

Roberto S. Gallegos Olea e Nidia F. Roque

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508, São Paulo – Brasil.

This paper, "Analysis of Triterpene Mixtures by ^{13}C NMR", describes a methodology to identify the constituents of triperpene mixtures by NOISE decoupled and DEPT 135 ^{13}C NMR spectra.

INTRODUÇÃO

A bibliografia sobre triterpenos mostra um grande número destas substâncias de ocorrência vegetal. Uma ampla diversidade quanto a esqueleto e funcionalização, predominantemente oxigenada, leva a mais de mil estruturas^{1,2}.

Dentro dessa ampla variedade de triterpenos existem alguns que ocorrem com frequência maior nos vegetais. Estes apresentam apenas um grupo funcional no C-3 e são pentacíclicos ou tetracíclicos que contêm no máximo uma ou duas ligações duplas respectivamente. Exemplos característicos são o lupeol, a α -amirina, a β -amirina, a friedelina e o lanostadienol.

Quando vários triterpenos do tipo mencionado estão presentes em um mesmo extrato vegetal, o fracionamento deste extrato efetuado por técnicas cromatográficas convencionais dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras. O que se obtém normalmente é uma mistura contendo esses triterpenos. Esta situação pode ser enfrentada de maneiras variadas dependendo do objetivo do estudo: utilizando técnicas cromatográficas especiais, se o interesse é isolar as substâncias, ou, se o objetivo é meramente identificá-las, recorrendo a outros procedimentos. Um destes pode ser o processo cromatográfico, desde que se disponha de padrões para a comparação. Um outro que dispensa o uso de padrões é a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, que requer porém uma comparação dos espectros de massas em bancos de dados espectrais via computador³. Portanto, a inexistência de padrões ou a falta de bancos de dados tornaria inviável a análise de misturas de triterpenos por estes métodos.

Um levantamento e uma análise de dados de RMN de ^{13}C de triterpenos registrados na literatura mostraram que os deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 , quando presentes, são altamente característicos de cada esqueleto, pelo menos no caso de triterpenos oxigenados apenas no C-3. Este fato nos levou a propor uma metodologia de análise de misturas destes triterpenos baseada em dados de RMN de ^{13}C .

METODOLOGIA

As misturas a serem analisadas devem ser submetidas a uma purificação prévia, de tal forma que haja garantia de que ela seja constituída unicamente por triterpenos, e estes triterpenos devem todos possuir a mesma função, por exemplo, uma hidroxila no C-3.

A garantia destas premissas pode ser obtida através de cromatografia em camada delgada e de espectros de RMN de ^1H e de infravermelho. Assim, as misturas ao serem cromato-

grafadas em camadas delgada devem dar uma única mancha quando eluídas com diferentes eluentes mostrando a "limpeza" da mistura; além disto, reveladores específicos podem indicar o caráter triterpênico. Um espectro de RMN de ^1H pode também sugerir que a mistura é constituída por triterpenos, e um espectro na região de infravermelho identifica a função existente nas moléculas.

Uma vez garantidos estes requisitos, são registrados dois espectros de RMN de ^{13}C , um com desacoplamento total dos prótons e um DEPT 135, no qual os sinais dos carbonos quaternários são eliminados e os dos grupos metilênicos aparecem com fase invertida em relação aos dos grupos metínicos e metílicos. Esta última técnica tem a vantagem de "limpar" um pouco o espectro além de ser altamente sensível. A nossa experiência indica que com 20 mg de amostra é possível identificar os componentes de uma mistura contendo quatro triterpenos, quando a análise é feita em um espectrômetro operando a 50 MHz para ^{13}C .

As primeiras informações obtidas através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C totalmente desacoplados são as seguintes: a) função orgânica presente nos triterpenos, b) número aproximado de triterpenos na mistura e c) abundância relativa dos triterpenos.

A primeira informação confirma informações obtidas anteriormente. No caso de triterpenos naturais mais comuns podemos classificá-los em 4 grupos em função das oxidações mais frequentes. A tabela 1 mostra estes grupos e os deslocamentos químicos que os caracterizam.

Tabela 1. $\delta^{13}\text{C}$ (ppm, CDCl_3) dos átomos de carbono oxigenados de triterpenos naturais mais frequentes.

1) Álcoois	$\alpha = 76,1 \pm 0,5$; $\beta = 78,6 \pm 0,5$
2) Acetatos de triterpenilas	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O}-\text{C} \end{array}$ $= 21,2 \pm 0,02$ $= 170,6 \pm 0,3$ $= 80,6 \pm 0,4$
3) Éteres metílicos	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$ $= 57,5 \pm 0,1$ $= 88,7 \pm 0,1$
4) Cetonas	$= 216,8 \pm 1,2$

A segunda informação deriva do número total de sinais registrados (que é sempre menor do que o número de carbonos totais), e também do número de carbonos sp^2 , considerando que os triterpenos pentacíclicos e tetracíclicos têm uma e duas ligações duplas respectivamente. Espectros de substâncias com os esqueletos friedelano e cicloartano, que não contêm ligações duplas, possuem outros sinais característicos, como veremos na tabela 2.

A terceira informação decorre da intensidade relativa dos sinais referentes a carbonos com igual número de hidrogênios no espectro totalmente desacoplado.

Quando os espectros obtidos indicam a presença predominante de um triterpeno na mistura, fato este muito freqüente, é interessante tentar uma cristalização e obter um espectro da água mãe. Neste novo espectro, a diminuição da intensidade dos picos da substância mais abundante facilita a identificação dos sinais dos demais componentes da mistura.

O espectro DEPT 135 dará informações quanto ao número de hidrogênios de cada carbono, cujo deslocamento químico já foi obtido pelo espectro totalmente desacoplado.

De posse destas informações, a identificação dos triterpenos presentes na mistura deve iniciar-se pela comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 com os existentes na literatura.

Embora o número de esqueletos triterpênicos seja grande (da ordem de uma centena), relativamente poucos têm os dados de RMN de ^{13}C registrados na literatura. É importante

observar que em nenhum dos casos analisados, uma variação do grupo funcional no C-3 provoca mudanças nos deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos.

Uma consulta às tabelas 1 e 2 levará então a uma proposta para os triterpenos presentes na mistura. Em muitos casos, uma análise da intensidade dos picos (feita a ressalva de que o número de hidrogênios ligados a cada carbono influi na intensidade), facilitará a associação dos dois sinais correspondentes a cada ligação dupla de cada triterpeno.

Aqui vale a pena ressaltar os casos onde a presença de mais de uma ligação dupla ocorre, ou, ao contrário, onde não existem ligações duplas. O segundo caso é mais facilmente contornado, uma vez que os triterpenos até agora detectados onde não ocorrem carbonos sp^2 possuem deslocamentos químicos que podem servir de indicação de sua presença. A identificação de triterpenos naturais com duas ligações duplas é mais difícil, uma vez que normalmente nos tetracíclicos uma delas é endocíclica e a outra está localizada na cadeia lateral, tornando difícil a correspondência do núcleo à cadeia, caso exista mais de um triterpeno nestas condições presentes na mistura.

A indicação obtida pela análise dos carbonos olefínicos é então submetida a uma confirmação pela análise dos carbonos metínicos. Como estes existem em menor número que os dos metilênicos ou dos metílicos podem ser observados mais claramente na mistura.

A procura dos dados de RMN de ^{13}C de triterpenos no Chemical Abstracts pode ser feita, mais facilmente, através

Tabela 2. Valores característicos de RMN de ^{13}C de carbonos sp^2 em Triterpenos.

Dados observados (ppm)	Triterpenos (exemplo)*	Ref. N ^o **
157,9 (s) ; 117,0 (d)	D-friedoolean-14-eno (taraxerol)	4
154,3 (s) ; 107,0 (t)	Urs-20(30)-eno (taraxasterol)	5
151,5 (s) ; 115,9 (d)	D:C-friedo-B':A'-neogamacer-9(11)-eno	6
150,5 (s) ; 109,3 (t)	Lup-20(29)-eno (lupeol)	7
148,7 (s) ; 114,8 (d)	Lanosta-9(11),24-dieno (parkeol)	8
130,9 (s) ; 125,2 (d)		
146,0 (s) ; 117,7 (d)	Lanosta-7,24-dieno (13 α , 14 β)	9
130,8 (s) ; 125,1 (d)		
142,7 (s) ; 120,1 (d)	Lanosta-7,9(11)-dieno (γ -lanostadienol)	10
145,9 (s) ; 116,3 (d)		
145,4 (s) ; 116,4 (d)	D:C-friedours-7-eno (bauerenol)	11
145,3 (s) ; 117,3 (d)	Lanost-7-eno (tirucallol)	9
145,1 (s) ; 121,7 (d)	Olean-12-eno (β -amirina)	12
142,6 (s) ; 129,8 (d)	Olean-18-eno (germanicol)	13
141,9 (s) ; 131,0 (s)	B':A'-neogamacer-13(18)-eno (bosmerol)	14
140,4 (s) ; 122,7 (s)	A'-neogamacer-21-eno	6
140,0 (s) ; 136,0 (s)	A'-neogamacer-17(21)-eno	6
139,6 (s) ; 118,8 (d)	Urs-20-eno (pseudotaraxasterol)	21
139,4 (s) ; 124,1 (d)	Urs-12-eno (α -amirina)	15
134,6 (s) ; 134,2 (s)	D:C-friedours-8-eno	11
134,4 (s) ; 134,2 (s)	Lanost-8-eno	16
134,1 (s) ; 133,6 (s)	Lanost-8-eno (13 α , 14 β) (eufenol)	10
134,1 (s) ; 133,3 (s)	Lanosta-8,24-dieno (13 α , 14 β) (eufadienol)	16
130,0 (s) ; 125,2 (d)		
130,8 (s) ; 125,4 (d)	9,19-ciclolanost-24-eno (cicloartenol)	17
sem ligação dupla, 6,8 (q)	D:A-friedooleanan-3-ona (friedelina)	18
sem ligação dupla, 20,0 (s)	9,19-ciclolanostano (cicloartenol)	19

(*) - A lista corresponde ao esqueleto dos triterpenos com a posição da ligação dupla. O nome entre parênteses corresponde a um exemplo característico.

(**) - A referência corresponde ao exemplo dado entre parênteses.

dos nomes destas substâncias que, derivam todos dos esqueletos: damarano, gamacerano, lanostano, lupano, oleanano e ursano.

Uma confirmação final da presença dos triterpenos na mistura pode ser obtida através de uma tabela onde se correlacionam os deslocamentos químicos observados no espectro totalmente desacoplado, a intensidade relativa de cada sinal, e a multiplicidade (número de hidrogênios) de cada carbono à atribuição. Nesta tabela espera-se observar todos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos de cada triterpeno presente, exceto talvez de algum carbono quaternário de um constituinte em menor proporção, lembrando que muitas vezes um mesmo deslocamento químico pode corresponder a mais de um carbono de uma mesma substância ou de substâncias diferentes.

APLICAÇÃO

Por esta metodologia analisamos, entre outras, uma mistura de triterpenos cetônicos extraída da espécie *Alibertia macrophylla* A. Rich (Rubiaceae)²⁰.

A tabela 3 mostra a correlação entre os dados extraídos dos espectros de RMN de ¹³C e as substâncias identificadas.

Tabela 3. Identificação dos triterpenos de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)

Nº	δ ppm	Int. Rel.	Mult.	Atribuições			
				I	II	III	IV
1	217,0	6,8	C			C-3	C-3
2	216,7	4,6	C	C-3	C-3		
3	150,5	7,4	C			C-20	
4	145,2	3,6	C		C-13		
5	142,5	3,1	C				C-18
6	139,8	4,0	C	C-13			
7	129,9	4,0	CH				C-19
8	124,3	7,0	CH	C-12			
9	121,6	3,8	CH		C-12		
10	109,6	11,4	CH ₂			C-29	
11	59,3	8,4	CH	C-18			
12	55,4	11,3	CH	C-5			
13	55,3	5,5	CH		C-5		
14	55,0	16,4	CH			C-5	
15	54,8	5,5	CH				C-5
16	50,6	4,6	CH				C-9
17	49,8	12,1	CH			C-9	
18	48,2	12,8	CH	C-9		C-18	
19	47,9	13,2	CH			C-19	
20	47,4	7,7	CH		C-18		
21	47,3	3,5	C		C-4	C-4	
22	47,2	3,0	C	C-4			C-4
23	47,0	11,7	CH				
24	46,9	9,3	CH		C-9		
25	46,8	3,0	CH ₂		C-19		
26	43,4	4,3	C				C-14
27	43,0	14,8	C			C-17	
28	43,0	8,0	C			C-14	
29	42,3	6,9	C	C-14			
30	41,9	3,2	C		C-14		
31	41,6	7,1	CH ₂	C-22			
32	40,9	11,4	C			C-8	
33	40,7	4,2	C				C-8
34	40,1	10,2	C	C-8			
35	40,0	13,5	CH ₂			C-22	
36	39,9	6,8	CH ₂				C-1
37	39,8	12,4	CH	C-19			
				C-20			
38	39,7	3,0	C		C-8		
39	39,7	20,0	CH ₂			C-1	
40	39,6	9,5	CH ₂	C-1			

Nº	γ ppm	Int. Rel.	Mult.	Atribuições			
				I	II	III	IV
41	39,4	5,0	CH ₂		C-1		
42	38,6	4,8	CH				C-13
43	38,3	16,7	CH			C-13	
44	37,7	4,6	CH ₂				C-16
45	37,4	4,7	CH ₂				C-22
46	37,2	4,3	CH ₂		C-22		
47	37,0	13,0	C			C-10	
48	36,7	5,0	C		C-10		C-10
49	36,7	8,4	C	C-10			
50	35,6	12,5	CH ₂			C-16	
51	34,8	4,8	CH ₂		C-21		
52	34,4	4,1	C				C-17
53	34,2	17,0	CH ₂		C-2		
54	34,1	9,1	CH ₂				C-2
55	34,0	11,6	CH ₂	C-2		C-2	
56	33,9	5,7	CH ₂				C-7
57	33,6	12,5	CH ₂			C-7	
58	33,4	8,0	CH ₃		C-29		
59	33,3	4,5	CH ₂				C-21
60	32,5	8,3	CH ₂	C-7			
61	32,3	4,0	C		C-17		C-20
62	32,2	4,4	CH ₂		C-7		
63	31,3	3,5	C		C-20		
64	31,3	7,6	CH ₃			C-29	
65	31,1	4,1	CH ₂	C-21			
66	29,9	12,1	CH ₂			C-21	
67	29,7	6,5	C				
68	29,3	5,1	CH ₃				C-30
69	28,8	8,0	CH ₃	C-28			
70	28,5	4,4	CH ₃		C-28		
71	28,2	7,8	CH ₂	C-15			
72	27,5	5,0	CH ₂				C-15
73	27,4	13,7	CH ₂			C-15	
74	27,0	3,0	CH ₂		C-15		
75	27,0	4,9	CH ₃				C-23
76	26,7	17,3	CH ₃			C-23	
77	26,6	9,0	CH ₃	C-23			
78	26,5	10,0	CH ₂	C-16			
79	26,2	6,0	CH ₃		C-23		
80	26,2	3,0	CH ₂				C-12
81	26,1	4,0	CH ₂		C-16		
82	25,9	4,5	CH ₃		C-27		
83	25,3	8,0	CH ₃				C-28
84	25,1	12,0	CH ₂			C-12	
85	23,7	4,9	CH ₃		C-30		
86	23,6	8,3	CH ₂		C-11		
87	23,5	10,0	CH ₂	C-11			
88	23,3	8,0	CH ₃	C-27			
89	22,2	2,5	CH ₃				
90	21,7	4,0	CH ₂				C-11
91	21,5	17,5	CH ₃	C-24	C-30		
92	21,4	9,3	CH ₂			C-11	
93	21,1	13,0	CH ₃		C-24	C-24	
94	21,0	4,0	CH ₃				C-24
95	19,8	19,9	CH ₂	C-6	C-6	C-6	C-6
96	19,4	5,0	CH ₃			C-30	
97	18,1	13,7	CH ₃			C-28	
98	17,5	12,0	CH ₃	C-29			
99	16,9	5,0	CH ₃	C-26			
100	16,7	4,0	CH ₃		C-26		
101	16,6	4,5	CH ₃				
102	16,0	15,6	CH ₃			C-26	C-25
							C-26
103	15,8	10,6	CH ₃			C-25	
104	15,5	7,0	CH ₃	C-25			
105	15,4	2,5	CH ₃				
106	15,3	4,0	CH ₃		C-25		
107	14,6	6,0	CH ₃			C-27	C-27

I - α-amirenona

II - β-amirenona

III - lupenona

IV - germaciona

Abundância relativa: III > I > II > IV

REFERÊNCIAS

1. Connolly, J.D.; Mill, R.A.; *Nat. Prod. Reports* (1989), **6**, 475.
2. Harborne, J.B.; Turner, B.L.; "Plant Chemosystematics" (1984), Academic Press.
3. Pinto, A. da C.; Cardoso, J.N.; Patitucci, M.L.; 13ª Reunião Anual da SBQ (1990), Caxambu-Minas Gerais, PN-43.
4. Sakurai, N.; Yaguchi, Y.; Inoue, T.; *Phytochemistry* (1987), **26**, 217.
5. Patra, A.; Mukhopadhyay, A.K.; Mitra, A.K.; *Org. Magn. Reson.* (1981), **17**, 166.
6. Wilkins, A.L.; Bird, P.W.; Jager, P.M.; *Magn. Reson. Chem.* (1987), **25**, 503.
7. Wenkert, E.; Baddeley, G.V.; Burfitt, I.R.; Moreno, L.N.; *Org. Magn. Reson.* (1978), **11**, 337.
8. Blunt, J.W.; Munro, H.G.; *Org. Magn. Reson.* (1980), **13**, 26.
9. Polonsky, J.; Varon, Z.; Rabanal, R.M.; *Israel J. Chem.* (1977), **16**, 16.
10. Knight, S.A.; *Org. Magn. Reson.* (1974), **6**, 603.
11. Roque, N.F.; Haraguchi, M.; resultados não publicados.
12. Sao, S.; Tomita, Y.; Tori, K.; *Tetrahedron Let.* (1975), **7**.
13. González, A.G.; Fraga, B.M.; González, P.; Hernández, M.G.; Ravelo, A.G.; *Phytochemistry* (1981), **20**, 1919.
14. Oyarzún, M.L.; Garbarino, J.A.; Gambaro, V.; Guilhem, J.; Pascard, C.; *Phytochemistry* (1981), **26**, 221.
15. Wehrli, F.W.; Nishida, T.; "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" (1976), **36**, 1.
16. Harref, A.B.; Lavergne, J.-P.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1985), **5**, 965.
17. Radics, L.; Kajtar-Paredy, M.; Corsano, S.; Standoli, L.; *Tetrahedron Let.* (1975), 4287.
18. Prakash, O.; Roy, R.; Garg, H.S.; Bhakuni, D.S.; *Magn. Reson. Chem.* (1987), **25**, 39.
19. Lakshminarayana, V.; Murty, Y.L.N.; Row, L.R.; *Org. Magn. Reson.* (1981), **17**, 77.
20. Bolzani, V. da S.; Trevisan, L.V.; Yong, M.C.M.; *Phytochemistry*, no prelo.
21. Majumder, P.L.; Laha, S.; *J. Indian Chem. Soc.* (1982), **59**, 881.