	1.8	
15 S							31.9		
16 S							35.9		
17 Q							30.2		
18 T							42.9		
19 S							34.6		
20 Q							28.1		
21 S							39.2		39.3
22 S							33.0		32.9
23 P	2	0	0	$\gamma\alpha$	γ	20.5	22.5	-2.0	9.9
24 P	3	0	0	γS	γ	22.2	24.2	-2.0	14.5
25 P	1	0	1	-	-	14.6	16.2	-1.6	18.2
26 P							18.3		18.6
27 P							19.5		20.2
28 P							32.3		32.1
29 P							31.9		31.8
30 P							34.9		35.0
OCOCH ₃							21.2		21.3
OCOCH ₃							170.4		170.5

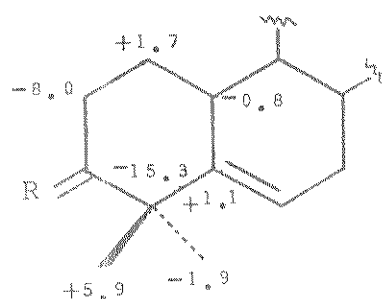
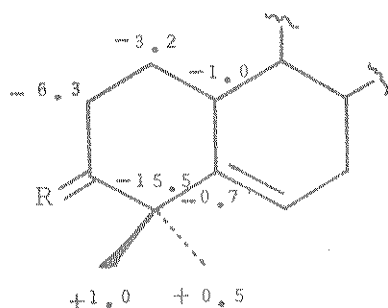
calculados e os observados podem ser devidas às modificações conformacionais produzidas nos anéis A e B pela insaturação C5 - C6, visto que as correções para ângulos diedros diferentes de 60° somente foram feitas quando estes eram muito próximos a 0° , ou então $\geq 90^\circ$.

Algumas informações adicionais úteis foram obtidas pela análise dos espectros FDFE (E.67, 68) (Frequência de desacoplamento Fora de Faixa) . Neste caso, cada carbono é caracterizado por um acoplamento residual apenas com o próton diretamente ligado, e a multiplicidade observada é uma função do número destes prótons /125/. No entanto, o espectro FDFE de compostos triterpenicos na região de campo alto apresenta um acúmulo de picos muitas vezes superpostos, que dificultam uma diferenciação inequívoca das multiplicidades. Nestas situações, as medidas de relaxação podem oferecer um método alternativo para a designação dos sinais. Informações valiosas podem ser obtidas através de um espectro de inversão-recuperação ("inversion-recovery"), como aquele registrado para o acetato de glutinol (E. 69). Pela escolha apropriada das condições de operação, as ressonâncias dos carbonos metínicos e metilênicos aparecem positivas, enquanto os carbonos quaternários e os metílicos, com tempo de relaxação maior, aparecem como linhas invertidas. No espectro 69 observamos nitidamente 6 sinais negativos agudos, relativos aos carbonos quaternários C 4 (sp^2), C 9, C 13, C 14, C 17 e C 20. Os picos devidos aos carbonos metílicos aparecem como linhas pequenas e largas, podendo ser encobertos por outros sinais. Aspectos teóricos e aplicações deste método de relaxação spin-reteículo são discutidos na ref. 125.

Para os carbonos dos anéis D e E, verificamos uma per

feita correlação entre os dados experimentais e aqueles registrados para os derivados friedelanos. Como já indicado, experimentos de INDOR em RMN¹H /109/ e estudos de raio-X /134/ com os triterpenos tipo friedelina evidenciaram uma conformação bote - bote para esses anéis. A semelhança entre os resultados de carbono-13 para as 2 séries de compostos vêm, portanto, reforçar a suposição de também termos esta conformação para os derivados glutinânicos.

Os dados das tabelas XIII, XIV e XV nos permitiram o cálculo dos incrementos ($\Delta\delta$) característicos no anel A destes compostos pela modificação da substituição no C 3. Assim, temos



VI - Análise dos espectros de massa de derivados glutinânicos

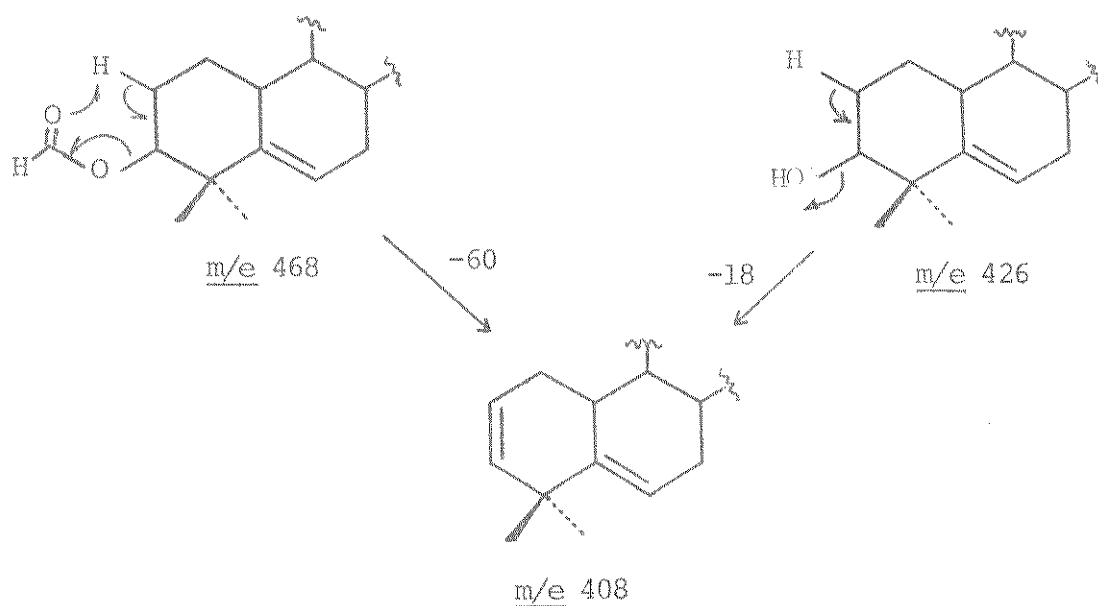
Como já citado, uma análise detalhada dos espectros de massa de compostos triterpênicos saturados e insaturados foi feita por DJERASSI e colaboradores /61, 69/, indicando que, em geral, o comportamento de fragmentação destes compostos pode ser caracteristicamente controlado pela presença de uma insaturação no

clear. No entanto, não encontramos na literatura referências quanto ao estudo de triterpenos Δ^5 -insaturados, como é o caso dos derivados glutinânicos em questão.

Assim, através da análise dos EM destes compostos, sugerimos um modelo de fragmentação com o apresentado no esquema IV.

Os 3 compostos analisados, Os-3 (D:B-friedoolean-5-en-3 β -acetôxi) (E.51), Os-3.1 (D:B-friedoolean-5-en-3 β -ol) (E.53) e Os-3.2 (D:B-friedoolean-5-en-3-ona) (E.55) apresentam pico base em m/e 274 e seus EM são muito semelhantes em relação aos picos de massas mais baixas. Pequenas variações são verificadas apenas nas intensidades relativas.

Em relação aos picos de massas mais altas, o acetato Os-3 e o álcool Os-3.1 mostram as típicas perdas de ácidos acético e de água, através de um rearranjo tipo MacLafferty para o acetato /50/ e de uma eliminação -1,2 para o álcool /59/. Os 3 compostos apresentam perda de 15 u.m.a., correspondente a $M^+ - CH_3$.

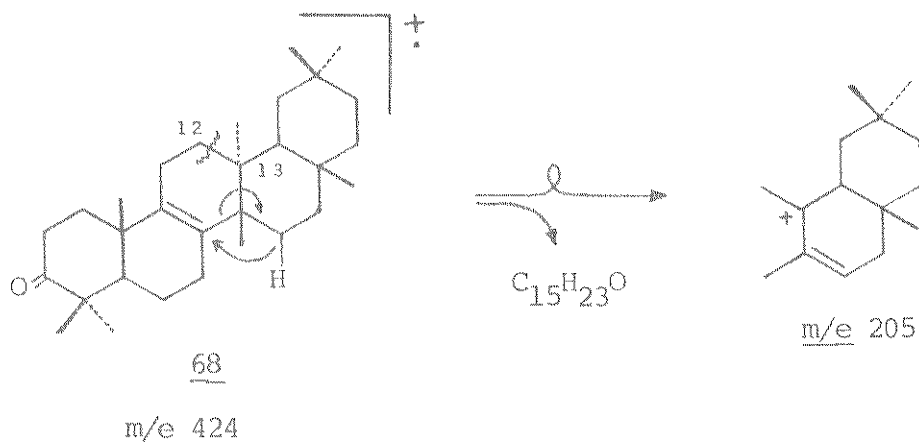


A fragmentação mais característica destes compostos pode ser melhor descrita pela clivagem do anel B, envolvendo a ligação dupla num processo retro Diels-Alder, gerando as espécies i para o acetato e o álcool, com m/e 134, j para a cetona, com m/e 150, e l para os 3 casos, com m/e 274 (Esquema IV).

O pico base em m/e 274 evidencia que nestes compostos a carga permanece com a espécie monoinsaturada, o que não é muito comum, pois normalmente a carga se localiza no dieno, que é então a espécie responsável pelo pico base.

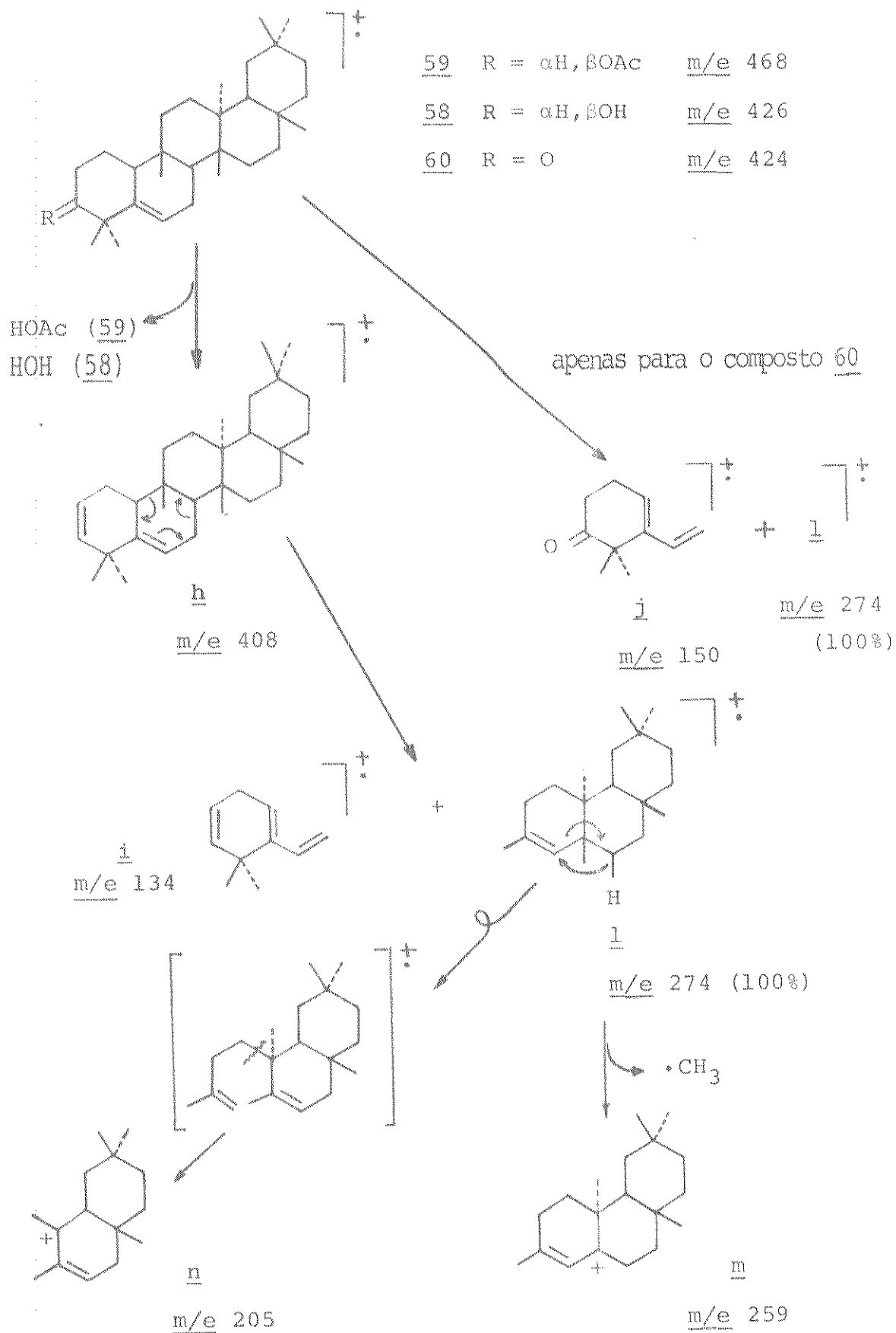
Um pico relativamente intenso em m/e 259 para os 3 compostos pode ser atribuído à espécie m, devido à perda de um grupo metila. A perda do Me-26 deve ser mais provável, pois gera um cátion alílico bastante estabilizado.

DJERASSI et al/61/ sugeriram uma fragmentação para a isomultifluorenona 68 envolvendo a transferência de um hidrogênio,



seguida pela clivagem da ligação 12-13 alilicamente ativada, resultando assim num cátion estabilizado com m/e 205. Comparando os anéis C, D e E da isomultifluorenona com o íon em m/e 274, podemos também sugerir um mecanismo análogo, resultando na espécie n com m/e 205, proposta que consideramos bastante plausível, pois os espectros de massa dos 3 derivados estudados mostraram este pico.

ESQUEMA IV - Fragmentações propostas para alguns derivados glutinanos



PARTE EXPERIMENTAL

- I - Materiais e métodos
- II - Coleta do material
- III - Obtenção dos extratos
- IV - Tratamento dos extratos e isolamento dos consti
tuintes
- V - Constituintes da parte aérea de Gnaphalium
spathulatum e seus derivados
- VI - Os -3 e derivados. Reações, propriedades físi
cas e dados espectroscópicos

I - Materiais e métodos

1. As cromatografias em coluna foram feitas utilizan
do-se sílica gel (0,06 - 0,20 mm) da Merck A.G. Darmstadt, Alema
nha. As dimensões das colunas variavam de acordo com a quantida
de de material empregada.

As eluições foram feitas com solventes orgânicos
em ordem crescente de polaridade e as frações coletadas, cujos vo
lumes dependiam da quantidade de material e da complexidade da
mistura, foram concentradas à pressão reduzida em evaporador rota
tório. Frações semelhantes por CCD foram reunidas.

Para purificação dos compostos isolados foi utili
zada, na maior parte das vezes, uma coluna curta sob pressão de
N₂ /135/ com sílica G ou H (Merck A.G.). Nesta coluna ($\phi_i = 2,6$
cm e altura total 35,5 cm) o adsorvente era colocado de modo a

perfazer um total de 14 cm após o empacotamento. Os melhores eluentes, quando misturas de solventes eram utilizadas, eram aqueles nos quais a proporção do componente mais polar era reduzida à metade em relação ao ideal para uma boa separação em CCD.

2. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas utilizando-se sílica gel 60 G ou HF₂₅₄ da Merck A.G., suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm de espessura, sobre placa de vidro de 5 x 20, 10 x 20 ou 20 x 20 cm, utilizando-se um aparelho Quickfit. Para cromatografia em camada espessa (CCE) utilizou-se sílica gel 60 PF_{254,366}, com espessura de 1 mm. Para os testes em camada delgada com sílica impregnada com AgNO₃ utilizou-se uma solução 15% deste sal, seguindo-se os métodos normais de preparação, como já indicado.

As revelações das placas foram obtidas por irradiação com uma lâmpada ultra violeta em 254 e 366 nm e/ou em cuba de vapor de iodo. Reveladores específicos para terpenóides, como ácido fosfórico: vanilina ou anisaldeído: ácido acético: ácido sulfúrico /38 c,d / , que coram caracteristicamente com esses tipos de compostos, também foram frequentemente utilizados.

3. Os critérios de pureza adotados foram nitidez do ponto de fusão, observação de uma única mancha em CCD com diversos sistemas de desenvolvimento e/ou um único pico em cromatografia gasosa.

4. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Mettler FP 52 (com registrador automático FP 5), instalado em um microscópio Carl Zeiss.

5. Os valores de rotação óptica ($[\alpha]_D$) foram determi

nados em polarímetro fotoelétrico da Carl Zeiss (precisão 0,005), com lâmpada de Na(raia D), em clorofórmio para espectroscopia (Merck).

6. Os espectros de absorção no infravermelho (IV, cm^{-1}) foram feitos num espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 337, em pastilhas de KBr com cerca de 1% da amostra ou em filmes sobre células de KBr ou NaCl. As absorções em 1601 e 1028 cm^{-1} de um filme de poliestireno foram utilizadas como referências.

7. Os espectros de absorção no ultra violeta (UV, λnm) foram feitos num espectrofotômetro Zeiss modelo DMR-21, em etanol ou metanol para espectroscopia (Merck).

8. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) foram feitos num instrumento da Varian Associates, modelo T-60. Os solventes utilizados foram tetracloreto de carbono e clorofórmio deuterado, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram dados em unidades δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As letras s, d, t, m e l foram usadas para designar bandas simples, dupla, tríplice, múltipla e larga, respectivamente.

Os espectros de RMN^1H a 100 MHz foram obtidos num instrumento da Varian Associates, modelo XL-100-1S-FT. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado.

9. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN^{13}C) foram obtidos num instrumento da Varian Associates, modelo XL-100-1S-FT (25,2 MHz) com transformada de Fourier. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado.

10. Os espectros de massas (EM) foram obtidos no ins

trumento da Varian, modelo MAT-311 a 70 eV. Serviram em todos os casos para a determinação dos pesos moleculares, e em alguns casos, para confirmação das estruturas propostas através da interpretação do padrão de fragmentação da substância.

11. Para cromatografia em fase gasosa foram utilizados os instrumentos: cromatógrafo Varian modelo 1800 e cromatógrafo Finnigan modelo 1015 S/L, ambos com detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detector sempre foram superiores à máxima alcançada pela coluna, numa base de 30 e 60°C, respectivamente.

12. Os reagentes e solventes utilizados foram analiticamente puros. Os solventes para colunas de extratos foram secos e redistilados em nosso laboratório.

II - Coleta do material

As plantas foram coletadas em duas épocas distintas, novembro de 1979 e agosto de 1980, ambas na Fazenda Sta. Eliza, pertencente ao Instituto Agronômico de Campinas, SP. A identificação foi feita pelo Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão Filho, Chefe do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP.

O material para o presente estudo constou da parte aérea da planta : folhas, flores e caule. Este foi, no caso da primeira coleta, seco ao ar, em estufa a 40°C por uma noite, e posteriormente triturado em moinho tipo Wiley para ser submetido às extrações. O material da segunda coleta foi utilizado sem secagem

da com AgNO_3 , mas as largas faixas de p.f. indicaram mistura (130-135°C e 160-170°C). Esta foi evidenciada por cromatografia gasosa do sólido acetilado, além de se constatar duas manchas também em placa de alumina impregnada com AgNO_3 (solvente-hexano). A acetilação foi feita com parte das frações combinadas sem purificação prévia, segundo método usual:

A 2,550 g da amostra adicionou-se 2,5 ml de piridina e 2,5 ml de anidrido acético, deixando-se a solução em repouso a temperatura ambiente por 48 h. Resfriou-se e adicionou-se lentamente 300 ml de água gelada. Extraiu-se 3 vezes com clorofórmio (150 ml cada), lavou-se a solução clorofórmica resultante uma vez com HCl aquoso (2:1) (150 ml) e depois duas vezes com água (150 ml). Secou-se sobre Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. O produto acetilado bruto (2,186 g) foi purificado em coluna de sílica (ϕ : 2,5 cm, 90 g de sílica) com hexano e hexano: acetato de etila como eluentes. Obteve-se deste modo 0,730 g de um sólido cristalino, recristalizado em CH_3OH , p.f. 137-141°C. Os melhores cromatogramas (fig. 7) foram obtidos com as seguintes condições:

Coluna: OV-17 3% (1,80 m)

Velocidade de vazão do gás de arraste (N_2): 30 ml/min
Temperatura da coluna: 280°C

Pode-se assim constatar que a mistura contém pelo menos 8 compostos, sendo que 2 foram identificados por coincidência com amostras autênticas, devidamente acetiladas e purificadas por cromatografia em coluna. Os compostos originais foram denominados Gs 10 e Gs 11 e identificados como 8-sitosterol 34 e estigmasterol 35, respectivamente. Uma confirmação das estruturas propostas, além de

prévia.

III - Obtenção dos extratos

1. Material proveniente da primeira coleta.

O material moído (1400 g) foi submetido a repetidas extrações à temperatura ambiente, no escuro, com hexano: éter etílico (1:1). Após cada extração, uma amostra era submetida a análise no ultra violeta para verificar a possível existência de poliacetilenos. Descartando-se esta possibilidade e verificando-se por CCD que todos os extratos eram idênticos, estes foram reunidos e o solvente evaporado à temperatura ambiente em evaporador rotatório à pressão reduzida.

Foi assim obtido um total de 24 g (1,7% do peso do material moído) de uma mistura que será denominada EXTRATO HEX:ÉTER I.

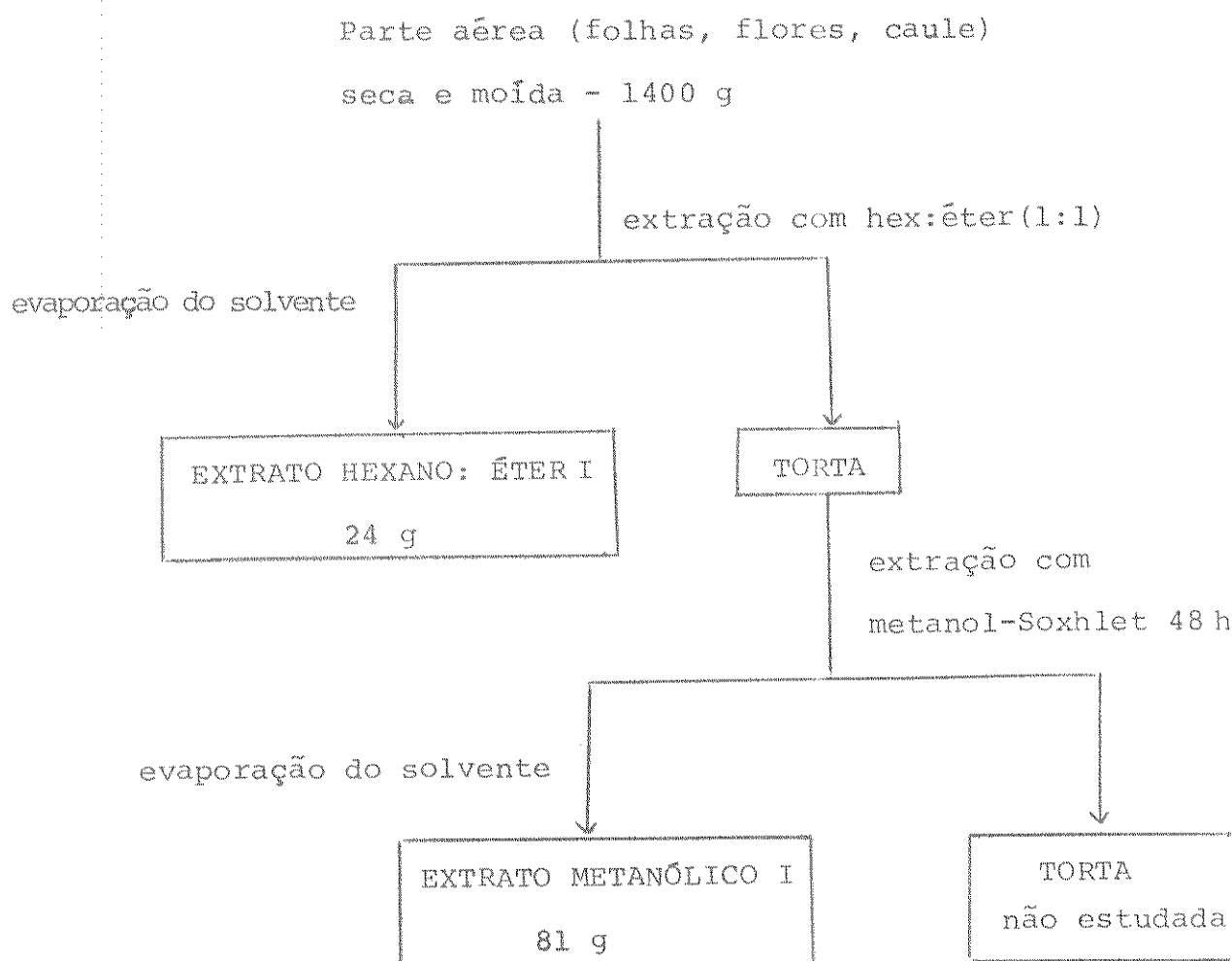
A torta resultante foi submetida a uma nova extração, agora com metanol em extrator do tipo Soxhlet por 48 h. Por evaporação do solvente em evaporador rotatório à pressão reduzida foi obtido um total de 81 g (5,7% do peso do material moído) de uma mistura que será denominada EXTRATO METANÓLICO I.

O esquema V resume as operações realizadas na obtenção desses extratos

2. Material proveniente da segunda coleta.

A parte aérea das plantas frescas (3800 g) foi cortada

ESQUEMA V - Obtenção dos extratos do material da primeira coleta



da em pequenos pedaços e separada em duas partes:

Parte a: 1100 g foram masceradas com metanol: água (1:1) à temperatura ambiente e o solvente foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (bomba de vácuo), com temperatura inferior a 40°C, até aproximadamente 200 ml. Obteve-se assim o extrato METANOL: ÁGUA.

Parte b: As 2700 g restantes foram submetidas a repetidas extrações com hexano: éter etílico (1:2) à temperatura am

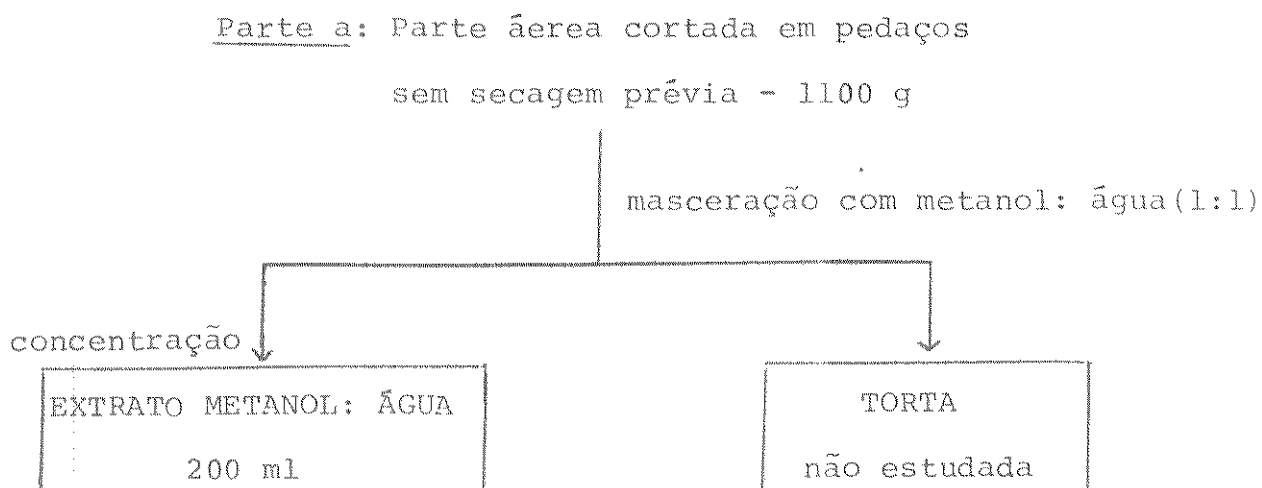
biente, no escuro. Como na obtenção do extrato HEX:ÉTER I , amostras de cada extração foram analisadas no ultra violeta para verificação da existência ou não de poliacetilenos. O solvente foi concentrado até aproximadamente 200 ml, obtendo-se assim o EXTRATO HEX: ÉTER II.

A torta resultante foi submetida a nova extração com benzeno, em extrator do tipo Soxhlet por 48 h. Por evaporação do solvente foi obtido 5 g do material (0,2% do peso da planta fresca) denominado EXTRATO BENZÊNICO.

A mesma torta foi submetida a uma terceira extração, desta vez com metanol à temperatura ambiente. Após repetidas percolações, o solvente foi evaporado, resultando em 11g de um material denominado EXTRATO METANÓLICO II (0,4% do peso da planta fresca).

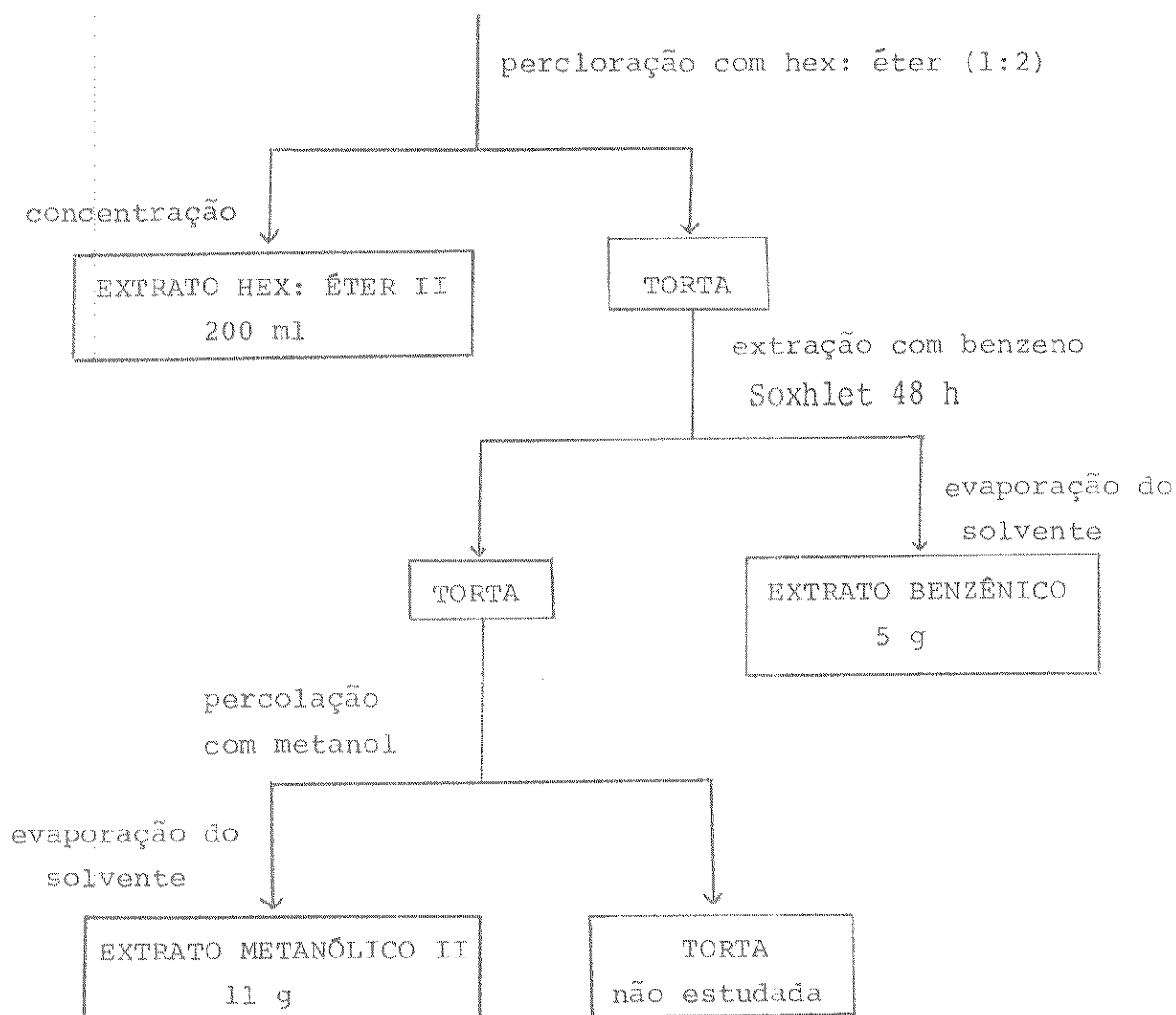
O esquema VI resume as operações realizadas na obtenção destes extratos.

ESQUEMA VI - Obtenção dos extratos do material da segunda coleta
(3800 g)



Parte b: Parte aérea cortada em pedaços

sem secagem prévia - 2700 g



IV - Tratamento dos extratos e isolamento dos constituintes

1 - EXTRATO HEX: ÉTER I

A quantidade total (24 g) do extrato HEX: ÉTER I foi submetida à cromatografia em coluna ($\phi_1 = 6$ cm) com sílica - gel (1200 g). Foram coletadas 250 frações de 400 ml, eluídas da coluna com hexano, hexano: éter, hexano: clorofórmio, clorofórmio e

clorofórmio:metanol. O material recuperado (22 g) correspondeu a 92% do peso original. Na Tabela XVI estão indicadas apenas as frações que conduziram ao isolamento de substâncias puras, ou ainda de misturas que serviram para estudos posteriores. As demais frações foram trabalhadas, mas apresentaram misturas complexas, com pequenas quantidades de compostos, apenas detectados por CCD e impurificados com muito material corante. Por isso, não foram submetidas a estudos posteriores.

TABELA XVI - Cromatografia em coluna de sílica-gel do extrato

HEX: ÉTER I (24 g)

FRAÇÕES REUNIDAS	ELUENTE	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	PESO (g)
4-6	hexano		5,012
8-14	hexano	Gs 1	0,249
59-65	hex:éter 2,5%	Gs 2 a Gs 8	3,590
105-108	hex:éter 7,5%	Gs 9	1,464
143-156	hex:éter 15%	Gs 10 a Gs 12	2,709
173-180	hex:éter 25%	Gs 13 a Gs 16	0,831
189-206	hex:éter 30%	Gs 17 - Gs 18	1,721

F (4-6)

O sólido das frações 4-6 foi recristalizado em CH_3OH e, apesar de apresentar uma mancha por CCD, mostrou larga faixa de p.f. $59-66^\circ\text{C}$. A amostra foi submetida à cromatografia gás-líquido com as seguintes condições operacionais:

Coluna: OV-17 3% (3 m)

Velocidade de vazão do gás de arraste (He): 40 ml/min

Temperatura da coluna: 270°C

O cromatograma revelou 9 picos, cujas substâncias não foram identificadas (fig. 4). Os dados espectrais são característicos de hidrocarbonetos.

F (8-14)

O material oleoso desta reunião de frações foi purificado por coluna curta sob pressão de N₂ usando-se hexano como eluente. O óleo incolor assim obtido (0,116 g), puro por CCD em vários sistemas de desenvolvimento (hexano, hexano:éter e hexano:acetato de etila), foi denominado GS 1 e identificado como esqualeno 25.

F (59-65)

Esta reunião de frações apresentou mistura de sólido e óleo amarelados, com odor agradável. CCD mostrou tratar-se de mistura complexa de substâncias que coram caracteristicamente com revelador específico para terpenóides. Tentativas de purificação por cromatografia em coluna foram infrutíferas. Os dados espectrais são característicos de ésteres alifáticos.

Cromatografia gás-líquido foi o método mais efetivo para a separação desses componentes e os melhores cromatogramas (fig. 5) foram obtidos nas seguintes condições:

Coluna: OV-17 3% (3 m)

Velocidade de vazão do gás de arraste (He): 30 ml/min

Temperatura da coluna: 225°C isotérmica ou com programação linear de temperatura de 205-250°C a 8°C/min

Constatou-se a existência de pelo menos 10 componentes, mas que não foram identificados através desta técnica por falta de padrões adequados.

O principal processo de análise usado na investigação química desta mistura foi cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (fig. 6, E.06-16). Foi utilizada uma técnica, recentemente aplicada na Universidade Federal do Ceará para análise de óleos essenciais, de comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de uma coleção de referências. Esta comparação é feita automaticamente por computador. Para tal análise foi utilizada uma coluna capilar de vidro (30 m x 0,025 mm) com fase SP-2.100 (metil-silicona). O espectro de massa foi obtido em instrumento Finnigan 3.300 com poder de resolução 1.000 u.m.a. acoplado a cromatógrafo a gás e a sistema de processamento de dados Finnigan 6.115. A fragmentação das substâncias foi obtida a 70eV. O programa para o computador, escrito em linguagem BASIC é encontrado na ref. 52.

Foram deste modo identificados:

Denominação	Pico molecular	Compostos	G.I*
Gs 2	<u>m/e</u> 228	laurato de etila <u>26</u>	não indicado
Gs 3	<u>m/e</u> 242	tetradecanoato de me tila <u>27</u>	0.98
Gs 4	<u>m/e</u> 256 <u>m/e</u> 110 - não identificado	miristato de etila <u>28</u>	não indicado
Gs 5	<u>m/e</u> 270	pentadecanoato de eti la <u>31</u>	não indicado
Gs 6	<u>m/e</u> 270	palmitato de metila <u>32</u>	
Gs 7	<u>m/e</u> 284	palmitato de etila <u>29</u>	0.92

m/e 294 - não identificado

m/e 308 - não identificado

Gs 8

m/e 312

octadecanoato de etil

la 30

0.93

(*) G.I. - parâmetro denominado grau de identidade que varia entre os limites de 0 e 1, os quais correspondem a ausência de identidade e identidade completa.

F(105-108)

Parte (0,500 g) das frações combinadas 105-108 (óleo viscoso amarelo) foram recromatografadas em coluna curta sob pressão (eluente hex:éter 12,5%), fornecendo um óleo incolor(0,080g), puro por CCD (hexano:éter 25%, benzeno:acetato de etila 5%, clorofôrmio) e que cora caracteristicamente com revelador específico para terpenóides. Será denominado Gs 9. Apresentou mesmo Rf (uma única mancha em ponto misto) em CCD e características espectrais (RMN¹H e IV) idênticas ao composto isolado do EXTRATO BENZÊNICO.

F(143-156)

Desta reunião de frações obteve-se um sólido cristalino do qual pequena porção foi purificada por recristalização em hexano. Mostrou apenas uma mancha em placa de sílica com vários sistemas de solventes como éter, hexano: acetato de etila 10% e clorofôrmio: metanol 0,5%, inclusive em placa de sílica impregna

maiores informações acerca da mistura, foi obtida pelo emprego da técnica de MIKES (Mass-Analysed Ion Kinetic Energy Spectra). Empregou-se um espectrometro Varian MAT 311A com condições típicas de operação: voltagem de aceleração a 3 kV, ionização dos elétrons a 70 eV e emissão de corrente a 2-3mA. Os compostos foram introduzidos via uma sonda de inserção direta, a temperaturas mínimas, para se evitar decomposição térmica. Para se obter os espectros de MIKE utilizou-se um voltímetro digital para se medir a voltagem E_1 dos íons precursores e E_2 dos íons fragmentos. Opera-se do seguinte modo: varre-se automaticamente a voltagem E de 2V/seg para se obter a forma do espectro. Em seguida varre-se manualmente a voltagem E para medir E_2 para cada pico, com precisão. Usando-se a relação:

$$m_2 = m_1 \frac{E_1}{E_2}$$

onde m_1 = massa do precursor, calcula-se a razão m/e do íon produto (m_2).

Deste modo foram confirmadas as estruturas propostas para Gs 10 e Gs 11, além de se identificar mais um composto, campesterol 36, denominado Gs 12.

F (173-180)

Por CCD destas frações observou-se uma mancha alongada que cora caracteristicamente com revelador específico de terpenóides, bastante impurificada por clorofila e seus produtos de decomposição. A amostra foi submetida a uma purificação prévia com

carvão ativo em metanol a quente e filtração sobre Celite. O óleo viscoso assim obtido (0,539 g) foi cromatografado em coluna curta de sílica sob pressão, com CHCl_3 :MeOH 0,8% como eluente, conseguindo-se assim 0,087 g de um óleo amarelado que apresenta mancha alongada por CCD. Por apresentar características espectrais de ácidos de cadeia longa, a amostra foi metilada com diazometano para posterior análise por cromatografia gasosa. A metilação se realizou segundo métodos usuais:

0,030 g do material a metilar foram dissolvidos em largo volume de éter etílico (100 ml). Sobre esta solução, colocada em banho de gelo, adicionou-se a solução etérea de diazometano, preparado a partir de N-nitroso metil uréia/45-vol.3, p 1017/ calculado para um excesso de aproximadamente 3 vezes. Deixou-se em repouso à temperatura ambiente. Ocorrendo metilação, nota-se decoloramento rápido. A reação foi acompanhada por CCD até se verificar metilação completa. Deixou-se o frasco aberto para eliminar o excesso de diazometano, após o que evaporou-se o solvente no vácuo até secura.

O produto (0,035 g) foi submetido à cromatografia gás-líquido, sendo que as melhores condições de operação foram as seguintes:

Coluna: silicone SE-30 5% (1.50 m)

Vazão do gás de arraste (N_2): 30 ml/min

Com programação linear da temperatura da coluna, de 120-230°C a 6°C/min, verificou-se no mínimo 11 picos correspondentes aos ésteres metílicos da mistura de ácidos (fig. 10).

Os padrões oleato, linoleato e estearato de metila não apresentaram boa separação nestas condições, por isso optou-se por programação multilinear de temperatura da coluna, como se

gue:

Total: 18 passos: 1 passo/min

Temperatura inicial: 120°C

5 passos: 6°/min

6 passos: 3°/min

2 passos: 1°/min

2 passos: 10°/min

3 passos: 16°/min

Por coinjeção com os padrões foram identificados 4 ésteres metílicos, a saber, palmitato, estearato, oleato e/ou linoleato de metila. Os respectivos ácidos foram denominados Gs 13, Gs 14, Gs 15 e Gs 16.

F(189-206)

Nesta reunião de frações foi observada a presença de sólido bastante impurificado por matéria corante. Por CCD notou-se, além de manchas características de compostos ácidos como os já indicados, outra mancha menos polar, que cora caracteristicamente com revelador específico de terpenóides.

Uma purificação prévia foi feita, após um teste com pequena quantidade: a amostra foi tratada com carvão ativo em metanol a quente e filtrada sobre Celite, recuperando-se 0,608 g do sólido amarelado.

A purificação total do composto sem modificações foi difícil, porque por cromatografia em coluna ele sempre eluía junto a um ácido de cadeia longa, apesar de mostrarem nítida diferen

ça de Rf por CCD. Tentativas de cristalização também foram mal sucedidas tendo-se testado com metanol, clorofórmio: metanol, éter e acetato de etila. Após repetidas colunas de sílica sob pressão (eluentes: clorofórmio, clorofórmio:metanol 0,8% e clorofórmio: metanol 1,25%), foram obtidas algumas frações apresentando apenas uma mancha por CCD (0,036 g). Foi recristalizado em etanol, resultando cristais na forma de agulhas com p.f. 277-280,6°C (286,5-288,5°C por recristalização em metanol).

Pelas características espectrais, especialmente as de IV, foi verificado tratar-se de ácidos hidroxilados, presentes numa mistura que foi denominada Gs 17,18.

Todas as demais frações que continham o composto foram reunidas (0.061g) e o total foi submetido a metilação, acetilação e posterior oxidação com dióxido de selênio.

Metilação Gs 17,18

Foi feita com diazometano segundo método usual, como já indicado para a F (173-180), utilizando-se 0,095 g do material e diazometano em excesso (3 vezes). A reação foi considerada completa após 3 h, sendo acompanhada por CCD.

Após evaporação do solvente foi obtido um sólido (0,112 g), com pequenas impurificações por CCD. Foi purificado por cromatografia em coluna curta sob pressão, usando-se clorofórmio:metanol 0,4% como eluente. O produto (0,080 g), que se mostrou puro por CCD, foi recristalizado em etanol, fornecendo cristais em forma de agulhas com p.f. 198-202°C. Foi denominado Gs 17,18-Me.

Acetilação Gs 17,18-Me

Gs 17,18-Me (0,070g) foi acetilado com piridina/ anidrido acético segundo método usual (ver F(143-156)). A acetilação foi considerada completa após uma noite à temperatura ambiente. O produto obtido (0,076 g) foi recristalizado em metanol:clorofórmio, fornecendo cristais incolores com p.f. 205-208°C, denominados Ac-Gs 17,18-Me.

Oxidação Ac-Gs 17,18-Me com dióxido de selênio/64/

Ac-Gs 17,18-Me (0,067 g) em ácido acético glacial (4ml) foi refluxado com dióxido de selênio recentemente sublimado /71, 74/ (0,040 g) por 24 h. O precipitado preto de selênio foi filtrado e a solução amarelada foi submetida a extrações com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com água e secada sobre Na₂SO₄. Por evaporação do solvente foram obtidas 0,043 g de uma mistura de produtos, que apresentou duas manchas principais por CCD.

Esta mistura foi cromatografada em coluna curta de sílica sob pressão, utilizando-se éter de petróleo: éter etílico (4:1) contendo 1% de ácido acético como eluente. As primeiras frações cristalinas (0,006 g) com p.f. 216-219°C foram uma mistura de compostos, constando principalmente de oleana-11,13(18)-dien-28-carbometóxi-3β-acetóxi 44, impurificado pelo ursolato de metila 39.

Continuando-se a eluição da coluna, a polaridade dos

solventes foi aumentada (1,5% de ácido acético) e foi obtido outro composto cristalino (0,016 g), recristalizado em metanol, p. f. 243-245°C. Foi identificado como oleana-9(11),13(18)-dien-28-carbometóxi-3 β -acetóxi-12,19-dioxo 45.

2 - EXTRATO METANÓLICO I

Este extrato, após concentração do solvente, se mostrou escuro, viscoso, com grande quantidade de sólido. Este sólido se mostrou insolúvel em solventes orgânicos comuns (hexano, éter etílico, benzeno, clorofórmio, metanol) e solúvel em água.

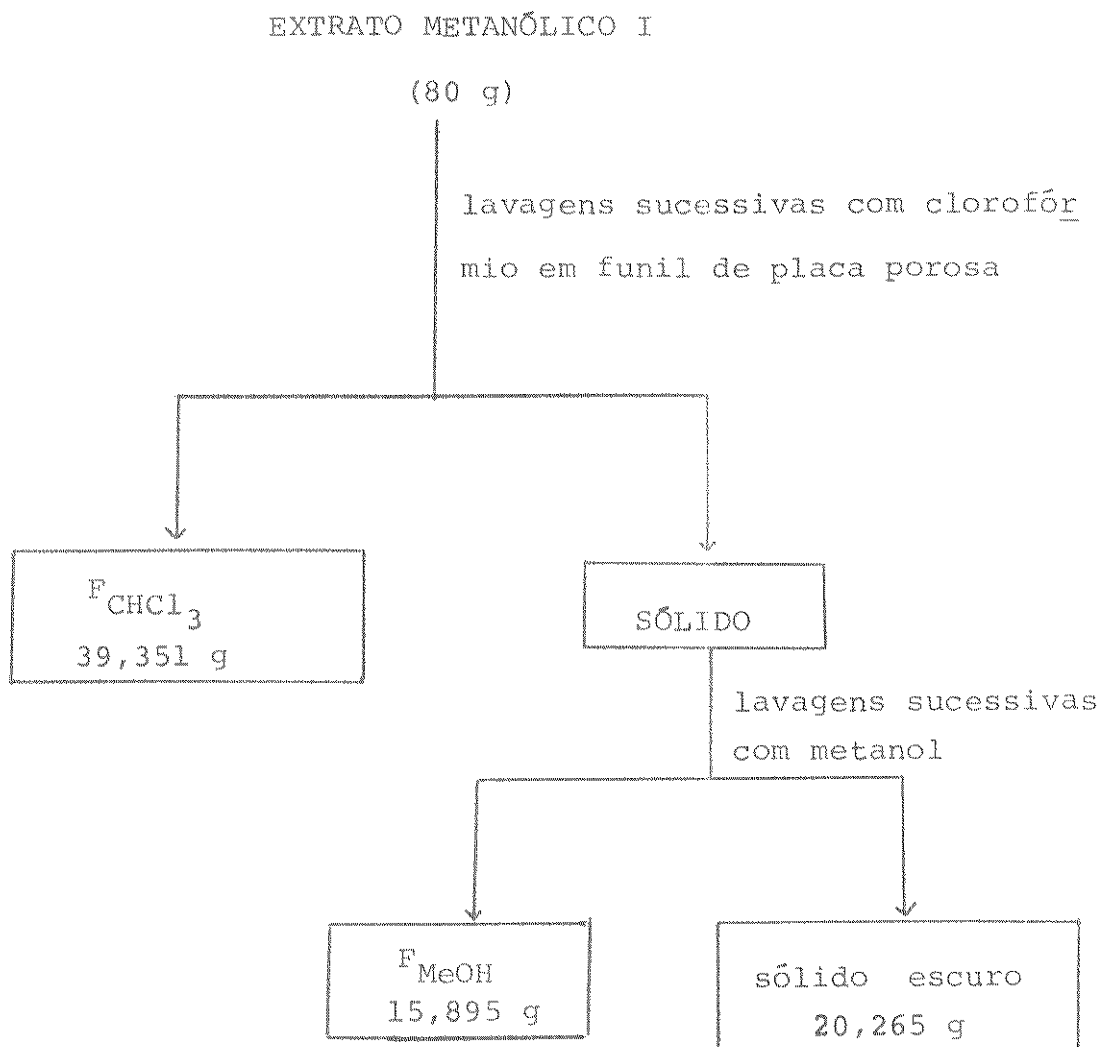
Uma amostra-teste foi purificada por lavagens sucessivas com solventes de polaridade crescente na seguinte ordem: hexano, éter etílico, clorofórmio e metanol. Os cristais brancos resultantes apresentaram p.f. acima de 300°C e não acusaram nenhuma mancha em CCD com vários reveladores utilizados (lâmpada de UV, vapor de iodo, H₂SO₄:MeOH, revelador para terpenóides, para açúcares, para ciclitóis, para flavonóides /38 b,c,f/).

O esquema VII mostra o tratamento feito com a quantidade total deste extrato (80 g)

Sólido

Este foi purificado como indicado para a amostra-teste, fazendo-se adicionalmente um tratamento com carvão ativo em água. Praticamente livre de pigmentos, foi reprecipitado em meta

ESQUEMA VII- Tratamento do EXTRATO METANÓLICO I



nol. Repetidas cristalizações em água-metanol resultaram em 4,530 g de um sólido cristalino com as mesmas características físicas da amostra anterior. Foi identificado como uma mistura de sais inorgânicos através dos seguintes testes qualitativos.

Análise de cátions

Teste prévio - Teste de chama: violeta $\rightarrow K^+$

Testes específicos - a) precipitação com cobaltonitrilo de sódio(+)

- b) CCD em celulose desenvolvida em HCl 0,1N 20% em etanol, revelada com hexanitrocobaltito de sódio: uma mancha amarela-esverdeada em fundo amarelo evidencia o câtion potássio /44/.

Análise de ânions

Testes prévios/40/ - a) solubilidade da amostra - totalmente solúvel em água

- b) pH da solução aquosa da amostra pH:4-5

Descartar: HSO_4^- ou ácidos livres (pH < 2)

CO_3^{--} , S^{--} , $\text{PO}_4^{=}$ (pH > 10)

- c) tratamento com H_2SO_4 diluído (6M) não desprende gás

Descartar: CO_3^{--} , NO_2^- , S^{--}

- d) formação de sal de prata insolúvel

Formou ppt branco, insolúvel em HNO_3

Descartar: CO_3^{--} , PO_4^{--} , S^{--} , Br^- , I^-

Pode ser Cl^-

Testes de identificação /39,40,41/

- a) cloreto (+)

- forma fumaça branca de cloreto de amônio

- forma ppt branco com AgNO_3 , que persiste com HNO_3 6M e dissolve em solução de

amônia

b) sulfato (+)

- forma ppt branco com solução de BaCl_2 tanto em meio neutro quando em meio básico

c) nitrato (+)

- forma vapor pardo avermelhado com odor picante, ao ser aquecido com H_2SO_4 conc. O H_2SO_4 diluído não tem ação (diferença do nitrito)
- forma vapor pardo avermelhado quando aquecido com H_2SO_4 conc. e cobre metálico. A solução fica azul pela formação de nitrato cúprico
- forma "anel pardo" com sol. de sulfato ferroso e H_2SO_4 conc.

Outros ânions foram descartados também por testes específicos (NO_2^- , CO_3^{--} , PO_4^{---}). Os testes para fosfato deram levemente positivos, mas sua ausência foi constatada através de reação com molibdato de amônio /41/. Estes falsos testes positivos ocorrem devido a interferência de outros ânions, principalmente cloretos.

F_{MeOH}

O material obtido pela evaporação do metanol (F_{MeOH}) se apresentou escuro e viscoso, parcialmente solúvel em soluções

alcoólicas, solúvel em água. Por CCD, foram observadas várias manchas que coram caracteristicamente com reveladores específicos para açúcares /37 - p 216 e 230, 38 c/. Por teste com reagente de Tollens confirmou-se a existência de açúcares redutores: grande quantidade de prata metálica é depositada nas paredes do tubo, formando-se o conhecido "espelho de prata".

Este material foi utilizado para os estudos dos carboidratos por cromatografia em camada delgada com impregnantes e por cromatografia em papel.

CCD de sílica com impregnantes

a) Preparação das cromatoplasmas: uma suspensão feita com 30 g de sílica gel G em 60 ml de uma solução de

- acetato de sódio 0,2M
- ácido bórico 0,03M (0,21 g de H_3BO_3 /100 ml H_2O dest.)

foi distribuída de maneira usual sobre placas de vidro, numa camada de 0,25 mm de espessura. Essas placas foram secas por 24h à temperatura ambiente e então ativadas por 1h a $110^{\circ}C$.

b) Detecção das manchas: depois do desenvolvimento, as cromatoplasmas foram secas à temperatura ambiente e em estufa a $110^{\circ}C$ até que todo solvente tenha evaporado (-1h em certos casos). As placas aquecidas foram então pulverizadas com uma solução recém preparada de 0,5 ml de anisaldeído e 1 ml H_2SO_4 conc. em 50 ml de HOAc glacial. Manchas vívidas contra um fundo claro foram obtidas com pouco aquecimento. Por ação prolongada do calor, as

placas tendem a escurecer e a diferenciação por cores se torna difícil.

Cromatografia em papel (descendente)

a) Papel: Whatman n^o 1 (20 x 50 cm)

b) Aplicação das amostras: as amostras foram aplicadas com uma micropipeta, de maneira usual, conservando uma distância de 2-3 cm entre elas. Os padrões foram preparados dissolvendo-se ~10 mg de cada açúcar em 2 ml de água destilada.

c) Sistema de desenvolvimento:

Acetato de etila: piridina: água (8:2:1)

d) Tempo de desenvolvimento: 16h

e) Detecção das manchas /80/: depois de totalmente secos, os cromatogramas foram pulverizados na seguinte ordem:

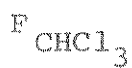
1º spray: 1 ml de solução saturada de AgNO_3 em 200 ml de acetona. Misturar e adicionar 5 a 10 ml de H_2O até dissolver o ppt. Conservar em vidro escuro.

2º spray: solução de NaOH 0,5N em metanol. Dissolver o NaOH em água (mínima quantidade) e completar com metanol.

Após a pulverização, os cromatogramas foram lavados com solução diluída de NH_4OH e depois com água corrente.

A separação e hidrólise dos polissacarídeos estão

descritas no EXTRATO METANOL:ÁGUA.



Esta fração se apresentou bastante impurificada por clorofila e seus produtos de decomposição. Uma purificação prévia foi feita através de uma partição em celulose (1:1) com solventes de várias polaridades - hexano, hexano:clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio:metanol, metanol.

Apenas a fração eluída com clorofórmio (2 g) foi submetida a fracionamento posterior. As demais, ou se encontravam muito impurificadas, ou em misturas muito complexas, ou em quantidades muito pequenas.

Por CCD foram observadas várias manchas visíveis sob irradiação com lâmpada UV, mas nenhuma muito nítida, nem com a aplicação de outros reveladores (H_2SO_4 :MeOH, iodo, revelador para terpenóide, para alcalóide).

200 mg do material foram submetidas à CCE de sílica desenvolvida em clorofórmio: acetona 20%. Foram separadas 4 faixas azuis sob irradiação para análise no UV.

Devido à dificuldade encontrada para se trabalhar com o material original, e visando compostos mais polares, que coravam caracteristicamente com Dragendorff e pareciam bastante hidroxilados (IV e manchas alongadas em placa), este foi acetilado com piridina/anidrido acético segundo métodos usuais (ver F (143-156) EXTR. HEX: ÉTER I), e submetido à cromatografia em coluna de sílica com hexano: clorofórmio, clorofórmio e clorofórmio:metanol. Foram isolados 3 compostos que coram caracteristicamente com Dragendorff.

Foram recromatografados em camada espessa de sílica (clorofórmio: metanol 5%) até apresentarem aparentemente uma única mancha em CCD clorofórmio: metanol 5%, acetato de etila: metanol 10%, acetona: acetato de etila: clorofórmio (3:4:2).

Os compostos (0,051 g, 0,032 g e 0,014 g em ordem de polaridade decrescente) não foram identificados.

3 - EXTRATO METANOL:ÁGUA

Este material foi utilizado para o estudo de polissacarídeos e açúcares livres da planta. Teste com reagente de Fehling /45/ deu resultado positivo.

O polissacarídeo foi precipitado por adição de etanol absoluto, até uma concentração alcoólica de 75% V/V, e deixado em repouso por 24 h. Após a decantação, o sobrenadante foi separado, o ppt foi redissolvido em água destilada e reprecipitado por nova adição de etanol. Este processo foi repetido 3 vezes, após o que o sólido fino foi filtrado em papel e lavado com etanol absoluto.

O polissacarídeo assim obtido foi dissolvido em água destilada e dialisado contra água destilada a 5°C por 48 h. Após a diálise, foi reprecipitado por adição de etanol e separado por decantação. Teste com reagente de Fehling /45/ deu resultado negativo.

O volume total do sobrenadante foi concentrado sob pressão reduzida à baixa temperatura até aproximadamente 100 ml. Com reagente de Fehling /45/ foi observada formação de ppt vermelho.

lho tijolo em quantidade abundante. Esta solução foi usada na identificação dos açúcares livres.

Hidrólise total do polissacarídeo

O polissacarídeo foi adicionado a uma solução de HCl 1N (5 ml) e mantido a 100°C por um período de 5h. A reação foi seguida por testes com reagente de Fehling /45/ e após 2 h já se observavam resultados positivos. A hidrólise foi total, como verificado pelos cromatogramas. O material hidrolisado foi usado na identificação dos monconstituintes do polissacarídeo.

4 - EXTRATO HEX: ÉTER II

Pequena porção do EXTRATO HEX:ÉTER II concentrado foi submetida, sem nenhum tratamento prévio, a cromatografia em camada espessa (CCE) de sílica para se tentar detectar algum composto com características de poliacetilenos. O solvente utilizado foi hexano:éter 20%. Foram separadas 5 faixas visíveis na lâmpada ultravioleta, que foram extraídas com éter e diretamente levadas à análise no ultra violeta.

O extrato concentrado total (200 ml) foi submetido ao seguinte tratamento: após ser resfriado a 0°C em banho de gelo e água, foi lavado repetidamente com porções de 50 ml de solução saturada de NaHCO_3 fria. A camada etérea foi seca sobre MgSO_4 e após análise no ultravioleta, o solvente foi evaporado à tempera

tura ambiente sob pressão reduzida. Foi denominado N_1 . A camada aquosa foi extraída com porções de 25 ml de éter, resultando assim uma nova camada etérea, tratada do mesmo modo que a anterior e denominada N_2 . À camada aquosa foi adicionada pequena porção de éter etílico, após o que esta foi acidificada com HCl aquoso 5% (gelado) até pH 2. A solução ácida foi extraída com 3 porções de 5 ml de éter, que foi lavado com solução saturada de NaCl e submetido a tratamento usual. A fração resultante foi denominada A. A camada aquosa foi abandonada.

Estas operações estão indicadas no esquema VIII

As frações N_1 e N_2 se mostraram idênticas quando comparadas por CCD com vários sistemas de solventes, sendo portanto reunidas numa única fração N.

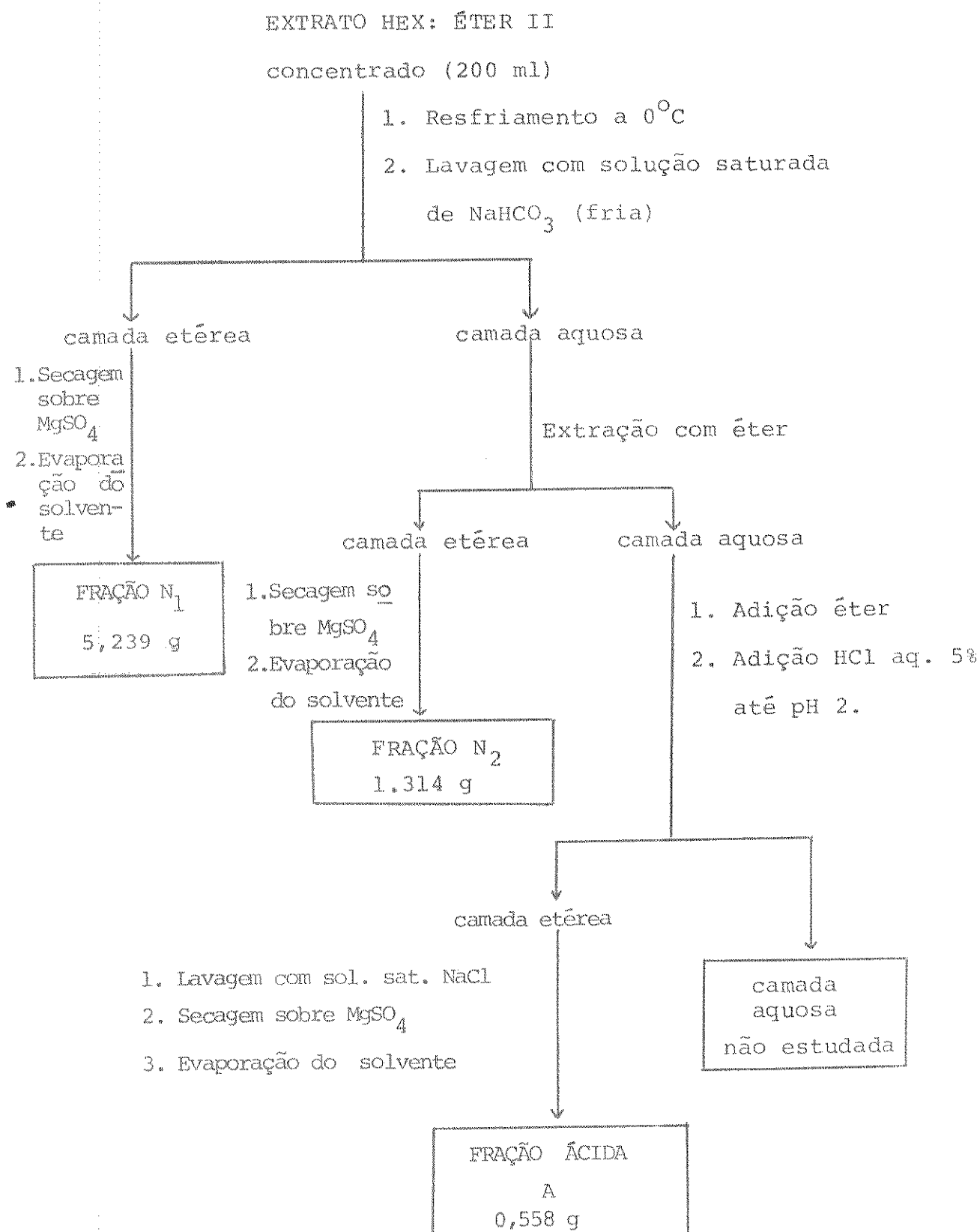
Para uma separação mais efetiva dos compostos ácidos ainda presentes na fração N, especialmente dos ácidos de cadeia longa, uma amostra teste foi submetida a uma reação de saponificação, como segue:

0,840 g do material foram dissolvidos em 50 ml de uma solução etanólica de KOH 0,05 N, e esta foi refluxada por 3 h. Foram adicionados 50 ml de água e o material não saponificável foi extraído com éter. Este foi lavado com água, secado sobre Na_2SO_4 anidro e por evaporação do solvente obteve-se 0,155 g de uma mistura amarelada. A camada aquosa foi acidificada com HCl concentrado até pH 2 e deixada em repouso por uma noite. Por extração com éter e tratamento usual, obteve-se 0,230 g do material saponificável.

A validade deste tratamento não ficou muito evidenciada, por isso não foi aplicado ao restante da fração N.

As frações N e A não foram submetidas a fracionamento

ESQUEMA VIII - Tratamento do extrato HEX: ÉTER II



tos posteriores.

5 - EXTRATO BENZÊNICO

Parte deste extrato (1 g) foi cromatografada em coluna de sílica (ϕ_1 : 2,5 cm, 40 g de sílica), iniciando-se a eluição com hexano: clorofórmio 25% e aumentando-se a polaridade com clorofórmio e posteriormente com metanol. Foram recolhidas 90 frações de 20 ml, recuperando-se um total de 0,912 g (91%). A reunião de frações 5-8 (0,160 g) foi recromatografada em coluna curta de sílica sob pressão, com clorofórmio como eluente. As demais frações apresentaram pequenas quantidades de misturas complexas e não foram submetidas a estudos posteriores.

Da coluna sob pressão foram isoladas 0,063 g de um óleo amarelado, puro por CCD em vários sistemas de solventes (clorofórmio, hexano:éter 1:1, clorofórmio:metanol 0,5%).

Por cromatografia gás-líquido, com as condições de operação especificadas abaixo, verificou-se um único pico significativo (fig. 15).

Coluna: silicone SE-30 (1.50 m)

Vazão do gás de arraste (N_2): 30 ml/min

Temperatura da coluna: programação linear de temperatura, de 150-280°C a 16°C/min.

Este composto se mostrou idêntico ao composto Gs 9 isolado do EXTR. HEX:ÉTER I e por apresentar características de éster de ácido de cadeia longa, foi submetido à hidrólise como segue:

Hidrólise básica de Gs 9

0,061 g de Gs 9 foram dissolvidas em 10 ml de solução etanólica de KOH 0,5 N e esta foi refluxada por 3 h. Foram adicionados 10 ml de água e a solução foi extraída com éter. A camada etérea foi seca sobre MgSO_4 e o solvente foi evaporado à pressão reduzida e temperatura ambiente, obtendo-se 0,019 g do material não saponificável. A fase aquosa foi acidificada com HCl concentrado até pH 2 e deixada em repouso por uma noite. Após extração com éter e tratamento usual obteve-se 0,028 g de material saponificável.

O material saponificável, constando de ácidos graxos de cadeia longa, foi submetido à metilação e posterior análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa.

A metilação foi feita com diazometano em excesso, preparado a partir de N-nitroso metil uréia, segundo método usual (ver F(173-180) do extrato HEX: ÉTER I). O produto foi purificado por cromatografia em coluna curta de sílica, utilizando-se clorofórmio como eluente. Obteve-se assim 0,020 g de um óleo amarelado, que por cromatografia gás-líquido nas condições abaixo especificadas, mostrou 3 picos principais (fig. 16), identificados por coinjeção com padrões como palmitato, oleato e estearato de metila.

Coluna: OV-17 3% (1.80 m)

Vazão do gás de arraste (N_2) 26 ml/min

Temperatura da coluna: 200°C (isotérmica)

Análises por cromatografia gasosa do material não saponificável não conduziram à identificação do composto alcoólico.

6 - EXTRATO METANÓLICO II

A quantidade total deste extrato (11 g) foi submetida à cromatografia em coluna (ϕ_1 : 4,5 cm) com sílica-gel (600g). Foram coletadas 290 frações de 200 ml, eluídas da coluna com hexano, hexano:clorofórmio, clorofórmio e clorofórmio:metanol. O material recuperado (8,089 g) correspondeu a 74% do peso original. Na tabela XVII estão indicadas apenas as frações que conduziram ao isolamento de substâncias puras, ou ainda de misturas que serviram para estudos posteriores. As demais frações foram trabalhadas, mas por se encontrarem em pequenas quantidades, ou ainda muito impurificadas por matéria corante, não foram conduzidas a estudos posteriores.

TABELA XVII - Cromatografia em coluna de sílica-gel do EXTRATO METANÓLICO II (11 g)

FRAÇÕES REUNIDAS	ELUENTE	COMPOSTOS	PESO(g)
26-37	hex:clorofórmio 5%	Gs 19	0,020
62-68	hex:clorofórmio 30%	Gs 20	0,073
99-108	clorofórmio	Gs21 e Gs22	0,291
109-120	clorofórmio:metanol 0,5%		0,350
131-145	clorofórmio:metanol 1%	Gs10 a Gs12	0,385
151-175	clorofórmio:metanol 2%	Gs13 a Gs16	0,935

F (26-37)

Óleo incolor, apresentando uma mancha por CCD que cora caracteristicamente com revelador para terpenóides. Foi denominado Gs 19.

F (62-68)

Óleo amarelado, apresentando predominância de uma mancha em CCD que cora caracteristicamente com revelador específico para terpenóides. Foi purificado por CCE de sílica utilizando-se hexano: acetato de etila 15% como sistema de desenvolvimento. Recuperou-se assim 0,039 g do composto, denominado Gs 20, puro por CCD em vários sistemas de solventes (hexano:clorofórmio 1:1, hexano: acetato de etila 15%).

F (99-108) e F (109-120)

Estas reuniões de frações apresentaram-se iguais por CCD, mostrando mistura de compostos com predominância de duas manchas, ambas visíveis sob irradiação com lâmpada ultravioleta (placa de sílica GF), e apenas uma, a correspondente ao composto mais polar, corando com revelador específico de terpenóides. A reunião de frações 109-120, num total de 0,325 g, foi submetida a cromatografia em coluna de sílica sob pressão, utilizando-se clorofórmio:metanol 0,25% como eluente. Desta coluna foram isolados os 2 compostos de interesse, a saber, 0,084 g de um sólido

cristalino denominado Gs 21, e 0,018 g de um óleo incolor denominado Gs 22.

Cromatografia em camada espessa de sílica-gel da F(99-108), utilizando-se hexano: acetato de etila 20% como sistema de desenvolvimento (2 vezes), resultou no isolamento de 0,014g de Gs 21 e 0,059 g de Gs 22.

Recristalização do sólido Gs 21 em metanol resultou em cristais em forma de agulhas, com p.f. 136.0-136.4°C e identificado como tereftalato de dimetila 49.

Parte de Gs 22 (0,020 g), identificado como fitol, foi submetida à acetilação com piridina/anidrido acético segundo método usual (ver (F143-156), EXTRATO HEX:ÊTER I), e após 18h de reação à temperatura ambiente, obteve-se 0,022 g do produto acetilado, denominado Ac-Gs 22.

F (131-145)

O sólido desta reunião de frações foi purificado por recristalizações sucessivas em hexano, obtendo-se assim cristais com p.f. 135-140°C, mostrando apenas uma mancha em CCD com vários sistemas de solventes (clorofórmio: metanol 1%, éter, hexano:acetato de etila 10%).

Acetilação de pequena quantidade (0,011 g), segundo métodos usuais (ver F(143-156), extrato HEX: ÊTER I) resultou em 0,016 g de produto, também apresentando uma única mancha por CCD. O mesmo foi observado por cromatografia em camada delgada de sílica impregnada com AgNO_3 . Recristalização do produto acetilado em metanol conduziu a cristais com p.f. 131-133°C.

As amostras original e acetilada foram comparadas por CCD com a mistura de esteróides isolada na F(143-156) do extrato HEX: ÉTER I (original e acetilada) e apresentaram uma única mancha em ponto misto.

Comparações das 2 amostras por cromatografia gasosa dos acetatos mostraram tratar-se de misturas análogas, o que foi confirmado por coinjeção (fig. 7). Pelos cromatogramas verificaram-se diferenças nas proporções relativas dos componentes para os 2 casos.

Portanto, por analogia, foram identificados β -sitosterol (Gs 10), estigmasterol (Gs 11) e campesterol (24-metilcolesterol) (Gs 12).

F (151-175)

Esta amostra foi submetida a uma purificação prévia com carvão ativo em metanol e filtração sobre Celite. O óleo amarelado obtido, por apresentar características espectrais de ácidos de cadeia longa, foi tratado como já indicado para a F(173-180) do EXTRATO HEX:ÉTER I. Comparações em CCD por ponto misto, cromatografia gasosa dos ésteres metílicos, além de comparações dos dados espectrais mostraram se tratar de misturas análogas. Assim ficaram identificados os ácidos palmítico, esteárico, oleico e/ou linoleico (Gs 13, Gs 14, Gs 15 e Gs 16, respectivamente) como componentes também desta mistura.

V - Constituintes do *Gnaphalium spathulatum* e seus derivadosGs 1 (esqualeno 25) /51/

hexano
 UV(E.02): λ max (nm) 244

filme
 IV(E.03): ν max (cm^{-1}) 29 10, 2870, 2800, 1660 (C=C),
 1460 e 1400.

RMN^1H (E.04): $\delta(\text{CCl}_4)$ 1.62, 1.68(s), 2.00(l) e 5.15(m)

- relação (4.1:3.8:1)

Gs 2 (laurato de etila 26)

EM(0.6): m/e (intensidade relativa): 228(M^+ , 9), 185
 (10), 183(14), 157(16), 149(15), 115(10), 101(39), 88(100), 73
 (20), 55(26).

Gs 3 (tetradecanoato de metila 27)

EM(E.07): m/e (intensidade relativa): 242 (M^+ , 8), 211
 (5), 199(10), 143(16), 87(59), 75(17), 74(100), 55(25), 43(32),
 41(32).

Gs 4 (miristato de etila 28)

EM(E.08): m/e (intensidade relativa): 256 (M^+ , 11), 213

(10), 211(10), 157(15), 101(51), 89(14), 88(100), 73(15), 55(26), 43(29).

Gs 5 (pentadecanoato de etila 31)

EM(E.10): m/e (intensidade relativa): 270(M^+ ,11), 227(9), 225(9), 157(16), 115(11), 101(56), 89(18), 88(100), 55(24), 43(27).

Gs 6 (palmitato de metila 32)

EM(E.11): m/e (intensidade relativa): 270(M^+ ,17), 239(6), 227(11), 143(18), 87(65), 75(21), 74(100), 55(27), 43(32), 41(25).

Gs 7 (palmitato de etila 29)

EM(E.09): m/e (intensidade relativa): 284(M^+ ,15), 241(7), 239(8), 157(16), 101(62), 89(18), 88(100), 73(18), 55(32), 43(35).

Gs 8 (octadecanoato de etila 30)

EM(E.16): m/e (intensidade relativa): 312(M^+ ,16), 269

(7), 267(6), 157(17), 101(54), 89(21), 88(100), 55(22), 43 (32).

Gs 9

IV(E.36): ν max ^{filme} (cm^{-1}) 3000, 2920, 2850, 1740 (C = O), 1460, 1380, 1160 (C - O), 720.

RMN¹H(E.37): $\delta(\text{CCl}_4)$ 0.93(s, CH_3), 1.10-1.80(l), 1.80-2.40 (vários sinais), 2.77 (tl), 4.22 (m), 5.37(m).

Gs 10 (β -sitosterol; (24R)-24-etil-colest-5-en-3 β -ol 34)
/58/.

Espectro MIKE (fig. 9)

Íon m/e 414 do EM (E. 19) da mistura de esteróides.

$m_1 = \underline{m/e} \ 414$

m_2

0,963 E_1	<u>m/e</u> 399
0,957 E_1	<u>m/e</u> 396
0,896 E_1	<u>m/e</u> 371
0,858 E_1	<u>m/e</u> 355
0,825 E_1	<u>m/e</u> 342
0,794 E_1	<u>m/e</u> 329
0,762 E_1	<u>m/e</u> 315
0,729 E_1	<u>m/e</u> 302

0,698 E ₁	<u>m/e</u> 289
0,659 E ₁	<u>m/e</u> 273
0,628 E ₁	<u>m/e</u> 260
0,594 E ₁	<u>m/e</u> 246
0,558 E ₁	<u>m/e</u> 231
0,429 E ₁	<u>m/e</u> 178

Gs 11 (estigmasterol; 24(S)-24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol 35) /58/.

Espectro MIKE (fig. 9)

Íon m/e 412 do EM (E.19) da mistura de esteróides

$m_1 = \underline{m/e} \ 412$

	m_2
0,963 E ₁	<u>m/e</u> 397
0,956 E ₁	<u>m/e</u> 394
0,920 E ₁	<u>m/e</u> 379
0,895 E ₁	<u>m/e</u> 369
0,858 E ₁	<u>m/e</u> 354
0,826 E ₁	<u>m/e</u> 341
0,794 E ₁	<u>m/e</u> 327
0,762 E ₁	<u>m/e</u> 314
0,726 E ₁	<u>m/e</u> 299,3
0,695 E ₁	<u>m/e</u> 286
0,657 E ₁	<u>m/e</u> 271
0,627 E ₁	<u>m/e</u> 258
0,595 E ₁	<u>m/e</u> 245

0,557 E_1 m/e 229

Gs 12 (campesterol; 24-metilcolesterol; 24-metilcolest
-5-en-3 β -ol 36) /58/

Espectro MIKE (fig. 9)

Íon m/e 400 do EM (E.19) da mistura de esteróides

$m_1 = \underline{m/e}$ 400

m_2

0,962 E_1 m/e 385

0,955 E_1 m/e 382

0,919 E_1 m/e 368

0,891 E_1 m/e 356

0,852 E_1 m/e 341

0,823 E_1 m/e 329

0,787 E_1 m/e 315

0,753 E_1 m/e 301

0,722 E_1 m/e 289

0,683 E_1 m/e 273

0,651 E_1 m/e 260

0,616 E_1 m/e 246

0,578 E_1 m/e 231

0,445 E_1 m/e 178

Gs 17,18 (predominantemente ácido oleanólico; ácido olean-3 β -hidroxi-28-oico 40 /68/.

p.f.: 277-280,6 $^{\circ}$ C (EtOH), 286.5-288.5 $^{\circ}$ C (MeOH)

$[\alpha]_D$: +68 $^{\circ}$ (c = 0.8, MeOH)

EtOH
UV: λ max (nm) 194 (ϵ 2400)

IV (E.23): ν max (cm^{-1}) $\overset{\text{KBr}}{\text{3400}}$ (OH), 2920, 2870, 1700
(C = O), 1470, 1390, 1370.

EM (E. 24): m/e (intensidade relativa) 456 (M^+ , 3), 410 (14), 249(24), 248(100), 233(8), 207(24), 204(38), 203(68), 190(16), 189(16), 175(10), 133(12).

Gs 17,18-Me (predominantemente oleanoato de metila; olean-12-en-28-carbometóxi-3 β -hidroxi 41) /62,68,69/.

p.f.: 198-202 $^{\circ}$ (EtOH)

$[\alpha]_D$: + 24 $^{\circ}$ (c = 1.1, MeOH)

EtOH
UV: λ max (nm) 202 (ϵ 9400)

IV (E.25): ν max (cm^{-1}) $\overset{\text{KBr}}{\text{3420}}$ (OH), 2940, 2850, 1730 (C=O), 1460, 1390, 1360.

EM (E.27): m/e (intensidade relativa) 470 (M^+ , 10), 263 (23), 262(97), 249(9), 248(9), 247(6), 207(29), 204(30), 203(100), 202(46), 201(10), 190(21), 189(43), 187(15), 175(16), 173(12), 147 (15), 135(13), 133(45), 119(25).

RMN¹H(E.26): δ (CDCl₃) 0.73 (sl, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 1.00 (s, 3H), 1.08 (s), 1.15 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 5.28 (m, 1H).

Ac-Gs 17,18-Me (predominantemente aceto-oleanoato de metila; olean-12-en-28-carbometóxi-3 β -acetóxi 42) /62,68/.

p.f.; 205-208^o (CHCl₃:MeOH)

$[\alpha]_D^{20}$: +60^o (c = 1.9, CHCl₃)
MeOH

UV: λ max (nm) 203 (ϵ 9000)

IV (E.28): ν max (cm⁻¹)
KBr 2940, 2860, 1740 (C=O) 1650 (C=C),
1470, 1390, 1370, 1240, 1020.

EM(E.30): m/e (intensidade relativa) 512 (M⁺, 27), 497 (3), 454 (12), 453 (3), 263 (33), 262 (100), 249 (23), 248 (15), 247 (5), 204 (33), 203 (10), 202 (27), 190 (27), 189 (32), 133 (18), 119 (10).

RMN¹H(E.29): δ (CDCl₃) 0.76 (sl, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 1.10 (s), 1.16 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 5.35 (m, 1H).

Oleana-9(11),13(18)-dien-28-carbometóxi-3 β -acetóxi-12,19-dioxo 45 /75/.

p.f.; 243-245^oC (EtOH) Lit: 244-246^o

$[\alpha]_D^{20}$ -148^o (c = 0.4, CHCl₃) Lit: -152 (c=0.36, CHCl₃)
EtOH

UV(E.32): λ max (nm) 276 (ϵ 11570)

Lit/64/ 278 (ϵ 14600)

IV(E.33): ν max (cm⁻¹)
KBr 2960, 2940, 1735 (C=O), 1705 (C=O),
1670 (C=O), 1630 (C=C), 1470, 1380, 1250 (C-O), 1030, 1610 (C=C)

EM(E.35): m/e (intensidade relativa) 538 (M⁺, 77), 479 (20), 478 (49), 438 (30), 437 (100), 267 (11).

RMN¹H (E.34): δ (CDCl₃) 0.92 (s, 6H), 1.08 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 5.93 (s, 1H).

Gs 19

UV(E.39): λ max ^{EtOH} (nm) 252, 211

IV: ν max ^{filme} (cm^{-1}) 2920, 2850, 1735 (C=O), 1660 (C=C),
1450, 1380.

RMN¹H (E.40): δ (CCl_4): 1.28(s1), 1.63(s), 2.02(s1),
2.55 (m), 3.95(m), 5.12(m).

Gs 20

UV (E.41): λ max ^{MeOH} (nm) 355, 255, 224, 203

IV: ν max ^{filme} (cm^{-1}) 2900, 2850, 1730 (C=O) 1460, 1380,
1170.

RMN¹H (E.42): δ (CCl_4) 0.90(s), 0.93(s), 1.27(s1), 1.72
(s), 1.86(s), 2.22(d, J=7Hz), 4.55(d, J=7 Hz), 5.25 (m).

Gs 21 (tereftalato de dimetila 49) /87,88,89/

p.f.: 136-136.4°C (MeOH) Lit: 139-140°C

UV (E.43): λ max ^{EtOH} 282, 239(ϵ 2120, 8780)

IV (E.44): ν max ^{KBr} (cm^{-1}) 3000, 2950, 1720 (C=O), 1500,
1440, 1420, 1280 (C-O), 1120-1110 (C-O), 1020, 815, 725.

EM (E.46): m/e (intensidade relativa): 194(M^+ , 33) 179

(4), 163(100), 135(15), 120(12), 103(16), 76(7).

RMN¹H (E. 45): δ (CCl₄) 4.00 (s, 6H), 8.20(s, 4H).

Gs 22 (fitol 50) /95/

EtOH
UV: λ max (nm) 202 (ϵ 9440)

filme
IV (E.47): ν max 3340(OH), 2920, 2850, 1660 (C=C),
1460, 1380.

RMN¹H (E. 48): δ (CCl₄) 0.83 (s, 6H), 0.93 (s, 6H) ,
1.22(1), 1.65(s, 3H), 4.04 (d, J = 7Hz, 2H), 5.37(t1, J=7Hz, 1H).

Ac-Gs 22 (acetato de fitila 51) /95/

EtOH
UV: λ max (nm) 201 (ϵ 10820)

filme
IV: ν max (cm⁻¹) 2910, 1735(C=O), 1660(C=C), 1460 ,
1370, 1230, 1020.

RMN¹H (E. 49): δ (CCl₄) 0.81(s, 6H), 0.91 (s, 6H), 1.21
(1), 1.70(s, 3H), 1.97 (s, 3H), 4.51(d, J = 7Hz, 2H), 5.31 (t1,
J = 7 Hz, 1H).

VI - Os -3 e derivados. Reações, propriedades físicas e dados espectroscópicos

Os -3

Acetato de glutinol; D:B-friedoolean-5-en-3 β -acetô-

xi 59.

p.f. 188.5-190,5°C (Bz: MeOH) Lit/101/:186-187°C

 $[\alpha]_D$: + 90° (c = 0.66, CHCl₃) Lit/101/: +80°EtOH
UV: λ max (nm) 207KBr
IV (E.50): ν max (cm⁻¹): 3420, 2920, 2860, 1740 (C=O),
1640 (C=C), 1460, 1390, 1370, 1240 (C-O).RMN¹H (E.58 - 100 MHz): δ (CDCl₃) 0.85, 0.95, 0.99,
1.01, 1.05, 1.07, 1.10, 1.17 (3H cada, 8Me), 2.00 (3H, OCOCH₃),
4.72 (1H, W 1/2 8Hz), 5.62 (1H).EM(E.51) m/e (%): 468 (M⁺, 20%), 453 (1%), 408 (8%),
274 (100%), 259 (36%), 205 (17%), 172 (12%), 134 (27%), 109 (22%),
95 (29%).

Hidrólise de Os-3

O acetato Os-3 (0.210 g), p.f.: 188,5-190.5°C, foi tratado com uma solução de KOH 3% em etanol (80 ml) e a mistura foi refluxada por 3h. Após a extração, feita de maneira usual com éter etílico, o sólido (0.190 g) foi cromatografado em uma coluna de sílica sob pressão. Eluição com benzeno: acetato de etila 3% forneceu um sólido cristalino (0.158 g), p.f. 206-207.4°C (metanol), denominado Os-3.1 e identificado como D:B-friedoolean-5-en-3 β -ol ou glutinol 58

p.f. 206-207,4°C (MeOH) Lit/101/:210-12°C

 $[\alpha]_D$: +57,8° (c = 0,74, CHCl₃) Lit/101/: + 55°KBr
IV (E.52): ν max (cm⁻¹) 3440 (OH), 2920, 2880, 1640

(C=C), 1460, 1390, 1370, 1040 (C-O).

RMN¹H (E.60 - 100MHz): δ (CDCl₃) 0.85, 0.95, 0.99, 1.00, 1.04, 1.09, 1.14, 1.16 (3H cada, 8 Me), 3.49 (1H, Wl/2 9Hz), 5.67 (1H).

EM (E.53): m/e (%) 426 (M⁺, 14%), 408(2%), 274(100%), 259 (34%), 205(14%), 152(24%), 134(28%).

Oxidação de Os-3.1

a) Preparação de clorocromato de piridina (CCP) adsorvido em alumina /115/.

A uma solução de trióxido de cromo (3 g) em HCl 6N(6 ml) foi adicionada piridina (3,5 ml) num período de 10 min a 40°C. A mistura foi resfriada a 10°C, até formar um sólido laranja. Este foi reaquecido a 40°C, retornando à forma de solução. Alumina (25 g) foi então adicionada à solução com agitação a 40°C. Depois da evaporação em um evaporador rotatório, o sólido laranja foi seco no vácuo à temperatura ambiente. Para melhor conservação da atividade, o reagente foi mantido no escuro sob vácuo.

b) Oxidação com CCP

D:B-friedoolean-5-en-3 β -ol (0,137 g-0,32 mmol) em benzeno (10 ml) foi tratado com clorocromato de piridina adsorvido em alumina (2.12 g - 1,72 mmol - recentemente preparado) por 7 h à temperatura ambiente. A mistura de reação foi filtrada em funil de placa porosa e o resíduo foi lavado com éter etílico (10 ml -3x). Após a evaporação do solvente, o produto (0.116g)

foi cromatografado em coluna de sílica sob pressão. Eluição com benzeno: acetato de etila 3% forneceu um sólido (0,101 g-74% de rendimento), recristalizado em benzeno:metanol, com p.f. 241-241,5°C (placas). Foi denominado Os-3.2 e identificado como D:B-friedoolean-5-en-3-ona ou glut-5-en-3-ona 60.

p.f.: 241-241,5°C (Bz:MeOH) Lit/112/: 247°C

$[\alpha]_D$: + 31° (c = 2.2, CHCl₃) Lit/112/: +31°

IV(E.54): ν max (cm⁻¹): 2920, 1710 (C=O), 1660 (C=C), 1460, 1390, 1370, 1120, 840.

RMN¹H (E.62 -100MHz): δ (CDCl₃) 0.82, 0.96, 1.00, 1.03, 1.10, 1.17 (3H cada, 6Me), 1.23 (6H, 2Me), 5.70 (1H).

EM(E.55): m/e (%) 424 (M⁺, 30%), 409(6%), 406 (4%), 274(100%), 259(40%), 245(10%), 205(28%), 138(29%), 137 (33%), 136(22%), 123(27%), 109(27%), 95(38%).

Redução de Os-3.2

Uma solução de D:B-friedoolean-5-en-3-ona (0.058g) em éter etílico seco (5 ml) /45/ foi adicionada gota a gota, à temperatura ambiente, à uma suspensão de LiAlH₄ em excesso (0.035 g) finamente pulverizado em éter etílico seco, sob agitação. A mistura reacional ferveu suavemente. Esta foi mantida em refluxo e a reação foi acompanhada por CCD até redução completa da cetona (2 h). O excesso de LiAlH₄ foi destruído pela adição cuidadosa de acetato de etila. A mistura foi vertida sobre solução diluída de HCl gelada para decompor os compostos comple

xos de alumínio e dissolver o $\text{Al}(\text{OH})_3$ precipitado. A camada etérea foi extraída, tratada de maneira usual, resultando em 0.037g de uma mistura de 2 produtos. Por cromatografia em coluna de sílica sob pressão (benzeno: acetato de etila 5%) estes foram separados e identificados como D:B-friedoolean-5-en-3 β -ol 58 (0.009g), p.f. 206-207,8°C e D:B-friedoolean-5-en-3 α -ol 61 (0.028 g), p.f. 201-202°C (benzeno:metanol). Este último recebeu a denominação Os 3.3.

p.f. 201-202°C (Bz: MeOH) Lit/101/:204°C

$[\alpha]_D$: +58.4° (c=1,0, CHCl_3) Lit/101/: +61°

IV(E. 56): $\overset{\text{KBr}}{\nu_{\text{max}}} (\text{cm}^{-1})$ 3400(OH), 2930, 2860, 1630(C=C), 1460, 1390, 1370, 1060-1010 (C-O).

RMN (E.64 - 100 MHz): $\delta(\text{CDCl}_3)$ 0.79, 0.99, 1.00, 1.09, 1.14, 1.16 (3H cada, 6Me), 0.95 (6H, 2Me), 3.24(1H, W1/2 15.6Hz), 5.67 (1H).

Acetilação de Os-3.3

D:B-friedoolean-5-en-3 α -ol (0,020 g) foi tratado com piridina (0,2 ml) e anidrido acético (0,2 ml) à temperatura ambiente por 24h. A solução foi vertida sobre água gelada e extraída 3 x com CHCl_3 (5 ml cada). Este foi lavado uma vez com solução aquosa de HCl 30% (5 ml) e depois 2 x com água. A solução clorofórmica foi tratada de maneira usual e por evaporação do solvente foram obtidas 0,010 g do produto, denominado Os-3.4 e identificado como D:B-friedoolean-5-en-3 α -acetóxi 62.

p.f. 234-235°C (benzeno:metanol) Lit/119/235-236°C

$[\alpha]_D$: $+50^\circ$ ($c=0.6$, CHCl_3) Lit/119/: $+46^\circ$

RMN¹H (E.65 - 100 MHz): δ (CDCl_3) 0.79, 0.95, 0.99, 1.01, 1.09, 1.16 (3H cada, 6 Me), 1.03 (6H, 2Me), 2.05 (3H, OCOCH_3), 4.46 (1H, W1/2 15Hz), 5.64 (1H).

BIBLIOGRAFIA

1. WAGNER, H. "Pharmaceutical and economic uses of the Compositae" em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977; vol. I, p. 411-433.
2. SØRENSEN, N.A. "Polyacetylenes and conservatism of chemical characters in the Compositae" em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977; vol. I, p. 385-409.
- 2'. NEIL TOWERS, G.H., CHI-KIT, W., GRAHAM, E.A, BANDONI, R.J., CHAN; G.F.Q., MITCHELL, J.C. e LAM, J. "Ultraviolet-mediated antibiotic activity of species of Compositae caused by polyacetylenic compounds;" Lloydia, 40, 487-98 (1977).
3. HEGNAUER, R. "The chemistry of the Compositae", em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977; vol. I, p. 283-336.
4. HEYWOOD, V.H., HARBORNE, J.B. e TURNER, B.L. "An overture to the Compositae" em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977; vol. I, p. 1-20.
5. MABRY, T.J. e BOHLMANN, F. "Summary of the chemistry of the Compositae" em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne, B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977; vol. II, p. 1097-1104.

6. HARBORNE, J.B. "Inuleae. chemical review." em "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds); Academic Press, London, 1977, vol. I, p. 603-19.
7. BOHLMANN, F., BURKHARDT, T. e ZDERO, C. "Naturally Occurring Acetylenes"; Academic Press, London, 1973; p.350-56.
8. HEGNAUER, R. "Chemotaxonomie der Pflanzen"; Birkhauser Verlag, Basle, 1964; vol. 4, p. 447-544.
9. PABLO REY, F. "Pluchea quitoc DC. Gnaphalium suaveoleus vell" Rev. Farm., 72, 544-64 (1930) - CA 25:4086⁷
10. FESTER, G.A., MARTINUZZI, E.A. e RICCIARDI, A.I. "Volatile oils. IV", Rev. Fac. Ing. Quim., 20, 47-60 (1951) - CA 48: 6655e
11. FESTER, G.A., MARTINUZZI, E.A., RETAMAR, Y.A. e RICCIARDI, A. I.A. "The essential oil of plants of Cordoba and San Luís, Argentina", Bol. Acad. Nacl. Cienc., 39, 375-416 (1956) - CA 52:2344i
12. LITVAK, M.K. "Chemical study of G. remyanum", An. Fac. Quim. Farm., 19, 58-62 (1967) - CA 70: 60758h
13. BOHLMANN, F. e ZIESCHE, J. "Naturally occurring terpene derivatives. Part 242. New diterpenes from Gnaphalium species" Phytochemistry, 19 (1), 71-4 (1980).
14. ESCARRIA, R.S., TORRENEGRA, R.D. e ANGARITA, B. "Columbian plants of the genus Gnaphalium". Phytochemistry, 16(10), 1618 (1977).

15. PAIVA, M.L. "Study of Achyrocline alata D.C.". Rev. Centro estud. farm. bioquím., 22, 34-45 (1932) - CA 27: 119⁷.
16. ITAKURA, Y., IMOTO, T., KATO, A. e YAGISHITA, K. "Flavonoids in the flowers of G. affine". Agric. Biol. Chem., 39 (11), 2237-81 (1975) - CA 84: 56535e
17. KONOPLEVA, M.M., SHELYUTO, V.L., SMIRNOVA, L.P. e GLYZIN, V. I. "Flavonoid compounds of G. sylvaticum" Fitokhim. Izuch. Flory B SSR Biofarm. Issled. Lek Prep., 93-5 (1975) - CA 89: 3152z.
18. TORRENEGRA, R.D., ESCARRIA, R.S. e DOMINGUEZ, X.A. "Flavonoids of G. pellitum". Rev. Latinoam. Quim., 9(2), 101 (1978) - CA 89: 143354s.
19. ARITOMI, M., KAWASAKI, J. "Dehydro-p-asebotin, a new chalcone glucoside in the flowers of G. affine". Chem. Pharm. Bull., 22(8), 1800-5 (1974).
20. ARITOMI, M., SHIMOJO, M. e MAZAKI, T. "Constituents in flowers of G. Affine". J. Pharm. Soc. Japan, 84, 895-6 (1964) - CA 62: 1970g.
21. KONOPLEVA, M.M., GLYZIN, V.I. e SHELYUTO, V.L. "Flavonoids of G. sylvaticum". Chem. of Nat. Comp., 14(3), 339-40 (1978).
22. KONOPLEVA, M.M., SMIRNOVA, L.P., GLYZIN, V.I. e SHELYUTO, V. L. "New acylated flavonoid glucoside from G. uliginosum". Chem. of Nat. Comp., (3), 269-72 (1979).
23. KONOPLEVA, M.M., SMIRNOVA, L.P. e GLYZIN, V.I. "Flavonoids of G. uliginosum". Chem. of Nat. Comp., (4), 420-3 (1979).

24. OHLENDORF, D., SCHWARZ, R. e HAENSEL, R. "3,5,7-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone from G. obtusifolium". Arch. Pharm., 304(3), 213-15 (1971) - CA 75: 16155p.
- HANSEL, R. e OHLENDORF, D. "B-ring unsubstituted flavones from G. obtusifolium". Tetrahedron Lett., 431-2 (1969).
25. TORRENEGRA, R.D., ESCARRIA, S., BOGOTA, C. e ACHENBACH, H. "Colombian plants of Gnaphalium genus. Part II". Rev. Latinoam. Quím., 10(2), 83-4 (1979) - CA 91: 171632r.
26. MARUYAMA, M., HAYASAKA, K., SASAKI, S., HOSOKAWA, S. e UCHIYAMA, H. "New chalcone glucoside from G. multiceps". Phytochemistry, 13(1), 286-8 (1974).
27. AHLUWALIA, V.K. e KANI, N. "Constitution and synthesis of Gnaphalin, a new chalcone glucoside from G. multiceps wall". Indian J. Chem., 14B (8), 594-5 (1976).
28. HAENSEL, R., OHLENDORF, D. e PELTER, A. "Obtusifoline, a flavone with a biogenetically unusual C₉ unit". Z. Naturforsch B, 25(9), 989-94 (1970) - CA 74: 12950a.
29. KOTIKOVA, N.M. e KHALETSKŮ, A.M. "Chemical composition of Gnaphalium". Khim. Farm. Inst., 28, 95-102 (1969) - CA 75: 137544y.
30. BOHLMANN, F., ARNDT, C. e ZDERO, C. "Polyacetylene compounds. CII. New enol ether polyynes from Anaphalis and Gnaphalium species". Chem. Ber., 99(5), 1648-51 (1966).
31. BOHLMANN, F. e SKUBALLA, W. "Polyacetylene compounds. 199. Synthesis of enol ether polyynes from Gnaphalium species".

Chem. Ber., 104(6), 1962-6 (1971).

32. BOHLMANN, F. e WEBER, R. "Polyacetylene compounds. 211. Synthesis of enol ether polyynes from Anaphalis and Gnaphalium species". Chem. Ber., 105(9), 3036-40 (1972).
33. SØRENSEN, J.S., HOLME, D., BORLAUG, E.T. e SØRENSEN, N. A. "Studies related to naturally occurring acetylene compounds. XX. A preliminary communication on some polyacetylenic pigments from Compositae plants. "Acta Chem. Scand., 8, 1769-78 (1954).
34. FAIR CHILD, W.A. "Tobacco substitute". U.S. 3,814,108 (1974)
-CA 81: 75071e
35. LEITÃO FILHO, H.F., ARANHA, C. e BACCHI, O. "Plantas invasoras de culturas no Estado de São Paulo"; Hucitec-Agiplan, SP, 1975; vol. II.
36. JOLY, A.B. "Botânica. Introdução à taxonomia vegetal" Companhia Editora Nacional, SP, 1966, p. 506-16.
37. HARBORNE, J.B. "Phytochemical Methods", Chapman and Hall, London, 1973.
p. 216 - revelador para açúcares: solução de anilina (9.2 ml) e ácido ftálico (16g) em n-BuOH (490 ml). Et₂O (490 ml) e água (20 ml).
p. 230 - revelador para açúcares e ciclitóis: solução recentemente preparada de tetracetato de chumbo 1% em etanol. Aquecimento por 2-3 min a 100°C.
38. "Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography". E. Merck, Darmstadt, Germany, 1971.

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| a) n $\overset{\circ}{=}$ 2, p.1 | e) n $\overset{\circ}{=}$ 132, p.41 |
| b) n $\overset{\circ}{=}$ 305, p.95 | f) n $\overset{\circ}{=}$ 3, p.1 |
| c) n $\overset{\circ}{=}$ 22, p. 7 | g) n $\overset{\circ}{=}$ 268, p. 82 |
| d) n $\overset{\circ}{=}$ 327, p.102 | |

39. VOGEL, A.I. "Química Analítica Cualitativa"; Kapelusz, Buenos Aires, 1974.
40. GODINHO, O.E.S., BACCAN, N., ALEIXO, L.M., STEIN, E. "Química Analítica Qualitativa", IQ, UNICAMP, Campinas, 1978.
41. ALEXEYEV, V. "Qualitative Analysis"; Mir Publishers, Moscow, 1967.
42. PLOUVIER, V. "Recherches des L-inositol, L-quebrachitol et D-pinitol dans quelques groupes botaniques". C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 258, 2921-24 (1964).
43. PLOUVIER, V. "Présence d'un mono-acetate de myo-inositol dans les campanules. Recherches des L-inositol, scyllitol, mannitol et sorbitol dans quelques groupes botaniques". C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., 270 D, 560-3 (1970).
44. HARBORNE, J.B. "Flavonoid sulphates: a new class of sulphur compounds in higher plants". Phytochemistry, 14, 1147-1155 (1975).
45. VOGEL, A.I. "Química Orgânica. Análise Orgânica Qualitativa", trad. 3ª. ed.; Ao Livro Técnico S.A., R.J., 1977; p. 355-6.
- 45'. VENKATARAMAN, K. "Methods for determining the structures of flavonoid compounds" em "The Chemistry of the flavonoid compounds" (T.A. Geissman, ed.); The Macmillan Company, NY,

1962; p. 73.

46. HABIB, A.-A.M. "False-positive alkaloid reactions", J. Pharm. Sci., 69(1), 37-43 (1980).
47. THALLER, V., Dyson Pervins Laboratory, University of Oxford - Comunicação pessoal.
48. NAKANISHI, K. e SOLOMON, P.H. "Infrared Absorption Spectroscopy", 2a. ed.; Holden-Day, Inc., San Francisco, 1977.
49. McLAFFERTY, F.W. "Interpretation of Mass Spectra", 2a. ed.; W.A. Benjamin, Inc., 1973.
50. SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, C.G. e MORRILL, T.C. "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 3a. ed.; John Wiley & Sons, Inc., NY, 1974.
51. "The Sadtler Standard Spectra"
Standard Infrared Grating Spectra n $\frac{O}{20247K}$
Standard NMR Spectra n $\frac{O}{9660 M}$
52. ALENCAR, J.W. "Análise de óleos essenciais por espectrometria de massa com auxílio de computador". Tese de livre-docência. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, 1979.
53. McLAFFERTY, F.W. "Mass Spectrometry of Organic Ions"; Academic Press, Inc., NY, 1963; cap. 9.
54. THOMPSON, M.J., DUTKY, S.R., PATTERSON, G.W. e GOODEN, E.L. "NMR Spectra of C-24 isomeric sterols". Phytochemistry, 11, 1781-90 (1972).
55. BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. e WILLIAMS, D.H. " Mass

Spectrometry of Organic Compounds"; Holden-Day, Inc., San Francisco, 1967; p. 42.

56. MAQUESTIAU, A., VAN HAVERBEKE, Y., DE MEYER, C., FLAMMANG, R. e PERLAUX, I. "Modification d'un spectrometre de masse a geometrie inversee et applications a l'étude de processus colliseonnels". Bull. Soc. Chim. Belges, 85, 69-78 (1976).
57. KASCHERES, C. "Estudos de íons metaestáveis e espectros de massa de benzenosulfonilhidrazinas e cloretos de benzeno sulfonilas". Tese de doutoramento. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1978.
58. MAQUESTIAU, A., VAN HAVERBEKE, Y., FLAMMANG, R., MISPREUVE, H., KAISIN, M., BRAEKMAN, J.C., DALOZE, D. e TURSCH, B. "Study of complex marine sterol mixtures by Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry". Steroids, 31, 31 (1978).
59. BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. e WILLIAMS, D.H. "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry"; Holden-Day, Inc., S. Francisco, 1964; vol. II, cap. 21.
60. PRESTON, Jr., S.T. e SPRECKELMEYER, S. "A guide to the analysis of fatty acids and their esters by gas chromatography". Poliscience Corporation, Illinois, USA, 1971.
61. BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J.M. e DJERASSI, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XXXII. Pentacyclic triterpenes". J. Am. Chem. Soc., 85, 3688-99 (1963).
62. SAVOIR, R., OTTINGER, R., TURSCH, B. e CHIURDOGLU, G.

- "Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de composés triterpéniques. Influence de la substitution sur les fréquences de résonance des groupes méthyles en série Δ^{12} -oléanénique". Bull. Soc. Chim. Belges, 76, 335-67 (1967).
63. idem 62, p. 371-73. "Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de composés triterpéniques. Les groupes méthyles en série ursénique".
64. STOUT, G. e STEVENS, K.L. "Yerbabuena.II. The identification of micromerol as ursolic acid". J. Org. Chem., 28, 1259-63 (1963).
65. BARTON, D.H.R. e BROOKS, C.G.W. "Triterpenoids. Part I. Morolic acid, a new triterpenoid sapogenin". J. Chem. Soc., 257-79 (1951).
66. EASTON, J.D., MANSON, W. e SPRING, F.S. "Triterpene resinols and related acids. Part XXVI - ursal-11:13(18)-dienol". J. Chem. Soc., 943-4 (1953).
67. DJERASSI, C., ROBINSON, C.H. e THOMAS, D.B. "Terpenoids. XXV. The structure of the Cactus triterpene". J. Am. Chem. Soc., 78, 5685-91 (1956).
68. "Dictionary of Organic Compounds" (G. Harris, ed); Eyre & Spottiswoode publishers, Ltd, London, 1965; p. 2570 e 3231.
69. DJERASSI, C., BUDZIKIEWICZ, H. e WILSON, J.M. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. Unsaturated pentacyclic terpenoids". Tetrahedron Lett., (7), 263-70 (1962).

70. TURSCH, B., DALOZE, D. e CHIURDOGLU, G. "L'oxydation de la coriacéolide par le dioxyde de sélénium". Bull. Soc. Chim. Belges, 75, 734-43 (1966).
71. TRACHTENBERG, E.N. "Selenium dioxide oxidation" em "Oxidation. Techniques and applications in organic synthesis" (R.L. Augustine, ed.); Marcel Dekker, Inc., NY, 1969; vol. I, p.119-87.
72. a) BHALERAO, U.T. e RAPOPORT, H. "Stereochemistry of allylic oxidation with selenium dioxide. Stereospecific oxidation of gem-dimethyl olefins". J. Am. Chem. Soc., 93, 4835-40 (1971).
- b) JERUSSI, R.A. "Selective oxidations with selenium dioxide" em "Selective organic transformations" (B.S. Thyagarajan, ed.); Wiley Interscience, NY, 1970; vol. I, p. 301-26.
- c) TRACHTENBERG, E.N., NELSON, C.H. e CARVER, J.R. "Mechanism of selenium dioxide oxidation of olefins". J. Org. Chem., 35, 1653-58 (1970).
73. CARRUTHERS, W. "Some modern methods of organic synthesis", 2a. ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1971; p.336.
- HOUSE, H.O. "Modern Synthetic Reactions", 2a. ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Califórnia, 1972; cap. 7, p.407-10.
74. BOOTH, H.S. (ed). "Inorganic Synthesis; McGraw-Hill Book Company, NY, 1939; vol. I, p. 120.
75. DALOZE, D., TURSCH, B., CHIURDOGLU, G. "Épimérisation en C-21

au cours de l'hydrolyse basique de dérivés oxydes de la coriacéolide et de l'acide machaerinique". Bull. Soc. Chim. Belges, 75 (11,12), 834-42 (1966).

76. HIROSHI, H., SUSUMU, N., TSUNEMATSU, T. "Microbial transformation of oleanolic acid". Yakugaku Zasshi, 89, 809-13 (1969) e 92, 1528-33 (1972)- CA 71: 88704g , 78: 55192e.
77. APLIN, R.T., HUI, W.H., HO, C.T. e YEE, C.W. "An examination of the Rubiaceae of Hong Kong. Part VIII. The structure of spinosic acid A, a new triterpenoid sapogenin from Randia spinosa". J. Chem. Soc. (C), 1067-69 (1971).
78. WEST, L.G. e McLAUGHLIN, J.L. "Triterpenes from the Button Cactus, Epithelantha micromeris" Lloydia, 40(5), 499-504 (1977).
79. BOAR, B., JOUKHADAR, L., LUQUE, M., McGHIE, J.F., BARTON, D. H.R., ARIGON, D., BRUNNER, H.G. e GIGER, R. "On the reported transformation of β -amyrin into oleanolic acid". J. Chem. Soc. Perkin I, 2104-9 (1977).
80. STAHL, E. e KALTENBACH, H. "Dünnschicht-chromatographie". J. Chromatog., 351 (1961).
81. LEWIS, B.A. e SMITH, F. "Sugars and derivatives" em "Thin-layer chromatography" (E. Stahl, ed.), 2a. ed.; Springer-Verlag, NY, 1969; p. 807-37.
82. LATO, M., BRUNELLI, B., CIUFFIN, G., MEZZETTI, T. "Bidimensional TLC of carbohydrates on silica gel impregnated with boric acid". J. Chromatog., 34, 26-34 (1968).

83. LATO, M., BRUNELLI, B., CIUFFIN, G. e MEZETTI, T. "Thin-layer chromatography of carbohydrates on silica gel impregnated with sodium acetate, monosodium phosphate and disodium phosphate". J. Chromatog., 39, 407-17 (1969).
84. DOEGE, M., MENDES, M.C.S.
Revista Brasileira de Farmácia, 107 (1975).
85. BARBER, M. MERREN, T.O. e KELLY, W. "The mass spectrometry of large molecules. I. The triglycerides of straight chain fatty acids". Tetrahedron Lett. 1063 (1964).
86. HERZ, W. e SUBRAMANIAN, P.S. "Pyromeconic acid in Parthenium integrifolium", Phytochemistry, 1689-90 (1971).
87. "The Sadtler Standard Spectra"
Standard Infrared Grating Spectra n ^o 352
Standard NMR Spectra n ^o 3242.
88. "Absorption Spectra in UV and Visible Region" (L.Lang, ed.)
Academic Press, Inc., NY, 1967; vol. 9, p.51, n ^o 1504.
89. CORNU, A. e MASSOT, R. "Compilation of mass spectral data"
Heyden & Sons Ltd, London, 1966; p. 63C.
90. HEATH, R.L. "Recovery of terephthalic acid". Imperial Chemical Industries Ltd. Brit. 610, 135 (1948) - CA 43: 4052b
91. BASLAS, K.K. e DESHAPANDE, S.S. "Essential oils from leaves, twigs and fruits of Aegle marmelos". J. Indian Chem. Soc., 28, 19-22 (1951).
92. THAKUR, R.S., JAIN, M.P., HRUBAN, L. SANTAVY, F. "Terephthalic

- acid and its methyl esters from Zizyphus sativa" Planta Med., 28(2), 172-3 (1975) - CA 84: 14675v.
93. LIONG CHUANG, O., HAK HONG, N. "Chemical constituents of Uncaria gambier". Nanyang Univ., Coll. Grad. stud., Inst. Nat. Sci., 13, 21 (1976) - CA 90: 164767q.
94. "High Resolution NMR Spectra Catalog", VARIAN Associates, 1962; vol. I, n^o 346.
95. BESSIÈRE-CHRÉTIEN, Y. e MARION, J.P. "Hidroboration dans la série du phytol." Bull. Soc. Chim. France, 3013-19 (1970).
96. HUGEL, G., OEHLISCHLAGER, A.C. e OURISSON, G. "The structure and stereochemistry of diterpenes from Trachylobium verrucosum Oliv.-V", Tetrahedron, suppl. 8, part I, 203-216 (1966).
97. BHACCA, N.S. e WILLIAMS, D.H. "Applications of NMR spectroscopy in organic chemistry"; Holden-Day, S. Francisco, 1964; p. 19-24.
98. LE CLERC, H. "G. dioicum, composition and pharmacology". Rev. phytothérapie, 13, 501-2 (1949) -CA 47: 10813f
- DI MODICA, C. e TIRA, S. "Flavonoids of G. luteum album". Ann. Chim., 53(6), 764-73 (1963).
99. MAGALHÃES, E.G. - trabalho não publicado, feito sob a orientação do Prof.Dr. R. Otto GOTTLIEB.
100. JACKMAN, L.M. e STERNHELL, S. "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", 2a. ed. Pergamon Press, Oxford, 1969; p. 286-9.

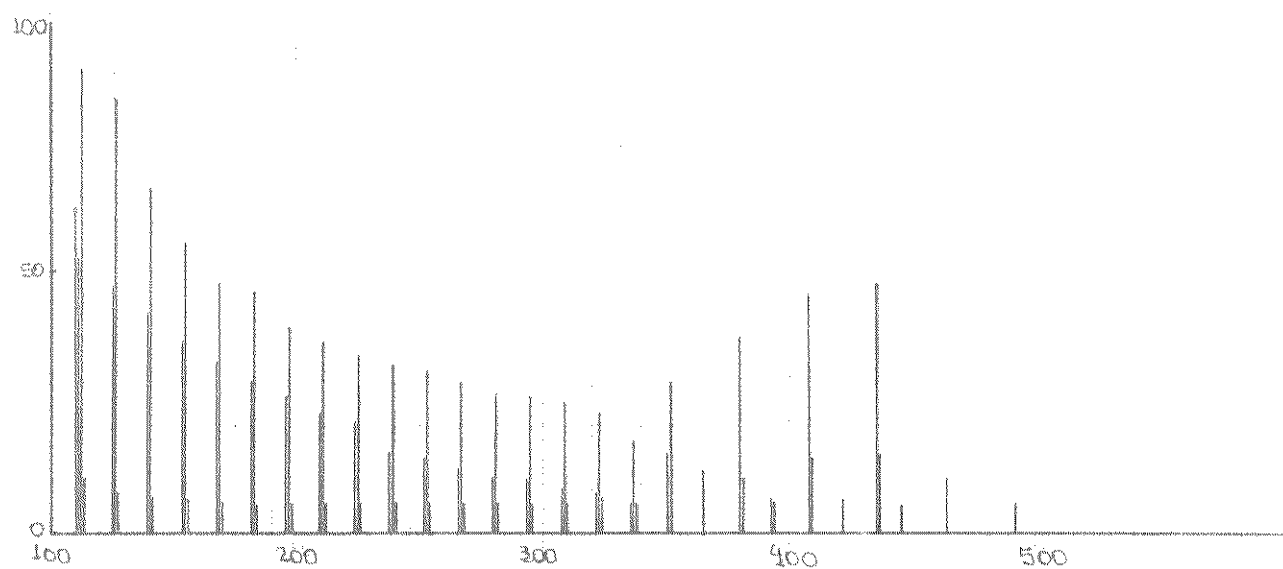
101. DEVON, T.K. e SCOTT, A.I. "Handbook of naturally occurring compounds. Terpenes"; Academic Press, NY, 1972, vol. II, p. 283-384.
102. HALSALL, T.G. e APLIN, R.T. "A pattern of development in the chemistry of pentacyclic triterpenes" em "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" (L. Zechmeister, ed.); Springer-Verlag, NY, 1964; vol. XXII.
103. LEWIS, R.B. e WENKERT, E. "Structure Elucidation of Natural Products" em "Nuclear Magnetic Resonance Shift" (R. E. Sievers, ed.); Academic Press, Inc., NY, 1973; p.99.
104. PARIKH, V.M. "Absorption spectroscopy of organic molecules"; Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, 1974, cap. 4, p.95-141.
105. ABRAHAM, R.J. e LOFTUS, P. "Proton and Carbon-13 NMR spectroscopy", Heyden & Son Ltd, London, 1979.
106. DEMARCO, P.V., ELZEY, T.K., LEWIS, R.B. e WENKERT, E. "Tris (dipivalometanato) europium(III). A shift reagent for use in the proton magnetic resonance analysis of steroids and terpenoids". J. Am. Chem. Soc., 92, 5737-9 (1970).
107. BUCKLEY, D.G., GREEN, G.H., RITCHIE, E. e TAYLOR, W.C., "Application of the tris (dipivalometanato) europium nuclear magnetic resonance shift reagent to the study of triterpenoids", Chem. and Ind., 289-9 (1971).
108. KIKUCHI, T., YOKOI, T., NIWA, M. e SHINGU, T. "Application of homonuclear internuclear double resonance technique in triterpene field. I. Nuclear Overhauser effects between methyl

- groups". Chem. Pharm. Bull., 25(8), 2078-81 (1977).
109. Idem 108. "II. Assignments of methyl resonances of triterpenes related to friedelin". Chem. Pharm. Bull., 28(7), 2014-23 (1980).
110. Van DEURSEN, F.W. "The detection of hidden proton magnetic resonance signals by means of INDOR". Org. Magn. Reson., 3, 221-42 (1971).
111. LAMBERT, J.B., SHURVELL, H.F., VERBIT, L., COOKS, R.G. e STOUT, G.H. "Organic Structural Analysis", MacMillan Publishing Co., Inc., NY, 1976; cap. 5 e 7.
112. BEATON, J.M., SPRING, F.S. e STEVENSON, R. "The characterization of alnusenone", J. Chem. Soc., 2616-9 (1955).
113. PATON, A.C., SPRING, F.S. e STEVENSON, R. "Triterpenoids Part LV. The stereochemistry of alcohols derived from glutinone (alnusenone)". J. Chem. Soc., 2640-5 (1958).
114. COREY, E.J. e SUGGS, J.W. "Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds", Tetrahedron Lett., 2647-50 (1975).
115. CHENG, Y.S., LIU, W.L. e CHEN, S.H. "Pyridinium chlorochromate adsorbed on alumina as a selective oxidant for primary and secondary alcohols". Synthesis, 223-4 (1980).
116. MENDES, M.C.S. "Estudo químico do Solanum granuloso-leprosum". Tese de Mestrado, IQ, UNICAMP, Campinas, SP, 1980.

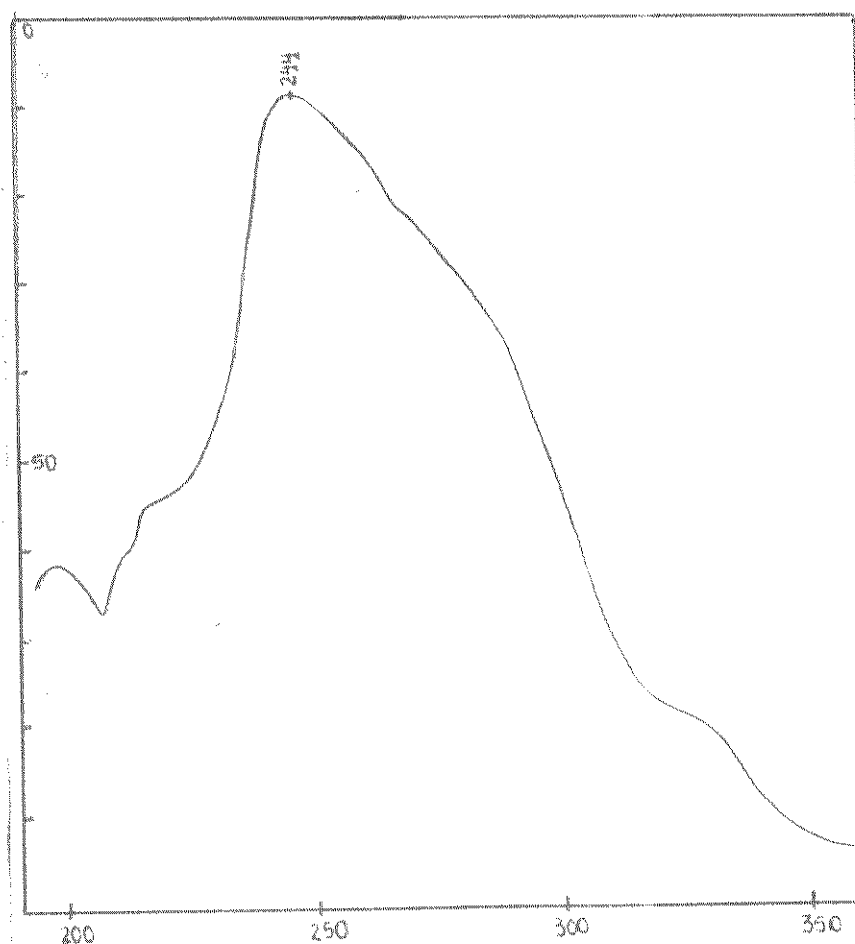
117. BROWN, W.G. "Reductions by lithium aluminum hydride" em "Organic Reactions" (R. Adams, ed.); John Wiley & Sons, Inc., London, 1951; vol. VI, p. 469.
118. STARRAT, A.N. "Triterpenoid constituents of Euphorbia cyparissias". Phytochemistry, 5 (6), 1341-4 (1966).
119. CHAPON , S. e DAVID, S. "Etude de l'insaponifiable de l'écorce d'aulne, Alnus glutinosa". Bull. Soc. Chim. France, 333-4 (1953).
120. ApSIMON, J.W., BEIERBECK, H. e FRUCHIER, A. "Conversion of nonlinear shift reagent plots to linear plots". Can. J. Chem., 50, 2725-7 (1972).
121. ApSIMON, J.W. e BEIERBECK, H. "A method for compensating for experimental errors in shift reagent work". J. Chem. Soc. Chem. Comm., 172-3 (1972).
122. SANDERS, J.K.M. e WILLIAMS, D.H. "Tris (dipivalomethanato) europium. A paramagnetic shift reagent for use nuclear magnetic resonance spectroscopy". J. Am. Chem. Soc., 93, 641-5 (1971).
123. SHINGU, T. YOKOI, T., NIWA, M. e KIBUCHI, T. "Application of tris (dipivaloylmethanato) europium (III) to the assignments of methyl resonances of triterpene acetates related to β -amyrin". Chem. Pharm. Bull., 21, 2252-56 (1973).
124. WENKERT, E., BUCKWALTER, B.L., BURFITT, I.R., GAŠIČ, M.J., GOTTLIEB, H.E., HAGAMAN, E.W., SCHELL, F.M. e WOJKULICH, P.M. "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances" em "Topics in carbon-13 NMR

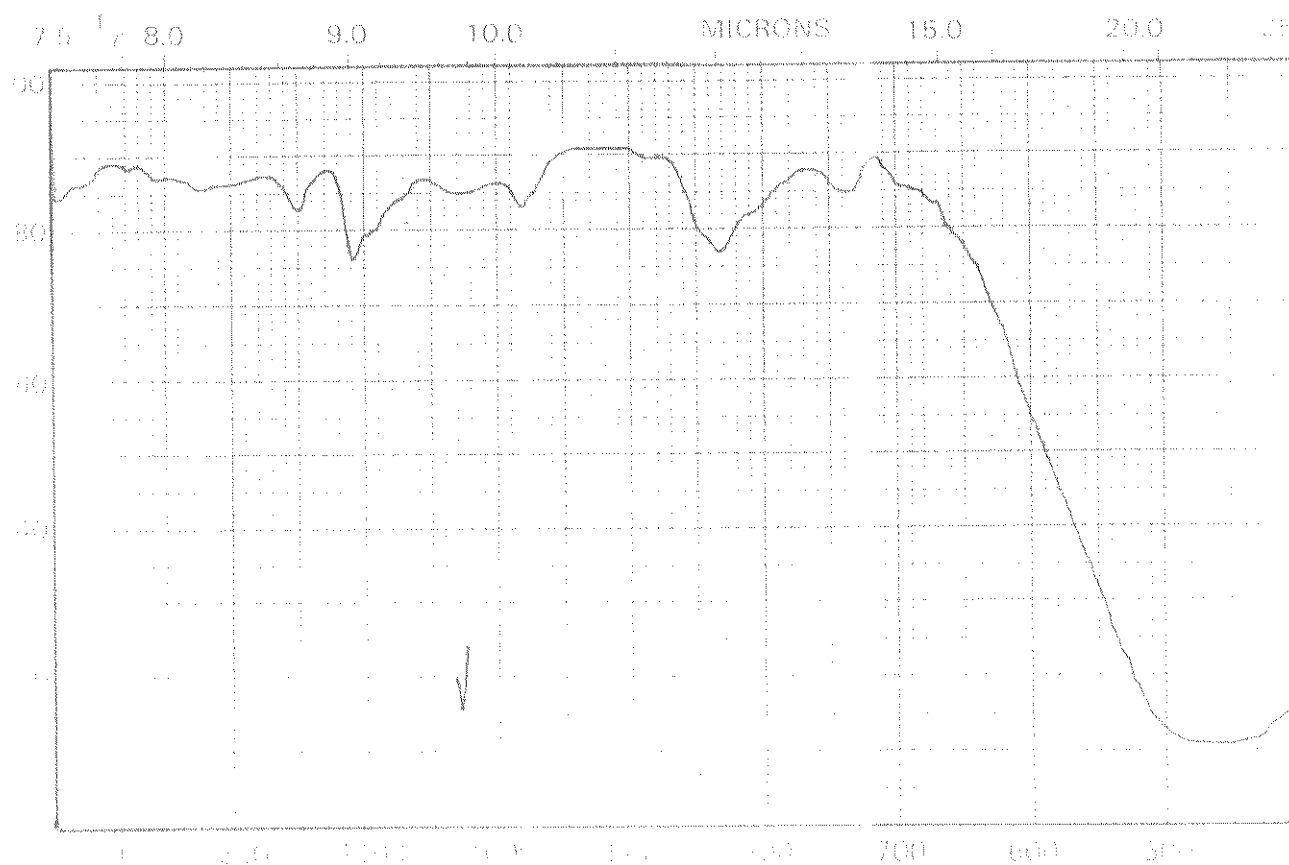
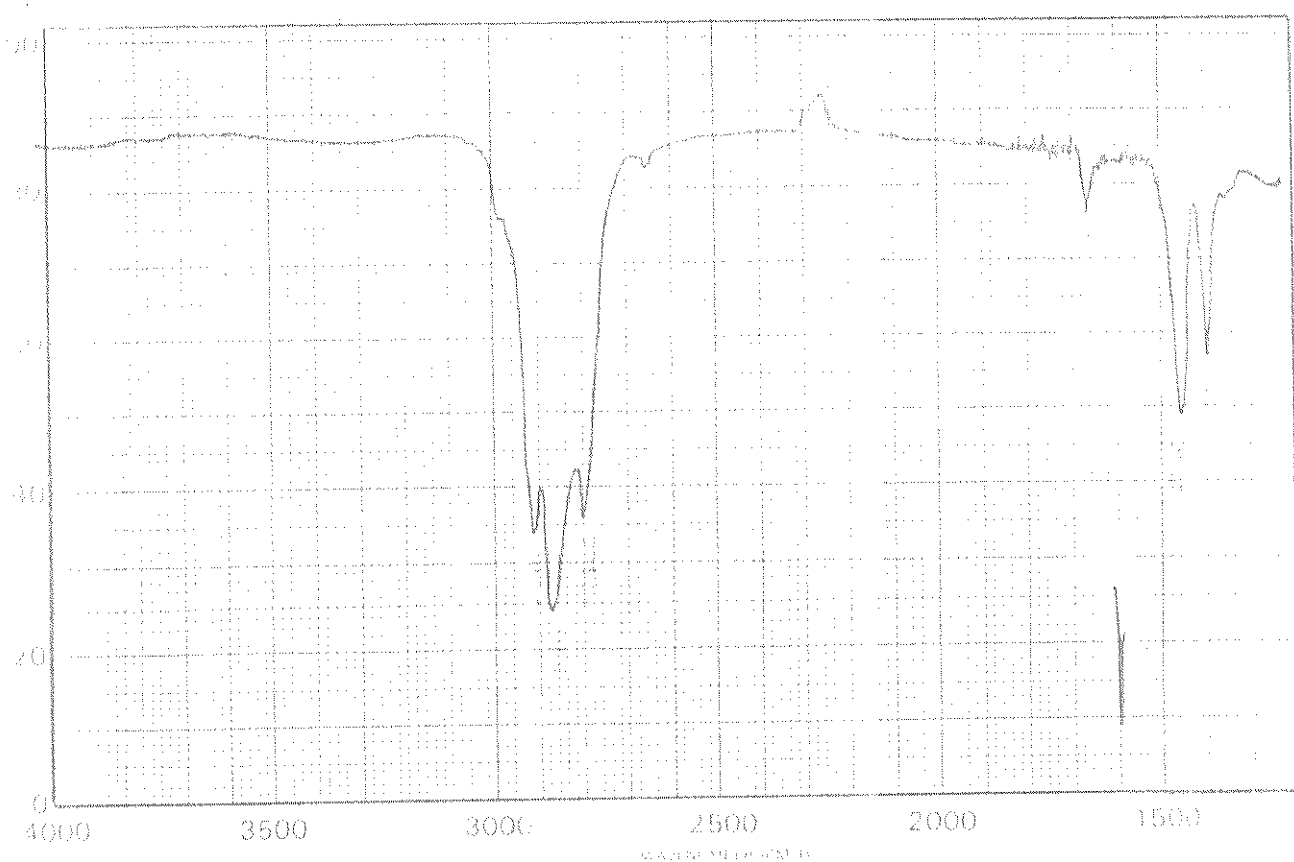
- spectroscopy" (G.C. Levy, ed.), John-Wiley & Sons, NY, 1976; vol. 2, p 85-124.
125. WEHRLI, F.W. e NISHIDA, T. "The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry" em "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" (W. Herz, H. Grisebach e G.W. Kirby, ed.); Springer-Verlag, NY, 1979; vol. 36, p.1-230.
126. BLUNT, J.W. e MUNRO, M.H.G. "Carbon-13 NMR spectra of some tetra- and pentacyclic triterpene methyl ethers". Org. Magn. Reson., 13(1), 26-27 (1980).
127. GUNATILAKA, A.A.L., NANAYAKKARA, N.P.D., SULTANBAWA, M.U.S. e WAZEER, M.I.M. "¹³C nuclear magnetic resonance spectra of some naturally occurring friedelanones". Org. Magn. Reson., 14 (5), 415-17 (1980).
128. Comunicação privada de Wenkert e colaboradores à Profa.Dra. Nídia Cavalcante Franca Roque.
129. BEIERBECK, H. e SAUNDERS, J.K. "β-carbon shielding effects in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy". Can. J. Chem., 53, 1307-13 (1975).
130. BEIERBECK, H. e SAUNDERS, J.K. "The shielding effect of heterosubstituents in ¹³C nuclear magnetic resonance". Can. J. Chem., 54, 632-41 (1976).
131. BEIERBECK, H. e SAUNDERS, J.K. "A reinterpretation of beta, gamma and delta substituent effects on ¹³C chemical shifts" Can. J. Chem., 54, 2985-95 (1976).

132. BEIERBECK, H., SAUNDERS, J.K. e ApSIMON, J.W. "The semiempirical derivation of ^{13}C nuclear magnetic resonance chemical shifts. Hydrocarbons, alcohols, amines, ketones and olefins". Can. J. Chem., 55, 2813-28 (1977).
133. WEHRLI, F.W. e WIRTHLIN, T. "Interpretation of carbon-13 NMR spectra", Heyden & Son Ltd., London, 1976, p. 45.
134. LAING, M., BURKE-LAING, M.E., BARTHO, R. e WEEKS, C.M. Tetrahedron Lett., 3839 (1977).
135. HUNT, B.J. e RIGBY, W. "Short column chromatography". Chem. and Ind., 1868-9 (1967).

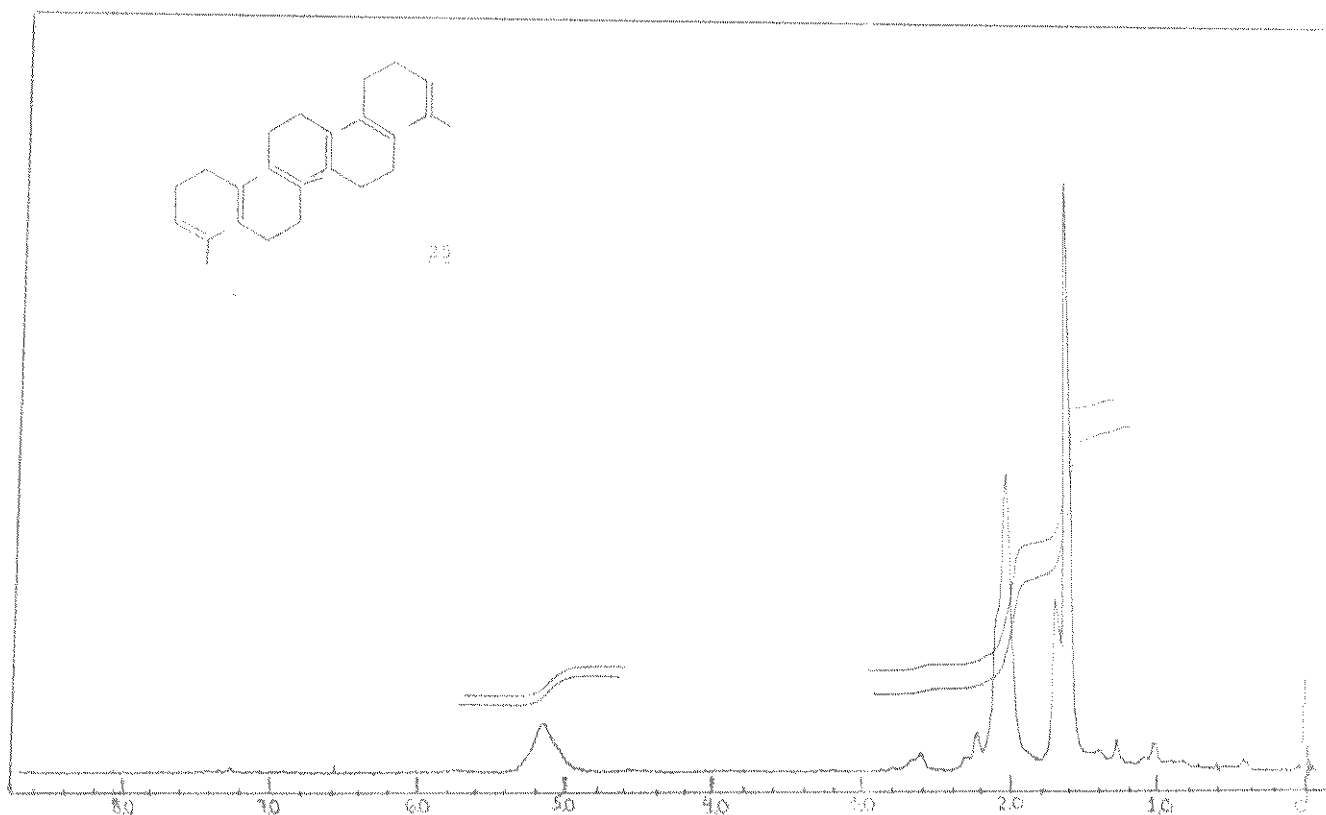
ESPECTROS

E.01 - Espectro de massa da mistura de hidrocarbonetos

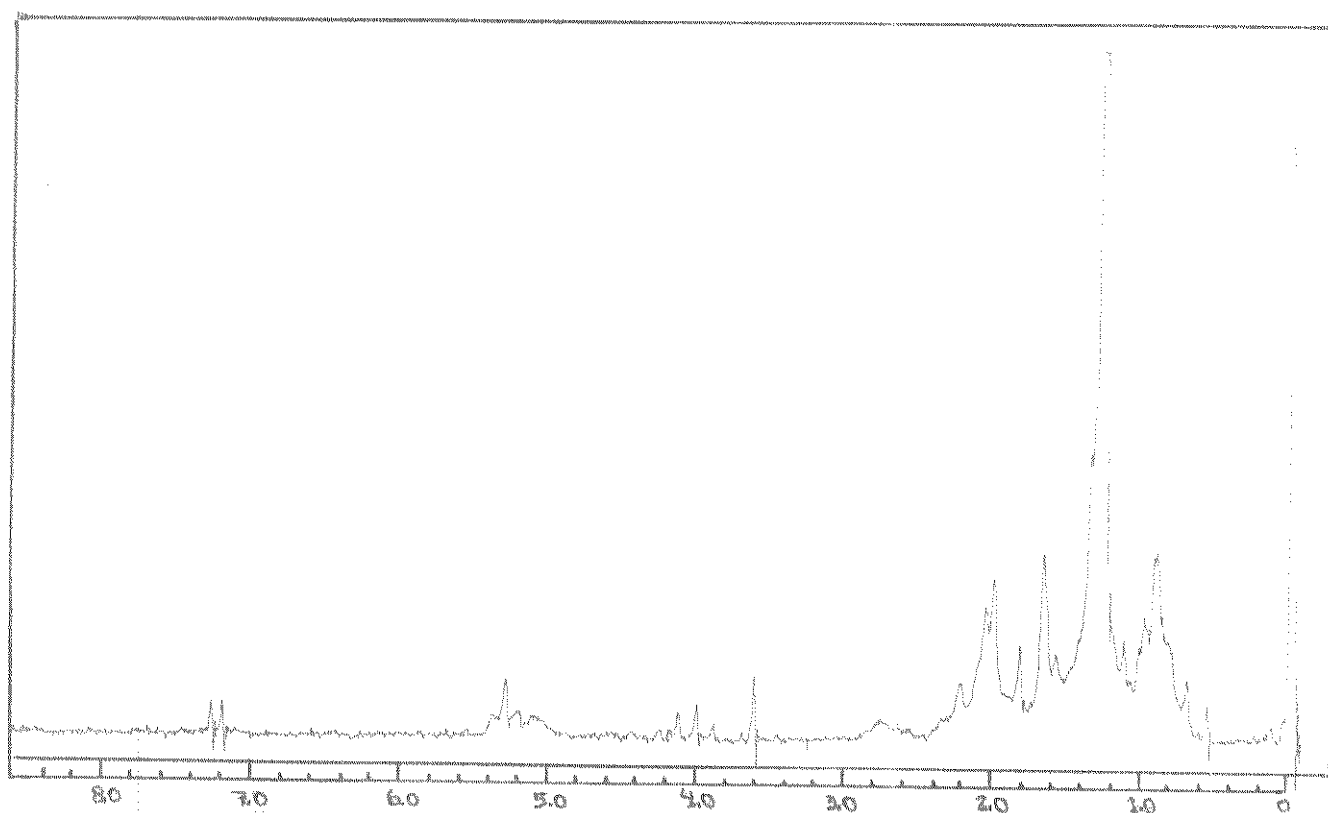
E.02 - Espectro de UV do esqualeno 25



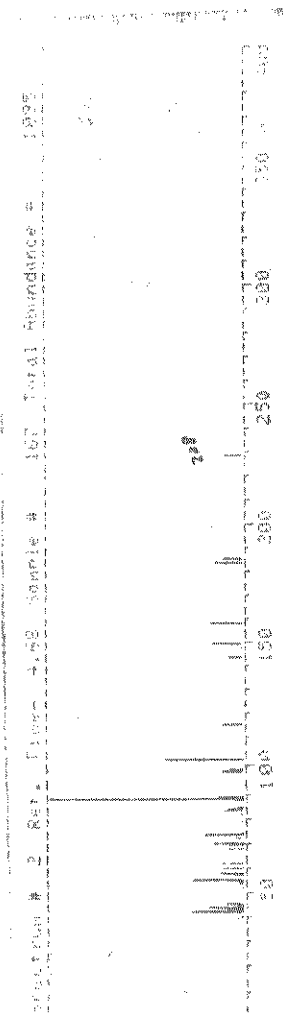
E.03 - Espectro de IV do esqualeno 25



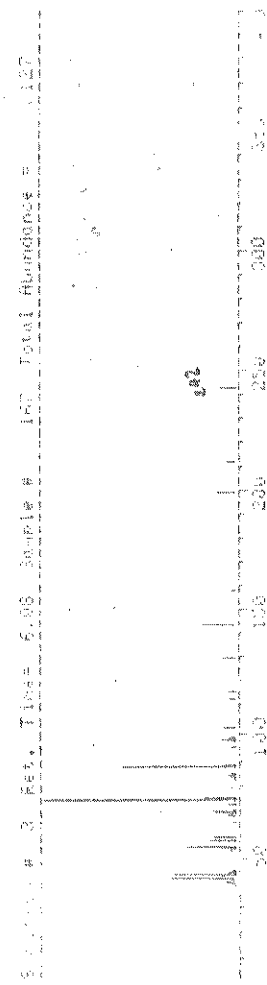
E.04 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) do esqualeno 25



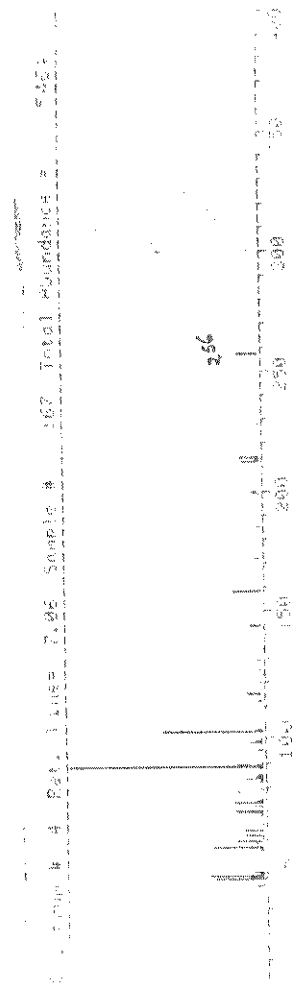
E.05 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) da mistura de ésteres Gs2 a Gs8



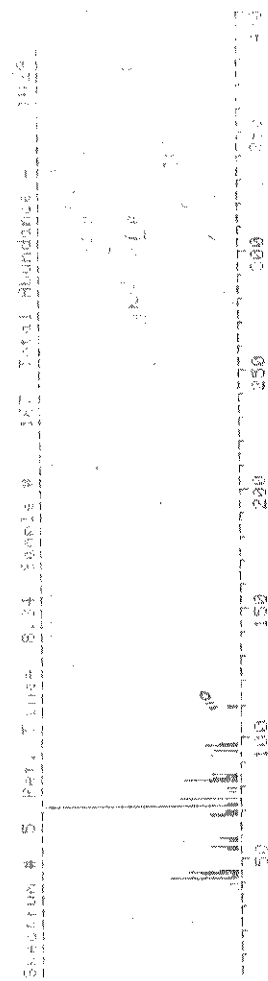
E.06 - Espectro de massa do laurato de etila 26



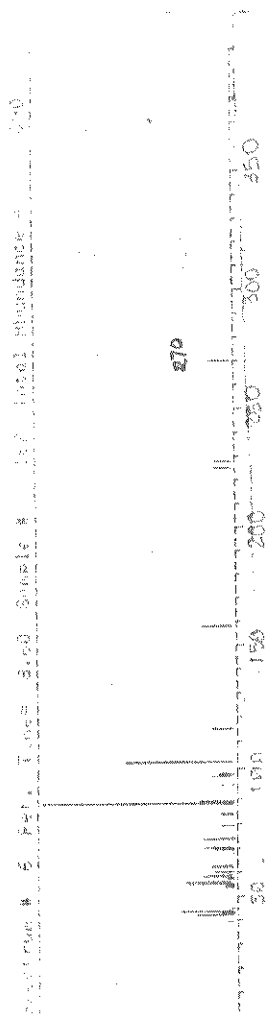
E.07 - Espectro de massa do tetradecanoato de metila 27



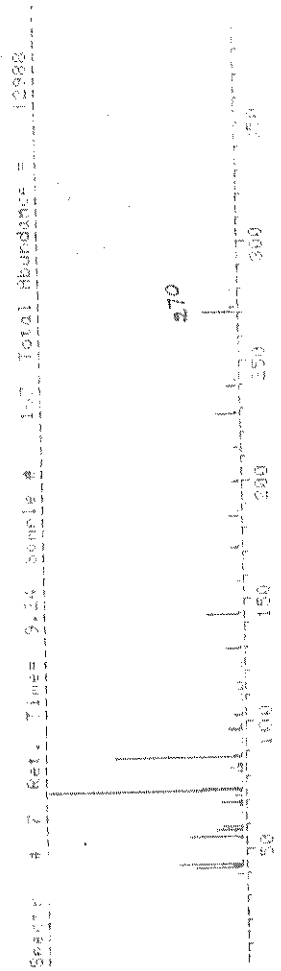
E.08 - Espectro de massa do miristato de etila 28



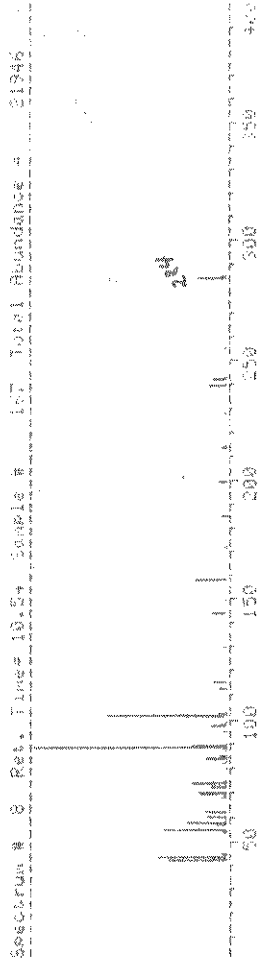
E.09 - Espectro de massa do composto com m/e 110

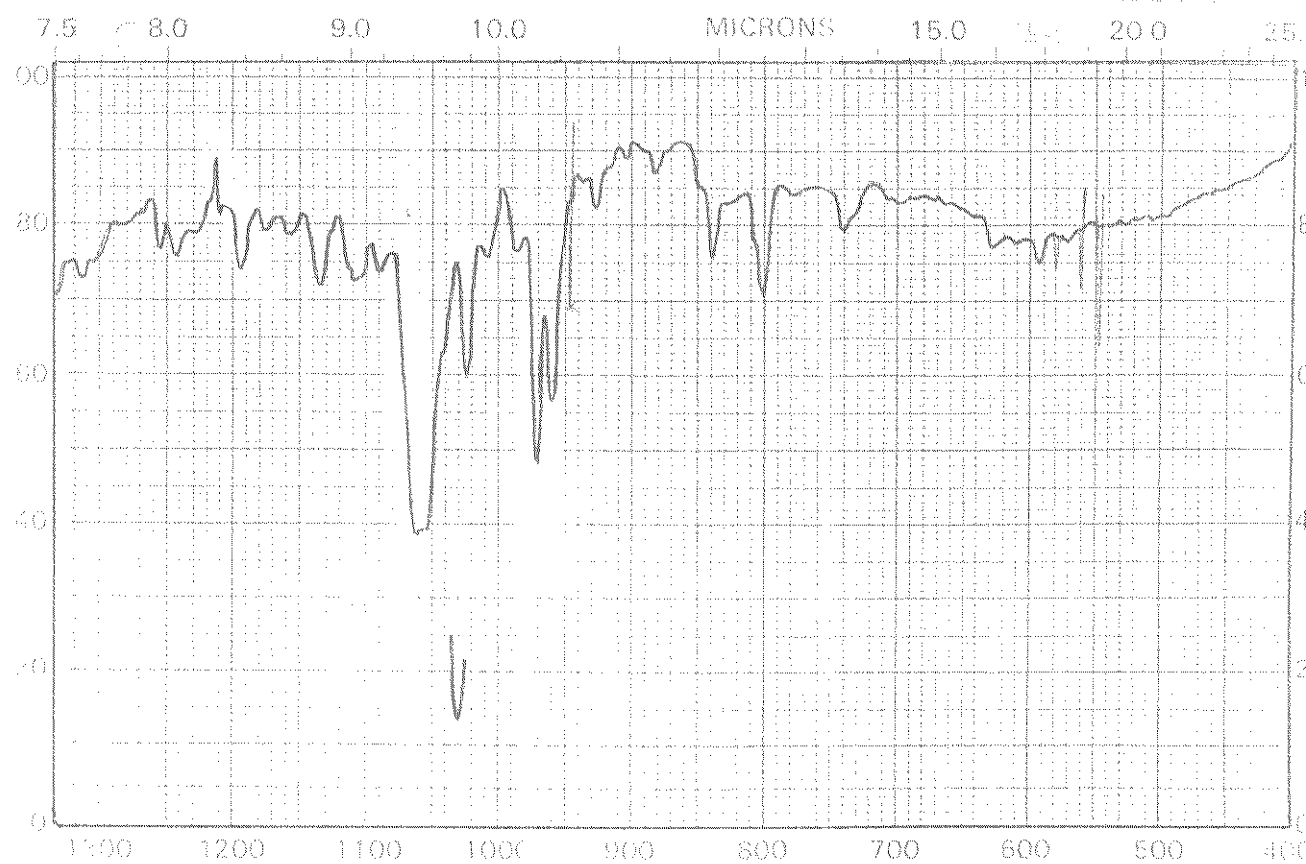
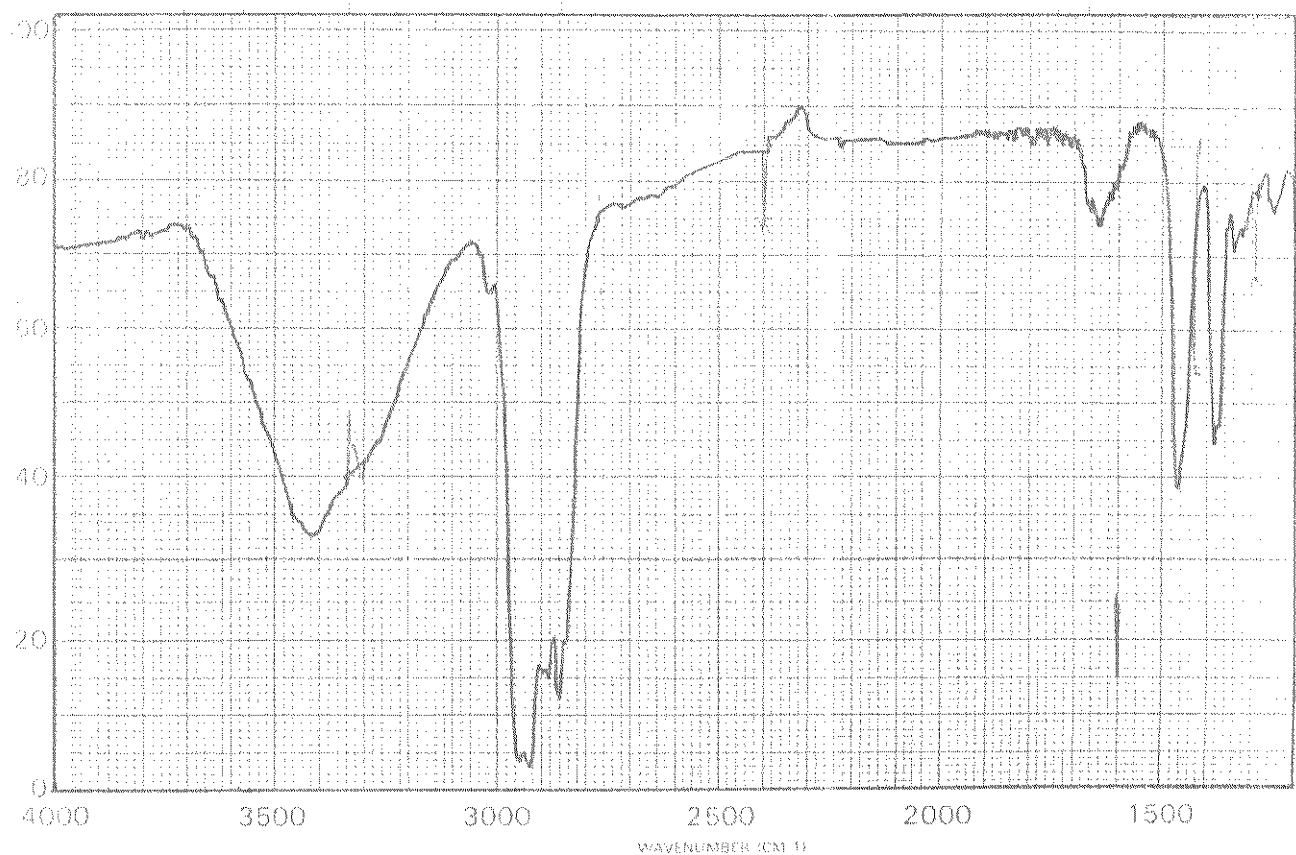


E.10 - Espectro de massa do pentadecanoato de etila 31

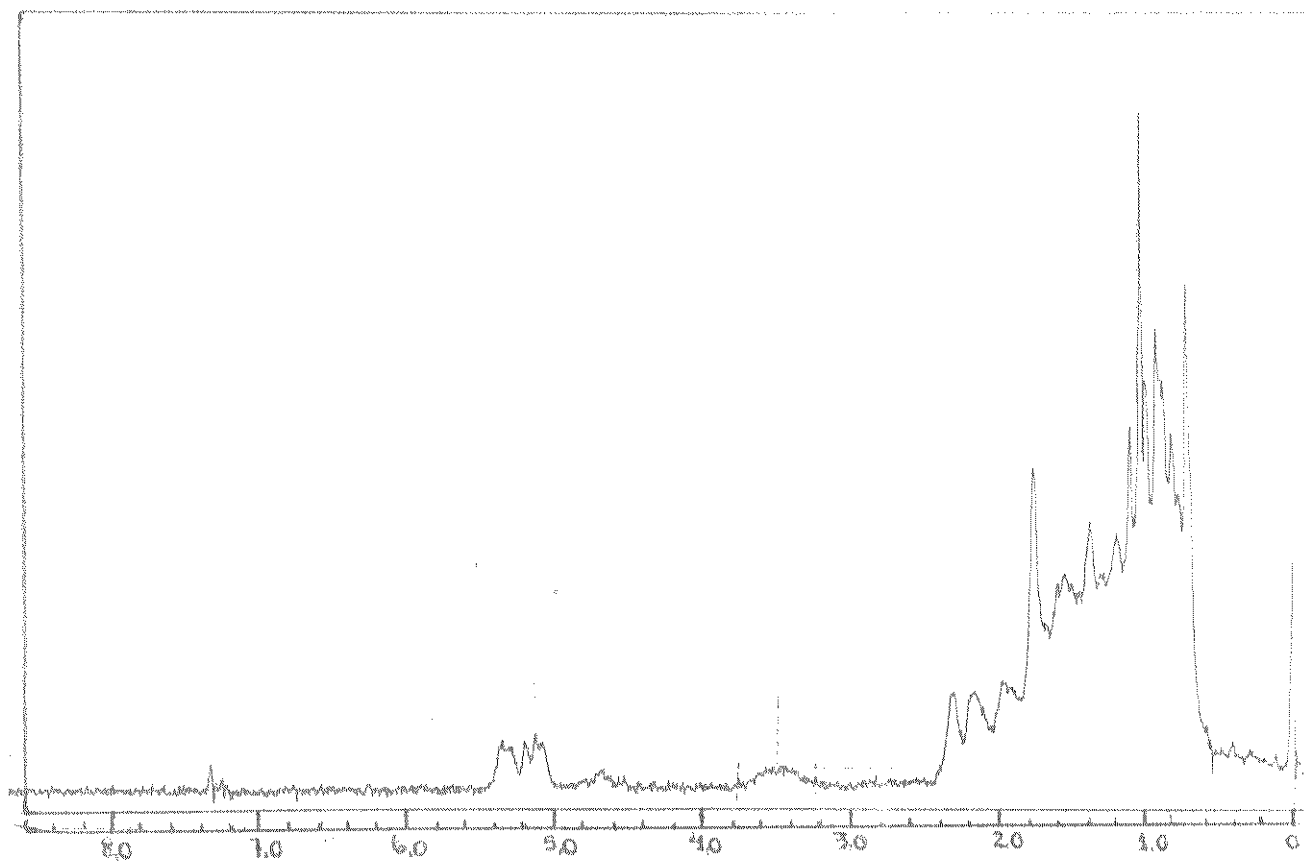


E.11 - Espectro de massa do palmitato de metila 32

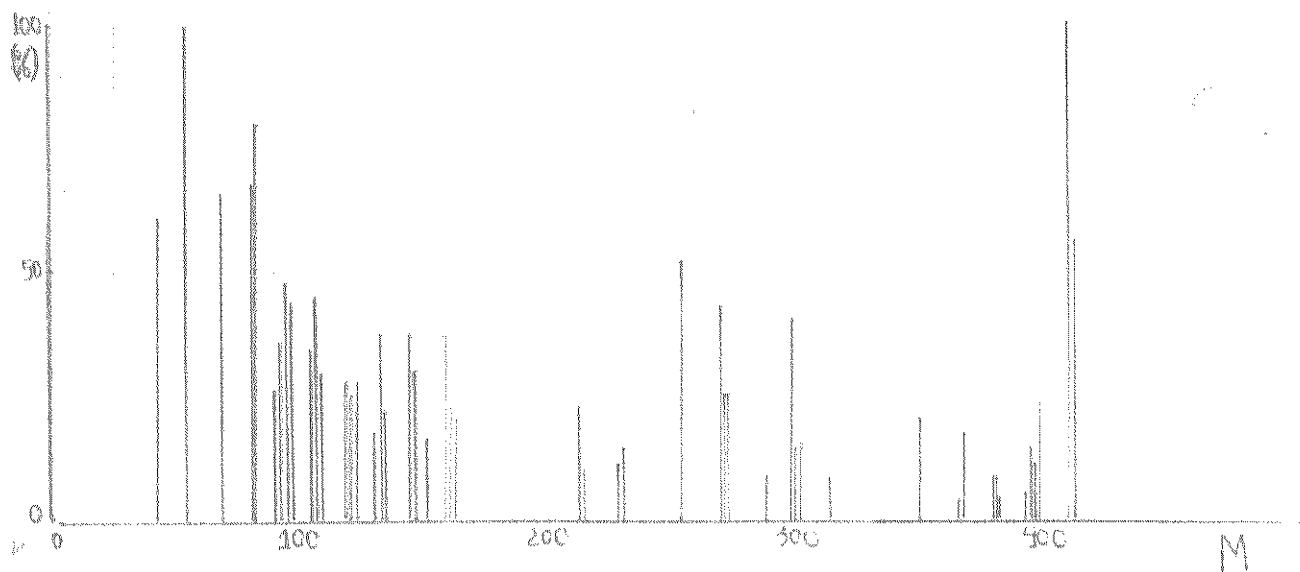




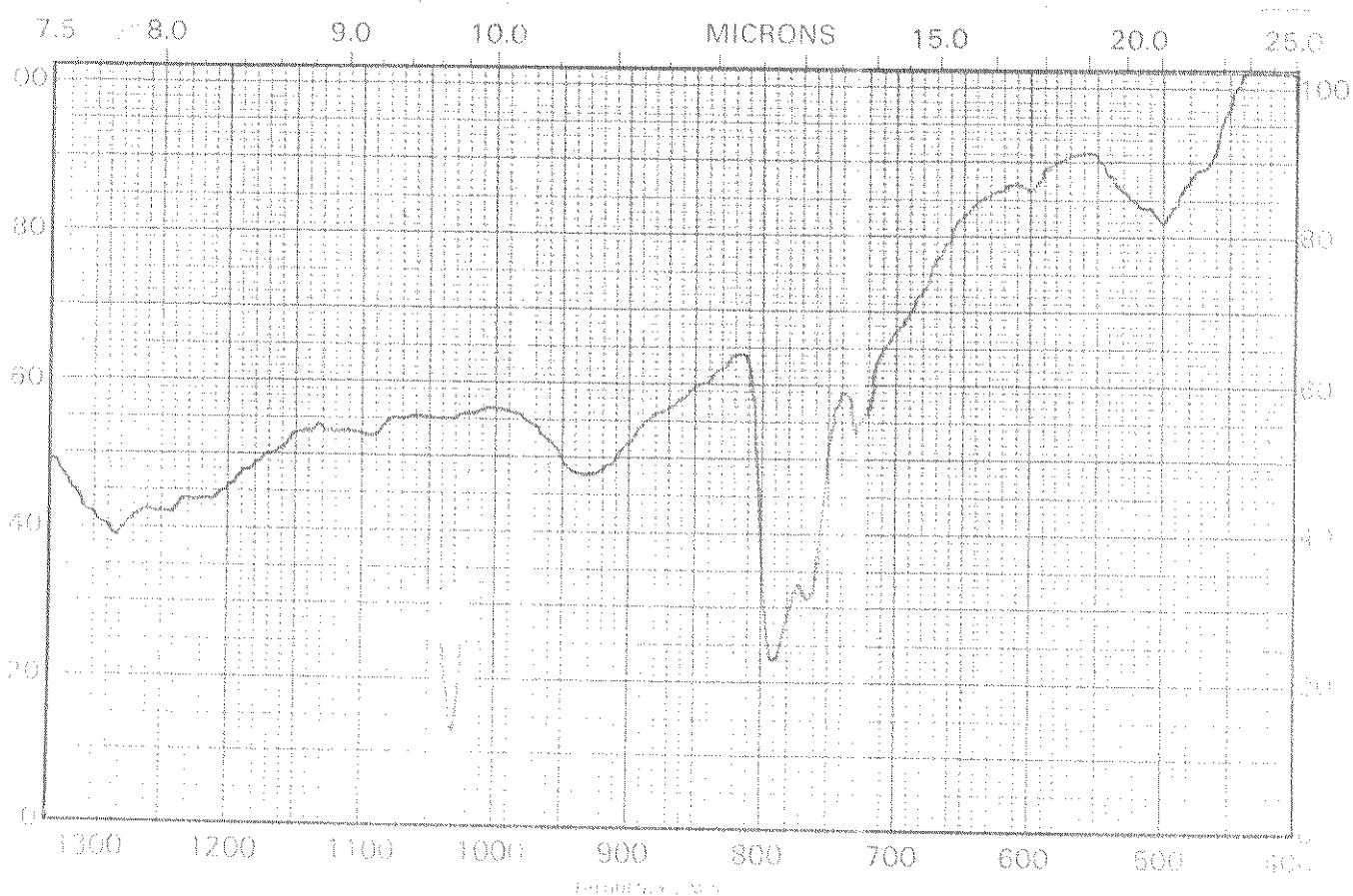
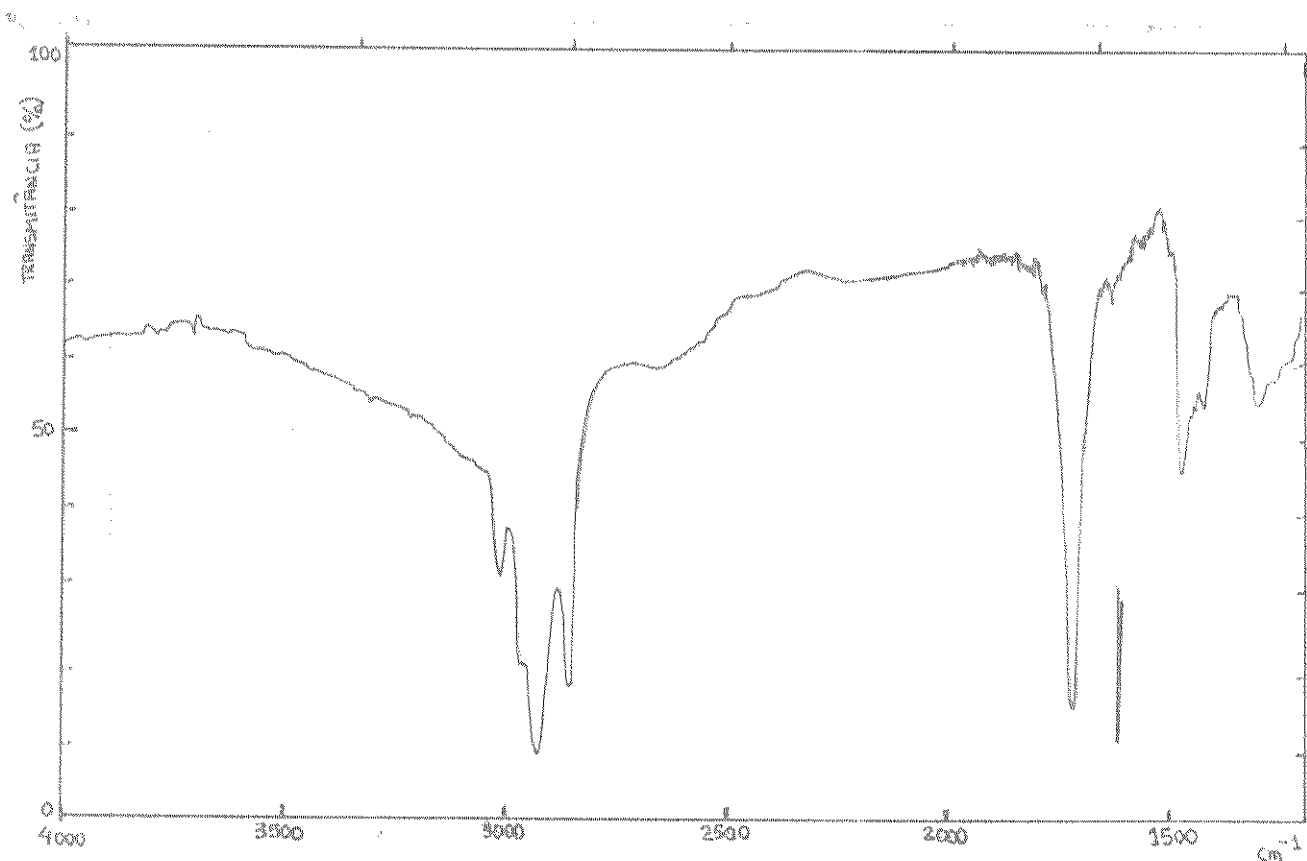
E.17 - Espectro de IV da mistura de esteróides



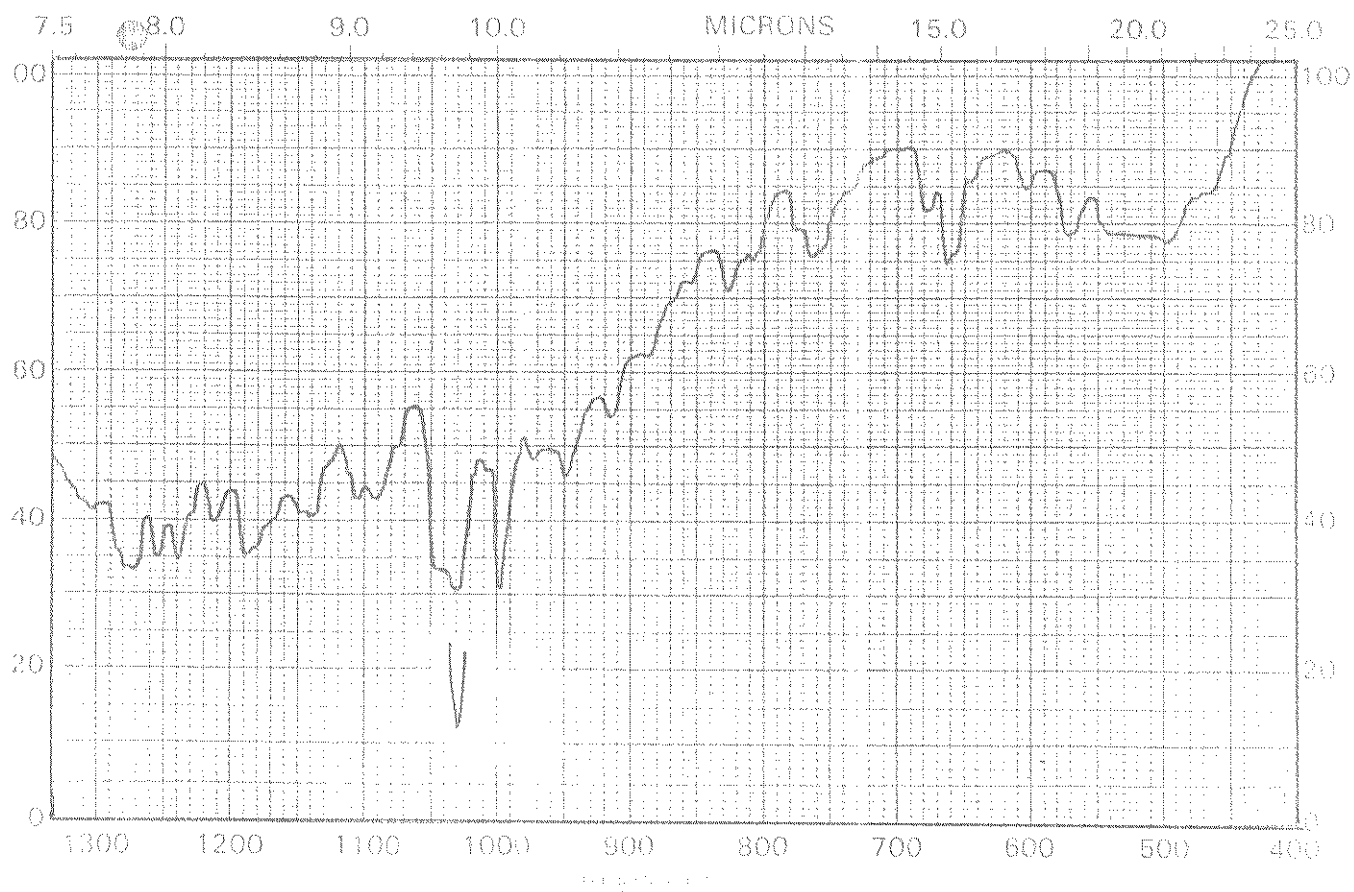
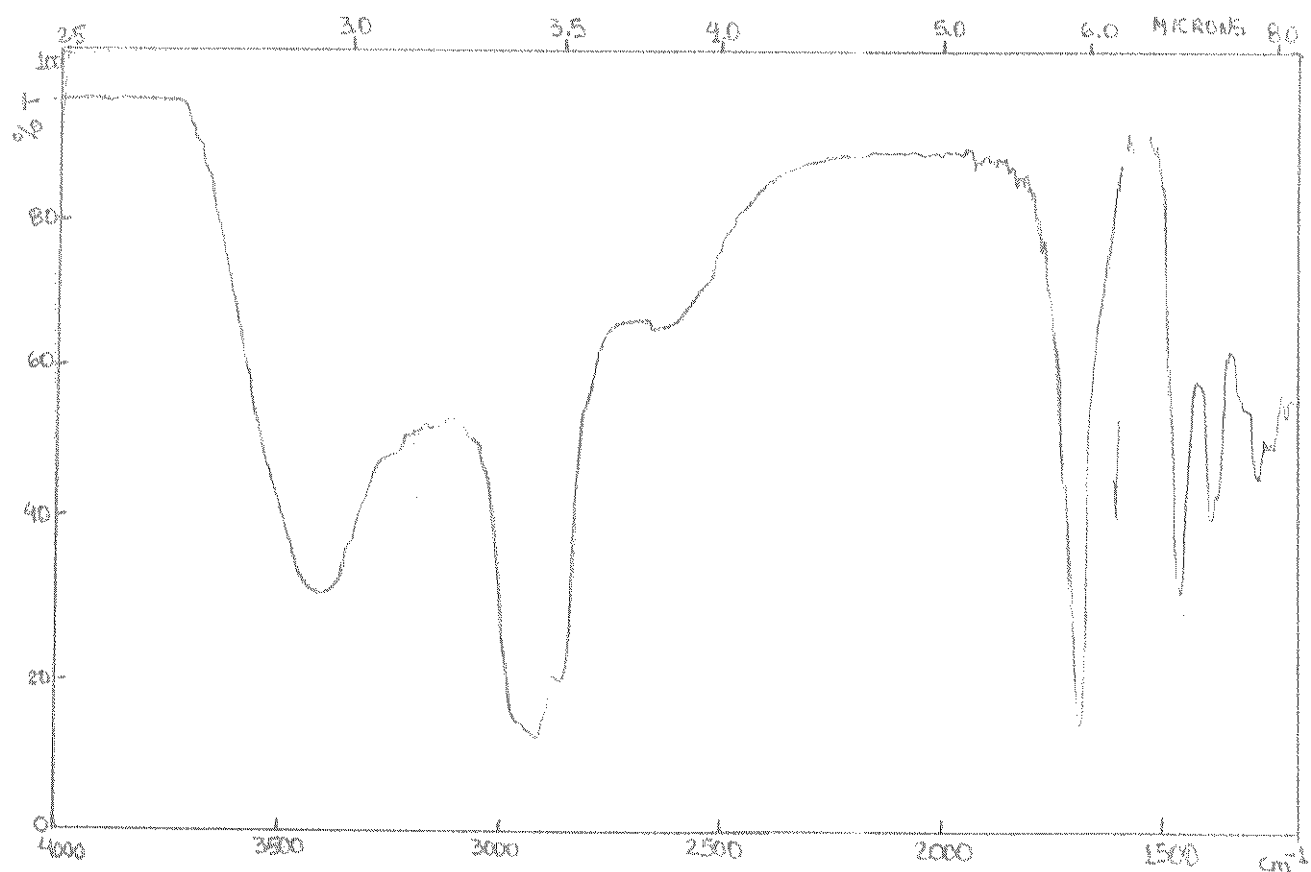
E.18 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) da mistura de esteróides



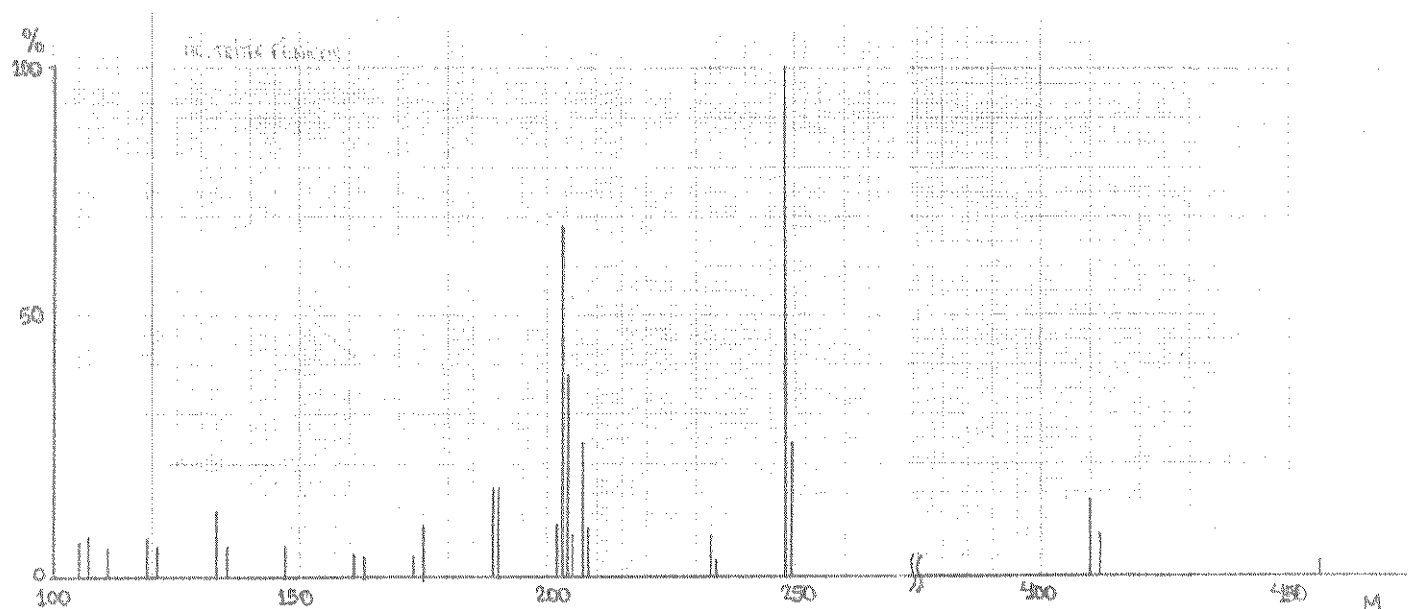
E.19 - Espectro de massa da mistura de esteróides



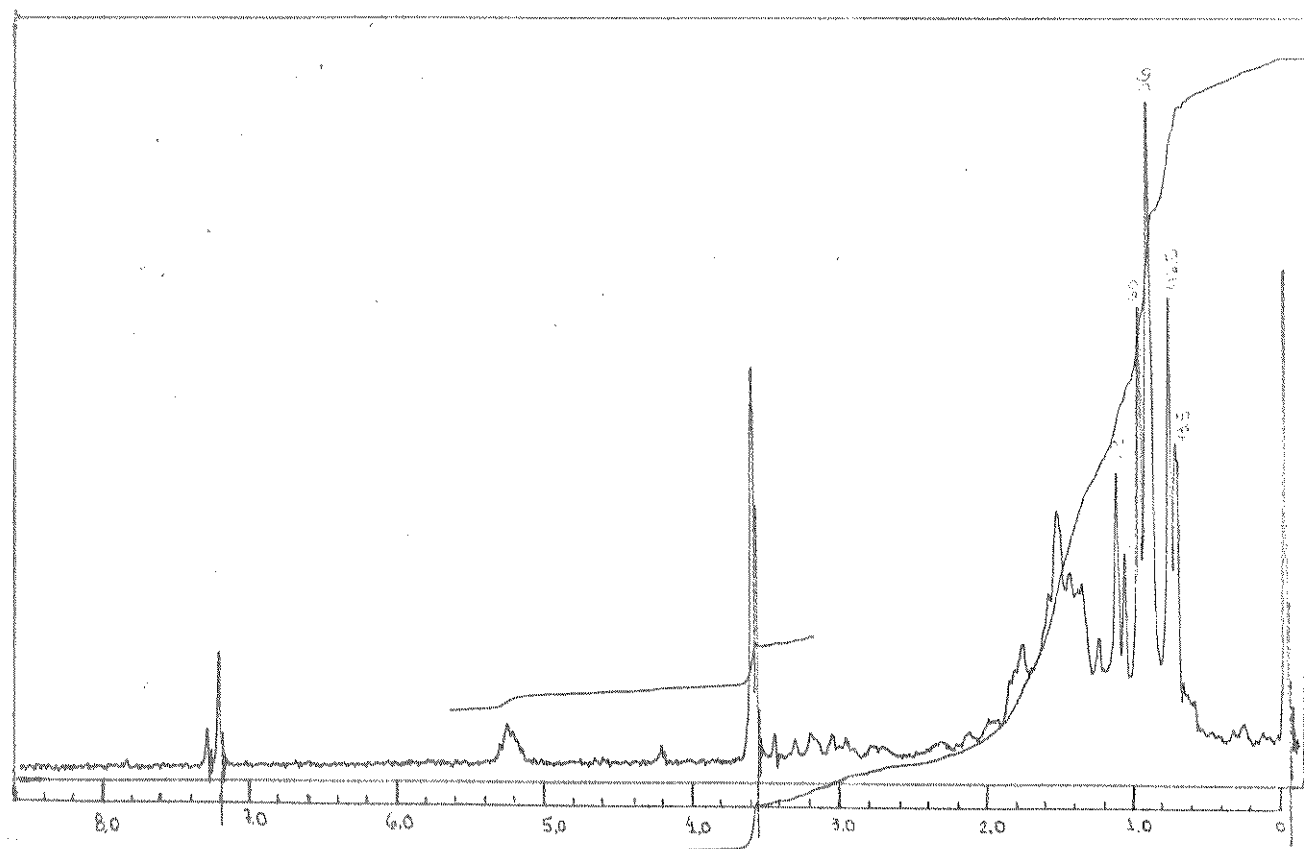
E20 - Espectro de IV da mistura de ácidos graxos



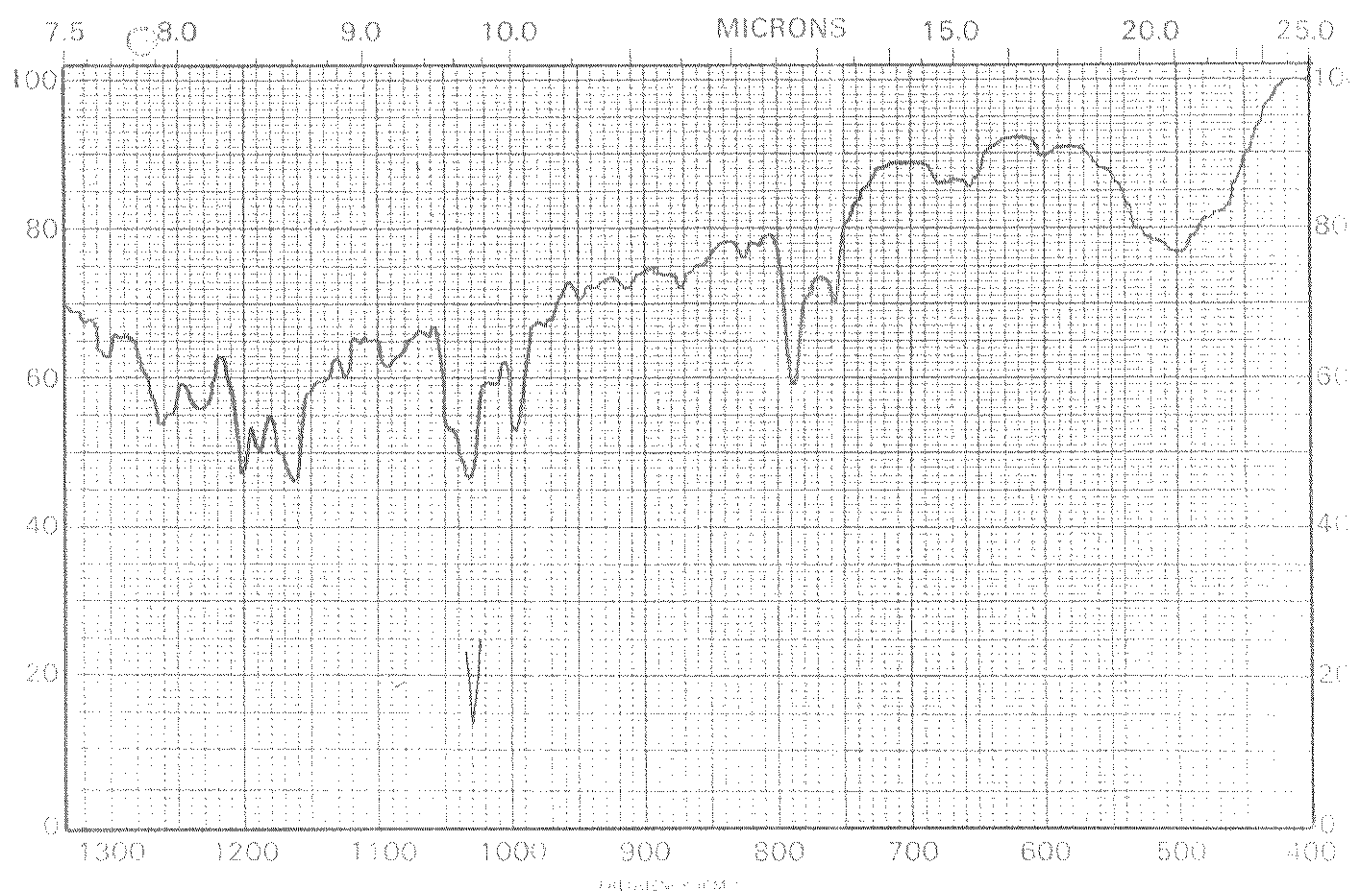
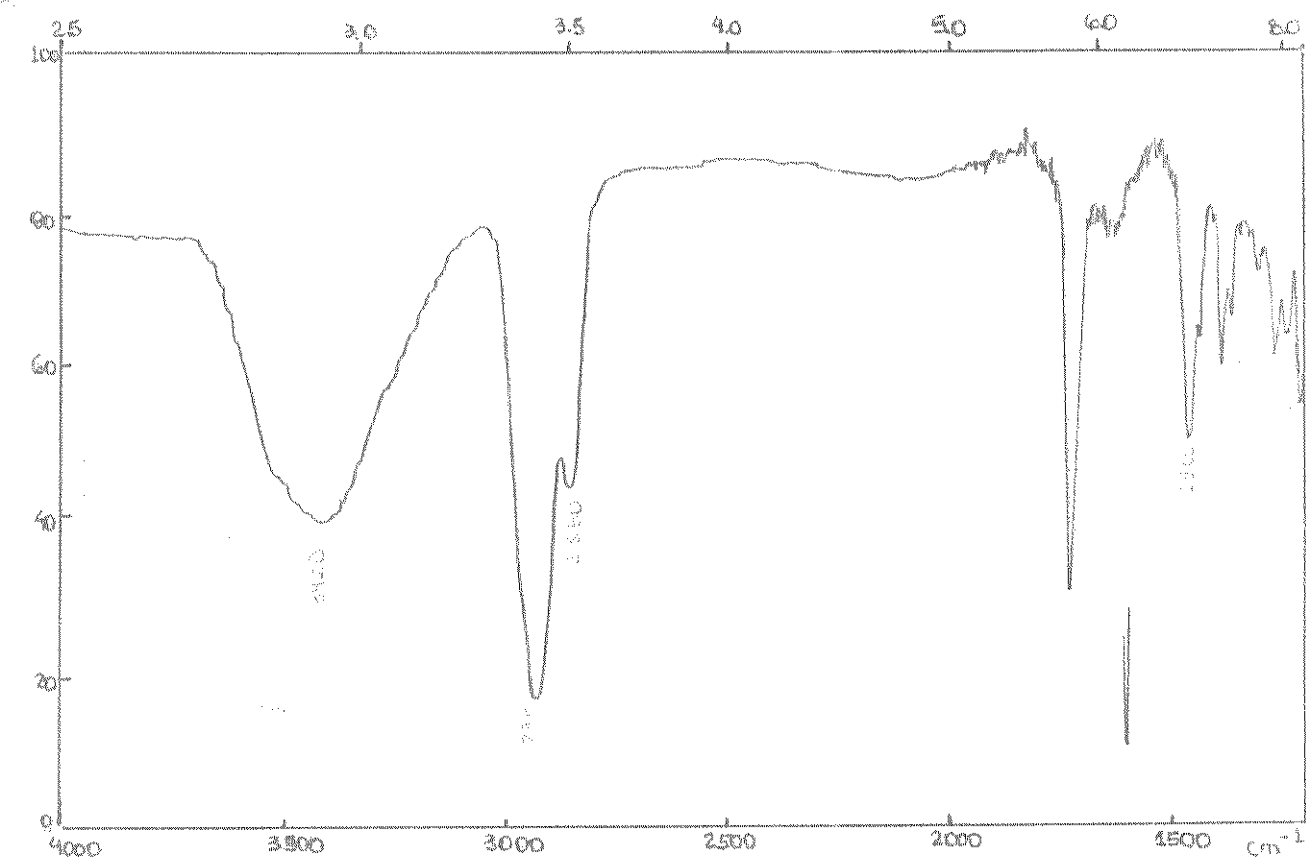
E.23 - Espectro de IV dos ácidos triterpênicos Gs 17,18



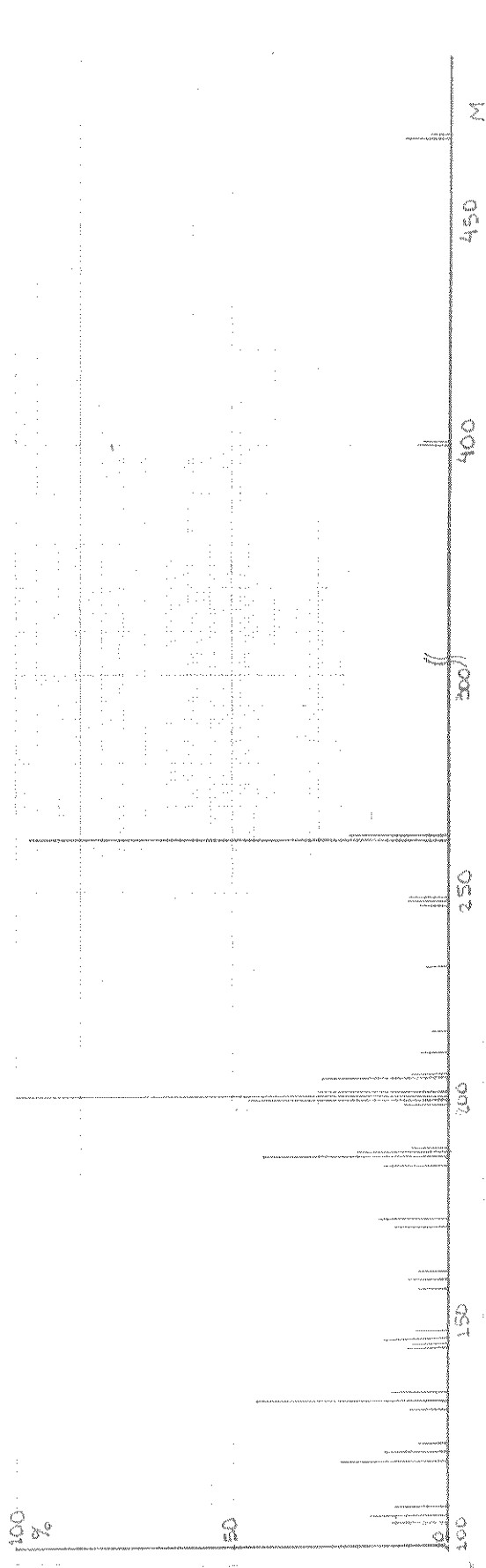
E.24 - Espectro de massa dos ácidos triterpênicos Gs 17,18



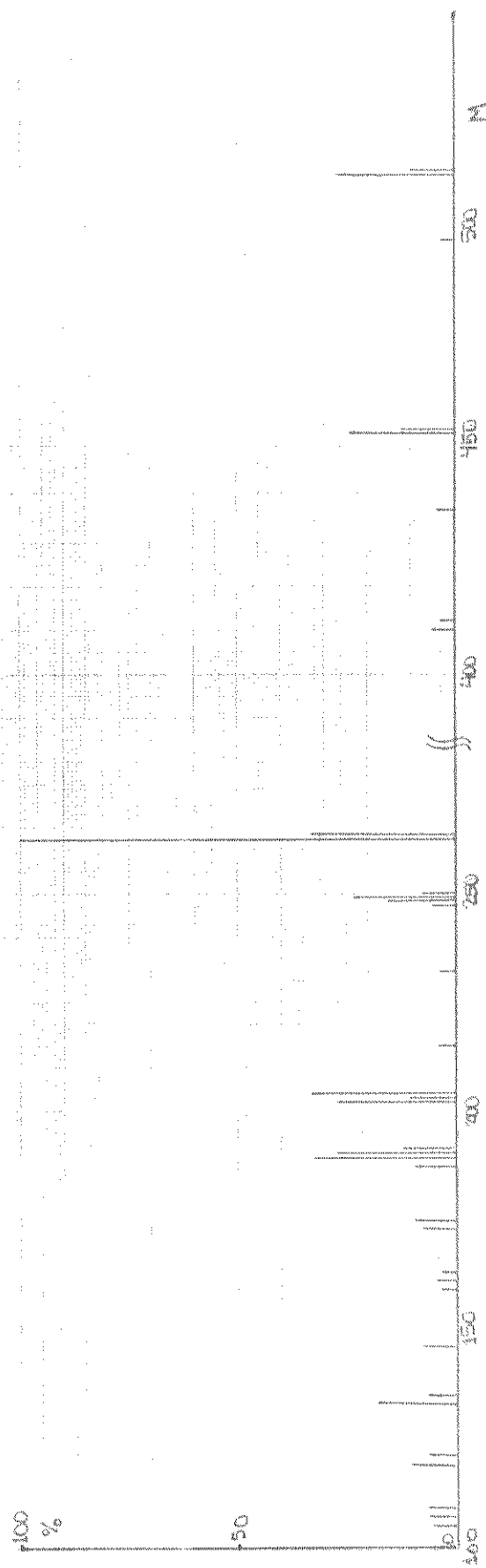
E.26 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) de Gs 17,18-Me



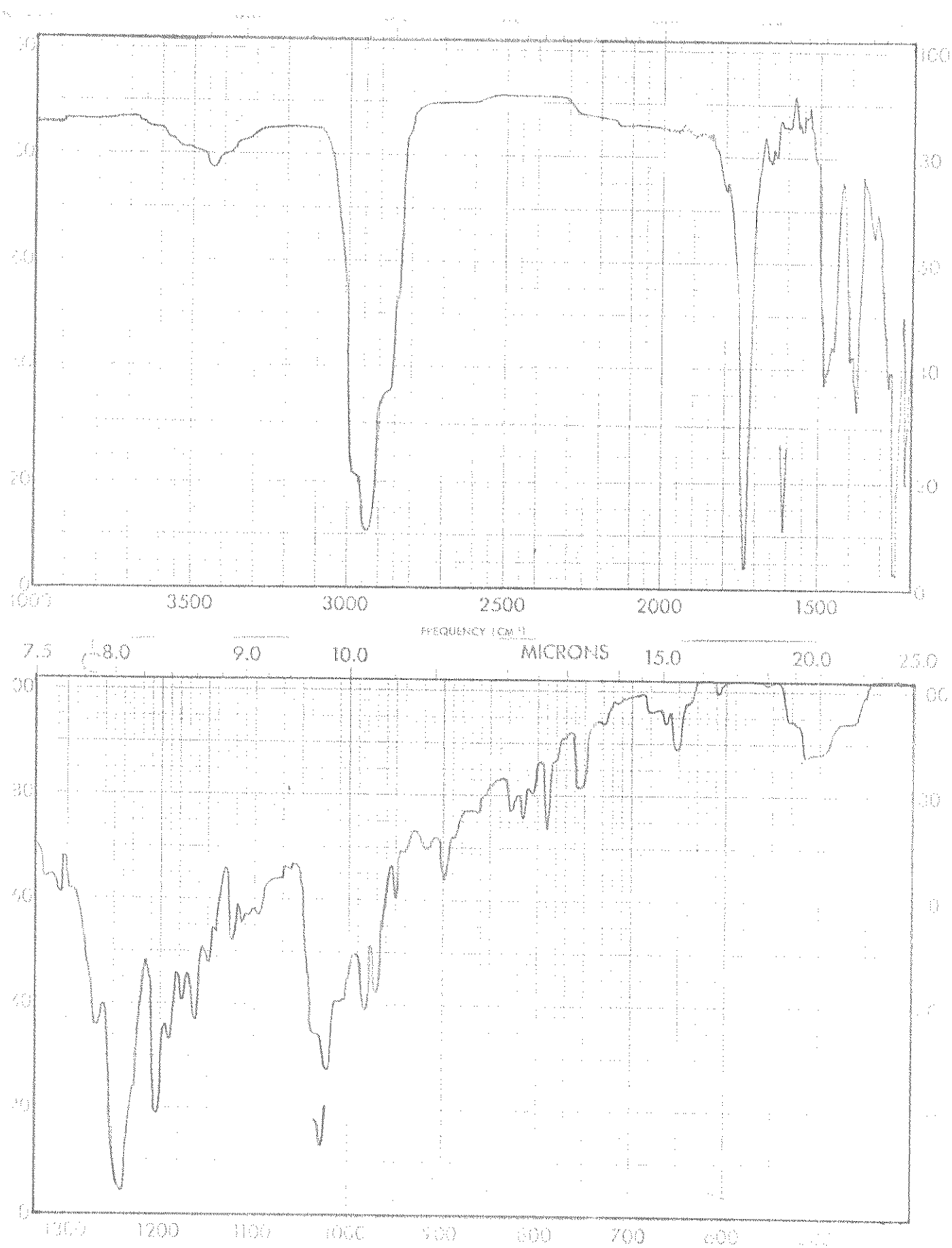
E.25 - Espectro de IV do Gs 17,18-Me



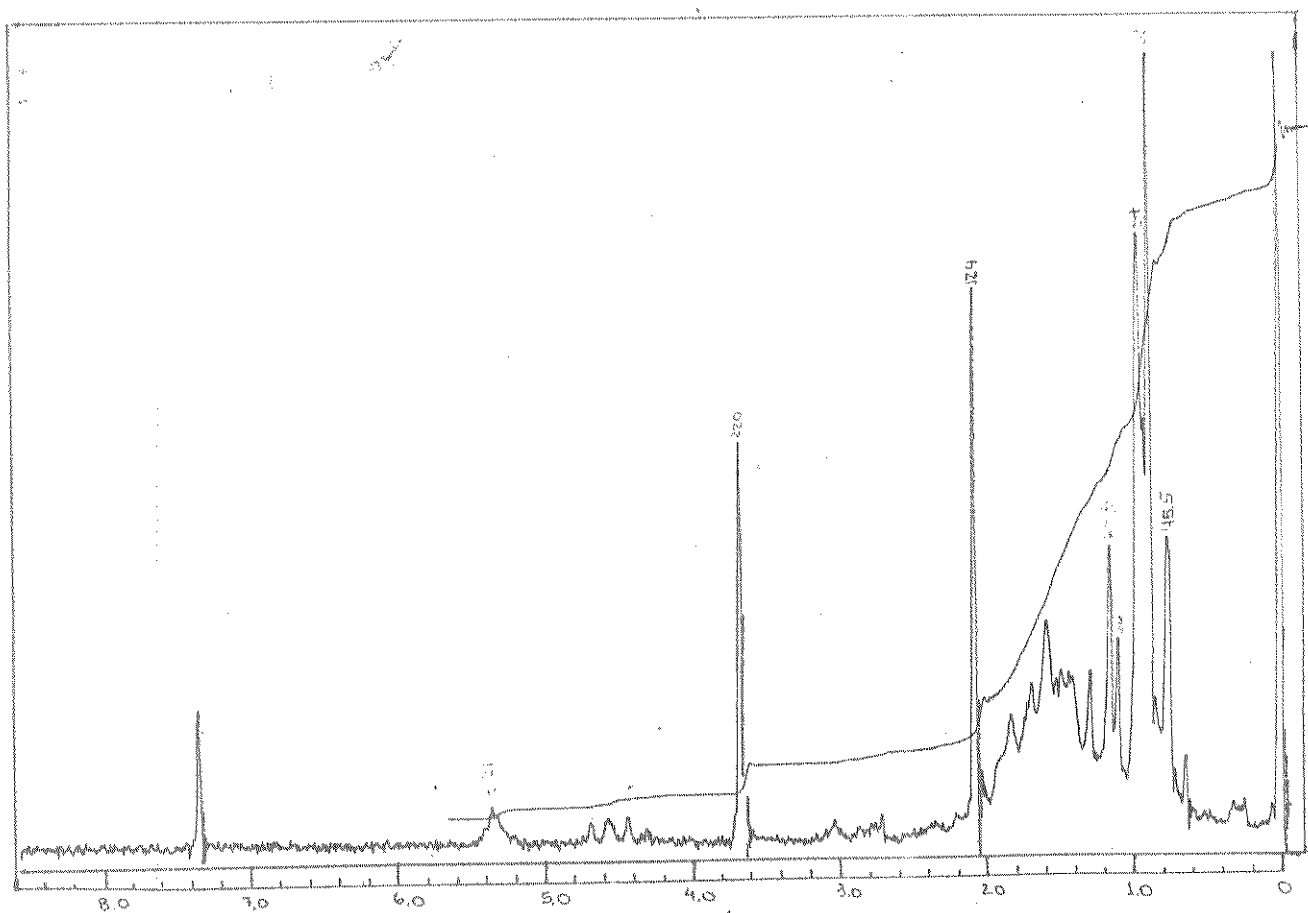
E.27 - Espectro de massa de Gs 17,18-Me



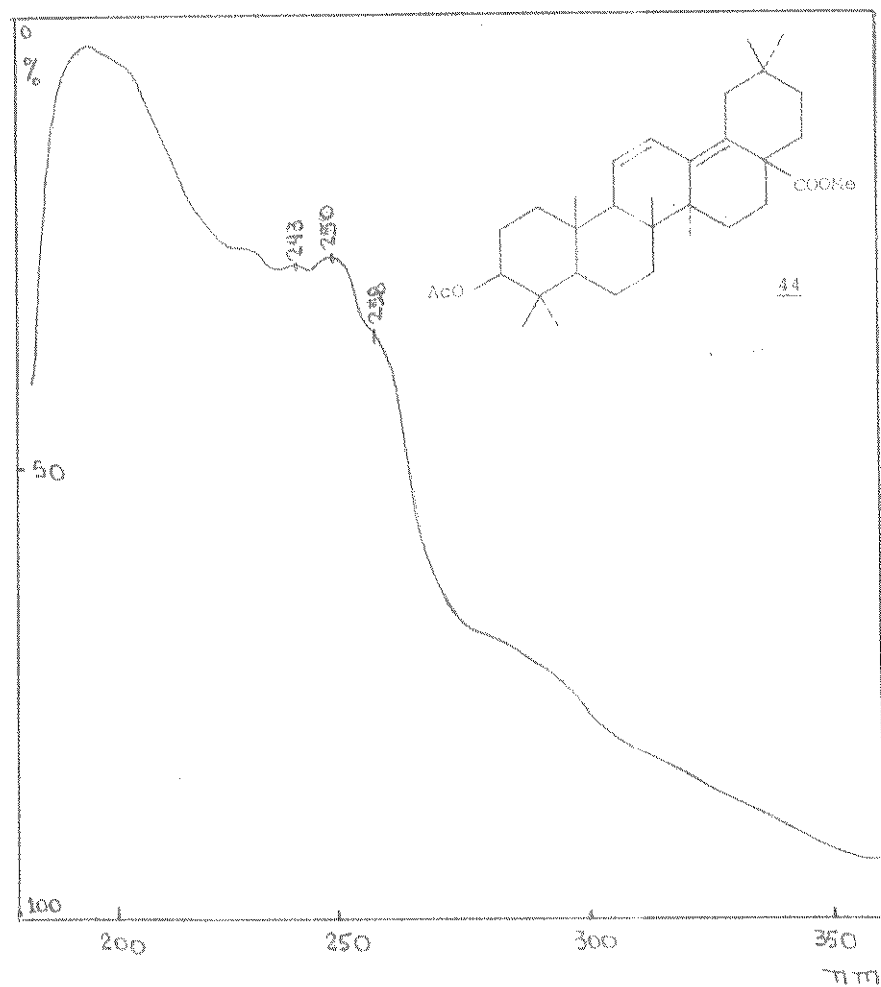
E.30 - Espectro de massa de Ac-Gs 17,18-Me



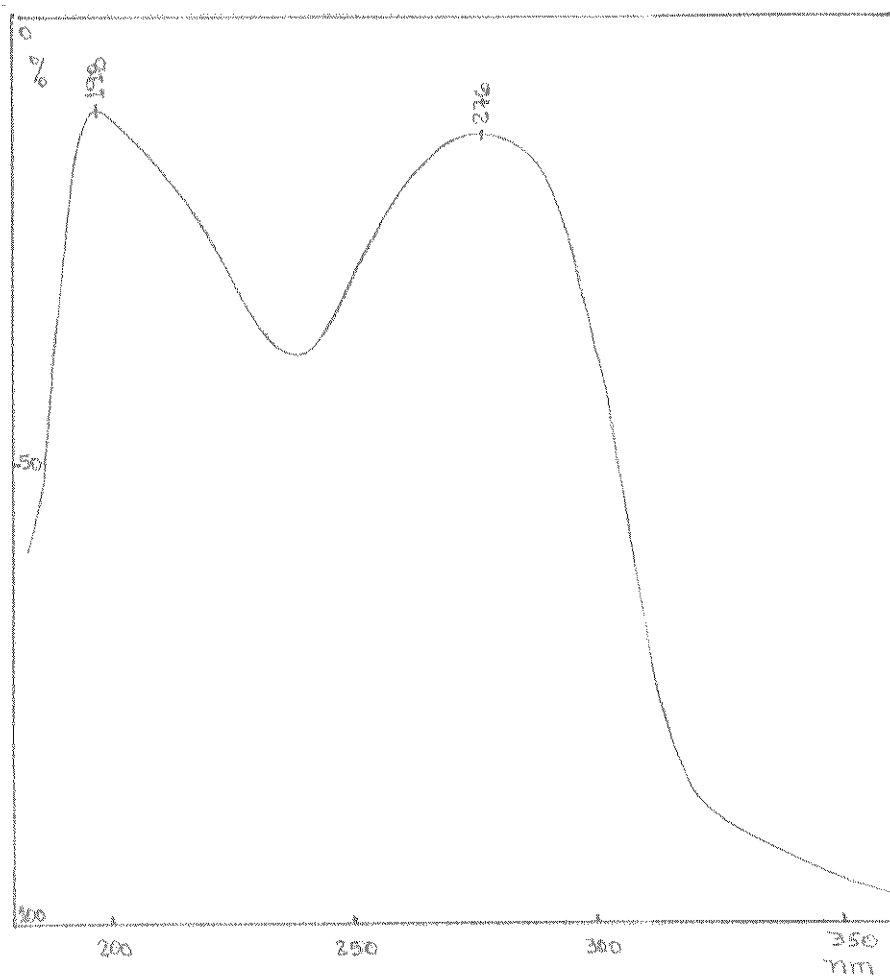
E.28 - Espectro de IV de Ac-Gs 17,18-Me



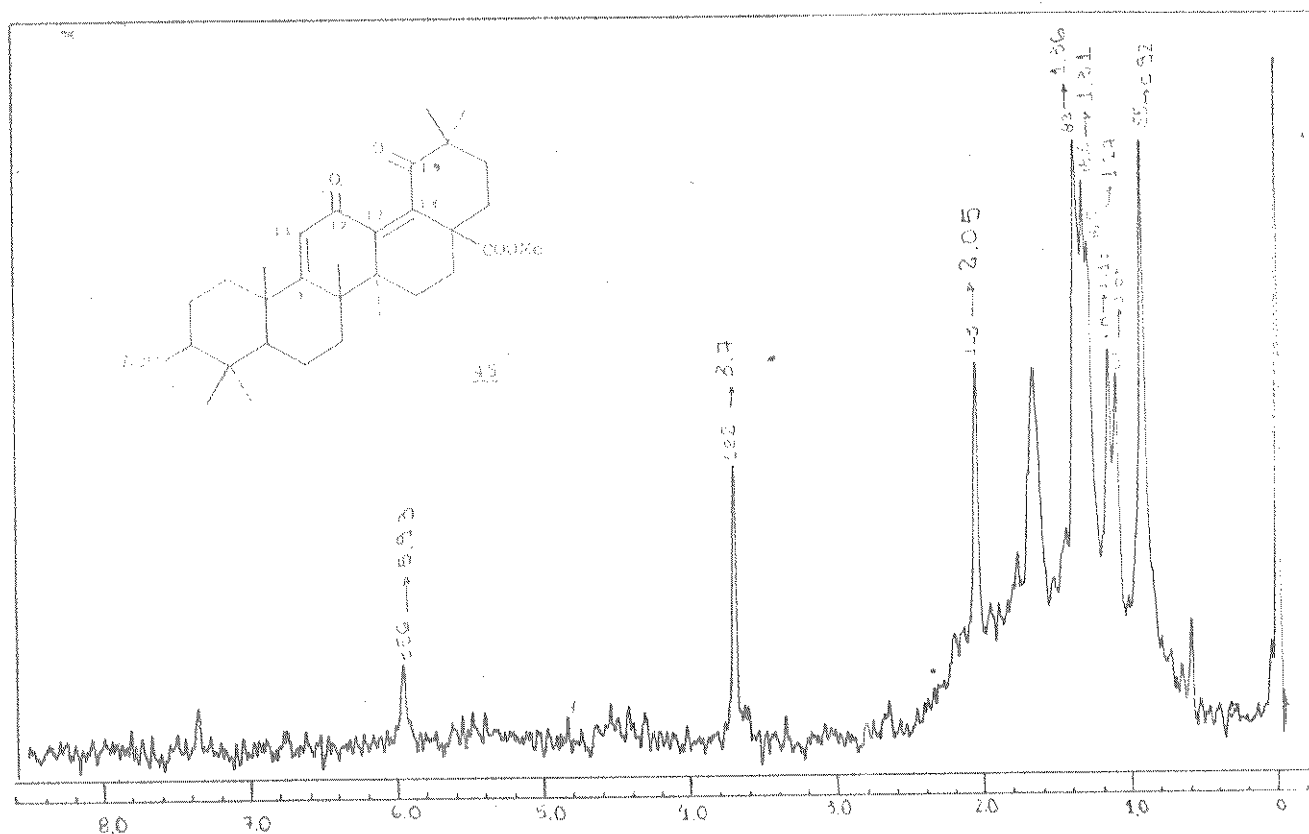
E.29 - Espectro de RMN¹H (60 MHz) de Ac-Gs 17,18-Me



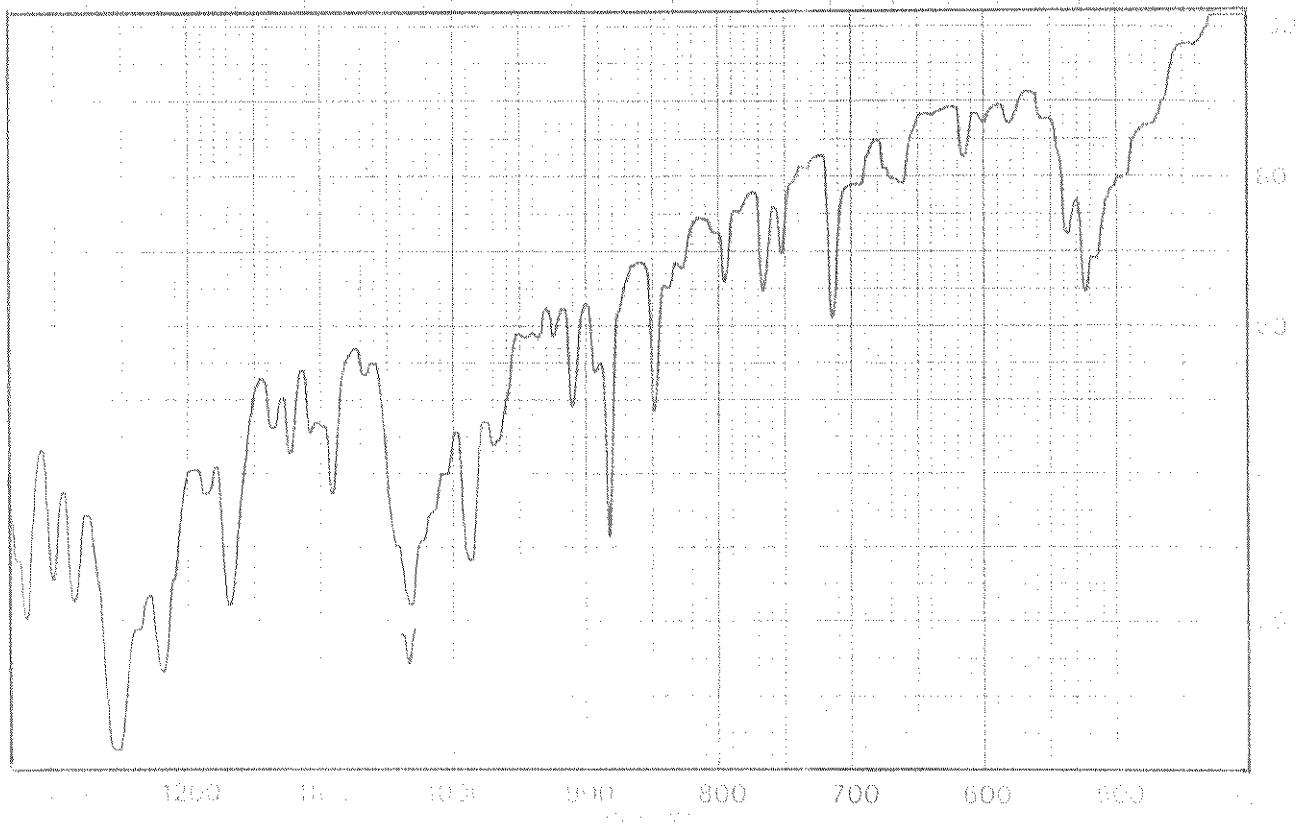
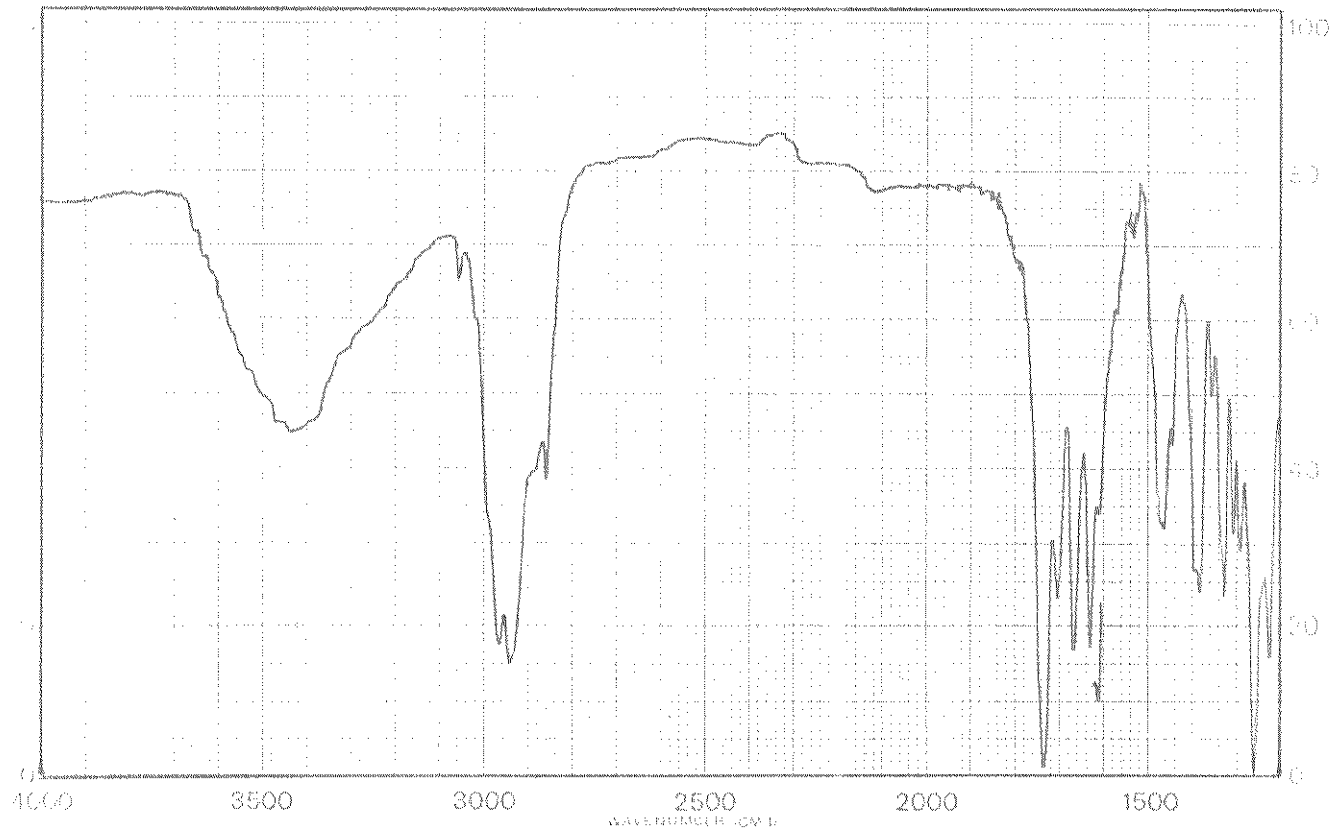
E.31 - Espectro de UV do $\Delta^{11,13(18)}$ -dieno 44



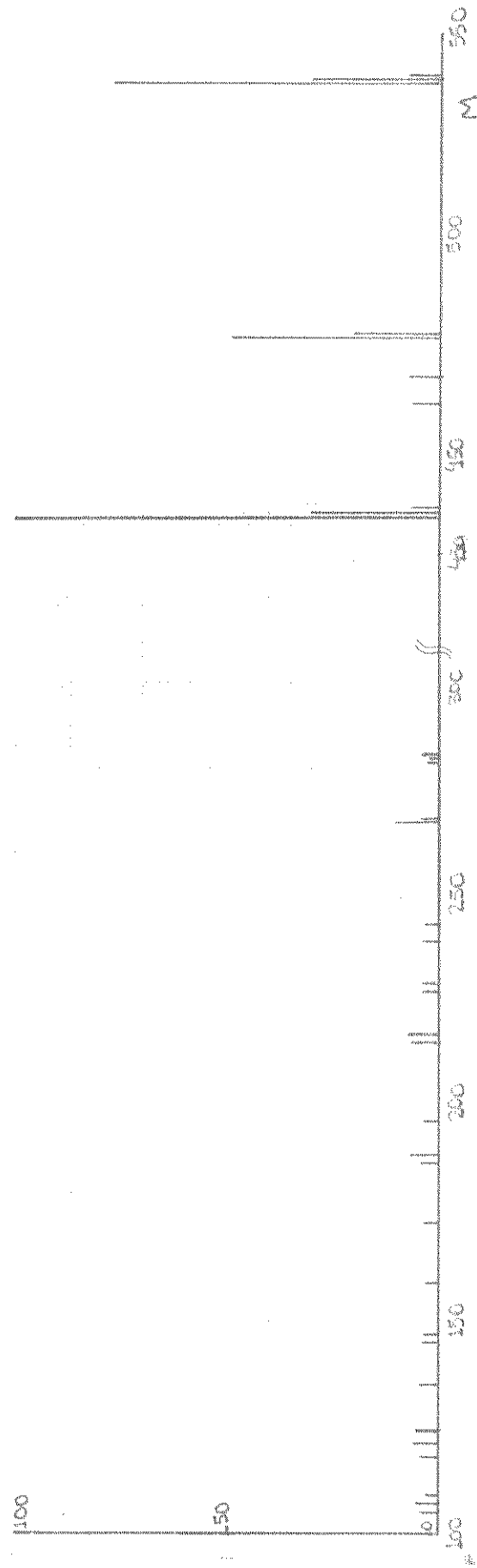
E.32 - Espectro de UV do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieno-12,19-diona 45



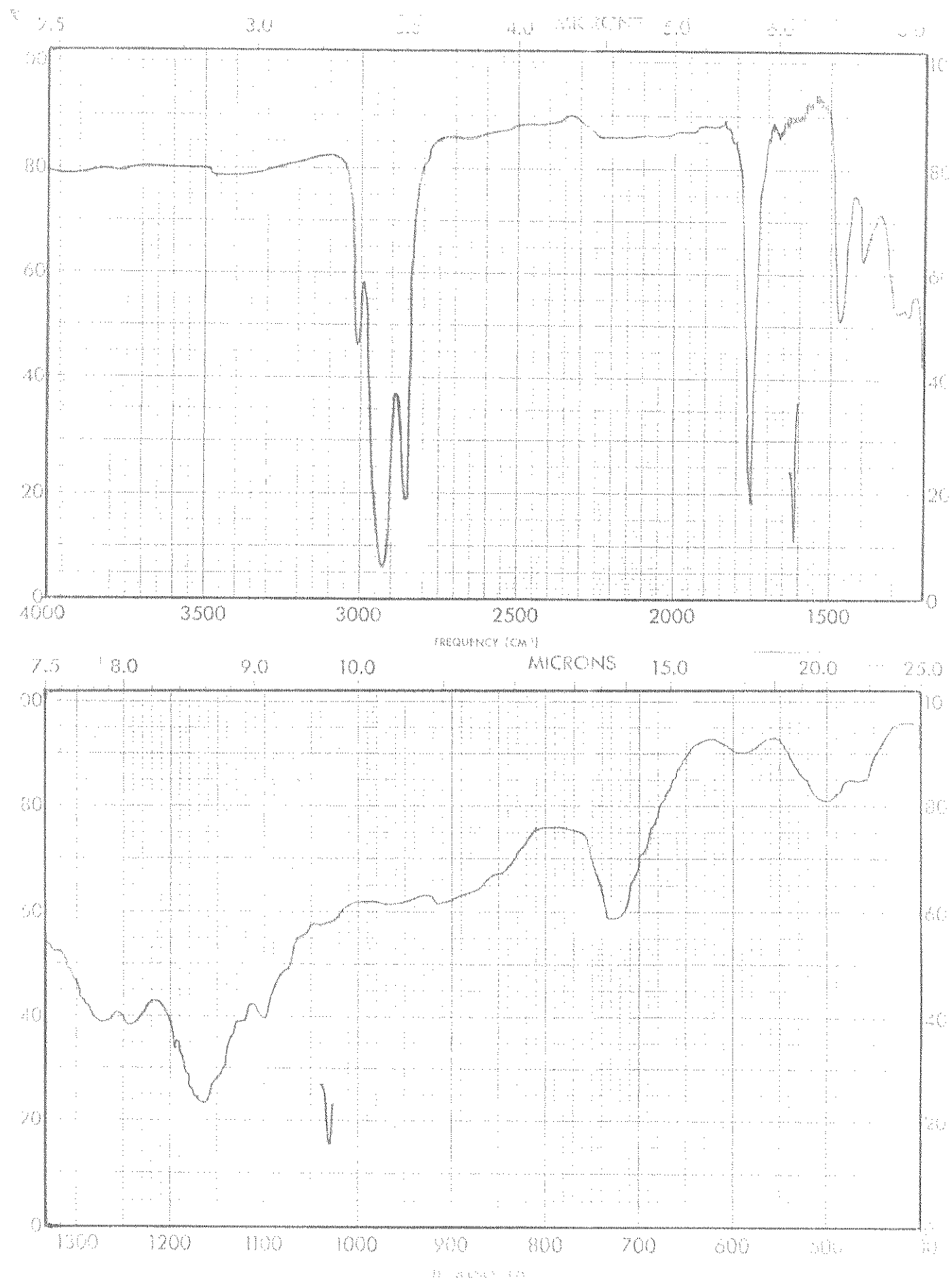
E.34 - Espectro de RMN ^1H (60 MHz) do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieno-12,19-diona 45



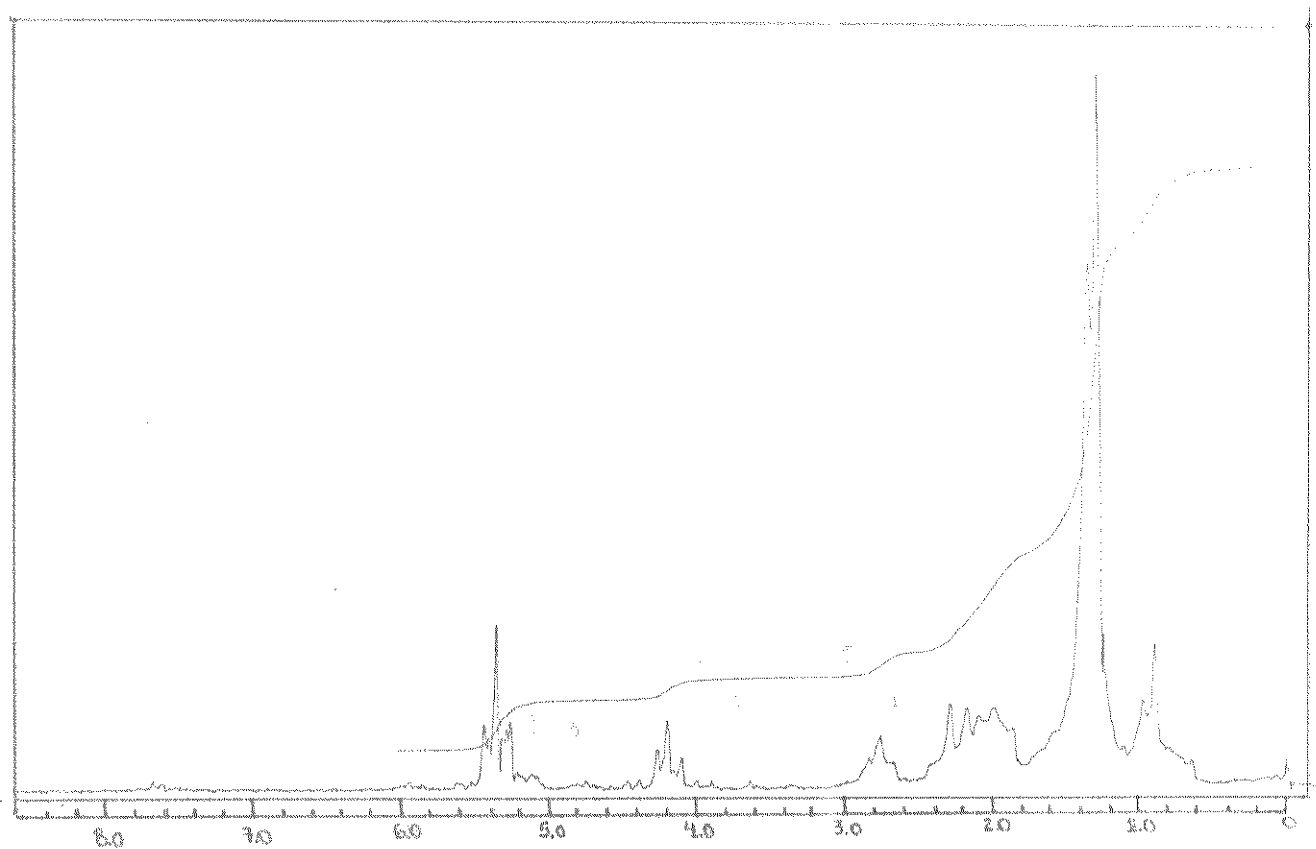
E.33 - Espectro de IV do $\Delta^{9(11),13(18)}$ -dieno-12,19-diona 45



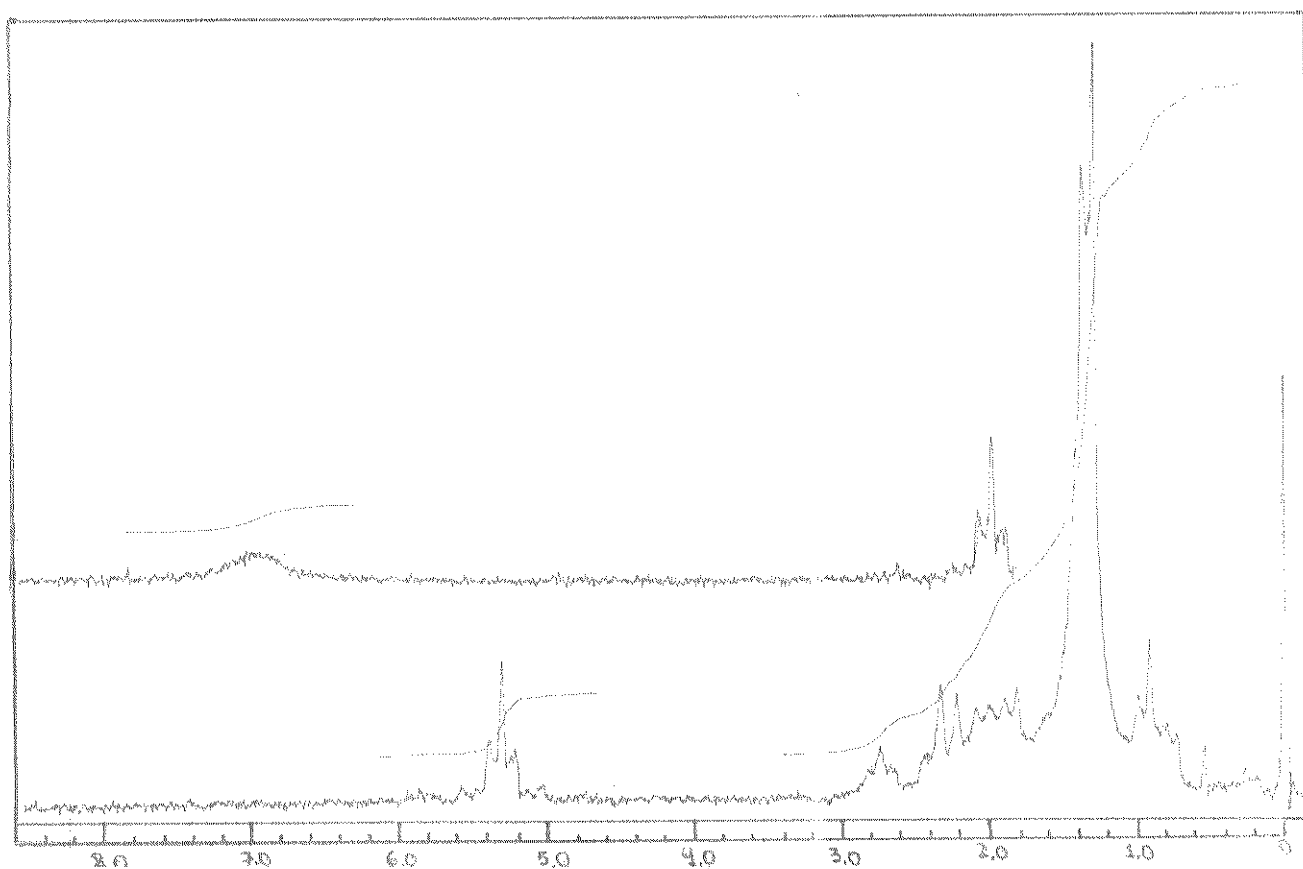
E.35 - EM do $\Delta^9(11),13(18)$ -dieno-12,19-diona 45



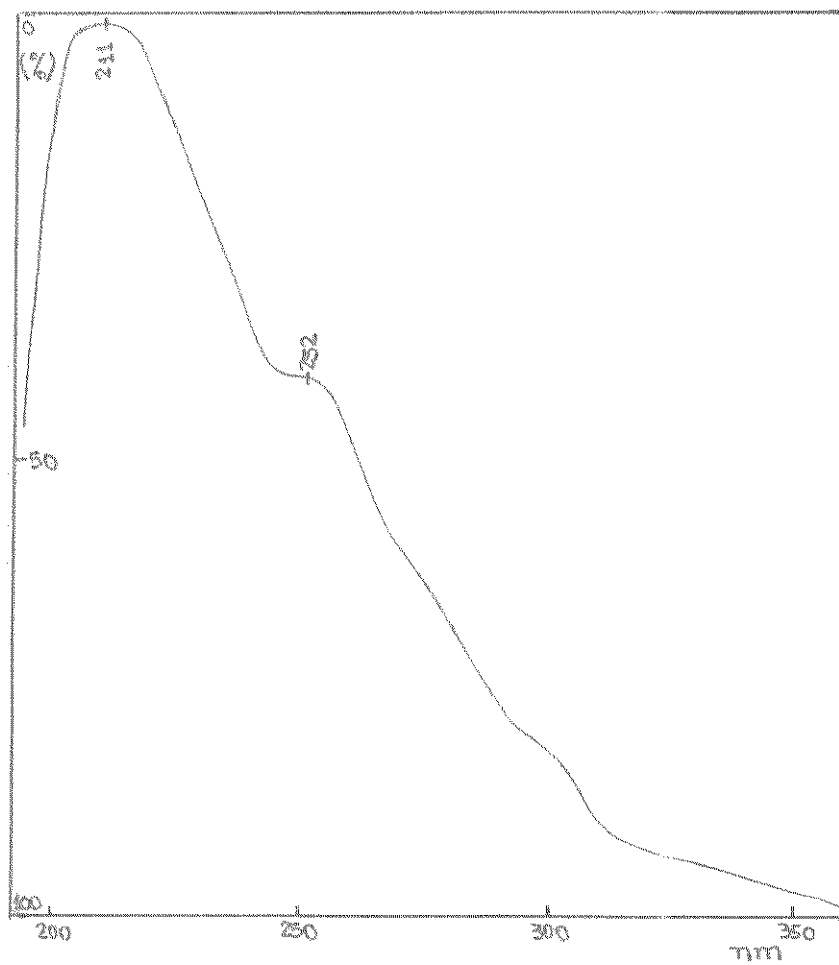
E.36 - Espectro de IV de Gs 9



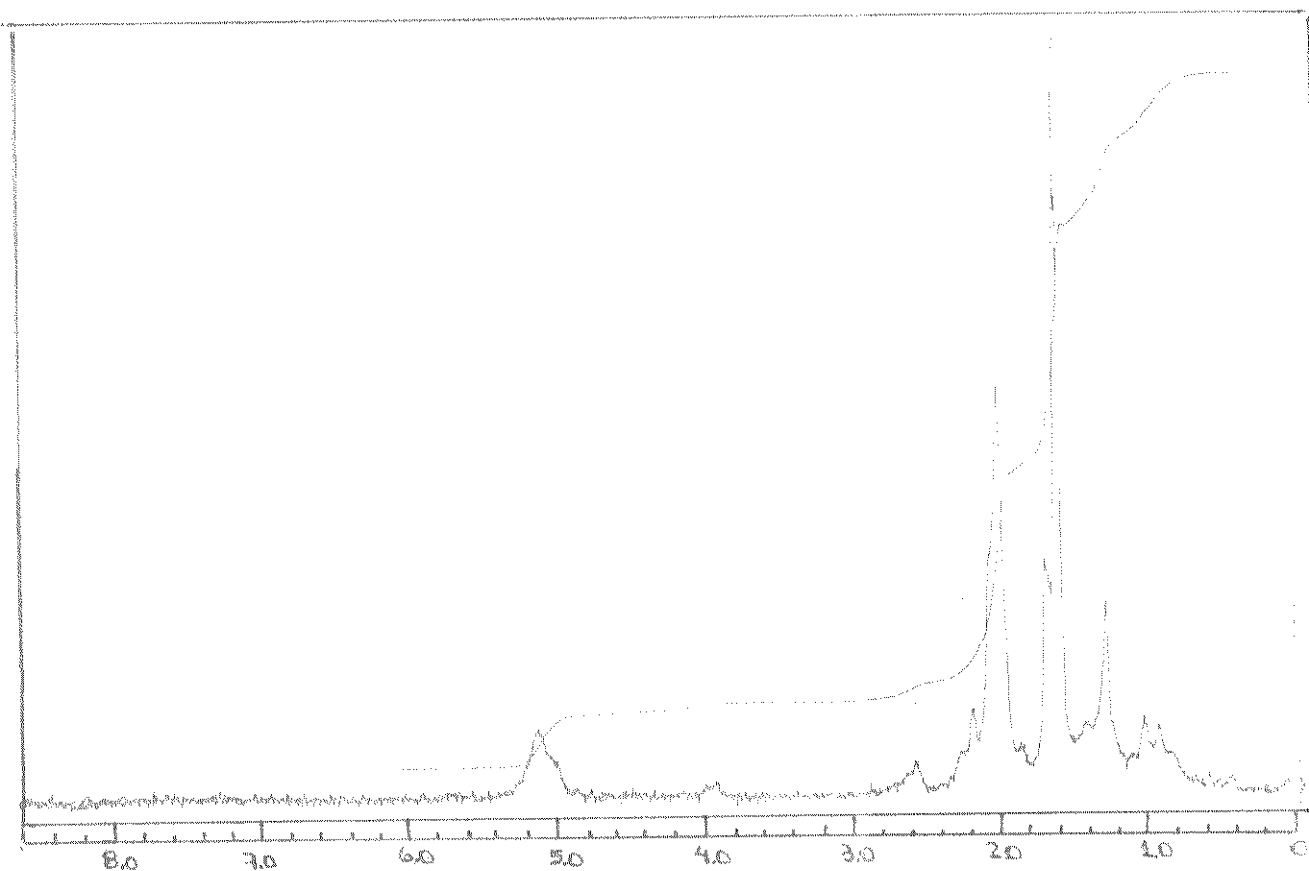
E.37 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) de Gs 9

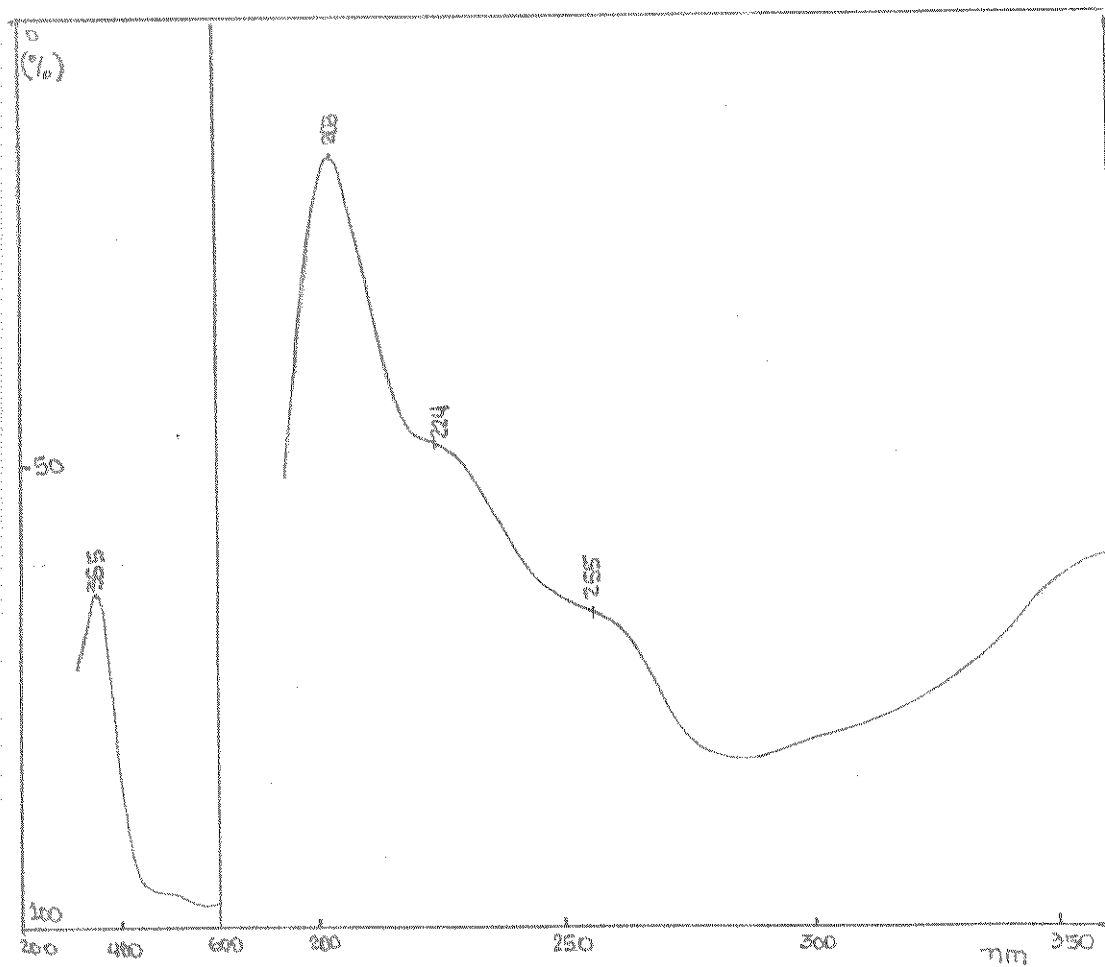


E.38 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) da porção ácida de Gs 9 - Produto de hidrólise

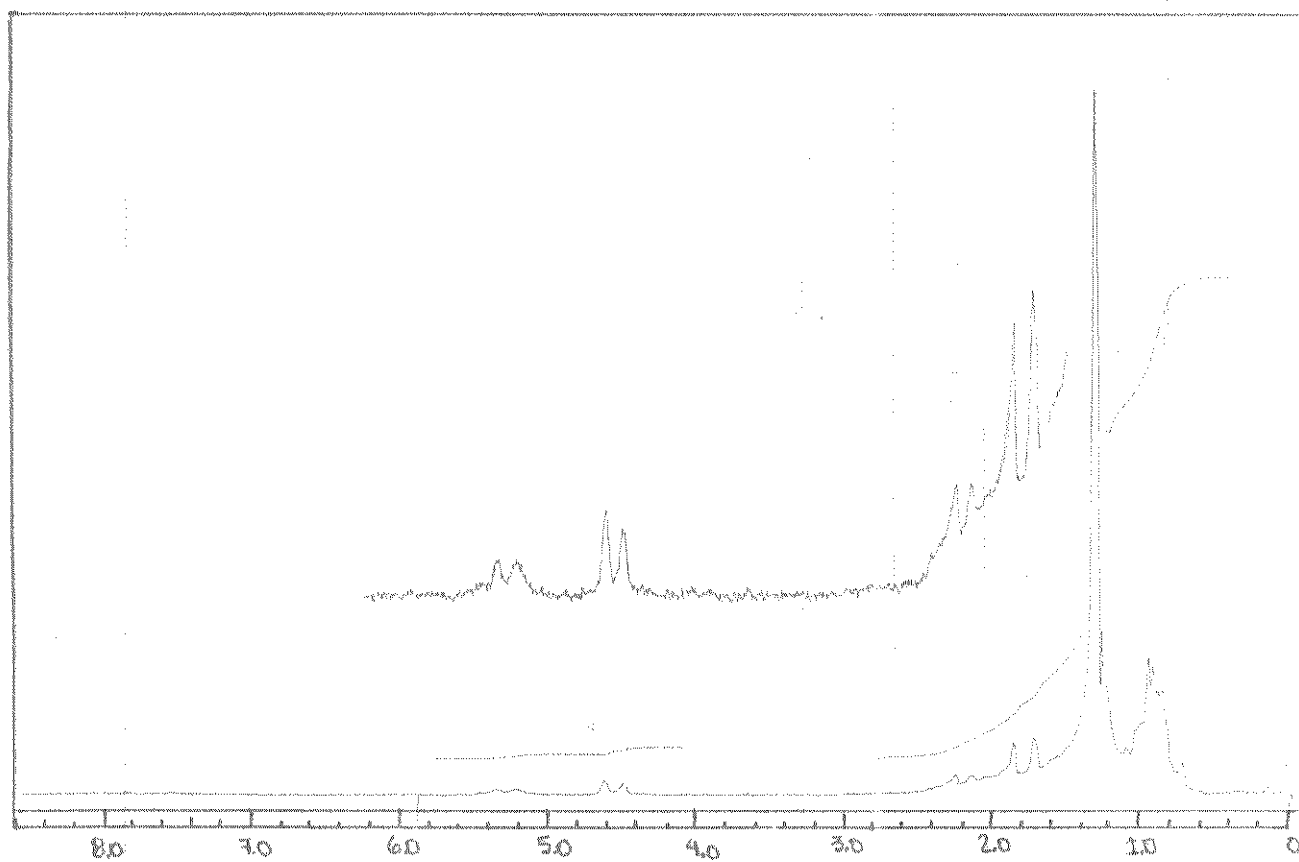


E.39 - Espectro de UV de Gs 19

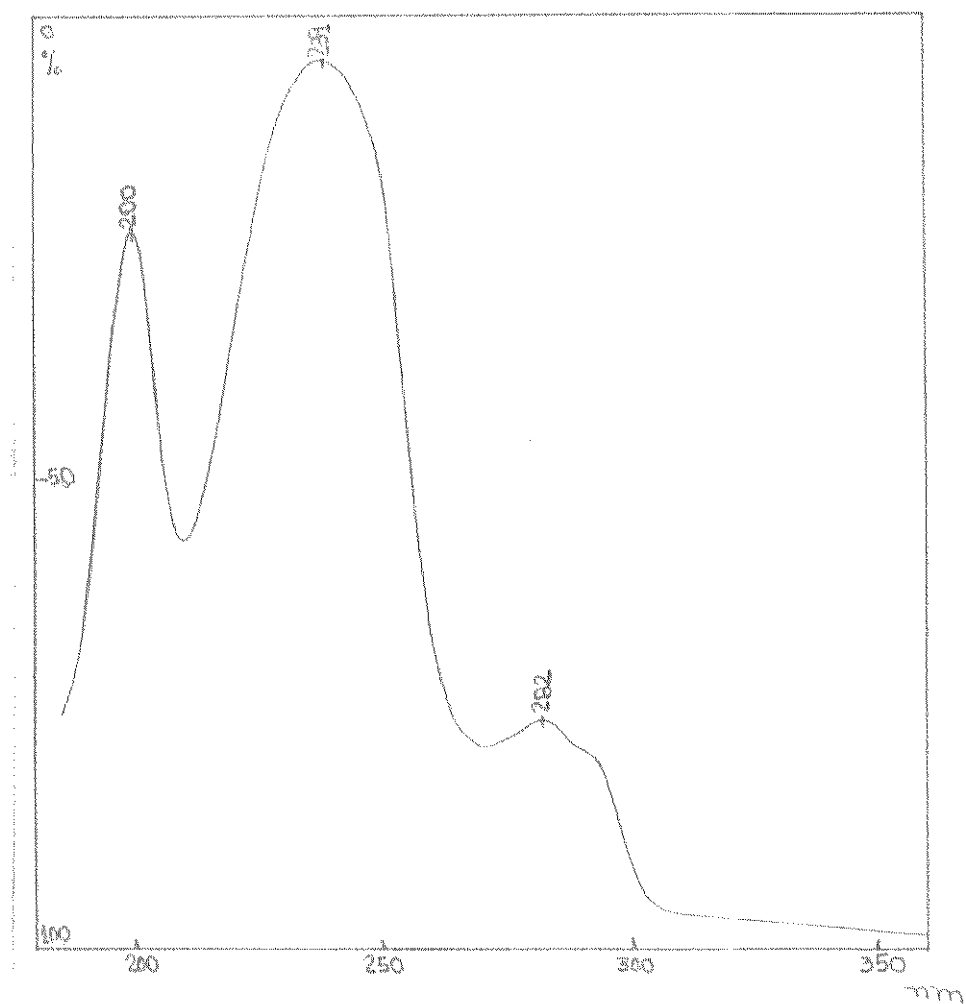
E.40 - Espectro de RMN¹H (60 MHz) de Gs 19



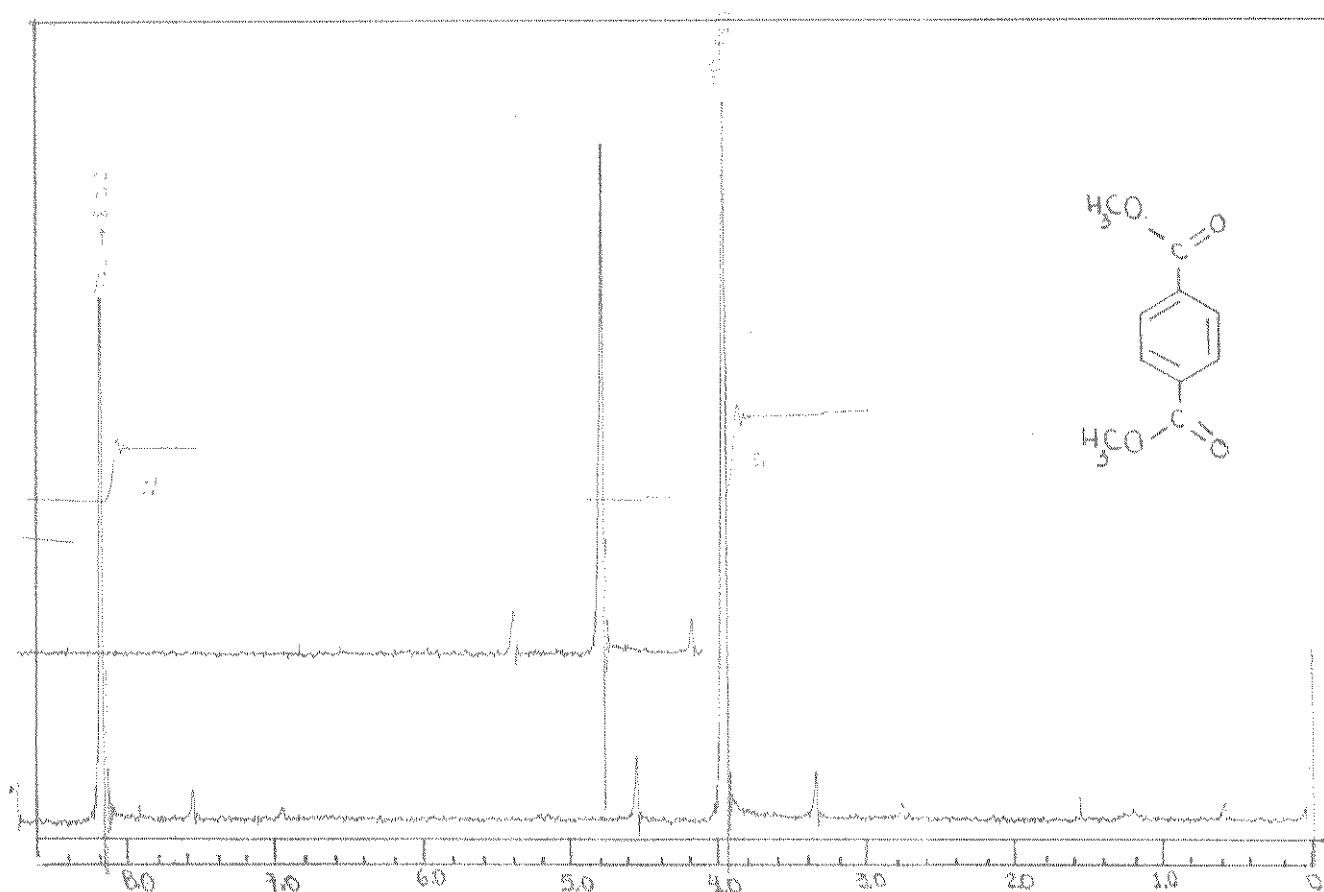
E.41 - Espectro de UV de Gs 20



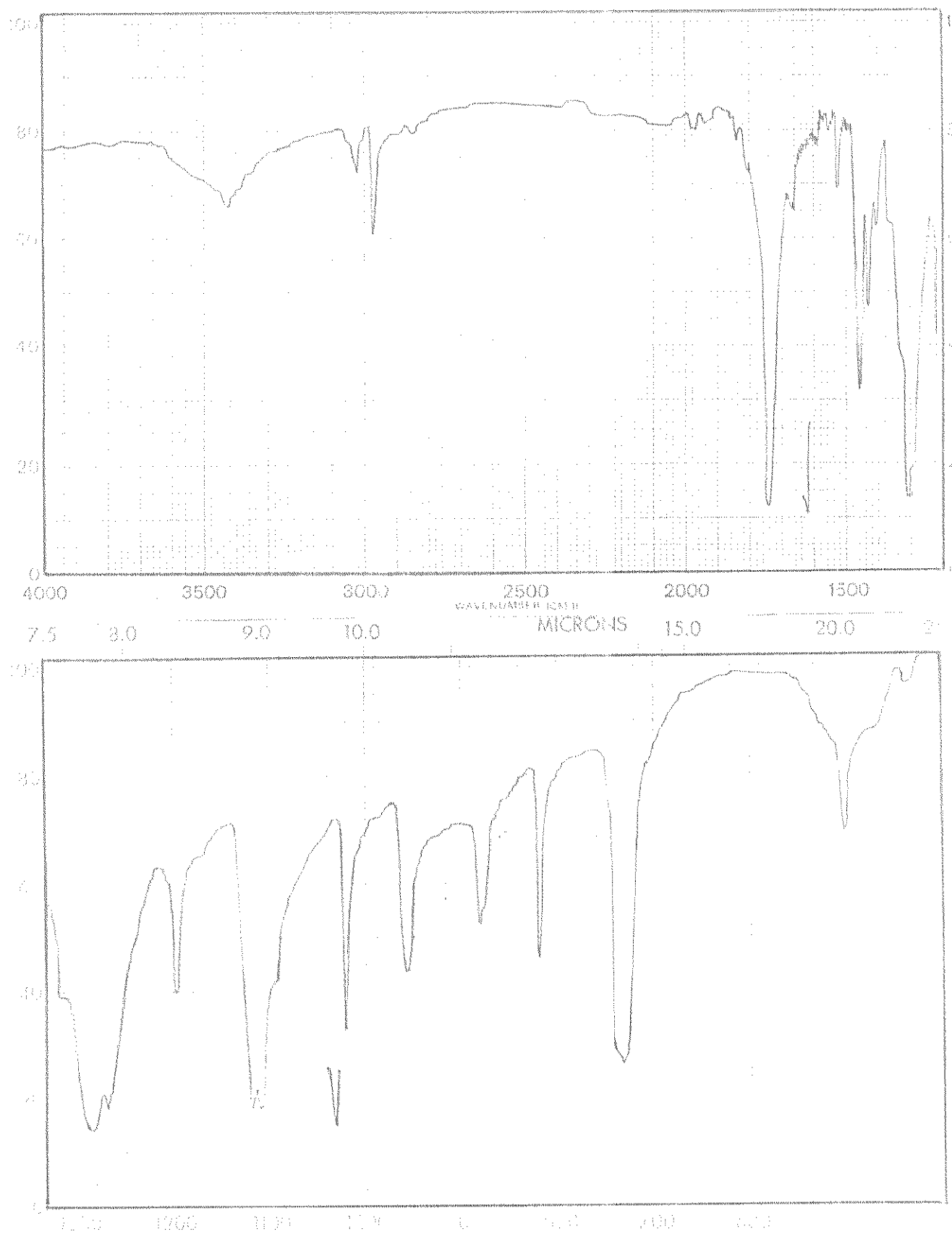
E.42 - Espectro de RMN ^1H (60 MHz) de Gs 20



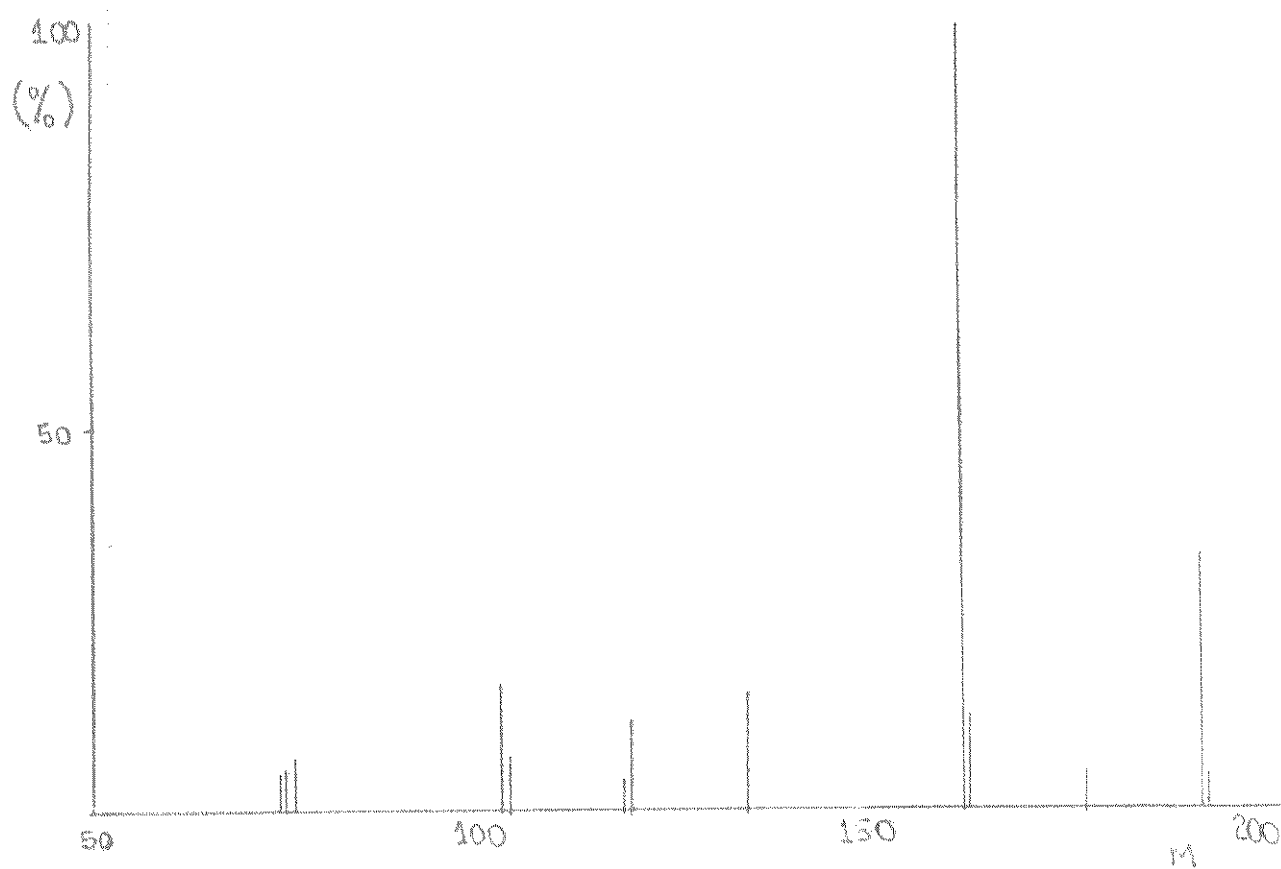
E.43 - Espectro de UV do tereftalato de dimetila 49



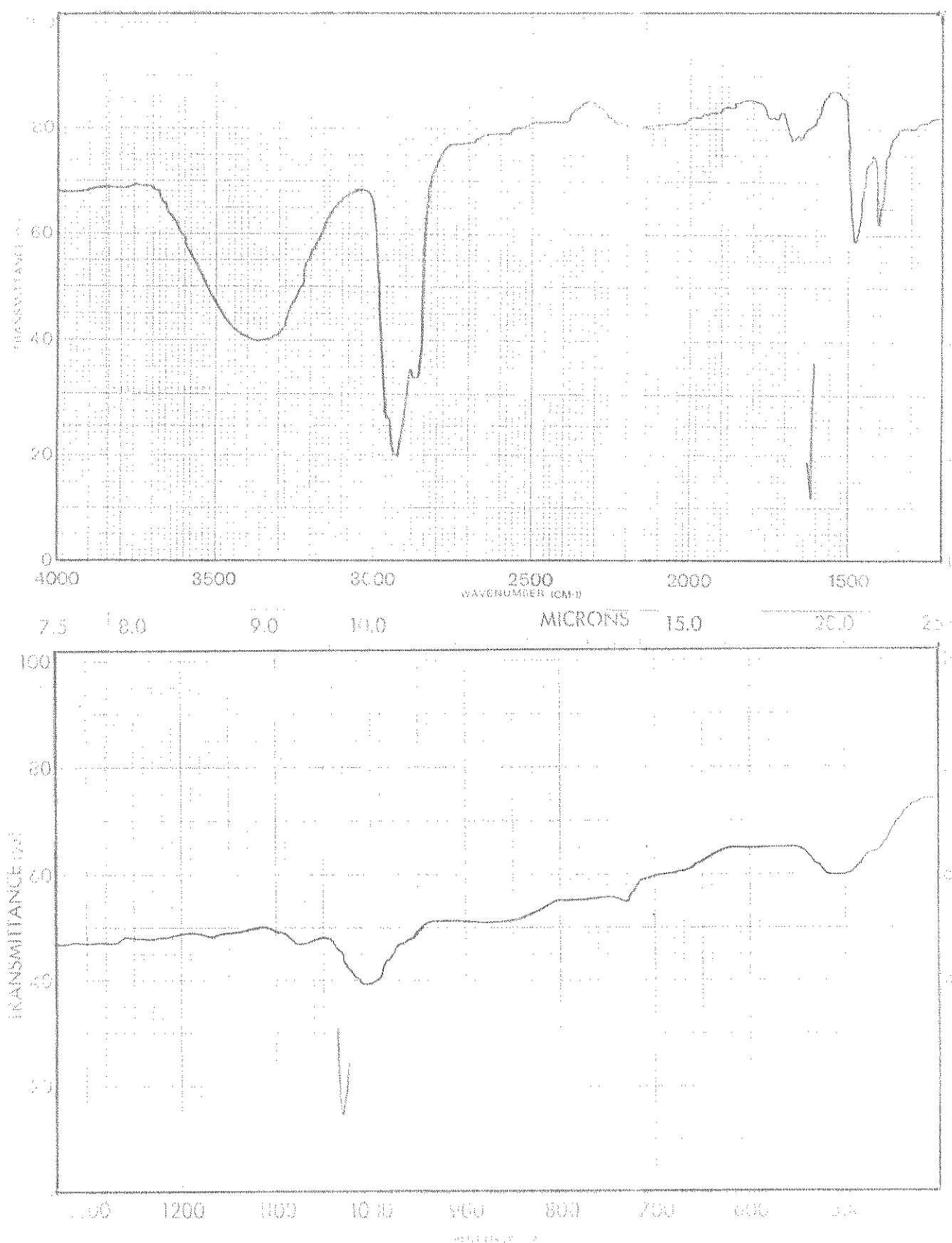
E.45 - Espectro de RN^1H do tereftalato de dimetila 49

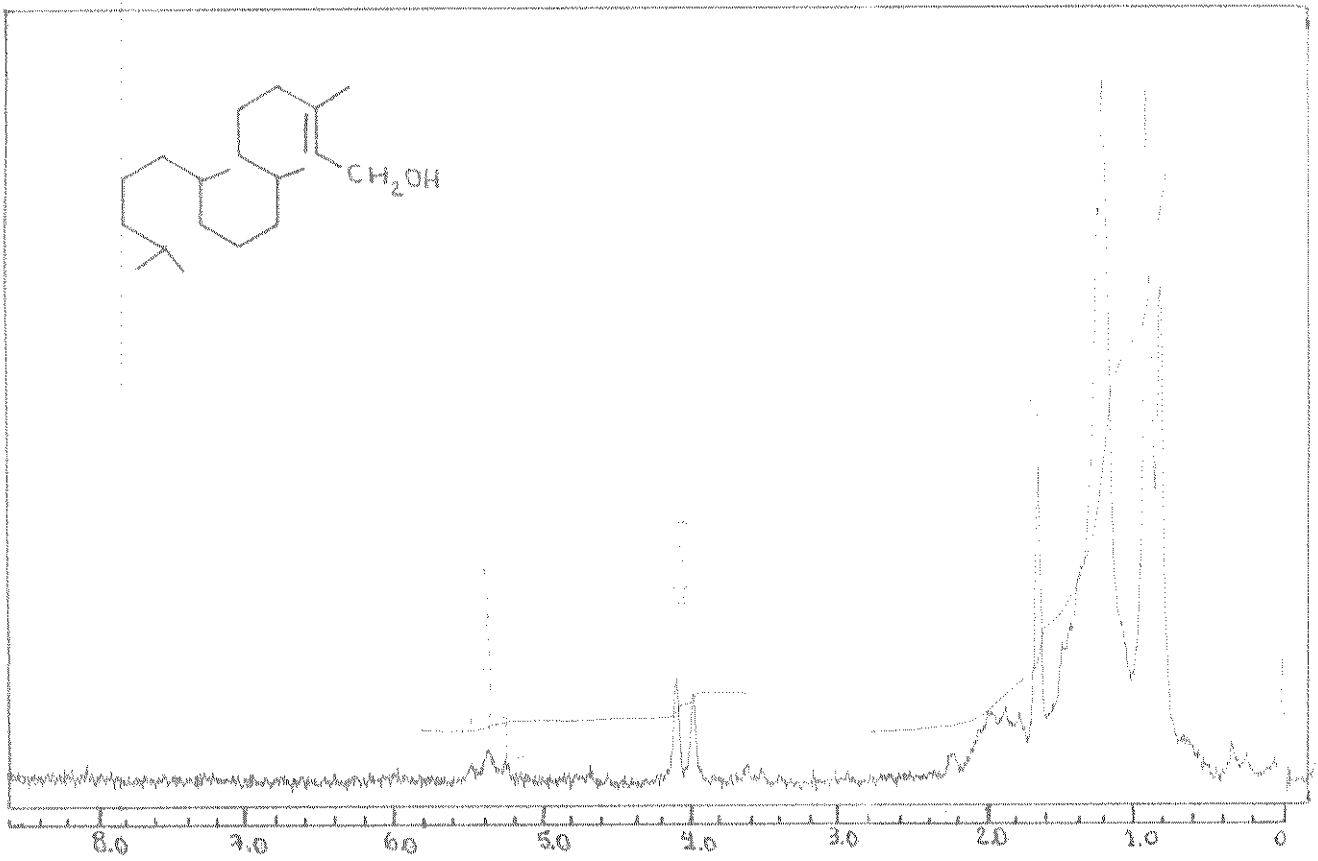


E.44 - Espectro de IV do tereftalato de dimetila 49

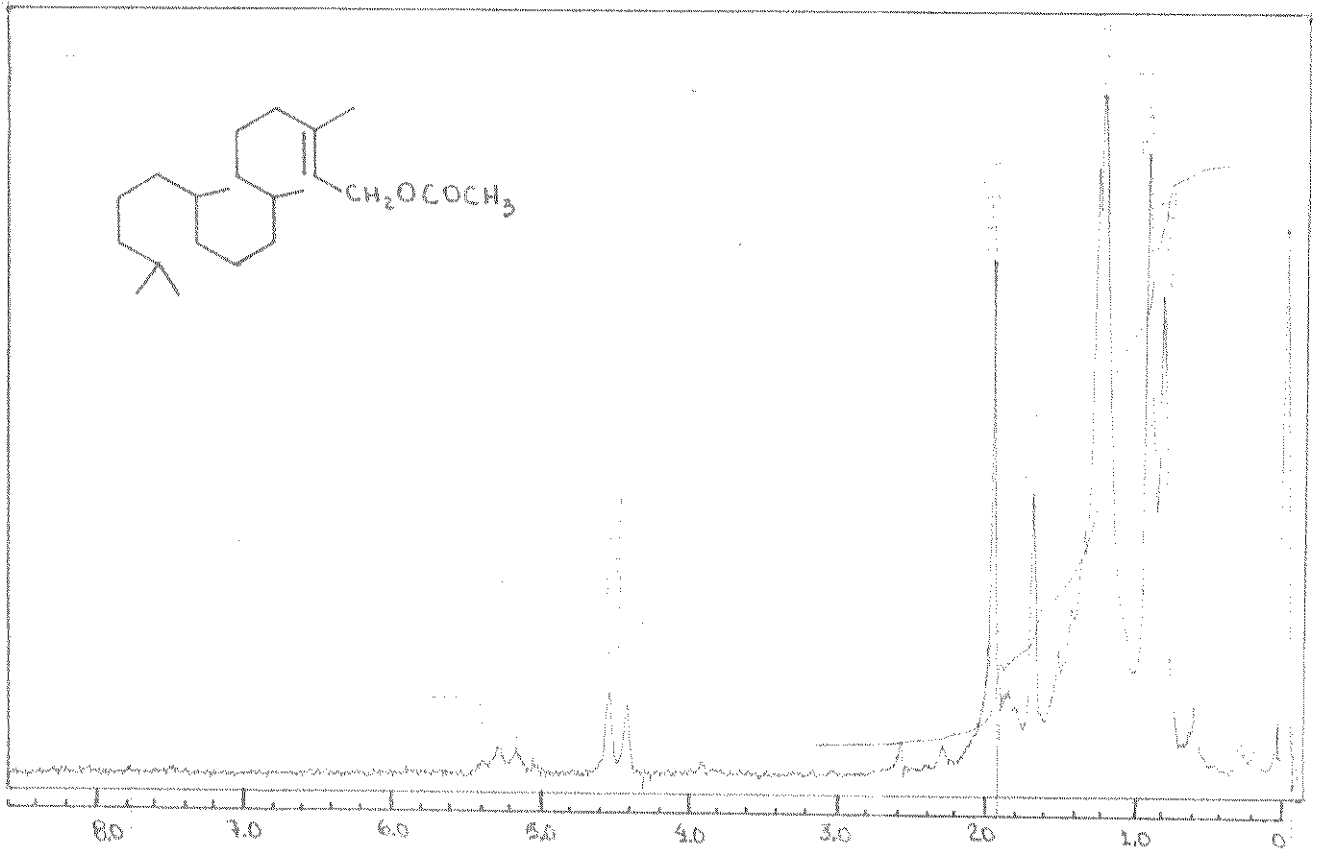


E.46 - Espectro de massa do tereftalato de dimetila 49

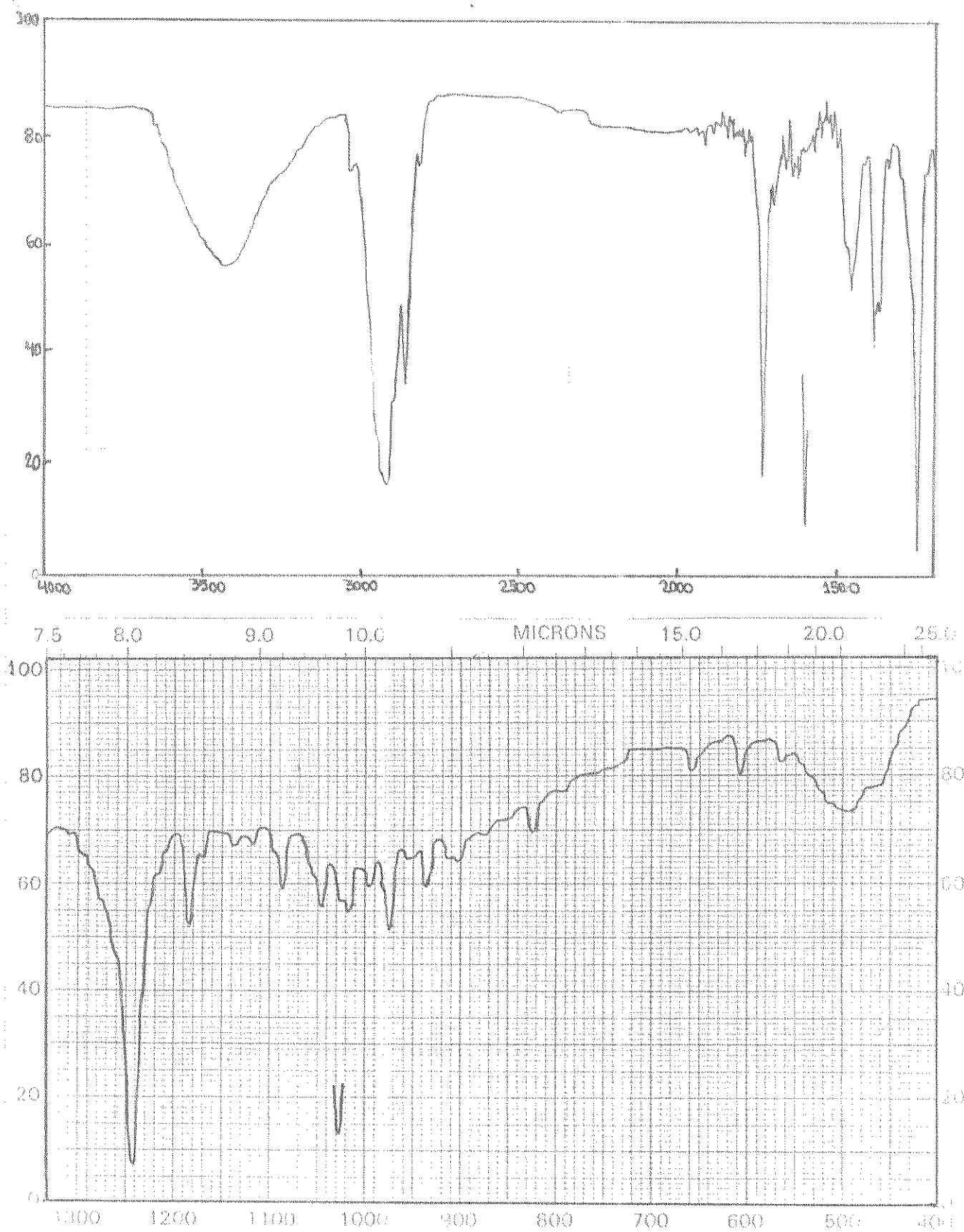
E.47 - Espectro de IV do fitol 50



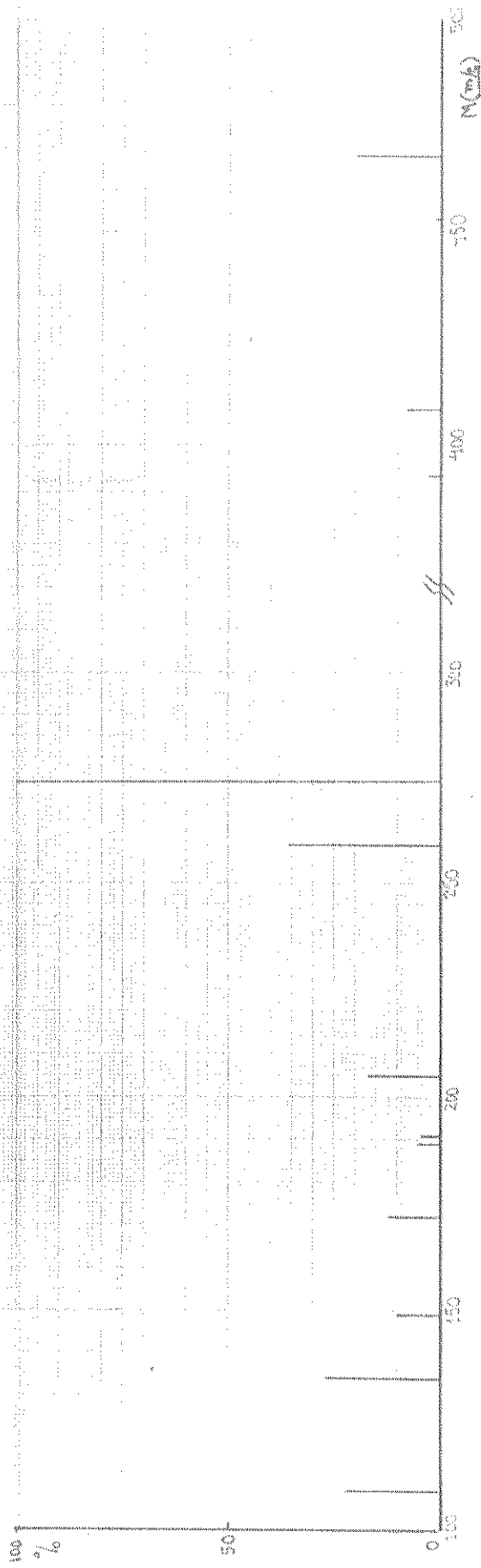
E.48 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) do fitol 50



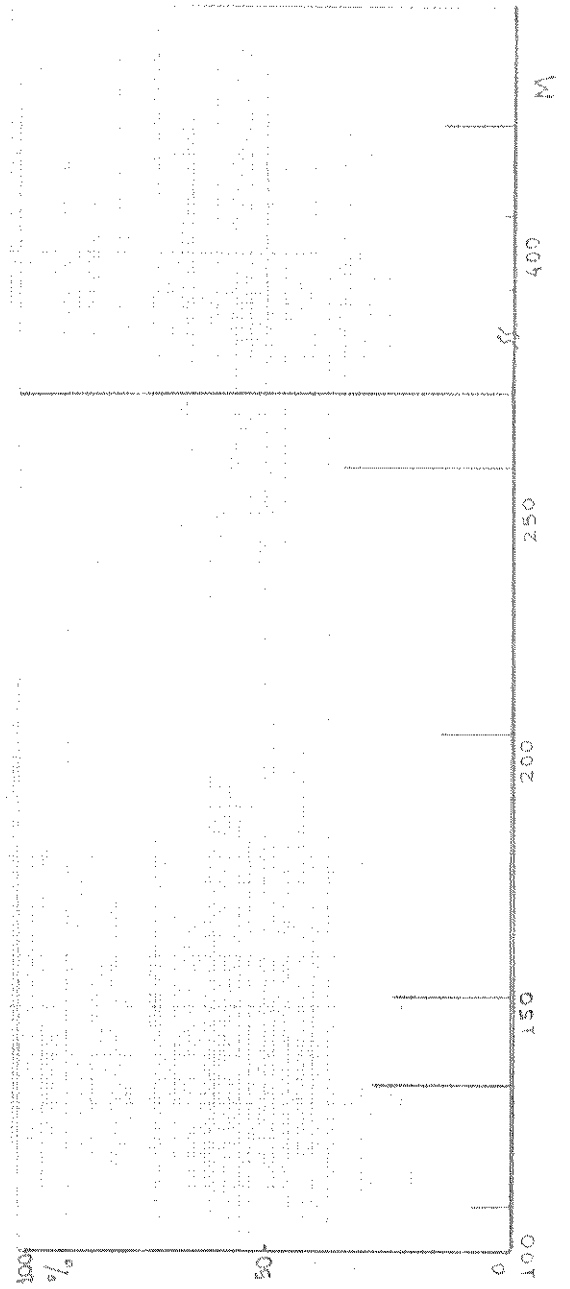
E.49 - Espectro de RMN^1H (60 MHz) do acetato de fitila 51



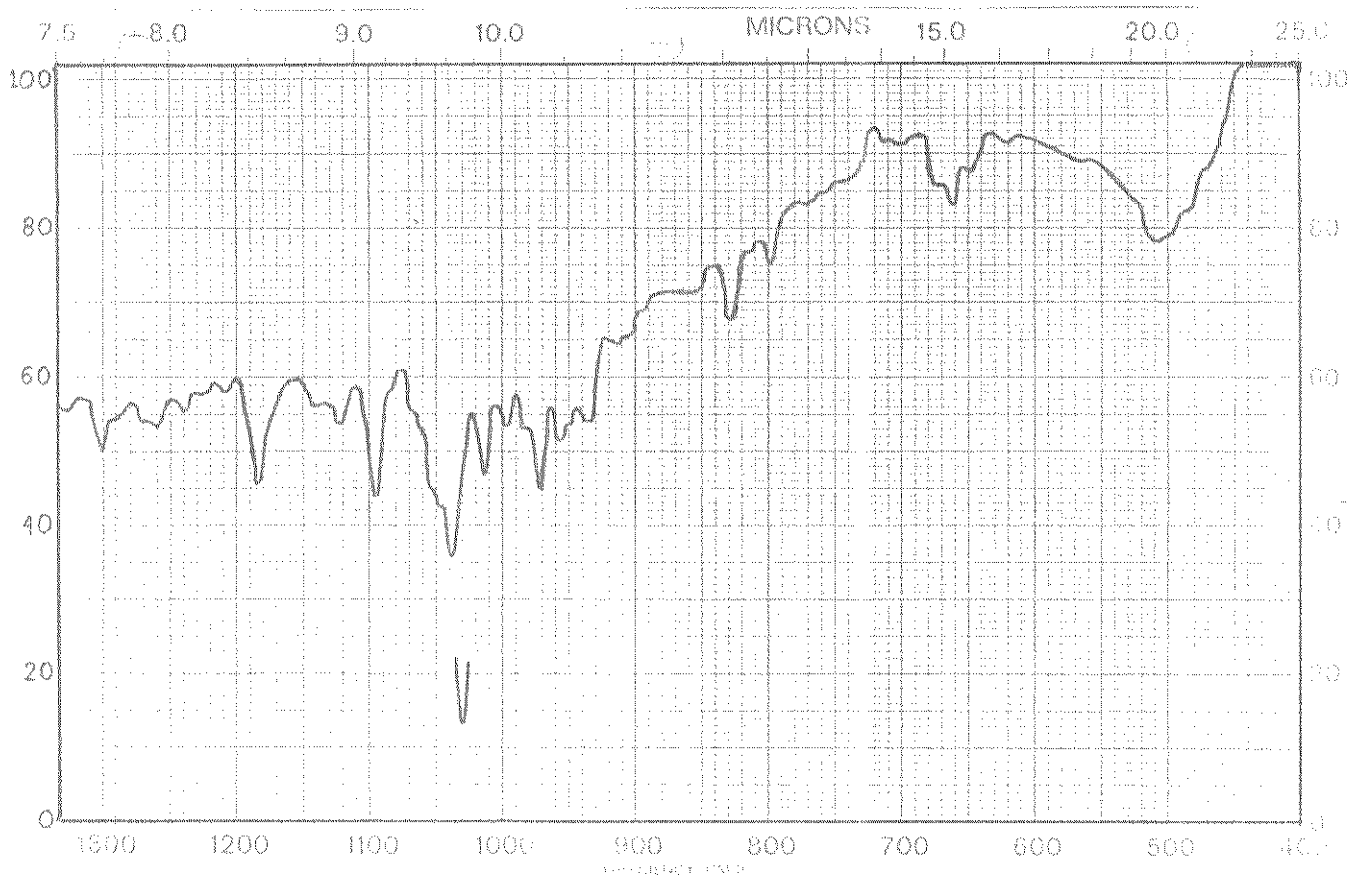
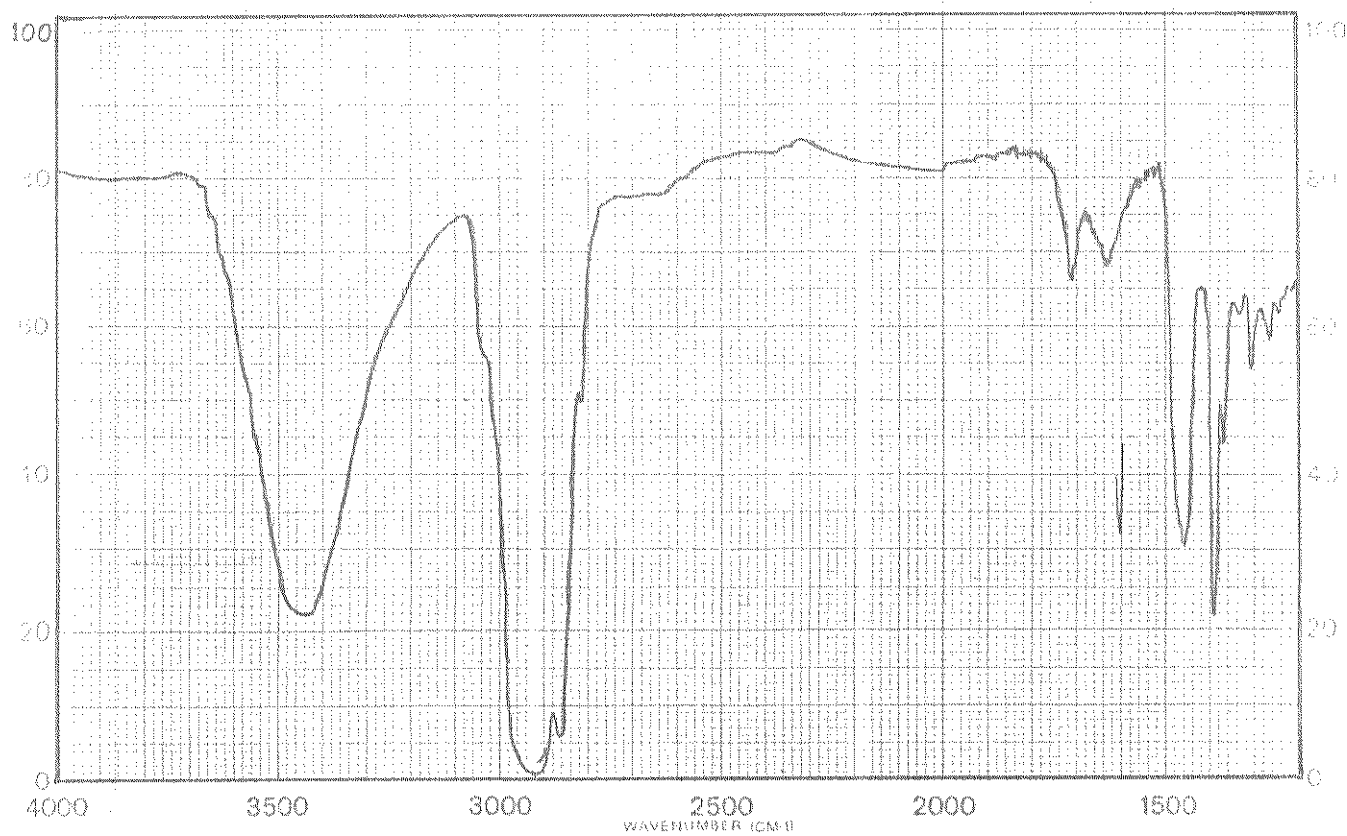
E.50 - Espectro de IV do acetato de glutinol 59



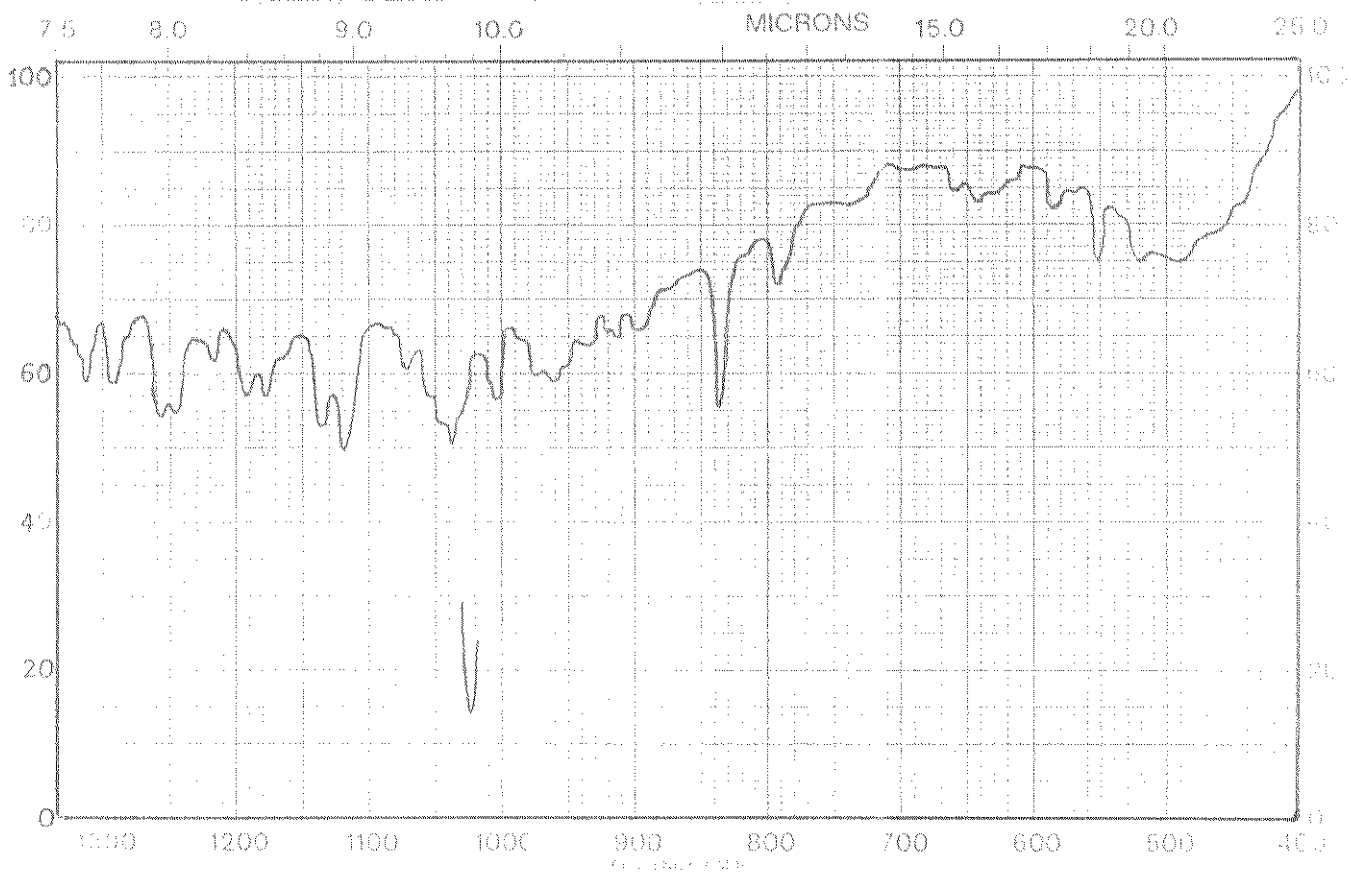
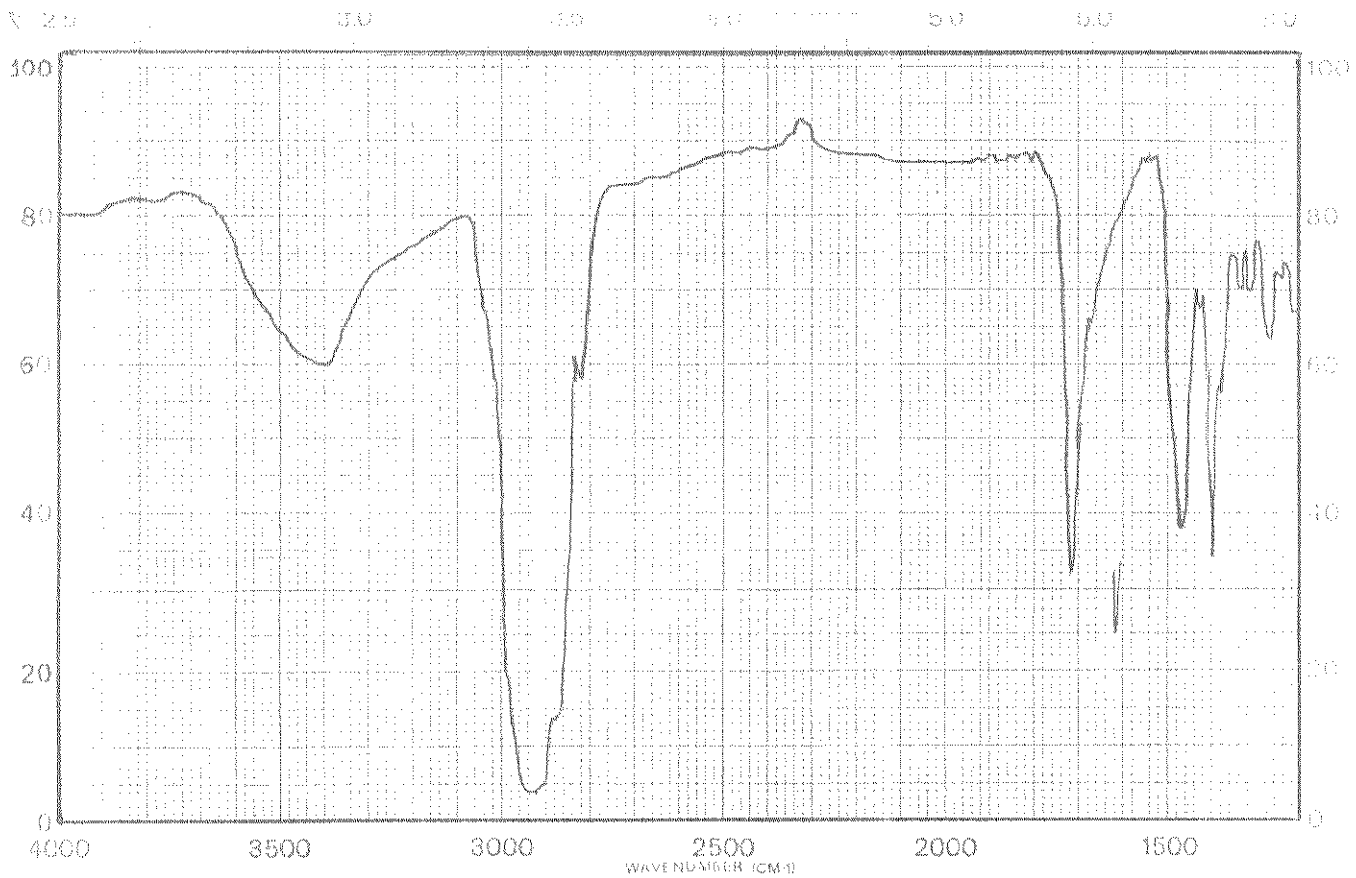
E.51 - Espectro de massa do acetato de glutinol 59



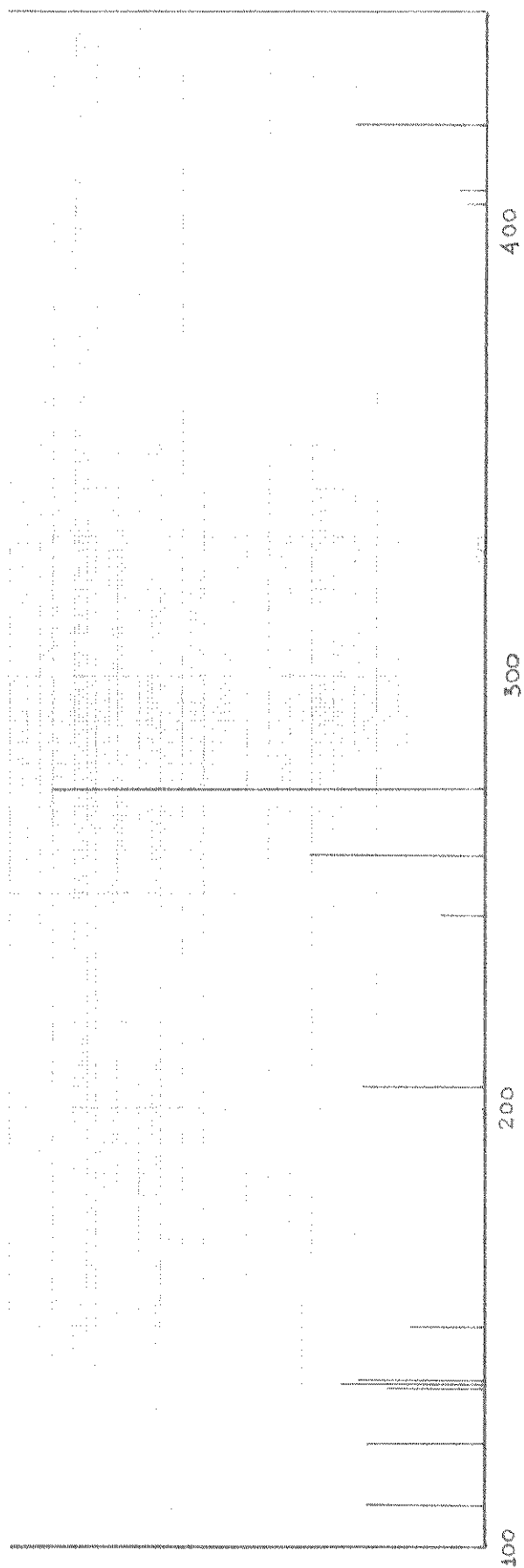
E.53 - Espectro de massa do glutinol 58



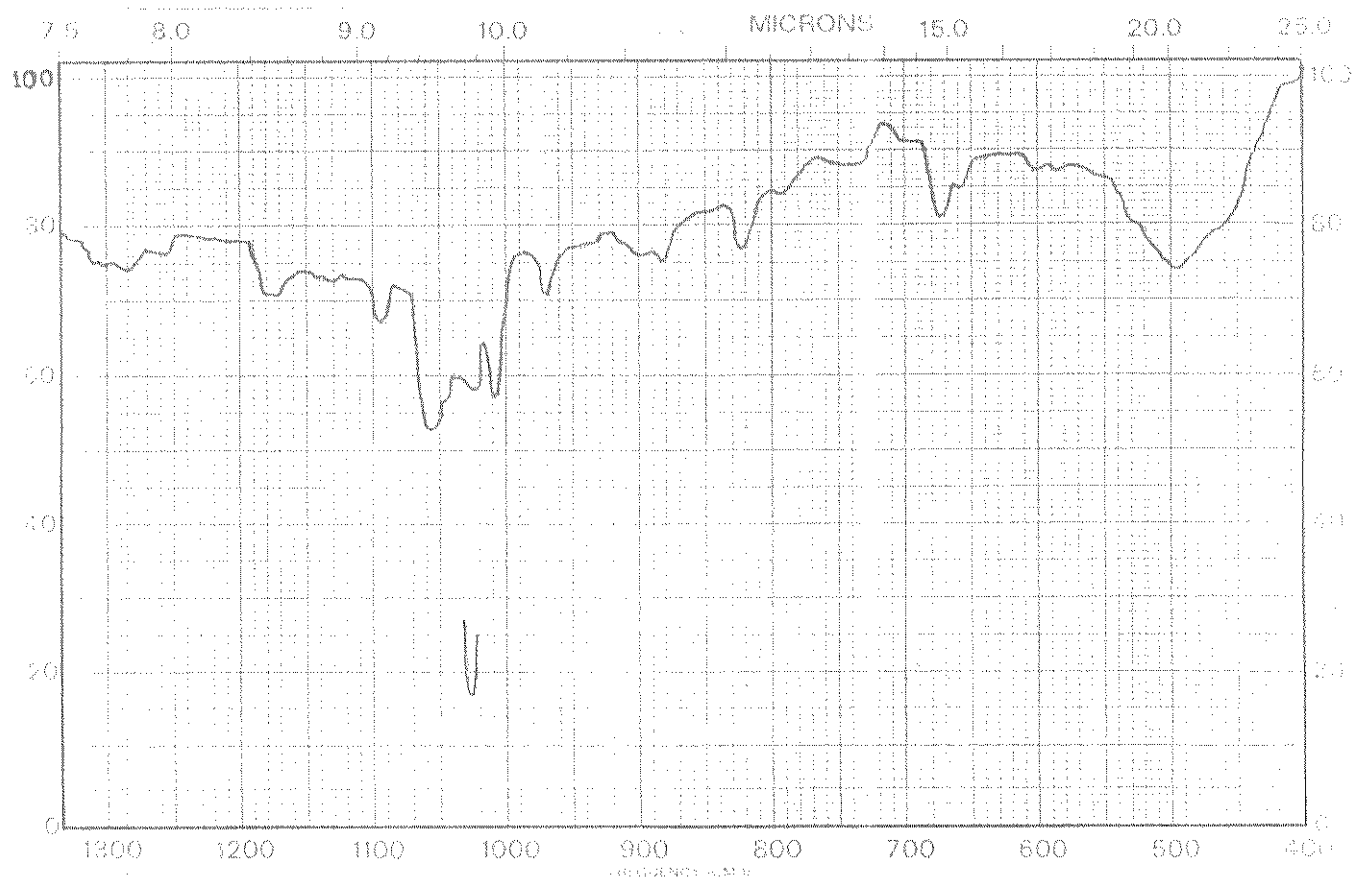
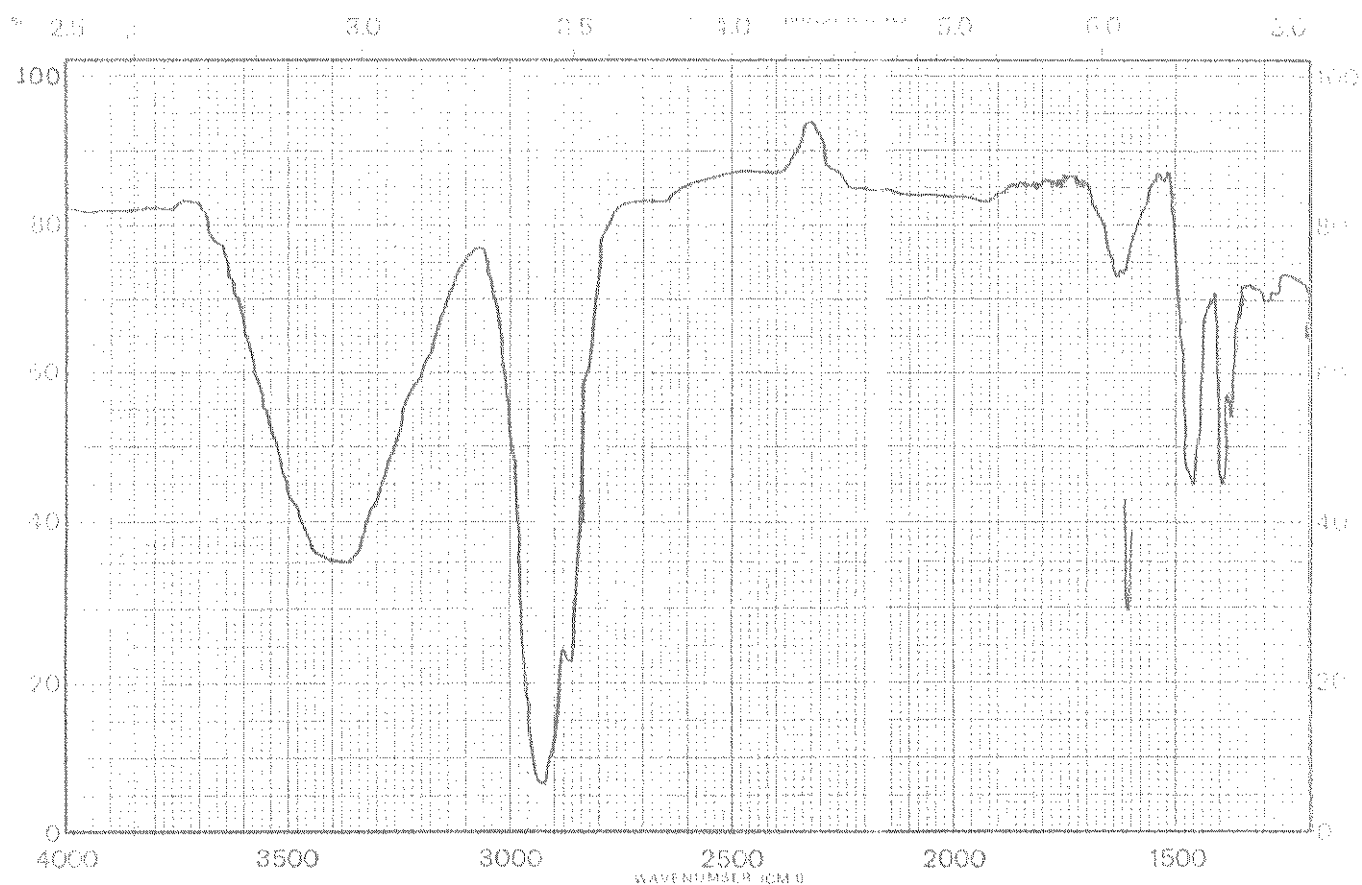
E.52 - Espectro de IV do glutinol 58



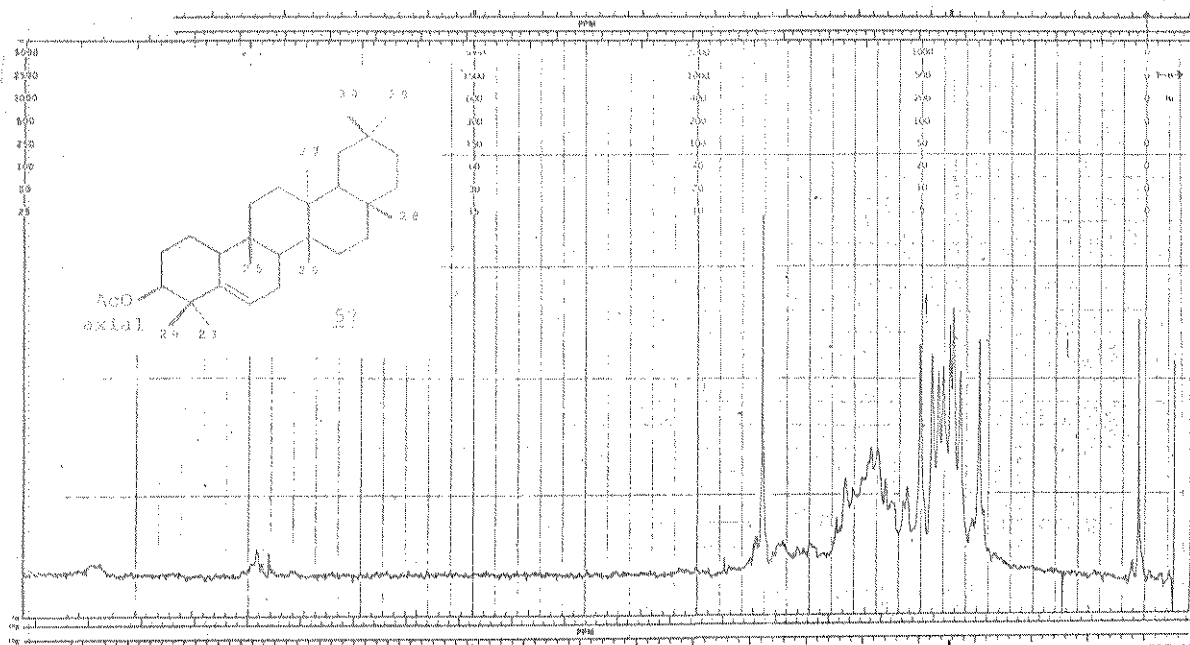
E.54 - Espectro de IV da glutinona 60



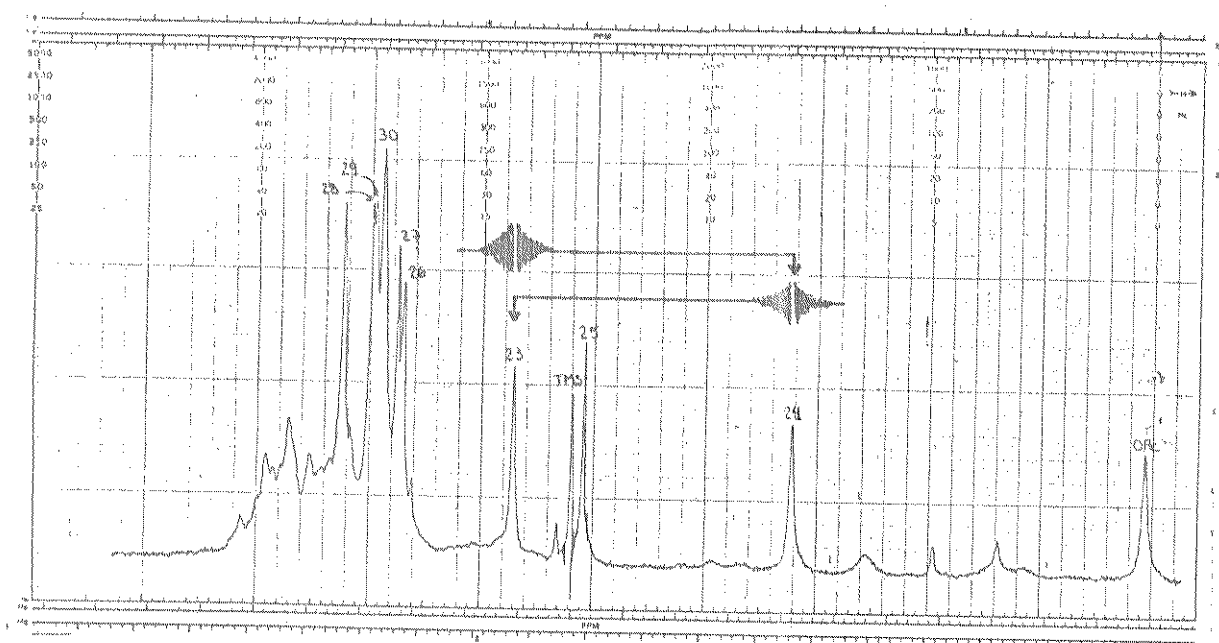
E.55 - Espectro de massa da glutinona 60



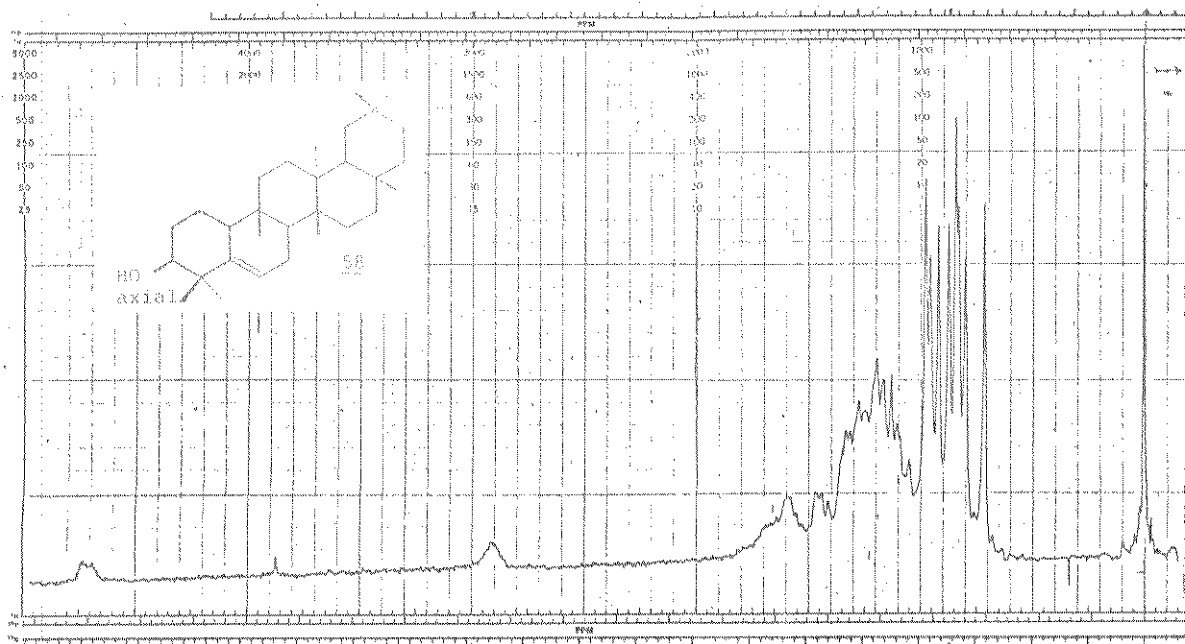
E.56 - Espectro de IV do epiglutinol 61



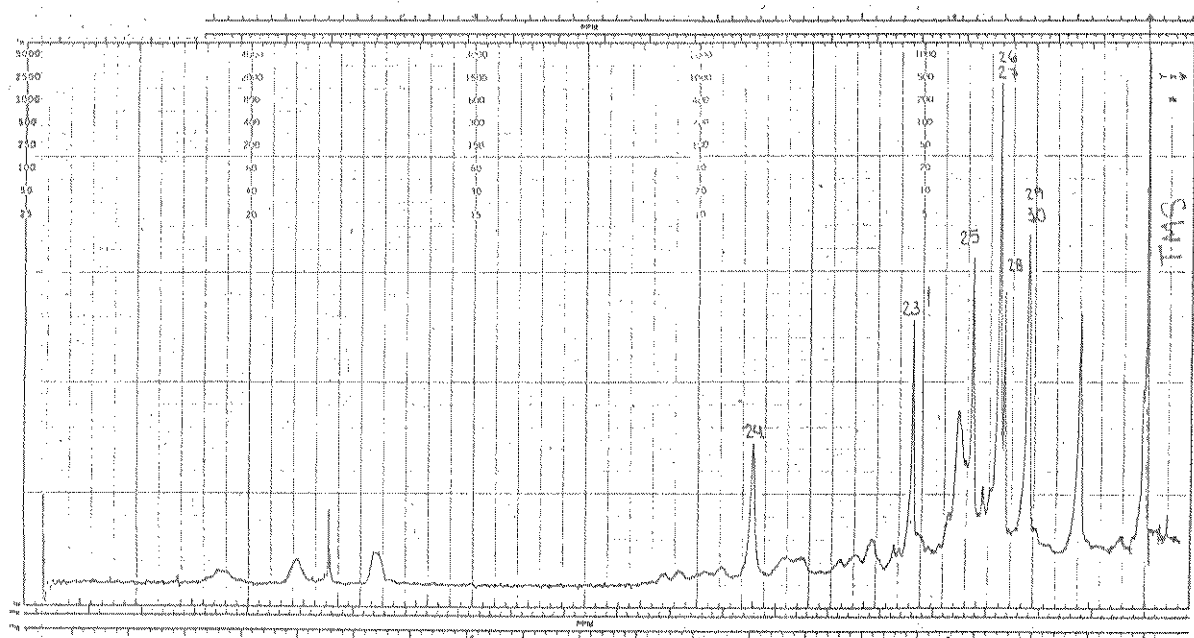
E.58 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) do acetato de glutinol 59



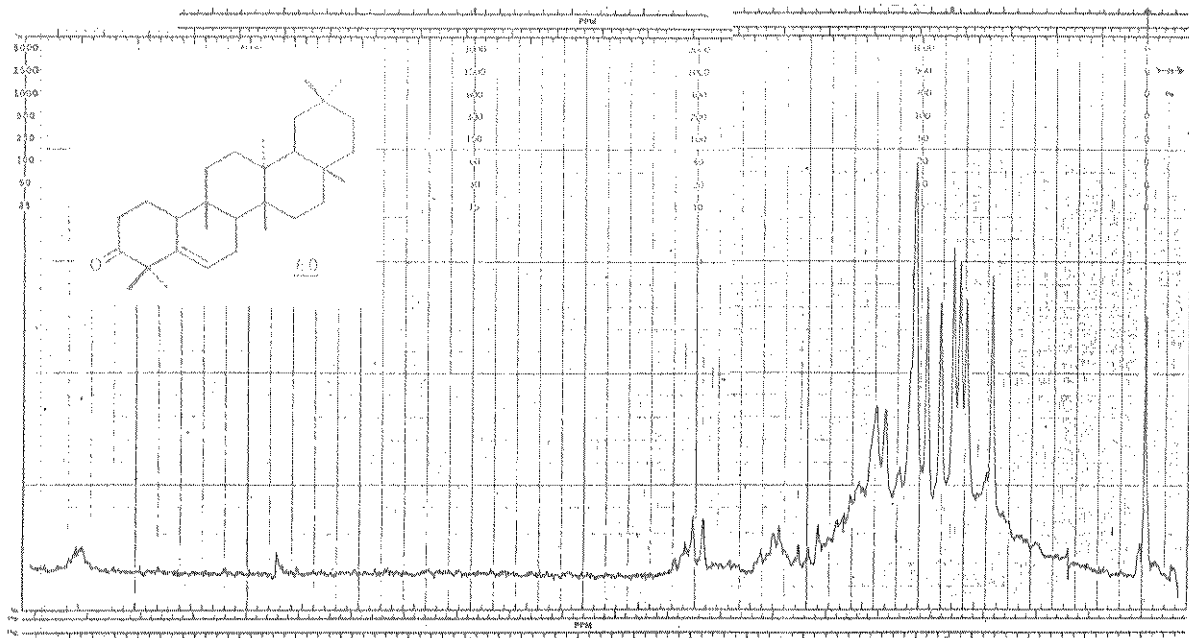
E.59 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) do acetato de glutinol 59
na presença de $\text{Pr}(\text{FOD})_3$



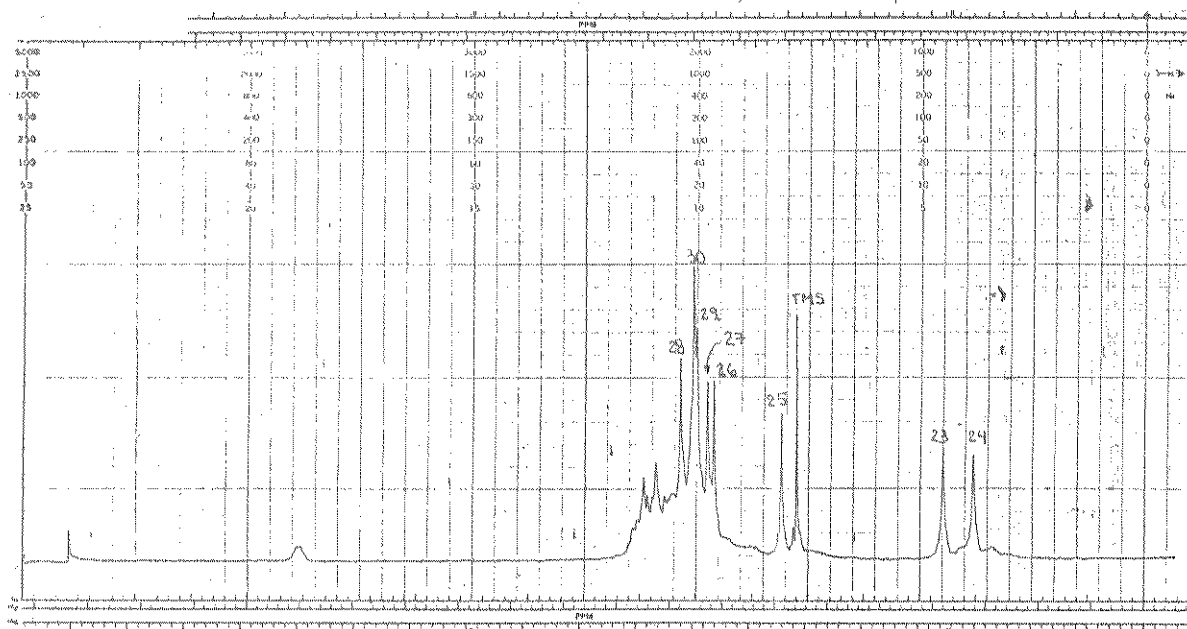
E.60 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) do glutinol 58



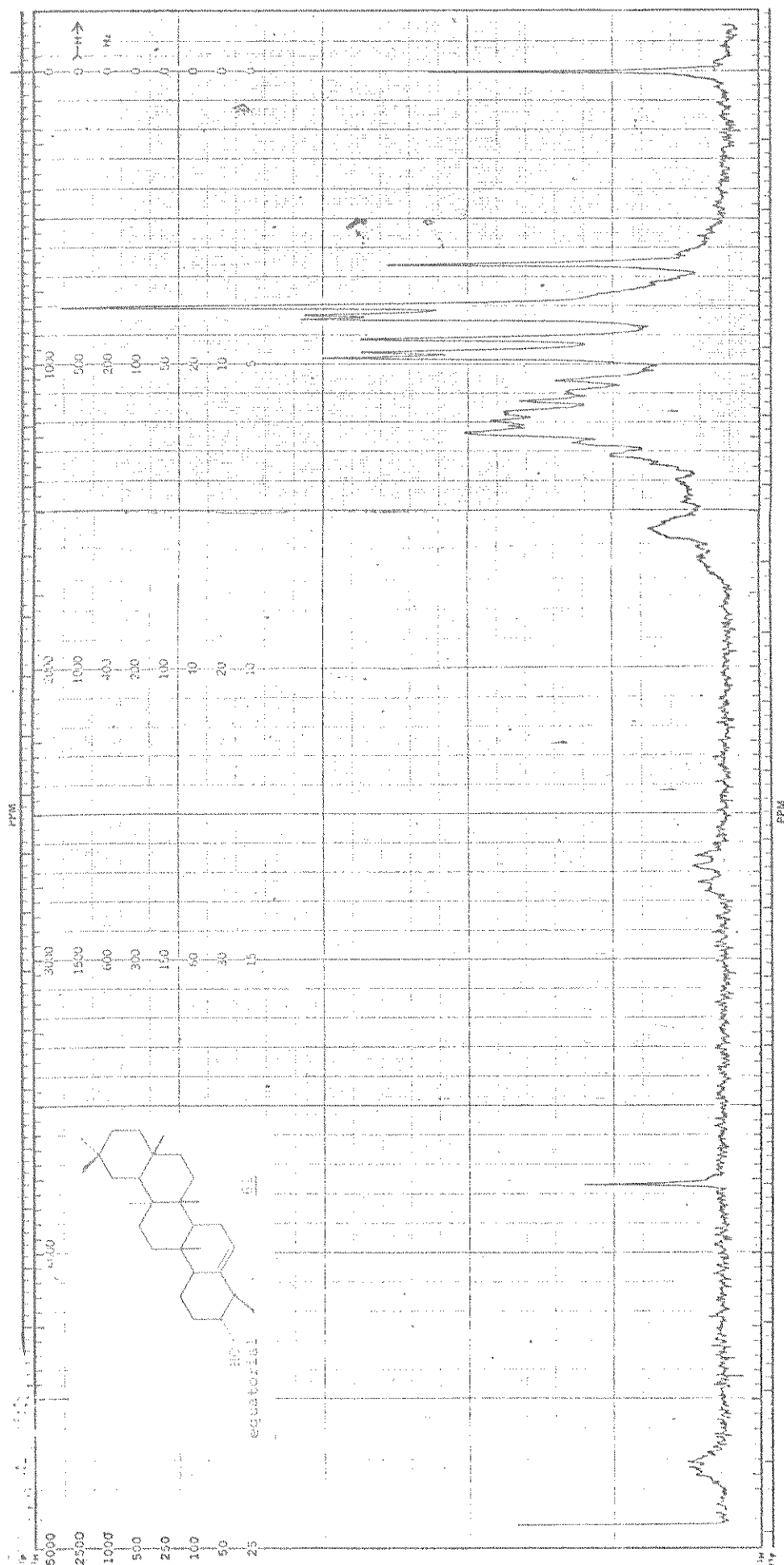
E.61 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) do glutinol 58 na presença de $\text{Eu}(\text{FOD})_3$



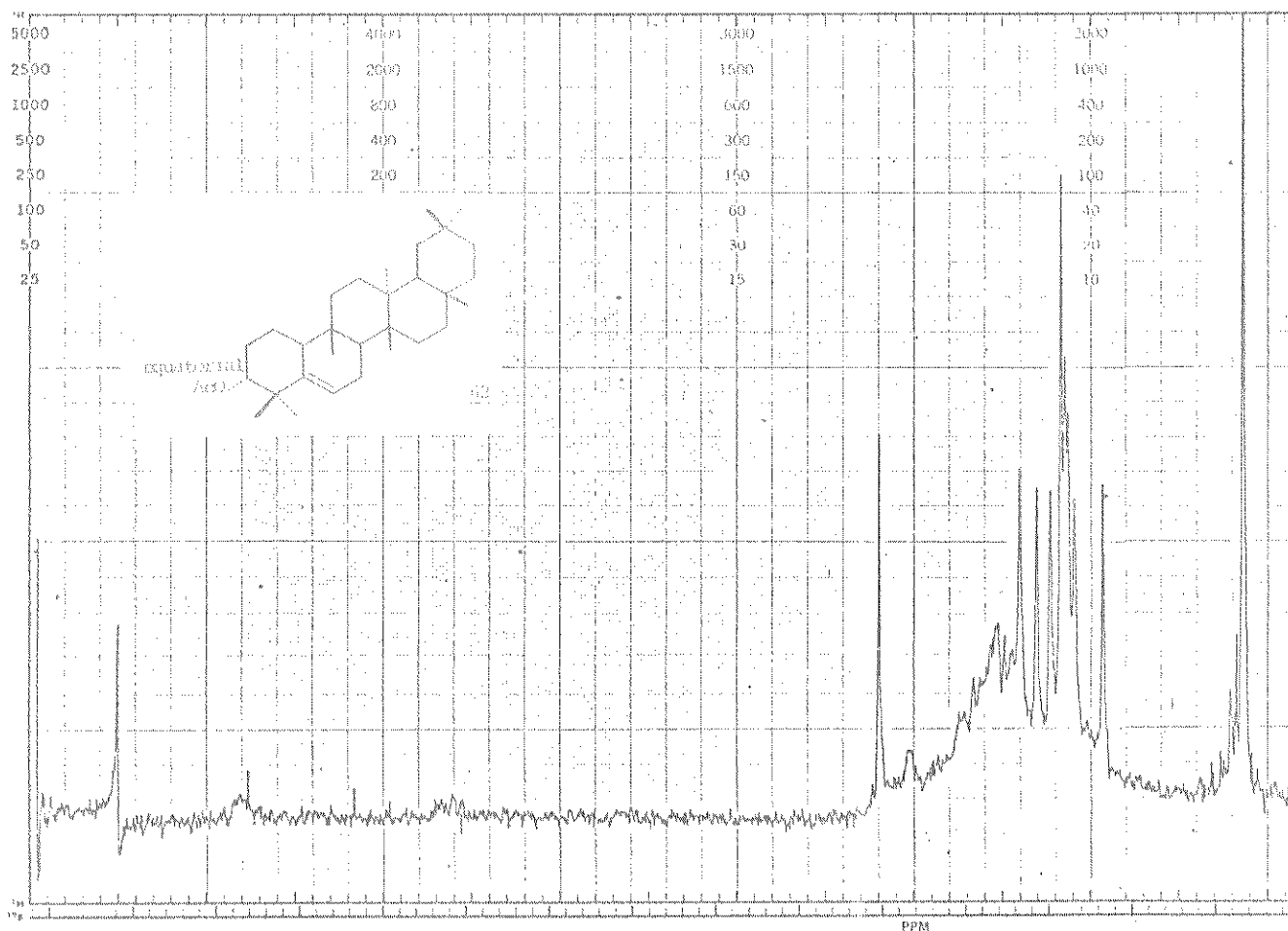
E.62 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) da glutinona 60



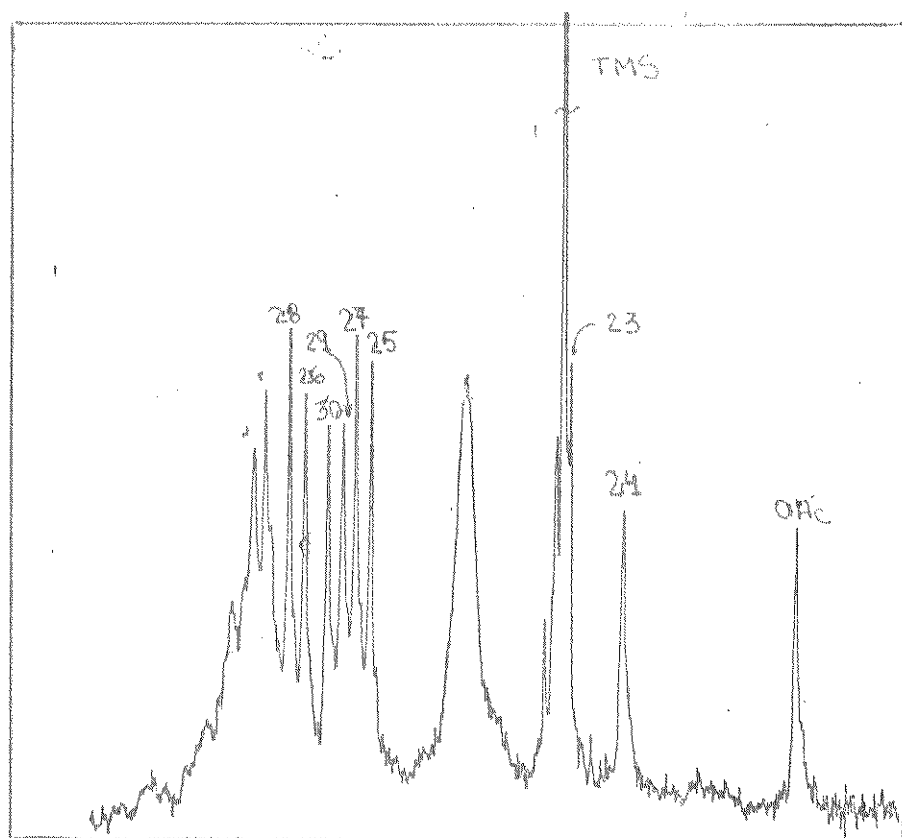
E.63 - Espectro de RMN^1H (100 MHz) da glutinona 60 na presença de $\text{Pr}(\text{FOD})_3$



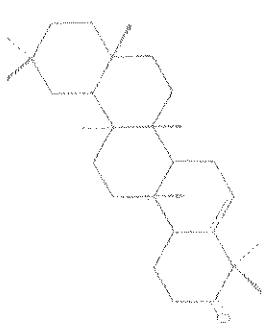
E.64 - Espectro de RMN¹H (100 MHz) do epiglutinol 61



E.65 - Espectro de RMN¹H (100 MHz) do acetato de epiglutanol 62

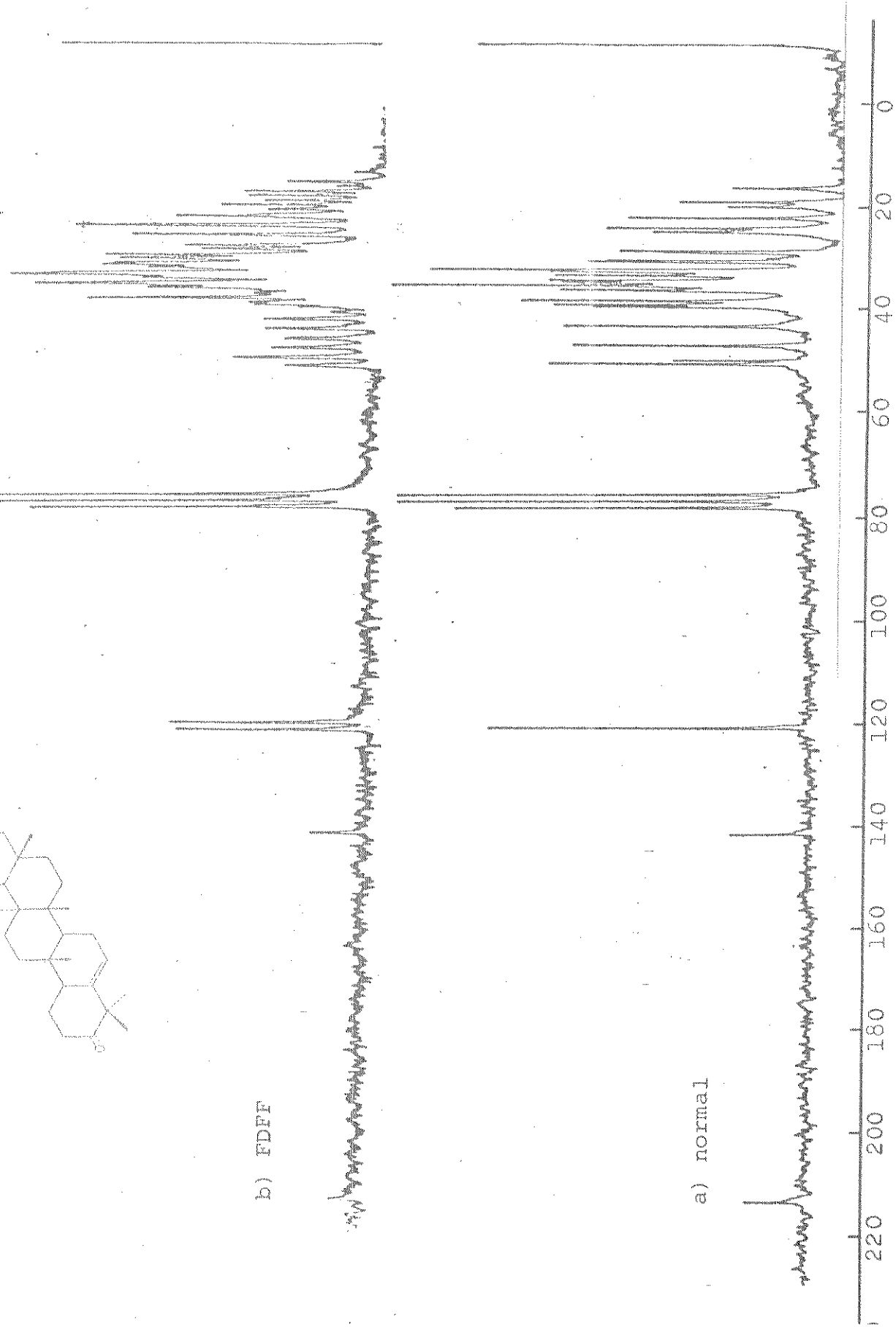


E.66 - Espectro de RMN¹H (100 MHz) do acetato de epiglutanol 62
na presença de Pr(FOD)₃

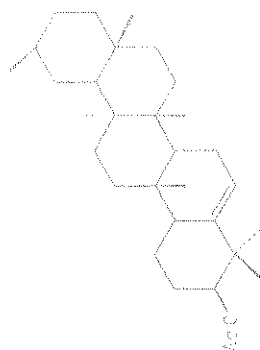


b) FDF

a) normal

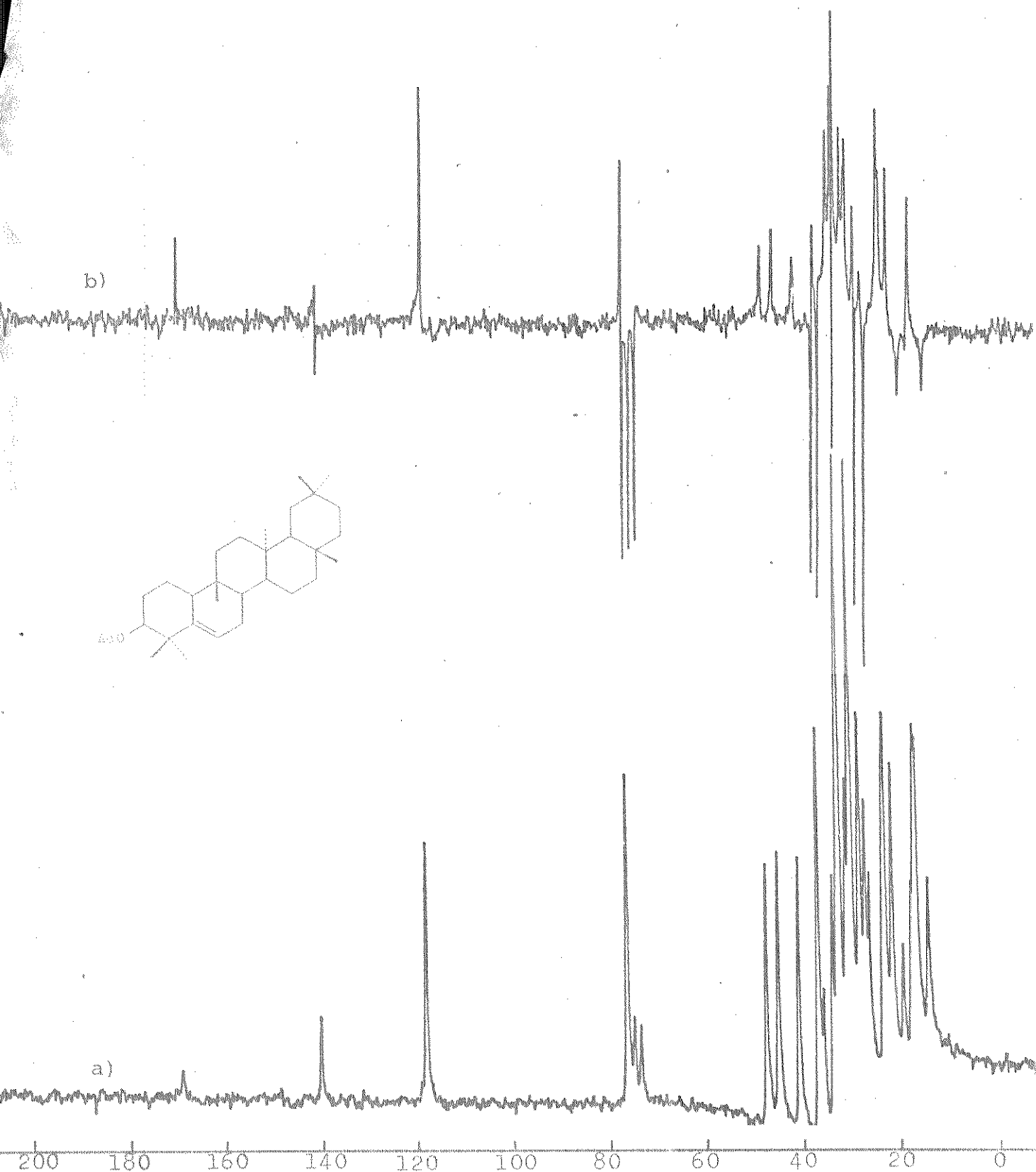


E.67 - Espectro de RMN¹³C da glutinona 60



b) FDFF

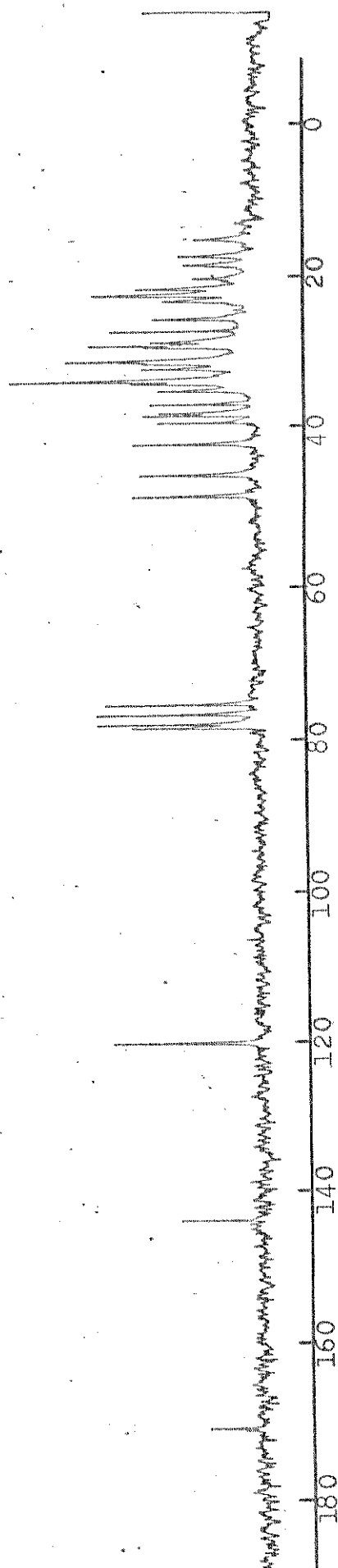
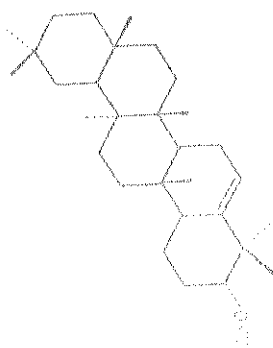
a) normal



E.69 - Espectro de RMN ^{13}C do acetato de glutinol 59

a) normal

b) inversão - recuperação



E.70 - Espectro de RMN ^{13}C do acetato de epiglutinol 62