

Departamento de química

universidade de aveiro



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TRANSFORMAÇÕES DE
COMPONENTES NÃO CELULÓSICOS DE ALGUMAS ESPÉCIES
DE ACÁCIA EXISTENTES EM PORTUGAL

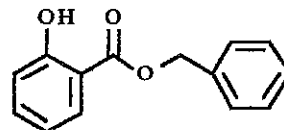
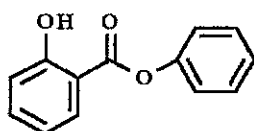
MARIA FLORBELA BENTO MARTINHO DE SÁ PEREIRA

Aveiro

1996

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
vii	19	detecção	detecção
2	17	cultivados	cultivadas
2	17	<i>trigonella</i>	<i>Trigonella</i>
4	cabeçalho	<i>Parte II</i>	<i>Parte I</i>
4	1, 2 e 3		suprimir
6	3	benzoato de hexilo	benzoato de hexanilo
6	estrutura (14)		



8	estrutura (25)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{NC}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{COCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OC}-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
8	estrutura (26)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{NH}_2\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{HO}-\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

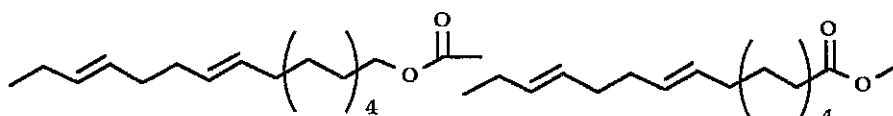
10	estrutura (33) e (34)		
14	5	tem sido	têm sido
14	16	malaria	malária
14	16	por a Organização	pela Organização
15	1	impirico	empírico
15	3	a família	à família
16	16	contrario	contrário
17	4	o Instituto	no Instituto
20	1	a cauda	à cauda
20	5	constituído	constituída
20	21	a os	aos
24	8	demonstram	demonstraram
24	13	poli-isoprenos	de poli-isoprenos
26	15	alelopaticos	alelopáticos
27	4	varias	várias
30	2	não é cultivada	não são cultivadas
37	2	purificadas	purificados
42	tabela 6	linolilo	linalilo
43	tabela 8	metilcinamato	cinamato de metilo

47	estrutura do 2-(Z)-penteno-1-ol		
47		n-hexenal	n-hexanal
47		1,4-hexadieno	3,4-dimetil-heptano

49	estrutura do 3,7-dimetilnonano		
----	--------------------------------	--	--

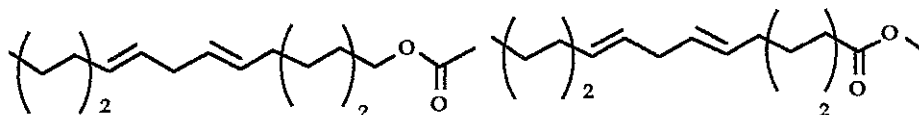
49

6



50

3



50

13 e 14

(64)...(65)...(66)...(67)

(63)...(64)...(65)...(66)

51

1

a identificação

à identificação

55

22

metilos

metilo

61

16

Esquema 3

Esquema 5

77

3

ácidos

álcoois

78

2.7

Discussão

Discussão

78

15

seis

cinco

82

7

carbono secundário

"carbono secundário"

87

7

as

às

89

legenda da figura 14

ampliado

92

3

d 1,43

δ 1,43

100, 112 e 116

12, 11 e 16

página 134

página 121

115

8

H-5, 9'

H-5', 9'

122

14

Bruker

Bruker

123

5

à qual sem

à qual se

123

23

montagem

extracção

124

14

sofrem

sofre

124

7

montagem

extractor

132

7

CHCL₃CHCl₃

138

2

identificação

identificação

138

13

não, se prende

não se prende

142

8

alifático

alifático

146

22

devidos

devido

149, 156 e 175

esquema 20,25 e 34

152

15

metabólitos

metabolitos

153

9

umdo

umdos

157

14

correspondente a

correspondente à

157

estrutura (144)

159

8

verificamdo-se

verificando-se

162

3

oxido

óxido

184

15

homogénia

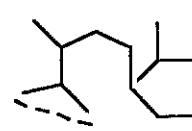
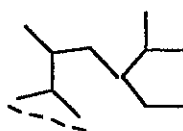
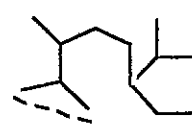
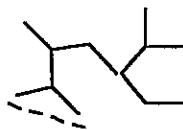
homogénea

211

1

realizadas

realizados



Resumo

Ao longo desta dissertação descreveram-se estudos de caracterização (Parte II), de transformação (Parte III) e de avaliação da actividade fungicida (Parte IV), de componentes não celulósicos da *A. dealbata* e *A. longifolia*.

A análise qualitativa da composição em voláteis das diferentes amostras, folhas, flores e sementes da *A. longifolia* e *A. dealbata* permitiu a identificação, com o recurso a GC-MS, de compostos ainda não identificados no género *acácia*.

Nas três amostras, folhas, flores e sementes de *A. longifolia* foram identificados 25 compostos ainda não identificados no género *Acácia* e 14 compostos já identificados no género mas não na espécie. Nesta espécie foram identificados os seguintes monoterpenos: β -pineno, *cis*-ocimeno, α -felandreno, *p*-cimeno, 3-tujeno-2-ol, α -terpineol, β -mirceno e *cis*-ocimeno.

Nas três amostras, folhas, flores e sementes de *A. dealbata* foram identificados 30 compostos não identificados no género *acácia*. Na amostra das folhas foram identificados 8 compostos já identificados neste género, mas não na espécie *A. dealbata*. Nesta espécie foram identificados os seguintes monoterpenos: 3-careno, α -pineno, *p*-cimeno, *cis*-ocimeno, β -pineno, tujeno e 1,8-cineol e os sesquiterpenos: aromandendreno e γ -muuroleno.

O estudo da composição em triterpenos e esteróides dos extractos de hexano e metanol das folhas, flores e sementes de *A. dealbata* permitiu o isolamento e caracterização de 12 compostos ainda não identificados nesta espécie e 10 destes ainda não identificados no género *acácia*.

No extracto de hexano das folhas, foram identificados os seguintes compostos: lupenona (117), lupeol (118), 1-metilupeol (119), (22E)-4-metilergosta-

7,22-dieno-3 β -ol (120), β -sitosterol (121), 12-(2'-hidroxietil)lup-20(29)-eno-3 β -ilo (122) e butirato de 12R-lup-20(29)-eno-3 β -ilo (124).

No extracto de hexano das flores, identificaram-se: lupenona (117), lupeol (118) e (22E)-4-metilergosta-7,22-dieno-3 β -ol (120).

No extracto de hexano das sementes identificaram-se: lupenona (117), palmitato de lupenilo (125) e araquidato de lupenilo (126).

No extracto de metanol das flores, foram identificados os seguintes compostos: lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (68), *trans*-7'-hidroxicinamato de lupenilo (127), *trans*-7'-hidroxicinamato de lup-7,20(29)-dieno-6-ona-3 β -ilo (128).

Foram estudadas transformações químicas da betulina (68), lupeol (118) e β -sitosterol (121). Foram testadas reacções como a acetilação, epoxidação e reacção com alcinetos com o fim último de produzir derivados furânicos. Foi possível produzir derivados acetilados e os seus epóxidos. Foi também testada a reacção de formação de derivados Δ^2 -pirazolinicos através do produto acetilado do composto (68). Várias outras reacções foram testadas tendo em conta estas duas vertentes principais.

Os compostos isolados de *A. dealbata*, bem como os compostos sintetizados foram caracterizados com recurso a varias técnicas espectroscópicas (MS, IV, RMN de ^1H , ^{13}C , ^{13}C com acoplamento de ^1H , HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$), COSY, DEPT e NOE.

Finalmente, na Parte IV, apresentam-se os resultados obtidos em estudos de actividade fungicida dos diferentes extractos (folhas, flores e sementes), de *A. dealbata* bem como de alguns dos compostos isolados e também dos compostos sintetizados.

Abstract

This thesis reports several studies on the characterization (Part II), transformation (Part III) and antifungal activity studies (Part IV) of some non-cellulosic components of *A. dealbata* and *A. longifolia*.

Qualitative analysis of the volatile fraction of the different leaves, flowers and seeds samples from *A. longifolia* and *A. dealbata* allowed the identification of several compounds not previously reported in the genus *acacia*.

In the three leaves, flowers and seeds samples from *A. longifolia*, 25 compounds were identified which had not been previously reported in this genus, and 14 compounds identified in genus *acacia* but not in this species. In this species the following monoterpenes were identified: β -pinene, α -felandrene, *p*-cimene, 3-thujen-2-ol, α -terpineol, β -mirceno and *cis*-ocimene.

In the three leaves, flowers and seeds samples from *A. dealbata*, 30 compounds were identified not previously reported in this genus. Only in the leaves samples 8 compounds were identified already reported in this genus, although not identified in the species *A. dealbata*. In this species the following monoterpenes were identified: 3-carene, α -pinene, *p*-cimene, *cis*-ocimene, β -pinene, thujene and 1,8-cineol and the sesquiterpenes: aromandendrene and γ -muurolene.

The study of the terpenoids composition of the hexane and metanol extracts of leaves, flowers and seeds of the *A. dealbata* allowed the isolation and identification of 12 compounds not reported in the genus *acacia*.

In the hexane extract of leaves, the following compounds were identified: lupenone (117), lupeol (118), 1-metilupeol (119), (22*E*)-4-metilergost-7,22-diene-3 β -

ol (**120**), β -sitosterol (**121**), 12-(2'-hydroxyethyl)lup-20(29)-en-3 β -yl (**122**) and 12R-lup-20(29)-en-3 β -yl butirate(**124**).

In the hexane extract of flowers, the following compounds were identified: lupenone (**117**), lupeol (**118**) and (22*E*)-4-metilergost-7,22-diene-3 β -ol (**120**).

In the hexane extract of seeds, the following compounds were identified: lupenone (**117**), lupenyl palmitate (**125**) and lupenyl araquidate (**126**).

In the methanol extract of flowers, the following compounds were identified: lup-20(29)-en-3 β ,28-diol (**68**), lupenyl *trans*-7'-hydroxicinamate (**127**), lup-7,20(29)-dien-6-one-3 β -yl *trans*-7'-hydroxicinamate (**128**).

Chemical transformations of betulina (**68**), lupeol (**118**) and β -sitosterol were also studied. Acetylation, epoxidation and reaction with alkynes were tested aiming the production of furanic derivatives. Acetylated, epoxide and Δ^2 -pirazolines derivatives from compound (**68**) were also prepared.

All the compounds isolated from *A. dealbata* and synthesised were characterized by spectroscopic techniques (MS, IR, NMR of ^1H , ^{13}C , ^{13}C coupled with ^1H , HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$), COSY, DEPT and NOE).

Finally, in the Part IV, antifungal activity studies of the different extracts (leaves, flowers and seeds) of *A. dealbata*, isolated compounds and synthesised compounds are presented.

Abreviaturas

CID- Dissociação induzida por colisão

CC- Cromatografia em coluna

COSY- Correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, em RMN

δ - Desvio químico

dd- Duplo duplete

DEPT- "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"

EL- Impacto electrónico

FTIR- Espectroscopia de infravermelho com transformadas de fourier

FAB- Bombardeamento atómico rápido

FPP- Pirofosfato de farnesilo

GC- Cromatografia de gás

GLC- Cromatografia gás líquido

HETCOR- Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, em RMN

HPLC- Cromatografia líquida de alta pressão

HR-MS- Espectro de massa de alta resolução

HMBC- Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional, em RMN por detenção inversa

IUPAC- União Internacional da Química Pura e Aplicada

INEPT- "Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer"

J- Constante de acoplamento

lit.- Literatura

m- Multipleteo

M⁺- Ião Molecular

Me- Metilo

MeOH- Metanol

MS- Espectrometria de massa

MCPBA- Ácido metacloroperbenzóico

m/z- Relação massa carga

MIKES- Medida de massa exacta

NBA- Álcool 3-nitrobenzílico

NOE- Efeito nuclear de Overhauser

NOESY- Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser e de troca

PC- Pressão crítica

p.f.- Ponto de fusão

RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de protão

RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono

RLB- Reagente de Libermann-Buchard

s- singuleto

t- tripleto

TC- Temperatura crítica

THF- Tetra-hidrofurano

tlc- Cromatografia em camada fina

TMS- Tetrametilsilano

tr- Tempo de retenção de um pico cromatografico

Índice	
Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vii
Índice	x

PARTE I INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais sobre a <i>acácia</i>	2
1.1. Considerações taxonómicas	2
1.2. A <i>acácia</i> em Portugal	3
1.3. Descrição dos diferentes tipos de compostos isolados no género <i>acácia</i>	5
2. Interesse do trabalho	
Plantas medicinais	14

PARTE II CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPONENTES NÃO CELULÓSICOS DE *Acácia dealbata* E *Acácia longifolia*

1. Óleos essenciais	19
1.1 Considerações gerais	19
1.1.2 Nomenclatura,	20
1.1.3 Biossíntese de compostos terpénicos	23
1.1.4 Função dos óleos essenciais	25
1.1.5 Aplicações dos óleos essenciais	27
1.2 Amostragem e armazenamento do material a ser analisado	29
1.3 Extracção dos componentes voláteis	31
1.3.1 Extracção por arrastamento de vapor	31

1.3.2	Extracção por solvente	32
1.3.3	Extracção por arrastamento de vapor/solvente extractor	33
1.3.4	Extracção com fluidos supercríticos,	35
1.4.	Execução experimental e resultados	37
1.4.1	Reagentes e equipamento	37
1.4.2	Amostragem e armazenamento	37
1.4.3	Extracção dos componentes voláteis	38
1.4.4	Análise e identificação	41
1.4.5	Crítica e discussão dos resultados	50
2.	Triterpenos e esteróides	53
2.1	Introdução	53
2.2	Nomenclatura de triterpenóides e de esteróides	53
2.2.1	Contração ou expansão de anéis	57
2.2.2	Abertura de anéis	58
2.3	Biossíntese	59
2.3.1-	Sifolano	65
2.3.2-	Sifonelano	66
2.3.3-	Polipodano	67
2.3.5-	Espirosupinano	69
2.3.6-	Radermasinina	69
2.3.7-	Bacarano	70
2.3.8-	Lanostanos rearranjados	71
2.3.9-	Triterpenos semelhantes aos carotenóides	72
2.4	Função	73
2.5	Aplicação	74
2.6	Extracção e fraccionamento	76
2.7.1	Triterpenos e esteróides isolados no extracto de hexano das folhas de <i>A. dealbata</i>	78
2.7.1.1	Identificação inequívoca da lupenona isolada na <i>A. dealbata</i>	79
2.7.1.2	Identificação dos restantes triterpenos	98
2.7.2	Triterpenos isolados no extracto de hexano das flores de <i>A. dealbata</i>	110
2.7.3	Triterpenos isolados no extracto de hexano das sementes de <i>A. dealbata</i>	110
2.7.4	Triterpenos isolados no extracto de metanol das flores de <i>A. dealbata</i>	114
2.8	Parte experimental	122
2.8.1	Reagentes e equipamento	122
2.8.2	Extracção e fraccionamento das amostras	124
2.8.3	Dados espectroscópios dos compostos isoladas na <i>A. dealbata</i>	127

PARTE III
TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS DA
Acácia dealbata

1- Considerações gerais sobre as transformações químicas	138
1.1- Valor acrescentado	138
1.2- Interesse nos compostos heterocíclicos	139
1.3- Nomenclatura de compostos heterocíclicos	141
2- Resultados e discussão	144
2.1- Reacção de Acetilação	144
2.2- Reacção de Epoxidação	147
2.3- Formação de compostos com um anel furânico	152
2.4- Formação de compostos com um anel de pirazolina	160
2.4.1- Síntese de Δ^2 -pirazolinas	162
2.4.2- Síntese de Δ^1 -pirazolinas	167
2.5- Formação de compostos com um anel de pirazol	169
2.6- Reacções diversas	171
2.6.1- Formação do triacetato de lupenilo	171
2.6.2- Formação do 20-carboxilupenilo	173
2.6.3- Desidratação do sitosterol	175
2.6.4- Diepóxido de limoneno	176
3- Parte Experimental	179
3.1- Reagentes e equipamento	179
3.2- Síntese do acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129)	180
3.3- Síntese do acetato lup-20(29)-eno-3 β -ilo (130)	181
3.4- Síntese do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131)	183
3.5- Síntese dos acetato de 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ilo (134) e (135)	184
3.6- Síntese do acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo (136)	186
3.7- Síntese do diacetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo (137)	187
3.8- Síntese do 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ol (144)	188
3.9- Síntese do acetato de 29-hidroxilupano-3 β -ilo (145)	189
3.10- Síntese do lupano-3 β ,28,29-triol (146)	190
3.11- Síntese do diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150)	191
3.12- Síntese do diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (151.a)	193
3.13- Síntese do diacetato de 20-(4'-1'-fenilsulfoxi- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.b)	194

3.14- Síntese do diacetato de 20-(4'-(1'-fenil)- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.c)	196
3.15- Síntese do diacetato de 20-(4'-(1'-(2',4')-dinitrofenil)- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.d)	197
3.16- Síntese do diacetato de 20-(4'- Δ^1 -pirazolina)-29-nor-30-oxolup-3 β ,28-diilo (152)	199
3.17- Síntese do diacetato de 20-(4'-pirazolil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (156)	201
3.18- Síntese do triacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28,30-triol (158)	202
3.19- Síntese do 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (160)	204
3.20- Síntese do 24-etilcolesta-3,5-dieno (161) e 24-etilcolesta-2,5-dieno (162)	205
3.21- Síntese do 1,2-epoxilimoneno (163) e 8,10-epoxilimoneno (164)	206

PARTE IV AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FUNGICIDA

1- Introdução	210
2- Avaliação da actividade fungicida	211
2.1- Avaliação da actividade fungicida de algumas fracções dos extractos de hexano e metanol das folhas, flores e sementes de <i>A. dealbata</i> .	212
2.2- Avaliação da actividade fungicida de alguns triterpenos isolados nos extractos de hexano e metanol das folhas, flores e sementes da <i>A. dealbata</i> .	215
2.3- Avaliação da actividade fungicida de alguns compostos de síntese	216
3- Conclusão	218
BIBLIOGRAFIA	220

PARTE I
INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais sobre a *acácia*

1.1. Considerações taxonómicas

A *acácia* pertence às leguminosas, sendo esta uma das maiores famílias de plantas com flor. Soma mais de 400 géneros e aproximadamente 7000 espécies de árvores, arbustos e ervas distribuídas de forma representativa por todo o mundo.¹Esta família pode ser dividida em 3 ou 4 subfamílias. Cada uma destas é considerada como uma família por alguns botânicos. No entanto neste trabalho vamos considerar as leguminosas como uma única família.

A família *Leguminosae* é constituída por um grande número de espécies tanto espontâneas como introduzidas, cultivadas para a alimentação do homem, produto de forragens e ornamentação.²As espécies mais frequentemente usadas na alimentação humana encontram-se nos géneros *Arachis*, *Cicer*, *Glycine*, *Lens*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vicia* e *Vigna*, nomeadamente *Arachis hypogae* (amendoim), *Cicer arietinum* (grão-de-bico), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum arvense* (trevo), *Vicia sativa* (ervilhaca), *Vicia ervilia* (ervilha-de-pombo) e *Vigna unguiculata* (feijão-frade), sendo a parte comestível a semente ou a vagem ou ambas. Espécies destes géneros e de muitos outros, especialmente *Anthyllis*, *Ceratonia*, *Coronilla*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Trifolium* e *trigonella*, são cultivados como forrageiras em grande escala ou usadas para melhorar pastagens.²

Uma das características desta família é apresentar semente,^{1,2} e sendo as sementes a parte da planta mais rica em gordura será de prever que as leguminosas tenham um grande interesse comercial. No entanto de forma um pouco surpreendente apenas os amendoins e os feijões-soja são utilizados em quantidades comercialmente importantes na produção de óleo.²

Segundo a divisão taxonómica mais recente, em Portugal a família *Leguminosae* está dividida em 3 sub-famílias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Lotoideae*, incluindo 36 géneros e aproximadamente 230 espécies.² A *Acácia* é um género da família *Leguminosae* e subfamília *Mimosoideae*.¹

O género *acácia* apresenta-se como uma árvore ou arbusto, com flores pequenas, amarelas ou brancas, dispostas em espiga cilíndrica ou capítulos globosos estes frequentemente em cachos.² As plantas deste género crescem rapidamente e muitas destas espécies são usadas como plantas ornamentais.^{1,2} Algumas espécies de *acácia* têm uma madeira perfumada e outras têm uma madeira extremamente durável.¹ Diz-se até que a lendária "arca de Noe" era feita de madeira da *Acácia seyal*.¹

O género *acácia* foi bastante utilizado na medicina tradicional. Almagboul *et al.*³ verificaram que os extractos das flores e folhas respectivamente da *Acácia nilotica* e *A. polycantha* apresentam grande actividade antibacteriana, atribuída à existência de taninos e triterpenos.

1.2. A acácia em Portugal

As árvores e arbustos do género *acácia* distribuem-se nos trópicos e subtropicos especialmente África, Índia e Austrália.²

Em Portugal são conhecidas nove espécies de *acácia*:²

A. karoo Hayne, *A. dealbata* Link, *A. mearnsii* De Wild, *A. longifolia* Willd, *A. cyclops* G. Don fil., *A. melanoxyton* R. Br. in Aiton, *A. pycnantha* Bentham, *A. cyanophylla* Lindley e *A. retinodes* Schlecht.

As espécies sublinhadas são aquelas que foram estudadas neste trabalho. Estas espécies foram escolhidas por existirem de forma endémica na região de Aveiro, principalmente nas zonas mais próximas do mar.

As espécies sublinhadas são aquelas que foram estudadas neste trabalho. Estas espécies foram escolhidas por existirem de forma endêmica na região de Aveiro, principalmente nas zonas mais próximas do mar.

As espécies de *acácia* existentes em Portugal apresentam como características comuns, serem frequentemente subespontâneas por vezes muito invasoras, serem utilizadas apenas como plantas ornamentais e serem originárias da Austrália com exceção da *A. longifolia*.²

A *A. dealbata* ² originária da Austrália e Tasmânia, onde é cultivada para fixação do solo, principalmente em regiões litorais, e apresenta-se como uma árvore de grande porte (podendo chegar até 30 metros de altura), com flores amarelas (Figura 1).

A *A. longifolia*² apresenta-se como um arbusto (até 8 metros) de flores amarelas, originário de Nova Gales do Sul, onde é utilizado principalmente para a fixação de dunas litorais (Figura 2).



Figura 1 - Aspecto visual de uma árvore de *A. dealbata* (A), folhas em pormenor (B) e flores (C).



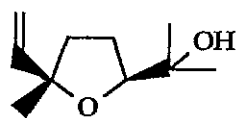
Figura 2 - Aspecto visual de uma árvore de *A. longifolia* (A), folhas em pormenor (B) e flores (C).

1.3. Descrição dos diferentes tipos de compostos isolados no género *acácia*

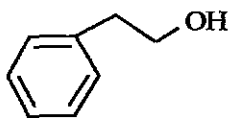
Existem pelo menos sete classes de substâncias implicadas na produção do odor de uma planta, nomeadamente compostos do tipo mono e sesquiterpénicos, alifáticos, aromáticos, azotados, isotiocianatos e sulfuretos. O mais vasto grupo de substâncias com cheiro são os terpenos voláteis que se verificou serem de grande importância como marcadores taxonómicos das gimnospérmicas.⁴

Os componentes voláteis de três espécies de acácia⁵ foram analisados e identificados por GC-MS. Verifica-se que as flores da *A. berlandieri* Benth e *A. rigidula* Benth são atractivas em relação à lombriga *Cochliomyia hominivorax*, enquanto que as flores da *A. farnesiana* Willd são inactivas. Dos compostos voláteis identificados nos três extractos das espécies de acácia estudadas, apenas catorze não estão presentes no extracto inactivo. Estes incluem compostos como o

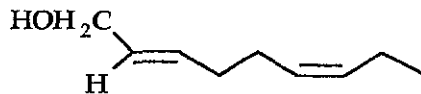
óxido de linalool A (1), o 2-feniletanol (2), o *trans,cis*-2,6-nonadien-1-ol (3), o óxido de linalool D (4), o 1-nonanol (5), o 1*H*-indolo (6), o *trans,trans*-2,4-nonadienal (7), o eugenol (8), o 2-metilbutirato de metilo (9), a jasmona (10), a acetato de geranilo (11), o benzoato de *cis*-3-hexenilo (12), o benzoato de hexilo (13) e o salicilato de benzilo (14). Este facto levou os autores a atribuírem a actividade dos dois primeiros extractos à presença desses compostos.



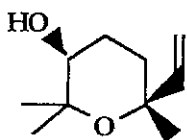
(1)



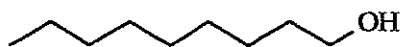
(2)



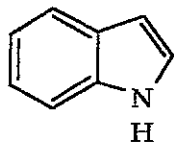
(3)



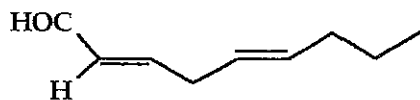
(4)



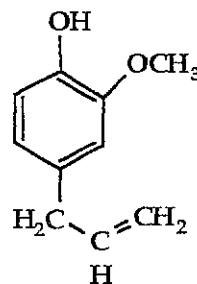
(5)



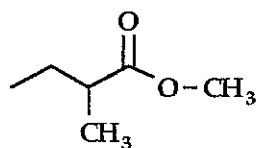
(6)



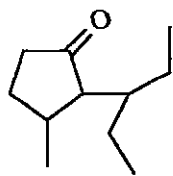
(7)



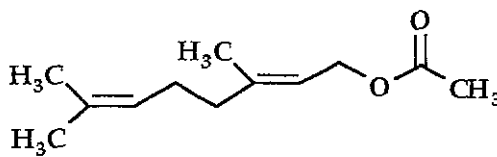
(8)



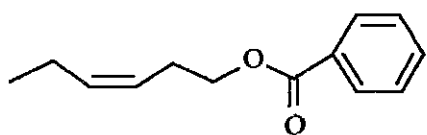
(9)



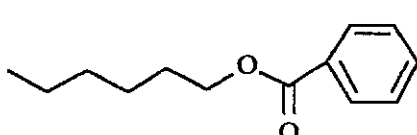
(10)



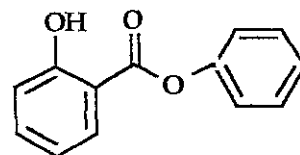
(11)



(12)

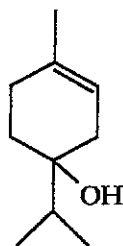


(13)

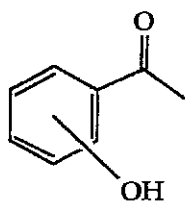


(14)

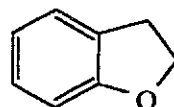
As flores de *A. farnesiana* Willd e *A. cavenia* Hook et. Arn são usadas na produção de fragâncias finas de tipos diferentes, incluindo o tipo floral, aldeídico, bem como o tipo semi-oriental e oriental. Anonis⁶ estudou a composição química do extracto das flores destas duas espécies de *acácia*, tendo referido alguns compostos ainda não identificados nesta espécie, tais como, o α -terpineol (15), a hidroxiacetofenona (16), a coumarina (17), o ácido butírico (18), o ácido palmítico (19) e o ácido benzóico (20).



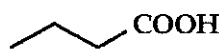
(15)



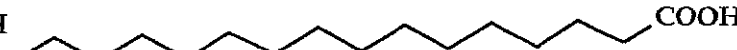
(16)



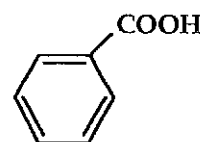
(17)



(18)



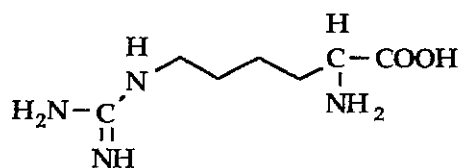
(19)



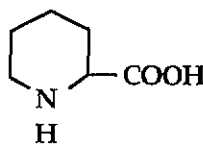
(20)

Um dos papéis dos metabolitos secundários nas plantas parece ser a protecção destas plantas contra potenciais predadores. Certos aminoácidos não-proteicos acumulam-se nas sementes e folhas de algumas plantas e podem ser tóxicos para os animais que se alimentam delas.

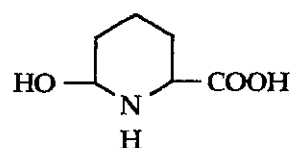
Evans e Bell⁷ identificaram nas folhas de *Acácia tortilis* e *A. albida* três aminoácidos não-proteicos: a homoarginina (21), o ácido piperólico (22) e o ácido 4-hidroxipiperólico (23). Tanto o gafanhoto *Aracridium melanorhodon* como o graminívoro *Locusta migratoria* se alimentam das folhas das espécies de *Acácia*. Verifica-se que o *L. migratoria* é mais sensível que o *A. melanorhodon* a esses aminoácidos, observando-se o efeito inibidor da capacidade de se alimentar para concentrações comparáveis às que existem nas folhas.



(21)

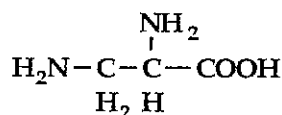


(22)

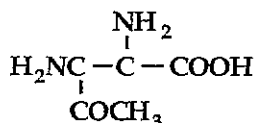


(23)

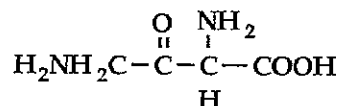
O estudo das sementes das mesmas espécies levou ao isolamento e identificação de três aminoácidos não-proteicos, o ácido 2,3-diaminopropiônico (24), o ácido 2-amino-3-acetilaminopropiônico (25) e o ácido 2-amino-3-oxalilaminopropiônico (26). Estes apresentam actividade como inibidores da alimentação superiores à dos aminoácidos existentes nas folhas, no caso de *A. melanorhodon*.⁷



(24)



(25)

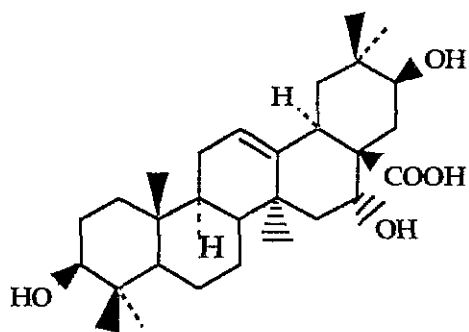


(26)

Evans *et al.*⁸ identificaram os aminoácidos livres nas sementes de 80 espécies de *acácia*. O significado taxonómico e filogenético desses resultados foi discutido principalmente tendo em conta os resultados obtidos em *A. albida*, *A. confusa*, *A. heterophylla*, *A. coulteri* e *A. kauaiensis*.⁸

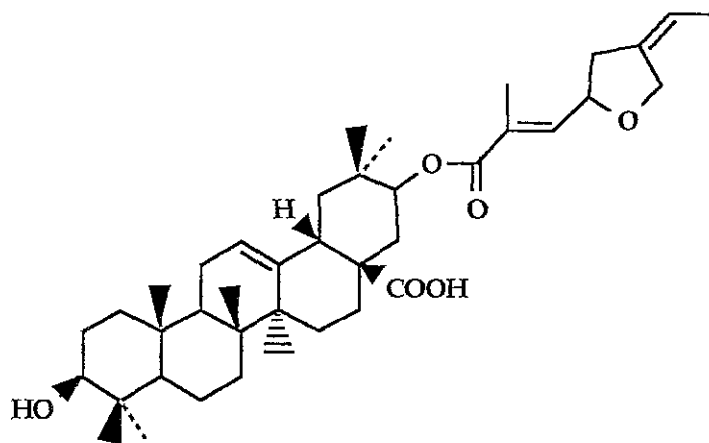
A composição triterpénica de uma planta pode ser analisada em termos taxonómicos.^{9,4} Verifica-se que os triterpenos não oxigenados, derivados por ciclização do esqualeno, se encontram principalmente em plantas primitivas como líquenes e fetos, enquanto que os triterpenos oxigenados, formados pela via do óxido de esqualeno se encontram em geral em plantas mais desenvolvidas.⁹

O triterpeno (27) foi identificado pela primeira vez em várias espécies de *acácia* e, desta forma, foi-lhe atribuído o nome de ácido acácico.¹⁰



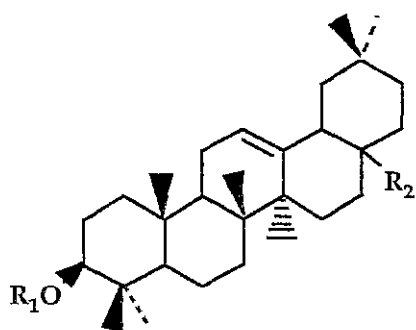
(27)

Anjaneyulu *et al.*¹¹ isolaram do extracto da *Acácia concinna* um novo triterpeno a que foi dado o nome de Acacigenina B (28).



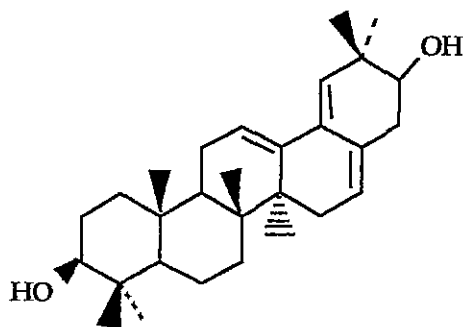
(28)

Eade *et al.*¹² identificaram no extracto de *Acácia myrtifolia* Willd três triterpenos glicosídicos, designados por mirtifoliosídeos A (29), B (30) e C (31).



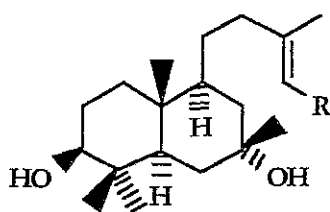
	R_1	R_2
(29) Resíduos	L-arabinose e D-glucose	$-CH_2OR_1$
(30) Resíduos	2 D-glucose e 1 D-galactose	$-CH_2OH$
(31) Resíduos	D-glucose e D-galactose	$-COOH$

Foi identificado o triterpeno 28-noroleano-16,18-dieno-3 β ,21 β -diol (32), de nome trivial acacidiol,¹¹ no extracto de *Acácia concinna*.



(32)

Foram isolados dois novos diterpenos¹³ de uma espécie de *acácia* não classificada, o (13*E*)-labd-13-eno-3 β ,8 α ,15-triol (33) e o ácido (13*E*)-3 β ,8 α -di-hidroxi-labd-13-eno-15-óico (34).

(33) R= CH₂OH ;

(34) R= COOH ;

Os flavanóides são os metabolitos secundários mais amplamente usados em estudos taxonómicos,⁴ o que se deve à sua ubiquidade nas plantas mais evoluídas e à sua grande diversidade estrutural. Tindale e Roux¹⁴ estudaram mais de 400 espécies de *acácia* do ponto de vista da sua composição em hidroxiflavonóides, com o objectivo de fazer uma análise quimotaxónomica e filogenética.

O género *acácia* está dividido em duas secções e cada um delas em subsecções (Esquema 1).¹⁴

1) PHYLLODINEAE :

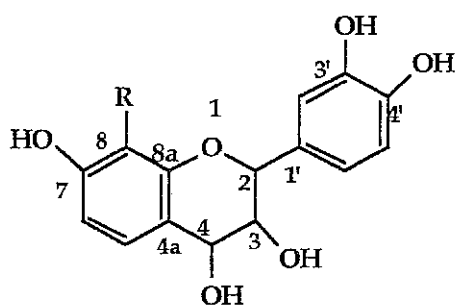
- *Continuae*
- *Pungentes*
- *Calamiformes*
- *Brunioideae*
- *Uninerves*
- *Plurinerves*
- *Juliflorae*

2) BIPINNATAE:

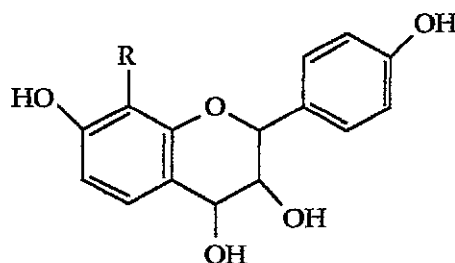
- *Botryocephaleae*

Esquema 1

A esta diferenciação taxonomica corresponde uma diferenciação química (entre as diferentes espécies de *acácia*) devida principalmente à ocorrência, por um lado, do par molissacacidina (35, R=H) (7,3',4'-trihidroxi) e guiburtacacidina (36, R=H) (7,4'-dihidroxi), por outro lado, do par melacacidina (35, R=OH) (7,8,3',4'-tetrahidroxi) e teracacidina (36, R=OH) (7,8,4'-trihidroxi).



(35)



(36)

A subsecção *Botryocephaleae*^{14,15} apresenta exclusivamente os flavonóides hidroxilados molissacacidina (35, R=H) e guiburtacacidina (36, R=H).

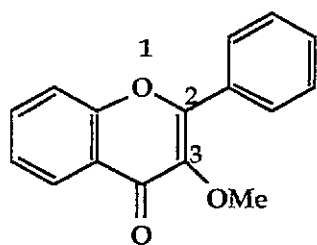
As madeiras das subsecções *Plurinerves* e *Juliflorae*¹⁴ apresentam apenas o par de hidroxiflavonóides melacacidina (35, R=OH) - teracacidina (36, R=OH).

Uma terceira categoria na composição de hidroxiflavanóides é representada por um grupo de "mistura" dos pares molissacacidina (35, R=H) - melacacidina (35, R=OH) e os seus associados guiburtacacidina (36, R=H) e teracacidina (36, R=OH). As espécies que reflectem tal "mistura" são principalmente agrupados nas subsecções: *Continuae*, *Pungentes*, *Calamiformes* e *Uninerves*.¹⁴

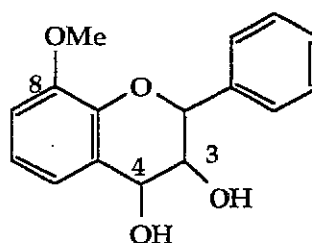
O género *acácia* em termos da composição em hidroxiflavanóides, não apresenta os 5-hidroxiflavanóides. Esta característica também se verifica na família *Leguminosae*.

Verifica-se que tanto do ponto de vista morfológico como químico, a subsecção de *Botryocephaleae* é a mais primitiva. Por outro lado as subsecções *Juliflorae* e *Plurinerves*¹⁴ são olhadas como mais evoluídas, tanto morfológica como quimicamente.

Clark-Lewis e Porter¹⁶ estudaram a composição em metoxiflavanóides de 14 espécies de *acácia* provenientes de zonas áridas da Austrália. Verificaram que todas as espécies analisadas continham em grande quantidade a 3-metoxiflavona (37), no entanto o 8-metoxiflavano-3,4-diol (38) foi apenas detectado em duas das espécies estudadas.

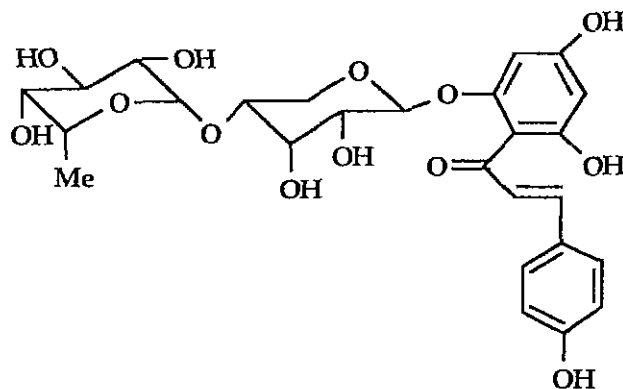


(37)



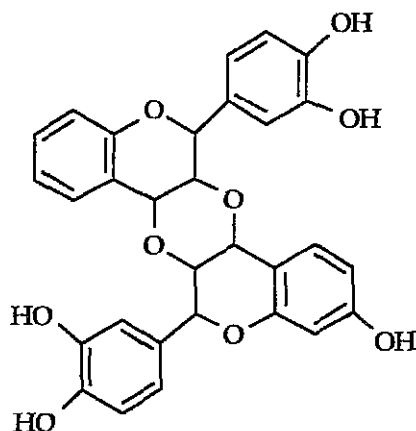
(38)

F. Imperato¹⁷ isolou do extracto das flores de *Acácia dealbata* uma calcona glicosídica, a 4,2',4',6'-tetra-hidroxicalcona-2'-[O-ramnosil-(1-->4)-xilosidose] (39).



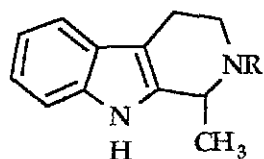
(39)

Drewes e Isley,¹⁸ isolaram e caracterizaram um novo flavanóide do extracto de madeira da *A. mearnsii*, demonstrando que as duas unidades de flavanóide estão ligadas através de um anel do tipo dioxano (40).



(40)

Das folhas de *Acácia complanata* foram extraídas dois alcalóides,¹⁹ o Nb-metiltetra-hidro-harmano (41) e tetra-hidro-harmano (42).

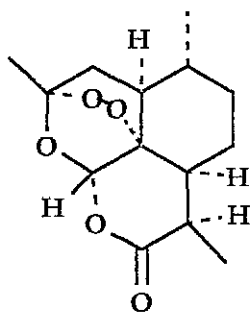
(41) R= CH₃ ;

(42) R= H ;

2. Interesse do trabalho: Plantas medicinais

Das 250 000 espécies de plantas superiores existentes na terra mais de 80 000 apresentam características medicinais.²⁰ Embora a medicina tradicional esteja difundida por todo o mundo, sendo parte integrante da cultura de cada povo, infelizmente muito do conhecimento antigo e muitas plantas importantes começam a perder-se num grau preocupante. As florestas tropicais tem sido destruídas a uma velocidade de 50 hectares por minuto e quem sabe quantas potenciais drogas têm sido perdidas desta forma.²¹ O estudo científico da medicina tradicional e a preservação sistemática das plantas medicinais é de grande importância.

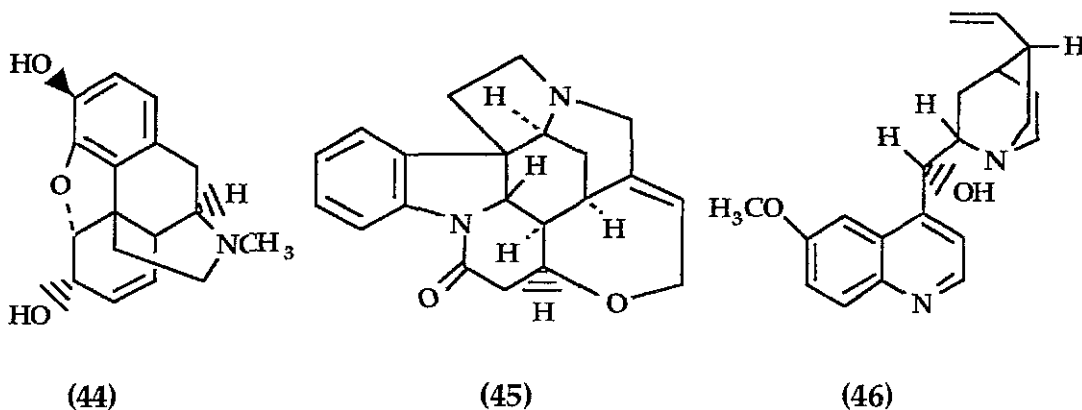
Os chineses foram o primeiro povo a tirar partido das plantas com aplicação na medicina tradicional. Há 5000 anos o Imperador Shen Nung estudou as plantas medicinais e verificou as suas propriedades curativas.²⁰ Aproximadamente 11000 medicamentos derivados das plantas foram desenvolvidos e usados na China durante milhares de anos. Entre estes inclui-se a *Artemisia annua* que é a fonte da artemisinina (43), uma nova droga anti-malaria cujo estudo e aplicação tem vindo a ser estudado por a Organização Mundial de Saúde e os Estados Unidos.



(43)

Após séculos de uso impirico de preparações ervais, no início do século XIX foram isolados os primeiros princípios activos de plantas biologicamente activas.

Pertenciam a família dos alcalóides, a morfina (44), a estricnina (45) e o quinino (46) etc.. Este foi o começo de uma nova era no uso de plantas medicinais e da investigação moderna das plantas medicinais.²²



Realça-se ainda o grande salto dado na importância das drogas extraídas das plantas, que produziram um enorme desenvolvimento na síntese farmacêutica e na fermentação microbiana após 1945.

Actualmente o uso de medicamentos de origem nas plantas, na Europa Ocidental, continua a ser visto como bastante duvidoso, muitas vezes associado a fins pouco ortodoxos. Contudo a consciencialização ecológica e um aumento da procura de terapias não-clássicas podem ser referidas como as principais razões para a renovação de mentalidades.

As Plantas são a principal fonte de medicamentos para os chineses e é graças a estas que os chineses conseguem ter uma esperança de vida muito próxima dos países industrializados.

Mesmo nos Estados Unidos um terço das drogas prescritas contém componentes de plantas²³ e mais de 120 medicamentos importantes derivam de plantas.²⁰ A maioria dessas drogas foram desenvolvidas devido à sua utilização na medicina tradicional.

A bebida nacional da Inglaterra é o chá,²¹ contudo esta bebida produzida pela extracção de plantas, não teve origem na Inglaterra mas sim no sudeste da Ásia. Contém compostos farmacologicamente activos, xantonas, cafeína (uma chávena média contém aproximadamente 100 mg) e teofilina (um broncodilatador que na forma pura tem sido usado no tratamento da asma).

As reservas de ópio²¹ dos chineses no século XIX originaram um negócio lucrativo para a Inglaterra e a América, o qual precipitou a guerra entre a Inglaterra e a China.

Desde sempre que indivíduos com um papel relevante na nossa história, utilizaram drogas extraídas de plantas exóticas e fungos. Muitos dos venenos mais famosos utilizados por Cleópatra²¹ eram retirados de plantas, para assegurar a sua eficácia, testava a toxicidade destes venenos nos seus escravos. Estes testes de toxicidade tinham como objectivo assegurar um fim rápido e pacífico às suas vítimas.

O Império Romano²¹ tinha o objectivo contrário, pretendiam drogas de acção lenta. Um dos venenos mais utilizados, era o fatal extracto das bagas da erva-moira. *Atropa belladonna* era a "arma" mais utilizado pela mulher do Imperador Augustus e pela mulher de Claudius. Augustus parecendo adivinhar as intenções da sua esposa preparava ele próprio toda a sua comida e bebida. Contudo, ela finalmente conseguiu as suas intenções pela injeção do veneno nos figos em crescimento da árvore pessoal do Imperador.

Com objectivos bem mais nobres, cientistas trabalham na procura de componentes químicos biologicamente activos, recorrendo a ajuda computadorizada com o objectivo de identificar moléculas de valor acrescentado.²⁴

O potencial das plantas evoluídas como fonte de novas drogas é ainda bastante inexplorado. Sabe-se que das 250 000 espécies de plantas existentes na Terra, apenas

uma pequena percentagem foi investigada do ponto de vista fitoquímico e a fracção submetida a avaliação biológica e farmacológica é ainda menor.²² No entanto muito está já a ser feito, por exemplo, o Instituto Nacional do Cancro (INC) dos Estados Unidos foram avaliadas aproximadamente 35 000 espécies de plantas para actividade anti-tumoral de 1957-1985²⁵ e em curso encontra-se um processo de avaliação de aproximadamente 20 000 espécies tropicais da América Latina, África e Ásia.²⁶

Todas estas plantas continuam a ser consideradas como "não investigadas" no que diz respeito a outra actividade farmacológica.

PARTE II

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
COMPONENTES NÃO CELULÓSICOS DA
Acácia dealbata E *Acácia longifolia*

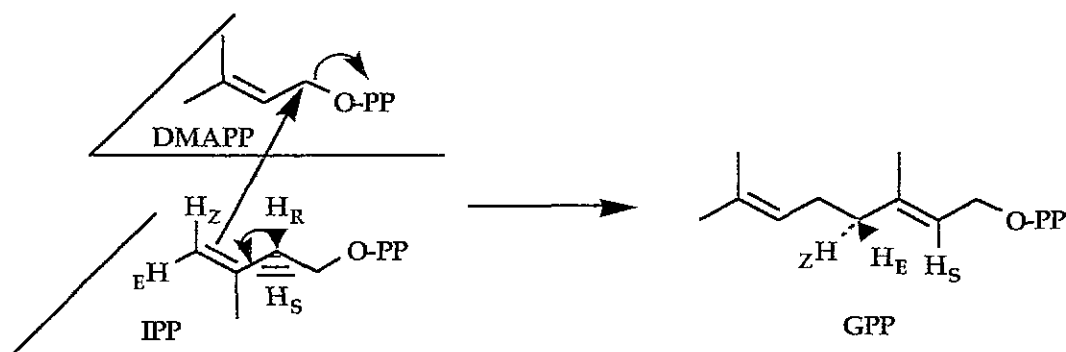
1. Óleos essenciais

1.1 Considerações gerais

Os terpenos e os seus derivados são o maior grupo e o mais amplamente distribuído no reino animal e vegetal tendo já sido isolados e identificados mais de 4 000 terpenos.²⁷

Durante o século XIX foram estabelecidas as estruturas de alguns componentes dos óleos essenciais de plantas.²⁸ Muitos destes foram identificados como sendo hidrocarbonetos insaturados de fórmula geral $C_{10}H_{16}$, e foi-lhes dado o nome de terpenos, um nome etimologicamente ligado ao óleo de *terebintina* e aos *alcenos*.²⁹

Todos os terpenos apresentam uma característica comum, podem ser divididos em unidades de C_5 , as quais foram chamadas de unidades de isopentenodieno ou de isopreno. De acordo com o número de unidades de isopreno nos terpenos, estes podem ser sub-divididos em várias classes: monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades) e triterpenos (6 unidades). As unidades de isopreno ligam-se de acordo com a regra do isopreno, segundo a qual a cauda de uma unidade se liga à cabeça da seguinte (Esquema2).^{27,29,30,31}



Esquema 2

A cabeça da unidade de pirofosfato de isopentenilo (IPP) liga-se a cauda da unidade de pirofosfato de dimetialilo (DMPP), eliminando o grupo pirofosfato e formando uma unidade de pirofosfato de geranilo (GPP).

O termo "óleo essencial" designa actualmente a fracção volátil extraída de plantas por arrastamento de vapor e que é constituído essencialmente por monoterpenos e sesquiterpenos. No entanto este termo teve origem no trabalho do médico Bombastus Paracelsus von Hohenheim (1493-1541), que introduziu o termo "*quinta essentia*" como sendo o princípio activo de qualquer droga e cujo isolamento seria o objectivo de qualquer farmacêutico.³²

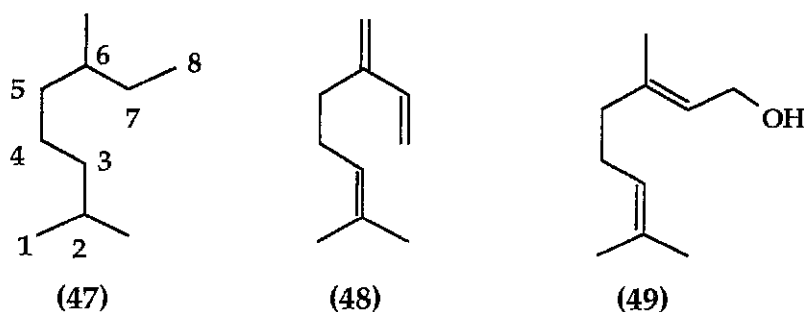
1.1.2 Nomenclatura^{33,34}

Os monoterpenos podem ser designados recorrendo às regras gerais da IUPAC, no entanto os nomes assim obtidos são muito compridos, complicados e difíceis de utilizar na prática. Tal como acontece com outros compostos naturais, podem distinguir-se dois tipos de nomenclatura muito usada: a nomenclatura trivial e a semi-sistemática.

Na ausência de outras regras, o nome trivial de novos produtos naturais deve ser baseado no nome do material de origem ou numa propriedade desse produto, e deve apresentar implícita no seu nome alguma relação com a sua estrutura química, preferivelmente o grupo funcional.

A nomenclatura semi-sistemática assenta num conjunto de estruturas fundamentais com estereoquímica implícita, nomes e numeração apropriados (dados pela nomenclatura trivial), a os quais se acrescentam indicações de quaisquer modificações e presença de grupos funcionais (dados pela nomenclatura sistemática).

Os nomes dos hidrocarbonetos terpênicos acíclicos são formados de modo análogo ao dos outros hidrocarbonetos acíclicos insaturados sem outras funções, por exemplo, o geranilano (47) corresponde ao 2,6-dimetiloctano.

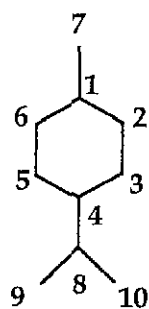


Apesar das recomendações a cima referidas, a nomenclatura trivial é mais utilizada que a sistemática (Tabela 1).

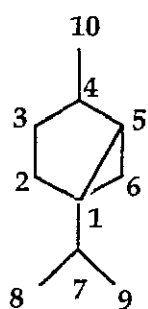
COMPOSTO	NOME TRIVIAL	NOME SISTEMÁTICO
(48)	mirceno	7-metil-3-metileno-1,6- octadieno
(49)	geraniol	3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ol

Tabela 1 - Comparação entre o nome trivial e sistemático de terpenos.

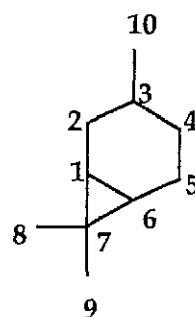
As estruturas que se apresentam em seguida com nomes e numerações especiais, servem de base à nomenclatura especializada dos hidrocarbonetos terpênicos monocíclicos e bicíclicos. Assim podem-se considerar o tujano (51) e o carano (52) derivados do *p*-mentano (50); enquanto o isocanfano (53) e o fenchano (54) devem ser designados como derivados do norbornano (55).



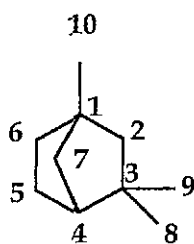
(50)



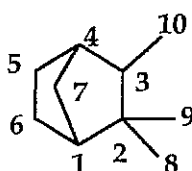
(51)



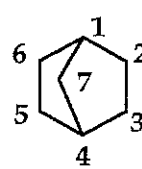
(52)



(53)

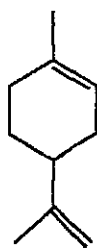


(54)

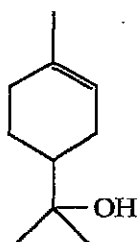


(55)

Alguns exemplos de nomes triviais e sistemáticos de monoterpênos cíclicos são apresentados na Tabela 2.



(56)



(15)

COMPOSTO	NOME TRIVIAL	NOME SEMI-SISTEMÁTICO
(56)	limoneno	1,8(9)- <i>p</i> -mentadieno
(15)	α -terpineol	<i>p</i> -ment-1-eno-8-ol

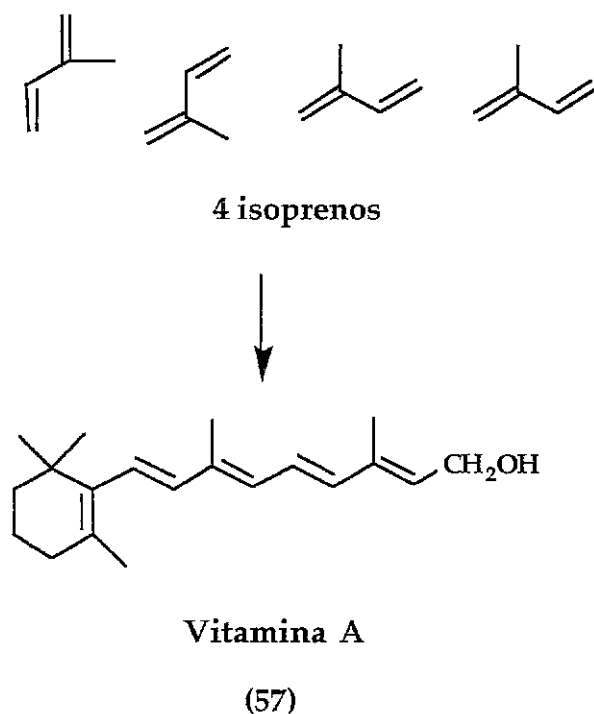
Tabela 2 - Comparação entre o nome trivial e semi-sistemático de terpenos

Ao longo deste trabalho os compostos terpênicos serão designados maioritariamente pelos seus nomes triviais.

1.1.3 Biossíntese de compostos terpênicos

Os terpenóides são compostos bastante abundantes nas plantas superiores e constituem um dos grupos mais abundantes dos metabolitos secundários das plantas. Uma característica geral dos metabolitos secundários é que a sua função principal é desconhecida, a sua produção está ligada a muitos factores externos tais como: o crescimento, a floração, a estação, a temperatura, o habitat, a duração da exposição da luz solar, etc.. Sabe-se actualmente que os metabolitos secundários têm um papel muito importante na co-existência e co-evolução das espécies.

Wallach³⁵ notou que muitos compostos, especialmente as principais fragâncias de plantas - óleos essenciais - podem ser divididas em cadeias de unidades C₅, chamadas unidades isopentadieno ou unidades de isopreno. Através desta teoria foi possível racionalizar a estrutura de compostos bastante complexos de massa molecular elevada, por exemplo a da vitamina A (Esquema 3):

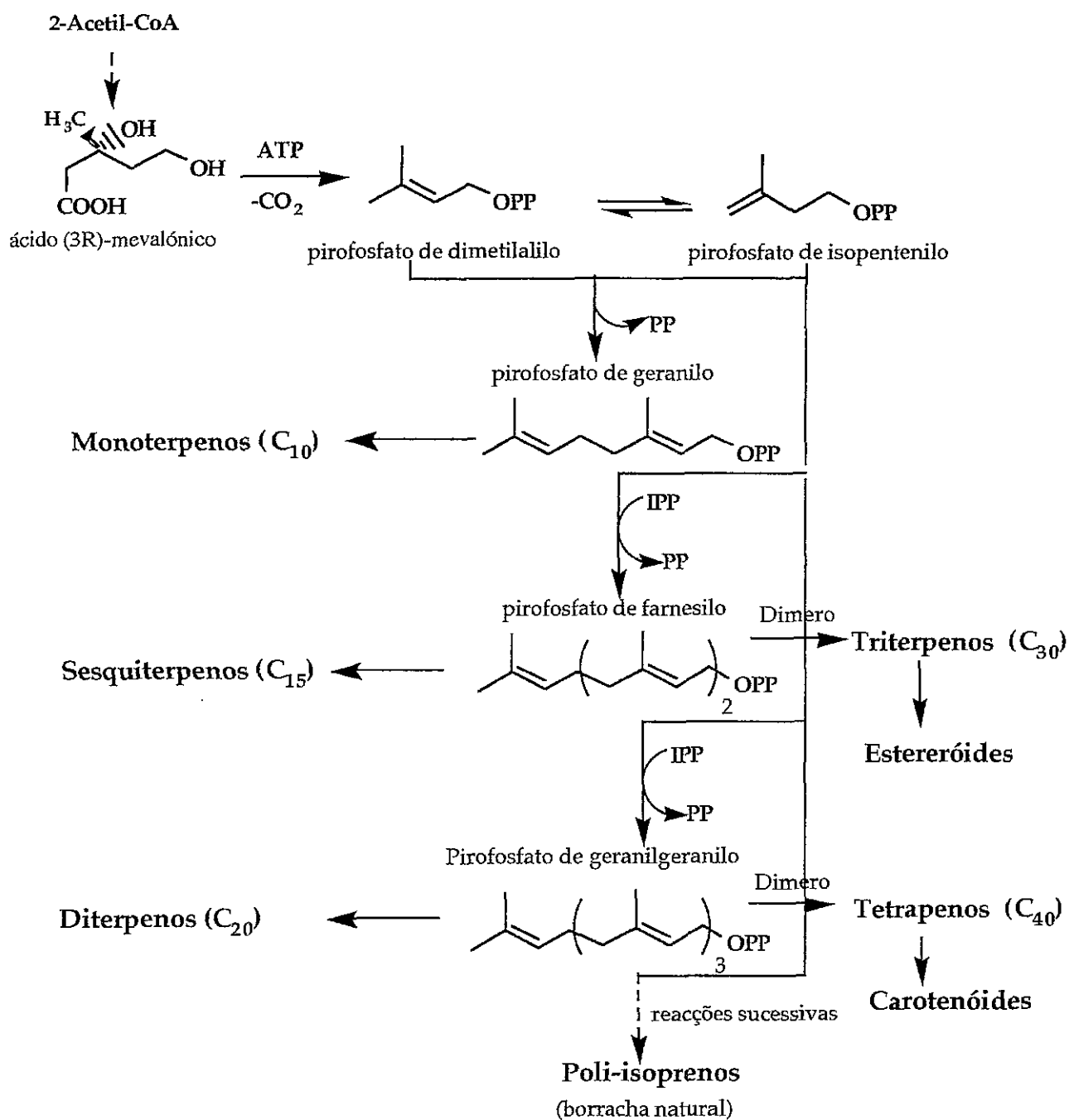


Esquema 3

De acordo com a regra do isopreno os terpenos podem ser considerados usualmente como produtos resultantes da ligação de varias unidades de isopreno (C_5). No entanto, cedo se demonstrou que tanto os esteróides, C_{27} , como muitos outros compostos semelhantes não obedecem a essa regra, o esqueleto destes compostos não pode ser explicado em termos da regra do isopreno pois a sua degradação não origina fragmentos cabeça-cauda.

Em 1959 Folkens isolou o ácido mevalónico e, posteriormente Bloch, Lynen, Connforth, Eggener e Popjak demonstram que este funciona como "bloco de construção" dos terpenóides.³⁵ Desta forma foi possível interpretar de forma correcta a biossíntese e as modificações secundárias dos terpenos. A biossíntese dos terpenóides inicia-se com a acetilcoenzima A, metabolito proveniente do metabolismo primário, e é uma parte da via biossintética que, em última instância, leva à formação poli-isoprenos (Esquema 4).

Os pirofosfatos de geranilo, de farnesilo, de geranilfarnesilo e de geranilgeranilo são obtidos a partir do ácido mevalólico, pela condensação inicial de uma unidade de pirofosfato de dimetilalilo, com uma unidade de pirofosfato de isopentenilo, seguida de condensações sucessivas de unidades de pirofosfato de isopentenilo (Esquema 4).^{29,35,36,37}



Esquema 4

1.1.4 Função dos óleos essenciais

Inicialmente pensava-se que os óleos essenciais nas plantas apresentavam, na maioria dos casos, funções ocasionais e eram considerados apenas como

produtos de excreção ou como desperdícios tóxicos do metabolismo, sem qualquer valor para a planta. Esta visão simplista deixou de ser aceite, embora não seja ainda claro o papel destes compostos nas plantas.

Existem alguns investigadores, entre eles Lutz,³⁸ que consideram que os componentes do óleo têm a função de moderar a oxidação intracelular de forma a proteger a planta contra a acção de agentes atmosféricos. Inclui também a possibilidade de alguns componentes poderem ser usados como fonte de energia, durante o estado de deficiência causado por uma interrupção anormal da assimilação de dióxido de carbono.

Foi também sugerido por outros observadores que as plantas que produzem consideráveis quantidades de óleos são protegidas do calor, nas estações mais quentes, já que uma quantidade considerável de calor é absorvida na vaporização do óleo. Deste ponto de vista o óleo deve funcionar como um mecanismo de poupança de água.³⁹

Considera-se que os óleos essenciais apresentam um papel ecológico.³⁰ Esta hipótese é suportada pela experiência, na qual se prova o papel de alguns terpenóides nas interacções da planta como agentes alelopáticos, inibidores em particular da germinação, bem como interacções planta-animal: protecção contra predadores (insectos e fungos), e atracção das espécies que dispersam o pólen da planta. Para alguns autores os terpenóides constituintes do óleo essencial suportam uma espécie de "comunicação", pensa-se que variedade estrutural dos terpenóides se deve a transferência selectiva destas "mensagens biológicas".³⁰

A inibição e os efeitos prejudiciais dos óleos em muitos processos biológicos foi encarado como uma vantagem no uso destes compostos como agentes bactericidas e fungicidas.

1.1.5 Aplicações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais e os compostos deles isolados são usados na Europa desde a Idade Média, em perfumaria e medicamentos, mas só a partir do século XIX estes produtos passaram a ter aplicação em grande escala.

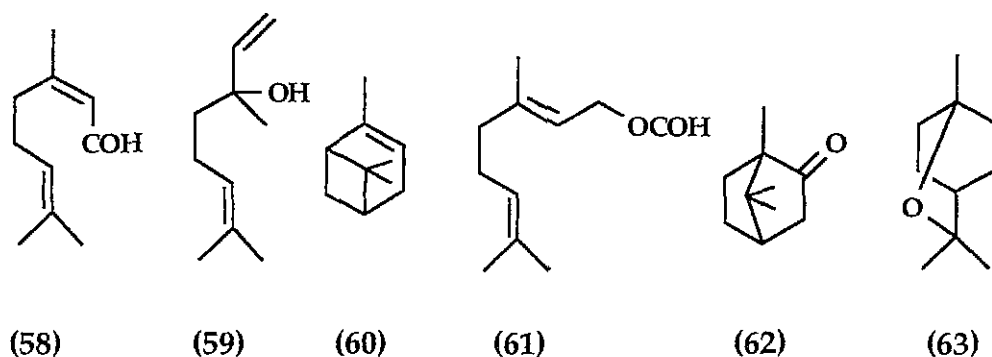
Os óleos essenciais apresentam actividade anti-séptica contra varias bactérias patogénicos, incluindo aquelas que são usualmente resistentes aos antibióticos. Muitos óleos essenciais são também activos contra fungos responsáveis por micoses e fermentos. As doses requeridas para a actividade são geralmente baixas, e estas quando determinadas em experiências *in vitro* são transferidas directamente para uso externo, e a maioria pode ser utilizado como defesa contra o agente patogénico. Os óleos essenciais conhecidos como tendo maior actividade anti-séptica são: o óleo de canela, o de alho, o de lavanda e o de eucalipto. Compostos tais como o citral (58), o geraniol (49) e o linalool (59) são respectivamente 5,2; 7,1 e 5 vezes mais anti-sépticos do que o fenol.³⁰

O óleo de terbentina³⁵ é usado no fabrico de tintas e tem como componente principal o α -pineno (60).²⁹

O citral (58) é um monoterpene que ocorre como uma mistura do isómeros *cis* e *trans* no óleo das folhas do limoeiro, sendo este composto o componente responsável pela utilização deste óleo, para conferir aroma de limão numa grande variedade de produtos.²⁹

Muitos monoterpeneos ou os seus ésteres, tais como o formato de geranilo (61), são usados no fabrico de perfumes e sabonetes.²⁹ A cânfora (62) é usada como plastificante.

Aplicações em estudo situam-se na área dos combustíveis alternativos, óleos ricos no monoterpeneo 1,8-cineol (63) foram testados como co-solvente em misturas de gasolina/etanol/água.⁴⁰



O óleo essencial das flores de *Acácia farnesiana* Willd^{6,41} foi utilizado desde o início do século na cosmética, principalmente no fabrico de perfumes, brilhantinas e *batons*.

Em geral o óleo das flores de *A. farnesiana* é utilizado no fabrico de perfumes pouco dispendiosos. No entanto, um perfume bastante conhecido, é até um clássico, tem como um dos seus componentes este óleo e designa-se por Chanel N° 5.⁶

Tendo em conta a acção bactericida de alguns monotepenos, um grande número de óleos essenciais foi também utilizado no tratamento de infecções urogenitais.³⁵

1.2 Amostragem e armazenamento do material a ser analisado^{42,43}

A finalidade de uma análise é a determinação da qualidade ou composição de um material; para que os resultados analíticos sejam válidos ou que tenham significado, é essencial que se adoptem processos de amostragem adequados. Chama-se amostragem ao processo de extracção de uma pequena porção que seja realmente representativa da composição de todo material.

Os métodos de amostragem são classificados em três grupos principais:

1. Aquele em que todo o material é examinado;
2. Amostragem casual (*ad hocc*);
3. Métodos em que se selecciona porções do material com base em critérios estatísticos.

O primeiro processo é, normalmente, impraticável, pois a maioria dos métodos usados são destrutivos e, em muitos casos, a quantidade de material a ser examinado é frequentemente em excesso.

O segundo processo de amostragem é totalmente não científico e pode levar a decisões formadas com informação inadequada.

Por estas razões, a única base de confiança para estabelecer um programa de amostragem deve ser baseada na estatística. Isto significa que, embora nem toda a amostra seja analisada, as limitações da selecção são calculadas cuidadosamente e a representatividade da amostra conhecida de antemão.

Na amostragem utilizada neste trabalho, tiveram-se em conta estes factores,

no entanto esta foi dificultada pelo facto da *Acácia dealbata* e *Acácia longifolia* serem espécies subespontâneas em Portugal, ou seja, que não é cultivada. Desta forma estas espécies distribuem-se de uma forma desordenada nos locais onde se desenvolvem. Nesse mesmo local desenvolvem-se outras espécies tais como eucaliptos, pinheiros e etc. É de referir ainda que se desconhece a idade real de todas as árvores utilizadas na amostragem.

1.3 Extracção dos componentes voláteis

Há muitas décadas que se procura otimizar a extracção dos óleos essenciais das plantas, existem actualmente já um grande número de métodos utilizados.

Os diferentes métodos de extracção têm como objectivo reproduzirem de modo mais fiel possível as características dos materiais de origem, ou seja, pretende-se evitar, durante o processo de extracção, a alteração da composição do extracto. Sabe-se que os óleos essenciais são constituídos por uma grande variedade de componentes, muitos deles em quantidades vestigiais. Desta forma, pretende-se também que durante o processo de extracção não ocorram perdas dos diferentes componentes do óleo essencial.

Outra característica muito importante do método de extracção é que este seja reprodutível.

Como já foi referido atrás, existe uma grande variedade de métodos de extracção de óleos essenciais, iremos referir alguns dos mais utilizados, tais como, extracção por arrastamento de vapor, extracção por solvente, extracção por arrastamento de vapor/solvente extractor e extracção com fluidos supercríticos.

1.3.1 Extracção por arrastamento de vapor

A extracção por arrastamento de vapor é um dos métodos de extracção mais antigos e mais utilizados ainda hoje, principalmente no caso de plantas ricas em óleos essenciais.

O princípio da extracção por arrastamento de vapor consiste na ruptura das paredes das glândulas oleíferas pelo calor gerado pela corrente de vapor de água, seguido do arrastamento das gotículas de óleo pela referida corrente; após a condensação do vapor, o óleo sobrenadante é facilmente recolhido. No entanto, existe sempre uma certa percentagem de óleo que se dissolve na água, desta forma, é necessário fazer uma extracção, com solvente, da água utilizada na destilação por arrastamento de vapor. Este método apresenta o inconveniente de poder originar perdas do material volátil, pois a solução que contém o óleo tem que ser concentrada por evaporação.⁴⁴

Além disso impurezas presentes mesmo em solventes ultra puros prejudicam a análise quando se trabalha na escala dos ppm.⁴⁴

Em algumas plantas os baixos teores em óleos essenciais tornam, este método impraticável.

1.3.2 Extracção por solvente

Nesta técnica o material vegetal é mergulhado num solvente orgânico apropriado, durante o tempo necessário, para que os compostos solúveis neste solvente possam ser extraídos. Trata-se de uma técnica bastante eficaz, em que uma pequena quantidade de material de partida da planta é colocada num recipiente contendo um solvente apropriado, cuja composição é analisada ao fim de um tempo pré-determinado.

A selecção do solvente é influenciada por parâmetros técnicos e económicos: a selectividade (bom solvente para os constituintes das fragâncias); a estabilidade, em outras palavras que seja quimicamente inerte; o ponto de ebulição: não muito alto, de forma a facilitar a posterior remoção do solvente, no entanto não muito baixo, para limitar perdas e custos de controlo; e permitir a extracção com

segurança (se possível, não tóxico nem inflamável).

Anonis⁶ usou este método para obter os óleos essenciais de *A. farnesiana* Willd e *A. caveria* Hook. As flores moídas de cada uma das espécies foram maceradas em álcool tendo obtido um óleo castanho, a que chamou extracto absoluto. Após concentração do extracto fez a destilação por arrastamento de vapor, obtendo um óleo incolor a que chamou extracto concreto, constituído pelos componentes voláteis da planta.

G. Lognay *et al.*⁴⁵ combinaram o método de extracção com solvente com o método de destilação com arrastamento de vapor/solvente extractor. As sementes de *R. alpinia* foram moídas e extraídas com n-hexano por um sistema de soxhlet, obtendo-se depois de concentrado o extracto, um óleo castanho escuro. De forma a extrair o óleo essencial, uma pequena quantidade deste óleo foi previamente disperso em água e submetido a destilação por arrastamento de vapor/solvente extractor num micro sistema Likens-Nickerson desenhado para a extracção de solventes menos densos que a água.

Um dos grandes inconvenientes, do método de extracção com solventes orgânicos, é o facto de extrair conjuntamente compostos voláteis e não voláteis.

1.3.3 Extracção por arrastamento de vapor/solvente extractor

Para amostras com pequenas quantidade de óleo essencial, o método de extracção por arrastamento de vapor pode originar perdas significativas. Para tais casos surgiu um método que alia a extracção por arrastamento de vapor à extracção com solvente, usando para o efeito sistemas do tipo Likens-Nickerson.⁴⁶ Este método é particularmente usado na extracção de óleos essenciais de flores.^{47,48}

Neste método a amostra é mergulhada em água, seguidamente através do aquecimento gera-se uma corrente de vapor de água que, em conjunto com os componentes voláteis, entram em contacto com o solvente volatilizado (imiscível em água). Os vapores heterogêneos são condensados numa superfície fria, e o óleo essencial dissolvido no solvente separa-se da água baseado numa diferença de densidade e miscibilidade (Figura 3).⁴⁹

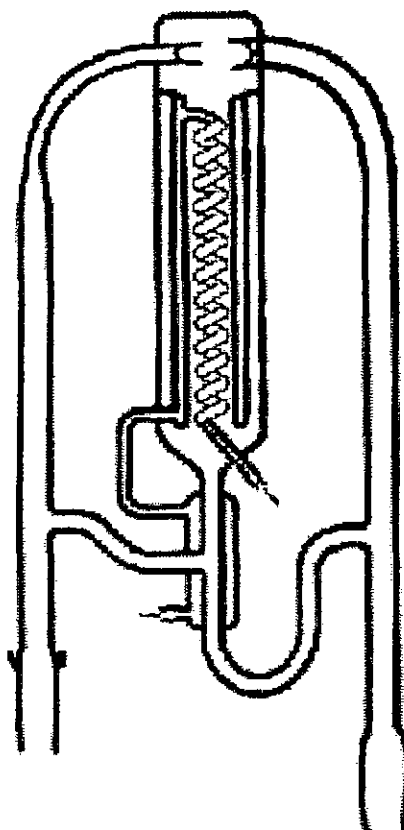


Figura 3 - Sistema do tipo Lickens-Nickerson utilizado ao longo deste trabalho.

Godefroot *et al.*⁴⁴ referem a utilização deste método no isolamento do óleo essencial das flores *R. simsii*, e as suas vantagens em amostras com baixa quantidade de óleos essenciais. Além disso pode ser utilizado também quando se tem um pequena quantidade de material. No entanto, este processo de extração apresenta a desvantagem de ser necessário a evaporação do solvente.

Um sistema Lickens-Nickerson modificado,^{46,50} foi elaborado de forma a

evitar a concentração do extracto. No entanto, este método apresenta a particularidade de se usar uma muito pequena quantidade de amostra.

De forma a tornar a extracção mais eficaz, existe um método que associa a extracção por arrastamento de vapor/solvente extractor a pressão reduzida,^{5,48} neste método reduz-se a temperatura em que ocorre a extracção e desta forma reduz-se também a possível formação de artefactos.

1.3.4 Extracção com fluidos supercríticos^{51,52}

Nas últimas décadas existiu um desenvolvimento de métodos de extracção com fluidos supercríticos, dos quais o dióxido de carbono tem sido o mais usado. Este apresenta vantagens consideráveis tais como ser: um produto natural, quimicamente inerte, não inflamável, não tóxico, de fácil eliminação e selectivo.

Não necessita de tecnologia muito evoluída, uma vez que as condições de temperatura e pressão críticas são bastante razoáveis (PC 73.8 bars e TC 31.06 °C). A maior vantagem é no entanto, a capacidade deste fluido produzir extractos de composição muito próxima dos produtos naturais de origem, e a possibilidade de um ajuste fino e selectivo de temperatura e pressão (para além do ponto critico, o fluido deve ter a densidade de um líquido e a viscosidade de um gás de qualquer forma este deve-se difundir através de sólidos, e deve ser um bom solvente).

O método de extracção com fluidos supercríticos é utilizado especialmente na química fina e de forma mais particular na extracção industrial de compostos naturais, embora também seja usado na descafeinação do café e na redução da nicotina do tabaco.

A baixa viscosidade destes fluidos e o seu elevado coeficiente de difusão, permite uma elevada eficiência na extracção num curto espaço de tempo.

O CO₂ supercrítico é um solvente que apresenta uma grande selectividade; são solúveis neste os componentes de baixa massa molecular quer álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, ácidos, ésteres e hidrocarbonetos. Na mesma família a solubilidade no CO₂ supercrítico diminui com a massa molecular. A adição de um grupo polar (ácido carboxílico) na molécula também traz consigo um decréscimo da solubilidade. As clorofilas, os carotenóides, os açucars, os alcalóides, os aminoácidos, e a maioria dos compostos inorgânicos são insolúveis.

Este método apresenta ainda as vantagens, de ser muito seguro, ocorrer num meio quimicamente inerte, não deixar resíduos no extracto e de ter características semelhantes à dum solvente apolar, como o pentano ou hexano.

1.4. Execução experimental e resultados

1.4.1 Reagentes e equipamento

Os solventes utilizados eram analiticamente puros ou comerciais, purificadas por destilação.

A análise de GC-MS^{53,54} foi realizada usando um espectrómetro de massa Hewlett Packard MSD 5970.

O cromatografo de gás foi equipado com uma coluna capilar tipo de DB-5 (60m x 0.32 mm i.d.) JW.

Foi utilizado como gás de arraste o hélio com velocidade linear de 25 cm/s.

As condições cromatográficas usadas foram as seguintes: temperatura do injector 200 °C; temperatura do detector 250 °C; split : 1:100; temperatura inicial : 50 °C (10 min.); 1º gradiente : 1°C/min. (até os 100 °C); 2º gradiente : 2°C/min. (até os 250 °C); temperatura final : 250 °C (15 min). Volume injectado : 0.1 µl.

1.4.2 Amostragem e armazenamento

Como já foi referido em 2., torna-se muito difícil fazer uma amostragem muito cuidada, já que o género *acácia* em Portugal é sub-espontâneo. No entanto, teve-se o cuidado de recolher material em diferentes árvores , em árvores de dimensões comparáveis e tendo em conta factores exteriores tais como a proximidade de estradas, etc.

As diferentes amostras das espécies de *acácia* foram recolhidas na zona da Costa Nova, junto ao litoral Aveirense. As espécies de *acácia* que foram estudadas

do ponto vista da sua composição em voláteis, foram a *A. dealbata* e a *A. longifolia*.

Fizeram-se duas amostragens das duas espécies de *acácia*, uma em Outubro de 1991 em que foram recolhidas folhas e outra em Março de 1992 em que foram recolhidas folhas, flores e sementes.

As diferentes amostras foram agrupadas (folhas, semente e flores), e guardadas a -10°C , até à extracção.

As duas árvores foram classificadas pelo departamento de Biologia - Universidade de Aveiro, no início do trabalho.

1.4.3 Extracção dos componentes voláteis

Foi inicialmente testado o método mais utilizado na extracção de voláteis, o método de arrastamento de vapor,⁵⁵ que no entanto deu resultados pouco satisfatórios. Com este método não foi possível extrair o óleo essencial das folhas de *Acácia dealbata*, talvez por este existir numa percentagem muito baixa.

Foram testadas duas modificações do método:

1. Aquecendo o balão que contém as folhas, com o objectivo de evitar que a água condensasse neste. Contudo, só se obtém óleo quando a amostra é carbonizada. Verificou-se que o óleo que era inicialmente amarelo, se torna castanho após algum tempo, devido talvez a decomposição dos componentes existentes no óleo de *A. dealbata*.

2. Fez-se passar pelo balão onde se gera o vapor de água uma corrente de azoto, para tentar que a corrente do vapor arrastador fosse maior. No entanto não se verificou a deposição de qualquer óleo essencial.

Desta forma, tornou-se necessário a introdução de um método de extracção de voláteis que fosse mais eficiente. Neste sentido foi testado o método de destilação por arrastamento de vapor/solvente extractor usando um sistema de Likens e Nickerson.⁴⁵

Os resultados preliminares foram satisfatórios, no entanto houve que ajustar vários factores, tais como:

- a) Solvente a utilizar;
- b) Tempo da extracção;
- c) O método ideal para proceder à concentração da amostra;
- d) Avaliação das possíveis perdas dos compostos voláteis durante o processo de extracção;

a) Foram testados dois solventes o n-hexano e o éter etílico. Verificou-se por GC-MS dos extractos obtidos pelos dois solventes, que o éter etílico permite extrair um maior número de compostos, principalmente os mais polares.

b) Para estimar o tempo ideal para a extracção foram efectuadas vários ensaios, com tempos de extracção de 2, 3, e 6 horas, e ainda uma extracção de 6 horas com renovação de amostra a meio da extracção. Verificou-se, que neste teste se consegue extrair um maior número de compostos, de acordo com os cromatogramas obtidos por GC-MS. A renovação da amostra a meio tem como objectivo, aumentar a concentração dos compostos extraídos, evitar que se evaporem os compostos mais voláteis e principalmente permite detectar compostos que de outra forma não seria possível identificar.

c) A concentração da amostra é um ponto crucial deste processo. Desta forma foi necessário encontrar um método em que não se verifiquem perdas significativas dos compostos ao longo do processo e também que evite a sua

possível degradação térmica. Foi utilizado um dispositivo provido com um condensador de azoto líquido e um balão de recolha, o que permite evaporar o solvente a temperatura ambiente e sob vácuo. O solvente recolhido foi concentrado e também analisado por GC-MS, não se detectando nenhum composto, o que prova que a concentração do extracto se faz sem perdas significativas de compostos voláteis.

Na extracção dos óleos essenciais da *A. dealbata* e *A. longifolia* foi utilizada a destilação por arrastamento de vapor/solvente extractor num sistema de Likens e Nickerson, tendo-se usado 3 amostras de cada espécie:

- Folhas;
- Flores;
- Sementes;

As condições da extracção foram as seguintes:

- 6 horas, com renovação da amostra a meio da extracção;
- Éter etílico como solvente;
- 100 g de amostra (no total 200g) e 1litro de água;

Após a evaporação do solvente nos diferentes extractos, a percentagem de óleo foi determinada por pesagem, Tabela 3.

Extracto	Peso do óleo (g)	% de óleo
<i>A. dealbata</i> flores	1,0231	0,51
<i>A. dealbata</i> folhas	1,2015	0,60
<i>A. dealbata</i> sementes	0,8954	0,45
<i>A. longifolia</i> flores	1,0543	0,53
<i>A. longifolia</i> folhas	1,1210	0,56
<i>A. longifolia</i> sementes	0,9943	0,50

Tabela 3 - O peso e a percentagem do óleo essencial de a *A. dealbata* e a *A. longifolia*.

1.4.4 Análise e identificação

Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com a base de dados informatizada do referido equipamento.

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4-9 e nas Figuras 4-9.

N ^o	COMPOSTO
1	2-(Z)-penteno-1-ol
2	n-hexanal#
3	2-hexenal
4	3-(Z)-hexeno-1-ol
5	4-(E)-hepteno-2-ol
6	2-heptanol*

Tabela 4 (cont.)

N ^o	COMPOSTO
7	3,4-dimetil-heptano
8	fenol
9	2,6-nonadieno-1-ol
10	octanal#
11	3-metilheptano-2-ol
12	acetato 4-(Z)-hexeno-1-ilo
13	álcool benzílico*#
14	undecano-2-ol
15	2-feniletanol*# ▶
16	coumarina# ▶
17	butanoato de linalilo
18	β-pineno*#
19	9-(E)-octadeceno
20	3,7-dimetilnonano
21	7-propiltridecano

Tabela 4 - Análise dos componentes voláteis identificados nas folhas da *A. longifolia*

N ^o	COMPOSTO
1	1-octeno
2	cis-ocimeno*#
3	α-felandreno
4	p-cimeno
5	formato de linalilo
6	3-tujeno-2-ol
7	α-terpineol# ▶
8	β-mirceno*#
9	n-nonadecano*# ▶
10	ciclo-hexadecano
11	n-icosano ▶

Tabela 5 - Análise dos componentes voláteis identificados nas flores da *A. longifolia*

N ^o	COMPOSTO
1	3-(Z)-hexeno-1-ol ▶
2	2-heptanol*
3	acetato de 3-(Z)-hexeno-1-ilo ▶
4	cis-ocimeno*#
5	β-pineno*#
6	butanoato de linalilo
7	formato de linolilo

Tabela 6 - Análise dos componentes voláteis identificados nas sementes da *A. longifolia*

N ^o	COMPOSTO
1	n-hexanal# ▶
2	1,4-hexadieno
3	3-metil-heptanol
4	3-careno
5	α -pineno*
6	2,4-nonadienal*#
7	<i>p</i> -cimeno
8	<i>cis</i> -ocimeno*#
9	β -pineno*#
10	2-feniletanol*# ▶
11	formato de linalilo
12	butanoato de linalilo
13	iridomirmecino
14	3,8-dimetilundecano
15	dodecano#
16	γ -muuroleno
17	9-(<i>Z</i>)-tricoseno
18	n-octadecano*

Tabela 7 - Análise dos componentes voláteis identificados nas folhas da *A. dealbata*

N ^o	COMPOSTO
1	4-metoxibenzoato de etilo
2	metilcinamato
3	2,3-dimetil-heptadecano
4	pentacosano
5	α -farnaseno ▶
6	n-tridecano
7	11,15-octadecadienoato de metilo
8	9-(<i>Z</i>)-tricoseno
9	n-hexadecano
10	1-nonadeceno
11	6-metiloctadecano
12	octadecanal
13	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona ▶
14	7,10-hexadecadienoato de metilo
15	9-(<i>Z</i>)-octadecanal
16	2-metil-8-propildodecano

Tabela 8 - Análise dos componentes voláteis identificados nas flores da *A. dealbata*

N°	COMPOSTO
1	tujeno
2	1,8-cineol
3	aromandendreno
4	γ -muuroleno

Tabela 9 - Análise dos componentes voláteis identificados nas sementes da *A. dealbata*

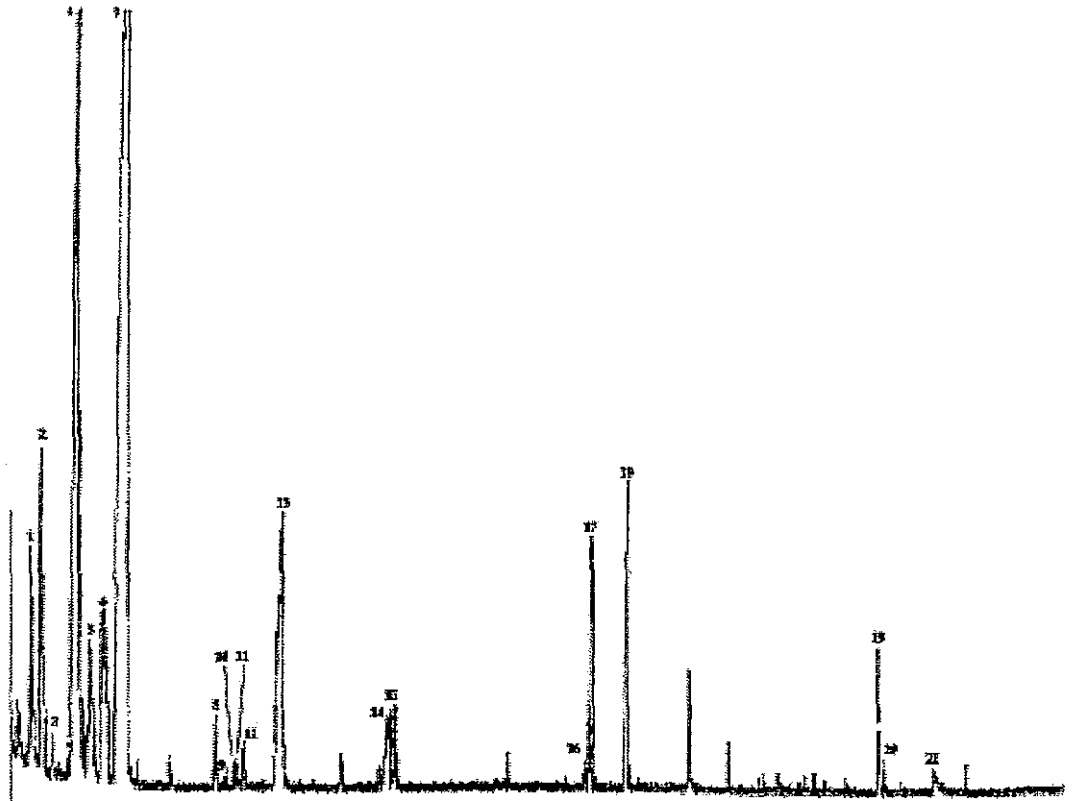


Figura 4 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das folhas de *A. longifolia*.

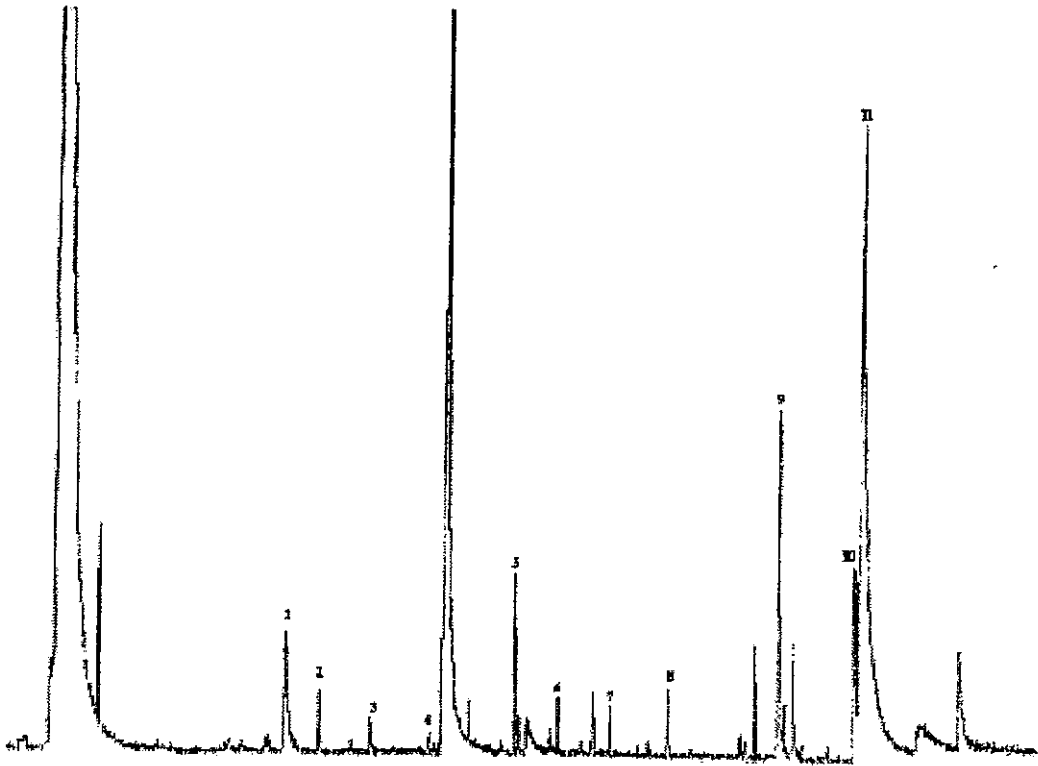


Figura 5 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das flores de *A. longifolia*.

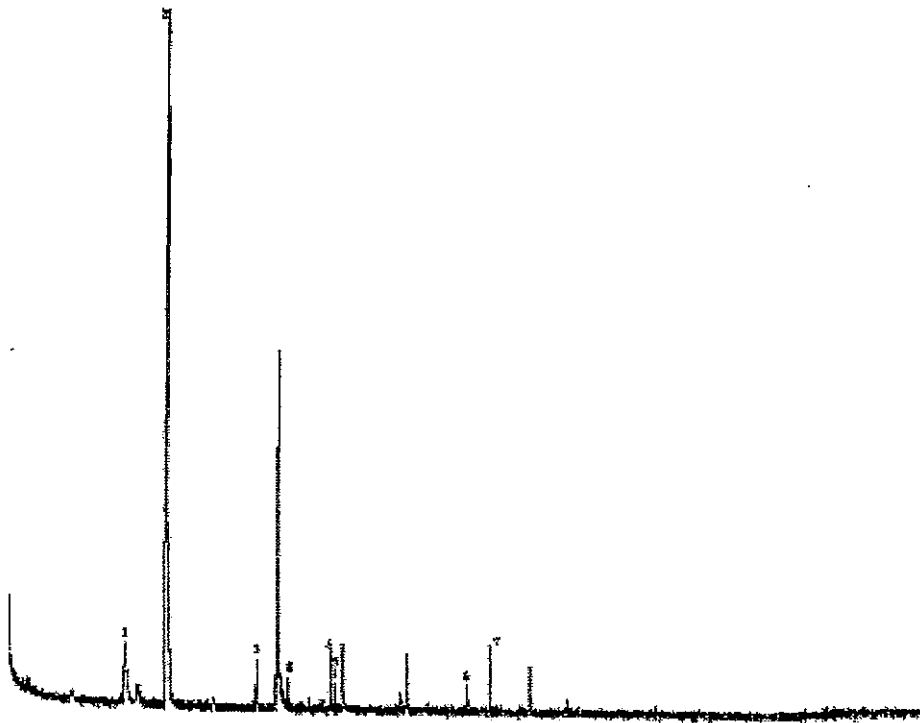


Figura 6 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das sementes de *A. longifolia*.

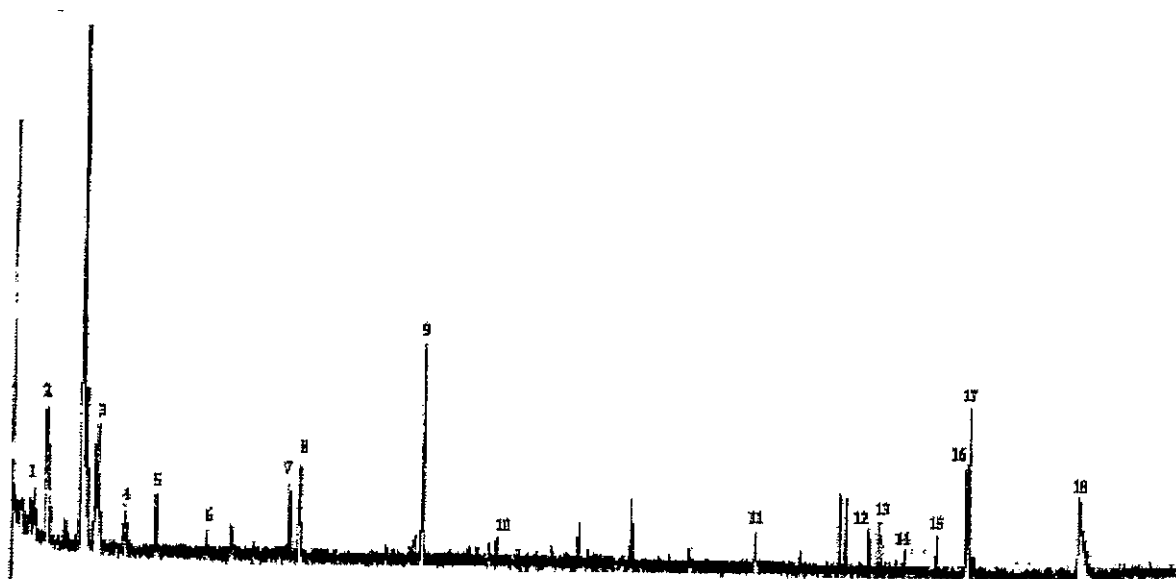


Figura 7 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das folhas de *A. dealbata*.

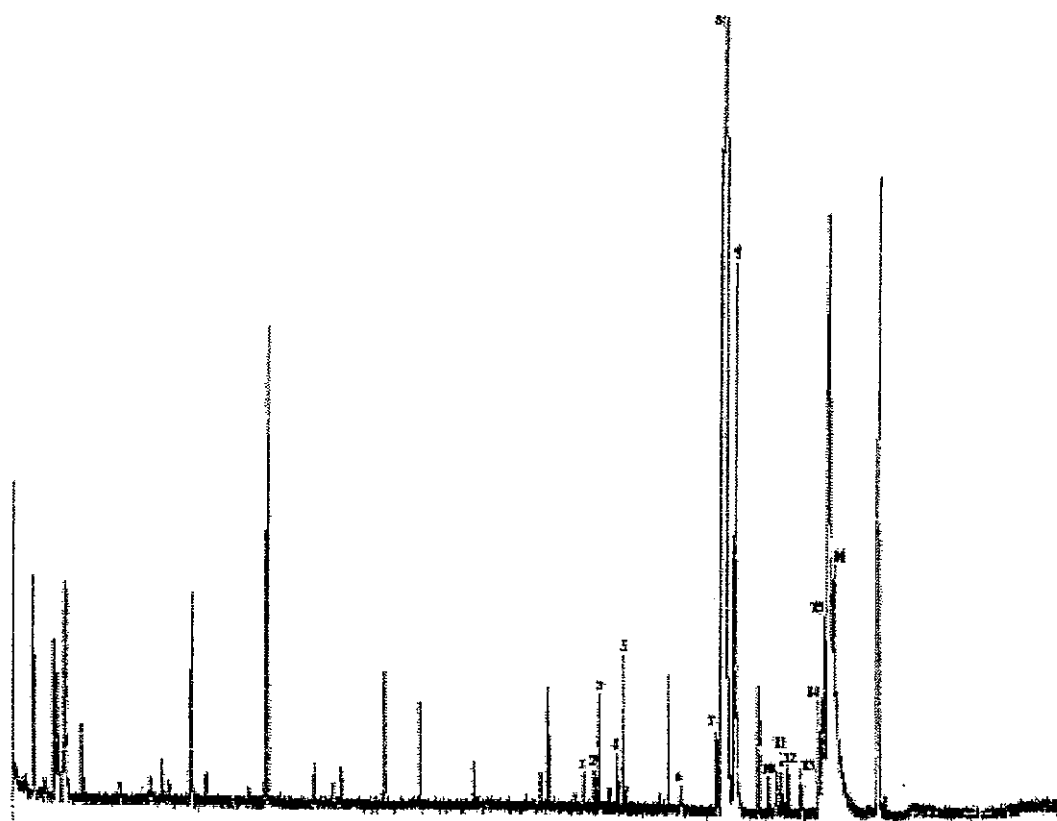


Figura 8 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das flores de *A. dealbata*.

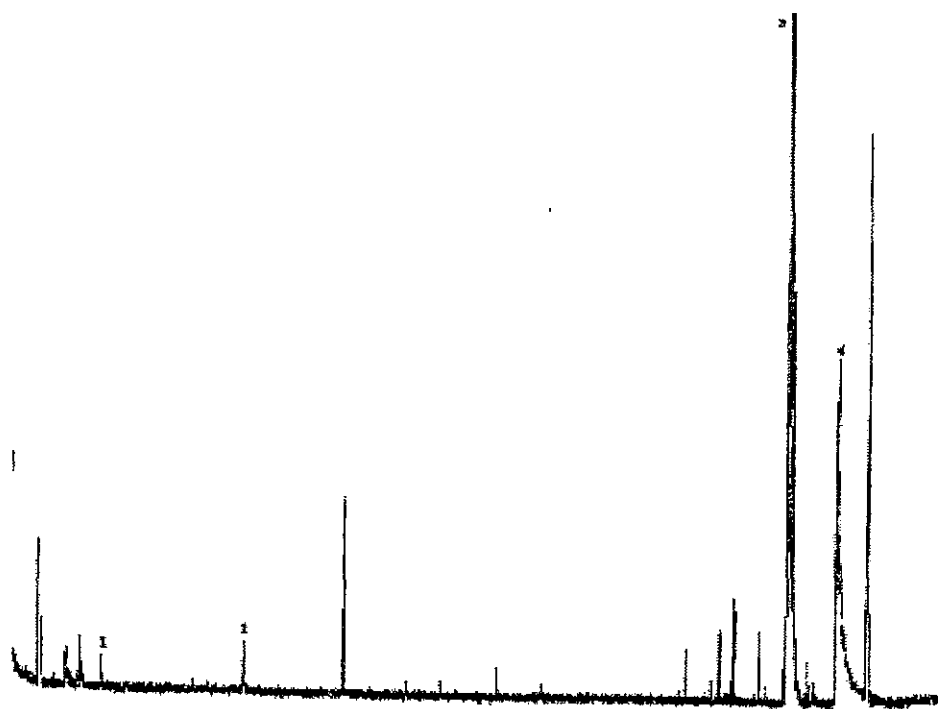
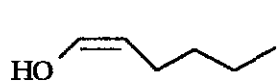


Figura 9 - Cromatograma típico dos componentes voláteis das sementes de *A. dealbata*.

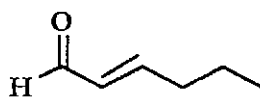
Estruturas dos compostos identificados na fracção de voláteis de *A. longifolia* e *A. dealbata*.



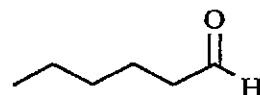
2-(Z)-penteno-1-ol



3-(Z)-hexeno-1-ol



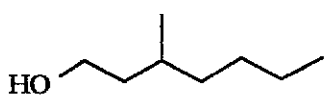
2-hexenal



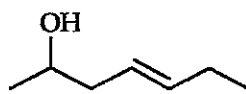
n-hexenal



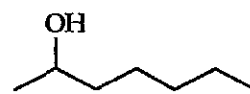
1,4-hexadieno



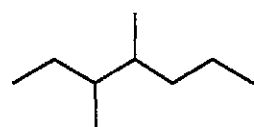
3-metil-heptanol



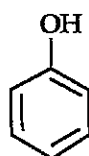
4-(E)-hepteno-2-ol



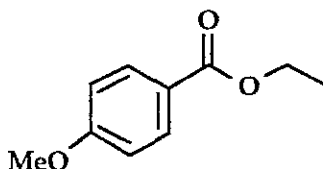
2-heptanol



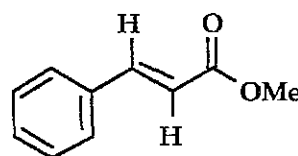
1,4-hexadieno



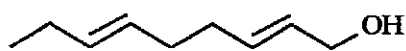
fenol



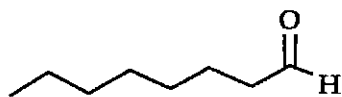
4-metoxibenzoato de etilo



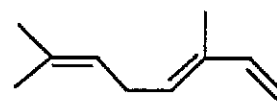
cinamato de metilo



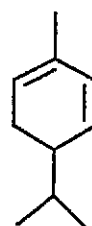
2,6-nonadieno-1-ol



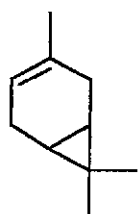
octanal



cis-ocimeno



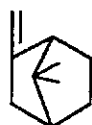
α -felandreno



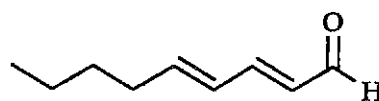
3-careno



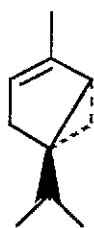
α -pineno



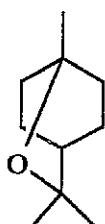
β -pineno



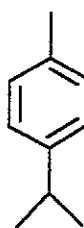
2,4-nonadienal



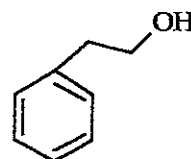
tujeno



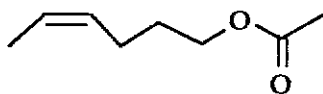
1,8-cineol



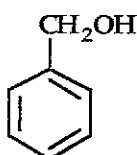
p-cimeno



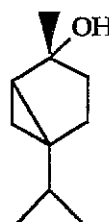
2-feniletanol



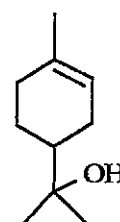
acetato de 4-(Z)-hexeno-2-ilo



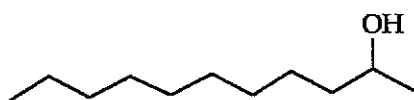
álcool benzílico



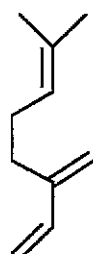
3-tujeno-2-ol



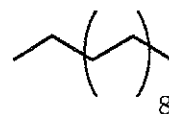
α -terpineol



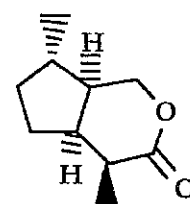
undecano-2-ol



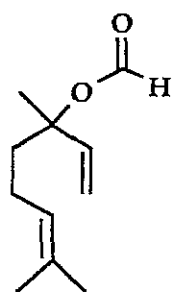
β -mirceno



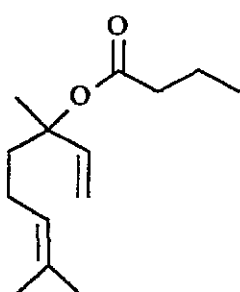
n-nonadecano



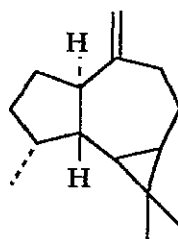
iridomirmecino



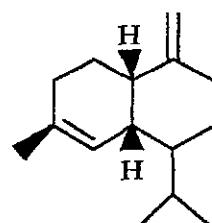
formato de linalilo



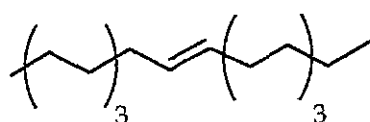
butanoato de linalilo



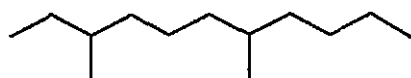
aromandendreno



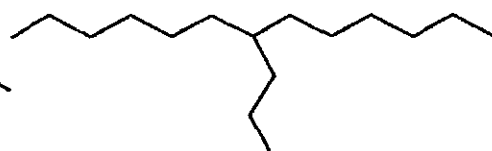
γ -muuroleno



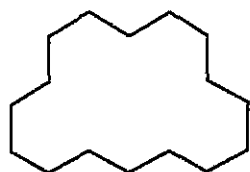
9-(*E*)-octadeceno



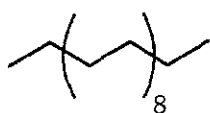
3,7-dimetilnonano



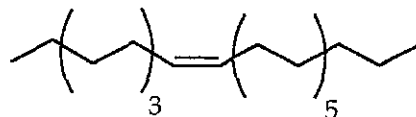
7-propiltridecano



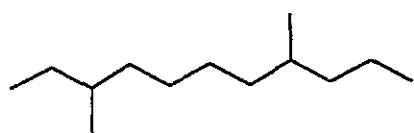
ciclo-hexadecano



n-icosano



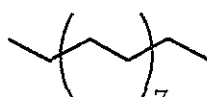
9-(*Z*)-tricoseno



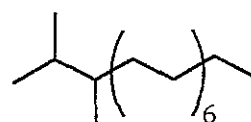
3,8-dimetilundecano



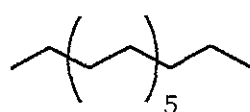
dodecano



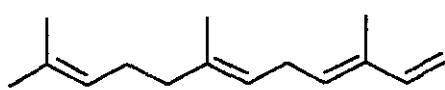
n-octadecano



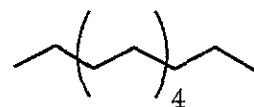
2,3-dimetil-heptadecano



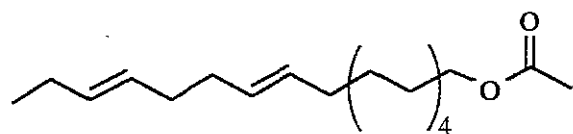
pentadecano



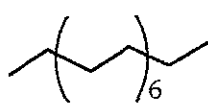
α -farnaseno



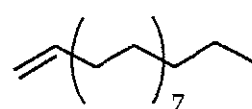
n-tridecano



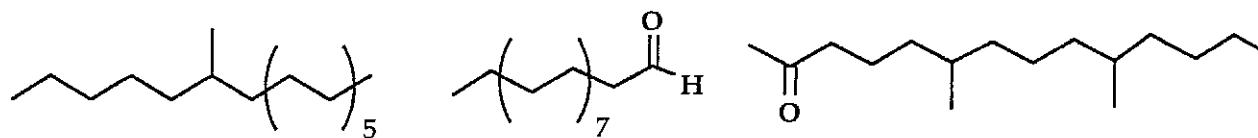
11,15-octadecadionato de metilo



n-hexadecano



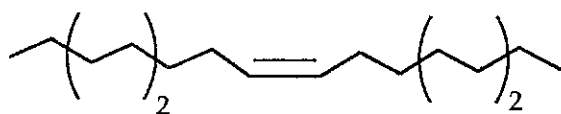
1-nonadeceno



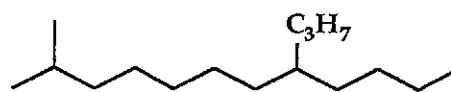
6-metiloctadecano

octadecanal

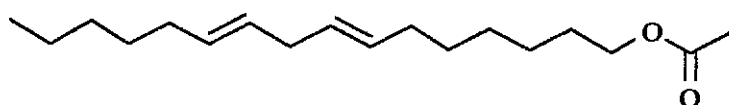
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona



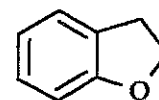
9-(Z)-octadecenal



2-metil-8-propildodecano



7,10-hexadecadienoato de metilo



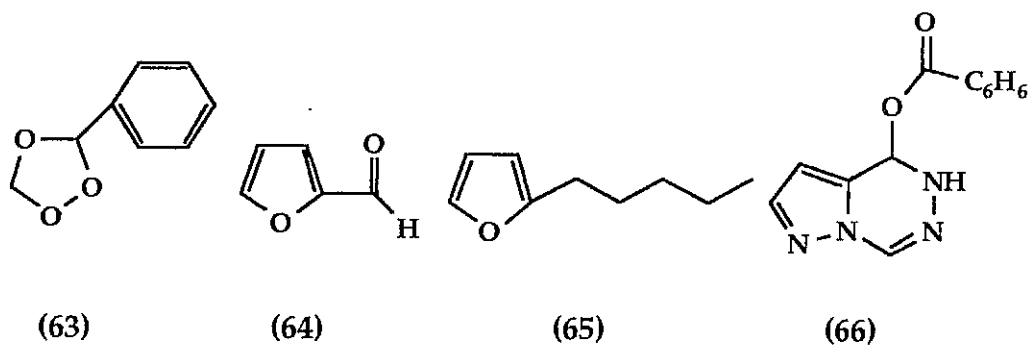
coumarina

1.4.5 Crítica e discussão dos resultados

Podemos considerar que em termos de extracção os resultados obtidos são razoáveis. Um dos problemas do processo de extracção é talvez a formação de novos compostos por degradação dos componentes naturais. Além dos compostos identificados nos diferentes extractos de *A. dealbata* e *A. longifolia*, Tabela 4-9, foram identificados alguns compostos que por serem pouco abundantes na natureza,^{56,57,58} são dificilmente considerados como componentes naturais da *acácia*.

Desta forma, os seguintes compostos identificados nos componentes voláteis de *A. dealbata* e *A. longifolia* são considerados como artefactos: 3-fenil-1,2,4-trioxalano (64), 2-furanocarboxaldeido (65), 2-pentilfurano (66) e pirazolo(5,1,c)-as-triazina-4-ol (67).





No que diz respeito a identificação não se pode considerar que os resultados sejam totalmente satisfatórios, pois esta foi baseada fundamentalmente na análise do espectro de massa dos compostos e da sua comparação com a base de dados do GC-MS.

De forma a complementar esta identificação foi efectuado um estudo do espectro de massa dos compostos e a sua comparação com a bibliografia disponível.⁵⁹

Um dos maiores problemas da identificação diz respeito aos monoterpenos e sesquiterpenos, uma vez que os espectros de massa dos diferentes isómeros são muito semelhantes, sendo praticamente impossível distingui-los apenas tendo em conta o MS.⁶⁰

Todos os compostos identificados neste estudo, foram identificados pela primeira vez nas espécies *A. dealbata* e *A. longifolia*. No entanto estudos na composição de voláteis foram efectuados em outras espécies de *Acácia*; *A. farnesiana* Willd,^{5,6} *A. rigidula* Benth,⁵ *A. berlandieri* Benth⁵, *A. cavenia* Hook e Arn.⁶ e *Acacia confusa* Merr..⁶¹

Os compostos assinalados com um asterisco (*), nas Tabelas 4-9, foram também identificados nos componentes voláteis da *A. berlandieri* Benth., *A. rigidula* Benth. e *A. farnesiana* Willd..⁵

Os compostos assinalados com o símbolo #, nas Tabelas 4-9, foram também

identificados nos componentes voláteis da *A. farnesiana* Willd..⁶

Os compostos assinalados com o símbolo **D**, nas Tabelas 4-9, foram também identificados nos componentes voláteis da *A. confusa* Merr..⁶¹

2. Triterpenos e esteróides

2.1 Introdução

Os triterpenóides constituem um dos grupos de compostos naturais com origem na via biossintética do ácido mevalónico (metabolismo secundário).⁶² Apesar do termo triterpenóide se referir a compostos com 30 átomos de carbono, ele aplica-se também a numerosas substâncias em que esse número pode ser maior ou menor, possuindo, no entanto, toda uma biogénese comum.⁶³

O interesse na presença de triterpenos em bactérias não-fotossintéticas advém de aspectos evolucionistas e funcionais.⁶⁴ Guy Ourisson⁶⁵ postulou que a presença de triterpenos em sedimentos orgânicos fósseis se deve à derivação filogenética de vários tipos de compostos orgânicos, pelos progressivos registos de novos sistemas enzimáticos.⁶³

Na natureza ocorrem triterpenos acíclicos, embora eles geralmente se apresentem ciclizados. As estruturas policíclicas formam-se a partir do esqualeno⁶⁶ ou do 2,3-epoxiesqualeno,⁶⁷ dependendo do produto final e do modo como o precursor foi previamente rearranjado (conformações pré-cadeira e pré-barco).

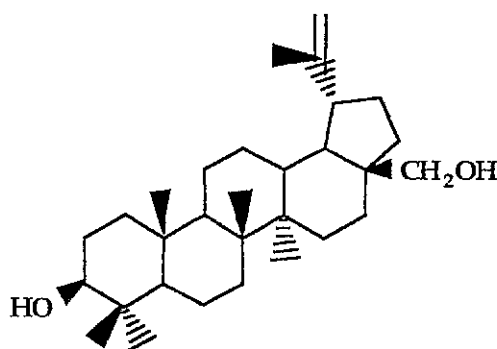
Embora o uso de compostos deste tipo em medicina seja bastante limitado, diversos trabalhos recentes demonstram o seu grande potencial como drogas.⁶³

2.2 Nomenclatura de triterpenóides e de esteróides

Tal como para os monoterpenos para os triterpenóides e esteróides podem distinguir-se dois tipos de nomenclatura muito utilizados: a nomenclatura trivial

e a nomenclatura semi-sistemática.

A nomenclatura sistemática baseia-se nas regras IUPAC,⁶⁸ como seria conveniente devido à complexidade estrutural deste tipo de compostos. Por exemplo, o composto a seguir representado (68, betulina) poderia ter os seguintes nomes sistemáticos:⁶⁹ "5a,5b,8,8,11a-pentametil-3a-hidroximetil-1-isopropenil-eicosa-hidro-1H-ciclopenta(a)-criseno-9-ol " ou " (3aS)-9c-hidroxi-5at,5bc,8,8,11ac-pentametil-3ar-hidroximetil-1t-isopropenil-(7atH,11btH,13acH)-eicosa-hidro-1H-ciclopenta(a)criseno ".



(68)

Na nomenclatura trivial, segundo as recomendações da IUPAC,^{67,70} o nome do composto deriva do nome em latim da fonte biológica de onde o composto foi isolado. Actualmente esta prática é em geral utilizada embora os compostos isolados há mais tempo tenham, por vezes, nomes baseados nouro tipo de considerações. Como exemplo podem citar-se:

- ferneno de "fern" (feto em inglês);⁷¹
- friedelina em homenagem a Friedel;⁷²
- lanosterol de lana (extraído da gordura da lã);⁷³
- betulina das espécies de *Betula*;⁷⁴
- lupeol de *Lupinus luteus*;⁷⁵

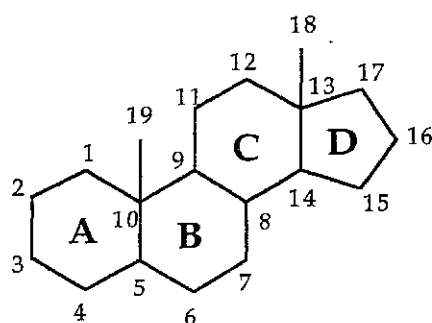
- ácido oleanólico de *Olea europaea*;⁷⁶

No entanto, a nomenclatura mais utilizada é sem dúvida, a semi-sistemática, adaptando-se, quando possível, às regras de nomenclatura dos esteróides,^{33,77,78,79,80} e os próprios triterpenóides sob o ponto de vista biossintético. Assim, consideram-se estruturas fundamentais com estereoquímica implícita, nomes e numerações apropriadas, aos quais se juntam indicações quando existem quaisquer modificações ou presença de grupos funcionais, seguindo-se os princípios da nomenclatura sistemática.⁶⁷

Até ao momento, têm-se escolhido, como base, nomes e estruturas relacionadas com o triterpeno biogeneticamente mais simples, sob a forma de hidrocarboneto saturado. Estas estruturas saturadas, esqueletos fundamentais, não são necessariamente os compostos isolados das fontes naturais, mas apenas um suporte para a nomenclatura. Como exemplos podem indicar-se:

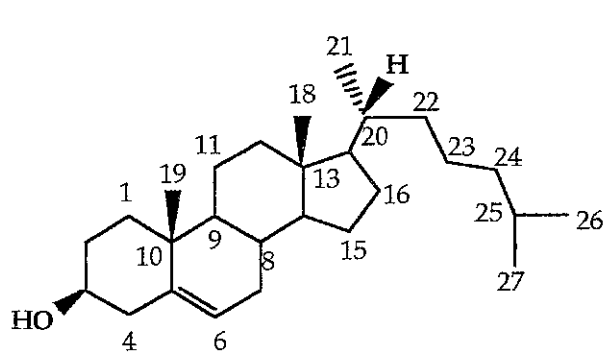
- a) Esqueleto do lanostano para o lanosterol;
- b) Esqueleto do lupano para o lupeol;

Para muitos compostos triterpênicos existem numerações bem estabelecidas com base em considerações biogenéticas e na aplicação dos princípios estabelecidos pela IUPAC.⁶⁷ No entanto, sempre que possível, a numeração de compostos triterpênicos tetracíclicos é a recomendada pela IUPAC.^{33,73,74} Os esteróides têm como estrutura base um núcleo de ciclofenantreno; os dois grupos metilos que se representam , em C-10 e C-13, aparecem como substituintes correntes nesta estrutura. Quando não participam em ligações duplas, os átomos de carbono 5, 8, 9, 10, 13 e 14 são assimétricos.



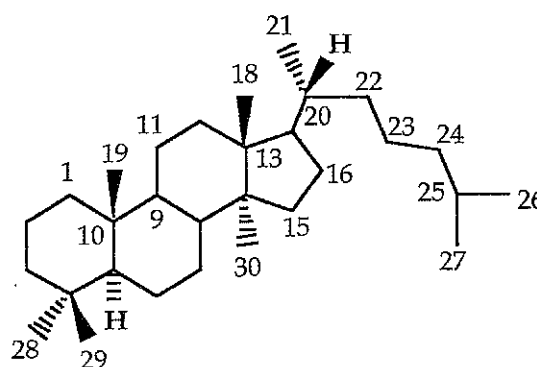
Quando os anéis são representados como projecções no plano do papel, um átomo ou grupo ligado a um anel será designado α se estiver colocado abaixo do plano, ou β se ficar acima do plano.

Os triterpenos tetracíclicos podem ser vistos como esteróides (69) trimetilados, os três grupos metilo adicionais são numerados por 28 (ligado ao C-4 com a configuração α), 29 (ligado ao C-4 com a configuração β) e 30 (ligado ao C-14). Desta forma, o lanostano (70) também pode ter o nome de 4,4,14 α -trimetil-5 α -colestano, implicando o primeiro nome a configuração 14 α , 20 R.



colesterol

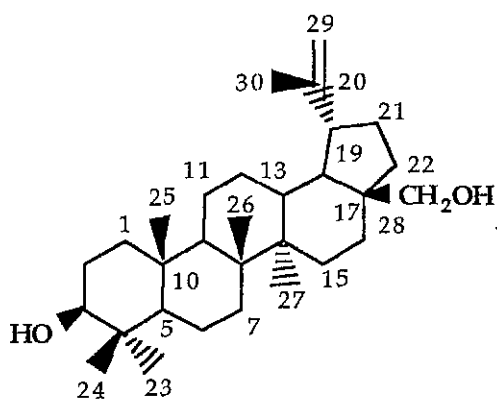
(69)



lanostano

(70)

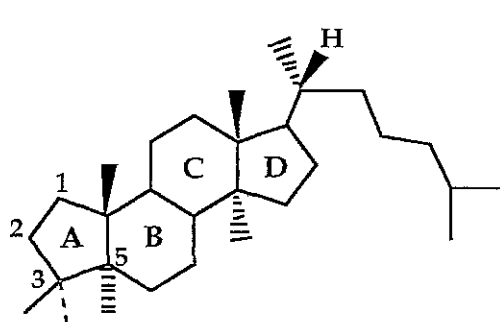
A numeração utilizada para os triterpenos pentacíclicos é ligeiramente diferente, por este facto é frequente encontrarem-se discrepâncias quanto aos números atribuídos aos átomos desta cadeia, (68).^{81,82}



(68)

2.2.1 Contração ou expansão de anéis

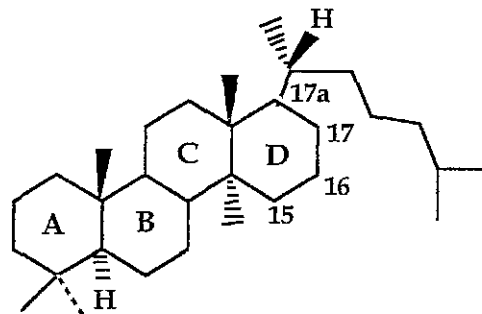
A contração ou expansão de anéis dos triterpenos por inserção de grupos metileno, são indicadas, respectivamente, pelos prefixos "nor" e "homo", explicitando-se o anel afectado (71) e (72). Nos casos de falta ou inserção de dois grupos metileno usam-se, respectivamente, os prefixos "dinor" e "di-homo".



(71)

(contração do anel A do lanostano)

A-nor-lanostano



(72)

(expansão do anel D do lanostano)

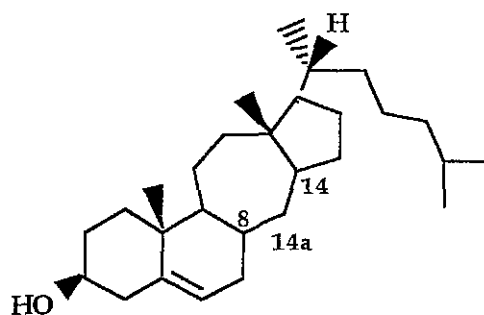
D-homo-lanostano

Na contração de anel mantém-se a numeração do esteróide original, apenas se suprime o número mais elevado do anel "contraído" (71), com excepção de algarismos referentes à união de anéis.

Nos casos de expansão de anel, excepto quando se trate de inserção de átomos em ligações directas entre vértices, acrescenta-se a letra *a* (e *b*, etc., quando necessário) ao número mais elevado do anel ampliado (72). Na expansão de anel por inserção de um grupo metileno entre dois vértices, representa-se da forma seguinte: as letras em itálico referem-se aos anéis afectados, e os algarismos entre parêntesis correspondem aos grupos metileno inseridos (Tabela 10) e (73).

CH ₂ inserido entre	Prefixo
C-5 e C-10	<i>AB</i> (10a)-Homo
C-8 e C-9	<i>BC</i> (8a)-Homo
C-8 e C-14	<i>C</i> (14a)-Homo
C-9 e C-10	<i>B</i> (9a)-Homo
C-13 e C-14	<i>CD</i> (13a)-Homo

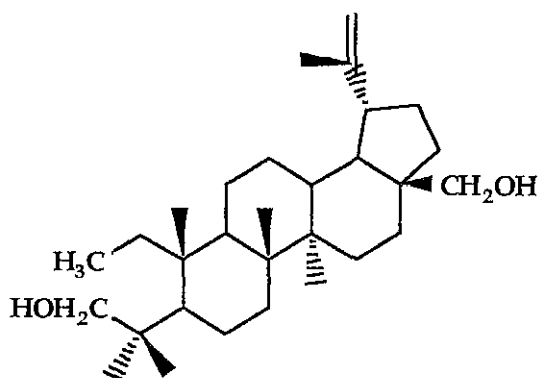
Tabela 10

*C*(14a)-Homo-colesterol

(73)

2.2.2 Abertura de anéis

A abertura de um anel, com adição de um radical hidrogénio em cada grupo terminal originário, é indicada pelo prefixo *seco-*, mantendo-se contudo a numeração normal do triterpeno ou esteróide (74).



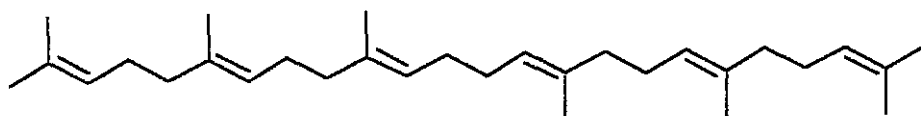
2,3-seco-lup-20(29)-eno-3,28-diol

(74)

2.3 Biossíntese

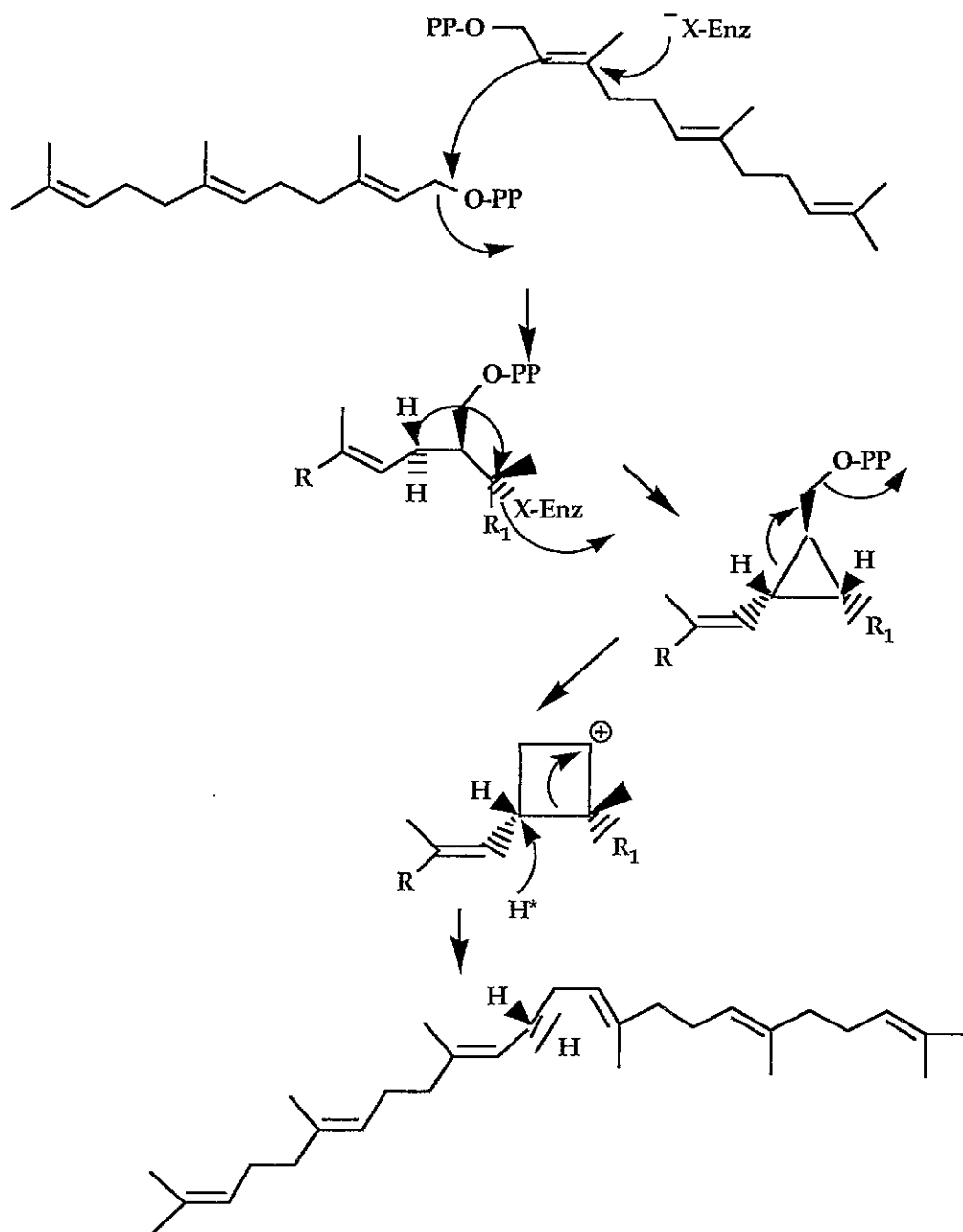
A variedade de compostos triterpênicos naturais é enorme, sendo frequente o isolamento de novos compostos.^{83,84} No entanto, devido à sua biossíntese, eles podem ser distribuídos por um número relativamente reduzido de esqueletos fundamentais.

Estudos paralelos nos diferentes aspectos da química dos terpenos e dos esteróides, gradualmente demonstrou o interesse à volta do raro hidrocarboneto esqualeno, C₃₀, como possível progenitor dos triterpenóides.^{35,85} O esqualeno (75) resulta da ligação de dois grupos pirofosfato de *trans*-farnesilo cauda-cauda.



(75)

O mecanismo de ligação destas duas unidades só recentemente foi elucidado, com o isolamento de um intermediário, o pirofosfato de pré-esqualilo (Esquema 4).³⁰



Esquema 4

A estrutura de ciclopropano do intermediário sugere que a ligação 2,3 no pirofosfato de farnesilo (FPP) é alquilada por outra molécula de FPP e que a eliminação de um protão origina a formação de um anel de ciclopropano.

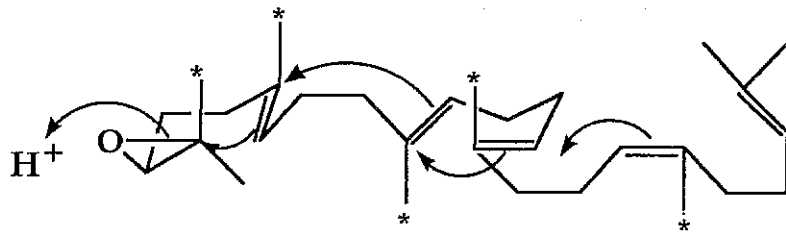
O esqualeno pode "dobrar-se" num grande número de formas, tanto no que diz respeito ao tamanho dos anéis, como à parte inicial e final da cadeia e também

à conformação em pré-cadeira e pré-barco da cadeia. Com poucas exceções os anéis A, B, e C são anéis de seis membros e a ciclização é sempre iniciada na ligação dupla terminal. Todavia, existem numerosas modificações secundárias tais como oxidações, desidrogenações e deslocamentos à distância de Wagner-Meerwein na estrutura.³⁵ O esqualeno é epoxidado em qualquer das duplas ligações terminais, formando o isómero 3-S, este facto indica que este se liga a outra enzima e depois é libertado.

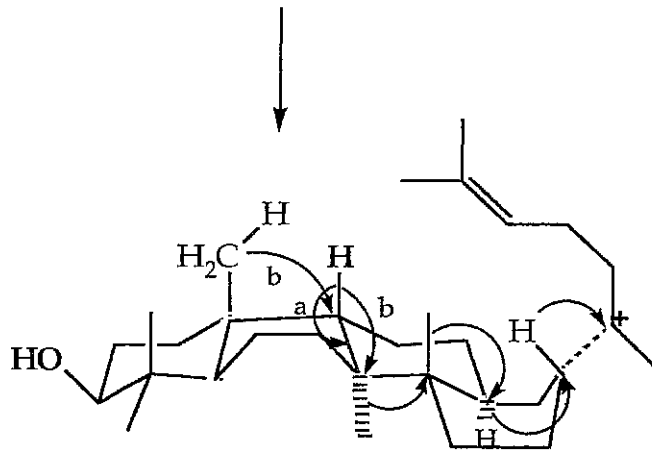
Podem ser reconhecidos de uma forma geral dois grupos principais de triterpenos, os triterpenos tetracíclicos incluindo os esteróides, e os triterpenos pentacíclicos. A conformação do epóxido de esqualeno na superfície da enzima e a grande extensão de rearranjos no seu esqueleto, seguido ainda da ciclização, originam um elevado número de subgrupos de compostos triterpénicos.

O amplamente distribuído lanosterol (76) deriva do (3S)-2,3-epoxiesqualeno na conformação cadeira-barco-cadeira-barco, seguindo a via do hipotético catião protoesteróide I e um quarto passo do deslocamento 1,2 de Wagner-Meerwein com a eliminação de C-H (Esquema 3, caminho a). O mesmo catião protoesteróide I, origina o cicloartenol (77), em que o metilo 19 ataca o carbono 9 e de seguida seguem-se passos idênticos aos do caminho a (Esquema 5, caminho b).

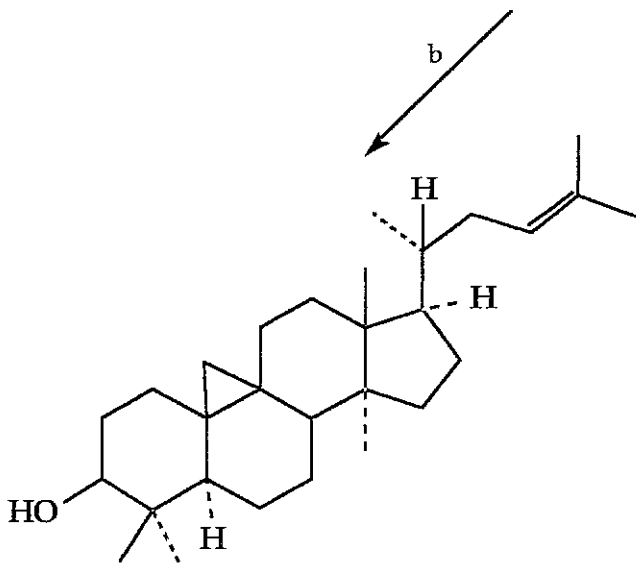
Nestes processos existe um balanço rigoroso entre os efeitos enzimáticos e estereoelectrónicos controlando rigorosamente a estereoquímica dos produtos formados.



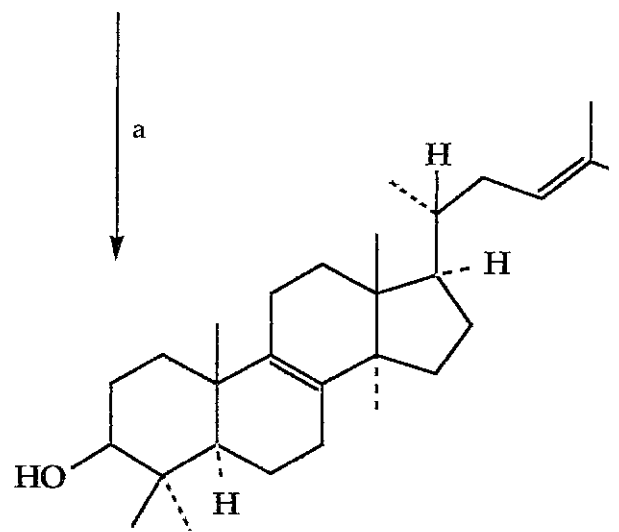
(3S)-2,3-epoxiesqualeno
cadeira-barco-cadeira-barco



catião protoesteróide I



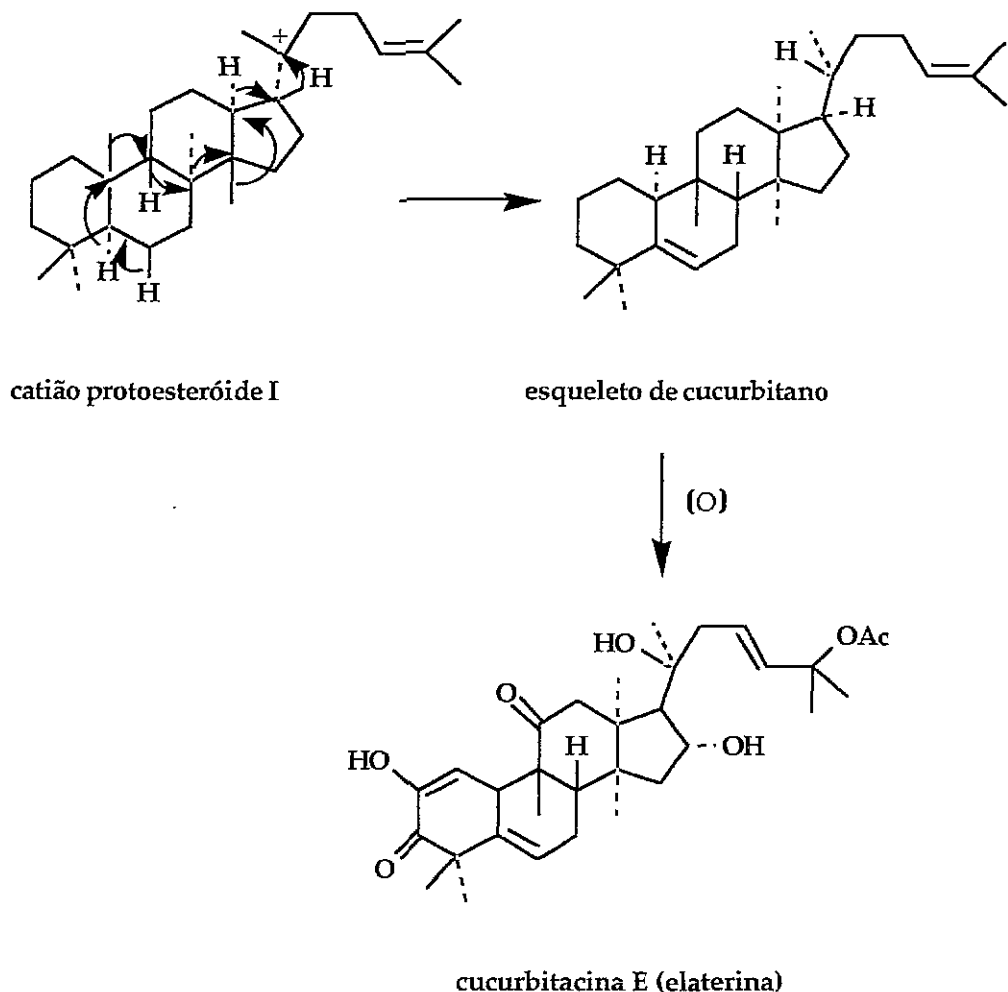
cicloartenol (77)



lanosterol (76)

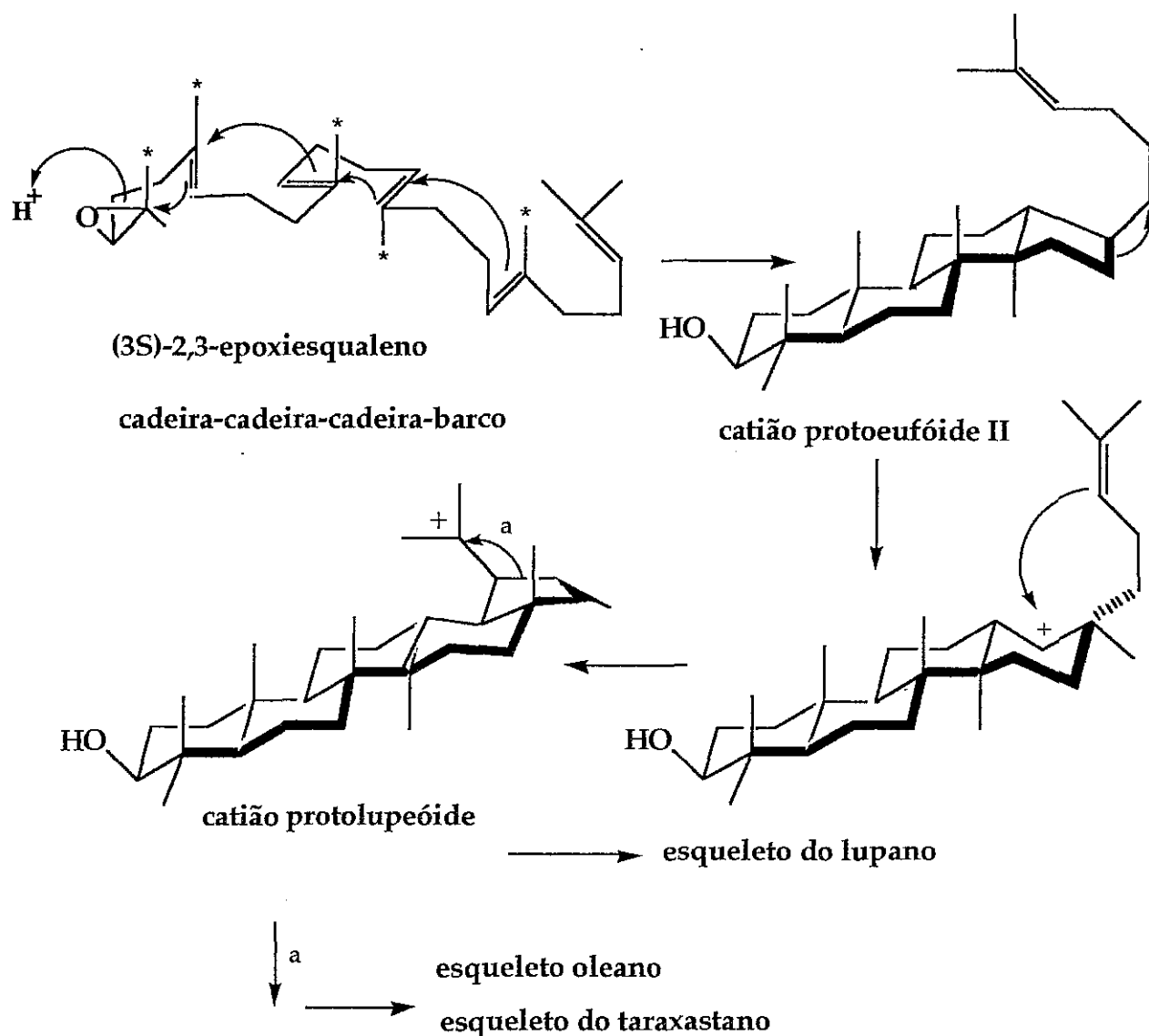
Esquema 5

Um rearranjo mais profundo do catião protoesteróide I origina os cucurbitanos, os princípios activos das plantas cucurbitáceas, um grupo de compostos altamente oxigenado de triterpenos tetracíclicos usados na medicina medieval, e que ainda hoje continuam a atrair interesse devido à sua toxicidade (Esquema 6).



Esquema 6

A maioria dos triterpenos pentacíclicos derivam do catião protoeufóide II, por expansão do anel D e ciclização da cadeia lateral. Se os rearranjos ocorrerem nos anéis D e E, originam-se triterpenos da família do lupano, oleano, taraxastano e os seus derivados oxigenados (Esquema 7).⁸⁶



Esquema 7

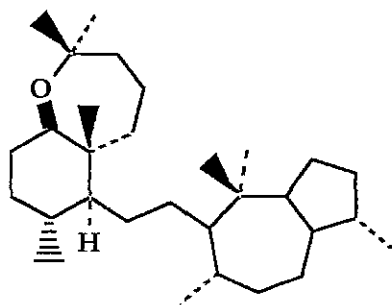
Por outro lado, um grande grupo de triterpenos pentacíclicos são formados por rearranjo do catião protoeufóide II, com múltiplos passos na forma de deslocamentos 1,2 de Wagner-Meerwein, originando os esqueletos de friedelano, glutinano, etc.. Estes rearranjos não são devidos apenas ao resultado da acção enzimática, mas também de nestes sistemas de anéis alifáticos altamente condensados, as interacções estereo 1,3-diaxiais, os factores conformacionais e os efeitos stereoelectrónicos contribuírem para a forma como os rearranjos

ocorrem.

A estrutura de novos triterpenóides é de grande interesse tendo em conta o ponto de vista da sua formação biogenética.

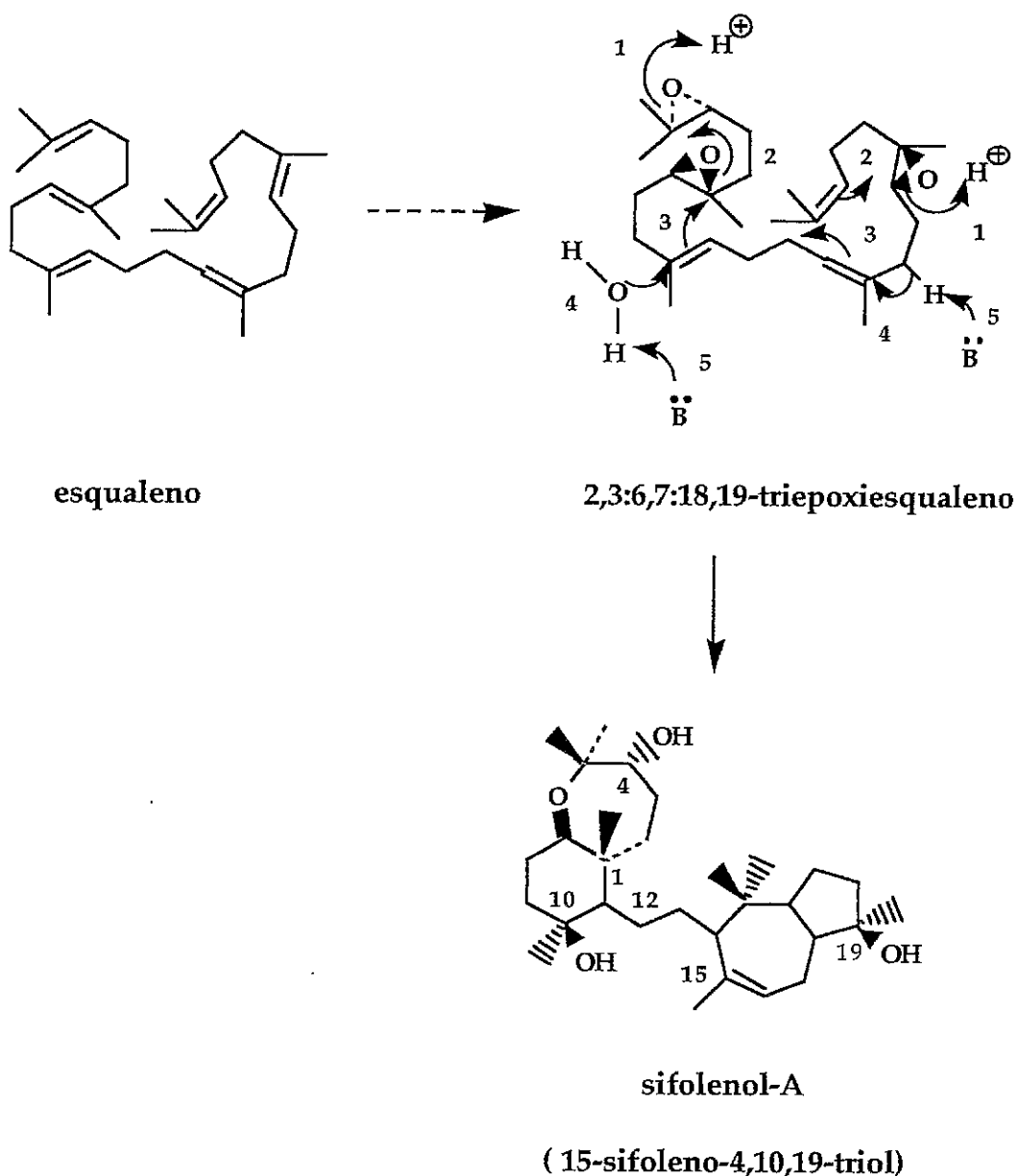
2.3.1- Sifolano

O esqueleto de sifolano^{87,88} (78) consiste numa unidade de *cis*-octahidroazuleno ligado por uma ponte de etileno a outra unidade de *trans*-decahidrobenzoxepino.



(78)

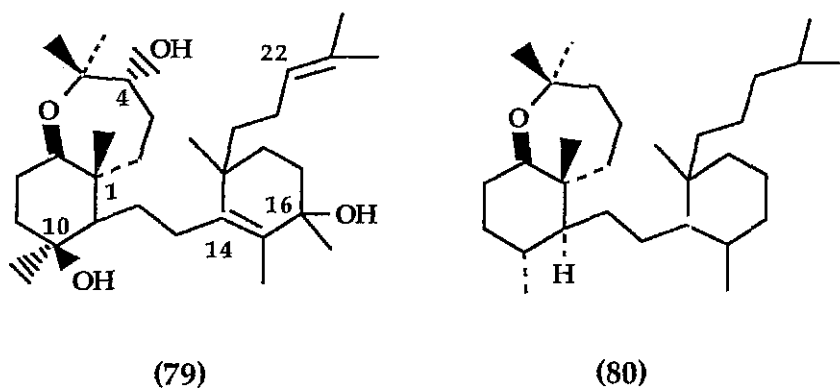
A biogénese dos sifolanos começa com o 2,3:6,7:18,19-triepoxiesqualeno. Em contraste com o processo mais simples de ciclização que tem lugar na biogénese de triterpenos tetra e pentacíclicos, no caso do sifolano a via de biossíntese sugerida envolve duas ciclizações consecutivas (Esquema 8).⁸⁷



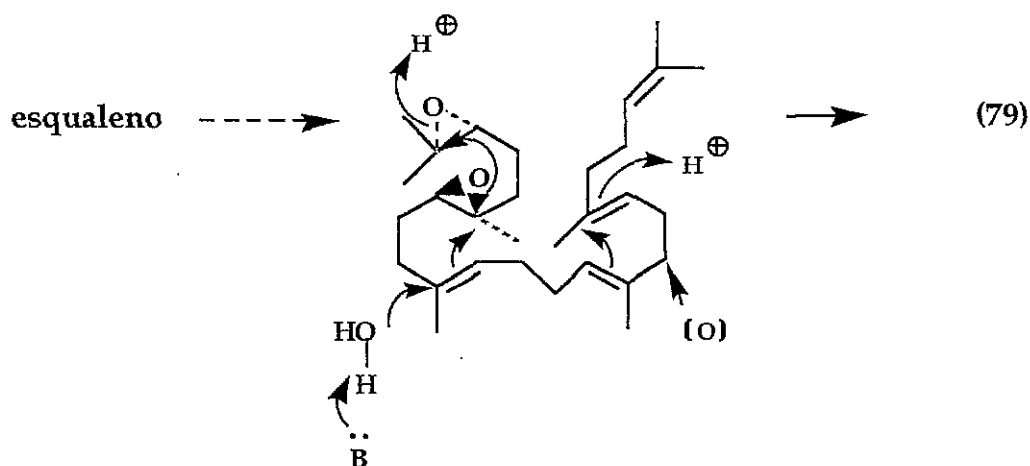
Esquema 8

2.3.2- Sifonelano

O sifonelinol (79), é um triterpeno possuindo um novo esqueleto carbocíclico, o sifonelano (80); tal como o anterior foi também isolado da esponja vermelha marinha *Siphonachalina siphonella*.⁸⁹

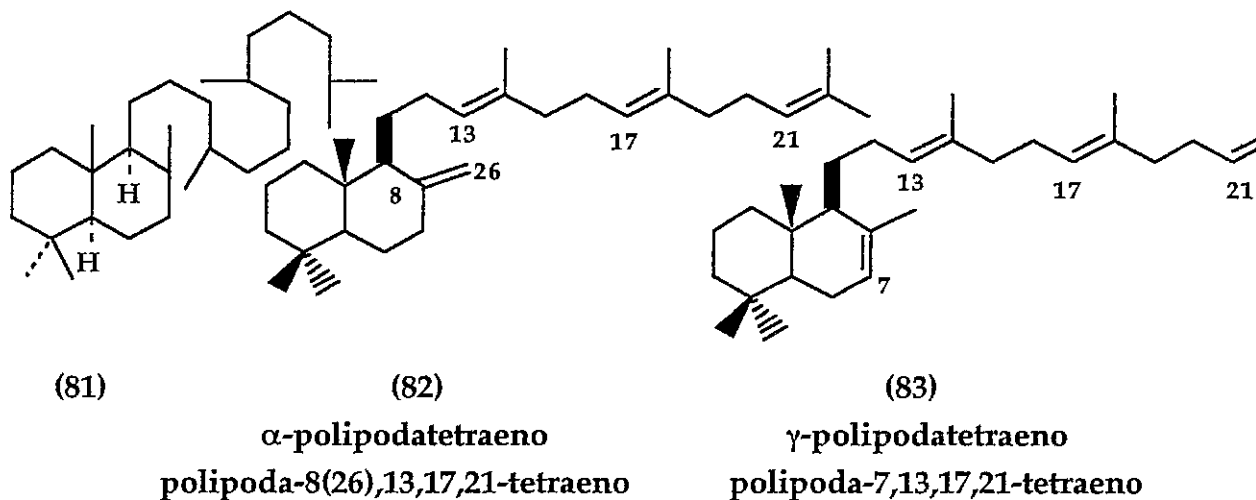


A proposta de biogênese deste triterpeno demonstra uma relação muito próxima com o derivado do esqualeno sifolano (78), principalmente na formação duma metade da molécula (Esquema 9).⁸⁸

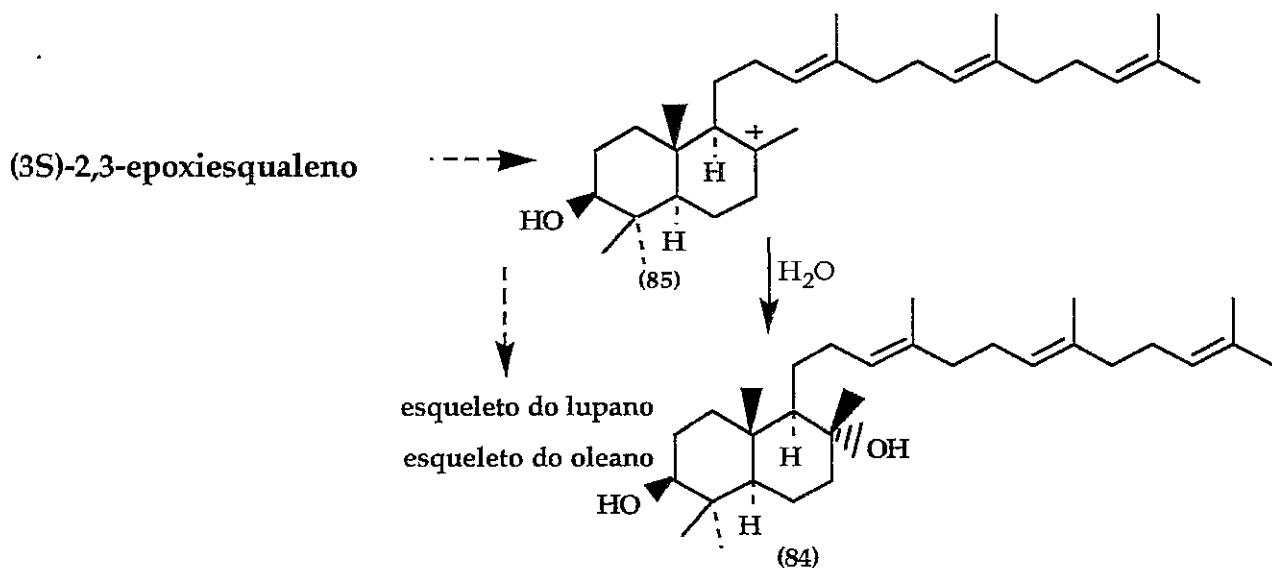


2.3.3- Polipodano

Dois novos triterpenos apresentando o esqueleto básico de polipodano (81) foram isolados, um das folhas frescas da *Polypodium fauriei* e *Lemmaphyllum microphyllum* (82)⁹⁰ e outro das folhas frescas de *Polystichum ovato-paleaceum* e *P. polyblephalum* (83).⁸⁹



Boar *et al*⁹¹ isolaram da goma de uma resina muito abundante e obtida do arbusto mediterrâneo *Pistacia lentiscus* um novo diol bicíclico (84), possuindo também um esqueleto de polipodano. A estrutura e a estereoquímica absoluta de (84) é totalmente consistente com a formação por interceptação do carbocátion bicíclico (85), postulado como um intermediário na ciclização do (3S)-2,3-epoxiesqualeno na conformação em cadeira-cadeira-barco. Este triterpeno bicíclico retém todos os factores de régio e estereoquímica necessários para continuar a ciclização (Esquema 10).

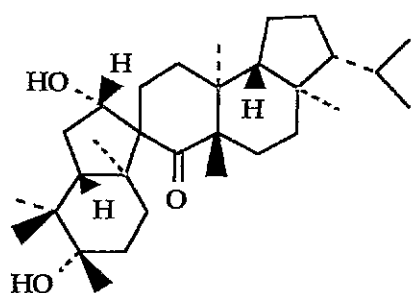


Esquema 10

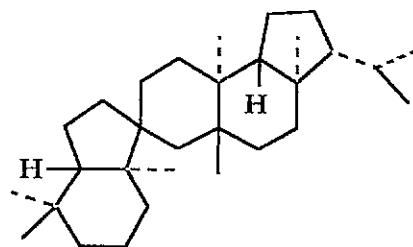
A identificação destes triterpenos bicíclicos suportam a teoria, em que se postula que a ciclização do esqualeno prossegue via uma série de intermediários carbocatiônicos de conformação rígida.⁹²

2.3.5- Espirosupinano

A estrutura do espirosupinanonadiol (86) um novo triterpeno isolado da *Euphorbia supina*,⁹³ foi estabelecida por análise espectroscópica e de raios X como sendo 7(8->9)abeo-9S-D:C-friedo-B':A'-neogamacerano-8-ona-3S,7S-diol, e que apresenta um esqueleto base desconhecido ao qual foi dado o nome espirosupinano (87).⁹²



(86)

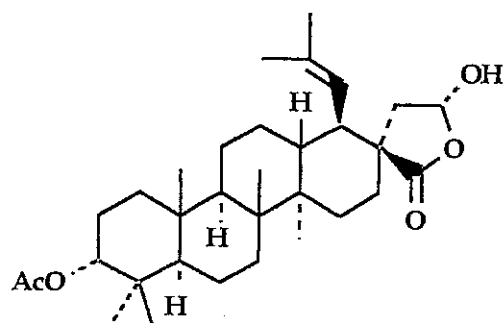


(87)

Na biogénese provável do espirosupinanonadiol (86) pode estar envolvido um derivado do 8,9-di-hidroxifernano. Este é o primeiro exemplo de um triterpeno possuindo um esqueleto espiro.⁹²

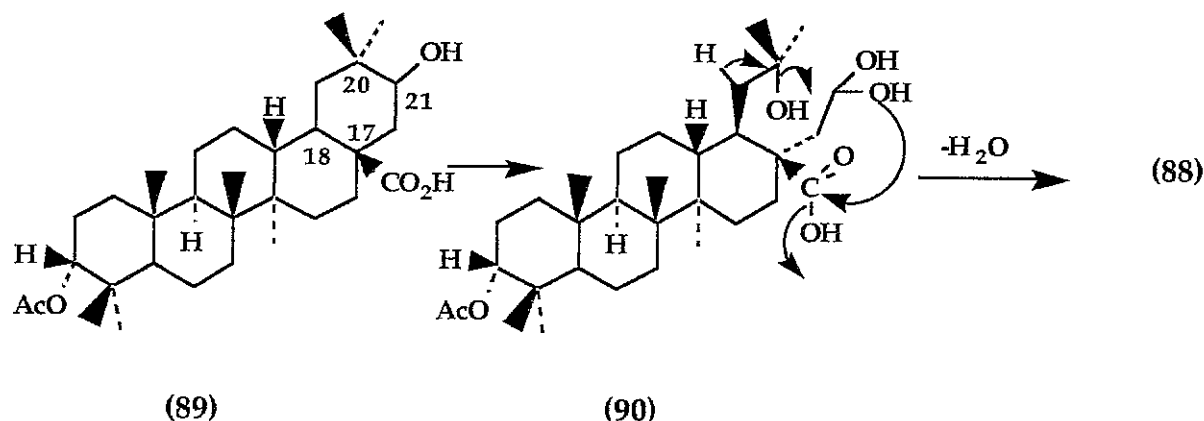
2.3.6- Radermasinina

A estrutura e estereoquímica da radermasinina, uma nova lactona triterpénica citotóxica isolada da *Radermachia sinica*,⁹⁴ foi demonstrada por análise espectroscópica e por análise de raios X de cristal único como sendo a estrutura (88).



(88)

Este triterpeno possui em C-18 um grupo vinílico, contendo dois grupos metilo geminais, e também uma γ -hidroxiespirolactona em C-17. Sugere-se que o possível caminho biogenético envolve um derivado do ácido 21-hidroxi-18 γ -oleano-28-óico (89). Este é sujeito a uma clivagem oxidativa da ligação C(20)-C(21) e subsequente desidratação e ciclização do anel de (90) originando o triterpeno (88) (Esquema 11).⁹³



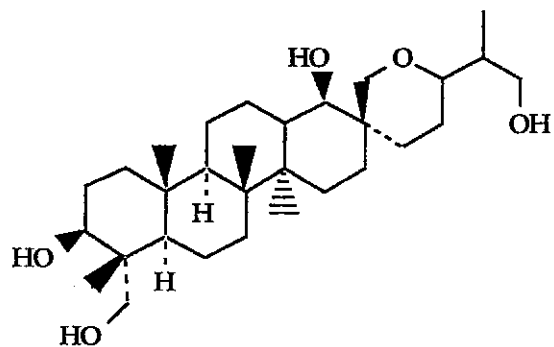
Esquema 11

2.3.7- Bacarano

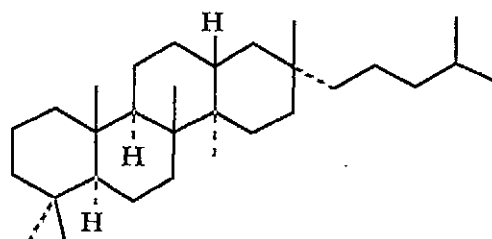
A estrutura do hosenkol-A (91), o primeiro exemplo natural de bacarano (92) e intermediário na formação dos triterpenos sionano (93) e lupano (94), foi

determinada por métodos espectroscópicos e por análise de raio X.

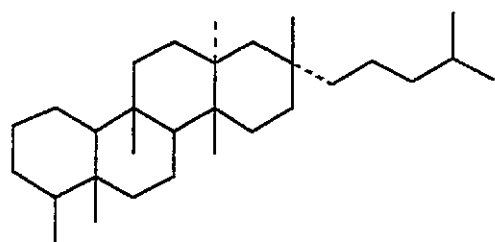
A biogênese do lupano e sionano foi postulada via bacarano e é fortemente suportada pelo aparecimento deste composto com anel espiro.⁹⁵



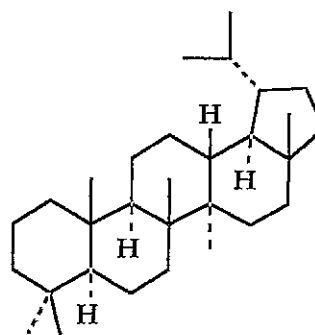
(91)



(92)



(93)

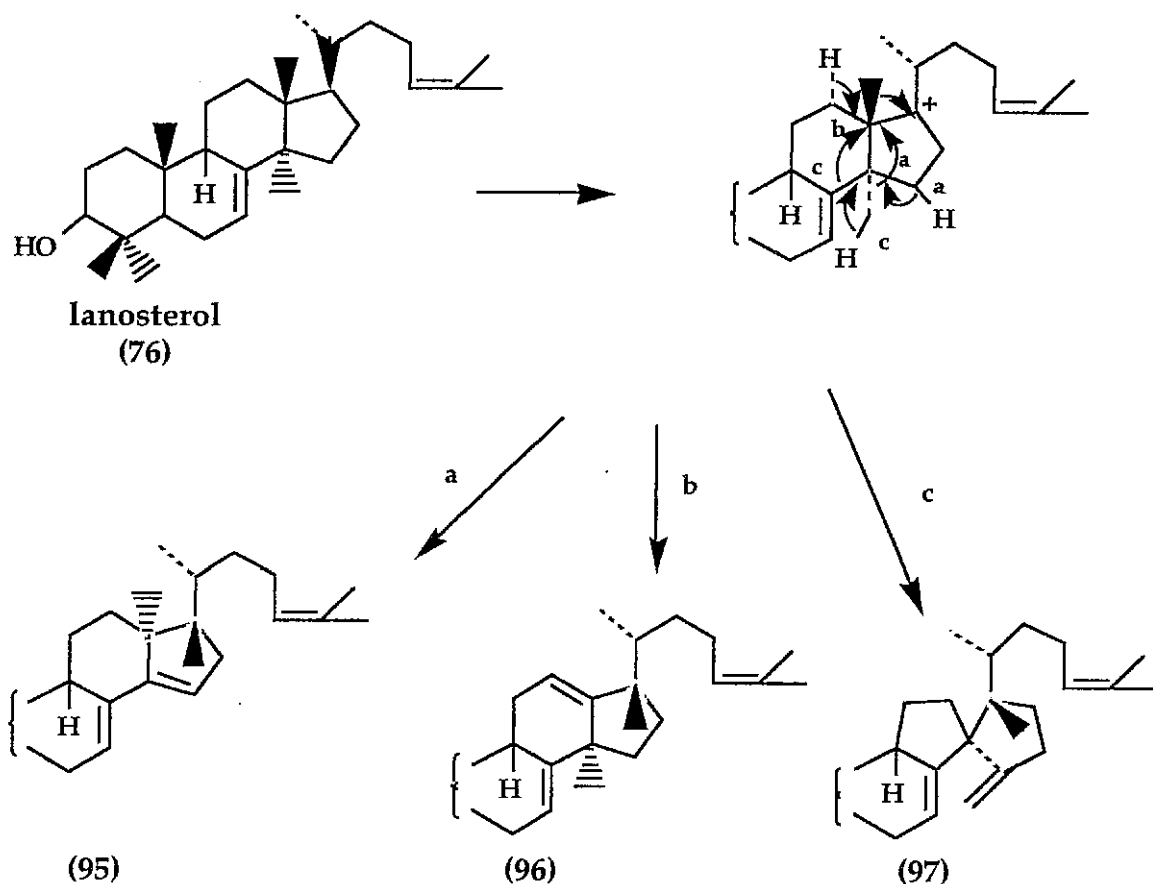


(94)

2.3.8- Lanostanos rearranjados

Muitos novos lanostanóides rearranjados têm um novo esqueleto de carbono, tais como 17,14-friedolanostano (95), 17,13-friedolanostano (96) e 8(14-->13R)-abeo-17,13-friedolanostano (97). Estes foram isolados das sementes da *Abies mariessii*^{96,97} e em particular os lanostanóides (95) e (96) foram encontrados também na *A. firma*.⁹⁶ Os novos esqueletos de lanostanos rearranjados foram considerados como sendo biossintetizados a partir do esqueleto de lanostanos por desidrogenação enzimática H-17 ou desidratação do

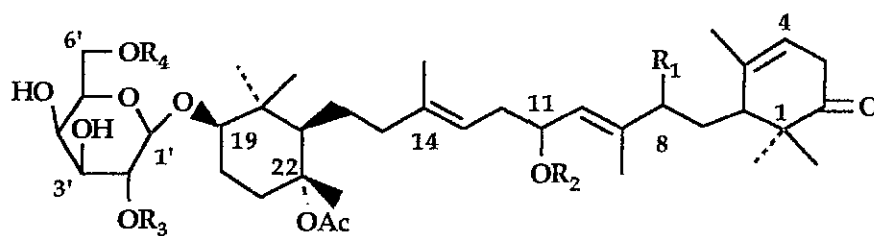
OH-17, seguida por sucessivo deslocamento 1,2 dos grupos metilo e da ligação ao anel C e D (Esquema 12).⁹⁶



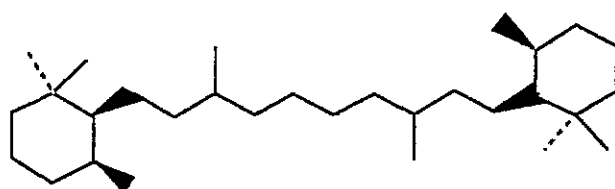
Esquema 12

2.3.9- Triterpenos semelhantes aos carotenóides

Ksebati *et al*⁹⁸ isolaram cinco novos triterpenos sob a forma de galactosídeos, denominados pouosidos A-E (98-102), da espécie *Asteropus*, uma esponja marítima do Pacífico. As agliconas pouosidos constituem um esqueleto triterpénico semelhante aos carotenóides C-40. Pode-se racionalizar este esqueleto como finalizando cada extremo da molécula num anel de ciclo-hexano ligado simetricamente por uma cadeia acíclica (103).⁹⁹



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
98	OAc	Ac	H	H
99	OAc	H	H	H
100	H	Ac	H	H
101	OAc	Ac	Ac	H
102	OAc	Ac	H	Ac



(103)

2.4 Função

A função biológica dos triterpenos não é totalmente compreendida, embora se possa afirmar que duas das suas funções principais são as de actuar como hormonas e como componentes das biomembranas.¹⁰⁰ Em qualquer destas funções, a estrutura tridimensional da molécula, a posição e a variedade de grupos funcionais presentes têm uma importância fundamental na manutenção da integridade estrutural e na regulação da rigidez e permeabilidade selectiva dessas membranas.¹⁰¹

A actividade biológica de muitos triterpenos é conhecida, sendo-lhes atribuídas propriedades citotóxicas, citostáticas, antimicrobianas, herbicidas, anti-inflamatórias e inibidoras/estimuladoras de diferentes processos metabólicos.^{101,102}

2.5 Aplicação

A ocorrência e diversidade estrutural dos triterpenóides atraiu desde sempre a atenção dos cientistas para a avaliação da sua actividade biológica.

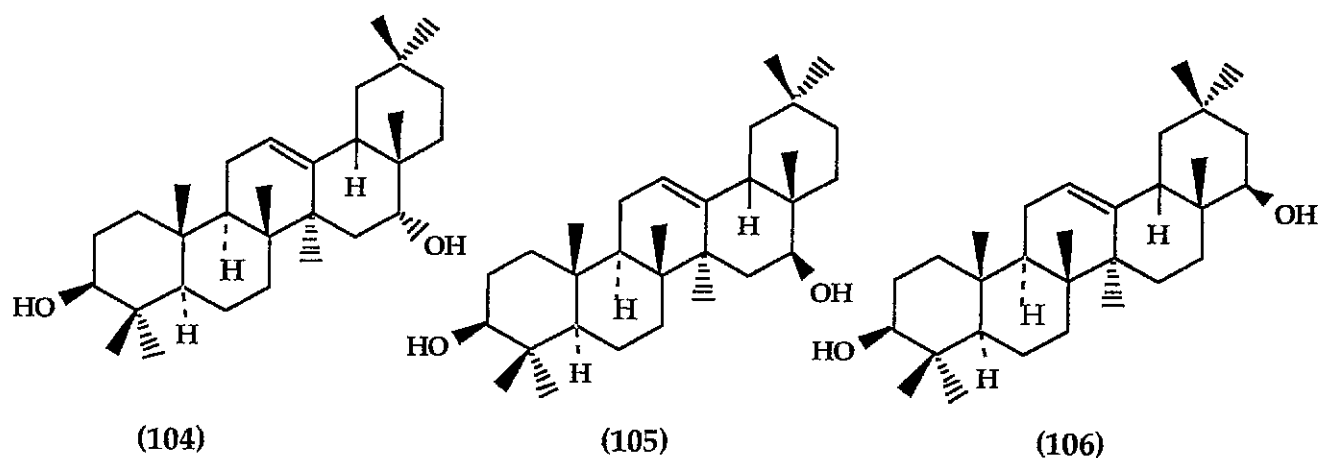
Embora a aplicação desses metabolitos secundários como agentes terapêuticos com sucesso ser bastante limitada, uma extensiva exploração da actividade nesta área tem sido levada a cabo recentemente.⁶³

A relação entre a estrutura química e a actividade anticancerígena de alguns triterpenos pentacíclicos e tetracíclicos foi estudada por Ling *et al.*¹⁰⁴

O efeito anticancerígeno destes compostos foi testado contra células cancerígenas humanas: ME-180, u-87MG, SK-HEP-1, CALU-1, CAMA-1, SK-OV-3 e HEC-1-A. Os triterpenos pentacíclicos testados foram: o epimanidiol (3 β ,16 α -di-hidroioleano-12-eno) (104), o epimero β do epimamidiol (105) e o sofonadiol (3 β ,22 β -di-hidroioleano-12-eno) (106). Os resultados obtidos estão sistematizados na Tabela 11.

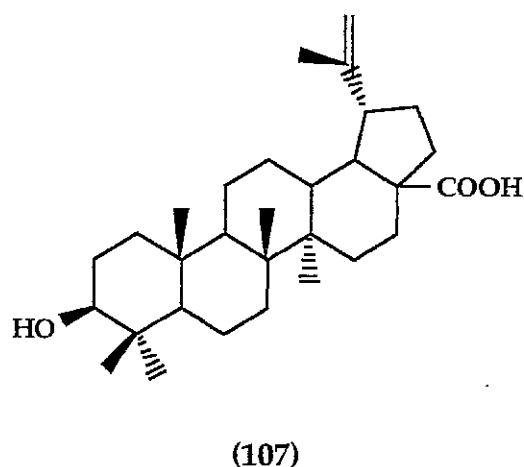
Composto	ME-180	u-87MG	SK-HEP-1	CALU-1	CAMA-1	SK-OV-3	HEC-1-A
100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (104)	+	+	--	+	+	+	+
10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (104)	--	--	--	--	--	--	+
100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (105)	+	--	--	--	+	--	--
100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (106)	+	--	--	--	--	--	--

Tabela 11 - Actividade citotóxica de triterpenos (103-105); (Os compostos que são citotóxicos para uma dada célula cancerígena são assinalados com o sinal + e os que são inactivos com o sinal --).

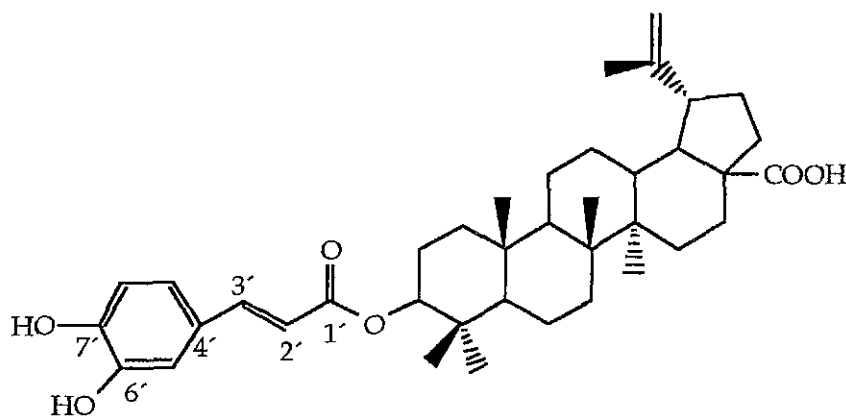


Estes resultados sugerem que a presença do grupo 16 α -hidroxilo é importante para o aparecimento de 12-oleanos citotóxicos.

A esterificação do grupo 3-hidroxilo e do grupo ácido em C-17, origina compostos com menor actividade citotóxica em células tumorais humanas. No entanto, apresentam actividade equivalente ou ligeiramente superior contra o crescimento das células leucémicas L-1210 e P-388. O ácido betulínico (107)⁶³ demonstrou ser inibidor do crescimento das células de leucémicas P-388.



O ácido piracrénico (108), isolado da madeira do *Pyracantha crebulata*¹⁰⁵ e caracterizado com ácido 3 β -(6',7'-di-hidroxicinamoiloxi)-lup-20(29)-eno-28-óico, foi testado em relação à sua actividade anti-inflamatória¹⁰⁴ pelo método cotton e demonstrou ser um inibidor da formação de tecido granuloso.



(108)

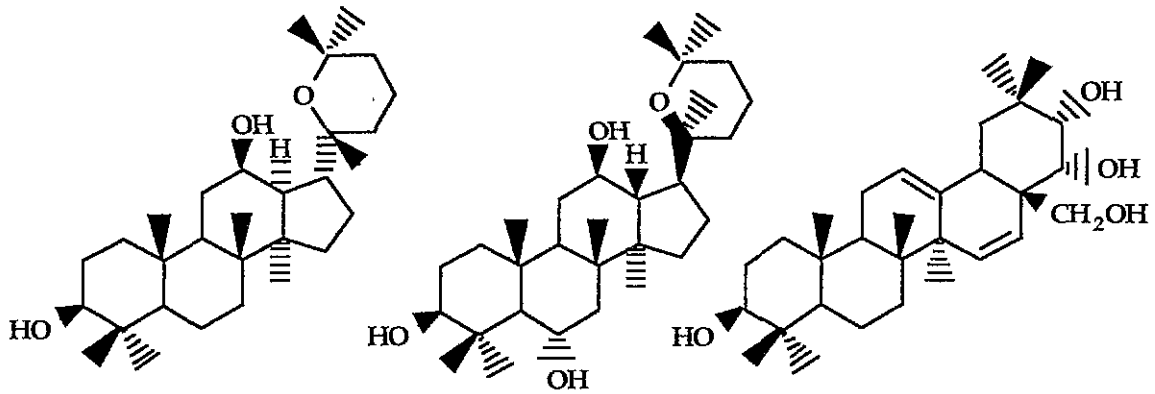
2.6 Extração e fracionamento

Os triterpenos podem ser extraídos da madeira, raiz, folhas, flores e sementes moídas de uma grande variedade de espécies de plantas. Contudo, estes compostos não aparecem somente nas plantas podem também ser isolados em bactérias, em sedimentos fósseis e etc..

O método vulgarmente utilizado para a extração de triterpenos e esteróides é o método de extração por solventes orgânicos, utilizando geralmente uma montagem de soxhlet. A utilização deste sistema está em geral associado ao uso de temperatura. Neste contexto é necessário ter cuidado com a possível formação de artefactos, devido à decomposição dos compostos de origem. Sempre que possível é preferível a utilização da temperatura ambiente ou temperatura tão baixa quanto possível.

Tal como outros metabolitos secundários, os triterpenos ocorrem no estado livre e na forma de glicosídeos. Neste último caso a clivagem do resíduo açúcar por hidrólise ácida e enzimática ou por outras técnicas, é muitas vezes necessário antes do isolamento e purificação da aglicona triterpeno. O método usual de hidrólise ácida dos glicosídeos muitas vezes origina artefactos, sendo muitos dos

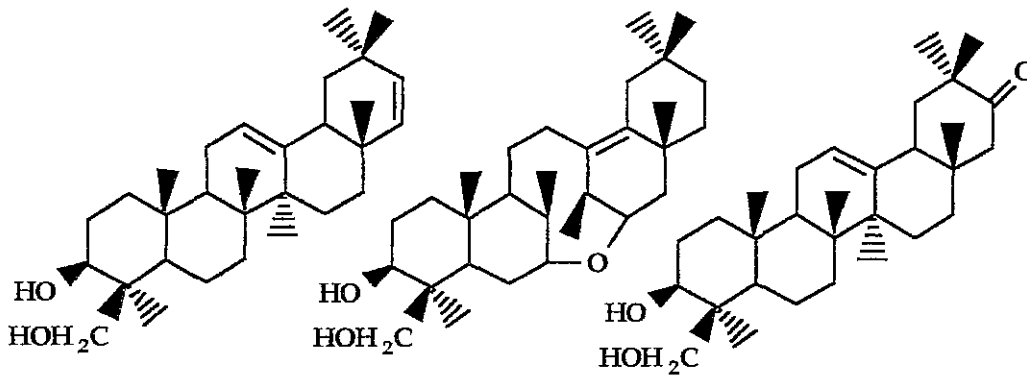
triterpenos conhecidos artefactos. Por exemplo, o panaxiol (109), o panaxatriol (110), o careiagenol D (111), os soiasapogenóis C (112), D (113) e F (114), as saikogenina A (115) e C (116), são ácidos triterpênicos rearranjos formados durante a hidrólise ácida de glicosídeos.⁶³



(109)

(110)

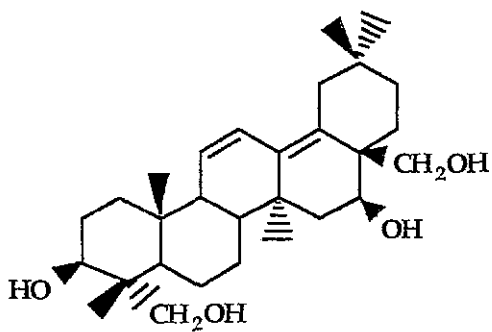
(111)



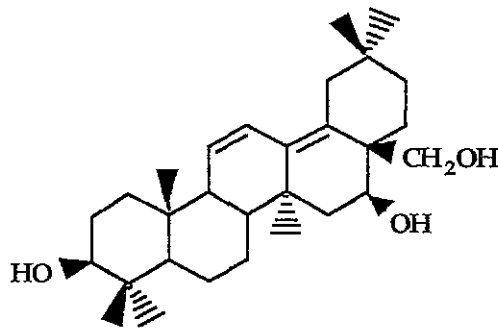
(112)

(113)

(114)



(115)



(116)

No fraccionamento dos extractos usa-se geralmente uma purificação prévia

por cromatografia de coluna, seguida de tlc preparativo. Todavia, no caso de misturas complexas, usam-se técnicas mais eficientes tais como HPLC, GC-MS, CC capilar.

Os isopentenóides policíclicos⁶³ β -amirina, α -amirina, δ -amirina, ferneno, isoarborinol, songumol, frematol, simiarenol, colesterol, campesterol, estimasterol e sitosterol foram inicialmente separados e identificados pela combinação de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, tais como, HPLC, GLC, GLC-MS, GLC-SIM e RMN de ^1H .

2.7 Discussão dos resultados

Os triterpenos e esteróides isolados no decorrer deste trabalho foram caracterizados usando técnicas analíticas actuais, tais como espectroscopia de infravermelho (IV), de RMN de ^1H e ^{13}C , RMN bidimensional e DEPT, espectrometria de massa e por comparação com dados existentes na literatura.^{106,107,108,109,110,111,112,113,114}

2.7.1 Triterpenos e esteróides isolados no extracto de hexano das folhas de *A. dealbata*

Foram isolados seis triterpenos pentacíclicos do extracto de hexano das folhas de *A. dealbata*:

- * lupenona (117);
- * lupeol (118);
- * 1-metilupeol (119);
- * 12-(2'-hidroxietil)lup-20(29)-eno-3 β -ol (122);

* butirato de 12-R-lup-20(29)-eno-3 β -ilo (124);

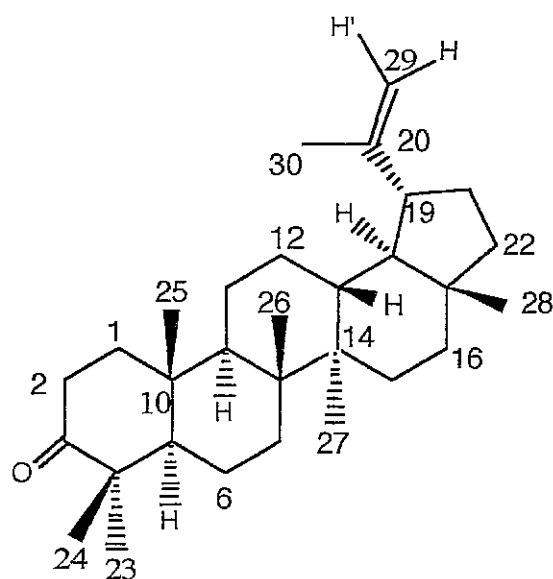
Foram também isolados um esteróide e um triterpeno tetracíclico, respectivamente:

* (22E)-4-metilergosta-7, 22-dieno-3 β -ol (120);

* sitosterol (121);

2.7.1.1 Identificação inequívoca da lupenona isolada na *A. dealbata*

O triterpeno pentacíclico, lupenona (117), foi isolado no extracto das folhas de *A. dealbata* em quantidades bastante superiores às dos outros compostos isolados, permitindo desta forma uma análise exaustiva desse composto.



(117)

O espectro de RMN de ^1H da lupenona (117) apresenta sete sinais em forma de singletos (δ 0,77; 0,85; 0,94; 0,98; 1,02; 1,12 e 1,75 ppm) correspondentes à ressonância dos sete grupos metilo da estrutura proposta.

É de referir que a integração destes sinais em forma de singuleto é concordante com três prótons cada. Pela análise da estrutura proposta, podemos desde logo prever que o Me-30 tenha o desvio a valores de campo mais baixo (δ 1,75 ppm), já que se encontra mais desprotegido (desescudados) que os restantes grupos metilo (Figura 10). Será também de prever que as ressonâncias dos grupos Me-23 e Me-24 surjam a valores de campos mais baixo que os restantes grupos metilo (Me-25, 26, 27 e 28). Destes dois grupos metilo aquele que se encontra numa configuração α , por se encontrar mais próximo do carbono carbonílico, será o que surgirá a campo mais baixo.

Me-23	δ 1,12 ppm;
Me-24	δ 1,02 ppm;

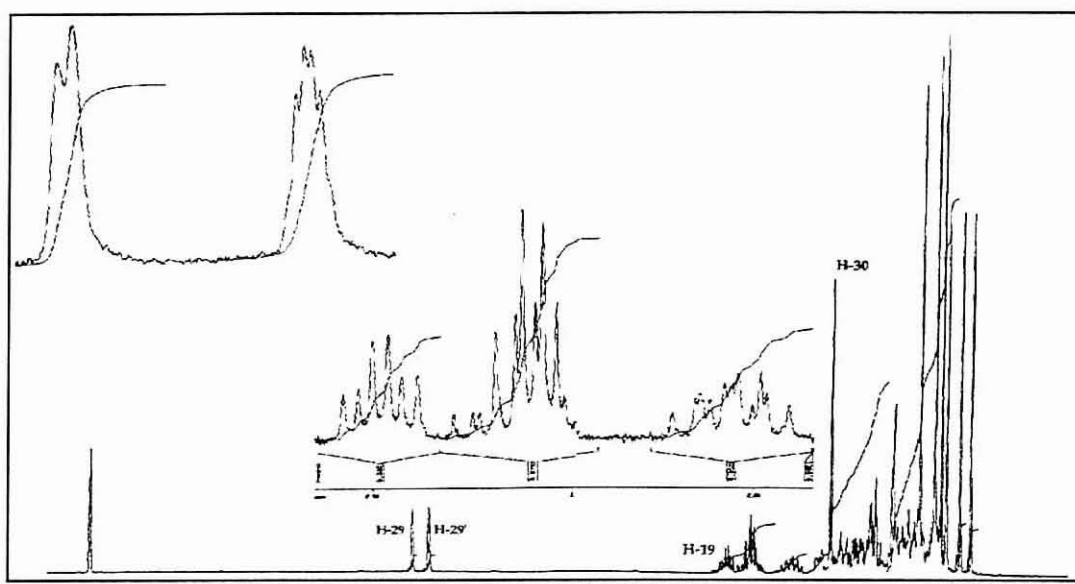


Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H da lupenona (117).

Por análise do RMN de ^1H é também possível identificar os sinais correspondentes à ressonância dos prótons vinílicos devido ao seu desvio químico característico e à sua multiplicidade. O tipo de sinal (duplo duplete) e as constantes de acoplamento do próton vinílico que se encontra do mesmo lado do Me-30, permite a sua identificação (Figura 10).

* H29' (Protão do lado do grupo Me-30)

δ 4,79 ppm (dd) $J_{29'-30} = 1,4$ Hz

$J_{29'-29} = 2,5$ Hz

* H29

δ 4,91 ppm (d) $J_{29-29'} = 2,5$ Hz

O acoplamento do protão vinílico H-29' com os protões do grupo Me-30, permite identificar o grupo isopropilideno na molécula.

O sinal correspondente à ressonância do protão H-19 aparece na forma de sexteto, δ 2,48 ppm, com as constantes de acoplamento de $J_{ea} = J_{ea'} = 11,4$ Hz e $J_{ee} = 5,8$ Hz. O aparecimento deste sinal confirma novamente a existência do grupo isopropilideno.

O sinal correspondente à ressonância dos dois protões H-2 aparece na forma de multiplete a δ 2,30 ppm.^{115,116}

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C da lupenona (117), é possível a identificação imediata do sinal correspondente à ressonância do carbono carbonílico, C-3, o qual surge numa gama típica deste tipo de carbonos, δ 215,4 ppm (Figura 11).

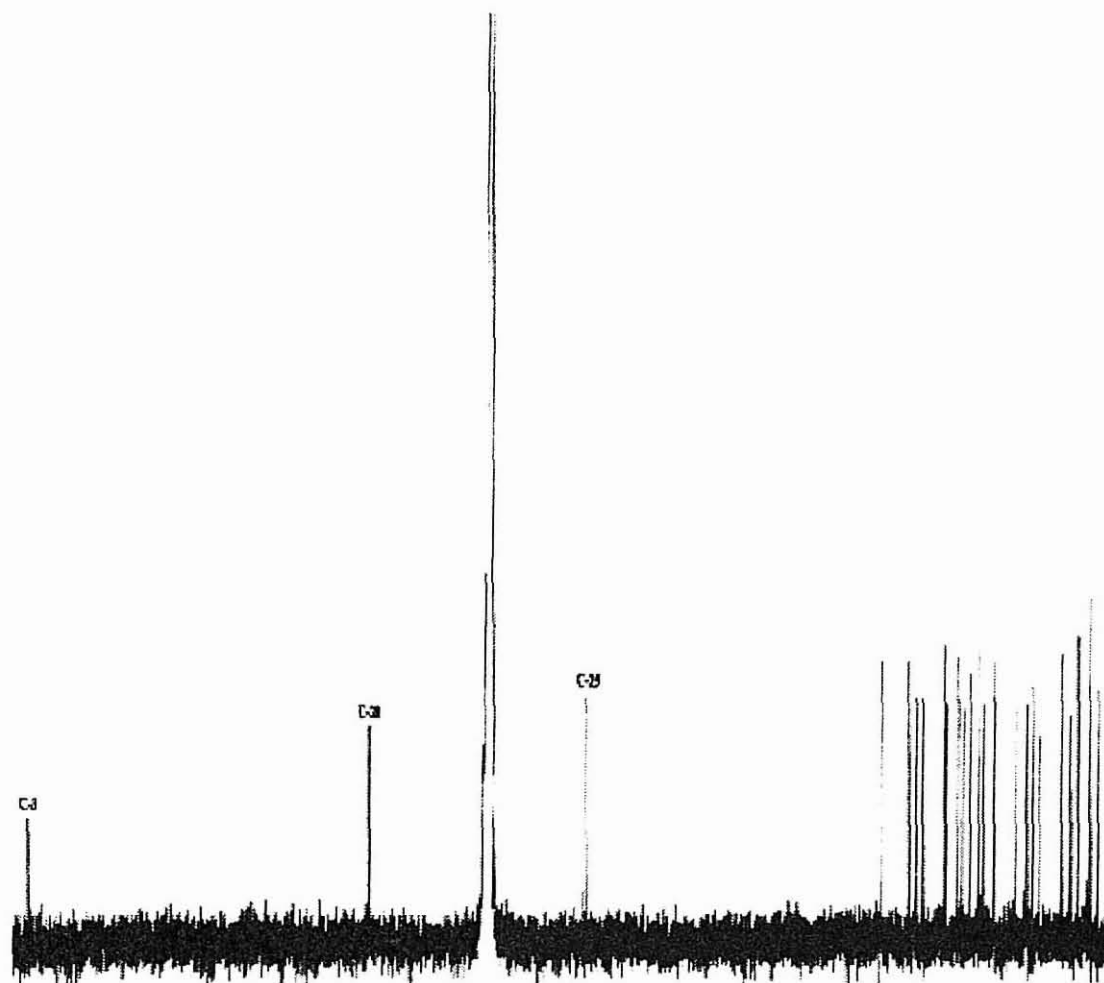


Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C da lupenona (117).

As ressonâncias dos carbonos vinílicos são identificadas por análise comparativa do espectro de RMN de ^{13}C e do DEPT (135°).

No espectro DEPT (135°) o sinal correspondente à ressonância do carbono C-20 não aparece, trata-se de um carbono quaternário, enquanto que o carbono C-29 é identificado como um carbono secundário ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

* C-20 a δ 151,2 ppm (carbono quaternário);

* C-29 a δ 110,5 ppm (carbono secundário);

Com a ajuda do DEPT (90°), foi possível identificar os sinais correspondentes aos carbonos terciários. São cinco os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos -CH: δ 55,5; 50,5; 49,1; 48,8 e 38,9 ppm.

O assinalamento inequívoco destas ressonâncias não foi possível, sendo atribuídas aos carbonos: C-5, C-9, C-13, C-18 e C-19.

O assinalamento dos sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos dos grupos metilo foi possível através da análise comparativa dos espectros DEPT (135° e 90°).

Existem sete sinais correspondentes aos sete carbonos, -CH₃, da estrutura proposta: δ 27,2; 21,7; 20,0; 18,7; 16,4 e 15,1.

Da análise comparativa dos espectros de RMN de ¹³C e de DEPT (135°) é possível identificar todos os carbonos quaternários, uma vez que estes apenas aparecem no RMN de ¹³C: δ 47,7; 43,7; 43,5; 41,4 e 37,4 ppm.

Sabemos que estes sinais correspondem aos carbonos: C-4, C-8, C-10, C-14 e C-17.

O espectro de RMN ¹³C com acoplamento de próton, devido à sua grande complexidade, apenas nos permite identificar de forma inequívoca as ressonâncias dos carbonos do grupo isopropilideno.

Como o carbono C-29 está ligado a dois prótons, origina um sinal com forma de tripleto com constante de acoplamento 1J muito grande, $^1J = 151$ Hz, no entanto, C-29 está também a acoplar com os 3 prótons do Me-30 e com H-19

aparecendo cada uma das linhas do tripleto desdobrada num quinteto, com constantes de acoplamento mais pequenas, ${}^3J = 6$ Hz.

Pela análise do espectro HETCOR (${}^1\text{H}/{}^{13}\text{C}$)¹¹⁷ é possível confirmar que o sinal que aparece a δ 110,5 ppm corresponde à ressonância do carbono C-29, já que este sinal está correlacionado com os dois prótons vinílicos. Foi também possível identificar as ressonâncias dos carbonos C-2, δ 34,6 ppm, e C-19, δ 48,8 ppm, uma vez que se conheciam os sinais dos prótons correspondentes H-2 e H-19 (Figura 12).

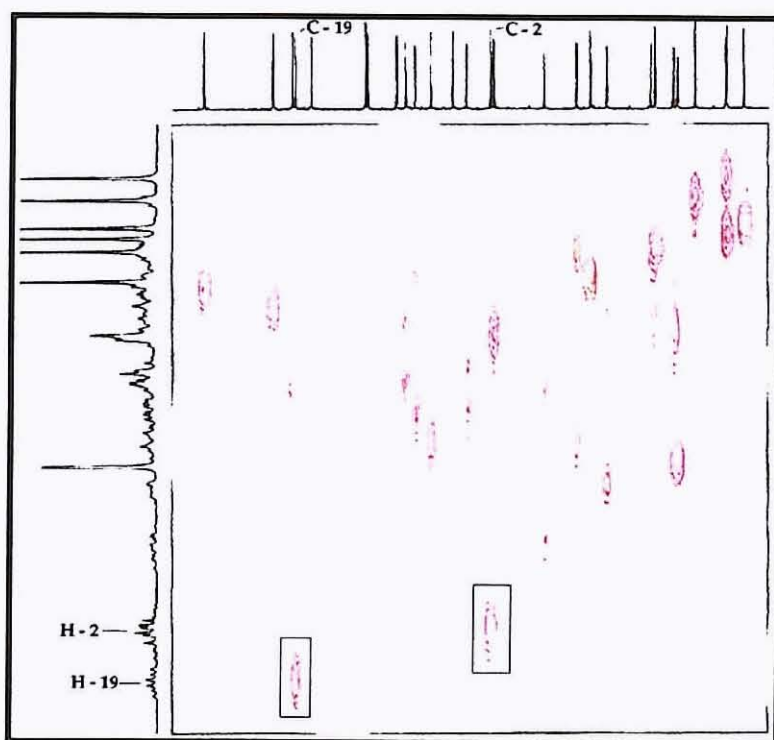


Figura 12 - Espectro de HETCOR (${}^1\text{H}/{}^{13}\text{C}$), ampliado, da lupenona (117).

A correlação entre as ressonâncias correspondentes aos prótons dos grupos metilo já identificados e os sinais respectivos de ${}^{13}\text{C}$ permitiu o assinalamento das ressonâncias desses carbonos (Tabela 12):

	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
Me-23	1,12 (s)	27,2
Me-24	1,02 (s)	21,7
Me-30	1,75 (s)	20,0

Tabela 12

Apresentam-se em seguida as correlações das ressonâncias de protão e carbono dos outros grupos metilo. No entanto, não foi possível efectuar o assinalamento das dos carbonos, porque ainda não foram conhecidas as dos protões (Tabela 13).

RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
0,98 (s)	16,4
0,94 (s)	15,1
0,85 (s)	18,7
0,77 (s)	16,4

Tabela 13

A partir do espectro de HETCOR (¹H/¹³C) confirmaram-se também todos os sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos quaternários, uma vez que estes não se correlacionam com nenhum sinal de protão. Verificam-se os mesmos resultados obtidos pela análise dos espectros DEPT.

Pela análise do espectro de COSY (¹H/¹H), confirmamos que o protão vinílico que acopla com os protões do Me-30, é o sinal em forma de duplo duplete a δ 4,79 ppm (H'-29). Verificou-se também que os dois protões vinílicos acoplam um com outro (Figura 13).

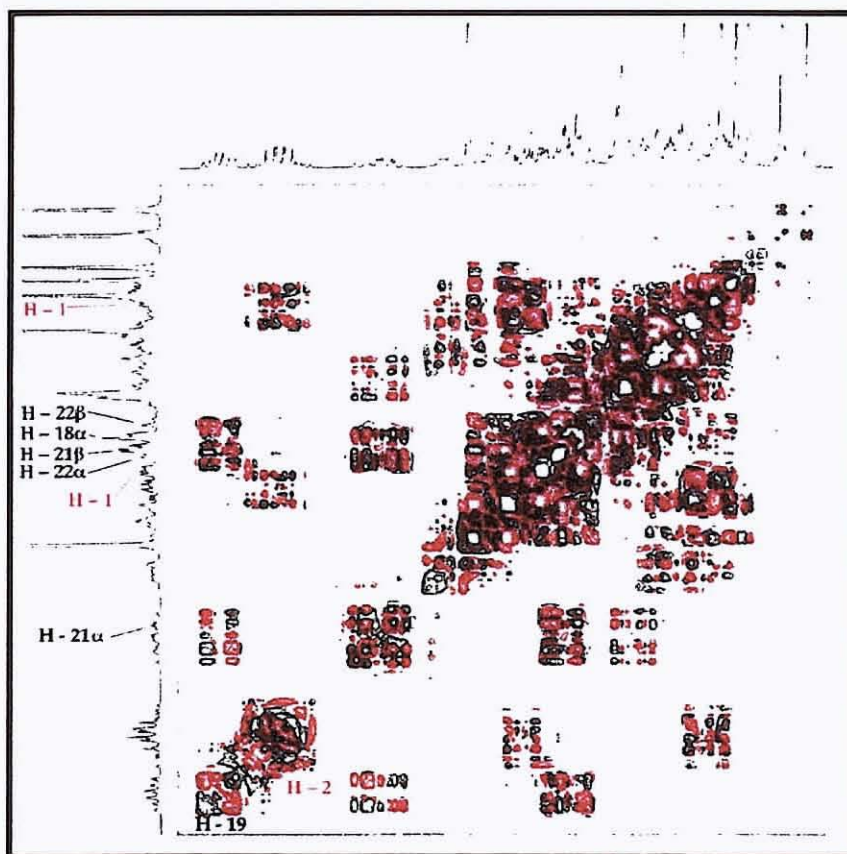


Figura 13 - Espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$), ampliado, da lupenona (117).

Através da ressonância dos dois prótons H-2 foi possível identificar os prótons H-1, já que os primeiros acoplam com estes.

H-1 1,58 ppm (m)

H-1 1,05 ppm (m)

Após o assinalamento da ressonância dos prótons H-1 podemos, por análise do espectro de HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$), identificar a ressonância de C-1 a δ 40,1 ppm (Figura 12).

Através da ressonância do próton H-19 e usando o espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) foi possível identificar os prótons com os quais ele acopla, H-18 (1H) e H-21 (2H). Com o auxílio do espectro de HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) foi então possível identificar as ressonâncias dos carbonos C-18 e C-21 (Figura 12, 13 e Tabela 14).¹¹⁸

	RMN ¹ H (ppm)		RMN ¹³ C (ppm)
H-18	1,43 (m)	C-18	49,1
H-21 β	2,02 (m)	C-21	30,7
H-21 α	1,47 (m)	C-21	30,7

Tabela 14

A ressonância do próton H-21 β aparece numa zona do espectro bastante "desempedida" e, desta forma, foi possível verificar os acoplamentos com os prótons, H21 α (m, a δ 1,47 ppm), H-22 (2H) e H-19 (1H). Através do espectro HETCOR foi possível efectuar o assinalamento das ressonâncias dos carbonos correspondentes:

H-22 β 1,46 ppm (m) C-22 40,8 ppm

H-22 α 1,24 ppm (m) C-22 40,8 ppm

Ainda faltam identificar os sinais correspondentes as ressonâncias dos carbonos C-7, C-12, C-6, C-16 e C-15. São todos carbonos secundários, através dos espectros, DEPT (135^o) e HETCOR é possível assinalar os correspondentes desvios químicos a δ : 36,3; 34,0; 28,3; 26,0 e 22,0 ppm.

Por análise do espectro de HMBC verificam-se correlações entre as ressonâncias dos prótons H-29 e H-29' e as dos carbonos C-30 e C-19, as quais também são indicativo da existência do grupo isopropilideno e confirmam as ressonâncias dos carbonos C-30 e C-19 (Tabela 15).

A ressonância de H-21 β está relacionada com a dos carbonos C-30 e C-18. Enquanto que a do próton H-21 α está relacionada com a do carbono C-18 e com a dum grupo metilo, δ 18,7 ppm, a qual é devida à ressonância do carbono de Me-28 (Tabela 15). Desta forma fica identificado de forma inequívoca a ressonância do

Me-28 em ^{13}C como em ^1H .

H-28 (3H) 0,85 ppm (s) C-28 18,7 ppm

Neste espectro HMBC verifica-se que a ressonância do próton H-21 α está também correlacionada com a dum carbono quaternário a δ 43,5 ppm, a qual é devida à ressonância do carbono C-17 (Tabela 15).

A ressonância dos prótons H-28 (s, δ , 0,85 ppm) está correlacionada com as dos carbonos C-18, C-22, C-17 e com a dum carbono secundário que é devido à ressonância do carbono C-16 (δ 36,3 ppm) (Tabela 15). Desta forma identifica-se de forma inequívoca a ressonância de C-16, através do HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) a dos prótons H-16:

H-16 α 1,57 ppm (m) C-16 36,3 ppm

H-16 β 1,40 ppm (m) C-16 36,3 ppm

Ainda não foram assinaladas as ressonâncias correspondentes aos carbonos C-9 e C-13, contudo a partir de dados da literatura¹⁰⁴ podemos prever que o δ de C-9 seja δ 50,5 ppm e o de C-13 seja δ 38,9 ppm. Com a ajuda do espectro de HETCOR:

H-9 1,18 ppm (m)

H-13 1,65 ppm (m)

No espectro de HMBC a ressonância do próton H-13 está correlacionado com a do carbono de um grupo metilo, que tendo em conta a estrutura só pode ser o C-27 (Me-27), δ 15,1 ppm (Tabela 15).

H-27 0,77 ppm (s) C-27 15,1 ppm

PROTÕES	CARBONOS CORRELACIONADOS
H-1 α	C-2, C-5, C-10
H-2	C-1, C-10
H-9 α	C-25, C-26
H-13 β	C-27
H-18 α	C-17, C-19, C-28
H-19 β	C-18, C-20, C-21, C-29, C-30
H-21 α	C-17, C-19, C-20, C-28
H-22 β	C-17, C-19, C-20, C-28
H-23	C-4, C-5, C-6
H-24	C-4, C-5, C-6
H-25	C-1, C-5, C-9, C-10
H-26	C-7, C-8, C-9, C-14
H-27	C-8, C-13, C-14, C-15
H-28	C-16, C-17, C-18, C-22
H-29	C-19, C-30
H-29'	C-19, C-30
H-30	C-19, C-20, C-29

Tabela 15 - Conectividades $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, encontradas no espectro de HMBC do composto (117).

A ressonância do próton H-27 (δ 0,77 ppm) correlaciona-se com a de dois carbonos quaternários, C-8 e C-14 (δ 41,4 e 43,7 ppm), e com a de um carbono secundário, C-15 (δ 28,3 ppm). Ficando este último assinalado inequivocamente, e através do espectro HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) é também possível identificar a ressonância dos prótons H-15:

H-15 α 1,01 ppm (s)

H-15 β 1,68 ppm (s)

A ressonância do próton H-9 correlaciona-se com a dos carbonos dos dois grupos metilo, C-25 (δ , 16,4 ppm) e C-26 (δ , 16,4 ppm) (Tabela 15). No entanto,

através do espectro de HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) foi possível assinalar a ressonância dos prótons correspondentes a δ 0,98 ppm, estando correlacionados com o carbono C-14 (43,7 ppm) (Tabela 15). Tendo em conta a estrutura do composto (117) só pode ser o Me-26, é possível desta forma assinalar as ressonâncias dos prótons e carbonos dos metilos das posições 25 e 26:

H-25	0,94 ppm (s)	C-25	16,4 ppm
------	--------------	------	----------

H-26	0,98 ppm (s)	C-26	16,4 ppm
------	--------------	------	----------

A análise do espectro de NOESY do composto (117) permitiu-nos identificar H-12 β , uma vez que este sente o efeito NOE devido a H-19 β . Por análise conjunta do espectro de HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$), Figura 13, 14 e Tabela 16:

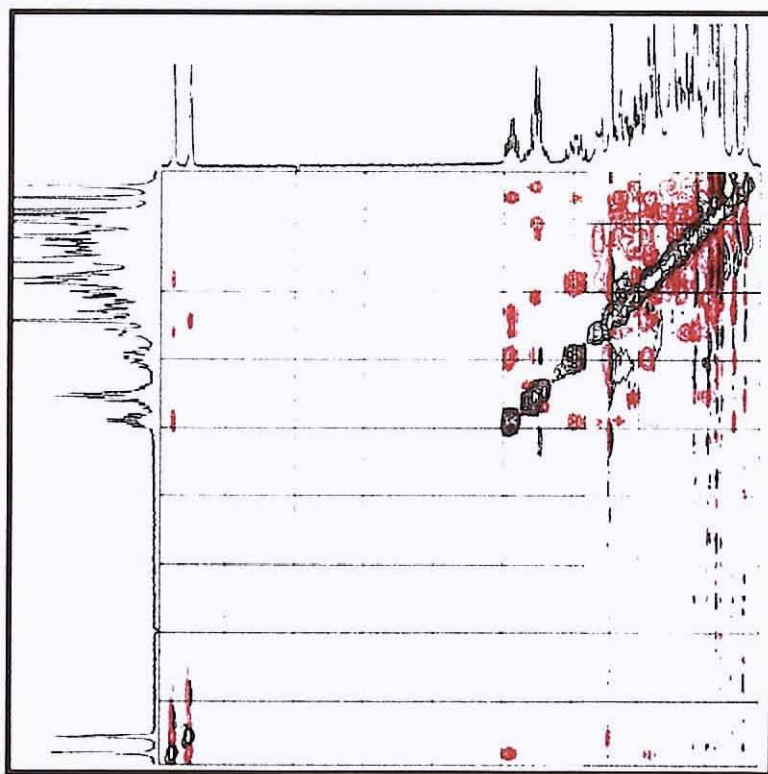


Figura 14 - Espectro de NOESY, ampliado, da lupenona (117).

	RMN ^1H (ppm)		RMN ^{13}C (ppm)
H-12 β	1,83 (m)	C-12	26,0
H-12 α	1,17 (m)	C-12	26,0
H-11 α	1,13 (m)	C-11	20,3
H-11 β	1,28 (m)	C-11	20,3

Tabela 16- Alguns desvios químicos de ^1H e ^{13}C da lupenona (117).

Com a análise do espectro de NOESY do composto (117) e com a ajuda da representação tridimensional da molécula (Figura 15 a 16, página 93 e 94), podemos estudar a estereoquímica de todos os centros assimétricos da lupenona (Tabela 17).

H-1 α	H-1 β , H-2, H-9 α
H-1 β	H-1 α , H-2
H-2	H-1 β , H-1 α , H-25
H-7	H-5 α , H-25, H-26
H-12 β	H-12 α , H-19 β
H-13 β	H-19 β , H-26, H-28
H-18 α	H-27, H-30
H-19 β	H-12 β , H-13 β , H-21 β , H-28, H-29
H-25	H-2, H-6, H-11
H-26	H-6, H-13 β , H-11
H-29	H-19 β , H-21 α , H-29'
H-29'	H-29, H-30
H-30	H-18 α , H-29'

Tabela 17- Picos de correlação NOE a partir do espectro de NOESY, sensível à fase, da lupenona (117).

Partindo do presuposto que H-19 se encontra com orientação β , e dos efeitos NOE da Tabela 17, conclui-se que:

δ 1,83 ppm (m) \rightarrow H-12 β

δ 1,65 ppm (m) \rightarrow H-13 β

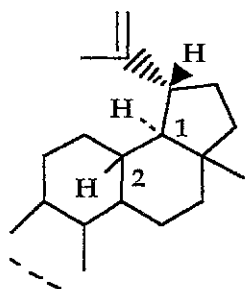
d 1,43 ppm (dd) \rightarrow H-18 α

A partir dos dados da Tabela 17 foi também possível assinalar a ressonância do próton H-12, que ainda não tinha sido identificado.

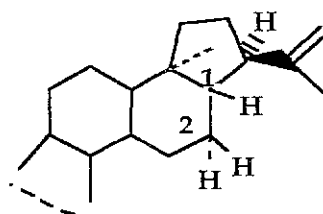
O grupo metilo 28 encontra-se orientado em lado oposto relativamente ao grupo isopropilideno.

Podemos concluir de uma forma geral, que H-18 está *cis* em relação ao grupo isopropilideno.

No entanto toda a identificação realizada é compatível com as duas estruturas seguintes:^{119,120}



Esqueleto da lupenona



Esqueleto da moretenona

No esqueleto da lupenona, a duas ligações (2) do grupo do isopropilideno temos um carbono terciário (-CH), enquanto que no esqueleto da moretenona na mesma posição (2) temos um carbono secundário (-CH₂).

Conhecendo já a ressonância de todos os carbonos, foi possível confirmar através da técnica de INEPT selectivo, qual das estruturas representa o composto isolado. Esta técnica permite ver a conectividade entre um determinado próton, irradiando a ressonância correspondente, e os carbonos que distam dele duas ou três ligações, quando se usa como constante de acoplamento J (C/H) a longa

distância 7 Hz. No caso presente, irradiando a ressonância do próton H-19, observam-se os sinais seguintes:

	C-20	151,2 ppm (grande)	
	C-29	110,6 ppm(+ pequeno)	
	C-18	49,1 ppm	(++ pequeno)
CARBONO TERCIÁRIO	→ C-13	38,9 ppm	(++++ pequeno)
	C-21	30,7 ppm	(++++ pequeno)
	C-30	20,0 ppm	(+++ pequeno)

A existência de um carbono terciário, sem ser C-18 (apareceria nas duas estruturas), demonstra que o composto isolado por nós é a lupenona (**117**) e não a moretenona. As atribuições de todos os carbonos da lupenona (**117**), estão sistematizados na Tabela 33 (página 120).

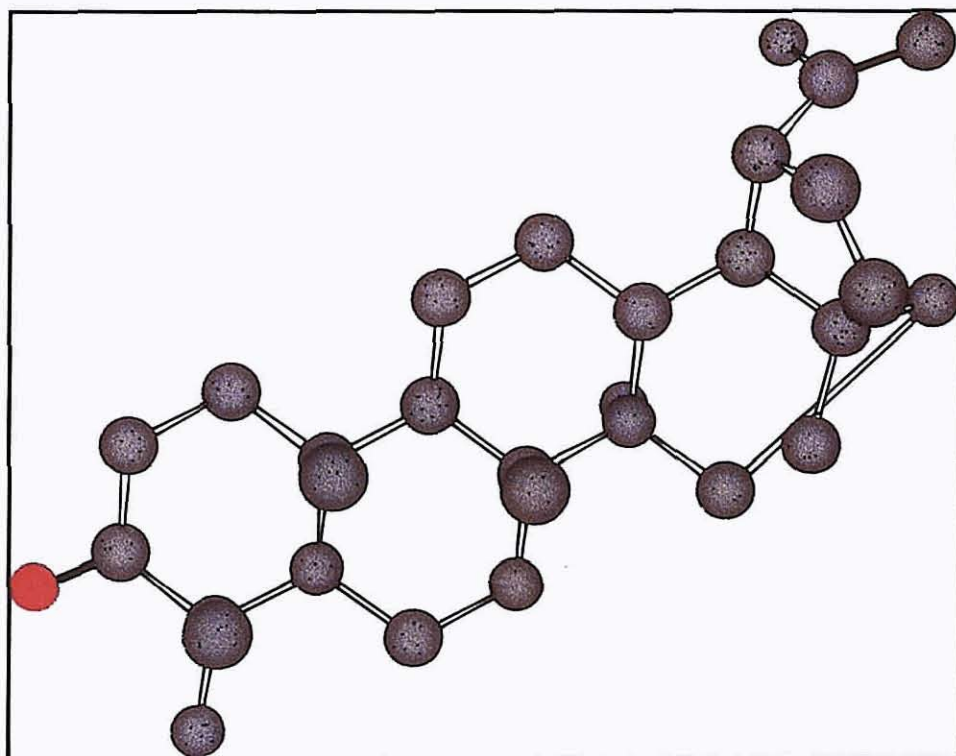


Figura 15- Representação tridimensional da lupenona (117), com a exceção dos hidrogénios

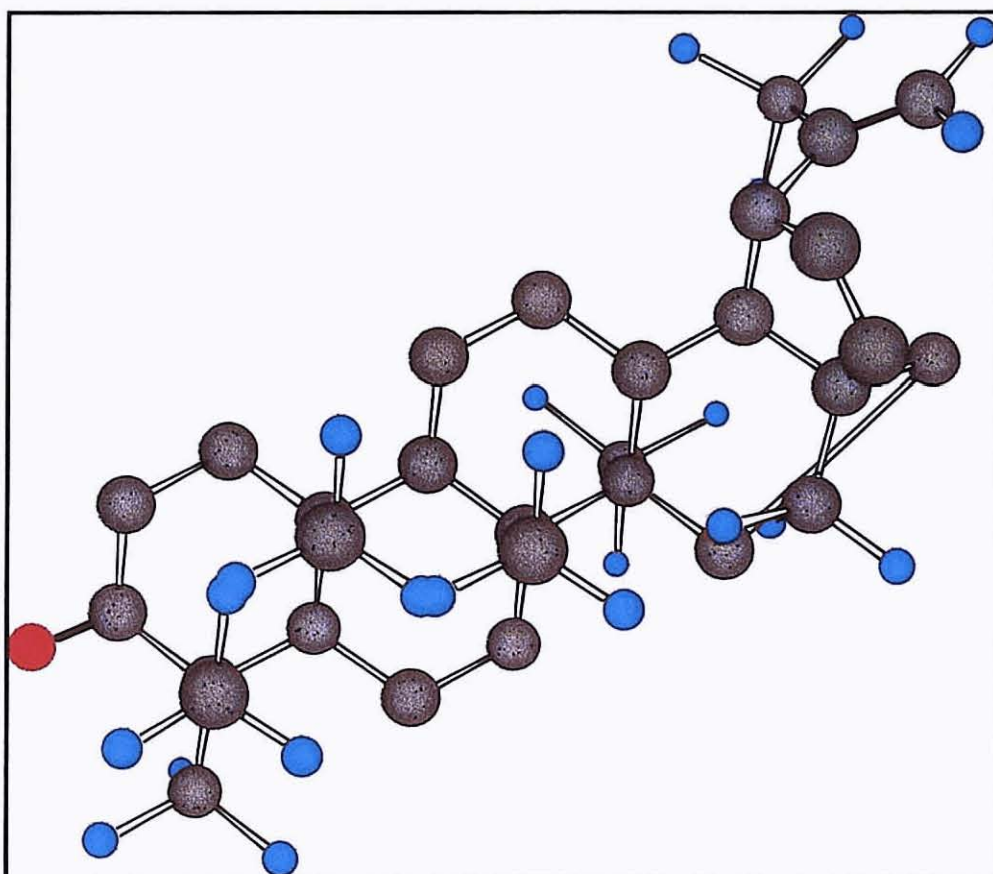
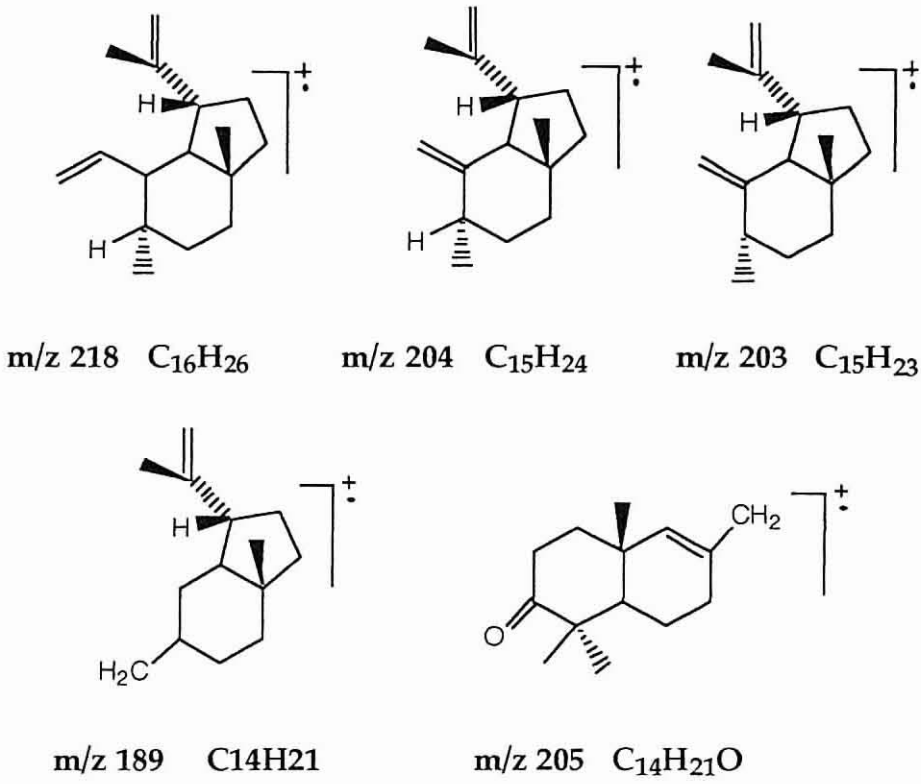


Figura 16- Representação tridimensional da lupenona (117), em que os hidrogénios, com a exceção dos grupos metilo e isopropilideno, estão escondidos

Pela análise do espectro de massa de impacto electrónico do composto (117), é possível identificar o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 424, o qual é consistente com a fórmula $C_{30}H_{48}O$. Além do ião molecular é também possível identificar fragmentos característicos dos triterpenos pentacíclicos m/z 189, 203, 204, e 218.

O fragmento m/z 205 característico dos triterpenos pentacíclicos com um grupo cetona no anel A ou B (Esquema 13 e Figura 17).

Este espectro de massa não apresenta o fragmento correspondente à perda de uma molécula de água o que confirma a estrutura proposta.^{108,109,121}



Esquema 13

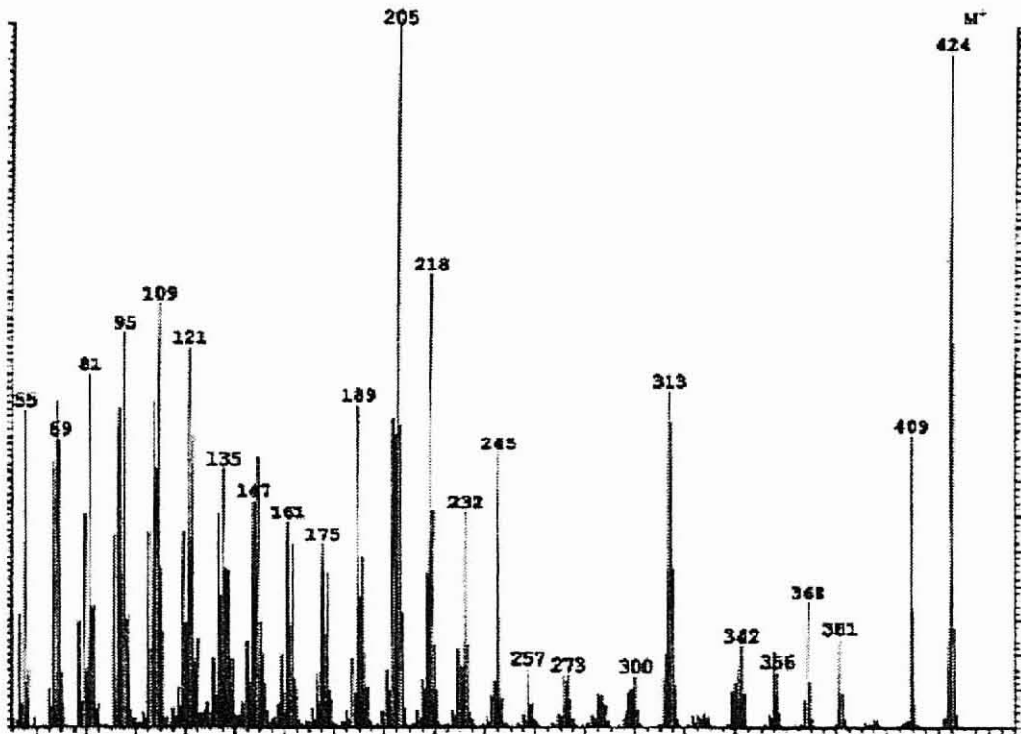
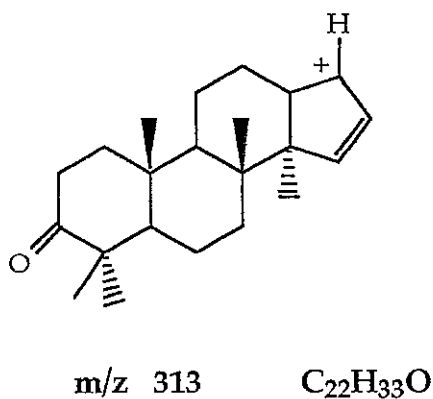


Figura 17 - Espectro de massa da lupenona (117).

Na tentativa de provar por espectrometria de massa a posição do grupo

isopropilideno, tentou-se ver se se tratava do esqueleto da lupenona ou do esqueleto da moretenona (página 92). Sabemos que os espectros de massa correspondentes aos compostos lupenona ou moretenona diferem fundamentalmente na existência de um fragmento m/z 313 (Esquema 14), de intensidade bastante razoável no primeiro e praticamente inexistente no segundo.

De forma a poder tirar mais conclusões sobre o efeito da posição do grupo isopropilideno no anel D, no aparecimento do ião fragmento m/z 313 apenas no espectro da lupenona (117), foram feitos estudos de dissociação induzida por colisão (CID) usando a técnica de MIKES e estudos de medida de massa exacta. No entanto por análise do espectro de CID-MIKES apenas podemos concluir que o pico a m/z 313 resulta da fragmentação do ião molecular. Os resultados de medida de massa exacta também se mostraram inconclusivos para a diferenciação dos dois compostos.



Esquema 14

Com o objectivo de esclarecer a questão da posição do grupo isopropilideno e a estereoquímica do composto foi utilizado o ultravioleta e o dicroísmo circular. A lupenona tem a sua absorvância máxima a 200 nm, tendo ainda mais duas bandas a 227 e 280 nm.

O estudo do dicroísmo circular^{122,123,124} do composto, na zona da banda de

280 nm, demonstrou que este é opticamente activo e possui um efeito de Cotton positivo. Contudo, não foi possível tirar quaisquer conclusões acerca da estereoquímica dos diferentes centros quirais, devido ser praticamente impossível trabalhar com as outras bandas no aparelho utilizado.

Da análise do espectro de NOESY, referido anteriormente, não foi possível determinar a configuração relativa do centro quiral, C-5 ou seja de acordo com estes dados tanto pode ser α ou β . A determinação da configuração destes centros só foi possível a partir da análise de Raio X da lupenona.¹²⁵

A análise de Raio X prova sem qualquer dúvida que os anéis A e B estão ligados numa configuração *trans* e desta forma H-5 está *trans* em relação a Me-25, (117), Figura 18.

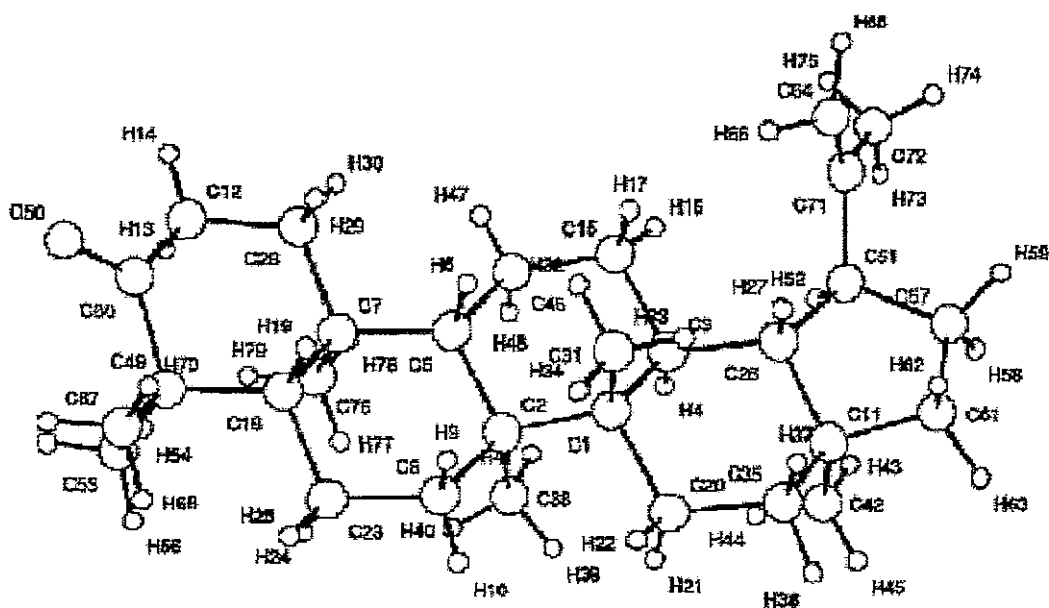


Figura 18- Representação tridimensional da lupenona (117), através dos dados de Raio X.

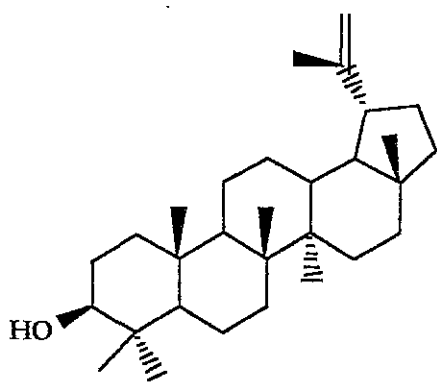
Muitos dos resultados descritos neste capítulo foram sistematizados num artigo publicado.¹²⁶

2.7.1.2 Identificação dos restantes triterpenos

Foram identificados, no extracto de hexano das folhas de *A. dealbata*, os triterpenos pentacíclicos lup-20(29)-eno-3 β -ol (118) e 1 β -metil-lup-20(29)-eno-3 β -ol (119).

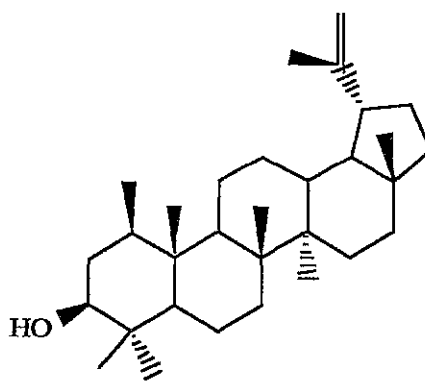
A estrutura proposta para os dois triterpenos pentacíclicos, foi confirmada por espectrometria de massa de impacto electrónico. Os espectros correspondentes apresentam os picos correspondentes aos iões moleculares M⁺ a m/z 426 e 440, os quais são consistentes com as fórmulas C₃₀H₅₀O e C₃₁H₅₂O, respectivamente.

É importante referir que os espectros de massa de ambos os compostos apresentam também os fragmentos característicos de triterpenos pentacíclicos,¹⁰⁸ a m/z 189, 203, 204 e 218.



lup-20(29)-eno-3 β -ol

(118)



1 β -metil-lup-20(29)-eno-3 β -ol

(119)

A análise dos espectros de RMN de ¹H dos compostos (118) e (119), contribuíram significativamente para o estabelecimento da estrutura destes compostos.

Os espectros de ambos os compostos apresentam:

a) Um sinal em forma de duplo duplete, correspondente à ressonância do

protão H-3;

(118) H-3 δ 3,18 ppm (dd) $J_{ae}= 5,6$ Hz, $J_{aa}= 11,3$ Hz

(119) H-3 δ 3,13 ppm (dd) $J_{ae}= 5,6$ Hz, $J_{aa}= 11,0$ Hz

b) Dois sinais em forma de dupletos e duplo dupletos, cada um correspondente a 1H, devido aos prótons vinílicos;

(118) H-29 δ 4,69 ppm (d) $J_{29-29'}= 2,5$ Hz

(118) H-29' δ 4,56 ppm (dd) $J_{29'-29}= 2,5$ Hz, $J_{29'-30}= 1,3$ Hz

(119) H-29 δ 4,65 ppm (d) $J_{29-29'}= 2,3$ Hz

(119) H-29' δ 4,52 ppm (dd) $J_{29'-29}= 2,3$ Hz, $J_{29'-30}= 1,4$ Hz

c) Um sinal em forma de singuleto correspondente ao metilo vinílico do grupo isopropilideno;

(118) H-30 δ 1,68 ppm (s)

(119) H-30 δ 1,68 ppm (s)

d) Um sinal em forma de sexteto, correspondente a 1H, que é atribuído a um protão do anel E, geminal ao grupo isopropilideno, H-19;

(118) H-19 δ 2,38 ppm (sext.) $J_{ee}= 5,8$ Hz, $J_{ea}= 11,4$ Hz

(119) H-19 δ 2,34 ppm (sext.) $J_{ee}= 5,7$ Hz, $J_{ea}= 11,4$ Hz

e) Também seis sinais em forma de singuleto correspondentes à ressonância dos seis grupos metilos;

	<u>Me-23</u>	<u>Me-24</u>	<u>Me-25</u>	<u>Me-26</u>	<u>Me-27</u>	<u>Me-28</u>
(118)	1,03 ppm	0,97 ppm	0,83 ppm	0,94 ppm	0,76 ppm	0,79 ppm

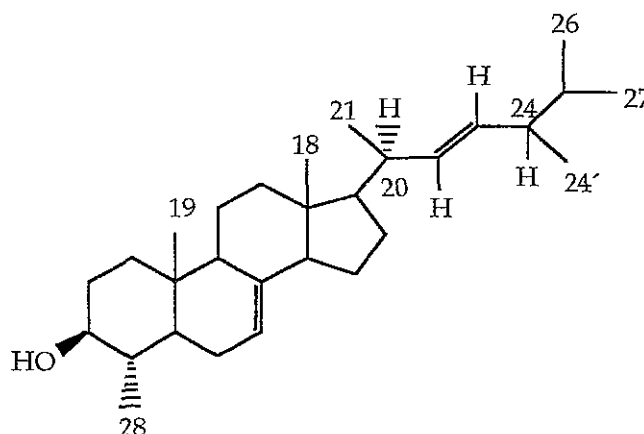
(119) 1,03 ppm 0,88 ppm 0,83 ppm 0,86 ppm 0,73 ppm 0,78 ppm

O espectro composto (119) além dos seis singletos referidos atrás, apresenta um duplete a δ 0,94 ppm ($J= 3,8$ Hz), correspondente à ressonância dos prótons do grupo metilo Me-1.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C dos compostos podem-se identificar os sinais correspondentes à ressonância do carbono C-3 ligado ao grupo hidroxilo, e dos carbonos do grupo isopropilideno. A ressonância do carbono C-3 dos compostos (118) e (119) aparecem respectivamente a δ 79,0 e 78,4 ppm, enquanto a dos carbonos vinílicos do grupo isopropilideno, C-20 e C-29, aparecem respectivamente a δ 151,0, 109,3 e 149,9, 109,7 ppm.

Os dados de RMN de ^{13}C dos compostos (118), estão sistematizados na Tabela 33 (página 134).

Do extracto de hexano de *A. dealbata* foi também isolado um triterpeno tetracíclico (120).

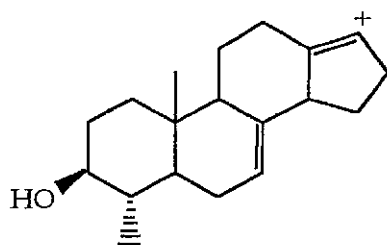


(22E)-4-metilergosta-7,22-dieno-3 β -ol

(120)

Pela análise do espectro de massa é possível confirmar a existência do ião molecular, M^+ a m/z 412, consistente com a fórmula proposta $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$. Este

espectro apresenta um dos fragmentos mais característicos dos triterpenos tetracíclicos, o fragmento correspondente a saída da cadeia lateral, m/z 271 (Esquema 15).



m/z 271 $C_{19}H_{27}O$

Esquema 15

Da análise do espectro de RMN de 1H podemos afirmar que este composto têm quatro grupos metilo na cadeia lateral, cujas ressonâncias surgem na forma de quatro singletos largos de δ 0,92 a 0,97 ppm, e também três grupos metilo na estrutura tetracíclica, cujas ressonâncias surgem em forma de singletos de δ 0,47 a 0,80 ppm.^{127,128}

O sinal correspondente à ressonância do próton H-3 aparece na forma de um multipletto largo a δ 3,39 ppm.

Os prótons correspondentes aos prótons vinílicos da cadeia lateral, formam um sistema ABX, desta forma o sinal correspondente às ressonâncias dos prótons H-22 e H-23 surgem em forma de duplo dupletto.

H-22 δ 5,26 ppm (dd) $J_{22-23}=15,6$ Hz, $J_{22-20}=8,7$ Hz

H-23 δ 5,11 ppm (dd) $J_{23-22}=15,6$ Hz, $J_{23-24}=8,7$ Hz

O sinal correspondente à ressonância do próton vinílico da ligação dupla endocíclica, H-7, surge em forma de singuleto largo a δ 5,29 ppm.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C é possível a identificação das

seguintes ressonâncias (Tabela 18):

C	δ (ppm)
3	71,3
7	130,2
8	139,9
22	139,2
23	118,6

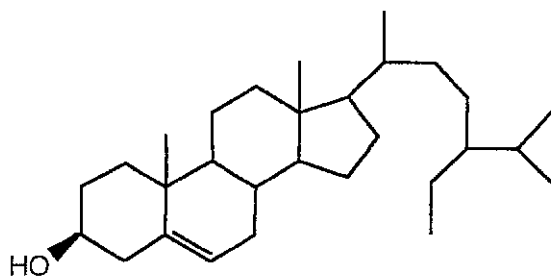
Tabela 18 - Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (120)

Este composto apresenta um espectro de UV com quatro bandas, a mais intensa a 197 nm. As outras, por ordem decrescente de intensidades, 207, 224 e 275 nm.

O estudo do dicroísmo circular¹²⁹ do composto, na zona da banda mais intensa, demonstrou que este é opticamente activo e possui um efeito de Cotton negativo.

O β -sitosterol (121), um dos compostos mais frequentemente isolado nos extractos de plantas, foi também neste caso isolado do extracto de hexano de *A. dealbata*.

Por espectrometria de massa é possível a identificação deste esteróide, pois apresenta um pico correspondente ao ião molecular M^+ a m/z 414, consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$.

 **β -sitosterol****(121)**

Por análise do espectro de RMN de ^1H do composto (121), podemos verificar a existência de dois grupos metilo endocíclicos, pelo aparecimento de dois sinais em forma de singuleto a δ 0,68 e 1,02 ppm, respectivamente, os quais correspondem à ressonância dos prótons dos grupos metilo Me-18 e Me-19. Os quatro grupos metilo existentes na cadeia lateral, aparecem em forma de multipletto complexo a δ 0,79 - 0,87 ppm.

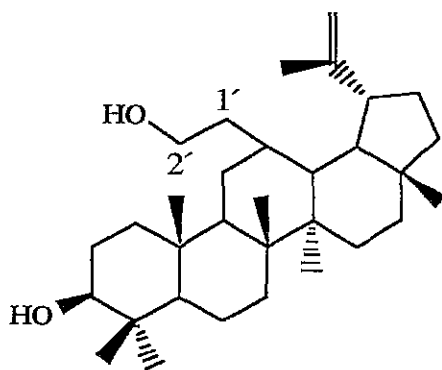
É possível identificar também o sinal correspondente à ressonância do próton H-3, um multipletto a δ 3,53 ppm. A ressonância do próton vinílico, H-6, aparece em forma de um dupletto a δ 5,35 ppm ($J = 4,9$ Hz), enquanto que a dos dois prótons, H-2, surgem em forma de multipletto a δ 2,31 ppm.

Por análise do RMN de ^{13}C foi possível identificar as ressonâncias dos seguintes carbonos (Tabela 19):

C	δ (ppm)
3	71,8
5	140,7
6	121,7

Tabela 19 - Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (121)

O espectro de massa do 12-(2'-hidroxietil)lup-20(29)-eno-3 β -ol (122), tanto pela técnica de ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB) como por EI, não apresenta o pico correspondente ao ião molecular; no entanto apresenta fragmentos característicos dos triterpenos pentacíclicos, m/z 189, 207 e 218. A estrutura proposta para o composto (122) deveria apresentar um ião molecular, M^+ 470, consistente com a fórmula $C_{32}H_{54}O_2$.



(122)

Por análise do espectro de RMN de 1H do composto (122) podemos verificar que este tem o perfil característico da família do lupeno, apresentando sinais correspondentes à ressonância dos prótons vinílicos do grupo isopropilideno. A do próton H-29' aparece como um singuleto largo a δ 4,57 ppm e a do próton H-29 como um duplete a δ 4,69 ppm ($J = 2,3$ Hz). A ressonância dos prótons do grupo metilo 30 aparece como um sinal em forma de singuleto a δ 1,68 ppm e a do H-19 como um sexteto a δ 2,38 ppm ($J = 5,7$ e 11,2 Hz).

Os desvios químicos de 1H e as constantes de acoplamento correspondentes às ressonâncias dos prótons do composto (122) estão apresentados na Tabela 20.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3	3,19 (dd)	5,5; 11,2
23	1,03 (s)	
24	0,97 (s)	
25	0,83 (s)	
26	0,94 (s)	
27	0,76 (s)	
28	0,79 (s)	
2'	3,64 (t)	6,8

Tabela 20 - Desvios químicos de ^1H (δ) do composto (122)

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C é possível identificar as seguintes ressonâncias típicas (Tabela 21).

C	δ (ppm)
3	79,0
20	151,0
29	109,3
2'	63,1

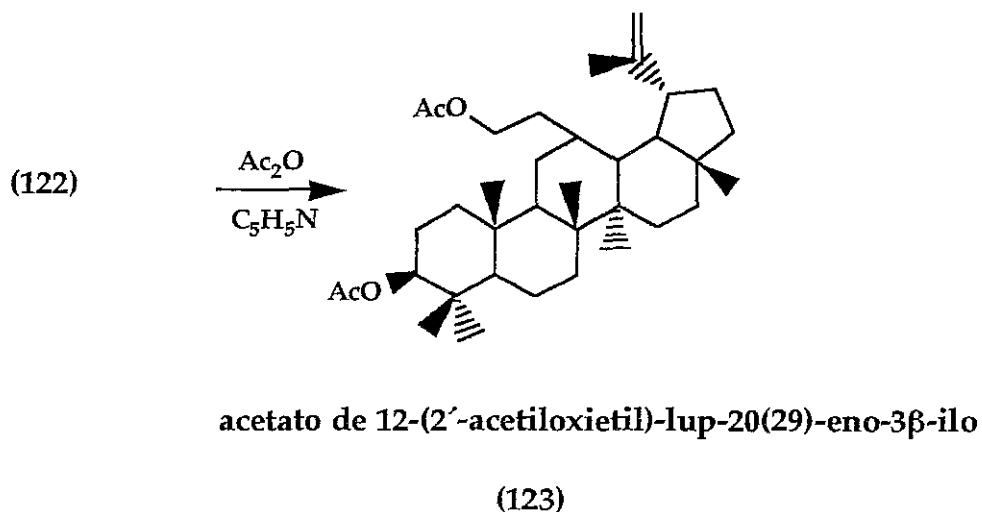
Tabela 21- Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (122)

Pela análise do espectro DEPT (135°) do composto (122) verifica-se que o carbono C-2', ao contrário do que seria de prever tendo em conta a integração do sinal correspondente à ressonância dos prótons a ele ligados (RMN de ^1H), era um $-\text{CH}_2$ e não um $-\text{CH}$.

Devido a alguns resultados não estarem muito de acordo com a estrutura proposta (122), resolvemos acetilar a amostra de forma a determinar quantos grupos $-\text{OH}$ livres existem na molécula e se possível observar algumas

modificações.

Da análise do RMN de ^1H do produto acetilado (123) (Esquema 16) verifica-se que a ressonância correspondente ao protão H-3 desloca-se para δ 4,48 ppm, e surge em forma de duplo duplete distorcido. O sinal correspondente à ressonância do protão H-2' desloca-se para 4,05 ppm, e surge em forma de triplete e com integração concordante com dois protões.



Esquema 16

Este facto indica-nos que ocorreu a acetilação no grupo 2'-OH, a qual modifica substancialmente o ambiente sentido pelos dois protões H- 2'.

Neste espectro surge um sinal em forma de singuleto largo a δ 2,05 ppm devido aos dois grupos metilo dos dois grupos acetato. Os sinais correspondentes à ressonância dos grupos metilo da estrutura base aparecem no produto acetilado mais juntos, menos bem definidos, enquanto que os restantes sinais praticamente não são alterados. Na Tabela 22 são descritos os desvios químicos de todos os metilos e o seu desvio em relação aos dos composto (122).

H	δ (ppm)	Δ 122
23	1,03 (s)	0,00
24	0,94 (s)	0,03
25	0,85 (s)	0,02
26	0,88 (s)	0,06
27	0,79 (s)	0,03
28	0,83 (s)	0,04

Tabela 22- Desvios químicos de ^1H (δ) do composto (123)

A ressonância do grupo metilo que é mais alterada com a acetilação do segundo grupo álcool (2'-OH), porque esta mais próximo deste, é o do Me-26, por este facto foi proposta a posição 12 para o grupo 2'-hidroxietilo.

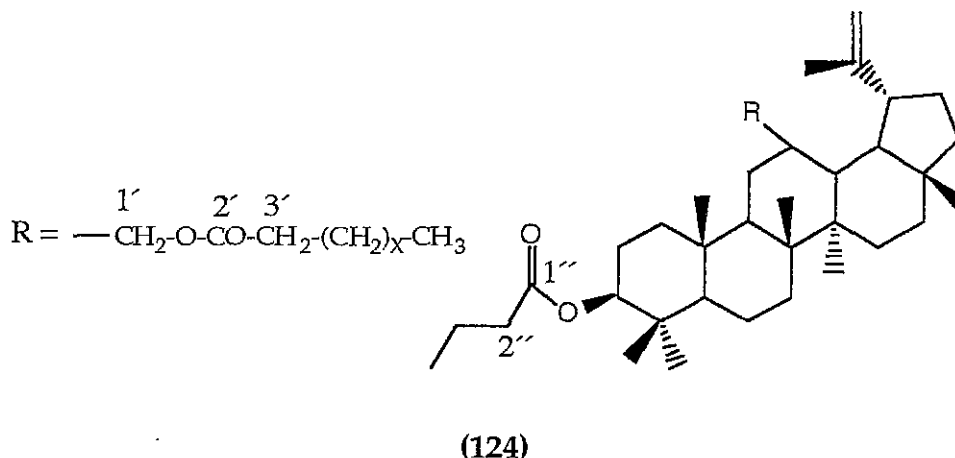
Da análise do espectro de RMN de ^{13}C do composto acetilado (123) verifica-se o aparecimento de dois sinais a δ 174,8 e 171,1 ppm, devidos à ressonância dos carbonilos dos dois grupos éster. A ressonância do carbono C-3 desloca-se para o δ 81,0 ppm e o C-2' para o δ 64,7 ppm. Verifica-se ainda o aparecimento da ressonância de dois carbonos correspondentes aos grupos metilo dos dois grupos éster, a δ 21,1 e 21,4 ppm. Foi possível o assinalamento das ressonâncias deste carbonos, pela análise do HETCOR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto acetilado, verificando-se a correlação entre o singuleto correspondente aos grupos metilo do grupo acetato no espectro de RMN de ^1H com estes sinais no RMN de ^{13}C .

De certa forma a estrutura proposta explica os resultados espectroscópicos obtidos, no entanto algumas duvidas permanecem ainda.

O espectro de massa do butirato de 12-R-lup-20(29)-eno-3 β -ilo (124), através da técnica de FAB, não apresenta o pico correspondente ao ião molecular.

Contudo foi possível identificar um fragmento que nos permite determinar a grupo éster ligado ao carbono 3, o fragmento $(M - R - C_4H_7O_2)^+$ m/z 495.

O espectro de massa utilizando a técnica de EI apresenta os fragmentos característicos dos triterpenos pentacíclicos, m/z 189, 204 e 218.



Pela análise do espectro de RMN de ^1H podemos verificar que o composto (124) apresenta o perfil característico dos triterpenos pentacíclicos da família do lupeno. O grupo isopropilideno é identificado pelos sinais correspondentes aos prótons vinílicos, H-29' aparece como um singuleto largo a δ 4,57 ppm e H-29 como um duplete a δ 4,69 ppm ($J = 2,3$ Hz). A ressonância do próton H-19 aparece na forma de sexteto a δ 2,39 ppm ($J = 5,7$ e $11,3$ Hz), enquanto que a dos prótons do grupo metilo 30 aparece como um singuleto a δ 1,68 ppm. As ressonâncias correspondentes aos prótons do composto (124) estão descritas na Tabela 23.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3	4,47 (dd)	6,9; 9,4
23	1,03 (s)	
24	0,94 (s)	
25	0,85 (s)	
26	0,88 (s)	
27	0,79 (s)	
28	0,84 (s)	
1'	4,05 (t)	6,9
3' e 2''	2,29 (t)	7,8

Tabela 23 - Desvios químicos de ^1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (124)

Da análise do espectro de RMN de ^{13}C verifica-se a existência de um sinal correspondente à ressonância do carbono carbonílico de um éster, δ 173,8 ppm. De acordo com a estrutura proposta (124) deveriam existir dois carbonos carbonilo, 2' e 1'', contudo verifica-se que o sinal tem um tamanho superior ao dos outros carbonos quaternários (exemplo C-20) o que nos leva a pensar que sejam dois sinais sobrepostos, como seria de prever pelo espectro de RMN de ^1H . As ressonâncias correspondentes aos carbonos do composto (124) estão descritas na Tabela 24.

C	δ (ppm)
3	80,6
20	151,0
29	109,4
1'	64,4

Tabela 24- Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (124)

2.7.2 Triterpenos isolados no extracto de hexano das flores de *A. dealbata*

Foram isolados dois triterpenos pentacíclicos do extracto de hexano das flores de *A. dealbata*:

- * lupenona (117);
- * lupeol (118);

Foi também isolado um triterpeno tetracíclico:

(22E)-4-metilergosta-7,22-dieno-3 β -ol (120);

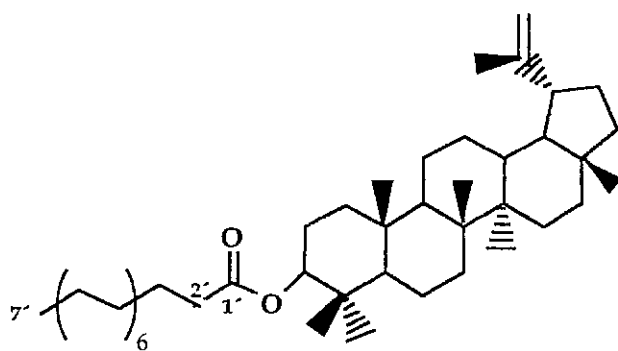
A discussão da identificação destes compostos foi efectuada na alínea 5.6.1.2.

2.7.3 Triterpenos isolados no extracto de hexano das sementes de *A. dealbata*

Foram isolados três triterpenos pentacíclicos do extracto de hexano das sementes de *A. dealbata*:

- * lupenona (117);
- * palmitato de lupenilo (125);
- * araquidato de lupenilo (126);

A estrutura proposta para o palmitato de lupenilo (125) é confirmada por espectrometria de massa impacto electrónico, verifica-se a existência de um pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 664, consistente com a fórmula $C_{46}H_{80}O_2$. Existe ainda um fragmento muito característicos dos ésteres de cadeia longa, $(M - C_{16}H_{31}O_2)^+$ m/z 409, e os fragmentos característicos dos triterpenos pentacíclicos, m/z 189, m/z 204 e m/z 218.



(125)

Por análise do espectro de RMN de ^1H é possível confirmar a estrutura proposta. O grupo isopropilideno é identificado pelo aparecimento dos sinais característicos dos prótons vinílicos, do H-19 e do Me-30 (Tabela 25).

H	δ (ppm)	J (Hz)
19 β	2,36 (sext.)	5,8; 11,6
29'	4,57 (s)	
29	4,69 (d)	2,0
30	1,68 (s)	

Tabela 25 - Desvios químicos de ^1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (125)

Devido ao grupo 3-hidroxilo se encontrar esterificado, o sinal correspondente à ressonância do próton H-3 aparece a maiores valores de frequência do que no caso do lupeol (118), aparece a δ 4,47 ppm e constantes de acoplamento ($J=5,5$ e $10,2$ Hz). Com a ajuda dos estudos de RMN realizados na lupenona (117), foi possível fazer uma atribuição dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons dos seis grupos metilo da estrutura (125) (Tabela 26).

H	δ (ppm)
23	1,03 (s)
24	0,94 (s)
25	0,88 (s)
26	0,87 (s)
27	0,79 (s)
28	0,84 (s)

Tabela 26 - Desvios químicos de ^1H (δ) dos grupos metilo do composto (125)

O sinal correspondente à ressonância dos dois prótons que se encontram na posição α relativamente ao grupo carbonilo surge na forma de triplete, a δ 2,29 ppm ($J=7,7$ Hz).

Por análise do espectro de RMN de ^{13}C do composto (125), é possível o assinalamento do sinal a δ 173,3 ppm, correspondente claramente à ressonância do carbono carbonilo do grupo éster, C-1'. Com a ajuda dos espectros DEPT (135° e 90°) foi possível identificar o sinal correspondente ao carbono do grupo metilo terminal da cadeia lateral:

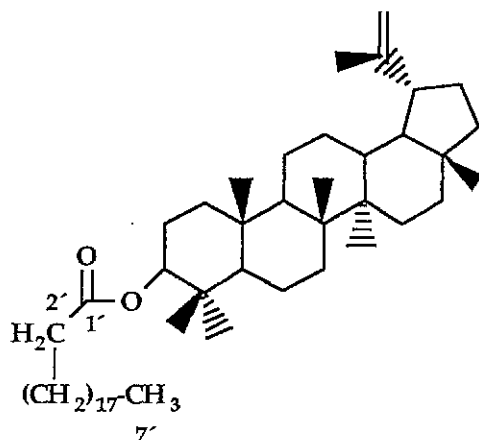
C-7' δ 17,3 ppm

As ressonâncias de RMN de ^{13}C do composto (125) estão sistematizadas na Tabela 33 (página 134), estes resultados foram obtidos com ajuda dos dados obtidos para a lupenona (117) e com a análise dos espectros DEPT (135° e 90°) do composto (125).

No espectro de IV do composto (125) é possível observar uma banda intensa a 1706 cm^{-1} , a qual é indicativa da presença ligação $\text{C}=\text{O}$ do carbonilo de um éster.

A estrutura do araquinato de lupenilo (126) foi confirmada por espectrometria de massa. O espectro de massa do composto apresenta um pico

correspondente ao íon molecular, M^+ , a m/z 720, consistente com a fórmula molecular $C_{50}H_{88}O_2$. Apresenta também um fragmento característico dos ésteres de cadeia longa, $(M - C_{20}H_{39}O_2)^+$ m/z 409.



(126)

O espectro de RMN de 1H do composto (126) é muito parecido com o perfil geral do espectro de (125), verificando-se que o primeiro apresenta uma zona bastante mais complicada a δ 0,6-2,6 ppm. Os dados de RMN de 1H estão sistematizados na Tabela 27.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3 α	4,47 (dd)	7,3; 9,6
29	4,69 (d)	2,0
29'	4,57 (s)	
30	1,68 (s)	
2'	2,29 (t)	7,8

Tabela 27- Desvios químicos de 1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (126)

Os dados mais relevantes do espectro de ^{13}C , estão descritos na Tabela 28, que são as ressonâncias dos carbonos dos grupos funcionais do composto (126).

C	δ (ppm)
3	80,4
20	150,7
29	110,1
1'	172,9

Tabela 28- Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (126)

2.7.4 Triterpenos isolados no extracto de metanol das flores de *A. dealbata*

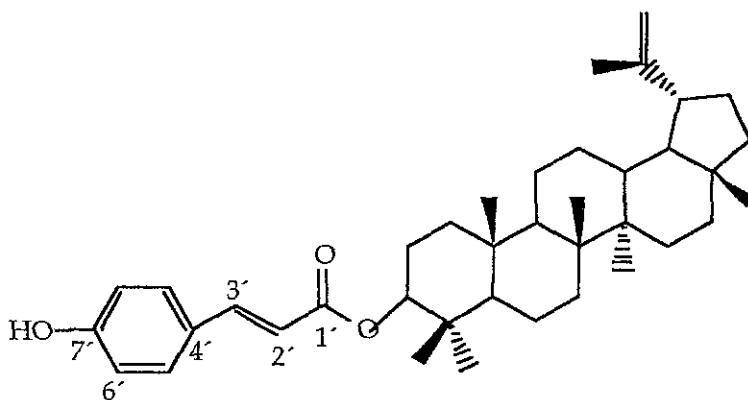
Foram isolados dois triterpenos pentacíclicos do extracto de metanol das flores de *A. dealbata*:

* *trans*-7'-hidroxicinamato de lupenilo (127);

* *trans*-7'-hidroxicinamato de lup-7,20(29)-dieno-6-ona-3 β -ilo (128);

* lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (68);

A estrutura proposta para o *trans*-7'-hidroxicinamato de lupenilo (127) foi confirmada por espectrometria de massa, pela técnica de ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB); o qual foi possível identificar o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 572, consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_3$.



(127)

Por análise do espectro de RMN de ^1H é possível identificar o grupo cinamoiloxilo, já que os sinais correspondentes aos prótons 2' e 3' aparecem em forma de dupletos respectivamente a δ 6,26 e 7,57 ppm. A determinação da correspondente constante de acoplamento ($J=16,7$ Hz), permite-nos concluir que se encontram numa configuração *trans*.¹³¹

Os sinais correspondentes ao anel benzénico do grupo cinamoiloxilo apresentam um padrão característico da substituição *para*. Os sinais correspondentes à ressonância dos dois prótons, H-5, 9', aparecem em forma de duplete a δ 7,41 ppm e os dos dois prótons, H-6', 8', a δ 6,77 ppm ($J=9,0$ Hz). Os restantes dados de RMN de ^1H são sistematizados na Tabela 28.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3 α	4,58 (dd)	5,8; 11,3
19 β	2,34 (sext.)	5,6; 11,2
23	1,04 (s)	
24	0,95 (s)	
25	0,90 (s)	
26	0,89 (s)	
27	0,79 (s)	
28	0,88 (s)	
29'	4,55 (dd)	1,2; 2,2
29	4,67 (d)	2,2
30	1,68 (s)	

Tabela 28 - Desvios químicos de ^1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (127)

O espectro de RMN de ^{13}C do composto (127) apresenta como características mais relevantes os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos do grupo cinamoiloxilo, desta forma a ressonância do carbono carbonilo do grupo éster (C-1') aparece a δ 166,8 ppm, desvio químico bastante característico deste grupo funcional.¹³²

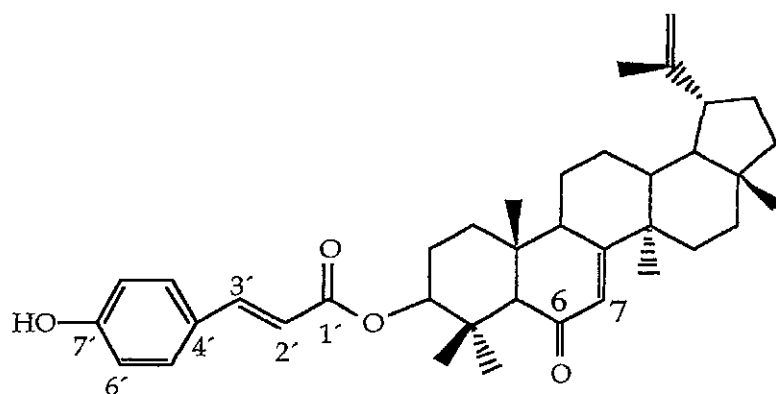
As ressonâncias dos carbonos da dupla ligação do grupo cinamoiloxilo (C-2' e C-3') aparecem respectivamente a δ 116,3 e 144,3 ppm.¹³⁰

O assinalamento das ressonâncias dos carbonos do anel benzénico foi efectuado tendo em conta os dados da bibliografia.¹³³ Os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos C-5',9' e C-6', 8' aparecem respectivamente a δ 130,0 e 116,0 ppm. Estes sinais são um pouco mais fáceis de identificar, devido ao facto do seu tamanho ser aproximadamente igual ao dobro do tamanho dos restante sinais. O sinal correspondente à ressonância do carbono C-4' aparece a δ 127,4 ppm e o sinal correspondente à do carbono C-7' a δ 158,0 ppm.

Os dados de RMN de ^{13}C do composto (127) estão sistematizados na Tabela 33 (página 134), estes resultados foram obtidos com ajuda dos dados obtidos para a lupenona (117) e também com a ajuda dos resultados da literatura.¹¹²

No espectro de infravermelho do composto (127) é possível observar uma banda larga e intensa a $3\,398\text{ cm}^{-1}$, a qual é indicativa da presença de grupos hidroxilo livres.¹³¹

O espectro de massa de FAB do *trans*-7'-hidroxicinamato de lup-7,20(29)-dieno-6-ona-3 β -ilo (128) apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 570, consistente com a fórmula $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_4$.



(128)

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do composto é possível identificar o grupo cinamoiloxilo. Os sinais correspondentes à ressonância dos prótons vinílicos H-2' e H-3' aparecem na forma de duplete respectivamente δ 6,26 e 7,56 ppm ($J = 16,5$ Hz). O valor da constante de acoplamento permite-nos concluir que este sistema vinílico se encontra numa configuração *trans*.¹³⁰

As ressonâncias dos prótons do anel aromático aparecem na forma de sistema AB, típico da substituição *para*. Desta forma, as ressonâncias dos prótons H-5',9' e H-6',8' aparecem na forma de dois dupletos a δ 7,41 e 6,79 ppm, respectivamente ($J = 8,8$ Hz).

Pela análise cuidadosa do espectro de RMN de ^1H em particular das integrações, é possível verificar que de baixo do sinal correspondente aos prótons H-6',8', aparece outro sinal correspondente ao próton da ligação dupla endocíclica H-7, como um multiplete a δ 6,76 ppm. As restantes ressonâncias de próton do composto (128) estão sistematizados na Tabela 29.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3 α	4,59 (dd)	5,4; 10,9
19 β	2,34 (sext.)	6,0; 11,7
23	1,04 (s)	
24	0,95 (s)	
25	0,90 (s)	
26	0,88 (s)	
27	0,79 (s)	
28	0,85 (s)	
29'	4,54 (dd)	1,2; 2,0
29	4,66 (d)	2,0
30	1,68 (s)	

Tabela 29 - Desvios químicos de ^1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (128)

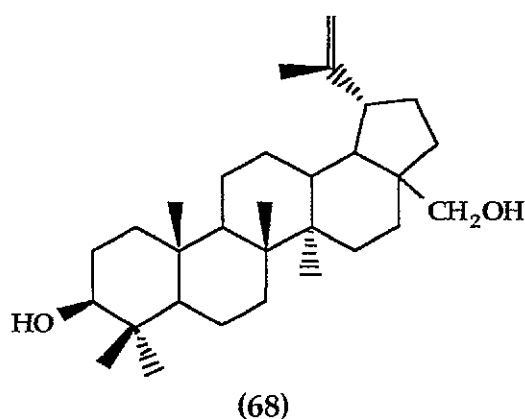
No espectro de RMN de ^{13}C do composto (128) é possível identificar as ressonâncias do grupo cinamoiloxilo, do grupo isopropilideno (Tabela 30) e também a do carbono carbonílico α,β insaturado no anel B do triterpeno. O sinal correspondente a frequência deste carbono (C-6), carbono cetônico, aparece a δ 194,1 ppm. As ressonâncias dos dois carbonos da dupla ligação endocíclica, C-7 e C-8, surgem a δ 115,0 e 133,0 ppm, respectivamente.

C	δ (ppm)
3	79,0
6	194,1
7	115,0
8	133,0
20	150,0
29	110,1
1'	167,0
2'	116,0
3'	144,0
4'	127,6
5'	130,0
6'	115,9
7'	158,0
8'	115,9
9'	130,0

Tabela 30- Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (128)

No espectro de infravermelho do composto (128) é possível observar uma banda larga e intensa a $3\,393\text{ cm}^{-1}$, a qual é indicativa da presença de grupos hidroxilo livres.¹³¹

No espectro de impacto electrónico do lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (68) observa-se o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 442, consistente com a fórmula $C_{30}H_{50}O_2$. Observam-se ainda picos correspondentes aos fragmentos característicos dos triterpenos pentacíclicos, m/z 189, 203, 207 e 220.



No espectro de RMN de ^1H do composto (68) surge um sinal em forma de sistema AB (δ 3,32 ppm e 3,79 ppm, $J=11,2\text{ Hz}$) que corresponde à ressonância dos dois prótons H-28 e é indicativo da presença do grupo OH-28.

Relativamente às outras estruturas do tipo lup-20(29)-eno já identificadas, verifica-se o desaparecimento do sinal em forma de singuleto correspondente à ressonância dos prótons de um grupo metilo; este facto é consistente com a oxidação do metilo 28 para o grupo 28- CH_2OH . Os restantes dados de RMN de ^1H do composto (68) estão sistematizados na Tabela 31.

H	δ (ppm)	J (Hz)
3 α	3,19 (dd)	5,5; 11,2
19 β	2,38 (sext.)	5,6; 10,6
23	1,02 (s)	
24	0,98 (s)	
25	0,82 (s)	
26	0,97 (s)	
27	0,76 (s)	
29'	4,58 (dd)	1,4; 2,1
29	4,68 (d)	2,1
30	1,68 (s)	

Tabela 31 - Desvios químicos de ^1H (δ) e correspondentes constantes de acoplamento do composto (68)

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C do composto (68) é possível identificar a ressonância de dois carbonos correspondes aos carbonos ligados ao grupo hidroxilo; C-3 a δ 79,0 ppm e C-28 a δ 60,5 ppm. Com a ajuda do espectro DEPT (135 $^\circ$) de (68), verifica-se que o sinal que foi atribuído ao C-3 corresponde um carbono terciário e o sinal atribuído ao carbono 28 corresponde um carbono secundário. Estes resultados são consistentes com a estrutura proposta para (68).

Os assinalamentos mais relevantes de RMN de ^{13}C do composto (68), estão sistematizados na Tabela 32.

C	δ (ppm)
3	79,0
20	150,5
28	60,5
29	109,7

Tabela 32- Desvios químicos de ^{13}C (δ) do composto (68)

No espectro de infravermelho do composto (68) é possível observar uma banda larga e intensa a 3280 cm^{-1} , a qual é indicativa da presença de grupos hidroxilo livres, e ainda duas outras bandas a 2926 e 2855 cm^{-1} devido ao alongamento das ligações C-H e C-H₂.

C	117	118	125	127
1	40,1	38,7	38,3	38,0
2	34,6	27,4	25,3	25,2
3	215,4	79,0	80,6	80,6
4	47,7	38,9	38,2	38,4
5	55,5	55,3	55,7	55,4
6	22,0	20,9	21,2	20,9
7	34,0	34,3	38,7	34,9
8	41,4	40,8	41,1	40,8
9	50,5	50,4	50,6	50,3
10	37,4	37,2	34,5	37,1
11	20,3	18,3	18,4	18,2
12	26,0	25,2	24,1	25,1
13	38,9	38,1	37,4	37,8
14	43,7	42,8	43,1	42,8
15	28,3	27,5	27,7	27,4
16	36,3	35,6	34,5	35,6
17	43,5	43,0	43,2	43,0
18	49,1	48,3	48,5	48,3
19	48,8	48,0	48,2	48,0
20	151,2	151,0	150,2	151,0
21	30,7	29,9	29,9	31,9
22	40,8	40,0	40,3	40,0
23	27,2	28,0	28,3	28,0
24	21,7	19,3	19,6	19,3
25	16,4	16,1	16,6	16,2
26	16,4	16,0	16,3	16,0
27	15,1	14,6	14,9	14,1
28	18,7	15,4	17,0	14,5
29	110,5	109,3	110,2	109,4
30	20,0	18,0	18,5	18,0
1'			173,3	166,8
2'			34,2	116,3
3'				144,3
4'				127,4
5'-9'				130,0
6'-8'				116,0
7'			17,3	158,0

Tabela 33 - Desvios químicos de ^{13}C (δ a partir do TMS) dos compostos (117), (118), (125) e (127).

2.8 Parte experimental

2.8.1 Reagentes e equipamento

Os espectro de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrofotómetro com transformadas de Fourier, Mattoson Gallexi 7020, em pastilhas de KBr. No caso das amostras em que a quantidade era muito pequena e devido ao facto da sua recuperação por este método ser difícil, foi utilizado outro processo. Este consiste em pastilhas de KBr que são impregnadas com uma solução da amostra em CCl_4 e em seguida secas sob vazio. Desta forma a pastilha fica coberta com uma fina película da amostra. Este método foi utilizado nas amostras: (119), (124), (126) e (128).

Os espectros de massa foram adquiridos num espectrómetro de Massa VG-Autospec Q, utilizando uma fonte de impacto electrónico 70 eV a 200 °C; os espectros de FAB foram efectuados utilizando como matriz o álcool 3-nitrobenzílico (NBA) e com bombardeamento com iões Cs^+ , estando a fonte a uma temperatura de 50 °C.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram adquiridos no aparelho Bruker AMX-300 operando a 300,13 e 75,47 MHz respectivamente; utilizando-se em geral benzeno deuterado (C_6D_6) como solvente, embora por vezes se tivesse usado como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As constantes de acoplamento são expressas em Hz.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de placa aquecida Reichert, modelo Thermovar e não foram corrigidos.

Na cromatografia em camada fina (tlc) utilizaram-se folhas plastificadas revestidas com sílica gel 60 N-HR/UV₂₅₄ da Merck. A revelação das placas de tlc foi feita com luz ultravioleta, 254 e 366 nm, no entanto, em alguns casos a revelação foi efectuada em câmara de iodo.

Na purificação dos compostos isolados dos extractos foram utilizadas placas de tlc preparativo. Estas foram feitas em placas de vidro (20x20), previamente revestidas com uma camada de sílica gel Merck 60 GF₂₅₄ de 0.2 mm de espessura. Numa preparação típica de 10 placas, misturaram-se 100 g de sílica gel 60 GF₂₅₄ com 200 ml de água destilada, formando-se uma papa à qual sem retiraram cuidadosamente as bolhas de ar por meio de agitação. Esta foi espalhada com a espessura uniforme de 0.2 mm sobre placas de 20x20 cm, previamente desengorduradas, limpas e secas ao ar. Imediatamente, antes de serem utilizadas, foram "activadas" a 100°C durante aproximadamente 6 horas.

Os extractos de hexano de todas as amostras (folhas, flores e sementes) sofreram fraccionamento prévio por cromatografia de coluna (CC), usando como fase estacionária alumina com desactivação III. Em geral na purificação dos extractos por CC, utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 com granulometria 0.015-0.040 mm.

Nos fraccionamentos seguintes dos extractos usou-se o método geralmente usado na revelação de triterpenos e esteróides.

Este consiste na pulverização de placas de tlc (preparadas sem indicador), após eluição, com o reagente de Libermann-Burchard^{134,135,136}(RLB) (mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico 95:5), as quais são em seguida aquecidas a 100-110 °C para a obtenção da máxima cor.

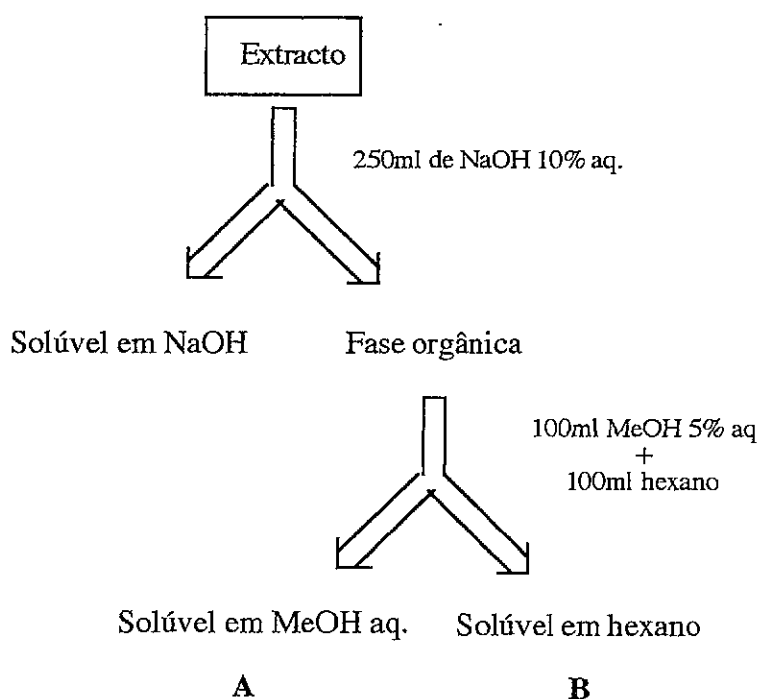
Os solventes utilizados eram analiticamente puros, ou comerciais purificados por destilação. Em particular, os solventes utilizados na montagem em soxhlet, o hexano e o metanol, foram bidestilados.

2.8.2 Extracção e fraccionamento das amostras

As folhas, flores e sementes da *A. dealbata* foram cortadas em Março de 1991 na zona litoral de Aveiro, próximo da Vageira. Após a secagem ao ar e ao abrigo da luz, separaram-se folhas, flores e sementes. As amostras separadas foram finamente moídas num moinho de lâminas.

Na preparação do extracto de hexano das folhas de *A. dealbata*, cerca de 250 g das folhas moídas foram colocadas no cartucho de papel de filtro colocado na montagem de soxhlet. Efectuou-se a extracção durante dez dias, contudo é de referir que nesse período a extracção apenas esteve ligada durante o dia devido a problemas de pressão de água. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida com auxílio do evaporador rotativo, o resíduo (10 g) apresentava um aspecto viscoso, verde escuro com odor intenso. A percentagem do material extraído no extracto das folhas de hexano é de 4%.

O resíduo foi dissolvido em 200 ml de éter etílico em refluxo durante 30 minutos, e em seguida sofrem o tratamento descrito no Esquema 13. O tratamento alcalino tem como objectivo fundamental a eliminação de clorofilas. A fracção orgânica (B) foi concentrada sob vácuo e em seguida cromatografada em coluna usando como suporte a alumina com desactivação III. Neste fraccionamento foram separadas seis fracções usando como eluente sucessivamente: hexano (1); tolueno (2); diclorometano (3); clorofórmio (4); acetato de etilo (5) e acetona (6).

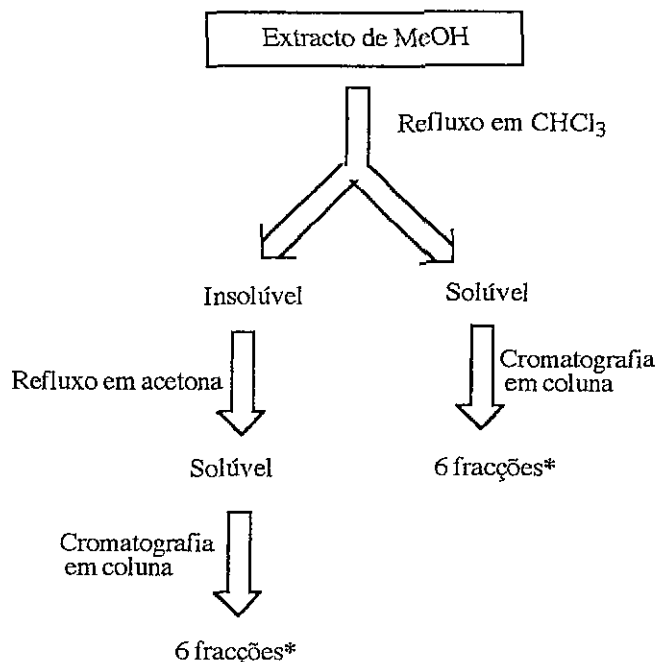
**Esquema 13**

As fracções separadas por CC da fase orgânica (B), são chamadas no caso da eluição com hexano B1; tolueno B2; diclorometano B3; clorofórmio B4; acetato de etilo B5 e acetona B6.

É importante referir que no processo de separação destas amostras por tlc, foi feito um grande esforço na utilização de solventes de boa qualidade, devido aos graves problemas de contaminação das amostras, principalmente com ftalatos.

De seguida procedeu-se a extracção por soxhlet com metanol durante 10 dias e no final desse tempo obteve-se um extracto que após evaporação do solvente originou um resíduo (20 g) de côr castanha escura e cheiro adocicado. A percentagem do material extraído no extracto das folhas de metanol é de 8%.

O extracto de metanol das folhas foi sujeito ao tratamento descrito no Esquema 14.



Esquema 14

Nas duas cromatografias em coluna efectuadas no tratamento do extracto de metanol, foi utilizado como suporte sílica gel 60 e como sistema de eluentes os mesmos que foram descritos para o extracto de hexano. As fracções obtidas da CC foram sujeitas a tlc preparativo, com o objectivo último de obter amostras puras.

Além das técnicas cromatográficas usadas na separação destes dois tipos de extractos (hexano e metanol) foi também utilizado a recristalização. A amostra é dissolvida em acetona a quente e como agente precipitante é utilizado uma pequena quantidade de metanol. Esta técnica é bastante eficaz na separação de alcanos de cadeia longa dos triterpenos.

Na preparação do extracto de hexano das flores de *A. dealbata* foram utilizados cerca de 250 g das flores moídas. No final da extracção utilizando o mesmo processo descrito para o extracto de hexano das folhas obtiveram-se 8 g de resíduo esverdeado. A percentagem do extracto de hexano nas flores é de 3%.

No extracto de metanol das flores usou-se o mesmo processo de preparação

do extracto de metanol das folhas, tendo-se obtido um resíduo (10 g) castanho bastante cheiroso. A percentagem do extracto de metanol das flores é de 4%.

Utilizando os mesmo processos para as sementes:

a) No caso do extracto de hexano obteve-se um resíduo (12 g). A percentagem deste extracto na amostra original é 5%.

b) No caso do extracto de metanol obteve-se um resíduo (10 g) castanho. A percentagem deste extracto na amostra original é 4%.

2.8.3 Dados espectroscópios dos compostos isoladas na *A.dealbata*

Lupenona, lup-20(29)-eno-3-ona (117); p.f.= 170-171 °C (cristalizado em acetona, p.f. lit.¹³⁷=170-171 °C)

RMN de ¹H: 1,58 (1H, m, 1-H α), 1,05 (1H, m, 1-H β), 2,30 (2H, m, 2-H), 1,14 (1H, m, 5-H α), 1,22 (2H, m, 6-H), 1,31 (2H, m, 7-H), 1,18 (1H, m, 9-H α), 1,13 (1H, m, 11-H α), 1,28 (1H, m, 11-H β), 1,83 (1H, m, 12-H β), 1,17 (1H, m, 12-H α), 1,65 (1H, m, 13-H β), 1,01 (1H, m, 15-H α), 1,68 (1H, m, 15-H β), 1,57 (1H, m, 16-H α), 1,40 (1H, m, 16-H β), 1,43 (1H, m, 18-H α), 2,48 (1H, sext., J= 5,8 e 11,4; 19-H β), 1,47 (1H, m, 21-H α), 2,02 (1H, m, 21-H β), 1,24 (1H, m, 22-H α), 1,46 (1H, m, 22-H β), 1,12 (3H, s, 23-CH₃), 1,02 (3H, s, 24-CH₃), 0,94 (3H, s, 25-CH₃), 0,98 (3H, s, 26-CH₃), 0,77 (3H, s, 27-CH₃), 0,85 (3H, s, 28-CH₃), 4,79 (1H, dd, J=1,4 e 2,5; 29'-H), 4,91 (1H, d, J=2,5; 29-H), 1,75 (3H, s, 30-CH₃).

RMN ¹³C: 40,1 (C-1), 34,6 (C-2), 215,4 (C-3), 47,7 (C-4), 55,5 (C-5), 22,0 (C-6), 34,0 (C-7), 41,4 (C-8), 50,5 (C-9), 37,4 (C-10), 20,3 (C-11), 26,0 (C-12), 38,9 (C-13), 43,7 (C-14),

28,3 (C-15), 36,3 (C-16), 43,5 (C-17), 49,1 (C-18), 48,8 (C-19), 151,2 (C-20), 30,7 (C-21), 40,8 (C-22), 27,2 (C-23), 21,7 (C-24), 16,4 (C-25), 16,4 (C-26), 15,1 (C-27), 18,7 (C-28), 110,5 (C-29), 20,0 (C-30).

IV ν max. (cm⁻¹): 1704, 1670, 830.

HR-MS: Encontrado 424,373396; Calculado para C₃₀H₄₈O, 424,370517.

EM IE m/z (int. rel.): 424 (M⁺, 94), 409 (39), 313 (44), 218 (64), 205 (100), 204 (39), 203 (15), 189 (44), 135 (34), 109 (59), 55 (44).

Dados de Raio X: A lupenona foi cristalizada num grupo ortorombico com espaço p₂1₂1₂1 com a= 10,579(2), b= 17,294(3) e c= 13,964(3) Å, V=2555 Å³. O valor final R foi 0,070 obtido por reflexão única com |F₀| > 4σ.|F₀| escolhido num intervalo de θ 1,5 < θ < 50° com radiação Mo-kα (0,71069 Å)¹². A estrutura da lupenona já tinha sido determinada com um valor de R semelhante.¹²⁵

Lupeol, lup-20(29)-eno-3-ol (118); p.f. = 212-213 °C (cristalizado em acetona, p.f. lit.¹³⁸=212-214 °C)

RMN ¹H: 3,18 (1H, dd, J=5,6 e 11,3; 3-Hα), 2,38 (1H, sext., J=5,8 e 11,4; 19-Hβ), 1,03 (3H, s, 23-CH₃), 0,97 (3H, s, 24-CH₃), 0,83 (3H, s, 25-CH₃), 0,94 (3H, s, 26-CH₃), 0,76 (3H, s, 27-CH₃), 0,79 (3H, s, 28-CH₃), 4,56 (1H, dd, J=1,3 e 2,5; 29'-H), 4,69 (1H, d, J= 2,5; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃).

RMN ¹³C: 38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 79,0 (C-3), 38,9 (C-4), 55,3 (C-5), 20,9 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,2 (C-10), 18,3 (C-11), 25,2 (C-12), 38,1 (C-13), 42,8 (C-14), 27,5 (C-15), 35,6 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 29,9 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 19,3 (C-24), 16,1 (C-25), 16,0 (C-26), 14,6 (C-27), 15,4 (C-28), 109,3 (C-29), 18,0 (C-30).

IV ν max. (cm⁻¹): 3505, 1670, 830.

EM IE m/z (int. rel.): 426 (M⁺, 100), 411(20), 408 (10), 315 (15), 218 (34), 207 (61), 204 (10), 203 (30), 189 (56), 135 (46), 109 (46).

1 β -metilup-20(29)-eno-3 β -ol (**119**); p.f. = 213-215 °C (cristalizado em acetona)

RMN de ¹H: 3,13 (1H, dd, J=5,6 e 11,0; 3-H α), 2,34 (1H, sext., J=5,7 e 11,4; 19-H β), 1,03 (3H, s, 23-CH₃), 0,88 (3H, s, 24-CH₃), 0,83 (3H, s, 25-CH₃), 0,86 (3H, s, 26-CH₃), 0,73 (3H, s, 27-CH₃), 0,78 (3H, s, 28-CH₃), 4,52 (1H, dd, J=1,4 e 2,3; 29'-H), 4,65 (1H, d, J=2,3; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃).

RMN ¹³C: 38,6 (C-1), 27,3 (C-2), 78,4 (C-3), 38,7 (C-4), 55,2 (C-5), 20,7 (C-6), 34,1 (C-7), 40,7 (C-8), 50,3 (C-9), 37,0 (C-10), 18,2 (C-11), 24,9 (C-12), 37,8 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,4 (C-16), 42,6 (C-17), 48,1 (C-18), 47,8 (C-19), 149,9 (C-20), 29,5 (C-21), 39,8 (C-22), 27,9 (C-23), 19,2 (C-24), 16,0 (C-25), 15,9 (C-26), 14,5 (C-27), 15,3 (C-28), 109,7 (C-29), 17,9 (C-30), 14,0 (C-31)

IV ν max. (cm⁻¹): 3500, 1670, 830.

EM IE m/z (int. rel.): 440 (M⁺, 10), 426 (36), 315 (52), 218 (20), 207 (20), 204 (15), 203 (15), 189 (25), 135 (20).

(22E)-4-metilergosta-7,22-dieno-3 β -ol (**120**); p.f. = 156-157 °C (cristalizado em acetona)

RMN de ¹H: 3,39 (1H, m, 3-H α), 5,29 (1H, s, 7-H), 0,47 (3H, s, 18-CH₃), 0,67 (3H, s, 19-CH₃), 1,00 (3H, s, 21-CH₃), 5,26 (1H, dd, J=8,7 e 15,6; 22-H), 5,11 (1H, dd, J=

8,7 e 15,6; 23-H), 0,92 (3H, d, J=6,5; 26-CH₃), 0,95 (3H, d, J=6,5; 27-CH₃), 0,80 (3H, s, 28-CH₃), 0,97 (3H,d, J=6,8; 24'-CH₃).

RMN ¹³C: 40,3 (C-1), 23,9 (C-2), 71,3 (C-3), 26,3 (C-4), 44,0 (C-5), 30,5 (C-6), 130,2 (C-7), 139,9 (C-8), 52,2 (C-9), 38,9 (C-10), 32,4 (C-11), 41,8 (C-12), 50,3 (C-13), 56,7 (C-14), 32,8 (C-15), 29,5 (C-16), 56,0 (C-17), 13,1 (C-18), 12,8 (C-19), 35,0 (C-20), 20,0 (C-21), 139,2 (C-22), 118,6 (C-23), 41,5 (C-24), 22,4 (C-24'), 22,2 (C-25), 21,9 (C-26), 21,9 (C-27), 13,7 (C-28).

IV ν max. (cm⁻¹): 3450, 1665, 820.

EM IE m/z (int. rel.): 412 (M⁺, 84), 397 (15), 300 (26), 271 (100), 255 (58), 246 (26), 213 (21).

β -Sitosterol (121), 24-etilcolest-5-eno-3 β -ol; p.f. = 140-141 °C (cristalizado em acetona, p.f. lit.¹³⁹=139-140 °C)

RMN de ¹H: 2,31 (2H, m, 2-H), 3,53 (1H, m, 3-H α), 5,35 (1H, d, J=4,9; 6-H), 0,68 (3H, s, 18-CH₃), 1,02 (3H, s, 19-CH₃), 0,87 (3H, d, J=1,9; 21-CH₃), 0,85 (3H, d, J=1,9; 26-CH₃), 0,82 (3H, d, J=1,9; 27-CH₃), 0,79 (3H, m, 24''-CH₃).

RMN ¹³C: 37,2 (C-1), 28,0 (C-2), 71,8 (C-3), 28,0 (C-4), 140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 31,6 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 31,9 (C-11), 39,7 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 31,9 (C-15), 28,2 (C-16), 56,1 (C-17), 19,4 (C-18), 18,7 (C-19), 35,8 (C-20), 21,0 (C-21), 36,2 (C-22), 23,8 (C-23), 39,5 (C-24), 35,8 (C-24'), 28,0 (C-24''), 24,3 (C-25), 22,8 (C-26), 22,5 (C-27).

IV ν max. (cm⁻¹): 3455, 1665, 820.

EM IE m/z (int. rel.): 414 (M⁺, 100), 400 (60), 382 (30), 271 (24), 255 (40), 213

(30), 137 (34).

12-(2'-hidroxietil)-lup-20(29)-eno-3 β -ol (**122**); p.f.= 222-224 °C (cristalizado em acetona)

RMN de ^1H : 3,19 (1H, dd, J=5,5 e 11,2; 3-H α), 2,38 (1H, sext., J=5,7 e 11,2; 19-H β), 1,03 (3H, s, 23-CH $_3$), 0,97 (3H, s, 24-CH $_3$), 0,83 (3H, s, 25-CH $_3$), 0,94 (3H, s, 26-CH $_3$), 0,76 (3H, s, 27-CH $_3$), 0,79 (3H, s, 28-CH $_3$), 4,57 (1H, s, 29'-H), 4,69 (1H, d, J=2,3; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH $_3$), 3,64 (1H, t, J=6,8; 2'-H).

RMN ^{13}C : 38,7 (C-1), 25,7 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,3 (C-5), 22,7 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,2 (C-10), 19,3 (C-11), 32,8 (C-12), 38,0 (C-13), 43,0 (C-14), 27,4 (C-15), 35,6 (C-16), 42,8 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 29,3 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 20,9 (C-24), 16,1 (C-25), 16,0 (C-26), 14,1 (C-27), 15,4 (C-28), 109,3 (C-29), 18,3 (C-30), 31,9 (C-1'), 63,1 (C-2').

IV ν max. (cm $^{-1}$): 3320, 1640, 874.

EM IE m/z (int. rel.): 462 (5), 448 (36), 426 (100), 421 (25), 411 (25), 364 (15), 315 (15), 218 (46), 207 (36), 189 (41), 135 (39).

acetato de 12-(2'-acetiloxietil)-lup-20(29)-eno-3 β -ilo (**123**); p.f.= 231-232 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

Adicionou-se o 12-(2'-hidroxietil)-lup-20(29)-eno-3 β -ol (**122**) (20mg, 43 μmol) a uma mistura de anidrido acético (2 ml, além de reagente é também solvente) e piridina (17 μl , 0,2 mmol). A mistura foi aquecida (num banho de óleo com agitação magnética a durante seis horas.

Após este período deixou-se arrefecer a solução, verteu-se sobre uma mistura de gelo e HCl a 10% e deixou-se a agitar durante alguns minutos. De seguida foi feita a extracção com acetato de etilo. A fase orgânica recolhida foi lavada com uma solução de HCl a 2%, para eliminar o excesso de piridina, sendo de seguida seca através de sulfato de sódio anidro. O acetato de etilo foi evaporado a pressão reduzida num evaporador rotativo.

O sólido resultante foi cristalizado numa mistura de CHCl₃/MeOH: dissolve-se numa pequena quantidade de CHCl₃, a quente, adicionando-se de seguida algumas gotas de MeOH até se verificar que a solução ficou ligeiramente turva. A solução resultante foi deixada em repouso protegido da luz. O sólido formado foi filtrado e seco na pistola de secagem por várias horas (pelo menos 4 horas) de forma a retirar o excesso de piridina e de anidrido acético. Obteve-se o acetato de 12-(2'-acetiloxietil)-lup-20(29)-eno-3β-ilo (**123**) em bom rendimento (0,024 g, 90%).

RMN de ¹H: 4,48 (1H, dd, J=5,5 e 11,2; 3-H_α), 2,36 (1H, sext., J=5,6 e 11,2; 19-H_β), 1,03 (3H, s, 23-CH₃), 0,94 (3H, s, 24-CH₃), 0,85 (3H, s, 25-CH₃), 0,88 (3H, s, 26-CH₃), 0,79 (3H, s, 27-CH₃), 0,83 (3H, s, 28-CH₃), 4,57 (1H, s, 29'-H), 4,69 (1H, d, J=2,3; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃), 4,05 (2H, t, J=7,0; 2'-H), 2,05 (3H, s, CH₃-CO-).

RMN ¹³C: 31,9 (C-1), 27,4 (C-2), 81,0 (C-3), 37,8 (C-4), 55,4 (C-5), 18,2 (C-6), 34,2 (C-7), 40,8 (C-8), 50,3 (C-9), 37,0 (C-10), 20,9 (C-11), 25,0 (C-12), 38,0 (C-13), 42,8 (C-14), 27,9 (C-15), 35,5 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 29,7 (C-21), 38,4 (C-22), 25,9 (C-23), 18,0 (C-24), 16,5 (C-25), 16,2 (C-26), 14,5 (C-27), 16,0 (C-28), 109,4 (C-29), 19,3 (C-30), 23,7 (C-1'), 64,7 (C-2'), 174,8 (CH₃-CO-), 171,0 (CH₃-CO-), 21,1 (CH₃-CO-), 21,4 (CH₃-CO-).

Butirato de 12-R-lup-20(29)-eno-3 β -ilo (**124**); p.f.= 165-166 °C (cristalizado em acetona)

RMN de ^1H : 4,47 (1H, dd, J=6,9 e 9,4; 3-H α), 2,39 (1H, sext., J=5,7 e 11,3; 19-H β), 1,03 (3H, s, 23-CH $_3$), 0,94 (3H, s, 24-CH $_3$), 0,85 (3H, s, 25-CH $_3$), 0,88 (3H, s, 26-CH $_3$), 0,79 (3H, s, 27-CH $_3$), 0,84 (3H, s, 28-CH $_3$), 4,57 (1H, s, 29'-H), 4,69 (1H, d, J= 2,3; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH $_3$), 4,05 (2H, t, J=6,9; 1'-H), 2,29 (4H, t, J=7,8; 3'-H e 2''-H).

RMN ^{13}C : 37,8 (C-1), 27,4 (C-2), 80,6 (C-3), 40,8 (C-4), 55,4 (C-5), 18,2 (C-6), 34,2 (C-7), 40,0 (C-8), 50,3 (C-9), 37,1 (C-10), 22,7 (C-11), 25,0 (C-12), 38,0 (C-13), 43,0 (C-14), 28,0 (C-15), 35,5 (C-16), 42,8 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 29,7 (C-21), 38,3 (C-22), 28,6 (C-23), 19,2 (C-24), 16,6 (C-25), 16,2 (C-26), 14,5 (C-27), 18,0 (C-28), 109,4 (C-29), 16,0 (C-30), 64,4 (C-1'), 173,8 (C-2'), 34,9 (C-3'), 173,8 (C-1''), 34,4 (C-2'').

IV ν max. (cm $^{-1}$): 1706, 1670, 830.

EM FAB m/z (int. rel.): 495 (15), 474 (15), 426 (30), 408 (84), 392 (44), 364 (49), 341 (30), 313 (74), 297 (26), 218 (10), 204 (10), 189 (15).

Palmitato de lupenilo (**125**); p.f. = 137-138 °C (cristalizado em acetona)

RMN ^1H : 4,47 (1H, dd, J=5,5 e 10,2; 3-H α), 2,36 (1H, sext., J $_1$ =5,8 e 11,6; 19-H β), 1,03 (3H, s, 23-CH $_3$), 0,94 (3H, s, 24-CH $_3$), 0,88 (3H, s, 25-CH $_3$), 0,87 (3H, s, 26-CH $_3$), 0,79 (3H, s, 27-CH $_3$), 0,84 (3H, s, 28-CH $_3$), 4,57 (1H, s, 29'-H), 4,69 (1H, d, J $_2$ = 2,0; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH $_3$), 2,29 (2H, t, J=7,7; 2'-H).

RMN ^{13}C : 38,3 (C-1), 25,3 (C-2), 80,6 (C-3), 38,2 (C-4), 55,7 (C-5), 21,2 (C-6), 38,7(C-7), 41,1 (C-8), 50,6 (C-9), 34,5 (C-10), 18,4 (C-11), 24,1 (C-12), 37,4(C-13), 43,1 (C-

14), 27,7 (C-15), 34,5 (C-16), 43,2 (C-17), 48,5 (C-18), 48,2 (C-19), 150,2(C-20), 29,9 (C-21), 40,3 (C-22), 28,3 (C-23), 19,6 (C-24), 16,6 (C-25), 16,3 (C-26), 14,9 (C-27), 17,0 (C-28), 110,2 (C-29), 18,5 (C-30), 173,3 (C-1'), 34,2 (C-2'), 17,3 (C-7').

IV ν max. (cm⁻¹): 1706, 1670, 830.

EM IE m/z (int. rel.): 664 (M⁺, 35), 409 (45), 218 (100), 204 (65), 189 (81), 137 (35), 109 (50).

Araquidato de lupenilo (126); p.f. = 143-144 °C (cristalizado em acetona)

RMN ¹H: 4,47 (1H, dd, J=7,3 e 9,6; 3-H α), 4,57 (1H, s, 29'-H), 4,69 (1H, d, J= 2,0; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃), 2,29 (2H, t, J=7,8; 2'-H).

RMN ¹³C: 39,3 (C-1), 25,6 (C-2), 80,4 (C-3), 39,5 (C-4), 55,6 (C-5), 21,1 (C-6), 35,9(C-7), 40,4 (C-8), 50,5 (C-9), 38,4 (C-10), 19,0 (C-11), 25,5 (C-12), 38,5(C-13), 43,1 (C-14), 27,8 (C-15), 37,2 (C-16), 42,7 (C-17), 48,6 (C-18), 48,4 (C-19), 150,7 (C-20), 32,3 (C-21), 41,1 (C-22), 28,2 (C-23), 20,1 (C-24), 17,0 (C-25), 15,6 (C-26), 12,2 (C-27), 14,4 (C-28), 110,1 (C-29), 18,2 (C-30), 172,9 (C-1'), 32,8 (C-2'), 14,8 (C-7').

IV ν max. (cm⁻¹): 1735, 1461, 719.

EM IE m/z (int. rel.): 720 (M⁺, 10), 664 (30), 409 (30), 218 (100), 204 (61), 189 (86), 175 (30), 135 (41).

trans-7'-hidroxicinamato de lupenilo (127); p.f. = 130-132 °C (cristalizado em acetona)

RMN ^1H : 4,58 (1H, dd, $J=5,8$ e $11,3$; 3-H α), 2,34 (1H, sext., $J=5,6$ e $11,2$; 19-H β), 1,04 (3H, s, 23-CH $_3$), 0,95 (3H, s, 24-CH $_3$), 0,90 (3H, s, 25-CH $_3$), 0,89 (3H, s, 26-CH $_3$), 0,79 (3H, s, 27-CH $_3$), 0,88 (3H, s, 28-CH $_3$), 4,55 (1H, dd, $J=1,2$ e $2,2$; 29'-H), 4,67 (1H, d, $J=2,2$; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH $_3$), 6,26 (1H, d, $J=16,7$; 2'-H), 7,57 (1H, d, $J=16,7$; 3'-H), 7,41 (2H, d, $J=9,0$; 5'-H e 9'-H), 6,77 (2H, d, $J=9,0$; 6'-H e 8'-H).

RMN ^{13}C : 38,0 (C-1), 25,2 (C-2), 80,6 (C-3), 38,4 (C-4), 55,4 (C-5), 20,9 (C-6), 34,9(C-7), 40,8 (C-8), 50,3 (C-9), 37,1 (C-10), 18,2 (C-11), 25,1 (C-12), 37,8(C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,6 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 31,9 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 19,3 (C-24), 16,2 (C-25), 16,0 (C-26), 14,1 (C-27), 14,5 (C-28), 109,4 (C-29), 18,0 (C-30), 166,8 (C-1'), 116,3 (C-2'), 144,3 (C-3'), 127,4 (C-4'), 130,0 (C-5'), 116,0 (C-6'), 158,0 (C-7'), 116,0 (C-8'), 130,0 (C-9').

IV ν max. (cm^{-1}): 3398, 1706, 1670, 830.

EM IE m/z (int. rel.): 572 (M^+ , 10), 460 (15), 409 (15), 307 (30), 154 (100), 136 (72).

trans-7'-hidroxicinamato de lup-7,20(29)-dieno-6-ona-3 β -ilo (128); p.f. = 160-162 °C (cristalizado em acetona)

RMN ^1H : 4,59 (1H, dd, $J=5,4$ e $10,9$; 3-H α), 6,76 (1H, m, 7-H), 2,34 (1H, sext., $J=6,0$ e $11,7$; 19-H β), 1,04 (3H, s, 23-CH $_3$), 0,95 (3H, s, 24-CH $_3$), 0,90 (3H, s, 25-CH $_3$), 0,88 (3H, s, 26-CH $_3$), 0,79 (3H, s, 27-CH $_3$), 0,85 (3H, s, 28-CH $_3$), 4,54 (1H, dd, $J=1,2$ e $2,0$; 29'-H), 4,66 (1H, d, $J=2,0$; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH $_3$), 6,26 (1H, d, $J=16,5$; 2'-H), 7,56(1H, d, $J=16,5$; 3'-H), 7,41 (2H, d, $J=8,8$; 5'-H e 9'-H), 6,79 (2H, d, $J=8,8$; 6'-H e 8'-H).

RMN ^{13}C : 38,2 (C-1), 24,2 (C-2), 79,0 (C-3), 38,2 (C-4), 55,7 (C-5), 194,1 (C-6), 115,0 (C-7), 133,0 (C-8), 50,6 (C-9), 35,8 (C-10), 18,5 (C-11), 21,2 (C-12), 37,4 (C-13), 43,2 (C-14), 27,7 (C-15), 34,5 (C-16), 43,1 (C-17), 48,5 (C-18), 48,2 (C-19), 150,0 (C-20), 29,9 (C-21), 40,2 (C-22), 28,3 (C-23), 19,6 (C-24), 17,0 (C-25), 16,5 (C-26), 14,8 (C-27), 16,3 (C-28), 110,1 (C-29), 18,3 (C-30), 167,0 (C-1'), 116,0 (C-2'), 144,0 (C-3'), 127,6 (C-4'), 130,0 (C-5'), 115,9 (C-6'), 158,0 (C-7'), 115,9 (C-8'), 130,0 (C-9').

IV ν max. (cm^{-1}): 3398, 1707, 1671, 831.

EM IE m/z (int. rel.): 570 (M^+ , 10), 482 (10), 460 (50), 409 (55), 391 (30), 329 (15), 307 (89), 289 (45), 273 (10), 176 (30).

Betulina, lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (68); p.f. = 254-255 °C (cristalizado em acetona, p.f. lit.¹³⁷ = 254-256 °C)

RMN ^1H : 3,19 (1H, dd, $J=5,5$ e $11,2$; 3-H α), 2,38 (1H, sext., $J=5,6$ e $10,6$; 19-H β), 1,02 (3H, s, 23- CH_3), 0,98 (3H, s, 24- CH_3), 0,82 (3H, s, 25- CH_3), 0,97 (3H, s, 26- CH_3), 0,76 (3H, s, 27- CH_3), 3,32 (1H, d, $J=11,2$; 28-H), 3,79 (1H, d, $J=11,2$; 28-H), 4,58 (1H, dd, $J=1,4$ e $2,1$; 29'-H), 4,68 (1H, d, $J=2,1$; 29-H), 1,68 (3H, s, 30- CH_3).

RMN ^{13}C : 38,3 (C-1), 27,0 (C-2), 79,0 (C-3), 38,7 (C-4), 55,2 (C-5), 20,8 (C-6), 29,7 (C-7), 40,9 (C-8), 50,4 (C-9), 34,2 (C-10), 18,3 (C-11), 25,2 (C-12), 37,1 (C-13), 45,1 (C-14), 27,4 (C-15), 34,0 (C-16), 42,7 (C-17), 48,7 (C-18), 47,8 (C-19), 150,5 (C-20), 29,1 (C-21), 38,8 (C-22), 28,0 (C-23), 19,1 (C-24), 16,0 (C-25), 15,4 (C-26), 14,7 (C-27), 60,5 (C-28), 109,7 (C-29), 16,1 (C-30).

IV ν max. (cm^{-1}): 3280, 1670, 830.

EM IE m/z (int. rel.): 442 (M^+ , 65), 424 (15), 411(80), 234 (35), 220 (24), 207 (80), 203 (65), 189 (100), 135 (70), 109 (50).

PARTE III

TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS DA *Acácia dealbata*

1- Considerações gerais sobre as transformações químicas

1.1- Valor acrescentado

Antes da evolução nas técnicas espectrométricas e espectrofotométricas, a identificação de compostos naturais era feita principalmente tendo em conta o ponto de ebulição, ponto de fusão e usando análises de combustão. A elucidação da estrutura destes compostos era geralmente acompanhada por transformações químicas de alguns grupos funcionais da molécula de forma a confirmar algumas das estruturas propostas. Os grupos hidroxilo de um composto, por exemplo, podem ser identificados por reacções de acetilação.

Da mesma forma, reacções ocorrendo de forma selectiva com determinados grupos ou tipos de compostos com mudança de cor ou outras alterações de fácil detecção eram bastante utilizadas. Os triterpenos e esteróides, por exemplo, eram identificados pelo teste de Liberman Buchard.¹³⁴

O interesse nas transformações químicas de compostos naturais nos nossos dias não, se prende tanto com a sua identificação, mas sim com o aumento de interesse tanto em termos de possíveis aplicações, como também com o objectivo de conhecer a sua biossíntese e o seu modo de acção nos sistemas biológicos onde têm origem.

Os terpenos são definidos como sendo compostos que derivam por ciclização e rearranjo de precursores alifáticos formados por unidades de isopreno. Este facto levou vários investigadores na área dos terpenos, a dedicarem a sua atenção ao estudo da biossíntese destas moléculas.³⁵

Da mesma forma o facto de muitos compostos naturais serem biologicamente activos e desempenharem na natureza algumas funções de relevo, levou a um grande esforço de investigação com o objectivo de aumentar a actividade biológica desses compostos. As transformações estruturais de compostos naturais, já por si complicados, constitui um exercício interessante e aliciante para um químico orgânico, que desta forma consegue juntar o interesse na síntese com o interesse na identificação.

Os triterpenos, como já foi referido no capítulo anterior, são compostos conhecidos por apresentarem actividade biológica.⁶³ Desta forma, pretende-se introduzir alterações estruturais nestes de forma a aumentar a sua actividade.

A transformação química do lupeol (118), betulina (68) e β -sitosterol (121) em produtos de valor acrescentado poderia constituir uma forma de aumentar a rentabilidade da "floresta de Acácia" ou de outras espécies ricas nestes compostos.

1.2- Interesse nos compostos heterocíclicos

Ao longo dos anos os triterpenos e os esteróides têm despertado o interesse dos químicos, devido às suas funções nas plantas e em geral nos seres vivos.⁶³ Muito trabalho, em termos químicos, tem sido feito de forma a esclarecer as suas funções e até torná-los mais activos, contudo ainda existe uma grande área de trabalho. Algumas transformações simples podem ser feitas de forma a aumentar o interesse químico e a actividade biológica dos triterpenos.

Muitas vezes a introdução de grupos muito complicados, mesmo quando eles só por si apresentam grande actividade biológica, em compostos já bastante complexos não se traduz num aumento significativo de actividade. Casos há que

transformações relativamente simples originam compostos de grande actividade biológica. Por exemplo, a esterificação do grupo álcool na posição C-3, de triterpenos e de esteróides, origina compostos com aumento da actividade citotóxica contra o crescimento de células leucémicas.⁶³ G. Kweifio-Okai¹⁴⁰ testou o acetato de lupeol como inibidor da artrite, em ratos em estado avançado de doença, e verificou que a adição deste composto tem efeitos benéficos no controle da doença sem aparentemente ter aspectos prejudiciais no crescimento normal dos ratos.

Moléculas contendo grupos epóxido apresentam nos compostos naturais um importante papel. O 2,3-epoxiesqualeno é o precursor biológico dos triterpenos pentacíclicos e triterpenos tetracíclicos hidroxilados¹⁴¹ na posição C-3. A introdução de um grupo epóxido em variadíssimos compostos dá origem a compostos carcinogénicos^{140,142} e mutagénicos.¹⁴⁰ Pensa-se que a actividade carcinogénica se deve à alquilação dos ácidos nucleicos pelo ataque do azoto nucleofílico ao grupo epóxido. De forma a obter respostas para a biossíntese e função destes compostos nos sistemas biológicos, os epóxidos têm sido extensamente estudados.¹⁴⁰

Também os triterpenos contendo um anel furânico na sua estrutura apresentam uma variedade de efeitos medicinais¹⁴³ nos animais e nos seres humanos, sendo de referir especialmente a actividade fungicida, bactericida e insecticida.¹⁴⁴ A sua evolução biossintética¹⁴⁰ tem sido vista no sentido do aumento da sua actividade contra os insectos. Nos últimos anos verificou-se um aumento significativo na pesquisa de novos agentes de controle de pestes, selectivos e biodegradáveis. Apesar do crescente interesse biológico, existem poucas aproximações à síntese de triterpenos contendo na sua estrutura um anel furânico.¹⁴⁵

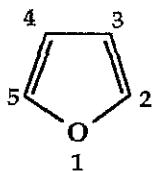
Da mesma forma, compostos contendo o grupo pirazol¹⁴⁶ apresentam

actividade biológica importante, o próprio pirazol e muitos outros derivados não substituídos na posição 1, são inibidores e desactivadores da enzima álcool desidrogenase. Sabe-se também que as 2-pirazolinas inibem as enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase.¹⁴² Além de serem compostos interessantes em termos da sua actividade biológica estes são raros na natureza, de tal forma que compostos contendo ligações N-N são igualmente bastante raros nas plantas mais evoluídas.

1.3- Nomenclatura de compostos heterocíclicos

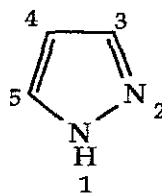
Os compostos heterocíclicos são aqueles que comportam, no anel, outro elemento além do carbono: azoto, oxigénio, enxofre, etc.. Consideramos aqui o furano, pirazol e oxirano, uma vez que iremos tentar a síntese de derivados destes compostos.

Exemplos:



Furano

(oxaciclopenta-2,4-dieno)



Pirazol

(1,2-diazaciclopenta-2,4-dieno)

Tal como para os compostos triterpénicos, referidos no capítulo anterior, também para os compostos heterocíclicos podem distinguir-se dois tipos de nomenclatura: a nomenclatura trivial e a nomenclatura semi-sistemática.

Como se pode ver no exemplo anterior, tanto o furano como o pirazol são nomes triviais, entre parêntesis encontram-se os nomes sistemáticos resultantes da aplicação das regras IUPAC. No entanto, os nomes mais utilizados são os triviais, desta forma é necessário conjugar esse tipo de nomenclatura com as regras IUPAC para compostos heterocíclicos.

As regras IUPAC mais importantes para compostos heterocíclicos são:^{33,147}

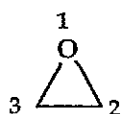
- Os sistemas heterocíclicos são designados sempre que possível pelo correspondente anel alifático. Os nomes dos compostos monocíclicos que contenham um ou mais heteroátomos num sistema cíclico formam-se combinando o prefixo ou prefixos adequados (oxa para o oxigénio, aza para o azoto e tia para o enxofre) com um dos sufixos da Tabela 34.

Nº de átomos do anel	Anéis com Azoto		Anéis sem Azoto	
	Insaturação*	Saturação	Insaturação*	Saturação
3	-irina	-iridina	-ireno	-irano
5	-ol	-olidina	-ol	-olano

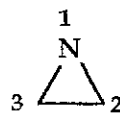
* Correspondente ao número máximo de ligações conjugadas;

Tabela 34: Sufixos usados na nomenclatura de compostos heterocíclicos.

Exemplos:



Oxirano

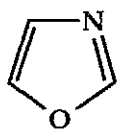


Aziridina

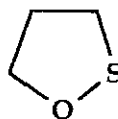
- Se o mesmo composto incluir heteroátomos de elementos diferentes, estes serão citados utilizando os prefixos, já referidos, por ordem decrescente do

respectivo grupo na Tabela Periódica e crescente do número atômico.

Exemplos:



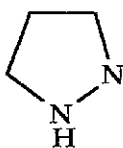
Oxazol



1,2-Oxatiolano

- Muitas vezes usam-se as regras IUPAC em conjunto com a nomenclatura trivial.

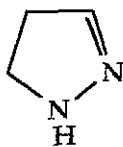
Exemplo:



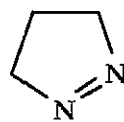
Pirazolidina

- Quando temos uma insaturação parcial o sufixo, para anéis com azoto de 5 membros é -olina.

Exemplos:



2-Pirazolina

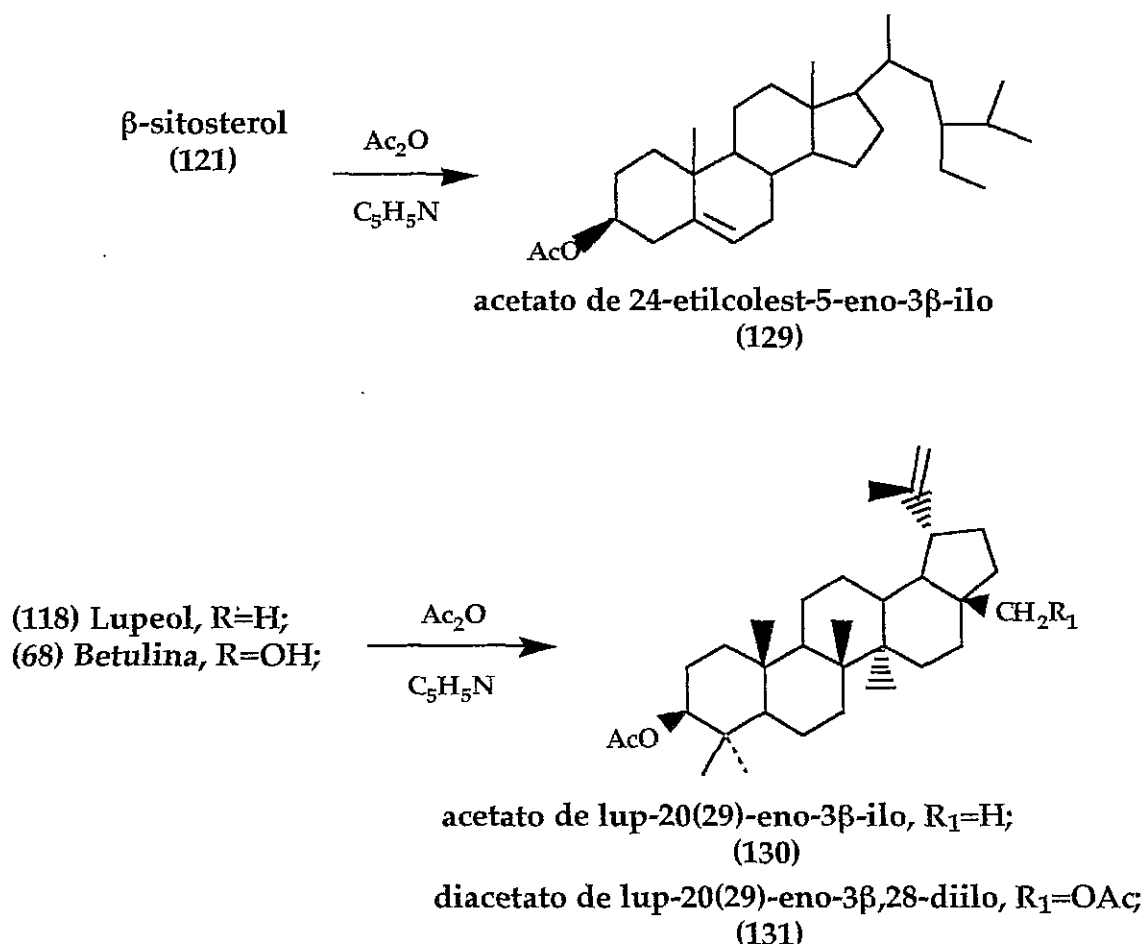


1-Pirazolina

2- Resultados e discussão

2.1- Reacção de Acetilação

Como foi referido em 1.2 existem casos em que a esterificação do grupo hidroxilo na posição C-3 dos triterpenos e esteróides, aumenta a sua actividade biológica. Com esse objectivo efectuámos a acetilação do grupo 3-hidroxilo, do lupeol (118), betulina (68) e β -sitosterol (121). Para além desse objectivo, com a acetilação, pretendíamos também proteger o grupo -OH para as transformações que se seguem, pois os grupos álcool são bastante reactivos e poderiam originar reacções secundárias. Nesta transformação usou-se o método clássico de acetilação de álcoois com anidrido acético em piridina (Esquema 17):



Esquema 17

A estrutura dos acetatos (129-131) foi confirmada por espectrometria de massa, espectroscopia de IV e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

O acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129) é identificado de forma inequívoca por RMN de ^1H ; pelo aparecimento de um sinal em forma de singuleto a δ 2,03 ppm, devido à ressonância dos prótons do metilo do grupo acetato. Além disso, a ressonância do próton H-3 desloca-se para maiores valores de frequência (δ 3,53 ppm \rightarrow δ 4,60 ppm), após a acetilação.

Por RMN de ^{13}C podemos confirmar a identidade do composto (129), pois observa-se o aparecimento de um sinal a δ 170,2 ppm devido à ressonância do carbono carbonílico do grupo acetato e também pela ressonância do carbono C-3 que se desloca de δ 71,8 ppm no álcool para δ 73,8 ppm no éster.

O ião molecular, M^+ , de (129) confirmado no espectro de massa do composto, a m/z 456, o que é consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Além do ião molecular este espectro apresenta também um pico correspondente a um fragmento muito característico dos compostos acetilados $(\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH})^+$, a m/z 396.

No espectro de IV do éster relativamente ao do álcool verifica-se o aparecimento de uma banda devido à elongação do carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, do grupo éster a 1735 cm^{-1} .

O acetato de lup-20(29)-eno-3 β -ilo (130) é identificado seguindo um raciocínio similar ao anterior. Por RMN de ^1H podemos verificar o aparecimento de um sinal em forma de singuleto a δ 2,04 ppm, devido à ressonância dos prótons metílicos do grupo acetato, e um outro em forma de duplo duplete correspondente à ressonância do próton H-3. A ressonância deste último próton sofreu um desvio para maiores valores de frequência (+1,28 ppm) após a acetilação.

No RMN de ^{13}C do composto (130) aparece também um sinal a δ 171,0 ppm devido à ressonância do carbono carbonílico do grupo acetiloxilo e o sinal correspondente à ressonância do carbono C-3 surge a maior frequência (δ 80,9 ppm) do que no caso do álcool (δ 79,0 ppm).

O espectro de massa apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 468, o que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Este espectro apresenta também um dos fragmentos mais importantes e especialmente característico dos compostos acetilados, o $(\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH})^+$ que surge a m/z 408.

No espectro de IV identifica-se a banda devido à elongação do carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, do grupo éster a 1729 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131) apresenta dois sinais em forma de singuletos a δ 2,07 e δ 2,04 ppm devido à ressonância dos prótons metílicos dos dois grupos acetiloxilo. Este espectro apresenta também um sinal em forma de duplo duplete correspondente à ressonância do próton H-3 a δ 4,46 ppm. Os dois prótons H-28 constituem um sistema de spins AB aparecendo sob a forma de dois dupletos, cada um correspondente a um próton, que surgem a δ 4,69 e 4,59 ppm. As ressonâncias dos prótons H-3 e H-28 no caso do álcool correspondente, betulina (68), surgem a menores valores de frequência: H-3 a δ 3,19 ppm e H-28, como sistema de spins AB, a δ 3,79 e 3,32 ppm.

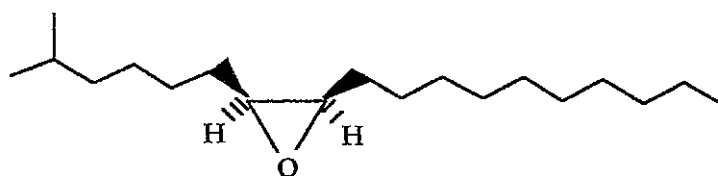
O RMN de ^{13}C do composto (131) apresenta dois sinais a δ 171,5 e 171,1 ppm devidos à ressonância dos carbonos carbonílicos dos dois grupos acetiloxilo. Os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos C-3 e C-28 surgem a δ 80,9 e 62,4 ppm, respectivamente. As ressonâncias destes carbonos surgem a maiores valores de frequência do que no caso do álcool correspondente, betulina (68): C-3 a δ 79,0 ppm e C-28 a δ 60,5 ppm.

O espectro de massa do (131) apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 526, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{34}H_{54}O_4$. No caso deste composto (131) como tem dois grupos acetiloxilo, o fragmento correspondente à saída de ácido acético é ainda mais abundante que no caso do composto (129) e (130), surgindo um pico a m/z 466 correspondente ao fragmento $(M - CH_3COOH)^+$.

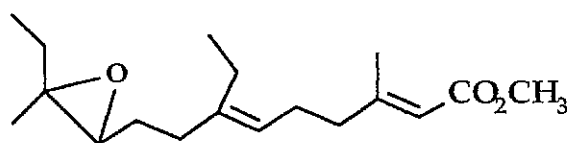
O espectro de IV apresenta uma banda intensa devido ao alongamento do grupo carbonilo, $C=O$, dos dois grupos éster a 1730 cm^{-1} .

2.2- Reacção de Epoxidação

Os epóxidos são muito frequentes nos compostos naturais. Como foi referido na parte II, o 2,3-epoxiesqualeno é o precursor biológico de esteróides, triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos hidroxilados em C-3.^{35,127,148} Outros exemplos são o disparluro (132) um epóxido que é emitido pela fêmea da traça "gypsy" para atrair o macho^{149,150} e a hormona juvenil do macho do bicho da seda (133).¹⁴⁶



(132)



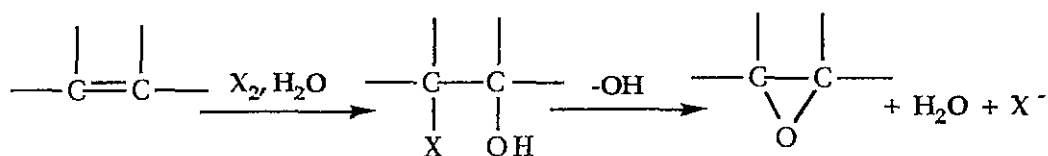
(133)

O epóxido mais simples, o epóxido de etileno, é de longe o que tem aplicação industrial mais importante, sendo preparado por oxidação catalítica do etileno

pelo oxigénio do ar.¹⁵¹

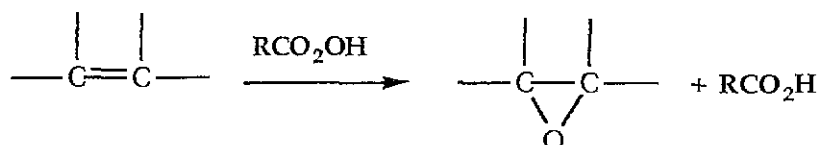
Na preparação de epóxidos utilizam-se principalmente dois métodos:

1) A partir das halidrinas¹⁴⁹(Esquema 18):



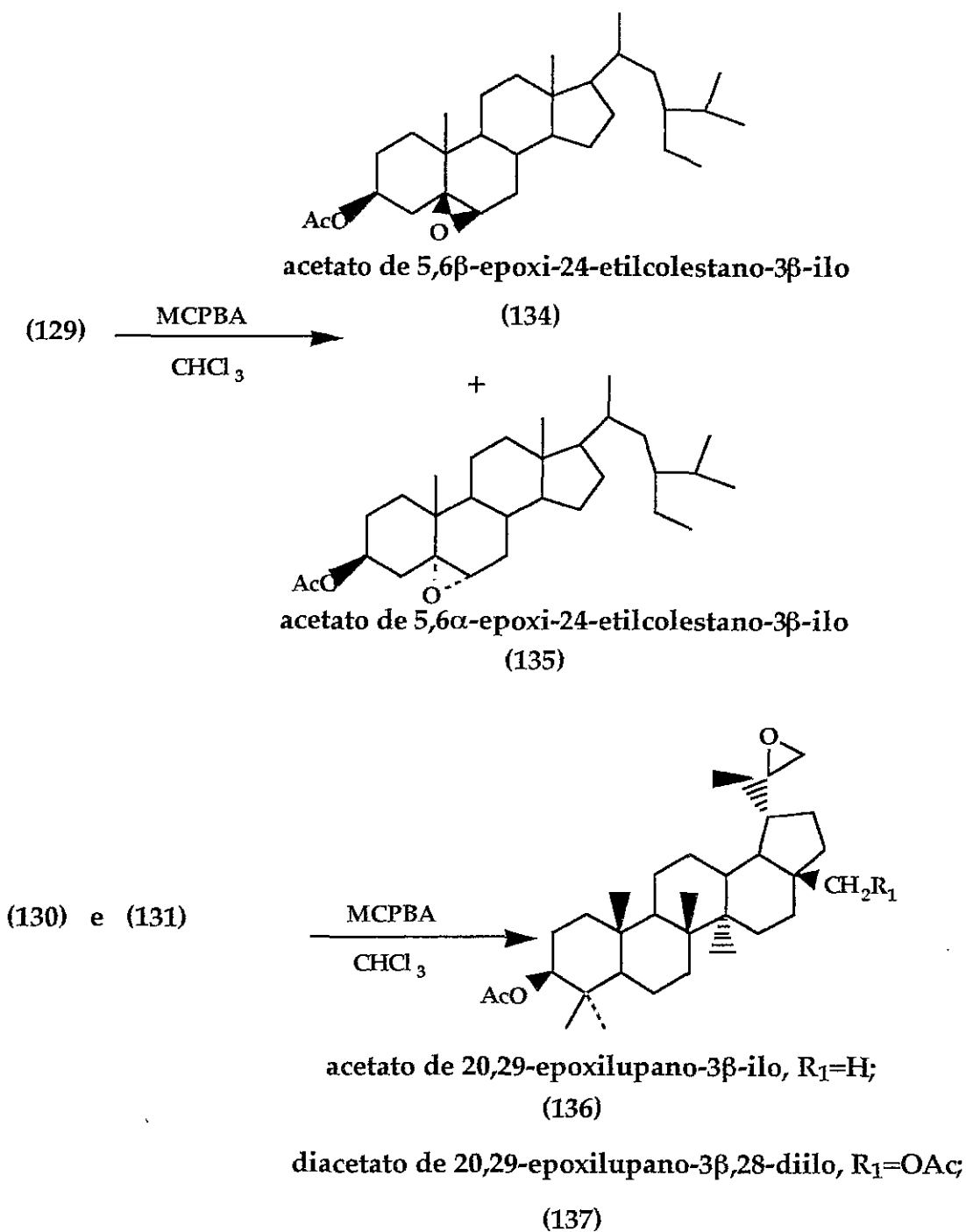
Esquema 18

2) Peroxidação¹⁴⁷ da ligação dupla carbono-carbono (Esquema 19):



Esquema 19

O método escolhido foi o segundo, porque é de mais fácil execução experimental: tem menos possibilidades de perdas pois ocorre apenas num passo e apresenta de uma maneira geral melhores rendimentos. Estes factores são particularmente importantes nos casos do lupeol (118) e da betulina (68), porque existiam em pequena quantidade. Efectuou-se a reacção de epoxidação do acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129), do acetato de lup-20(29)-eno-3 β -ilo (130) e do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131) com ácido *m*-cloroperbenzóico (MCPBA) (Esquema 20):



Esquema 20

A estrutura dos epóxidos (134-137) foi confirmada por espectrometria de massa, espectroscopia de IV e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

A reacção de epoxidação é uma reacção estereoespecífica,^{147,149} consiste

numa adição sinestérea, desta forma só serão de prever dois estereoisômeros.

Por RMN de ^{13}C é possível verificar que a epoxidação do acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129) origina dois isômeros. O espectro apresenta duas ressonâncias de carbonos carbonílicos (δ 170,6 e 170,2 ppm), e também dois sinais a δ 71,3 e 71,4 ppm que podem ser correspondentes à ressonância de carbonos do tipo C-3. Estes dados levam-nos a concluir que estamos em presença de dois isômeros, os epóxidos (134) e (135).

O epóxido é identificado também pelo desaparecimento das ressonâncias correspondentes aos carbonos vinílicos e o aparecimento de quatro novos sinais a δ 63,6 e 65,2; 59,2 e 62,5 ppm. Estes sinais serão correspondentes à ressonância dos carbonos C-5 e C-6 da mistura dos dois epóxidos isômeros (134) e (135). As frequências destas ressonâncias são concordantes com as características dos carbono de epóxidos.¹⁵²

O espectro de RMN de ^1H confirma a existência de uma mistura de dois isômeros (134) e (135) do epóxido e as proporções relativas em que aparecem; no entanto, não conseguimos distinguir quais dos sinais correspondem a cada um dos isômeros α e β . Para facilitar a exposição vamos considerar, por hipótese, que o isômero maioritário é (134), ou seja o β .

No espectro de RMN ^1H do isômero (134) verifica-se o desaparecimento do sinal correspondente ao próton vinílico e o aparecimento de um sinal em forma de duplete a δ 2,89 ppm, devido à ressonância do próton H-6 do epóxido. O sinal correspondente à ressonância do próton H-3 surge como multiplete a δ 4,95 ppm. Verificamos também a existência de dois sinais em forma de singuletos (δ 2,03 e 2,01 ppm) correspondentes à ressonância dos metilos dos grupos acetiloxilo.

O espectro de RMN de ^1H do isômero (135) apresenta um sinal em forma de duplete a δ 3,08 ppm, devido à ressonância do próton H-6. A ressonância do

protão H-3 surge a δ 4,77 ppm em forma de multiplete.

Os desvios químicos de ambos os isômeros (134) e (135) são concordantes com os dados bibliográficos¹⁵³ para este tipo de compostos.

Por espectrometria de massa da mistura dos isômeros não é possível verificar a existência dos dois isômeros. O ião molecular, M^+ , de (134) e (135) no espectro de massa da mistura a m/z 472, é consistente com a fórmula molecular $C_{31}H_{52}O_3$.

O espectro de IV apresenta uma banda devido a alongamento do grupo carbonilo, $C=O$, do grupo éster a 1734 cm^{-1} .

Por comparação dos espectros de RMN de 1H do acetato de lup-20(29-eno-3 β -ilo (130) com o do acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo (136) verifica-se o desaparecimento dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons vinílicos e o aparecimento de dois sinais em forma de duplete a δ 2,67 e 2,59 ppm, os quais são devidos à ressonância dos dois prótons H-29 do epóxido. Verifica-se também que a ressonância dos prótons do grupo Me-30 que aparece no alceno como um singuleto a δ 1,68 ppm, se desloca no caso do epóxido para δ 1,63 ppm.

Verifica-se uma situação similar através da comparação dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos (130) e (136): verifica-se o desaparecimento dos sinais correspondentes à ressonância dos carbonos vinílicos e o aparecimento de dois sinais a δ 60,4 e 57,5, correspondentes à ressonância dos carbonos C-20 e C-29 do epóxido. Estes resultados estão de acordo com os dados bibliográficos.^{129,130}

O espectro de massa do composto (136) apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ , a m/z 484, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_3$.

O espectro de IV apresenta uma banda devido ao alongamento do grupo carbonilo, C=O, do grupo éster a 1730 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H do diacetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo (137) é possível:

a) identificar a ressonância dos dois prótons H-29 do epóxido a δ 2,66 e 2,59 ppm, em forma de dois dupletos;

b) verificar o desaparecimento das ressonâncias dos prótons vinílicos, os quais surgem no espectro do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131);

O íon molecular, M^+ , do composto (137) é confirmado pelo espectro de massa do composto a m/z 542, o que é consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_5$.

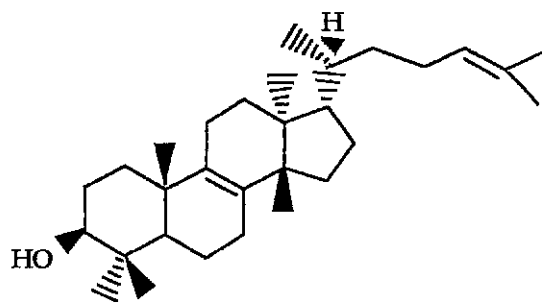
O espectro de IV apresenta uma banda devido ao alongamento do grupo carbonilo, C=O, do grupo éster a 1731 cm^{-1} .

2.3- Formação de compostos com um anel furânico

Os compostos do tipo triterpeno contendo um anel furânico na sua estrutura, são um dos grupos de metabólitos secundários mais importantes nas plantas, denominando-se de limonóides.¹⁴² Os trabalhos mais recentes nesta área demonstraram que estes compostos apresentam um grande espectro de actividade biológica. Esta inclui a inibição da capacidade de alimentação^{142,144,154,155} e regulação do crescimento de insectos, uma variedade de efeitos medicinais no homem e animais, actividade fungicida,

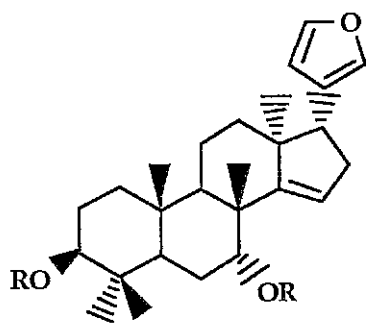
bactericida e anti-viral.¹⁴²

Os limonóides são triterpenos modificados, derivados do esqueleto precursor do 4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide. A biossíntese e a evolução dos limonóides tem sido estudada extensamente e, desta forma, pensa-se que estes compostos são derivados do triterpeno pentacíclico eufol (138), no qual a cadeia lateral é ciclizada com a saída de quatro carbonos para formar o anel furano 17-β.

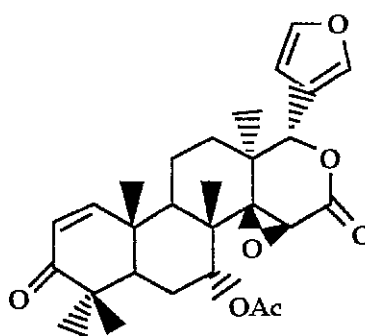


(138)

Existem várias vias de biossíntese de limonóides, originando dez grupos distintos, onde os limonóides de estrutura base (139), são os mais activos. Frequentemente o anel D é oxidado a lactona (D-seco limonóides), um dos compostos conhecidos que apresenta este esqueleto é o genudino (140), um poderoso inibidor da alimentação de insectos.^{142,144}



(139)

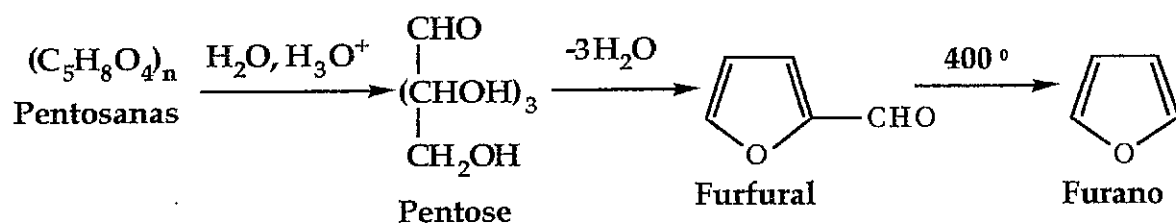


(140)

Muitos limonóides apresentam actividade anti-cancerígena e muitas espécies ricas nesses compostos foram utilizadas, na medicina tradicional, para

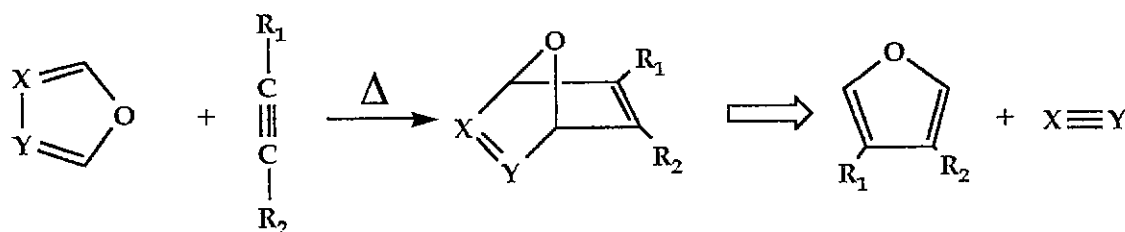
tratar essa doença. No entanto, os derivados anti-carcinogénicos mais activos são bastante citotóxicos.¹⁴² Testes efectuados em ratos levam a pensar que a actividade cancerígena deste tipo de compostos se deve à presença do anel furânico, o qual tende a provocar a diminuição da actividade da S-transferase da glutathiona.¹⁵⁶

A maneira mais fácil de preparar o furano¹⁴⁹ mais simples, consiste na descarboxilação do furfural, o qual se obtém por tratamento ácido e desidratação de pentosanas (Esquema 21):



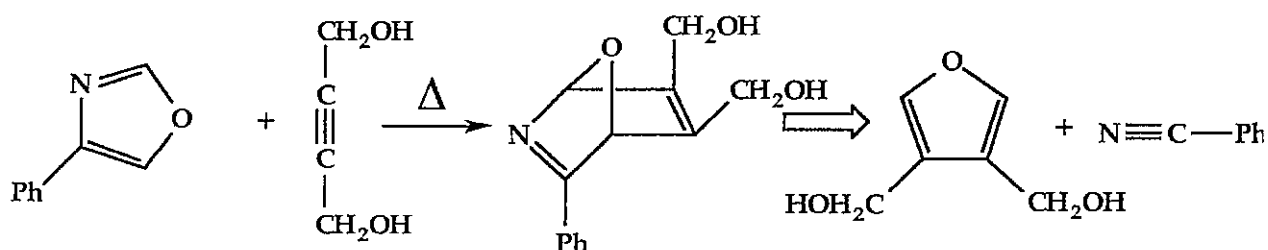
Esquema 21

Dennis Liotta *et al.*¹⁵⁷ propõe a síntese de derivados furânicos através de aductos de Diels-Alder que após reacção *retro*-Diels-Alder dão origem ao furano desejado (Esquema 22).



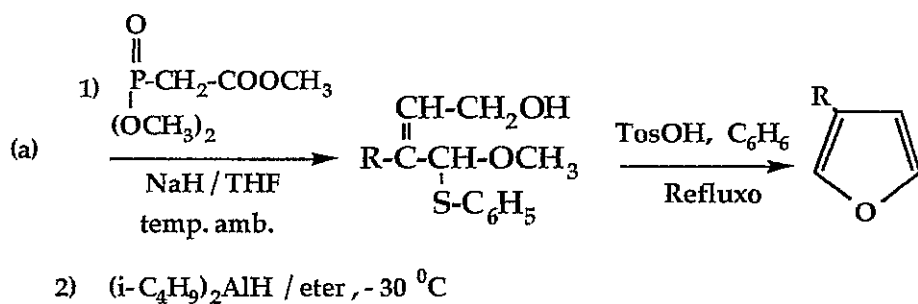
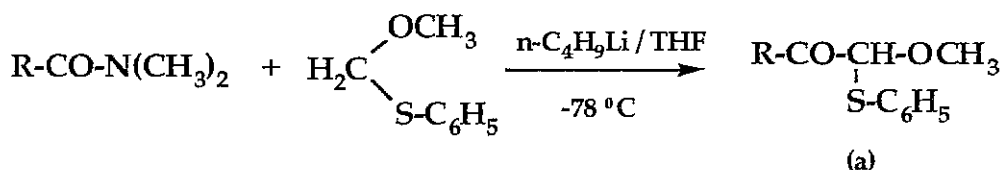
Esquema 22

Hutton¹⁵⁸ referiu a utilização, neste tipo de reacção, da 4-feniloxazola (como dieno) e do 2-butino-1,4-diol na síntese do 3,4-di-hidroxi metilfurano (Esquema 23).



Esquema 23

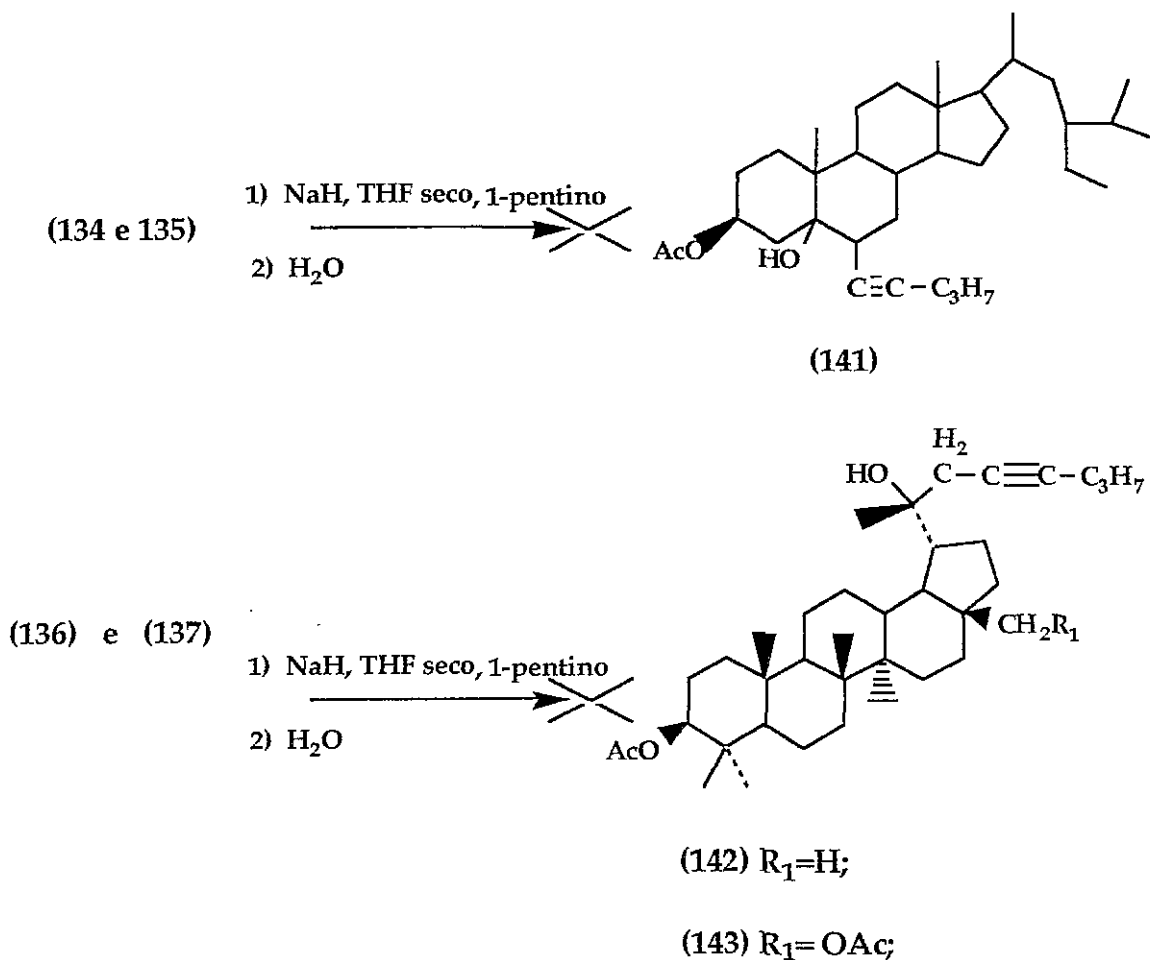
R.Mori¹⁵⁹ propõe um método inovador, embora um pouco mais complicado que o anterior, de síntese dos derivados 3-furânicos, através de uma amina e dum tioeter (Esquema 24):



Esquema 24

Após a análise destes dois métodos gerais de síntese de furanos, verifica-se que o referido em primeiro lugar tem um menor número de passos e uma execução laboratorial mais simples. Deste modo, optou-se por este, tendo-se tentado a preparação do acetato de 5-hidroxi-6-(1'-pentinil)-colestano-3β-ilo (141), acetato de 20-hidroxi-29-(1'-pentinil)-lupano-3β-ilo (142) e diacetato de 20-hidroxi-

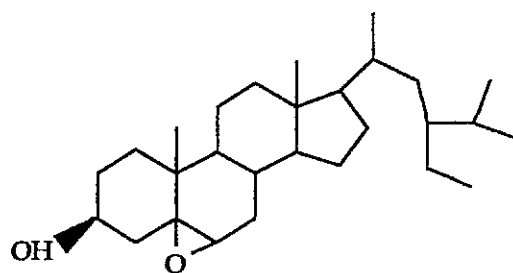
29-(1'-pentinil)-lupano-3 β ,28-diilo (143), a partir dos respectivos epóxidos (134 e 135), (136) e (137), (Esquema 25):



Esquema 25

No entanto as reacções sistematizadas no esquema anterior não produzem os alcinos pretendidos.

A reacção do acetato de 5,6-epoxicolestano-3 β -ilo (134 e 135) com o pentineto de sódio não originou o acetato de 5-hidroxi-6-(1'-pentinil)-colestano-3 β -ilo (141), mas sim o 5,6-epoxicolestano-3 β -ol (144).



(144)

Apesar do insucesso desta reacção é de referir que a síntese do alcino (141) foi repetida várias vezes, mudando vários factores experimentais, tais como, tempo de reacção, quantidade dos reagentes e temperatura da reacção. Pensamos que este facto se deve provavelmente ao impedimento estereo devido aos anéis fixos numa estrutura rígida e volumosa, impedindo a reacção, ou dificultando bastante, uma vez que o grupo 1-pentinilo é bastante volumoso.

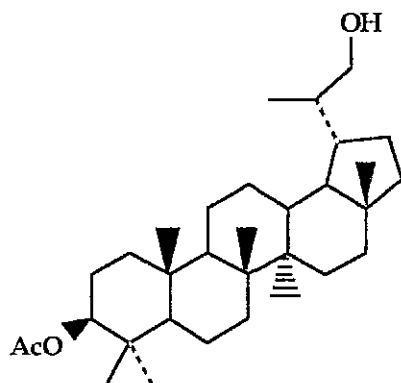
O hidreto de sódio pode ser responsável pela redução do éster e consequente formação de dois álcoois, o álcool (144) e o álcool etílico. No entanto talvez mais provável seja a hidrólise dos grupos éster, após a finalização da reacção em água.^{147,149,160,161}

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do composto (144) podemos provar a existência do grupo epóxido pelo aparecimento de um duplete a δ 2,90 ppm devido à ressonância do protão H-6. Verificou-se que ocorreu a hidrólise do grupo acetato porque se observa o deslocamento do multiplete correspondente a ressonância do protão H-3 de δ 4,95 ppm no acetato (134) para δ 3,90 ppm no álcool (144).

A reacção do acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo (136) por um lado e do diacetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo (137) por outro, com o pentineto de sódio, após terminar da reacção em água, não originou o acetato de 20-hidroxi-29-(1'-pentinil)-lupano-3 β -ilo (142) nem o diacetato de 20-hidroxi-29-(1'-pentinil)-

lupano-3 β ,28-diilo (143). No caso do epóxido (136) forma-se o acetato de 29-hidroxilupano-3 β -ilo (145) e o epóxido (137) origina o lupano-3 β ,28,29-triol (146).

O espectro de massa do acetato de 29-hidroxilupano-3 β -ilo (145) apresenta um pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 486, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{32}H_{54}O_3$.



(145)

Da análise do RMN de 1H do composto (145) podemos verificar a existência de um grupo hidroxilo na posição 29, devido ao aparecimento de um sinal em forma de multiplete a δ 4,12 ppm e o desaparecimento das ressonâncias correspondentes aos dois prótons H-29 do grupo epóxido no composto (136).

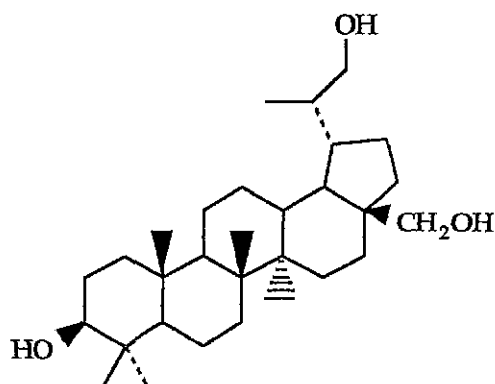
O espectro de RMN de ^{13}C do composto (145) confirma estes resultados, pois verifica-se o desaparecimento das ressonâncias correspondentes aos carbonos C-20 e C-29 do grupo epóxido do composto (136) e o aparecimento por outro lado da ressonância a δ 65,0 ppm correspondente ao carbono C-29 ligado ao grupo hidroxilo do composto (145).

O composto (145) forma-se pela abertura do grupo epóxido do composto (136) e com a conseqüente formação do grupo álcool na posição 29.

O composto lupano-3 β ,28,29-triol (146) resulta da abertura do grupo epóxido do composto (137), com a conseqüente formação do grupo álcool na posição 29, e

hidrólise dos grupos éster nas posições 3 e 28.

O espectro de massa do composto (146) apresenta um pico correspondente ao íon molecular, M^+ , a m/z 458, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$.



(146)

Da análise do espectro de RMN de 1H do composto (146) podemos verificar a existência de um grupo hidroxilo na posição 29, devido ao aparecimento de um sinal em forma de multipletto a δ 4,09 ppm e o desaparecimento da ressonância correspondente aos dois prótons H-29 do grupo epóxido do composto (137). Verifica-se também que houve hidrólise dos grupos éster, pois o duplo dupletto correspondente à ressonância do próton H-3 desloca-se para δ 3,19 ppm e os dois dupletos correspondentes às ressonâncias dos dois prótons H-28 deslocam-se para δ 3,78 e 3,31 ppm.

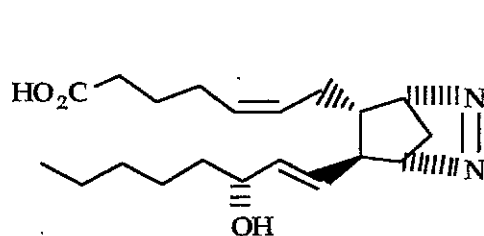
Como não conseguimos sintetizar os alcinos pretendidos (141), (142) e (143), não foi possível prosseguir na síntese dos respectivos derivados furânicos; como estava previsto de acordo com o Esquema 22 e usando a 4-feniloxazola como dieno.

2.4- Formação de compostos com um anel de pirazolina

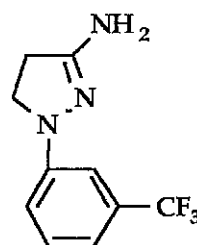
Os compostos do tipo pirazolina têm propriedades farmacológicas interessantes e por essa razão são bastante usados na síntese de novas drogas, apesar da tendência recente para eliminar compostos contendo ligações N-N da medicina.¹⁶² São pouco numerosos os exemplos conhecidos de drogas, contendo um núcleo pirazolina.¹⁴⁹ Destes podem-se referir:

- O 9,11-azo-PGE₂ (147), um endoperóxido estável que bloqueia especificamente a sintetase TXA₂;

- O BW-755C (148) um derivado da 2-pirazolina, tendo-se demonstrado que inibe as enzimas ciclooxygenase e lipooxygenase;

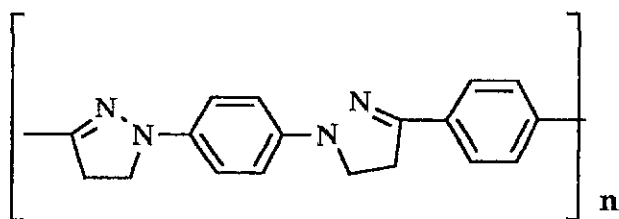


(147)



(148)

Além da aplicação de pirazolinas na indústria farmacêutica, estas são também utilizadas na indústria de polímeros. O estudo de polímeros com um anel de cinco membros heterocíclico tem sido desenvolvido nestes últimos 10 anos, constituindo uma nova área de materiais tecnicamente estáveis. Um dos polímeros conhecidos é a estável poli(1,3-fenilpirazolina)¹⁴⁵ de fórmula geral (149).

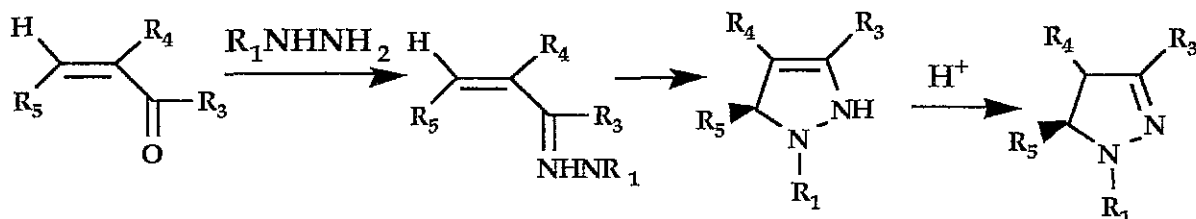


(149)

As pirazolininas podem ser obtidas por redução de pirazóis por hidrogenação catalítica com sódio em paládio ou por meios electroquímicos. Existem casos em que a redução evolui com a formação de pirazolidinas e produtos de cadeia aberta.¹⁶⁰

Uma grande variedade de agentes oxidantes transformam as pirazolininas em pirazóis: permanganato de potássio, dióxido de chumbo e acetato de mercúrio(II). Todos os isómeros de pirazolinina podem ser reduzidos com êxito a pirazolidinas, Δ^1 -pirazolinina, de forma catalítica, Δ^2 -pirazolinina, de forma polarográfica e Δ^3 -pirazolinina, por acção do boro-hidreto de sódio.¹⁶⁰

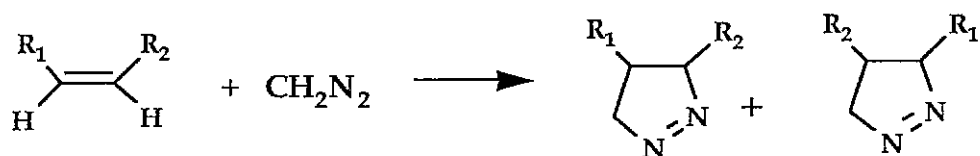
As Δ^2 -pirazolininas¹⁶³ são obtidas pela reacção de derivados carbonílicos α,β -insaturados com hidrazinas; é de referir que nesta reacção ocorre a epimerização em C-4 (Esquema 26).



Esquema 26

As Δ^1 -pirazolininas^{148,160} podem ser obtidas por reacção de compostos diazo com alcenos. Muitas vezes as Δ^1 -pirazolininas isomerizam em Δ^2 -pirazolininas quando existe um hidrogénio α à ligação N=N. A configuração do alceno é conservada nas Δ^1 -pirazolininas (estereoespecificidade) mas a regioespecificidade

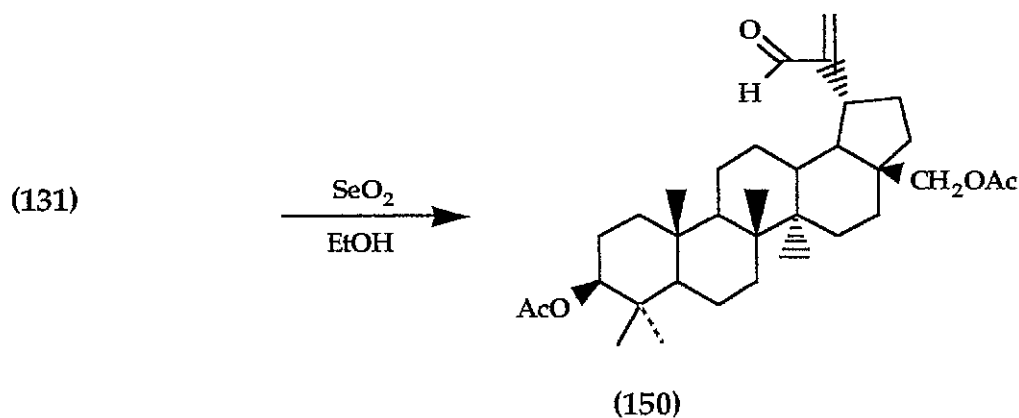
depende dos substituintes tanto do alceno como do composto diazo (Esquema 27).



Esquema 27

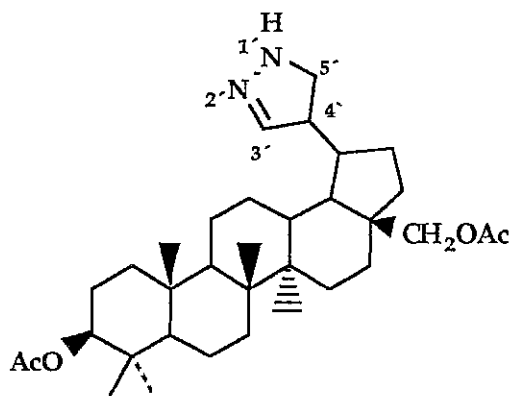
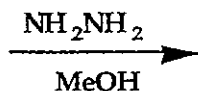
2.4.1- Síntese de Δ^2 -pirazolinás

Pretendemos introduzir em C-20 do diacetato de 29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo o anel de Δ^2 -pirazolina, para isso procedemos à oxidação alílica com óxido de selénio do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131), seguida de reacção com derivados de hidrazina (Esquema 28).



diacetato de 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo

(150)



(151.a)

diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo

Esquema 28

O diacetato de 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) é identificado por espectroscopia de IV, de RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massa.

A partir do espectro de RMN de ^1H foi possível identificar o composto (150), através das ressonâncias de alguns prótons típicas:

i) dois sinais em forma de duplete correspondente à ressonância dos prótons H-29 a δ 6,29 e 5,94 ppm, os quais apresentam desvios para maiores valores de frequência relativamente às correspondentes ressonâncias do composto (131);

ii) um sinal em forma de singuleto devido à ressonância do próton do grupo aldeído, H-30, a δ 9,51 ppm;

iii) um sinal em forma de sexteto correspondente à ressonância do próton H-19 a δ 2,80 ppm.

Relativamente ao espectro de RMN de ^1H do composto (131), no do (150) verifica-se o desaparecimento da ressonância dos prótons do grupo metilo Me-30.

O composto (150) apresenta um RMN de ^{13}C característico:

i) o sinal correspondente à ressonância do carbono carbonilo do grupo aldeído, C-30, a δ 195,6 ppm;

ii) os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos vinílicos, C-20 e C-29, a δ 156,4 e 134,1 ppm.

Contudo é de referir que as ressonâncias destes carbonos vinílicos só aparecem no espectro de RMN de ^{13}C quando este é obtido à temperatura de -50°C e de 50°C , não aparecendo à temperatura de 0°C e à temperatura ambiente. No entanto o sinal correspondente à ressonância do carbono C-30 surge sempre, independentemente da temperatura em que foram obtidos os espectros. Para tentar uma justificação para este facto, foi efectuado o RMN de ^{13}C em fase sólida, verificando-se o aparecimento da ressonância correspondente aos carbonos vinílicos e do carbono C-30. No entanto este facto não é referido na identificação de um composto semelhante na bibliografia.¹⁶⁴

O espectro de massa do composto (150) apresenta um pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 540, o que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5$.

O espectro de IV confirma a estrutura proposta para o composto (150), sendo o facto mais relevante o aparecimento de uma banda correspondente à elongação do carbono carbonílico do grupo aldeído α,β -insaturado a 1691 cm^{-1} , o que está de acordo com os dados bibliográficos.¹³¹

Os diacetatos de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (151.a) foram identificados por espectroscopia de IV, de RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massa.

Neste tipo de síntese começou-se por usar o hidrato de hidrazina, tendo-se obtido o diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (151.a). A partir da análise do RMN ^1H é possível identificar os seguintes sinais:

- a) Um duplete correspondente à ressonância do protão H-3' (δ 3,86 ppm);
- b) Um multiplete a δ 3,47 ppm, o qual é devido à ressonância do protão H-4';
- c) Um duplete a δ 6,87 ppm, correspondente à ressonância do protão H-1'.

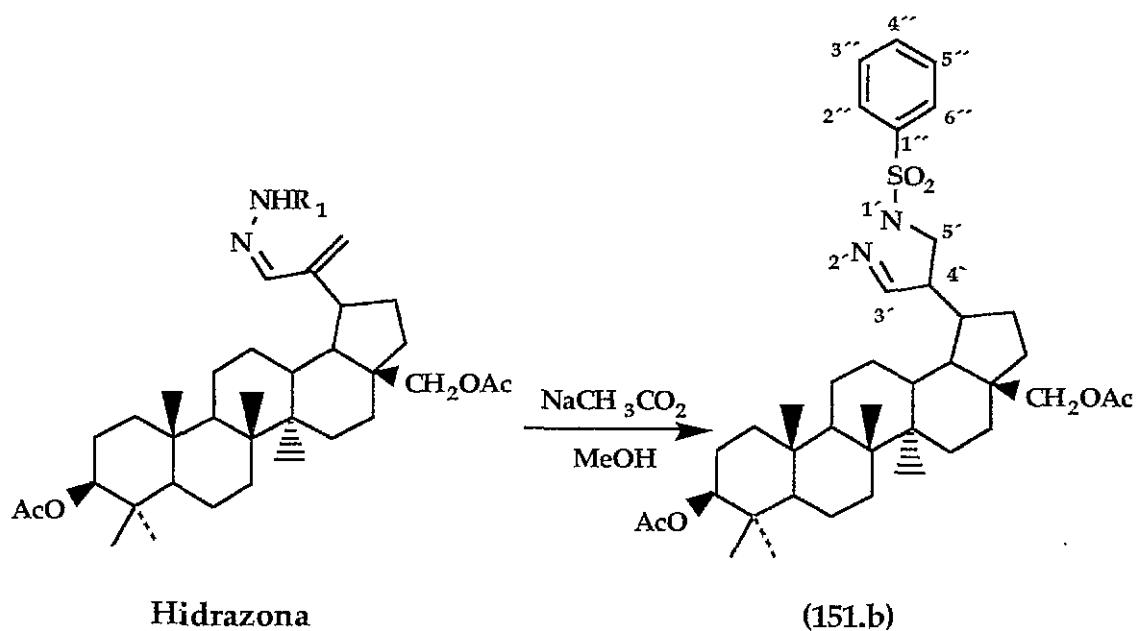
No espectro do composto (151.a) não se observam os sinais correspondentes aos protões vinílicos e aldeídico do composto de partida o 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150).

O RMN de ^{13}C do composto (151.a) apresenta um sinal a δ 160,0 ppm correspondente à ressonância do carbono C-3' e um sinal a δ 20,8 ppm correspondente à ressonância do carbono C-4', este último sinal foi atribuído tendo em conta os dados obtidos dos espectros DPTE (135° e 90°). Verifica-se o desaparecimento das ressonâncias dos carbonos vinílicos e do carbono carbonílico do composto (150). É de referir que não foi possível assinalar a ressonância do carbono C-5' de forma inequívoca pois este aparece na zona mais complicada de 55-30 ppm. As atribuições efectuadas por nós foram feitas tendo em conta os dados bibliográficos para 2-pirazolinas simples.¹⁶⁰

O espectro de massa do composto (151.a) apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 554, o que está de acordo com a fórmula molecular prevista $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{N}_2$.

O espectro de IV do composto (151.a) apresenta uma banda correspondente à vibração da ligação C=N a 1664 cm^{-1} , o que está de acordo com a bibliografia^{111,131} Além da hidrazina simples foram utilizadas na reacção descrita no Esquema 28 outras hidrazinas: a fenil-hidrazina ($\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5$), a

sulfoxifenil-hidrazina ($R_1 = \text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$) e a 2,4-dinitrofenil-hidrazina ($R_1 = 2,4\text{-(NO}_2)_2\text{C}_6\text{H}_3$). Tanto com a fenil-hidrazina como com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina não se obteve da reacção o produto pretendido. Apenas obtivemos o derivado Δ^2 -pirazolino no caso da hidrazina, já exposto atrás, e da sulfoxifenil-hidrazina. No entanto, no caso desta última foi necessário isolar a hidrazona e só depois proceder à ciclização com acetato de sódio (Esquema 29).



Esquema 29

A hidrazona apresenta espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C característicos, verificando-se ainda os sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons e dos carbonos vinílicos, respectivamente.

Por RMN de ^1H podemos confirmar a estrutura de (151.b), $R_1 = \text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, verifica-se o aparecimento de um sinal em forma de duplete a δ 3,98 ppm devido à ressonância do próton H-3', um multiplete a δ 3,10 ppm correspondente à ressonância do próton H-4', um duplete a δ 2,24 ppm devido à ressonância dos prótons 2H-5' e as ressonâncias dos prótons aromáticos aparecem sob a forma de

dois multipletos a δ 7,63 e 7,92 ppm correspondentes respectivamente aos prótons H-3'', 4'' e 5'' e H-2'' e 6''.

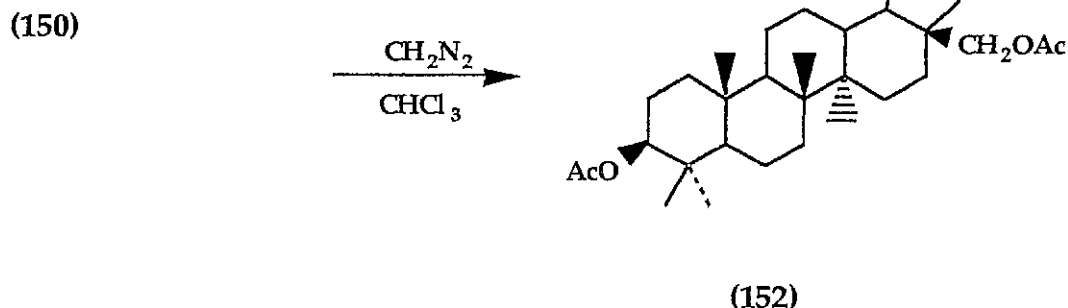
O RMN de ^{13}C apresenta um sinal a δ 134,0 ppm correspondente à ressonância do carbono C-3', dois sinais devidos às ressonâncias dos carbonos C-4' e C-5' a δ 46,2 e 48,9 ppm respectivamente e seis sinais devidos às ressonâncias dos carbonos do grupo fenilo a δ 129,6- 128,5 ppm.

O espectro de massa não apresenta o pico devido ao ião molecular, M^+ , a m/z 694, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$. No entanto observamos outros fragmentos, como $(M - \text{C}_2\text{H}_5)^+$ m/z 665, característico de compostos alifáticos e $((M - \text{C}_2\text{H}_5) - \text{CH}_3\text{CO})^+$ m/z 622, característico de compostos alifáticos contendo na sua estrutura um grupo éster.

O espectro de IV do composto (151.b), apresenta uma banda correspondente à vibração de distensão da ligação C=N à 1644 cm^{-1} .

2.4.2- Síntese de Δ^1 -pirazolinas

Fizemos a reacção do diacetato de 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) com diazometano com o objectivo de obter um derivado triterpénico Δ^1 -pirazolino (Esquema 30).



diacetato de 20-(4'- Δ^1 -pirazolinil)-29-nor-30-oxolup-3 β ,28-diilo

Esquema 30

O diacetato de 20-(4'- Δ^1 -pirazolinil)-29-nor-30-oxolup-3 β ,28-diilo (152) foi identificado por espectroscopia de IV, de RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massa.

No espectro de RMN de ^1H do composto (152) foi possível identificar um duplete a δ 4,26 ppm devido à ressonância de um dos prótons H-3', um duplete a δ 3,85 ppm correspondente à ressonância de um dos prótons H-5'. As ressonâncias dos outros dois prótons do anel pirazolino aparecem respectivamente como um duplete a δ 2,27 ppm (H-3') e 2,12 ppm (H-5'), enquanto a ressonância do próton do grupo aldeído, H-30, aparece como um singuleto a δ 8,78 ppm.

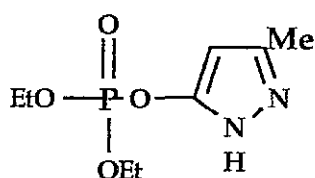
O RMN de ^{13}C confirma também a estrutura prevista para o composto (152), apresenta um sinal a δ 201,7 ppm correspondente à ressonância do carbono carbonilo do grupo aldeído, C-30 e outros dois sinais a δ 23,6 e 35,1 ppm correspondentes às ressonâncias dos carbonos C-3' e C-5'.

O espectro de massa do composto (152) apresenta o pico correspondente ao íon molecular, M^+ , a m/z 582, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{35}H_{54}O_5N_2$.

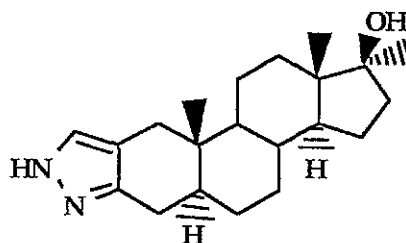
O espectro de IV apresenta uma banda correspondente à ligação $N=N$ a 1689 cm^{-1} .

2.5- Formação de compostos com um anel de pirazol

Como foi referido anteriormente (ver 1.2) os pirazóis apresentam actividade biológica. Há insecticidas¹⁴⁵ conhecidos com um anel de pirazol na sua estrutura (153), enquanto outros pirazois são utilizados como esteróides anabolizantes¹⁴⁵ sem efeitos secundários (154).

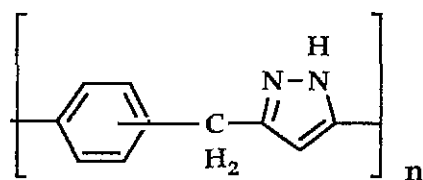


(153)



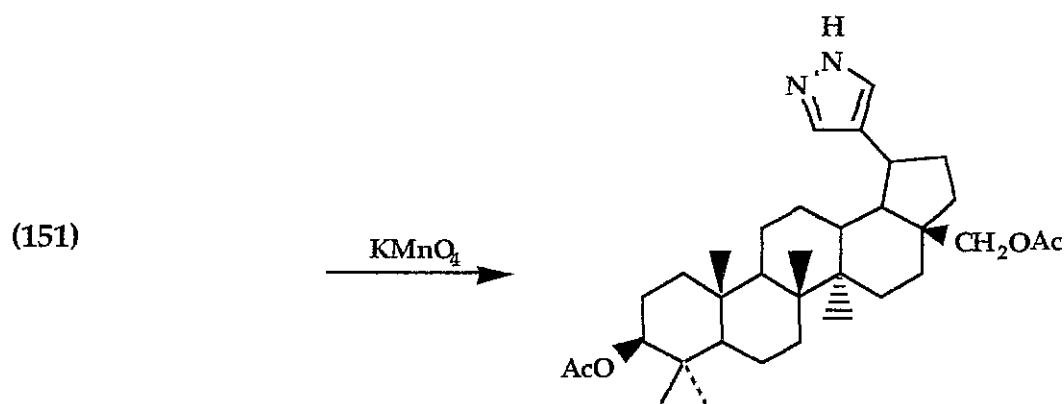
(154)

Tal como as pirazolinas, os pirazóis são também utilizados no fabrico de polímeros. O poli(3-benzilopirazol)¹⁴⁵ (155) é preparado pela condensação do polidietilbenzeno com a hidrazina em piridina com um rendimento de 60-97 %.



(155)

Os pirazóis podem ser formados pela oxidação das pirazolinas, como referido em 2.4. Com o objectivo de sintetizar triterpenos com um anel de pirazol, tentou-se a oxidação Δ^2 -pirazolina (151.a) com permanganato de potássio (Esquema 31).



(156)

diacetato de 20-(4'-pirazolil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo

Esquema 31

Foi possível identificar o composto (156) por RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa. O espectro de RMN de ^1H parece indicar a existência de dois isómeros, 20- β e 20- α , devido aos sinais correspondentes a alguns prótons se apresentarem em duplicado.

Surgem dois sinais em forma de singuleto devidos provavelmente às ressonâncias dos prótons pirazólicos (N-H) dos dois isómeros, a δ 8,08 e 7,85 ppm.

As ressonâncias dos prótons H-3' e H-5', aparecem na forma de singuleto em cada um dos isómeros, respectivamente δ 5,56, 5,62 ppm e δ 5,36 e 5,45 ppm.

Por RMN de ^{13}C não é possível verificar a existência dos dois isómeros, contudo identificamos perfeitamente o composto (156) pelo aparecimento de três novos sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos do anel de pirazol, a δ 148,8; 134,7 e 113,0 ppm, C-3', C-5' e C-4' respectivamente.

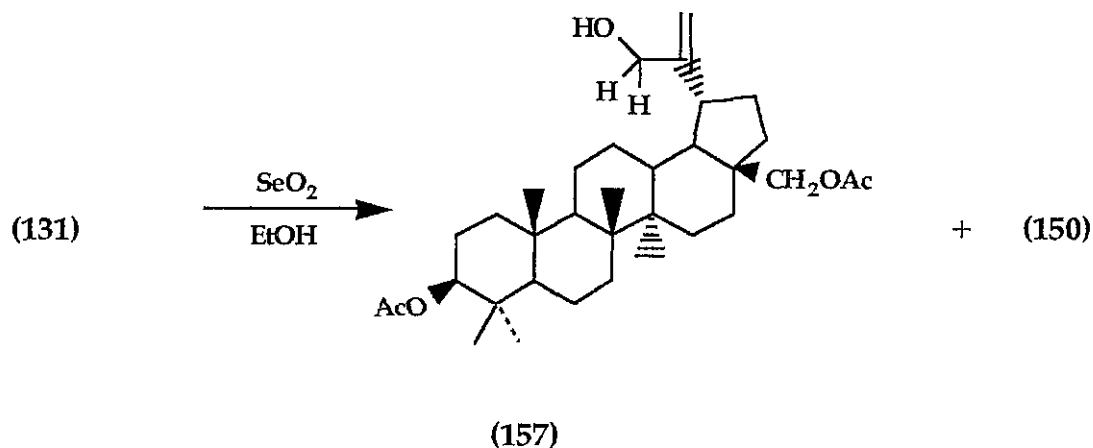
O espectro de massa apresenta um pico correspondente ao ião molecular m/z 552, o que está de acordo com a fórmula molecular proposta $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{N}_2$.

O espectro de IV, apresenta uma banda correspondente a vibração de distensão da ligação C=N a 1644 cm^{-1} .

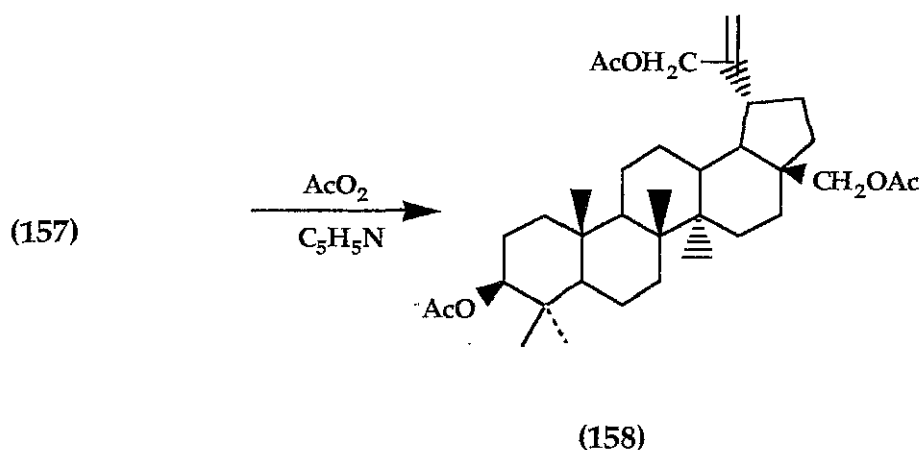
2.6- Reacções diversas

2.6.1- Formação do triacetato de lupenilo

A oxidação alílica do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131) com dióxido de selénio, além de originar o aldeído (150), como foi referido em 2.4.1, produz também o diacetato de 30-hidroxilup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (157) (Esquema 32). Tendo em vista a caracterização de todos os produtos de reacção, e a obteccção de novos compostos para ensaios biológicos, efectuou-se a acetilação do composto (157). Este foi acetilado pelo processo usado em 2.1, originando o triacetato (158) (Esquema 32).



diacetato de 30-hidroxilup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo



triacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28,30-triol

Esquema 32

O composto (158) foi identificado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa. O espectro de RMN de ^1H apresenta três sinais em forma de singuleto a δ 2,04; 2,08 e 2,10 ppm devidos às ressonâncias dos prótons dos grupos metilo dos três grupos éster (3-Me, 28-Me e 30-Me). Os dois sinais em forma de duplete correspondentes à ressonâncias dos prótons vinílicos H-29' e H-

29, surgem a δ 4,96 e 4,54 ppm, respectivamente. Verifica-se que a distância entre estes dois dupletos (0,42 ppm no triacetato (158)), passa a 0,35 ppm no diacetato (150) (grupo aldeído na posição 30) e a 0,10 ppm no diacetato (131) (grupo metilo na posição 30). Esta evidência é mais um motivo para pensar que o novo grupo éster se encontra na vizinhança da dupla ligação exocíclica.

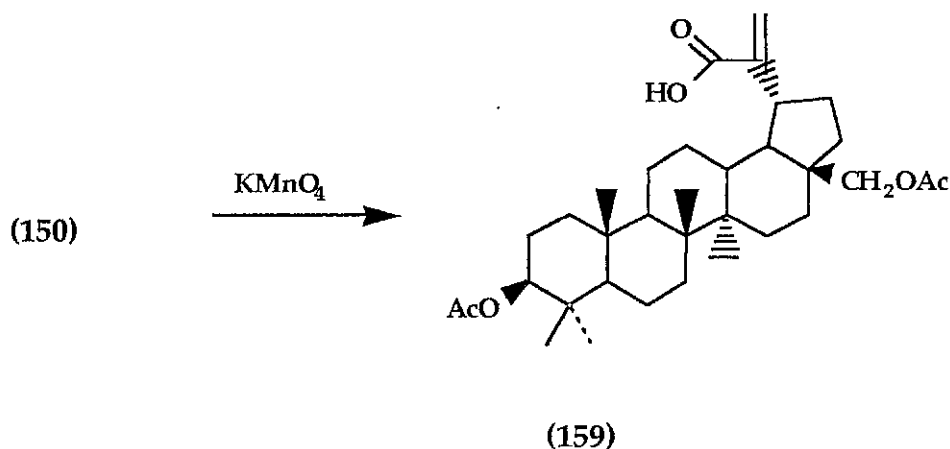
O espectro de RMN de ^{13}C confirma a estrutura proposta para (158), apresenta três sinais devidos à ressonância dos carbonos carbonílicos do grupo éster a δ 170,8; 171,1 e 171,7 ppm (C-3, C-28 e C-30). A ressonância do carbono C-30 aparece a δ 66,0 ppm, o que está de acordo com o desvio químico tipo¹³⁹ de um carbono $-\text{H}_2\text{C}-\text{O}$. As ressonâncias dos carbonos vinílicos aparecem a δ 110,7 e 148,7 ppm, correspondendo respectivamente, a C-29 e C-20.

O íão molecular de (158) é confirmado pelo espectro de massa do composto, M^+ a m/z 584, o que é consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_6$.

O espectro de IV apresenta uma banda correspondente à elongação do carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, do éster a 1736 cm^{-1} .

2.6.2- Formação do 20-carboxilupenilo

Tentou-se a síntese do diacetato de 20-carboxilup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (159) por a oxidação do aldeído (150) com permanganato de potássio (Esquema 33).



diacetato de 20-carboxilup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo

Esquema 33

No entanto, esta reacção origina não o composto pretendido (159), mas sim o produto resultante da hidrólise dos grupos éster na posição 3 e 28, o 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diolo (160). Este composto foi identificado por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C e de IV e espectrometria de massa.

O espectro de RMN de ^1H do composto (160) apresenta um sinal em forma de duplo duplete correspondente à ressonância do protão H-3 a δ 3,18 ppm e outros dois em forma de duplete devidos à ressonância dos protões H-28 a δ 3,37 e 3,80 ppm. A comparação das ressonâncias destes protões no diacetato de 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) e do composto (160) ($\Delta\delta_{\text{H}_3} = -1,28$ ppm e $\Delta\delta_{\text{H}_{28}} = -0,44$ e $-0,48$ ppm), dá uma forte indicação da hidrólise dos ésteres em C-3 e C-28.

O espectro de RMN de ^{13}C confirma a estrutura proposta para o composto (160), verifica-se o desaparecimento dos sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos carbonílicos dos grupos acetiloxilo e os sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos C-3 e C-28 deslocam-se para δ 79,0 e 60,2 ppm respectivamente.

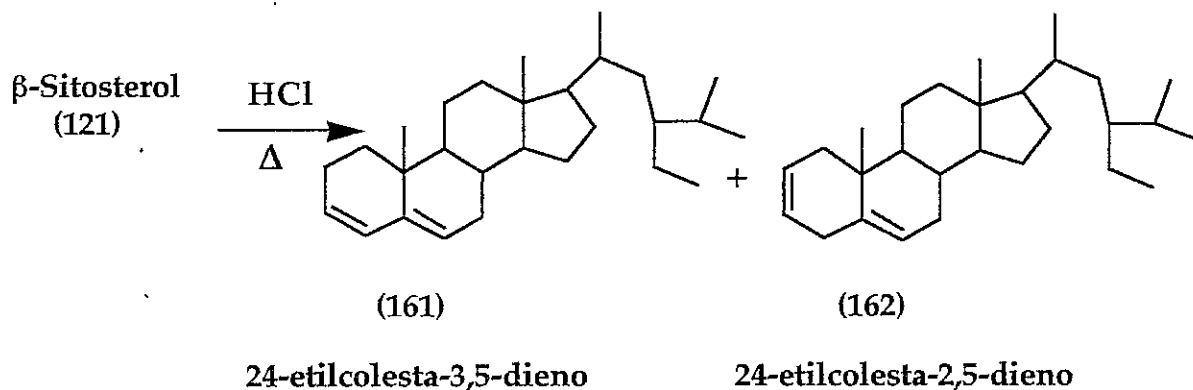
O espectro de massa do composto (160) apresenta o pico correspondente ao íão molecular, M^+ , a m/z 456, o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$.

Verificamos no espectro de IV o aparecimento de uma banda intensa correspondente à vibração da ligação -OH a 3451 cm^{-1} , o que está de acordo com a estrutura proposta para (160).

Esta reacção não produz o composto pretendido (159) devido provavelmente a reacção de hidrólise dos grupos éster ocorrer rapidamente, uma vez, que as condições da reacção, meio aquoso ligeiramente alcalino seguido da acidificação, serem condições ideais para esta reacção secundária.^{147,149,158,159}

2.6.3- Desidratação do sitosterol

Com o objectivo de provocar a desidratação do sitosterol, procedeu-se ao aquecimento de uma solução alcoólica de HCl a 10% deste esteróide, tendo-se obtido dois isómeros de posição, o 24-etilcolesta-3,5-dieno (161) e o 24-etilcolesta-2,5-dieno (162) (Esquema 34).



Esquema 34

Foi possível identificar os compostos (161) e (162) por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massa.

O espectro de RMN de ^1H do composto (161) apresenta um sinal em forma de tripleto a δ 4,47 ppm devido à ressonância do próton H-4 e o sinal correspondente à ressonância do próton H-3 surge como duplo tripleto a δ 2,76 ppm. A constante de acoplamento, $J=10,4$ Hz, indica-nos que se trata do isómero *cis*.

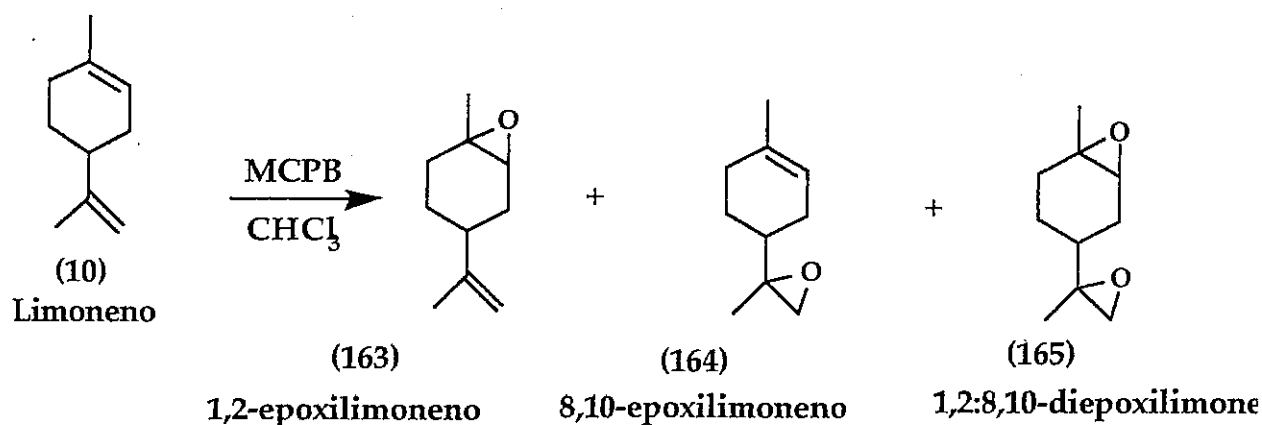
O espectro de RMN de ^{13}C apresenta as ressonâncias típicas¹²⁸ de carbonos vinílicos a δ 123,5 e 137,2 ppm devidas aos carbonos C-3 e C-4.

Por RMN de ^1H foi possível identificar o composto (162), as ressonâncias dos prótons vinílicos aparecem cada uma delas como sinal em forma de duplo duplete, a δ 5,51 e δ 5,17 ppm. As constantes de acoplamento dos dois prótons, $J=10,1$ Hz, indicam-nos que se trata do isómero *cis*.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta as ressonâncias típicas dos carbonos vinílicos, δ 127,5 e 131,6 ppm devido aos carbonos C-2 e C-3.¹³⁰

2.6.4- Diepoxido de limoneno

Com o objectivo de otimizar a reacção de epoxidação, tentou-se essa reacção num substrato mais simples. Efectuou-se a síntese do diepóxico de limoneno (165) por epoxidação do limoneno (10) com o ácido *m*-cloroperbenzóico (MCPB) (Esquema 35).



Esquema 35

Os epóxidos 163-164 foram identificados por RMN de ^1H e GC-MS.

Por GC-MS identificamos dois composto (163) e (164), cujos tempos de retenção são respectivamente 4,27 e 3,68 min. O diepóxido (165) não se forma nesta reacção ou forma-se em tão pequena proporção que não se consegue detectar. Verifica-se que o componente maioritário é o 8,10-epoxilimoneno (164).

O espectro de massa dos compostos (163) e (164) apresenta o pico correspondente ao ião molecular, M^+ a m/z 152 o que está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$. Contudo é possível identificar os dois isómeros de posição, pelo fragmento característico do composto (163), m/z 121, que corresponde a $(\text{M} - \text{CH}_2 = \text{OH})^+$.

O espectro de RMN de ^1H confirma os resultados obtidos por GC-MS. As ressonâncias dos protões vinílicos, aparecem cada uma delas como singuleto largo, o isómero (163) a δ 4,66 ppm devido aos protões H-10 e o isómero (164) a δ 4,72 ppm devido ao protão H-2. Os multipletos correspondentes às ressonâncias dos protões do grupo epóxido, 2H-10 no isómero (164) e H-2 no isómero (163), aparecem a δ 3,02 e 2,56 ppm, respectivamente.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C é possível identificar os dois isómeros (163) e (164). O espectro de RMN de ^{13}C da mistura apresenta dois grupos de sinais de intensidades distintas correspondentes a cada um dos isómeros. Os sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos vinílicos do isómero (163) aparecem a δ 109,2 ppm (C-10) e δ 148,8 ppm (C-8), os sinais devidos às ressonâncias dos carbonos do grupo epóxido C-1 e C-2 aparecem respectivamente δ 69,9 e 58,0 ppm. Os sinais correspondentes às ressonâncias dos carbonos vinílicos do isómero (164) aparecem a δ 133,1 ppm (C-1) e δ 127,7 ppm (C-2), os sinais devidos às ressonâncias dos carbonos do grupo epóxido C-8 e C-10 aparecem respectivamente δ 71,3 e 73,9 ppm

3- Parte Experimental

3.1- Reagentes e equipamento

Os solventes utilizados eram analiticamente puros, ou comerciais purificados por destilação.

O THF foi seco por refluxo sobre potássio metálico até adquirir uma cor azul turquesa com a adição de benzofenona e destilado em seguida.

A evolução das reacções foi seguida por tlc usando folhas Merck plastificadas e revestidas com sílica gel 60 N-HR/UV₂₅₄. As cromatografias preparativas foram efectuadas em placas de vidro (20 x 20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel Merck 60 GF₂₅₄, de 0,5 mm de espessura. A revelação das placas de tlc foi feita à luz ultravioleta a 254 e 366 nm, em alguns casos a revelação das manchas foi efectuada em câmara de iodo

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de placa aquecida Reichert, modelo Thermovar e não foram corrigidos.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos no aparelho Bruker AMX-300 a 300,13 e 75,47 MHz respectivamente, utilizando-se geralmente CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna.

Os espectros de massa foram adquiridos no espectrómetro de Massa VG-Autospec Q, utilizando uma fonte de impacto electrónico (70 eV) a 200°C, os espectros de FAB foram feitos utilizando como matriz o álcool 3-nitrobenzílico (NBA) e com bombardeamento com iões Cs⁺ à temperatura da fonte de 50°C.

A análise de GC-MS foi feita num cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II/MS, utilizando uma coluna capilar de polaridade intermédia (equivalente à DB5) de 60 m de comprimento, $\phi_i=0,32$ mm e $0,25$ μm de espessura de filme e usando como gás de arraste hélio. O volume injectado de solução foi 1 μl e as condições separativas foram: Temperatura_{inicial}= 100°C , tempo= 0 min, Rampa= $10^\circ\text{C}/\text{min}$, Temperatura_{final}= 250°C , tempo= 0 min, Temperatura_{injector}= 220°C , Temperatura_{interface}= 250°C ;

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrofotómetro com transformadas de fourier, Mattson Galaxy 7020, em pastilhas de KBr.

3.2- Síntese do acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129)

Adicionou-se sitosterol (121) (1g , $2,42$ mmol) a uma mistura de anidrido acético (10 ml) e piridina (1 ml, 12 mmol). Refluxou-se a mistura num banho de óleo, com agitação magnética, a 100°C durante seis horas.

Deixou-se arrefecer a mistura reaccional, verteu-se sobre uma mistura de gelo e uma solução de HCl a 10% em volume e deixou-se agitar por alguns minutos. De seguida extraiu-se com acetato de etilo. A fase orgânica foi recolhida e lavada com uma solução de HCl a 2% em volume, sendo de seguida seca através de sulfato de sódio anidro. O acetato de etilo foi evaporado a pressão reduzida num evaporador rotativo. O sólido resultante foi cristalizado, dissolvendo-o numa pequena quantidade de CHCl_3 , a quente, adicionando-se de seguida algumas gotas de MeOH até se verificar turvação ligeira da solução. A solução foi deixada em repouso protegida da luz, verificando-se após alguns dias a formação de agulhas do acetato de 24-etilcolest-5-eno-3 β -ilo (129).

O sólido formado foi filtrado e seco na pistola de secagem por várias horas (pelo menos 4 horas) de forma a retirar o excesso de piridina e de anidrido acético.

Massa: 0,993 g

Rend.: 90% p.f.= 126-127°C (cristalizado em clorofórmio-metanol, lit. 134°C¹⁰)

RMN ¹H: 4,60 (1H, m, 3-H), 5,37 (1H, d, J= 4,5 Hz, 6-H), 0,68 (3H, s, 18-CH₃), 1,02 (3H, s, 19-CH₃), 2,03 (3H, s, O-CO-CH₃).

RMN ¹³C: 39,6 (C-1), 33,8 (C-2), 73,8 (C-3)*, 38,0 (C-4), 139,5 (C-5)*, 122,6 (C-6)*, 33,6 (C-7), 56,0 (C-8), 55,6 (C-9), 42,2 (C-10), 20,9 (C-11), 26,0 (C-12), 36,4 (C-13), 39,0 (C-14), 28,2 (C-15), 36,9 (C-16), 49,9 (C-17), 11,9 (C-18), 11,8 (C-19), 38,8 (C-20), 21,4 (C-21), 31,8 (C-22), 30,2 (C-23), 32,3 (C-24), 28,2 (C-24₁), 20,5 (C-24₂), 29,0 (C-25), 20,2 (C-26), 19,8 (C-27), 170,2 (-O-CO-CH₃)*, 15,4 (-O-CO-CH₃)*.

* As ressonâncias de todos os carbonos que não se encontram assinalados com este símbolo foram identificados por a análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 456 (M⁺, 1), 414 (1), 396 (100), 382 (77), 367 (15), 255 (24), 213 (15), 199 (6), 185 (5), 147 (40), 81(40).

IV ν max (cm⁻¹): 2865 (C-H), 1735 (CO).

3.3- Síntese do acetato lup-20(29)-eno-3β-ilo (130)

Adicionou-se lupeol (118) (50 mg, 0,12 mmol) a uma mistura de anidrido acético (2 ml) e piridina (50 ml, 0.6 mmol).

Seguindo-se o método descrito em 3.2 obtiveram-se cristais de cor branca do acetato de lup-20(29)-eno-3 β -ilo.

Massa: 0,051 g

Rend.: 91% p.f.= 216-217°C (cristalizado em clorofórmio-metanol, lit. 214-220°C^{10,165,166,167,168,169})

RMN ¹H: 4,46 (1H, dd, J= 6,0 e 10,7; 3-H), 2,38 (1H, sext., J= 5,7 e 11,4; 19-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,94 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,78 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,85 (3H, s, 26-CH₃)*, 0,84 (3H, s, 27-CH₃)*, 0,83 (3H, s, 28-CH₃)*, 4,57 (1H, m, J= 1,2 e 2,3; 29-H), 4,69 (1H, d, J= 2,3; 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃), 2,04 (3H, s, O-CO-CH₃).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ¹³C: 40,1 (C-1), 34,2 (C-2), 80,9 (C-3)*, 43,0 (C-4), 55,3 (C-5), 20,9 (C-6), 35,6 (C-7), 42,8 (C-8), 50,3 (C-9), 37,8 (C-10), 19,3 (C-11), 27,4 (C-12), 27,9 (C-13), 40,8 (C-14), 29,8 (C-15), 38,3 (C-16), 38,0 (C-17), 48,2 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20)*, 34,2 (C-21), 35,5 (C-22), 27,9 (C-23), 18,0 (C-24), 16,2 (C-25), 16,0 (C-26), 14,5 (C-27), 16,5 (-28), 109,3 (C-29)*, 21,4 (C-30), 171,0 (-O-CO-CH₃)*, 16,5 (-O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 468 (M⁺, 58), 453 (8), 408 (7), 314 (23), 239(100), 218 (33), 204 (28), 189 (50), 149 (38), 69 (60).

IV ν_{\max} (cm^{-1}): 2865 (C-H), 1729 (CO).

3.4- Síntese do diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131)

Adicionou-se betulina (68) (100 mg, 0,23 mmol) a uma mistura de anidrido acético (4 ml) e piridina (90 μl , 1,1 mmol).

Seguindo-se o método descrito em 3.2 obtiveram-se cristais brancos de diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,109 g

Rend.: 90% p.f.= 213-214°C (cristalizado em clorofórmio-metanol, lit. 216-217°C¹⁰)

RMN ^1H : 4,46 (1H, dd, J= 5,5 e 10,0; 3-H), 2,44 (1H, sext., J= 5,6 e 11,1; 19-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,97 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,83 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,84 (6H, s, 26-CH₃ e 27-CH₃)*, 4,59 (1H, d, J= 11,1; 28-H), 4,69 (1H, d, J= 11,1; 28-H), 4,59 (1H, m, $J_{\text{H}30} = 1,4$ Hz e $J_{\text{H}29} = 2,1$ Hz, 29-H'), 4,69 (1H, d, $J_{\text{H}29} = 2,1$ Hz, 29-H), 1,68 (3H, s, 30-CH₃), 2,04 (3H, s, O-CO-CH₃)**, 2,07 (3H, s, O-CO-CH₃)**.

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

** Não conseguimos identificar os diferentes sinais dos grupos metilo dos dois grupos éster, por essa razão nos assinalamentos não os distinguimos.

RMN ^{13}C : 38,3 (C-1), 34,4 (C-2), 80,9 (C-3)*, 47,6 (C-4), 55,2 (C5), 23,6 (C-6), 34,0 (C-7), 40,8 (C-8), 50,2 (C-9), 37,7 (C-10), 20,7 (C-11), 26,9 (C-12), 37,4 (C-13), 42,6 (C-14), 29,4 (C-15), 38,3 (C-16), 46,1 (C-17), 48,6 (C-18), 48,6 (C-19), 150,0 (C-20)*, 25,0 (C-21), 23,6 (C-22), 27,8 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 16,1 (C-26), 14,6 (C-27), 62,4 (C-28)*, 109,8 (C-29)*, 20,7 (C-30), 171,1 (-O-CO-CH₃)*, 171,5 (-O-CO-CH₃)*, 15,9 (-O-CO-CH₃)*, 16,4 (-O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e com a análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 526 (M^+ , 8), 466 (54), 453 (8), 423 (9), 393 (5), 276 (7), 216 (14), 203 (27), 189 (57), 135 (30), 107 (30), 95 (37).

IV ν_{max} (cm^{-1}): 2865 (C-H), 1730 (CO).

3.5- Síntese dos acetato de 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ilo (134) e (135)

Dissolveu-se acetato de colest-5-eno-3 β -ilo (129) (500 mg, 1,10 mmol) em clorofórmio pa (10 ml), tendo-se agitado durante alguns minutos a mistura até estar completamente homogênia. A esta solução adiciona-se gota-a-gota, uma outra solução de MCPBA (284 mg, 1,64 mmol) em clorofórmio (10 ml). Depois de completa a adição, a mistura reaccional, foi aquecida a 60 °C num banho de óleo, com agitação magnética, durante 3 horas. No final deste período, verteu-se a mistura reaccional sobre uma solução aquosa fria de NaOH a 2% e deixou-se a agitar durante alguns minutos. Em seguida extraíu-se com acetato de etilo (3X 50 ml), a fase orgânica obtida foi seca através de sulfato de sódio anidro e o acetato de etilo foi evaporado a pressão reduzida com auxílio do evaporador rotativo. O

resíduo obtido foi retomado numa pequena quantidade de clorofórmio e purificado por tlc preparativa, usando a mistura de acetato de etilo : hexano (1:3) como eluente.

O produto obtido foi cristalizado em diclorometano com o mínimo possível de metanol, obtendo-se um sólido amarelado amorfo de acetato de 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ilo.

Massa: 0,363 g

Rend.: 70% p.f.= 142-143°C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,95 e 4,77 (1H, m, 3-H)*, 2,89 e 3,08 (1H, d, J= 4,5; 6-H), 0,61 e 0,64 (3H, s, 18-CH₃)*, 1,07 e 1,00 (3H, s, 19-CH₃)*, 2,03 e 2,01 (3H, s, O-CO-CH₃)**.

RMN ^{13}C : 39,3 (C-1), 33,8 (C-2), 71,3 e 71,4 (C-3)*, 38,0 (C-4), 63,6 e 65,2 (C-5)*, 59,2 e 62,5 (C-6)*, 33,6 (C-7), 56,7 (C-8), 56,1 (C-9), 55,7 (C-10), 20,5 (C-11), 25,9 (C-12), 25,9 (C-13), 34,9 (C-14), 28,1 (C-15), 36,6 (C-16), 50,9 (C-17), 11,9 (C-18), 11,8 (C-19), 42,4 (C-20), 21,3 (C-21), 32,1 (C-22), 29,8 (C-23), 32,4 (C-24), 28,1 (C-24₁), 20,2 (C-24₂), 29,1 (C-25), 20,5 (C-26), 19,8 (C-27), 170,2 e 170,6 (-O-CO-CH₃)*, 15,8 (-O-CO-CH₃).

* Como referido em 2.2 nesta reacção formam-se dois isómeros, contudo não conseguimos no espectro de RMN de ^1H assinalar as ressonâncias de cada um dos isómeros.

EM IE m/z (int. rel.): 472 (M⁺, 5), 412 (100), 398 (76), 380 (20), 370 (10), 302 (5), 271 (10), 253 (20), 229 (13), 211 (15), 199 (8), 175 (10), 135 (30), 123 (35), 96 (54).

IV ν_{\max} (cm⁻¹): 2865 (C-H), 1734 (CO).

3.6- Síntese do acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo (136)

A uma solução de acetato de lup-20(29)-eno-3 β -ilo (130) (50 mg, 0,107 mmol) em clorofórmio (2 ml), adiciona-se, gota-a-gota, uma outra de MCPBA (28 mg, 0,160mmol) em clorofórmio (2 ml). Seguiu-se o método descrito em 3.5, tendo-se obtido um sólido, o acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo.

Massa: 0,036 g

Rend.: 70% p.f.= > 229 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ¹H: 4,48 (1H, dd, J= 5,5 e 10,4; 3-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,94 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,85 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,87 (3H, s, 26-CH₃)*, 0,73 (3H, s, 27-CH₃)*, 0,84 (3H,s, 28-CH₃)*, 2,59 (1H, d, J= 4,9; 29-H⁺), 2,67 (1H, d, J= 4,9; 29-H), 1,63 (3H, s, 30-CH₃), 2,05 (3H, s, O-CO-CH₃).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ¹³C: 39,7 (C-1), 34,2 (C-2), 80,9 (C-3)*, 46,4 (C-4), 55,3 (C-5), 21,3 (C-6), 34,2 (C-7), 40,8 (C-8), 50,1 (C-9), 37,8 (C-10), 21,0 (C-11), 25,9 (C-12), 38,4 (C-13), 43,3 (C-14), 27,9 (C-15), 37,0 (C-16), 42,8 (C-17), 49,4 (C-18), 23,6 (C-19), 60,4 (C-20)*, 35,4 (C-21), 37,2 (C-22), 27,1 (C-23), 21,3 (C-24), 16,5 (C-25), 16,1 (C-26), 14,3 (C-27), 18,1 (C-28),

57,5 (C-29)*, 21,0 (C-30), 171,0 (O-CO-CH₃)*, 26,8 (O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 484 (M⁺, 20), 466 (5), 426 (44), 410 (24), 400 (14), 381 (10), 367 (13), 329 (5), 249 (14), 220 (12), 203 (33), 190 (54), 189 (100), 175 (24), 163 (30), 135 (54), 121 (70), 107 (64).

IV ν_{\max} (cm⁻¹): 2865 (C-H), 1730 (CO).

3.7- Síntese do diacetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo (137)

A uma solução de diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131) (100 mg, 0,107 mmol) em clorofórmio (5 ml), adicionou-se, gota-a-gota, uma outra solução de MCPBA (49 mg, 0,285 mmol) em clorofórmio (5 ml). Seguindo-se o método descrito em 3.5, obteve-se um sólido branco, de aspecto amorfo, o diacetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,040 g

Rend.: 70% p.f.= 203-209 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ¹H: 4,48 (1H, dd, J= 5,5 e 10,2; 3-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,96 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,84 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,88 (3H, s, 26-CH₃)*, 0,85 (3H, s, 27-CH₃)*, 3,68 (1H, d, J= 11,2; 28-H), 4,23 (1H, d, J= 11,2; 28-H), 2,59 (1H, d, J= 4,9; 29-H), 2,66 (1H, d, J= 4,9;

29H), 1,25 (3H, s, 30-CH₃), 2,05 (3H, s, O-CO-CH₃), 2,08 (3H, s, O-CO-CH₃).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

EM IE m/z (int. rel.): 542 (M⁺, 5), 524 (5), 511 (3), 498 (15), 482 (35), 468 (20), 424 (25), 411 (10), 249 (10), 215 (10), 201 (25), 189 (100), 175 (35), 161 (41), 135 (59), 119 (67), 107 (59).

IV ν_{\max} (cm⁻¹): 2865 (C-H), 1731 (CO).

3.8- Síntese do 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ol (144)

O acetato de 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ilo (133 e 134) (100 mg, 0,21 mmol) foi dissolvido em tetra-hidrofurano (THF) seco (6 ml). O pentineto foi gerado pela adição de hidreto de sódio a 90% (8,5 mg, 0,32 mmol) com 1-pentino (31 μ l, 0,32 mmol) em THF (1 ml) seco em banho de gelo e atmosfera de azoto. A mistura reaccional foi agitada por 1 hora, durante este período a côr da mistura reaccional alterou-se, passou de incolor para amarelo canário.

Após esse período de tempo, foi adicionada, gota-a-gota, uma solução dos epóxidos (133 e 134) em THF por meio de um funil de carga. Depois de completa a adição, a mistura reaccional, é aquecida a 40°C, com agitação magnética, por 24 horas.

No final desse período, a mistura reaccional foi adicionada a água destilada e gelo e deixada a agitar por alguns minutos. A seguir foi feita a extracção com acetato de etilo (3 X 20 ml), a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio

anidro e o acetato de etilo foi evaporado a pressão reduzida num evaporador rotativo. O resíduo obtido foi retomado numa pequena quantidade de clorofórmio e purificado por tlc preparativo, utilizando uma mistura de acetato de etilo: hexano (1:3) como sistema eluente. O produto obtido foi cristalizado em diclorometano e o mínimo possível de metanol, obtendo-se um sólido branco amorfo que se verificou ser o 5,6-epoxi-24-etilcolestano-3 β -ol (144).

Massa: 0,010 g

Rend.: 11% p.f.= 250-252 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ¹H: 3,90 e 3,69 (1H, m, 3-H), 2,90 e 3,06 (1H, d, J=3,3; 6-H), 0,61 e 0,64 (3H,s, 18-CH₃), 1,06 e 0,99 (3H, s, 19-CH₃).

3.9- Síntese do acetato de 29-hidroxilupano-3 β -ilo (145)

O acetato de 20,29-epoxilupano-3 β -ilo (136) (30 mg, 62 μ mol) foi dissolvido em tetra-hidrofurano (THF) (2 ml) seco. O pentineto foi gerado pela adição de hidreto de sódio a 90% (2,5 mg, 93 μ moles) com 1-pentino (9 μ l, 93 μ mol) em de THF (1 ml) seco, em banho de gelo e atmosfera de azoto.

Seguindo-se o método descrito em 3.8, obteve-se um sólido branco, identificado como acetato de 29-hidroxilupano-3 β -ilo (145).

Massa: 0,003 g

Rend. 10% p.f.= > 217 °C decompõem-se

RMN ^1H : 4,47 (1H, dd, $J= 5,8$ e $10,9$; 3-H), 2,16 (1H, sext., $J= 5,9$ e $11,7$; 19-H), 1,03 (3H, s, 23- CH_3), 0,94 (3H, s, 24- CH_3), 0,83 (3H, s, 25- CH_3), 0,85 (3H, s, 26- CH_3), 0,76 (3H, s, 27- CH_3), 0,84 (3H, s, 28- CH_3), 4,12 (2H, m, 29- CH_2), 1,25 (3H, s, 30- CH_3).

RMN ^{13}C : 80,9 (C-3), 65,0 (C-29), 171,0 (O-CO- CH_3).

EM IE m/z (int. rel.): 486 (M^+ , 15), 484 (40), 466 (10), 427 (95), 411 (70), 395 (15), 249 (40), 220 (10), 203 (30), 189 (100), 135 (55), 121 (90).

3.10- Síntese do lupano-3 β ,28,29-triol (146)

O acetato de 20,29-epoxilupano-3 β ,28-diilo (137) (30 mg, 62 μmoles) foi dissolvido em tetra-hidrofurano (THF) (2 ml) seco.

O pentineto foi gerado pela adição de hidreto de sódio a 90% (2,5 mg, 93 μmoles) com 1-pentino (9 μl , 93 μmoles) em THF (1 ml) seco, em banho de gelo e atmosfera de azoto.

Seguindo-se o método descrito em 3.8, obteve-se um sólido branco, o lupano-3 β ,28,29-triol (146).

Massa: 0,004 g

Rend. 14% p.f.= 227-229 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 3,19 (1H, dd, $J= 5,1$ e $10,2$; 3-H), 2,61 (1H, sext., $J= 5,9$ e $11,6$; 19-H),

1,02 (3H, s, 23-CH₃), 1,00 (3H, s, 24-CH₃), 0,82 (3H, s, 25-CH₃), 0,97 (3H, s, 26-CH₃), 0,76 (3H, s, 27-CH₃), 3,31 (1H, d, J= 11,1; 28-H), 3,78 (1H, d, J= 11,1; 28-H), 4,09 (2H, m, 29-CH₂), 1,40 (3H, s, 30-CH₃).

EM IE m/z (int. rel.): 458 (M⁺, 54), 444 (25), 426 (30), 369 (34), 247 (54), 207 (59), 189 (81), 135 (63), 81 (100).

3.11- Síntese do diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150)

A uma solução de diacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (131) (100 mg, 0,190 mmol) em EtOH (10 ml, 96%) adicionou-se uma outra solução de SeO₂ (32 mg, 0,285 mmol) em EtOH (10 ml). Refluxou-se a mistura resultante com agitação, em contacto com o ar, durante 48 horas. Após esse período, evaporou-se a mistura até à secura, retomou-se em água e extraiu-se com EtOAc (3 X 50 ml). A fase orgânica foi lavada (3 X 25 ml) com uma solução saturada NaHCO₃, e extraída com EtOAc (2x 50 ml). As diferentes fracções de acetato de etilo foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro, concentradas e levadas à secura com auxílio do evaporador rotativo.

O resíduo foi retomado em clorofórmio e purificado por tlc preparativo, utilizando como eluente uma mistura de EtOAc : hexano (1:3). O produto obtido foi cristalizado em diclorometano com o mínimo possível de metanol, tendo-se obtido um sólido na forma de agulhas amarela claras de diacetato 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,026 g

Rend. 25% p.f.= 238-242 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ¹H: 4,45 (1H, dd, J= 5,6 e 10,8; 3-H), 2,80 (1H, m, 19-H), 1,02 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,94 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,83 (6H, s, 25-CH₃ e 27-CH₃)*, 0,84 (3H, s, 26-CH₃)*, 3,86 (1H, d, J= 11,4; 28-H), 4,27 (1H, d, J= 11,4; 28-H), 5,94 (1H, s, 29-H), 6,29 (1H, s, 29-H'), 9,51 (1H, s, 30-COH), 2,04 (3H, s, O-CO-CH₃), 2,08 ((3H, s, O-CO-CH₃)).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ¹³C: 37,4 (C-1), 33,6 (C-2), 80,6 (C-3)*, 42,2 (C-4), 54,6 (C-5), 21,7 (C-6), 33,3 (C-7), 42,0 (C-8), 52,2 (C-9), 36,4 (C-10), 20,2 (C-11), 23,2 (C-12), 36,4 (C-13), 40,4 (C-14), 27,6 (C-15), 34,2 (C-16), 40,2 (C-17), 45,9 (C-18), 49,3 (C-19), 156,4 (C-20)*, 29,0 (C-21), 37,6 (C-22), 26,2 (C-23), 21,4 (C-24), 17,7 (C-25), 15,5 (C-26), 14,1 (C-27), 62,2 (C-28), 134,1 (C-29)*, 195,6 (C-30)*, 171,6 (-OCO-CH₃)*, 172,2 (-OCO-CH₃)*, 15,9 (-OCO-CH₃)*, 16,3 (-OCO-CH₃)*.

Os assinalamentos das ressonâncias de todos os carbonos foram efectuadas no espectro adquirido a - 50°C. Os carbonos C-20 e C-29, apenas aparecem a temperatura de - 50°C e 50°C, e quando efectuado o RMN de ¹³C no estado sólido.

* Com excepção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 540 (M⁺, 18), 480 (96), 465 (33), 452(5), 437 (19), 420 (10), 407 (18), 377 (5), 271 (5), 261 (10), 249 (8), 229 (5), 215 (19), 203 (32), 189 (100), 175 (19), 161 (22), 147 (25), 135 (46), 107 (35), 95 (44).

IV ν_{\max} (cm^{-1}): 2947 e 2869 (C-H), 1736 (CO de um grupo éster), 1691 (CO de um grupo aldeído).

3.12- Síntese do diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (151.a)

Uma solução de diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (50 mg, 0.093 mmol) em MeOH (10 ml) foi arrefecida num banho de gelo. Seguidamente, adicionou-se uma solução aquosa de hidrato de hidrazina (22 ml, 0,465 mmol, 90 %) e aqueceu-se a mistura reaccional lentamente até o refluxo, sob atmosfera de azoto, durante 8 horas. Após este período, evaporou-se o solvente à secura. Ao resíduo adicionou-se água acidificada a 1% com HCl e extraiu-se com EtOAc (3 X 50 ml). As diferentes proções de EtOAc foram secas através de sulfato de sódio anidro, concentradas até à secura com auxílio do evaporador rotativo.

O resíduo foi dissolvido em clorofórmio e purificado por tlc preparativo utilizando como eluente uma mistura de EtOAc : hexano (1: 3). O produto obtido foi cristalizado em diclorometano com o mínimo possível de metanol, obtendo-se um sólido amarelo claro de diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,010 g

Rend. 19% p.f.= 190 - 192 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,48 (1H, dd, J= 5,5 e 10,5; 3-H), 1,05 (3H, s, 23- CH_3)*, 0,98 (3H, s, 24-

CH₃)*, 0,84 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,87 (3H, s, 26-CH₃)*, 0,85 (3H, s, 27-CH₃)*, 3,72 (1H, d, J= 11,2; 28-H), 4,24 (1H, d, J= 11,2; 28-H), 2,05 (3H, s, O-CO-CH₃), 2,07 (3H, s, O-CO-CH₃), 6,87 (1H, d, J= 1,2 Hz, 1'-H), 3,86 (1H, d, J= 14,2 Hz, 3'-H), 3,47 (1H, m, 4'-H), 2,30 (2H, s, 5'-CH₂).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ¹³C: 37,8 (C-1), 34,1 (C-2), 80,9 (C-3)*, 42,6 (C-4), 55,3 (C-5), 23,6 (C-6), 34,1 (C-7), 42,6 (C-8), 50,1 (C-9), 37,0 (C-10), 21,1 (C-11), 25,3 (C-12), 37,8 (C-13), 40,8 (C-14), 27,9 (C-15), 34,4 (C-16), 40,8 (C-17), 46,4 (C-18), 16,4 (C-19)*, 29,8 (C-21), 38,3 (C-22), 27,0 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 14,7 (C-26), 14,7 (C-27), 62,8 (C-28)*, 160,0 (C-3')*, 20,8 (C-4')*, 171,1 (-O-CO-CH₃)*, 171,7 (-O-CO-CH₃)*, 16,0 (-O-CO-CH₃)*, 16,5 (-O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise do espectro DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 554 (M⁺, 7), 540 (7), 526 (10), 495 (5), 480 (24), 466 (58), 453 (13), 424 (18), 406 (5), 393 (8), 262 (10), 249 (15), 229 (10), 215 (20), 203 (49), 189 (100), 175 (34), 161 (36), 147 (41), 135 (41), 119 (44), 107 (51), 95 (59).

IV ν_{\max} (cm⁻¹): 2944 e 2871 (C-H), 1736 (CO de um grupo éster), 1664 (C=N do anel de pirazolina).

3.13- Síntese do diacetato de 20-(4'-1'-fenilsulfoxi- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.b)

A uma solução de diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (50

mg, 0,093 mmol) em MeOH (10 ml), adicionou-se lentamente sulfoxifenilhidrazina (80 mg, 0,465 mmol), previamente cristalizada. A mistura reaccional foi refluxada, sob atmosfera de azoto, durante 6 horas. Após esse período, evaporou-se o solvente até à secura. Ao resíduo adicionou-se água acidificada a 1% com HCl e extraiu-se com EtOAc (3 X 50 ml), todas as diferentes porções de EtOAc foram secas através de sulfato de sódio anidro, concentrada até à secura.

O resíduo foi dissolvido em EtOH (10 ml, 96%) tendo-se adicionado a esta solução acetato de sódio (7,6 mg, 0,093 mmol). A mistura foi refluxada durante 6 horas. Após este período, o resíduo foi retomado em clorofórmio, lavado com uma solução de HCl a 1%. A fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro, concentrada no evaporador rotativo e purificada por tlc. Após cristalização nas condições descritas em 3.8 e 3.2, respectivamente, obtiveram-se cristais de diacetato de 20-(4'-1'-fenilsulfoxi- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,013 g

Rend. 20% p.f.= 116 - 120 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,50 (1H, sext., J= 6,0; 2,7; 8,4 e 12,0; 3-H), 0,96 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,90 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,76 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,77 (6H, s, 26-CH₃ e 27-CH₃)*, 3,66 (1H, d, J= 11,0; 28-H), 4,26 (1H, d, J= 11,0; 28-H), 1,97 (3H, s, O-CO-CH₃), 2,00 (3H, s, O-CO-CH₃), 3,98 (1H, d, J= 14,2 Hz, 3'-H), 3,10 (1H, m, 4'-H), 2,24 (2H, d, J= 10, 5'-CH₂), 7,63 (3H, m, 3''-H, 4''-H e 5''-H), 7,92 (2H, m, 2''-H e 6''-H).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e

COSY.

RMN ^{13}C : 37,7 (C-1), 34,0 (C-2), 80,8 (C-3)*, 42,6 (C-4), 55,3 (C-5), 23,6 (C-6), 34,0 (C-7), 42,6 (C-8), 50,2 (C-9), 37,0 (C-10), 21,0 (C-11), 25,0 (C-12), 37,7 (C-13), 40,8 (C-14), 27,9 (C-15), 34,5 (C-16), 40,8 (C-17), 46,4 (C-18), 46,4 (C-19), 29,6 (C-21), 38,3 (C-22), 27,0 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 14,8 (C-26), 14,5 (C-27), 62,7 (C-28)*, 134,0 (C-3')*, 46,2 (C-4')*, 48,9 (C-5')*, 129,6 (C-1'')*, 129,4 (C-2'' e C-6''), 129,0 (C-3'' e C-5'')*, 128,5 (C-4'')*, 171,6 (-O-CO-CH₃)*, 171,0 (-O-CO-CH₃)*, 15,9 (-O-CO-CH₃)*, 16,1 (-O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise dos espectros DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 665 (2), 622 (9), 542 (10), 480 (25), 464 (10), 452 (12), 437 (8), 424 (10), 411 (7), 249 (10), 215 (15), 203 (28), 191 (36), 190 (56), 189 (100), 175 (25), 161 (30), 136 (36), 121 (56), 107 (49), 95 (54).

IV ν_{max} (cm⁻¹): 3394 (SO₂), 2940 e 2870 (C-H), 1742 (CO de um grupo éster), 1644 (C=N do anel da pirozolina).

3.14- Síntese do diacetato de 20-(4'-(1'-fenil)- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.c)

A uma solução de diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (50 mg, 0,093 mmol) em MeOH (10 ml), mergulhado num banho de gelo, adicionou-se fenil-hidrazina (46 μl , 0,465 mmol) e ácido *p*-toluenossulfónico (18 mg, 0,093 mmol). A mistura reaccional foi refluxada sob atmosfera de azoto, durante 6 horas. Após esse período, evaporou-se o solvente até à secura, e ao resíduo adicionou-se água acidificada a 1% com HCl e extraiu-se com EtOAc (3 X 50 ml). A

fracção de EtOAc foi seca através de sulfato de sódio anidro e concentrada até à secura.

Ao resíduo dissolvido em EtOH (10 ml, 96%) adicionou-se acetato de sódio (7,6 mg, 0,093 mmol), sendo a mistura resultante refluxada durante 6 horas. Após esse período, o resíduo foi retomado em clorofórmio e lavado com uma solução de HCl a 1%. A fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro, concentrada no evaporador rotativo e purificada por tlc.

Apenas se obteve o produto de partida (150) e produtos de polimerização da fenil-hidrazina.

3.15- Síntese do diacetato de 20-{4'-(1'-(2',4')-dinitrofenil)- Δ^2 -pirazolinil)-29,30-dinor-3 β ,28-diilo (151.d)

A uma solução de diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (50 mg, 0,093 mmol) em MeOH (10 ml), adicionou-se, lentamente, 2,4-dinitrofenil-hidrazina (92 mg, 0,465 mmol). A mistura reaccional foi refluxada, sob atmosfera de azoto durante 8 horas. Após esse período a solução foi levada à secura, ao resíduo adicionou-se água acidificada a 1% com HCl e extraiu-se com EtOAc (3 X 50 ml), as diferentes porções foram secas através de sulfato de sódio anidro e concentradas até à secura.

Ao resíduo dissolvido em EtOH (10 ml, 96%), adicionou-se acetato de sódio (7,6 mg, 0,093 mmol) e a mistura foi refluxada durante 8 horas. Após esse período, o resíduo foi retomado em clorofórmio; a fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl a 1%, seca através de sulfato de sódio anidro, concentrada no evaporador rotativo e purificada por tlc. Foram isoladas e identificadas dois

componentes, o produto de partida (150) e a hidrazona correspondente.

Em seguida seguem-se os dados correspondentes à hidrazona.

Hidrazona:

Massa: 0,010 g

Rend. 19% p.f.= Decompõem-se a 200 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ¹H: 4,47 (1H, dd, J= 5,2 e 10,7; 3-H), 2,45 (1H, sext., J= 6,0 e 11,1; 19-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,97 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,83 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,84 (6H, s, 26-CH₃ e 27-CH₃)*, 3,85 (1H, d, J= 10,8; 28-H), 4,25 (1H, d, J= 10,8; 28-H), 4,59 (1H, d, J= 2,1; 29'-H), 4,69 (1H, d, J= 2,1; 29-H), 4,21 (1H, m, 30-H), 2,04 (3H, s, -O-CO-CH₃), 2,07 (3H, s, -O-CO-CH₃), 7,00 (3H, m, 3''-H, 5''-H e 6''-H).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ¹³C: 37,7 (C-1), 34,5 (C-2), 80,9 (C-3)*, 42,6 (C-4), 55,3 (C-5), 23,6 (C-6), 34,1 (C-7), 42,6 (C-8), 50,2 (C-9), 37,0 (C-10), 21,0 (C-11), 25,1 (C-12), 37,8 (C-13), 40,8 (C-14), 27,9 (C-15), 30,3 (C-16), 46,2 (C-17), 48,7 (C-18), 68,1 (C-19)*, 150,1 (C-20)*, 29,7 (C-21), 38,3 (C-22), 28,9 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 14,7 (C-26), 14,0 (C-27), 62,8 (C-28)*, 109,9 (C-29)*, 167,8 (C-30)*, 128,3; 128,8; 130,9 e 132,4 (C-1''; C-2''; C-3''; C-4''; C-5'' e C-6'')*, 171,7 (-O-CO-CH₃)*, 171,0 (-O-CO-CH₃)*, 16,1 (-O-CO-CH₃)*, 16,4 (-O-CO-CH₃)*.

* Com excepção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise dos

espectros DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 570 (M^{+} , 1), 540 (2), 526 (3), 480 (13), 466 (30), 453 (21), 424 (10), 409 (21), 393 (40), 381 (13), 355 (21), 342 (8), 330 (21), 289 (15), 279 (36), 261 (30), 249 (45), 234 (40), 215 (52), 203 (37), 189 (85), 175 (21), 135 (45).

IV ν_{\max} (cm⁻¹): 2940 e 2870 (C-H), 1742 (CO de um grupo éster), 1644 (C=N da hidrazona).

3.16- Síntese do diacetato de 20-(4'- Δ^1 -pirazolina)-29-nor-30-oxolup-3 β ,28-diilo (152)

A uma solução de N-metil-N-nitro-4-toluenossulfonilamida (2,14 g, 10 mmol) em éter etílico (30 ml), adicionou-se, gota-a-gota, uma solução etanólica de KOH a 4% (10 ml). Agitou-se a solução por alguns minutos e destilou-se o diazometano gerado para uma solução de diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (50 mg, 0.093 mmol) em CHCl₃ (20 ml). Depois desta solução ficar com uma cor amarela intensa, devido ao diazometano em excesso, protegeu-se a solução do meio exterior e deixou-se a agitar durante 24 horas.

Após esse período, o solvente foi removido com recurso ao evaporador rotativo. Dissolveu-se o resíduo em CH₂Cl₂ e purificou-se por tlc preparativo, usando como eluente uma mistura de hexano: acetato de etilo (3:1). Após cristalização nas condições descritas em 3.8 e 3.2, respectivamente, obteve-se um sólido cristalino de diacetato de 20-(4'- Δ^1 -pirazolina)-29-nor-30-oxolup-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,014 g

Rend. 24% p.f.= 217-220 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,47 (1H, dd, J= 5,5 e 10,8; 3-H), 1,01 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,96 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,83 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,84 (6H, s, 26-CH₃ e 27-CH₃)*, 3,75 (1H, d, J= 11,5; 28-H), 4,15 (1H, d, J= 11,5; 28-H), 8,78 (1H, d, J= 0,93; 30-H), 2,04 (3H, s, -O-CO-CH₃), 2,06 (3H, s, -O-CO-CH₃), 4,26 (1H, d, J= 11,5 Hz, 3'β-H), 3,85 (1H, d, J= 11,5 Hz, 5'β-H), 2,27 (1H, d, J= 8,7 Hz, 3'α-H), 2,12 (1H, d, J= 8,7 Hz, 5'α-H).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ^{13}C : 37,7 (C-1), 34,0 (C-2), 80,8 (C-3)*, 42,9 (C-4), 55,2 (C-5), 23,6 (C-6), 33,4 (C-7), 42,9 (C-8), 49,9 (C-9), 37,0 (C-10), 21,3 (C-11), 25,5 (C-12), 37,7 (C-13), 40,8 (C-14), 27,9 (C-15), 35,1 (C-16), 40,8 (C-17), 46,9 (C-18), 46,4 (C-19), 29,7 (C-21), 38,3 (C-22), 27,0 (C-23), 21,0 (C-24), 18,1 (C-25), 15,9 (C-25), 14,8 (C-26), 62,5 (C-28)*, 201,7 (C-30)*, 171,0 (-O-CO-CH₃)*, 171,7 (-O-CO-CH₃)*, 16,1 (-O-CO-CH₃)*, 16,4 (-O-CO-CH₃)*, 23,6 (C-3')*, 36,8 (C-4')*, 35,1 (C-5')*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise dos espectros DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 582 (M⁺, 4), 568 (13), 550 (27), 536 (15), 508 (37), 494 (70), 481 (37), 465 (12), 451 (20), 435 (12), 421 (17), 286 (15), 272 (38), 257 (5), 243 (15), 229 (37), 217 (40), 203 (50), 190 (80), 189 (100), 175 (47), 159 (40), 135 (80), 95 (80).

IV ν_{max} (cm⁻¹): 2942 e 2871 (C-H), 1736 (CO de um grupo éster), 1708 (CO de um grupo aldeído) 1689 (N=N da Δ^1 -pirazolina).

3.17- Síntese do diacetato de 20-(4'-pirazolil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (156)

Aqueceu-se uma mistura de diacetato de 20-(4'- Δ^2 -pirazolina)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo (151.a) (20 mg, 36 mmol) e carbonato de sódio (10 mg, 108 mmol) em água destilada (20 ml), a 100 °C, sob agitação. Seguidamente, adicionou-se lentamente permanganato de pótassio (80 mg, 506 mmol) e refluxou-se durante aproximadamente 4 horas até a cor purpura desaparecer. Arrefeceu-se a mistura em banho de gelo e adicionou-se cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado (2 ml). Refluxou-se a mistura novamente durante 30 minutos; após esse período arrefeceu-se a mistura em banho de gelo e destruiu-se o excesso de dióxido de manganês por adição lenta de bissulfito de sódio até a solução ficar branca opaca. Em seguida extraiu-se esta solução com CHCl₃ (3 X 50 ml) e a fracção orgânica resultante foi seca através de sulfato de sódio anidro e concentrada no evaporador rotativo.

O resíduo obtido é dissolvido numa pequena quantidade de CHCl₃ e purificada em tlc preparativo usando como eluente uma mistura de hexano : acetato de etilo (3:1). Após cristalização nas condições descritas em 3.8 e 3.2, respectivamente, obteve-se por este método um sólido amarelo de diacetato de 20-(4'-pirazolil)-29,30-dinorlup-3 β ,28-diilo.

Massa: 0,004 g

Rend. 20% p.f. = 202 - 204 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,46 (1H, dd, $J= 5,6$ e $10,0$; 3-H), 2,99 (1H, sext., $J= 6,0$ e $11,1$; 19-H), 1,02 (3H, s, 23- CH_3)*, 0,97 (3H, s, 24- CH_3)*, 0,82 (3H, s, 25- CH_3)*, 0,84 (6H, s, 26- CH_3 e 27- CH_3)*, 3,83 (1H, d, $J= 11,4$; 28-H), 4,30 (1H, d, $J= 11,4$; 28-H), 2,04 (3H, s, -O-CO- CH_3), 2,08 (3H, s, -O-CO- CH_3), 5,36 (1H, s, 3'-H isómero β), 5,56 (1H, s, 3'-H isómero α), 5,45 (1H, s, 5'-H isómero β), 5,62 (1H, s, 5'-H isómero α), 7,85 (1H, s, 1'-H isómero β), 8,08 (1H, s, 1'-H isómero α).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ^{13}C : 37,7 (C-1), 34,0 (C-2), 80,7 (C-3)*, 42,6 (C-4), 55,2 (C-5), 23,6 (C-6), 34,0 (C-7), 42,5 (C-8), 49,7 (C-9), 36,9 (C-10), 21,0 (C-11), 24,0 (C-12), 24,0 (C-12), 37,7 (C-13), 40,8 (C-14), 27,8 (C-15), 34,0 (C-16), 40,8 (C-17), 46,4 (C-18), 46,3 (C-19), 29,6 (C-21), 38,3 (C-22), 27,9 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 15,9 (C-26), 14,1 (C-27), 62,7 (C-28)*, 148,8 (C-3')*, 113,0 (C-4')*, 134,7 (C-5')*, 171,0 (-O-CO- CH_3)*, 171,6 (-O-CO- CH_3)*, 16,1 (-O-CO- CH_3)*, 16,4 (-O-CO- CH_3)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise dos espectros DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 552 (M^+ , 2), 536 (3), 526 (5), 509 (4), 494 (20), 481 (10), 466 (60), 451 (15), 423 (10), 393 (5), 288 (15), 272 (8), 249 (10), 231 (8), 217 (20), 204 (21), 203 (45), 201 (31), 190 (60), 189 (100), 175 (35), 161 (35), 135 (64), 107 (57).

IV ν_{max} (cm^{-1}): 2940 e 2870 (C-H), 1742 (CO de um grupo éster), 1644 (C=N do anel da pirazol).

3.18- Síntese do triacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28,30-triol (158)

O diacetato de 30-hidroxi-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (157) (20 mg, 37 μ m) foi acetilado pelo método usado em 3.2, tendo-se obtido o triacetato de lup-20(29)-eno-3 β ,28,30-triol em forma de agulhas de cor amarela.

Massa: 0,019 g

Rend. 88% p.f. = 244 - 246 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 4,40 (1H, dd, J = 5,7 Hz e 10,8; 3-H), 2,40 (1H, m, 19-H), 1,03 (3H, s, 23-CH₃)*, 0,97 (3H, s, 24-CH₃)*, 0,83 (3H, s, 25-CH₃)*, 0,84 (6H, s, 26-CH₃ e 27-CH₃)*, 3,76 (1H, d, J = 11,2; 28-H), 4,17 (1H, d, J = 11,2; 28-H), 4,96 (1H, d, J = 3,2; 29-H'), 4,54 (1H, d, J = 3,2; 29-H), 2,04 (3H, s, -O-CO-CH₃), 2,08 (3H, s, -O-CO-CH₃), 2,10 (3H, s, -O-CO-CH₃).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídas tendo em conta os estudos de RMN da lupenona (117), principalmente os espectros HETCOR e COSY.

RMN ^{13}C : 38,3 (C-1), 34,3 (C-2), 80,9 (C-3)*, 46,3 (C-4), 55,3 (C-5), 23,6 (C-6), 34,1 (C-4), 55,3 (C-5), 23,6 (C-6), 34,1 (C-7), 40,9 (C-8), 50,2 (C-9), 37,8 (C-10), 20,8 (C-11), 27,0 (C-12), 37,4 (C-13), 42,6 (C-14), 29,4 (C-15), 38,3 (C-16), 46,3 (C-17), 49,4 (C-18), 49,4 (C-19), 148,7 (C-20)*, 26,5 (C-21), 22,7 (C-22), 27,9 (C-23), 21,3 (C-24), 18,1 (C-25), 16,1 (C-26), 14,7 (C-27), 62,4 (C-28)*, 110,7 (C-29)*, 66,0 (C-30)*, 170,8 (-O-CO-CH₃)*, 171,1 (-O-CO-CH₃)*, 171,7 (-O-CO-CH₃)*, 16,0 (-O-CO-CH₃)*, 16,5 (-O-CO-CH₃)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e por análise dos

espectros DEPT (90° e 135°).

EM IE m/z (int. rel.): 584 (M^+ , 4), 566 (6), 540 (4), 524 (17), 511 (4), 498 (8), 482 (8), 466 (11), 451 (9), 426 (13), 410 (11), 382 (6), 368 (11), 341 (6), 320 (48), 293 (38), 217 (29), 203 (38), 189 (86), 159 (38), 138 (86), 122 (99).

IV ν_{\max} (cm^{-1}): 2942 e 2871 (C-H), 1736 (CO de um grupo éster).

3.19- Síntese do 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (160)

O diacetato de 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diilo (150) (20 mg, 0,037 mmol) foram oxidados pelo método descrito em 3.17, obtendo-se um sólido que se verificou ser o 30-oxo-lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol (160) em vez do produto pretendido (159).

Massa: 0,002 g

Rend. 12% p.f. = 231 - 232 °C (cristalizado em clorofórmio-metanol)

RMN ^1H : 3,18 (1H, dd, $J= 5,3$ e $10,9$; 3-H), 2,75 (1H, m, 19-H), 1,00 (3H, s, 23- CH_3)*, 0,96 (3H, s, 24- CH_3)*, 0,80 (3H, s, 25- CH_3)*, 0,95 (3H, s, 26- CH_3)*, 0,76 (3H, s, 27- CH_3)*, 3,37 (1H, d, $J= 11,3$; 28-H), 3,80 (1H, d, $J= 11,3$; 28-H), 5,93 (1H, s, 29-H), 6,29 (1H, s, 29-H'), 9,50 (1H, s, 30-H).

* As ressonâncias dos grupos metilo foram atribuídos tendo em conta os estudos de RMN da lupenona, principalmente o HETCOR e o COSY.

RMN ^{13}C : 37,1 (C-1), 34,2 (C-2), 79,0 (C-3)*, 38,8 (C-4), 55,2 (C-5), 26,9 (C-6), 33,9 (C-7), 42,6 (C-8), 50,2 (C-9), 36,9 (C-10), 31,0 (C-11), 27,3 (C-12), 38,7 (C-13), 40,8 (C-14), 29,1 (C-15), 31,0 (C-16), 37,1 (C-17), 48,0 (C-18), 48,0 (C-19), Não aparece (C-20), 31,0 (C-21), 29,1 (C-22), 28,0 (C-23), 20,8 (C-24), 18,3 (C-25), 15,9 (C-26), 14,6 (C-27), 60,2 (C-28)*, Não aparece (C-29), 207,1 (C-30)*.

* Com exceção dos carbonos assinalados, todos os outros foram identificados com a ajuda dos estudos de RMN feitos na lupenona (117), e com a análise do DEPT desta amostra.

EMIE m/z (int. rel.): 456 (M^+ , 18), 439 (20), 425 (51), 407 (39), 369 (8), 271 (8), 247 (10), 219 (25), 218 (39), 207 (59), 191 (46), 190 (79), 189 (98), 172 (25), 161 (28), 149 (36), 135 (74).

IV ν_{max} (cm^{-1}): 2947 e 2871 (C-H), 1693 (CO de um aldeído), 3451 (-OH do grupo álcool).

3.20- Síntese do 24-etilcolesta-3,5-dieno (161) e 24-etilcolesta-2,5-dieno (162)

Adicionou-se β -sitosterol (121), (500 mg, 1,2 mmol) a uma solução metanólica de HCl a 10% (100 ml); a mistura reaccional foi refluxada durante 3 horas. Após esse período, arrefeceu-se a mistura reaccional, adicionou-se água e em seguida adicionou-se, gota-a-gota, uma solução aquosa de NaOH a 10% (até o meio ser aproximadamente neutro).

A mistura resultante foi concentrada no evaporador rotativo, até todo o metanol ter sido eliminado. Seguidamente, extraiu-se com clorofórmio (3 X 50 ml), a fase orgânica resultante foi seca através de sulfato de sódio anidro e depois concentrada sob vácuo. O resíduo obtido foi retomado em diclorometano e

purificado por tlc preparativo. Foram obtidas três fracções, os dois dienos (161), (162) e o β -sitosterol.

Rend. (161)= 25%

Rend. (162)= 25%

RMN ^1H isómero 161: 2,76 (1H, dt, J= 2,6 e 10,4; 3-H), 4,47 (1H, t, J= 3,0; 4-H), 5,36 (1H, s, 6-H), 0,67 (3H, s, 18-CH₃), 1,02 (3H, s, 19-CH₃).

RMN ^{13}C isómero 161: 39,6 (C-1), 33,9 (C-2), 123,5 (C-3), 137,2 (C-4), 140,7 (C-5), 122,4 (C-6), 33,7 (C-7), 56,6 (C-8), 56,0 (C-9), 42,3 (C-10), 20,9 (C-11), 26,0 (C-12), 36,3 (C-13), 39,0 (C-14), 28,2 (C-15), 36,9 (C-16), 50,0 (C-17), 12,0 (C-18), 11,8 (C-19), 38,8 (C-20), 21,1 (C-21), 31,8 (C-22), 30,2 (C-23), 32,4 (C-24), 28,2 (C-24₁), 20,5 (C-24₂), 29,1 (C-25), 20,2 (C-26), 19,8 (C-27).

RMN ^1H isómero 162: 5,51 (1H, dd, J= 1,4 e 10,1; 2-H), 5,17 (1H, dd, J= 2,6 e J= 10,1; 3-H), 5,36 (1H, s, 6-H), 0,67 (3H, s, 18-CH₃), 1,02 (3H, s, 19-CH₃).

RMN ^{13}C isómero 162: 39,7 (C-1), 127,5 (C-2), 131,6 (C-3), 54,9 (C-4), 140,7 (C-5), 122,4 (C-6), 33,7 (C-7), 56,6 (C-8), 56,1 (C-9), 42,3 (C-10), 20,9 (C-11), 26,0 (C-12), 36,4 (C-13), 39,1 (C-14), 28,2 (C-15), 36,9 (C-16), 50,0 (C-17), 12,0 (C-18), 11,8 (C-19), 38,8 (C-20), 20,9 (C-21), 31,8 (C-22), 30,3 (C-23), 32,4 (C-24), 28,2 (C-24₁), 20,5 (C-24₂), 29,1 (C-25), 20,2 (C-26), 19,8 (C-27).

3.21- Síntese do 1,2-epoxilimoneno (163) e 8,10-epoxilimoneno (164)

Arrefeceu-se uma solução de limoneno (10), (1 ml, 8.82 mmol) em

clorofórmio pa (5 ml) num banho de gelo, e adicionou-se lentamente, MCPBA (1,52 g, 8,82 mmol). A mistura foi deixada à agitar a temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto, durante uma hora. Após esse período, verteu-se a mistura reaccional sobre solução aquosa de NaOH a 2% (5 ml) e agitou-se durante uns minutos. Em seguida a extraiu-se com clorofórmio (3 X 25 ml); a fase orgânica obtida foi seca através de sulfato de sódio anidro e concentrada de seguida no evaporador rotativo. Dissolveu-se o óleo em 2 ml de diclorometano e 1 μ l desta solução foi utilizado para análise de GC-MS. O óleo obtido demonstrou ser uma mistura dos dois mono-epóxidos (163) e (164), os quais não foram separados. No entanto apresentam-se alguns dados de RMN de cada um dos isómeros.

Massa: 1,206 g

Rend. [(163) e (164)] = 90%

Por análise do cromatograma obtido:

1. Isómero (163) o tempo de retenção (tr) é 4,27 min. de intensidade relativa 40%.

2. Isómero (164) o tempo de retenção (tr) é 3,68 min. de intensidade relativa 100%.

GC-MS m/z - isómero 163- (int. rel.): 152 (M^{+} , 6), 137 (14), 121 (63), 105 (34), 94 (86), 70 (100), 67 (51), 53 (28), 40 (48).

GC-MS m/z - isómero 164- (int. rel.): 152 (M^{+} , 7), 137 (7), 108 (33), 94 (47), 70 (33), 67 (53), 55 (27), 40 (100).

RMN 1H isómero 163: 2,56 (1H, m, 2-H), , 1,69 (3H, s, 7- CH_3), 1,67 (3H, s, 9- CH_3), 4,66 (2H, d, $J=0,7$; 10-H).

RMN 1H isómero 164: 4,72 (1H, t, $J=1,4$; 2-H), 1,31 (3H, s, 7- CH_3), 1,32 (3H, s,

9-CH₃), 3,02 (2H, m, 10-H).

RMN ¹³C isómero 163: 69,9 (C-1), 58,0 (C-2), 34,7 (C-3), 38,3 (C-4), 26,7 (C-5), 31,0 (C-6), 24,3 (C-7), 148,8 (C-8), 18,7(C-9), 109,2 (C-10).

RMN ¹³C isómero 164: 133,1 (C-1), 127,7 (C-2), 34,0 (C-3), 37,4 (C-4), 26,2 (C-5), 33,6 (C-6), 20,9 (C-7), 71,3 (C-8), 21,1 (C-9), 73,9 (C-10).

PARTE IV
AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE FUNGICIDA

1- Introdução

Almagboul³ avaliou a actividade bactericida de 102 extractos de 15 plantas, em bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dos 102 extractos, 87 apresentam efeitos inibidores em um ou mais microrganismos. Sete das plantas analisadas apresentam-se como sendo mais activas, entre estas encontra-se uma espécie de Acácia, a *A. nilotica* Wild, a qual, na medicina tradicional no Sudão, é utilizada em estados febris comuns e no tratamento da meningite. O estudo fitoquímico preliminar dos extractos das sete plantas mais activas, demonstrou que estes eram ricos em taninos, flavonóides e triterpenos.

A identificação dos compostos responsáveis pela possível actividade biológica dos diferentes extractos de *A. dealbata* e também o estudo da actividade biológica de produtos de síntese obtidos a partir dos existentes nos extractos constitui um primeiro passo na tentativa de encontrar potenciais vias de valorização de produtos derivados da *A. dealbata*.

2- Avaliação da actividade fungicida

Os estudos de actividade fungicida foram realizadas contra o fungo fitopatogénico *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Art (Allen & Kúc., 1968).^{170,171} Foi usada a técnica de ensaio bio-autográfico¹³⁵ nos testes de avaliação de actividade fungicida, a qual é constituída por três etapas distintas:

a) Aplicação e eluição dos compostos a testar em placas de tlc preparativo;

b) Pulverização das placas com uma suspensão densa de esporos do fungo numa solução nutritiva à base de glucose que permite o desenvolvimento do fungo;

c) Incubação das placas durante dois a três dias em condições de alta humidade, à temperatura de 25 °C e às escuras;

A actividade fungicida de um dado composto é determinada pela existência de manchas brancas correspondentes a zonas de inibição do crescimento do fungo, rodeadas de um fundo pardo correspondente ao seu micélio.

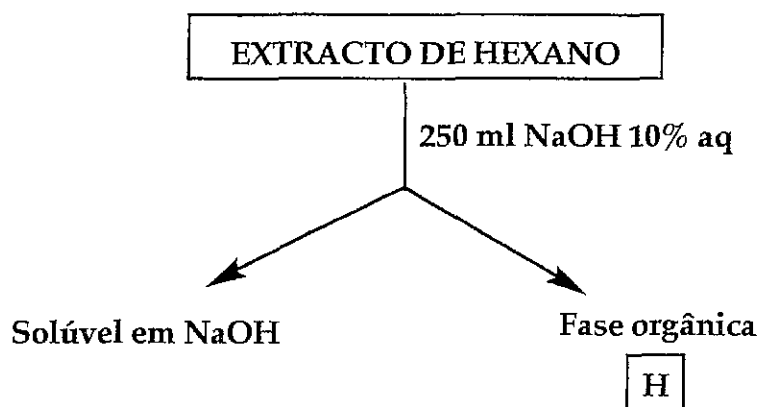
O ensaio bio-autográfico não permite uma medida absoluta da actividade fungicida, mas permite uma determinação rápida, reprodutível e comparativa da actividade fungicida dos compostos testados.

2.1- Avaliação da actividade fungicida de algumas fracções dos extractos de hexano e metanol das folhas, flores e sementes de *A. dealbata*.

As folhas, flores e sementes foram préviamente secas e moídas, efectuando-

se em seguida a extracção por soxhlet, usando como solventes extractores o hexano e depois o metanol. Foi utilizado um fraccionamento idêntico ao usado no isolamento dos compostos (Parte II, capítulo 2.6).

Os extractos de hexano das diferentes amostras foram sujeito inicialmente a um tratamento em meio alcalino (saponificação) de forma a eliminar fundamentalmente as clorofilas (Esquema 36):



Esquema 36

A fracção H foi concentrada sob vácuo e em seguida submetida a cromatografia em coluna usando como suporte alumina. Neste fraccionamento são separadas seis fracções usando como eluentes sucessivamente: hexano (1), tolueno (2), diclorometano (3), clorofórmio (4), acetato de etilo (5) e acetona (6).

Para facilitar a exposição dos resultados, vamos usar a seguinte simbologia:

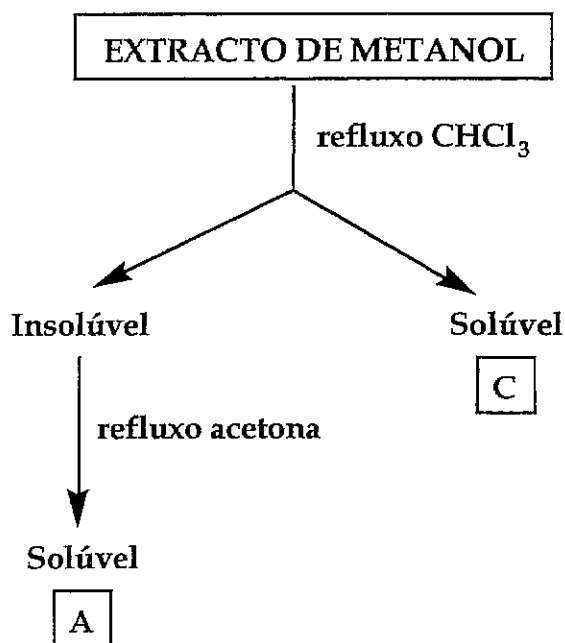
Hfolhas é a fase orgânica (H) do extracto de hexano das folhas;

Hflores é a fase orgânica (H) do extracto de hexano das flores;

Hsementes é a fase orgânica (H) do extracto de hexano das sementes;

Então, por exemplo, a fracção eluída com tolueno (2) da fase orgânica (H) do extracto de hexano das flores, vai designar-se Hflores2 e da mesma forma para as outras fracções.

Os extractos de metanol das folhas, flores e sementes foram levados à secura sob vazio, e sujeitos ao tratamento descrito no Esquema 37:



Esquema 37

Tanto a fracção A como a fracção C foram sujeitas a cromatografia em coluna, usando como suporte sílica gel 60 e como eluente os mesmos que foram descritos para o extracto de hexano. A terminologia utilizada é idêntica.

Como já dissemos atrás, os resultados obtidos dos ensaios bio-autográficos são comparativos, desta forma, os resultados dos testes serão apresentados usando a seguinte "escala":

n.d.- Actividade fungicida não detectável

+ - Pouca actividade fungicida

++ - Actividade fungicida moderada

+++ - Actividade fungicida grande

++++ - Actividade fungicida muito grande

Em seguida apresentam-se os dados obtidos.

FRACÇÕES	ACTIVIDADE FUNGICIDA
Hfolhas1	n.d.
Hfolhas2	n.d.
Hfolhas3	n.d.
Hfolhas4	n.d.
Hfolhas5	n.d.
Hfolhas6	n.d.
Afolhas1	n.d.
Afolhas2	+
Afolhas3	n.d.
Afolhas4	n.d.
Afolhas5	n.d.
Afolhas6	n.d.
Cfolhas1	n.d.
Cfolhas2	+++
Cfolhas3	+
Cfolhas4	n.d.
Cfolhas5	n.d.
Cfolhas6	n.d.

Tabela 35 - Actividade fungicida de diferentes fracções e extractos das folhas de *A. dealbata*.

FRACÇÕES	ACTIVIDADE FUNGICIDA
Hflores1	n.d.
Hflores2	n.d.
Hflores3	n.d.
Hflores4	n.d.
Hflores5	n.d.
Hflores6	n.d.
Aflores1	n.d.
Aflores2	n.d.
Aflores3	n.d.
Aflores4	n.d.
Aflores5	n.d.
Aflores6	n.d.
Cflores1	n.d.
Cflores2	n.d.
Cflores3	n.d.
Cflores4	n.d.
Cflores5	n.d.
Cflores6	n.d.

Tabela 36 - Actividade fungicida de diferentes fracções e extractos das flores de *A. dealbata*.

FRACÇÕES	ACTIVIDADE FUNGICIDA
Hsementes1	n.d.
Hsementes2	n.d.
Hsementes3	++
Hsementes4	n.d.
Hsementes5	n.d.
Hsementes6	n.d.
Asementes1	n.d.
Asementes2	n.d.
Asementes3	n.d.
Asementes4	n.d.
Asementes5	n.d.
Asementes6	n.d.
Csementes1	n.d.
Csementes2	n.d.
Csementes3	n.d.
Csementes4	n.d.
Csementes5	n.d.
Csementes6	n.d.

Tabela 37 - Actividade fungicida de diferentes fracções e extractos das sementes de *A. dealbata*.

2.2- Avaliação da actividade fungicida de alguns triterpenos isolados nos extractos de hexano e metanol das folhas, flores e sementes da *A. dealbata*.

Foram separados e identificados nos diferentes extractos da *A. dealbata* vários triterpenos, que foram sujeitos aos testes de actividade fungicida, obtendo-se os seguintes resultados (Tabela 38):

COMPOSTO	ACTIVIDADE FUNGICIDA
(68)	n.d.
(117)	n.d.
(118)	n.d.
(119)	n.d.
(121)	n.d.
(123)	n.d.
(125)	n.d.
(127)	n.d.

Tabela 38 - Actividade fungicida de alguns compostos puros isolados nos diferentes extractos *A. dealbata*.

2.3- Avaliação da actividade fungicida de alguns compostos de síntese

As transformações químicas efectuadas nos triterpenos isolados tiveram como objectivo, a obtenção de compostos com maior actividade biológica. Desta forma, como referido na parte III, introduziram-se alguns grupos nos compostos que por si só já apresentam alguma actividade. Alguns destes compostos foram sujeitos ao teste de actividade fungicida, a numeração utilizada para todos os compostos é a mesma que foi utilizada na parte III, os resultados foram sistematizados da seguinte forma (Tabela 39 e Figura 17):

COMPOSTO	ACTIVIDADE FUNGICIDA
(129)	n.d.
(130)	n.d.
(131)	+
(134 e 135)	n.d.
(136)	n.d.
(137)	+
(150)	++
(151.a)	n.d.
(151.b)	++
(151.d)	n.d.
(152)	+
(156)	++
(157)	n.d.
(158)	+
(160)	+
(163 e 164)	n.d.
(167 - 169)	n.d.

Tabela 39 - Actividade fungicida de alguns compostos sintetizados e descritos na parte III.

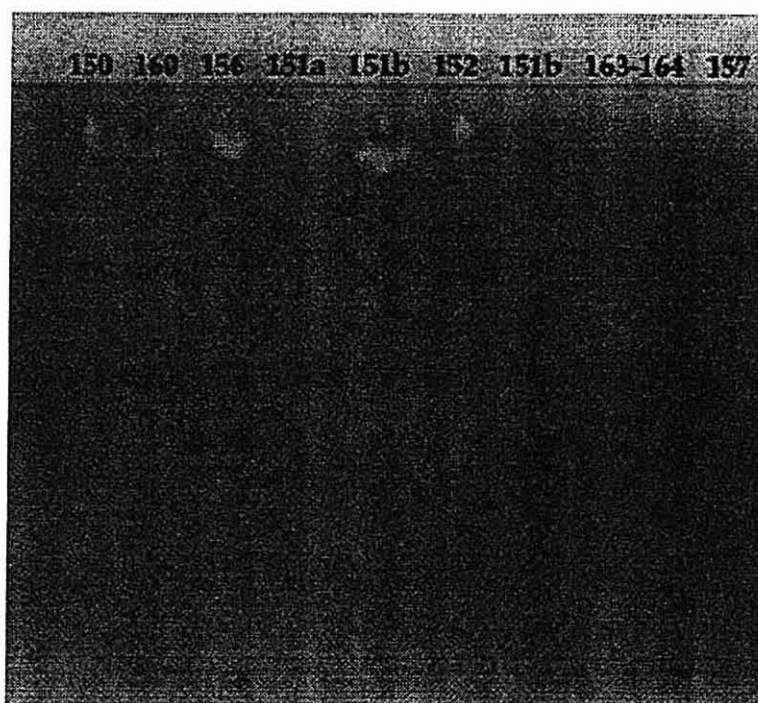


Figura 18- O tlc preparativo de alguns compostos obtidos por transformação de componentes de *A. dealbata* foi pulverizado com uma suspensão do esporo de *Cladosporium cucumerinum* e incubado

3- Conclusão

Verificou-se que as diferentes fracções dos extractos das folhas, flores e sementes de *A. dealbata* não apresentam de uma forma geral, actividade fungicida em relação ao fungo *Cladosporium cucumerinum*. As fracções que apresentam alguma actividade são:

- A fracção solúvel em clorofórmio do extracto de metanol das folhas e que foi eluída com tolueno, a qual apresenta actividade fungicida grande(Cfolhas2);

- A fracção solúvel em clorofórmio do extracto de metanol das folhas e que foi eluída com diclorometano, a qual apresenta pouca actividade fungicida(Cfolhas3);

- A fracção solúvel em acetona do extracto de metanol das folhas e que foi eluída com diclorometano, a qual apresenta pouca actividade fungicida(Afolhas2);

- A fracção eluída com diclorometano do extracto de hexano das sementes, a qual apresenta actividade fungicida moderada(Hsementes3);

De forma a poder relacionar a actividade fungicida das diferentes fracções dos extractos de *A. dealbata* com a sua composição em triterpenos e esteróides, foi feito o teste de Liberman Buchard nas mesmas condições do ensaio bio-autográfico (mesma quantidade de amostra e mesmo eluente).

Verificou-se que não existe uma correlação directa entre fracções ricas em triterpenos e esteróides e actividade fungicida. Contudo a fracção que apresenta uma maior actividade fungicida (Cfolhas2) revela também um teste de Liberman Buchard positivo.

Os triterpenos isolados dos vários extractos de *A. dealbata*, sujeitos a avaliação fungicida não demonstram actividade detectável. Finalmente, em relação aos compostos obtidos por transformação dos extraídos, verifica-se na sua maioria uma actividade fungicida considerável.

As transformações produzidas na betulina (68), são quase todas positivas, ou seja originam compostos com actividade fungicida maior. Deve realçar-se, principalmente, a introdução de um grupo aldeído, um anel de 1-sulfoxifenil- Δ^2 -pirazolina e um anel de pirazol.

Desta forma, podemos concluir que as transformações químicas efectuadas em alguns dos triterpenos isolados deram origem a compostos de valor acrescentado.

BIBLIOGRAFIA

- 1 L. F. Alves, A. Chimiak, M. J. Milwska e T. Nomura, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Product*, vol. 53, Springer-Verlag Wien, New York 1988.
- 2 J. A. Franco, *Nova Flora de Portugal*, vol. 1, Lisboa.
- 3 A. Z. Almagboul, A. K. Bashir, A. Karim e M. SaliH, *Fitoterapia*, 1988, **59**, 57.
- 4 J. B. Harborne e B. L. Turner, *Plant Chemosystematics*, Academic Press.
- 5 R. A. Flath, T. R. Mon, G. Lorenz, C. J. Whitten e J. W. Mackley, *J. Agric. Food Chem.*, 1983, **31**, 1167.
- 6 D. P. Anonis, Rego Park, *Perfumer & Flavorist* , 1988, **12**, 31.
- 7 C. S. Evans e E. A. Bell, *Phytochemistry* , 1979, **18**, 1807.
- 8 C. S. Evans, M. Y. Qureshi e E. A. Bell, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 565.
- 9 W. J. Baas, *Phytochemistry*, 1985, **24**, 1875.
- 10 J. S. Glasby, *Enciclopaedia of terpenoids*, John Wiley & Sons-1982.
- 11 A. S. R. Anjaneyulu, L. R. Row e A. Sree, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 463.1
- 12 R. A. Eade, F. J. Mc Donald e J. J. H. Simes, *Aust. J. Chem.*, 1973, **26**, 839.
- 13 P. G. forster, E. L. Ghisalberti e P. R. Jefferies, *Phytochemistry*, 1985, **24**, 2991.
- 14 M. D. Tindale e G. D. Roux, *Phytochemistry*, 1974, **13**, 829.
- 15 M. D. Tindale e G. D. Roux, *Phytochemistry*, 1969, **8**, 1713.
- 16 J. W. Clark-Lewis e L. J. Porter, *Aust. J. Chem.*, 1972, **25**, 1943.
- 17 F. Imperato, *Phytochemistry*, 1982, **21**, 480.
- 18 S.E. Drewes e A. H. Isley, *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 897.
- 19 S. R. Johns, J. A. Lamberton e A. A. Sioumis, *Aust. J. Chem.*, 1966, **19**, 1539.
- 20 P. L. Huang, P. L. Huang, P. Huang, H. I Huang e S. Lee-Huang, *Chemistry &*

- Industry*, 1992, 290.
- 21 J. Mann, *Chemistry & Industry*, 1993, 852.
- 22 M. Hamburger e K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 3864.
- 23 N. R. Farnsworth e R. W. Morris, *Am. J. Pharm.*, 1976, **148**, 46.
- 24 S. Hadlington, *Chemistry & Industry*, 1992, 10.
- 25 M. Suffeness e J. Douros, *J. Nat. Prod.*, 1982, **45**, 1.
- 26 J. M. Cassady, W. M. Baird e C. J. Chang, *J. Nat. Prod.*, 1990, **53**, 23.
- 27 D. Fengel e G. Wegener, Wood, *Chemistry Ultra-structure, reactions-* De Gruyter.
- 28 Paul J. Teisseire, *Chemistry of fragrant substances*, 1994 VCH Publishers, Inc.
- 29 J. M. Tedder, *Basic Organic Chemistry*, part 4 - John Wiley & Sons.
- 30 J. Bruneton, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier-New York 1993.
- 31 D. Fengel e G. Wegener, Wood, *Chemistry Ultrastructure, reaction -* De Gruyter.
- 32 "Eucalyptus Leaf oils, use, *Chemistry and Marketing*", Roland, 1991.
- 33 L. S. Campos, *Guia dos compostos orgânicos e bioquímicos*, Europress, Lisboa 1987.
- 34 J. H. Fletcher, O. C. Derner e R. B. Fox- *American Chemical Society*, Washington D. C. 1974.
- 35 K. B. G. Torssel, *Natural Product Chemistry- A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism-* John Wiley & Sons Limited - New York.
- 36 R. Croteau, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 929.
- 37 E. Sjostrom, *Wood Chemistry- Fundamentals and Applications-* 2º edição, Academic Press, INC., 1993.

- 38 A. Lutz, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1940, **22**, 497.
- 39 J. Audus e E. Cheetham, *Ann. Botanny* (N.S.), 1940, **4**, 465.
- 40 A. F. Barton, *Fuel*, 1989, **68**, 11.
- 41 E. Demole, P. Enggist e M. Stoll, *Helvetica Chimica Acta*, 1969, **52**, 24.
- 42 J. Basset, R. C. Denney, G. H. Jeffery e J. Mendhan, *Vogel- Análise Inorgânica Quantitativa- 4º edição*, Editora Guanabara, 1978.
- 43 O. A. Ohlweiler, *Química Análítica Quantitativa*, vol. 1, 3º edição, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.
- 44 M. Godefroot, P. Sandra e M. Verzele, *J. of chromatography*, 1981, **203**, 325.
- 45 G. Lognay, M. Marlier, M. Severin, E. Hamburge, V. Libon e E. Trevejo, *Flavour and Fragrance J.*, 1991, **6**, 87.
- 46 S. Likens e G. Nickerson, *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1964, 5.
- 47 M. Godefroot, P. Sandra e M. Verzele, *J. of chromatography*, 1981, **203**, 325.
- 48 Y. Ueyana, S. Hashimoto, H. Nii e K. Furukawa, *Flavour and Fragrance J.*, 1991, **6**, 87.
- 49 R. A. Flath, R. R. Forrey, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, **25**, 103.
- 50 G. Ruberto, D. Biondi e M. Piattelli, *Flavour and Fragrance J.*, 1991, **6**, 121.
- 51 P. Pellerin, *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 1986, **71**, 61.
- 52 E. Reverchor, *Flavour and Fragrance J.*, 1992, **7**, 227.
- 53 M. C. Brauw, *J. Chromatogr.*, 1979, **165**, 207.
- 54 A. Silvestre, *Caracterização e transformação de componentes não celulósicos de Eucalyptus globulus Labill. Seleccionados*, Universidade de Aveiro, 1994.
- 55 C. Merritt e Jr Charles, *Mass Spectrometry - Part A*, Vol 3, 69.
- 56 A. R. Katritzky, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry - The structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic Compounds- Chairman of*

- Editorial Board, Pergamon Press 1984, Vol.4, 705.
- 57 Ref. 56, Vol.5, 302.
- 58 Ref. 56, Vol.7, 119.
- 59 Eight peak index of mass spectra, segunda edição, vol. 1 e 2.
- 60 G. Rucker e M. Neugebauer, *Flavour and Fragrance J.* , 1990, 5, 1.
- 61 Z. Liangfeng, L. Yonghua, L. Baoling, L. Biyao e Z. Wenlian, *Aromatic Plants and Essential Constituents-* Hai Feng Publishing Co., 1995.
- 62 T. W. Goodwin, *Biochem. J.* , 1971, 123, 293.
- 63 D. Linkel e J. Russel, *Naval Stores, Production Chemistry - Editors* New York.
- 64 S. B. Machato, A. K. Nandy e G. Roy, *Phytochemistry*, 1992, 31, 2199.
- 65 G. Ourisson, *Pure & Appl. Chem.* , 1989, 61, 345.
- 66 C. A. M. Rohmer e G. Ourisson, *J. Am. Chem. Soc.* , 1976, 98, 1274.
- 67 D. H. R. Barton, T. R. Jarman, K. G. Watson e D. A. Widdowson, *J. Chem. Soc., Chem. Comum.* , 1974, 861.
- 68 International Union of Pure and Applied Chemistry- *Nomenclature of Organic Chemistry*, sections A, B, C, D, E, F e H, 1979, Pergamon Press, Oxford.
- 69 E. W. A. Hayek, U. Jordis, W. Moche e F. Sauter, *Phytochemistry*, 1989, 28, 2229.
- 70 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature,, *Nomenclature of Steroids*, *Pure & App. Chem.*, 1989, 61, 1784.
- 71 J. Ageta, H. Iwata e T. Natori, *Tetrahedron Lett.*, 1963, 1447.
- 72 R. F. Chandler e S. N. Hopper, *Phytochemistry*, 1979, 18, 711.
- 73 L. Ruzicka, Ed. Rey e A. C. Muhr, *Helv. Chim. Acta*, 1944, 27, 472.

- 74 H. Schulze e K. Pieroh, *Chem. Ber.*, 1922, **55B**, 2332.
- 75 L. Ruzicka e G. Rosenterantz, *Helv. Chim. Acta*, 1939, **22**, 778.
- 76 J. Barton e A. Holness, *J. Chem. Soc.*, 1952, 78.
- 77 A. B. Harref e J. P. Lavergene, *Bull. Soc. Chim. France*, 1985, **5**, 965.
- 78 N. Afza, A. Q. Khan, A. Malik e Y. Badar, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 1982.
- 79 S. Allard e G. Ourisson, *Tetrahedron*, 1957, **1**, 277.
- 80 G. P. Moss, *Pure & Appl. Chem.*, 1989, **61**, 1783
- 81 R. C. Heupel, *Phytochemistry*, 1985, **24**, 2929.
- 82 S. Matsunaga, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1984, 1128.
- 83 M. J. Kulshreshtha, D. K. Kulshreshtha e R. P. Rastogi, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 2369.
- 84 S. K. Agarwal e R. P. Rastogi, *Phytochemistry*, 1974, **13**, 2623.
- 85 M. Lewin e I. S. Goldstein, *Wood Structure and Composition*, 1991 Marcel Dekker, INC.
- 86 Chairman, *Comprehensive Organic Chemistry, The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*, Vol. 5, Pergamon Press.
- 87 U. Shmueli, S. Carmely, A. Groweiss e Y. Kashman, *Tetrahedron Letters*, 1981, **22**, 709.
- 88 S. Carmely, Y. Kashman, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 3517.
- 89 S. Carmely, Y. Loya, Y. Kashman, *Tetrahedron Letters*, 1983, **24**, 3673.
- 90 K. Shiojima, Y. Arai, K. Masuda, T. Kamoda e H. Ageta, *Tetrahedron Letters*, 1983, **24**, 5733.
- 91 R. Boar, L. A. Couchman, A. J. Jaques e M. J. Perkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2476.
- 92 E. E. van Tamelen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104** 6480.

- 93 S. Matsunaga, R. Morita, T. Ishida, M. Inone e A. Miyamae, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1984, 1128.
- 94 G. K. Rice, T. Yokoi, T. Hayashi, H. Susuki, K. H. Lee e A. T. McPhail, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1986, 1397.
- 95 N. Shoji, A. Umeyana, Z. Taira, T. Takemoto, K. Nomoto, K. Mizukawa e Y. Ohizumi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1983, 871.
- 96 S. Hasegawa, T. Miura, Y. Hirose e Y. I. Taka, *Chem. Letters*, 1985, 1589.
- 97 S. Hasegawa, T. Miura, N. Kaneko, Y. Hirose, Y. Iitaka, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 1775.
- 98 M. B. Ksebati, F. J. Schmitz e S. P. Gunasekera, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 3917.
- 99 D. W. Sopher e J. H. Utley, *J. H. P. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1984, 1361.
- 100 B. Balogh, D. M. Wilson, P. Christiansen e A. L. Burlingame, *Nature*, 1973, **242**, 603.
- 101 W. D. Nes e E. Heftmann, *J. Nat. Prod.*, 1981, **44**, 377.
- 102 C. M. Das, S. B. Mahato, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 1071.
- 103 E. W. H. Hyek, U. Jordis, W. Moche e F. Sauter, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 2229.
- 104 H. C. Ling, M. L. King, C. F. Chen, K. P. Hsu e M. H. Su, M. H. Lin, *Chung-hua 1 Hsueh Tsa Chih*, 1982, **29**, 308; *Chem Abs.*, 1982, **97**, 120120.
- 105 H. Otsuka, S. Fujioka, T. Komiya, M. Goto, Y. Hiramatsu e H. Fujimura, *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, **29**, 3099.
- 106 E. Wenkert, G. V. Baddeley, I. R. Burfitt e L. N. Moreno, *Org. Magn. Reson.*, 1978, **11**, 337.
- 107 W. Ammann, R. Richarz, T. Wirthlin e D. Wendisch, *Org. Magn. Reson.*, 1982, **20**, 261.
- 108 W. F. Reynolds, S. McLean e J. Poplawski, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 3419.
- 109 P. T. Holland e A. L. Wilkins, *Org. Mass Spect.*, 1979, **14**, 160.

- 110 J. Schmidt e S. Huneck, *Org. Mass Spect.*, 1979, **14**, 656.
- 111 Andrew e Derone, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Volume 6, 1987, Pergamon Press.
- 112 C. J. Pouchert, *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, 1975 Aldrich Chemical Company.
- 113 G. C. Levy, R. L. Licheter e G. L. Nelson, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2^o edição, 1980 John Wiley & Sons, Inc.
- 114 J. W. Blunt e J. B. Stothers, *Org. Magn. Reson.* 1977, **9**, 439.
- 115 K. Yano, T. Akihisa, R. Kawaguchi, T. Tamura e T. Matsumoto, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 1741.
- 116 Y. Takaishi, Y. Murakani, T. Okashi, K. Nakano, K. Murakani e T. Tomimatsu, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 2341.
- 117 W. E. Reynolds, J. F. Sawyer, R. G. Enriquez, L. I. Escobar, M. A. Chavez e J. N. Shoolery, *Can. J. Chem.*, 1985, **63**, 1048.
- 118 W. F. Reynolds, S. McLean e J. Poplawshi, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 3419.
- 119 M. J. Ferreira, A. M. Lobo e H. Wyler, *Fitoterapia*, 1993, **64**, 377.
- 120 J. S. Shannon e W. C. Taylor, *Aust. J. Chem.*, 1965, **18**, 226.
- 121 C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.*, 1992, **27**, 1341.
- 122 NaKamoto, *Spectroscopy and Structure of Metal Chelate Compounds* - John Wiley & Sons.
- 123 D. N. Kirk e W. Klyne, *J.C.S. Perkin I*, 1974, 1076.
- 124 F. Fernandez, D. N. Kirk e M. Scopes, *J.C.S. Perkin I*, 1974, 18.

- 125 P. Dampawan, C. Huntrakul, V. Reutrakul, C. L. Raston e A. H. White, *J. Sci. Soc. Thailand*, 3, **14**, 1977.
- 126 F. Pereira, F. Domingues e A. Silva, *Natural Product Letters*, 1996, **8**, 97.
- 127 P. Teresa, J. G. Urones, I. S. Marcos, P. Basabe, M. S. Quadrado e R. F. Moro, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1767.
- 128 V. Anjaneyulu, K. Ravi, K. H. Prasad e J. D. Connolly, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 1471.
- 129 D. N. Kirk, W. P. Mose e P. M. Scopes, *J.C.S. Chem. Comm.*, 1972, 81.
- 130 H. Eggert, C. VanAntwerp, N. S. Bhacca e C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 71.
- 131 A. S. R. Anjaneyulu, M. Bapuji, L. Ramachandra Row e A. Sree, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 463.
- 132 D. H. Williams e I. Fleming, *Spectroscopic methods in organic chemistry*, segunda edição, Mcgraw-Hill Book Company (UK) Limitada.
- 133 H. Wang e Y. Fujimoto, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 151.
- 134 B. L. Browning, *Methods of Wood Chemistry*, vol.1.
- 135 A. F. Costa, *Farmacognosia*, Fund. Calouste Gulbenkian, vol. 1.
- 136 B. Fried e J. Sherma, *Thin-Layer Chromatography- Tecniques and Aplications*, 3º edição- Marcel Dekker, INC., 1994.
- 137 W. Hui e M. Li, *Phytochemistry*, 1976, **15**, 561.
- 138 P. Monaco e L. Previtera, *J. Nat. Prod.*, 1984, **47**, 673.
- 139 W. Hui e M. Li, *Phytochemistry*, 1976, **15**, 561.
- 140 G. Kweifio-Okai e A. R. Carroll, *PhytoTherapy Research*, 1993, **7**, 213

- 141 Ref. 56, vol.7, 119.
- 142 B. M. Trost e D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 1380.
- 143 D. E. Champagne, O. Koul, M. B. Isman, G. G. Scudder e G. H. N. Towers, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 377
- 144 C. J. Turner e K. Nakanishi, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 2789
- 145 M. Renoud-Grappin, C. Vanucci e G. Lhommet, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3902
- 146 Ref. 56, vol. 5, 291.
- 147 J. H. Fletcher, O. C. Dermer e R. B. Fox, *Nomenclature of Organic Compounds- Principles and Practice-* American Chemical Society, Washington, D. C., 1974.
- 148 A. M. Lobo, *Biossíntese de Productos Naturais-Metabolismo Secundário*, Universidade Nova de Lisboa
- 149 F. A. Carey, *Organic Chemistry*, segunda edição, Mc. Graw Hill, Inc.
- 150 T. L. Gilchrist, *Heterocyclic Chemistry*, 2º edição, Longman Scientific & Technical, 1994 - New York.
- 151 R. Morrison e R. Boyd, *Química Orgânica*, 8º edição, Fundação Calouste Gulbenkian
- 152 H. O. Kalinowski, S. Berger e S. Braun, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons
- 153 Ref. 56, vol.7, 99.
- 154 A. F. Mateos e J. A. de la Fuente Blanco, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 1349.
- 155 M. Nakatani, R. C. Huang, H. Okamura, T. Iwagana e K. Tadera, *Chemistry letters*, 1995, 995.
- 156 L. K. T. Lam, Y. Li, S. Hasegawa, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 878.
- 157 D. Liotta, M. Saindaine e W. Ott, *Tetrahedron lett*, 1983, **24**, 2437

- 158 J. Hutton, B. Potts e P. Southern, *Synthetic Commun*, 1974, **9**, 789.
- 159 T. Mandai e K. Mori, *Chem. lett*, 1983, **12**, 1909
- 160 J. McMurry, *Organic Chemistry* - Brooks/Cole Publishing Company.
- 161 J. March, *Advanced Organic Chemistry, Reaction, Mechanisms, e Structure*, 4ª edição - John Wiley & Sons, 1992.
- 162 Ref. 56, vol. 5, 168.
- 163 J. Elguero e C. Marzin, *Bull. Soc. Chim. Fra.*, 1973, **12**, 3401
- 164 V. G. Ahmad, N. Noorwals, F. V. Mohammad, M. G. Shah e A. Parvez, *Planta Med.*, 1993, **59**, 366.
- 165 L. Carvalho, *Compostos Triterpénicos da Securinea tinctoria (L.) Rothm.(Eufhorbiaceae)*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro- Vila Real, 1991.
- 166 W. H. Hui e M. L. Sung, *Australian J. Chem*, 1968, **21**, 2137.
- 167 S. Matsunaga e M. Akagi, *Phytochemistry*, 1988, **27**, 535.
- 168 W. H. Hui e H. R. Arthur, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 1063.
- 169 N. Kumar e T. R. Seshadri, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 521.
- 170 M. E. M. Guedes, M. L. Morais e J. M. S. Martins, *Garcia de Orta, Sér. Est. Agron.*, 1982, **9**, 243.
- 171 M. E.M. Guedes, A. Silva e J. Cavaleiro, *Acta Horticulturae*, 1994, **381**, 561.