

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Henrique António Bilou Chaveiro

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO FITOQUÍMICO DA
TOLPIS BARBATA

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Jesús Miguel López Rodilla

" esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri "

Évora
2002

Aos meus Pais

À Alda

Ao Nuno

AGRADECIMENTOS

Assumindo o risco de incorrer nalgum esquecimento injusto, gostaria aqui agradecer muito especialmente:

Ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais, do Departamento de Química da Universidade de Évora, que me propôs o tema de investigação e depositou confiança em mim para me aceitar no seu grupo de trabalho, me orientar no estudo preliminar da composição química e da actividade biológica da *Tolpis barbata*, desejo expressar a minha gratidão pelos valiosos ensinamentos, estímulo, conselhos e amizade.

Ao professor Doutor Jesús Miguel López Rodilla, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, supervisor desta tese, quero manifestar o meu profundo agradecimento pelo empenho, amizade, ensinamentos e interesse demonstrado durante a sua valiosa orientação neste trabalho. Quero ainda agradecer ao Professor Doutor J. M. L. Rodilla a inestimável ajuda prestada na obtenção dos espectros de Massa e de RMN de próton e carbono e o auxílio na sua interpretação. À Universidade da Beira Interior cabe-me agradecer a facilidade concedida na utilização do equipamento necessário.

À Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo, do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, expresse o meu sincero agradecimento pela amizade, incentivo e valiosos ensinamentos em técnicas interpretativas de análise espectral e caracterização estrutural de compostos, tão importantes na concretização deste trabalho.

À Engenheira Marízia Dias Pereira, do Departamento de Planeamento Biofísico e Paisagístico da Universidade de Évora, agradeço a amizade e a inestimável colaboração prestada na recolha identificação e caracterização da planta *T. barbata*.

À Universidade de Évora, e em particular ao Departamento de Química, agradeço por ter sido admitido como aluno no curso de Mestrado. Agradeço ainda pelas facilidades concedidas nas diversas deslocações ao Departamento de Química da Universidade da Beira Interior e pela utilização dos espaços físicos e meios materiais disponibilizados, indispensáveis para a concretização deste trabalho experimental.

A todos os docentes do curso de Mestrado em Química Analítica da Universidade de Évora agradeço pelos conhecimentos que me transmitiram e que ajudaram a concretizar esta investigação.

Aos colegas do Grupo de Bioquímica da Universidade de Évora, Dr^a Fátima Candeias, Professora Doutora Teresa Tinoco, Professor Doutor Rui Ferreira e Dr^a Rosário Martins agradeço a forma como me acolheram no grupo de investigação e o apoio que me concederam na fase inicial deste trabalho, além da amizade e excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Ao Mestre António Teixeira do Departamento de Química da Universidade de Évora, agradeço pela amizade, incentivo e interesse repetidamente demonstrados e ainda pela ajuda na recolha de bibliografia e pelas sugestões muito oportunas que me facilitaram a escrita da tese. Ao Professor Doutor António Pereira do Departamento de Química da Universidade de Évora, agradeço a amizade e o interesse demonstrado, materializado na medição de pontos de fusão e poder rotatório específico, de vários compostos isolados e também pela comparação dos dados de GC do lupeol por co-injecção de um padrão, utilizando para o efeito, equipamento ao seu dispor na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Química da U. E. agradeço o estímulo o interesse e a confiança que manifestaram no meu trabalho, foi sem dúvida uma preciosa motivação para conseguir ultrapassar os momentos mais difíceis.

Quero deixar uma palavra de agradecimento às senhoras D. Maria Jesuína Mósca, D. Ana Maria Mendes, D. Anabela Cabeça, D. Maria Custódia Canivete e D. Maria Esperança Alves pelo seu contributo no apoio ao trabalho laboratorial.

A todos os colegas de curso de Mestrado quero agradecer pelo excelente relacionamento, troca de experiências, momentos de convívio e amizade que me dispensaram.

A todos os amigos e familiares agradeço pelo estímulo e apoio manifestados.

Aos meus pais e muito em especial à Alda e ao meu filho Nuno quero agradecer o enorme incentivo, a infinita paciência e a grande compreensão que sempre manifestaram ao longo de tantas ausências e falta de convívio familiar.

RESUMO

Esta dissertação descreve o estudo preliminar da composição química dos extractos de caules e folhas da *Tolpis barbata*, descreve também o isolamento e caracterização química de produtos naturais isolados da fracção de n-hexano.

Numa breve introdução são abordados resumidamente, aspectos gerais da biossíntese dos compostos terpénicos e é revista a actividade biológica de compostos triterpénicos pentacíclicos.

Nos extractos da fracção de n-hexano foram isolados e identificados vinte e oito compostos, destes, vinte e sete são compostos naturais da planta e um foi obtido por reacção de hidrólise alcalina. Todos os compostos identificados já eram anteriormente conhecidos mas foram isolados pela primeira vez em plantas do género *Tolpis* Adanson.

No extracto menos polar desta fracção foram identificados por *GC-MS* dezanove hidrocarbonetos de cadeia longa, sendo dois ramificados e três insaturados. Das outras fracções analisadas isolaram-se por métodos cromatográficos nove compostos de esqueleto triterpénico pentacíclico, dos quais sete são álcoois esterificados, nomeadamente, o palmitato de lupeol (72), o acetato de germanicol (111), o diéster 3,28-eritrodiool (112) e as misturas de palmitato de α -amirina (74) com palmitato de β -amirina (110) e de acetato de α -amirina (113) com acetato de β -amirina (114). Foram também isolados os álcoois lupeol (48) e germanicol (83), este, foi obtido por hidrólise do acetato de germanicol (111).

ABSTRACT

This thesis dissertation describes the preliminary study of the chemical composition of the stems and leaves extracts of *Tolpis barbata* and the isolation and chemical characterization of the natural products isolated from the n-hexane fraction.

The introduction begins with a brief overview of the terpenic compounds biosynthesis followed by a review of the published work on the biological activity of the triterpenic pentacyclic compounds.

From extracts of the n-hexane fraction, twenty eight compounds were isolated and identified, one of them obtained by basic hydrolysis. All the identified compounds were previously known, although herein described for the first time in *Tolpis Adanson* gender plants.

From the less polar sub-fractions of the n-hexane extract, were identified by *GC-MS*, nineteen long-chain hydrocarbons, including two branched and three unsaturated hydrocarbons.

From the other studied sub-fractions, nine compounds with a triterpenoid pentacyclic skeleton, were isolated by chromatographic methods. Seven esterified alcohols were obtained, namely, the lupeol palmitate (72), the germanicol acetate (111), the 3,28-erythrodiol diester (112) and two mixtures of α -amyirin acetate (113) and β -amyirin acetate (114) and α -amyirin palmitate (74) and β -amyirin palmitate (110). Two alcohols were also isolated, the lupeol (48) and the germanicol (83), this last one obtained from the germanicol acetate (111) hydrolysis.

ABREVIATURAS

IPP	pirofosfato de isopentenilo
MVA	ácido 3 <i>R</i> -(+)-mevalônico
acetil-CoA	acetil-coenzima A
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido-2'-fosfato
ATP	trifosfato de adenosina
PP	grupo pirofosfato
MVAPP	ácido 5-pirofosfatil-mevalônico
DMAPP	pirofosfato de 3,3-dimetilalilo
GPP	pirofosfato de geranilo
NPP	pirofosfato de nerilo
LPP	pirofosfato de linalilo
2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -FPP	pirofosfato de 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesilo
2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> -FPP	pirofosfato de 2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> -farnesilo
GGPP	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -geranilgeranilo
GLPP	pirofosfato de geranil-linalilo
<i>RMN</i> ¹ <i>H</i>	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
<i>RMN</i> ¹³ <i>C</i>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>GC-MS</i>	Cromatografia Gasosa em associação com Espectrometria de Massa
<i>IV</i>	Espectroscopia de Infra-vermelho
<i>UV-Vis</i>	Espectroscopia de UV-visível
<i>p.f.</i>	ponto de fusão
$[\alpha]_D^{25}$	poder rotatório específico
<i>m/z</i>	massa/carga dos iões
δ	desvio químico expresso em ppm

ppm	partes por milhão
<i>dt</i>	duplo tripleto
<i>J</i>	constante de acoplamento expresso em Hz
Hz	hertz
<i>m</i>	multipleteo
<i>DEPT</i>	<i>“distortioneless enhancement by polarization transfer”</i>
<i>M⁺</i>	ião molecular
<i>dd</i>	duplo dupleteo
<i>t</i>	tripleto
<i>s</i>	singuleto
<i>d</i>	dubleteo
<i>CCFP</i>	cromatografia em camada fina preparativa
<i>GC</i>	cromatografia gasosa (cromatografia gás-líquido)
<i>CC</i>	cromatografia em coluna
<i>CCF</i>	cromatografia em camada fina
<i>EIMS</i>	Espectrometria de massa de impacto electrónico

ÍNDICE

Índice de esquemas	xiii
Índice de figuras	xiii
Índice de quadros	xv
Índice de tabelas	xvi
Capítulo I – Introdução.....	1
I. Introdução.....	2
I.1. Os produtos naturais das plantas.....	4
I.2. Os terpenóides das plantas.....	7
I.2.1. Principais vias da biossíntese de terpenóides	8
I.2.1.1. Biossíntese do ácido mevalónico e do pirofosfato de isopentenilo pela via do acetato/mevalonato	8
I.2.1.2. Os monoterpenóides.....	12
I.2.1.3. Os sesquiterpenóides	14
I.2.1.4. Os diterpenóides	16
I.2.1.4.1. Biossíntese dos diterpenóides	16
I.2.1.5. Triterpenóides e esteróides	18
I.2.1.5.1. Biossíntese de triterpenos pentacíclicos.....	19
I.2.1.6. Biossíntese de tetraterpenos.....	23
I.2.2. Actividade biológica de triterpenos pentacíclicos.....	25
I.3. O estudo fitoquímico da planta <i>Tolpis barbata</i>	32
Capítulo II - Selecção e Caracterização da Planta	34
II. Caracterização da Planta	35
II.1. Caracterização da planta - <i>Tolpis barbata</i> (L.) Gaertner	36
II.1.1. Taxonomia.....	36
II.1.2. Nome científico	36
II.1.3. Sinónimos.....	36
II.1.4. Nomes vulgares	37
II.1.5. Descrição taxonómica	37
II.1.6. Época de floração.....	38
II.1.7. Fisionomia.....	38
II.1.8. Biologia.....	38
II.1.9. Distribuição fitogeográfica.....	38

II.1.10. Ecologia.....	38
II.1.11. Biogeografia.....	39
CAPÍTULO III – METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
III. Metodologia, Resultados e Discussão.....	41
III.1. Metodologia geral.....	41
III.2. Obtenção dos extractos da <i>T. barbata</i> por digestão a de 35° C.....	42
III. 2.1. Análise da massa dos extractos da planta.....	44
III.3. Estudo preliminar da composição química da <i>T. barbata</i>	46
III.3.1. Principais grupos de compostos da <i>T. barbata</i>	47
III.4. Isolamento de produtos naturais da fracção de n-hexano da <i>T. barbata</i>	49
III.4.1. Extracção com aparelho de Soxhlet.....	49
Lixiviação em soxhlet	50
III.4.2. Fraccionamento do extracto de n-hexano – Cromatografia A.....	51
III.5. Separação e identificação dos hidrocarbonetos da <i>T. barbata</i>	51
III.5.1. Identificação de hidrocarbonetos da <i>T. barbata</i> por GC-MS.....	52
III.5.1. Identificação de hidrocarbonetos da <i>T. barbata</i> por GC-MS.....	53
III.5.2. Isolamento e caracterização estrutural de uma mistura de palmitatos de α + β -amirina...63	
III.5.3. Isolamento e caracterização estrutural do lupeol.....	65
III.5.4. Isolamento e caracterização estrutural do palmitato de lupeol	73
III.5.4.1. Identificação do grupo éster do composto (72).....	80
III.5.4.2. Análise parcial das fracções A ₃₁₋₃₇ e A ₃₈₋₄₂ do extracto de n-hexano da <i>T. barbata</i>	84
III.5.5. Isolamento e caracterização estrutural do acetato de germanicol.....	84
III.5.5.1. Caracterização estrutural do germanicol (83).....	92
III.5.6. Isolamento e caracterização estrutural do composto (112).....	98
III.5.7. Isolamento e caracterização estrutural de uma mistura de acetatos de α + β -amirina..	106
3.6. Conclusões.....	112
CAPITULO IV – PARTE EXPERIMENTAL	115
IV. Parte Experimental.....	116
IV.1. Identificação, recolha e conservação da <i>T. barbata</i>	116
IV.2. Preparação da planta para a análise.....	116
IV. 2. 1. Pesagem dos lotes de plantas.....	117
IV.2. Estudo preliminar dos principais grupos de compostos da <i>Tolpis barbata</i>	118
IV.2.1. Metodologia seguida no estudo preliminar da composição química da <i>T. barbata</i>	118
IV.2.2. Extracção pelo processo de digestão à temperatura de 35° C.....	119

IV.2.2.1. Extracções efectuadas pelo processo de <i>digestão</i>	119
IV.2.3. Testes utilizados na caracterização química preliminar da <i>T. barbata</i>	120
IV.3. Instrumentação e técnicas analíticas mais utilizadas	121
IV.3.1. Determinação dos pontos de fusão.....	121
IV.3.2. Determinação da rotação óptica específica.....	121
IV.3.3. Espectros de infravermelho	121
IV.3.4. Espectros de ultravioleta-visível	121
IV.3.5. Espectros de ressonância magnética nuclear	122
IV.3.6. Espectrometria de massa	122
IV.3.7. Cromatografia gás líquido.....	122
IV.3.8. Técnicas Cromatográficas Gerais:	123
IV.3.8.1. Cromatografia em camada fina analítica.....	123
IV.3.8.2. Cromatografia em camada fina preparativa	123
IV.3.8.3. Cromatografia em coluna	123
IV.3.8.4. Cromatografias “flash”	124
IV.4. Reacções gerais utilizadas:.....	124
IV.4.1. Reacção de saponificação.....	124
IV.4.2. Preparação do diazometano.....	125
IV.4.3. Metilação com diazometano	125
IV.5. Estudo da composição química do extracto de n-hexano da <i>T. barbata</i>	126
IV.5.1. Extracção por <i>lixiviação</i> com extractor de Soxhlet.....	126
IV.5.2. Fraccionamento do extracto de n-hexano da <i>T. barbata</i>	126
IV.5.3. Isolamento dos compostos das fracções 1 a 15 da <i>cromatografia A</i>	128
IV.5.4. Isolamento dos compostos das fracções 31 a 37 da <i>cromatografia A</i>	128
IV.5.4.1. Isolamento de compostos das fracções 11 a 21 da <i>cromatografia B</i>	128
IV.5.4.2. Purificação do composto (111) isolado na fracção 52 da <i>cromatografia B</i>	129
IV.5.5. Isolamento dos compostos das fracções 38 a 42 da <i>cromatografia A</i>	129
IV.5.5.1. Isolamento de compostos resultantes das reacções de saponificação.....	130
IV.5.5.2. Separação da mistura (113; 114) a partir das fracções 48 a 64 da <i>cromatografia C</i>	132
IV.5.5.3. Isolamento do composto (48) a partir das fracções 144 a 167 da <i>cromatografia C</i>	133
IV.5.6. Isolamento dos compostos das fracções 43 a 50 da <i>cromatografia A</i>	134
IV.5.6.1. Isolamento do composto (112) a partir das fracções 27 a 33 da <i>cromatografia D</i>	135

IV.6. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados.....	136
IV.6.1. Hidrocarbonetos.....	136
IV.6.1.1. 5-Metil-undecano (91).....	136
IV.6.1.2. Tridecano (92).....	137
IV.6.1.3. Dodec-2-eno (93).....	137
IV.6.1.4. Tetradecano (94).....	137
IV.6.1.5. 2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano (95).....	138
IV.6.1.6. Hexadec-2-eno (96).....	138
IV.6.1.7. Hexadecano (97).....	138
IV.6.1.8. Octadec-5-eno (98).....	139
IV.6.1.9. Octadecano (99).....	139
IV.6.1.10. Nonadecano (100).....	139
IV.6.1.11. Eicosano (101).....	140
IV.6.1.12. Uneicosano (102).....	140
IV.6.1.13. Docosano (103).....	140
IV.6.1.14. Tricosano (104).....	141
IV.6.1.15. Tetracosano (105).....	141
IV.6.1.16. Pentacosano (106).....	141
IV.6.1.17. Heptacosano (107).....	142
IV.6.1.18. Nonacosano (108).....	142
IV.6.1.19. Untriacontano (109).....	142
IV.6.2. Triterpenos pentacíclicos.....	143
IV.6.2.1. Mistura: palmitato de α + β -amirina (74;110).....	143
IV.6.2.2. Palmitato de lupeol (72).....	144
IV.6.2.2.1 Trimeristina (72a).....	145
IV.6.2.3. Acetato de germanicol (111).....	145
IV.6.2.4. Diéster de 3,28-eritrodio (112).....	146
IV.6.2.5. Mistura de acetato de α + β -amirina (113;114).....	147
IV.6.2.6. Lupeol (48).....	148
IV.6.2.7. Germanicol (83).....	149
BIBLIOGRAFIA	150

Índice de esquemas

Introdução

Esquema I. 1.: Mecanismos da via metabólica do pirofosfato de isopentenilo.....	9
Esquema I. 2.: Via biossintética do acetato/mevalonato na formação do pirofosfato de isopentenilo.....	10
Esquema I. 3.: Precursores das principais subclasses dos terpenóides das plantas.....	11
Esquema I. 4.: Formação do pirofosfato de geranilo e do pirofosfato de nerilo.....	12
Esquema I. 5.: Monoterpenos cíclicos derivados do catião geranilo e monoterpenos acíclicos obtidos a partir do sistema de isomerizações ($GPP \rightleftharpoons LPP \rightleftharpoons NPP$).....	13
Esquema I. 6.: Mecanismos da biossíntese dos precursores dos mono- sesqui- e diterterpenóides.....	14
Esquema I. 7.: Mecanismo de biossíntese de sesquiterpenos derivados do pirofosfato de nerolidilo. ...	15
Esquema I. 8.: Mecanismo de biossíntese dos diterpenóides fitol, ácido pimárico, caureno e ácido giberélico.....	17
Esquema I. 9.: Mecanismo de biossíntese do esqualeno.	20
Esquema I. 10.: Mecanismo da ciclização do composto (3S)-2,3-epóxi-esqualeno com formação de lupeol.....	22
Esquema I. 11.: Mecanismo da biossíntese da β -amirina e da α -amirina.....	23
Esquema I. 12 – Mecanismo da biossíntese do fitoeno.	24

Metodologia, Resultados e Discussão

Esquema III. 1.: Interpretação do espectro de massa do composto hexadec-2-eno (96).....	54
Esquema III.2.: Interpretação do espectro de massa do composto hexadecano (97).....	56
Esquema III.3.: Interpretação do espectro de massa do composto octadec-5-eno (98).	59
Esquema III. 4.: Representação das principais fragmentações do espectro de massa do lupeol.	72
Esquema III. 5.: Representação das principais fragmentações resultantes da Espectrometria de Massa de Impacto Electrónico (MS-EI) do composto acetato de germanicol.....	91

Índice de figuras

Seleccção e Caracterização da Planta

Figura II. 1.: Ilustração da planta <i>Tolpis barbata</i>	35
Figura II. 2.: Ilustração de inflorescências da <i>Tolpis barbata</i>	37

Metodologia, Resultados e Discussão

Figura III 1.: Representação dos compostos (91) a (94) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).....	55
Figura III 2.: Representação dos compostos (95) a (98) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).....	57
Figura III 3.: Representação dos compostos (99) a (102) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).....	58
Figura III 4.: Representação dos compostos (103) a (106) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).....	60
Figura III 5.: Representação dos compostos (107) a (108) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).....	61
Figura III 6.: Espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (48).....	65
Figura III 7.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (48) entre δ 4,40 a 4,80 ppm.....	66
Figura III 8.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (48) entre δ 2,20 e δ 2,60 ppm e grupo isopropenilo ligado a um anel pentacíclico de um esqueleto ursano.....	66
Figura III 9.: Esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo lupano.....	67
Figura III 10.: Espectros de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> - <i>DEPT</i> do composto (48);.....	68
Figura III 11.: <i>DEPT</i> da região alifática dos espectros de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> do composto (48).....	69
Figura III 12.: Espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (72).....	74
Figura III 13.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (72) entre δ 4,36 e δ 4,76 ppm.....	74
Figura III 14.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (72) entre δ 2,12 e δ 2,56 ppm.....	75
Figura III 15.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (72) entre δ 0,70 e δ 1,70 ppm.....	76
Figura III 16.: Espectros de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> - <i>DEPT</i> do composto (72);.....	77
Figura III 17.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> da trimeristina entre δ 0,60 a δ 2,60 ppm.....	80
Figura III 18.: Espectro de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> - <i>DEPT</i> da trimeristina; <i>em baixo</i> , desacoplamento protónico de banda cheia; <i>em cima</i> , espectro <i>DEPT</i> com pulso a 135°.....	81
Figura III 19.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> da trimeristina na zona entre δ 35 a δ 13 ppm.....	81
Figura III 20.: Espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (111).....	85
Figura III 21.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (111) entre δ 4,30 e δ 4,90 ppm.....	86
Figura III 22.: Esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo olean-18-eno.....	86
Figura III 23.: Espectros de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> - <i>DEPT</i> do composto (111);.....	88
Figura III 24.: Espectro de <i>RMN</i> ¹³ <i>C</i> - <i>DEPT</i> da região alifática do composto (111).	89
Figura III 25.: Espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (83).....	93
Figura III 26.: Ampliação do espectro de <i>RMN</i> ¹ <i>H</i> do composto (83) na zona entre δ 2,10 e δ 3,40 ppm.....	93

Figura III 27.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (83);.....	94
Figura III 28.: Espectro de RMN^1H do composto (112).....	98
Figura III 29.: Ampliação do espectro de RMN^1H do composto (112) na zona entre δ 3,50 e δ 5,40 ppm.....	99
Figura III 30.: Ampliação do espectro de RMN^1H do composto (112) na zona entre δ 0,65 e δ 2,35 ppm.....	100
Figura III 31.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (112);.....	101
Figura III 32.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da região alifática do composto (112);	102
Figura III 33.: Ampliação do espectro de $RMN^{13}C$ do composto (112) na zona entre δ 27,4 e δ 30,4 ppm.....	102
Figura III 34.: Espectro de RMN^1H da mistura dos compostos (113;114).....	107
Figura III 35.: Ampliação do espectro de RMN^1H da mistura (113;114) na zona entre δ 0,60 e δ 2,20 ppm.....	107
Figura III 36.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT da mistura dos composto (113;114);	108
Figura III 37.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da região alifática da mistura dos composto (113;114);	109

Índice de quadros

Metodologia, Resultados e Discussão

Quadro III. 1.: Percentagens dos extractos nas amostras D ₂ (caules) e D ₃ (folhas) da <i>T. barbata</i>	45
Quadro III. 2.: Testes efectuados para a caracterização química geral da <i>T. barbata</i>	46
Quadro III. 3.: Resultados das análises da caracterização química da <i>T. barbata</i>	47
Quadro III. 4.: Hidrocarbonetos da <i>T. barbata</i> identificados por análise de GC - MS.....	62

Parte experimental

Quadro IV. 1.: Peso dos lotes de plantas da <i>T. Barbata</i> antes e depois da secagem.....	117
Quadro IV. 2.: Peso de órgãos da planta e sua percentagem relativa ao peso total de planta seca....	118
Quadro IV. 3.: Peso dos extractos dos lotes D ₂ e D ₃ da <i>T. barbata</i> obtidos por digestão a 35° C	119
Quadro IV. 4.: Testes efectuados no estudo preliminar da caracterização química da <i>T. barbata</i>	120
Quadro IV. 5.: Peso do extracto de n-hexano da <i>T. barbata</i> obtido com extractor de Soxhlet	126
Quadro IV. 6.: Dados da cromatografia A	127
Quadro IV. 7.: Dados da cromatografia B	128
Quadro IV. 8.: Dados da cromatografia B ₁	129

Quadro IV. 9.: Dados da <i>cromatografia C</i>	130
Quadro IV. 10.: Dados da <i>cromatografia C₁</i>	131
Quadro IV. 11.: Dados da <i>cromatografia C₂</i>	131
Quadro IV. 12.: Dados da <i>cromatografia C₃</i>	132
Quadro IV. 13.: Dados da <i>cromatografia C₄</i>	133
Quadro IV. 14.: Dados da <i>cromatografia C₅</i>	133
Quadro IV. 15.: Dados da <i>cromatografia C₆</i>	134
Quadro IV. 16.: Dados da <i>cromatografia D</i>	134
Quadro IV. 17.: Dados da <i>cromatografia D₂</i>	135

Índice de tabelas

Metodologia, Resultados e Discussão

Tabela III. 1.: Percentagem de massa do extracto de n-hexano da <i>T. barbata</i> - extracção com soxhlet	50
Tabela III. 2.: Relação dos tipos de carbono do composto (48) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	70
Tabela III. 3.: Relação dos tipos de carbono do composto (72) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	78
Tabela III.4.: Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (48) e (72) e comparação com os valores da literatura.	79
Tabela III. 5.: Atribuição dos desvios químicos de carbono do grupo éster do composto (72) por comparação com padrões de ácido palmítico, trimeristina e valores da literatura.....	82
Tabela III. 6.: Relação dos tipos de carbono do composto (111) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	87
Tabela III. 7.: Relação dos tipos de carbono do composto (83) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	95
Tabela III. 8.:Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (111) e (83) e comparação com os valores da literatura.	97
Tabela III. 9.: Relação dos tipos de carbono do composto (112) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	103
Tabela III. 10.: Atribuição dos desvios químicos de carbono do compostos (112) (diéster) e comparação com os valores da literatura.....	104
Tabela III. 11.: Relação dos tipos de carbono da mistura (113 ; 114) identificados por <i>RMN ¹³C - DEPT</i>	110
Tabela III. 12.: Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (113) e (114) e comparação com os valores da literatura.....	111

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I. Introdução

A Química Orgânica dos Produtos Naturais, simplesmente designada por Química dos Produtos Naturais (Q.P.N.) e a Fitoquímica têm em comum o estudo dos metabolitos secundários produzidos nos seres vivos, designados usualmente por produtos naturais. Esta sobreposição de objectivos é parcial, dado que, a Fitoquímica estuda apenas os metabolitos do reino vegetal, no entanto, o seu domínio é muito vasto uma vez que engloba também os aspectos inerentes à bioquímica vegetal.¹

A Fitoquímica desenvolveu-se como disciplina autónoma, situando-se entre a Bioquímica Vegetal e a Química dos Produtos Naturais, estando intimamente relacionada com ambas.² Também se relaciona com outras áreas, nomeadamente, a Botânica através dos estudos de quimiotaxonomia; as Ciências Agrárias através da pesquisa de culturas alternativas às tradicionais, destinadas à valorização económica de solos pobres.^{3, 4} Quando se ocupa dos aspectos relacionados com a fisiologia vegetal e a biologia molecular relaciona-se com a Biologia, estes são apenas alguns exemplos.^{1, 5}

O desenvolvimento da Fitoquímica ao longo do século XX trouxe uma nova visão sobre o reino vegetal. Os estudos já efectuados têm ajudado a compreender o significado biológico de determinados metabolitos secundários produzidos nas plantas.⁶

Desde a antiguidade que o Homem utiliza produtos com actividade biológica produzidos por seres vivos, na caça, nas curas tradicionais, na guerra, nos actos de cariz religioso e também para tornar mais agradável o sabor ou o aspecto dos alimentos. Alguns povos dominam técnicas de caça e de defesa que utilizam setas ou dardos envenenados com extractos de determinadas plantas. Na actualidade algumas destas substâncias também são utilizadas na medicina contemporânea durante algumas intervenções cirúrgicas.¹

Ao longo de muitas gerações transmitiram-se usos, costumes e saberes ancestrais, na maioria das vezes baseados em acontecimentos fortuitos, que criaram a base do conhecimento

empírico da Humanidade. A utilização dos recursos naturais, nomeadamente da flora geral e endémica, poderá ter contribuído de forma decisiva para desenvolver nos povos as bases da atitude experimentalista. É sabido que nas antigas civilizações já existia o hábito de recorrer a preparados de certas plantas consideradas medicinais e neles procurar virtudes curativas. Esta relação do Homem com o meio ambiente marcou o início da tentativa de interpretação e aproveitamento do vastíssimo património que a Natureza lhe legou, permitindo-lhe usufruir de novos produtos naturais para a melhoria no seu bem estar.

Estudos etnobotânicos realizados com comunidades orientais, tradicionalmente conservadoras de usos e costumes, evidenciaram que a evolução do conhecimento sobre a utilização de plantas destinadas à alimentação e suas técnicas de cultivo se desenvolveu em paralelo com o aumento do conhecimento sobre as espécies que manifestavam propriedades terapêuticas, tóxicas ou outras.^{7, 8, 9}

Já nos primeiros tratados médicos as plantas eram referidas pelas suas propriedades curativas e foram elas a base dos primeiros receituários. Actualmente, sobretudo em zonas onde o seu crescimento é endémico, elas constituem a base da medicina tradicional, complementar ou alternativa à terapêutica actual. O desenvolvimento das indústrias de perfumaria e de cosmética estimularam a descoberta de novos produtos naturais, dos quais a maioria são obtidos a partir de extractos vegetais.^{6, 9, 10} O grande avanço tecnológico e científico promovido pela Revolução Industrial no século XIX, marcou o ponto de viragem na evolução das ciências. A Química progrediu rapidamente impulsionada pela constante evolução das tecnologias, tornando-se mais fácil isolar compostos a partir de misturas complexas. Paralelamente, o desenvolvimento das ciências médicas e a expansão da indústria farmacêutica, fomentaram a pesquisa de novos produtos naturais com propriedades medicinais.

A Química dos Produtos Naturais tem-se desenvolvido como resposta à necessidade de isolar, purificar e caracterizar quimicamente os produtos naturais dos extractos de plantas ou animais, com vista à obtenção de compostos que apresentem actividade biológica.

I.1. Os produtos naturais das plantas

Uma das características dos vegetais é a produção de numerosos compostos cujo papel, ao nível da planta, ainda é mal conhecido.⁵ O facto de muitos destes compostos não se encontrarem em todas as espécies, mostra que eles não fazem parte do metabolismo geral: são os metabolitos secundários (produtos naturais), não exercendo função directa ao nível das actividades fundamentais do organismo vegetal (crescimento, desenvolvimento, reprodução ...). Em contraste, os metabolitos primários, tais como os fitoesteróis, os lípidos, os aminoácidos, os nucleótidos e os ácidos orgânicos representam papéis metabólicos essenciais e estão presentes em todas as plantas.^{1, 11}

Com a evolução da Fitoquímica deparou-se com uma enorme variedade de compostos produzidos pelas plantas e que aparentemente não tinham utilidade no seu ciclo biológico, por isso, não constituíam motivo de interesse para os biólogos.¹¹ No entanto tornaram-se de extrema importância no desenvolvimento dos estudos quimiotaxonómicos, enzimáticos e de ecologia química.¹² Através destes estudos foi possível conhecer a importância dos produtos naturais como mediadores de interacções ecológicas entre as espécies. Os metabolitos secundários produzidos nas plantas devido à sua actividade biológica apresentam funções de grande utilidade na preservação das espécies que os produzem, por exemplo: impedem o crescimento de concorrentes ao mesmo território; actuam como pesticidas na protecção contra pragas; servem como repelente de insectos e outros animais. Alguns pelo contrário contribuem para o relacionamento simbiótico com outros organismos, por exemplo, ao atrair agentes de polinização (manifestação de cores exuberantes, produção de feromonas sexuais), apresentando por isso benefícios para a planta.^{2, 5, 6, 12}

Na Natureza, cada espécie luta pela sobrevivência tanto na procura de alimentos como no despiste de predadores dos quais, as plantas, ao contrário dos animais, não lhes podem fugir, por isso algumas plantas desenvolveram mecanismos de defesa e de adaptação ao meio ambiente.^{5, 13}

Baseado na sua origem biossintética, os metabolitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: os alcalóides, os terpenóides, os fenilpropanóides e compostos fenólicos relacionados.¹¹ Na Fig. I.1, ilustram-se alguns destes compostos que se obtiveram no estado puro ainda no decorrer do século XIX,^{11, 15} no entanto, na grande maioria dos casos, o esclarecimento da sua estrutura molecular só foi possível mais tarde, pois dependeu da evolução das técnicas de análise, sobretudo das espectroscopias e da espectrometria de massa.

Apresentando propriedades medicinais, o ricino (1) foi primeiramente isolado a partir do óleo de castor, manifesta propriedades purgativas, enquanto a quinina (2) extraída da casca da *Chinchona*

officinalis é utilizada como antipirético principalmente no tratamento da malária.^{11, 14, 15} A cocaína (3) é extraída da planta *Erythroxylon coca* enquanto a cafeína (4) se pode obter da planta *Coffea arabica*.¹¹

Estes compostos são conhecidos por serem estimulantes.^{14, 15} O consumo destas substâncias pelo homem pode criar habituação, sendo que a primeira, torna os indivíduos muito dependentes e em casos extremos pode criar-lhes graves distúrbios comportamentais.¹⁶

Os compostos (5) e (6), morfina e tetra-hidrocanabinol respectivamente, inserem-se na classe dos narcóticos ou alucinógenos. A morfina é o mais importante dos alcalóides do ópio, foi utilizado em medicina como analgésico e soporífico. Obtém-se das cápsulas maduras de duas espécies de papoulas, a *Papaver somniferum* e a *Papaver setigerum*,^{11, 15, 16} também as rãs da espécie *Bufo marinus* acumulam quantidade apreciável de morfina na sua pele.¹¹ O tetra-hidrocanabinol (também conhecida por maconha, marijuana, haxixe, liamba entre outros) é extraído de uma variedade de cânhamo, chamada *Cannabis sativa* pertencente à família das moráceas.

A estricnina (7) é um alcalóide de núcleo indólico, pode-se isolar a partir de sementes de duas espécies de Loganiáceas a *Strychnos Nux vomica* L. e a *Strychnos Ignatii Berg*.^{11, 15} A sua síntese total foi conseguida por Woodward. É um poderoso veneno, a sua comercialização está proibida na maioria dos países. Foi utilizado no combate a pragas, sobretudo no controlo de roedores e outros animais daninhos. Teve diversas aplicações, algumas no campo da medicina, porém, existem inúmeros relatos de envenenamentos provocados em humanos pela *estricnina*, uns de origem criminosa outros por acidente ou suicídio.¹⁶ A batracotoxina (8) é outro alcalóide venenoso, algumas espécies de rãs existentes na América do Sul produzem-no para se defenderem dos seus predadores.¹⁵

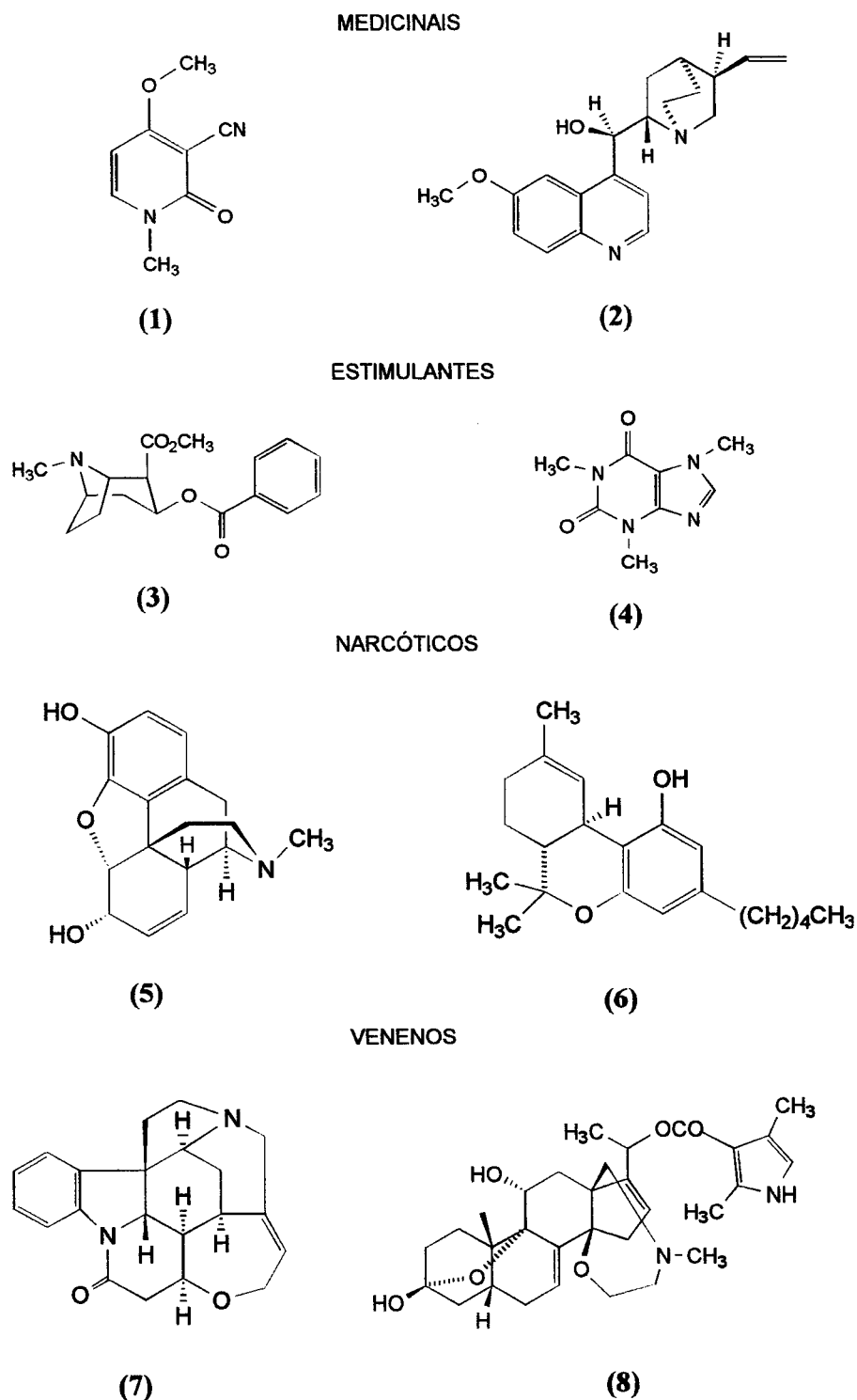


Figura I. 1.: Representação de produtos naturais obtidos sob a forma de cristais durante o século XIX e que são conhecidos por apresentarem actividade biológica.

Estima-se que o número de produtos naturais já identificados ascende a 45.000. Os cerca de 8.000 composto fenólicos conhecidos são produzidos pela via do ácido xiquímico ou pela via do malonato/acetato. Os alcalóides, cerca de 12.000, são biossintetizados principalmente a partir dos

aminoácidos. Todos os terpenóides, tanto os metabolitos primários como os mais de 25.000 metabolitos secundários, são derivados de um precursor com cinco átomos de carbono, o pirofosfato de isopentenilo (IPP) (9).¹¹

Nos pontos seguintes abordam-se somente os aspectos relacionados com os terpenóides. Pretende-se rever os conceitos que facilitem a descrição e a caracterização dos principais compostos que foram isolados e identificados durante a realização experimental deste trabalho.

1.2. Os terpenóides das plantas

Os terpenóides são uma classe de produtos naturais muito abundante e estruturalmente muito variada. São constituídos a partir de monómeros de cinco átomos de carbono (unidades isoprénicas) compreendendo esqueletos hidrocarbonados com o seguinte número de átomos de carbono: C₅, C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₂₅, C₃₀, C₄₀ e superiores.

Estes compostos podem ser encontrados em todos os órgãos das plantas superiores e também em fungos, algas e líquens, embora alguns sejam de origem microbiana ou de insectos. Esta proliferação na Natureza pode ser ilustrada pela ocorrência de pelo menos 38 tipos de esqueleto diferente de monoterpenóides, aumentando para mais de 200 nos sesquiterpenóides, conhecem-se mais de 500 compostos de iridóides (um dos subgrupos dos monoterpenóides).⁶

Os terpenóides devem o seu nome ao facto dos primeiros membros desta classe terem sido isolados da terebentina ("*terpentin*" em alemão).¹¹

Desde a antiguidade que o Homem utiliza estes produtos, principalmente os que existem em óleos ou extractos, como ingredientes de sabores, conservantes, perfumes, terapêutica, narcóticos, sabões e pigmentos.⁶

Os terpenóides encontram-se divididos em subclasses de acordo com o número de átomos de carbono do seu esqueleto hidrocarbonado. Os mais simples são os hemiterpenóides com apenas cinco átomos de carbono, enquanto as restantes subclasses apresentam esqueletos que são múltiplos deste.

Os terpenóides podem existir na forma livre ou então na forma glucosidada, esta confere-lhe maior solubilidade aquosa e facilidade de transporte intra e intercelular.¹⁷

Os mono- e sesquiterpenos são com os fenilpropanóides os compostos principais dos óleos essenciais das plantas. Eles podem ser acíclicos, monocíclicos, ou policíclicos.¹ Juntamente com os hidrocarbonetos encontram-se os diversos derivados oxigenados: álcoois, aldeídos, epóxidos, cetonas

e ácidos. Na mesma planta coexistem várias moléculas de fórmulas químicas muito semelhantes diferindo apenas no grau de hidrogenação ou de hidroxilação ¹

1.2.1. Principais vias da biossíntese de terpenóides

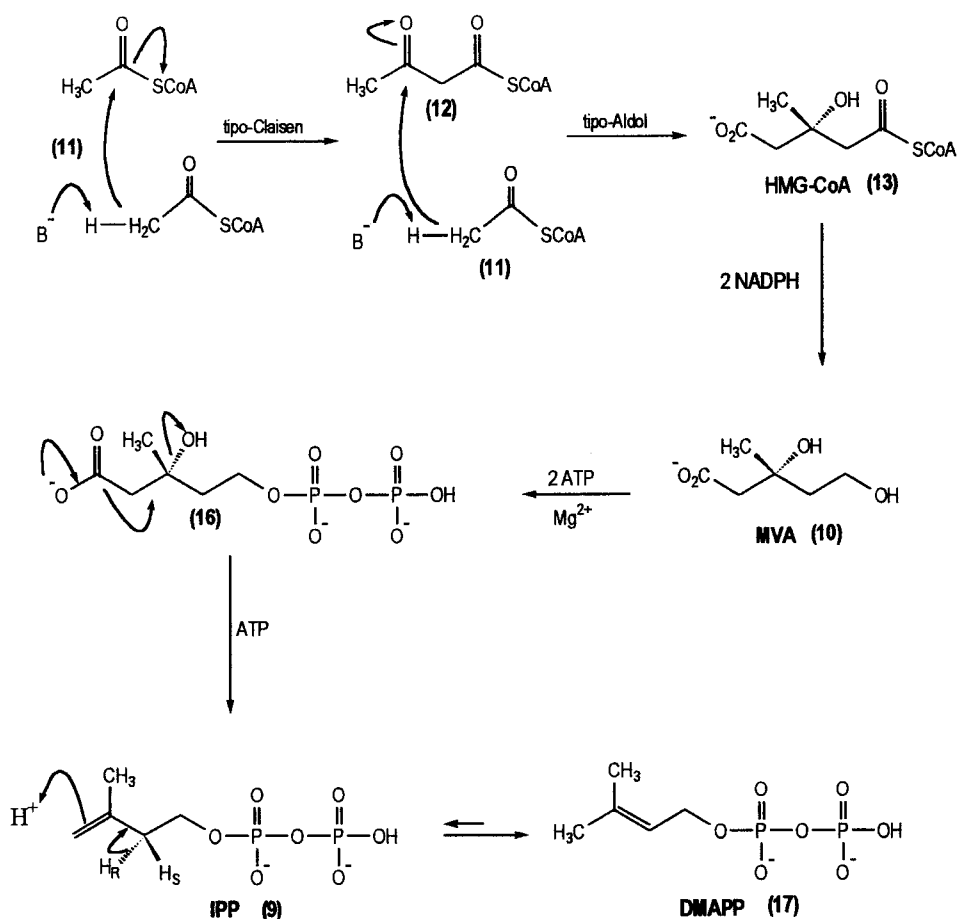
A “... síntese de terpenóides não é exclusiva dos vegetais; o esqualeno, tal como o nome indica é um terpeno abundante no tubarão; o colesterol encontrado em certas algas é característico dos animais. Mas os derivados terpênicos encontrados nos animais são apenas em pequeno número, o que contrasta com a extrema diversidade dos que puderam ser isolados das plantas, sendo que a síntese de numerosos terpenóides (fitol, carotenóides ...) é específica dos vegetais.”¹

Os terpenóides são formados por polimerização de monómeros de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), em 1887 Wallach propôs a “via do isopreno” que veio a ser confirmada por volta de 1894, quando se elucidaram as estruturas da cânfora e do α -pineno. Neste, as unidades isoprênicas foram encontradas ligadas cabeça com cauda, confirmando-se mais tarde que esta disposição era geral para os monoterpenóides.⁶

1.2.1.1. Biossíntese do ácido mevalónico e do pirofosfato de isopentenilo pela via do acetato/mevalonato

O ácido 3R-(+)-mevalónico (MVA) (10) é o precursor bioquímico dos terpenóides. Embora possuindo uma cadeia hidrocarbonada de seis átomos de carbono, o MVA é um composto intermediário na biossíntese do pirofosfato de isopentenilo (IPP) (9), atrás citado como precursor dos terpenóides, por vezes referido genericamente como “unidade isoprênica”. Representa-se no esquema I.1 o mecanismo normalmente aceite para explicar a via metabólica do pirofosfato de isopentenilo.

Duas moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) (11) reagem entre si por influência do enzima *β -cetotiolase*, sofrem condensação de Claisen e originam o composto acetoacetil-CoA (12)^{1, 6, 11, 14, 15, 18} este na presença de uma terceira molécula de acetil-CoA e do enzima *HMG-CoA sintetase* sofre condensação aldólica e origina o produto 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (13).^{11, 14, 15, 18}

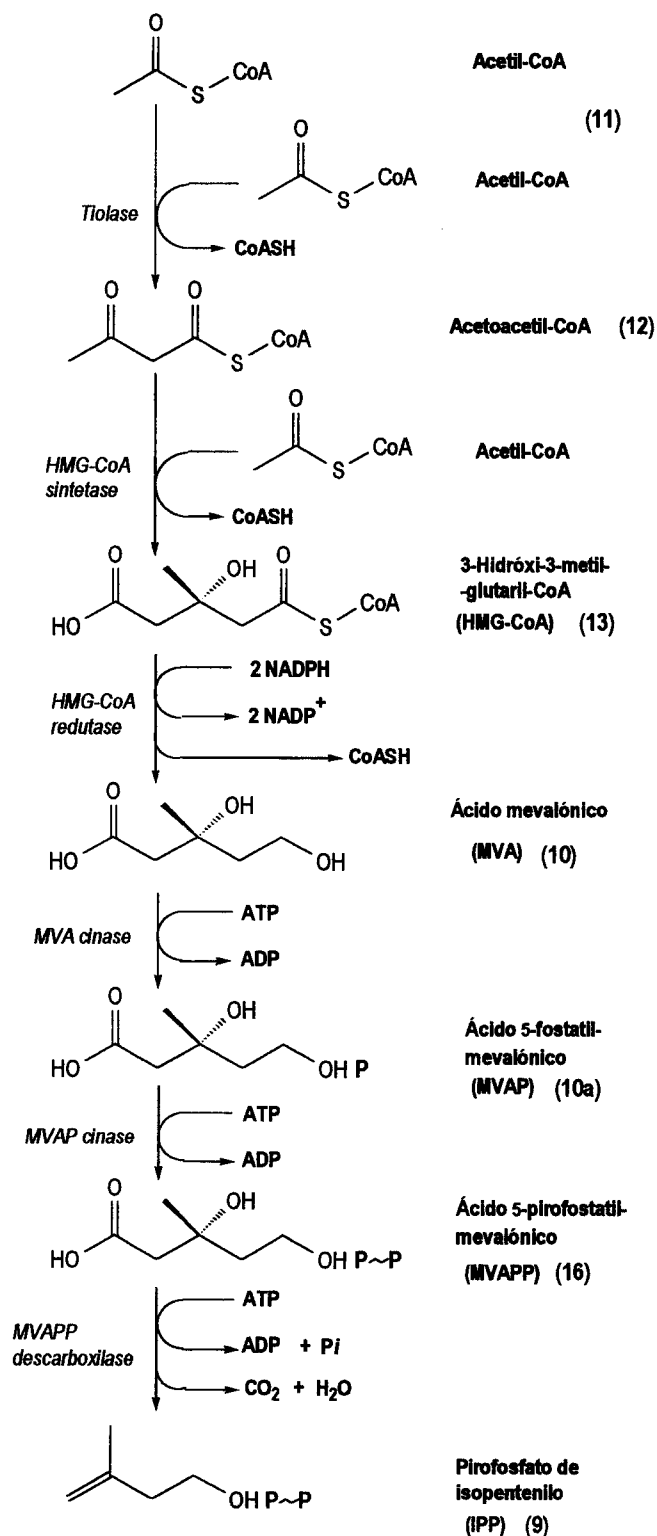


Esquema I. 1.: Mecanismos da via metabólica do pirofosfato de isopentenilo.

Por acção de duas moléculas de NADPH (14) e do enzima *HMG-CoA redutase* o carbonilo ligado ao coenzima A reduz-se a álcool. A redução ocorre em dois passos irreversíveis e velocidade-limitante,¹⁴ No primeiro passo, liberta-se o tioéster CoASH e forma-se um aldeído por intervenção de NADPH (14), este aldeído é um intermediário que não está livre pois encontra-se ligado ao enzima.^{1, 11} No segundo passo, a outra molécula de NADPH (14) assegura a redução do carbonilo (no carbono C₅) a álcool, formando o ácido 3,5-di-hidróxi-3-metilpentanóico ou seja o ácido 3R-(+)-mevalónico (MVA) (10), no estado livre.^{1, 6, 14, 15}

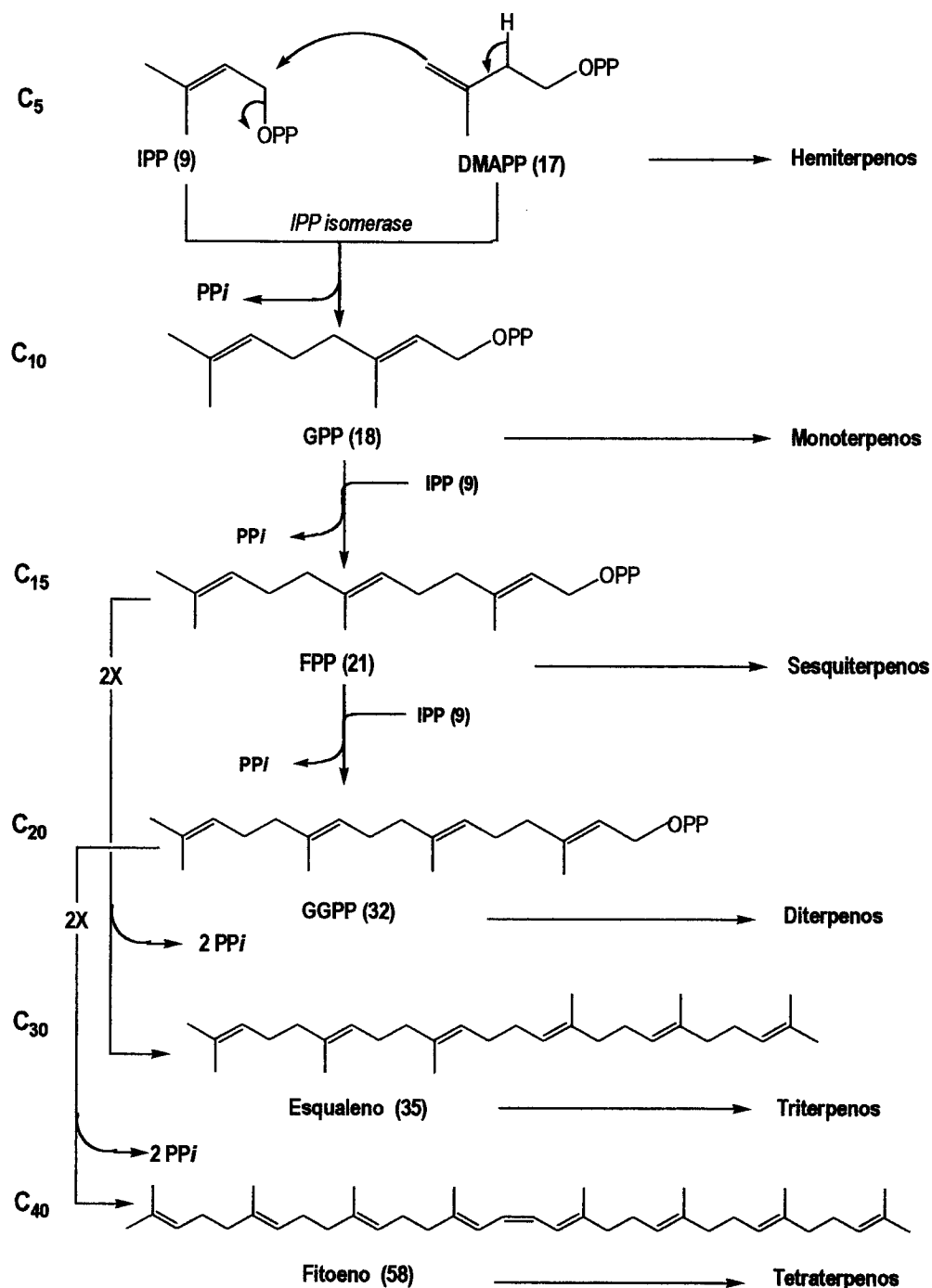
O ácido 3R-(+)-mevalónico (10) sofre duas fosforilações por acção de ATP (15) na presença de cátions Mg^{2+} e dos enzimas *MVA cinase* e *MVAP cinase* (esquemas I.1 e I.2).^{11,15, 18, 19, 20} O grupo pirofosfato (PP) liga-se ao grupo álcool primário do MVA (10) formando o ácido 5-pirofosfatilmevalónico (16). Este composto activado pelo PP, sob a influência de uma terceira molécula de ATP (15) e na presença do enzima *MVAPP descarboxilase*, sofre descarboxilação, elimina o CO_2 do grupo ácido e também o grupo álcool terciário, convertendo-se em pirofosfato de isopentenilo (IPP) (9). Este

sofre isomerização através de reacções enzimáticas estereoespecíficas, aceita um próton do meio em C_4 e cede o átomo de hidrogénio *pro-R* do metileno C_2 , formando o pirofosfato de 3,3-dimetilalilo (DMAPP) (17), com o qual passa a coexistir. Cerca de 90% da mistura que se forma durante a reacção de isomerização corresponde ao DMAPP.^{6, 14, 21}



Esquema I. 2.: Via biossintética do acetato/mevalonato na formação do pirofosfato de isopentenilo.

A formação do pirofosfato de geranilo (GPP) (18) e a sua conversão nas principais subclasses de terpenóides das plantas estão representadas resumidamente no esquema I.3, onde também se referem os precursores nas respectivas vias de biossíntese. 11, 14, 18, 19, 20

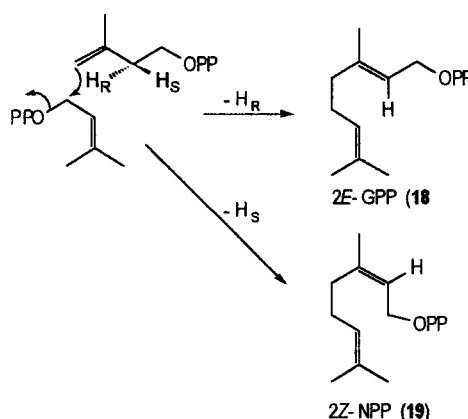


Esquema I. 3.: Precursores das principais subclasses dos terpenóides das plantas.

Nalgumas espécies de plantas a biossíntese de terpenóides culmina num processo de polimerização, esta via leva à produção de polímeros naturais.

I.2.1.2. Os monoterpenóides

Os monoterpenóides alicíclicos, monocíclicos e bicíclicos são vulgares nas plantas, embora existindo nalguns insectos, só raramente surgem em animais.¹⁴ Estudos enzimáticos revelaram que os compostos cíclicos e acíclicos podem derivar do pirofosfato de geranilo (GPP) (18) e do pirofosfato de nerilo (NPP) (19). Estes compostos são estereoisómeros *cis* e *trans* (GPP (2-*E*); NPP (2-*Z*)) ambos formados directamente da união do IPP (9) com o DMAPP (17). As diferenças nos dois compostos justificam-se pela eliminação no DMAPP (17) de um hidrogénio *pro-R* e *pro-S* respectivamente, conforme se representa no esquema I.4.

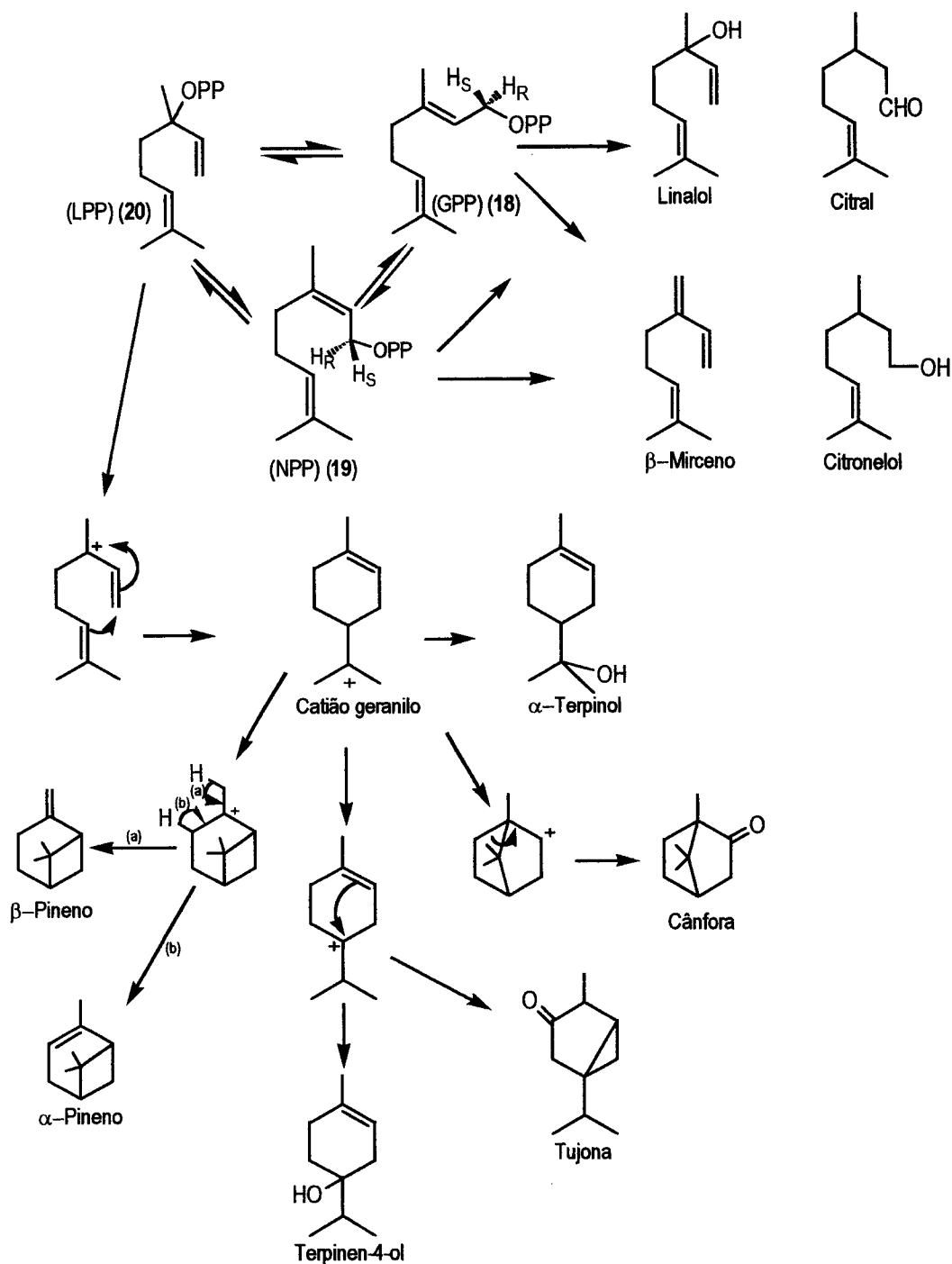


Esquema I. 4.: Formação do pirofosfato de geranilo e do pirofosfato de nerilo.

Banthorp²² demonstrou que ocorre isomerização estereoespecífica na *Rosa damascena*, intacta. O geraniol foi convertido em nerol pela remoção do átomo de hidrogénio 1-*pro-S*), enquanto o processo inverso envolveu a remoção do átomo de hidrogénio 1-*pro-R*) do pirofosfato de nerilo (19). Outros estudos com sistemas enzimáticos de diversas plantas evidenciaram que todas elas podiam produzir os seus monoterpenos cíclicos a partir do GPP (18) e do NPP (19), no entanto, um outro precursor, o pirofosfato de linalilo (LPP) (20) revelou-se como o mais eficaz na produção destes compostos cíclicos.¹⁴ É possível que os enzimas ciclases actuem como função isomerase-ciclase, convertendo o GPP (18) em LPP (20). Uma suposta via passa pelas isomerizações $GPP \rightleftharpoons LPP \rightleftharpoons NPP$. Segundo Mann J.,¹⁴ a ciclização para a produção de monoterpenos monocíclicos e bicíclicos pode processar-se pela via dos intermediários catiónicos, através de rearranjos do tipo Wagner–Meerwein com deslocação de hidreto, dando origem à diversidade dos tipos de esqueletos monoterpénicos que existem na Natureza.

Quanto à sua estrutura, os monoterpenóides podem-se dividir em acíclicos e cíclicos. Os compostos GPP (18) e NPP (19) são considerados os principais precursores de monoterpenóides

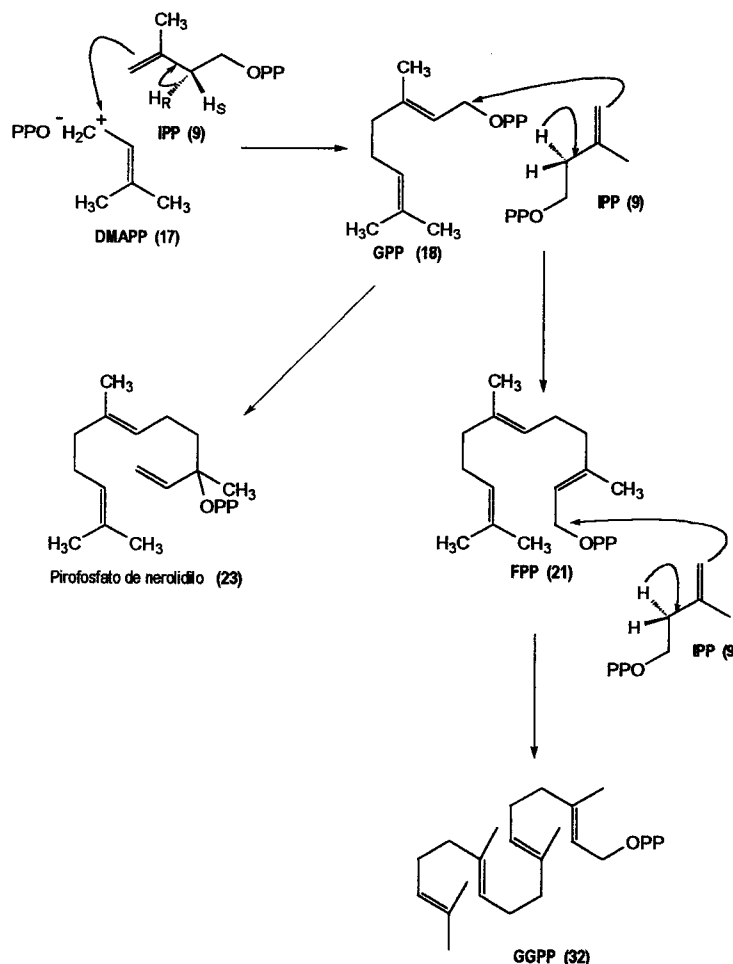
acíclicos enquanto a principal via de biossíntese dos monoterpenóides monocíclicos e bicíclicos se faz através do LPP (20). No esquema I.5. representam-se monoterpenos cíclicos derivados do catião geranilo obtido pela via do LPP (20)^{11, 14, 18, 20, 21} e monoterpenos acíclicos obtidos a partir do sistema de isomerizações ($GPP \rightleftharpoons LPP \rightleftharpoons NPP$). Porém, a conversão reversível destes três isômeros sugere que todos possam ser precursores na síntese de qualquer monoterpeno.^{11, 14}



Esquema I. 5.: Monoterpenos cíclicos derivados do catião geranilo e monoterpenos acíclicos obtidos a partir do sistema de isomerizações ($GPP \rightleftharpoons LPP \rightleftharpoons NPP$).

I.2.1.3. Os sesquiterpenóides

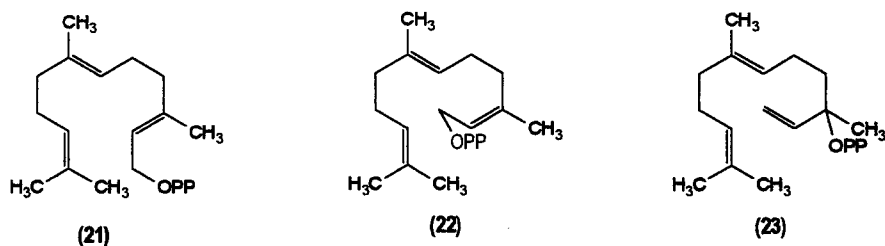
Os sesquiterpenóides, como o farnesol e seus derivados, contêm três unidades isoprénicas num arranjo regular cabeça com cauda,¹⁸ no esquema I.6 estão representados os principais precursores dos mono- sesqui- e diterterpenóides. Os sesquiterpenóides são uma classe de compostos muito abundante nas plantas, obtêm-se principalmente a partir dos seus óleos essenciais.



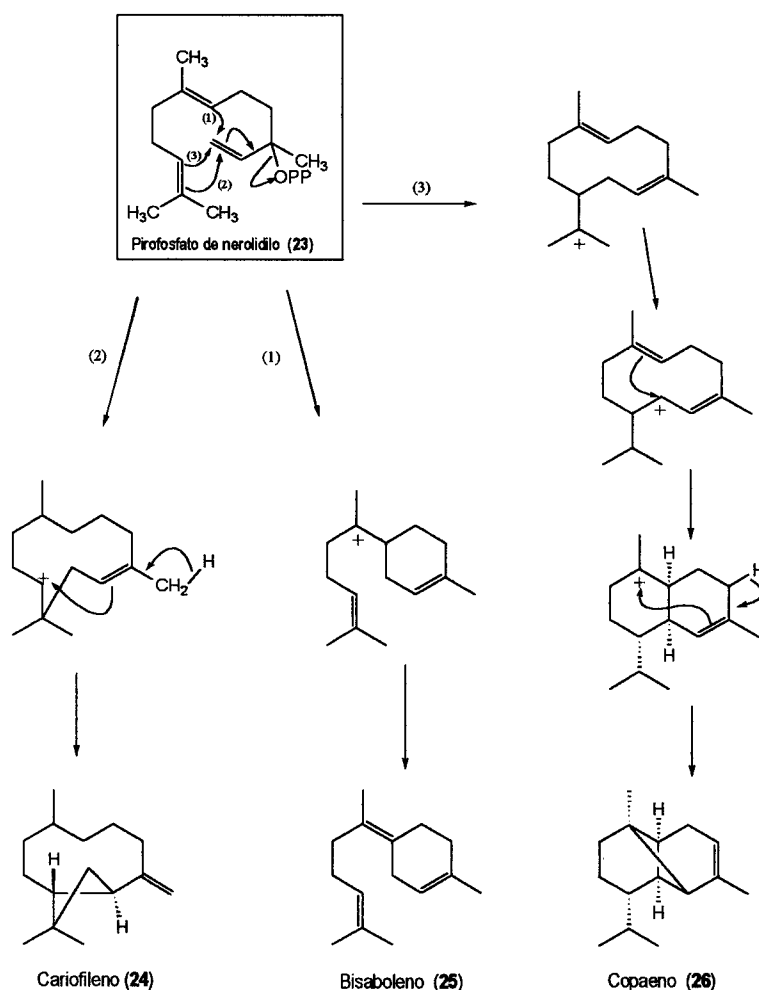
Esquema I. 6.: Mecanismos da biossíntese dos precursores dos mono- sesqui- e diterterpenóides

Numerosos sesquiterpenóides actuam como fitoalexinas, compostos antibióticos produzidos pelas plantas em resposta a ataques microbianos e como "antifeedants" para repelir herbívoros oportunistas.¹¹ Outra particularidade dos sesquiterpenóides relaciona-se com o facto das hormonas juvenis dos insectos (inibidoras de metamorfoses) serem sintetizadas a partir do pirofosfato de farnesol, por adição de dois grupos metilo, daí o seu grande interesse no controlo de insectos.²⁰

À semelhança dos monoterpenos também o precursor dos sesquiterpenos o pirofosfato de 2E,6E-farnesilo (2E,6E-FPP) (21) possui dois isômeros. Os diversos esqueletos hidrocarbonados dos sesquiterpenos podem derivar do 2E,6E-FPP (21), do seu isômero *cis-trans*, o pirofosfato de 2Z,6E-farnesilo (22) ou do pirofosfato de 6E-nerolidilo (23).¹⁴



Da grande variedade de esqueletos hidrocarbonados da classe dos sesquiterpenos representam-se no esquema I.7 um composto bicíclico, o cariofileno (24), um composto monocíclico misto, o bisaboleno (25) e um composto tricíclico, o copaeno (26), todos obtidos pela via biossintética do pirofosfato de nerolidilo (23).^{14, 18}

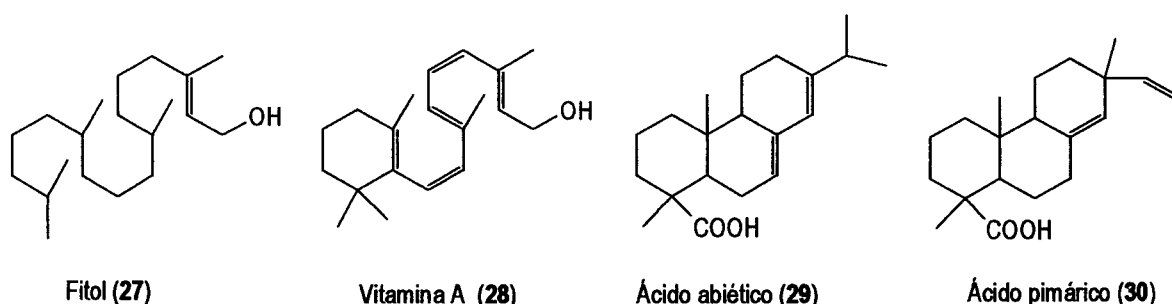


Esquema I. 7.: Mecanismo de biossintese de sesquiterpenos derivados do pirofosfato de nerolidilo.

1.2.1.4. Os diterpenóides

Os diterpenóides são uma importante classe de compostos naturais sintetizados nas plantas. São conhecidos por apresentarem actividade biológica muito diversificada.

Da enorme variedade e quantidade de diterpenóides apresenta-se a título de exemplo, o fitol (27) (um dos constituintes da clorofila), a vitamina A (28) (sintetizada em grande quantidade pela salsa mas que existe tanto nas plantas como nos animais, nestes obtém-se por ruptura da molécula de caroteno e fixação de água), os ácidos resínicos das coníferas (por exemplo, os ácidos abiético (29) e pimárico (30)), e as giberlinas, (por exemplo o ácido giberélico (31)).^{1, 11, 14, 15, 20}

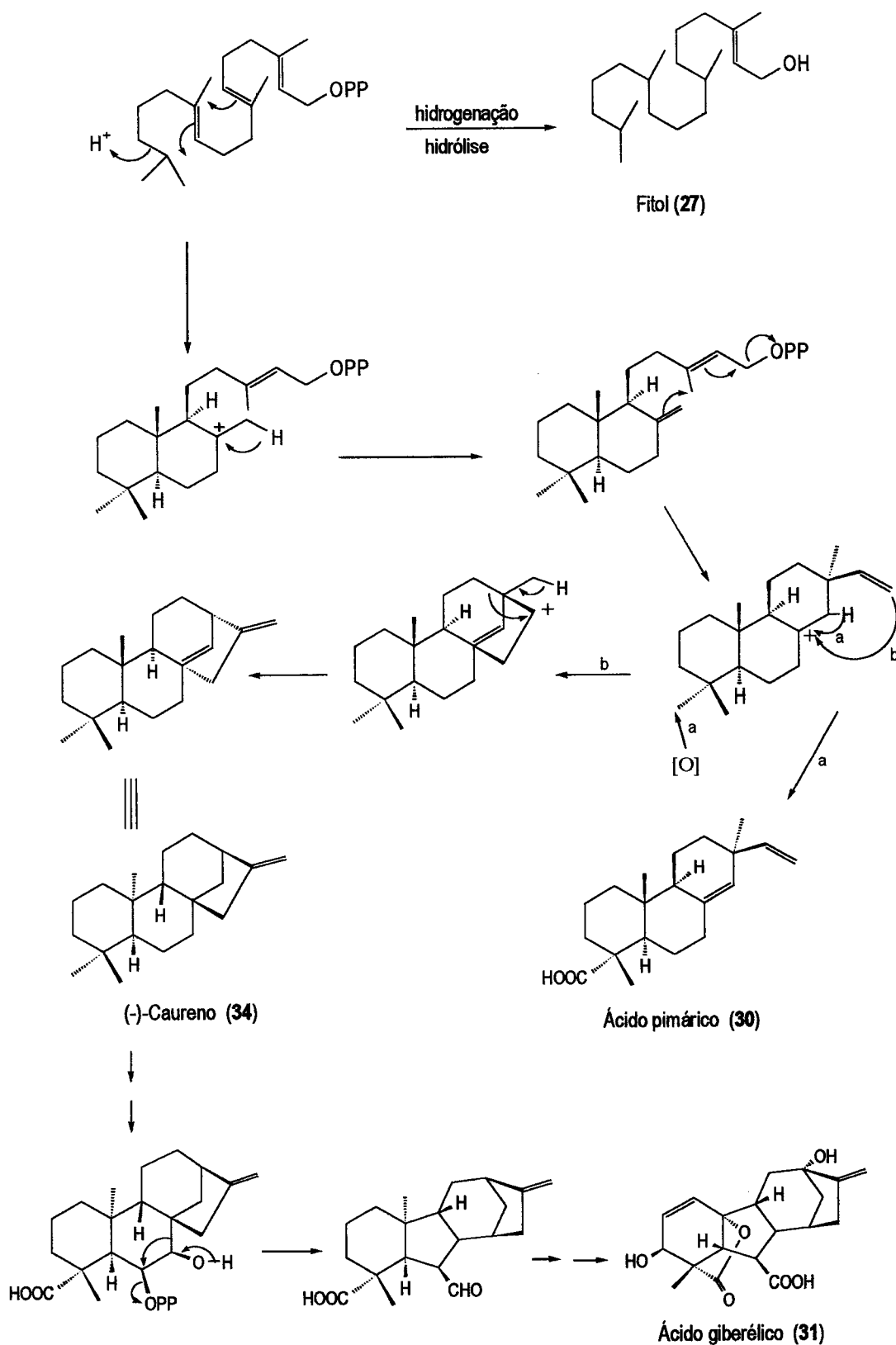


1.2.1.4.1. Biossíntese dos diterpenóides

Os precursores dos diterpenóides são o pirofosfato de 2E,6E,10E-geranilgeranilo (GGPP) (32) ou o seu isómero alílico, o pirofosfato de geranil-linalilo (GLPP) (33), formados pela condensação do IPP (9) com o pirofosfato de 2E,6E-farnesilo (FPP) (21), conforme se apresentou no esquema 1.6.

O pirofosfato de geranilgeranilo (32) cicliza com a cadeia dobrada de diferente forma originando os diversos diterpenos. No esquema 1.8 representa-se resumidamente os principais passos da biossíntese do fitol (27), do ácido pimárico (32), do caureno (34) e também do ácido giberélico (31),^{14, 15, 20, 21} a biossíntese deste último é complexa por isso apenas se representam os passos chave.

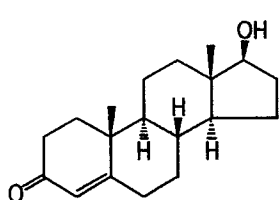
O ácido giberélico (31) pertence à classe de diterpenos mais estudada, as giberelinas, foram pela primeira vez isoladas do fungo "*Giberella fujikoro*" mas também estão presentes nas plantas superiores. Actuam como hormonas de crescimento das plantas e desempenham também um importante papel no mecanismo de controlo da floração.^{1, 14, 15, 20}



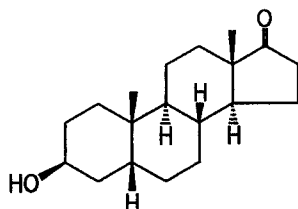
Esquema I. 8.: Mecanismo de biossíntese dos diterpenóides fitol, ácido pimárico, caureno e ácido giberélico.

1.2.1.5. Triterpenóides e esteróides

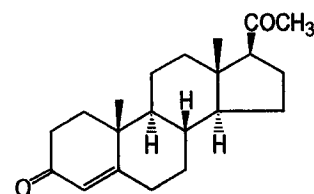
Os triterpenóides são um grupo muito numeroso e diversificado de produtos naturais derivados do esqualeno (35). Actualmente já foram isolados mais de 4000 triterpenóides distribuídos por mais de 40 tipos de esqueletos.²³ Dividem-se principalmente em dois grandes grupos, os triterpenos tetracíclicos e os triterpenos pentacíclicos. Nos primeiros incluem-se os esteróides, metabolitos considerados vitais para muitos organismos, em particular os animais. Esta classe é muito variada, existindo nela compostos como: as hormonas sexuais dos mamíferos (testosterona (36), androsterona (37) e progesterona (38)), o colesterol (39), o β -sitosterol (40), o cicloartenol (41), o brassinoesterol (42), as vitaminas D (por exemplo o calciferol (43)) entre muitos.



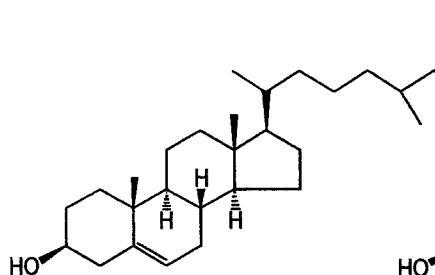
Testosterona (36)



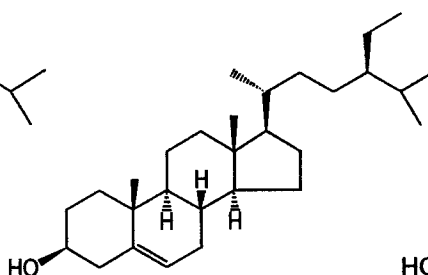
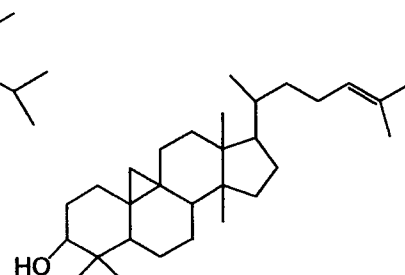
Androsterona (37)



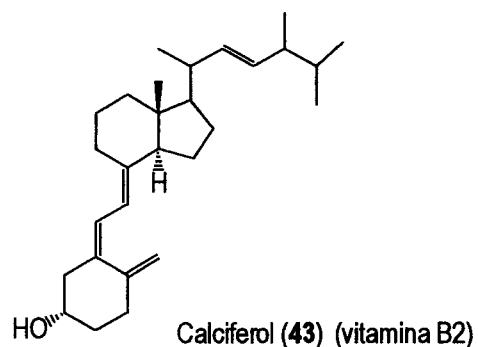
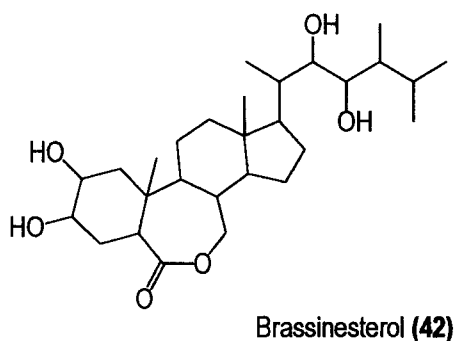
Progesterona (38)



Colesterol (39)

 β -Sitosterol (40)

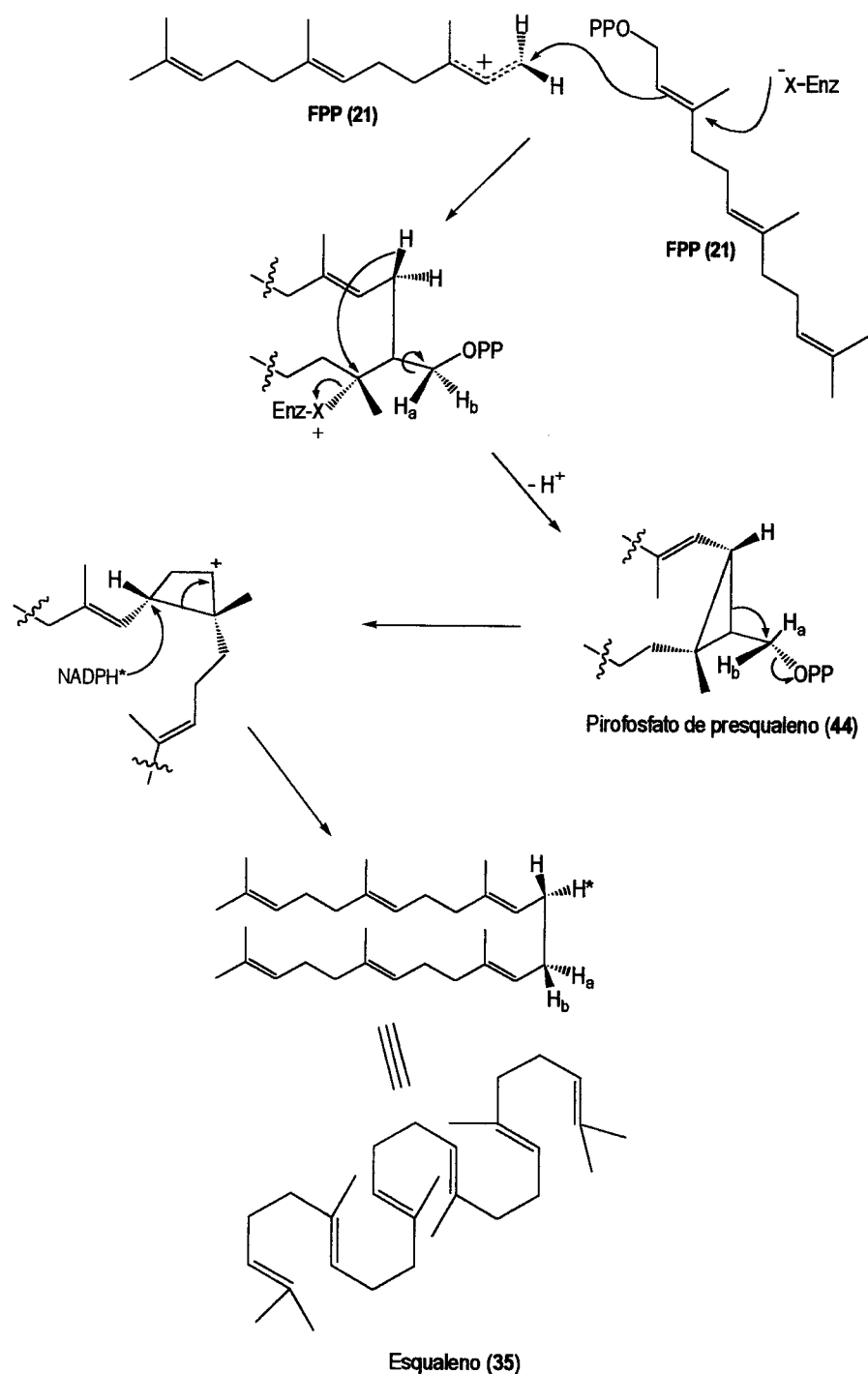
Cicloartenol (41)



I.2.1.5.1. Biossíntese de triterpenos pentacíclicos

O esqualeno (35) é o precursor comum dos triterpenóides e por sua vez é o mais simples dos triterpenos. A sua biossíntese não segue a via normal dos restantes terpenos à excepção dos tetraterpenos que apresentam uma via biossintética muito semelhante.

Os triterpenos resultam da união cauda-cauda de dois grupos pirofosfato de *trans*-farnesilo (21).^{14, 18} Desta condensação surge um composto intermediário, o pirofosfato de pré-esqualeno (44), com eliminação de um átomo de hidrogénio *Pro-S* da molécula inicial de ácido 3*R*-(+)-mevalónico (10). Embora este mecanismo não esteja inteiramente determinado, aquele que actualmente reúne maior consenso, apresenta-se no esquema I.9 o qual representa a biossíntese do esqualeno (35).^{14, 20, 24}

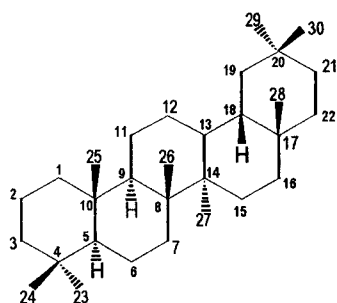


Esquema I. 9.: Mecanismo de biossíntese do esqualeno.

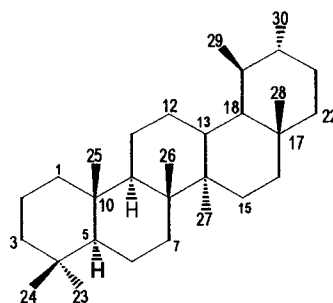
Durante os processos de biossíntese dos triterpenos (e esteróides), a molécula de esqualeno (35) pode dobrar-se de maneira diversa (conformações *pré-cadeira* e *pré-barco*) e originar compostos cujas estruturas podem divergir na forma e tamanho dos seus anéis, bem como na forma da cadeia lateral (sobretudo nos compostos esteróides).

Quando o esqualeno (35) sofre oxidação numa das extremidades da sua cadeia por acção do oxigénio em presença de NADPH (14), forma o composto (3S)-2,3-epóxi-esqualeno (45). A conformação assumida por esta molécula quando se liga à superfície do enzima (3S)-2,3-epóxi-esqualeno ciclase, a forma como se dá a ciclização e as diversas transformações que podem ocorrer devidas a rearranjos na estrutura, estão na origem dos vários subgrupos em que se subdividem os triterpenos.^{14, 20, 25}

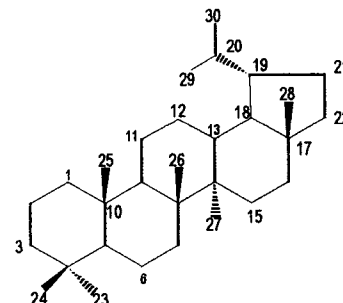
No processo de ciclização do (3S)-2,3-epóxi-esqualeno (45) forma-se o catião tetracíclico dammarenilo (46) também conhecido por catião protoeufóide. Este catião intervém na maioria das vias de biossíntese dos triterpenos pentacíclicos. No esquema I.10, representa-se um destes mecanismos de biossíntese. Uma característica geral nestes mecanismos é a expansão do anel virtual D seguindo-se a ciclização da cadeia lateral do catião. No caso do catião dammarenilo (46) a ciclização conduz à formação do catião lupenilo (47). Deste pode obter-se directamente o lupeol (48) ou então por expansão do anel E produzir-se o catião oleanilo (49). Por sua vez, este catião é precursor na biossíntese de muitos outros triterpenos pentacíclicos, por exemplo, os que se incluem nas famílias do oleanano (50), do ursano (51) e do lupano (52).^{26, 27}



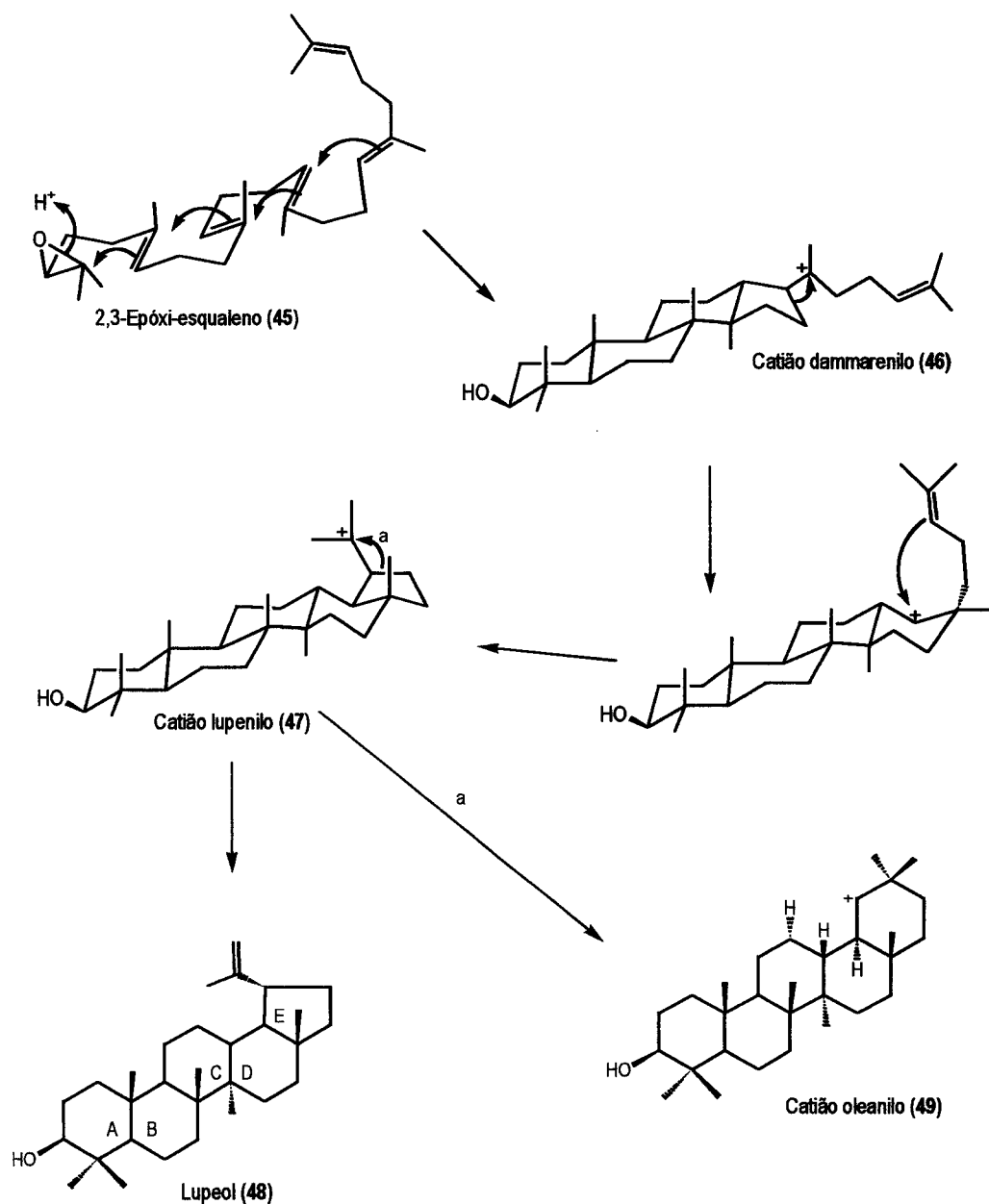
Oleanano (50)



Ursano (51)

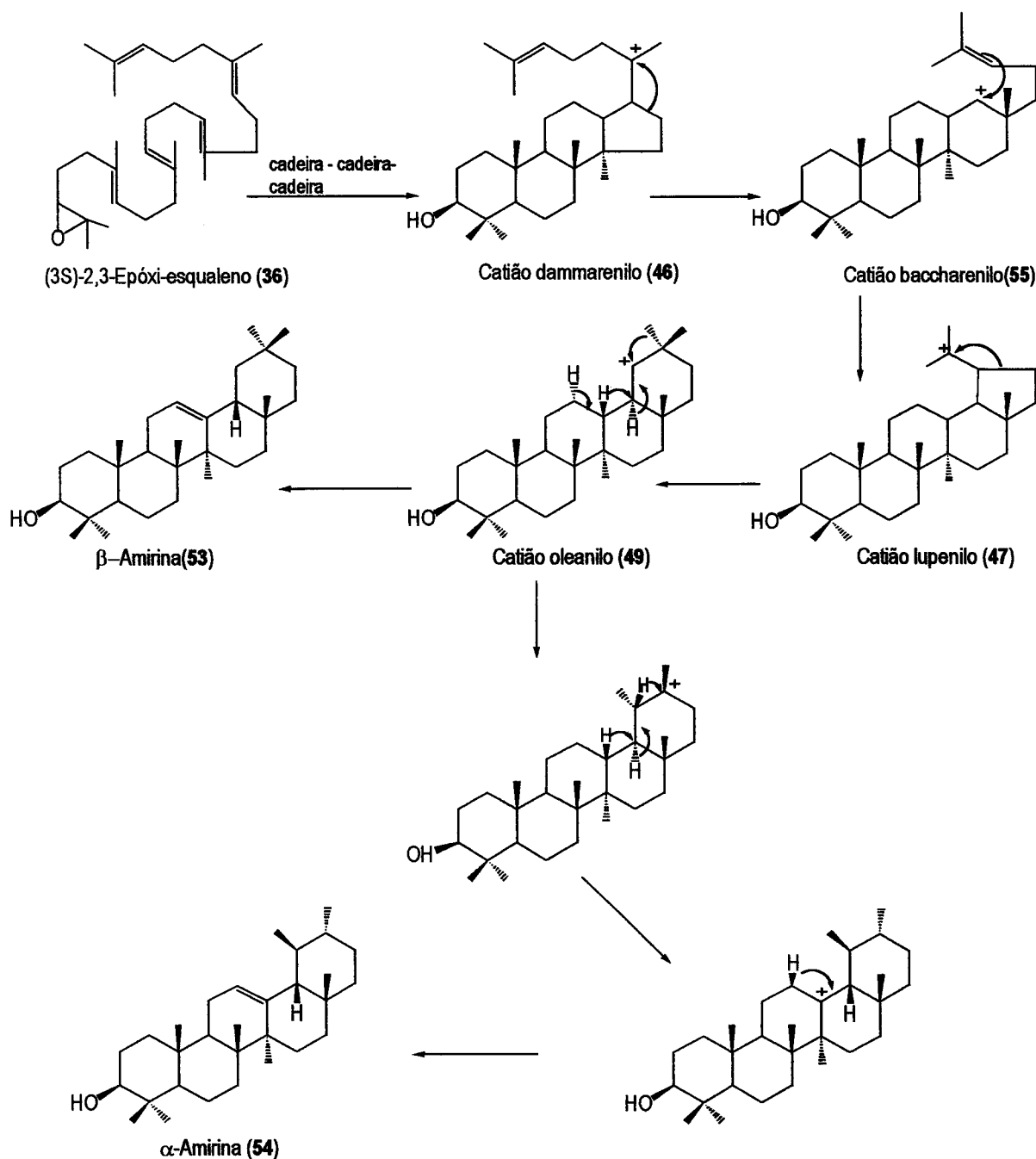


Lupano (52)



Esquema I. 10.: Mecanismo da ciclização do composto (3S)-2,3-epóxi-esqualeno com formação de lupeol.

Noutro processo de biossíntese de triterpenos pentacíclicos apresentado no esquema I.11, a ciclização do composto (3S)-2,3-epóxi-esqualeno (45) leva também à formação do catião dammarenilo (46) seguindo-se uma série de rearranjos que conduzem aos compostos pentacíclicos β -amirina (53) e α -amirina (54) pela via das espécies catiónicas bacharenilo (55), lupenilo (47) e oleanilo (49).^{27, 28}

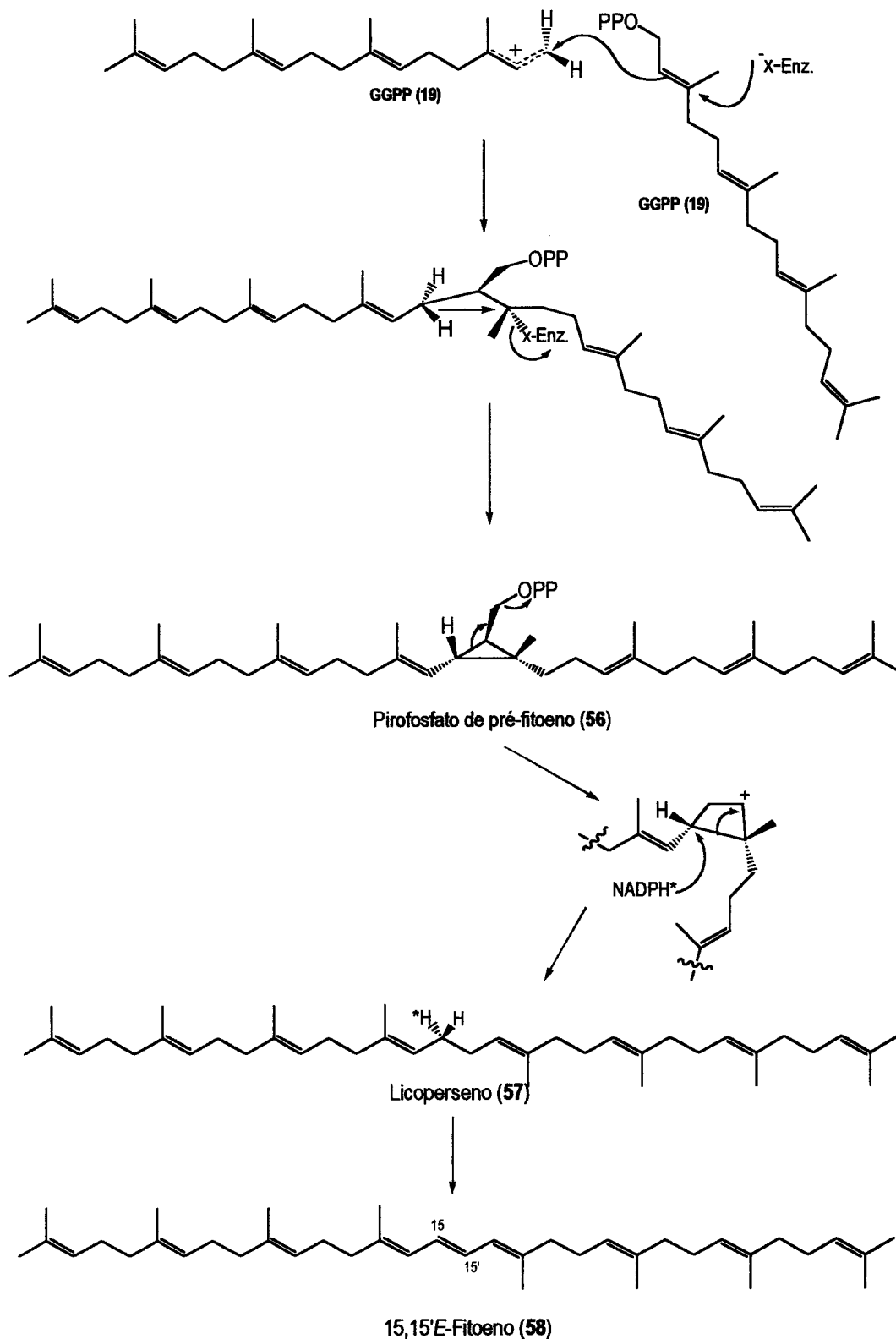


Esquema I. 11.: Mecanismo da biossíntese da β-amirina e da α-amirina.

I.2.1.6. Biossíntese de tetraterpenos

Os tetraterpenóides formam-se pela união cauda-cauda de duas unidades de pirofosfato de geranyl-geranilo (32), segundo um mecanismo semelhante ao da biossíntese do esqualeno (35), com

formação de pirofosfato de pré-fitoeno (**56**), que origina o licoperseno (**57**), o qual sofre eliminação de dois átomos de H, formando o fitoeno (**58**) (Esquema I.12).^{14, 6, 17, 15} *In vivo*, parece formar-se tanto o isômero *cis* como o *trans*.^{14, 10}



Esquema I. 12 – Mecanismo da biossíntese do fitoeno.

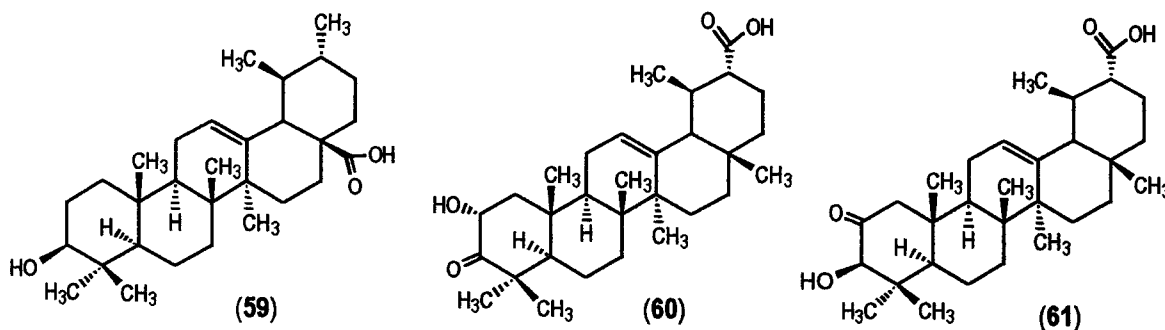
1.2.2. Actividade biológica de triterpenos pentacíclicos

Os triterpenos pentacíclicos possuem diversos tipos de estrutura e estão dispersos tanto em organismos procariotas como em eucariotas. Na composição química do latex e resinas de algumas plantas existem triterpenos em quantidade apreciável. Admite-se que estes compostos naturais desempenham nas plantas uma função fisiológica de defesa química contra herbívoros e agentes patogénicos. No entanto, os estudos de actividade biológica realizados ao longo das últimas décadas, levantam a possibilidade de alguns destes compostos triterpénicos poderem actuar contra certos agentes patogénicos causadores de doença em humanos e nos animais em geral.²⁸

A actividade biológica de triterpenos pentacíclicos tem sido objecto de vários estudos no decurso dos últimos dez anos e divulgados nas principais revistas científicas.

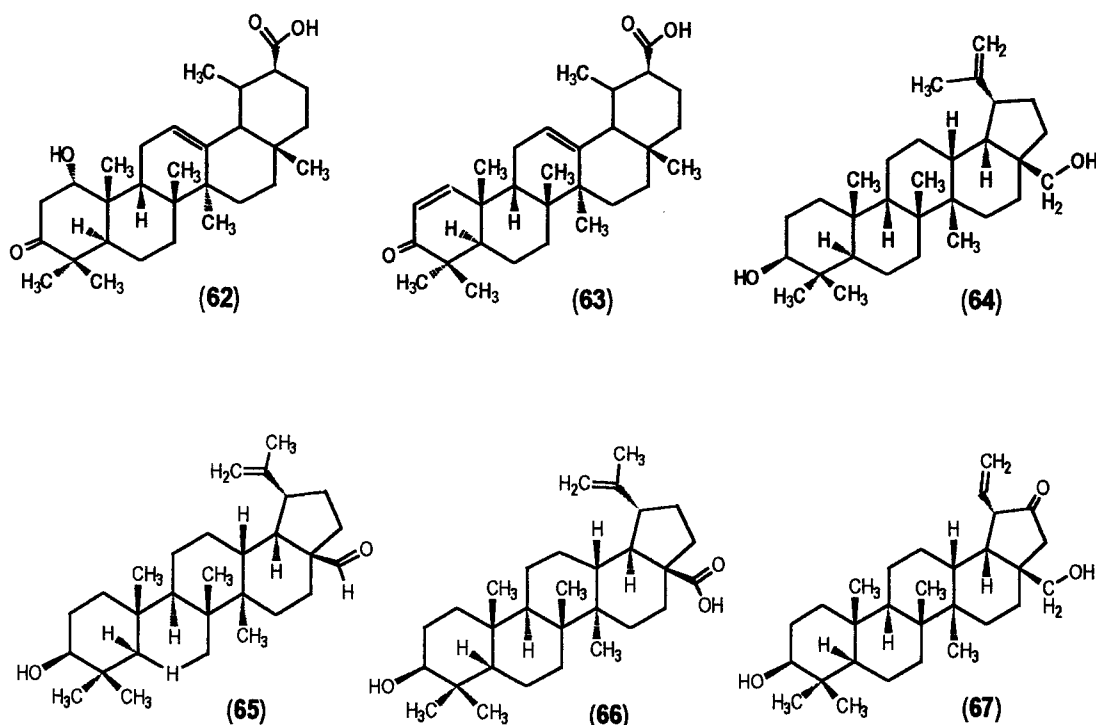
Numa investigação com células tumorais A-549, L-1210 e KB, Yamagishi, T. *et al.* (1988),²⁹ concluíram que o ácido ursólico (59) manifestava propriedades citotóxicas para estas células. Posteriormente, Simon, A. *et al.* (1992),³⁰ publicaram resultados apresentando o ácido ursólico (59) como responsável pela inibição do desenvolvimento de tumores produzidos na pele de murganhos. As investigações efectuadas com este produto natural revelavam-se prometedoras no campo da medicina. Talvez este facto tenha contribuído para o súbito interesse demonstrado no estudo da actividade biológica dos triterpenos pentacíclicos.

Num trabalho realizado por Sticher, O. *et al.* (1994),³¹ os triterpenóides da série do oleanano (50), ácido 2 α -hidróxi-3-oxoolean-12-en-30-óico (60), ácido 2-oxo-3 β -hidróxiolean-12-en-30-óico (61), ácido 1 α -hidróxi-3-oxoolean-12-en-30-óico (62) e ácido 3-oxoolean-1,12-dien-30-óico (63) apresentaram actividade antibacteriana contra o *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, e *Micrococcus luteus*.

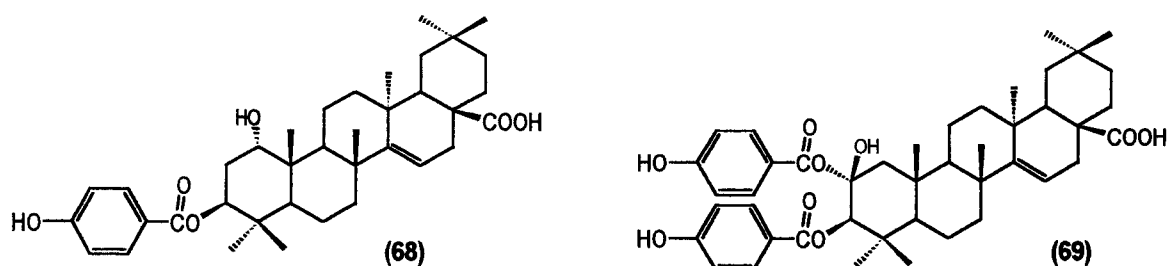


A actividade alelopática de triterpenóides da série do lupano (52) foi testada por Macias, F.A. *et al.* (1994).³² Segundo os autores, os compostos lupeol (48), betulinol (64) (Lup-20(29)en-3,28 diol),

aldeído betulínico (65), ácido betulínico (66), e o norlupano messagenin (67) (30-norlupane-3 β ,28-diol-20-ona) possuem potencial actividade alelopática, em particular sobre espécies dicotiledóneas e parecem estar significativamente envolvidas na acção alelopática da *Melilotus messanensis*.

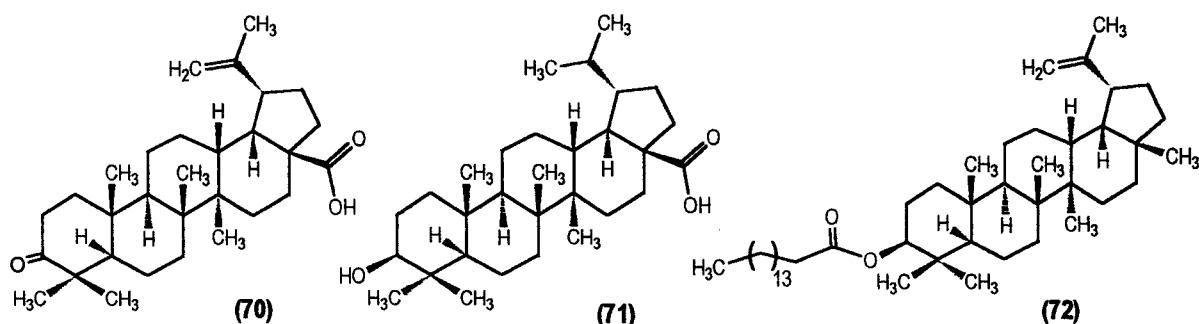


Da *Maprounea africana* foram isolados dois triterpenos pentacíclicos por Pezzuto, J.M. *et al.* (1994),³³ o ácido 1 β -hidróximaprounico-3-p-hidróxibenzoato (68) e o ácido 2 α -hidróximaprounico-2,3-bis-p-hidróxibenzoato (69). Estes compostos e os respectivos produtos de hidrólise (geninas) manifestaram uma potente actividade inibidora contra a transcriptase reversa do vírus HIV-1.

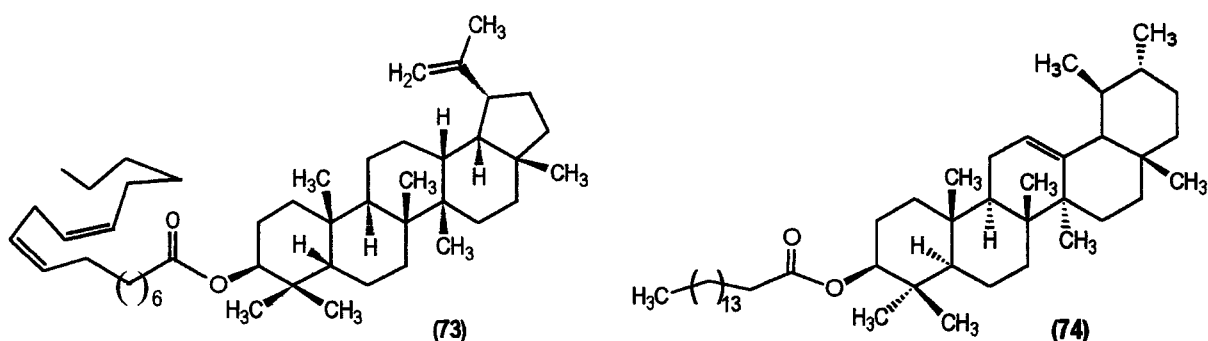


Lee, K.H. *et al.* (1994),³⁴ isolaram nas folhas da *Syzygium claviflorum* os ácidos platânico (70) e ácido betulínico (66). Estes triterpenóides apresentaram efeito inibidor na replicação do vírus HIV em células de linfócitos H9. Na avaliação da actividade anti-HIV realizada com oito derivados do ácido betulínico (66), o ácido di-hidrobetulínico (71) também se revelou um potente inibidor da replicação

deste vírus. Segundo a opinião dos autores, o grupo hidroxilo em C-3 e o grupo ácido carboxílico em C-17, assim como as substituições feitas em C-19, poderão contribuir para realçar a actividade anti-HIV desta classe de compostos.



Ratos Wistar padecendo de artrite foram tratados por Kweifookai, G. *et al.* (1995),³⁵ com triterpenóides de esqueleto lupano. Foi-lhes administrado por via oral lupeol (48), lupeol-3-palmitato (72) e lupeol-3-linoleato (73). O mecanismo antiartrítico do lupeol (48) e seus ésteres permitiram aos autores concluir que os compostos com maior eficácia antiartrítica relativa seguiam a ordem: linoleato de lupeol (73) > palmitato de lupeol (72) > lupeol (48). A eficácia antiartrítica do lupeol (48), foi posteriormente aumentada por esterificação com ácidos gordos de cadeia longa.³⁶ Estes autores observaram ainda que o palmitato de α -amirina (74), um outro triterpeno pentacíclico, também apresenta efeito antiartrítico.³⁷



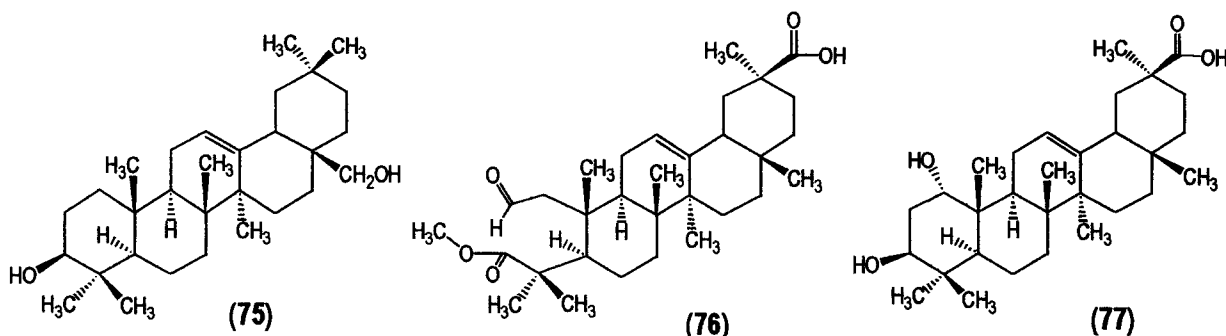
Noutro trabalho de actividade antiartrítica de triterpenos, Varalakshmi, P. *et al.* (1998 a 2001),^{38, 39, 40, 41} também concluíram que a eficácia antiartrítica do linoleato de lupeol (73) era superior à que foi conseguida com o lupeol (48).

Rios, J.L. *et al.* (1995),^{42, 43} isolaram da *Diospyros leucomelas* os triterpenos betulinol (64), ácido betulínico (ácido 3 β -hidróxi-20(29)-lupen-28-óico) (66) e ácido ursólico (59), estes compostos mostraram actividade anti-inflamatória. Para estabelecer uma possível relação entre as estruturas

químicas e as suas propriedades farmacológicas, investigaram a actividade anti-inflamatória de dez triterpenóides pertencentes às séries oleanano (50), ursano (51) e lupano (52). Todos os triterpenóides estudados foram bastante activos contra os edemas. Os autores admitiram que os esqueletos básicos não têm influência na actividade dos compostos, no entanto, a presença de um grupo carboxílico em C-28 ou C-30 ou, a presença de um grupo hidroxilo em C-28 produzem um aumento na actividade anti-inflamatória dos compostos.

Rios, J.L. *et al.* (1997),⁴⁴ estudaram o efeito de alguns triterpenóides na inflamação crónica da pele. Concluíram que o eritrodíol (75) e o ácido ursólico (59) apresentaram actividade biológica significativa.

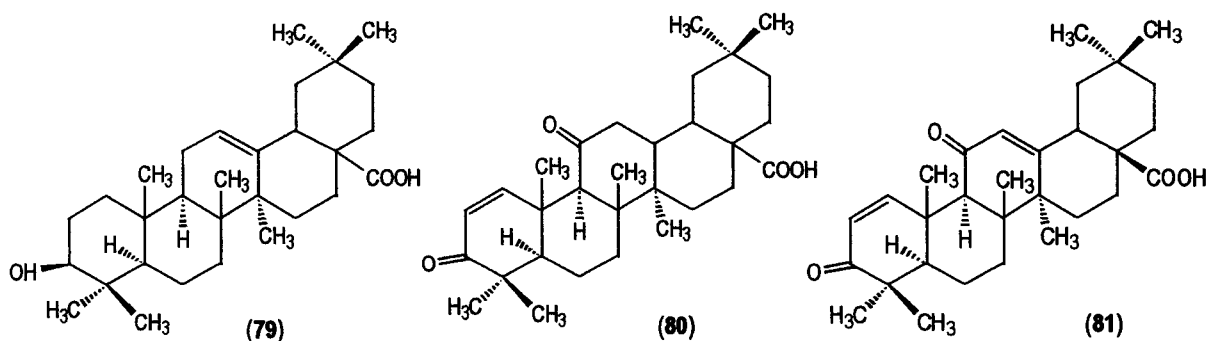
Os triterpenóides de esqueleto oleanano caracterizados como ácido 2,3-seco-2-oxoolean-12-en-3-metiléster-30-óico (76) e ácido 1 α ,3 β -di-hidróiolean-12-en-30-óico (77) (ácidos dillénico D e E), isolados da *Dillenia papuana* por Sticher O. *et al.* (1995),⁴⁵ manifestaram actividade antibacteriana. Através da comparação dos resultados obtidos com estes compostos e com os que foram referidos anteriormente para os ácidos dillénicos A, B e C, estes investigadores admitem que a actividade observada nos ácidos dillénicos pode estar relacionada com a dupla ligação nas posições \square ou \square relativamente ao grupo carboxílico e com a função cetona no anel A do esqueleto oleanano.



O ácido pulsátilico (ácido 3-oxo-23-hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico) (78), triterpenóide da série do lupano, isolado da planta *Pulsatilla chinensis* por Ye, W.C. *et al.* (1996),⁴⁶ exibiu actividade citotóxica contra células do carcinoma do pulmão, tanto da linha celular P-388, Lewis, como de numerosas células de pulmão humano.

Kaiya, T. *et al.* (1997),⁴⁷ avaliaram a citotoxicidade de vários triterpenos contra células de leucemia L1210, cultivadas em meios de cultura com diferentes valores de pH. O ácido betulínico (66) manifestou toxicidade para estas células em meios de pH ligeiramente ácido. Segundo os autores este ácido revelou-se um promissor agente antitumoral contra tumores sólidos, porque, o valor do pH no interior dos tecidos do tumor é normalmente mais baixo do que nos tecidos normais.

Mais de 80 novos triterpenos derivados do ácido ursólico (59) e do ácido oleanólico (79) foram sintetizados por Sporn M.B *et al.* (1998).⁴⁸ Estes compostos foram estudados como potenciais agentes anti-inflamatórios e quimiopreventivos. Foi avaliada a sua aptidão na supressão de renovação de dois enzimas, o *óxido nítrico sintase induzível* (iNOS) e o *ciclooxigenase induzível* (COX-2). Dois destes compostos sintéticos pertencentes à série oleanano (50), o ácido 3,11-dioxolean-1-en-28-óico (80) e o ácido 3,11-dioxolean-1,12-dien-28-óico (81), revelaram-se fortemente inibidores da renovação dos dois enzimas iNOS e COX-2. Outro composto sintético que também inibiu a renovação do enzima COX-2, foi o ácido 3 α -ursólico (82), contrariamente, o seu epímero de ocorrência natural, o ácido 3 β -ursólico (59), não apresentou actividade inibidora. Estes investigadores consideram que é possível desenvolver triterpenóides como agentes úteis na quimioprevenção do cancro ou de outras doenças crónicas com uma componente inflamatória.



Gribble, G.W. *et al.* (1997),⁴⁹ sintetizaram oito composto análogos por clivagem do anel A de triterpenos das série oleanano (50), e ursano (51). Estes compostos foram avaliados relativamente à sua facilidade em inibir a proliferação celular em células da próstata do tipo NRP.152. Quatro compostos resultantes das clivagens apresentaram actividade biológica significativa.

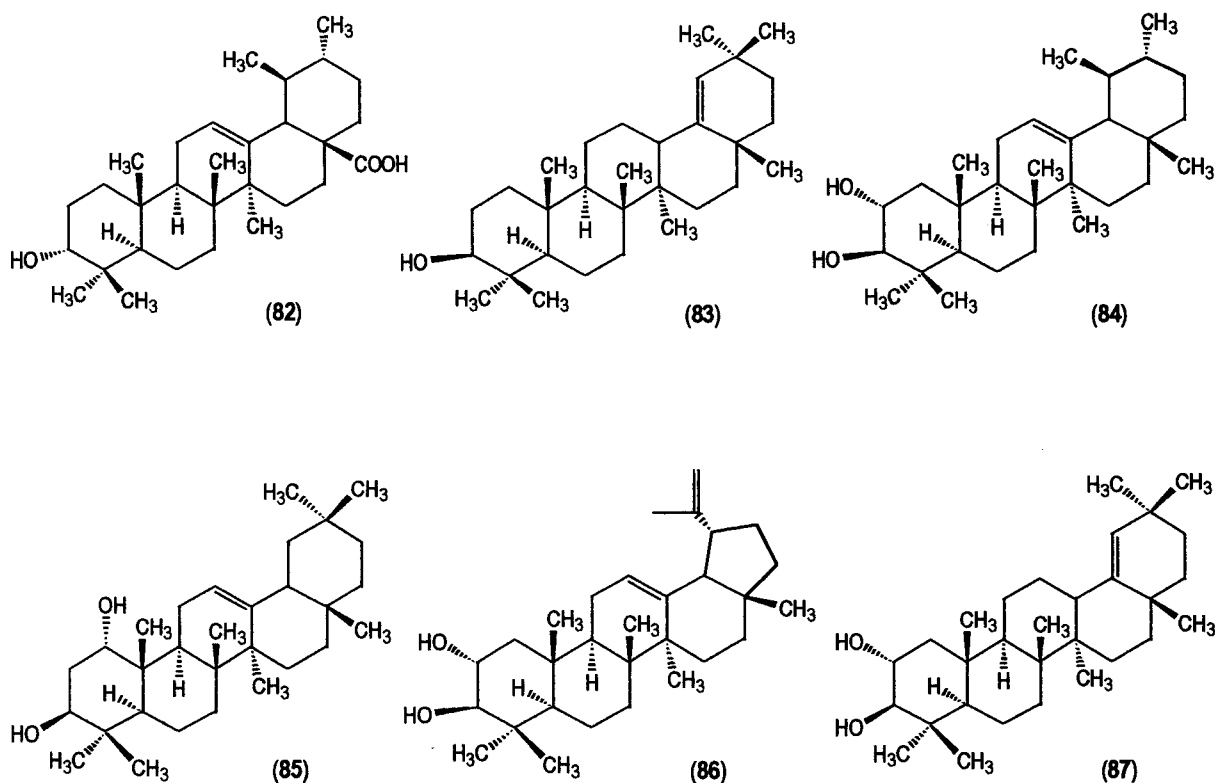
Na medicina popular chilena o trevo *Trevoa trinervis* Miers é utilizado no tratamento de chagas e queimaduras. Backhouse, C.N. *et al.* (1997),⁵⁰ isolaram os ácidos betulínico (66) (metabolito maioritário), oleanólico (79) e ursólico (59) a partir da fracção de diclorometano, esta fracção da planta foi a que apresentou maior actividade anti-inflamatória e antipirética. O ácido betulínico (66) revelou também alguma actividade contra linhas de células neoplásicas, mas apenas actividade residual contra células do melanoma Mel-28.

Da planta *Triphyophyllum peltatum* foi isolado o ácido betulínico (66) por Bringmann G. *et al.* (1997).⁵¹ Este composto exibiu actividade antimalárica contra a fase assexual eritrocítica do *Plasmodium falciparum*, parasita da malária humana.

Segundo Hasmeda, M. *et al.* (1999, 2000),^{52, 53} a α -amirina (**54**) e o lupeol (**48**) são exemplos de compostos triterpénicos anti-inflamatórios potentes inibidores da sub-unidade catalítica (cAK) da proteína ciclica AMP-dependente proteína cinase (PKA) do fígado de rato. Também os ésteres palmitato e linoleato destes compostos apresentam forte actividade inibidora da cAK.

Varalakshmi, P. *et al.* (1999),⁵⁴ testaram a acção protectora do lupeol (**48**) contra a nefrotoxicidade induzida em ratos após administração de cádmio. Os valores dos parâmetros urinários dos animais de controlo reflectiam perturbação na membrana renal, contrariamente, os animais que foram tratados com lupeol (**48**) juntamente com a administração de cádmio apresentaram valores de actividade enzimática próxima do normal, indicador da protecção do rim contra lesões renais induzidas pelo cádmio.

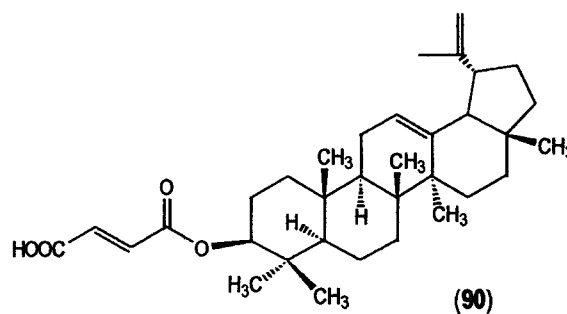
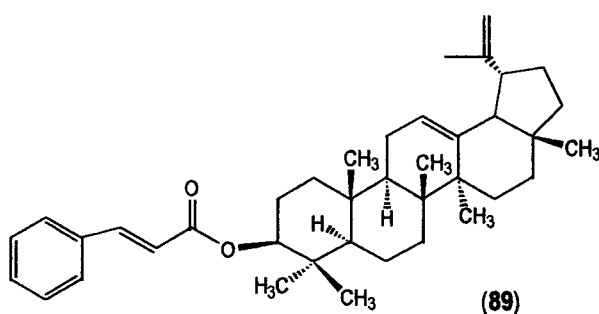
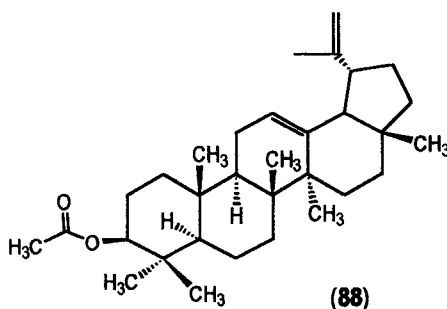
Do extracto de n-hexano da *Marsypianthes chamaedrys* foram separadas duas misturas de compostos triterpénicos por Menezes, F.D. *et al.* (1999).⁵⁵ A primeira contendo os compostos monohidroxilados α -amirina (**54**), β -amirina (**53**), lupeol (**48**) e germanicol (**83**), a segunda, os compostos dihidroxilados chamaedrydiol (urs-12-en-2 α ,3 β -diol) (**84**), castanopsol (1 α ,3 β -di-hidróiolean-12-eno) (**85**), 2 α -hidroxilupeol (**86**) e epigermanidiol (**87**). Foram efectuados testes moluscicidas com o extracto de n-hexano e com as duas misturas. A mistura constituída pelos compostos di-hidroxilados apresentou grande actividade.



Segundo Varalakshmi, P. *et al.* (2000),⁵⁶ os triterpenos lupeol (48) e betulinol (64) apresentam actividade anti-litíase, ambos possuem efeito protector contra a formação de cálculos renais e hepáticos.

O latex da planta *Himatanthus sucuba* é utilizado em medicina popular amazónica como remédio anti-inflamatório. Pinto, A.C. *et al.* (2000),⁵⁷ avaliaram as propriedades farmacológicas da planta e observaram que o extracto de hexano inibia a formação de edema induzido em ratos. Os triterpenos presentes na fracção de hexano foram identificados como acetato de lupeol (88), α -amirina (54) e cinamato de lupeol (89). Entre todas as fracções estudadas, a fracção contendo apenas cinamato de lupeol (89) exibiu o melhor teste de actividade anti-inflamatória. Os autores admitem que este composto pode ser o principal responsável pela actividade do extracto.

Nikiema, J.B. *et al.* (2001),⁵⁸ testaram a actividade anti-inflamatória de vários triterpenos isolados do latex da *Leptadenia hastate*. O lupeol (48) e seus ésteres acetato e palmitato, revelaram-se os principais constituintes com actividade anti-inflamatória. Testes efectuados com hemisuccinato de lupeol (90), produto de hemi-síntese, revelaram que este composto possuía maior actividade do que a apresentada pelo lupeol (48). Os resultados obtidos pelos autores justificam a utilização tópica do latex da *Leptadenia hastate* na medicina tradicional e mostram que a actividade anti-inflamatória do lupeol (48) pode ser aumentada por hemisuccinilação, pelo contrário, a esterificação por acetilação ou palmitoilação diminui esta actividade.



I.3. O estudo fitoquímico da planta *Tolpis barbata*.

O interesse no estudo da planta *T. barbata* surgiu na sequência de uma pesquisa etnobotânica realizada pelo grupo de Química dos Produtos Naturais da Universidade de Évora e destinada a seleccionar espécies espontâneas na região do Alentejo que justificassem o seu estudo fitoquímico.

No inquérito efectuado, alguns criadores de gado consideram que a *T. barbata* é uma planta tóxica. Porém, outros inquiridos suspeitam que a toxicidade poderá ser apenas nalguma fase do crescimento da planta, uma vez que os ovinos e os caprinos a incluem na sua alimentação durante os meses de Verão quando as pastagens escasseiam.

Para avaliar esta questão, Chaveiro, H. B., Candeias, M. F. e Cruz Morais, J. M., (1994),⁵⁹ realizaram um estudo prévio da actividade biológica dos extractos da planta. Este trabalho incidiu principalmente na determinação da toxicidade aguda dos extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol e água. Foram inoculados por via intraperitoneal ratos Swiss macho (murganhos) com a dose única de 1g de extracto/ kg de animal. Os autores concluíram que a fracção butanólica do extracto etanólico e a fracção butanólica do extracto aquoso da planta apresentaram toxicidade aguda, sendo o extracto aquoso o mais tóxico. Os restantes extractos não revelaram este efeito.

Na determinação da DL₅₀ (dose letal para 50% dos murganhos inoculados) os autores utilizaram a fracção butanólica do extracto aquoso e obtiveram como resultado para a DL₅₀ o valor de 56,6 mg/Kg (mg de extracto/ kg de animal).

Nas pesquisas bibliográficas efectuadas até à presente data não foram encontradas referências a estudos fitoquímicos e de actividade biológica com plantas do Género - *Tolpis* Adanson. Por isso, é possível que o estudo da toxicidade aguda da planta tenha sido o primeiro trabalho no âmbito da fitoquímica que se realizou com a *T. barbata*.

A inexistência de estudos anteriores e o interesse em aprofundar o estudo fitoquímico da planta, constituiu a principal motivação para a realização do presente trabalho.

Pode-se dividir este estudo em duas partes mais evidentes. Na primeira estão incluídos objectivos que pretendem revelar aspectos gerais da caracterização química da planta, mas que são úteis por fornecerem dados pertinentes para utilizar no estudo fitoquímico, tais como:

- a determinação do teor de humidade da planta fresca;
- a determinação do peso relativo dos órgãos da planta nas várias fases da sua maturação;

- a determinação da percentagem de extracto de n-hexano, clorofórmio, etanol e água obtidos por digestão a 35° C;
- a determinação da percentagem de extracto de n-hexano, clorofórmio, etanol e água obtidos com extractor de Soxhlet;
- a identificação dos principais grupos de compostos naturais com actividade biológica existentes nos extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol e água;

Na segunda parte deste trabalho iniciou-se o estudo da composição química da *T. barbata*, para o qual foram definidos como objectivos principais, o isolamento, a identificação e a caracterização estrutural de componentes maioritários da fracção menos polar da planta. O estudo incidiu sobre o extracto de n-hexano.

CAPÍTULO II - SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PLANTA

II. Caracterização da Planta



Figura II. 1.: Ilustração da planta *Tolpis barbata*

II.1. Caracterização da planta - *Tolpis barbata* (L.) Gaertner *

II.1.1. Taxonomia

A caracterização taxonómica é feita de acordo com Tutin, T.G. *et al.*:⁶⁰

Subdivisão ANGIOSPERMAE

Classe DYCOTYLEDONE

Ordem - Campanulales

Família - Compositae

Género - *Tolpis* Adanson

Espécie - *Tolpis barbata* (L.) Gaertner

II.1.2. Nome científico

Tolpis barbata (L.) Gaertner. Esta planta foi descrita pela primeira vez em “*De Fructibus et Seminibus Plantarum*” Vol. 2: 372, 1791.

II.1.3. Sinónimos

Não tem sinónimos científicos

* A caracterização da planta foi feita pela Eng^a Marízia Dias Pereira, do Departamento de Planeamento Biofísico da Universidade de Évora, onde estão depositados alguns exemplares da planta.

II.1.4. Nomes vulgares

Leituga; olho-de-mocho.



Figura II. 2.: Ilustração de inflorescências da *Tolpis barbata*

II.1.5. Descrição taxonómica

Planta com 10-50 (6-90) cm de altura, um tanto robusta ou pouco delgada, lanuginosa inferiormente.

As folhas basilares com 2-10 cm, são obovado-oblongas, sinuado-dentadas ou subpenatifendidas, geralmente agudas e as caulinares, oblongo-lanceoladas, subinteiras.

Caule simples ou ramoso, com ramos excedendo o caule principal.

A inflorescência é uma cimeira paniculada, composta por capítulos majúsculos (2-3 cm de diâmetro), com as corolas externas amarelas e as centrais purpúreo-escuras. Estão inseridos em pedúnculos aclavados e providos de poucas a muitas brácteas escamiformes, setáceas e curvas.

Os frutos são aquênios tetragonais, octi-sexcostados, de ordinário com papilho de duas aristas, raras vezes uma a três.

II.1.6. Época de floração

A fenologia da floração estuda o intervalo de tempo que medeia o início e o termo da floração de um taxon. Para esta composta de polinização cruzada, este período coincide, geralmente, com a época do ano mais favorável (Abril a Julho) e com o apogeu dos insectos (agentes polinizadores), “regulado hormonalmente e estimulado basicamente pela temperatura, que deve atingir um determinado limite para que o processo se inicie”.⁶¹

II.1.7. Fisionomia

De acordo com a classificação de Raunkjaer citado por Font Quer, P., trata-se de um terófito, pois, passa o período do ano desfavorável para o seu desenvolvimento, sob a forma de semente.⁶²

II.1.8. Biologia

É uma anual, isto é, nasce, desenvolve, floresce, frutifica e morre durante um período vegetativo (um ano) e invernical, porque nasce no outono e floresce na primavera ou no verão.⁶²

II.1.9. Distribuição fitogeográfica

Em Portugal, Sampaio, G., Coutinho, A. X. P. e Franco, J. A., referem que esta planta aparece em quase todo o país.^{63, 64, 65}

Segundo Valdés, B., aparece a Oeste da região mediterrânica e Tutin, T. G. *et al.*, no Sul da Europa.^{60, 66}

II.1.10. Ecologia

Trata-se de uma planta silicícola dos campos, pastagens, pinhais, sebes e incultos, muito frequente em Portugal Continental.

II.1.11. Biogeografia

Segundo Costa *et al* , a localização biogeográfica das regiões onde foi herborizada a *Tolpis barbata*, é a seguinte:⁶⁷

Reino Holoártico

Região Mediterrânica

Sub-Região Mediterrânica Ocidental

Super-Província Mediterrânica Ibero-Atlântica

Província Luso-Extremadureense

Sector Mariânico-Monchiquense

Sub-Sector Araceno-Pacense

Super-Distrito Alto-Alentejano

CAPÍTULO III – METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. Metodologia, Resultados e Discussão

III.1. Metodologia geral

O processo utilizado na obtenção dos extractos da *T. barbata*, destinados à análise qualitativa dos principais grupos de compostos químicos não voláteis, foi a digestão à temperatura de 35° C. Utilizaram-se por ordem de polaridade crescente os solventes n-hexano, clorofórmio, etanol e água. Nas digestões efectuadas seguiram-se principalmente as indicações de Harborne, J. B.,⁶⁸ Prista, L. N. e Alves, A. C..^{69, 70}

A análise geral dos principais grupos de compostos da planta foi efectuada de acordo com o método proposto por Ciulei, I.⁷¹ tendo-se introduzido pequenas alterações. Enquanto Ciulei, I., propõe que os estudos incidam sobre os extractos de éter etílico, etanol a 95° e água, neste trabalho optou-se por estudar os extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol a 95° e água.

Os testes gerais destinados à caracterização química dos principais grupos de compostos com actividade biológica existentes na planta, incidiram sobre os seguintes grupos de compostos: alcalóides (bases), alcalóides (sais), agliconas flavónicas, flavonósidos, emodóis, antracénósidos, cumarinas, heterósidos cumarínicos, esteróis e/ou triterpenos, heterósidos esterólicos, heterósidos triterpénicos,

carotenóides, óleos voláteis, matérias gordas, ácidos gordos, taninos gállicos, taninos catéquicos, compostos redutores, antocianósidos, glúcidos (oses, polioses).

Após a análise preliminar da composição química da planta e da sua toxicidade aguda, considerou-se que não existiam diferenças significativas na composição química dos extractos resultantes das folhas e dos caules que justificassem a sua análise em separado, por isso, optou-se por estudar em conjunto as folhas e os caules da planta.

A amostra, constituída por caules e folhas da planta previamente seca e posteriormente triturada, foi extraída por lixiviação em extractor de Soxhlet, sucessivamente com n-hexano, clorofórmio, etanol a 95° e água.

O extracto de n-hexano foi fraccionado através de uma cromatografia em coluna sobre sílica gel, utilizando um sistema de eluição de polaridade crescente.

As fracções obtidas com sistemas de eluente de menor polaridade foram recromatografadas em vários sistemas cromatográficos até se conseguir o isolamento dos compostos maioritários dessas fracções. No diagrama III.1 apresentam-se os processos efectuados. Os detalhes referentes ao procedimento de extracção e de separação dos compostos são referidos no capítulo IV.

Na identificação química e na caracterização estrutural dos compostos isolados utilizaram-se os seguintes métodos instrumentais de análise: Ressonância Magnética Nuclear de Protão (*RMN ¹H*), Ressonância Magnética Nuclear Carbono (*RMN ¹³C*), Cromatografia Gasosa em associação com Espectrometria de Massa (*GC-MS*), Espectroscopia de Infra-vermelho (*IV*), Espectroscopia de UV-Visível (*UV-Vis*), além das determinações de propriedades físicas como o ponto de fusão (*pf*) e poder rotatório específico ($[\alpha]_D^{25}$).

III.2. Obtenção dos extractos da *T. barbata* por digestão a de 35° C

A digestão é um processo extractivo que é uma variante da maceração, a diferença reside no facto de se realizar em recipiente fechado e à temperatura de 35° C, enquanto que a maceração é um processo que ocorre à temperatura ambiente. Ambos se baseiam no fenómeno de difusão dos compostos através das paredes das células para a solução extractante. Segundo Prista, L. N. e Alves, A. C.⁶⁹ os períodos de digestão dependem da característica da amostra e poderão ir de 30 minutos até alguns dias. Os extractos aquosos devem ser obtidos em períodos curtos porque se infestam

facilmente por microorganismos, por outro lado, existe também o risco de alguns metabolitos secundários sofrerem hidrólises enzimáticas durante a extracção em meio aquoso.^{68, 69, 70}

Este processo extractivo pode ser muito demorado, no entanto, é um dos mais utilizados quando se pretende isolar produtos naturais, sobretudo, quando se desconhece a composição química do material em análise. Alguns compostos naturais com actividade biológica são destruídos se sujeitos a temperaturas relativamente elevadas, pelo que não se deverá utilizar um método de extracção que utilize uma temperatura de extracção superior a 40° C.⁶⁹

Alguns autores recomendam como solvente para a extracção de compostos polares uma solução aquosa de metanol a 70% (v/v).⁷² As principais vantagens da utilização deste método são a maior facilidade de evaporação do solvente relativamente à água e a eliminação do problema de infestação do extracto por fungos durante as etapas da digestão e da evaporação, dado que estes dificilmente se desenvolvem em meio alcoólico.

No diagrama III.1. esquematizam-se as digestões efectuadas a 35° C com caules e folhas da *Tolpis barbata*.

Para identificar os extractos atribuiu-se-lhes um código. A primeira letra indica o lote da planta, o algarismo representa um dos seus órgãos (Raiz → 1; caule → 2; folha → 3; flor → 4), a segunda letra identifica a solução extractante (n-hexano → H ; clorofórmio → C ; etanol a 95° → E; água → A).

Exemplo do código de um extracto:

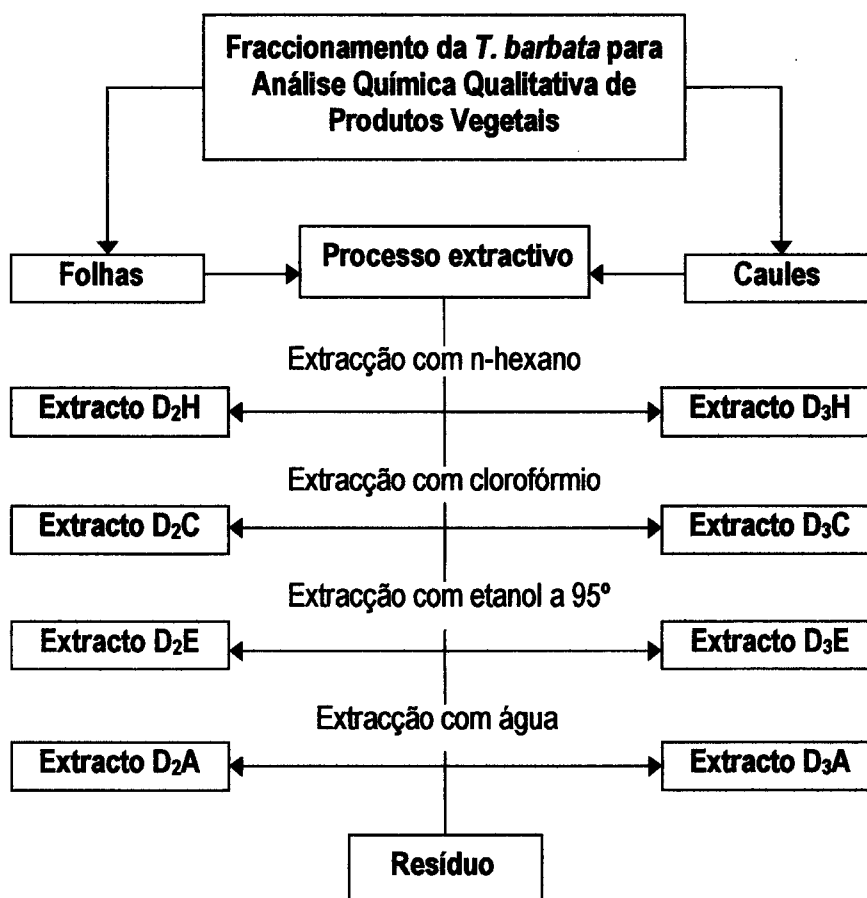
D₂H

D → lote da planta

2 → caule

H → extractante (n-hexano)

Diagrama III.1 - Fraccionamento da amostra por digestões à temperatura de 35° C



III. 2.1. Análise da massa dos extractos da planta

Os extractos obtidos com os diferentes solventes são apresentados no quadro III.1. A massa dos extractos dos caules e das folhas foram analisadas para avaliar a percentagem relativa de cada extracto em função da massa inicial de amostra seca.

Quadro III. 1.: Percentagens dos extractos nas amostras D₂ (caules) e D₃ (folhas) da *T. barbata*.

Solvente	Peso de amostra (g)		Peso de extracto (g)		% de extracto	
	caule	folha	caule	folha	caule	folha
n-Hexano	116,73	34,84	2,3203	1,8179	1,99	5,22
Clorofórmio			0,9105	0,7655	0,78	2,20
Etanol			21,2043	6,8462	18,16	19,65
Água			21,6432	6,5129	18,54	18,69

A análise do quadro III.1 revela que a razão entre a massa dos extractos de n-hexano e de clorofórmio e a massa das amostras de onde foram extraídos, apresenta nas folhas um valor cerca de duas vezes e meia superior à mesma razão obtida nos caules. Relativamente aos extractos de etanol e aquoso não existe diferença significativa na percentagem de compostos polares extraídos por cada solvente em ambos os órgãos da planta.

Quando se relacionam as percentagens de extração obtidas nas folhas e nos caules com os solventes n-hexano e clorofórmio, obtêm-se as relações (1) e (2):

$$(D_2H/D_2) / (D_2C/D_2) = 0,39 \quad (1)$$

$$(D_3H/D_3) / (D_3C/D_3) = 0,42 \quad (2)$$

Quando se relacionam (1) e (2) obtêm-se a seguinte correlação:

$$\text{Correlação} = 0,39/0,42 = 0,93 \quad (3)$$

A correlação (3) evidencia que o método extractivo é aparentemente homogéneo em ambos os órgãos da planta.

As massas do extracto de n-hexano obtido a partir da amostra constituída por folhas da *T. barbata* permitem admitir que é neste órgão da planta que existe maior concentração de compostos de menor polaridade ou/e portadores de cadeias hidrocarbonadas longas, por exemplo, de ésteres de

ácidos gordos, de hidrocarbonetos ou de álcoois de elevada massa molecular, entre outros. Esta dedução está de acordo com Lea P.J e Leegood, R.C.,⁷³ segundo estes autores, as plantas acumulam cerca de 75% dos seus lípidos nas folhas. Os lípidos resultam da esterificação de um álcool de elevado peso molecular com um ácido gordo, frequentemente o palmítico ou o esteárico mas este em menor quantidade.^{74, 75} Estes compostos são conhecidos vulgarmente por ceras, possuem função protectora tanto das folhas como dos frutos e são extraídos facilmente com n-hexano.

III.3. Estudo preliminar da composição química da *T. barbata*

O estudo preliminar da composição química da *T. barbata* baseou-se na análise química qualitativa dos produtos vegetais. Visou detectar a presença de grupos de substâncias que apresentam normalmente actividade biológica. Esta análise é constituída por um conjunto de testes de diagnóstico, geralmente pouco específicos, cuja finalidade é fornecer ao investigador uma orientação sobre a composição geral dos diversos extractos da planta.

Conforme foi referido anteriormente, neste estudo utilizou-se o método de análise de produtos vegetais proposto por Ciulei, I..⁷¹ Os grupos de compostos químicos que se podem detectar através deste conjunto de testes está indicado no quadro III.2.

Quadro III. 2.: Testes efectuados para a caracterização química geral da *T. barbata*

Teste nº	Reacção de:	Grupo de compostos detectáveis
1	Mayer, Bertrand; Dragendorff	Alcalóides (bases), Alcalóides (sais)
2	Schibata	Agliconas flavónicas, Flavonósidos
3	Bomträger	Emodóis, Antracenósidos
4	(Fluorescência UV)	Cumarinas, Heterósidos cumarínicos
5	Liebermann – Burchard	Esteróis e/ou Triterpenos, Heterósidos esterólicos e/ou triterpénicos
6	Carr – Price	Carotenóides
7	(Destilação em corrente de vapor)	Óleos voláteis
8	Saponificação	Matérias gordas, Ácidos gordos
9	FeCl ₃	Taninos gálhicos e Taninos catéquicos
10	Fehling	Compostos redutores
11	(ΔpH ⇒ alteração de cor)	Antocianósidos
12	Timol em meio ácido	Glúcidos (oses, polioses)

III.3.1. Principais grupos de compostos da *T. barbata*

No quadro III.3 resumem-se os resultados das análises nos vários extractos. Estes são identificados pelas letras H, C, E, A., que significam respectivamente, n-hexano, clorofórmio, etanol e aquoso.

Quadro III. 3.: Resultados das análises da caracterização química da *T. barbata*.

Análises	Resultados							
	D ₂ H	D ₃ H	D ₂ C	D ₃ C	D ₂ E	D ₃ E	D ₂ A	D ₃ A
óleos voláteis	-	-	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
matérias gordas, ácidos gordos	+	+	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
esteróis e/ou triterpenos	+	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
carotenóides	-	-	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
alcalóides (bases)	-	-	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
agliconas flavónicas	-	-	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
emodóis	-	-	-	-	-	-	n.e.	n.e.
cumarinas	-	-	-	-	-	-	n.e.	n.e.
taninos gálhicos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-	-	-
taninos catéquicos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	+	+
compostos redutores	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	+	+
alcalóides (sais)	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-	-	-
antracenosídeos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-	n.e.	n.e.
heterósidos cumarínicos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-	n.e.	n.e.
flavonósidos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	+	+
heterósidos triterpénicos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	-	-
heterósidos esterólicos e/ou triterpénicos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	-	-
antocianósidos	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-	-	-
glúcidos (oses, polioses)	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	+	+

Interpretação: - negativo; + positivo; n.e. não efectuado

Pela análise do quadro III.3. verifica-se que as folhas e os caules da *T. barbata* apresentaram em todos os testes de identificação efectuados resultados idênticos. Pode-se admitir que os grupos de compostos identificados se encontram tanto nos caules como nas folhas.

Seguidamente apresentam-se os resultados dos testes efectuados aos diversos extracto.

1) Extracto de n-hexano

O extracto de n-hexano apresenta teste positivo para a reacção de Liebermann – Burchard, por isso poderão estar presentes na amostra esteróis ou triterpenos ou ambos simultaneamente porque a falta de especificidade deste teste não lhe permite diferenciar estes grupos de compostos.

A saponificação da amostra revelou a presença de matérias gordas ou ácidos gordos.

Os testes para a identificação de óleos voláteis, alcalóides, agliconas flavónicas, emodóis, cumarinas e carotenóides apresentaram leitura negativa. Pode significar que no extracto de n-hexano ou não existem ou a sua concentração é tão baixa que não é detectável por este método.

2) Extracto de clorofórmio

Este extracto apresenta teste positivo para a reacção de Liebermann – Burchard, podendo estar presentes na amostra esteróis e/ou triterpenos.

Apresentaram leitura negativa os testes para a identificação de óleos voláteis, alcalóides, agliconas flavónicas, emodóis, cumarinas e carotenóides.

3) Extracto de etanol

Neste extracto obteve-se leitura positiva para os testes de identificação de taninos catéquicos, compostos redutores, flavonósidos, heterósidos triterpénicos e/ou heterósidos esterólicos e glúcidos (oses e polioses).

Apresentaram leitura negativa os testes para a identificação de emodóis, cumarinas, taninos gálhicos, alcalóides, antracénósidos, heterósidos cumarínicos e antocianósidos.

4) Extracto aquoso

O extracto aquoso apresenta testes positivos para os testes de identificação de taninos catéquicos, compostos redutores, flavonósidos e glúcidos (oses e polioses).

Apresentaram leitura negativa os testes para a identificação de taninos gállicos, alcalóides, antocianósidos, heterósidos triterpénicos e/ou heterósidos esterólicios.

III.4. Isolamento de produtos naturais da fracção de n-hexano da *T. barbata*.

Descrevem-se neste ponto os vários compostos que foram isolados a partir do extracto de n-hexano da *T. barbata*. Discutem-se também os aspectos relevantes que permitiram isolar e identificar os referidos compostos.

O extracto obteve-se por lixiviação de uma amostra constituída por folhas e caules de planta seca, utilizando um extractor de Soxhlet.

III.4.1. Extração com aparelho de Soxhlet

Nos casos em que é possível submeter a amostra à temperatura de ebulição do solvente, pode-se fazer a extração a quente através de uma lixiviação. Normalmente utiliza-se um extractor de Soxhlet que permite fazer a extração em contínuo num circuito fechado. Neste aparelho o solvente da solução extractiva é continuamente evaporado, condensado e lançado no topo da coluna contendo o material a extrair.

Este método extractivo apresenta como principais vantagens a rapidez do processo e a economia de solventes. A renovação permanente do solvente puro aumenta a velocidade de dissolução dos compostos, por isso, este método é um dos preferidos quando se pretende maior rapidez. É muito cómodo porque o volume de solvente que será necessário evaporar é pequeno.

Apresenta como principal desvantagem o facto do método de extração utilizar temperaturas relativamente elevadas. À temperatura de ebulição das soluções extractivas alguns compostos naturais poderão sofrer modificações químicas. Como consequência, aqueles que possuem actividade biológica poderão perde-la. Por isso, a aplicação deste processo extractivo no estudo de produtos naturais limita-se aos casos onde se reconhece estabilidade termoquímica nos compostos que se pretendem extrair.

Na Tabela III.1, apresentam-se a massa dos extractos de n-hexano, extraídos por lixiviação com extractor de Soxhlet e por digestão a 35° C e os rendimentos de extracção que se obtiveram nos dois processos.

Tabela III. 1.: Percentagem de massa do extracto de n-hexano da *T. barbata* - extracção com soxhlet

	Lixiviação em soxhlet	Digestão a 35 ° C
Massa de folhas e caules (g)	560,0 g	151,5
Massa de extracto de n-hexano (g)	11,05 g	4,14
Percentagem de extracção (%)	1,97	2,73

Quando se comparam os rendimentos de extracção de ambos os métodos pode-se calcular a eficiência relativa da lixiviação face à da digestão:

$$\eta = ((1,97) / (2,73)) \times 100 = 72,2\%$$

η representa a eficiência relativa da lixiviação face à digestão nas condições em que se efectuaram as extracções.

A percentagem de extracção por lixiviação em aparelho de Soxhlet surge um pouco inferior, mas ao comparar os períodos de extracção de ambos os métodos neste estudo, 18 dias para a digestão e cerca de 60 horas para a lixiviação, pode-se considerar que a eficiência do método mais rápido é boa. Esta poderá ser melhorada se for alargado o período de extracção e se for diminuído o número de extracções recorrendo-se a extractores de maior capacidade.

III.4.2. Fraccionamento do extracto de n-hexano – Cromatografia A

Da extracção de 560 g de caules e folhas da *T. barbata* obteve-se 11,05 g de extracto. Deste extracto, 10,42 g foi fraccionado em coluna de sílica gel por um sistema de solventes de polaridade crescente (cromatografia A).

A eluição teve como solvente inicial o n-hexano passando-se para misturas de solventes de maior polaridade. Como eluentes utilizaram-se éter isopropílico, éter etílico, clorofórmio, acetato de etilo, metanol e água.

Na cromatografia A obtiveram-se 211 fracções. Neste trabalho estudaram-se as primeiras 50 fracções totalizando 6,660 g de extracto, que representa 64% da massa total do extracto de n-hexano cromatografado. Identificaram-se 28 compostos, tendo-se isolado 9 compostos de esqueleto triterpénico pentacíclico.

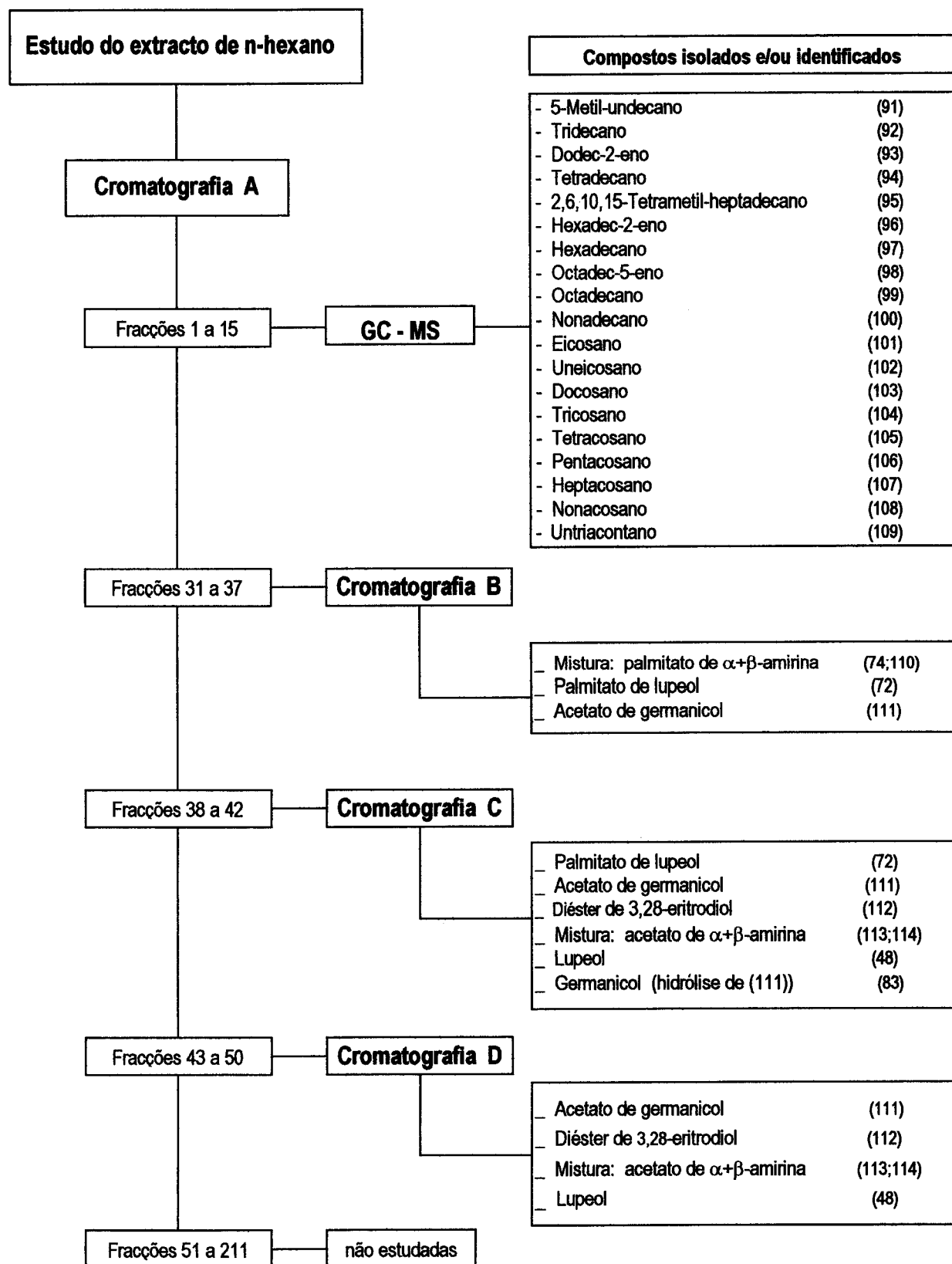
Como a amostra não foi descerada, puderam-se identificar 19 hidrocarbonetos de cadeia longa e quatro ésteres de ácidos gordos esterificados com álcoois triterpénicos. Tanto os hidrocarbonetos como os ácidos gordos identificados são frequentes na maioria das plantas.

Para tornar mais perceptível a explicação do isolamento e identificação dos referidos compostos, apresenta-se de forma resumida a marcha geral seguida no processo de análise, ver diagrama III.2.

III.5. Separação e identificação dos hidrocarbonetos da *T. barbata*.

Na mistura que se obteve pela reunião das fracções A₁ a A₁₅ da eluição da coluna A com n-hexano, foram identificados hidrocarbonetos de cadeia carbonada longa (compostos (91) a (109)).

Na análise desta fracção do extracto de n-hexano da *T. barbata* recorreu-se às técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (*RMN* ¹H) e de Carbono (*RMN* ¹³C) para reconhecimento dos grupos funcionais existentes na mistura. Na separação e identificação dos compostos foi utilizada a Cromatografia Gás-Líquido em associação com a Espectrometria de Massa (*GC - MS*).

Diagrama III. 2. Resumo dos compostos isolados e/ou identificados no extracto de n-hexano da *T. barbata*

III.5.1. Identificação de hidrocarbonetos da *T. barbata* por GC-MS.

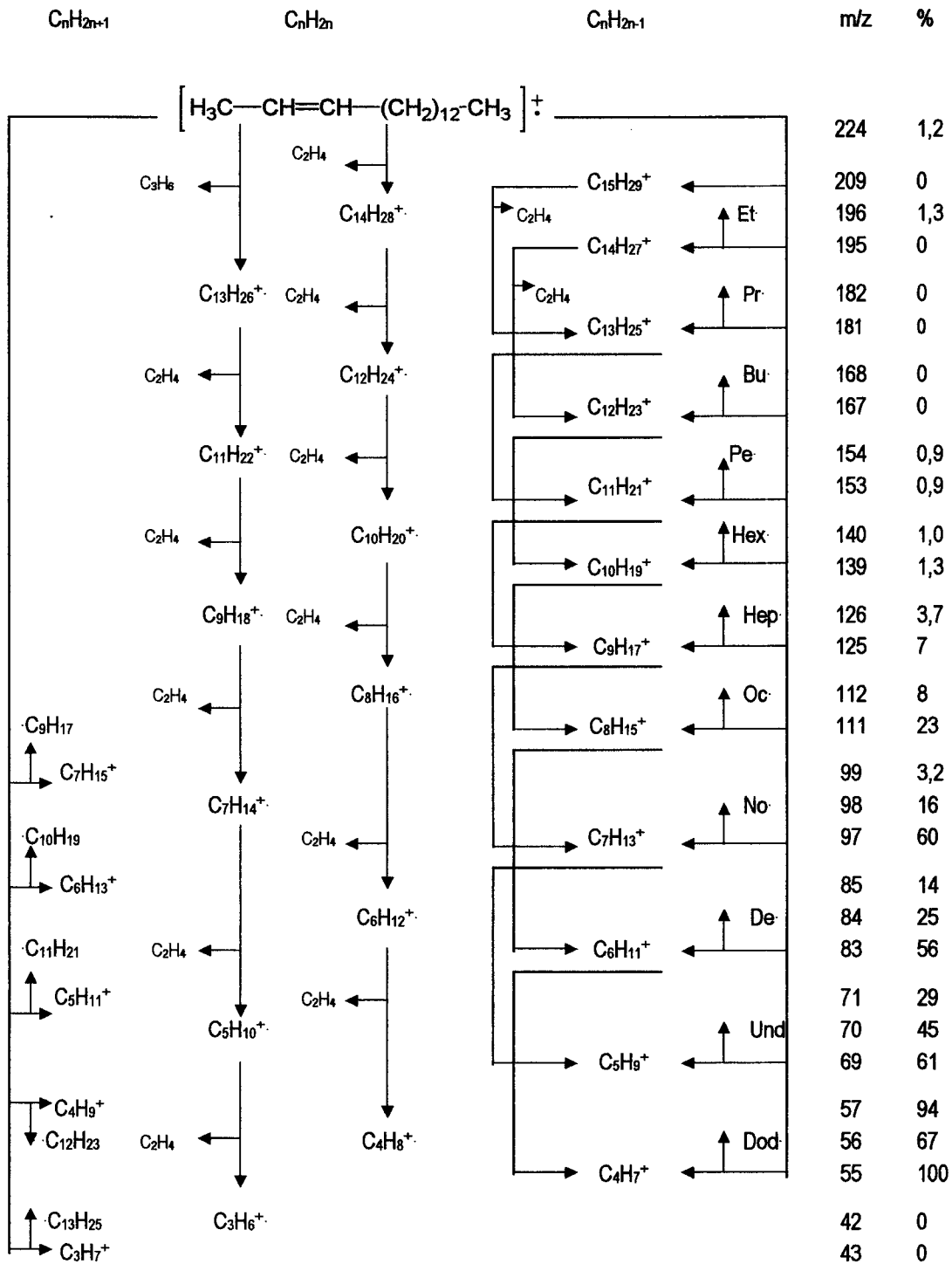
A identificação dos compostos fez-se por interpretação dos espectros de massa em conjugação com a comparação directa de outros espectros existentes na base de dados do espectrometro de massa (*VG MassLab DataBase: WILEY*). A identificação da maioria dos hidrocarbonetos foi confirmada por comparação dos seus espectros de massa com os espectros de compostos padrão.

Nos esquemas III.1 a III.3 analisam-se as principais fragmentações sofridas pelos compostos hexadec-2-eno (**96**), hexadecano (**97**) e octadec-5-eno (**98**).

Nas figuras III.1 a III.5 representam-se os compostos (**91**) a (**109**) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores da relação massa/carga dos iões (m/z).

Esquema III. 1.: Interpretação do espectro de massa do composto hexadec-2-eno (96)

(GC-MS: espectro nº 1428 ; tr: 23,802 min.)



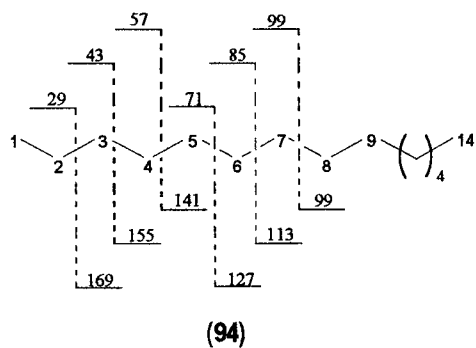
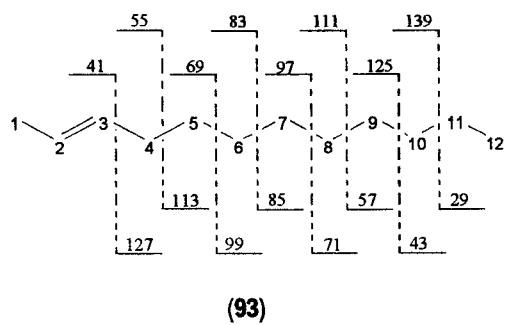
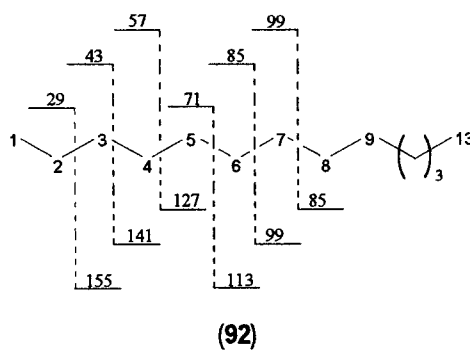
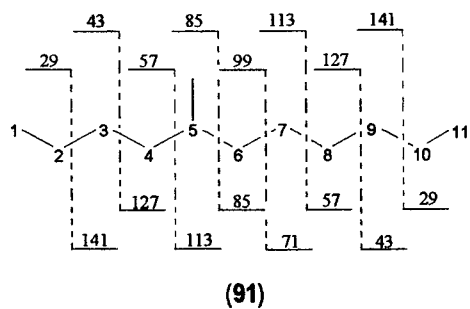
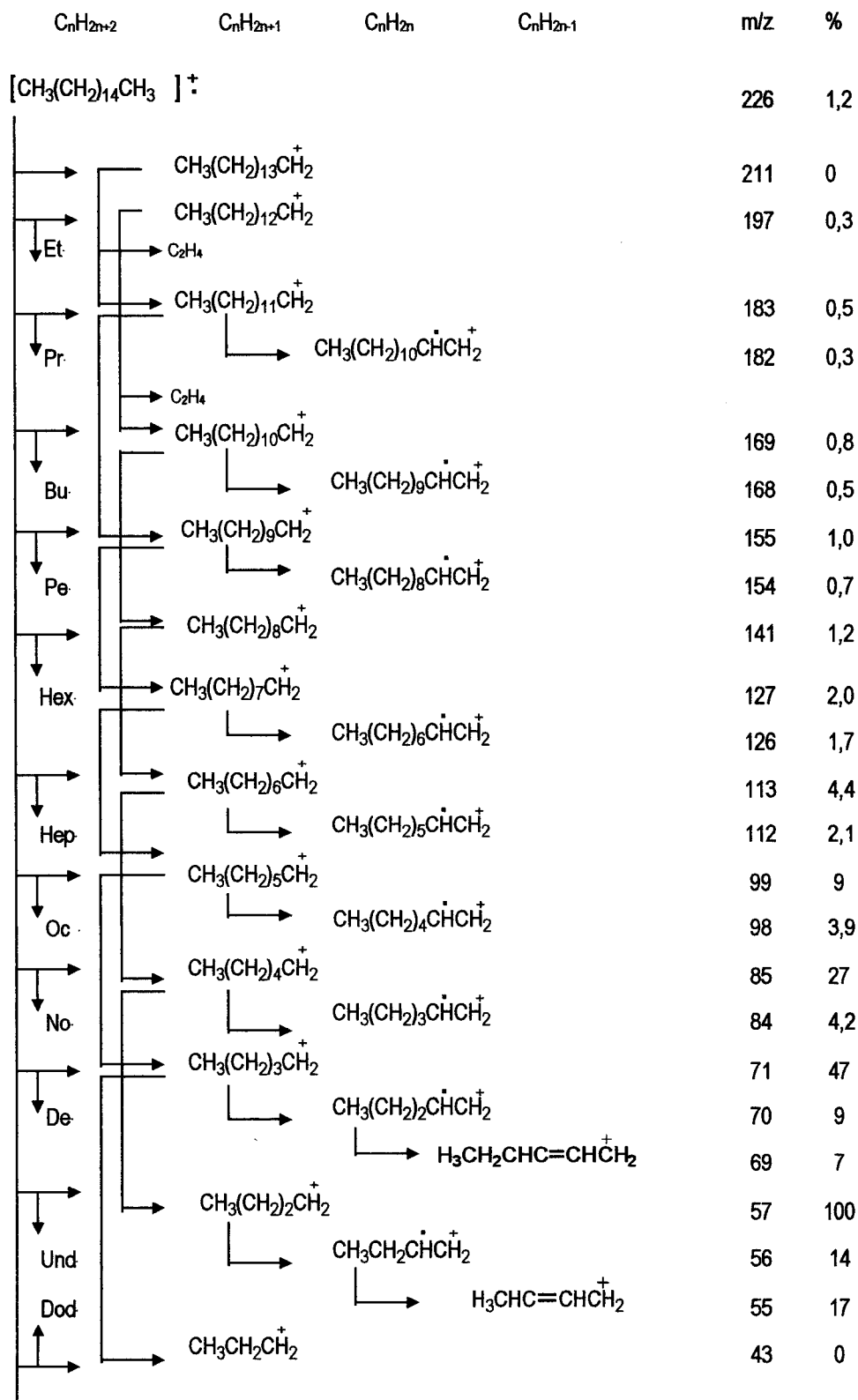


Figura III 1.: Representação dos compostos (91) a (94) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z) .

Esquema III.2.: Interpretação do espectro de massa do composto hexadecano (97)

(GC-MS: espectro nº 1440 ; *tr* 24,002 min.)

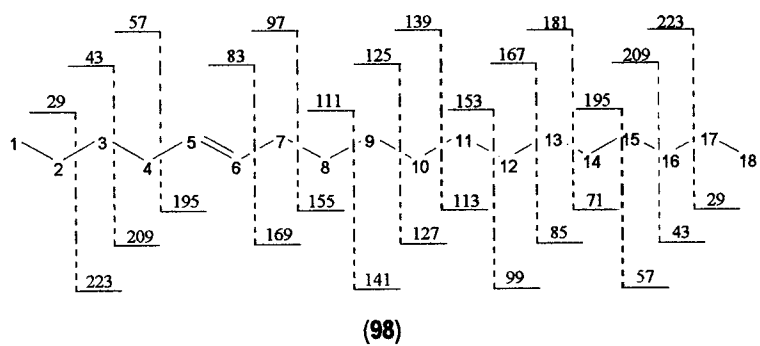
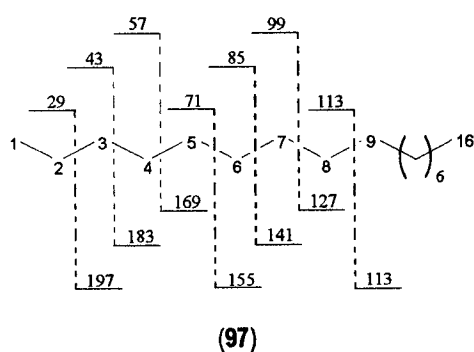
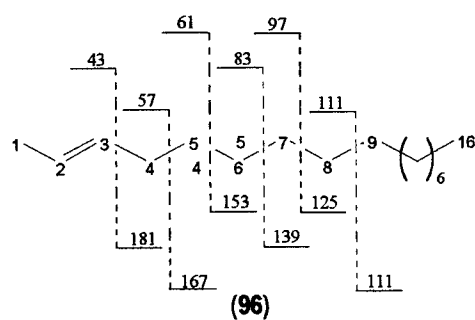
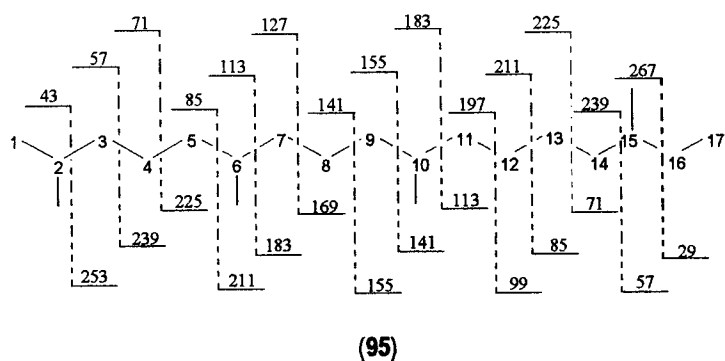
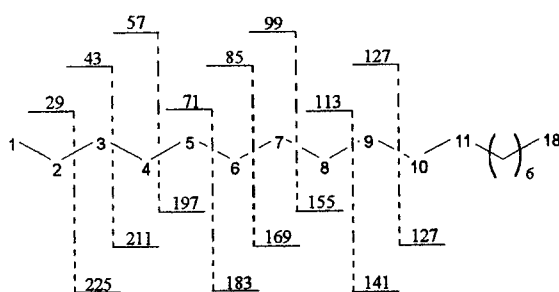
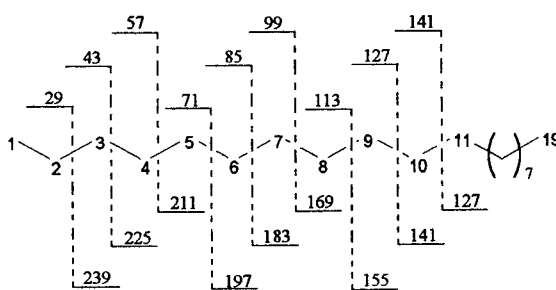


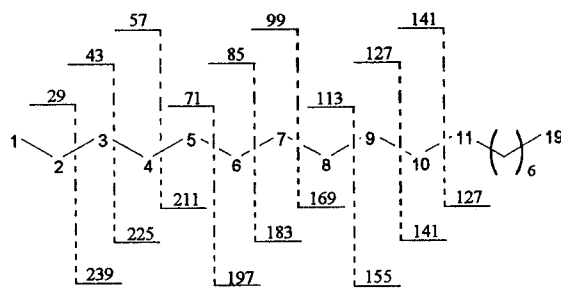
Figura III 2.: Representação dos compostos (95) a (98) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de (m/z).



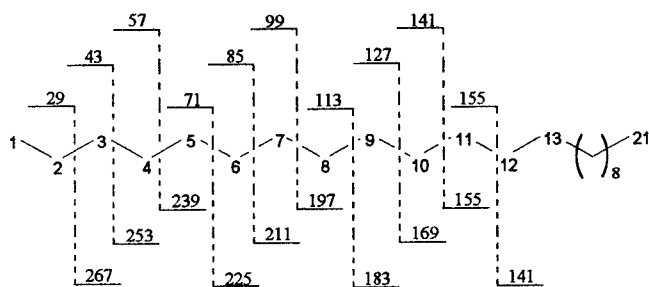
(99)



(100)



(101)

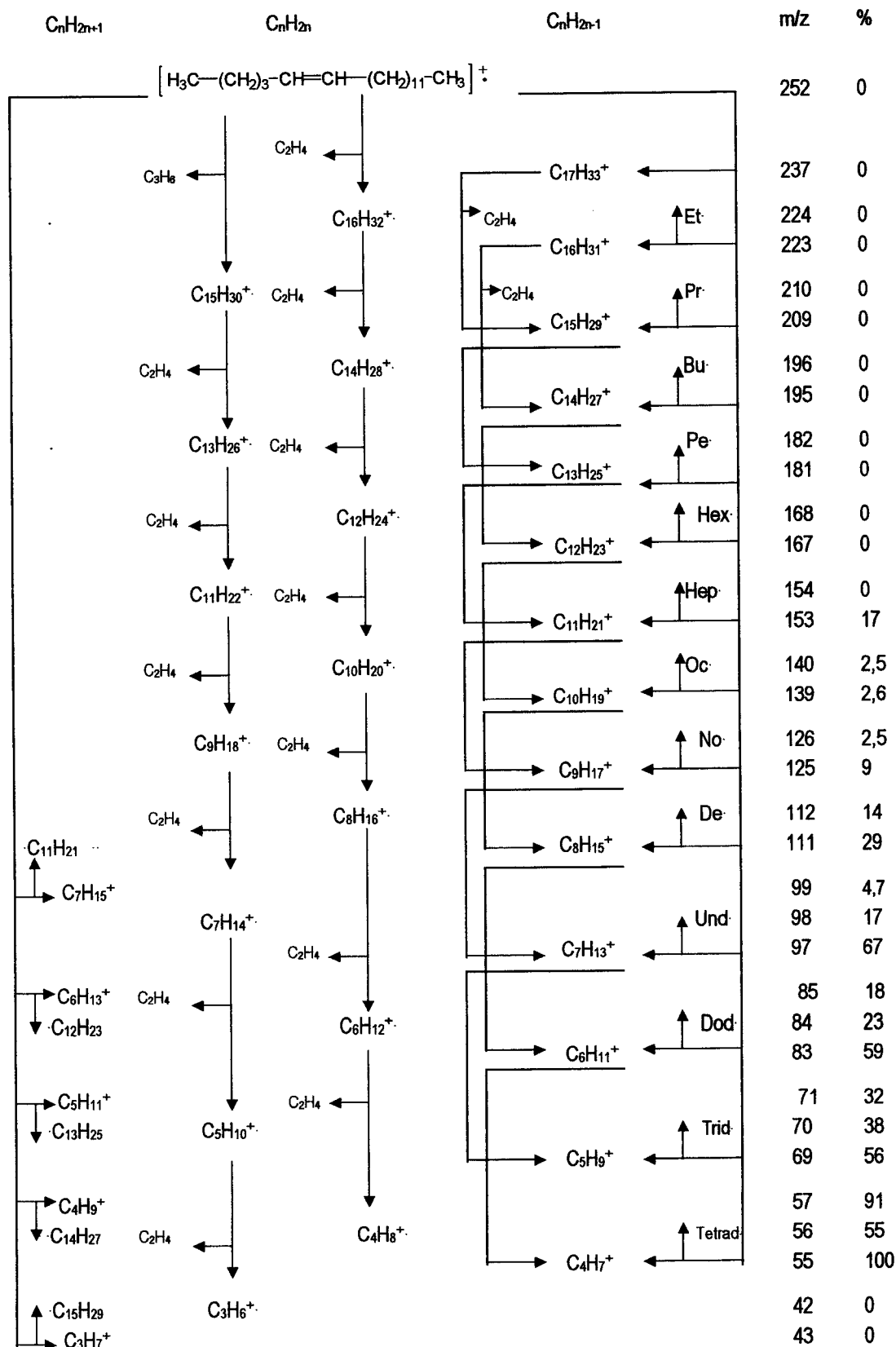


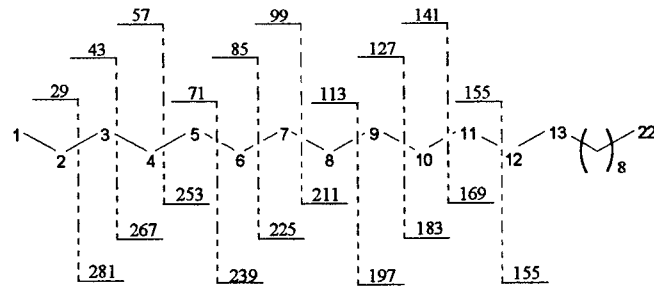
(102)

Figura III 3.: Representação dos compostos (99) a (102) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de m/z .

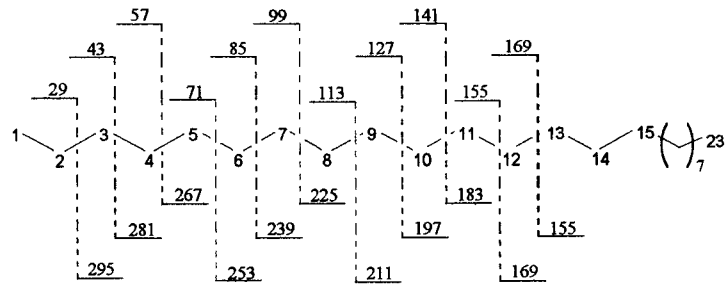
Esquema III.3.: Interpretação do espectro de massa do composto octadec-5-eno (98).

(GC-MS: espectro nº 1724 ; tr: 28,735 min.)

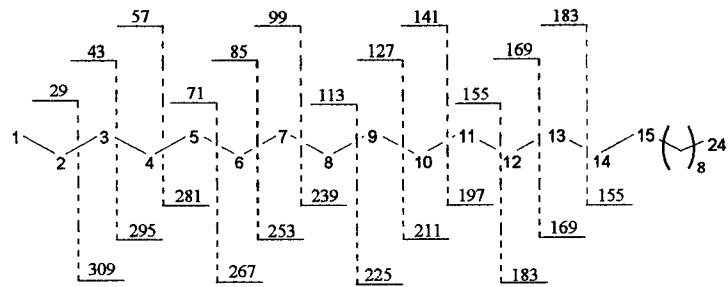




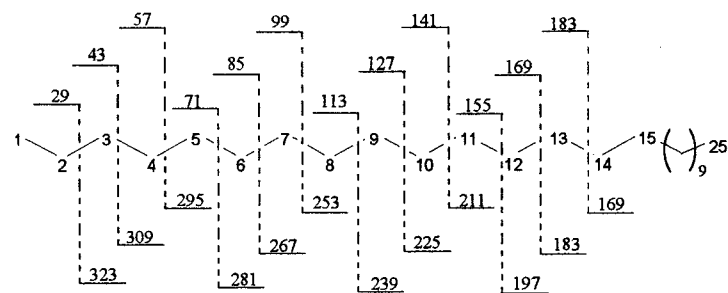
(103)



(104)



(105)



(106)

Figura III 4.: Representação dos compostos (103) a (106) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de m/z .

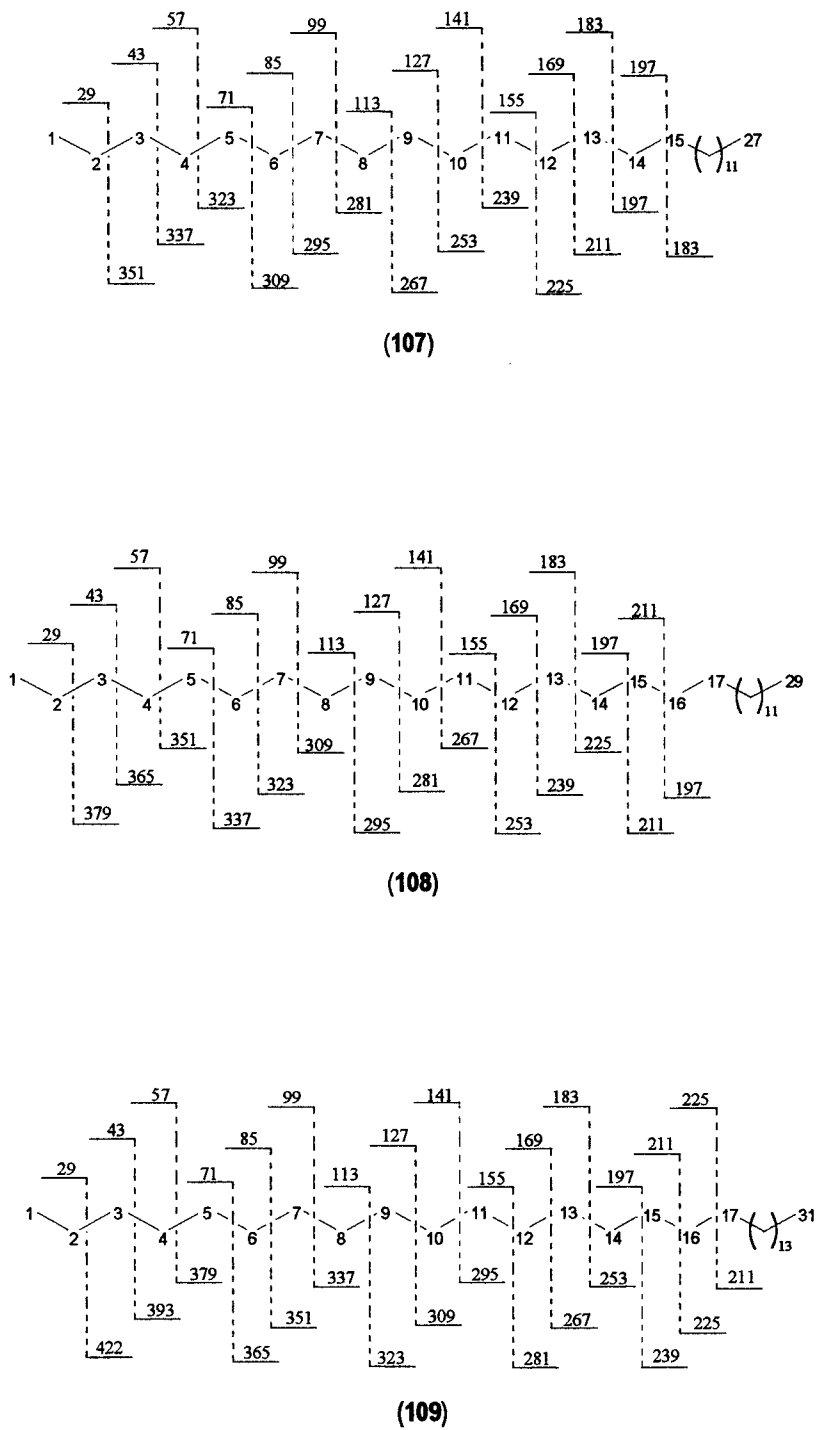


Figura III 5.: Representação dos compostos (107) a (108) com indicação das principais fragmentações e respectivos valores de m/z .

Os compostos identificados pela técnica de GC-MS são apresentados no quadro III.4 pela sequência dos respectivos tempos de retenção na cromatografia gasosa.

Quadro III. 4.: Hidrocarbonetos da *T. barbata* identificados por análise de GC - MS

Tempo de retenção (min.)	lão molecular m/z (% relativa)	Composto	Código
9,37	170 (1,9)	5-Metil-undecano	(91)
14,13	184 (1,8)	Tridecano	(92)
17,67	168 (.....)	Dodec-2-eno	(93)
17,97	198 (1,8)	Tetradecano	(94)
20,02	296 (.....)	2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano	(95)
23,80	224 (1,2)	Hexadec-2-eno	(96)
24,00	226 (1,2)	Hexadecano	(97)
28,73	252 (.....)	Octadec-5-eno	(98)
28,88	254 (1,0)	Octadecano	(99)
31,14	268 (0,7)	Nonadecano	(100)
33,15	282 (1,0)	Eicosano	(101)
35,12	296 (0,6)	Uneicosano	(102)
36,99	310 (.....)	Docosano	(103)
38,79	324 (0,6)	Tricosano	(104)
40,52	338 (.....)	Tetracontano	(105)
42,50	352 (0,4)	Pentacosano	(106)
47,85	380 (0,3)	Heptacosano	(107)
53,60	408 (0,2)	Nonacosano	(108)
53,60	436 (0,3)	Untriacontano	(109)

III.5.2. Isolamento e caracterização estrutural de uma mistura de palmitatos de α + β -amirina.

As fracções A₃₁ a A₃₇, eluídas com éter isopropílico na cromatografia A, foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel G60 - *cromatografia B*. Nas fracções B₁₁ a B₂₁, separou-se com n-hexano, 177 mg de uma mistura constituída por compostos pouco polares. Efectuaram-se várias cromatografias em camada fina tendo-se observado três manchas. Uma das manchas apresentava R_f muito elevado, as outras duas estavam praticamente sobrepostas. Nos vários sistemas de eluentes usados na cromatografia em camada fina (CCF) não foi possível separar as manchas que apresentavam os valores de R_f muito semelhantes. Admitiu-se por isso, que seriam compostos com grande semelhança química.

Para isolar o componente de maior R_f desta mistura, fez-se uma cromatografia em camada fina preparativa (CCFP) em sílica gel G60. Esta separação designou-se por cromatografia 1P e dela resultaram três fracções, que se apresentam por ordem de polaridade crescente: 1P₁; 1P₂; 1P₃.

O espectro de RMN ¹H da fracção 1P₁ apresenta sinais que correspondem ao perfil característico de compostos de estrutura linear. Por não apresentar sinais atribuíveis a qualquer outro grupo funcional não se fez a caracterização estrutural do composto.

Os espectros de RMN ¹H das fracções 1P₂ e 1P₃ revelaram-se quase idênticos, por isso, estas fracções foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel:nitrato de prata - *cromatografia B*₁. Na eluição com n-hexano, isolaram-se 92 mg de um sólido branco amorfo que não foi possível purificar. Foram efectuadas diversas cromatografias monitorizadas por CCF que apresentaram invariavelmente duas manchas praticamente sobrepostas.

No espectro de IV desta mistura, observa-se uma banda de forte intensidade a 1734 cm⁻¹, que pode estar associada à vibração de alongação do grupo funcional carbonilo (de ésteres ou lactonas). Observam-se também as bandas de intensidade média centradas a 1174 cm⁻¹ e a 989 cm⁻¹, atribuíveis a vibrações de alongação das ligações C-O, características da presença de ésteres na mistura. A presença de uma banda de fraca intensidade a 1620 cm⁻¹ pode ser atribuída a um grupo alceno.⁷⁶

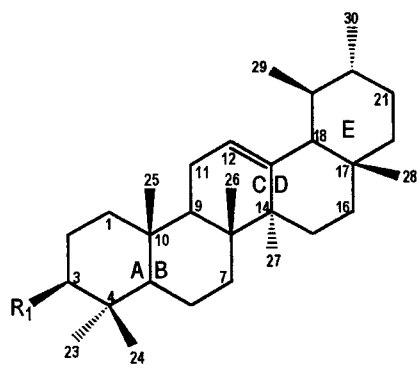
No espectro de RMN ¹H da mistura dos compostos (74;110) observa-se um multipeto centrado a δ 4,50 ppm (1H, m) característico de um próton geminal a um grupo éster - RCOOCH₁R₂.^{77, 78} O sinal centrado a δ 2,29 ppm (2H, t, J=7,4 Hz) é atribuível aos prótons metilénicos do átomo de carbono em posição α relativamente ao grupo carbonilo da cadeia carbonada - CH₃(CH₂)_nCH₂OCOR.^{79, 80, 81} A existência de dois tripletos centrados a δ 5,17 e a δ 5,13 ppm (1H, t, J=3,6 Hz), característicos do próton olefinico em H-12 dos triterpenos pentacíclicos do tipo olean-12-eno e urs-12-eno,

respectivamente, em conjunto com os outros sinais detectados, permitem identificar a presença de β -amirina e de α -amirina.^{82, 83, 84}

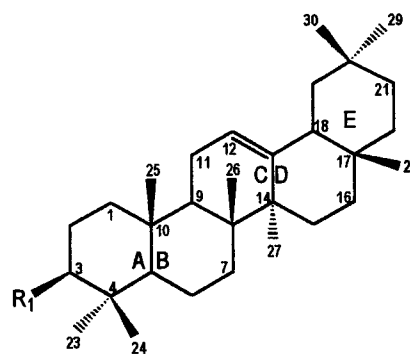
Entre δ 1,13 e δ 0,83 ppm observam-se diversos sinais singuleto relativos à ressonância de grupos metilo de compostos com esqueleto triterpénico.

No espectro de *RMN* 1H observa-se ainda a presença de um sinal muito intenso a δ 1,25 ppm, sugerindo a existência de um número elevado de grupos CH_2 , pelo que o composto deve apresentar uma cadeia linear. A existência de um tripleto centrado a δ 0,79 (3H, s, $CH_3(CH_2)_nCOOR$) atribuível aos prótons metílicos da cadeia linear do grupo éster, e a ausência neste mesmo espectro de um singuleto a δ 2,03 ppm exclui a possibilidade da existência de grupo acetato na mistura e admite a possibilidade de se tratar de ésteres de cadeia longa.

O sinal a δ 2,29 ppm é característico de compostos que foram esterificados com ácido palmítico. A comparação dos dados de *RMN* 1H com dados da literatura,^{79, 80, 81, 82, 83, 84} permite aceitar que a mistura de compostos (74 ; 110) proveniente das fracções 5 a 10 da cromatografia B₁, é uma mistura de palmitato de α -amirina (74) e palmitato de β -amirina (110).



3 β -palmitóxiurs-12-eno (74)
(palmitato de α -amirina)



3 β -palmitóxiolean-12-eno (74)
(palmitato de β -amirina)

III.5.3. Isolamento e caracterização estrutural do lupeol.

As fracções A₄₃ a A₅₀, eluídas com éter isopropílico, foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel G60 - *cromatografia D*. Nesta cromatografia isolou-se com uma mistura de n-hexano/éter etílico (98/2) (fracções D₆₈ a D₇₂) 293 mg de um sólido cristalino incolor, composto (48), apresentando o p.f. 212- 214 °C e $[\alpha]_D^{22} + 27,8^\circ$ (c= 0,19; CHCl₃).

O espectro de IV apresenta uma banda a 3330 cm⁻¹ atribuível a um grupo hidroxilo, confirmada pela presença de uma banda forte a 1037 cm⁻¹ atribuível a vibração de alongação C-O. Na região da absorção da alongação dos grupos C-H apresenta uma banda muito intensa a 2945 cm⁻¹, o que sugere a existência de um número elevado de ligações C-H. Também apresenta uma banda média a 1643 cm⁻¹ atribuível à alongação da ligação dupla C=C em carbono vinílico, confirmada pela existência de uma banda fraca a 3080 cm⁻¹. Por último, a presença de uma banda fraca a 882 cm⁻¹ atribuível a vibrações de deformação de um grupo metileno terminal sugere a existência de um grupo R₁R₂C=CH₂.^{76, 85, 86}

No espectro de *RMN* ¹H do composto (48), figuras III.6 a III.8, pode-se observar:

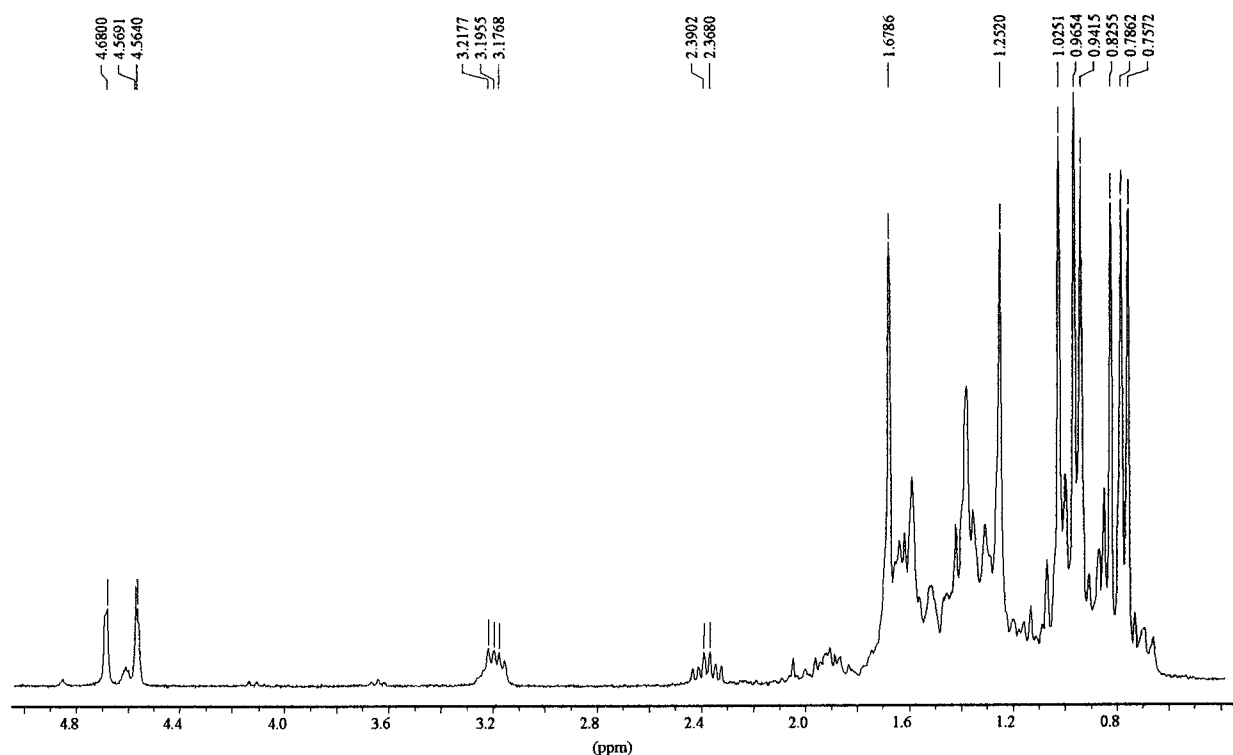


Figura III 6.: Espectro de *RMN* ¹H do composto (48)

- dois singletos largos entre 4,40 - 4,80 ppm (figura III.7), um centrado a 4,68 ppm (1H) e o outro centrado a 4,56 ppm (1H), característicos de prótons vinílicos geminais, atribuídos ao acoplamento vicinal, em posição *anti* e *syn*, de um agrupamento de tipo $\text{CH}_2=\text{CCH}_3\text{R}$,^{86, 87, 88} esta atribuição pode ser confirmada pela existência de um singuleto a 1,68 ppm (3H) atribuível a um grupo metilo em posição α relativamente à dupla ligação $\text{C}=\text{C}$, o que reforça a hipótese anterior e sugere a existência de grupo isoprenilo no composto;^{86, 88}

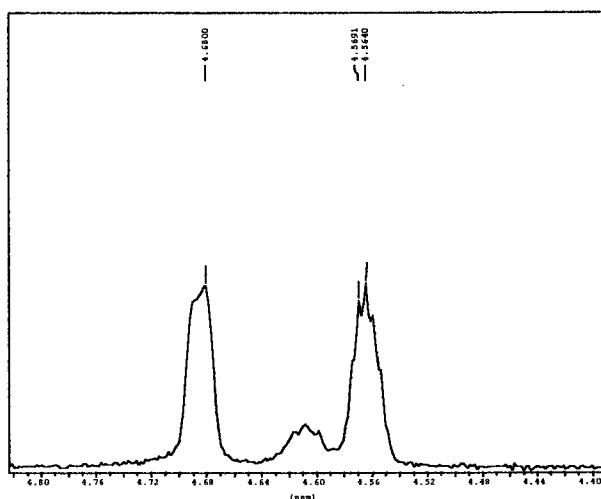


Figura III 7.: Ampliação do espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ do composto (48) entre δ 4,40 a 4,80 ppm.

- um duplo tripleto centrado a 2,38 ppm (1H; dt; $J_1 = 5,5 \text{ Hz}$, $J_2 = 10,9 \text{ Hz}$) na zona do espectro

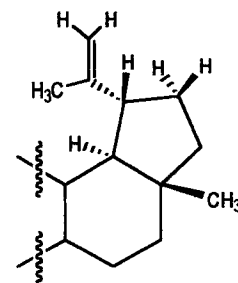
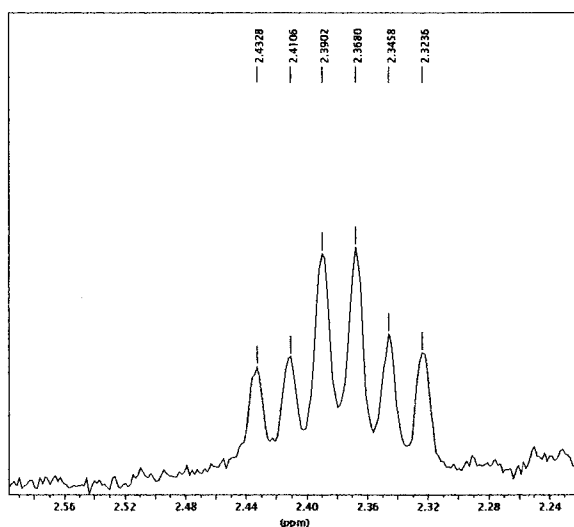


Figura III 8.: Ampliação do espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ do composto (48) entre δ 2,20 e δ 2,60 ppm e grupo isoprenilo ligado a um anel pentacíclico de um esqueleto ursano.

compreendida entre δ 2,20 – 2,60 ppm (figura III.8), que pode ser originado pelo acoplamento de um próton metínico vicinal a um carbono sp^2 de um alceno,⁸⁸ o qual acopla com os dois prótons do metileno adjacente, podendo originar um tripleto. Este metino pode acoplar simultaneamente com o próton de um metino vicinal em posição *anti.*, desdobrando o tripleto inicial num duplo tripleto. O acoplamento entre os dois metinos apresenta uma constante de acoplamento de $J = 5,5$ Hz;

- um multiplete centrado a δ 3,20 (1H, m) na zona do espectro compreendida entre δ 3,10 - 3,30 ppm, atribuível ao acoplamento de um metino em posição geminal relativamente a um grupo OH e com um metileno adjacente na mesma cadeia carbonada;⁸⁸

- seis singuletos (3H cada) com os desvios químicos δ 1,02, 0,96, 0,94, 0,82, 0,79 e 0,76 ppm, atribuíveis a outros tantos grupos metilo.

A análise do espectro de *RMN* ¹H permite colocar a hipótese de estarmos perante um composto de um esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo lupano, no qual se podem identificar os prótons H-29 (4,68 e 4,56 ppm), H-30 (1,68 ppm), H-19 (2,38 ppm) e H-3 (3,20 ppm).

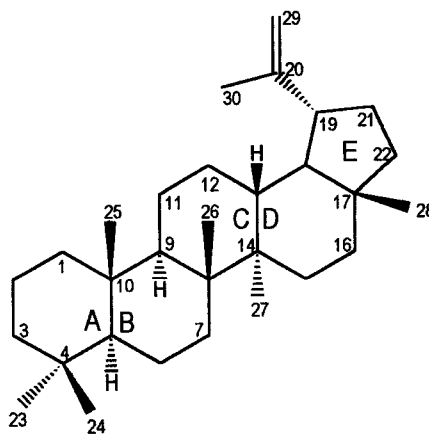


Figura III 9.: Esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo lupano.

No espectro de *RMN* ¹³C com desacoplamento prótonico de banda cheia podem-se observar os sinais relativos aos átomos de carbono do composto. Na figura III.10 existem 30 sinais que representam a totalidade dos átomos de carbono do composto (48).

O espectro de *RMN* ¹³C - DEPT com pulso a 135°, permite observar na sua zona positiva os sinais produzidos pelos átomos de carbono dos grupos CH₃ e CH, os sinais invertidos representam os

átomos de carbono dos grupos CH_2 . No espectro de $\text{RMN } ^{13}\text{C} - \text{DEPT}$ com pulso a 90° observam-se apenas os sinais relativos aos grupos CH .^{89, 90, 78, 91} Pela análise das figuras III.10 e III.11, podem-se identificar sete grupos metilo, onze grupos metileno, dos quais um é olefínico, seis grupos metino e seis átomos de carbono tetrasubstituídos, sendo um olefínico.

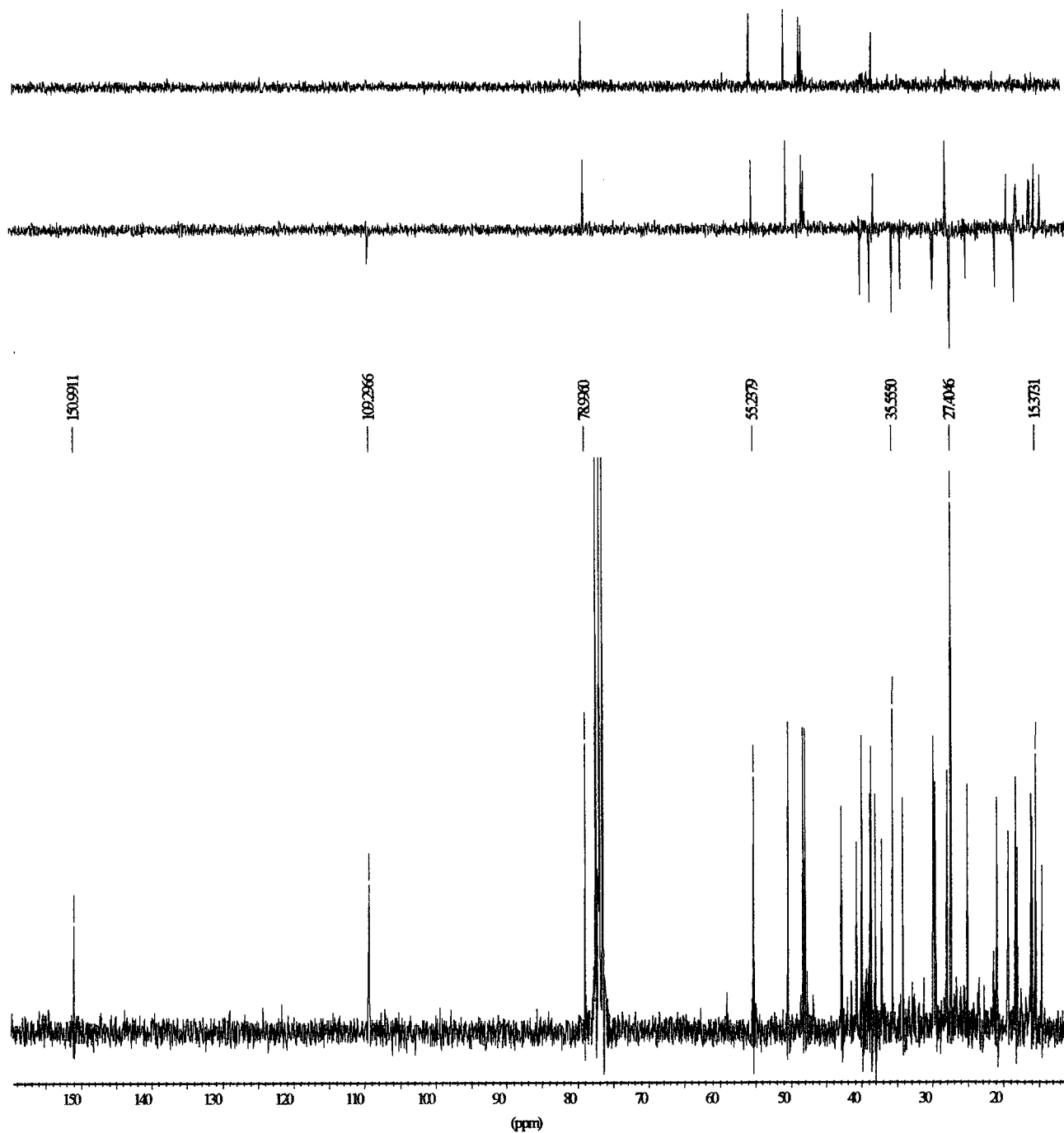


Figura III 10.: Espectros de $\text{RMN } ^{13}\text{C} - \text{DEPT}$ do composto (48);
em baixo, desacoplamento protônico de banda cheia; a meio, espectro DEPT com pulso a 135° ;
em cima, espectro DEPT com pulso a 90° .

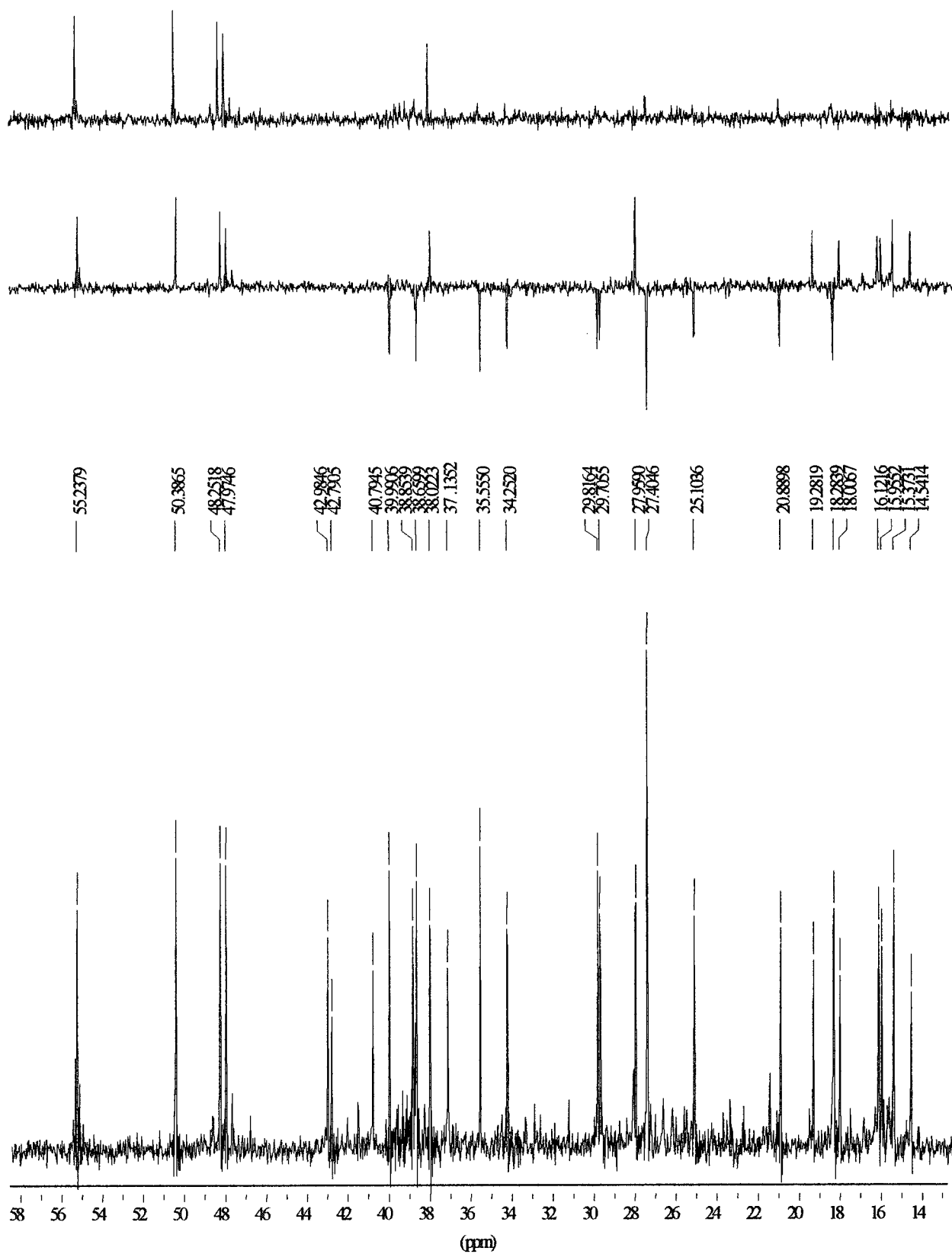


Figura III 11.: DEPT da região alifática dos espectros de RMN ^{13}C do composto (48)

Na tabela III.2 representam-se os valores dos desvios químicos dos sinais observados nos espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (48) e a respectiva atribuição aos diversos tipos de grupos a que os átomos de carbono pertencem no composto.

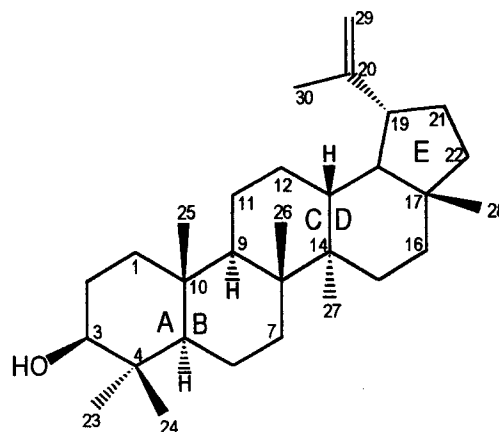
Tabela III. 2.: Relação dos tipos de carbono do composto (48) identificados por $RMN^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono						
$-CH_3$	$\diagup CH_2$	$=CH_2$	$-CH$	$R-CH$	$-C-$	$=C$
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
14,5	18,3	109,3	38,0	79,0	37,1	150,99
15,4	20,9		48,0		38,8	
15,9	25,1		48,2		40,8	
16,1	27,4		50,4		42,8	
18,0	27,4		55,2		43,0	
19,3	29,8					
28,0	34,2					
	35,6					
	38,7					
	40,0					

A análise dos espectros de $RMN^{13}C$ e de RMN^1H e a comparação dos sinais observados com os dados da literatura,^{92, 88, 93, 94, 95, 96, 97, 98} permite confirmar a existência de um esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo lupano, pela presença dos sinais a:

- 109,3 ppm característico de um carbono sp^2 metilénico, C-29;
- 150,9 ppm característico de um carbono quaternário insaturado, C-20;
- 19,3 ppm característico de um carbono metílico terminal, C-30;

A ausência de sinais na zona 125 a 145 ppm, característicos da existência de duplas ligações nas cadeias cíclicas, e o sinal a 79,0 ppm característico de um carbono metínico hidroxilado em C-3, reforça a hipótese de identificar o composto (48) como sendo o 5α -lup-20(29)-en-3 β -ol conhecido por lupeol.

5 α -lup-20(29)-en-3 β -ol (**48**)

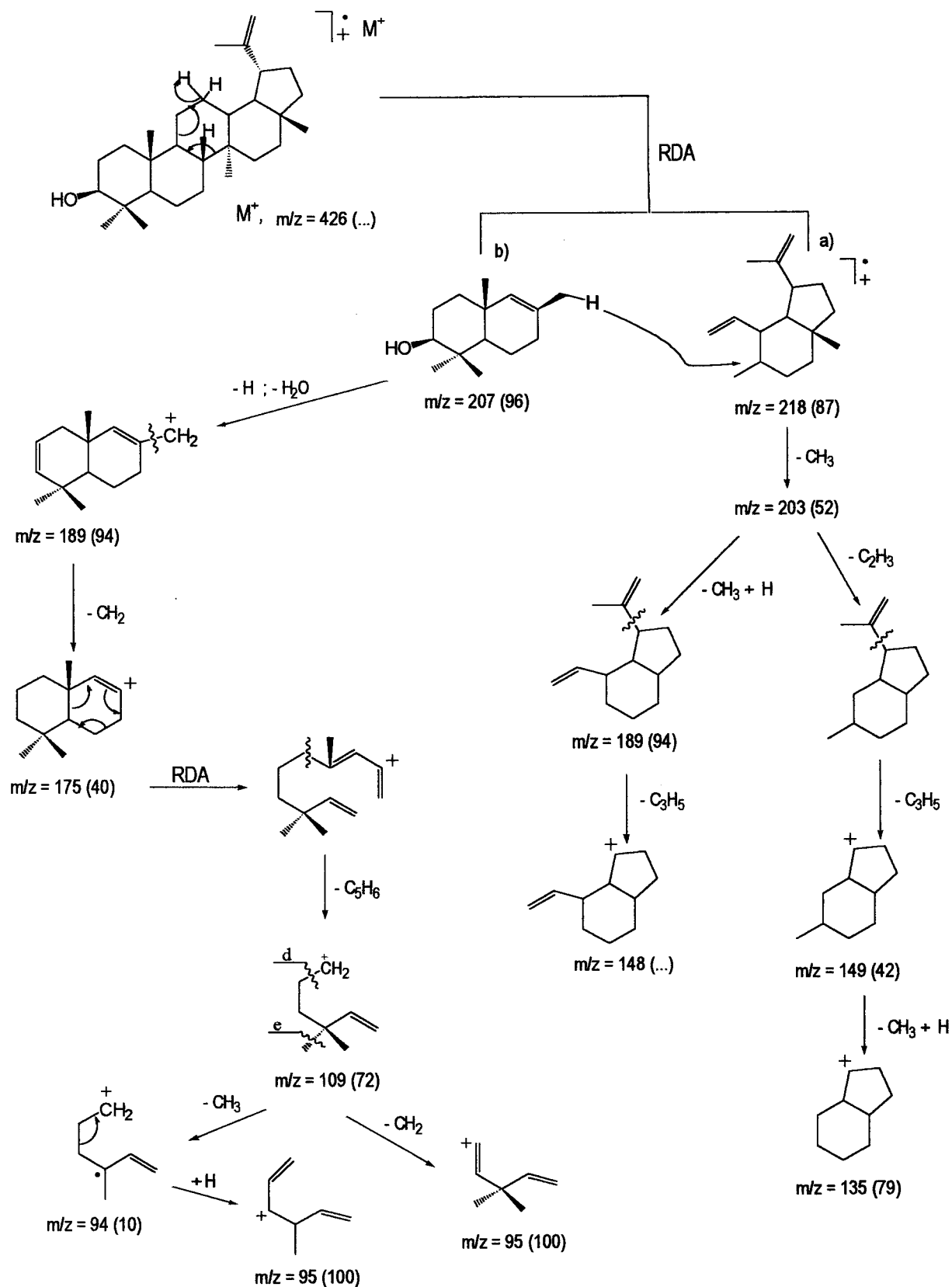
(lupeol)

O espectro de massa do composto (**48**) apresenta os sinais característicos de triterpenos pentacíclicos, nomeadamente, a rotura do anel C por fragmentação rectro Diels-Alder (RDA).^{99, 84} No esquema III.4, estão representadas as relações hipotéticas entre os principais sinais do espectro de massa do composto (**48**) e as possíveis fragmentações do lupeol.

As fragmentações com m/z 189, m/z 207 e m/z 218 são características dos triterpenos pentacíclicos mono-hidroxilados em C-3. Resultam da sua fragmentação por RDA com quebra do anel C. O fragmento m/z 207 provém da parte da molécula que contém os anéis A e B, enquanto os fragmentos m/z 218 m/z e m/z 189 são originados na parte que contém os anéis D e E, podendo o último provir de ambas e assumir sinais muito intensos no espectro de massa de compostos de esqueleto lupano.¹⁰⁰

Os desvios químicos da RMN ^{13}C experimentais podem ser comparados na tabela III.4, com valores da literatura,^{88, 95} onde é evidente a sua coincidência. De certo modo este facto reforça a convicção de que o composto (**48**) pode ser o lupeol.

Esquema III. 4.: Representação das principais fragmentações do espectro de massa do lupeol.



III.5.4. Isolamento e caracterização estrutural do palmitato de lupeol

As fracções A₃₁ a A₃₇, eluídas com éter isopropílico, foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel G60 - *cromatografia B*. Nesta cromatografia separou-se com n-hexano (nas fracções B₁₁ a B₂₁) uma mistura constituída por compostos pouco polares. Fez-se uma cromatografia em camada fina preparativa (CCFP), a mesma que foi descrita no ponto III.5.2..

As fracções 1P₂ e 1P₃ foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel:nitrato de prata - *cromatografia B₁*. Nas fracções 31 a 35 isolou-se, com n-hexano, 23 mg de um composto sólido de cor branca e aspecto amorfo, designado por composto (72). Este composto apresentou o p.f. 47- 49 °C e $[\alpha]_D^{20} + 22,8^\circ$ (c= 0,02; CHCl₃).

O espectro de IV apresenta uma banda muito intensa a 1730 cm⁻¹ atribuível à elongação do grupo carbonilo.¹⁰¹ A existência de três bandas médias a 1260, 1104 e 1011 cm⁻¹ atribuíveis à ligação C-O indiciam a presença de um grupo éster no composto isolado.

Este espectro apresenta ainda uma banda fraca a 3080 cm⁻¹ atribuível à elongação de ligações C-H vinílicas, uma banda fraca a média a 1642 cm⁻¹ atribuível à elongação da ligação dupla C=C e uma banda média a 883 cm⁻¹ atribuível a vibrações de deformação de um grupo metileno terminal, sugere a existência de um grupo CR₁R₂=CH₂.^{76, 85, 86,101}

No espectro de RMN¹H do composto (72), figuras III.12 e III.13, pode-se observar:

- dois singletos largos, um centrado a δ 4,68 ppm (1H) e o outro centrado a δ 4,56 ppm (1H), característicos de prótons vinílicos geminais do tipo $\text{CH}_2=\text{CCH}_3\text{R}$,^{86, 87, 88, 101}
- um singuleto a δ 1,68 ppm (3H) atribuível a um grupo metilo em posição α relativamente à dupla ligação C=C, o que sugere a existência de grupo isopropenilo no composto, tal como no lupeol;
- um duplo duplete centrado a δ 4,46 ppm (1H, *dd*, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2=10,0$ Hz) cujos sinais se podem atribuir ao acoplamento de um metino geminal a um átomo de oxigénio (H-3), com um grupo metileno vicinal.^{101, 102}

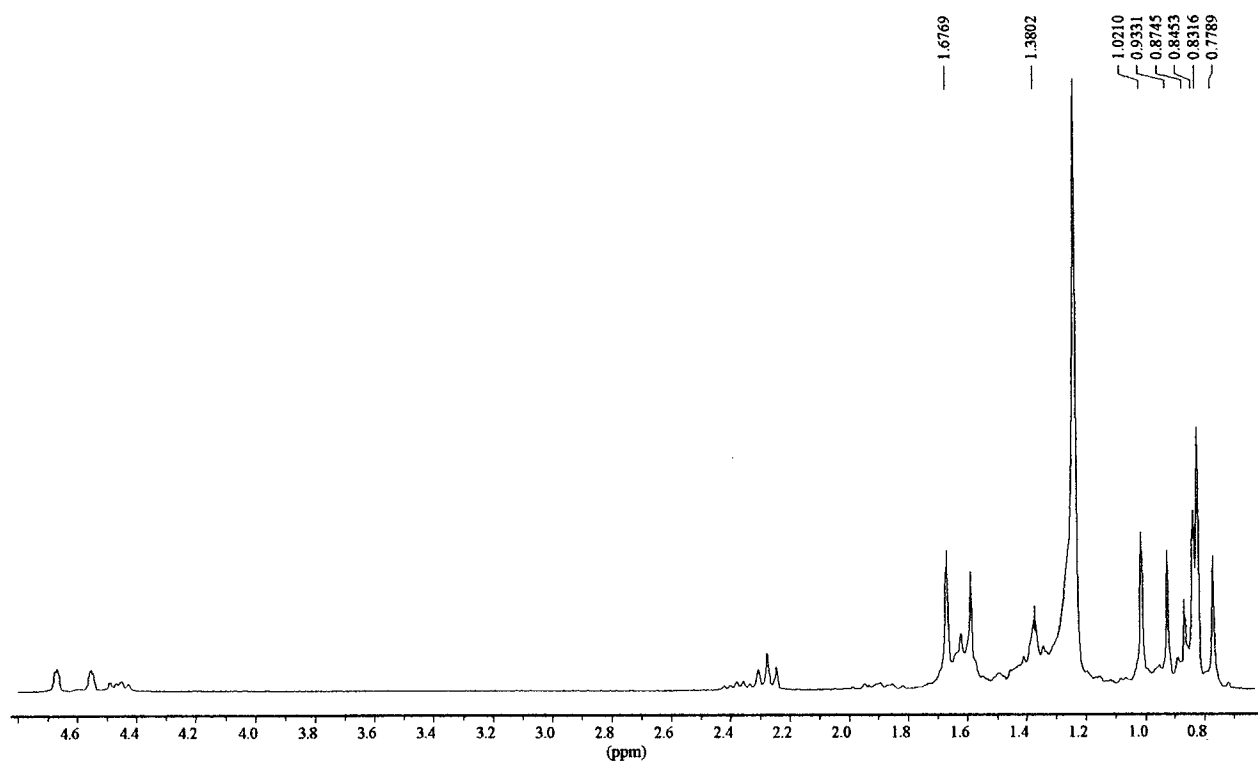


Figura III 12.: Espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ do composto (72)

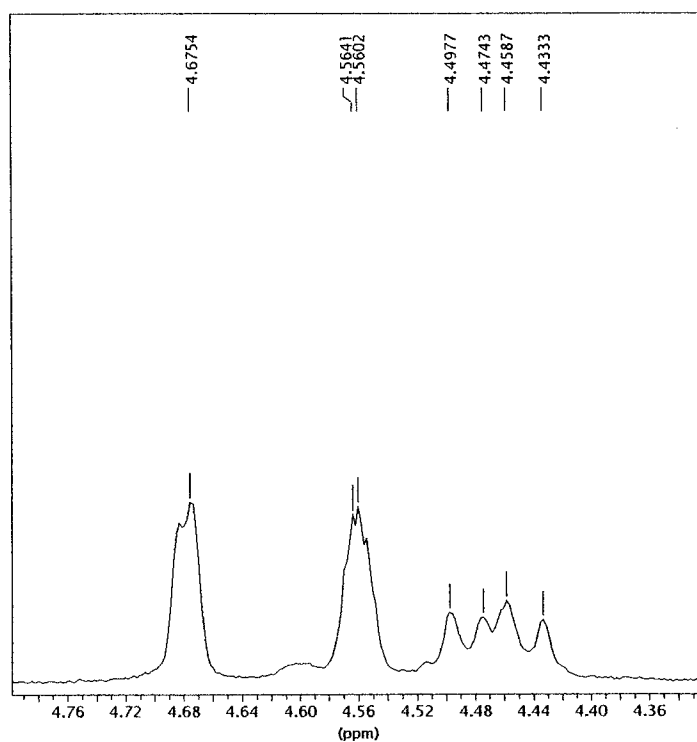


Figura III 13.: Ampliação do espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ do composto (72) entre δ 4,36 e δ 4,76 ppm

Na zona do espectro entre 2,12 e 2,56 ppm, figura III.14, pode-se observar:

- um multipletto centrado a δ 2,37 ppm (1H; m) que pode ser devido ao acoplamento do próton do metino (H-19) vicinal ao carbono sp^2 de um grupo isopropenilo e ao grupo metileno (H-20), de um esqueleto lupano. Este próton pode acoplar simultaneamente com o outro metino vicinal em posição *anti* (H-18), desdobrando o tripleto inicial num multipletto;^{88, 103}

- um tripleto centrado a δ 2,28 (2H, t, $J = 7,6$ Hz) atribuível ao acoplamento de um metileno, em posição α relativamente ao carbonilo de um éster de ácido gordo, com o metileno β da mesma cadeia carbonada.

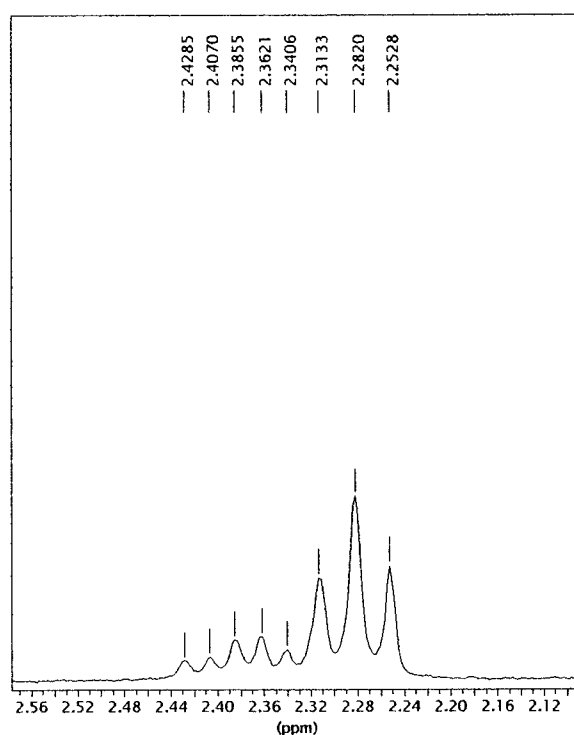


Figura III 14.: Ampliação do espectro de *RMN* 1H do composto (72) entre δ 2,12 e δ 2,56 ppm.

Na zona do espectro entre δ 0,70 e δ 1,70 ppm, figura III.15, pode-se observar:

- um singuleto com desvio químico a 1,68 ppm atribuível ao próton H-30;^{101,103}
- cinco singuletos com os desvios químicos 1,02, 0,93 ppm (6H, s, 2x CH₃), 0,84 ppm (6H, s, 2x CH₃), 0,73 e 0,78 ppm (6H, s, 2x CH₃) atribuíveis a seis grupos metilo;¹⁰¹
- um tripleto centrado a δ 0,87 ppm (3H, t, $J = 5,4$ Hz) atribuível a um metilo em posição extrema da cadeia de um éster de cadeia longa;

- um singlete muito intenso a δ 1,24 ppm (nH) atribuível a vários grupos metileno de cadeia linear.

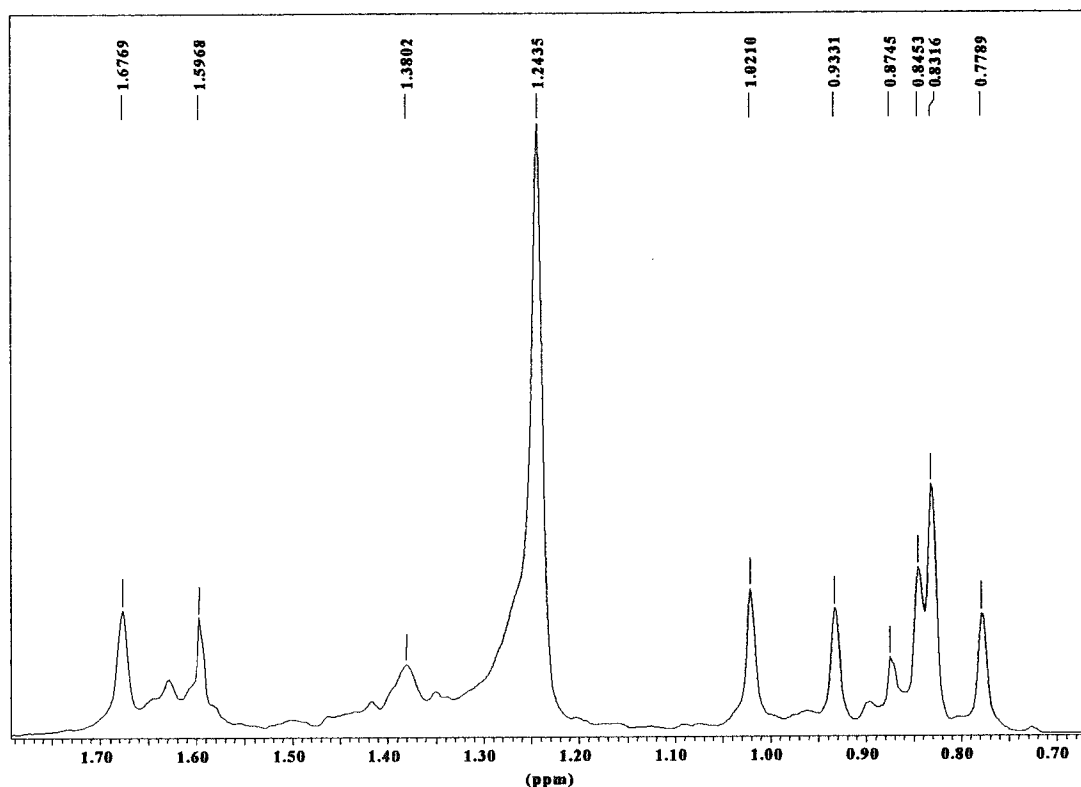


Figura III 15.: Ampliação do espectro de RMN 1H do composto (72) entre δ 0,70 e δ 1,70 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C com desacoplamento protônico de banda cheia do composto (72), figura III.16, observam-se 41 sinais que, analisados pela técnica *DEPT* (tabela III.3), se atribuem a oito grupos metilo, vinte grupos metileno sendo um olefínico,* seis grupos metino e sete átomos de carbono quaternário, dos quais um é olefínico e outro é carbonílico.

* existe um número de átomos de carbono além da parte triterpénica do composto, que podem ser atribuídos a uma cadeia carbonada de um éster de um ácido gordo, esta pode ser identificada pelo sinal característico a 29,7 ppm.

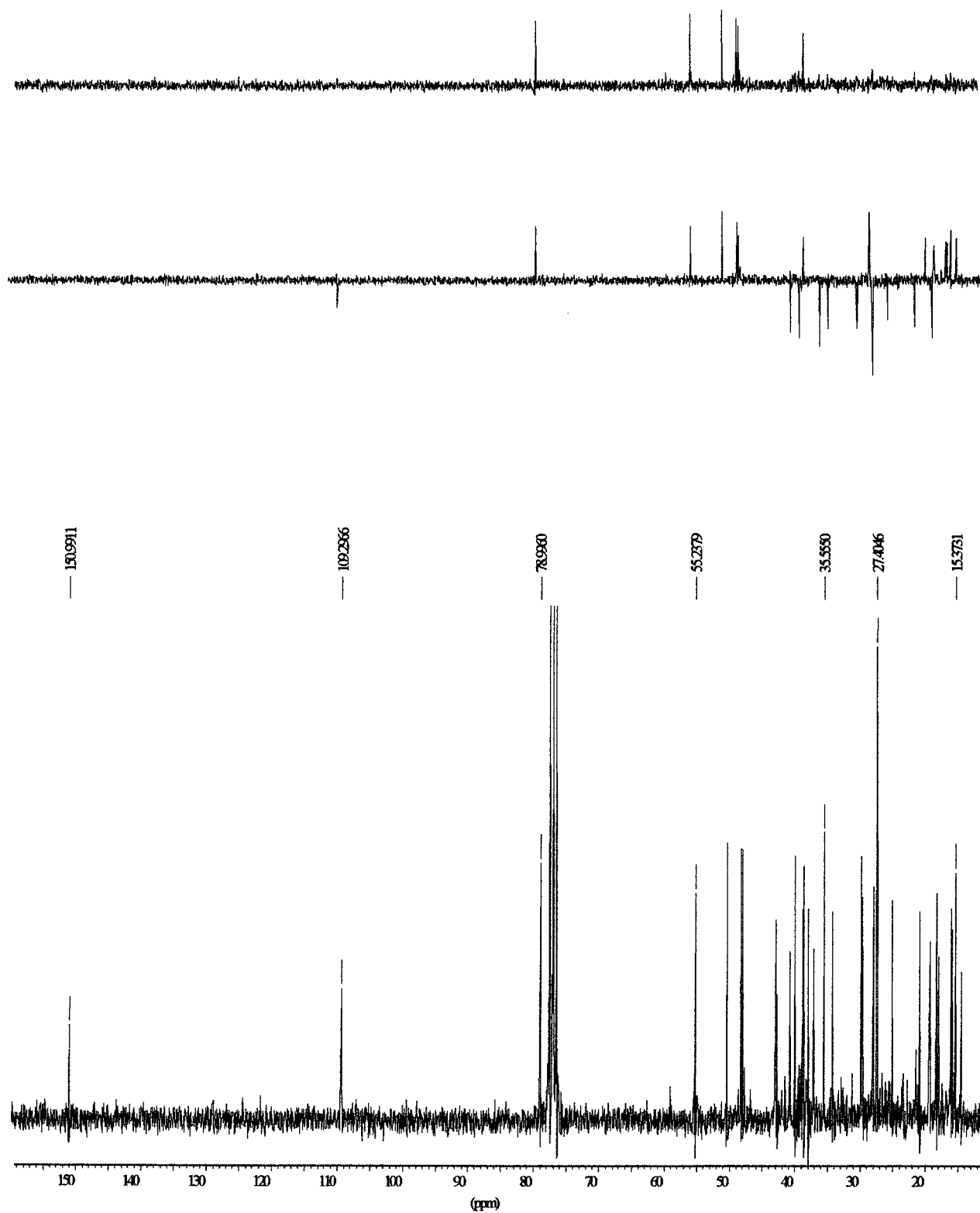


Figura III 16.: Espectros de $\text{RMN } ^{13}\text{C}$ - DEPT do composto (72);

em baixo, desacoplamento protônico de banda cheia; *a meio*, espectro DEPT com pulso a 135° ;
em cima, espectro DEPT com pulso a 90° .

Tabela III. 3.: Relação dos tipos de carbono do composto (72) identificados por $RMN^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono							
$-\text{CH}_3$	$\diagup\text{CH}_2$	$=\text{CH}_2$	$-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{H}$	$\text{R}-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{H}$	$-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-$	$=\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}$	$\text{R}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{OOR}'$
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
14,1	18,2	109,3	38,0	80,6	37,0	151,0	173,7
14,5	20,9		48,0		37,8		
15,9	22,7		48,2		40,8		
16,2	23,7		50,3		42,8		
16,6	25,0		55,3		43,0		
18,0	25,1						
19,2	27,4						
27,9	29,1						
	29,2						
	29,4						
	29,5						
	29,7						
	29,8						
	31,9						
	34,2						
	34,9						
	35,5						
	38,3						
	40,0						

O desvio químico dos sinais observados no espectro de $RMN^{13}C$ e a sua atribuição aos átomos de carbono do composto (72) estão sistematizados na tabela III.4..

Tabela III.4.: Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (48) e (72) e comparação com os valores da literatura.

Atribuição	Lupeol		Composto (48)	Composto (72)	Palmit. de lupeol	Acetato de lupeol	
	δ (ppm) ⁸⁸	δ (ppm) ⁹⁵				δ (ppm)	δ (ppm) ⁸⁷
C-1	38,7	38,7	38,7	38,3	38,3	38,4	38,3
C-2	27,4	27,5	27,4	23,7	23,7	23,7	23,6
C-3	78,9	79,0	79,0	80,6	80,6	81,0	80,7
C-4	38,8	38,9	38,8	37,8	37,8	37,8	37,7
C-5	55,2	55,3	55,2	55,3	55,3	55,4	55,3
C-6	18,3	18,3	18,3	18,2	18,2	18,2	18,2
C-7	34,2	34,3	34,2	34,2	34,2	34,3	34,1
C-8	40,8	40,9	40,8	40,8	40,8	40,9	40,7
C-9	50,4	50,5	50,4	50,3	50,3	50,4	50,2
C-10	37,1	37,2	37,1	37,0	37,0	37,1	37,0
C-11	20,9	21,0	20,9	20,9	20,9	21,0	20,9
C-12	25,1	25,2	25,1	25,1	25,1	25,1	25,0
C-13	38,0	38,1	38,0	38,0	38,0	38,1	37,9
C-14	42,8	42,9	42,8	42,8	42,8	42,9	42,7
C-15	27,4	27,5	27,4	27,4	27,4	27,5	27,4
C-16	35,5	35,6	35,6	35,5	35,5	35,6	35,5
C-17	43,0	43,0	43,0	43,0	42,9	43,0	42,9
C-18	48,2	48,3	48,2	48,2	48,2	48,0	48,2
C-19	47,9	48,0	48,0	48,0	48,0	48,3	47,9
C-20	150,9	150,9	151,0	151,0	150,9	150,9	150,5
C-21	29,8	29,9	29,8	29,8	29,7	29,9	29,8
C-22	40,0	40,0	40,0	40,0	39,9	40,0	39,9
C-23	28,0	28,0	28,0	27,9	27,9	28,0	27,9
C-24	15,4	15,3	15,4	16,2	16,6	16,2	16,5
C-25	16,1	16,1	16,1	16,6	16,1	16,5	16,1
C-26	15,9	16,0	15,9	15,9	15,9	16,0	15,9
C-27	14,5	14,6	14,5	14,5	14,5	14,5	14,4
C-28	18,0	18,0	18,0	18,0	17,9	18,0	18,0
C-29	109,3	109,3	109,3	109,3	109,4	109,4	109,2
C-30	19,3	19,3	19,3	19,2	19,3	19,3	19,2
CH ₃ (CH ₂) _n COOR				14,1	14,1		21,0
CH ₃ (CH ₂) _n COOR				173,7	173,4		170,4
CH ₃ (CH ₂) _n COOR				29,7	29,5		

A análise dos sinais de RMN^1H anteriormente discutidos e a sua comparação com os dados do composto (48), permitem colocar a hipótese do composto (72) ser um derivado esterificado do lupeol. Nos espectros de próton dos dois compostos estão presentes os sinais dos prótons H-29 (4,68 e 4,56 ppm), H-30 (1,68 ppm), H-19 (2,37 ppm), H-3 (4,46 ppm), característicos de um esqueleto lupano. A presença dos sinais atribuíveis aos prótons H-2' (2,28 ppm) e H-n' (0,87 ppm) indiciam a existência de uma cadeia lateral que poderá ser atribuída a uma possível esterificação no lupeol.

A análise dos espectros de $RMN^{13}C$ e a comparação dos sinais nele observados com os dados da literatura^{92, 93, 94, 95, 96, 97, 98} confirmam a existência de um esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo lupano. A presença de outros sinais existentes nos espectros de próton e de carbono do composto (72) e que não são atribuíveis ao esqueleto lupano, serão discutidos no ponto III.5.4.1..

III.5.4.1. Identificação do grupo éster do composto (72).

A confirmação do grupo éster do composto (72) fez-se por comparação dos dados do composto isolado com os dados das espectroscopias de RMN^1H e $RMN^{13}C$ de um padrão de trimeristina (72a) (tri-hexadecanoato de propano-1,2,3-triilo) cuja fórmula molecular é $C_{51}H_{98}O_6$ e também por comparação com dados da literatura da trimeristina, do palmitato de metilo (72b) e do ácido palmítico (72c).

Na figura III.17 podem-se observar os seguintes sinais:

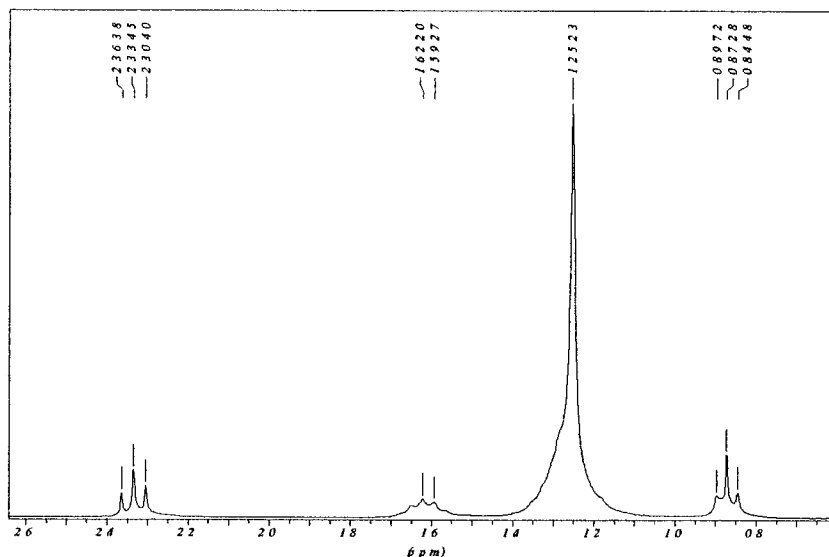


Figura III 17.: Ampliação do espectro de RMN^1H da trimeristina entre δ 0,60 a δ 2,60 ppm

- um tripleto centrado a δ 2,33 (2H, t, $J = 7,5$ Hz) atribuível ao acoplamento de um metileno, em posição α relativamente a um carbonilo, com o metileno β da mesma cadeia carbonada;

- um tripleto centrado a δ 0,87 ppm (3H, t, $J = 6,1$ Hz) atribuível a um metilo em posição extrema da cadeia de um éster de cadeia longa;

- um singuleto muito intenso a δ 1,24 ppm (nH) atribuível a vários grupos metileno de cadeia linear.

No espectro de $RMN^{13}C$, figura III.18, observam-se 15 sinais que segundo a análise pela técnica DEPT podem corresponder a um grupo metilo, 12 grupos metileno (podendo ser dezasseis dado que o sinal a δ 29,6 ppm pode representar cinco metilenos), um metino e três grupos carbonilo.

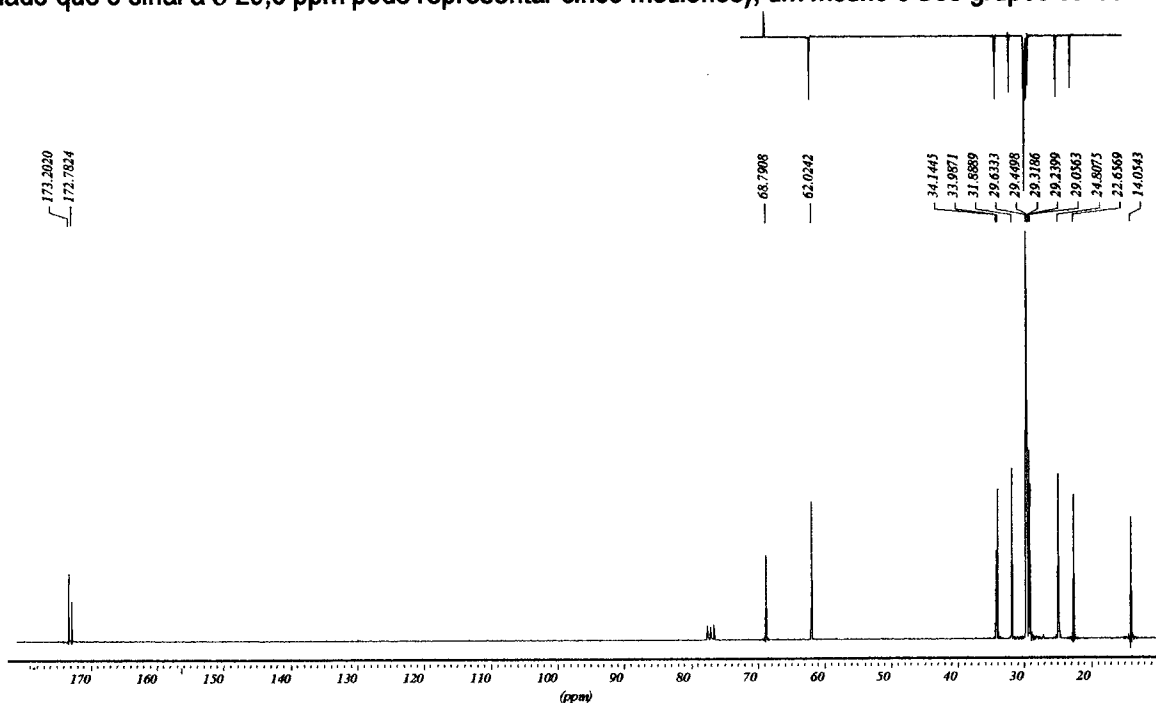


Figura III 18.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da trimeristina; em baixo, desacoplamento protónico de banda cheia; em cima, espectro DEPT com pulso a 135°

Para analisar a região do espectro onde se localizam os sinais dos átomos de carbono saturados das cadeias de palmitato na trimeristina, ampliou-se o espectro na zona entre δ 13,0 a δ 35,0 ppm.

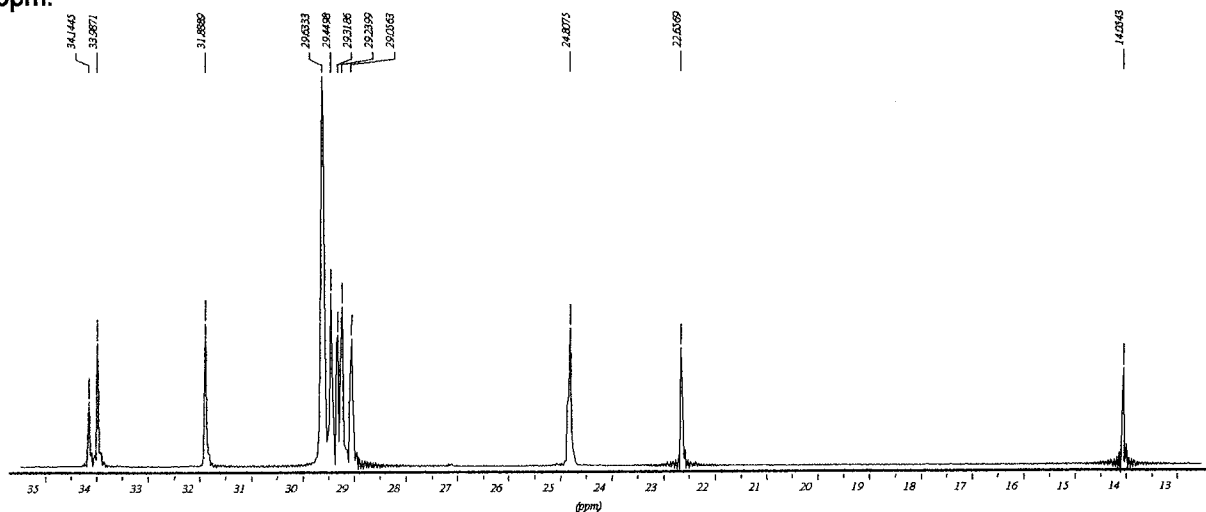


Figura III 19.: Ampliação do espectro de $RMN^{13}C$ da trimeristina na zona entre δ 35 a δ 13 ppm.

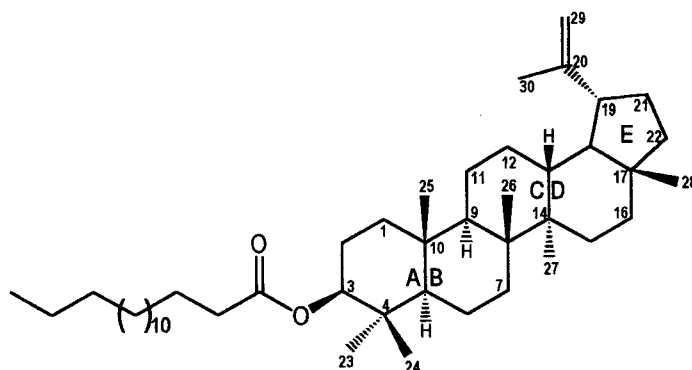
Tabela III. 5.: Atribuição dos desvios químicos de carbono do grupo éster do composto (72) por comparação com padrões de ácido palmítico, trimeristina e valores da literatura.

Carbono	Composto (72)	Palmitato de metilo	Ác. palmítico	Trimeristina	
	δ (ppm)	δ (ppm) ^{98,106}	δ (ppm) ¹⁰⁴	δ (ppm) ¹⁰⁴	δ (ppm) ^{**}
C-1 ¹	173,7	173,4	180,6	173,2	173,2
C-1 ²				172,8	172,8
C-1 ³				173,2	173,2
C-2 ¹	34,9	34,7	34,2	34,1	34,0
C-2 ²				34,3	34,1
C-2 ³				34,1	34,0
C-3	25,0	25,1	24,8	24,9	24,8
C-4	29,5	29,6	29,4	29,7	29,6
C-5	29,7	29,6	29,2	29,7	29,6
C-6	29,7	29,6	29,6	29,7	29,6
C-7	29,7	29,6	29,8	29,7	29,6
C-8	29,7	29,6	29,8	29,7	29,6
C-9	29,7	29,6	29,8	29,7	29,6
C-10	29,7	29,6	29,8	29,5	29,4
C-11	29,4	29,6	29,8	29,4	29,3
C-12	29,2	29,6	29,8	29,3	29,2
C-13	29,1	29,6	29,5	29,2	29,1
C-14	31,9	31,9	32,0	32,0	31,9
C-15	22,7	22,6	22,8	22,7	22,7
C-16	14,1	18,1	14,1	14,1	14,1
C-1'				62,2	62,0
C-2'				69,0	68,8
C-3'				62,2	62,0

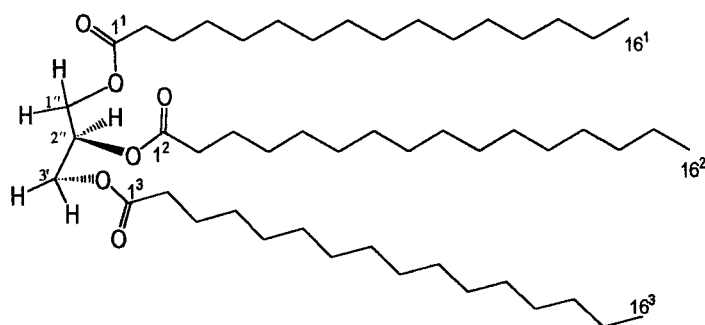
** - Valores obtidos experimentalmente com um padrão de trimeristina

Conforme se pode constatar pela análise da tabela III.5. os sinais do espectro de $RMN^{13}C$ não atribuíveis ao esqueleto lupano no composto (72), coincidem com os sinais observados no espectro da trimeristina e também com os valores referidos na literatura para os compostos palmitato de metilo e ácido palmítico. No entanto, existem pequenas diferenças nos valores de desvio químico relativamente aos átomos de carbono carbonilo e aos grupos metilênicos em posição α nas três cadeias de ácido gordo que esterificaram as funções álcool do glicerol. Este resultado era previsível, uma vez que a existência de três carbonilos, por se influenciarem mutuamente, alteraria a própria vizinhança química e a de átomos de carbono vicinais.

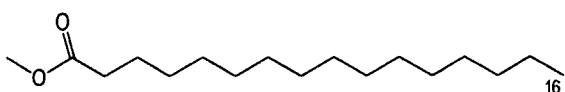
Em suma, os dados espectrais dos compostos (72) e da trimeristina (72a) e ainda a sua comparação com os valores referidos na literatura^{80, 98, 104, 105, 106} relativamente aos compostos palmitato de metilo (72b) e ácido palmítico (72c), permitem identificar o composto (72) como sendo o palmitato de lupeol.



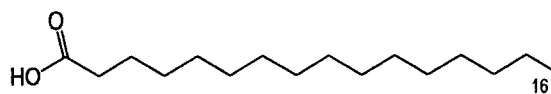
3β-palmitóxi-5α-lup-20(29)-eno (72)
(palmitato de lupeol)



trimeristina (72a)



palmitato de metilo (72b)



ácido palmítico (72c)

III.5.4.2. Análise parcial das fracções A₃₁₋₃₇ e A₃₈₋₄₂ do extracto de n-hexano da *T. barbata*

Nas fracções A₃₁₋₃₇ e A₃₈₋₄₂ eluídas com éter isopropílico na coluna mãe do extracto de n-hexano foram identificados os mesmos compostos em ambas as misturas. Após diversos fraccionamentos obtiveram-se 57 mg de uma mistura de palmitato de α + β -amirina, 23 mg de composto palmitato de lupeol, conforme se descreveu nos pontos III.5.2.e III.5.3. e 27 mg do composto (111), um sólido branco que apresentava polaridade superior aos anteriores.

Os espectros de *RMN* ¹H e a análise por cromatografia gasosa (GC) revelaram que nas fracções A₃₈₋₄₂ o composto (111) era o composto mais abundante da mistura. No próximo ponto descreve-se o seu isolamento e respectiva caracterização estrutural.

III.5.5. Isolamento e caracterização estrutural do acetato de germanicol

Os compostos das fracções A₃₁₋₃₇ foram separados por cromatografia em coluna de sílica gel (*cromatografia B*). Na fracção 52 da *cromatografia B* separou-se uma outra mistura que depois de recromatografada em CCFP originou 45 mg do composto (111), um sólido branco cristalino.

As fracções A₃₈₋₄₂ foram recromatografadas em cromatografia em coluna (CC) de sílica gel (*cromatografia C*). Nas fracções C₃₇₋₃₈ separou-se uma mistura que apresentava os mesmos compostos das fracções A₃₁₋₃₇, mas nesta mistura o composto (111) era claramente maioritário. Nas fracções C₄₀₋₄₅ obteve-se 990 mg de uma mistura onde este composto se apresentava praticamente puro. Recromatografaram-se 450 mg desta mistura em diversos sistemas e após recristalização em CH₃OH / CHCl₃, obtiveram-se mais 284 mg do composto cristalino (111), com o ponto de fusão a 279-281° C e poder rotatório óptico específico $[\alpha]_D^{21} = +15,8^\circ$ (c = 0,31; CHCl₃).

O espectro de *IV* do composto apresenta uma banda muito intensa a 1731 cm⁻¹ atribuível à elongação do grupo carbonilo. A existência de uma banda intensa a 1251 cm⁻¹ e outra média a forte a 1025 cm⁻¹ atribuíveis à ligação C-O indicam a presença de um grupo éster, duas bandas fortes a 1454 e a 1377 cm⁻¹ atribuíveis às vibrações de deformação do grupo metilo em carbono α relativamente ao carbonilo sugere a existência de acetato no composto. Uma banda fraca a 1640 cm⁻¹ e outra média a 847 cm⁻¹ sugerem uma insaturação de tipo CR₁R₂=CHR₃. Uma banda muito forte centrada a 2951 cm⁻¹ sugere a existência de um número elevado de grupos C-H no composto.^{107, 108}

No espectro de RMN^1H do composto (111), figura III.20 e III.21, podem-se observar:

- um singuleto largo centrado a 4,86 ppm (1H, sl) atribuível ao próton de um metino em carbono insaturado de um agrupamento $CR_1R_2=CHR_3$ (onde R_3 é um carbono quaternário), característico do próton olefinico em H-19 dos triterpenos pentacíclicos, com esqueleto do tipo olean-18-eno;^{109, 110}

- um multiplete centrado a 4,48 ppm (1H, m) cujos sinais se podem atribuir ao acoplamento de do próton de um metino geminal a um átomo de oxigénio com um grupo metileno adjacente na mesma cadeia carbonada ($Me-COO-CH$).^{109, 110, 111}

- um singuleto a δ 2,05 ppm (3H, s) atribuível aos prótons metílicos de um acetato, confirma a existência do grupo éster no composto;^{109, 110}

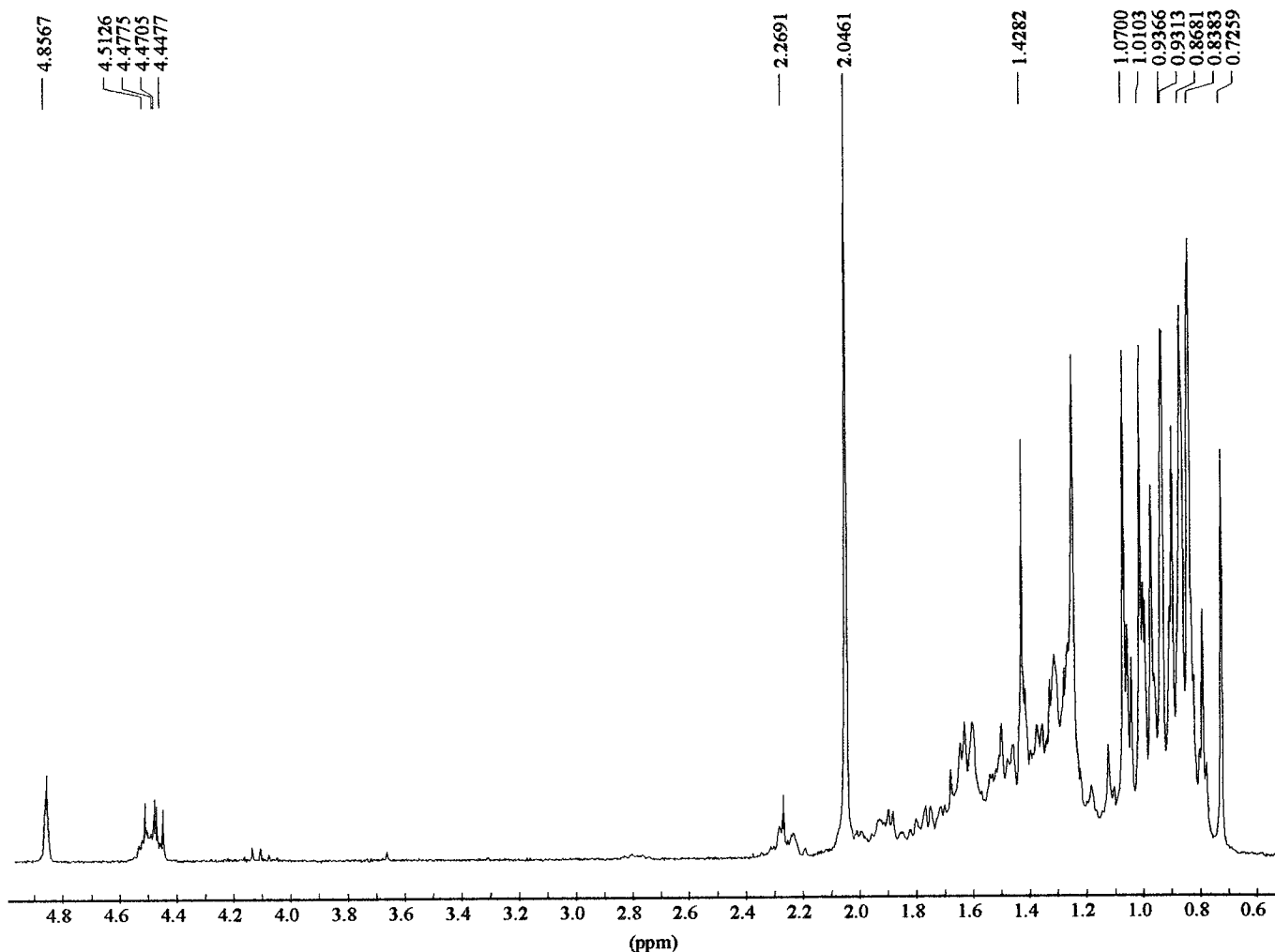


Figura III 20.: Espectro de RMN^1H do composto (111)

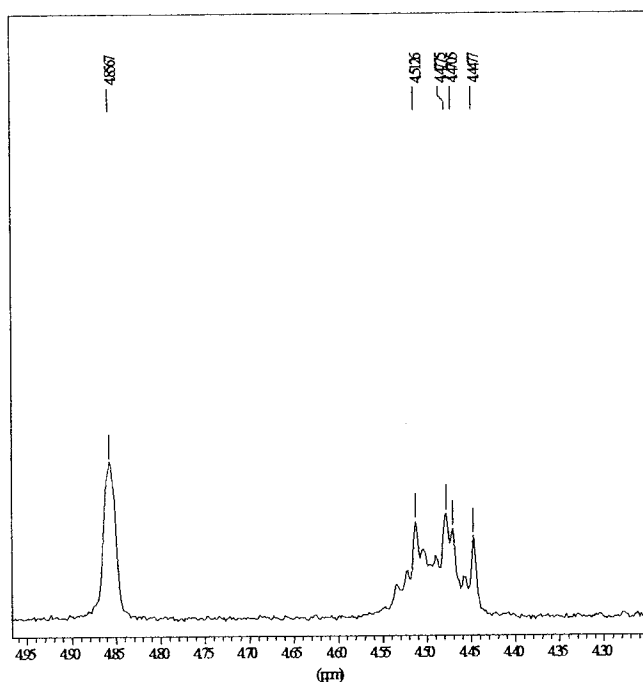


Figura III 21.: Ampliação do espectro de $RMN\ ^1H$ do composto (111) entre $\delta\ 4,30$ e $\delta\ 4,90$ ppm

- com desvios químicos a $\delta\ 1,08, 1,01, 0,94, 0,93, 0,91, 0,87, 0,84, 0,73$ ppm observam-se oito singletos (3H cada) atribuíveis a outros tantos grupos metilo.^{109, 110}

A análise dos sinais de $RMN\ ^1H$ anteriormente discutidos permitem colocar a hipótese da presença de um esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo olean-18-eno por ser possível identificar os sinais dos prótons H19 (4,86 ppm).^{109, 110}

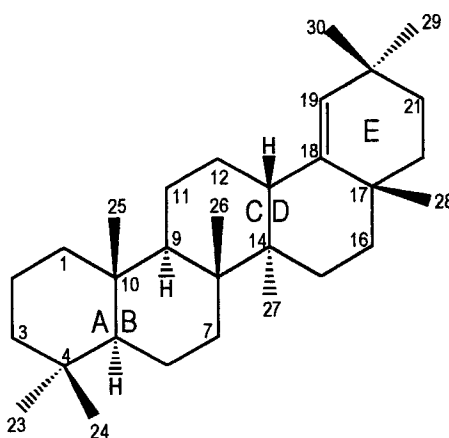


Figura III 22.: Esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo olean-18-eno.

Uma característica espectral dos compostos que possuem este esqueleto é o de apresentarem a campo baixo no espectro de $RMN\ ^1H$ um sinal único, como singuleto, entre δ 4,8 e 4,9 ppm relativo ao próton de um metino em carbono sp^2 , numa cadeia onde não existe hidrogénio nos átomos de carbono adjacentes.

Outros compostos triterpénicos pentacíclicos que apresentam um espectro de $RMN\ ^1H$ ainda mais simples a campo baixo, pertencem ao outro esqueleto olean-13(18)-eno, nestes compostos os dois átomos de carbono olefinicos são ambos tetrasubstituídos não originando por isso qualquer sinal a campo baixo.

No espectro de $RMN\ ^{13}C$ do composto (111) observam-se trinta e dois sinais que pela técnica de DEPT (figuras III.23 e III.24) se atribuem a nove grupos metilo, dez grupos metileno, cinco grupos metino e oito átomos de carbono tetrasubstituído, dos quais um é olefinico e outro é carbonilo. O desvio químico dos sinais observados no espectro e a sua atribuição aos átomos de carbono do composto natural estão representados na tabela III.6.

Tabela III. 6.: Relação dos tipos de carbono do composto (111) identificados por $RMN\ ^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono							
$-CH_3$	$\diagup CH_2$	$-CH$	$=CH$	$R-CH$	$-C-$	$=C$	$R\text{COOR}'$
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
14,6	18,2	38,4	129,7	80,9	32,3	142,6	171,0
16,1	21,1	51,1			34,5		
16,5	23,7	55,5			37,1		
16,8	26,2				37,8		
21,3	27,5				40,7		
25,2	33,3				43,3		
27,9	34,5						
29,2	37,3						
31,3	37,7						
	38,6						

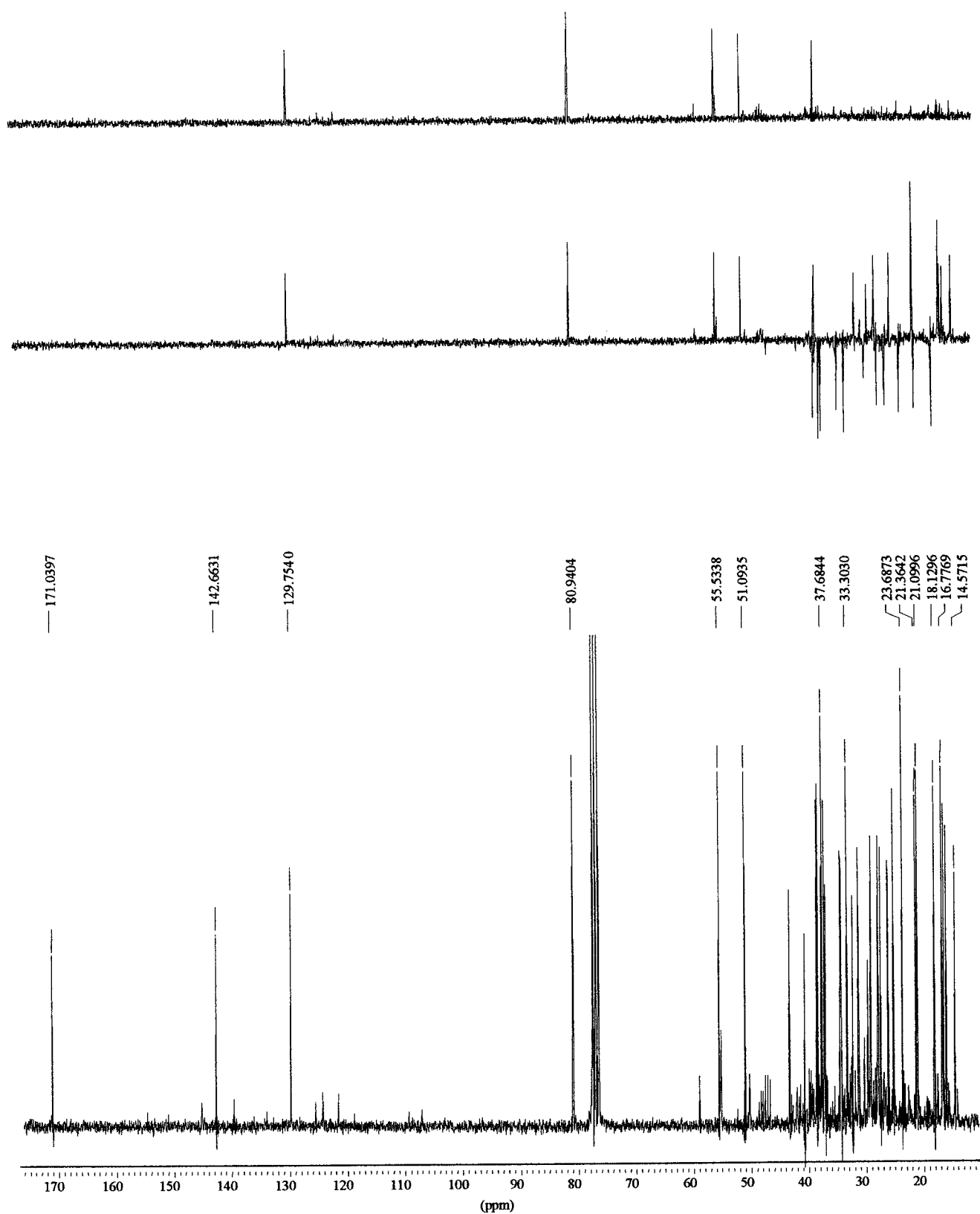


Figura III 23.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (111);
em baixo, desacoplamento protônico de banda cheia; a meio, espectro DEPT com pulso a 135° ;
em cima, espectro DEPT com pulso a 90° .

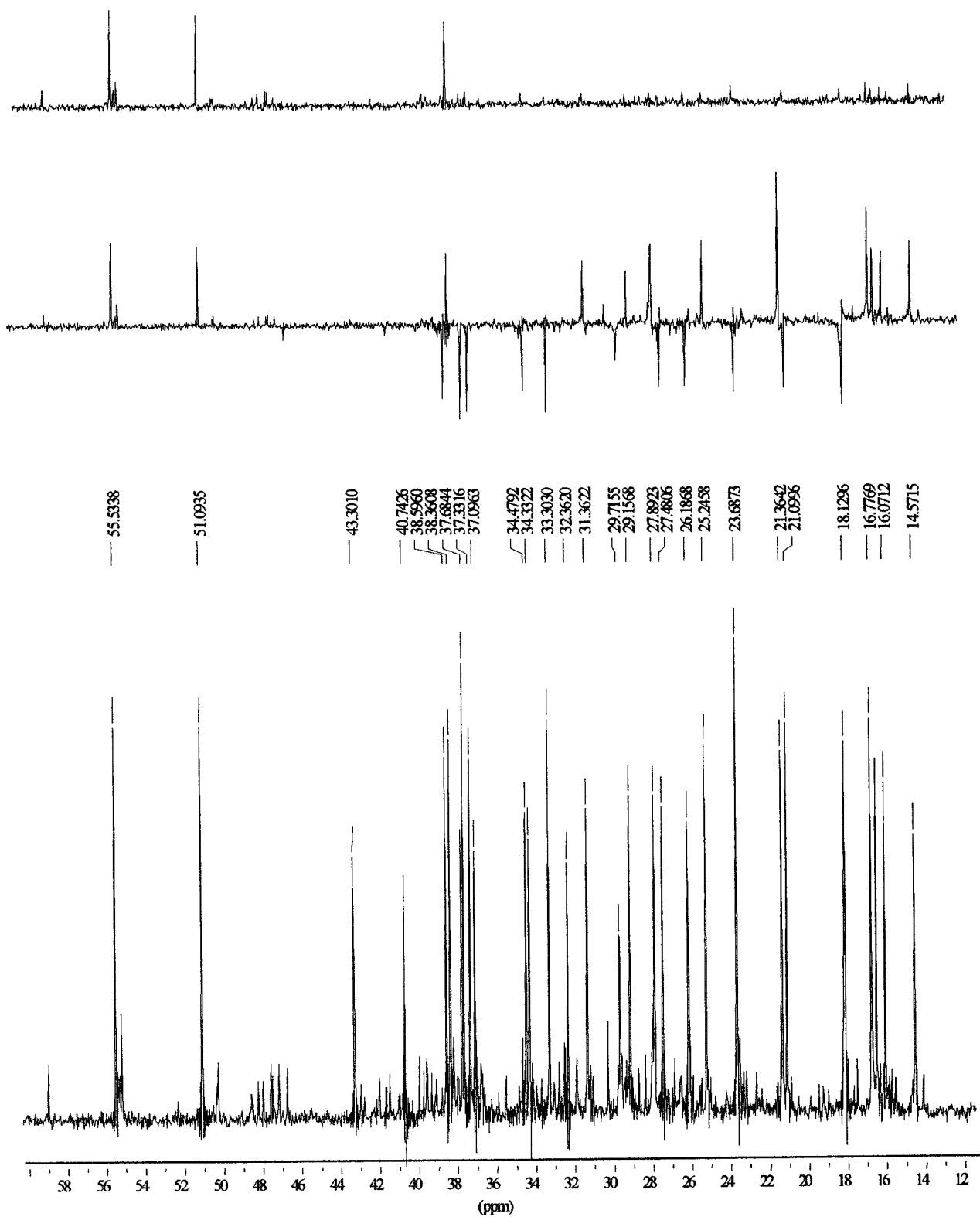


Figura III 24.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da região alifática do composto (111).

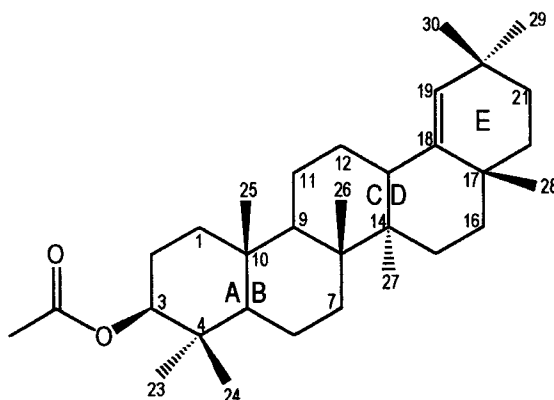
A análise do espectro de $RMN^{13}C$ e a comparação dos sinais observados com os dados da literatura^{112, 113, 109, 114, 115} confirma a existência de um esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo olean-18-eno, já prevista pela análise de RMN^1H , e agora justificada pela presença dos sinais a:

142,9 ppm característico de um carbono sp^2 metínico, C-19;

129,7 ppm característico de um carbono sp^2 tetrasubstituído, C-18;

26,2 ppm característico de um carbono metilénico pouco desblindado, C-12.

A existência do sinal 80,9 ppm característico de um carbono metínico esterificado e o facto dos átomos de carbono C-2 e C-4 surgirem a campo mais baixo do que no *olean-18-eno*, sugere que o grupo éster está ligado ao carbono C-3. O efeito de desblindagem que este grupo também exerce sobre o metilo do carbono C-24 reforça a hipótese de identificar o composto (111) como sendo o 3 β -acetóxi-olean-18-eno, usualmente designado por acetato de germanicol.



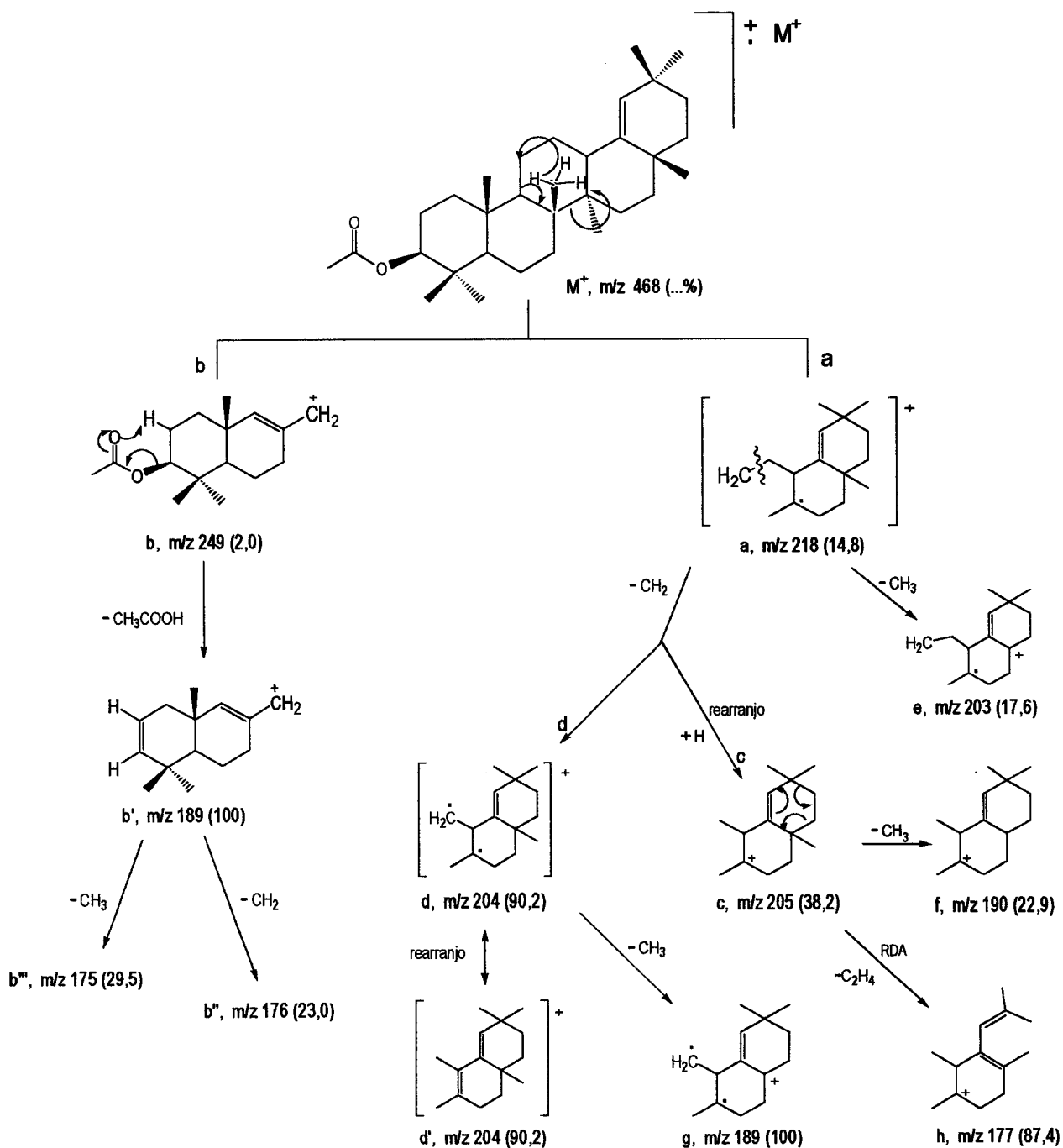
3 β -acetóxiolean-18-eno (111)

(acetato de germanicol)

A caracterização feita através das espectroscopias é reforçada pela análise do espectro de massa do composto. À semelhança do espectro do composto (48) também o espectro do composto (111) apresenta os sinais característicos de triterpenos pentacíclicos, nomeadamente, a rotura do anel C por fragmentação rectro Diels-Alder (RDA),¹¹⁶ por outro lado, existe um conjunto de picos resultante das fragmentações com m/z : 249, 218, 204, 190, 189 e 177 que podem ser atribuídos aos iões resultantes das diversas fragmentações do acetato de germanicol.

No esquema III.5 estão representadas algumas espécies resultantes das principais fragmentações do composto (111), assim como a intensidade relativa dos respectivos picos expressa em percentagem.

Esquema III. 5.: Representação das principais fragmentações resultantes da Espectrometria de Massa de Impacto Electrónico (MS-EI) do composto acetato de germanicol.



III.5.5.1. Caracterização estrutural do germanicol (83)

Uma amostra de 118 mg acetato de germanicol proveniente das fracções 44 e 45 da *cromatografia C*, foi hidrolisada por reacção em meio alcalino. A parte neutra resultante foi extraída com éter etílico, obtiveram-se 98 mg de extracto. As cromatografias em camada fina (CCF) efectuadas revelaram duas manchas com R_f muito distinto. Por cromatografia em coluna de sílica gel G60/nitrato de prata a 10% (m/m), *cromatografia C₃*, isolaram-se dois componentes da mistura. Nas fracções 10 a 19 obtiveram-se 12 mg do composto (111) (acetato germanicol) e nas fracções 22 a 47 isolaram-se 61 mg do composto (83), um sólido branco cristalino, que após recristalização em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{CHCl}_3$ apresentou o ponto de fusão 172-174° C e um poder rotatório óptico específico $[\alpha]_D^{22} + 8,4$ ($c=0,06$; CHCl_3).

No ponto IV.5.5.1. descrevem-se os detalhes do isolamento destes compostos.

O espectro de *IV* do composto (83) apresenta uma banda a 3350 cm^{-1} atribuível a um grupo hidroxilo, confirmada pela presença de uma banda forte a 1026 cm^{-1} atribuível a vibração de elongação C-O.

Uma banda fraca a 1620 cm^{-1} e outra média a 841 cm^{-1} sugerem uma insaturação de tipo $\text{CR}_1\text{R}_2=\text{CHR}_3$.^{109, 110}

Na região da absorção da elongação dos grupos C-H apresenta uma banda muito intensa a 2926 cm^{-1} , o que sugere a existência de um número elevado de grupos C-H.^{107, 108}

No espectro de *RMN* ¹H do composto (83) (figuras III.25 e III.26) podem-se observar:

- um singuleto centrado a 4,85 ppm (1H, s) atribuível a um metino em carbono insaturado de um agrupamento $\text{CR}_1\text{R}_2=\text{CHR}_3$, onde R_3 é um carbono quaternário, característico do próton olefinico em H-19 dos triterpenos pentacíclicos que apresentam um esqueleto do tipo olean-18-eno;
- um duplo duplete centrado a δ 3,20 ppm (1H, dd, $J_1 = 5,4$ Hz, $J_2 = 10,7$ Hz) cujos sinais se podem atribuir ao acoplamento de um metino geminal a um grupo hidróxilo com um grupo metileno adjacente na mesma cadeia carbonada;
- um duplete largo a δ 2,25 ppm (1H, dl, $J = 11,5$ Hz) atribuível ao próton do grupo hidróxilo;

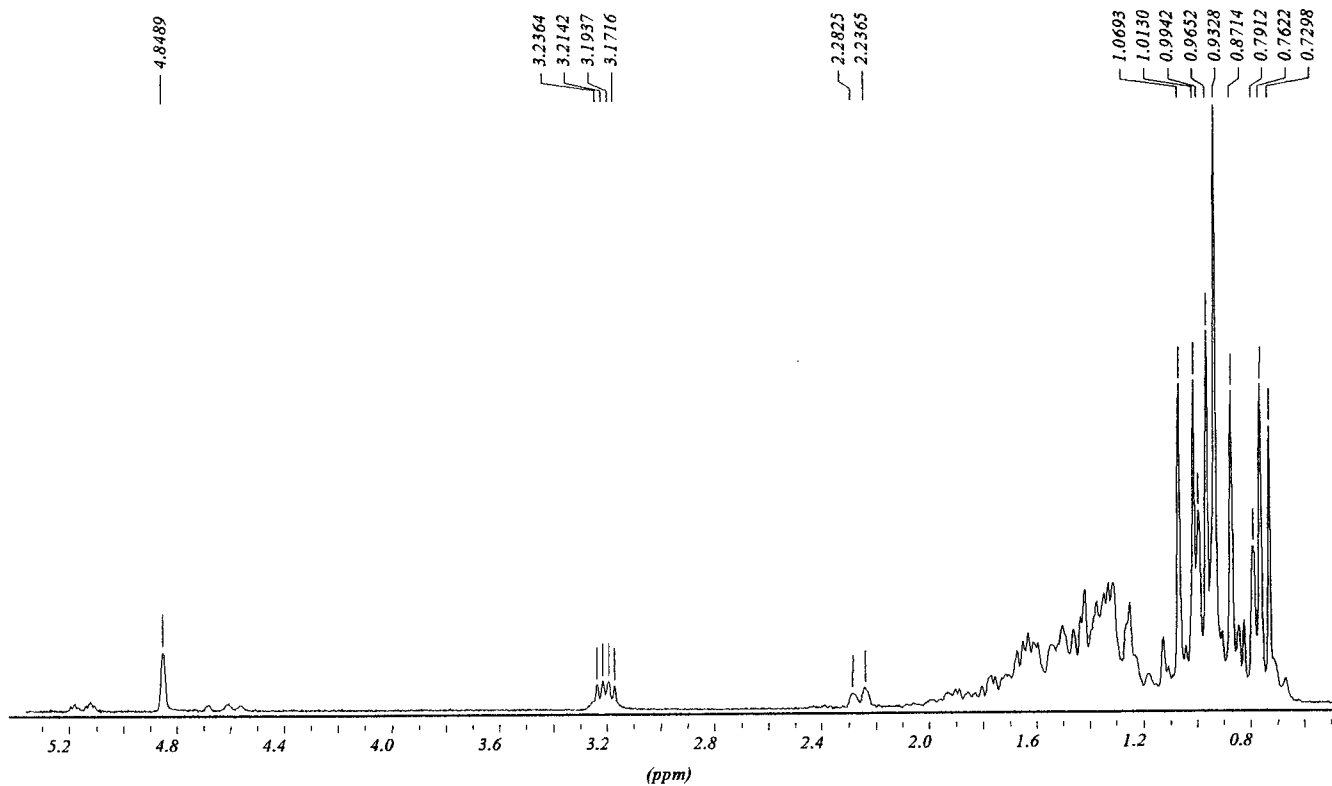


Figura III 25.: Espectro de *RMN* ¹H do composto (83)

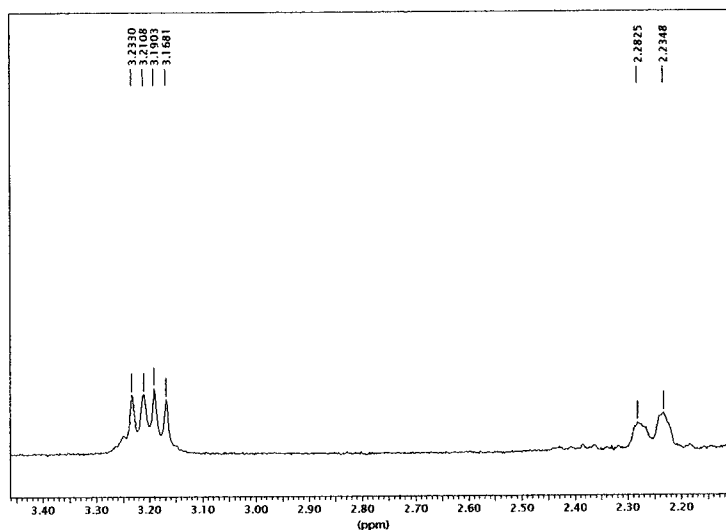


Figura III 26.: Ampliação do espectro de *RMN* ¹H do composto (83) na zona entre δ 2,10 e δ 3,40 ppm

- observam-se três singletos com desvios químicos a δ 1,07, 1,01, 0,96 ppm (3H cada), um singlete a δ 0,93 ppm (6H) e outros três singletos com desvios químicos a δ 0,87, 0,76 e 0,73 ppm (3H cada) atribuíveis a oito grupos metilo. ^{109, 110}

No espectro de $RMN^{13}C$ do composto (83) observaram-se 30 sinais que pela técnica DEPT (figura III.27), se atribuem a oito grupos metilo, dez grupos metileno, cinco grupos metino sendo um olefinico e sete átomos de carbono tetrasubstituídos, dos quais um é olefinico, conforme se menciona na tabela III.7.

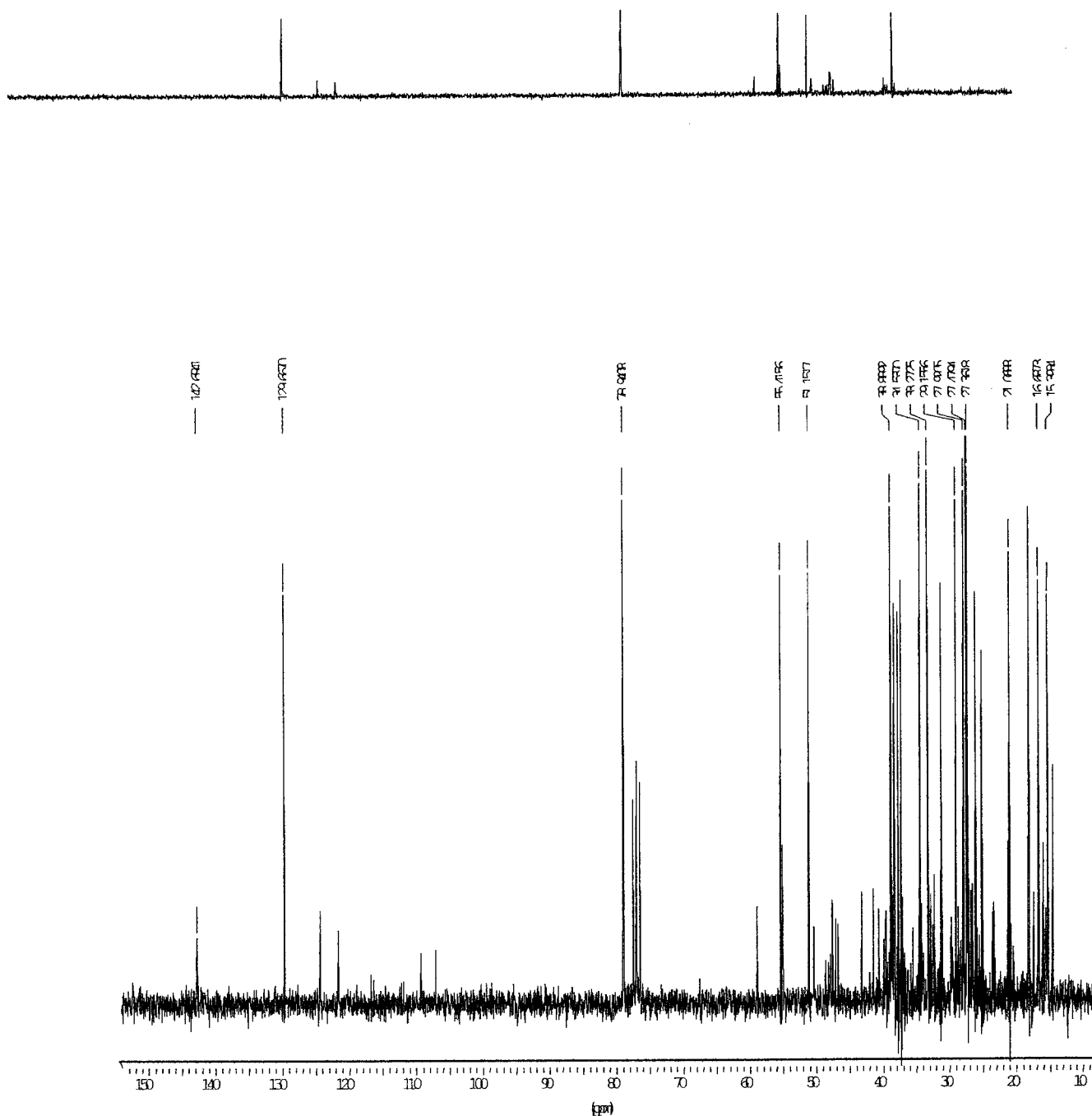


Figura III 27.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (83);

em baixo, desacoplamento protônico de banda cheia; *a meio*, espectro DEPT com pulso a 135° ; *em cima*, espectro DEPT com pulso a 90° .

Tabela III. 7.: Relação dos tipos de carbono do composto (83) identificados por $RMN^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono						
$-CH_3$	$\diagup CH_2$	$=CH$	$-CH$	$R-CH$	$-C-$	$=C$
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
14,6	18,2	129,7	38,4	78,9	32,3	142,7
15,4	21,1		51,2		34,4	
16,1	26,2		55,4		37,2	
16,7	27,3				38,9	
25,2	27,5				41,5	
27,9	33,3				43,3	
29,2	34,5					
31,4	37,3					
	37,7					
	38,5					

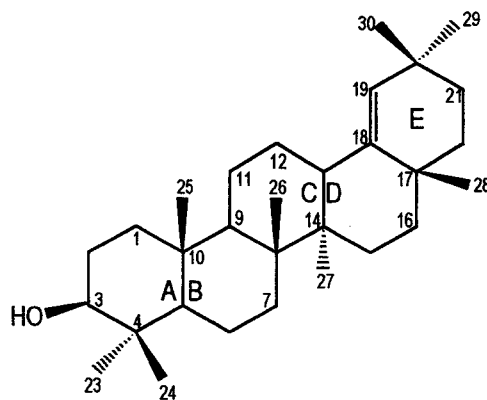
Tal como no composto acetato de germanicol a análise do espectro de $RMN^{13}C$ e a comparação dos sinais observados com os dados da literatura,^{112, 113, 109} sugere que o composto (83) também apresenta um esqueleto do tipo olean-18-eno, o que se confirma através da existência no espectro dos sinais a:

142,7 ppm característico de um carbono sp^2 metínico, C-19;

129,7 ppm característico de um carbono sp^2 tetrasubstituído, C-18;

26,2 ppm característico de um carbono metilénico pouco desblindado, C-12.

A existência de um sinal a 78,9 ppm característico de um carbono metínico hidroxilado e o facto dos átomos de carbono C-2 e C-4 surgirem a campo mais baixo do que no olean-18-eno, sugere que o grupo hidroxilo está ligado ao carbono C-3. O efeito de desblindagem que este grupo também exerce sobre o metilo do carbono C-24 reforça a hipótese de identificar o composto (83) como sendo o 3 β -hidróxi-olean-18-eno, usualmente designado por germanicol.



3 β -hidróxiolean-18-eno (**83**)

(germanicol)

O desvio químico dos sinais observados no espectro de *RMN* ^{13}C e a sua atribuição aos átomos de carbono do germanicol estão representados na tabela III.8.

Tabela III. 8.:Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (111) e (83) e comparação com os valores da literatura.

Atribuição	Acetato de germanicol		Composto (111)	Composto (83)	Germanicol	
	δ (ppm) ¹¹³	δ (ppm) ⁹⁸			δ (ppm) ¹¹³	δ (ppm) ⁹⁶
C-1	38,5	38,6	38,6	38,5	38,5	38,6
C-2	23,8	23,6	23,7	27,3	27,4	27,4
C-3	81,0	80,8	80,9	78,9	79,0	78,8
C-4	37,9	37,7	37,8	38,9	39,0	38,8
C-5	55,7	55,5	55,5	55,4	55,7	55,4
C-6	18,2	18,0	18,2	18,2	18,3	18,2
C-7	34,6	33,3	34,5	34,5	34,7	34,5
C-8	40,9	40,7	40,7	41,5	40,8	40,6
C-9	51,2	51,0	51,1	51,2	51,3	51,1
C-10	37,3	37,0	37,1	37,2	37,3	37,2
C-11	21,2	21,1	21,1	21,1	21,2	21,2
C-12	26,2	26,0	26,2	26,2	26,2	26,4
C-13	38,7	38,3	38,4	38,7	39,0	38,8
C-14	43,4	43,2	43,3	43,3	43,4	43,2
C-15	27,6	27,4	27,5	27,5	27,6	27,8
C-16	37,7	37,3	37,7	37,7	37,7	37,6
C-17	34,4	34,2	34,5	34,4	34,4	34,5
C-18	142,7	142,5	142,6	142,7	142,8	142,6
C-19	129,8	129,6	129,7	129,7	129,8	129,5
C-20	32,4	32,2	32,3	32,3	32,3	32,3
C-21	33,4	34,5	33,3	33,3	33,4	32,2
C-22	37,5	37,6	37,3	37,3	37,4	37,5
C-23	28,0	27,8	27,9	27,9	28,0	27,9
C-24	16,5	16,6	16,5	15,4	15,4	15,4
C-25	16,1	16,0	16,1	16,1	16,1	15,9
C-26	16,8	16,4	16,8	16,7	16,7	16,7
C-27	14,5	14,4	14,6	14,6	14,6	14,4
C-28	25,3	25,1	25,2	25,2	25,3	25,2
C-29	31,3	31,2	31,3	31,4	31,3	31,2
C-30	29,2	29,1	29,2	29,2	29,2	29,5
CH ₃ COOR		21,0	21,3			
CH ₃ C(O)OR		170,7	171,0			

III.5.6. Isolamento e caracterização estrutural do composto (112).

As fracções A₄₃ a A₅₀, eluídas com éter isopropílico, foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica gel G60 - *cromatografia D*. Numa das fracções (ver diagrama III.2.) isolou-se através de uma mistura de n-hexano/éter etílico (95/5), 51 mg de um sólido amorfo de cor branca, composto (112).

O espectro de *IV* deste composto, apresenta uma banda muito intensa a 1735 cm⁻¹ atribuível à elongação do grupo carbonilo de um éster.¹⁰¹ Uma banda muito intensa a 1239 cm⁻¹ e duas de intensidade média a 1036 e a 1018 cm⁻¹ atribuíveis à ligação C-O confirmam a presença de grupo éster, duas bandas fortes a 1463 e a 1383 cm⁻¹ atribuíveis às vibrações de deformação do grupo metilo em carbono α relativamente ao carbonilo sugere a presença de acetato no composto. Uma banda fraca a 1620 cm⁻¹ e outra média a 987 cm⁻¹ sugerem uma insaturação de tipo CR₁R₂=CHR₃. Bandas muito fortes centrada a 2933, 2918 e 2856 cm⁻¹ sugerem a existência de um número elevado de ligações C-H no composto.^{107, 108}

No espectro de *RMN* ¹H do composto (112) (figuras III.28, III.29 e III.30) podem-se observar:

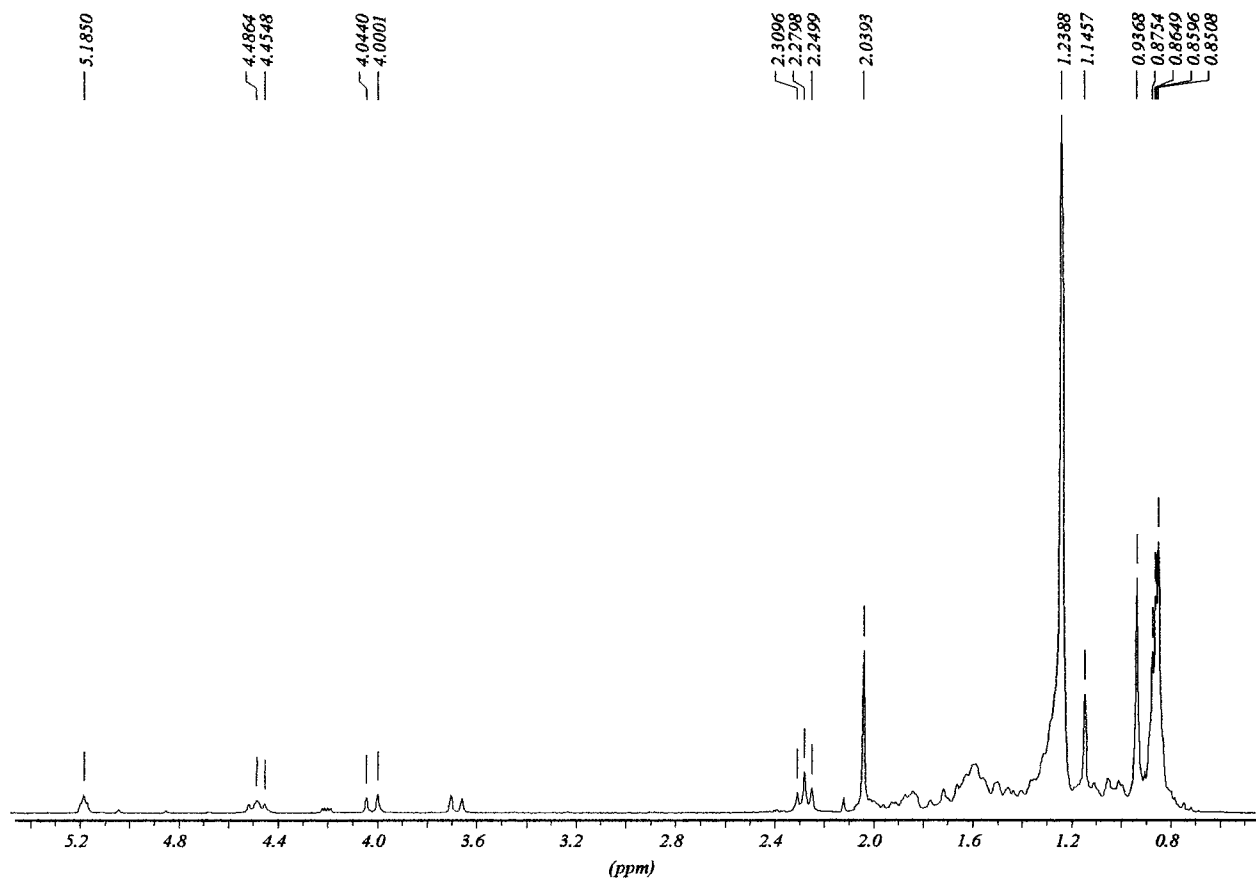


Figura III 28.: Espectro de *RMN* ¹H do composto (112).

- um tripleto centrado a 5,18 ppm (1H, t, $J = 3,3$ Hz) atribuível ao acoplamento de um metino de um agrupamento $CR_1R_2=CHCH_2R_3$, cujo desvio químico é característico do próton olefinico H-12 de triterpenos pentacíclicos que possuem esqueleto do tipo olean-12-eno;^{82, 83, 84}

- um tripleto centrado a 4,49 ppm (1H, t, $J = 7,9$ Hz) atribuível ao acoplamento entre o próton de um metino com os prótons de um metileno vicinal, num agrupamento do tipo $CH_3(C=O)OCHR_1R_2$, onde R_2 representa um carbono quaternário;^{77, 78, 110}

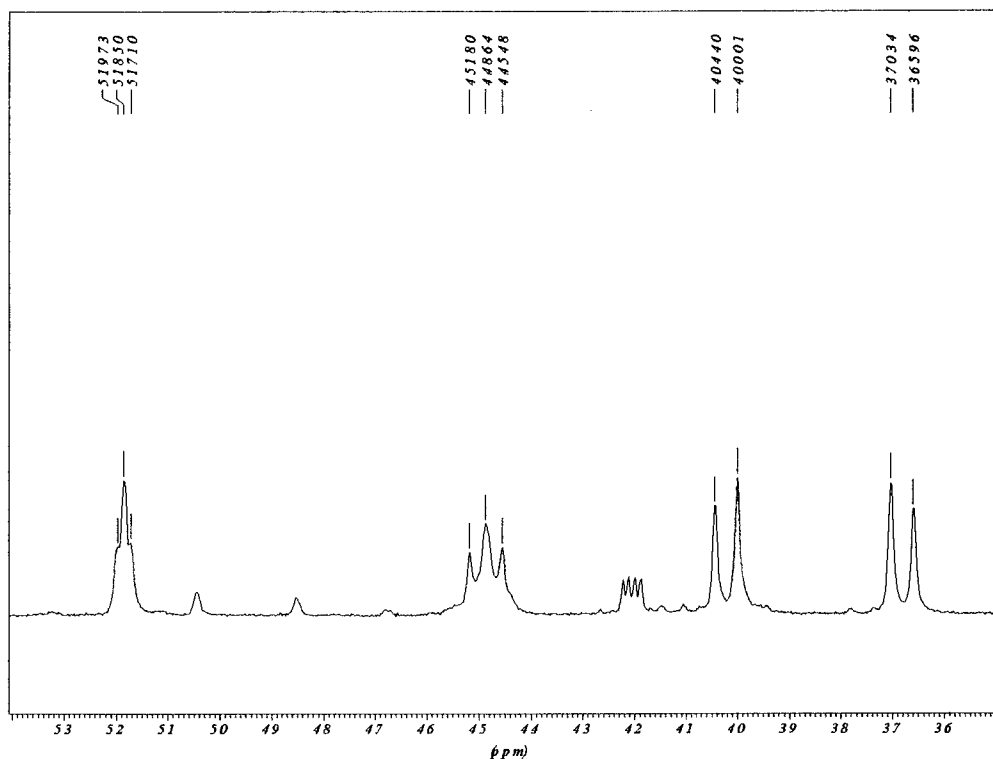


Figura III 29.: Ampliação do espectro de RMN^1H do composto (112) na zona entre δ 3,50 e δ 5,40 ppm.

- um sistema de dois dubletos, um centrado a 4,02 ppm (1H, d, $^2J(H,H)=10,98$ Hz) e outro centrado a 3,66 ppm (1H, d, $^2J(H,H)=10,95$ Hz). Este sistema poderá dever-se ao acoplamento geminal dos hidrogénios H e H' de um metileno que está ligado a um carbono quaternário de uma estrutura olean-12-eno e que sofre a influência de uma ligação geminal a um grupo éster;^{78, 90, 117, 118}

- cinco singletos a δ 1,14, 0,94, 0,88, 0,86 e 0,85 ppm, atribuíveis à ressonância dos grupos metilo de um esqueleto de tipo olean-12-eno. Os sinais a 0,94 e a 0,85 ppm podem representar dois metilos cada.^{79 a 84}

- um singuleto a 2,04 ppm (3H, s) atribuível a um metilo de um grupo acetato;^{109, 110, 111, 118}

- um tripleto centrado a 2,28 ppm (2H, t, $J = 7,46$ Hz) atribuível ao metileno α em relação ao carbonilo de um grupo éster;^{79, 80, 82, 84}

- um tripleto centrado a 0,87 ppm (3H, t, CH_3) atribuível a um metilo de uma cadeia linear e

- um singuleto muito intenso a δ 1,24 ppm (nH, s, nCH₂) característico de metilenos de cadeia linear longa^{101, 104, 117, 118}

A análise do espectro de *RMN* ¹H permite colocar a hipótese do composto (112) ser um triterpeno pentacíclico de esqueleto olean-12-eno. Pode-se também inferir que no composto existem dois grupos éster, dos quais, um será o acetato e o outro poderá ser um éster de cadeia longa.

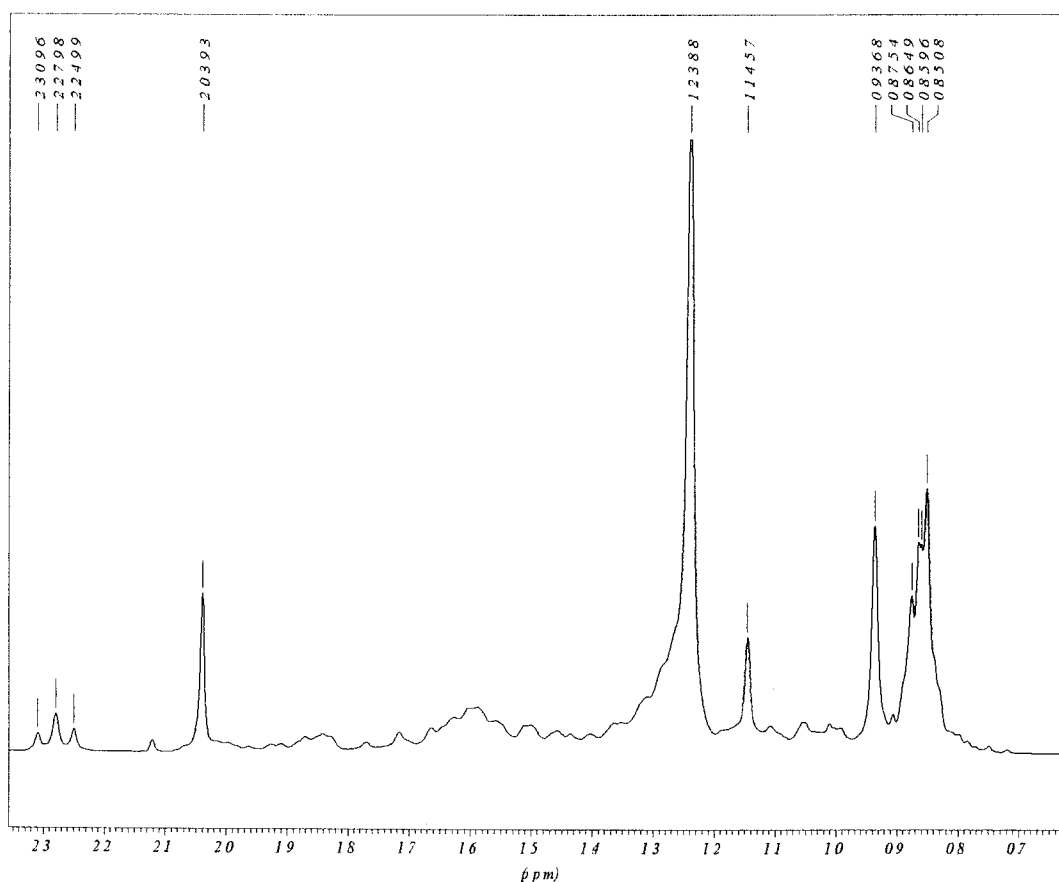


Figura III 30.: Ampliação do espectro de *RMN* ¹H do composto (112) na zona entre δ 0,65 e δ 2,35 ppm.

No espectro de *RMN* ¹³C observam-se 42 sinais que pela análise da técnica *DEPT* (figura III.31) se atribuem a nove grupos metilo, 19 grupos metileno (podendo ser vinte e quatro dado que o sinal a δ 29,6 ppm pode representar vários metilenos), cinco grupos metino sendo um olefínico e nove átomos de carbono tetrasubstituídos, dos quais um é olefínico e dois são carbonílicos, conforme se indica na tabela III.9.

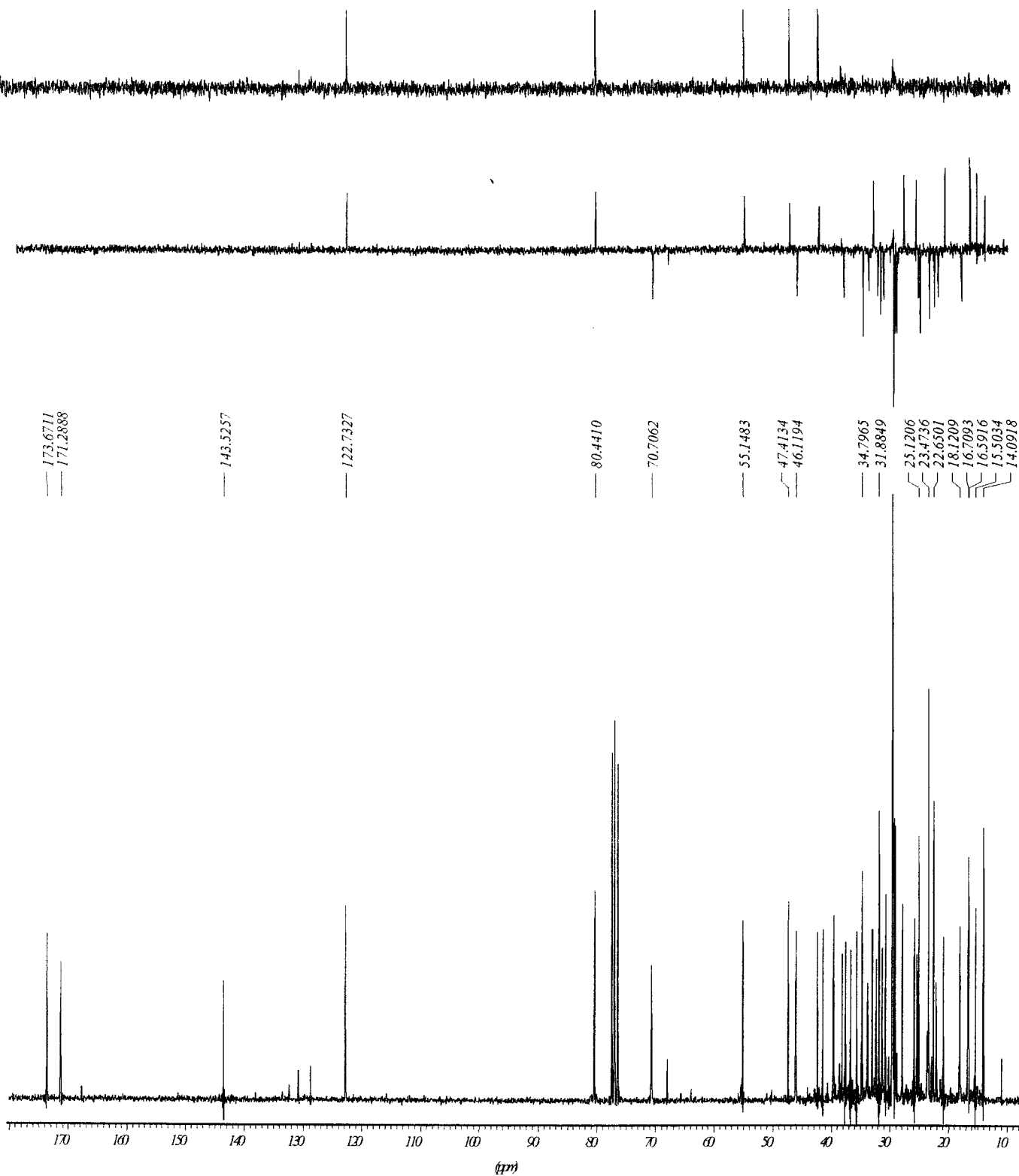


Figura III 31.: Espectros de $RMN^{13}C$ - DEPT do composto (112);

em baixo, desacoplamento protónico de banda cheia; *a meio*, espectro DEPT com pulso a 135° ;

em cima, espectro DEPT com pulso a 90° .

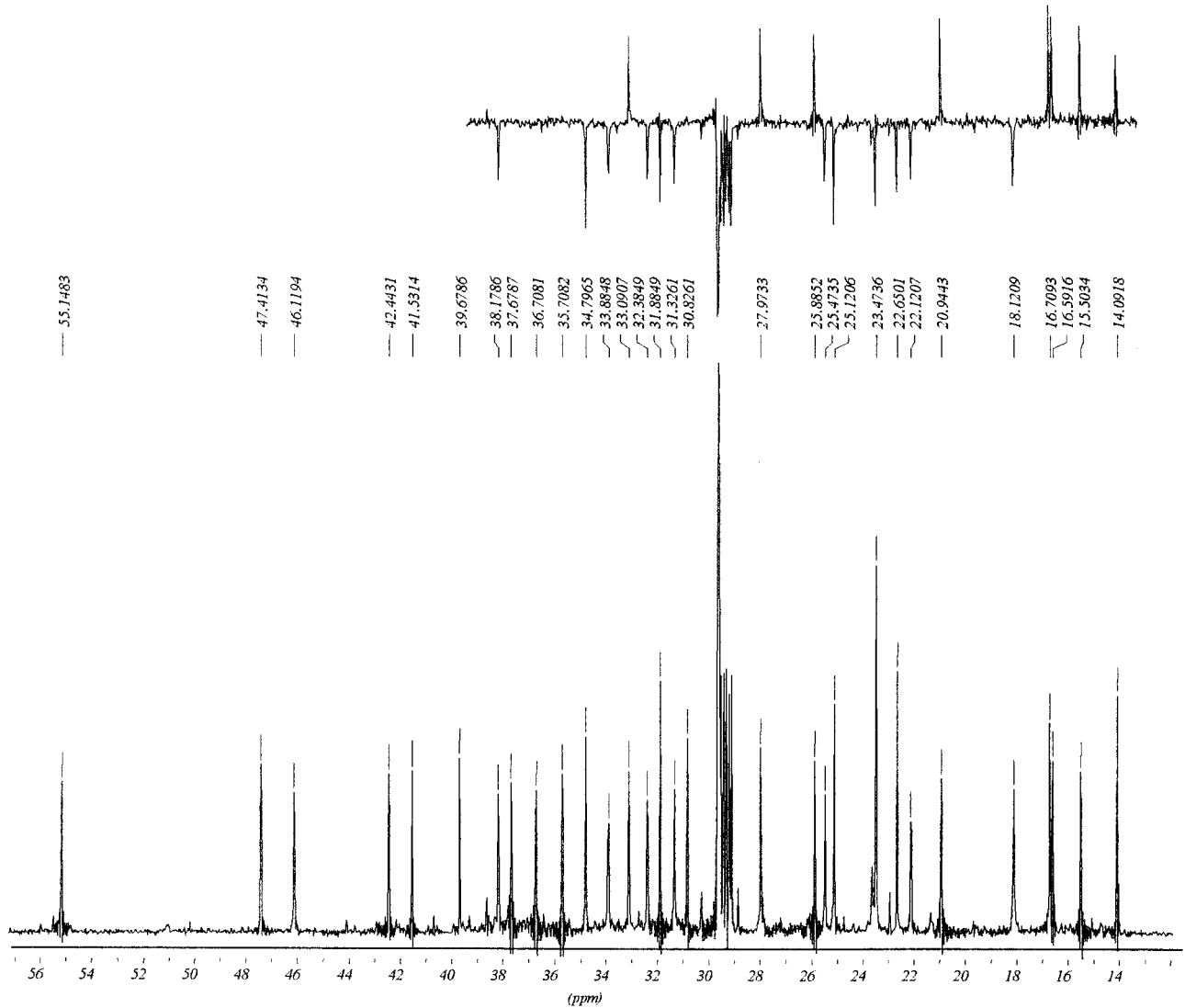


Figura III 32.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da região alifática do composto (112);
em baixo, desacoplamento protônico de banda cheia; em cima, espectro DEPT com pulso a 135° ;

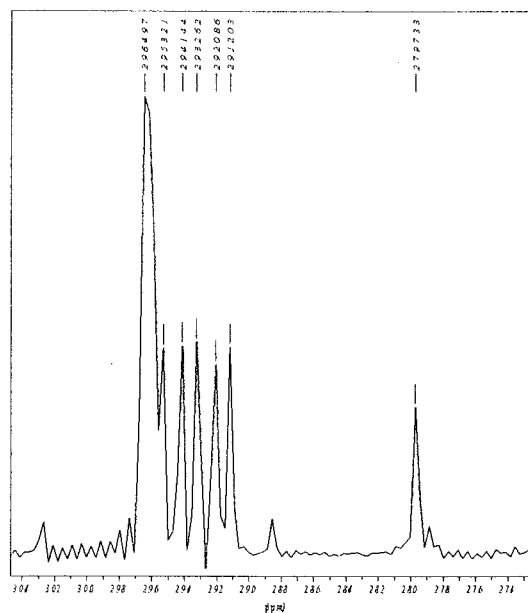


Figura III 33.: Ampliação do espectro de $RMN^{13}C$ do composto (112) na zona entre δ 27,4 e δ 30,4 ppm.

Tabela III. 9.: Relação dos tipos de carbono do composto (112) identificados por $RMN^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono						
$-CH_3$	$\diagup CH_2$	$\begin{array}{c} \\ -C- \\ \end{array}$	$=CH$	$\begin{array}{c} \\ -C- \\ \end{array}$	$=C \diagdown$	$R\text{COOR}'$
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
14,1	18,2	42,5	122,7	30,8	143,5	171,3
15,5	22,1	47,4		35,7		173,7
16,6	22,6	55,2		36,7		
16,7	23,5	80,4		37,7		
20,9	25,1			39,7		
25,9	25,5			41,5		
28,0	29,1					
33,1	29,2					
33,9	29,3					
	29,4					
	29,5					
	29,6					
	31,3					
	31,9					
	32,4					
	34,8					
	38,2					
	46,1					
	70,7					

Tabela III. 10.: Atribuição dos desvios químicos de carbono do compostos (112) (diéster) e comparação com os valores da literatura

Atribuição	composto (112)	diacetato de eritrodioI	eritrodioI
Carbono	δ (ppm)	δ (ppm) ¹¹⁷	δ (ppm) ^{117, 118}
C-1	38,2	38,2	38,6
C-2	23,5	23,4	27,2
C-3	80,4	80,7	79,0
C-4	36,7	37,6	38,8
C-5	55,2	55,1	55,2
C-6	18,1	18,1	18,4
C-7	32,4	32,4	32,6
C-8	39,7	39,6	39,8
C-9	47,4	47,4	47,6
C-10	36,7	36,7	36,9
C-11	23,5	23,4	23,6
C-12	122,7	122,5	122,3
C-13	143,5	143,3	144,2
C-14	41,5	41,5	41,7
C-15	25,5	25,5	25,6
C-16	22,1	22,1	22,0
C-17	35,7	35,7	36,9
C-18	42,4	42,4	42,3
C-19	46,1	46,1	46,5
C-20	30,8	30,7	31,0
C-21	33,9	33,9	34,1
C-22	31,3	31,3	31,0
C-23	28,0	27,9	28,1
C-24	16,6	16,6	15,5
C-25	15,5	15,5	15,5
C-26	16,7	16,6	16,7
C-27	25,9	25,8	25,9
C-28	70,7	70,5	69,7
C-29	33,1	33,0	33,2
C-30	23,5	23,4	23,6

R₁ (acetato): 171,3 (C'1), 20,9 (C'2).
R₂ (palmitato): 173,7 (C'1), 34,8 (C'2), 25,1 (C'3), 29,4 (C'4), 29,6 (C'5-C'8), 29,5 (C'9), 29,3 (C'10), 29,2 (C'11), 29,1 (C'12), 28,0 (C'13), 31,9 (C'14), 22,6 (C'15), 14,1 (C'16).¹⁰¹

A análise dos espectros de RMN^1H e de $RMN^{13}C$ e a comparação dos sinais observados com os dados da literatura,^{101, 117, 118} permite confirmar que o composto (112) apresenta um esqueleto triterpénico pentacíclico do tipo olean-12-eno. Esta convicção é apoiada pela presença dos sinais a:

143,5 ppm característico de um carbono sp^2 metínico, C-12;

122,7 ppm característico de um carbono sp^2 tetrasubstituído, C-13;

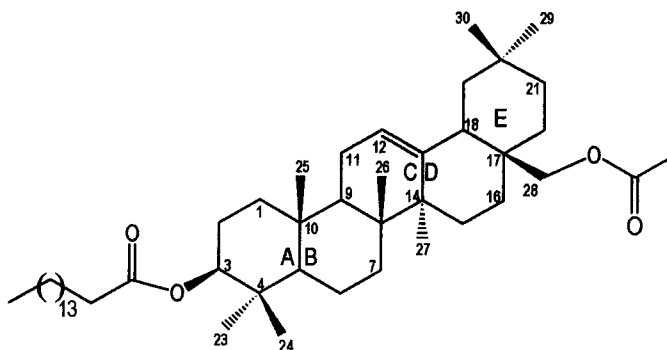
30,8 ppm característico de um carbono quaternário, C-20,

e por terem sido identificados por DEPT seis carbonos quaternários na estrutura do composto. Este facto permite distinguir um esqueleto olean-12-eno de um esqueleto urs-12-eno, visto este possuir apenas cinco carbonos quaternários.

No espectro de $RMN^{13}C$ do composto (112) existem dois sinais característicos da presença de grupos éster. Um dos sinais surge apresenta um δ a 80,4 ppm e foi identificado por DEPT como metino, o outro com δ a 70,7 ppm foi identificado como sendo um metileno. Por comparação dos dados de $RMN^{13}C$ do composto (112) com os dados referidos na literatura^{117, 118} para os compostos, eritrodioleína e diacetato de eritrodioleína (compostos de esqueleto olean-12-eno) pode-se admitir que os dois grupos éster se encontram ligados aos átomos de carbono C-3 e C-28.

Os dados apresentados nas tabelas III.9 e III.10, permitem identificar os grupos éster como sendo o acetato e o palmitato. No entanto as evidências espectrocópicas não são conclusivas a ponto de defenir a qual dos carbonos C-3 ou C-28 se encontram ligados.

A análise dos espectros de próton e de carbono e a semelhança dos dados obtidos com os da literatura,^{98, 104, 105, 106, 117, 118, 120, 121} permite identificar a estrutura do composto (112) com a do 3 β -palmitóxi-28-acetóxi-olean-12-eno (diéster de eritrodioleína).



3 β -palmitóxi-28-acetóxi-olean-12-eno (112)

(diéster de eritrodioleína)

III.5.7. Isolamento e caracterização estrutural de uma mistura de acetatos de α + β -amirina.

As fracções 48 a 64 da cromatografia C, eluídas com n-hexano:éter etílico (98:2), foram reunidas resultando 142 mg de amostra.

Nos espectros de próton destas fracções observou-se um conjunto de sinais característicos dos compostos triterpenos pentacíclicos do tipo urs-12-eno e olean-12-eno que indicavam a presença de uma mistura de α -amirina e β -amirina na amostra. A presença do sinal característico do grupo metilo do acetato permitiu suspeitar que as amirinas estavam esterificadas.

Outros sinais de pequena intensidade e com desvios químicos entre δ 2,8 e δ 4,2 ppm e a existência de um sinal muito intenso com δ 1,23 ppm, característico de prótons metilénicos, levou a admitir que nesta mistura também existiam outros compostos, possivelmente álcoois de cadeia linear.

O processo de separação iniciou-se submetendo 123 mg da mistura a uma cromatografia em camada fina preparativa (CCFP: 3P). Na cromatografia obtiveram-se três fracções, as duas menos polares (3P₁ e 3P₂) eram misturas que apresentaram grande complexidade. A fracção mais polar (3P₃), com a massa de 76 mg, apresentou em várias CCF duas manchas intensas praticamente sobrepostas e outras manchas de compostos minoritários.

Os compostos maioritários da fracção 3P₃ foram separados por cromatografia "flash" em sílica gel G60, cromatografia C₄. Nas fracções 9 a 16 foram isolados 68 mg da mistura (113,114), um sólido branco amorfo que não foi possível isolar nas cromatografias efectuadas.

No espectro de IV da mistura (113,114), pode-se observar uma banda de forte intensidade a 1732 cm⁻¹ associada à vibração de alongação do grupo funcional carbonilo (de ésteres ou lactonas). Observam-se também as bandas de intensidade média a forte centradas a 1163 cm⁻¹, 1076 e 989 cm⁻¹, atribuíveis a vibrações de alongação das ligações C-O características da presença de ésteres na mistura.⁷⁶

No espectro de RMN ¹H da mistura dos compostos (113,114) (figuras III.24 e III.25) observa-se:

- um tripleto centrado a δ 4,50 ppm (1H, t, J=8,5r Hz) característico de um próton geminal a um grupo éster - RCOOCH₂R₁R₂.^{77, 78}

- um singuleto centrado a δ 2,05 ppm (2H, s) que é atribuível aos prótons do grupo metilo do acetato - CH₃OCOR.^{77, 78, 79}

- dois tripletos centrados a δ 5,18 e a δ 5,13 ppm (1H, t), característicos do próton olefínico em H-12 dos triterpenos pentacíclicos do tipo olean-12-eno e urs-12-eno, respectivamente, que

conjuntamente com outros sinais permitiram identificar a presença de acetatos de β -amirina e de α -amirina. 77, 78, 79,

- entre δ 1,13 e δ 0,80 ppm observam-se diversos sinais singuleto relativos à ressonância de grupos metilo de compostos com esqueleto triterpênico.

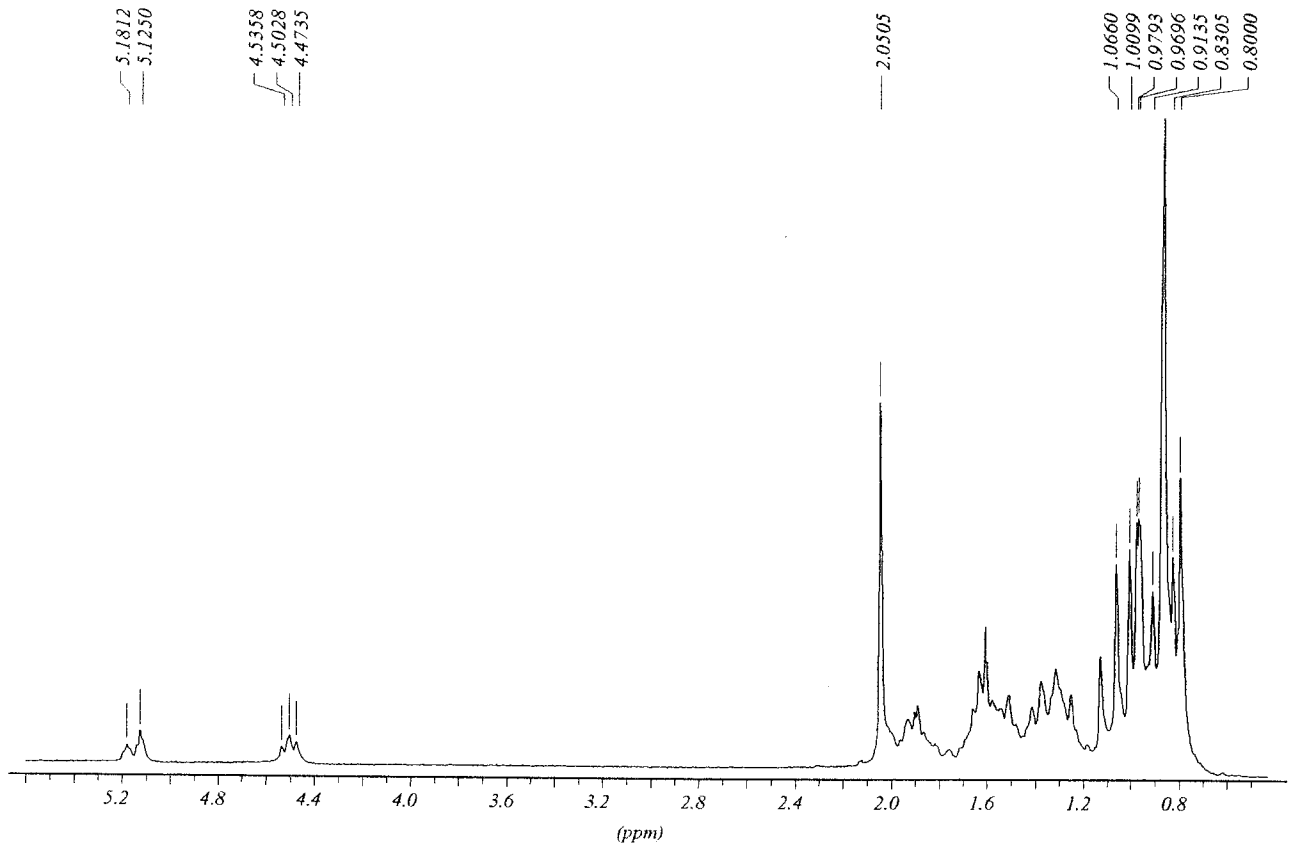


Figura III 34.: Espectro de RMN^1H da mistura dos compostos (113;114)

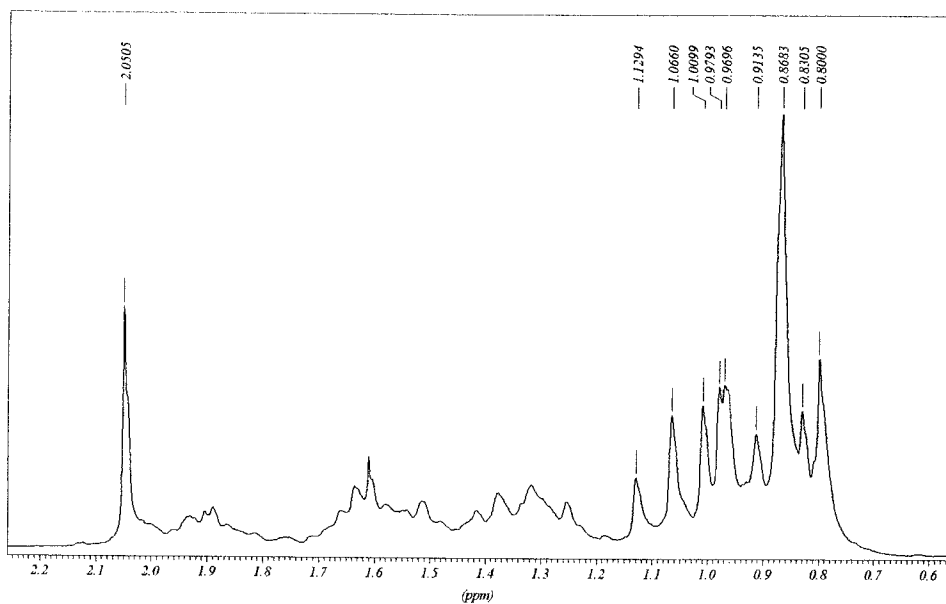


Figura III 35.: Ampliação do espectro de RMN^1H da mistura (113;114) na zona entre δ 0,60 e δ 2,20 ppm.

No espectro de $RMN^{13}C$ da mistura (113,114) observam-se cinquenta sinais que pela técnica de $DEPT$ (figuras III.36, III.37) se atribuem (na tabela III.11) a dezasseis grupos metilo, quinze grupos metileno, nove grupos metino, dez átomos de carbono tetrasubstituído, dos quais dois são olefinicos e um é carbonilo. O desvio químico dos sinais observados no espectro e a sua atribuição aos átomos de carbono dos compostos fez-se por comparação com os valores da literatura e estão representados na tabela III.12.

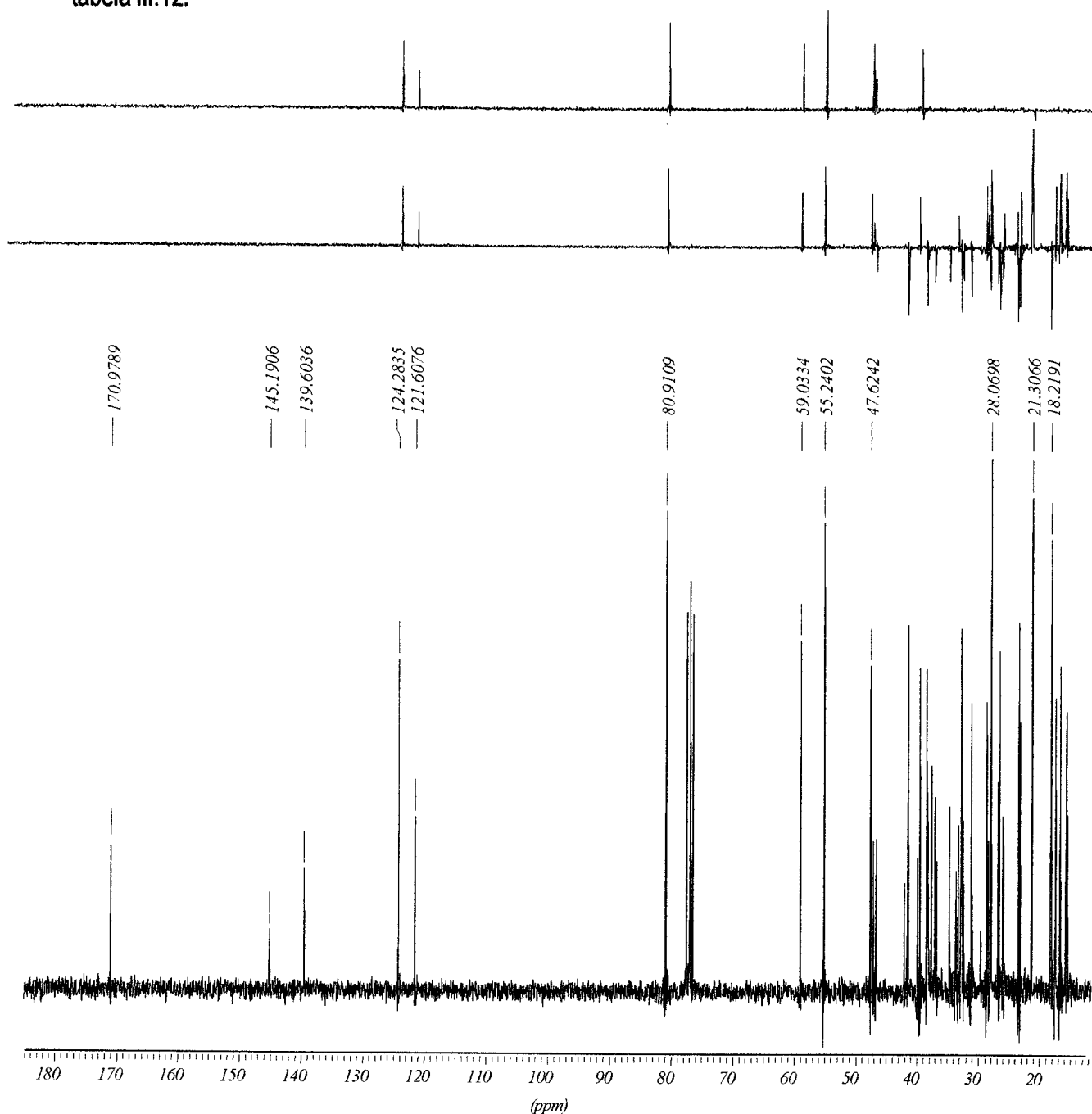


Figura III 36.: Espectros de $RMN^{13}C$ - $DEPT$ da mistura dos composto (113;114); em baixo, desacoplamento prótonico de banda cheia; a meio, espectro $DEPT$ com pulso a 135° ; em cima, espectro $DEPT$ com pulso a 90° .

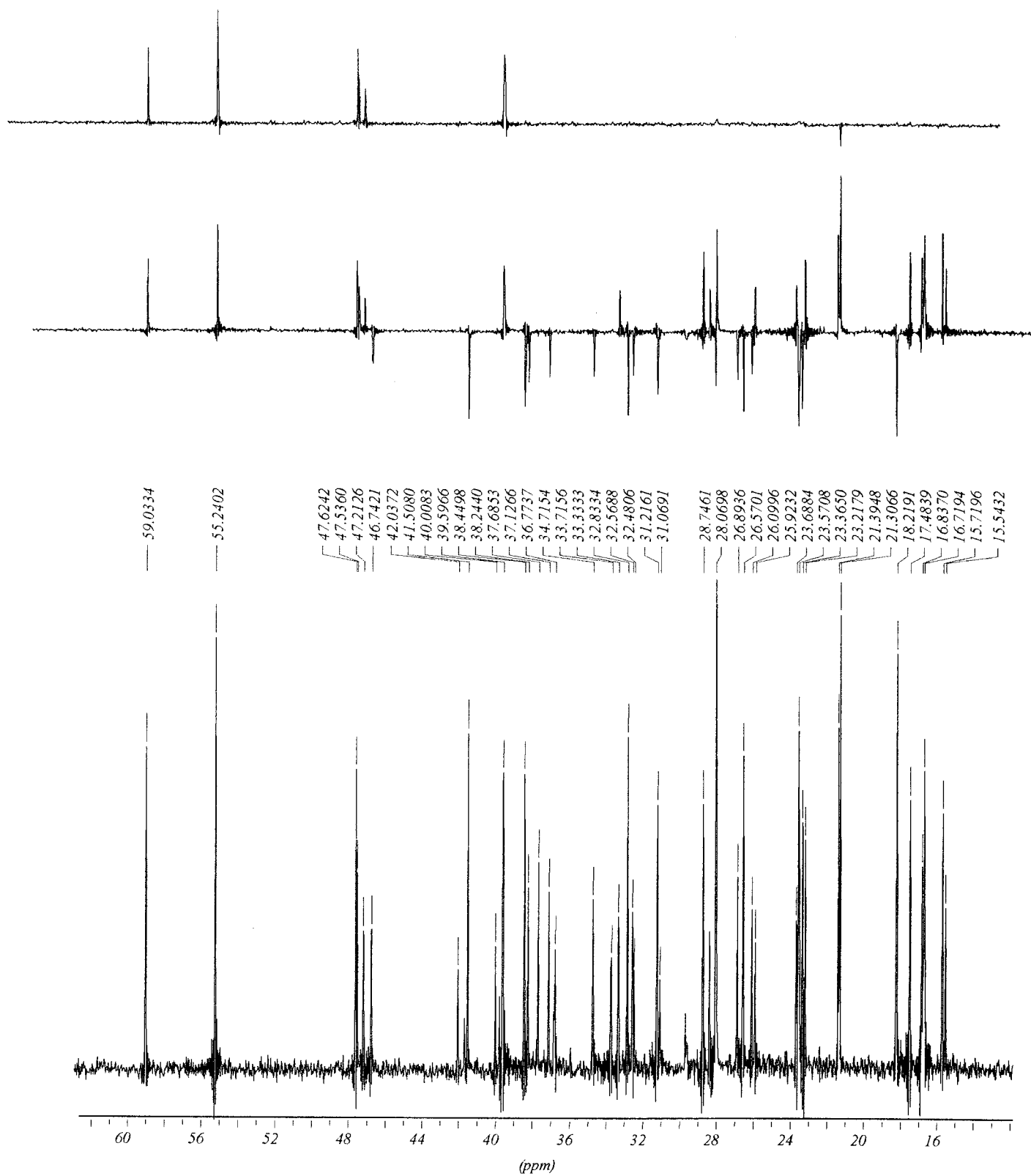
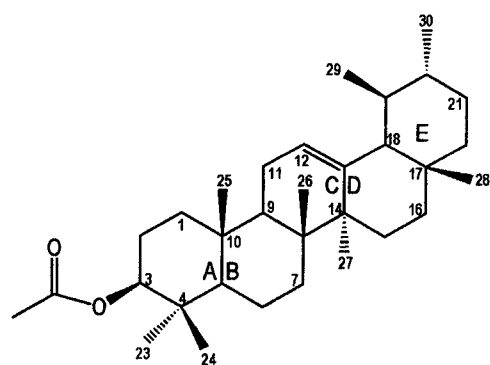


Figura III 37.: Espectro de $RMN^{13}C$ - DEPT da região alifática da mistura dos composto (113;114); em baixo, desacoplamento prótonico de banda cheia; a meio, espectro DEPT com pulso a 135° ; em cima, espectro DEPT com pulso a 90° .

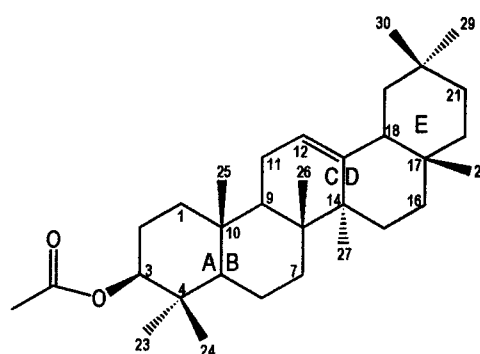
Tabela III. 11.: Relação dos tipos de carbono da mistura (113 ; 114) identificados por $RMN^{13}C$ - DEPT.

Tipo de Carbono						
$-\text{CH}_3$	>CH_2	$-\text{CH}$	$=\text{CH}$	$-\text{C}-$	$=\text{C}$	RCOOR'
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
15,5	18,2	39,6	121,6	31,1	139,6	171,0
15,7	23,4	47,2	124,3	32,5	145,2	
16,7	23,6	47,5		33,7		
16,8	26,1	47,6		36,8		
17,5	26,6	55,2		37,7		
21,3	26,9	59,0		40,0		
21,4	28,2	80,9		42,0		
23,2	31,2					
23,7	32,6					
25,9	32,8					
26,5	34,7					
28,1	37,1					
28,4	38,2					
28,7	38,4					
33,3	41,5					
	46,7					

A análise dos espectros de RMN^1H e $RMN^{13}C$ e a sua comparação com dados da literatura,^{79, 80, 81, 82, 83, 119, 120, 121, 122} permite concluir que a mistura de compostos (113;114) proveniente das fracções 9 a 16 da cromatografia C_4 é uma mistura de acetato de α -amirina (113) e acetato de β -amirina (114).



3 β -acetóxi-urs-12-eno (113)
(acetato de α -amirina)



3 β -acetóxi-olean-12-eno (114)
(acetato de β -amirina)

Tabela III. 12.: Atribuição dos desvios químicos de carbono dos compostos (113) e (114) e comparação com os valores da literatura.

Atribuição	Acetato de α -amirina	Composto (113)	Composto (114)	Acetato de β -amirina
Carbono	δ (ppm) ^{119, 120}	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm) ^{121, 122}
C-1	38,4	38,4	38,2	38,2
C-2	23,6	23,6	23,6	23,6
C-3	80,7	80,9	80,9	80,7
C-4	37,6	37,7	37,7	37,6
C-5	55,3	55,2	55,2	55,3
C-6	18,3	18,2	18,2	18,3
C-7	32,8	32,8	32,6	32,6
C-8	40,1	40,0	40,0	39,7
C-9	47,6	47,5	47,6	47,6
C-10	36,8	36,8	36,8	36,8
C-11	23,3	23,4	23,4	23,4
C-12	124,1	124,3	121,6	121,5
C-13	139,4	139,6	145,2	144,9
C-14	42,1	42,0	42,0	41,7
C-15	28,7	28,7	28,2	28,3
C-16	26,7	26,6	26,1	26,2
C-17	33,8	33,7	32,5	32,5
C-18	59,0	59,0	47,2	47,2
C-19	39,7	39,6	46,7	46,8
C-20	39,7	39,6	31,1	31,1
C-21	31,3	31,2	34,7	34,8
C-22	41,5	41,5	37,1	37,1
C-23	28,1	28,1	28,1	28,1
C-24	16,8	16,7	15,5	15,5
C-25	15,7	15,7	15,7	15,7
C-26	16,8	16,8	16,7	16,8
C-27	23,2	23,2	25,9	26,0
C-28	28,1	28,1	28,4	28,4
C-29	23,2	23,2	33,3	33,4
C-30	21,4	21,4	23,7	23,6
CH ₃ COOR	21,2	21,3	21,3	21,2
CH ₃ COOR	170,4	171,0	171,0	170,4

3.6. Conclusões

Os resultados dos testes efectuados no estudo preliminar da composição química de caules e folhas da *Tolpis barbata* apontam para a existência na planta dos seguintes grupos de compostos químicos:

- matérias gordas e/ou ácidos gordos
- esteróis e/ou triterpenos
- taninos catéquicos
- compostos redutores
- flavonósidos
- heterósidos triterpénicos
- heterósidos esterólicos e/ou heterósidos triterpénicos
- glúcidos (oses e/ou polioses)

Na fracção menos polar dos extractos de n-hexano de folhas e caules da *T. barbata* foram identificados por GC-MS, dezanove hidrocarbonetos de cadeia longa, dos quais, dois são ramificados e três são insaturados. A numeração destes compostos segue a ordem crescente dos seus tempos de retenção:

5-Metil-undecano (91) ; Tridecano (92) ; Dodec-2-eno (93) ; Tetradecano (94);

2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano (95) ; Hexadec-2-eno (96) ; Hexadecano (97);

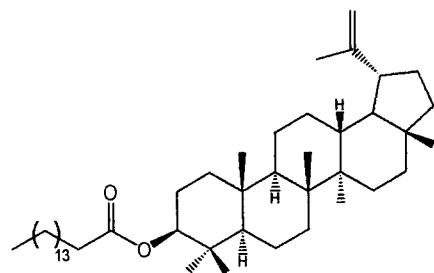
Octadec-5-eno (98) ; Octadecano (99) ; Nonadecano (100) ; Eicosano (101);

Uneicosano (102) ; Docosano (103) ; Tricosano (104) ; Tetracosano (105);

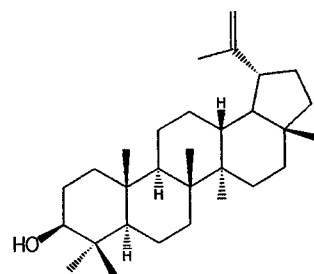
Pentacosano (106) ; Heptacosano (107) ; Nonacosano (108) ; Untriacontano (109)

No extracto de n-hexano de folhas e caules da *T. barbata* foram isolados, por técnicas cromatográficas gerais, nove compostos triterpenos pentacíclicos, sendo dois de esqueleto lupano, dois de esqueleto urs-12-eno, três de esqueleto olean-12-eno e dois de esqueleto olean-18-eno. Destes, apenas um composto não existe como produto natural na planta, pois foi obtido por hidrólise alcalina de um composto natural.

Compostos isolados com esqueleto lupano:

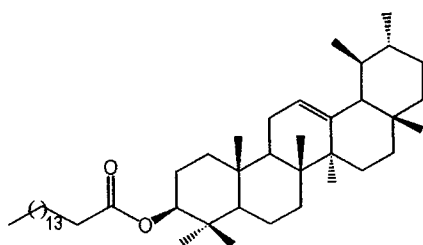


3β-palmitóxi-5α-lup-20(29)-eno (72)
(palmitato de lupeol)

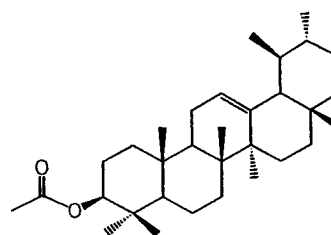


lup-20(29)-en-3β-ol (48)
(lupeol)

Compostos isolados com esqueleto urs-12-eno:

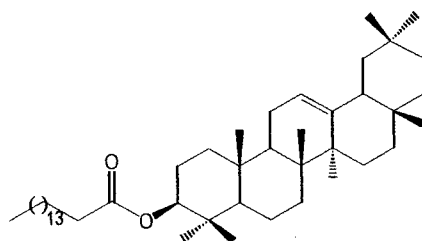


(3β-palmitóxi-urs-12-enilo) (74)
(palmitato de α-amirina)

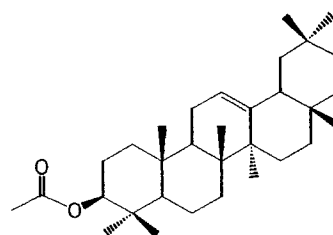


3β-acetóxi-urs-12-eno (113)
(acetato de α-amirina)

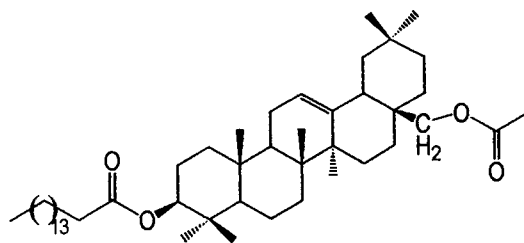
Compostos isolados com esqueleto olean-12-eno:



(3β-palmitóxi-olean-12-enilo) (110)
(palmitato de β-amirina)

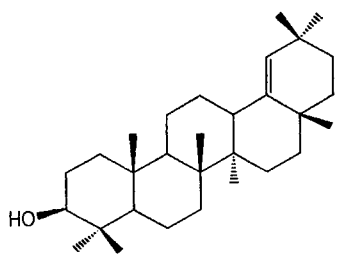


3β-acetóxi-olean-12-eno (114)
(acetato de β-amirina)

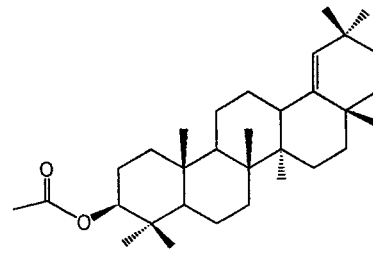


3β-palmitóxi-28-acetóxi-olean-12-eno (**112**)
(diéster de eritrodil)

Compostos isolados com esqueleto olean-18-eno



3β-hidróxiolean-18-eno (**83**)
(germanicol)



3β-acetóxi-olean-18-eno (**111**)
(acetato de germanicol)

A identificação e a caracterização estrutural dos compostos isolados foi feita através de métodos cromatográficos e espectrais, GC-MS, $RMN^{13}C$, RMN^1H e IV.

CAPÍTULO IV – PARTE EXPERIMENTAL

IV. Parte Experimental

IV.1. Identificação, recolha e conservação da *T. barbata*

A colheita da *T. barbata* efectuou-se na Herdade Experimental da Mitra, situada na freguesia de Valverde, no concelho de Évora. As plantas foram identificadas no local por um especialista do Departamento de Planeamento Biofísico da Universidade de Évora, que depois de delimitar a zona de colheita colaborou na sua recolha.

A recolha obedeceu aos critérios de protecção da espécie na zona de colheita e outros relacionados com as condições climáticas e de localização das plantas no prado. Evitaram-se as colheitas nas zonas húmidas, por serem locais onde normalmente as plantas produzem metabolitos secundários em menor quantidade.^{68, 69}

Procurou-se que a recolha fosse representativa do crescimento médio destas plantas na zona. Colheu-se material suficiente para a realização das diversas fases do estudo da planta.

Vários espécimes foram cuidadosamente preparados e guardados no Departamento de Química da Universidade de Évora. O restante material depois de seco foi armazenado, respeitando-se os requisitos para a sua conservação.

IV.2. Preparação da planta para a análise

As plantas foram separadas em lotes de acordo com o seu estado de maturação.

Fez-se a monda no material colhido, ou seja, procedeu-se à sua limpeza para eliminar plantas de outras espécies, poeiras e outros detritos.

Eliminaram-se as partes da planta que apresentavam deterioração ou que apresentavam sinais da presença de larvas ou ovos de insectos.

IV. 2. 1. Pesagem dos lotes de plantas

As plantas depois de preparadas foram pesadas e secas ao abrigo da luz em local arejado e à temperatura ambiente.

Após a fase de secagem, as plantas foram novamente pesadas e posteriormente separadas nos diversos órgãos: raiz, caule, folha e flor. Pesaram-se também os órgãos de cada lote de planta. Apresentam-se no quadro IV.1., os valores dos pesos dos diversos lotes de plantas antes e depois de secas. Também é possível recolher neste quadro outras informações, época do ano em que foram feitas as colheitas, critério para a elaboração dos lotes e a relação *peso de planta seca/ peso de planta fresca*.

Quadro IV. 1.: Peso dos lotes de plantas da *T. Barbata* antes e depois da secagem

Lote	Planta fresca (g)	Planta seca (g)	Material seco (%)	Observações
Colheita em finais de Abril				
B	731,6	154,9	21,2	muitos botões; algumas flores, muitas folhas
C	627,2	147,8	23,6	poucos botões; muitas flores, muitas folhas
D	961,4	248,4	25,8	muitas flores, poucas folhas, caules muito ramificados

No quadro IV.2 apresenta-se o peso dos órgãos das plantas obtido após secagem. Estes lotes de plantas foram considerados de referência relativamente a três fases do seu crescimento. O lote B era constituído por plantas um pouco mais jovens, estas apresentavam muitos botões mas estavam mais atrasadas na floração do que as dos lotes C e D. Estes dois lotes apresentavam idêntica floração, apresentando o lote D caules mais longos.

Para os lotes referidos também se apresentam os valores em percentagem da relação *peso do órgão/peso total de planta seca*.

Quadro IV. 2.: Peso de órgãos da planta e sua percentagem relativa ao peso total de planta seca

Lote	Peso do órgão (g)		Peso de planta seca (g)	Peso do órgão / Peso de planta seca (%)
	Órgão	Peso (g)		
B	Flor	21,29	143,96	15,3
	Folha	48,62		33,8
	Caule	47,86		33,3
	Raiz	25,79		17,9
C	Flor	28,17	141,90	19,9
	Folha	31,29		22,1
	Caule	59,62		42,0
	Raiz	22,77		16,1
D	Flor	58,02	241,84	24,0
	Folha	34,84		14,4
	Caule	116,73		48,3
	Raiz	32,25		13,3

IV.2. Estudo preliminar dos principais grupos de compostos da *Tolpis barbata*.

IV.2.1. Metodologia seguida no estudo preliminar da composição química da *T. barbata*

O material em estudo (caule e folha, analisados separadamente) foi esgotado por extracções com solventes de polaridade crescente, à temperatura constante de 35° C. Obtiveram-se os extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol e água. Com os extractos efectuou-se um estudo preliminar da composição química da *T. barbata*, ou seja, determinou-se os principais grupos de produtos naturais de cada extracto. Para o efeito, procedeu-se de acordo com o método proposto por Ioan Ciulei, (1984),⁷¹ tendo-se introduzido pequenas alterações à marcha geral de análise. O autor baseia o estudo nos extractos de éter etílico, etanol e água. Neste trabalho, estudaram-se os extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol e água.

Os dois extractos menos polares (n-hexano e clorofórmio) foram submetidos aos mesmos testes que Ciulei, I.⁷¹ propõe para o estudo do extracto de éter etílico. Em relação aos alcalóides, além dos testes propostos com os reagentes de Mayer e de Bertrand, utilizou-se também o reagente de Dragendorff.

IV.2.2. Extracção pelo processo de digestão à temperatura de 35° C

O processo utilizado na obtenção dos extractos dos lotes D₂ (caules) e D₃ (folhas) destinados ao estudo preliminar dos principais grupos de compostos químicos não voláteis da *T. barbata*, foi a digestão à temperatura de 35° C.

Nas extracções utilizaram-se por ordem de polaridade crescente os solventes n-hexano, clorofórmio, etanol e água.

IV.2.2.1. Extracções efectuadas pelo processo de digestão

Caules e folhas da planta foram triturados em separado. As amostras foram colocadas em digestores separados e mantidos à temperatura de 35° C. As amostras foram esgotadas com cada um dos solventes. No final de cada digestão, a solução resultante foi filtrada e o solvente foi evaporado a pressão reduzida à temperatura de 35° C. Os extractos foram conservados em atmosfera de azoto à temperatura de 4° C.

Os pesos dos extractos de n-hexano, clorofórmio, etanol e água, obtidos com os lotes de planta designados por D₂ (caule) e D₃ (folha), apresentam-se no quadro IV.3..

Quadro IV. 3.: Peso dos extractos dos lotes D₂ e D₃ da *T. barbata* obtidos por digestão a 35° C

Solvente	Peso de amostra (g)		Período de extracção (dia)	Peso de extracto (g)		% de extracto	
	caule	folha		caule	folha	caule	folha
n-Hexano	116,73	34,84	18	2,3203	1,8179	1,99	5,22
Clorofórmio			21	0,9105	0,7655	0,78	2,20
Etanol			34	21,2043	6,8462	18,16	19,65
Água			16	21,6432	6,5129	18,54	18,69

IV.2.3. Testes utilizados na caracterização química preliminar da *T. barbata*

A marcha geral efectuada na caracterização química dos principais grupos de compostos da planta, apresenta-se resumidamente no quadro IV.4.. Neste quadro, os extractos são referidos pelas letras H, C, E e A, respectivamente, n-Hexano, etanol, clorofórmio e água.

Quadro IV. 4.: Testes efectuados no estudo preliminar da caracterização química da *T. barbata*

Análise	Grupo de compostos	Extracto	Teste	Reacção de:
1	Alcalóides (bases)	H ; C	1	Mayer; Bertrand; Dragendorff
2	Agliconas flavónicas	H ; C	2	Schibata
3	Emodóis	H ; C ; E	3	Bornträger
4	Cumarinas	H ; C ; E	4	(Fluorescência UV)
5	Esteróis ou Triterpenos	H ; C	5	Liebermann-Burchard
6	Carotenóides	H ; C	6	Carr - Price
7	Óleos voláteis	H ; C	7	(Destilação em corrente de vapor)
8	Esteróis ou triterpenos	H ; C	5	Saponificação ; Liebermann-Burchard
9	Carotenóides	H ; C	6	Saponificação ; Carr - Price
10	Ácidos gordos	H ; C	8	Saponificação
11	Taninos gállicos	E ; A	9	FeCl ₃
12	Taninos catéquicos	E ; A	9	FeCl ₃
13	Compostos redutores	E ; A	10	Fehling
14	Alcalóides (sais)	E ; A	1	Mayer; Bertrand; Dragendorff
15	Antocianósidos	E ; A	11	($\Delta pH \Rightarrow$ alteração de cor)
16	Antracénósidos	E	3	Bornträger
17	Heterósidos esterólicos	E ; A	5	Liebermann-Burchard
18	Heterósidos triterpénicos	E ; A	5	Liebermann-Burchard
19	Heterósidos cumarínicos	E	4	(Fluorescência UV)
20	Flavonósidos	E ; A	2	Schibata
21	Poliósidos	A	12	Timol em meio ácido

IV.3. Instrumentação e técnicas analíticas mais utilizadas

IV.3.1. Determinação dos pontos de fusão

Os pontos de fusão (*p.f.*) não estão corrigidos, foram determinados em aparelhos de placa aquecida com microscópio incorporado, das marcas Reichert – Jung e LEICA VMTG.

IV.3.2. Determinação da rotação óptica específica

A rotação óptica específica $[\alpha]$ foi determinada nos polarímetros da marca Perkin Elmer modelo 241 MC e Atago modelo Polax – L. O solvente e a concentração a que se fez a determinação são especificados para cada caso.

IV.3.3. Espectros de infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) foram traçados em espectrofotômetro com transformada de Fourier, da marca Perkin Elmer modelo Paragon 1000 PC, em pastilha de brometo de potássio (KBr) e em película fina por dissolução em solvente adequado.

IV.3.4. Espectros de ultravioleta-visível

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram traçados num espectrofotômetro de feixe duplo, da marca Hitachi modelo U-2001. Utilizaram-se cubas de quartzo com 1 cm de espessura. O solvente e a concentração a que se fez a determinação são especificados para cada caso.

IV.3.5. Espectros de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (*RMN* ^1H) e de carbono (*RMN* ^{13}C) foram traçados num aparelho da marca Bruker modelo AC 250 P operando a 250 MHz para o próton e a 62,9 MHz para o carbono. Usando-se como solvente o deuteroclorofórmio (CDCl_3). Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm (utilizando como referência o CHCl_3 residual, 7,26 ppm para o ^1H e 77,0 ppm para o ^{13}C) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Os dados de *RMN* ^1H são apresentados pela seguinte ordem: solvente, desvio químico (δ) em ppm, intensidade relativa de prótons (H), multiplicidade e constantes de acoplamento (J) em Hz. A multiplicidade refere-se por: *s* - singuleto, *sl* - singuleto largo, *d* - duplete, *dl* - duplete largo, *dd* - duplo duplete, *t* - tripleto, *dt* - duplo tripleto, *m* - multiplete.

Nos espectro de *RMN* ^{13}C a multiplicidade foi assinalada pela utilização da técnica *DEPT* a 90° e a 135° .

IV.3.6. Espectrometria de massa

Os espectros de massa obtiveram-se por *CG-MS* num cromatografo Fissons System equipado com um detector de massa do tipo quadrupolo VG Trio 1000 e com uma fonte de impacto electrónico operando a 70 eV. A este equipamento está associado a uma biblioteca de espectros da base de dados Wiley.

IV.3.7. Cromatografia gás líquido

A cromatografia gás líquido (GC) foi uma das técnicas utilizadas na determinação do grau de pureza e na identificação de compostos por comparação com amostras autênticas. Nesta técnica foi utilizado um cromatógrafo de gases da marca Shimadzu modelo QP-1000, equipado com coluna capilar DB1 (15m x 0,25 mm, 0,1 μm ; J e W Scientific). O argon foi utilizado como gás de arraste.

IV.3.8. Técnicas Cromatográficas Gerais:

IV.3.8.1. Cromatografia em camada fina analítica

As cromatografias em camada fina analítica (CCF) foram realizadas em placas de sílica gel G-60 Merck 1.05553 e em placas de sílica gel G-60 F₂₅₄ Merck 1.05554, ambas com a espessura 0,2 mm e preparadas em suporte de alumínio. Foram activadas durante uma hora a 120 °C. No desenvolvimento cromatográfico foram utilizadas diversas misturas de solventes, com maior frequência a mistura de ciclohexano:acetato de etilo. As manchas foram visualizadas por irradiação com luz ultravioleta de comprimento de onda (λ) 254 e 365 nm. Na revelação fizeram-se pulverizações com solução de ácido sulfúrico em etanol a 20% (v/v) ou solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 5%, (p/v), seguidas de aquecimento à temperatura de 120 °C durante cerca de 10 minutos.

IV.3.8.2. Cromatografia em camada fina preparativa

As cromatografias em camada fina preparativa (CCFP) foram efectuadas em placas de sílica-gel F₂₅₄ Merck 1.05554 de dimensão 20x20 cm e espessura 0,5 mm ou 0,75 mm, preparadas em suporte de alumínio. Foram activadas durante 2 horas a 120 °C. Os compostos foram recuperados por percolação com misturas n-hexano:éter etílico ou n-hexano:acetato de etilo.¹²³

IV.3.8.3. Cromatografia em coluna

Nas cromatografias em coluna húmida (CC) utilizou-se como fase estacionária sílica gel G 60 Merck 1.07734 ou uma mistura desta com nitrato de prata (sílica gel:AgNO₃) numa proporção de 10:1 (p/p). Em ambos os casos a massa de adsorvente utilizada foi estimada numa proporção média de 80:1 face à massa de amostra.

As colunas de vidro foram cheias lançando a fase estacionária sobre o eluente inicial (n-hexano). Para facilitar a compactação e homogeneização da fase estacionária produziu-se vibração na coluna e agitou-se frequentemente durante a fase de enchimento. As amostras foram aplicadas após 24

horas de sedimentação. Nas situações onde a amostra não se dissolvia totalmente no eluente inicial, esta era dissolvida num solvente mais polar juntamente com uma pequena quantidade de celite . Depois de evaporar o solvente transferia-se a mistura para a coluna.

Nas cromatografias utilizaram-se sequências de eluentes com polaridade crescente. As misturas para os sistemas de eluição fizeram-se com solventes p.a. ou puros redestilados. O volume das fracções eluídas foi constante em cada cromatografia e a sua composição foi seguida através de *CCF*. As fracções foram secas a pressão reduzida à temperatura de 35° C e o seu peso acompanhado por pesagem em balança analítica.

IV.3.8.4. Cromatografias “flash”

Nas cromatografias realizadas com a técnica “*flash*” foi utilizada sílica gel G60 400-230 mesh , Merck 9385. Nas colunas de vidro equipadas com placa purosa foi previamente depositada uma pequena camada de sílica gel G60 40-60 mesh , em seguida a fase absorvente foi introduzida na coluna na ausência de eluente, formando uma coluna compactada de cerca de 10 cm. Após a aplicação da amostra adicionou-se nova camada de sílica gel 40-60 mesh. Ao sistema cromatográfico foi aplicada pressão positiva durante a eluição. Os eluentes foram testados por *CCF* afinando o sistema para que no desenvolvimento cromatográfico o componente menos polar apresentasse um R_f de cerca de dois terços. Nestas condições e sem alterar a composição do eluente, cerca de vinte eluições deverão ser suficientes para conseguir o esgotamento completo da coluna.¹²⁴

IV.4. Reacções gerais utilizadas:

IV.4.1. Reacção de saponificação

A amostra destinada à reacção de hidrólise dissolveu-se numa solução metanólica de hidróxido de potássio a 10% (p/v) e a reacção processou-se à temperatura ambiente durante 48 horas, o avanço da reacção foi seguido por *CCF*. Terminada a fase de hidrólise, foi adicionada água até duplicar o volume da mistura. A amostra foi concentrada para eliminar o metanol. Procedeu-se à extracção com

éter etílico, tendo-se lavado repetidas vezes a fase orgânica com água, para eliminar o excesso de base. Foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente.⁷⁷

IV.4.2. Preparação do diazometano

A uma mistura de 4,8 g de hidróxido de potássio, 9 mL de água, 28 mL de metanol e 8 mL de éter, contida num balão de duas tubuladuras adaptado a um sistema de destilação simples, foi adicionado gota a gota uma solução de 17,2 g de N-nitroso-N-metilolilsulfonamida em 100 mL de éter, com agitação e aquecimento a 60-65 °C. O diazometano produzido foi recolhido em éter seco e conservado no frio e ao abrigo da luz.¹²⁵

IV.4.3. Metilação com diazometano

A amostra destinada à reacção de esterificação foi dissolvida numa pequena quantidade de éter seco e foi-lhe adicionado pequenos volumes de solução etérea de diazometano. Quando se iniciou o processo de metilação observou-se a libertação de azoto no seio da solução. Enquanto esta situação se manteve, repetiram-se as adições até ao momento em que a solução apresentou coloração amarela persistente. Terminada a reacção, a mistura reaccional foi guardada ao abrigo da luz durante uma noite. Posteriormente foi lavada diversas vezes com solução de HCl 2M e depois com uma solução de NaHCO₃. Por fim, a solução foi lavada várias vezes com água destilada até se atingir um pH neutro. Após as lavagens, secou-se com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida.^{77, 125}

IV.5. Estudo da composição química do extracto de n-hexano da *T. barbata*

IV.5.1. Extracção por *lixiviação* com extractor de Soxhlet

O estudo preliminar da composição química de folhas e caules da *T. barbata*, discutido no ponto III.3.1, não apresentou diferenças que justificassem prosseguir a análise de caules e folhas em amostras separadas. Por isso, o extracto de n-hexano destinado ao estudo da composição química da *T. barbata* foi obtido a partir de uma amostra de folhas e caules da planta provenientes de lotes de plantas com um estado de maturação idêntico ao das plantas utilizadas no estudo preliminar da composição química..

O material foi triturado e pesado. Obteve-se 560 g de amostra que foi dividida em dez fracções destinadas à *lixiviação* com extractor de Soxhlet. Cada fracção foi extraída com n-hexano durante oito horas.

Os dados relativos a este processo extractivo são apresentados no quadro IV.5. Na extracção obteve-se 9,730 g de extracto, do qual, 9,235 g foi fraccionado por cromatografia em coluna de sílica gel num sistema de solventes de polaridade crescente (*cromatografia A*).

Quadro IV. 5.: Peso do extracto de n-hexano da *T. barbata* obtido com extractor de Soxhlet

Solvente	Peso amostra (g)	Peso de extracto (g)	Observações
n-hexano	560,0	9,730	aspecto ceroso

IV.5.2. Fraccionamento do extracto de n-hexano da *T. barbata*

Preparou-se de modo habitual uma coluna de cromatografia, de 100 cm de altura por 5 cm de diâmetro, com 850 g de sílica Gel 60 (70-230) mesh, Merck 1.07734, em n-hexano.

A amostra, 9,235 g de extracto de n-hexano, foi dissolvida em éter etílico, foi-lhe adicionado 3 g de celite, tendo o solvente sido evaporado a pressão reduzida. A mistura foi recuperada e aplicada na coluna de cromatografia. Referenciou-se esta cromatografia por *cromatografia A*.

Durante a eluição recolheram-se fracções de 100 mL, alterando-se progressivamente a polaridade do eluente.

A eluição teve como solvente inicial o n-hexano passando-se para misturas de solventes de maior polaridade, éter isopropílico, éter etílico e clorofórmio. Desta cromatografia resultaram misturas de compostos menos complexas. Os resultados da *cromatografia A* resumem-se no quadro IV.6.

Quadro IV. 6.: Dados da *cromatografia A*

Fracções	Eluente	Peso (g)	%	Técnicas de separação e Compostos isolados
1 - 15	n-hexano	0,210	2,3	GC- MS (mistura de hidrocarbonetos - (91 a 109))
16 - 30	" "	0,057	0,6	misturas
31 - 37	" "	0,593	6,4	cromatografia B
38 - 42	éter isopropílico	1,258	13,6	cromatografia C
43 - 50	" "	3,031	32,8	cromatografia D
51 - 103	" "	1,494	16,2	não estudadas
104 - 159	éter isopropílico:éter etílico (1:1)	0,887	9,6	" "
160 - 195	éter etílico	1,112	12,0	" "
196 - 211	clorofórmio	0,532	5,8	" "
Totais		9,174	99,3	

Neste trabalho experimental foram estudadas as primeiras 50 fracções do extracto de n-hexano que representam 57% deste extracto.

IV.5.3. Isolamento dos compostos das fracções 1 a 15 da cromatografia A

As primeiras quinze fracções eluídas com n-hexano directamente na *cromatografia A*, renderam cerca de 0,210 g de um sólido amorfo, nesta fracção do extracto de n-hexano da *T. barbata* obtiveram-se os compostos menos polares da planta.

A amostra foi analisada por *GC-MS* tendo sido identificado uma mistura de hidrocarbonetos lineares. Os compostos foram referenciados pelos números (91 a 109) ordenados pela ordem crescente dos seus tempos de retenção na coluna de *GC*.

IV.5.4. Isolamento dos compostos das fracções 31 a 37 da cromatografia A

Nas fracções 31 a 37 da *cromatografia A* obteve-se a massa de 0,593 g de extracto. A mistura foi recromatografada em coluna de sílica gel G60, *cromatografia B*.

Como eluente foi utilizado o n-hexano puro e misturas de polaridade crescente de n-hexano:acetato de etilo. Os resultados obtidos na *cromatografia B* apresentam-se no quadro IV.7..

Quadro IV. 7.: Dados da *cromatografia B*

Fracções	Eluente	Peso (g)	%	Técnicas de separação e compostos isolados
1 – 10	n- hexano	0,0181	3,1	misturas complexas
11 – 21	" "	0,1766	29,8	<i>CCFP</i> : 1P + <i>CC</i> : B ₁ (mistura (74; 110) ; composto (72))
22 – 49	" "	0,1009	17,0	misturas complexas
52	n-hexano: AcOEt (9:1)	0,1613	27,2	<i>CCFP</i> : 2P (misturas + acetato de gemanicol (111))
53 – 54	" "	0,0393	6,6	(composto (111) + misturas)
55 – 70	" "	0,0572	9,6	misturas complexas
71 – 75	n-hexano:AcOEt (85:15)	0,0080	1,3	" "
76 – 80	n-hexano:AcOEt (7:3)	0,0089	1,5	" "
Totais		0,5703	96,1	

IV.5.4.1. Isolamento de compostos das fracções 11 a 21 da cromatografia B

A separação dos compostos das fracções 11 a 21 da *cromatografia B* foi feita por cromatografia em camada fina preparativa (*CCFP*: 1P) em placa de sílica gel de 20x20 cm. Na eluição foi utilizada a

mistura n-hexano:éter isopropílico (97:3). Da cromatografia seleccionaram-se duas fracções, a sua análise por *RMN* ¹H evidenciou que ambas eram misturas de compostos.

As duas fracções foram reunidas, resultando 153 mg de amostra, esta foi recromatografada em coluna de sílica gel:nitrato de prata a 10% (m/m), *cromatografia B*₁. Os dados relativos à separação apresentam-se no quadro IV.8.

Quadro IV. 8.: Dados da *cromatografia B*₁

Fracções	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 4	n- hexano	0,0039	2,5	misturas complexas
5 – 7	" "	0,0915	59,8	mistura de compostos (74 ; 110)
8 – 10	" "	0,0097	6,3	mistura de compostos (74;110) + misturas
11 – 25	n-hexano:éter etílico (99:1)	0,0060	3,9	misturas
26 – 30	n-hexano:éter etílico (98:2)	0,0000	0	
31 – 35	" "	0,0354	23,1	composto (72)
36 – 39	" "	0,0028	1,8	composto (72) + misturas
40 – 50	" "	0,0021	1,4	misturas
Totais		0,1514	98,8	

IV.5.4.2. Purificação do composto (111) isolado na fracção 52 da *cromatografia B*

Na fracção 52 da *cromatografia B* obtiveram-se 161 mg de uma mistura que apresentou na CCF uma mancha muito intensa destacada de outras também presentes. A separação dos compostos da mistura fez-se por cromatografia em camada fina preparativa (CCFP: 2P). Isolaram-se 45 mg do composto (111) (acetato de germanicol) puro.

Os espectros de *RMN* ¹H das fracções 53 e 54 da *cromatografia B* também evidenciaram sinais característicos da presença do composto (111), enquanto nas fracções posteriores se obtiveram misturas muito complexas que não foram purificadas.

IV.5.5. Isolamento dos compostos das fracções 38 a 42 da *cromatografia A*

As fracções 38 a 42 da *cromatografia A* foram reunidas e secas, tendo-se apurado a massa de 1,258 g de extracto. A mistura foi recromatografada em coluna de sílica gel, *cromatografia C*. Preparou-se de modo habitual uma coluna de cromatografia de sílica Gel 60 (70-230) mesh, em n-hexano.

Os resultados obtidos na *cromatografia C* estão registados no quadro IV.9..

Quadro IV. 9.: Dados da *cromatografia C*

Fracções	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 10	n-hexano	0,0061	0,5	misturas
11 – 19	n-hexano:éter etílico (99:1)	0,0011	0,1	misturas
20 – 26	n-hexano:éter etílico (98:2)	0,0043	0,3	misturas
27 – 38	" "	0,1607	12,8	mistura dos compostos (74 ; 110 ; 72)
39	" "	0,0607	4,8	mistura dos compostos (74 ; 110 ; 72 ; 111)
40 – 45	" "	0,3442	27,4	composto (111) (acetato de germanicol)
46 – 47	" "	0,0848	6,7	mistura de (111) e diéster de eritrodíol (112)
48 – 64	" "	0,1420	11,3	misturas + compostos (113 ; 114)
65 – 83	" "	0,0910	7,2	compostos lineares
84 - 114	n-hexano:éter etílico (97:3)	0,0361	2,9	" "
115 - 143	(95:5)	0,0764	6,1	misturas + composto (48)
144 - 167	(92:8)	0,1070	8,5	composto (48) + misturas
168 - 190	(9:1)	0,0953	7,6	misturas complexas
Totais		1,2099	96,2	

V.5.5.1. Isolamento de compostos resultantes das reacções de saponificação

As fracções 37, 38, 44 e 45 da *cromatografia C* foram submetidas a reacções de hidrólise alcalina através do processo referido no ponto IV.4.1.

Os espectros de protão das fracções 37 e 38 revelaram que se tratava de misturas de ésteres de amirinas e de lupeol, enquanto os espectros das fracções 44 e 45 apresentaram sinais característicos do acetato de germanicol quase puro.

A parte neutra resultante da hidrólise de 42 mg dos compostos da fracção 37, foi extraída com éter etílico, tendo-se obtido 36 mg de extracto. Este foi cromatografado em sílica gel G60, *cromatografia C₁*. Nas fracções 22 a 31 isolou-se 10 mg da mistura de compostos (53;54) (β + α -amirina) e nas fracções 36 a 46 isolou-se 14 mg do composto (48) (lupeol).

Os resultados obtidos na *cromatografia C₁* estão registados no quadro IV.10..

Quadro IV. 10.: Dados da *cromatografia C₁*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 12	n- hexano	0,0076	21,1	mistura dos compostos (74 ; 110 ; 72)
13 – 21	n-hexano/éter etílico (98:2)	0,0024	6,7	misturas
22 – 35	" "	0,0101	28,1	mistura dos compostos (53 ; 54) (amirinas)
36 – 46	(95:5)	0,0135	37,5	composto (48) (lupeol)
47 – 56	(9:1)	0,0012	3,3	misturas
Totais		0,0348	96,7	

A parte neutra que resultou da hidrólise alcalina de 95 mg da fracção 38 da *cromatografia C* foi extraída com éter etílico. Obteve-se 65 mg de extracto. O processo de separação seguido foi idêntico ao da fracção etérea 37. Nas fracções 16 a 24 da *cromatografia C₂* isolaram-se 12 mg da mistura (53;54) (β + α -amirina) e nas fracções 32 a 49 isolou-se 40 mg do composto (48) (lupeol).

Os resultados obtidos na *cromatografia C₂* estão registados no quadro IV.11..

Quadro IV. 11.: Dados da *cromatografia C₂*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 8	n- hexano	0,0067	10,3	mistura dos compostos (74 ; 110 ; 72)
9 – 15	n-hexano/éter etílico (98:2)	0,0030	4,6	misturas
16 – 24	" "	0,0119	18,3	mistura dos compostos (53 ; 54) (amirinas)
25 – 31	(95:5)	0,0022	3,4	misturas
32 – 49	" "	0,0395	60,8	composto (48) (lupeol)
47 – 54	(9:1)	0,0009	1,4	misturas
Totais		0,0642	98,8	

A parte neutra resultante da hidrólise de 118 mg das fracções 44 e 45 da *cromatografia C* foi extraída com éter etílico, resultando 98 mg de uma mistura de compostos. Estes foram isolados por *cromatografia* em coluna de sílica gel G60/nitrato de prata a 10% (m/m), *cromatografia C₃*. Nas fracções 10 a 19 obtiveram-se 12 mg do composto (111) (acetato germanicol) e nas fracções 22 a 47 isolou-se 61 mg do composto (83) (germanicol).

Os resultados obtidos na *cromatografia C₃* estão registados no quadro IV.12..

Quadro IV. 12.: Dados da *cromatografia C₃*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 8	n- hexano	0,0037	3,8	misturas
10 – 19	n-hexano/éter etílico (98:2)	0,0117	11,9	composto (111) (acetato de germanicol)
20 – 21	" "	0,0026	2,7	misturas
22 – 47	" "	0,0609	62,2	composto (83) (germanicol)
48 – 50	(9:1)	0,0053	5,4	misturas
51 – 55	(1:1)	0,0056	5,7	misturas
56 – 60	éter etílico	0,0046	4,7	misturas
Totais		0,0944	96,4	

IV.5.5.2. Separação da mistura (113; 114) a partir das fracções 48 a 64 da *cromatografia C*

As fracções 48 a 64 da *cromatografia C* apresentaram espectros de próton muito semelhantes. A análise destes espectros revelou que estas fracções eram misturas, apresentavam sinais com desvios químicos δ 5,13 e δ 5,18 ppm característicos dos compostos α -amirina e β -amirina respectivamente. A presença do sinal a δ 2,04 ppm, característico de prótons metílicos do grupo acetato, permitiu suspeitar que as amirinas estariam esterificadas. Outros sinais de pequena intensidade com desvios químicos entre δ 2,8 e δ 4,2 ppm e a existência de um sinal muito intenso com δ 1,23 ppm, característico de prótons metilénicos, poderiam revelar a existência de outros compostos na mistura, possivelmente álcoois de cadeia linear.

As fracções 48 a 64 foram reunidas, obteve-se 123 mg de amostra. A separação dos compostos fez-se primeiro por *cromatografia* em camada fina preparativa (CCFP: 3P). Obtiveram-se três fracções, as duas fracções menos polares (3P₁ e 3P₂) pareciam ser misturas muito complexas, uma vez que apresentaram em vários sistemas de CCF diversas manchas com R_f muito semelhante. A fracção mais polar (3P₃), aproximadamente 76 mg, revelou ser também uma mistura. Nas várias CCF efectuadas visualizaram-se sistematicamente duas manchas intensas praticamente sobrepostas.

Para eliminar outros compostos da mistura, a amostra foi submetida a uma *cromatografia "flash"* em sílica gel G60, *cromatografia C₄*. Nas fracções 9 a 16 foram isolados 68 mg de uma mistura. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C da mistura permitiram identificar os compostos, acetato de α - amirina (113) e acetato de β -amirina (114).

Os resultados obtidos na *cromatografia C₄* estão registados no quadro IV.13..

Quadro IV. 13.: Dados da *cromatografia C₄*

Fracções	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 a 8	n- hexano/ AcOEt (95:5)	0,0048	6,3	misturas
9 – 16	“ “	0,0682	89,7	mistura de compostos (113 ; 114)
17 – 25	“ “	0,0014	1,8	misturas
Totais		0,0744	97,8	

IV.5.5.3. Isolamento do composto (48) a partir das fracções 144 a 167 da *cromatografia C*

A separação de compostos das fracções 144 a 167 da *cromatografia C* (107 mg) fez-se por *cromatografia* em camada fina preparativa (CCFP: 4P), em placa de sílica gel. O eluente utilizado foi uma mistura de n-hexano:éter isopropílico (92:8). Desta *cromatografia* seleccionaram-se duas fracções, os espectros de *RMN ¹H* evidenciaram que ambas eram misturas de compostos.

A fracção menos polar da (CCFP: 4P) foi designada por 4P₁, apresentou a massa de 47 mg e foi recromatografada em coluna de sílica gel/nitrato de prata 10% (m/m), *cromatografia C₅*. Nas fracções 37 a 55, eluídas com uma mistura n-hexano:éter isopropílico (96:4), obtiveram-se 36 mg de uma mistura. Os espectros de *RMN ¹H* apresentaram sinais característicos da presença dos compostos β-amirina (53) e α-amirina (54).

Os dados da *cromatografia C₅* estão registados no quadro IV.14..

Quadro IV. 14.: Dados da *cromatografia C₅*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 11	n- hexano	0,0024	5,1	misturas
12 – 24	n-hexano/éter etílico (98:2)	0,0008	1,7	misturas
25 – 36	(96:4)	0,0026	5,5	misturas + compostos (53 ; 54)
37 – 55	(94:6)	0,0358	76,2	mistura de (53 ; 54) (β+α-amirina)
56 – 63	“ “	0,0043	9,1	compostos (53 ; 54) + misturas
Totais		0,0459	97,6	

A fracção mais polar da (CCFP: 4P) aqui designada por 4P₃, apresentou a massa de 23 mg e foi submetida a um processo de separação idêntico ao utilizado na purificação da fracção 4P₁, tendo-se obtido 12 mg do composto (48) a partir das fracções 46 a 55 da *cromatografia C₆*.

Os dados da *cromatografia C₆* estão registados no quadro IV.15..

Quadro IV. 15.: Dados da *cromatografia C₆*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 12	n- hexano	0,0031	13,5	misturas
13 – 25	n-hexano/éter etílico (98:2)	0,0026	11,3	misturas
26 – 45	(96:4)	0,0034	14,8	misturas + composto (48)
46 – 55	(94:6)	0,0118	51,3	composto (48) (lupeol)
56 – 60	" "	0,0014	6,1	composto (48) + misturas
Totais		0,0223	97,0	

IV.5.6. Isolamento dos compostos das fracções 43 a 50 da *cromatografia A*

As fracções 43 a 50 da *cromatografia A* foram reunidas e secas, obteve-se 3,031g de extracto. A mistura foi recromatografada em coluna de sílica gel, *cromatografia D*. Preparou-se de modo habitual uma coluna de *cromatografia* de sílica Gel 60 (70-230) mesh, em n-hexano.

Os resultados obtidos na *cromatografia D* estão registados no quadro IV.16..

Quadro IV. 16.: Dados da *cromatografia D*

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 – 22	n- hexano	0,0307	1,0	misturas
23 – 26	n-hexano/éter etílico (95:5)	0,8082	26,7	composto (111) (acetato de germanicol)
27 – 33	" "	0,1066	3,5	composto (112) (diéster de eritrodiol)
34 – 49	(9:1)	0,2295	7,6	compostos lineares + (112; 113; 114)
50 – 56	" "	0,1163	3,8	compostos lineares
57 – 67	" "	0,3154	10,4	compostos lineares + composto (48)
68 – 72	" "	0,2927	9,7	composto (48) (lupeol)
73 – 74	" "	0,0549	1,8	composto (48) + misturas
75 – 91	(8:2)	0,1686	5,6	compostos lineares
92 - 113	(6:4)	0,4649	15,3	não estudado
114 - 125	(4:6)	0,0706	2,3	" "
126 - 130	éter etílico	0,3540	11,7	" "
Totais		3,0124	99,4	

IV.5.6.1. Isolamento do composto (112) a partir das fracções 27 a 33 da cromatografia D

As fracções 27 a 33 foram recromatografadas em coluna de sílica gel/nitrato de prata 10% (m/m), cromatografia D_1 . Nas fracções 27 a 38, eluídas com uma mistura n-hexano:éter isopropílico (98:2), obtiveram-se 60 mg de uma mistura. Os espectros de RMN 1H apresentaram sinais característicos de compostos triterpenos pentacíclicos esterificados.

A mistura foi purificada por cromatografia "flash" em sílica gel G60, cromatografia D_2 . Nas fracções 4 a 12 isolaram-se 51 mg do composto (112).

Os resultados obtidos na cromatografia D_2 estão registados no quadro IV.17..

Quadro IV. 17.: Dados da cromatografia D_2

Fracção	Eluente	Peso (g)	%	Compostos isolados
1 - 3	n- hexano/ AcOEt (95:5)	0,0040	6,7	misturas
4 -12	" "	0,0512	85,3	composto (112) (diéster de eritrodioI)
13 - 31	" "	0,0025	4,2	misturas
Totais		0,0577	96,2	

IV.6. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados

IV.6.1. Hidrocarbonetos

Nas fracções 1 a 15 da *cromatografia A*, obteve-se a mistura menos polar do extracto de *n*-hexano. Depois da evaporação do solvente obteve-se um sólido branco de aspecto ceroso. O seu espectro de próton apresentava um sinal muito intenso característico de compostos lineares e não revelava sinais da presença de grupos funcionais na mistura. Partindo-se do pressuposto que a mistura seria constituída essencialmente por hidrocarbonetos, fez-se a identificação dos compostos por *GC-MS*.

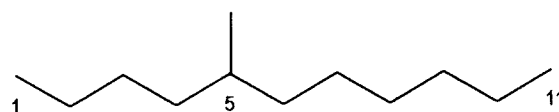
Na análise desta mistura foi utilizado um cromatografo de gases da marca *Fissons Sistem* equipado com um detector de massa do tipo *quadrupolo modelo VG Trio 1000* e com uma fonte de impacto electrónico operando a 70 eV. Utilizou-se uma coluna capilar *DB-5* com 30 metros de comprimento, um diâmetro interno de 0,25 mm. Como gás de arraste foi utilizado hélio. O sistema de temperaturas utilizado foi o seguinte:

- temperatura do injecto 210 °C;
- temperatura do detector 220 °C;
- temperatura da coluna: - isotérmica a 100 °C durante oito minutos; primeira rampa de aquecimento com subida de 10 °C/minuto até a 250 °C seguido de uma segunda rampa com subida de 15 °C/minuto até 290 °C; isotérmica a 290 °C durante quinze minutos.

IV.6.1.1. 5-Metil-undecano (91)

GC - Tempo de retenção de (91): 9,37 min.

EIMS *m/z* (int. rel.): 170 (1,9) [*M*⁺, C₁₂H₂₆], 127 (2,0), 126 (1,1), 113 (1,7), 99 (4,0), 98 (4,7), 85 (18,3), 84 (5,2), 72 (2,4), 71 (39), 70 (9,4), 69 (7,3), 58 (4,6), 57 (100,0), 56 (18,3), 55 (17,3).



IV.6.1.2. Tridecano (92)

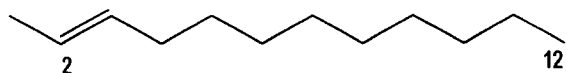
GC - Tempo de retenção de (92): 14,13 min.

EIMS *m/z* (int. rel.): 184 (1,8) [M^+ , $C_{13}H_{28}$], 141 (9,7), 127 (18,5), 126 (10,4), 113 (89,6), 112 (2,8), 99 (5,1), 98 (3,7), 85 (21,5), 84 (5,3), 83 (4,4), 72 (2,9), 71 (41,6), 70 (9,4), 69 (6,0), 58 (4,7), 57 (100,0), 56 (17,6), 55 (17,5).

**IV.6.1.3. Dodec-2-eno (93)**

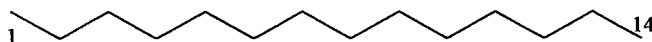
GC - Tempo de retenção de (93): 17,67 min.

EIMS *m/z* (int. rel.): 168 (...) [M^+ , $C_{12}H_{24}$], 126 (2,7), 125 (5,0), 112 (7,2), 111 (15,5), 110 (3,3), 98 (14,0), 97 (39,7), 96 (7,9), 85 (9,9), 84 (23,5), 83 (44,7), 82 (13,3), 81 (10,9), 71 (20,0), 70 (47,3), 69 (52,5), 68 (12,1), 67 (14,8), 58 (3,7), 57 (74,1), 56 (70,9), 55 (100,0), 54 (17,3), 53 (8,3).

**IV.6.1.4. Tetradecano (94)**

GC - Tempo de retenção de (94): 17,97 min.

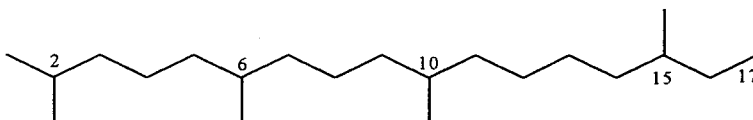
EIMS *m/z* (int. rel.): 198 (1,8) [M^+ , $C_{14}H_{30}$], 199 (2,7), 169 (3,6), 155 (6,4), 154 (4,4), 141 (6,5), 140 (7,3), 128 (2,0), 126 (13,3), 125 (2,3), 113 (3,0), 112 (2,9), 99 (6,6), 98 (3,9), 85 (24,8), 84 (4,3), 71 (44,2), 70 (8,3), 69 (5,6), 58 (4,4), 57 (100,0), 56 (15,3), 55 (15,7).



IV.6.1.5. 2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano (95)

GC - Tempo de retenção de (95): 20,02 min.

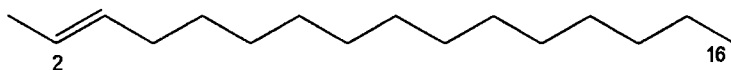
EIMS m/z (int. rel.): 296 (...) [M^+ , $C_{21}H_{44}$], 183 (2,6), 141 (4,7), 137 (2,6), 127 (3,0), 113 (9,0), 112 (10,5), 99 (10,2), 98 (2,9), 97 (5,2), 85 (27,6), 84 (7,0), 83 (3,4), 72 (3,4), 71 (57,5), 70 (15,7), 69 (9,5), 67 (3,3), 58 (4,7), 57 (100,0), 56 (21,4), 55 (23,1).



IV.6.1.6. Hexadec-2-eno (96)

GC - Tempo de retenção de (96): 23,80 min.

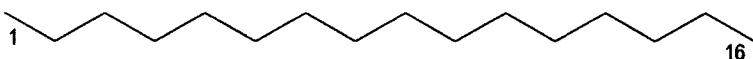
EIMS m/z (int. rel.): 224 (1,2) [M^+ , $C_{21}H_{44}$], 196 (12,6), 154 (8,8), 153 (9,1), 140 (9,6), 139 (12,7), 138 (9,5), 126 (3,7), 125 (6,8), 114 (1,6), 112 (7,8), 111 (22,6), 99 (3,2), 98 (16,1), 97 (59,5), 96 (14,3), 95 (3,3), 85 (14,4), 84 (25,1), 83 (56,0), 82 (17,4), 81 (7,0), 71 (28,7), 70 (44,7), 69 (60,5), 68 (12,5), 67 (16,1), 58 (3,9), 57 (93,5), 56 (67,0), 55 (100,0), 54 (16,0), 53 (7,0).



IV.6.1.7. Hexadecano (97)

GC - Tempo de retenção de (97): 24,00 min.

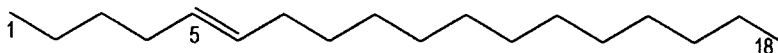
EIMS m/z (int. rel.): 226 (1,2) [M^+ , $C_{16}H_{34}$], 197 (3,3), 183 (4,5), 169 (7,5), 168 (4,7), 155 (10,0), 154 (7,0), 141 (12,4), 127 (2,0), 113 (4,4), 99 (8,8), 98 (3,9), 97 (3,3), 85 (26,6), 84 (4,2), 71 (46,7), 70 (8,6), 69 (6,6), 58 (4,7), 57, (100,0), 56 14,3, 55 (17,0).



IV.6.1.8. Octadec-5-eno (98)

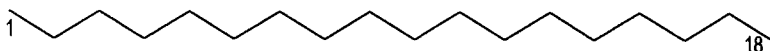
GC - Tempo de retenção de (98): 28,73 min.

EIMS m/z (int. rel.): 252 (...) [M^+ , $C_{18}H_{36}$], 153 (17), 140 (2,5), 139 (2,6), 126 (2,5), 125 (8,8), 124 (2,6), 112 (13,7), 111 (28,55), 110 (7,2), 99 (4,7), 98 (16,7), 97 (67,3), 96 (12,9), 95 (4,0), 85 (17,9), 84 (22,9), 83 (59,1), 82 (17,5), 81 (8,2), 71 (32,2), 70 (38,2), 69 (55,5), 68 (12,4), 67 (15,7), 57 (91,1), 56 (55,2), 55 (100,0), 54 (14,4), 53 (6,4).

**IV.6.1.9. Octadecano (99)**

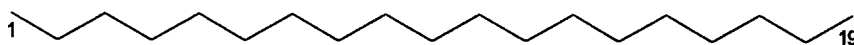
GC - Tempo de retenção de (99): 28,88 min.

EIMS m/z (int. rel.): 254 (1,0) [M^+ , $C_{18}H_{38}$], 225 (3,2), 211 (5,5), 210 (2,9), 197 (8,8), 196 (4,9), 183 (8,8), 182 (5,3), 169 (9,3), 168 (6,1), 155 (12,6), 154 (5,3), 142 (2,5), 141 (18,3), 140 (11,0), 127 (3,0), 126 (2,1), 113 (5,9), 111 (2,5), 99 (11,4), 98 (3,8), 97 (4,7), 85 (31,3), 83 (4,8), 82 (4,7), 71 (50,2), 70 (8,6), 69 (8,1), 58 (4,6), 57 (100,0), 56 (14,7), 55 (19,9).

**IV.6.1.10. Nonadecano (100)**

GC - Tempo de retenção de (100): 31,14 min.

EIMS m/z (int. rel.): 268 (0,7) [M^+ , $C_{19}H_{40}$], 269 (0,2), 239 (1,4), 225 (2,8), 211 (4,3), 210 (2,5), 197 (4,7), 196 (2,7), 183 (5,1), 182 (3,5), 169 (6,9), 168 (4,7), 155 (10,8), 154 (6,7), 141 (18,0), 140 (9,7), 127 (3,0), 126 (1,6), 113 (9,7), 99 (12,0), 97 (2,9), 86 (1,6), 85 (26,2), 84 (4,0), 83 (4,4), 82 (1,7), 71 (49,3), 70 (8,7), 69 (8,4), 58 (4,8), 57 (100,0), 56 (12,7), 55 (15,9).



IV.6.1.11. Eicosano (101)

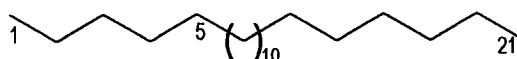
GC - Tempo de retenção de (101): 33,15 min.

EIMS m/z (int. rel.): 282 (1,0) [M⁺, C₂₀H₄₂], 225 (6,9), 211 (6,4), 210 (4,5), 197 (8,4), 196 (6,9), 183 (9,8), 182 (6,4), 169 (11,0), 168 (4,8), 155 (15,6), 154 (8,2), 141 (2,5), 127 (3,7), 113 (6,3), 99 (12,8), 98 (3,9), 97 (5,5), 85 (30,8), 84 (4,6), 83 (5,9), 71 (49,6), 70 (8,1), 69 (9,0), 57 (100,0), 56 (14,0), 55 (22,2).

**IV.6.1.12. Uneicosano (102)**

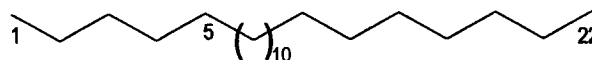
GC - Tempo de retenção de (102): 35,12 min.

EIMS m/z (int. rel.): 296 (0,6) [M⁺, C₂₁H₄₄], 297 (0,2), 253 (2,3), 239 (4,1), 238 (2,9), 225 (5,6), 224 (3,3), 211 (7,6), 210 (3,9), 197 (9,3), 196 (55,5), 183 (9,4), 182 (5,4), 169 (11,4), 168 (6,1), 155 (10,6), 154 (6,9), 141 (1,9), 127 (3,3), 113 (7,2), 99 (13,2), 98 (3,4), 97 (5,1), 85 (30,8), 84 (4,3), 85 (30,8), 84 (4,3), 83 (5,5), 71 (48,6), 70 (8,0), 69 (9,1), 58 (4,1), 57 (100,0), 56 (13,9), 55 (21,5).

**IV.6.1.13. Docosano (103)**

GC - Tempo de retenção de (103): 36,99 min.

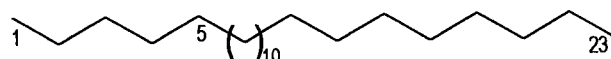
EIMS m/z (int. rel.): 310 (...) [M⁺, C₂₂H₄₆], 239 (7,1), 225 (9,4), 211 (10,1), 210 (7,6), 197 (13,4), 183 (13,6), 182 (9,6), 169 (16,9), 168 (7,5), 155 (19,8), 154 (8,9), 141 (3,0), 127 (4,1), 113 (8,3), 112 (3,1), 99 (15,5), 98 (4,2), 97 (8,2), 85 (34,9), 84 (4,6), 83 (7,5), 72 (3,2), 71 (53,1), 70 (8,5), 69 (11,1), 58 (4,7), 57 (100,0), 56 (15,0), 55 (24,9).



IV.6.1.14. Tricosano (104)

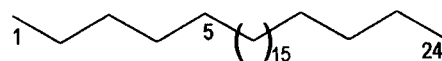
GC - Tempo de retenção de (104): 38,79 min.

EIMS m/z (int. rel.): 324 (0,6) [M⁺, C₂₃H₄₈], 281 (8,8), 267 (3,3), 253 (5,0), 239 (5,3), 225 (6,4), 224 (3,8), 211 (9,8), 210 (6,2), 197 (11,6), 196 (6,2), 183 (12,8), 182 (6,5), 169 (14,4), 168 (6,8), 155 (19,7), 154 (8,2), 153 (3,1), 127 (4,0), 113 (8,1), 112 (2,7), 111 (3,5), 99 (15,2), 98 (8,8), 97 (7,2), 85 (34,1), 84 (5,3), 83 (7,2), 71 (53,4), 70 (8,3), 69 (10,0), 58 (4,3), 57 (100,0), 56 (14,5), 55 (23,6).

**IV.6.1.15. Tetracosano (105)**

GC - Tempo de retenção de (105): 40,52 min.

EIMS m/z (int. rel.): 338 (...) [M⁺, C₂₄H₅₀], 281 (29,3), 211 (2,3), 197 (2,0), 191 (1,6), 183 (1,7), 169 (2,0), 155 (1,9), 141 (3,7), 127 (3,3), 125 (2,6), 133 (8,9), 112 (3,8), 111 (3,3), 110 (2,0), 100 (2,0), 99 (16,8), 98 (5,0), 97 (9,9), 96 (2,5), 95 (2,8), 86 (3,1), 85 (35,7), 84 (5,7), 83 (10,1), 82 (6,0), 81 (3,5), 73 (2,4), 72 (3,7), 71 (53,6), 70 (10,2), 69 (13,0), 68 (3,3), 67 (4,0), 58 (5,2), 57 (100,0), 56 (15,9), 55 (27,3), 54 (3,7).

**IV.6.1.16. Pentacosano (106)**

GC - Tempo de retenção de (106): 42,50 min.

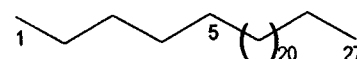
EIMS m/z (int. rel.): 352 (0,4) [M⁺, C₂₅H₅₂], 309 (2,5), 295 (3,0), 281 (6,9), 267 (3,9), 253 (5,5), 248 (3,2), 225 (7,7), 224 (4,0), 212 (8,7), 211 (5,9), 197 (2,5), 183 (12,3), 182 (6,0), 169 (17,9), 168 (7,7), 155 (20,0), 154 (5,0), 153 (3,7), 141 (7,3), 127 (4,1), 113 (7,8), 111 (4,0), 98 (4,1), 97 (7,8), 85 (33,6), 84 (4,5), 83 (7,2), 71 (50,4), 70 (7,9), 69 (10,7), 58 (4,5), 57 (100,0), 56 (14,0), 55 (22,6).



IV.6.1.17. Heptacosano (107)

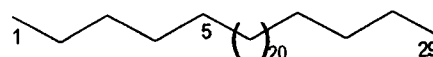
GC - Tempo de retenção de (107): 47,85 min.

EIMS m/z (int. rel.): 380 (0,3) [M⁺, C₂₇H₅₆], 337 (2,5), 323 (7,8), 309 (4,2), 296, (3,6), 281 (5,4), 268 (4,2), 267 (3,2), 253 (5,3), 252 (3,2), 239 (6,4), 238 (3,7), 225 (8,2), 223 (4,6), 212 (2,4), 211 (10,9), 210 (5,3), 208 (3,2), 197 (12,1), 196 (5,7), 183 (15,1), 182 (7,0), 169 (18,3), 168 (7,7), 156 (3,0), 155 (21,8), 154 (8,1), 153 (4,5), 141 (2,8), 127 (4,6), 113 (8,2), 111 (4,1), 99 (14,5), 98 (3,7), 97 (8,2), 85 (32,1), 84 (4,8), 83 (7,9), 82 (3,3), 71 (50,8), 70 (7,7) 69 (11,1), 58 (4,2), 57 (100,0), 56 (13,7), 55 (21,1).

**IV.6.1.18. Nonacosano (108)**

GC - Tempo de retenção de (108): 53,60 min. 492 (2,3)

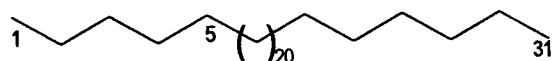
EIMS m/z (int. rel.): 408 (0,2) [M⁺, C₂₉H₆₀], 365 (1,3), 351 (2,1), 333 (2,4), 323 (2,6), 309 (2,3), 295 (2,7), 282 (5,0), 281 (5,0), 262 (3,4), 253 (5,6), 239 (5,8), 225 (7,4), 224 (4,0), 211 (9,6), 210 (4,3), 198 (1,7), 198 (9,9), 196 (4,4), 183 (12,5), 182 (5,5), 169 (14,3), 168 (10,5), 167 (3,5), 155 (19,1), 154 (7,6), 153 (3,6), 141 (2,9), 127 (4,8), 113 (7,9), 111 (5,0), 99 (10,2), 97 (6,2), 85 (28,1), 84, (3,9), 83 (7,7), 71 (48,4), 70 (8,1), 69 (11,7), 58 (43) 57 (100,0), 56 (12,8), 55 (19,1).

**IV.6.1.19. Untriacontano (109)**

GC - Tempo de retenção de (109): 58,49 min.

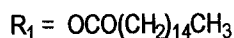
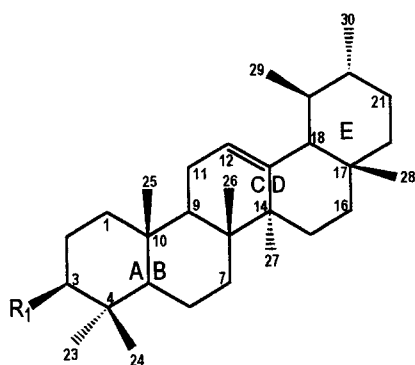
EIMS m/z (int. rel.): 436 (0,3) [M⁺, C₃₁H₆₄], 408 (0,2), 393 (1,7), 380 (2,2), 366 (3,0), 355 (1,8), 351(2,8), 337 (7,7), 336 (1,7), 332 (1,3), 328 (1,6), 323 (3,8), 322 (2,1), 309 (3,8), 295 (4,8), 294 (2,3), 283 (2,5), 282 (4,1), 281 (14,3), 280 (2,0), 267 (6,8), 266 (3,1), 265 (2,2), 254 (2,1), 253 (10,3), 252 (2,7), 226 (1,2), 212 (1,7), 207 (4,4), 198 (1,7), 183 (1,9), 169 (2,2), 155 (2,4), 154 (1,3), 141 (3,7), 140 (1,5),

127 (5,2), 126 (2,6), 113 (10,5), 112 (2,7), 111 (5,1), 110 (1,4), 100 (1,2), 99 (15,6), 98 (4,1), 97 (10,7), 96 (3,1), 86 (2,5), 85 (33,7), 84 (4,8), 83 (9,2), 82 (3,0), 81 (1,1), 73 (1,4), 72 (3,1), 71 (52,2), 70 (9,1), 69 (12,6), 68 (2,4), 67 (2,5), 68 (4,4), 57 (100,0), 56 (14,1), 55 (21,9), 54 (2,4).



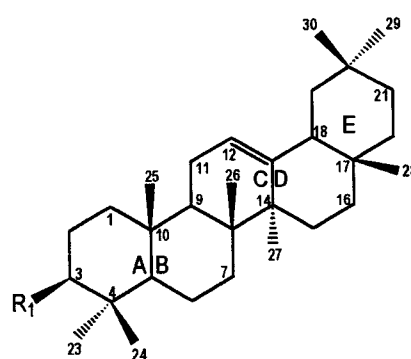
IV.6.2. Triterpenos pentacíclicos

IV.6.2.1. Mistura: palmitato de α + β -amirina (74;110)



3 β -palmitóxiurs-12-eno (74)

(palmitato de α -amirina)



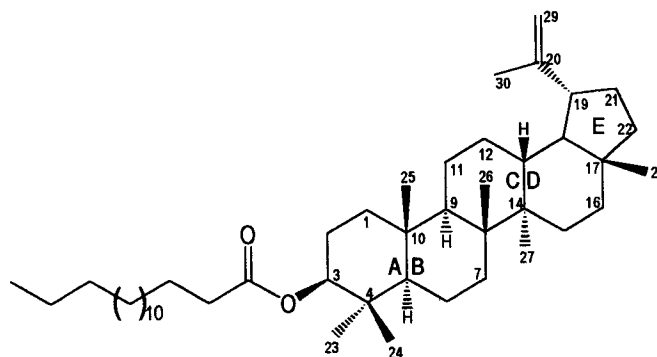
3 β -palmitóxiolean-12-eno (111)

(palmitato de β -amirina)

IV (KBr) ν_{max} : 2921, 2850, 1734, 1620, 1464, 1379, 1174, 989, 720 cm^{-1}

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,17 (1H, t, $J=3,6$ Hz), 5,13 (1H, t, $J=3,6$ Hz), 4,50 (1H, m), 2,29 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 1,25 ($n\text{CH}_2$, s), 1,13 a 0,83 ($n\text{CH}_3$, s), 0,79 (3H,m)

IV.6.2.2. Palmitato de lupeol (72)



3β-palmitóxi-5α-lup-20(29)-eno (72)
(palmitato de lupeol)

p.f. = 46- 49° C (cristalizado em CHCl_3 :MeOH)

p.f. lit.¹⁰¹ = 47-50° C (cristalizado em MeOH:Me₂CO)

$[\alpha]_D^{20} = +22,8^\circ$ (c = 0,02; CHCl_3).

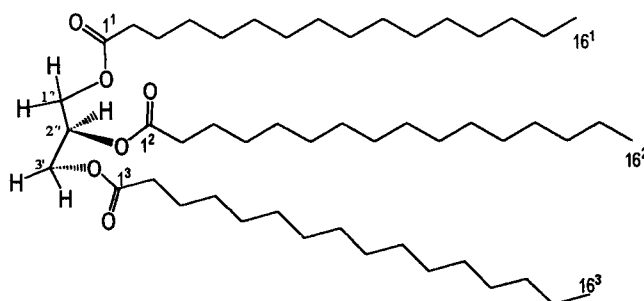
$[\alpha]_D$ lit.¹²⁶ = +22°

IV (KBr) ν_{max} : 3058, 2920, 2852, 1730, 1642, 1467, 1382, 1260, 1175, 1105, 1011, 978, 883, 804, 719 cm^{-1} .

RMN ¹H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,68 (1H, s), 4,56 (1H, s), 4,46 ppm (1H, dd, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 10,0$ Hz), 2,37 (1H; m), 2,28 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,68 (1H, s), 1,24 (nH₂) 1,02 e 0,93 (6H, s, 2x CH₃), 0,87 (3H, t, $J = 5,4$ Hz), 0,84 (6H, s, 2x CH₃), 0,73 e 0,78 (6H, s, 2x CH₃).

RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOR}$), 14,5 (C-27), 15,9 (C-26), 16,2 (C-24), 16,6 (C-25), 18,0 (C-28), 18,2 (C-6), 19,2 (C-30), 20,9 (C-11), 23,7 (C-2), 25,1 (C-12), 27,4 (C-15), 27,9 (C-23), 29,7 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOR}$), 29,8 (C-21), 34,2 (C-7), 35,5 (C-16), 37,0 (C-10), 37,8 (C-4), 38,0 (C-13), 38,3 (C-1), 40,0 (C-22), 40,8 (C-8), 42,8 (C-14), 43,0 (C-17), 48,0 (C-19), 48,2 (C-18), 50,3 (C-9), 55,3 (C-5), 80,6 (C-3), 109,3 (C-29), 151,0 (C-20), 173,7 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOR}$).

IV.6.2.2.1 Trimeristina (72a)

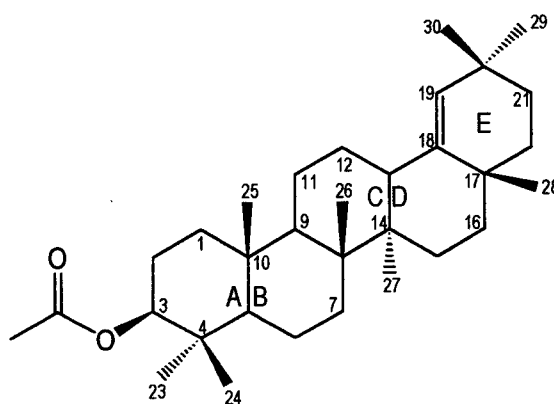


tri-hexadecanoato de propano-1,2,3-triilo (72a)
(trimeristina)

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,33 (2H, t, $J = 7,5$ Hz), 0,87 (3H, t, $J = 6,1$ Hz), 1,24 (nH₂).

RMN ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (C-16), 22,7 (C-15), 24,8 (C-3), 29,1 (C-13), 29,2 (C-12), 29,3 (C-11), 29,4 (C-10), 29,6 (C-4), 29,6 (C-5), 29,6 (C-6), 29,6 (C-7), 29,6 (C-8), 29,6 (C-9), 31,9 (C-14), 34,0 (C-2¹), 34,0 (C-2³), 34,1 (C-2²), 62,0 (C-1¹), 62,0 (C-3¹), 68,8 (C-2¹), 172,8 (C-1²), 173,2 (C-1¹), 173,2 (C-1³).

IV.6.2.3. Acetato de germanicol (111)



3 β -acetóiolean-18-enilo (111)
(acetato de germanicol)

p.f. = 279-281° C (cristalizado em CHCl_3 :MeOH)

p.f. lit.¹²⁷ = 281-282° C

$[\alpha]_D^{21} = +15,8^\circ$ ($c = 0,31$; CHCl_3).

$[\alpha]_D$ lit.¹²⁷ = +17,0° (CHCl_3).

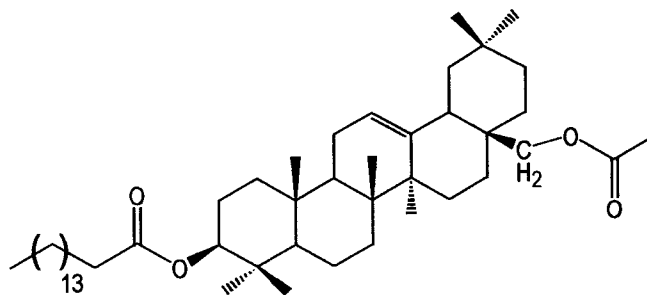
IV (KBr) ν_{\max} : 2951, 1731, 1640, 1454, 1377, 1251, 1178, 1105, 1025, 984, 863, 847, 662, 611 cm^{-1} .

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,86 (1H, s), 4,48 (1H, m), 2,05 (3H, s), 1,08, 1,01, 0,94, 0,93, 0,91, 0,87, 0,84, 0,73 (8x3H, s, 8x CH_3).

RMN ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 14,6 (C-27), 16,1 (C-25), 16,5 (C-24), 16,8 (C-26), 18,2 (C-6), 21,1 (C-11), 21,3 (CH_3COOR), 23,7 (C-2), 25,2 (C-28), 26,2 (C-12), 27,5 (C-15), 27,9 (C-23), 29,2 (C-30), 31,3 (C-29), 32,3 (C-20), 33,3 (C-21), 34,5 (C-7), 34,5 (C-17), 37,1 (C-10), 37,3 (C-22), 37,7 (C-16), 37,8 (C-4), 38,4 (C-13), 38,6 (C-1), 40,7 (C-8), 43,3 (C-14), 51,1 (C-9), 55,5 (C-5), 80,9 (C-3), 129,7 (C-19), 142,6 (C-18), 171,0 (CH_3COOR).

EIMS m/z (int. rel.): 468 (...) [M^+ , $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$], 249 (2), 218 (15), 205 (38), 204 (40), 203 (18), 190 (23), 189 (100), 177 (87), 176 (23), 175 (30).

IV.6.2.4. Diéster de 3,28-eritrodiool (112)



3 β -palmitóxi-28-acetóxi-olean-12-eno (112)

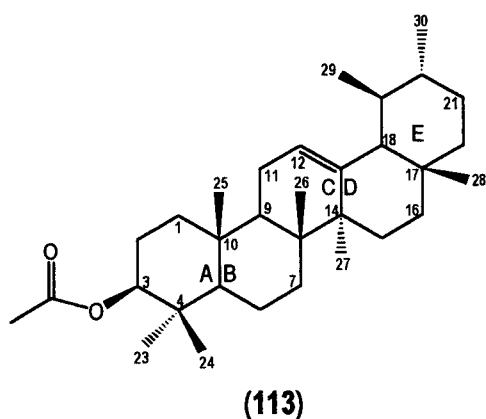
(diéster de eritrodiool)

IV (KBr) ν_{\max} : 2933, 2918, 2856, 1735, 1620, 1463, 1383, 1239, 1178, 1036, 1018, 987 cm^{-1} .

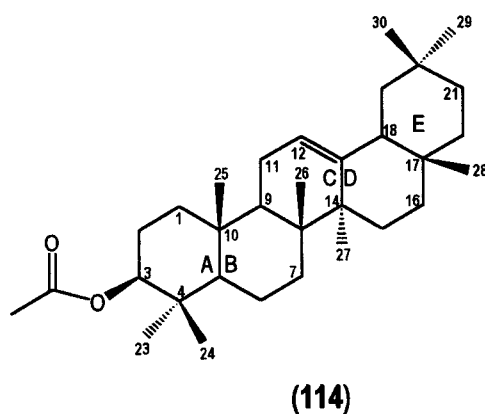
RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,18 ppm (1H, t, $J = 3,3$ Hz), 4,49 ppm (1H, t, $J = 7,9$ Hz), 4,02 ppm (1H, d, $^2J(\text{H,H}) = 10,98$ Hz), 3,66 ppm (1H, d, $^2J(\text{H,H}) = 10,95$ Hz), 2,28 ppm (2H, t, $J = 7,46$ Hz), 2,04 (3H, s), 1,24 ppm (nH, s, n CH_2), 1,14, 0,94, 0,88 (4x3H, s, 4x CH_3), 0,87 ppm (3H, t, CH_3), 0,86 e 0,85 (3x3H, s, 3x CH_3).

RMN ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 14,1(C'16), 15,5 (C-25), 16,6 (C-24), 16,7 (C-26), 18,1 (C-6), 20,9 (C''2), 22,1 (C-16), 22,6 (C'15), 23,5 (C-2), 23,5 (C-11), 23,5 (C-30), 25,1 (C'3), 25,5 (C-15), 25,9 (C-27), 28,0 (C-23, C'13), 29,1 (C'12), 29,2 (C'11), 29,3 (C'10), 29,4 (C'4), 29,5 (C'9), 29,6 (C'5-C'8), 30,8 (C-20), 31,3 (C-22), 31,9 (C'14), 32,4 (C-7), 33,1 (C-29), 33,9 (C-21), 34,8 (C'2), 35,7(C-17), 36,7 (C-4), 36,7 (C-10), 38,2 (C-1), 39,7 (C-8), 41,5 (C-14), 42,4 (C-18), 46,1(C-19), 47,4 (C-9), 55,2 (C-5), 70,7 (C-28), 80,4 (C-3), 122,7 (C-12), 143,5(C-13), 171,3 (C''1), 173,7 (C'1).

IV.6.2.5. Mistura de acetato de α + β -amirina (113;114)



3 β -acetóxiurs-12-eno (113)
(acetato de α -amirina)



3 β -acetóxiolean-12-eno (114)
(acetato de β -amirina)

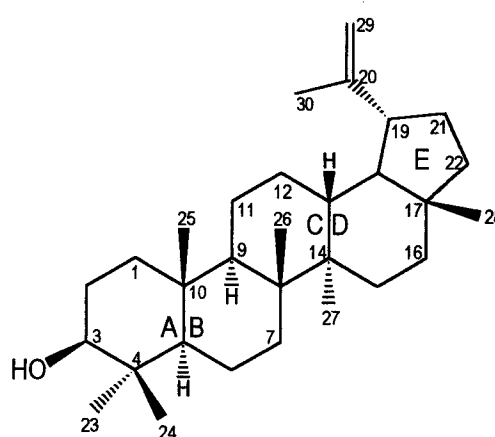
Mistura (113;114) - IV (KBr) ν_{max} : 1732, 1163, 1076, 989 cm^{-1} .

Mistura (113;114) - *RMN* ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,50 ppm (1H, t, $J=8,5\text{r Hz}$), 2,05 ppm (2H, s), 5,18 (1H, t), 5,13 (1H, t), 1,13, 1,07, 0,98, 0,97, 0,91, 0,87, 0,83, 0,80 e 0,80 ppm (nH, 9s, n CH_3).

Acetato de α -amirina (113) - *RMN* ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 171,0 (CH_3COOR), 139,6 (C-13), 124,3 (C-12), 80,9 (C-3), 59,0 (C-18), 55,2 (C-5), 47,5 (C-9), 42,0 (C-14), 41,5 (C-22), 40,0 (C-8), 39,6 (C-19), 39,6 (C-20), 38,4 (C-1), 37,7 (C-4), 36,8 (C-10), 33,7 (C-17), 32,8 (C-7), 31,2 (C-21), 28,7 (C-15), 28,1 (C-23), 28,1 (C-28), 26,6 (C-16), 23,6 (C-2), 23,4 (C-11), 23,2 (C-27), 23,2 (C-29), 21,3 (CH_3COOR), 21,4 (C-30), 18,2 (C-6), 16,8 (C-26), 16,7 (C-24), 15,7 (C-25),

Acetato de β -amirina (114) - 15,5 (C-24), 15,7 (C-25), 16,7 (C-26), 18,2 (C-6), 21,3 (CH_3COOR), 23,4 (C-11), 23,6 (C-2), 23,7 (C-30), 25,9 (C-27), 26,1 (C-16), 28,1 (C-23), 28,2 (C-15), 28,4 (C-28), 31,1 (C-20), 32,5 (C-17), 32,6 (C-7), 33,3 (C-29), 34,7 (C-21), 36,8 (C-10), 37,1 (C-22), 37,7 (C-4), 38,2 (C-1) 40,0 (C-8), 42,0 (C-14), 46,7 (C-19), 47,2 (C-18), 47,6 (C-9), 55,2 (C-5), 80,9 (C-3), 121,6 (C-12), 145,2 (C-13), 171,0 (CH_3COOR).

IV.6.2.6. Lupeol (48)



(lup-20(29)-en-3 β -ol) (48)

(lupeol)

p.f. 212- 214° C (cristalizado em CHCl_3 :MeOH)

p.f. lit.¹²⁸ 210- 213° C; p.f. lit.¹²⁹ 212-215

$[\alpha]_D^{22} + 27,8^\circ$ (c= 0,19; CHCl_3).

$[\alpha]_D$ lit.¹²⁹ = + 28,0° (CHCl_3).

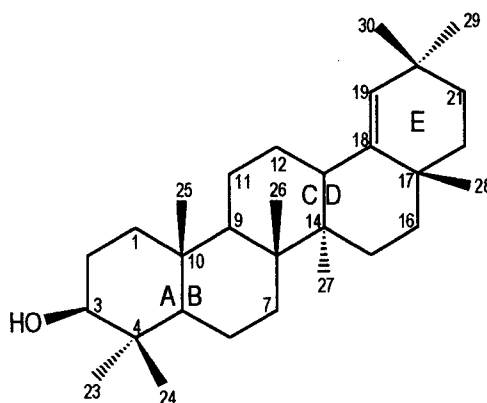
IV (KBr) ν_{max} : 3330, 3080, 2945, 1643, 1461, 1383, 1190, 1138, 1094, 1037, 994, 882 cm^{-1} .

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,68 (1H, sl), 4,56 (1H, sl), 1,68 ppm (3H, s.), 2,38 (1H; dt; $J_1 = 5,5$ Hz, $J_2 = 10,9$ Hz), 3,20 (1H, m), 1,02, 0,96, 0,94, 0,82, 0,79 e 0,76 (6x3H, s, 6x CH_3).

RMN ^{13}C (62,9 MHz, CDCl_3) δ : 14,5 (C-27), 15,4 (C-24), 15,9 (C-26), 16,1 (C-25), 18,0 (C-28), 18,3 (C-6), 19,3 (C-30), 20,9 (C-11), 25,1 (C-12), 27,4 (C-2), 27,4 (C-15), 28,0 (C-23), 29,8 (C-21), 34,2 (C-7), 35,6 (C-16), 37,1 (C-10), 38,0 (C-13), 38,7 (C-1), 38,8 (C-4), 40,0 (C-22), 40,8 (C-8), 42,8 (C-14), 43,0 (C-17), 48,0 (C-19), 48,2 (C-18), 50,4 (C-9), 55,2 (C-5), 79,0 (C-3), 109,3 (C-29), 151,0 (C-20).

EIMS m/z (int. rel.): 218 (87,4), 219 (23,7), 207 (95,8), 208 (27,4), 191 (41,3), 190 (40,0), 189 (93,7), 175 (40,3), 161 (46,1), 149 (42,1), 148 (33,7), 147 (52,4), 136 (38,7), 135 (78,9), 133 (42,6), 123 (45,3), 122 (32,6), 121 (61,3), 109 (71,6), 108 (43,7), 107 (74,7), 105 (43,9), 95 (100), 94 (30,8), 93 (85,3), 91 (48,7), 81 (96,84), 79 (60,5), 69 (90,5), 68 (42,3), 67 (72,6), 55 (87,4), 53 (16,7), 43 (77,9), 41(65,6).

IV.6.2.7. Germanicol (83)



3 β -hidróxiolean-18-eno (**83**)

(germanicol)

p.f. 172-174° C (cristalizado em CHCl₃.MeOH).

p.f. lit.¹¹⁰ 173-175° C (CHCl₃.MeOH).

$[\alpha]_D^{22} + 8,4^\circ$ (c=0,06; CHCl₃).

$[\alpha]_D$ lit.¹¹⁰ +6,2°

IV (KBr) ν_{\max} : 3350, 3040, 2926, 1620, 1466, 1448, 1385, 1138, 1094, 1026, 862, 841, cm⁻¹.

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4,85 (1H, s), δ 3,20 (1H, *dd*, $J_1 = 5,4$ Hz, $J_2 = 10,7$ Hz), 2,25 (1H, *dl*, $J=11,5$ Hz), 1,07, 1,01e 0,96 (3x3H, s, 3xCH₃), 0,93 (6H, s, 2xCH₃), 0,87, 0,76 e 0,73 (3x3H, s, 3xCH₃).

RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) δ : 14,6 (C-27), 15,4 (C-24), 16,1(C-25), 16,7 (C-26), 18,2 (C-6), 21,1(C-11), 25,2 (C-28), 26,2 (C-12), 27,3 (C-2), 27,5 (C-15), 27,9(C-23), 29,2 (C-30), 31,4 (C-29), 32,3 (C-20), 33,3 (C-21), 34,4 (C-17), 34,5 (C-7), 37,2 (C-10), 37,3 (C-22), 37,7 (C-16), 38,5 (C-1), 38,7 (C-13), 38,9 (C-4), 41,5 (C-8), 43,3 (C-14), 51,2 (C-9), 55,4 (C-5), 78,9 (C-39), 129,7 (C-19), 142,7 (C-18).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 – Guignard, J. L. *et al.*, "Abrégé de Phytochimie", Masson, Paris, 1955.
- 2 – Harborne, J. B., "Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analyses", 2nd ed., Chapman and Hall, London, 1984.
- 3 – Thompson, A. E., *Economic Botany*, 1985, **39**(4), 436-453.
- 4 – Carr, M. E. *et al.*, *Economic Botany*, 1985, **39**(4), 505-513.
- 5 – Edwards, R. e Gatehouse, J. A. "Secondary Metabolism", in "Plant Biochemistry and Molecular Biology", Lea P. J. e Leegood R. C., (ed.), 2nd ed., John Wiley Sons, New York, 1999.
- 6 – Banthorpe, D. V., "Terpenoids", in "Natural Products: their chemistry and biological significance", Longman Scientific & Technical, Harlow, 1994.
- 7 – Cox, P. A., "Etnopharmacology and the search for new drugs", Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium **154**), 40-55, 1990.
- 8 – Farnsworth, N. R., "The role of ethnopharmacology in drug development" in "Bioactive compounds from plants", Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium **154**), 2-21, 1990.
- 9 – Hosler, D. M., e Mikita, M. A., *Journal of Chemical Education*, **4**, 328-332, 1987.
- 10 – Teixeira, A. P. S., "Terpenóides das Espécies *Plectranthus Grandidentatus* Gürke e *Solenostemon Monostachyus* (P.Beauv.) Briq." Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 1995.
- 11 – Croteau, R. *et al.*; "Natural Products (Secondary Metabolites)", in "Biochemistry & Molecular Biology of Plants", Buchanan B. *et al.*; Eds. American Society of Plant Physiologists, 2000.
- 12 – Lourenço, A. M. F. C., "Diterpenóides de Plantas do Género *Teucrium* e Produtos Naturais do Fungo *Phellinus pini*" Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 1992.
- 13 – Santos, S.M.M.B.P.P., "Estudo Fitoquímico de Endemismos Ibéricos da Família Asteraceae.", Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 1991.
- 14 – Mann, J., "Secondary Metabolism", 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1992.
- 15 – Mann, J., "Chemical Aspects of Biosynthesis", Oxford Chemistry Primers - 20, Oxford, 1994.
- 16 – Fabré, R. e Truhaut, R., "Toxicologia" Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.
- 17 – "Terpenoids", Charlwood, D. V. e Banthorpe, D. V. (eds.), vol. 7, Academic Press, London, 1991.
- 18 – Ruzicka, L., *Experientia*, **IX** (10), 357-396, 1953.
- 19 – Ruzicka, L., *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 1-20, 1973.

- 20 – Lobo, A. M., “Métodos de estudo biossintético”, in “Biossíntese de produtos naturais - Metabolismo secundário”, Lobo A. M. (coord.), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 1976.
- 21 – Harrison, D. M., *Natural Product Reports*, Vol.5, 25-39, 1988.
- 22 – Banthorpe, D. V. , Ekundayo, O. e Njar, V. C. O., *Phytochemistry*, **23**, 291, 1984.
- 23 – Connolly, J. D. e Hill, R. A., “Triterpenóids” in “Methods in Plant Biochemistry” volume 7, Academic Press Limited, 1991.
- 24 – Harrison, D. M., *Natural Product Reports*, Vol.5, 459-484, 1990.
- 25 – Corey, E. J. e Ortiz de Montellano, P. R., *Journal of the American Chemical Society*, **89**, 3362-3363, 1967.
- 26 – Heupel, R. C., *Phytochemistry*, **24**, 2929-2937, 1985.
- 27 – Harrison, D. M., *Natural Product Reports*, Vol.6, 526-560, 1985.
- 28 – Mahato, S. B. e Sem, S., *Phytochemistry*, **44**, 1185-1236, 1997.
- 29 – Yamagishi, T., Zhang, D. C., Chang, J. J., McPhail, D. R., McPhail, A. T. e Lee, K. H., *Phytochemistry*, **27**, 3213, 1988.
- 30 – Simon, A., Delage, C., Saux, M., A. Chulia, J., Najida, A. e Rigaud, M., *Acta Crystallogr. Sec. C.*, **48**, 726, 1992.
- 31 – Nick, A., Wright, A. D., Sticher, O. e Rali, T., *Journal of Natural Products*. **57**(9):1245-1250, 1994.
- 32 – Macias, F. A., Simonet, A. M. e Esteban, M. D., *Phytochemistry*. **36**(6):1369-1379, 1994.
- 33 – Pengsuparp, T., Cai, L., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., Wani, M. C. e Wall, M. E., *Journal of Natural Products*. **57**(3):415-418, 1994.
- 34 – Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L.M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S. e Lee, K. H., *Journal of Natural Products*. **57**(2):243-247, 1994.
- 35 – Kweifookai, G., Field, B., Rumble, B. A., Macrides, T. A. e Demunk, F., *Drug Development Research*. **35**(3):137-141, 1995.
- 36 – Kweifookai, G., Demunk, F., Macrides, T. A., Smith, P. e Rumble B. A., *Drug Development Research*. **36**(1):20-24, 1995.
- 37 – Kweifookai, G., Bird, D., Field, B., Ambrose, R., Carroll, A. R., Smith, P. e Valdes, R., *Journal of Ethnopharmacology*, **46**(1):7-15, 1995.
- 38 – Geetha, T., Varalakshmi, P. e Latha, R. M., *Pharmacological Research*. **37**(3):191-195, 1998.
- 39 – Geetha, T. e Varalakshmi, P., *General Pharmacology*, **32** (4) : 495-497, 1999.
- 40 – Geetha, T. e Varalakshmi, P., *Molecular and cellular Biochemistry*, **201** (1-2) : 83-87, 1999.
- 41 – Geetha, T. e Varalakshmi, P., *Journal of Ethnopharmacology*, **76** (1) : 77-80, 2001.

- 42 – Recio, M. D., Giner, R. M., Manez, S., Gueho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K. e Rios, J. L., *Planta Medica*, **61**(1):9-12, 1995.
- 43 – Recio, M. D., Giner, R. M., Manez, S. e Rios, J. L., *Planta Medica*. **61**(2):182-185, 1995.
- 44 – Manez, S., Recio, M. C., Giner, R.M. e Rios, J. L., *European Journal of Pharmacology*. **334**(1):103-105, 1997.
- 45 – Nick, A., Wright, A. D., Rali, T. e Sticher, O., *Phytochemistry*. **40**(6):1691-1695, 1995.
- 46 – Ye, W. C., Ji, N. N., Zhao, S. X., Liu, J. H., Ye, T., Mckervey, M. A. e Stevenson, P., *Phytochemistry*. **42**, 799-802, 1996.
- 47 – Noda, Y., Kaiya, T., Kohda, K. e Kawazoe, Y., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **45**(10):1665-1670, 1997.
- 48 – Suh, N., Honda, T., Finlay, H. J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N. E., Xie, Q. W., Nathan, C., Gribble, G. W. e Sporn, M. B., *Cancer Research*. **58**(4):717-723, 1998.
- 49 – Finlay, H. J., Honda, T., Gribble, G. W., Danielpour, D., Benoit, N. E., Suh, N., Williams, C. e Sporn, M. B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **7**(13):1769-1772, 1997.
- 50 – Delporte, C. L., Backhouse, C. N., Erazo, S., Negrete, R. E., Silva, C., Hess, A., Munoz, O., Garciagravalos, M. D. e Sanfeliciano, A., *Phytotherapy Research*. **11**(7):504-507, 1997.
- 51 – Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L. A., Francois, G., Narayanan, A. S. S., Peters, K. e Peters, E. M., *Planta Medica*. **63**(3):255-257, 1997.
- 52 – Hasmeda, M., Kweifio-Okai, G., Macrides, T. e Polya, G. M., *Planta Medica*. **65**(1):14-18, 1999.
- 53 – Rajic, A., Kweifio-Okai, G., Macrides, T., Sandeman, R. M., Chandler, D. S. e Polya, G. M., *Planta Medica*, **66** (3) : 206-210, 2000.
- 54 – Sunitha, S., Nagaraj, M. e Varalakshmi, P., *Medical Science Research*, **27** (8) : 535-540, 1999.
- 55 – Menezes, F. D., Silva, C. S., Pereira, N. A., Matos, F. J. D., Borsatto, A. S. e Kaplan, M. A. C., *Phytotherapy Research*, **13** (5) : 433-435, 1999.
- 56 – Malini, M. M., Lenin, M. e Varalakshmi, P., *Pharmacological Research*, **41** (4) : 413-418, 2000.
- 57 – Miranda, A. L. P., Silva, J. R. A., Rezende, C. M., Neves, J. S., Parrini, S. C., Pinheiro, M. L. B., Cordeiro, M. C., Tamborini, E. e Pinto, A. C., *Planta Medica*, **66** (3) : 284-286, 2000.
- 58 – Nikiema, J. B., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., De-Graef, C. e Heenen, M., *Phytotherapy Research*, **15** (2) : 131-134, 2001.
- 59 – Chaveiro, H. B., Candeias, M. F. e Cruz Morais, J. M., “Estudo Preliminar Sobre a Composição Química e Actividade Biológica da *Tolpis Barbata* (L.) Gaertner”, comunicação em poster, XIV Encontro Nacional da SPQ, Aveiro, 1994 (Abstract N17).

- 60 – Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. e Webb, D.A., “Flora Europaea”, Vol. 4, 2ª edição. Cambridge University Press, 1992.
- 61 – Alcaraz, J. A. D., “Vegetación y Flora de Extremadura”, Universitas Editorial, Badajoz, 1995.
- 62 – Font Quer, P., “Diccionario de Botánica” Editorial Labor, S. A. Barcelona, 1985.
- 63 – Coutinho, A. X. P., “Flora de Portugal. Plantas vasculares”, Livraria Bertrand, 2ª edição, Lisboa, 1939.
- 64 – Franco, J. A., “Nova Flora de Portugal. (Continente e Açores)”, Vol. II. *Clethraceae-Compositae*, Sociedade Astória, Lda., Lisboa, 1984.
- 65 – Sampaio, G., “Flora Portuguesa. Fac-simile”, Instituto Nacional de Investigação Científica. 3ª edição, Lisboa, 1988.
- 66 – Valdés, B., Talavera, S. e Fernandez-Galiano, E., “Flora Vascular de Andalucía Occidental”, Vol. 3. Ketres Editora, S. A., Barcelona, 1987.
- 67 – Costa, J. C., Aguiar, C., Capelo, J.H., Lousã, M. e Neto, C., “Biogeografia de Portugal Continental”, *Quercetea*, vol. 0. Bragança, 1999.
- 68 – Harborne, J. B., “Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analyses”, 2nd ed., Chapman and Hall, London, 1984.
- 69 – Prista, L. N. e Alves, A. C., “Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica”, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1982.
- 70 – Costa, A. F., “Farmacognosia Experimental”, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1982.
- 71 – Ciulei, I., “Methodologie d’Analyses de Produits Vegetaux”, UNIDO, 1984.
- 72 – Smolarz, H. D. e Krzaczek, T., *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 57, 1, 93-105, 1988.
- 73 – Lea, P.J. e Leegood, R. C., “Plant Biochemistry and Molecular Biology” Second Edition, John Wiley & Sons. Inc., New York, 1999.
- 74 – Ricardo, C. P. e Teixeira, A. N., “Moléculas Biológicas estruturas e propriedades” 4ª edição actualizada, Didáctica Editora, Lisboa, 1993.
- 75 – Dey, P. M. e Harborne, J. B., “Plant Biochemistry”, Academic Press, London, 1997.
- 76 – Cross, D., “An introduction to practical, Infra-Red Spectroscopy”, 2nd ed., Butterworths, London, 1964.
- 77 – Rodilla, J. M. L., “Componentes Diterpénicos do *Halimium verticillatum*”, Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Évora, 1988.
- 78 – Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., “Spectrometric Identification of Organic Compounds”, 5th ed., John Wiley & Sons, New York (1991)

- 79 – Oksuz, S. e Topcu, G., *Phytochemistry*, **26**, 3082, 1987.
- 80 – Sá Pereira, M. F. B. M., “Caracterização Química e Transformações de Componentes não Celulósicos de Algumas Espécies de Acácia Existentes em Portugal”, Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, 1996.
- 81 – Verma, R. K., Singh, N. e Gupta, M. M., *Fitoterapia*, **58**, 271, 1987.
- 82 – Heupel, R. C., *Phytochemistry*, **24**, 2929, 1985.
- 83 – Shingu, T., Yokoi, T., Niwa, M. e Kikuchi, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2252-2256, 1973.
- 84 – Ito, S., Kodama, M., Sunagawa, M., Oba, T. e Hikino, H., *Tetrahedron Lett.*, 2905, 1969.
- 85 – Hui, W. H. e Li, M. M., *Phytochemistry*, **16**, 113-115, 1977.
- 86 – Itoh, T., Tamura, T. e Matsumoto, T., *Phytochemistry*, **16**, 1723-1726, 1977.
- 87 – Talapatra, S. K., Shrestha, K. M., Pal, M. K., Basak, A. e Talapatra, B., *Phytochemistry*, **28**, 3437-3442, 1989.
- 88 – Reynolds, W. F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R., Escobar, L. I. e Leon, I., *Tetrahedron*, **42**, 3419-3428, 1986.
- 89 – Duddeck, H., Dietrich, W., Tóth, G., “Elucidación estructural por RMN” Springer - Verlag Ibérica, Barcelona, 2000.
- 90 – Friebolin, H., “Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy”, Wiley – VCH, 1998.
- 91 – Breitmaier, E., Voelter, W., “Carbon-13 NMR Spectroscopy”, VCH, 1990.
- 92 – Shama, M., Glick, R. E. e Mumma, R. O., *J. Org. Chem*, **27**, 4512-4517, 1962.
- 93 – Ahmad, V., Bano, U. e Mamad, S. E., *Planta Med.*, 521, 1985.
- 94 – Wenkert, E., Baddeley, G. V., Burfitt, I. R. e Moreno, L. N., *Org. Magn. Resonance*, **11**, 337, 1978.
- 95 – Gaydou, E. M., *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 495, 1992.
- 96 – Menezes, F. S., Borsatto, A. S., Pereira, N. A., Matos, F. J. A. e Kaplan, M. A. C., *Phytochemistry*, **48**, 323-325, 1998.
- 97 – Mahato, S. B. e Kundu, A. P., *Phytochemistry*, **37**, 1517, 1575, 1994.
- 98 – Patra, A., Mukhopadhyay, K. e Mitra, A. K., *Org. Magn. Resonance*, **17**, 166-168, 1981.
- 99 – Shannon, J. S., *Aust. J. Chem.*, **16**, 683-689, 1963.
- 100 – Cortez, D. A. G., Young, M. C. M., Marston, A., Wolfender, J. L. e Hostettmann, K., *Phytochemistry*, **47**, 1367-1374, 1998.
- 101 – Lin, C. N. e Tome, W. P., *Planta Medica*, **54**, 223, 1988.
- 102 – Wahyuono, S., Hoffmann, J. J., Jolad, S. D. e Dentali, S. J., *Phytochemistry*, **26**, 1213, 1987.
- 103 – Gunasekera, S. P., Kumar, V., Sultanbawa, M. U. S. e Balasubramaniam, S., *Phytochemistry*, **16**, 923, 1977.

- 104 – National Institute of Material and Chemical Research, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan, SDBSWeb:<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/>(access date).
- 105 – Chávez, J. P., Santos, I. D., Cruz, F. G. e Davide, J. M., *Phytochemistry*, **41**, 941-943, 1996.
- 106 – Gunatilaka, A. A. L., Nanayakkara, N. P. D., Sultanbawa, M. U. S. e Wazeer, M. I. M., *Org. Magn. Reson.* **14**, 415, 1980.
- 107 – Pretsch, E., Clerc, T., Seidl, J. E. e Simon, W., “ tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos” Editorial Alhambra, Madrid, 1980.
- 108 – Nicollier, G., Tabacchi, R., Gavin, J., Breton, J. L. e Gonzalez, A. G., “*Helvetica Chimica Acta*”, **62**, 807- 810, 1979.
- 109 – Goad, L. J. e Akihisa, T., “Analysis of Sterols”, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, 1997.
- 110 – Tanaka, R. e Matsunaga, S., *Phytochemistry*, **27**, 3579-3584, 1988.
- 111 – Santos, G. G., Alves, J. C. N., Rodilla, J. M. L., Duarte, A. P., Lithgow, A. M. e Urones, J. G., *Phytochemistry*, **44**, 1309-1312, 1997.
- 112 – Menezes, F. S., Borsatto, A. S., Pereira, N. A., Matos, F. J. A. e Kaplan, M. A. C., *Phytochemistry*, **48**, 323-325, 1998.
- 113 – González, A. G., Fraga, B. M., González, P., Hernández M. G. e Ravelo A. G., *Phytochemistry*, **20**, 1919-1921, 1981.
- 114 – Stevens, J. F., Hart, H., Bolch, A., Zwaving, J. H. E. e Malingré, T. M., *Phytochemistry*, **35**, 389-399, 1994.
- 115 – Patra, A., Mukhopadhyay, K. e Mitra, A. K., *Org. Magn. Reson.*, **17**, 166-168, 1981.
- 116 – Karliner, J. e Djerassi, C., “*J. Org. Chem.*” **31**, 1945-1956, 1966.
- 117 – Xue, H. Z., Lu, Z. Z., Konno C., Soejarto, D. D., Fong, G. A., Cordell, H. H. S. e Hodgson, W., *Phytochemistry*, **27**, 233, 1988.
- 118 – Nes, W. D., Benson M. e Heftmann, E., *Phytochemistry*, **20**, 2299, 1981.
- 119 – Seo, S., Tomita, Y. e Tori, K., *Tetrahedron Lett.*, **1**, 7-10, 1975.
- 120 – Seo, S., Tomita, Y. e Tori, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2075, 1981.
- 121 – Knight, S.A., *Org. Magn. Reson.*, **6**, 603-611, 1974.
- 122 – Mahato, S. B., Nancy, A.K. e Roy, G., *Phytochemistry*, **31**, 2199, 1993.
- 123 – Kirchner, J. G., “ Techniques of Chemistry, Volume XIV - Thin-Layer Chromatography”, John Wiley & Sons, 1978.
- 124 – Still, Michael, K. e Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 - 2925, 1978.

- 125 – Furniss, B. S. *et al.*; "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry"; 5th ed., Longman Scientific & Technical, London, 1991.
- 126 – Appleton, R.A. e Enzell, C.R., *Phytochemistry*, **10**, 447, 1971.
- 127 – Ageta, H. e Aray, Y., *Phytochemistry*, **22**, 1801, 1983.
- 128 – Kircher, H. W., *Phytochemistry*, **19**, 2707-2712, 1980.
- 129 – Pereira, A. M. D. R. L., "Produtos Naturais da Planta Medicinal *Sarcocephalus latifolius*" Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, 2001.