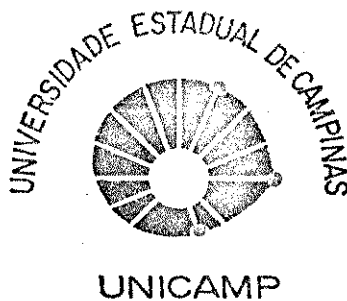




INSTITUTO DE QUÍMICA

CG - EM dos esteróis da esponja Tedania
ignis e espectrometria de massa dos deri-
vados do colesterol.

ROSA TOYOKO SHIRAISHI
Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Luís Guillermo Bravo Navarrete

CAMPINAS - SÃO PAULO

1978

Ao meu pai (in memorium) e à minha
mãe, a eterna gratidão.

Aos meus irmãos, pelo apoio e in -
centivo.

A autora deseja expressar seu agradecimento:

Ao Prof. Dr. Luís Guillermo Bravo Navarrete, pela orientação deste trabalho.

À Direção do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por proporcionar condições para a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos auxílios concedidos.

À CNPq, pelos auxílios concedidos.

À Profª Dra. Rúess V.F. de Bravo, pela disponibilidade na obtenção do espectro MIKE, pela sua valiosa ajuda na discussão dos espectros e na montagem deste trabalho.

Ao Prof. Lawrence T. Nielsen, pela disponibilidade na obtenção dos espectros de massa a 70 eV (MAT 311 A).

Ao Prof. Dr. Pierre C.G. Montouchet (Instituto de Biologia - Unicamp), pela disponibilidade na coleta e identificação da esponja Tedania ignis.

Ao Sr. L.F. Lembo Duarte e Srta. E.H. Morgado (Instituto de Biologia - Unicamp), pela ajuda na coleta da T. ignis.

Ao Sr. Nelson Frighetto (Rhodia), pela disponibilidade na realização das análises elementares.

Aos amigos e colegas que compartilharam as alegrias e tristezas, pelo incentivo e pela convivência saudável durante a realização deste trabalho.

À Srta. Rosalina Mazzarotto, pela sua valiosa ajuda na correção do português deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química (UNICAMP) pela dedicação e particularmente ao Sr. William Kalaf pelo excelente trabalho de datilografia.

Resumo

A esponja vermelha, coletada em Ubatuba (S.P.), na Praia da Ribeira, foi classificada como Tedania ignis (Duchaissaing & Michelotti) Verrill., pelo Prof. Dr. Sarã da Universidade de Gênova (Gênova - Itália).

A mistura esterólica foi estudada por um sistema Finnigan de cromatógrafo de gás (mod. 9500) - espectrômetro de massa (mod. 1015 S/L) - computador (mod. 6100); e através desta análise propomos as estruturas para seis componentes, como sendo: desmosterol; colesterol (componente mais abundante); brassicasterol; 22,23-dihidrobrassicasterol; estigmasterol ou poriferasterol e β -sitosterol.

Foram feitos estudos, por espectrometria de massa, dos derivados do colesterol com substituintes no anel A do esqueleto esteroide. Algumas das fragmentações foram confirmadas por "MIKES" (Espectros de energia cinética dos íons analisados por massa).

Abstract

A red sponge collected on the Ribeira beach in Ubatuba, São Paulo, was classified as Tedania ignis (Duchaissaing and Michelotti) Verrill., by Professor Sarã of Gênova University, Gênova, Italy.

This sponge was extracted with various organic solvents. The fractions containing sterols were then studied by gas chromatography (Finnigan 9.500) coupled with mass spectrometry (Finnigan 1015 S/L) coupled with a computer (Finnigan 6100). On this basis, it was possible to identify the following sterols in the mixture: desmosterol; cholesterol (the most abundant component); brassicasterol; 22,23-dihydrobrassicasterol; stigmasterol or poriferasterol and β -sitosterol.

A mass spectra study of six cholesterol derivatives with substitution in the A ring was also undertaken. The effect of substitution on the fragmentation pattern is discussed. In several cases, the fragmentation was also studied by MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectra).

Índice Geral

1ª Parte

	Pag.
I. Introdução	1
A. Revisão do constituinte esteroidal das esponjas	3
B. Cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro - de massa na análise de misturas esterólicas ex- traídas de tecidos vivos	12
II. Objetivos	16
III. Parte Experimental	17
A. Informações gerais	17
B. Coleta e identificação das esponjas	18
C. Extração	19
D. Isolamento do constituinte esteroidal do extra- to TEP	24
E. Isolamento do constituinte esteroidal do extra- to acetônico	29
F. Caracterização dos esteróis	31
G. Estudos com CG acoplado ao EM	36
IV. Resultados e Discussão	43
V. Conclusão	69

2ª Parte

I. Introdução	71
II. Objetivos	80
III. Resultados e Discussão	82
IV. Parte Experimental	117
V. Conclusão	131
Bibliografia	133
Apêndice	136

Índice de Figuras, Tabelas e esquemas

Figura 1. Esteróis "classicos" encontrados nas esponjas ...	4
Figura 2. Diagrama esquemático de um sistema CG-EM-Computador	13
Figura 3. Cromatograma de gás em SE-30 (3%) dos acetatos dos esteróis (<u>Axinella cannabina</u>)	14
Figura 4. Espectro no I.V. do extrato éter de petróleo.....	21
Figura 5. Espectro no I.V. do extrato acetônico	23
Figura 6. Espectro no I.V. do extrato CHCl_3 -MeOH (2:1)	27
Figura 7. Cromatograma da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> ...	33
Figura 8. Espectro no I.V. da mistura esterólica TA	34
Figura 9. Espectro de RMN da mistura esterólica TA	35
Figura 10. Espectro no I.V. do acetato da mistura esterólica	37
Figura 11. Espectro de RMN do acetato da mistura esterólica	38
Figura 12. Comparação dos cromatogramas da mistura esterólica	41
Figura 13. Comparação dos cromatogramas do acetato da mistura esterólica	42
Figura 14. Espectro de massa do pico A da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV).....	49
Figura 15. Espectro de massa do acetato de pico A (70 eV) ..	50
Figura 16. Espectro de massa do pico C da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV)	51
Figura 17. Espectro de massa do acetato do pico C (70 eV)...	52
Figura 18. Espectro de massa do pico D da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV).....	55
Figura 19. Espectro de massa do acetato do pico D (70 eV) ..	56
Figura 20. Espectro de massa do pico E da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV).....	57
Figura 21. Espectro de massa do acetato do pico E	58

Figura 22. Espectro de massa do pico F da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV)	60
Figura 23. Espectro de massa do acetato do pico F.....	61
Figura 24. Espectro de massa do pico G da mistura esterólica da <u>T.ignis</u> (20 eV e 70 eV)	63
Figura 25. Espectro de massa do acetato do pico G	64
Figura 26. Espectro de massa do pico H da mistura esterólica da <u>T. ignis</u> (20 eV e 70 eV)	65
Figura 27. Espectro de massa do acetato do pico H	66
Figura 28. Espectro no U.V. do 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona	126
Figura 29. a) Espectro de massa do acetato de colesterol....	72
b) Espectro de massa do colesterol	72
Figura 30. Espectro de massa do colest-5-en-3-ona (<u>48</u>).....	84
Figura 31. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (<u>49</u>).....	87
Figura 32. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (<u>50</u>)	92
Figura 33. EM de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (<u>51</u>)...	95
Figura 34. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 410 de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (<u>51</u>)	96
Figura 35. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 395 de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (<u>51</u>)	97
Figura 36. Espectro de massa de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (<u>52</u>)	99
Figura 37. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 441 do composto(<u>52</u>).....	100
Figura 38. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona (<u>53</u>).....	103
Figura 39. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 456 do composto (<u>53</u>).....	106
Figura 40. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 439 do composto (<u>53</u>).....	109
Figura 41. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 438 do composto (<u>53</u>).....	110
Figura 42. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 425 do composto (<u>53</u>)....	113
Figura 43. Espectro MIKE do íon <u>m/e</u> 426 do composto (<u>53</u>).....	114
Figura 44. Espectro no I.V. do composto (<u>48</u>).....	120

Figura 45. Espectro no I.V. do composto (49).....	123
Figura 46. Espectro no I.V. do composto (52).....	127
Figura 47. Espectro no I.V. do composto (51)	129
Figura 48. Espectro no I.V. do composto(53).....	130
Figura 49. Diagrama esquemático de um analisador quadrupolar	138
Figura 50. Diagrama esquemático do espectrômetro de massa MIKES (geometria de Nier-Johnson inversa)	140

Tabela 1. Esteróis "clássicos" encontrados nas esponjas.....	5 e 6
Tabela 2. Extração com éter de petróleo da <u>T.ignis</u>	20
Tabela 3. Extração com acetona da <u>T.ignis</u>	22
Tabela 4. Extração com CHCl_3 -MeOH (2:1) da <u>T.ignis</u>	24
Tabela 5. Frações agrupadas da cromatografia líquida em coluna, do extrato TEP (I).....	29
Tabela 6. Fracionamento do extrato acetônico (TA).....	31
Tabela 7. Análise dos espectros no I.V. da mistura esterólica TA e do acetato da mistura TA	44
Tabela 8. Principais íons do espectro de massa dos esteróis da <u>T.ignis</u>	67
Tabela 9. Principais íons do espectro de massa dos acetatos da mistura esterólica da <u>T.ignis</u>	68

	Pag.
Esquema 1	22
Esquema 2	25
Esquema 3	26
Esquema 4	28
Esquema 5	53
Esquema 6	74
Esquema 7	75
Esquema 8	77
Esquema 9	77
Esquema 10.....	79
Esquema 11.....	83
Esquema 12.....	85
Esquema 13.....	89
Esquema 14,.....	90
Esquema 15.....	93
Esquema 16.....	94
Esquema 17.....	98
Esquema 18.....	101
Esquema 19.....	105
Esquema 20.....	107
Esquema 21.....	108
Esquema 22.....	111
Esquema 23.....	112
Esquema 24.....	115

Símbolos e Abreviações

CG		Cromatografia gasosa
EM		Espectrometria de massa
Fig.		Figura
I.V.		Infravermelho
RMN		Ressonância magnética nuclear de prótons
U.V.		Ultravioleta
P.F.		Ponto de fusão
MIKES		Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Spectra (Espectro de energia cinética dos íons analisados por massa).
M^+		Íon molecular
Me		Metila
Et		Etila
AcOH		Ácido acético
ppm		partes por milhão
δ		deslocamento químico em ppm
m/e		Relação massa/carga
max		maximo
Δ		Insaturação na cadeia carbonada

1ª PARTE

I. Introdução

A química das substâncias derivadas de plantas, fungos e bactérias tem recebido, durante várias décadas, uma atenção muito grande dos químicos de produtos naturais. Com a crescente necessidade de se obter substâncias de interesse econômico ou biologicamente ativas, há atualmente, numerosos estudos sobre a atividade química das substâncias obtidas a partir da imensa variedade da fauna e flora marinhas.

Devido às condições biossintéticas, do meio ambiente marinho, serem totalmente diferentes daquelas encontradas em terra, esta diferença fundamental deverá favorecer a descoberta de novas substâncias com grandes propriedades benéficas. Além disso, muitos organismos marinhos mantiveram ou adquiriram um estágio evolutivo diverso daquele atingido por plantas e animais terrestres aumentando as possibilidades de descoberta de novas atividades biológicas e de substâncias ainda desconhecidas.

Um dos maiores problemas que os químicos de produtos naturais marinhos enfrentam é a dificuldade de identificar os organismos marinhos dos quais os compostos são obtidos. Isto é particularmente verdadeiro para a identificação das esponjas, já que os taxonomistas, freqüentemente, falham ao fazê-la¹.

As esponjas constituem o filo Porífera, que é o mais primitivo dos animais multicelulares. Sua natureza animal foi reconhecida em 1765, mas seu lugar no Reino Animal continuou incerto até cerca de 1857. Não apresentam verdadeiros tecidos ou órgãos, e as células apresentam considerável grau de independência. Todos os membros deste grupo são sésseis e exibem movimento muito pouco detectável^{2,3}.

A maioria das esponjas é marinha, vivendo da linha de maré baixa até profundidades de 6000 metros, em forma de colônias. Algumas são de coloração cinzenta ou parda, outras são brilhantemente vermelhas, alaranjadas, azuis, violáceas ou pretas. Há somente uma família na água doce². O esqueleto interno de sustentação pode ser de espículas cristalinas ou fibras irregulares de espongina, ou ambas, porém sempre presente.

A classificação das esponjas tem sido uma tarefa difícil para os taxonomistas de invertebrados. Para a finalidade desta introdução, podemos classificá-las³ em:

Classe 1

Calcárea (Calciospongiae). Esponjas calcáreas. Apresentam espículas calcáreas; monoaxiais ou com 3 ou 4 raios. A superfície do corpo cerdosa, cores apagadas e geralmente com menos de 15 cm de comprimento.

Classe 2

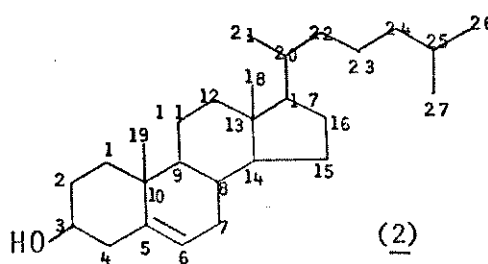
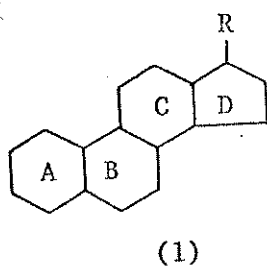
Hexactinellida (Hyalospongiae). Esponjas de vidro. Apresentam espículas silicosas; com 6 raios (hexactinas), separadas ou unidas em rede, alguns esqueletos assemelham-se a fios de vidro. A massa do corpo, geralmente cilíndrica ou em forma de funil; sem epitêlio na superfície e coanócitos somente em camadas digitiformes; comprimento de até um metro. São exclusivamente marinhas à profundidade da linha de maré baixa até 6000 metros.

Classe 3

Demospongiae. Apresenta esqueleto de espículas silicosas ou de esponginas, ou de ambas e pode até mesmo estar ausente. As espículas quando presentes são de 6 raios.

A. Revisão do constituinte esteroidal das esponjas

Os esteróis compreendem um grupo de produtos naturais que têm como esqueleto base, um esqueleto tetracíclico substituído(1). O esterol mais abundante, de origem animal, é o colesterol(2). Muitos outros estão relacionados estruturalmente à 2; e entre estes estão aqueles que foram extraídos de invertebrados marinhos. Estes esteróis são produtos metabolizados através de processos biológicos, e capazes de se transformarem em outras substâncias necessárias à vida dos organismos. Alguns deles são utilizados como materiais de partida para as sínteses de hormônios esteroidais farmacologicamente ativos.



A química da esponja começou com o trabalho pioneiro de Bergmann⁴ sobre os esteróis da esponja Microciona prolifera. Desde então, as esponjas foram reconhecidas como constituintes da maior variedade de esteróis do Reino Animal⁵. Em 1972, surgiram as modernas reinvestigações sobre os esteróis das esponjas confirmando-se a complexidade da composição esteroidal no filo e descobriu-se esteróis totalmente novos.

Na Figura 1 e Tabela 1 estão os esteróis "clássicos" (isolados das esponjas), que têm o núcleo tetracíclico com 19 átomos de carbono e a cadeia lateral com 8 átomos de carbono ou modificada

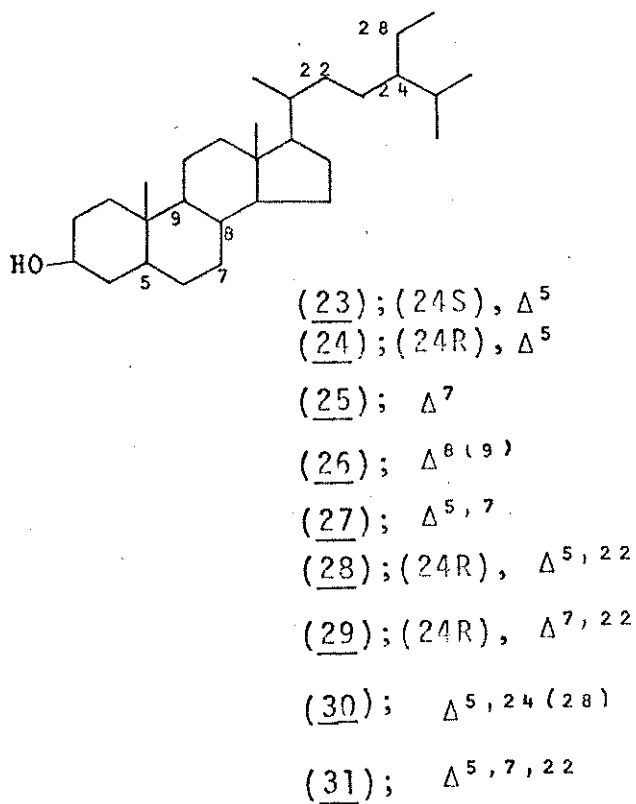
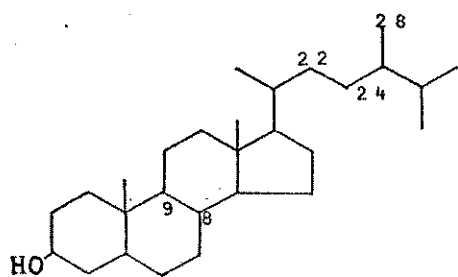
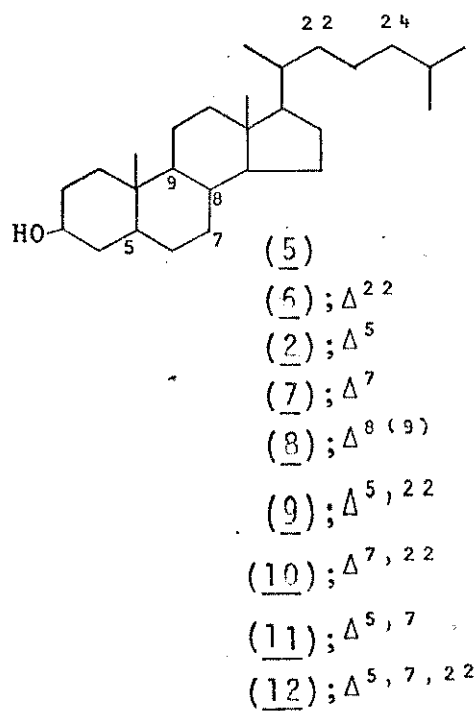
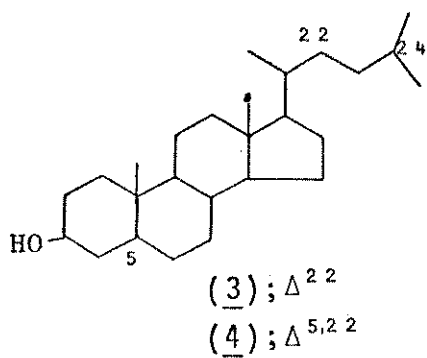


Figura 1. Esteróis "clássicos" encontrados nas esponjas. Os nomes sistemáticos e as referências a literatura científica estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Os esteróis "clássicos" encontrados nas esponjas, reportados na literatura científica.

Composto	Nome comum	Nome sistemático	Ref.
2	colesterol	colest-5-en-3 β -ol	7,11
3	-	24-norcolesta-22-en-3 β -ol	7
4	-	24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol	7,11
5	colestanol	5 α -colest-3 β -ol	7
6	22-dehidrocolestanol	5 α -colest-22-en-3 β -ol	7
7	latosterol*	5 α -colest-7-en-3 β -ol	8
8	Δ 8(9)-colest-3 β -ol	5 α -colest-8(9)-en-3 β -ol	8
9	22-dehidrocolest-3 β -ol	colest-5,22-dien-3 β -ol	7,11
10	Δ 7,22-colest-3 β -ol	colest-7,22-dien-3 β -ol	8
11	7-dehidrocolest-3 β -ol	colest-5,7-dien-3 β -ol	8
12	-	colest-5,7,22-trien-3 β -ol	8
13	22,23-dihidrobrassicasterol	(24S)-24-metilcolest-5-en-3 β -ol	7,11
14	Δ 7-ergosterol*	24-metilcolest-7-en-3 β -ol	8
15	Δ 8(9)-ergosterol*	24-metilcolest-8(9)-en-3 β -ol	8
16	neospingosterol	5 α -(24S)-24-metilcolest-22-en-3 β -ol	7
17	24-metilenocolestanol	5 α -24-metilcolest-24(28)-en-3 β -ol	7
18	22,23-dihidroergosterol*	24-metilcolest-5,7-dien-3 β -ol	8
19	5,6-dihidroergosterol*	24-metilcolest-7,22-dien-3 β -ol	8
20	brassicasterol	(24R)-24-metilcolest-5,22-dien-3 β -ol	7,11
21	24-metilenocolesterol	24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol	7,9,11
22	ergosterol	(24R)-24-metilcolest-5,7,22-trien-3 β -ol	8
23	clionasterol	(24S)-24-etilcolest-5-en-3 β -ol	7,10,11
24	β -sitosterol	(24R)-24-etilcolest-5-en-3 β -ol	7
25	- *	24-etilcolest-7-en-3 β -ol	8
26	- *	24-etilcolest-8(9)-en-3 β -ol	8
27	- *	24-etilcolest-5,7-dien-3 β -ol	8

Tabela 1 - Continuação

28	poriferasterol	(24R)-24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol	7,10,11
29	condrilasterol	(24R)-24-etilcolesta-7,22-dien-3 β -ol	-
30	fucoesterol	24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol	7
31	- *	24-etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol	8

* Esteróis identificados por C.G.L./E.M., e não foram isolados.

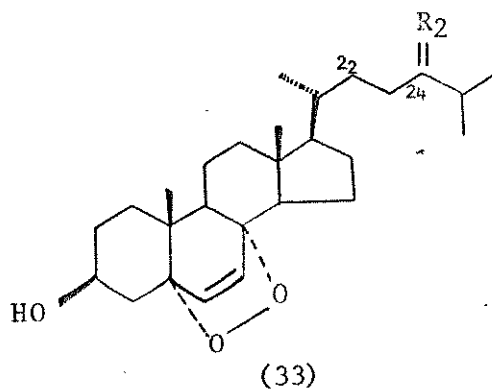
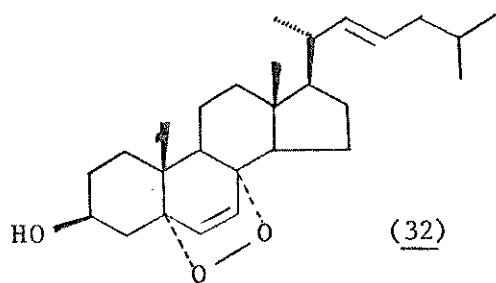
pela adição de um ou dois átomos de carbono em C-24⁶.

Em 1972, Erdman e Thomson⁷ aludiram à reinvestigação dos esteróis das esponjas Cliona celata e Hymeniacidon perleve. A Clio na celata continha uma mistura de 8 esteróis: colesterol (2, componente predominante); 24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol(4); 22-deidrocolesterol(9); 24-metilenocolesterol(21); brassicasterol(20); 22,23-diidrobrassicasterol(13); poriferasterol(28) e clionasterol(23). Em Hymeniacidon perleve, o colestanol(5) era o esterol predominante, acompanhado de mais sete esteróis em quantidades menores, incluindo três novos esteróis marinhos: 24-norcolesta-22-en-3 β -ol(3); 22-deidrocolestanol(6) e 24-metilenocolestanol(17).

Uma análise dos esteróis da Axinella cannabina, pelo grupo de Fattorusso⁸, revelou a presença de quinze componentes incluindo esteróis 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 31; juntamente com o colesterol (2%). Encontraram também uma mistura de 5,8-peróxidos, dos quais o 5,8-epidioxicolesta-6,22-dien-3 β -ol¹²(32) era de maior quantidade. Sheikh e Djerassi¹³ isolaram uma série de 5 α ,8 α -peróxidos (33.a até 33.d) juntamente com Z-24-propilidenocolesta-5-en-3 β -ol(34), da esponja Tethya aurantia.

Todas as espécies Verongia estudadas continham, como componentes principais, dois novos esteróis designados aplisterol(35) e 24,28-dideidroaplisterol(36), com um padrão de alquilação "normal" da cadeia lateral em C-24 e uma adição "extra" de um grupo metila em C-26. Outros esteróis, sem o grupo metila em C-26, também foram encontrados em menor quantidade (1% do conteúdo esterólico) em quase todas estas espécies.

Outro padrão de alquilação da cadeia lateral foi encontrado no esterol denominado calisterol, componente principal da esponja Calix nicaensis. A estrutura (37) do esterol foi proposta pelo

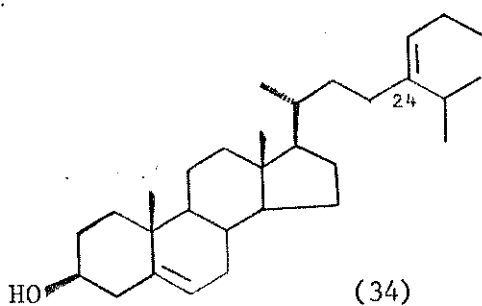


33.a; R=H₂

33.b; R= $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$; $\Delta^{2,2}$

33.c; R= CH₂; $\Delta^{2,4(28)}$

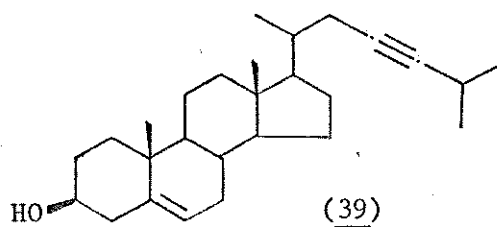
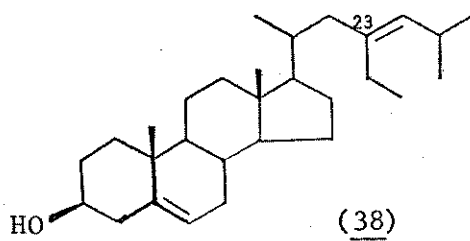
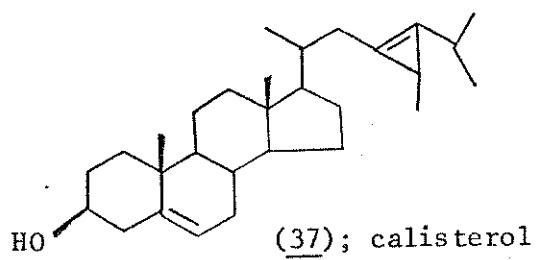
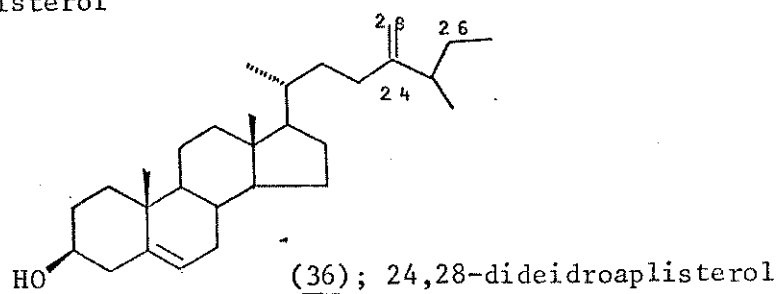
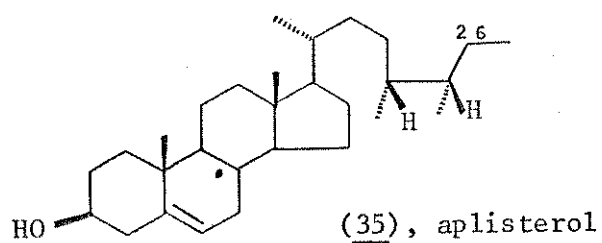
33.d; R= CH₂CH₃



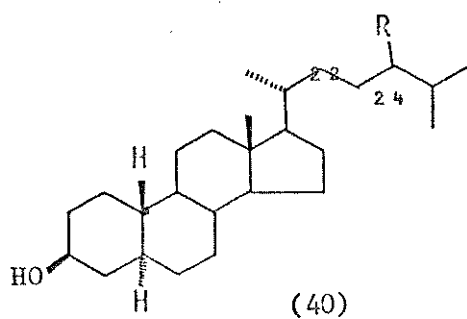
grupo de Fattorusso¹⁵, baseando-se nos dados espectroscópicos (EM e RMP) do acetato e nas degradações químicas. O mesmo grupo também descobriu dois outros esteróis novos, (38) e (39); este último é o primeiro exemplo de um esteróide com função acetilênica.

O componente esteroidal da *Axinella polypoides* é uma mistura de estanóis tendo o núcleo 19-norcolestanol(40) com cadeia lateral saturada e C₇(24-nor), C₈, C₉ e C₁₀ mono-insaturada¹⁶.

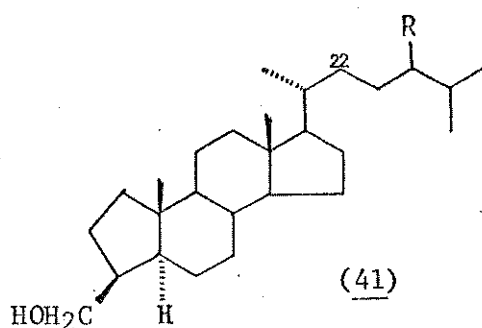
*Axinella verrucosa*¹⁷ contém uma série de estanóis com um nú



cleo 3 β -hidroxi-A-nor-5 α -colestano(41) e a cadeia lateral com C₈, C₉ e C₁₀.



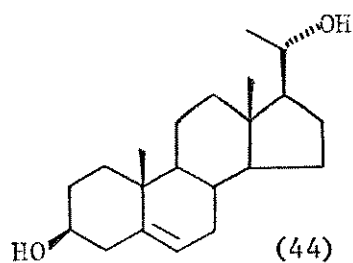
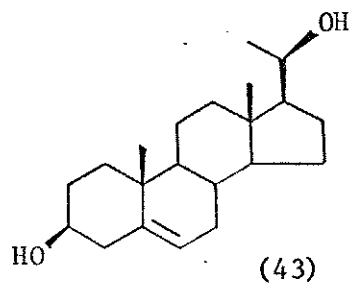
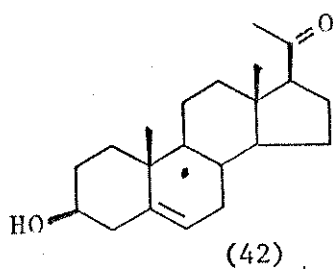
- a; R = H, 24-nor
b; R = H
c; R = Me
d; R = Et
e; R = H, Δ^{22} -trans
f; R = Me, Δ^{22} -trans
g; R = Me, Δ^{24} (28)
h; R = Et, Δ^{22} -trans



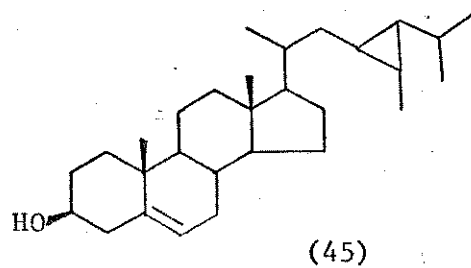
- a; R = H
b; R = Me
c; R = Et, Δ^{22}
d; R = H, Δ^{22}
e; R = Me, Δ^{22}
f; R = Et

Recentemente foi relatada a ocorrência de um número de derivados de pregnana na mistura esterólica isolada da esponja Haliclona rubens¹⁸. Esta esponja contém (42); 3 β ,20 β -dihidroxi-17 β -pregn-5-eno(43) e 3 β ,20 α -diidroxi-17 β -pregn-5-eno(44) juntamente com outros ceto-esteróis ainda não identificados. Esta é a primeira comunicação da ocorrência de esteróis livres derivados de pregnana no ambiente marinho.

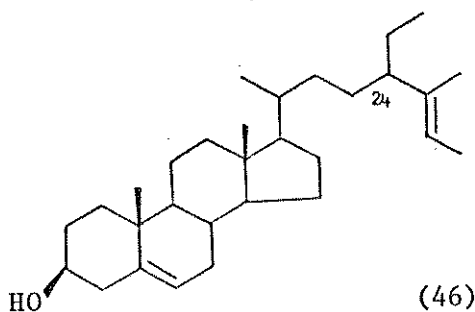
Da esponja Petrosia ficiformis¹⁹ isolou-se o esterol 23,28-cicloestigmast-5-en-3 β -ol(45, componente mais abundante) denominado petrosterol. Sua estrutura difere daquela do calisterol(37)



somente pela ausência da ligação dupla em C_{23,24}.



Estoriferasterol(46) é um novo esterol marinho, com uma ligação dupla na cadeia lateral, isolado da esponja Jaspis stolife-ra. Sua estrutura é baseada no RMN e espectrometria de massa (fragmentações características dos esteróis com insaturação no C₅ e na cadeia lateral)²⁰.

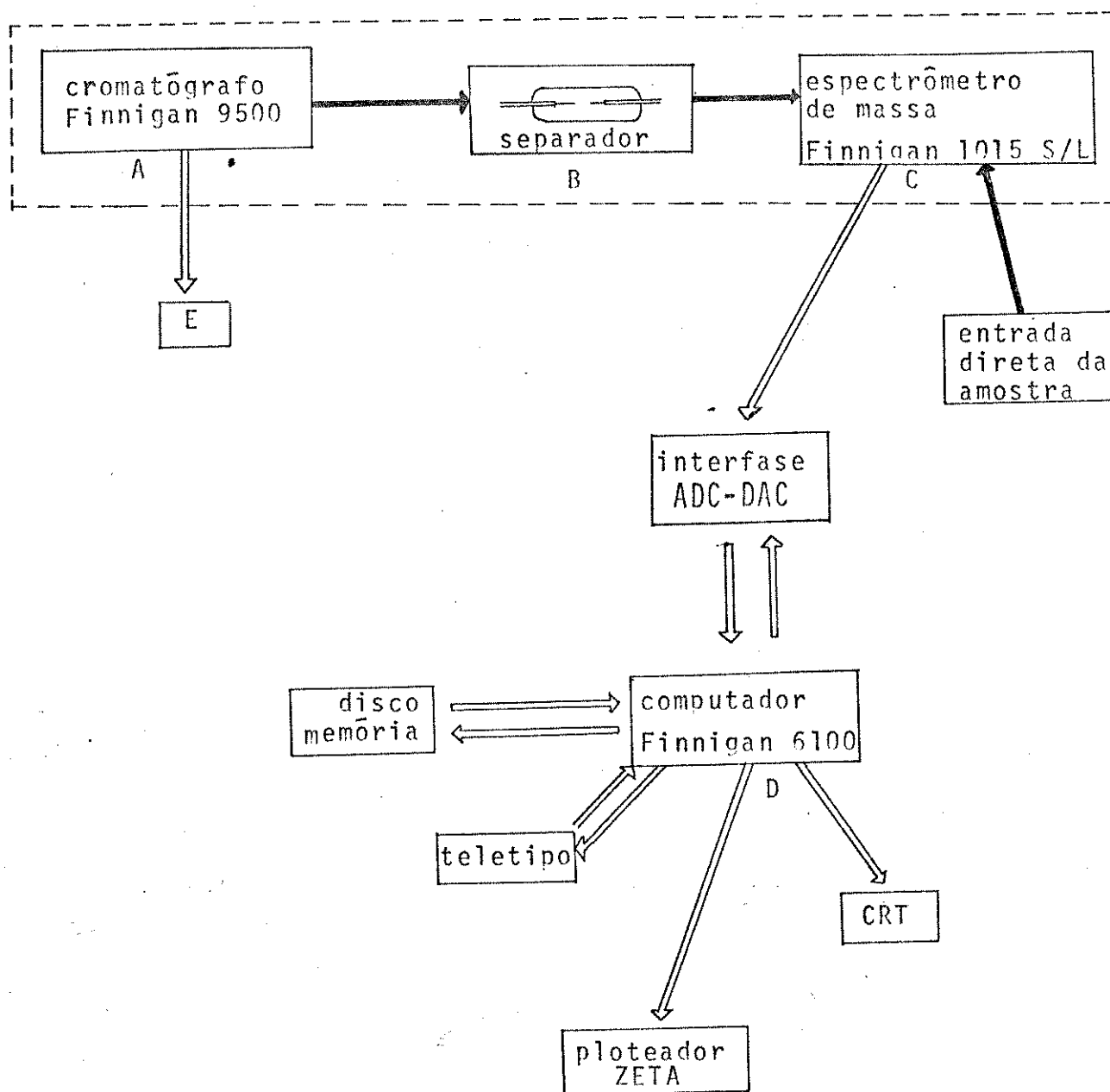


B. Cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de massa na análise de misturas esterólicas extraídas de tecidos vivos.

A cromatografia gasosa, por si só, é capaz de detectar, separar e caracterizar parcialmente os compostos, usando-se quantidades extremamente pequenas. Por outro lado, a espectrometria de massa pode proporcionar informações estruturais, também com quantidades mínimas. A associação destas duas técnicas constitui um dos sistemas mais úteis na identificação de compostos, presentes nas misturas bem complexas, tanto naturais quanto sintéticas.

O sistema básico de um CG-EM consiste de várias partes. As fundamentais são: o cromatógrafo de gás (A) e o espectrômetro de massa (C) (Figura 2). Existe uma diferença de pressão bastante alta entre estes dois sistemas. O cromatógrafo de gás (A) opera a uma pressão de aproximadamente 1 atmosfera (760 Torr). Por outro lado, o espectrômetro de massa (C) opera à pressão na faixa de 10^{-6} a 10^{-4} Torr. Por esta razão, é necessário uma interfase (B) entre os dois sistemas. Em geral, a interfase reduz a pressão utilizando-se o princípio da diferença na velocidade de efusão das moléculas, com pesos moleculares diferentes²¹:

$$\frac{v_1}{v_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}}$$



E=Registrador potenciométrico para CG.

----- Limite de zonas aquecidas.

————> Caminho da amostra.

====> Caminho dos dados.

CRT= Tubo de raios catódicos.

ADC= Conversor análogo ao digital.

DAC= Conversor digital ao análogo.

Figura 2. Diagrama esquemático de um sistema CG-EM-Computador.

Assim, se o gás de arraste é o Hélio (P.M. = 2), a velocidade de efusão dele será muito maior que a velocidade de efusão de qualquer outro gás de um composto orgânico. O resultado é que, usando-se um sistema de bombardeamento rápido, pode-se concentrar a amostra em relação ao gás de arraste, e ao mesmo tempo reduzir a pressão total.

A técnica CG-EM tem sido extensivamente utilizada no estudo das composições esteroidais de animais marinhos, bem como nos estudos biossintéticos. Por exemplo, a esponja marinha Axinella cannabina⁸ continha pelo menos 16 esteróis quando analisados por CG-EM. Primeiramente, a mistura esterólica foi acetilada e a seguir foi cromatografada numa coluna de $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{AgNO}_3$ (2:1). Foram isolados três componentes puros (2, 7, 14) na forma dos seus derivados acetatos. Devido à complexidade da mistura, foram selecionadas cinco frações da coluna cromatográfica de $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{AgNO}_3$, e estas foram examinadas por CG-EM (Figura 3). Outros treze compo

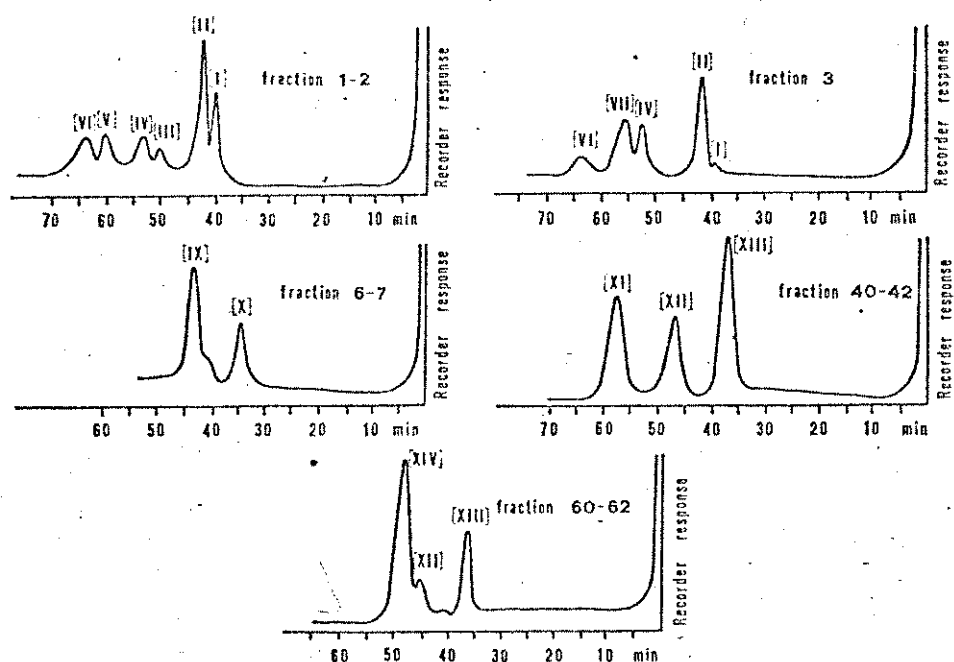


Figura 3. Cromatograma de gás em SE 30(3%) dos acetatos do esteroi obtidos após uma separação preliminar por coluna cromatográfica de $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{AgNO}_3$.

10

nentes foram identificados, através das análises dos seus derivados acetatos, baseando-se principalmente nos padrões de fragmentações comuns dos esteróis e comparados com aqueles de amostras autênticas.

Como podemos notar, o método de cromatografia líquida de baixa pressão, além de ser trabalhoso não é muito eficiente, principalmente quando se trata de uma mistura esteróica tão complexa. Por outro lado uma seleção, das colunas utilizadas e das condições ideais de operação do cromatógrafo de gás, proporciona uma separação bastante razoável permitindo a identificação de cada componente através da análise dos espectros de massa correspondentes a cada pico do cromatograma de gás.

II. Objetivos

A extensa pesquisa de Bergmann⁴ sobre os esteróis das esponjas foi iniciada antes da introdução de eficientes métodos cromatográficos. Ele sabia que muitos dos dados acumulados, provavelmente, se referiam à mistura de esteróis e não aos compostos puros. Tendo-se em mente esta dificuldade de separação dos esteróis das esponjas, decidimos iniciar o estudo da mistura esteróica da esponja Tedania ignis com três objetivos principais:

a) Usar a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) para comprovar a existência e o número de esteróis na Tedania ignis;

b) Verificar a presença ou não de esteróis totalmente novos, devido às condições do meio ambiente serem totalmente diferentes daquelas esponjas já estudadas (geralmente do Mar Mediterrâneo e Oceano Pacífico);

c) E propor uma estrutura para os esteróis encontrados.

III. Parte Experimental

A. Informações gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros das marcas Fischer, Merck e Carlo Erba.

Os pontos de fusão foram determinados em um instrumento Mettler FP5 acoplado ao microscópio FP52, da Carl Zeiss.

As cromatografias em camada delgada foram feitas utilizando-se sílica gel G ou HF₂₅₄ Merck A.G. suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm sobre placas de 5 x 20 cm, 10 x 20 cm ou 20 x 20 cm, utilizando-se um aparelho Quickfit. As placas preparativas foram feitas da mesma maneira utilizando-se sílica PF₂₅₄, distribuída em camada de 1,00 mm. Essas cromatografias foram reveladas em lâmpada ultravioleta Gelman-Camag (254 nm), ou então vapor de iodo ressublimado.

As cromatografias líquidas em coluna foram feitas utilizando-se sílica gel (0,05-0,20 mm) para cromatografia. O diâmetro e comprimento das colunas de vidro utilizadas variaram de acordo com a quantidade de adsorvente utilizado.

Os espectros de absorção no infravermelho foram feitos em pastilhas de KBr (1:100), em um instrumento Perkin-Elmer modelo 337. Foram utilizadas como referência as absorções em 1601 cm⁻¹ e 1028 cm⁻¹, de um filme de poliestireno.

Os espectros de ressonância magnética protônica, foram obtidos com um instrumento Varian mod. T-60, usando-se TMS como referência interna. Utilizou-se CDCl₃ ou CCl₄ como solvente.

Os espectros de massa foram obtidos com um sistema Finnigan resumido a seguir.

Resumo da instrumentação CG-EM (Figura 2)

Cromatógrafo de gás (CG). Cromatógrafo Finnigan mod. 9500

2 colunas de vidro Pyrex, em forma de U e 2m x 2 mm de ϕ_i , em paralelas acopladas a 2 detectores:

a) Detetor de ionização de chama:

Temperatura do detetor: 280°

b) Detecção por espectrômetro de massa

Fase estacionária: 3% de OV-17

Suporte sólido: Gas Chrom Q 60/80 mesh

Gás de arraste: Hélio (He)

Fluxo: 30 ml/min

Temperatura das colunas: programada entre 200-250°, com velocidade de 2°/min. Ao término da programação a temperatura foi mantida no limite superior.

Quantidade injetada: 2 μ l (5 mg da mistura/1 ml de solvente).

Separador: Separador de vidro, a jato, de um único estágio.

Espectrômetro de massa (EM). Espectrômetro Quadrupolar Finnigan mod. 1015 S/L.

Energia iônica: 20 e 70 eV

Corrente iônica total: 300 μ A

Sensibilidade: 10⁻⁷ A/mV

Computador: Finnigan mod. 6100

Teletipo: mod. TTY SET

Ploteador: "Zeta Plotter" - série 100

B. Coleta e identificação das esponjas

A coleta foi feita no mês de setembro de 1975, pelos Prof. Dr. Luis Bravo (Química), Prof. Dr. Pierre Montouchet (Biologia),

L.F. Lembo Duarte (Biologia) e E.H. Morgado (Biologia), na enseada do Flamengo, Praia da Ribeira, ao sul da cidade de Ubatuba no estado de São Paulo à baixa maré. As esponjas vermelhas foram cortadas da rocha com uma espátula, à linha da maré baixa e foram semi-congeladas numa caixa de isopor para serem transportadas até a cidade de Campinas (Unicamp). Na Unicamp, elas ficaram estocadas durante cinco dias no congelador (Freezer).

As esponjas foram trituradas num moedor e colocadas em bandejas próprias do liofilizador "Stokes Freeze Dryer. Equip. Div. Pennsalt Chem. Phila.", do ITAL (Instituto Tecnológico de Alimentos). As esponjas foram liofilizadas durante 36 horas, até atingir uma temperatura final de 15°C.

A classificação destas esponjas foi feita pelo Prof. Dr. M. Sarà da Universidade de Gênova em Itália. Assim, ele confirmou que esta esponja é a Tedania ignis que pertence à classe Demospongiae.

C. Extração

Para o início do trabalho foram repartidas aproximadamente três kg de esponjas liofilizadas em dois recipientes, devidamente cobertos com papel escuro, da seguinte maneira:

Recipiente 1: 1500 g de esponjas liofilizadas

Recipiente 2: 1435 g de esponjas liofilizadas

Foram feitos 3 extratos: um com éter de petróleo, outro com acetona e outro com clorofórmio-metanol (2:1)

1. Extração com éter de petróleo

As esponjas (2935 g) liofilizadas foram extraídas com éter

de petróleo, à temperatura ambiente, em 5 etapas conforme indica a Tabela 2.

Tabela 2. Extração com éter de petróleo (30° - 40°) da esponja Tedania ignis.

	Quantidade de éter de petróleo-P.A. /litros	Tempo de extração (dias)
1a. etapa	28	8
2a. etapa	21 [*]	5
3a. etapa	21 [*]	5
4a. etapa	20 [*]	7
5a. etapa	20 [*]	3

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior

Após cada extração o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo.

Obteve-se 91,5 g de um material pastoso, vermelho-escuro, denominado extrato éter de petróleo (TEP). O espectro no infravermelho deste extrato (Figura 4) apresenta picos nas regiões características para hidroxila e estiramento C-H para hidrocarbonetos.

2. Extração com acetona

Após a eliminação do éter de petróleo das esponjas do recipiente 1 (1500 g de esponja), prosseguiu-se à extração com acetona. A extração foi realizada em 5 etapas, à temperatura ambiente, conforme a Tabela 3.

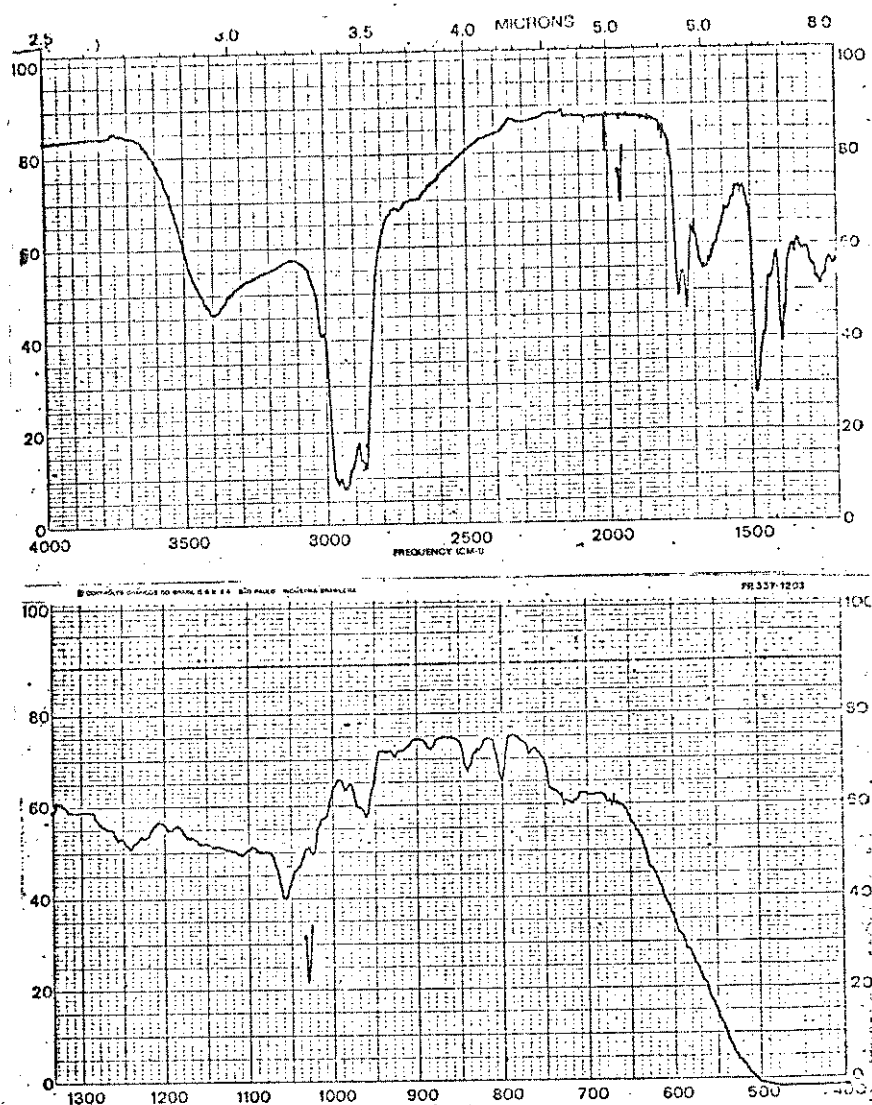


Figura 4. Espectro no I.V. do extrato éter de petróleo (TEP).

Após a concentração a baixo vácuo, no evaporador rotativo, resultou uma massa oleosa marron-escuro, que foi submetida a uma extração de partição com éter etílico e água destilada (3 vezes), conforme o Esquema 1.

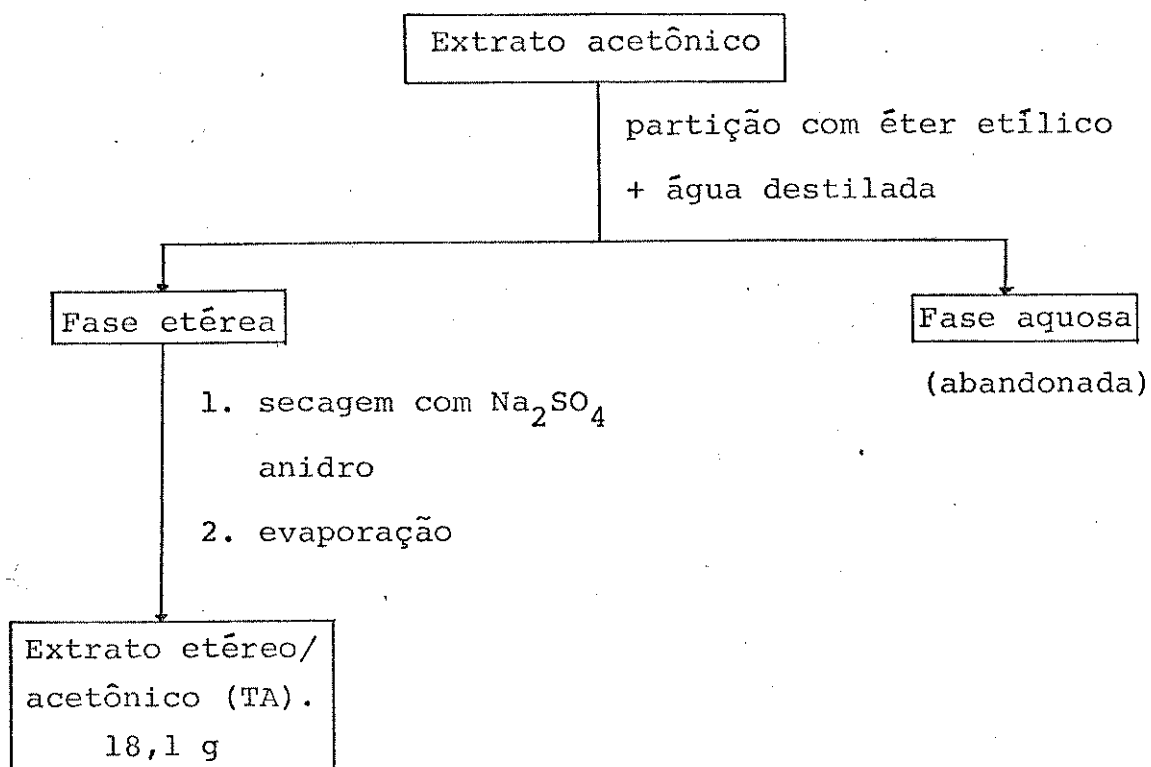
Obteve-se 18,1 g de extrato etéreo/acetônico, marron-escuro, denominado TA. O espectro de absorção no infravermelho é apresentado na Figura 5. O espectro apresenta picos nas regiões características para carbonila, hidroxila e estiramento C-H de hidrocarbonetos.

Tabela 3. Extração com acetona da esponja Tedania ignis
(resíduo da extração com éter de petróleo).

	Quantidade de acetona - P.A. /litros	Tempo de extração (dias)
1a. etapa	8	10
2a. etapa	8*	10
3a. etapa	8*	8
4a. etapa	8*	19
5a. etapa	8*	7

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior

Esquema 1



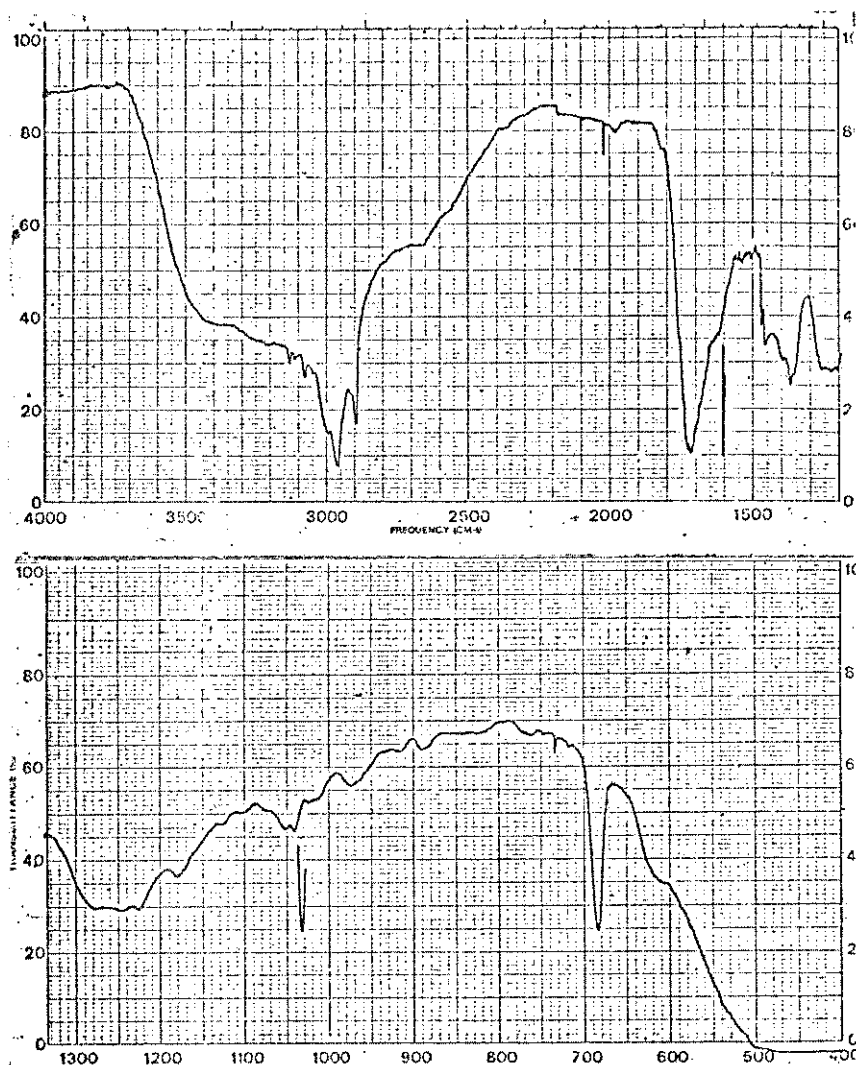


Figura 5. Espectro no I.V. do extrato acetônico (TA).

3. Extração com clorofórmio-metanol (2:1)

Após a eliminação do éter de petróleo, a extração foi prosseguida com clorofórmio-metanol (2:1), para o recipiente 2 (1435 g de esponja). A extração foi feita em 4 etapas conforme a Tabela 4.

Após a evaporação do solvente, no evaporador rotativo, resultou uma pasta escura, que recebeu o tratamento resumido no Es-

Tabela 4. Extração com clorofórmio-metanol (2:1) da esponja Tedania ignis (resíduo da extração com éter de petróleo).

	Quantidade de clorofórmio-metanol (2:1) - P.A. /litros	Tempo de extração (dias)
1a. etapa	8	7
2a. etapa	8*	12
3a. etapa	8*	15
4a. etapa	8*	150

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior.

quema 2 .

Obteve-se 42,4 g do extrato clorofórmio-metanol (2:1)/fase etérea, e o seu espectro de absorção no infravermelho é apresentado na Figura 6. O espectro apresenta picos característicos na região de hidroxila, carbonila e estiramento C-H de hidrocarbonetos.

No Esquema 3 apresentamos um resumo dos tratamentos a que as esponjas foram submetidas.

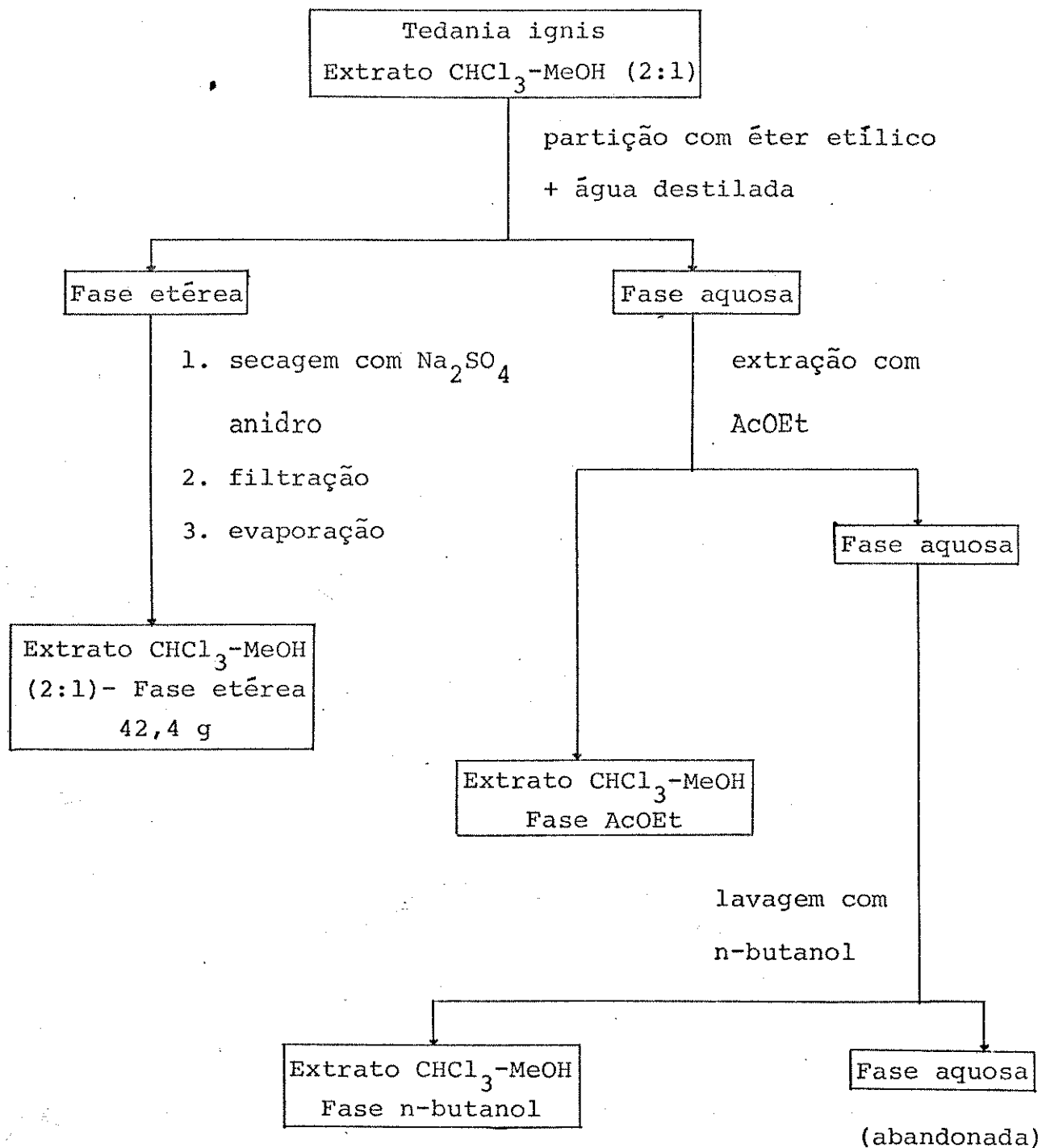
D. Isolamento do constituinte esteroidal do extrato TEP

O estudo preliminar do extrato éter de petróleo (TEP) foi feito através de cromatografia gasosa do extrato bruto. Esse teste preliminar nos indicou que o extrato continha os esteróis.

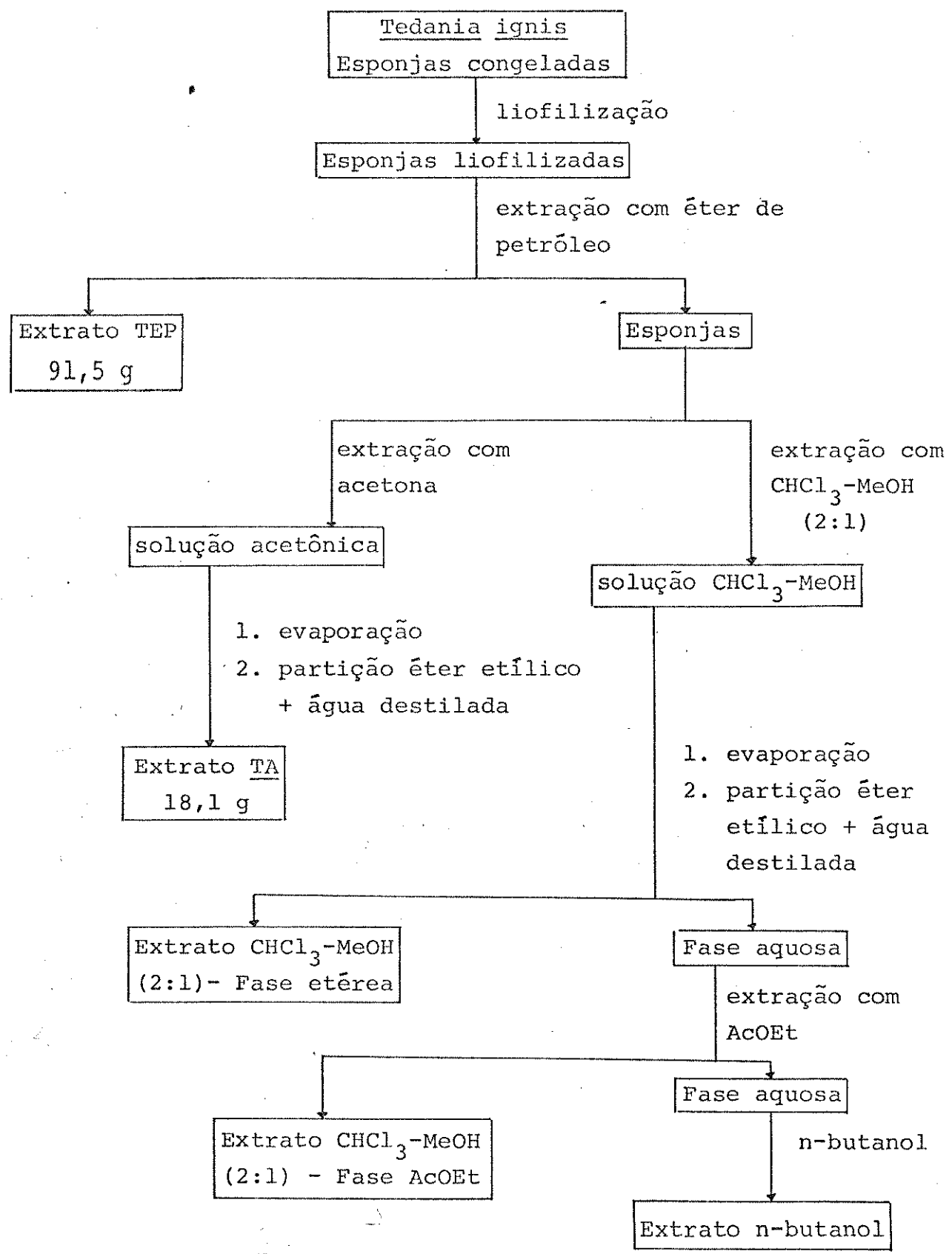
O extrato foi submetido a uma saponificação para obter os esteróis da parte não saponificada.

A saponificação foi feita com 39,0 g do extrato TEP, adicionando-se 700 ml de solução metanólica de KOH (10%). Deixou-se a

Esquema 2



Esquema 3



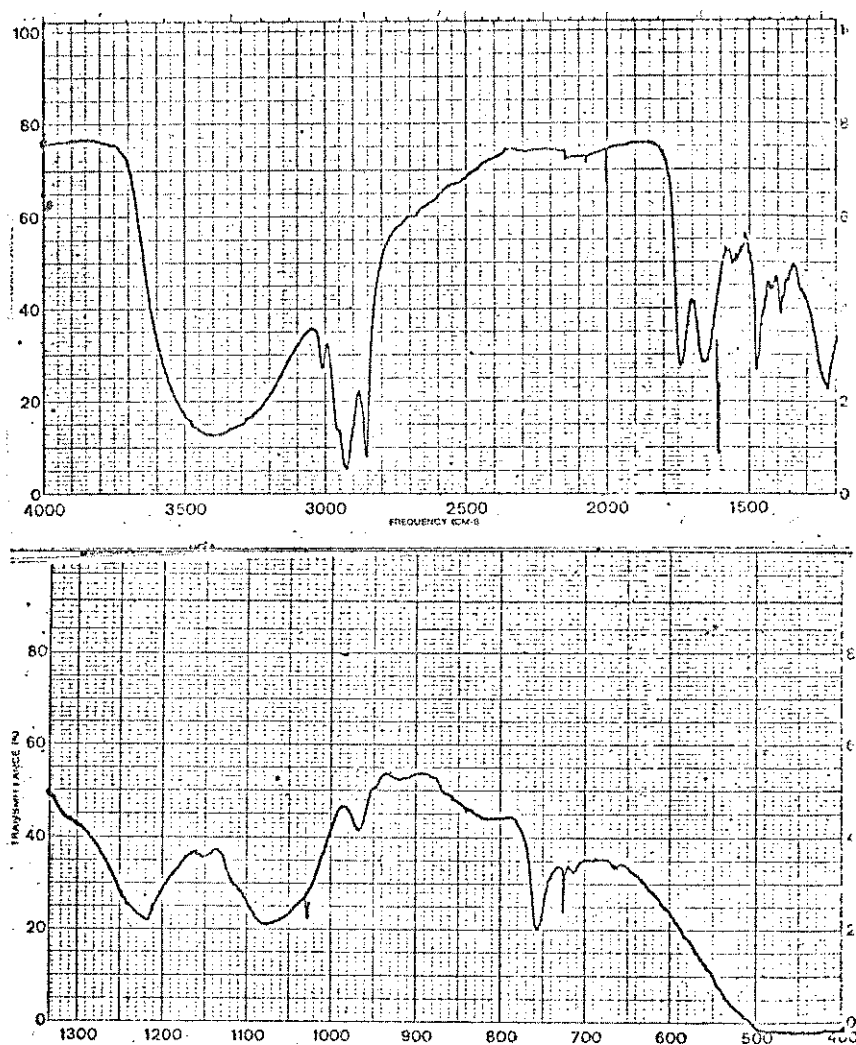


Figura 6. Espectro de I.V. do extrato $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1).

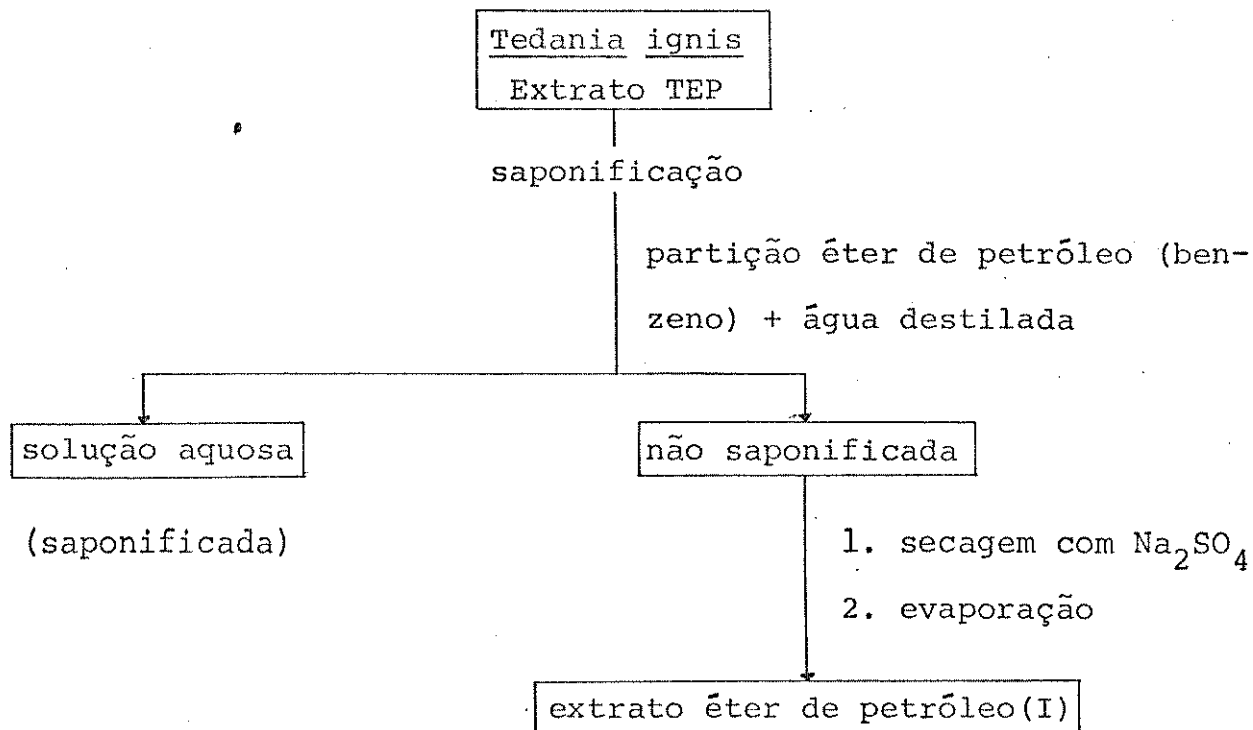
solução em refluxo durante 6 horas. Após este período de refluxo, evaporou-se o solvente, em evaporador rotativo, e adicionou-se água destilada para fazer partição com éter de petróleo e benzeno, várias vezes. Estas soluções foram combinadas e lavadas com água até que a solução aquosa se tornasse neutra (Esquema 4).

O extrato da parte não saponificada TEP(I), foi fracionado através de cromatografia em coluna de sílica gel, com as seguintes condições:

quantidade de sílica gel: 450 g

altura da sílica gel na coluna: 60 cm

Esquema 4



diâmetro interno da coluna: 4,5 cm

quantidade do extrato: 10 g.

Iniciando-se a eluição com hexano, aumentou-se a polaridade misturando-se CH_2Cl_2 ao hexano nas seguintes proporções: 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100% de CH_2Cl_2 . Em seguida o CH_2Cl_2 foi misturado com MeOH nas proporções de 10%, 30% e 50% de MeOH.

Coletou-se 307 frações de 250 ml cada uma. As frações foram agrupadas conforme se apresentaram na cromatografia em camada delgada de sílica gel (Tabela 5).

Foram separadas duas frações para um estudo mais detalhado. Estas foram EPI-A (frações 182-202; 1,270 g) e EPI-B (frações 203-238; 3,060 g). Cada uma foi cristalizada e recristalizada em benzeno/metanol. Obteve-se cristais transparentes e bem brilhantes. A fração EPI-A nos forneceu 0,950 g de composto cristalino, de ponto de fusão $131,0-136,0^\circ\text{C}$, e a fração EPI-B nos forneceu

Tabela 5. Frações agrupadas da cromatografia
líquida em coluna do extrato TEP(I),
da esponja Tedania ignis.

Frações agrupadas	Peso (gramas)
1-6	0,215
7-8	0,383
9-13	0,101
19-45	0,029
49-114	0,065
115-157	0,050
158-181	0,431
182-202	1,270
203-238	3,060
239-257	0,256
258-301	0,589
302-306	0,196
307	1,390

2,245 g de composto cristalino, de ponto de fusão 133,5-138,0°C.

E. Isolamento do constituinte esteroidal do Extrato acetônico

Iniciou-se o estudo do extrato acetônico por meio de cromatografia em camada delgada de sílica gel, usando-se diferentes sistemas de solventes. Baseando-se nos resultados das placas, decidiu-se fazer um fracionamento preliminar, por cromatografia em coluna de sílica gel.

O extrato acetônico (TA, 18,1 g), marron-escuro, foi dividido em duas porções: uma de 11,0 g e outra de 7,1 g. Cada porção foi fracionada em coluna de sílica gel, com as seguintes condições:

diâmetro da coluna: 4,5 cm

altura da coluna de sílica gel: 70 cm

quantidade de sílica gel na coluna: 450 g.

Iniciou-se a eluição com cloreto de metileno. A partir da fração 45 aumentou-se a polaridade misturando-se metanol ao cloreto de metileno nas seguintes proporções: 1%, 5%, 10% e 50%.

Foram coletadas frações de 250 ml cada uma e agrupadas conforme se apresentaram na cromatografia em camada delgada de sílica gel. As frações semelhantes, conforme as placas analíticas de ambas as colunas, foram combinadas (Tabela 6).

E.1. Estudo da fração TA-D

Iniciou-se o estudo da fração TA-D (0,651 g) (Tabela 6) por meio de cromatografia em camada de sílica gel, utilizando-se diferentes sistemas de solventes.

A partir dos dados das placas analíticas, decidiu-se fazer cromatografia em placa preparativa, utilizando-se benzeno/éter etílico (15%) como eluente e aplicando-se aproximadamente 100 mg do composto em cada placa. Destas placas foram obtidas duas faixas principais (f-1 e f-3), sendo f-1 a faixa mais polar.

Da faixa f-1 obteve-se um composto branco, que foi recristalizado em hexano/metanol, dando-se cristais brilhantes em forma de agulha (40,6 mg), denominado D/B, ponto de fusão 132,0-139,0°C.

Com a faixa f-3 (0,137 g) foram feitas placas analíticas em vários solventes e a partir dos resultados das placas decidiu-se fazer cromatografia em coluna de sílica gel. Utilizou-se benzeno como eluente e aumentou-se a polaridade gradativamente com acetato de etila. As frações semelhantes foram agrupadas e o solvente evaporado.

Tabela 6. Fracionamento do extrato acetônico (TA) da esponja Tedania ignis.

Eluentes	Frações coletadas	Frações combinadas	Denominação	Pesos (g)	Coloração
cloreto de metileno	0 a 45	0-2	TA-D	0,359	laranja
		3-4		0,356	vermelha
		5-15		0,251	vermelho-escuro
		16-29		0,651	creme
		30-45		0,100	verde
cloreto de metileno-metanol(5%)	45 a 56	46-53	TA-G	0,384	marron
		54-56		5,177	preto
cloreto de metileno-metanol(10%)	57 a 66	57-63		0,733	preto
		64-68		7,050	preto
cloreto de metileno-metanol(50%)	67 - 68	-	-	-	-
				Total =	
				15,064g	

(-) quantidade retida na coluna.

O composto creme obtido foi recristalizado em hexano/metanol, dando-se cristais transparentes, finos e bem brilhantes. Este composto (60 mg) foi denominado F-3, ponto de fusão 132,0-135,0°C.

F. Caracterização dos esteróis

Foram empregados testes de coloração, cromatografia gasosa, estudos espectroscópicos, preparação do derivado e finalmente cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para a caracterização dos esteróis D/B, F-3, EPI-A e EPI-B.

a) Teste de coloração. Para este fim, utilizou-se a reação de Liebermann-Burchard²².

Dissolveu-se cerca de 1 mg de esterol em 0,5 ml de clorofórmio. À esta solução adicionou-se, sucessivamente, 3 gotas de anidrido acético e 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. A solução imediatamente adquiriu uma coloração vermelha que passou para azul e em seguida verde. Esta é considerada uma reação positiva dos esteróis.

Os quatro compostos testados deram resultados positivos de esterol.

b) Cromatografia gasosa

Um estudo destes compostos, no cromatógrafo de gás, forneceu cromatogramas onde os quatro compostos apresentavam o mesmo número de picos e tempos de retenção idênticos (Figura 7). Então, decidiu-se reunir estes esteróis e denominou-se mistura esterólica da Tedania ignis.

c) Dados espectroscópicos

O espectro de absorção no infravermelho da mistura esterólica (Figura 8) apresentou as seguintes absorções; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} (\text{cm}^{-1})$: 3420, 2950, 2860, 1470, 1380, 1340, 1050, 960, 840 e 800. O espectro de ressonância magnética protônica da mistura esterólica (Figura 9); δ (60 MHz; CDCl_3): 0,70(s), 0,90(s), 1,04(s), 3,50(m), 5,40(m).

d) Obtenção do derivado

Acetilação da mistura esterólica: Dissolveu-se 40 mg da mistura esterólica em 4 ml de piridina adicionando-se a seguir 4 ml de anidrido acético. A reação foi deixada à temperatura ambiente

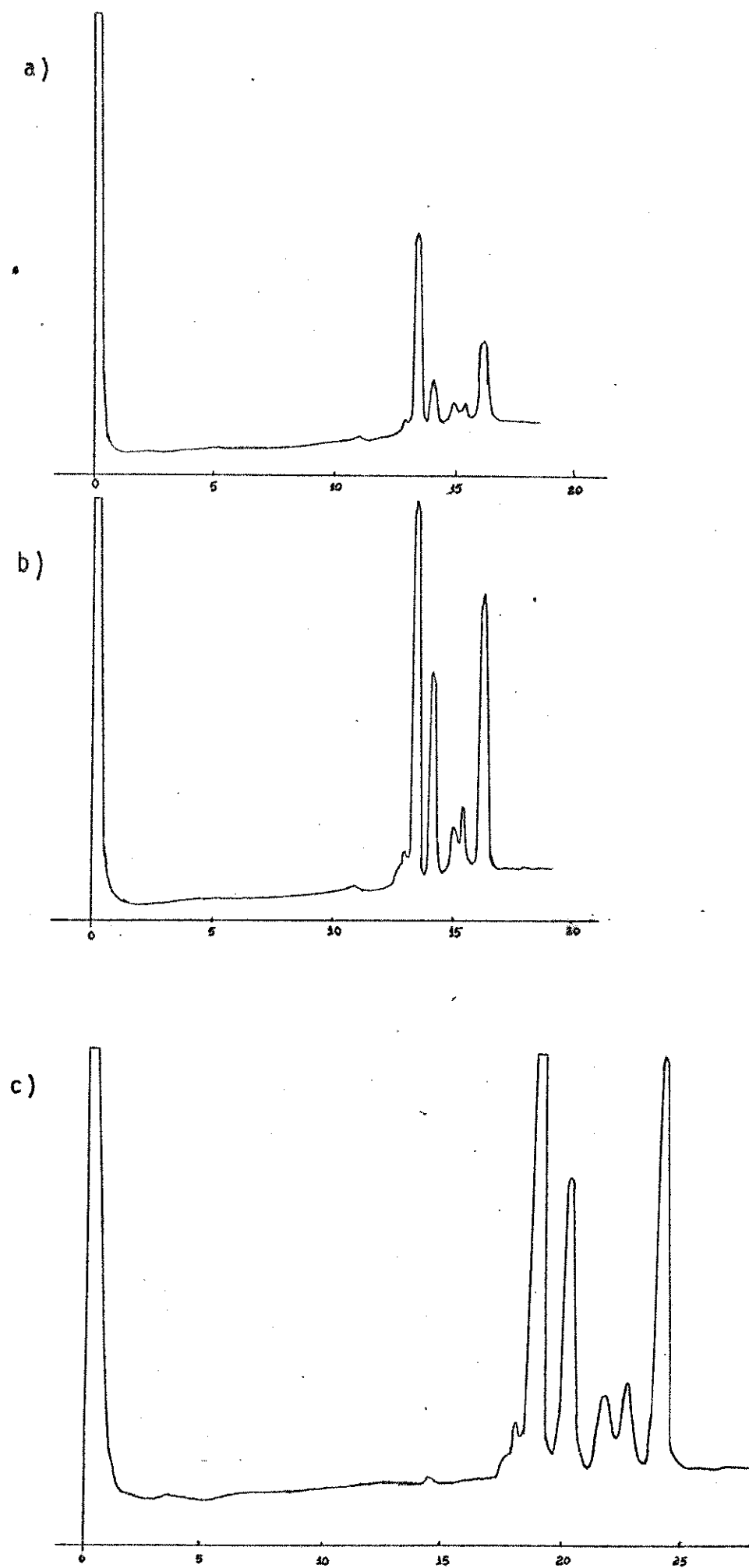


Figura 7. Cromatograma da mistura esterôica da Tedania ignis.

a) D/B (4°C/min.) b) F-3 (4°C/min.) c) TEP (2°C/min.)

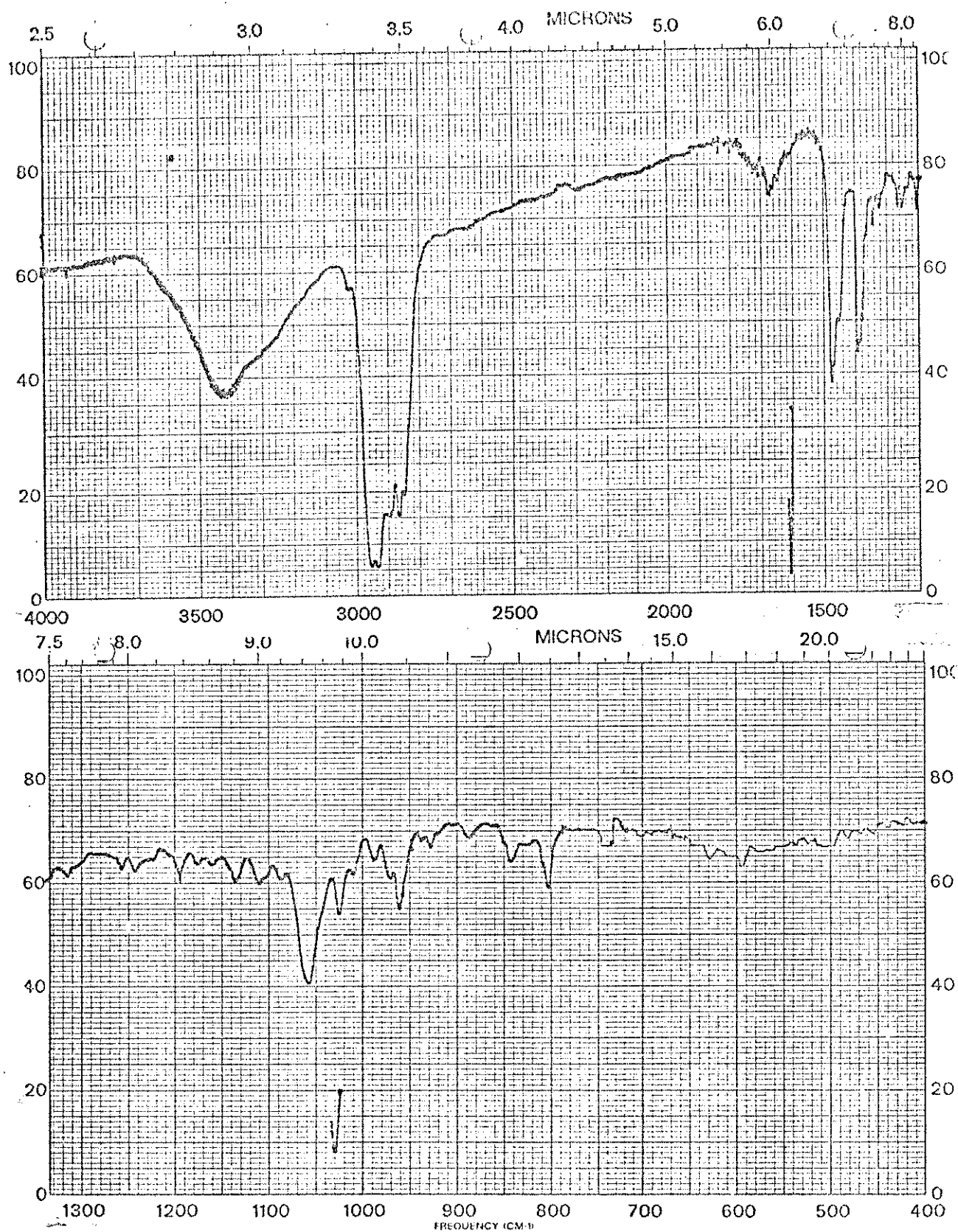


Figura 8. Espectro de absorção no I.V. da mistura esteróica da esponja T. ignis.

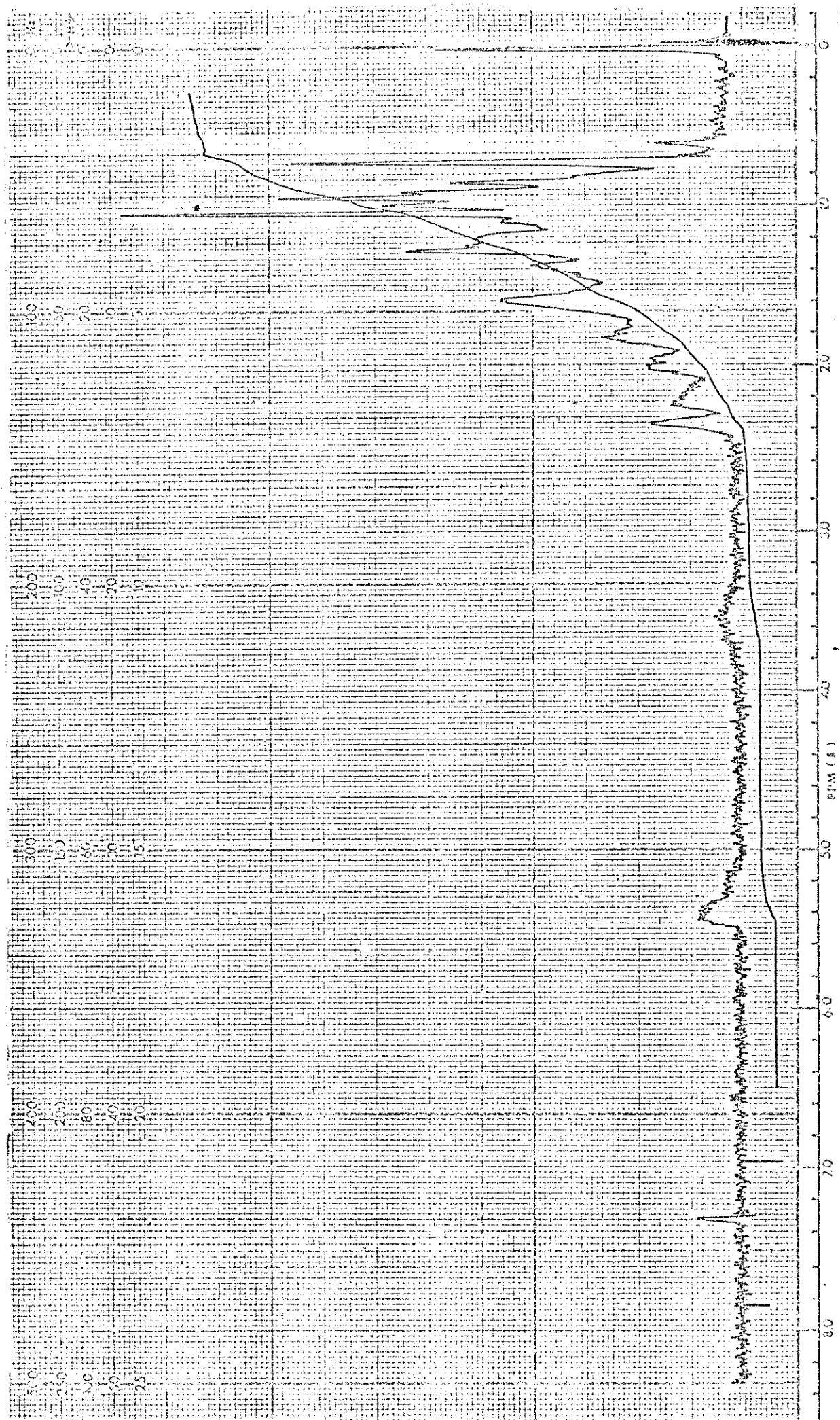


Figura 9. Espectro de RN da mistura esteróica da esponja I. ignis.

por 20 horas.

À mistura adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico 2N, formando-se um precipitado branco. Durante a adição do ácido, a solução foi mantida em banho de gelo. A solução foi extraída três vezes com clorofórmio e as frações combinadas foram lavadas com uma solução de ácido clorídrico 1N para eliminar a piridina. Fez-se a secagem da solução com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, num evaporador rotativo, fornecendo um resíduo que foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (0,05-0,20 mm), coletando-se frações de 10 ml cada.

As frações foram agrupadas conforme a placa analítica. Obteve-se 39,4 mg do acetato da mistura esterólica. Ponto de fusão 123-133°C; espectro de absorção no infravermelho (Figura 10; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 2950, 2850, 1715, 1470, 1370, 1250 e 1040; espectro de ressonância magnética protônica (Figura 11); δ (60 MHz; CCl_4): 0,70 (s), 1,00 (s), 1,95 (s), 4,50 (m), 5,40 (m).

G. Estudos com CG acoplado ao EM

A mistura esterólica foi separada com sucesso aplicando-se o cromatógrafo de gás. Após uma separação preliminar usando-se o detetor de ionização de chama, as mesmas condições foram aplicadas para uma análise através do acoplamento entre cromatógrafo de gás e espectrômetro de massa.

A cromatografia auxiliar deve ter as mesmas condições daquela acoplada ao espectrômetro de massa, porque após ter sido determinada as condições ideais de operação, as mínimas variações afetam a separação dos picos de uma mistura bem complexa. Os injetores usados devem ser interiormente cobertos de vidro para evitar

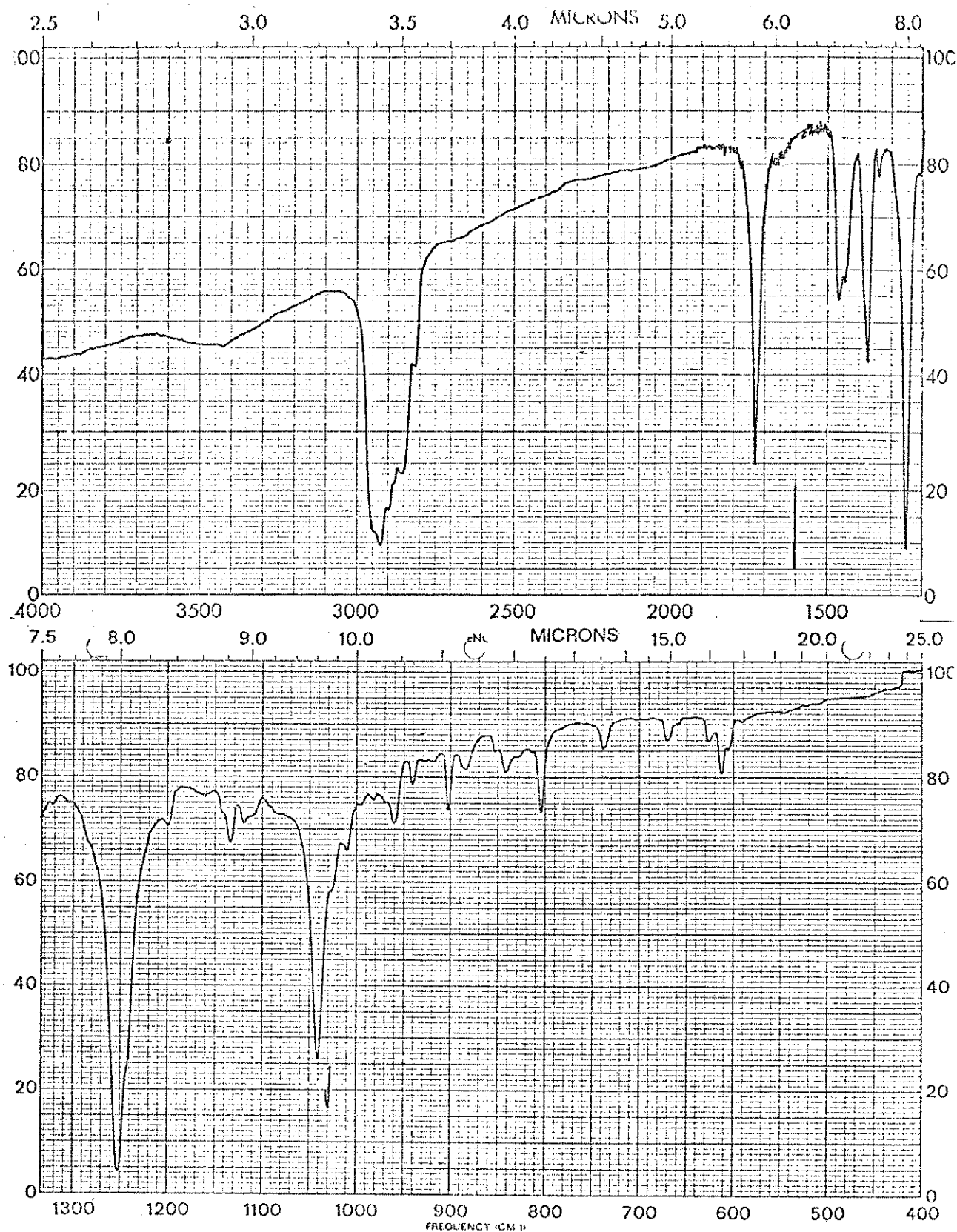


Figura 10. Espectro de absorção no I.V. do acetato da mistura esterófica da esponja T. ignis.

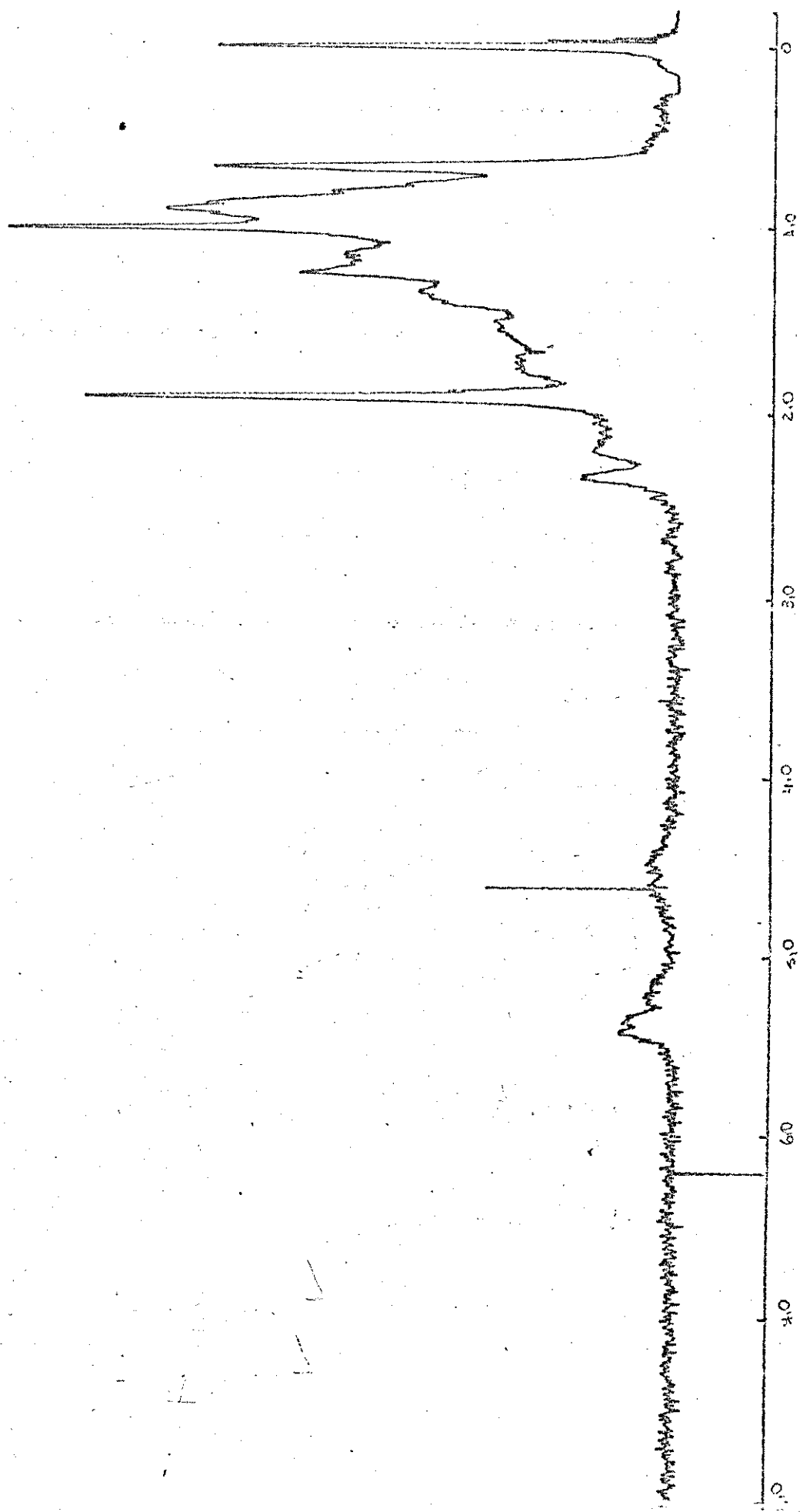


Figura 11. Espectro de RMN do acetato da mistura esteróica da esponja T. ignis.

a decomposição da mistura, o que ocorreria se existisse uma superfície metálica quente. O tipo de detetor usado na cromatografia gasosa auxiliar deve ser de ionização de chama (FID), para que se obtenha uma sensibilidade semelhante àquela do espectrômetro de massa.

Foram utilizadas colunas de vidro de 2 mm de ϕ_1 e 2 metros de comprimento. Utilizou-se 3% de OV-17, como fase estacionária, sobre Gas Chrom Q 60/80 mesh, como suporte sólido. Tomou-se cuidado de não injetar grande quantidade de solvente (5 a 10 microlitros), pois isto aumenta a pressão gasosa no espectrômetro de massa. As colunas capilares oferecem melhor resolução para este tipo de análise porém, não foram utilizadas por serem caras, aceitarem pequenas quantidades de amostra e requererem tempos de separação muito longos.

Utilizou-se n-hexano como solvente, por não oferecer problemas laterais, como por exemplo não tem a seção transversal de ionização tão grande, que possa causar problemas no sistema de segurança eletrônico do instrumento, como acontece com clorofórmio ou cloreto de metileno. A única desvantagem é que as misturas se solubilizaram com dificuldade. A quantidade máxima injetada foi de 3 μ l.

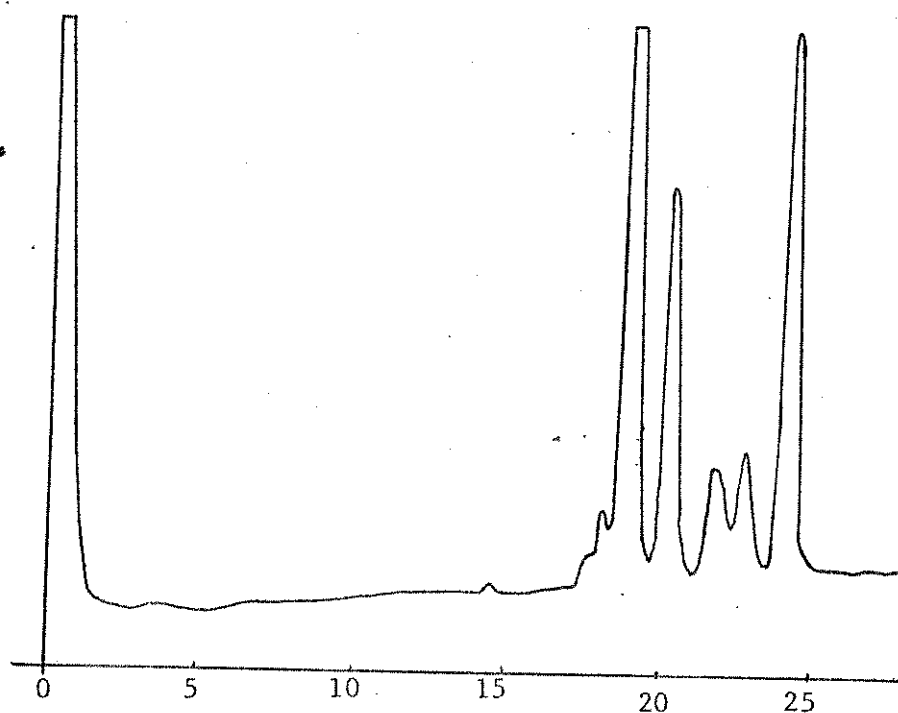
Nas análises de CG-EM utilizam-se, geralmente, a temperatura programada. As velocidades de programação de 2°/min ou 4°/min são as mais comuns. Às vezes, o programa é estendido até o limite superior recomendado para a fase líquida. No nosso caso (OV-17), esta temperatura é de 350°C. Nas temperaturas próximas a esta ocorre sangramento da coluna. Em nosso caso isto não foi problema, pois a temperatura máxima utilizada foi de 250°C.

Para fazer as análises de CG-EM utilizou-se o sistema CG-EM-

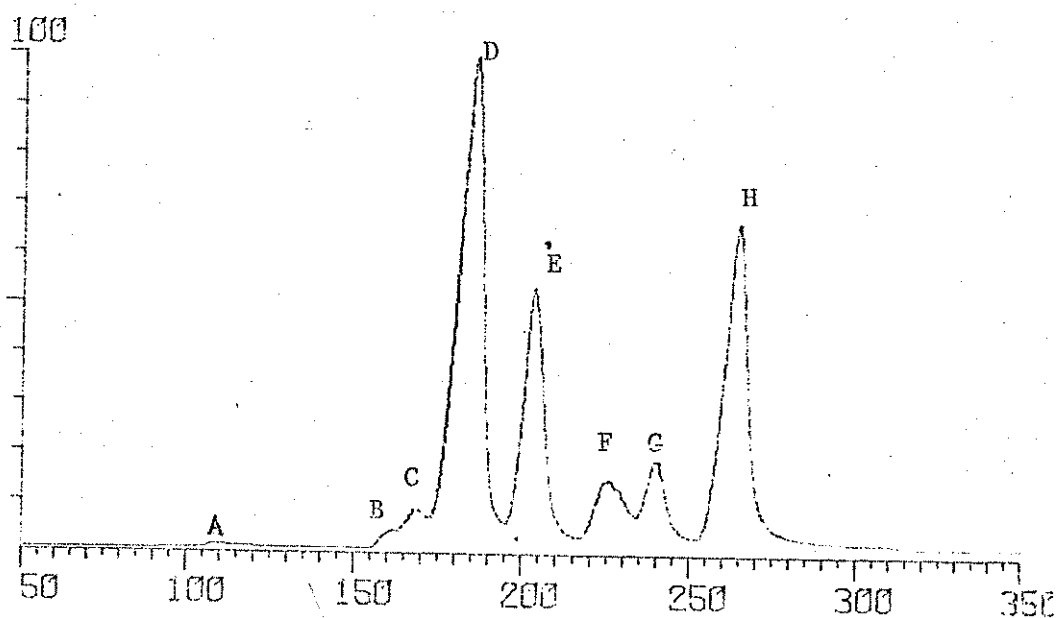
Computador, Finnigan, esquematizado na Figura 2. Uma das aplicações mais importantes do sistema CG-EM-Computador é o uso do computador na aquisição e processamento de uma série de espectros durante uma corrida CG-EM. Foi utilizado o sistema Finnigan modelo 6100 para adquirir os dados. Este sistema adquire e processa dados de duas maneiras: a) Varrida e b) Fragmentografia. A imagem dos dados é mantida no tubo de raios catódicos (CRT) durante a aquisição. Eles são armazenados no disco e podem ser chamados posteriormente.

A operação do CG-EM foi realizada no sistema Finnigan descrito anteriormente. O armazenamento de dados pelo computador é suficiente para conter todas as varridas tomadas durante o processo cromatográfico. O computador pode reconstruir o cromatograma iônico total, após a corrida cromatográfica. O cromatograma iônico total proporciona um registro importante do processo cromatográfico, para compará-lo ao cromatograma obtido previamente (ou simultaneamente) com o detetor de ionização de chama (FID). A sensibilidade específica destas duas maneiras de registro não é a mesma para todos os compostos, mas é muito semelhante a uma comparação direta (10-15% de diferença). Os dois cromatogramas deveriam ser efetivamente os mesmos. Uma comparação entre um cromatograma de ionização de chama e um cromatograma iônico total reconstruído pelo computador da mistura esteróica e do acetato estão apresentadas nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Analizou-se o cromatograma reconstruído e selecionou-se os números das varridas que correspondem especificamente a cada pico. Geralmente, seleciona-se duas ou três varreduras por pico. Estes números das varreduras são fornecidos ao computador para pedir os espectros de massa correspondentes. Uma vez escolhido o espectro,



a) Cromatograma de gas obtido com um detetor de ionização de chama. As coordenadas são intensidade x tempo (min.)



b) Cromatograma reconstruído pelo computador. As coordenadas são corrente iônica total e número do espectro de massa.

Figura 12. Comparação dos cromatogramas da mistura esteróica.

solicita-se o gráfico ao computador. Há a possibilidade de se multiplicar parte do espectro para aumentar a intensidade das regiões de interesse; especialmente aquelas de alta massa. Quando necessário, subtrai-se o "background" que às vezes é a subtração dos espectros adjacentes.

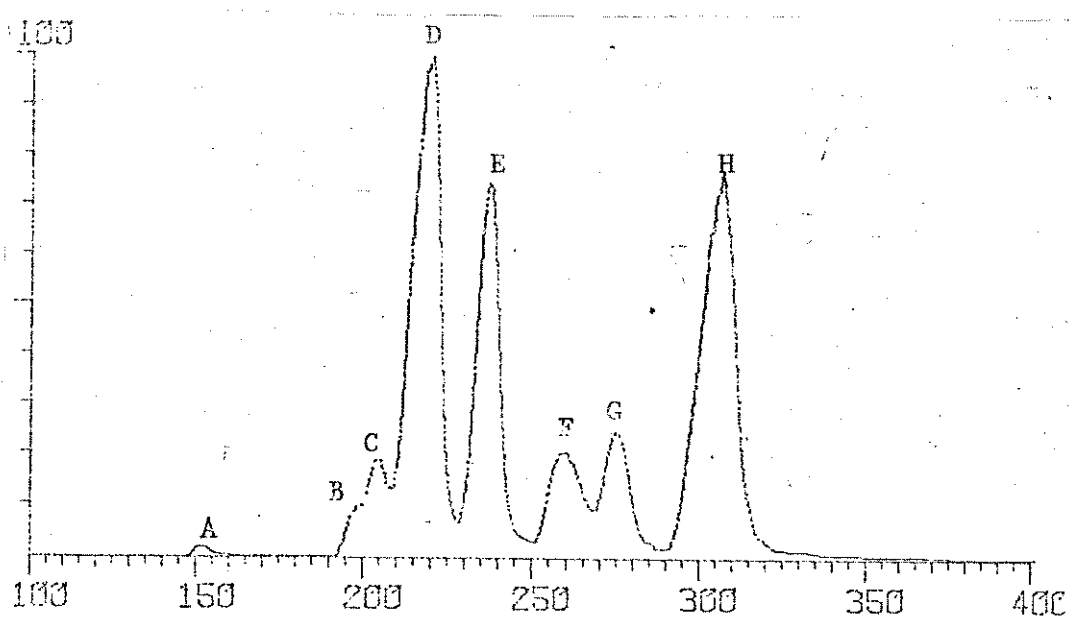
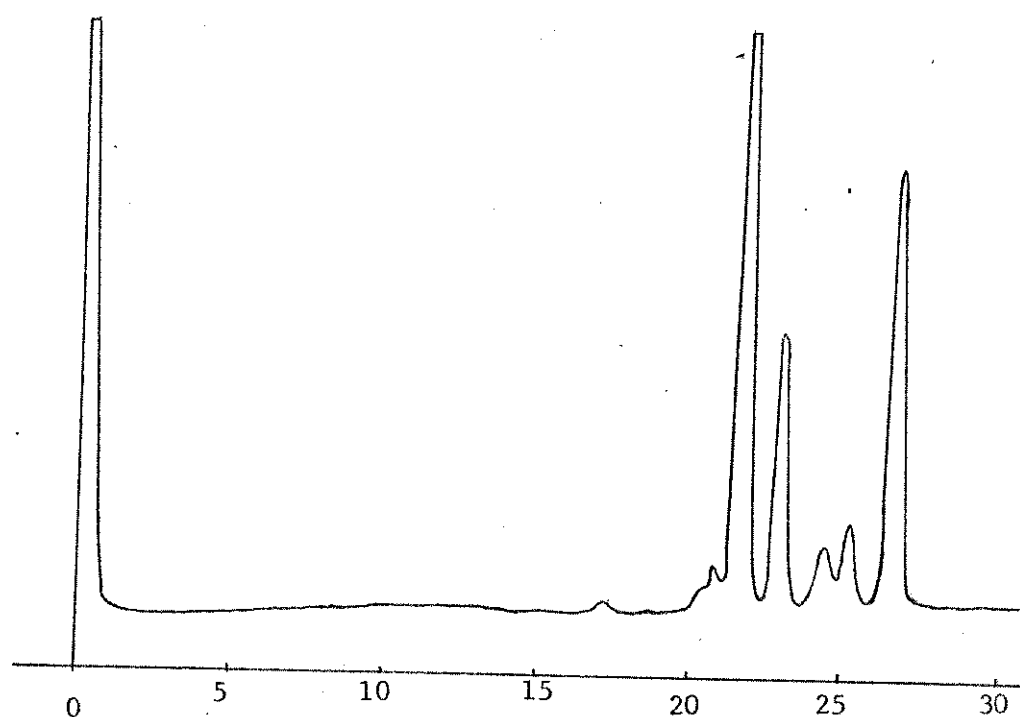


Figura 13. Comparação dos cromatogramas do acetato da mistura esteróica.

IV. Resultados e Discussão

A esponja vermelha foi coletada em Ubatuba (SP), na Praia da Ribeira. Em seguida, ela foi classificada como Tedania ignis (Duchaissaing & Michelotti) Verrill, pelo Prof. Dr. M. Sarà da Universidade de Gênova (Itália). A Tedania ignis foi liofilizada e o produto liofilizado foi extraído com éter de petróleo, com acetona e com clorofórmio-metanol (2:1). Os extratos éter de petróleo (TEP) e acetônico (TA) foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em placa preparativa. O extrato clorofórmio-metanol (2:1) não foi estudado.

A purificação dos extratos TEP e TA resultou no isolamento de uma mistura cristalina. Esta mistura compreende os esteróis livres presentes na esponja Tedania ignis e apresenta ponto de fusão 132-138°C. A análise do espectro de absorção no infravermelho (Figura 8) sugeriu a presença de um grupo hidroxílico (ν OH 3420 cm^{-1} , ν C-O 1050 cm^{-1})²³, como mostra a Tabela 7. O espectro de ressonância magnética protônica (Figura 9) apresentou grupos metílicos (δ 0,70 a δ 1,04). A banda larga em δ 3,50, correspondente a um próton, foi atribuída a um hidrogênio do carbono carbinólico. A presença de um próton olefínico pode ser confirmada pela banda múltipla em δ 5,40²⁴.

Alguns derivados da mistura esterólica foram preparados. O espectro no infravermelho do acetato da mistura (Figura 10) apresenta forte absorção em 1715 cm^{-1} característica de carbonila, indicando que a reação de acetilação foi bem sucedida (Tabela 7). Examinando-se o espectro de ressonância magnética protônica do acetato (Figura 11), pode-se verificar a presença de um pico simples referente à metila do grupo acetoxila (δ 1,95). Pode-se no-

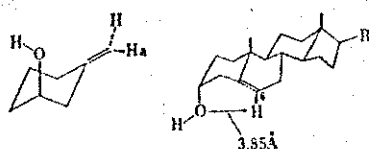
Tabela 7. Análise dos espectros de infravermelho da mistura esterólica TA e o acetato da mistura TA.

	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Grupo funcional correspondente
Esterol TA	3420 (m)	estiramento O-H
	2950 (F)	estiramento C-H
	2860 (F)	estiramento simétrico CH_2
	1470 (m)	dobramento assimétrico CH_3
	1390 (m)	dobramento simétrico CH_3
	1050 (m)	estiramento C-O
	840,800 (f)	dobramento C-H fora do plano
	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Grupo funcional correspondente
Acetato de TA	2950 (F)	estiramento C-H
	2850 (F)	estiramento simétrico CH_2
	1715 (F)	estiramento C=O
	1470 (m)	estiramento C=O
	1450 (m)	dobramento assimétrico CH_3
	1370 (F)	dobramento simétrico CH_3
	1250 (F)	estiramento assimétrico C-O

F = forte m = médio f = fraco

tar neste espectro que a posição do próton do carbono carbinólico muda de δ 3,50 no álcool para δ 4,50 no acetato. Isto indica que este próton está mais desprotegido no último composto. A banda múltipla em δ 5,40, correspondente a um próton, foi atribuída ao hidrogênio olefínico. Pela sua posição, podemos dizer que não há nenhum efeito da hidroxila interagindo no seu deslocamento químico, pois se houvesse esta interação, a acetilação da hidroxila deslocaria o próton vinílico para um campo ligeiramente mais alto²⁵. Com isto, podemos dizer que a hidroxila está na posição be

ta e conseqüentemente o próton do carbono carbinólico na posição alfa.



A cromatografia em camada delgada de sílica gel da mistura esterólica, em vários solventes, apresentou uma única mancha bem definida. Mas, examinando-se o seu cromatograma de gás (Figura 7) podemos notar que ela é uma mistura de pelo menos oito esteróis, sendo três em maior abundância. Por meio do cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de massa foi possível analisar estes esteróis.

Em geral a maioria das misturas requer uma experimentação preliminar em cromatógrafo de gás. Isto tem como objetivo a seleção das condições cromatográficas ideais antes de efetuar as análises CG-EM. Isto é necessário para evitar a utilização desnecessária do espectrômetro de massa.

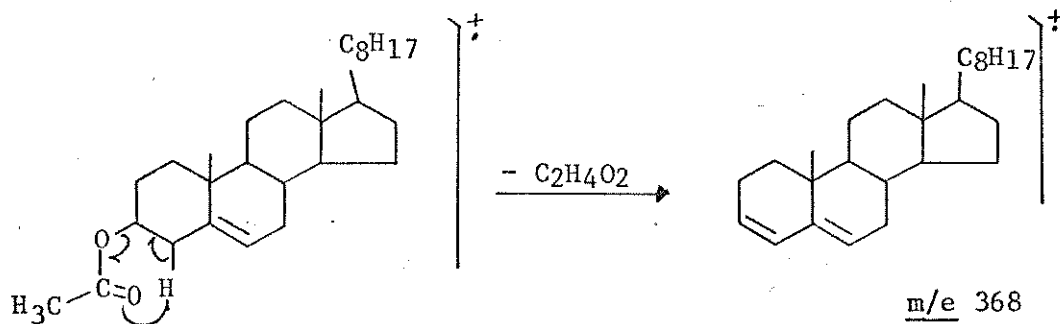
Os cromatogramas dos esteróis e dos acetatos obtidos através da coluna de OV-17 são reproduzidos nas Figuras 12 e 13 respectivamente. Em cada cromatograma foram observados oito picos. Mediante a varrida múltipla no espectrômetro de massa, estabeleceu-se a presença de oito esteróis. Isto é confirmado no espectro de massa dos derivados acetatos que apresentam o mesmo perfil cromatográfico.

Na interpretação dos espectros de massa dos esteróis, pode-

se considerar alguns aspectos gerais já conhecidos sobre a espectrometria de massa destes compostos. Estes são:

a) Peso molecular: O peso molecular dos esteróis pode ser determinado, precisamente, através do pico de íon molecular, M^+ , que é o pico correspondente à molécula com remoção de um elétron. Este pico pode facilmente ser reconhecido no espectro porque, com exceção dos picos isotópicos, é o pico de maior massa. Em geral, os íons moleculares de esteróis são detetáveis, apesar de algumas vezes terem baixa abundância.

Os espectros dos acetatos contêm um "pico molecular aparente", localizado a 60 unidades de massa abaixo do "verdadeiro" pico molecular, correspondente à eliminação dos elementos de ácido acético (CH_3COOH). Por exemplo:



Houve especulação de que a ausência do pico correspondente ao íon molecular se devesse, talvez às altas temperaturas empregadas nestes estudos²⁶. Mas, a eliminação do ácido acético envolvendo o hidrogênio alilicamente ativado do C-4 por impacto eletrônico foi confirmada pelo estudo do composto deuterado, utilizando-se a sonda de inserção direta²⁶.

b) Perda de água. Os espectros de massa dos esteróides, con

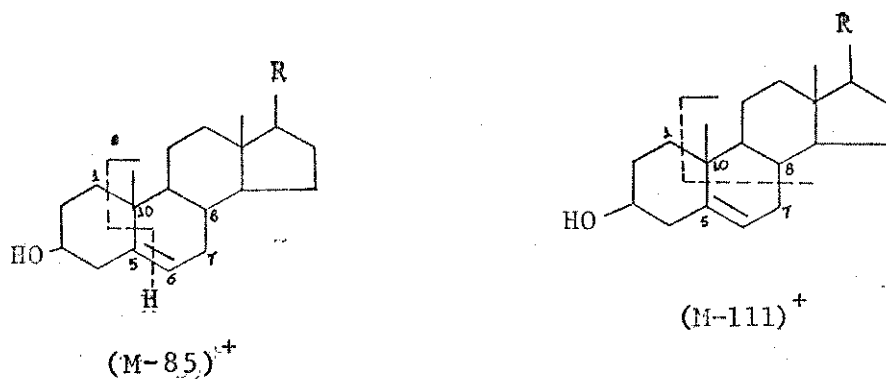
tendo o grupo hidroxila, são caracterizados pela presença de um grande pico a 18 unidades de massa abaixo do pico molecular. Um pico a M-18 é dado também pelos ceto-esteróides, mas em geral este é menor que 10% do pico molecular²⁷. Quando o grupo hidroxila está no C-3, o espectro mostra um pico abundante que corresponde à perda dos elementos de água da estrutura inicial. A formação de muitos dos principais íons envolve a perda de água em combinação com os outros mecanismos de fragmentação.

c) Perda de metila. Este tipo de fragmentação, por si só ou em combinação com alguma outra quebra na molécula, é característica de todos os esteróides. Estes radicais expelidos são os grupos metilas angulares²⁸; C-18 e C-19.

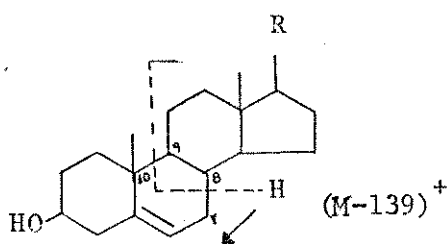
d) Perda da cadeia lateral. Esta é uma fragmentação muito comum aos esteróis, embora a sua intensidade relativa varie entre os compostos. A presença da ligação dupla no C-5 auxilia este tipo de fragmentação²⁸, aumentando-se assim a sua intensidade relativa.

Outra fragmentação muito característica é a perda da cadeia lateral juntamente com outros três átomos de carbono do anel D e um hidrogênio extra, provavelmente do C-14²⁹.

e) Presença da insaturação no C₅²⁸. A presença da insaturação na posição C-5 do esqueleto esteroidal controla as fragmentações muito complexas, que envolvem a perda do anel A e parte do anel B, através da clivagem das ligações 1-10, 5-10 e 5-6 ou 7-8 levando à formação dos íons (M-85)⁺ e (M-111)⁺. Sua formação está representada a seguir.



Um outro íon, talvez o mais característico dos esteróis com insaturação na posição C-5, é aquele (M-139)⁺, cuja formação envolve a perda do anel A e B, pela clivagem das ligações 7-8 e 9-10 e a transferência de mais um hidrogênio. Sua formação está representada a seguir:



A presença de um pico de grande intensidade a m/e 271 no espectro dos esteróis indica que o composto provavelmente tem um núcleo Δ^5 -3-ol juntamente com uma ligação dupla na cadeia lateral²⁹.

Na Figura 14, encontra-se o espectro de massa do pico A da mistura esterólica da Tedania ignis. Com respeito a este pico A, só podemos dizer que ele corresponde a um esteroide de íon molecular m/e 370 (M^+); o que é confirmado pela perda dos elementos do ácido acético (m/e 352) do seu derivado acetato (Figura 15). O espectro de massa do derivado acetato apresenta um pico correspondente à perda do grupo metila juntamente com elementos de ácido a

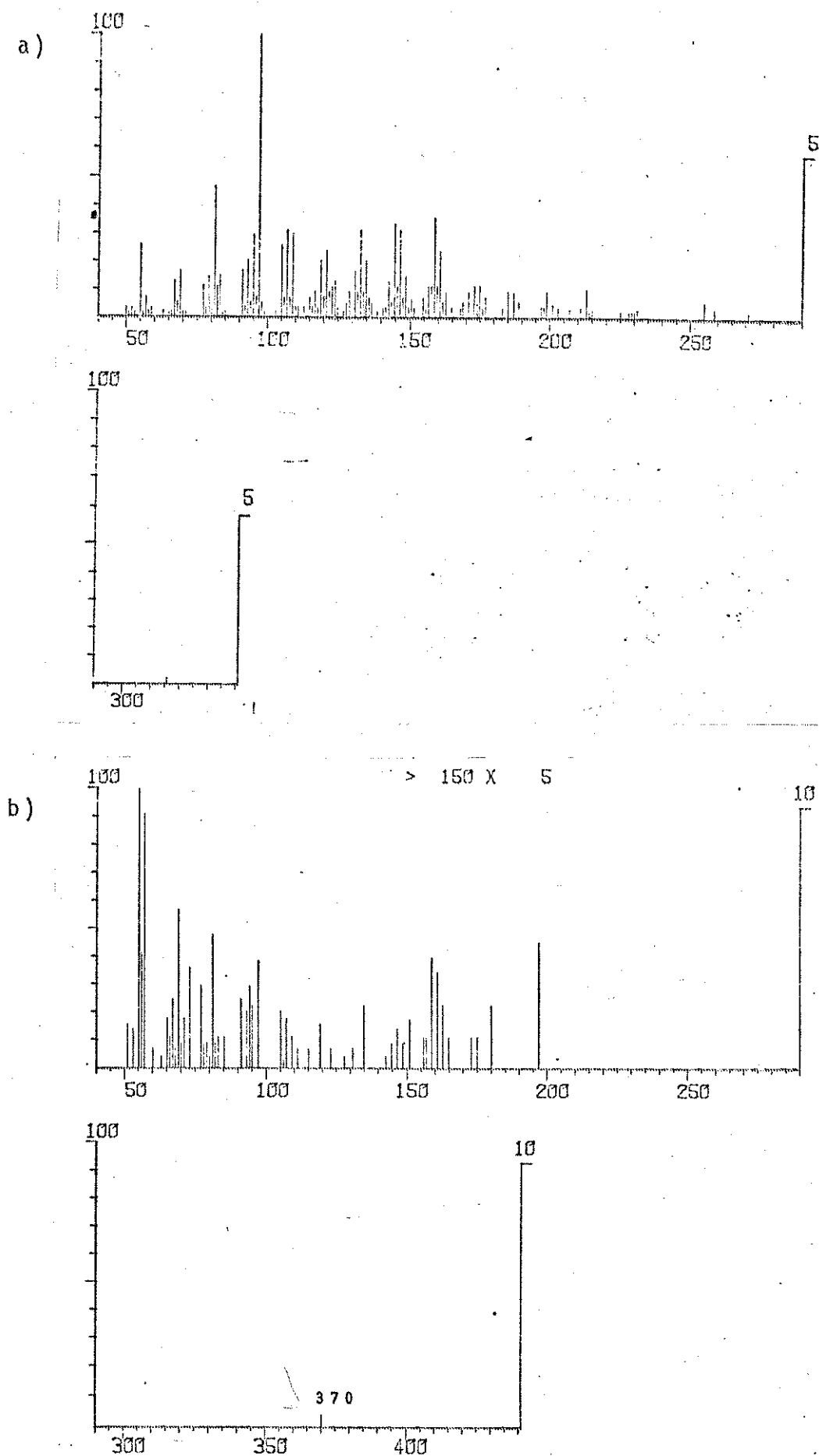


Figura 14. Espectro de massa do pico A da mistura esterôlica. a) 20 eV; b) 70 eV.

cético (m/e 337), e também um pico correspondente à perda da cadeia lateral (m/e 255) a partir do "pico molecular aparente".

Devido à má resolução do pico B no cromatograma (Figura 13), não foi possível caracterizá-lo.

Os espectros de massa do pico C, da mistura esterólica e do seu acetato, encontram-se nas Figuras 16 e 17 respectivamente. Eles apresentam os picos correspondentes às fragmentações básicas dos esteróis como por exemplo: perda do grupo metila, perda de água e perda da cadeia lateral. O espectro na Figura 16 apresenta o pico de m/e 384 como íon molecular e além deste pico observa-se a presença do pico de m/e 271, relativamente grande, que pode sugerir um esqueleto Δ^5 -3-ol juntamente com uma ligação dupla na ca

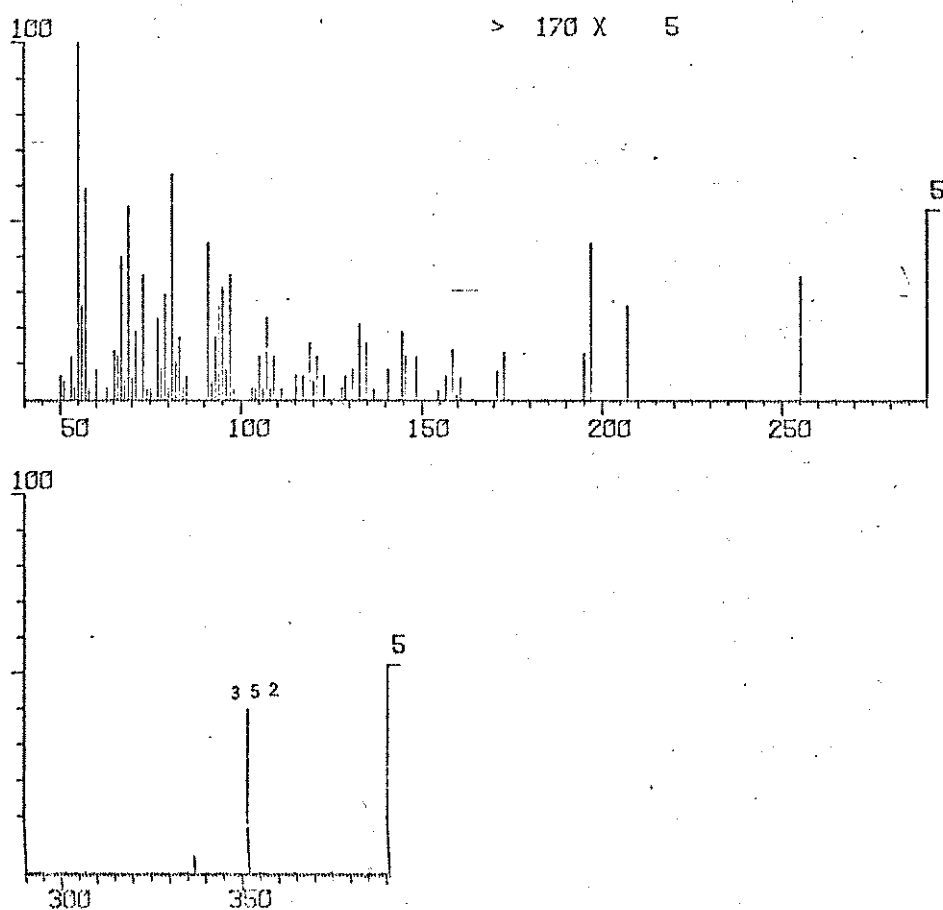


Figura 15. Espectro de massa do acetato do pico A (70 eV).

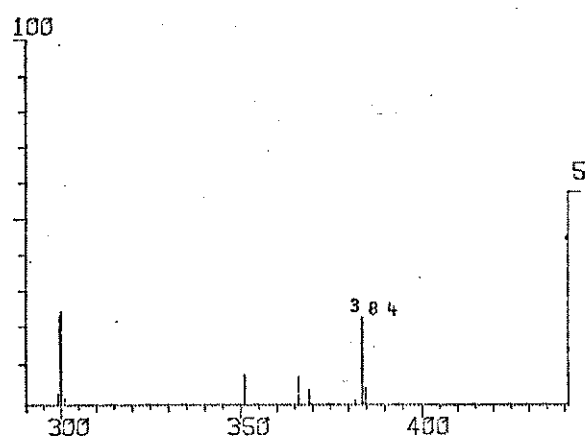
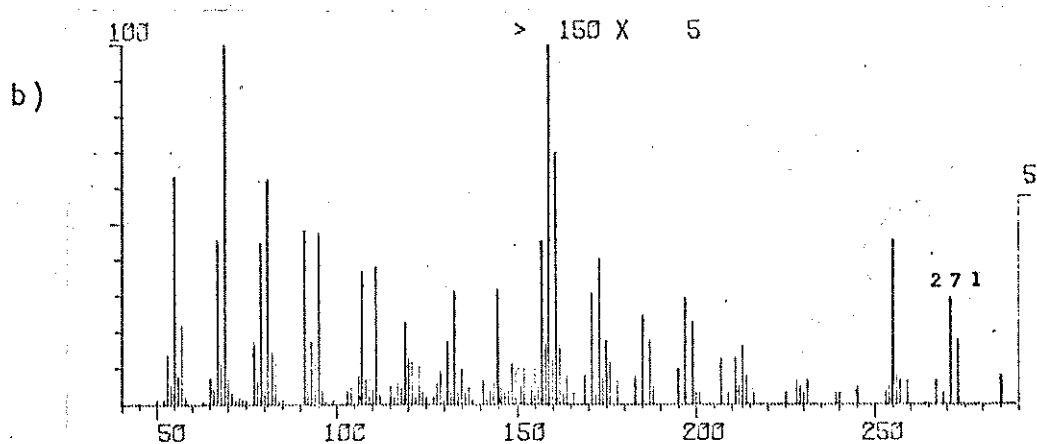
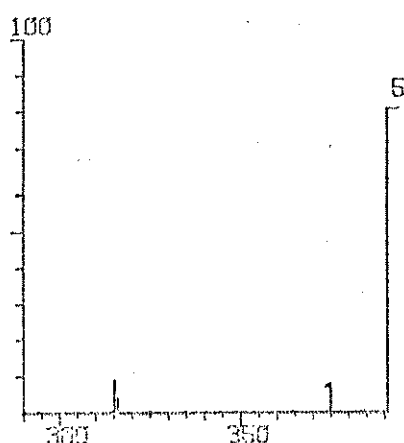
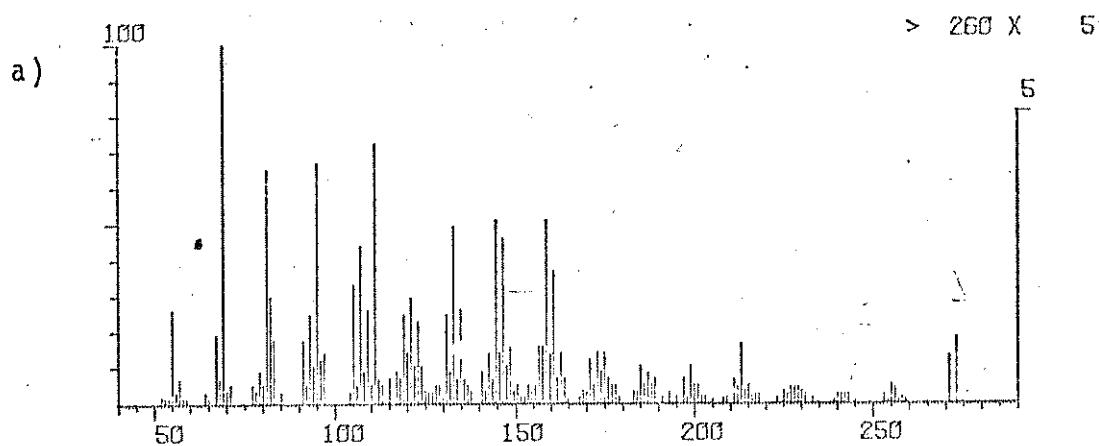


Figura 16. Espectro de massa do pico C da mistura esterôica.
a) 20 eV b) 70 eV.

deia lateral²⁹. A presença da ligação dupla na cadeia lateral dá origem a novos picos não encontrados nos espectros dos compostos análogos saturados²⁹. Para os esteróis Δ^{24} , observa-se a perda da cadeia lateral envolvendo a quebra da ligação 17-20 e a transferência de dois átomos de hidrogênio, um dos quais é específico do C-17. Forma-se assim o íon alilicamente estabilizado. Um dos prováveis mecanismos proposto por Knights³⁰ encontra-se no Esquema 5.

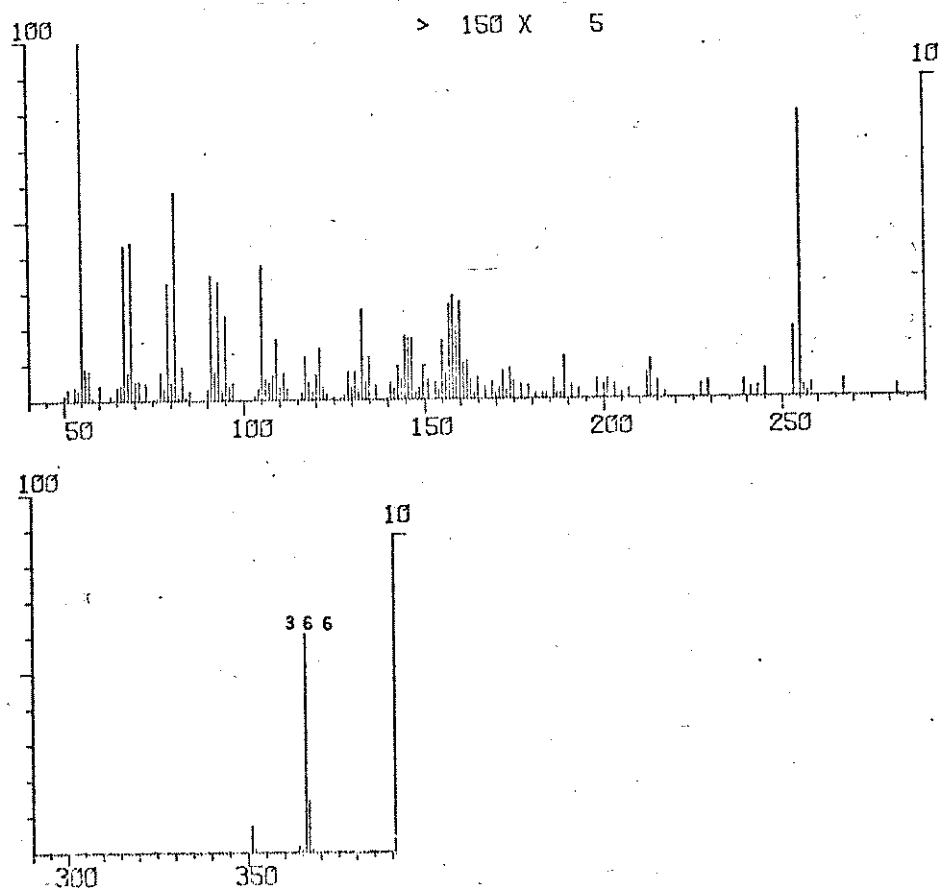
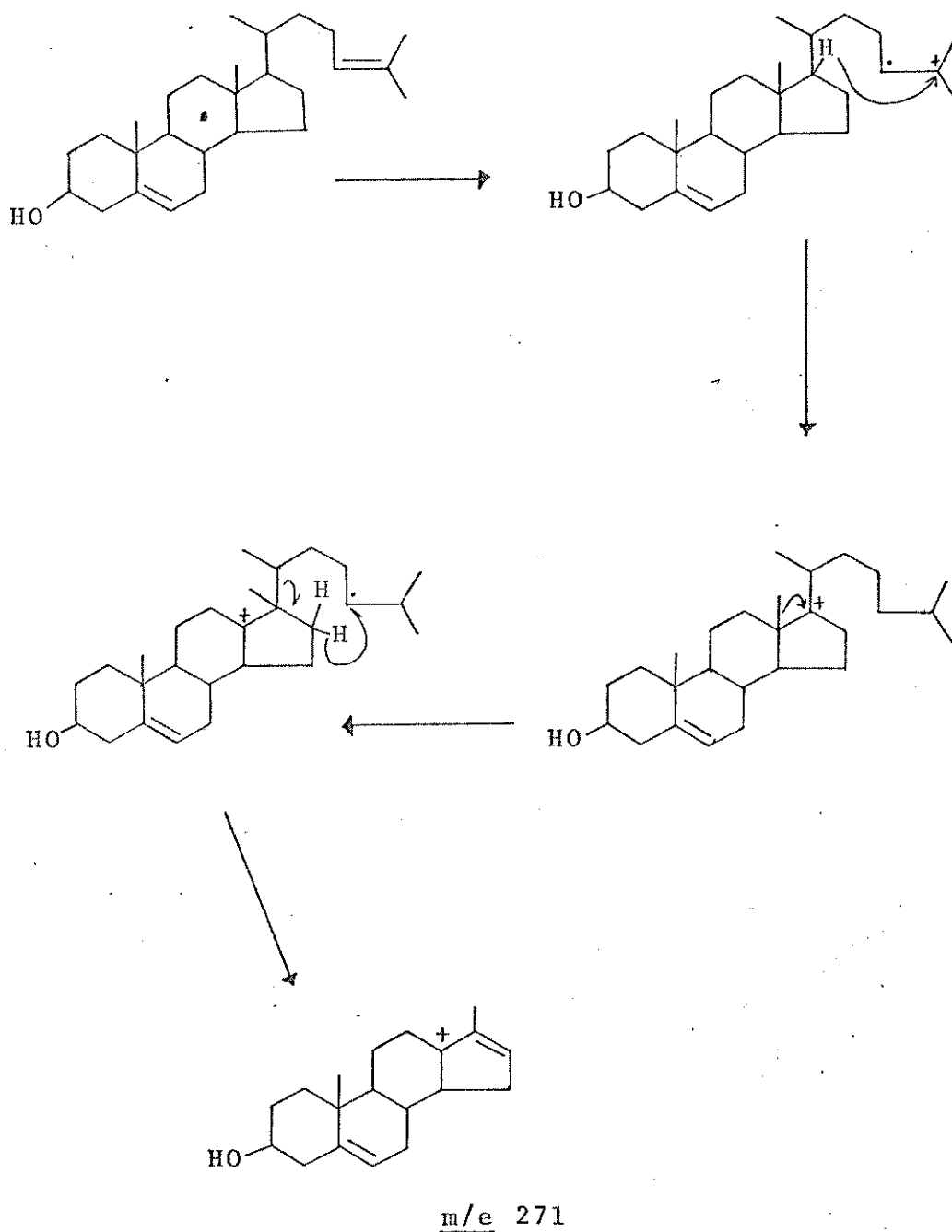
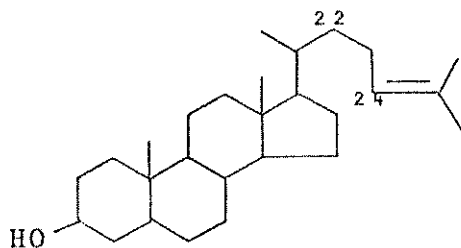


Figura 17 Espectro de massa do acetato do pico C (70 eV).

Esquema 5



Baseando-se nestas considerações gerais sobre as fragmentações do esterol, com insaturações nas posições C-5 e C-24, propusemos uma provável estrutura para o esterol correspondente ao pico C, como sendo desmosterol (47)³⁰, (íon molecular m/e 384):



Pico C, desmosterol (47)

O espectro de massa do pico D da mistura esterólica encontra-se na Figura 18. Este espectro apresenta o pico de m/e 386 correspondente ao íon molecular. Ao lado das fragmentações comuns dos esteróis resultantes da perda do radical metila e/ou perda de água do seu íon molecular, este espectro apresenta outros picos bastante intensos na região de alta massa. Estes são: o pico de m/e 301 ($M-85$)⁺, o pico de m/e 275 ($M-111$)⁺ e o pico de m/e 247 ($M-139$)⁺, característicos dos esteróis com insaturação na posição C-5. O espectro de massa do acetato do pico D (Figura 19) apresenta um íon molecular aparente de m/e 368 e os picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis. Baseando-se nestes dados de fragmentações, sugerimos uma provável estrutura para o pico D, como sendo colesterol (2). A comparação destes espectros com o de uma amostra autêntica confirmou a nossa proposição de que o pico D corresponde ao colesterol, componente principal da mistura esterólica da Tedania ignis.

O espectro de massa do pico E da mistura esterólica (Figura 20) apresenta um pico de m/e 398 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 21) apresenta o pico

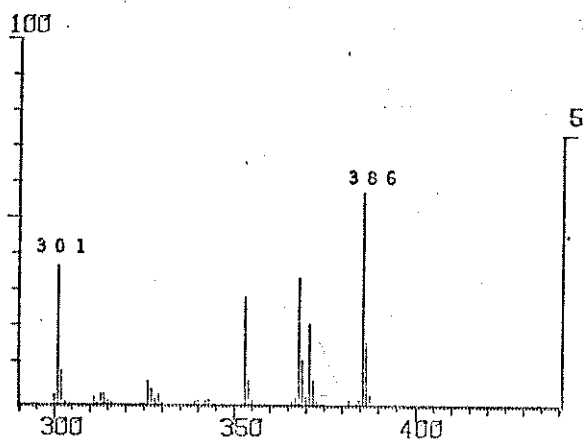
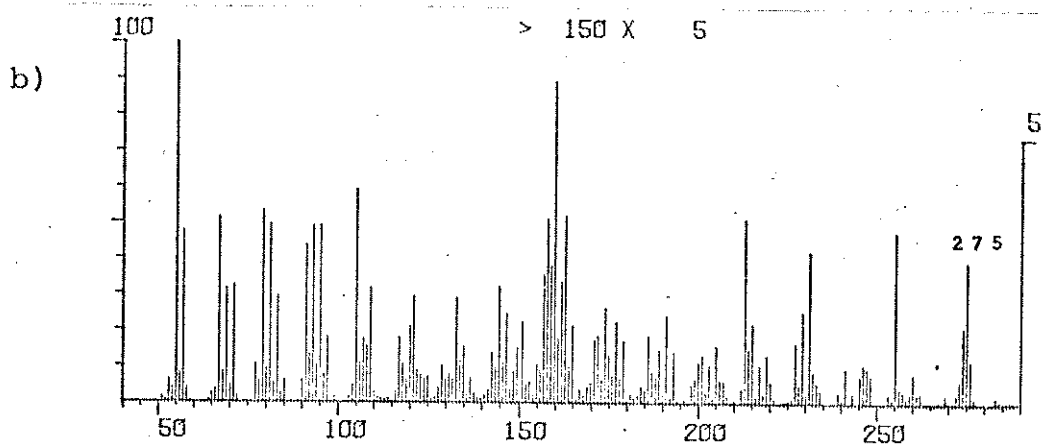
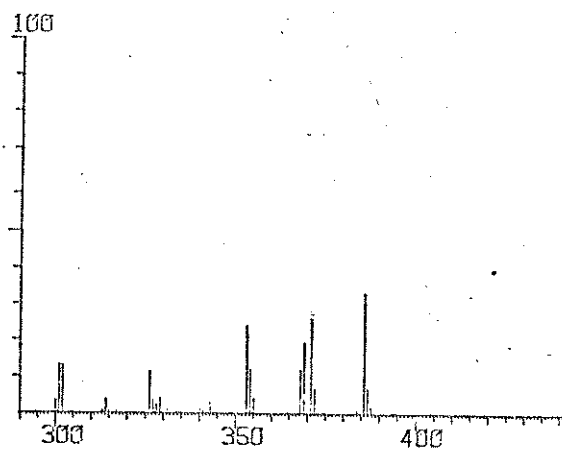
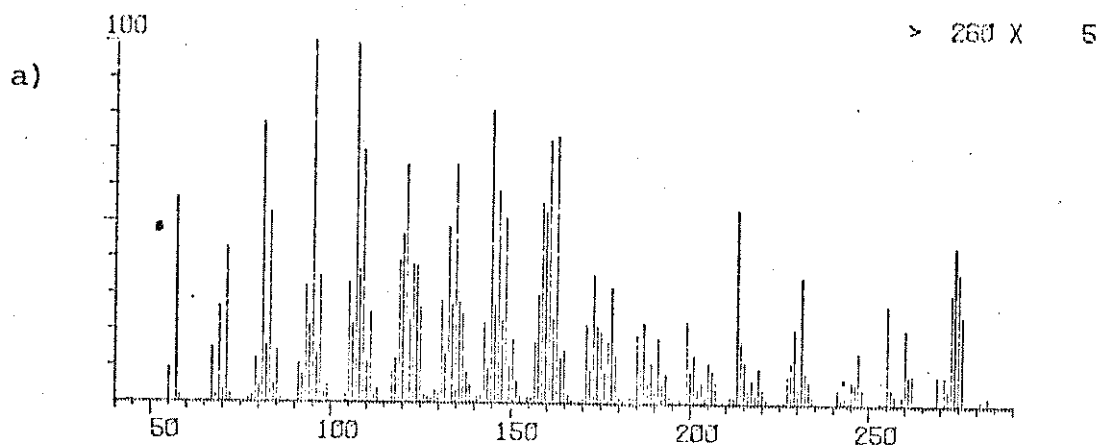


Figura 18 Espectro de massa da mistura esterólica do pico D.
a) 20 eV; b) 70 eV.

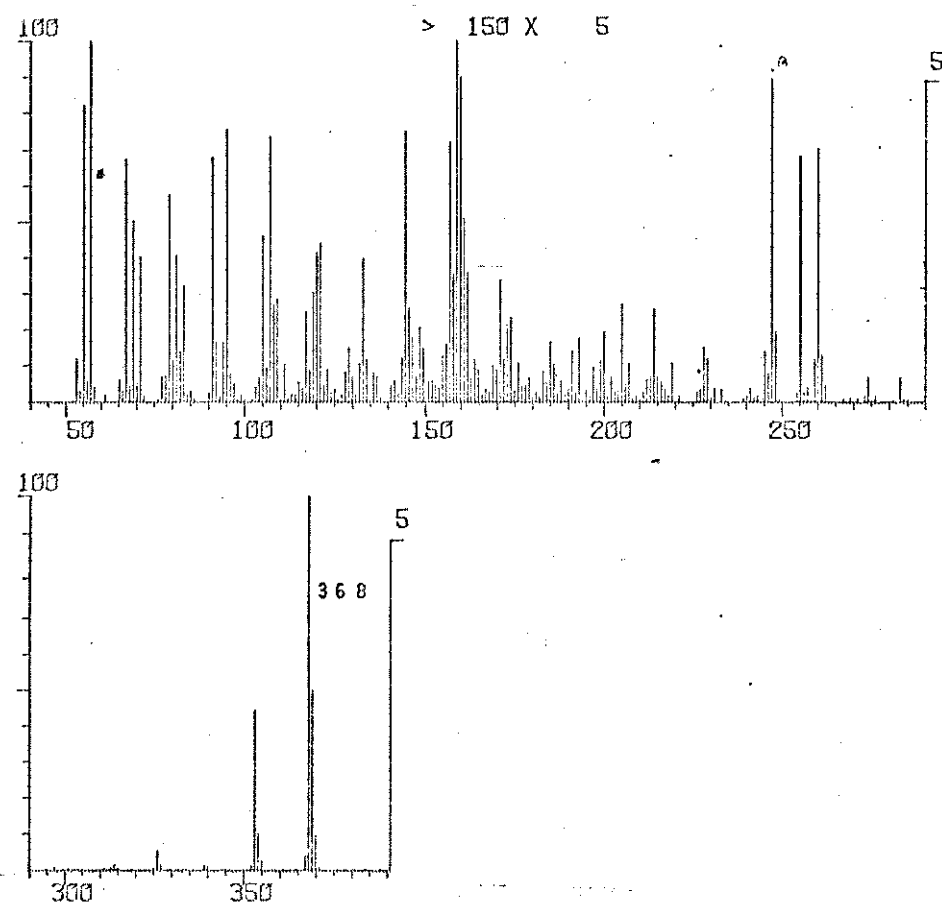
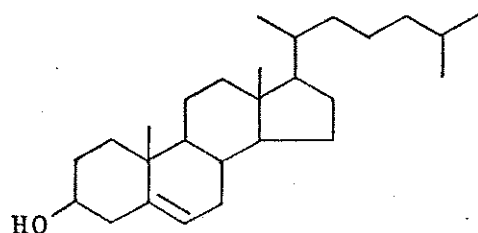


Figura 19. Espectro de massa do acetato do pico D (70 eV).



Pico D, colesterol (2)

de íon molecular aparente (m/e 380) correspondente à perda dos elementos do ácido acético. Estes espectros mostram picos resultantes das fragmentações comuns dos esteróis. Como por exemplo: perda do radical metila, perda de água e perda da cadeia lateral.

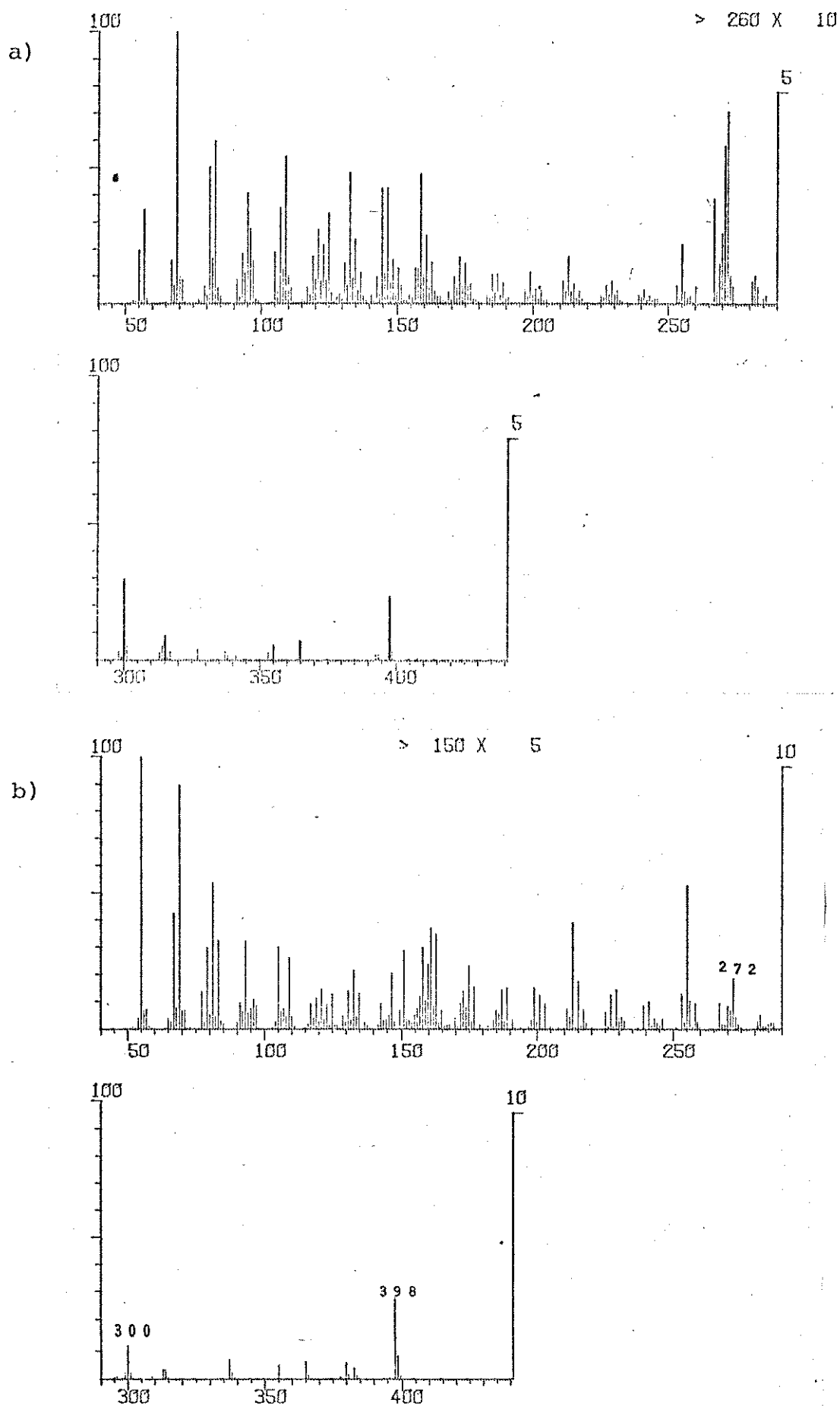


Figura 20 Espectro de massa do pico E da mistura esteróica da T. ignis. a) 20 eV b) 70 eV

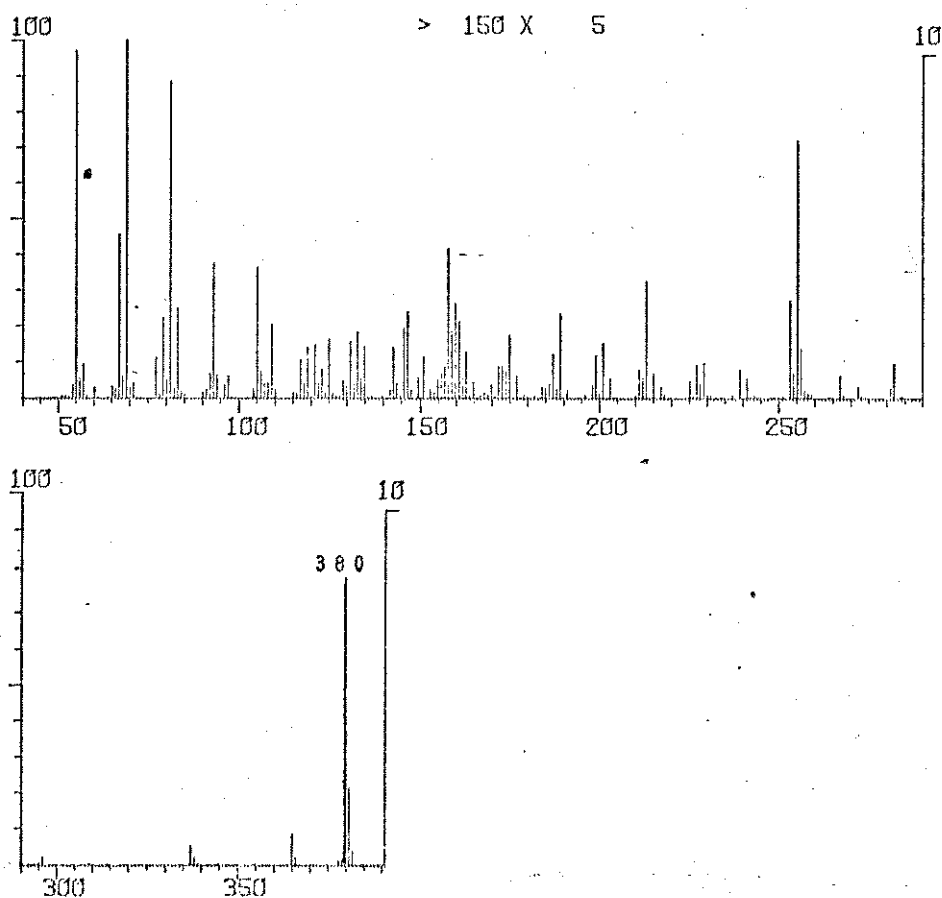
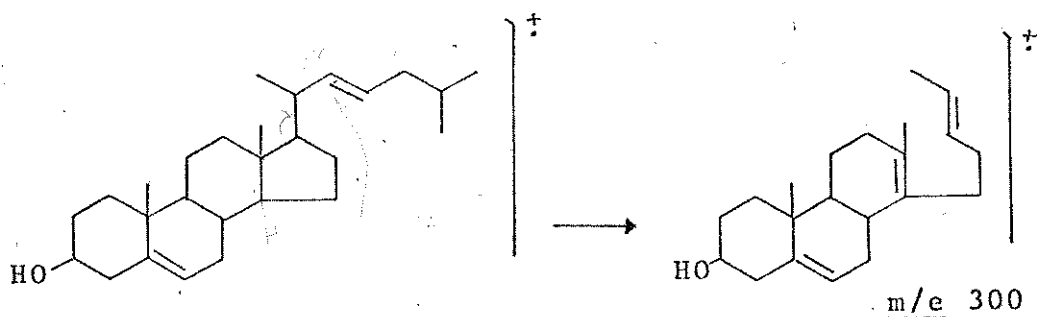
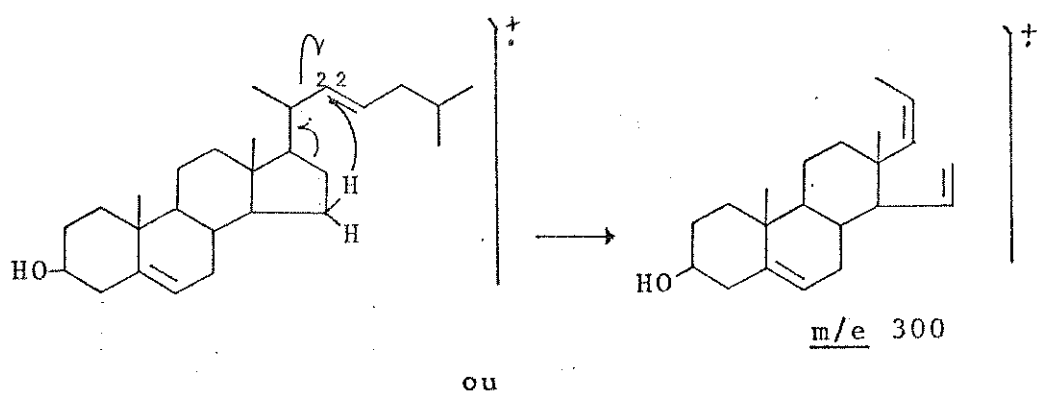
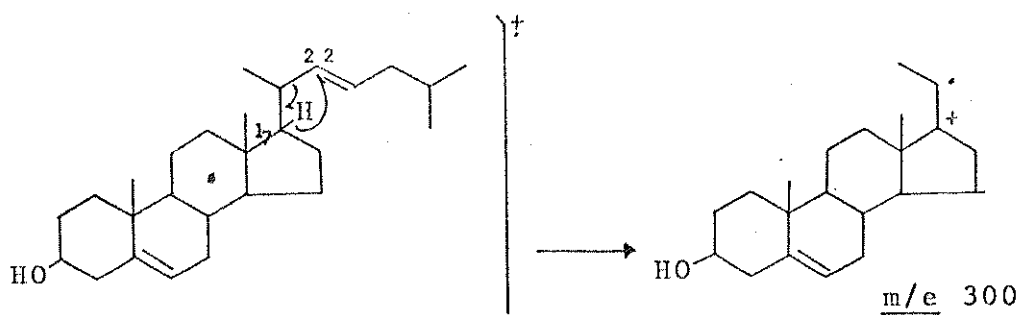


Figura 21. Espectro de massa do acetato do pico E (70 eV).

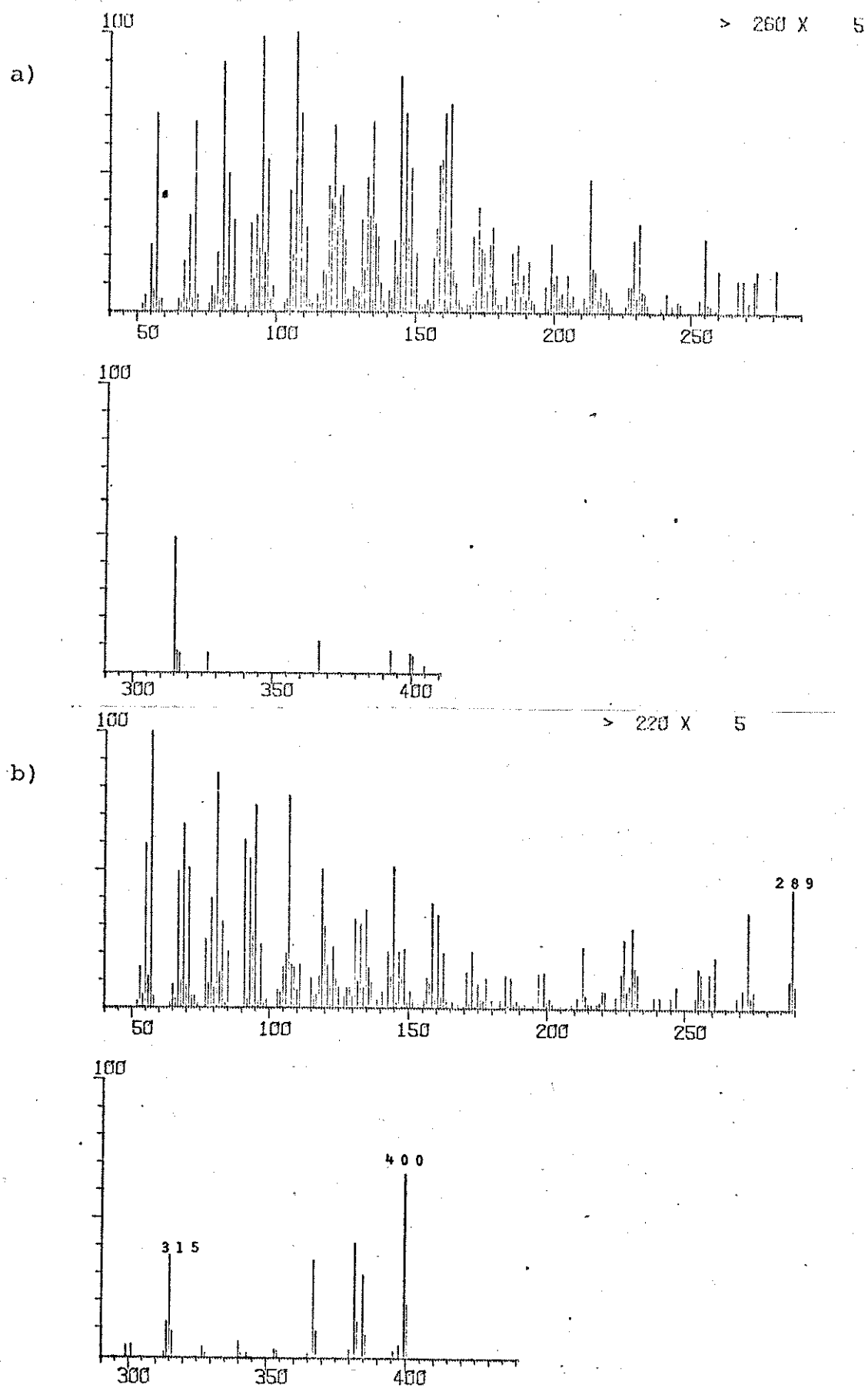
Além destes picos, o espectro da Figura 20 mostra um pico correspondente ao íon $(M-C_6H_{12})^+$ (m/e 300). Este tipo de íon é característico do esteroi com insaturação na posição C-22. Esta fragmentação envolve uma clivagem vinílica, formalmente muito desfavorável, juntamente com a transferência de um hidrogênio²⁹. Foram propostos prováveis mecanismos de fragmentação com a formação de íons favoravelmente estabilizados, dependendo da origem do hidrogênio transferido, como podem ser vistos a seguir²⁹:

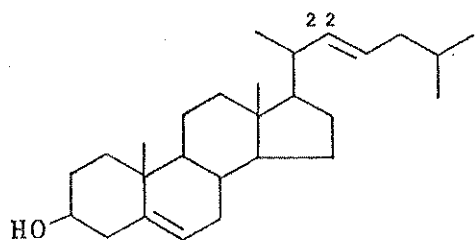


Outro íon também característico dos esteróis com insaturação na posição C-22 é o íon $(M-43)^+$ (m/e 355), que corresponde à perda do grupo isopropila terminal (Figura 20). A formação deste íon envolve, simplesmente, uma clivagem alílica³⁰.

A partir destas considerações gerais, sugerimos uma estrutura para o esterol do pico E, como sendo brassicasterol (20).

Na Figura 22, encontra-se o espectro de massa do pico F da





Pico E, brassicasterol(20)

mistura esterólica da T. ignis. Este espectro mostra o pico de m/e 400 correspondente ao íon molecular, o que é confirmado pelo íon molecular aparente (m/e 382) no espectro do seu acetato (Figura 23). Estes espectros mostram as fragmentações comuns dos esteróis, e as fragmentações características do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C-5 (m/e 315, m/e 289 e m/e 261). Com estes dados, propusemos a estrutura para o pico F, como sendo 22, 23-diidrobrassicasterol (13).

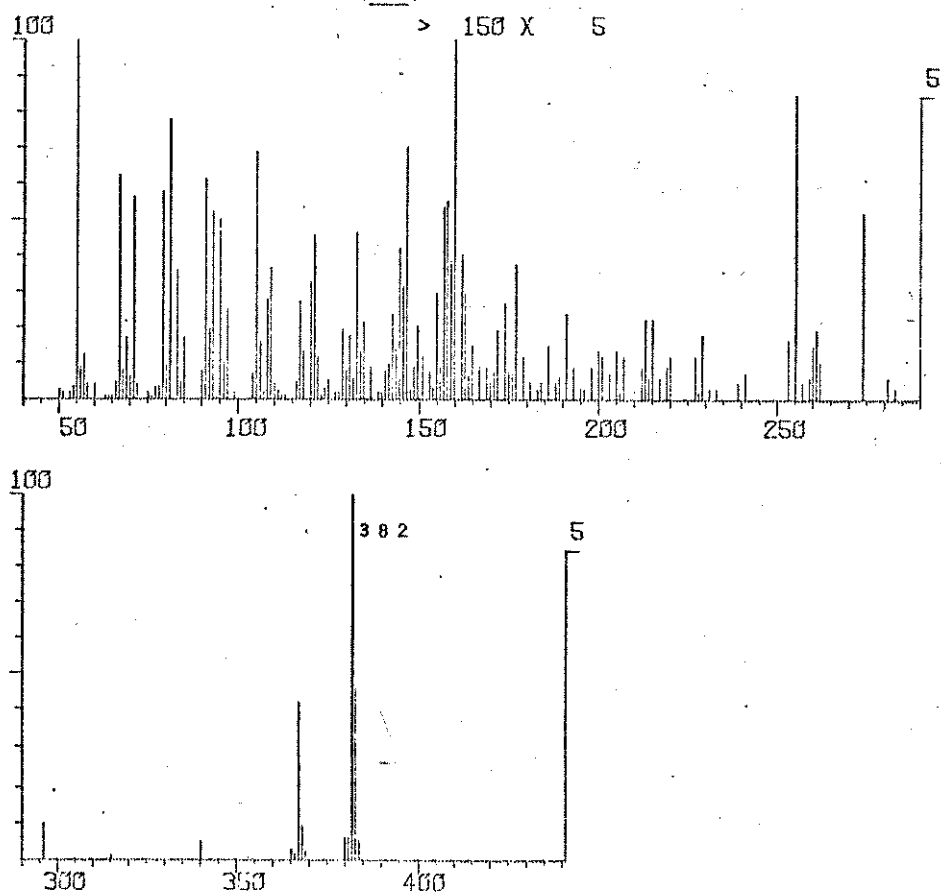
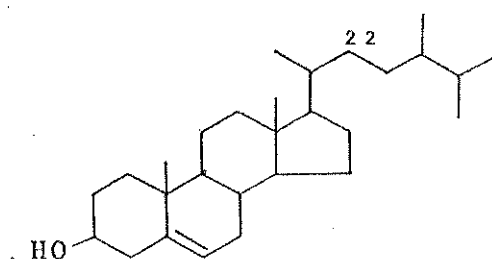
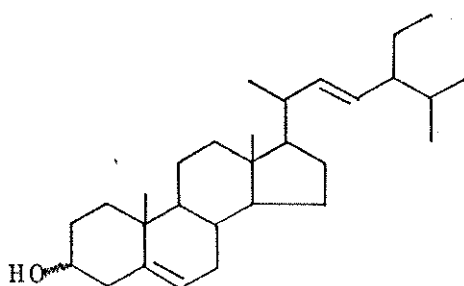


Figura 23. Espectro de massa do acetato do pico F (70 eV).



pico F; 22,23-dihidrobrassicasterol(13)

Na Figura 24, encontra-se o espectro de massa do pico G da mistura esterólica da esponja T. ignis. Este espectro apresenta o pico de m/e 412 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 25) mostra o pico de m/e 394 correspondente ao íon molecular aparente resultante da perda dos elementos de ácido acético. Ao lado dos picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis e às fragmentações características do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C-5, há também um pico correspondente à fragmentação característica do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C-22 da cadeia lateral. Baseando-se nestas considerações, propusemos a estrutura para o esterol do pico G, como sendo estigmasterol ou poriferasterol (dependendo da configuração do grupo hidroxila no C-3)



pico G, Estigmasterol ou Poriferasterol (28)

O espectro de massa do pico H, da mistura esterólica da esponja T. ignis encontra-se na Figura 26. Ele apresenta o pico de

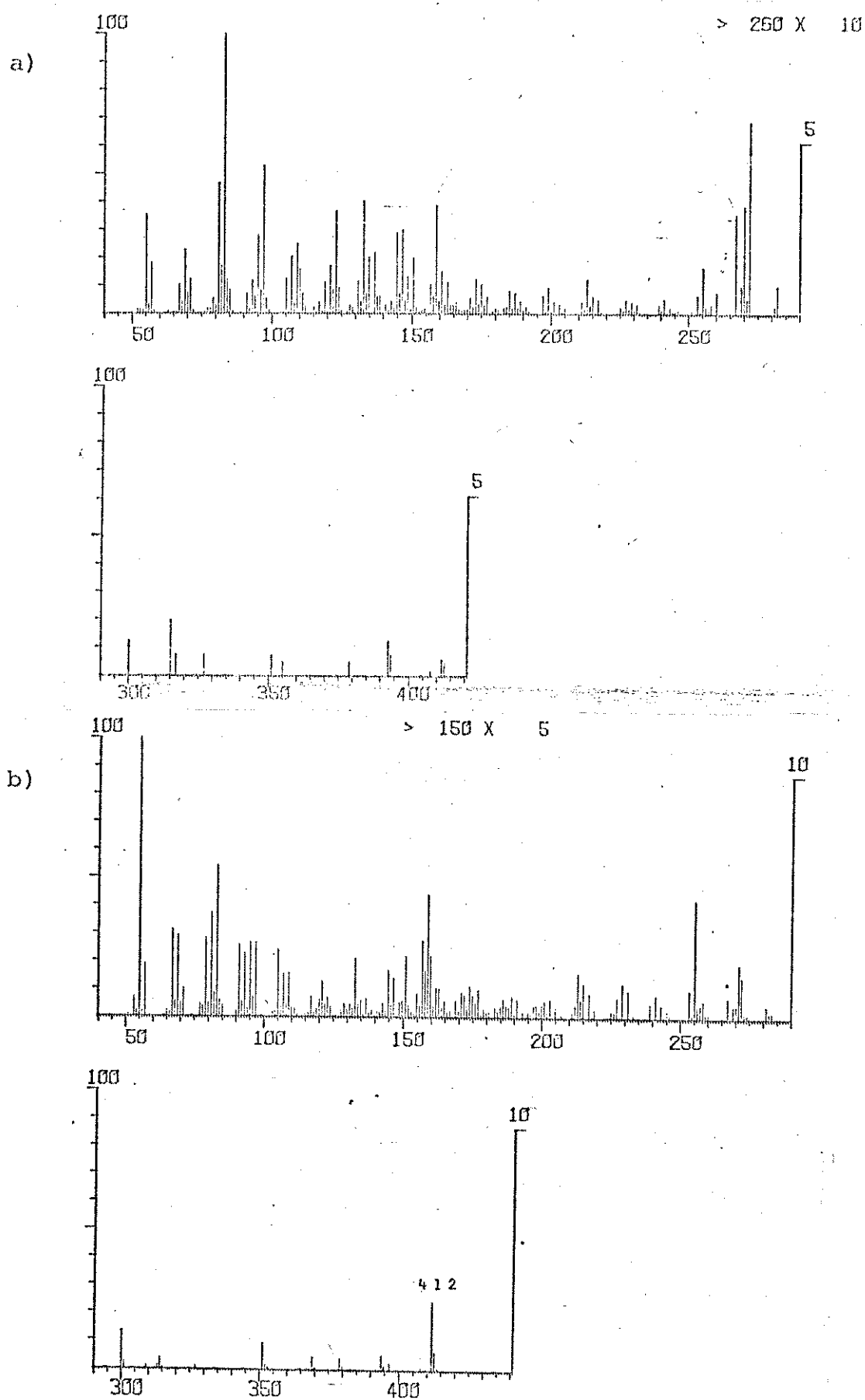


Figura 24. Espectro de massa do pico G, da mistura esterólica da *T. ignis*. a) 20 eV; b) 70 eV.

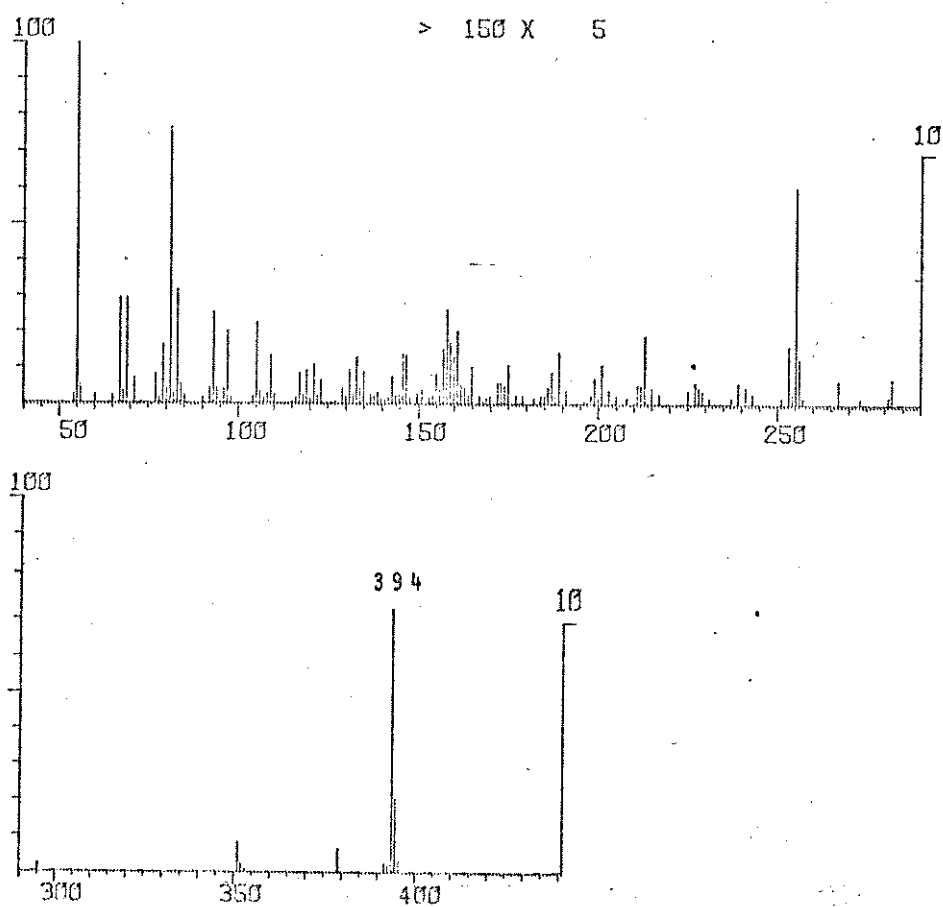


Figura 25 Espectro de massa do acetato do pico G (70 eV).

m/e 414 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 27) confirma isto, mostrando o pico de m/e 396 resultante da perda dos elementos de ácido acético. Estes espectros apresentam picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis, como por exemplo: perda do radical metila, perda de água e perda da cadeia lateral. Além destes picos, há também fragmentações características do esteroi com insaturação na posição C-5 (m/e 329, m/e 303, m/e 275).

A partir destas considerações propusemos a estrutura para o esteroi do pico H como sendo β -sitosterol

Nas Tabelas 8 e 9 estão resumidos os principais íons do espectro de massa da mistura esterólica e do seu acetato, obtidos

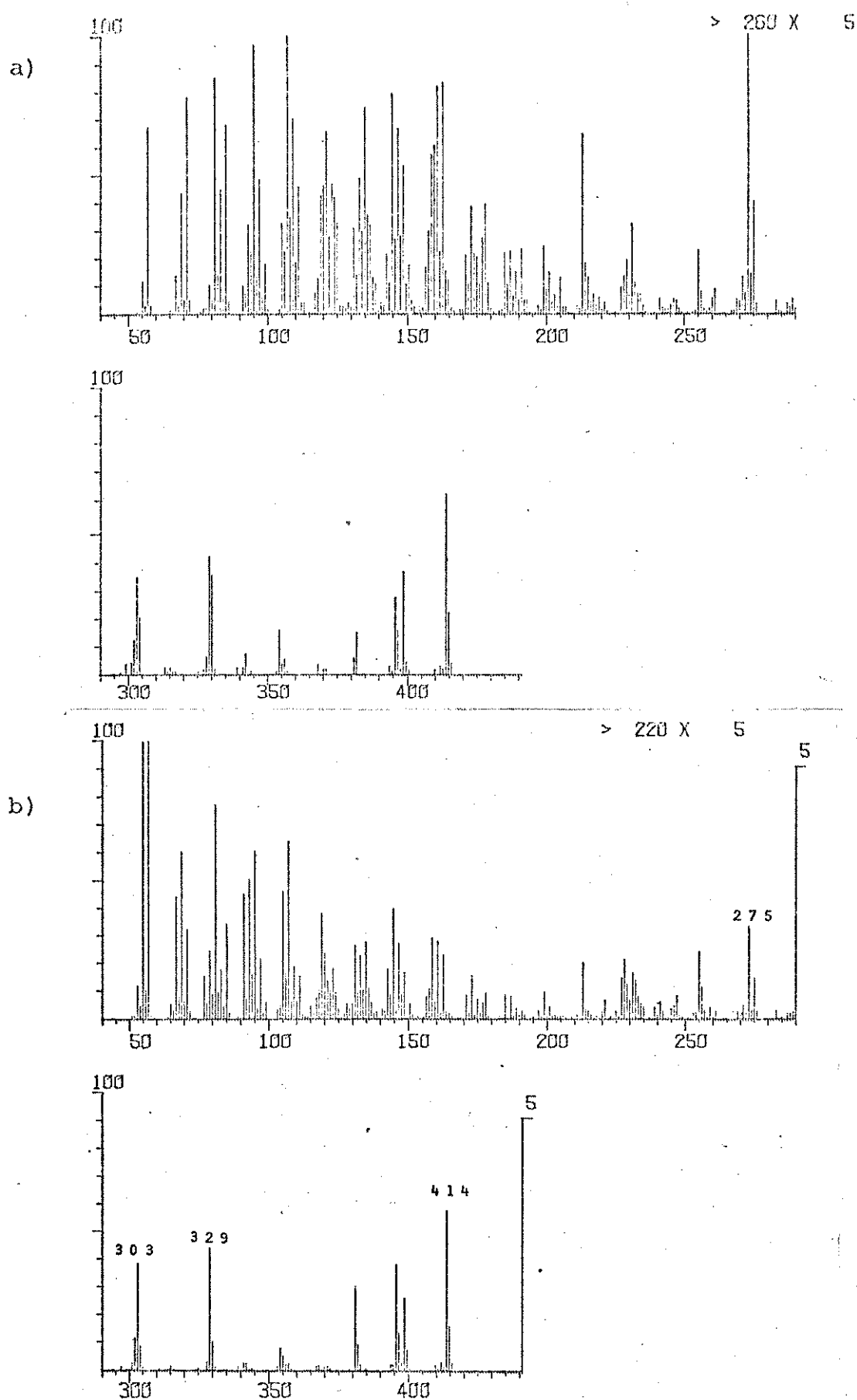


Figura 26. Espectro de massa do pico H, da mistura esterôica da T. ignis. a) 20 eV; b) 70 eV.

da esponja Tedania ignis.

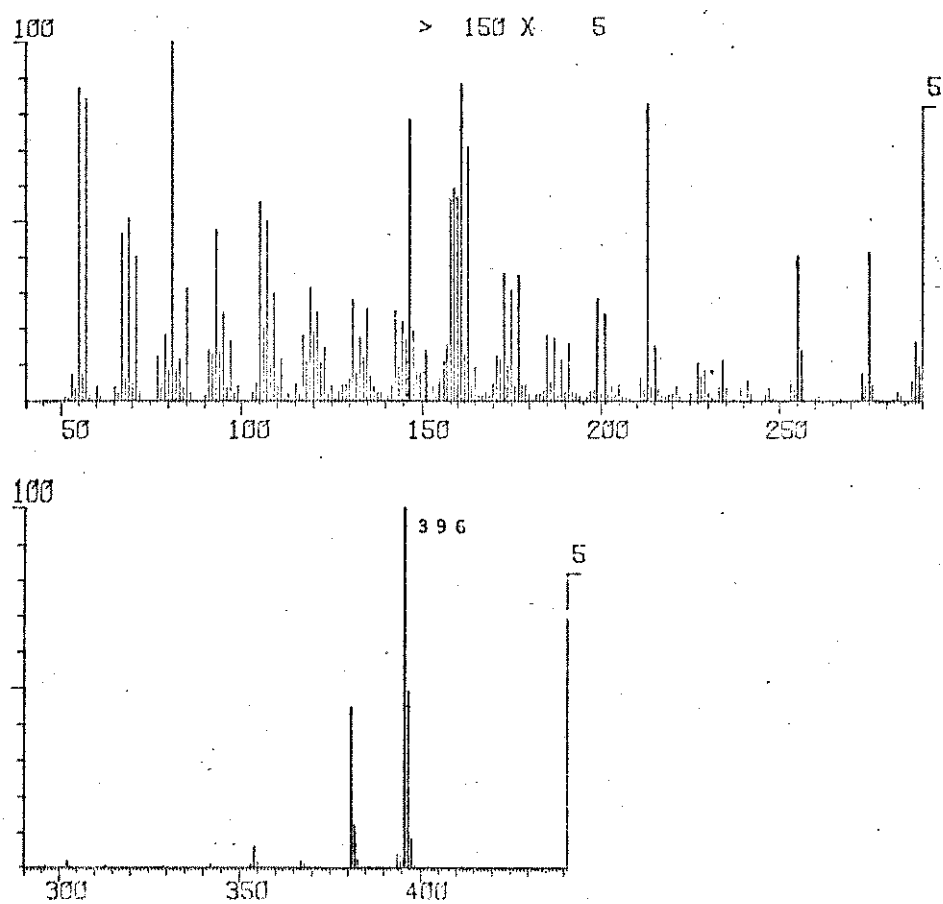
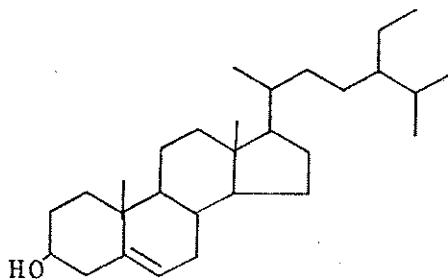


Figura 27. Espectro de massa do acetato do pico H (70 eV).



pico H, β -sitosterol

Tabela 8. Principais íons do espectro de massa dos esteróis da *Tedania ignis*.

Fig. Nº	Pico	M^+	(M-CH ₃)	(M-H ₂ O)	M-(CH ₃ , H ₂ O)	M-(cadeia lateral)	M-(cadeia lat., H ₂ O)	M-anel D, H)	M-(anel D, H, H ₂ O)	Íon a	Íon b	Íon c	M-43	Δ^{22}_{24} ou Δ^{24}
14	A	370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	C	384	369	366	351	273	255	231	213	299	273	245	-	271
18	D	386	371	368	353	273	255	231	213	301	275	247	-	-
20	E	398	383	380	365	273	255	231	213	313	287	259	355	300
22	F	400	385	382	367	273	255	231	213	315	289	261	-	-
24	G	412	397	394	379	273	255	231	213	327	301	273	369	300
26	H	414	399	396	381	273	255	231	213	329	303	275	-	-

Tabela 9. Principais íons do espectro de massa dos acetatos, da mistura esteróica da Tedania ignis.

Fig. Nº	Pico	M ⁺ -AcOH	M ⁺ -CH ₃ -AcOH	M ⁺ -cadeia lat. -AcOH	M ⁺ -anel D,H -AcOH	Íon a	Íon c	M ⁺ -C ₈ H ₁₂ -AcOH
15	A	352	337	255				
	B							
17	C	366	351	255	213	-	245	258
19	D	368	353	255	213	301	247	260
21	E	380	365	255	213	-	269	272
23	F	382	367	255	213	315	261	274
25	G	394	379	255	213	-	273	286
27	H	396	381	255	213	329	275	288

V. Conclusão

Após o extenso trabalho de extração e purificação dos esteróis da esponja T.ignis, utilizamos a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) para o estudo da mistura esterólica encontrada na T.ignis. Através desta técnica foi possível constatar a existência de pelo menos oito esteróis.

Analizando-se os espectros de massa de cada pico da mistura esterólica, encontramos os íons fragmentos comuns aos esteróis, como por exemplo: a perda de água, perda do radical metila, perda da cadeia lateral e perda do anel D.

Os íons $(M-85)^+$ (a), $(M-111)^+$ (b) e $(M-C_9H_{15}O)^+$ (c), que são considerados característicos dos esteróis com insaturação na posição C-5 e hidroxila em C-3, também estavam presentes em todos os esteróis analisados. Foi possível distinguir os compostos isoméricos, contendo insaturação em C-22 e C-24, por meio de fragmentações características apresentadas por estes compostos.

Baseando-se nestes estudos de fragmentações atribuímos as prováveis estruturas para os seis esteróis, como sendo: desmosterol (pico C), colesterol (pico D, componente principal) brassicasterol (pico E), 22,23-diidrobrassicasterol (pico F), estigmasterol ou poriferasterol (pico G) e β -sitosterol (pico H). Não foi possível caracterizar o pico A devido à sua pequena abundância e o pico B devido à má resolução no cromatograma de gás. A estrutura do colesterol foi confirmada pela comparação com uma amostra autêntica. Os outros componentes não foram confirmados devido à falta das respectivas amostras autênticas.

Podemos dizer que a esponja vermelha Tedania ignis contém uma mistura de esteróis, já conhecidos na literatura, que são comuns no ambiente marinho. Apesar das condições do meio ambiente serem diferentes daquelas esponjas já estudadas e mencionadas na literatura, a esponja T. ignis não continha nenhum esterol novo. Comparado ao estudo da mistura de esteróis já conhecido, esta mistura era relativamente simples.

Concluimos esta parte do trabalho enfatizando a aplicabilidade da técnica de CG-EM nos estudos de esteróis encontrados em tecidos vivos, principalmente porque através dela podemos analisar a mistura de esteróis encontrados em materiais biológicos. Devemos lembrar que as amostras a serem analisadas são em quantidades ínfimas, o que requer uma técnica altamente sensível para detectá-las.

2a PARTE

I. Introdução

A aplicação da espectrometria de massa está sendo muito usada para o estudo de esteróide por meio das análises de fragmentações "características" induzidas por impacto eletrônico principalmente na tentativa de identificar aqueles que são mais comuns na natureza e que são biologicamente importantes.

É interessante estudar o grau de alteração que os diferentes substituintes no anel A, do esqueleto esteroidal, podem produzir sobre os mecanismos de fragmentações do colesterol (2). O espectro de massa do colesterol pode servir como base para a interpretação de espectros mais complicados.

O espectro de massa do colesterol (Figura 29.b) a apresenta vários picos importantes na região de alto peso molecular. Alguns destes picos se devem às clivagens comuns do esqueleto esteroidal²⁸⁻³¹, como por exemplo: a perda da cadeia lateral (m/e 273), o produto de desidratação devido à presença do grupo hidroxila na posição C-3 (m/e 368) e também o pico resultante da perda do radical metila, que é angular, muito comum nos esteróis (m/e 371).

Analogamente à proposição de Djerassi³² para o composto colest-5-ene, também foi proposto que a presença da ligação dupla na posição C-5 do colesterol contribui muito na perda da cadeia lateral²⁸, formando-se assim o íon favoravelmente estabilizado, como se acha representado a seguir:

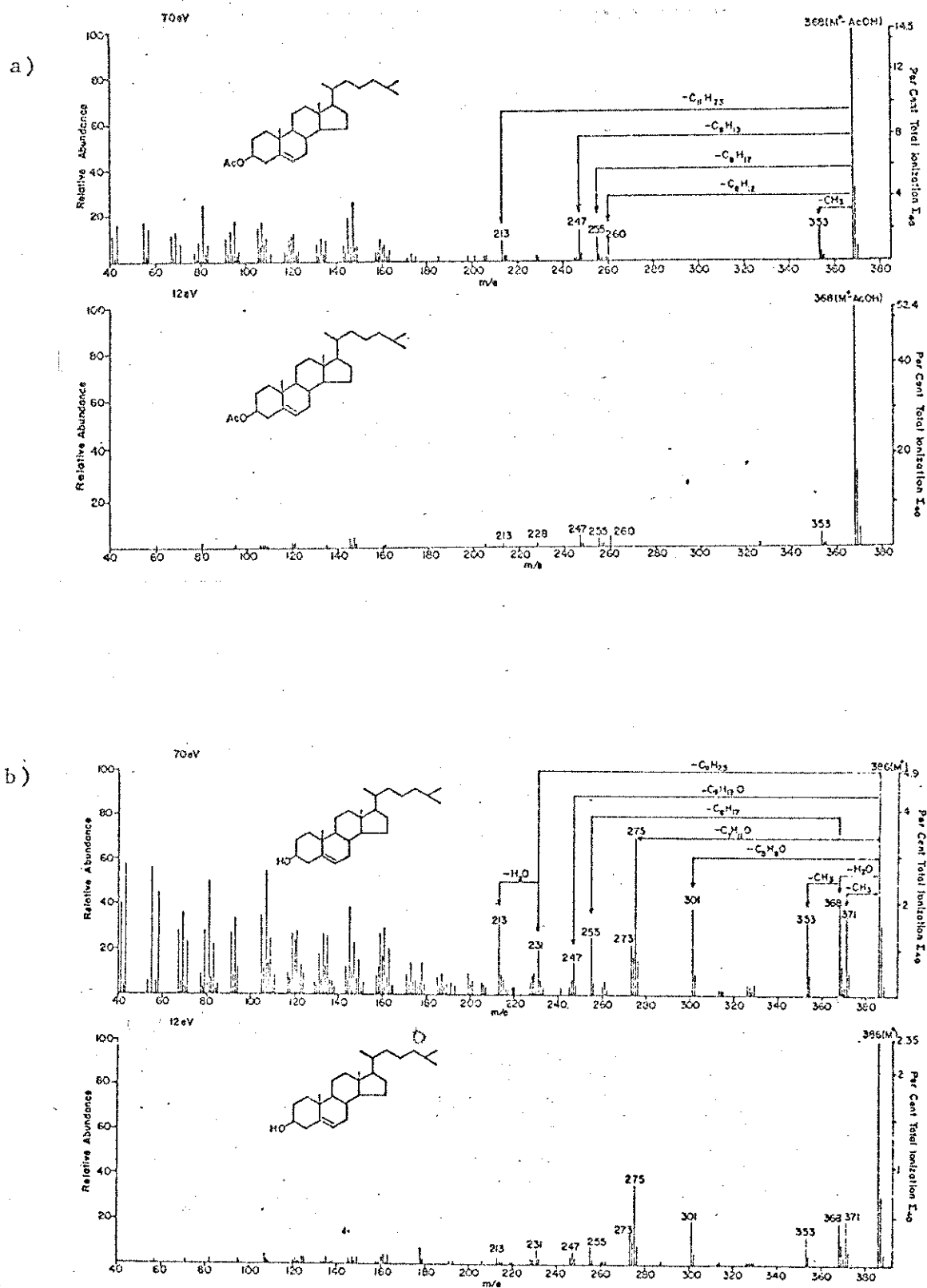
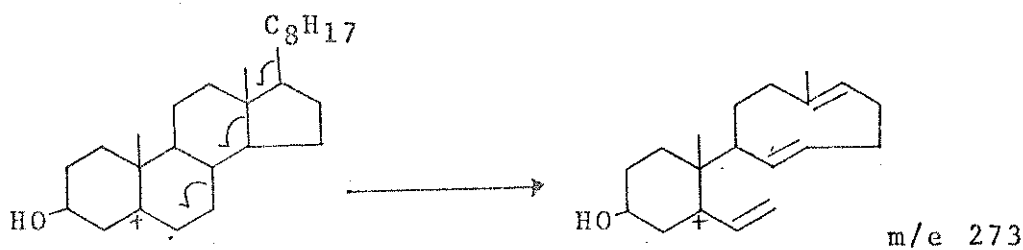
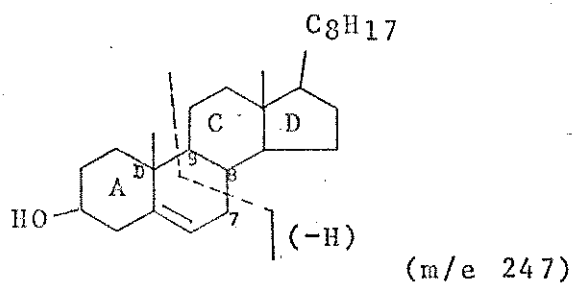


Figura 29. a) Espectro de massa do acetato de colesterol.

b) Espectro de massa do colesterol.



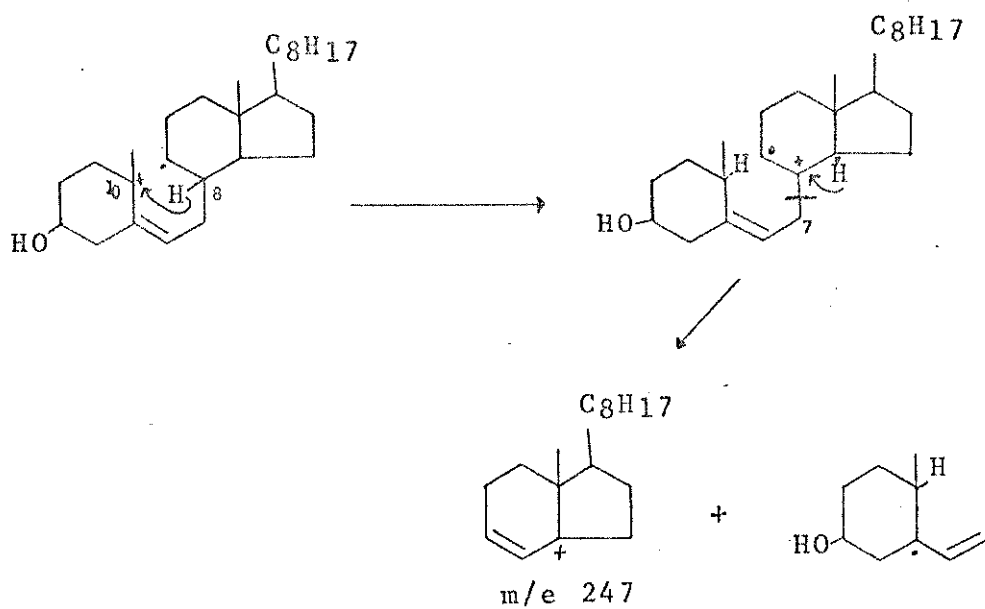
O pico de m/e 247 parece ser bastante característico do colesterol. A sua formação foi proposta, primeiramente por Friedland³¹ e mais tarde por Knights³⁰, como sendo uma fragmentação que envolve a ruptura das ligações 7-8 e 9-10. O íon m/e 247 resulta da perda dos elementos do anel A e parte do anel B juntamente com mais um átomo de hidrogênio, como se acha representado abaixo:



Mais recentemente, foi confirmado este tipo de clivagem através do estudo de colesterol deuterado²⁸. Foram propostos dois mecanismos de fragmentações para a formação deste íon. Um deles é aquele em que a fragmentação se inicia pela ruptura da ligação alílica 9-10 seguida de duas transferências sucessivas de hidrogênio das posições C-8 e C-14, e da quebra da ligação alílica 7-8 que leva à formação do íon m/e 247 e mais um radical, ambos alilicamente estabilizados (Esquema 6).

O outro mecanismo é aquele em que a fragmentação

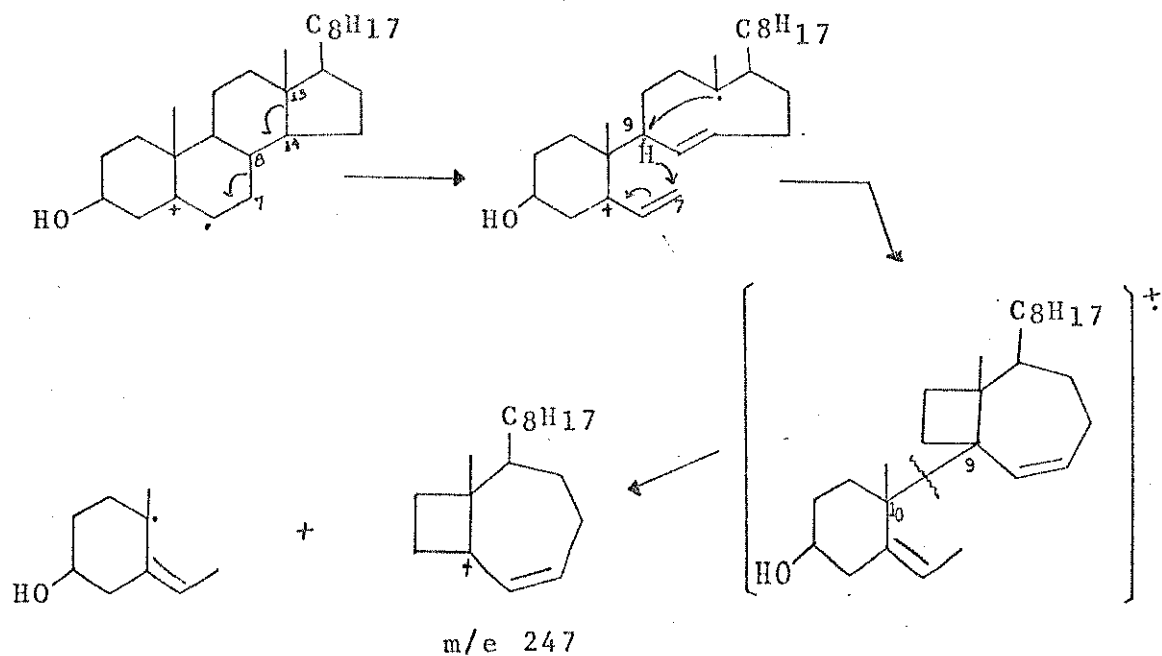
Esquema 6



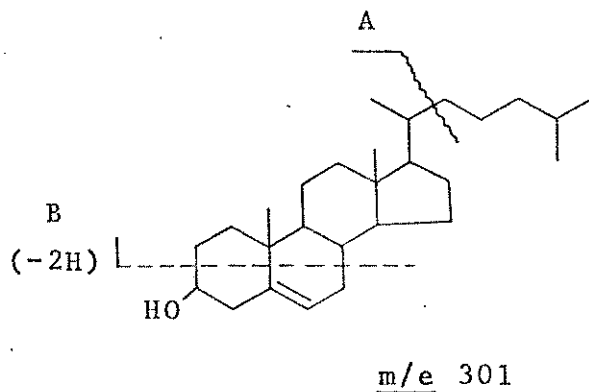
se inicia pela ruptura simultânea das ligações 7-8 e 13-14 seguida de uma transferência, de hidrogênio da posição alílica 9 α para o carbono C-7, num estado de transição de 6 membros. Localizando-se a carga no C-9, pode-se formar a ligação com o radical isolado do C-13 formando-se assim um anel de quatro membros. Esta etapa pode ser sincrônica com a transferência de hidrogênio (Esquema 7). A ruptura da ligação 9-10, duplamente alílica, leva à formação do íon $\text{m/e } 247$ e mais um radical favoravelmente estabilizados²⁸. (Esquema 7).

Os picos de $\text{m/e } 301(\text{M}-85)^+$ e $\text{m/e } 275(\text{M}-111)^+$, de grande intensidade no espectro de massa do colesterol, parecem ser comuns a todos os espectros de esteróis com insaturação na posição C-5 e hidroxila em C-3. Estes íons não apresentam nenhum pico análogo no espectro de massa do seu acetato²⁶ (Figura 29.a). Quanto à formação destes íons, foram propostas as mais diversas fragmentações do anel esteroidal. Para o íon $(\text{M}-85)^+$, a fragmentação proposta envolvia a perda parcial da cadeia lateral^{33,34}, ou a perda parcial do anel A e parte do anel B como mais tarde sugeriu

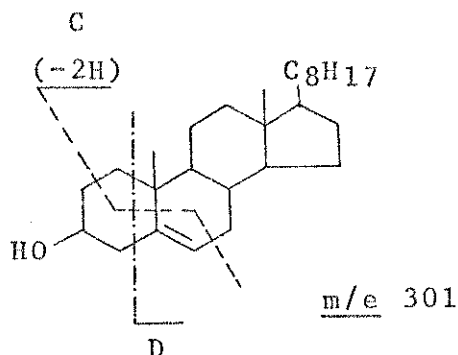
Esquema 7



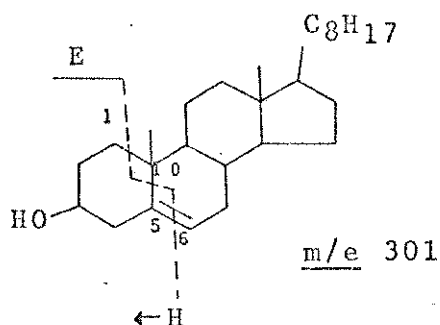
Knights³⁰. Estas proposições estão representadas graficamente a seguir:



Este pico de m/e 301, de grande intensidade, também foi centro de outras proposições especulativas^{35,36}. Uma das proposições é aquela que envolve a clivagem de três ligações, duas das quais são vinílicas³⁵ (clivagem C). A outra alternativa é a clivagem das ligações que levam à perda dos elementos do anel A³⁶ (clivagem D). Estas duas proposições podem ser graficamente representadas a seguir:

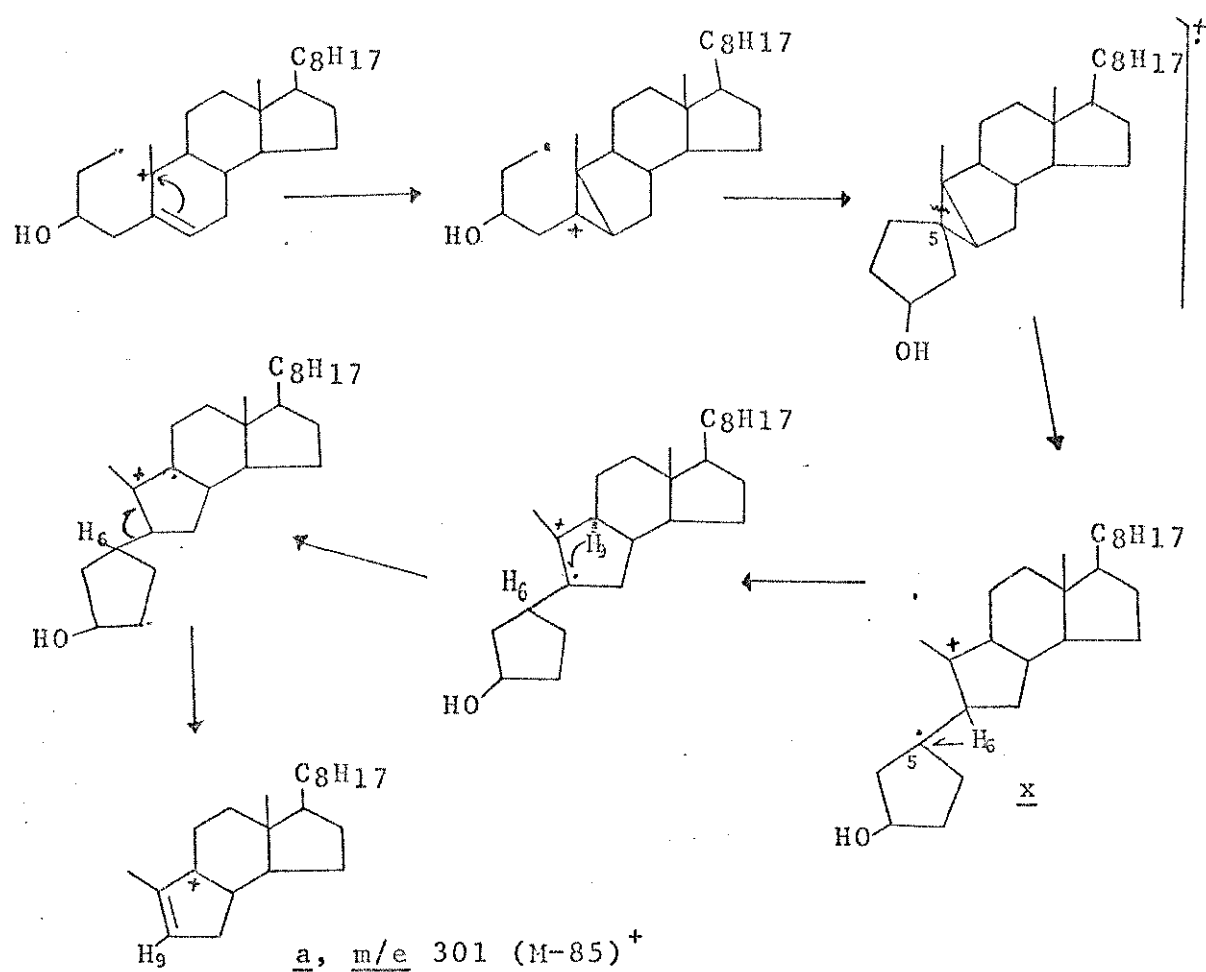


Finalmente, Naqvi³⁷ sugeriu uma fragmentação que envolve a ruptura das ligações 1-10, 5-10 e 5-6 e mais a perda de um próton, representada a seguir:



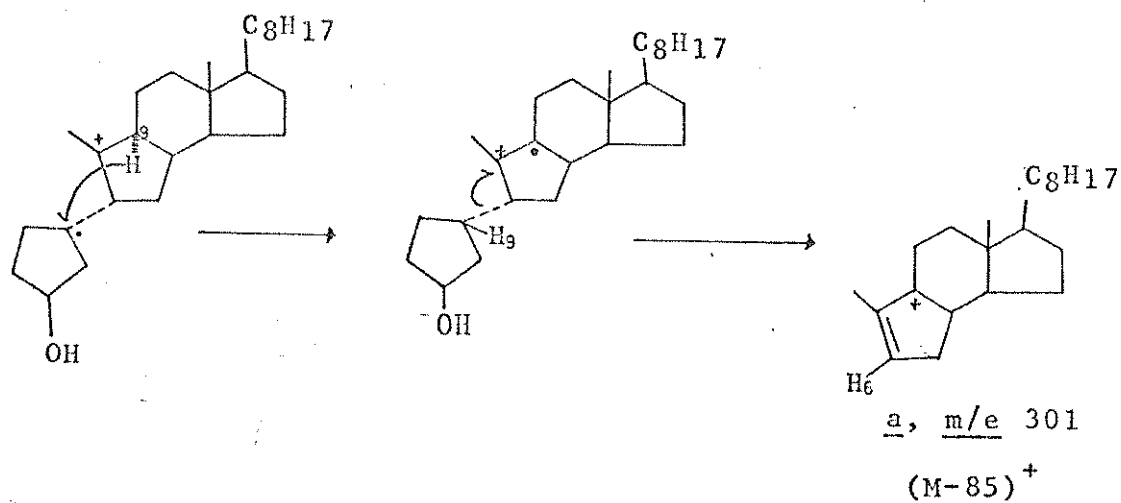
Esta fragmentação foi confirmada através de estudos das fragmentações do colesterol deuterado²⁸ e dos análogos deuterados³⁸. Com estas informações, foi elaborado um mecanismo de fragmentação²⁸ que envolve as clivagens propostas anteriormente³⁷. O mecanismo sugere a transferência de hidrogênio do C-6 para C-5; a formação do íon m/e 301 se acha representada no Esquema 8. O íon x pode ter dois estereoisômeros no C-6. Considerando-se o estereoisômero em que o grupo ciclopentila está no lado alfa, o hidrogênio a ser transferido pode ser da posição 9α (Esquema 9). Apesar da distância internuclear (entre o hidrogênio 9α e o carbono radicalar) ser maior neste caso do que no proposto no esquema anteri-

Esquema 8

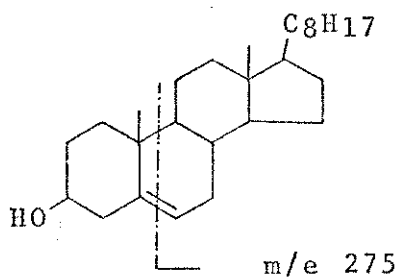


or. Os íons $\text{m/e } 301$ formados são idênticos²⁸, diferindo apenas na origem dos hidrogênios das posições C-5 e C-6.

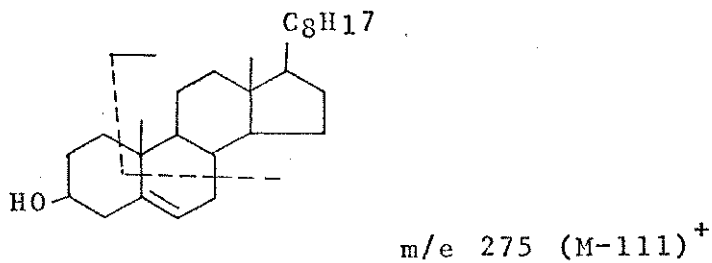
Esquema 9



O íon m/e 275 ($M-111$)⁺, de maior intensidade que o íon m/e 301 no espectro de massa do colesterol, também recebeu várias proposições quanto à fragmentação que resultou na formação deste íon. Inicialmente, Friedland³¹ propôs uma fragmentação envolvendo as clivagens que causam a perda do anel A e parte do anel B, conforme representação a seguir:



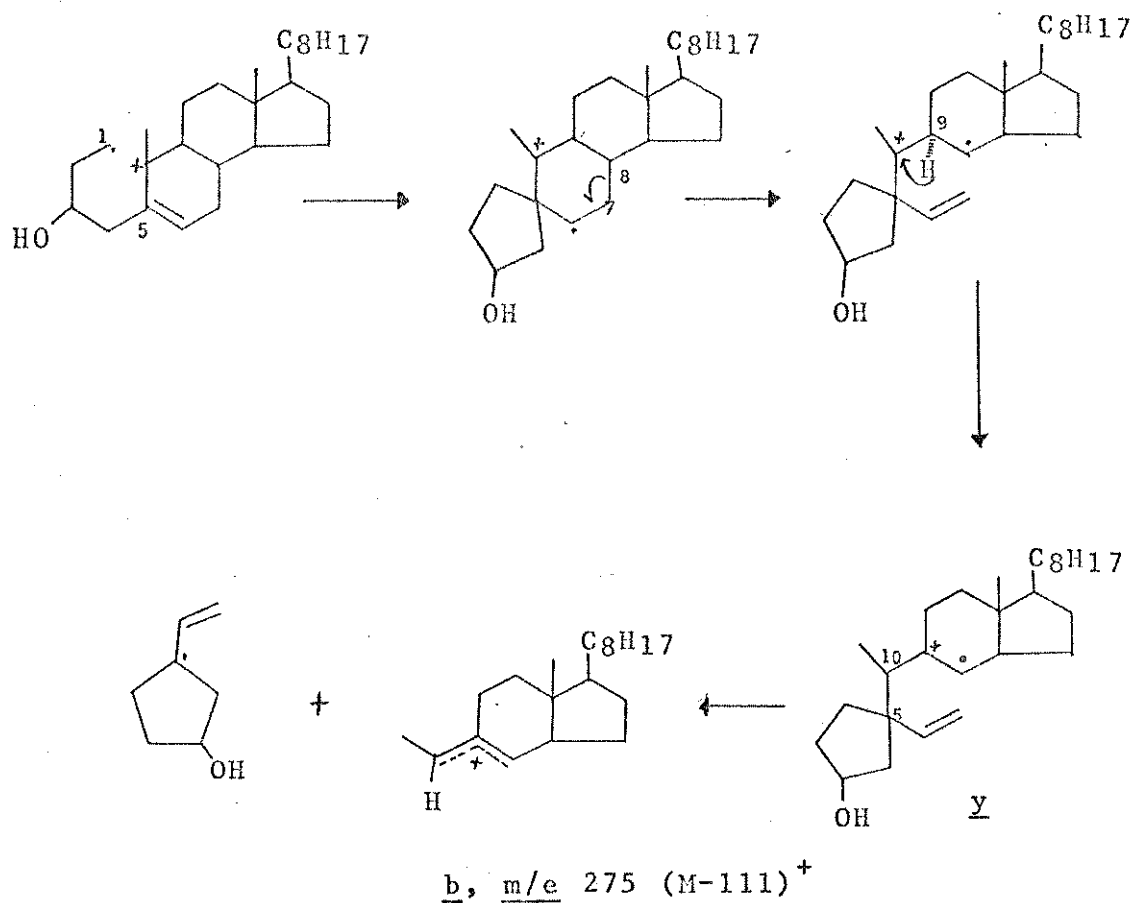
Outra proposição, de Knights³⁰, é aquela que envolve a clivagem de três ligações, duas das quais são alílicas, que leva à perda do anel A e parte do anel B, como se encontra representada a seguir:



Através da análise do espectro de alta resolução dos íons do colesterol deuterado e dos análogos deuterados³⁸ foi confirmada a fragmentação proposta anteriormente³⁰. Um provável mecanismo envolve a formação de uma ligação entre as posições C-1 e C-5, no íon molecular, seguida da ruptura da ligação 7-8 e da transferência de hidrogênio da posição 9_α para o íon carbônio adjacente. A homôli

se da ligação 5-10 no íon γ resulta na formação do íon m/e 275 e mais um radical, alilicamente estabilizados²⁸, como se observa no esquema 10.

Esquema 10



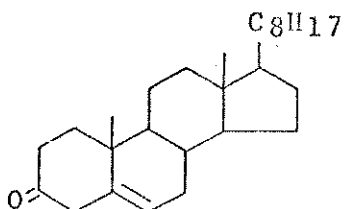
Estes estudos^{28,38} indicaram que a formação dos íons característicos, ($M-85$)⁺ ($\underline{a}$), ($M-111$)⁺ ($\underline{b}$) e o íon m/e 247 ($\underline{c}$, no colesterol), dos esteróis com hidroxila em C-3 e insaturação na posição C-5 provavelmente é controlada pela ligação dupla. Estes íons estão presentes nos espectros de compostos esteroidais que não apresentam outros grupos funcionais que possam controlar estas fragmentações.

II. Objetivo

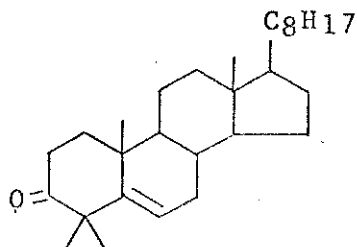
Os espectros de massa, do colesterol e seu derivado acetato, foram estudados detalhadamente^{26,28}. Os autores constataram que os principais íons do colesterol e dos esteróis relacionados a este sob o impacto eletrônico de 70 eV são: $(M-139)^+$ (c), $(M-111)^+$ (b) e $(M-85)^+$ (a). Estes autores sugerem que as clivagens envolvidas na geração destes íons sejam provavelmente controladas apenas pela ligação dupla na posição C-5. Tendo isto em mente, decidimos estudar seis derivados do colesterol com substituintes no anel A, cujo objetivo é estudar as possíveis influências destes grupos no mecanismo de fragmentação do colesterol.

Para evitar a migração da ligação dupla para a posição C-4, que é uma posição conjugada com a carbonila, decidimos alquilar a posição C-4 com dois grupos metílicos para eliminar esta possibilidade. Assim, podemos ver se a fragmentação é controlada apenas pela ligação dupla em C-5 ou se a ligação dupla em C-4 tem alguma influência.

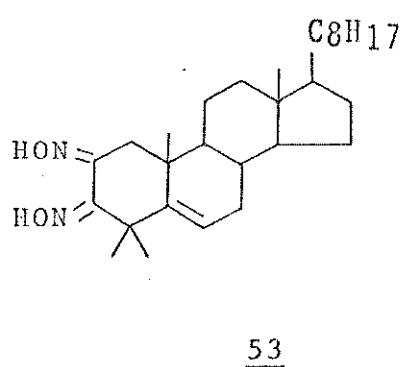
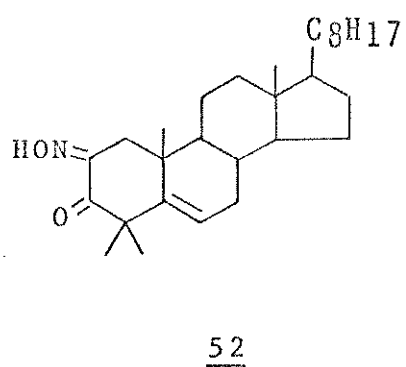
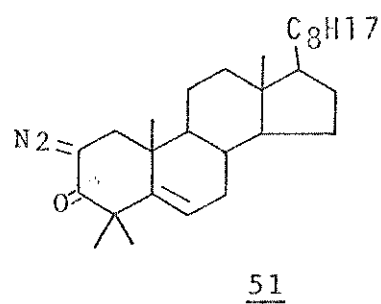
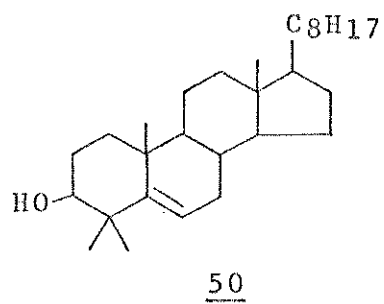
Foram estudados os seguintes compostos:



48



49



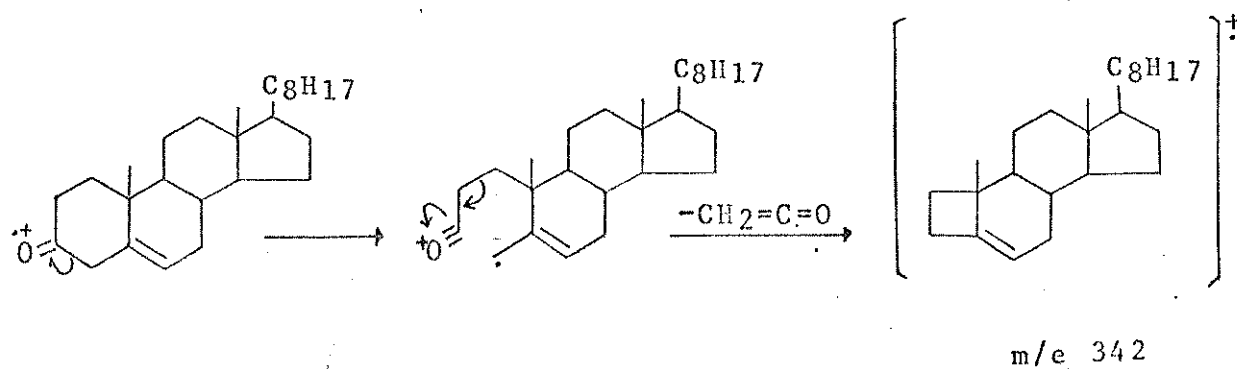
III. Resultados e Discussão

A comparação entre o espectro de massa do colest-5-eno e vários esteróis 3 β -hidroxilados e insaturação na posição C-5 indica que a fragmentação produz íons característicos destes compostos, e é aparentemente controlada pela ligação dupla. Utilizando-se de vários esteróis deuterados comprovou-se que os íons do colesterol se devem às fragmentações e rearranjos muito complexos²⁸.

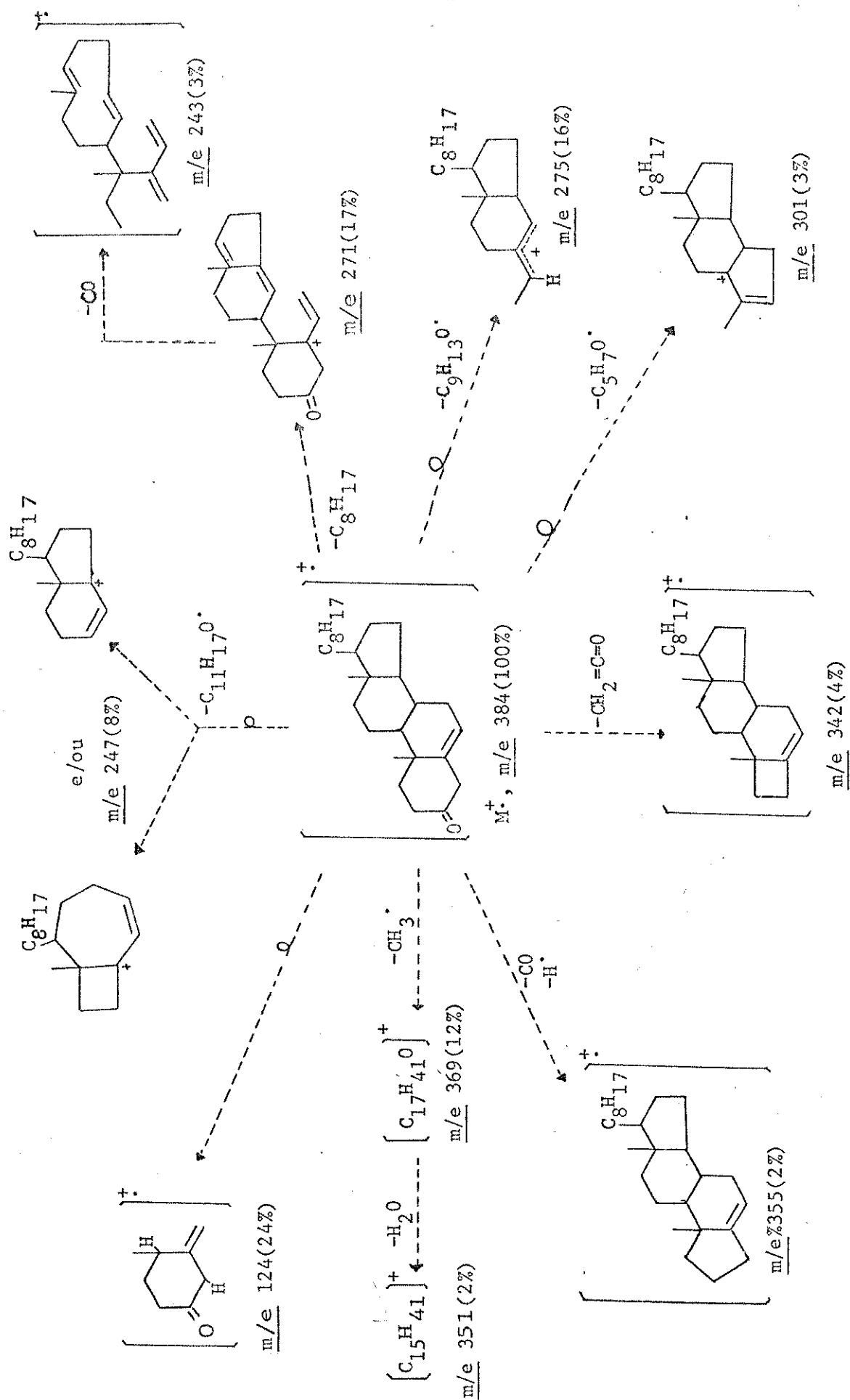
Para estudar o efeito produzido por diferentes grupos funcionais, no anel A do esqueleto esteroidal, nas fragmentações do colesterol induzidas por impacto de elétrons, decidimos analisar os compostos de 48 a 53.

O espectro de massa do colest-5-en-3-ona (48, Figura 30) apresenta um íon molecular de m/e 384 (M^+), que corresponde ao pico base no espectro. Os principais íons são m/e 369, m/e 355, m/e 342, m/e 301, m/e 275, m/e 271, m/e 243, m/e 247, m/e 229 e m/e 124. A formação deles está elaborada no esquema 11.

A formação de um íon de m/e 342, provavelmente envolve a localização da carga no heteroátomo com eliminação de ceteno³⁹ pelo seguinte mecanismo:



Esquema 11



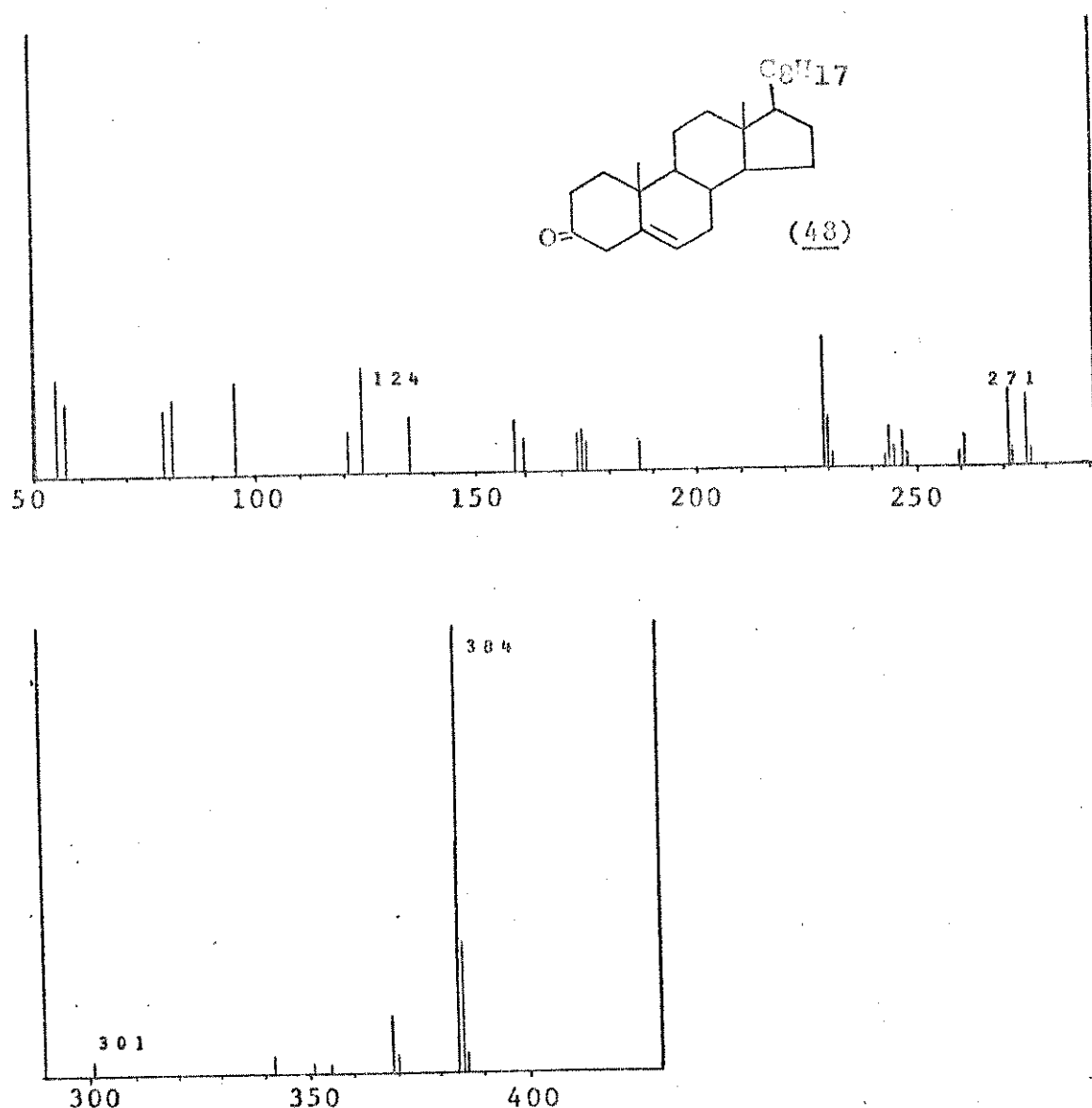
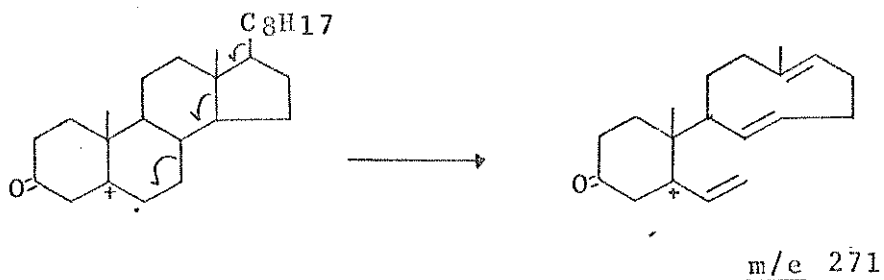


Figura 30. Espectro de massa do colest-5-en-3-ona (48) (70eV)

Analogamente aos esquemas de fragmentações do colesterol²⁸, os íons de m/e 301, m/e 275 e m/e 247, característicos dos esteróis 3 β -hidroxilados e insaturação na posição C-5, também estão presentes no espectro do composto 48, mas são de menor intensidade.

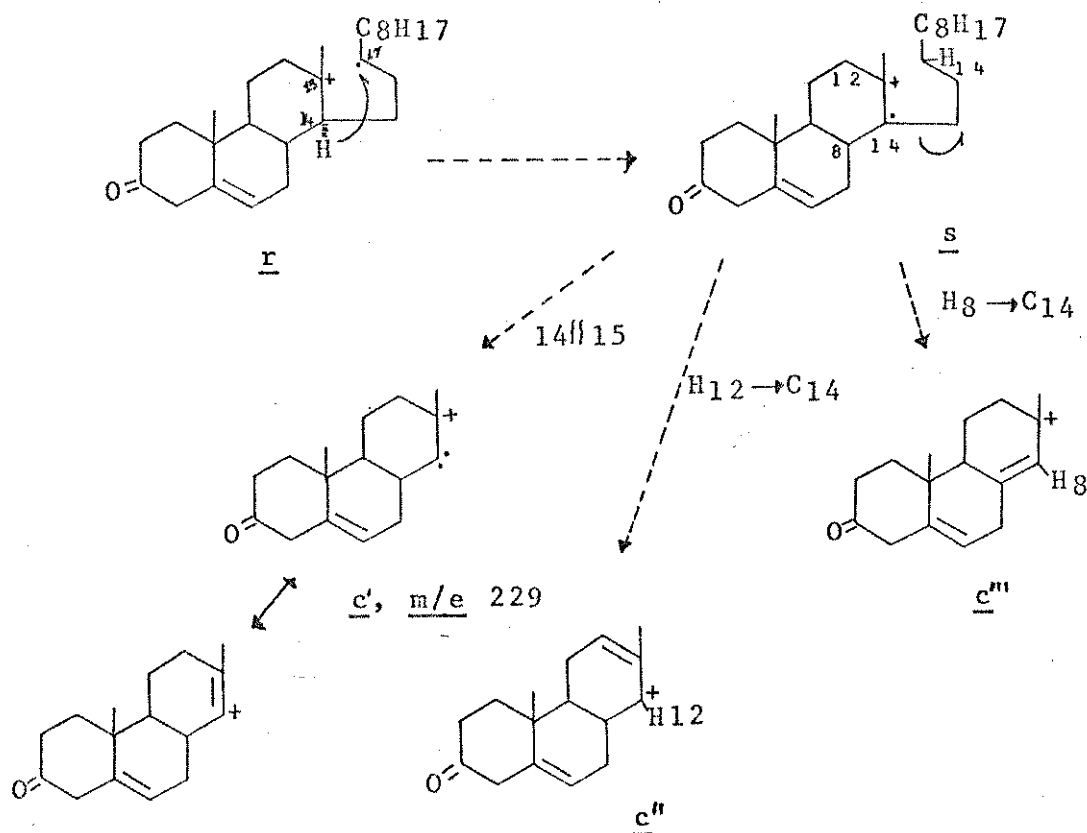
A formação do íon de m/e 271, que corresponde à perda da cadeia lateral, provavelmente é favorecida pela presença da ligação dupla em C-5 e o íon formado é alilicamente esta-

bilizado²⁸:

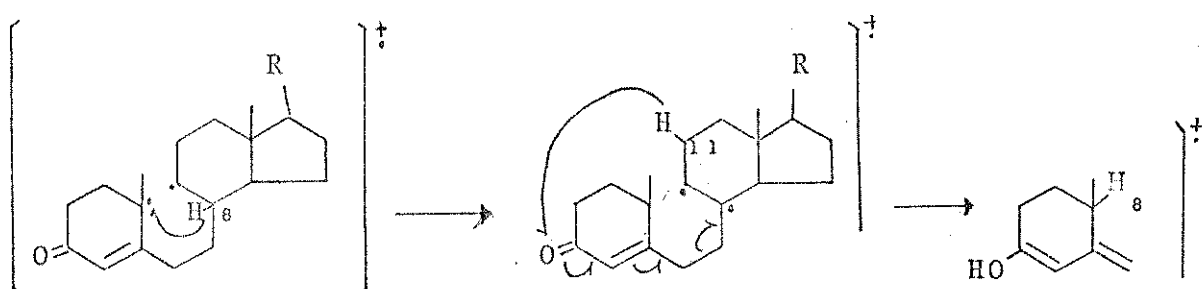


O pico de m/e 229, de relativa intensidade no espectro, corresponde à perda do anel D. A sua formação, provavelmente, envolve a ruptura da ligação 13-17 (r) com transferência de hidrogênio do C-14 (s) e uma ruptura subsequente da ligação 14-15. O íon resultante poderia ser um carbeno (c') ou um íon carbônio c'' ou c''' alilicamente estabilizados²⁰. Um provável mecanismo se encontra no esquema 12.

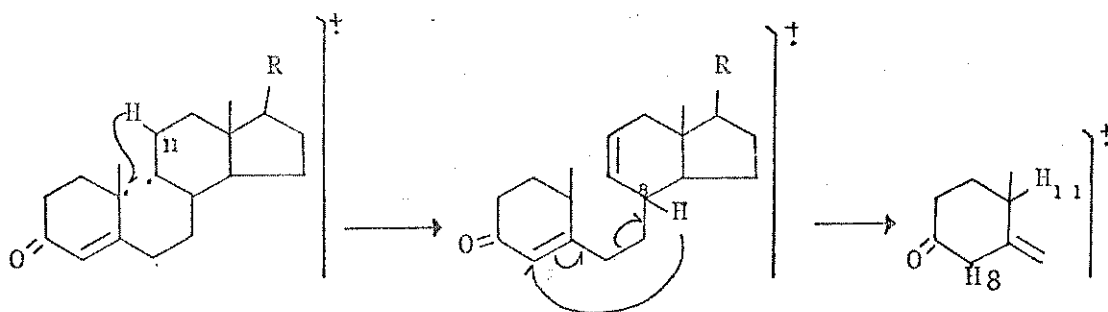
Esquema 12



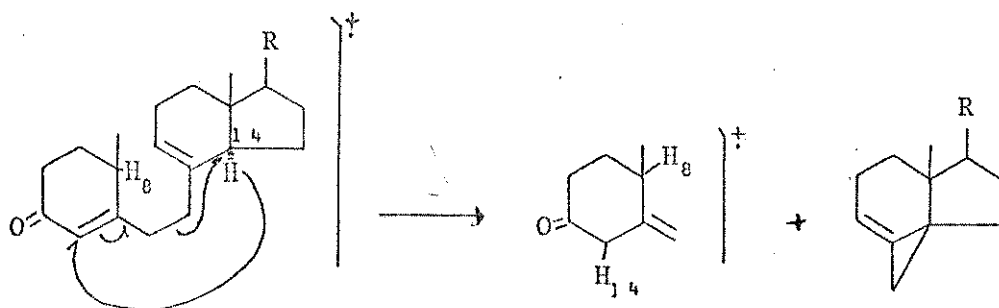
Tem-se referido na literatura²⁰ que os Δ^4 -3-ceto esteróis dão origem ao pico de m/e 124, de grande intensidade. Sua formação parece envolver a ruptura do anel B com dupla transferência de hidrogênio. Este processo é representado de três maneiras, dependendo da origem do hidrogênio que migra em primeiro lugar. A segunda migração é de uma posição alilicamente ativada. Sendo o H₈ o principal iniciante deste processo, conforme foi confirmado pelo estudo do composto deuterado²⁰.



ou



ou

m/e 124

Analisando-se o espectro do composto 48 encontramos este íon de m/e 124. Apesar do composto ter insaturação no C-5 , não é difícil imaginar que o aquecimento na fonte leve à migração da ligação dupla para C-4 numa posição conjugada com a carbonila³⁴. Por esta razão encontramos o mesmo tipo de fragmentação citado anteriormente.

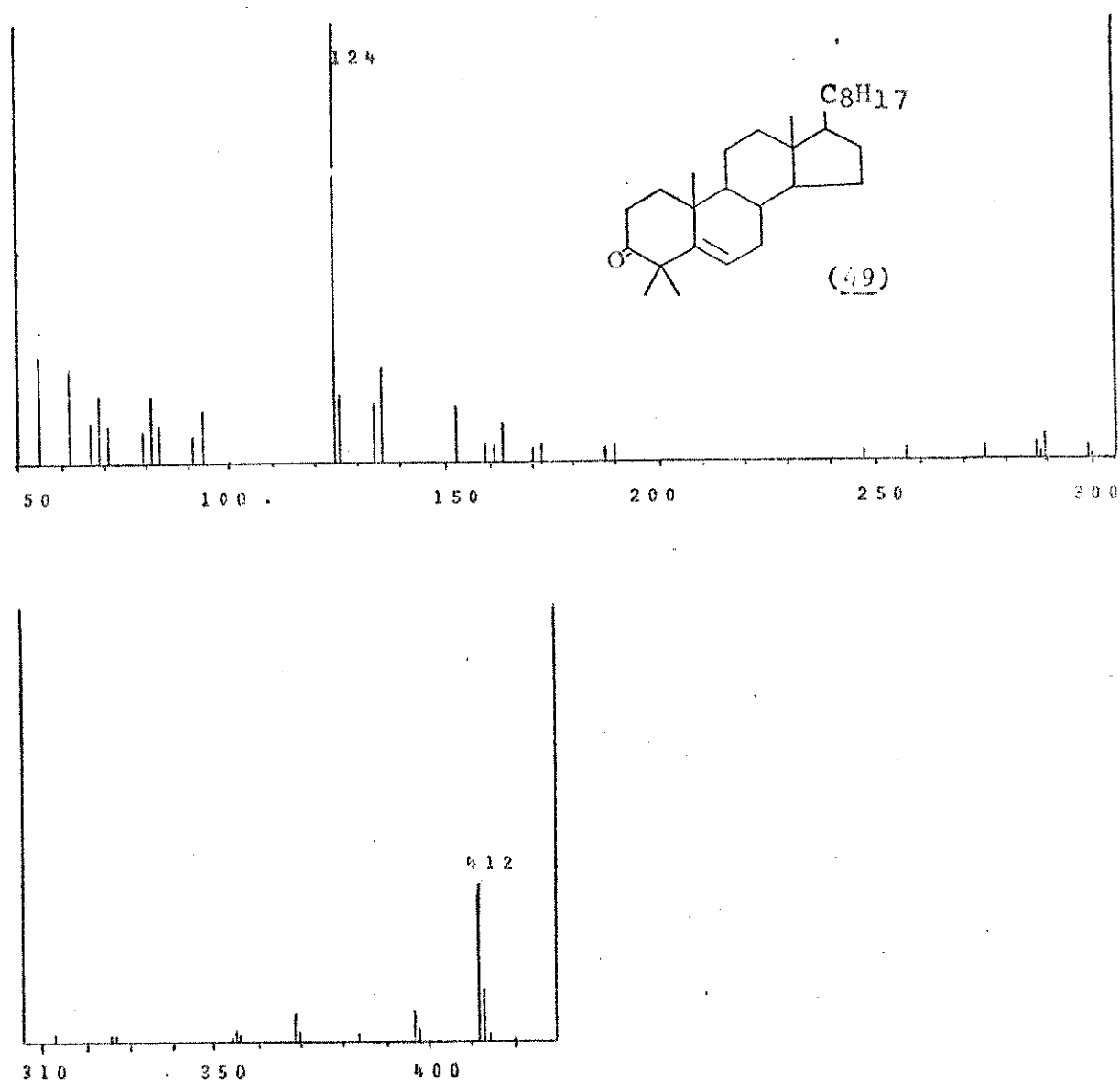
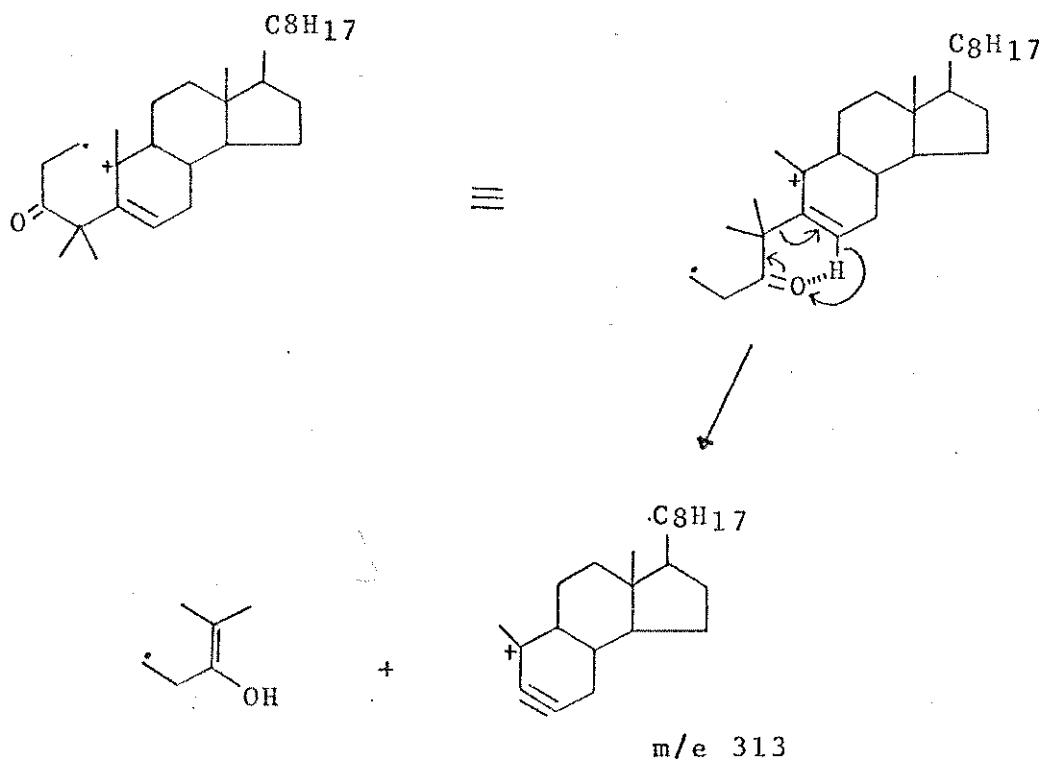


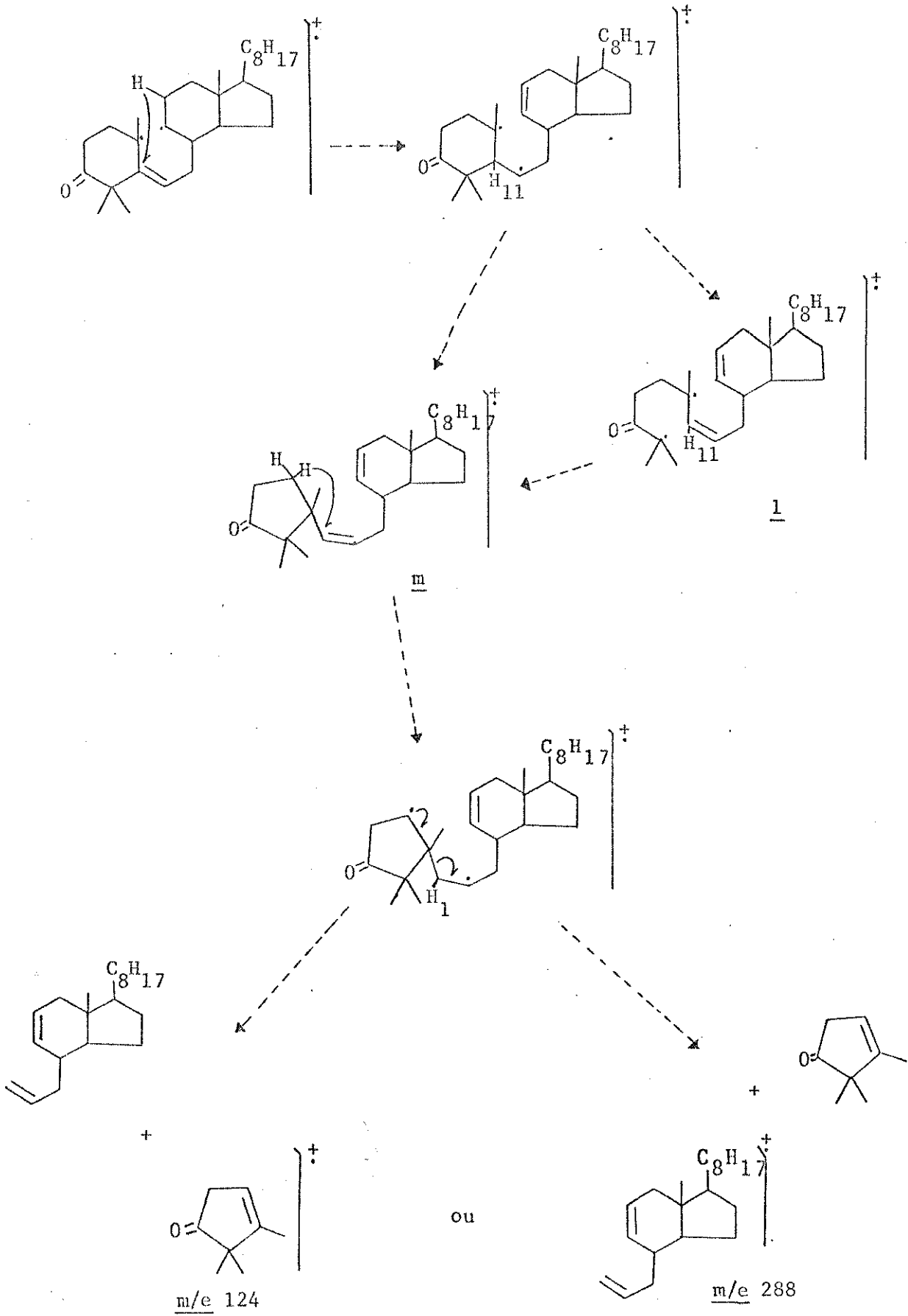
Figura 31. Espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona(49).

O espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (49, Figura 31) apresenta um íon molecular em m/e 412 (M^+). Este espectro também mostra íons característicos de esteróis 3 β -hidroxilados e insaturação no C-5 que correspondem aos picos de m/e 247, m/e 275 e m/e 299 (este último corresponde ao m/e 301 do colesterol), mas são de menor intensidade. Outros principais fragmentos são m/e 397 ($M-CH_3$)⁺, m/e 384 ($M-CO$), m/e 370 [$M-(CH_2=C=O)$] e os picos que representam, provavelmente, a decomposição do íon de m/e 370, como mostra o esquema 13.

Além destes fragmentos, o espectro apresenta um pico de m/e 313 que não foi encontrado no espectro do colest-5-en-3-ona (48). Este íon é formado, provavelmente, pelo processo que envolve a perda dos elementos do anel A por um rearranjo análogo ao rearranjo de McLafferty que é muito importante nos compostos carbonílicos⁴⁰. Um provável mecanismo para sua formação é o seguinte:



Esquema 14



O pico de maior intensidade no espectro é de m/e 124. Como este composto tem o C-4 totalmente bloqueado pelas duas metilas, não há a possibilidade de migração da ligação dupla para esta posição. Por esta razão, seguramente este íon de m/e 124 é diferente daquele encontrado no composto 48. Um provável mecanismo proposto envolve o rearranjo com contração do anel A e a migração múltipla de hidrogênio seguida da clivagem do anel A, como se encontra representado no esquema 14. A formação do íon 1 é possível por ser um radical terciário. Por outro lado, a formação direta do íon m é também bastante coerente. A alta intensidade do pico de m/e 124 é devida, provavelmente, à alta estabilidade do íon proposto.

O espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (50, Figura 32) apresenta o íon molecular de m/e 414 (M^+). Outros principais fragmentos são m/e 399 ($M-CH_3$), m/e 396 ($M-H_2O$), m/e 381 ($M-CH_3, H_2O$), m/e 283 ($M-C_8H_{17}, H_2O$) e m/e 259 (M -anel D, H). Estes são comuns aos esteróis²⁸. Analogamente ao colesterol²⁸ os íons de m/e 301, m/e 275 e m/e 247 também estão presentes. A formação dos íons estão elaborados no esquema 15.

Um pico na região de alta massa de relativa intensidade (38%) corresponde ao íon de m/e 331. Sua formação, provavelmente, envolve a perda dos elementos do anel A e a transferência de hidroxila para a espécie que retém a carga. Este íon não foi encontrado no espectro do composto 49 e parece representar uma fragmentação específica⁴¹ para o colesterol alquilado no C-4. Um provável mecanismo para sua formação está representado no esquema 16.

Este processo envolve um rearranjo e uma rotação da ligação 4-5, assim o grupo hidroxila no C-3 se situa numa posição favorável à sua transferência ao C-6 com a clivagem con-

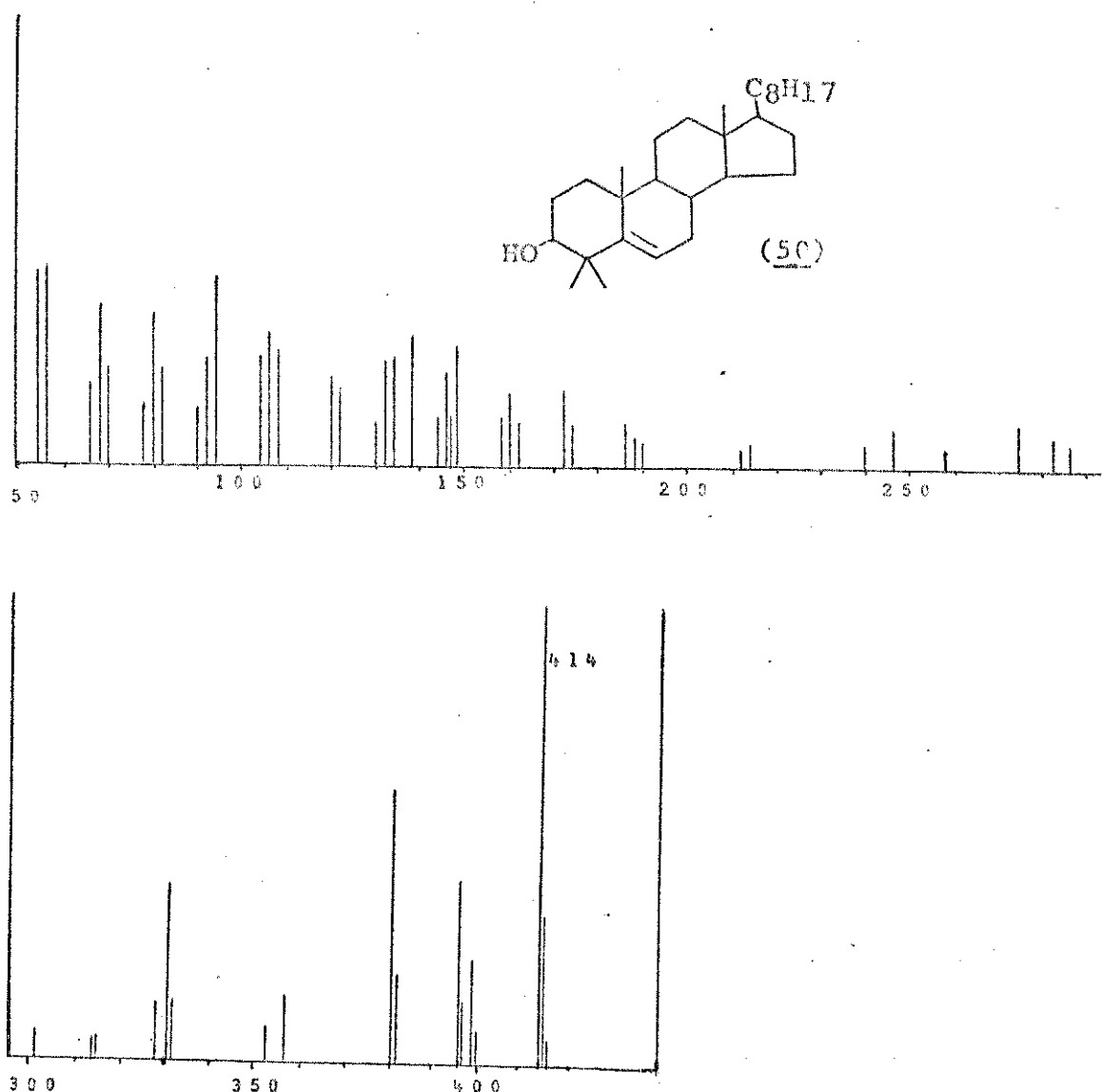
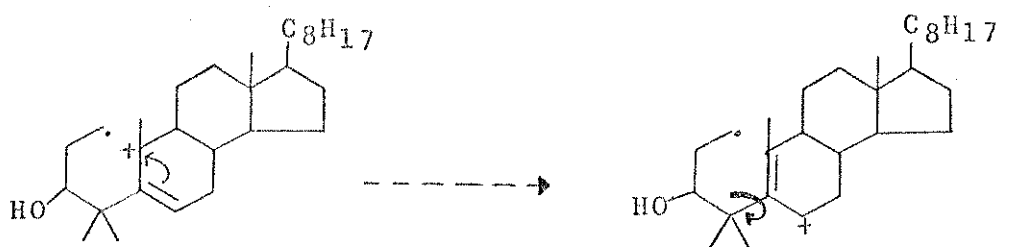


Figura 32. Espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (50).

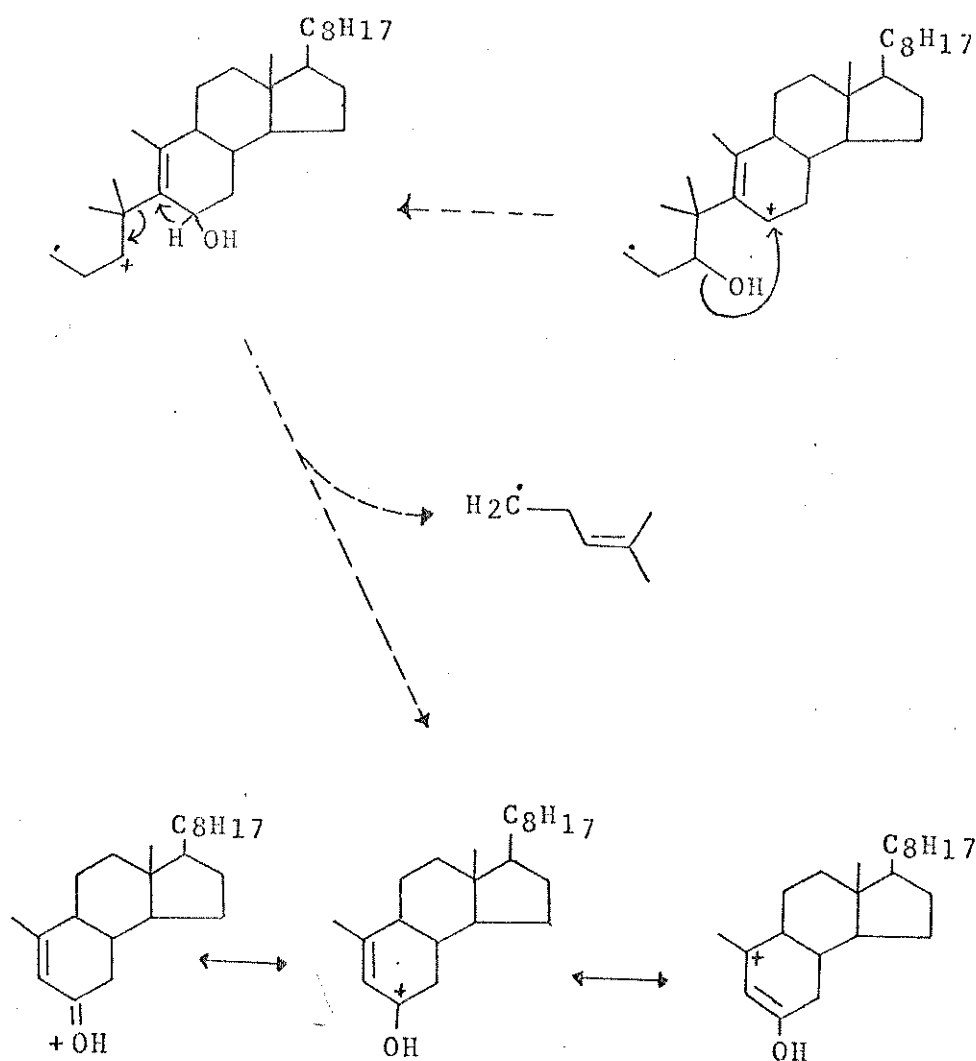
mitante da ligação C-O. A clivagem, que envolve a transferência de hidrogênio do C-6 para C-5 com a perda do fragmento de m/e 69, leva à formação do íon de m/e 331 estabilizado por três formas canônicas de ressonância.

O espectro de massa, de 2-diazo-4,4-dimetilcoles-5-en-3-ona (51, Figura 33), apresenta um íon molecular de m/e 438 muito pequeno (1%). Isto se deve, provavelmente, à perda rápida de nitrogênio resultando íon de m/e 410. Esta perda é comumente observada em diazocetonas⁴². O pico de m/e 410 aparentemen

Esquema 16



III

m/e 331

te se fragmenta pela perda do radical metila formando o pico base do espectro em m/e 395. Esta fragmentação é confirmada pela presença de um pico de grande intensidade a $0,964 E_1$ no espectro de MIKE⁴⁵ deste íon (Figura 34). Estes são os únicos picos de maior intensidade na região de alta massa do espectro deste composto, entretanto o espectro de MIKE⁴⁶ do íon m/e 410 (Figura 34) também contém um pico pequeno a $0,932 E_1$ que corresponde à perda de CO deste íon resultando m/e 382 que é um pico de intensidade mui

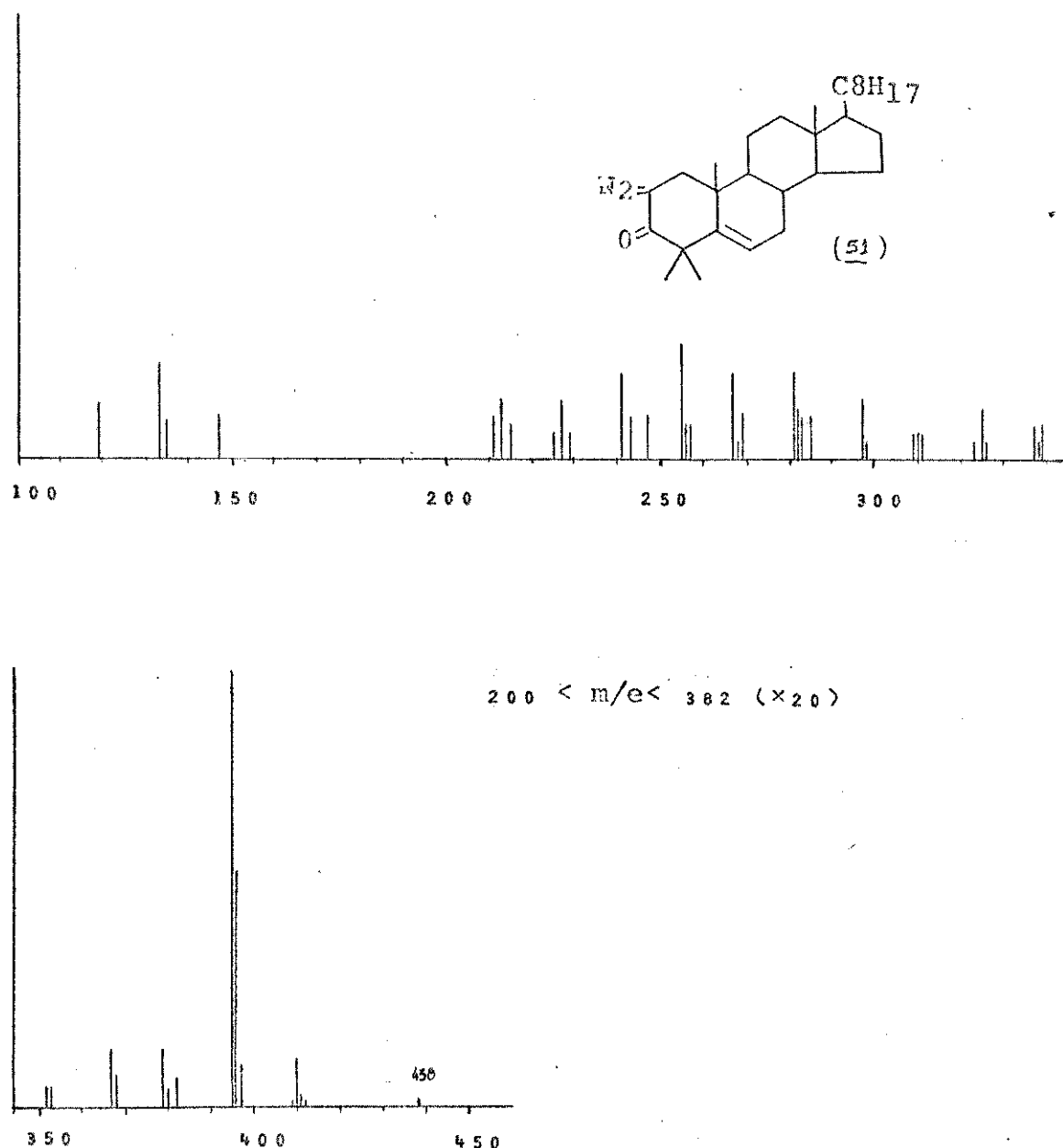


Figura 33. Espectro de massa de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona(51)

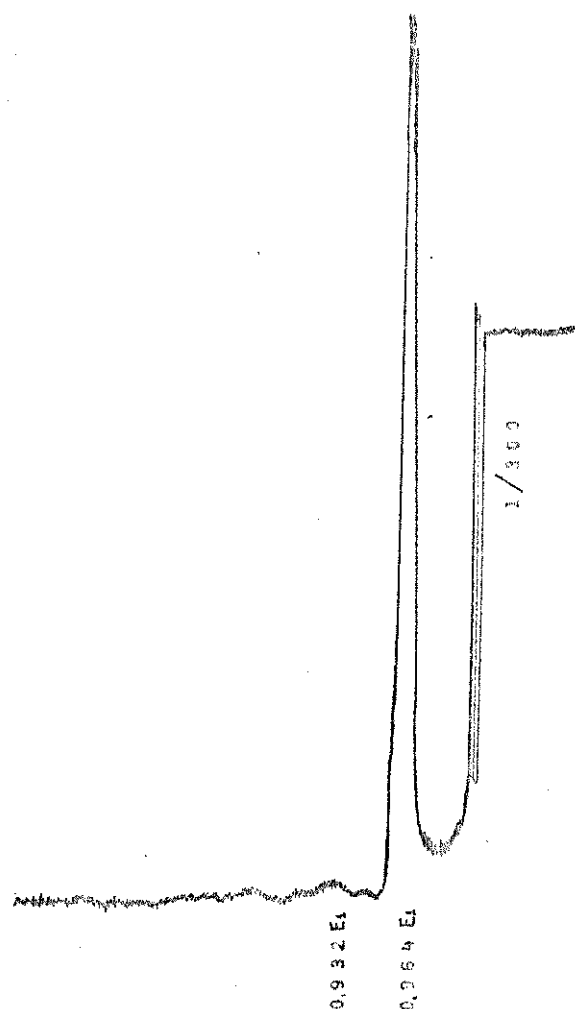


Figura 34. Espectro MIKE do íon m/e 410 do composto 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (51).

to baixa no espectro de massa.

A intensidade do pico de m/e 395, comparada à intensidade de todos os outros picos, é tão alta que provavelmente este íon apresente uma estrutura bastante estável. No MIKES deste íon de m/e 395 (Figura 35) é possível confirmar várias de suas fragmentações correspondendo:

$\tilde{a}$ 0,964 E_1	m/e 395	$\xrightarrow{-CH_3}$	m/e 380
$\tilde{a}$ 0,928 E_1	m/e 395	$\xrightarrow{-CO}$	m/e 367
$\tilde{a}$ 0,893 E_1	m/e 395	$\xrightarrow{-C_3H_6}$	m/e 353
$\tilde{a}$ 0,853 E_1	m/e 395	$\xrightarrow{-C_3H_6O}$	m/e 337
$\tilde{a}$ 0,717 E_1	m/e 395	$\xrightarrow{-C_8H_{16}}$	m/e 283

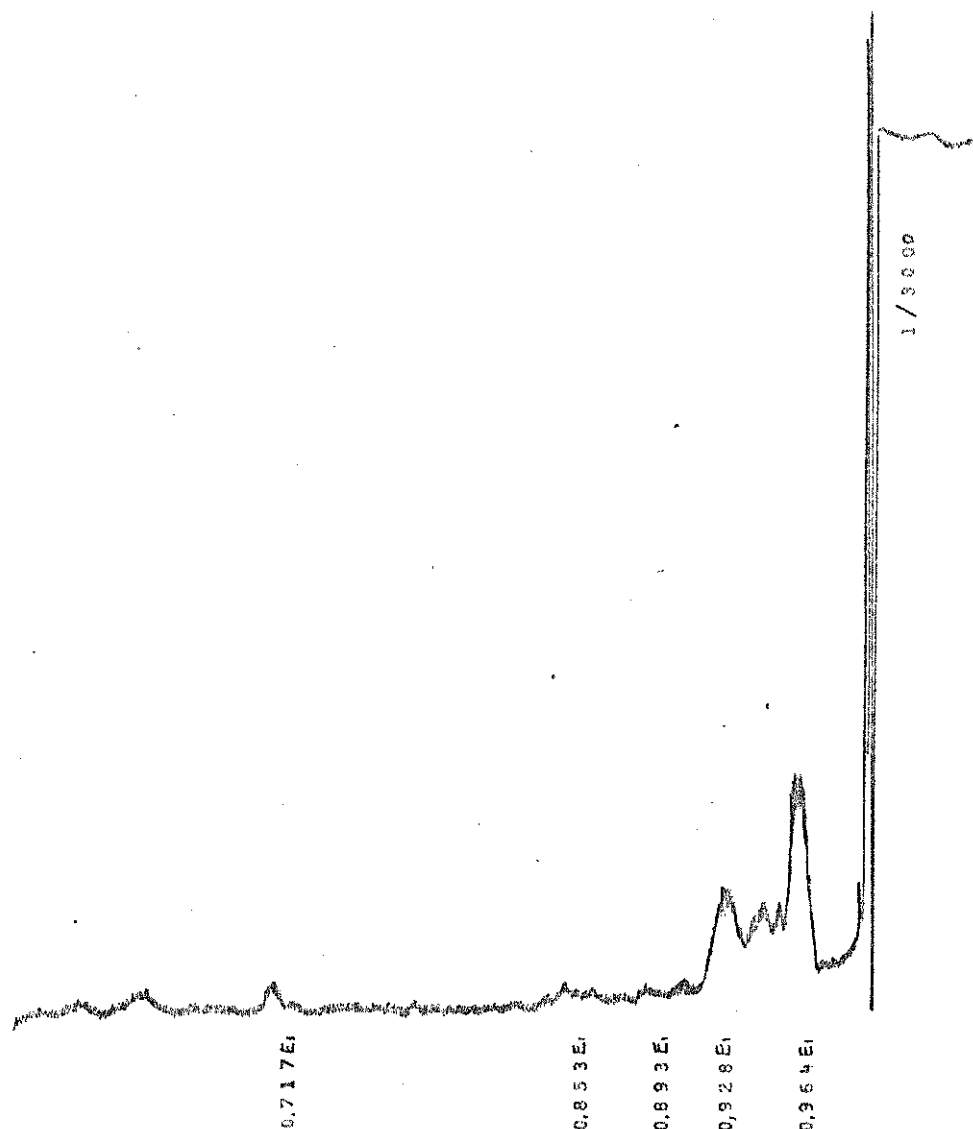


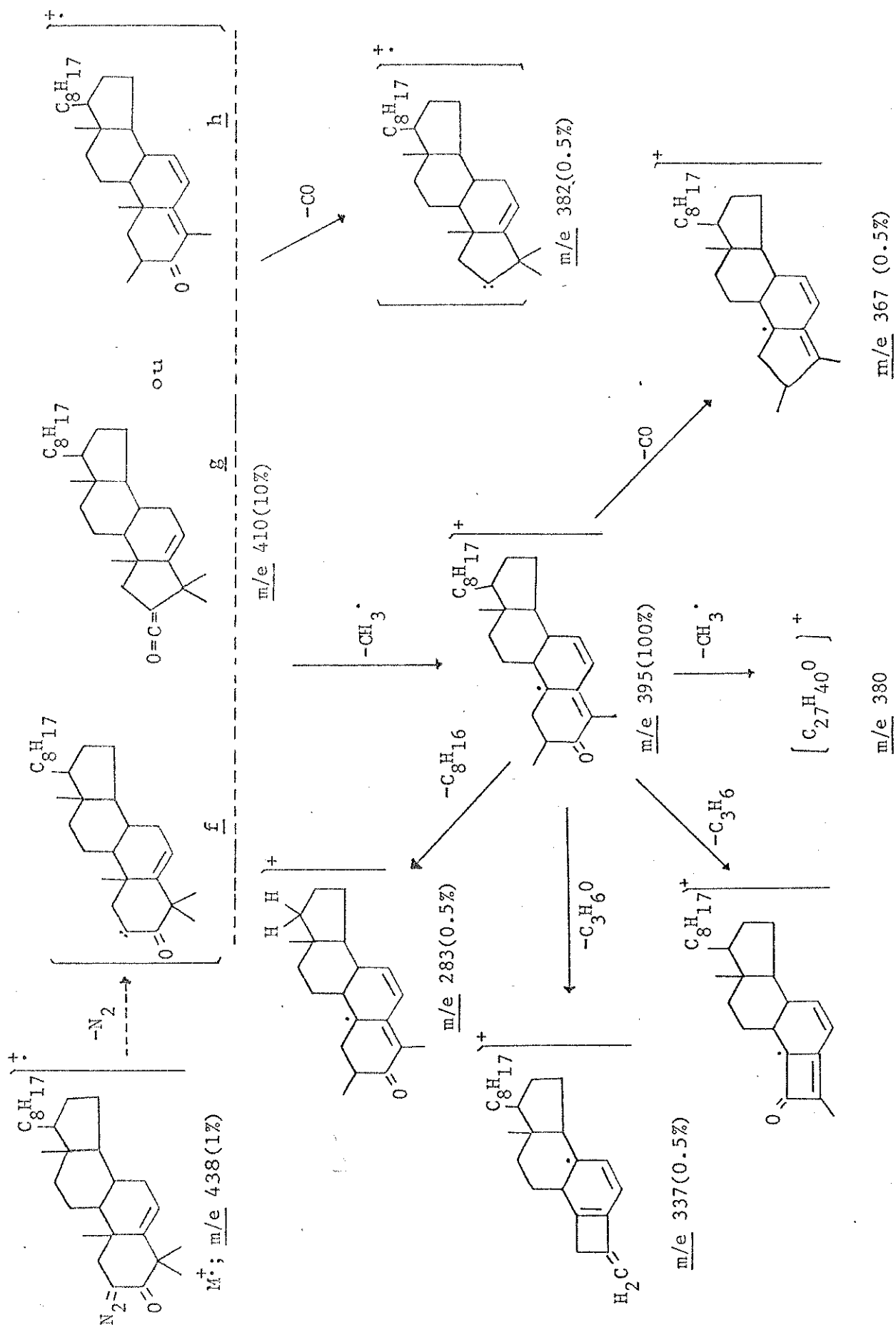
Figura 35. Espectro MIKE do íon m/e 395 ($M-43$)⁺ do composto 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (51).

Utilizando-se de todos os dados podemos elaborar um esquema de fragmentação (Esquema 17). Pode-se notar que a perda de nitrogênio do íon molecular resulta na formação de um íon de m/e 410, que poderia ter a estrutura de um α -ceto carbeno (f). Normalmente os carbenos podem participar de vários tipos de reação⁴². Entre estes estão os seguintes:

- 1) Rearranjo de Wolff: o íon f resultará no íon g.
- 2) Inserção numa ligação C-H para formar uma ligação dupla.
- 3) Inserção numa ligação C-C resultando num rearranjo do esqueleto carbonado.

No caso do íon m/e 410 (f), um rearranjo do último tipo com trans

Esquema 17



ferência de H_7 dará o íon h . A perda de metila do íon h resulta na formação do íon de m/e 395. Escolhemos esta estrutura para o íon m/e 395, porque a partir dela são explicadas todas as perdas observadas no MIKES. É possível a perda do radical CH_3 de vários lugares da molécula, a perda de CO pela clivagem das ligações 2-3 e 3-4, a perda de $CH_3CH=CH_2$ pela clivagem das ligações 1-10 e 2-3, a perda de C_3H_6O pelo rearranjo de dois hidrogênios mais a clivagem das ligações 1-2 e 3-4 e finalmente a perda da cadeia lateral com transferência de um hidrogênio ao anel D.

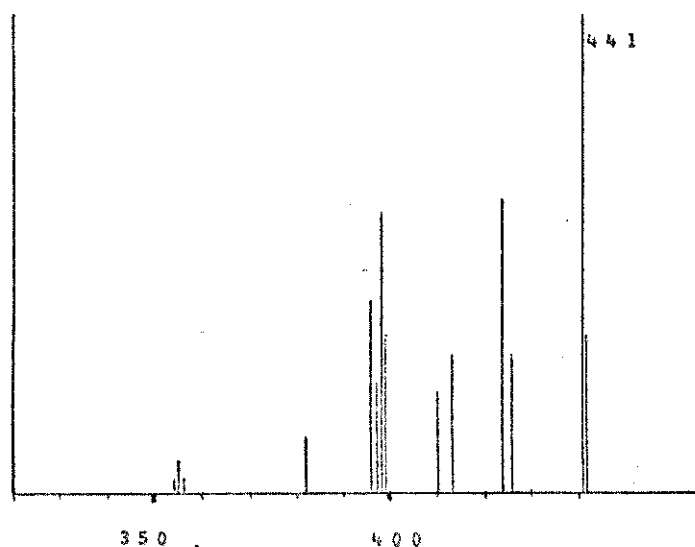
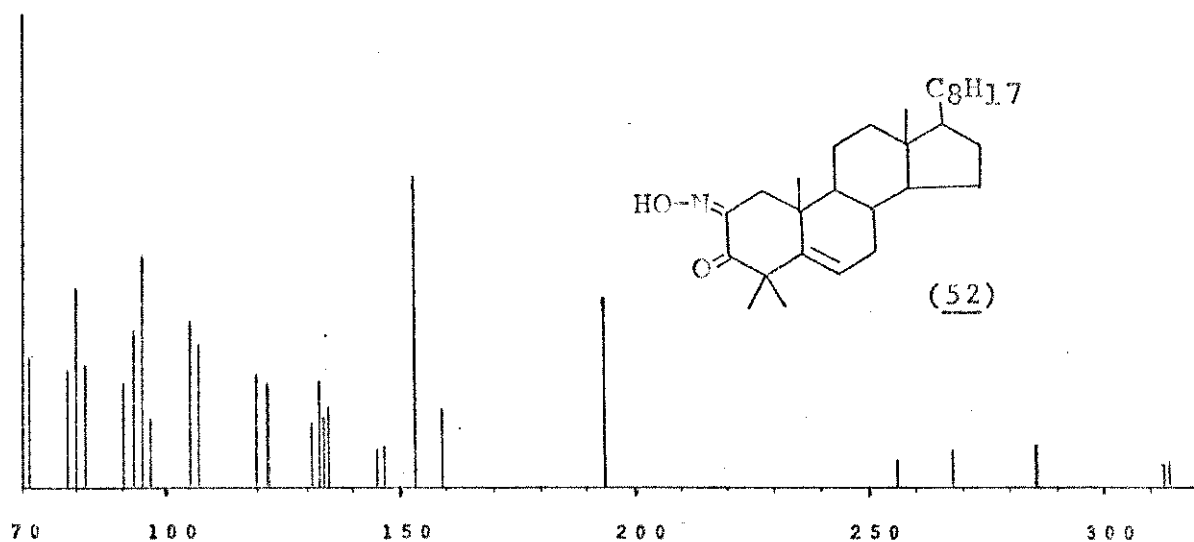


Figura 36. Espectro de massa de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (52).

O espectro de massa de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (52, Figura 36) apresenta um íon molecular em m/e 441 (M^+ , 100%). Este composto também apresenta o íon de m/e 247 bastante característico do colesterol²⁸. Outros principais fragmentos são m/e 426, m/e 424, m/e 413, m/e 410, m/e 398 e m/e 396. A formação destes íons estão elaboradas no esquema 18. A fragmentação do íon molecular se inicia com a perda do grupo hidroxila, confirmada pelo MIKES (Figura 37), que apresenta um pico a 0,961 E_1 correspondente ao íon m/e 424. No MIKES pode-se confirmar também as seguintes fragmentações:

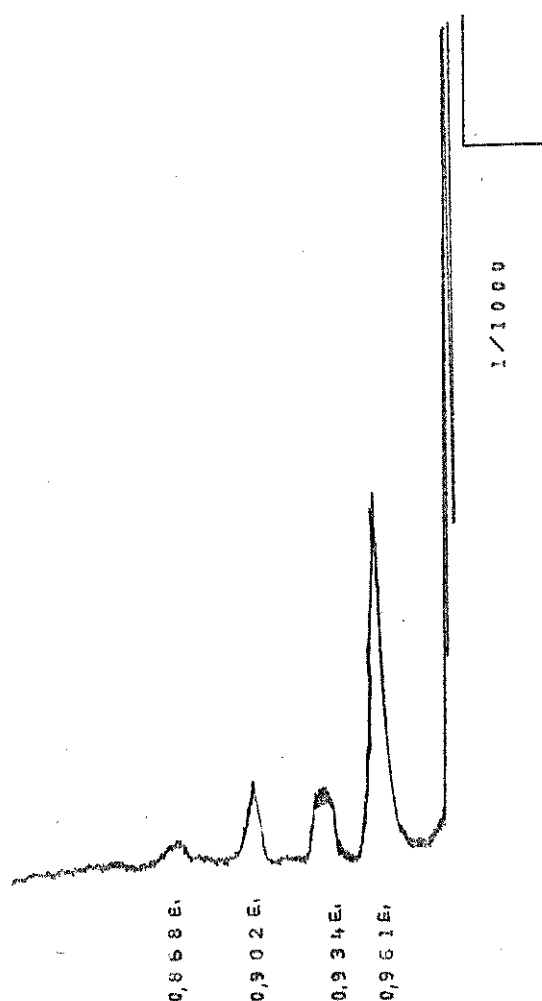
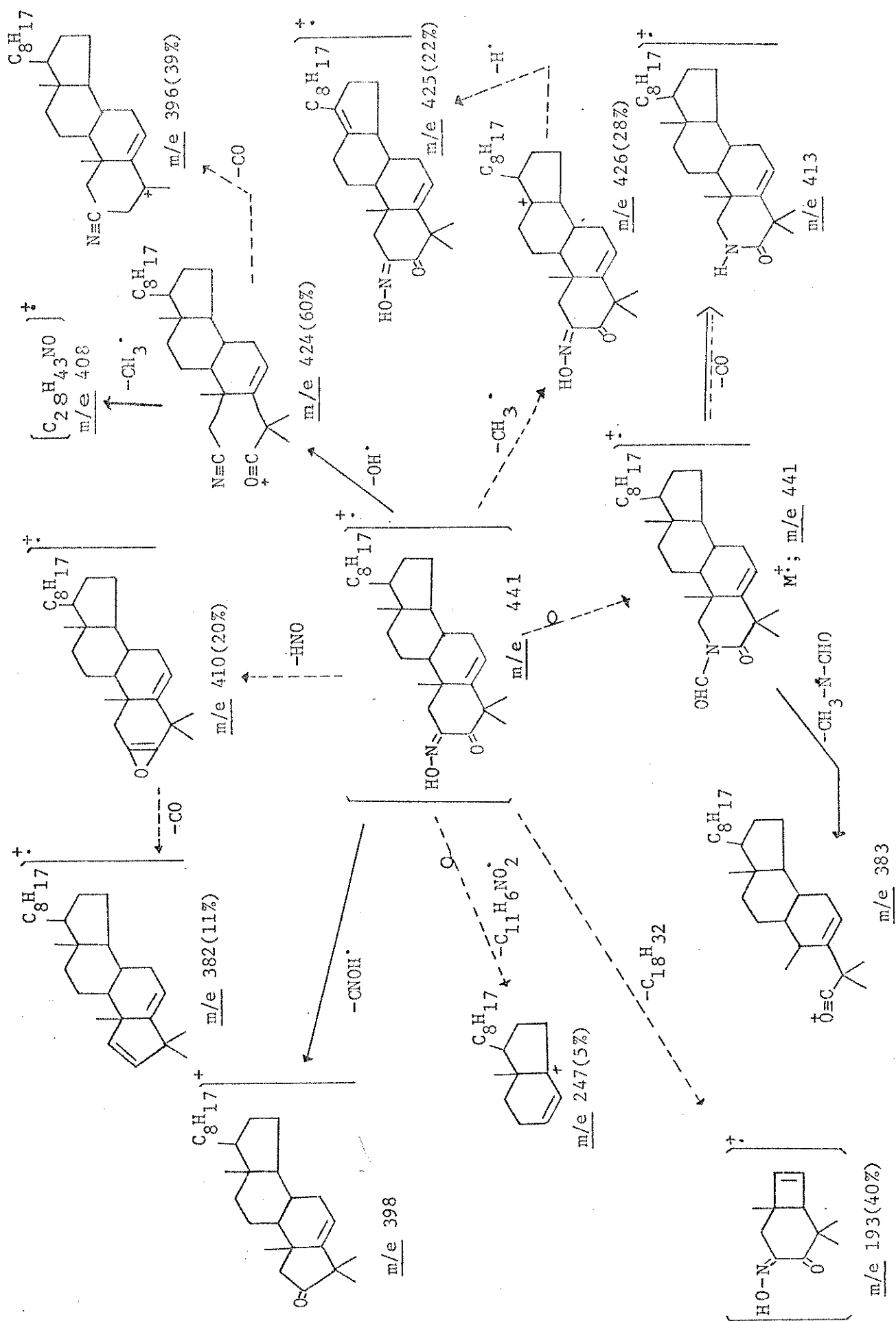


Figura 37. Espectro MIKE do íon m/e 441(M^+) do composto 52.

Esquema 18



$\tilde{\alpha}$ 0,934 E ₁	<u>m/e</u> 441	—————→	<u>m/e</u> 412(413)
$\tilde{\alpha}$ 0,902 E ₁	<u>m/e</u> 441	—————→	<u>m/e</u> 398
$\tilde{\alpha}$ 0,868 E ₁	<u>m/e</u> 441	—————→	<u>m/e</u> 383

Na primeira transição o valor medido indica a perda de 29 unidades de massa porém como o pico é muito largo, torna-se difícil a localização do centro. Baseando-se no espectro de massa de baixa resolução pode-se pensar que o valor corresponda à perda de 28 unidades de massa resultando o íon m/e 413.

A segunda transição corresponde à perda de 43 unidades de massa que pode equivaler à perda dos elementos CNOH devido à clivagem das ligações 1-2 e 2-3. A última transição envolve a perda de 58 unidades de massa que, provavelmente, resulta do íon molecular rearranjado^{43,44}.

A formação do íon de m/e 426 resulta da clivagem de um grupo metila do íon molecular. Esta fragmentação não pode ser confirmada pelo MIKES, no entanto existe um pico metaestável da primeira região livre de campo, então pode-se dizer que pelo menos nessa região ocorre esta fragmentação (ver apêndice).

O íon m/e 424, resultante da perda do radical hidroxila do íon molecular, apresenta um pico no MIKES $\tilde{\alpha}$ 0,961 E₁ que corresponde à perda do grupo metila resultando no íon m/e 408.

Uma outra fragmentação de interesse é a formação do íon m/e 410. Este íon deve-se, provavelmente, à perda de NOH do íon molecular. O íon resultante pode ter uma estrutura idêntica à aquela observada para o íon m/e 410 do composto 51. Examinando-se o MIKES do íon m/e 410, em ambos os compostos, nota-se que os espectros são completamente diferentes. Este é um indício de que as estruturas dos íons m/e 410 dos compostos 51 e 52 devem ser diferentes.

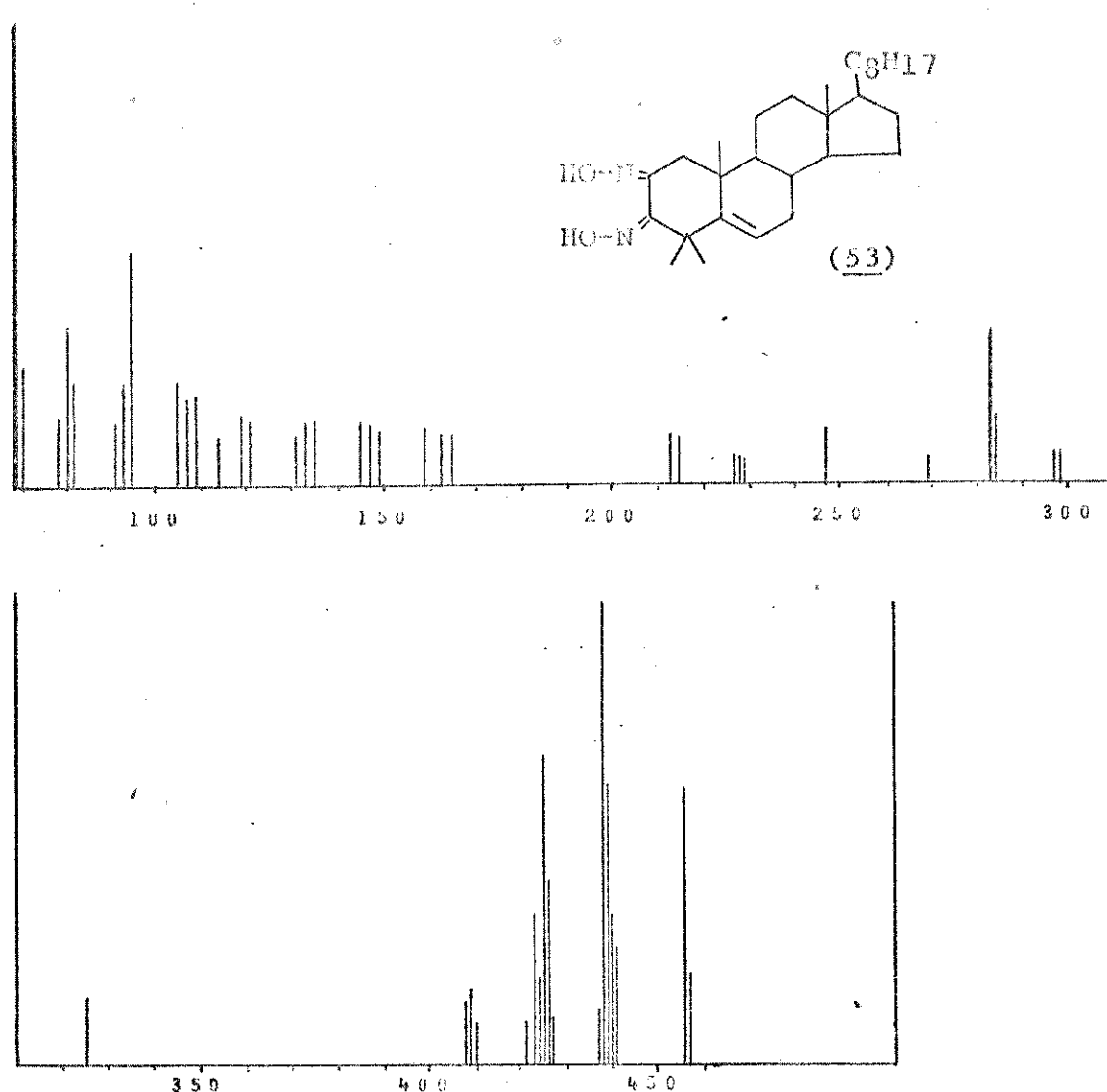
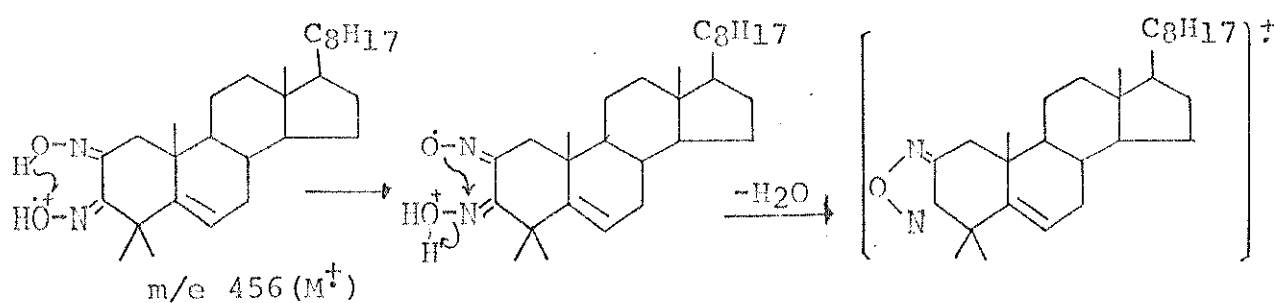


Figura 38. Espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona dioxina (53).

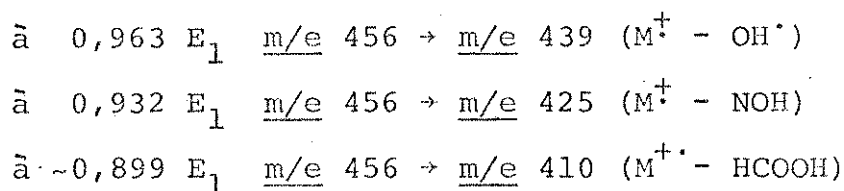
O espectro de massa do 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona dioxina (53, Figura 38) apresenta um íon molecular de m/e 456 (M^+). Os principais íons são m/e 439, m/e 438, m/e 426, m/e 425, m/e 423, m/e 409, m/e 325 e m/e 283. Analogamente ao espectro do colesterol²⁸, o íon m/e 247, também está presente no espectro do composto 53.

Tendo-se em vista o fato de que no composto 52 a perda de OH' do íon molecular é confirmada pelo MIKES, não sendo confirmada a perda de água, decidimos estudar alguns íons do composto 53 mais

detalhadamente. Com isso podemos observar se há a perda de água do composto resultando no íon m/e 438 que corresponde ao pico base no espectro. Este íon, de intensidade muito grande no espectro, possivelmente apresenta uma estrutura bastante estável e ele é formado pela perda de H_2O através do seguinte mecanismo:



No MIKES do íon molecular (Figura 39) podemos confirmar as seguintes fragmentações:

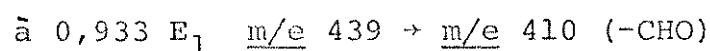


Como podemos observar, não foi encontrada nenhuma evidência da perda da molécula de água do íon molecular. As fragmentações do íon molecular (m/e 456) estão elaboradas no Esquema 19.^{43,44}

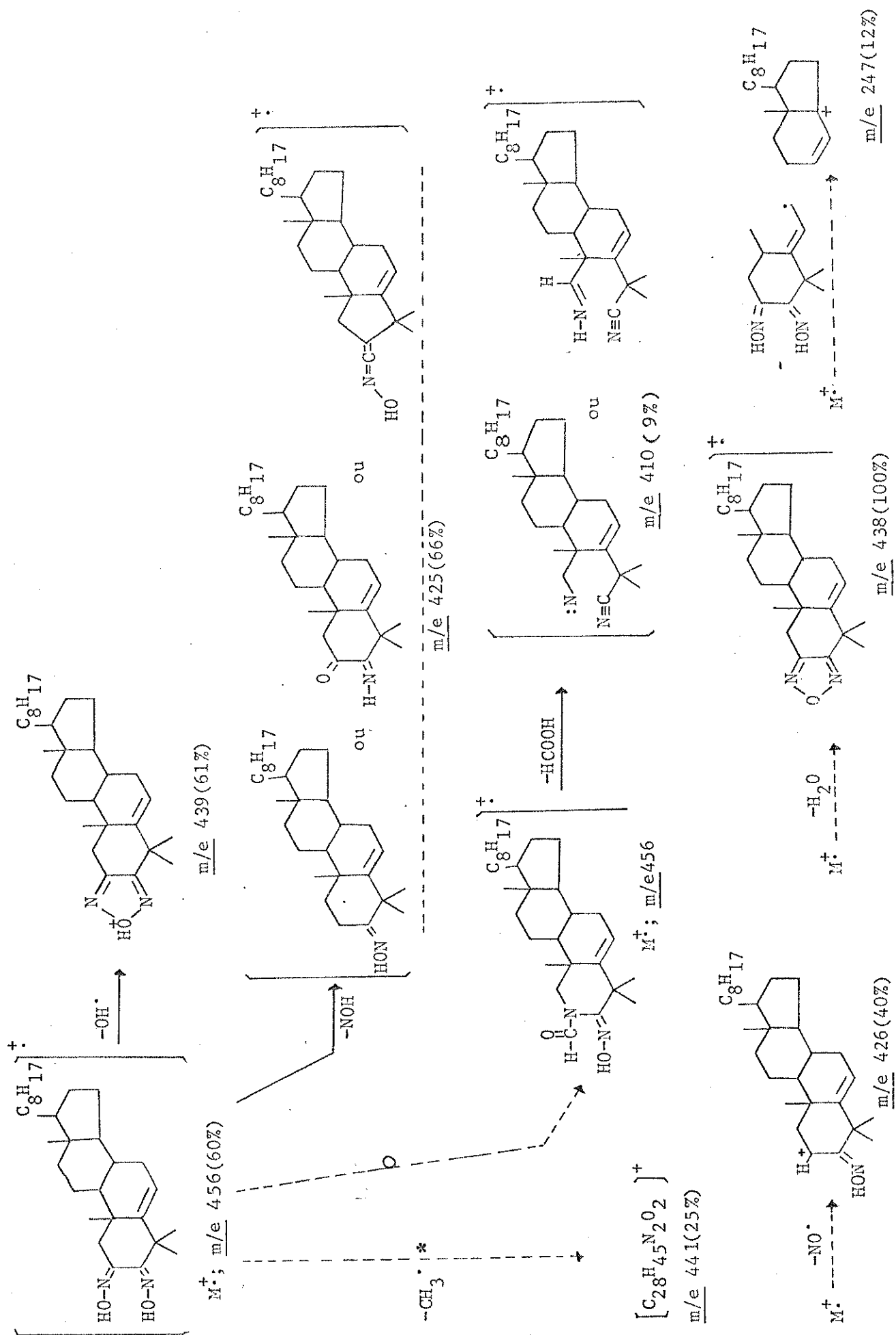
O MIKES do íon fragmento m/e 439 ($M-OH$)⁺ (Figura 40) apresenta um pico correspondente:



O pico observado é largo. Provavelmente, é o resultado da superposição de dois picos, porém a transição medida é devido à perda de $OH^\bullet$ e a outra transição pode ser devido à perda de $CH_3^\bullet$. Além desta transição, podemos confirmar as seguintes fragmentações:



Esquema 19



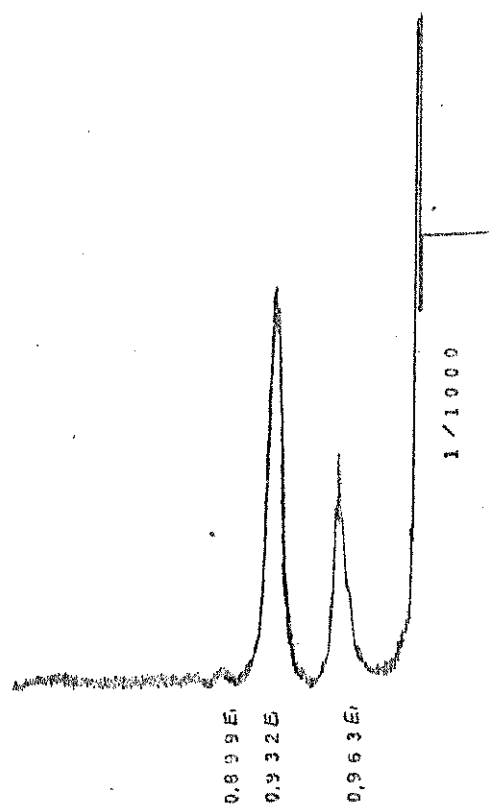


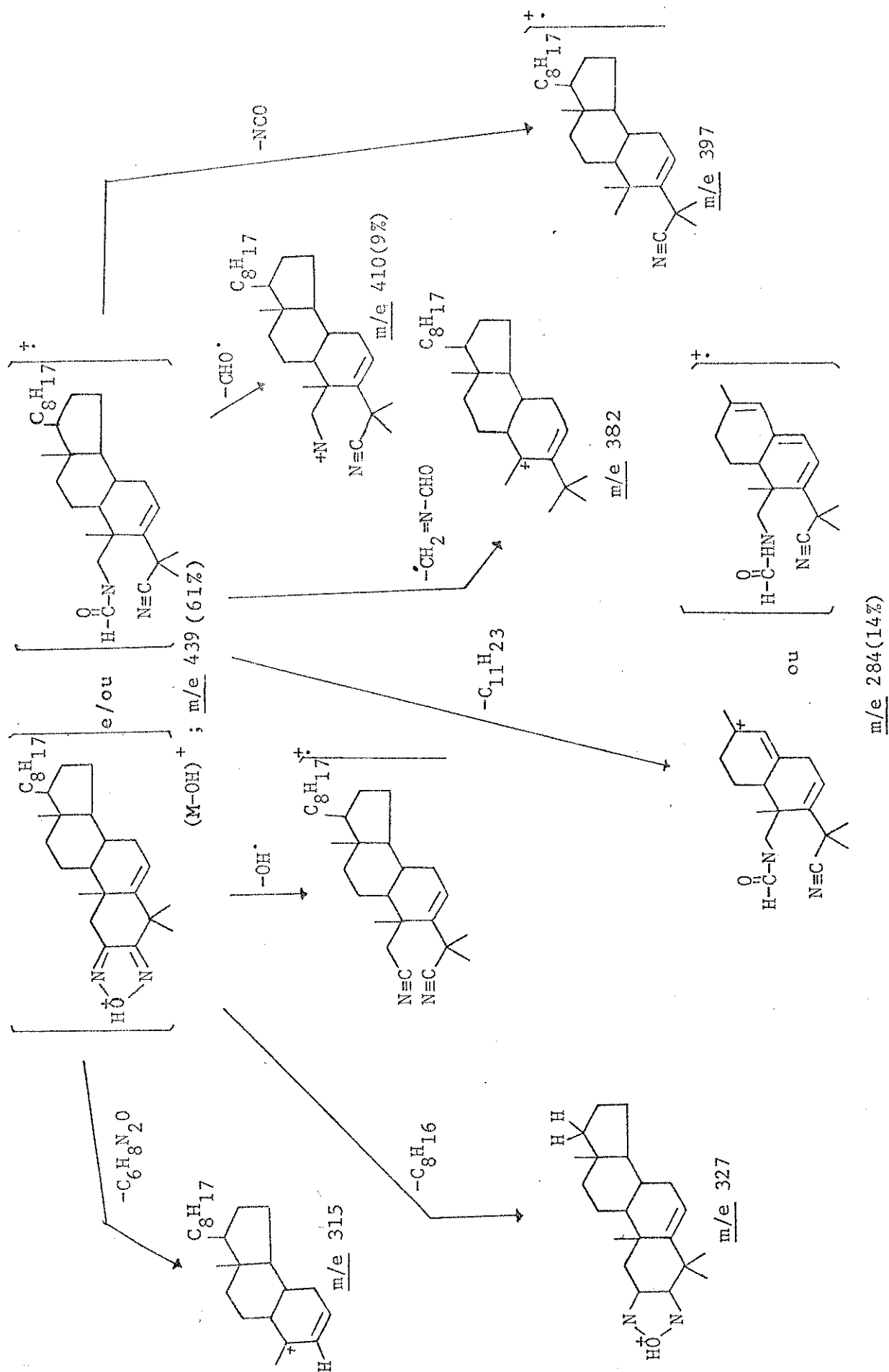
Figura 39. Espectro MIKE do íon M^+ (m/e 456) do composto 53.

- à 0,950 E_1 m/e 439 → m/e 397 ($-CNO$)
- à 0,871 E_1 m/e 439 → m/e 382 ($-CH_2=N-CHO$)
- à 0,746 E_1 m/e 439 → m/e 327 ($-C_8H_{16}$)
- à 0,718 E_1 m/e 439 → m/e 315 ($-C_6H_8N_2O$)
- à 0,647 E_1 m/e 439 → m/e 284 ($-C_8H_{17}, -C_3H_6$)

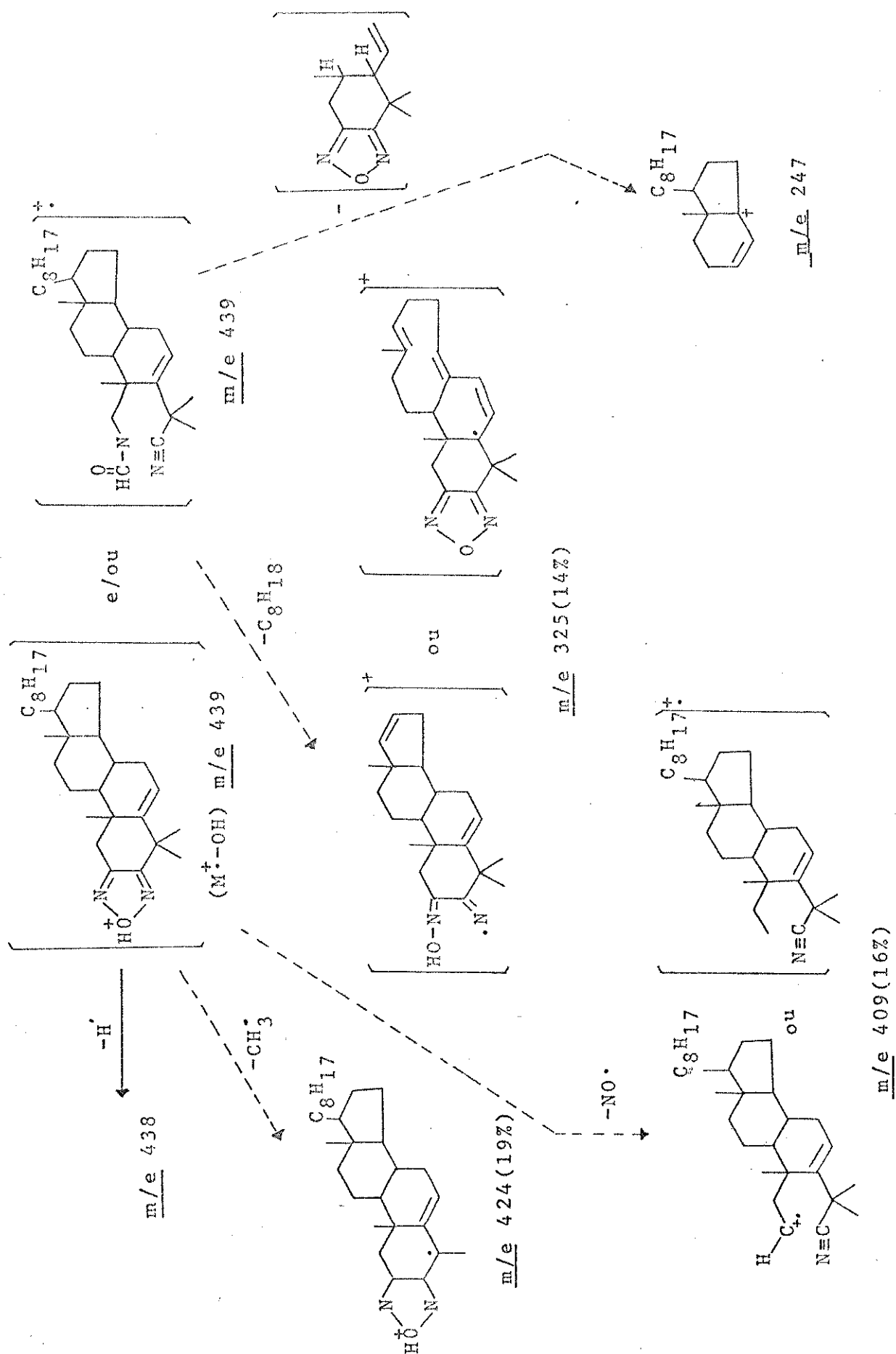
A formação dos íons se encontra no Esquema 20. O Esquema 21 mostra outras prováveis fragmentações do íon m/e 439 que não a parecem no MIKE.

O pico base do espectro de massa é o íon m/e 438. Provavelmente, ele se origina da perda de um átomo de hidrogênio do

Esquema 20



Esquema 21



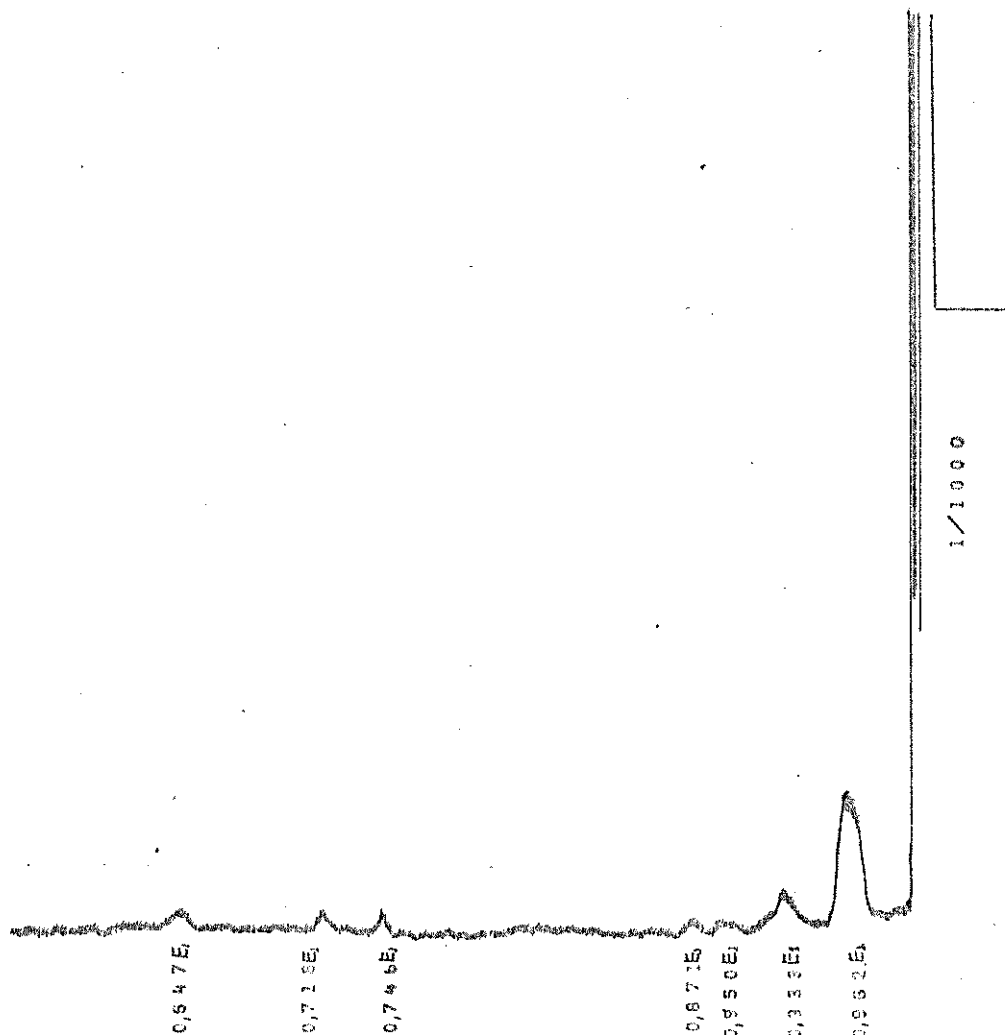
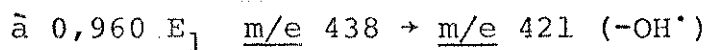
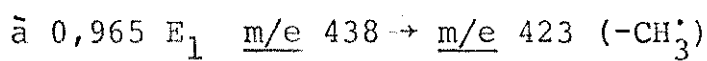


Figura 40. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 439, do composto 53.

íon m/e 439. No MIKES do íon m/e 438 (Figura 41) observa-se um pico largo, que provavelmente é uma superposição de dois picos correspondendo:



Outras transições observadas para o íon m/e 438 são:

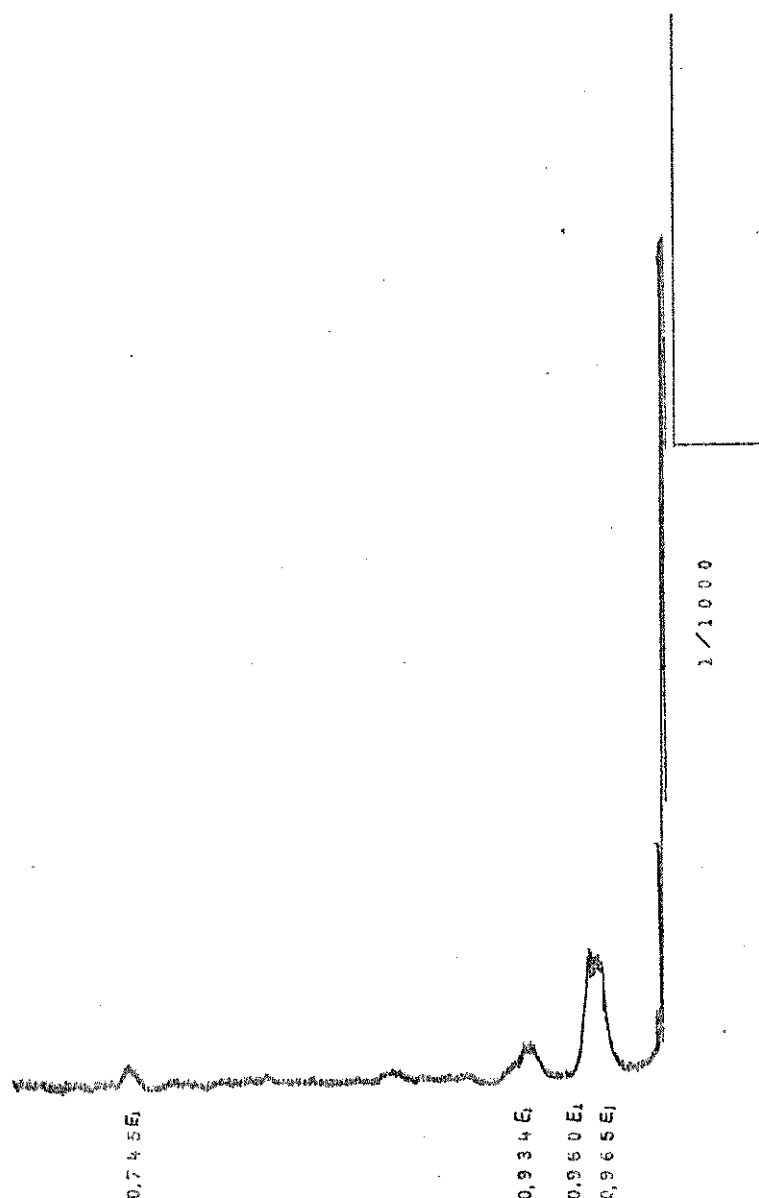


Figura 41. Espectro MIKE do Íon fragmento m/e 438 do composto 53.

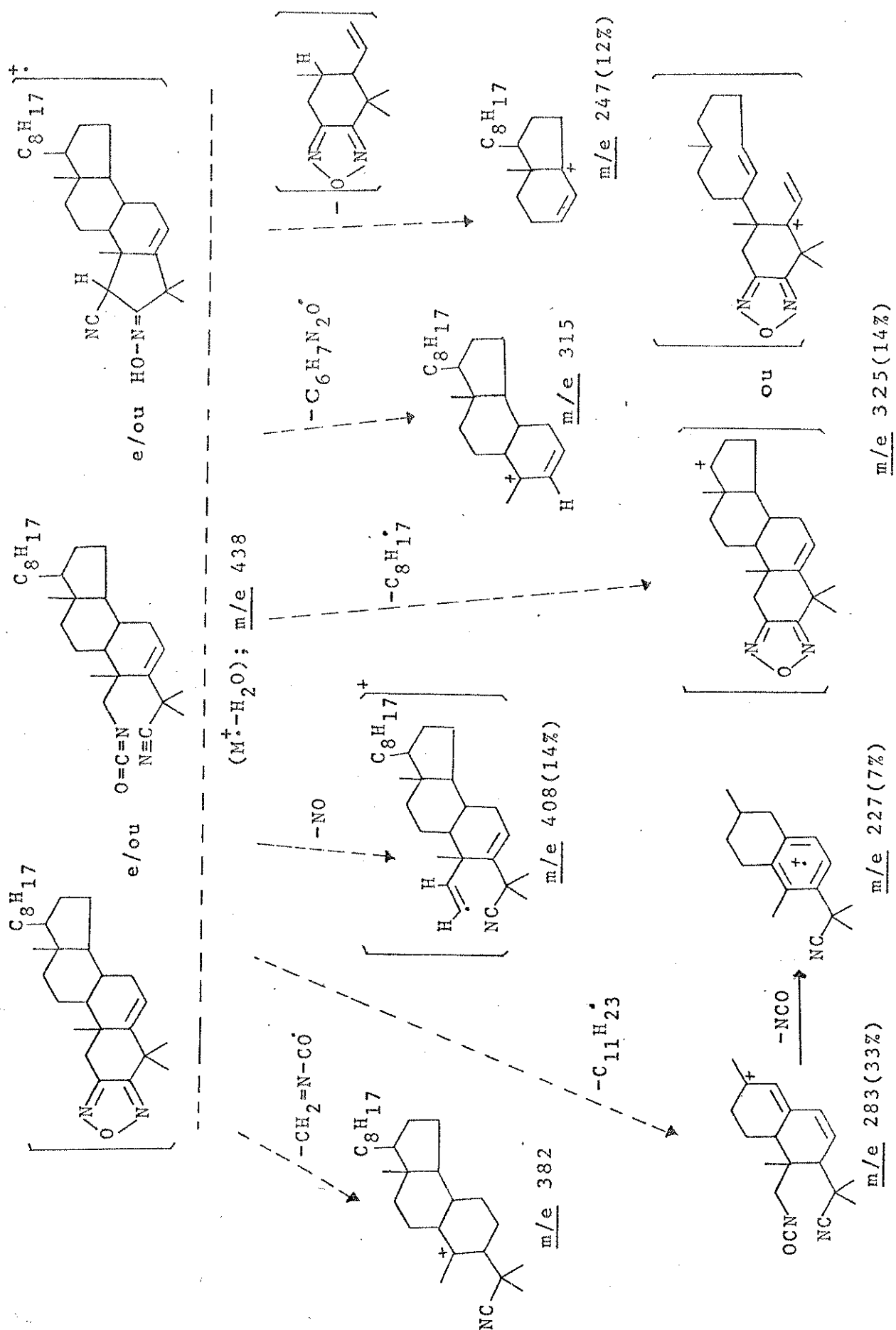
$\tilde{\alpha}$ 0,934 E_1 m/e 438 $\rightarrow$ m/e 409 (-CHO)

$\tilde{\alpha}$ 0,745 E_1 m/e 438 $\rightarrow$ m/e 326 ($-C_8H_{16}$)

A formação dos íons referidos se encontra no Esquema 22. No Esquema 23 estão propostas outras fragmentações baseadas apenas no espectro de massa.

No MIKES do íon fragmento m/e 425 (Figura 42) pode-se con-

Esquema 23



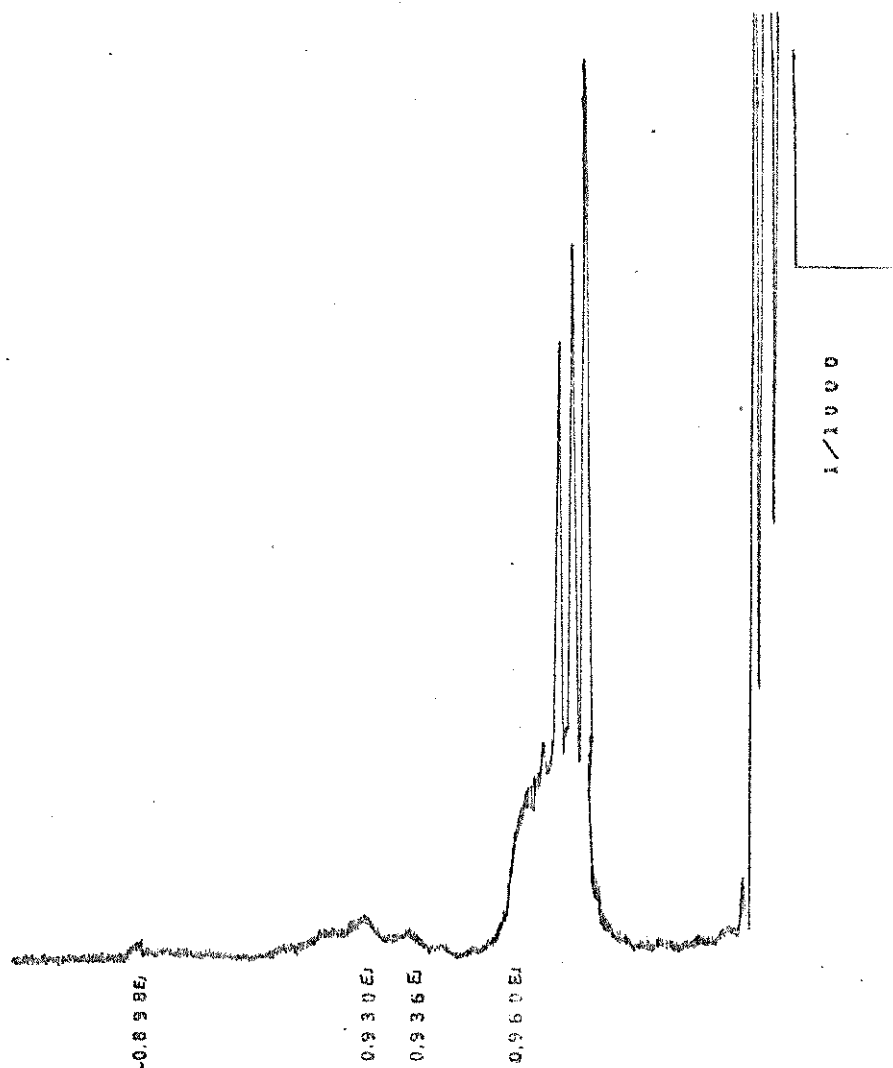


Figura 42. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 425 (M^+-NOH) do composto 53.

firmar várias fragmentações:

- à 0,960 E_1 m/e 425 $\rightarrow$ m/e 408 ($-OH^+$)
- à 0,936 E_1 m/e 425 $\rightarrow$ m/e 398 ($-HCN$)
- à 0,930 E_1 m/e 425 $\rightarrow$ m/e 395 ($-NO$)
- à 0,898 E_1 m/e 425 $\rightarrow$ m/e 382 (-43)

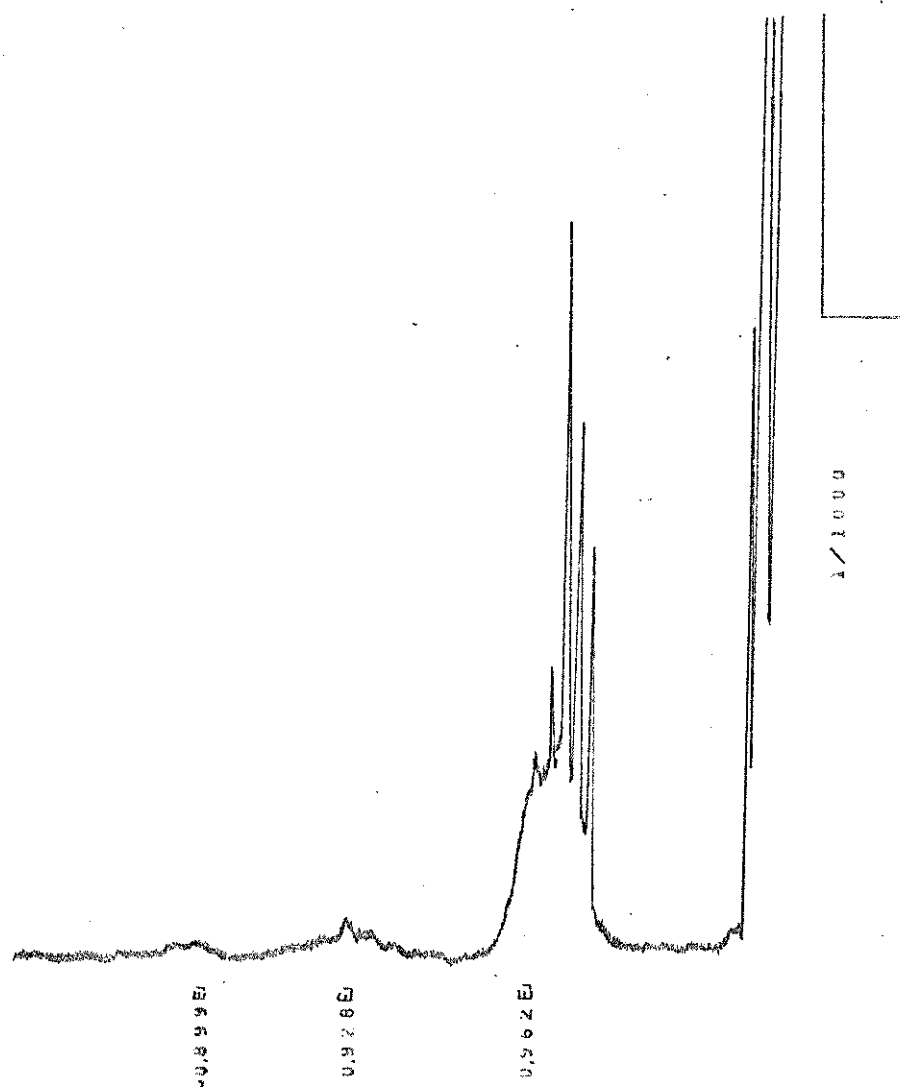
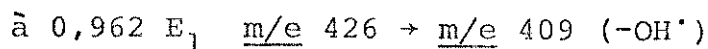


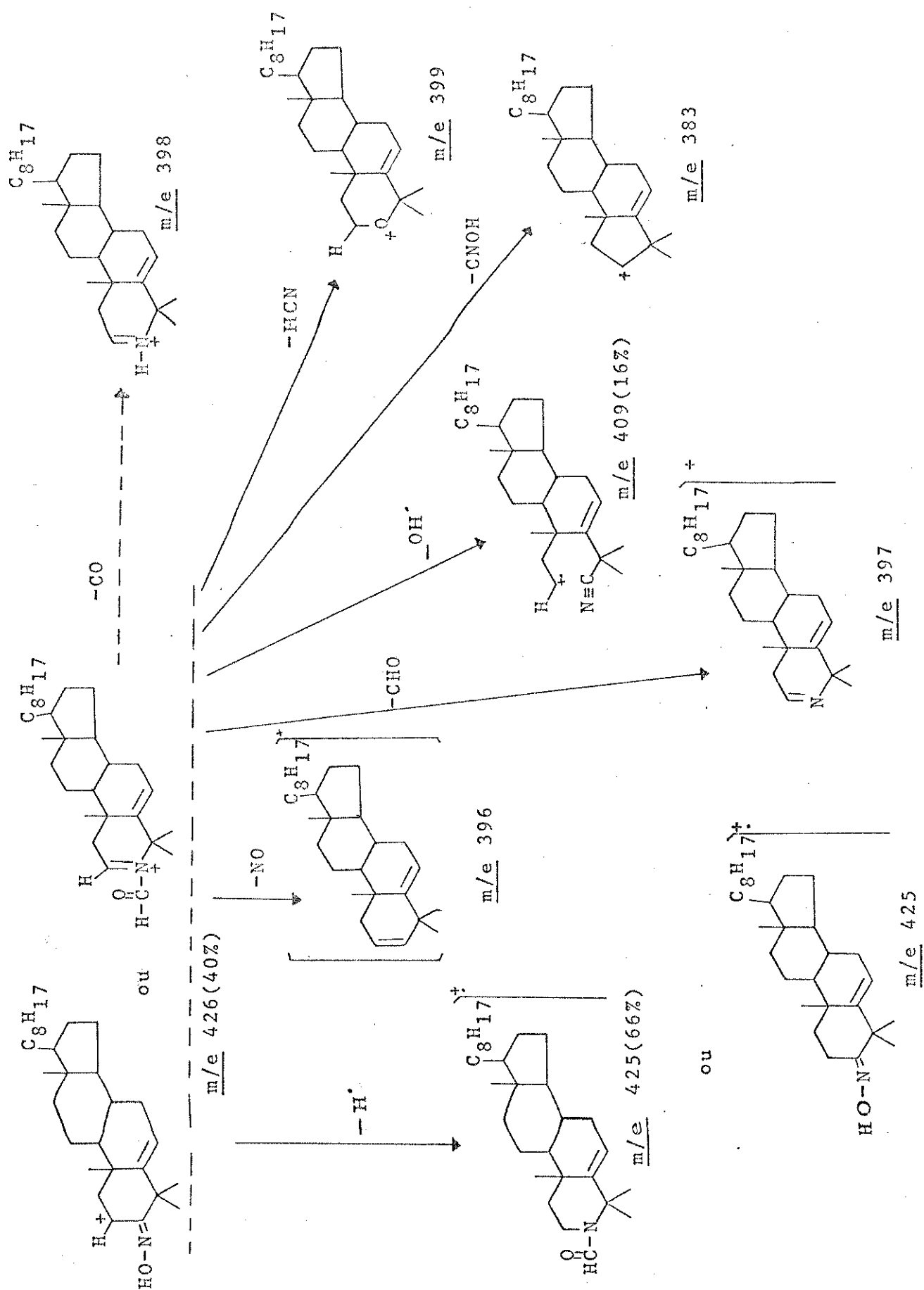
Figura 43. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 426 (M^+-NO^+) do composto 53.

Os picos agudos no MIKES são devido às transições na primeira região livre de campo (Apêndice). A formação destes íons se encontra no Esquema 24.

O MIKES do íon fragmento m/e 426 (Figura 43) é muito parecido com o de m/e 425. É provável que este último íon se forme com a perda de um átomo de hidrogênio do íon m/e 426. Assim, as fragmentações são semelhantes podendo-se observar as seguintes transições:



Esquema 24



$\tilde{\alpha} \ 0,928 \ E_1 \ \underline{m/e} \ 426 \rightarrow \underline{m/e} \ 396 \ (-NO)$

$\tilde{\alpha} \ 0,899 \ E_1 \ \underline{m/e} \ 426 \rightarrow \underline{m/e} \ 383 \ (-43)$

A formação destes íons se encontra no Esquema 24.

Parte Experimental

A. Informações Gerais

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento, segundo Kofler, instalada em um microscópio modelo Thermopan (C. Reichert Optische Werke A.G.) e o aparelho Metler FP5 acoplado ao FP52, e não sofreram correções.

Para obter os espectros de massa e de MIKE, empregou-se um espectrômetro MAT 311A cuja voltagem de aceleração é de 3 KV. O aparelho foi operado a 70 eV. Os compostos foram introduzidos via uma sonda de inserção direta, a temperaturas mínimas, para evitar a decomposição térmica. Para obter os espectros de MIKE, utilizou-se um voltímetro digital para medir a voltagem E_1 dos íons precursores e as voltagens E_2 dos íons fragmentos. Estes espectros foram obtidos da seguinte maneira: varreu-se automaticamente a voltagem E de 2V/seg para se obter a forma do espectro. Em seguida varreu-se manualmente a voltagem E para medir E_2 para cada pico, com precisão. Usando-se a relação:

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

calculou-se a razão m/e do íon produto.

Os espectros de absorção no infravermelho foram feitos em pastilhas de KBr contendo 1% da amostra. Utilizou-se o instrumento Perkin-Elmer modelo 337.

Os espectros de absorção no ultravioleta foram feitos em etanol, utilizando-se um instrumento Zeiss modelo DMR 21.

As rotações ópticas foram obtidas em um polarímetro fotométrico (precisão $0,005^\circ$) da Carl Zeiss, usando-se clorofórmio e etanol como solventes.

Para cromatografia líquida em coluna empregou-se síli-

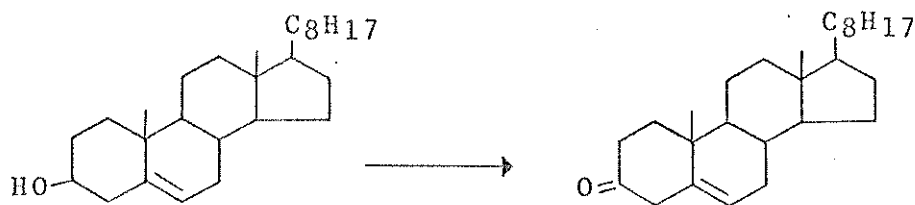
ca gel (0,05-0,20 mm) e alúmina neutra. Para cromatografia em camada delgada utilizou-se sílica gel tipo G ou fluorescente PF₂₅₄ da Merck A.G. e alúmina neutra para cromatografia em camada delgada. As placas foram reveladas com lâmpada ultravioleta (254 nm) e com o vapor de iôdo ressublimado.

Foram utilizados solventes e reagentes analiticamente puros das marcas Carlo Erba, Fischer, Eastman e Aldrich. Quando necessários, os solventes foram purificados.

As análises elementares foram realizadas no Centro de Pesquisas da Rhodia-Paulínia, utilizando-se o analisador elementar da Perkin-Elmer modelo 240.

B. Preparação dos compostos

1. Preparação do Δ^5 -colestene-3-ona (48)^{47,48}



O composto foi obtido em três etapas:

1.a) Preparação do dibrometo de colesterol. Foram dissolvidos 150 g (0,388 moles) de colesterol comercial em 1000 ml de éter etílico absoluto, por breve ebulição. Em seguida uma solução de 5 g (0,061 moles) de acetato de sódio anidro e 68 g (0,851 moles) de bromo em 600 ml de ácido acético foi adicionada, por meio de um funil de separação, à solução esterólica. A mistura foi esfriada num banho de gelo. O precipitado foi coletado no funil de

Buchner e lavado com ácido acético (500 ml) até que o filtrado ficasse incolor.

1.b) Preparação de 5 α ,6 β -dibromocolestan-3-ona. O dibrometo ainda úmido, obtido em 1.a), ficou suspenso em 2l de ácido acético à temperatura ambiente, num balão equipado com agitador mecânico.

Uma outra solução de 80 g (0,242 moles) de dicromato de sódio diidratado em 2 litros de ácido acético, pré-aquecida a 90°, foi adicionada à mistura em agitação (a 25°), por meio de um funil de separação. A temperatura da mistura alcançou 55-58° durante a oxidação e todo o sólido dissolveu-se em 3 a 5 minutos. O balão foi acondicionado num banho de gelo para que o composto se cristalizasse. Após este período adicionou-se 400 ml de água gelada. O cristal foi coletado num funil de Buchner e lavado com metanol até que o filtrado ficasse totalmente incolor.

1.c) Preparação do Δ^5 -coleston-3-ona. Dibromocolestanona ainda úmido de metanol, obtido em 1.b), ficou suspenso em 2000 ml de éter etílico. Com o balão acondicionado num banho de gelo, adicionou-se 25 ml de ácido acético e a mistura foi agitada mecanicamente até que a temperatura atingisse aproximadamente 15°. Removeu-se o banho de gelo e 5 g de zinco em pó foi adicionado com agitação constante. Logo que se iniciou a reação exotérmica de dehalogenação a temperatura foi controlada entre 15-20°, por meio de esfriamento, durante a adição de mais 35 g (total de 0,616 atgs) de zinco em pó. Após este período, removeu-se o banho de gelo e com agitação constante adicionou-se 40 ml de piridina, formando-se assim um precipitado branco.

O precipitado foi coletado num funil de Buchner e lavado com éter etílico. Extraiu-se o filtrado (incolor) com 600 ml

de água destilada, num funil de separação, e foi lavado com 5% de solução aquosa de bicarbonato de sódio (para remover traços de ácido acético). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e concentrada até a metade do seu volume. Adicionou-se metanol e a evaporação foi prosseguida até atingir um volume de 3/4 do total. A solução ficou à temperatura ambiente e resultou um produto cristalino transparente.

Rendimento: 51 g (0,133 moles, 34% do colesterol comercial).

Ponto de fusão: 120-125°

$[\alpha]_D^{25}$ (CHCl₃): -2,6° (c:1,0)

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (Figura 44): 2940, 2850, 1715, 1470, 1375, 1240 e 1140 cm⁻¹.

m/e 384 (M⁺) (Figura 30)..

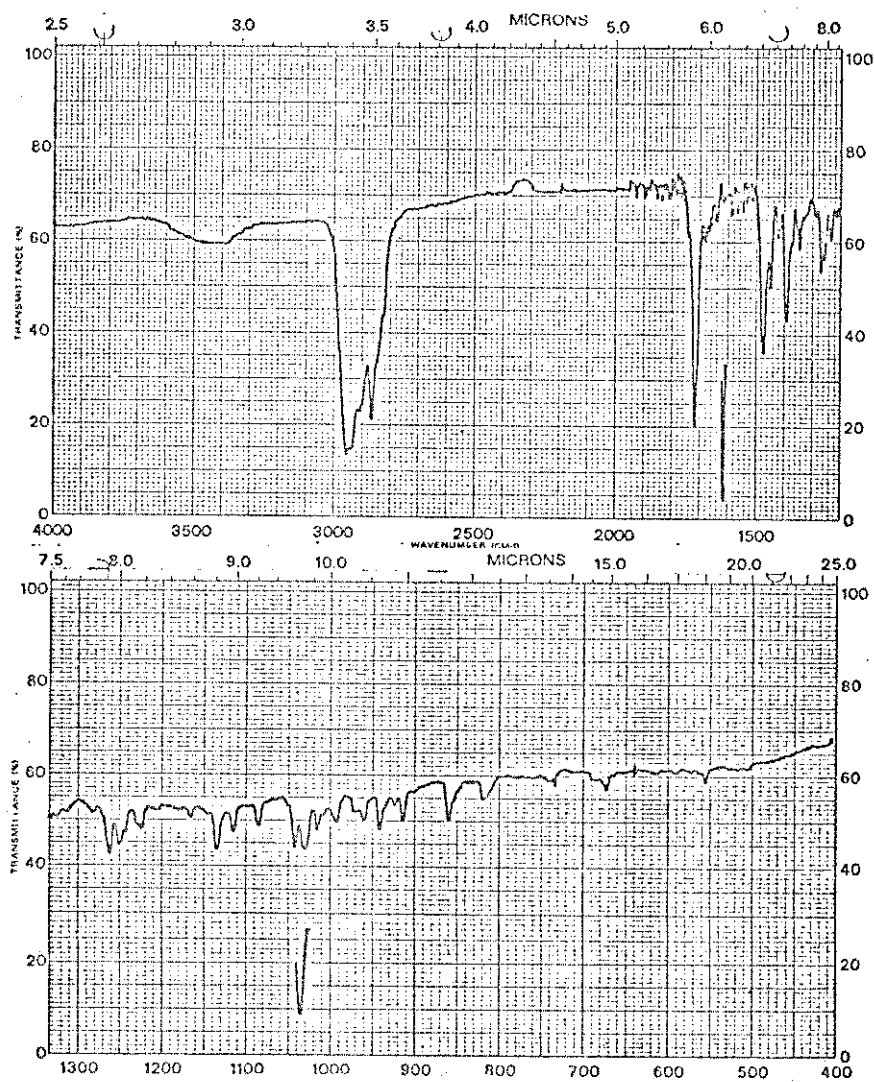
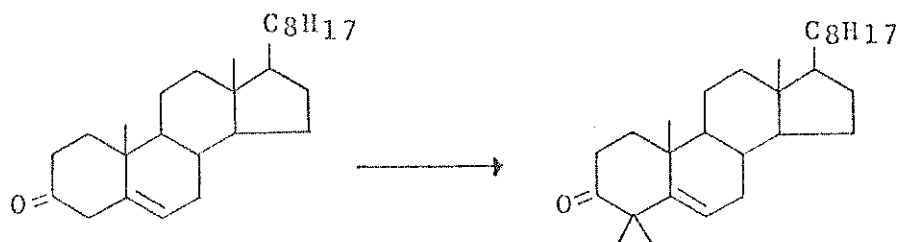
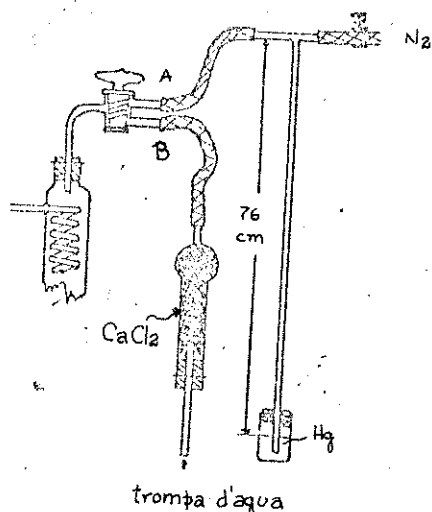


Figura 44. Espectro no I.V. do composto 48

2. preparação do 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (49)^{49,50}



2.a) Preparação do t-butóxido de potássio⁵¹



Preparou-se a aparelhagem apresentada acima. Adaptou-se um balão de 3 bocas ao condensador de refluxo (tipo serpentina) e o topo do condensador à uma torneira de três saídas que conduz, por meio de A para um cilindro de nitrogênio com uma válvula de controle fino e dispositivo contendo mercúrio, e por meio de B para uma trompa d'água. Secou-se completamente o balão e o condensador, aquecendo-se com um secador de cabelo, enquanto o sistema estava a pressão reduzida (a torneira aberta na posição B estava ligada com a trompa d'água). Permitiu-se a entrada de nitrogênio seco na aparelhagem, com a torneira aberta na posição A (passando pelo "trap" de segurança).

No balão, rapidamente esfriado, colocou-se 100 ml (0,941 moles) de álcool t-butilico anidro e 2 g (0,051 atgs) de potássio metálico e adaptou-se novamente na aparelhagem. Interrompeu-se a corrente de nitrogênio e a mistura foi refluxada até que

o potássio dissolvesse completamente. O hidrogênio liberado passou-se através do dispositivo de mercúrio.

Esfriou-se a solução à temperatura ambiente, permitindo-se a entrada de nitrogênio para igualar a pressão.

2.b) Preparação do 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona.

Em um balão equipado com condensador, tratou-se 11,5 gramas (0,030 moles) de colestenona (preparada em 1.c) com 430 ml de álcool t-butilico até o refluxo. A solução foi esfriada à temperatura ambiente e vertida sobre a base preparada em 2.a). Continuou-se o refluxo por mais meia hora.

Esfriou-se a solução até aproximadamente 40°C, e então adicionou-se 2,5 ml (0,037 moles) de iodeto de metila, de uma só vez, e a solução foi refluxada sob atmosfera de nitrogênio por mais uma hora.

A mistura foi esfriada e colocada no banho de gelo e em seguida foi acidificada com HCl concentrado, até pH=5. Adicionou-se um pouco de água destilada para quebrar a turbidez da solução e o álcool t-butilico foi evaporado a pressão reduzida, num evaporador rotativo. A fase orgânica foi extraída com benzeno e o extrato foi lavado, várias vezes, com água destilada. Evaporou-se o benzeno e o composto foi cristalizado em clorofórmio-etanol.

Rendimento: 6,2 g (0,015 moles, 50%).

Ponto de fusão: 175-177°C

$[\alpha]_D^{25}(\text{CHCl}_3): +1^\circ$ (c:1,0)

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (Figura 45): 3000-2850, 1705, 1460 e 1380 cm^{-1}

m/e 412 (M^+) (Figura 31).

Análise elementar: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

Encontrado: %C=84,35	%H=11,68	%O=3,60
----------------------	----------	---------

Calculado : %C=84,40	%H=11,7)	%O=3,87
----------------------	----------	---------

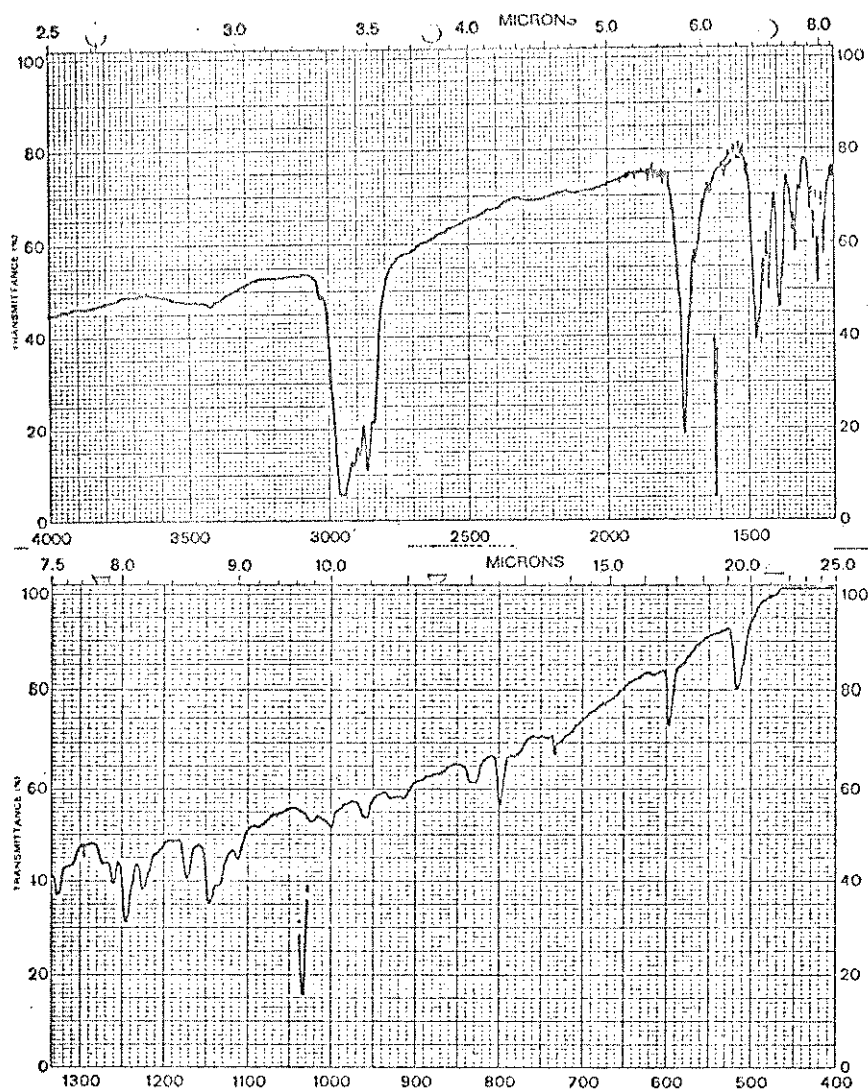
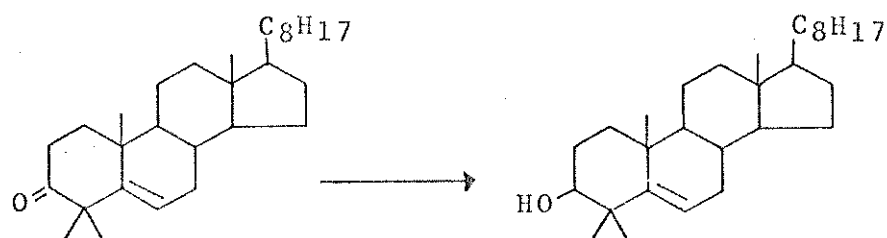


Figura 45. Espectro m I.V. do composto 49.

3. Preparação de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol.^{(50)²}



Num balão equipado com condensador de refluxo, tratou-se 100 mg (0,242 mmoles) de 4,4,-dimetilcolest-5-en-3-ona com 10 ml de metanol e adicionou-se, bem lentamente, 300 mg (7,89mmoles) de borohidreto de sódio (com agitação constante). A solução foi aquecida até um pouco menos que o ponto de ebulição do sol -

vente. Segui-se o curso da reação através de placa analítica. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo e adicionou-se 10 ml de água gelada. Em seguida, adicionou-se ácido acético, gota a gota para destruir o excesso de borohidreto de sódio.

O composto (branco) foi coletado num funil de Buchner e lavado com água, várias vezes. O produto foi purificado através de uma coluna cromatográfica líquida, utilizando-se o benzeno como solvente. Obteve-se 45 mg de um cristal transparente puro.

Rendimento: 45 mg (0,109 mmoles, 45%).

Ponto de fusão: 144,0-146,0°

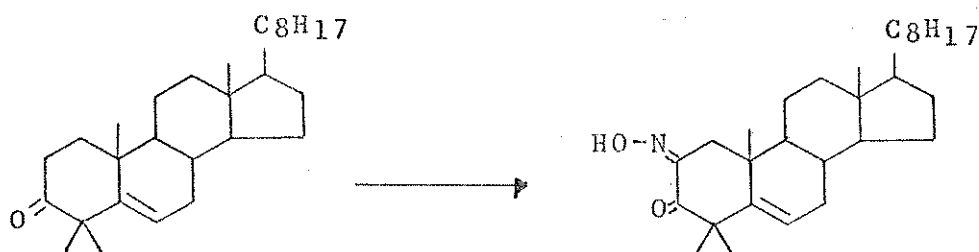
m/e 414 (M^+) (Figura 32).

Análise elementar: $C_{29}H_{50}O$

Encontrado: %C= 84,00 %H=12,18 %O=3,82

Calculado : %C=83,99 %H=12,15 %O=3,86

4. Preparação de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona.(52)⁵³



4.a) Preparação do nitrito de n-butila ($n\text{-BuNO}_2$)⁵⁴.

No balão equipado com agitador mecânico, funil de separação de haste longa e um termômetro, foram colocados 38 g de nitrito de sódio (0,542 moles) e 150 ml de água destilada. O balão foi acondicionado num banho de gelo e a solução foi agitada até atingir uma temperatura de 0°.

Uma mistura de 10 ml de água destilada, 13,6 ml (0,25 moles) de H_2SO_4 concentrado e 45,7 ml (0,5 moles) de n-butanol foi esfriada até 0°. Esta mistura foi adicionada lentamente, através do funil de separação com a haste que ficasse por baixo da superfície da solução de nitrito em agitação, para evitar a

formação do gas. A temperatura sempre foi mantida em torno de 0-1°, num período de aproximadamente 2 horas.

A mistura resultante foi acondicionada num banho de gelo até que se separasse em camadas. A fase líquida foi decantada para um funil de separação e a fase aquosa (a mais densa) foi removida. A camada de nitrito de butila foi lavada com solução de 2 g de bicarbonato de sódio e 25 g de NaCl em 100 ml de água. Secou-se a solução sobre sulfato de sódio anidro, em seguida foi filtrada e guardada no congelador.

4.b) Preparação do 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona.

Com 1,0 g (0,026 atgs) de potássio metálico e 30 ml (0,318 moles) de t-butanol, preparou-se o t-butóxido de potássio. Esfriou-se a solução a temperatura ambiente, e adicionou-se 1,0 g (0,0024 moles) de cetona (4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona). A solução foi refluxada por 90 minutos.

Esfriou-se a solução à temperatura ambiente e com agitação constante adicionou-se 1,0 ml de n-BuNO₂, obtido em 4.a), gota a gota. Deixou-se em agitação durante uma noite. Após este período, o precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico. Uma solução aquosa deste sal foi acidificada, com o frasco acondicionado num banho de gelo, e o precipitado foi coletado num funil de Buchner. Diluindo-se com água destilada e acidificando o filtrado, obteve-se mais deste composto. O composto impuro foi cristalizado e recristalizado em etanol-água, dando cristais transparentes, bem finos e brilhantes.

Rendimento: 658,3 mg (1,49 mmoles, 62%).

Ponto de fusão: 205,5-207,9°

$[\alpha]_D^{25}$ (EtOH): +72,5° (c:1,0)

EtOH(neutro)

$\lambda_{\max}$: 234,0 nm

(Figura 28).

$\lambda_{\max}$ EtOH(básico): 290,4 nm

$\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (Figura 46): 3250, 1705, 1610, 960 e 940 cm⁻¹.

m/e 441 (M⁺) (Figura 36)

Análise elementar: C₂₉H₄₇O₂N

Encontrado: %C=78,47 %H=10,98 %N=2,97 %O=7,58

Calculado : %C=78,85 %H=10,72 %N=3,17 %O=7,24

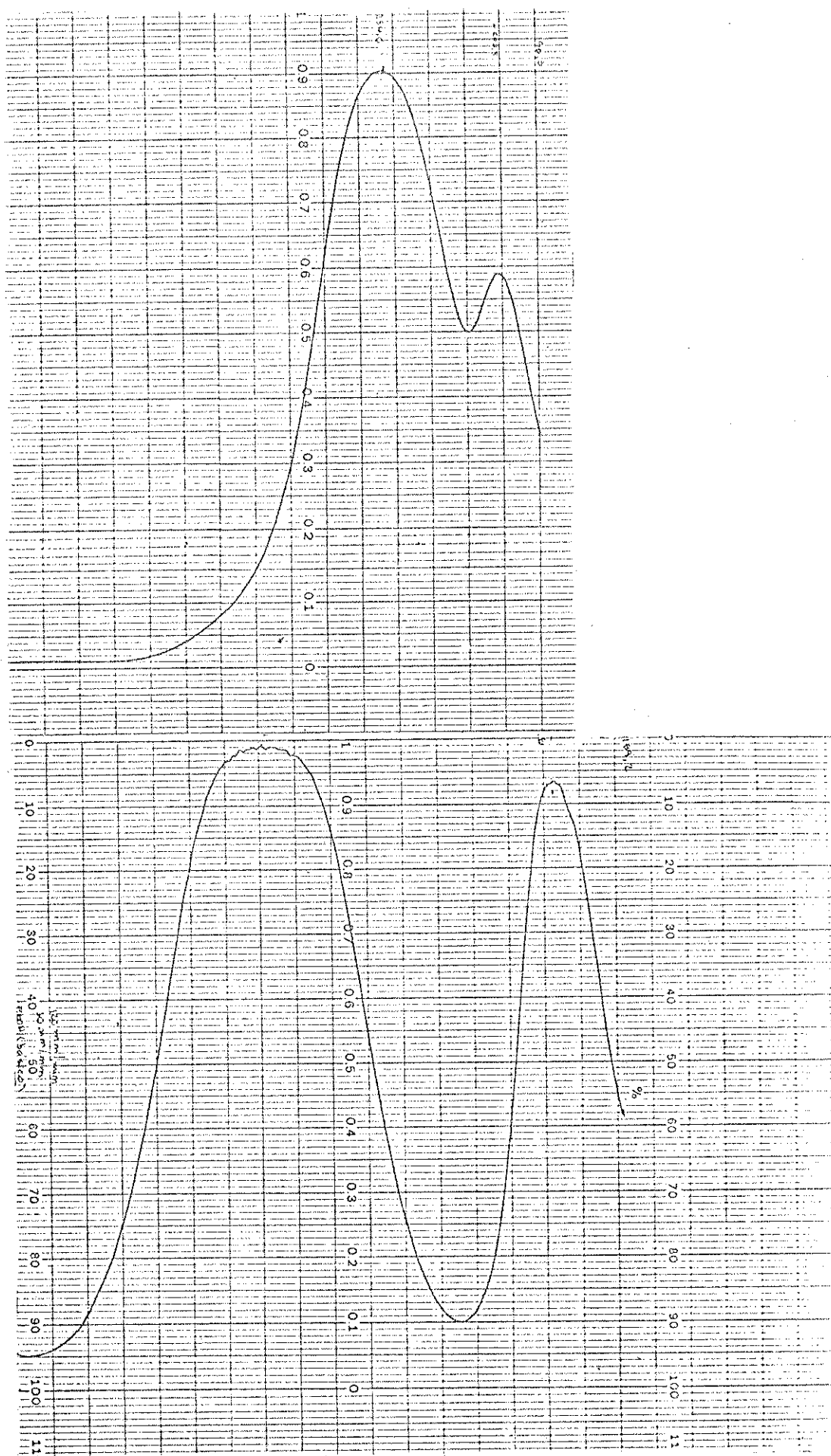


Figura 28. Espectro no U.V. do composto 52 (EtOH neutro e EtOH básico, respectivamente).

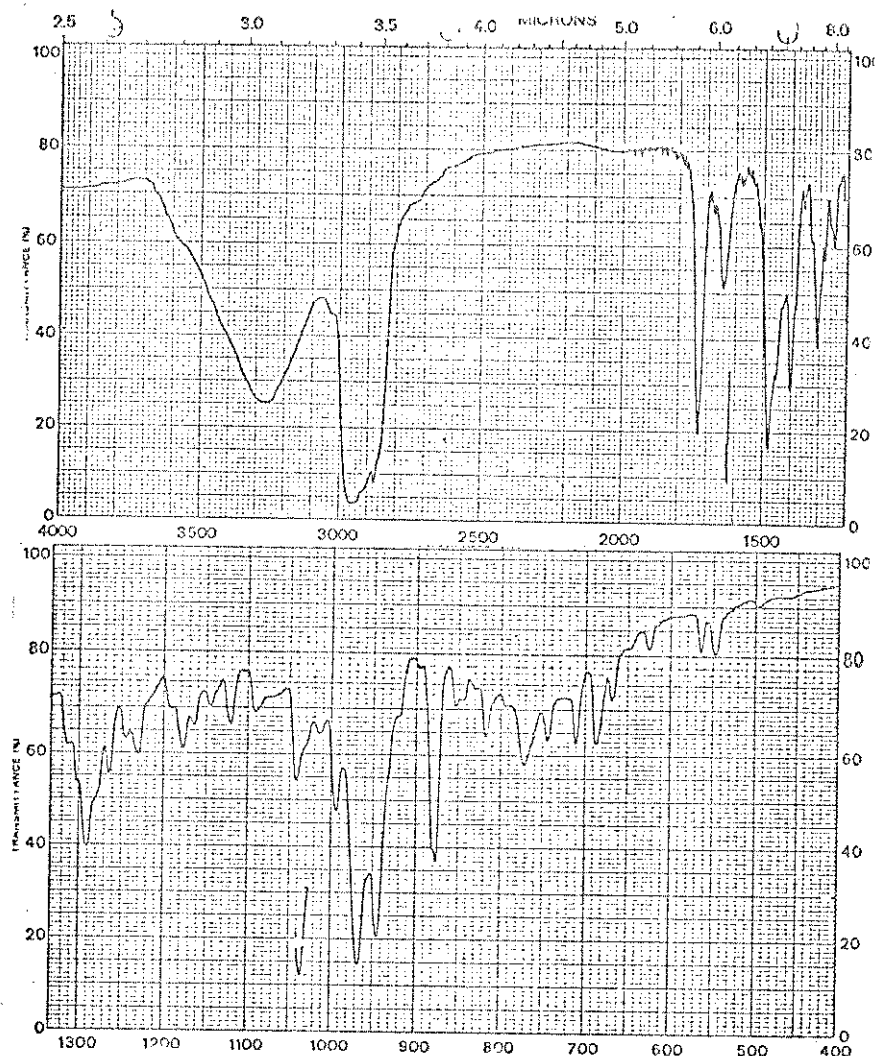
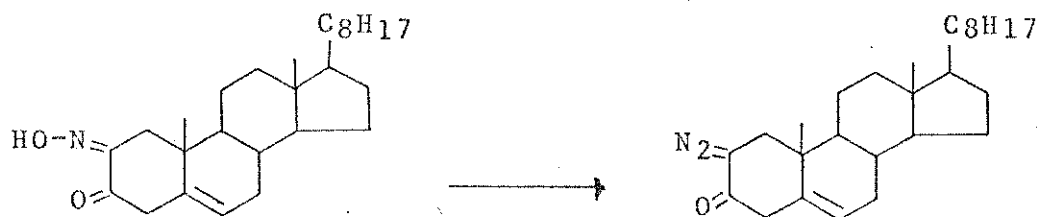


Figura 46. Espectro no I.V. do composto 52.

5. Preparação de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona(51)⁵³



Em uma solução de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (100 mg, 0,242 mmoles), obtido em 4.b), numa quantidade

mínima de THF, foi adicionado 1,3 ml de NaOH aquoso 4N e 0,5 ml de NH_4OH concentrado. Esfriou-se a solução a 10° (num banho de gelo). Adicionou-se 2 ml de hipoclorito de sódio aquoso (comercial; 5,25% NaOCl) gota a gota, com vigorosa agitação e com o balão acondicionado no banho de gelo. A mistura ficou em agitação durante uma noite, à temperatura ambiente.

Diluiu-se a reação com água e o precipitado, ligeiramente amarelado, foi filtrado por sucção. O composto foi dissolvido em clorofórmio e fez-se purificação por coluna cromatográfica líquida de filtração, utilizando-se aluminóxido neutro de atividade I (20 g). Utilizou-se clorofórmio como eluente.

Evaporou-se o solvente à pressão reduzida, num evaporador rotativo, e o composto recristalizado em CHCl_3 -MeOH, proporcionando-nos cristais amarelos e bem brilhantes.

Rendimento: 76 mg (0,174 mmoles, 72%).

Ponto de fusão: $123-125^\circ$

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (Figura 51): 2080, 1620 e 1340 cm^{-1}

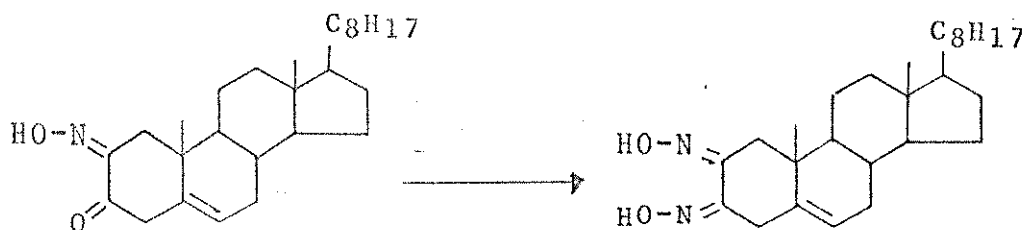
m/e 438 (M^+) (Figura 33)

Análise elementar: $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{ON}_2$

Encontrado: %C=78,92 %H=10,59 %N=6,36

Calculado : %C=79,92 %H=10,56 %N=6,38

6. Preparação de 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona dioxima(53)⁵⁵



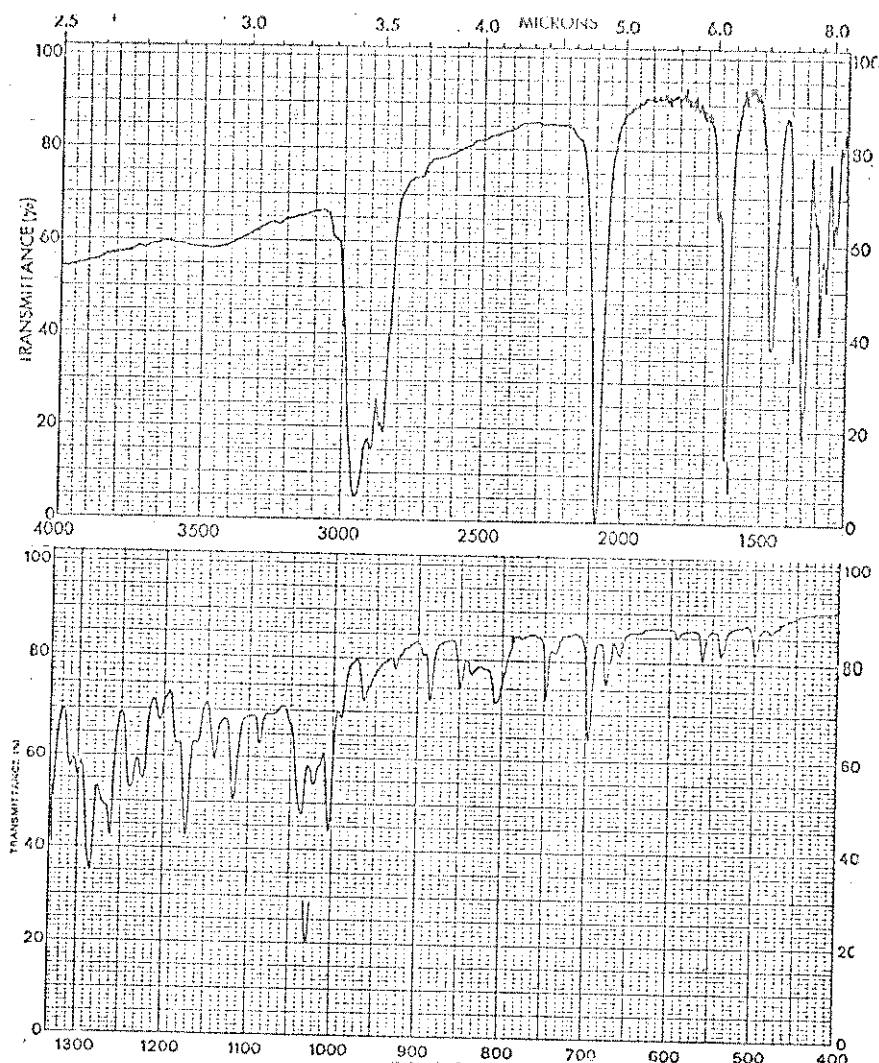


Figura 47. Espectro no I.V. do composto 51.

Uma mistura de 100 mg (0,228 mmoles) do composto oximino, obtido em 4.b), 100 mg (1,42 mmoles) do cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$), 2 ml de etanol e 0,5 ml de piridina foi mantida em refluxo, num banho de silicone, por aproximadamente 90 minutos. Neste período, desenvolveu-se uma coloração rosada. Em seguida, o solvente foi destilado à pressão reduzida. Deixou-se o balão sob a corrente de nitrogênio para secar melhor. A seguir, adicionou-se alguns mls de água gelada e os cristais foram moidos, com uma espátula, e filtrados num funil de Buchner. O composto foi recristalizado em etanol-água.

Rendimento: 82 mg (0,179 mmoles, 79%).

Ponto de fusão: 210-212°

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (Figura 48): 3320, 950 e 915 cm^{-1}

m/e 456 (M^+) (Figura 38).

Análise elementar: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_2$

Encontrado: %C=76,17 %H=10,72 %N=6,33 %O=6,78

Calculado : %C=76,26 %H=10,59 %N=6,13 %O=7,00

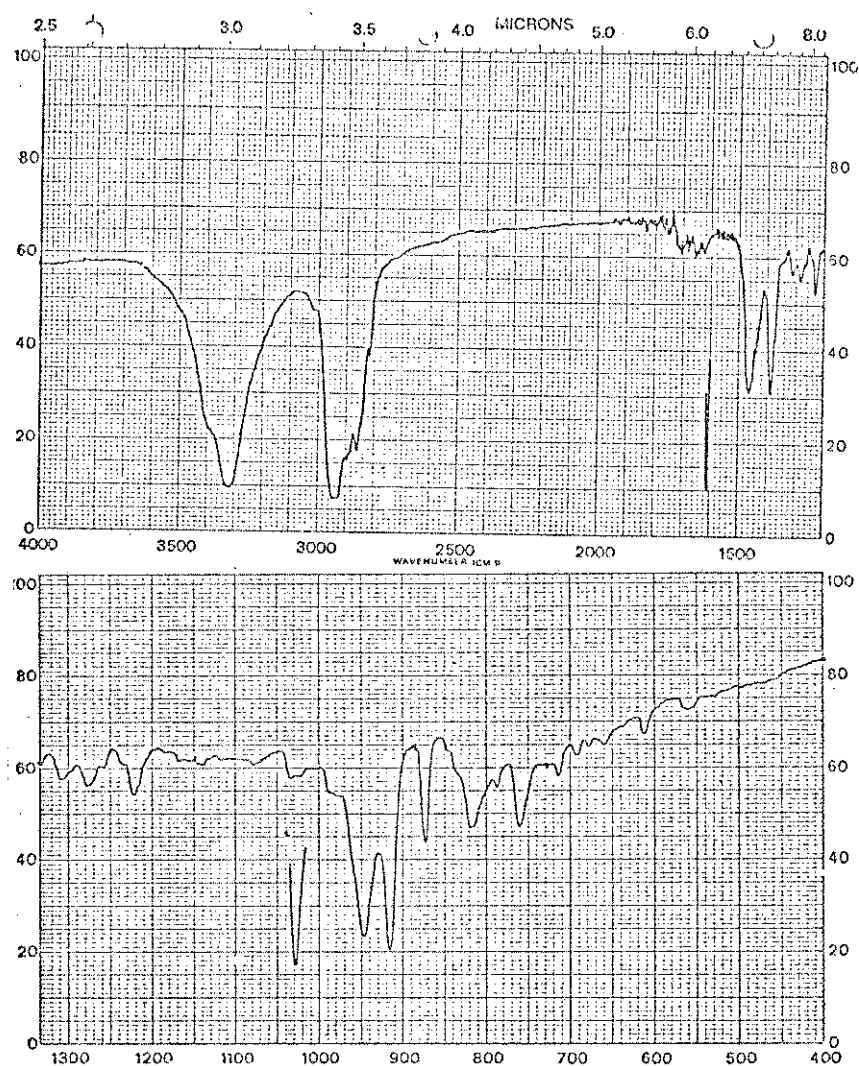


Figura 48. Espectro no I.V. do composto 53.

V. Conclusão

Tomando-se como base o espectro de massa do colesterol analisamos os efeitos que os diferentes substituintes no anel A, do esqueleto esteroidal, podem produzir sobre o mecanismo de fragmentação encontrado no espectro base. Para este fim, estudamos os compostos de 48 a 53.

Observando-se os espectros de massa dos compostos 48, 49 e 50 pudemos notar a presença de fragmentações características encontradas no colesterol²⁸, formando-se os íons $(M-85)^+$, $(M-111)^+$ (b) e m/e 247 (c, no colesterol).

A presença dos grupos alquila, no C-4 dos compostos 49 e 50, deu origem aos íons não encontrados no composto 48. Propusemos também, que os íons m/e 124 do composto 48 e m/e 124 do composto 49, provavelmente, tem estruturas diferentes devido à presença dos grupos alquila na posição C-4, do composto 49, bloqueando a migração da ligação dupla para a posição conjugada com a carbonila. A formação do íon m/e 331 (do composto 50) se deve à transferência do grupo hidroxila, do C-3 para C-6, que representa uma fragmentação específica para o colesterol alquilado no C-4. Este íon é estabilizado por três formas canônicas de ressonância.

Quando os substituintes eram nitrogenados (51, 52 e 53), os espectros de massa destes compostos não apresentam os íons $(M-85)^+$ (a) ou $(M-111)^+$ (b), mas somente o íon m/e 247 (c, no colesterol) em pequena abundância. O composto α -diazó-cetona (51) apresentou um íon molecular muito pequeno (A.R.=1%), provavelmente devido à perda rápida de nitrogênio, resultando o íon de m/e 410, mas a fragmentação foi suficientemente característica para ser útil na identificação. O íon m/e 410 se fragmenta pela perda do radical metila formando-se o pico base do espectro em m/e 395. Esta

fragmentação foi confirmada pela presença de um pico de grande intensidade à $0,964 E_1$ no espectro de MIKE do íon m/e 410. O íon m/e 395 foi analisado por MIKES e algumas de suas fragmentações foram confirmadas.

O espectro de massa do composto 52 apresentou um íon molecular em m/e 441 (que é o pico base no espectro). O espectro de MIKE deste íon confirmou várias fragmentações. Uma fragmentação de interesse foi a formação do íon m/e 410 que se deve, provavelmente, à perda de NOH do íon molecular. O íon resultante pode ter uma estrutura idêntica àquela observada para o íon m/e 410 do composto 51. Examinando-se o MIKES deste íon, em ambos os compostos, notou-se que os espectros eram completamente diferentes. Este é um indício de que as estruturas dos íons m/e 410 dos compostos 51 e 52 devem ser diferentes.

O espectro de massa do composto 53 apresentou um íon molecular de m/e 456. Tendo-se em vista o fato de que no composto 52 não foi confirmada a perda de água (mas somente a perda de OH) do íon molecular, analisamos o íon m/e 456 por MIKES. Como pudemos observar, no espectro, não foi confirmada nenhuma evidência da perda de água do íon molecular. O íon m/e 438 (que é o pico base no espectro) provavelmente se origina da perda de um átomo de hidrogênio do íon m/e 439 (formado pela perda de OH[•] do íon molecular).

Comparando-se o espectro de massa do colesterol com aqueles dos seus derivados, podemos concluir que a ligação dupla realmente pode controlar a fragmentação destes derivados, mas a presença de outros grupos funcionais (diferentes da ligação dupla) modifica este esquema de fragmentação encontrado no colesterol.

Bibliografia

1. Faulkner, D.J.: Tetrahedron, 33, 1421 (1977)
2. Storer, T.I. e Usinger, R.L.: "Zoologia Geral" (Editora da Universidade de São Paulo) (1974) p. 267.
3. Barnes, R.D.: "Invertebrate Zoology" - second edition - W.B. Saunders, Philadelphia (1968) p. 64.
4. Bergmann, W.: "Comparative Biochemistry", (Edited by Florkin, M. & Mason, S.) vol. 3. - Academic Press. New York (1962).
5. Minale, L.: Pure & Appl. Chem., 48, 7 (1976).
6. Minale, L.; Cimino, G.; De Stefano, S. e Sodano, G.: "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", (Edited by Springer-Verlag/Wien (New York) vol. 33, (1976) p. 1.
7. Erdman, T.R. e Thomson, R.H.: Tetrahedron, 28, 5163 (1972).
8. Fattorusso, E.; Cafieri, F.; Frigerio, A.; Santacroce, C. e Sica, D.: Gazz. Chim. Ital., 105, 595 (1975).
9. De Luca, P.; De Rosa, M.; Minale, L. e Sodano, G.: J.C.S. Perkin I, 2132 (1972).
10. Valentin Jr., F.R. e Bergmann, W.: J. Org. Chem., 6, 452 (1941).
11. De Rosa, M.; Minale, L. e Sodano, G.: Comp. Biochem. Physiol., 46B, 823 (1973).
12. Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacroce, C. e Sica, D.: Gazz. Chim. Ital., 104, 409 (1974).
13. Sheikh, Y.M. e Djerassi, C.: Tetrahedron, 30, 4095 (1974).
14. De Luca, P.; De Rosa, M.; Minale, L.; Puliti, R.; Sodano, G.; Giordano, K. e Mazzarella, L.: J.C.S. Chem. Comm. 825 (1973).
15. Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C. e Sica, D.: Tetrahedron, 31, 1715 (1975).
16. Minale, L. e Sodano, G.: J.C.S. Perkin 7, 1888 (1974).
17. Minale, L. e Sodano, G.: J.C.S. Perkin 7, 2380 (1974).
18. Ballantine, J.A. e Williams, K.: Tetrahedron Letters, 18, 1547 (1977).
19. Sica, D. e Zollo, F.: Tetrahedron Letters, 9, 837 (1978).
20. Djerassi, C.: Pure & Appl. Chem., 50, 171 (1978).
21. Moore, W.J.: "Físico-Química", (Editora da Universidade de São Paulo) vol. 1. (1976) p. 114.
22. Liebermann, C.: Ber. 18, 1803 (1886).

23. Nakanishi, K.: "Infrared Absorption Spectroscopy - Practical"-
1a. ed., Holden-Day, Inc., San Francisco (1962).
24. Bhacca, N.S. e Williams, D.H.: "Applications of NMR Spectro-
scopy in Organic Chemistry" - 2a. ed., Holden-Day, Inc., San
Francisco (1966).
25. Okamoto, T. e Kawazoe, Y.: Chem. Pharm. Bull., 11, 643 (1963).
26. Partridge, L.G. e Djerassi, C.: J. Org. Chem., 42, 2799
(1977).
27. Fitches, H.J.M.: "Advances in Mass Spectrometry", (Edited by
R.M. Elliot - The MacMillan - Company, New York) vol. 2,
(1962) p. 428.
28. Wyllie, S.G.; Amos, B.A. e Tökés, L.: J. Org. Chem., 42, 725
(1977).
29. Wyllie, S.G. e Djerassi, C.: J. Org. Chem., 33, 305 (1968).
30. Knights, B.A.: J. of Gas Chromatography, 5, 273 (1967).
31. Friedland, S.S.; Lane Jr., G.H.; Longman, R.T.; Train, K.E. e
O'Neal Jr., M.J.: Anal. Chem., 31, 169 (1959).
32. Djerassi, C.: Pure & Appl. Chem., 21, 205 (1970).
33. Ryhage, R. e Stenhagen, E.: J. Lipid. Res. 1, 361 (1960).
34. Wulfson, N.S.; Zaretskii, V.I.; Zaikin, V.G.; Segal, G.M.;
Torgov, I.V. e Fradkina, T.P.: Tetrahedron Letters, 3015
(1964).
35. Tökés, L.; Jones, G. e Djerassi, C.: J. Am. Chem. Soc., 90,
5465 (1968).
36. M. Spiteller-Friedmann e Spiteller, G.: Org. Mass. Spectrom.,
1, 231 (1968).
37. Naqvi, S.H. Mujtaba: Steroids, 22, 285 (1973).
38. Budzikiewicz, H. e Ockels, W.: Tetrahedron, 32, 143 (1976).
39. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C. e Williams, D.H.: "Mass
Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day, Inc. (1967)
p. 152.
40. Parikh, V.M.: "Absorption Spectroscopy of Organic Compounds".
Addison-Wesley Publishing Company, Inc. (USA) (1974) p. 168.
41. Knapp Jr., F.F. e Schroepfer Jr., G.J.: J.C.S. Chem. Comm.,
537 (1974).
42. De Jongh, D.C.; Van Fossen, R.Y.; Dusold, L.R. e Cava, M.P.:
Org. Mass Spectrom., 3, 31 (1970).
43. Razmara, F. e Waight, E.S.: Org. Mass Spectrom., 11, 1227
(1976).

44. Vijfhuizen, P.C. e Heerma, W.: Org. Mass Spectrom., 11, 787 (1976).
45. Schlunegger, U.P.: Angew. Chem. Internat. Edit., 14, 679 (1975).
46. Kondrat, R.W. e Cooks, R.G.: Anal. Chem., 50 (1), 81A (1978).
47. Fieser, L.F.: J. Am. Chem. Soc., 75, 5421 (1953).
48. Rabjohn, N.: "Organic Syntheses", Coll. vol. IV, Edited by John Wiley & Sons, Inc., New York (1967) p. 195.
49. Woodward, R.B.; Patchett, A.A.; Barton, D.H.R.; Ives, D.A.J. e Kelly, R.B.: J. Chem. Soc., 1131 (1957).
50. Atwater, N.W.: J. Am. Chem. Soc., 82, 2847 (1960).
51. Vogel, A.I.: "Química Orgânica - Análise Orgânica Qualitativa", vol. 3, Editora da Universidade de São Paulo (3a. edição) (1971) p. 967.
52. Ringold, H.J. e Rosenkranz, G.: J. Org. Chem., 22, 602 (1957).
53. Cava, M.P. e Weintraub, P.M.: Steroids, 4, 41 (1964).
54. Noyes, W.A.: "Organic Syntheses", Coll. vol. II, Edited by John Wiley & Sons, Inc., New York (1943) p. 108.
55. Landgrebe, J.A.: "Theory and Practice in the Organic Laboratory". Edited by D.C. Heath and Company. Lexington, Massachusetts (1973) p. 404.

APÊNDICE

Os Princípios Gerais de Espectrometria de Massa

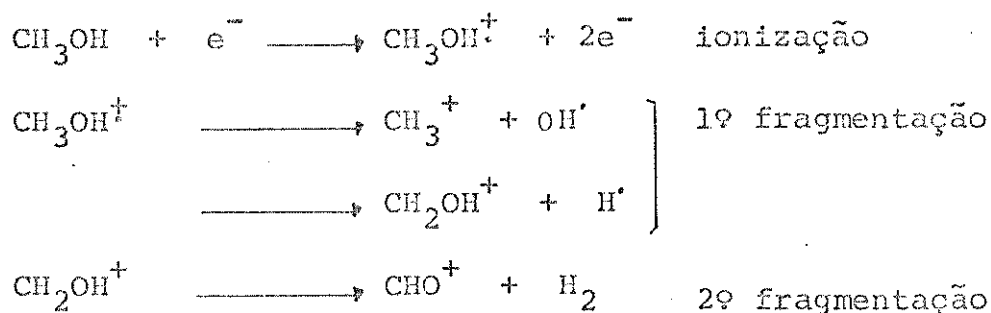
No espectrômetro de massa, as substâncias no estado gasoso estão sujeitas à ionização. Existem várias técnicas para efetuar esta ionização. A maioria dos instrumentos, particularmente aqueles utilizados para medir a abundância isotópica ou a massa de uma molécula (análises químicas, elucidação de estruturas e estudos de ionização e dissociação de moléculas), utiliza a técnica do impacto eletrônico. Nesta técnica, o vapor é introduzido sob baixa pressão na fonte iônica e as moléculas da amostra são bombardeadas por um feixe de elétrons emitidos por um filamento de tungstênio ou rênio.

Se a energia dos elétrons, que vão bombardear a molécula, é menor que o potencial de ionização da molécula (menos que 10 eV para a maioria das moléculas orgânicas) não ocorrerá nenhuma variação aparente nelas. Entretanto, se a energia for gradualmente aumentada até acima do potencial de ionização, a probabilidade de ocorrer uma colisão entre uma molécula e um elétron, para induzir a ionização, também aumentará. O processo é o seguinte:



Se a energia do feixe de elétrons for aumentada ainda mais, o excesso de energia será transferido para os íons moleculares resultando na fragmentação de uma porção deles. Na prática usa-se elétrons de 70 eV. Assim, há energia suficiente para quebrar algumas ligações na molécula. Por ex: introduzindo-se metanol gasoso

na fonte iônica e bombardeando-se com um feixe de elétrons, de 70 eV, o processo de ionização e fragmentação resultante será:



Todas estas reações ocorrem dentro da fonte dando uma mistura de íons (íons moleculares, íons fragmentos, íons isotópicos). Estes íons são acelerados por um potencial de aceleração, U , da fonte ao tubo de analisador.

Os espectrômetros de massa comerciais mais comuns utilizam os seguintes tipos de analisadores:

1. Deflexão Iônica. No tubo do analisador os íons estão sujeitos a um campo magnético perpendicular à direção do feixe de íons. Neste campo, eles são defletidos ao longo de um caminho circular de raio r , de acordo com a equação:

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2 r^2}{2U}$$

onde a) a deflexão dos íons depende do potencial de aceleração (U), da força do campo magnético (B) e da razão massa/carga dos íons.

- b) a deflexão causada pelo campo magnético fixo (B) é proporcional à razão massa/carga dos íons acelerados por uma voltagem fixa U .

2. Filtro de Massa Quadrupolar. Um analisador quadrupolar consiste de um tubo cilíndrico contendo quatro pólos cilíndricos colocados paralelamente (Figura 49). Os íons que entram no tubo,

por um pequeno orifício, estão sujeitos a uma corrente de radio-frequência oscilante. Somente os íons com um certo valor para a razão massa/carga serão capazes de atravessar o caminho ao longo do eixo, enquanto os outros íons oscilarão instavelmente e serão neutralizados quando colidirem com um dos quatro pólos. O espectro será varrido pela variação gradual da voltagem dc e radio-frequência mantendo-se a razão e a frequência de oscilação constantes.

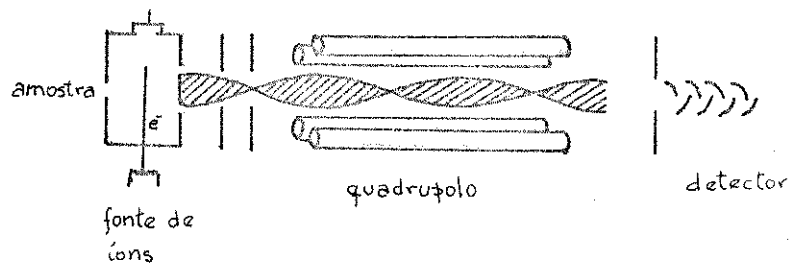


Figura 49 . Diagrama esquemático de um analisador quadrupolar. A linha sólida representa o caminho estável de um íon com determinado valor de m/e . A linha pontilhada representa o caminho instável de um íon com um outro m/e . Quando em contato com um dos pólos o íon sofre neutralização.

Atualmente, existem espectrômetros de massa de focalização simples, que utilizam o filtro quadrupolar ou o campo magnético para efetuar a separação dos íons de acordo com a razão massa/carga. Existem também instrumentos de dupla focalização nos

quais há um campo magnético e um campo eletrostático. Tais instrumentos são capazes de discriminar as massas de diferentes partículas, mesmo que esta diferença seja bem pequena (Por ex. 1 ppm de uma unidade de massa). Na figura 50 encontra-se um diagrama esquemático deste tipo de instrumento (geometria de Nier-Johnson inversa) no qual o setor magnético precede o analisador elétrico. Neste arranjo, os íons são analisados por massa no setor magnético, antes de serem analisados por energia cinética no setor elétrico. Assim, todos os íons que são detetados têm m/e idênticos e energias cinéticas idênticas.

Íons metaestáveis: fragmentações na segunda região livre de campo.

A ionização e a fragmentação das moléculas orgânicas podem ocorrer tanto na fonte de íons como em qualquer parte do espectrômetro de massa. Os íons registrados no espectro de massa comum serão os formados na fonte. Os íons que se fragmentam fora da fonte iônica serão denominados íons metaestáveis.

Em princípio, um íon metaestável pode decompor em qualquer região do seu percurso até o detetor. Se eles se decompuerem na região do campo elétrico ou magnético não serão focalizados e não resultarão picos no detetor. Entretanto, se a origem da decomposição estiver na região livre de campo, todos os íons poderão ser focalizados pelo campo subsequente e darão "picos metaestáveis" (estes picos não serão devido às espécies metaestáveis em si, mas sim aos produtos de suas decomposições). Particularmente, os íons que se decompõem na segunda região livre de campo de um espectrômetro de massa de dupla focalização com geometria de Nier-Johnson inversa (Figura 50), poderão ser intensivamente analisados. Estes estudos são denominados "MIKES" (Mass Analyzed

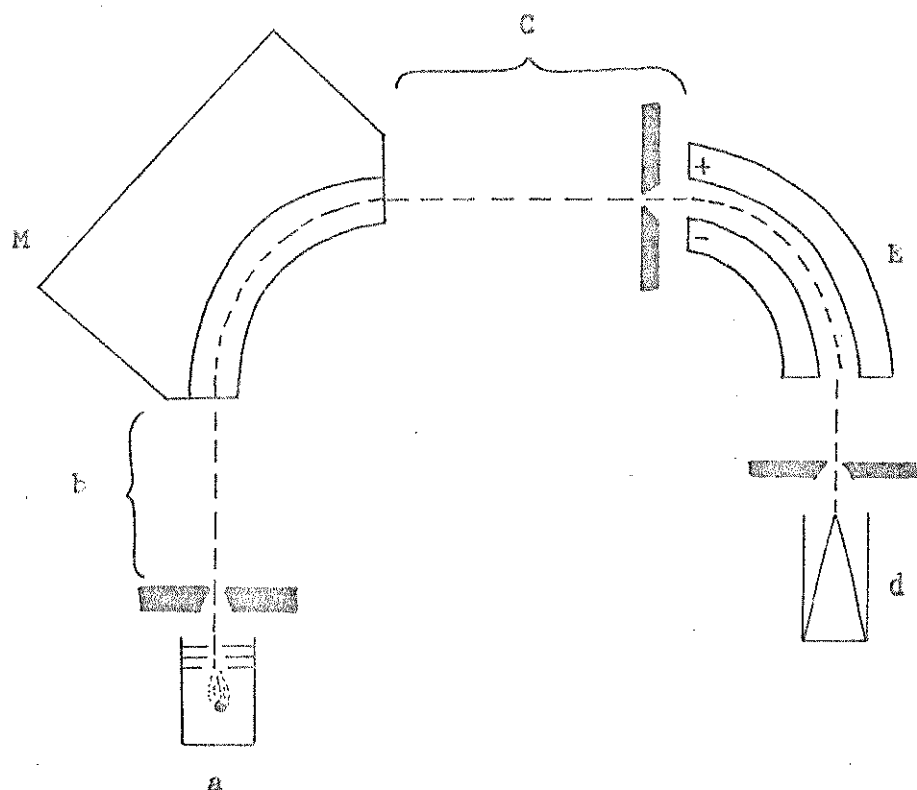


Figura 50. Diagrama esquemático do espectrômetro de massa MIKES (geometria de Nier-Johnson inversa).

a. Fonte de íons; b. Primeira região livre de campo ; M. Analisador magnético; c. Segunda região livre de campo (região MIKES); E. analisador eletrostático (filtro de energia); d. Detetor.

Ion Kinetic Energy Spectra - Espectro de energia cinética dos íons analisados por massa).

A segunda região livre de campo não contém todos os íons formados e acelerados na fonte de íons. Aí só chegam aqueles que já passaram pelo campo magnético, cuja função é selecionar os íons pela massa. Todas as outras partículas serão defletidas para a parede do aparelho e serão eliminadas. Portanto, quando ocorrer a decomposição de íons metaestáveis na segunda região livre de campo, eles se originarão de íons que foram selecionados pelo cam

po magnético.

No potencial inicial do campo eletrostático, E_1 , o íon precursor (m_1) passa por este campo com a energia cinética ($1/2 m_1 v^2$)

$$\frac{m_1 v^2}{2} = eE_1$$

$$\frac{m_1}{e} \cdot \frac{v^2}{2} = E_1$$

Quando ele se decompõe, a energia cinética é dividida entre o íon fragmento (m_2) e a partícula neutra. A energia cinética do fragmento é $1/2 m_2 v^2$. O potencial do campo eletrostático, E_2 , necessário para permitir a passagem do fragmento será:

$$\frac{m_2}{e} \cdot \frac{v^2}{2} = E_2$$

Combinando estas equações, podemos determinar a relação entre m_2 , E_1 , E_2 e m_1 :

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

Assim, sabendo-se a massa do precursor (m_1), o potencial inicial (E_1) e medindo-se o potencial no qual pode-se observar a passagem do produto (E_2) é possível calcular a sua massa (m_2).

Íons metaestáveis: fragmentações na primeira região livre de campo.

Se a decomposição do íon metaestável ocorrer na pri-

meira região livre de campo, o íon produto será em seguida analisado pelo campo magnético. Neste caso, como o produto m_2 não tem a energia cinética dos íons de mesma massa formados na fonte iônica ele será transmitido pelo setor magnético com uma massa aparente (m^*) onde:

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

Assim, se a massa de um íon estudado por MIKES tem valor idêntico a m^* , um pico agudo será observado à medida que o campo elétrico for diminuído. Este pico metaestável (m^*) formado na primeira região livre de campo é um pico difuso que inclui uma faixa de valores de massas. Se o íon estável com massa m^* atravessa o campo elétrico com certo potencial, E_1 , o íon produto de massa m_2 será transmitido numa voltagem, E_2 , onde:

$$m_2 = m^* \cdot \frac{E_1}{E_2}$$

Os valores de m^* e E_1 são conhecidos, E_2 é medido; portanto m_2 pode ser calculado. Para se encontrar o precursor (m_1) é necessário saber o valor de m^* exatamente. Este pode ser medido fazendo-se a varredura de ambos os campos juntos.