

**UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO NA DETECÇÃO DE CLASSE DE TERPENOS EM EXTRATOS BRUTOS VEGETAIS<sup>1</sup>****Maria Lucia Patitucci, Valdir F. Veiga Jr. e Angelo C. Pinto**

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Tecnologia - Bloco A - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

**Maria das Graças B. Zoghbi e Jeferson Rocha de A. Silva**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais - Avenida Cosme Ferreira, 1756 Aleixo - Cx. P. 478 - 69083-000 - Manaus - AM

Recebido em 12/2/95; aceito em 21/3/95

**Analysis by High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry on non-polar stationary phase of the crude (or pre-fractionated) extracts of species of *Copaifera*, Velloziaceae and Polypodiaceae, separated monofunctional, sesqui, di and triterpenoids. In this study we present the utilization of this technique for detection of mono, sesqui, di and triterpenoids of the crude hexane extract from *Protium strumosum* (Burseraceae). The analyses were done by the comparison with the chromatograms of the different classes of terpenoids with several oxidation states, under different chromatographic conditions.**

**Keywords: terpenoids; gas chromatography; *Copaifera*; Velloziaceae; Polypodiaceae; Burseraceae.**

**INTRODUÇÃO**

Terpenóides são largamente distribuídos no reino vegetal e apresentam uma grande diversidade estrutural. A identificação destas substâncias na composição de um extrato é feita, em geral, a partir de procedimentos exaustivos de isolamento, purificação e análises de um conjunto de métodos espectrométricos.

Recentemente, a identificação de terpenos em extratos brutos ou pré-fractionados vem sendo realizada através da utilização de cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM) e co-injeções de padrões autênticos, dispensando processos de isolamento. Esta metodologia tem sido aplicada a extratos brutos e pré-fractionados de baixa e média polaridade de diversas espécies do gênero *Copaifera* e das famílias Velloziaceae e Polypodiaceae (composições majoritárias: sesqui e diterpenos<sup>1-3</sup>, di e triterpenos<sup>4-9</sup> e triterpenos<sup>10,11</sup>, respectivamente). Nestas análises cromatográficas observou-se que quando se usa fases estacionárias apolares ou pouco polares nas mesmas condições de temperatura e vazão, sesqui, di e triterpenos eluem em regiões específicas do cromatograma.

Neste trabalho apresenta-se a determinação de regiões de eluição cromatográfica, em CGAR, usando-se padrões autênticos, para quatro classes de terpenos mono funcionalizados (mono, sesqui, di e triterpenos), em fase estacionária de baixa polaridade (SE-54).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No decorrer de análises por CGAR de extratos brutos (de baixa e média polaridade) e/ou frações de diversas espécies de *Copaifera*, Velloziaceae e Polypodiaceae, observou-se um perfil cromatográfico comum para as espécies de cada gênero ou família. Os componentes destas misturas eluem em regiões bem distintas dos cromatogramas. Os espectros de massas das substâncias presentes nos extratos foram obtidos através de CGAR/EM, o que permitiu a caracterização de praticamente a totalidade

de constituintes. As diversas substâncias foram detectadas pelos seus íons moleculares e pelos íons resultantes de rotas de fragmentação características das classes de produtos naturais presentes nas amostras estudadas. Estes resultados evidenciaram a presença majoritária de sesqui e diterpenos em *Copaifera*, di e triterpenos em Velloziaceae e triterpenos em Polypodiaceae, estando em acordo com trabalhos descritos na literatura<sup>1-11</sup>.

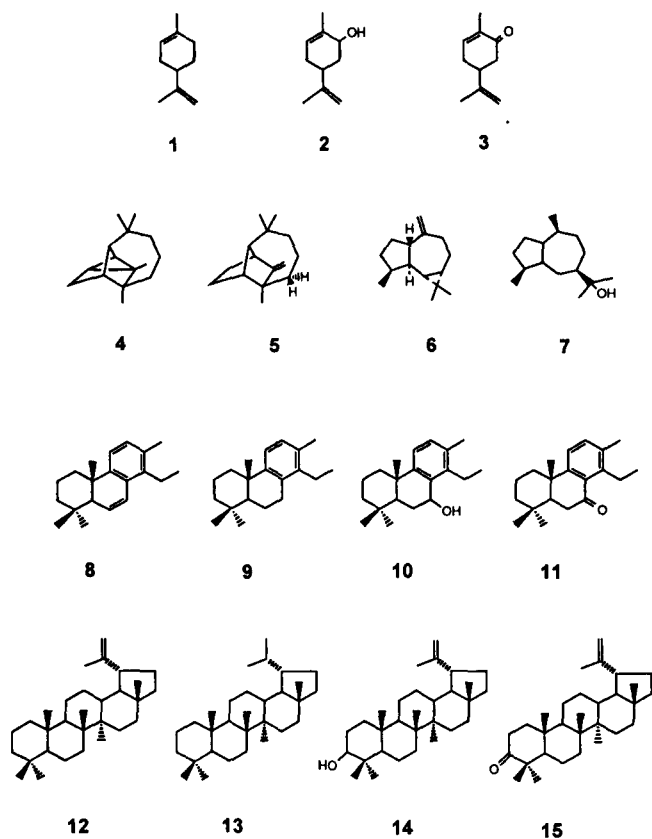
Neste trabalho são apresentadas programações de temperatura otimizadas para a detecção de classes de terpenos em extratos vegetais brutos ou pré-fractionados através de análise por CGAR. A utilização de padrões terpênicos autênticos permitiu a determinação de regiões de eluição para mono, sesqui, di e triterpenos definidas nos cromatogramas.

Inicialmente foram selecionadas, como padrões, substâncias mono-funcionalizadas das diversas classes de terpenos, sendo considerados seus esqueletos, níveis de oxidação e insaturação (Quadro 1).

A seguir otimizou-se a programação em CGAR (fase estacionária SE-54) para cada classe de terpenos, obtendo-se os cromatogramas denominados **Cromatogramas-Padrão** (Figuras 1-4). A ordem de eluição dos padrões, determinada através de análise por CGAR-EM, apresentou tempo de retenção crescente para hidrocarbonetos, álcoois e cetonas dentro de cada classe. Posteriormente foi preparada uma mistura de todos os padrões terpênicos e procedeu-se à otimização da programação para a visualização das diferentes regiões de eluição de mono, sesqui, di e triterpenos, possibilitando a detecção de cada classe, como pode ser visto no **Cromatograma-padrão para detecção de terpenos** (Figura 5).

Óleos brutos exudados de tronco de espécies de *Copaifera* e óleos de copaíba comerciais foram submetidos a análises por CGAR nas condições determinadas para a mistura de padrões terpênicos, observando-se um perfil cromatográfico com regiões de eluição definidas no cromatograma para sesqui e diterpenos, como mostra a Figura 6. Análises sob as mesmas condições cromatográficas de extratos hexânicos brutos de diversas Velloziaceae mostraram uma composição predominante de di e triterpenos (Figura 7), enquanto os extratos hexânicos brutos das Polypodiaceae estudados apresentaram composição triterpênica majoritária (Figura 8).

<sup>1</sup> Dedicado ao Professor Raimundo Braz Filho por ocasião de seu sexagésimo aniversário.



Quadro 1

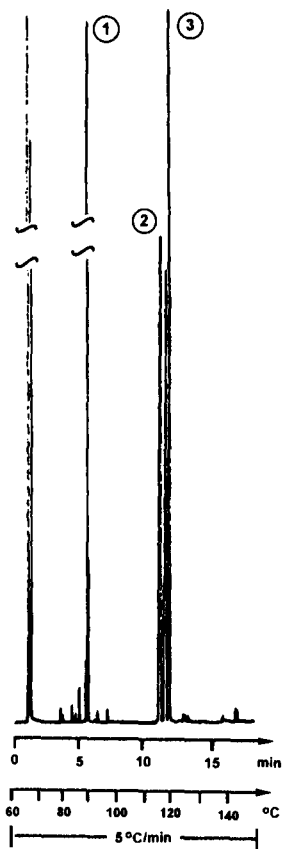


Figura 1. Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões monoterpênicos (fase estacionária SE-54).

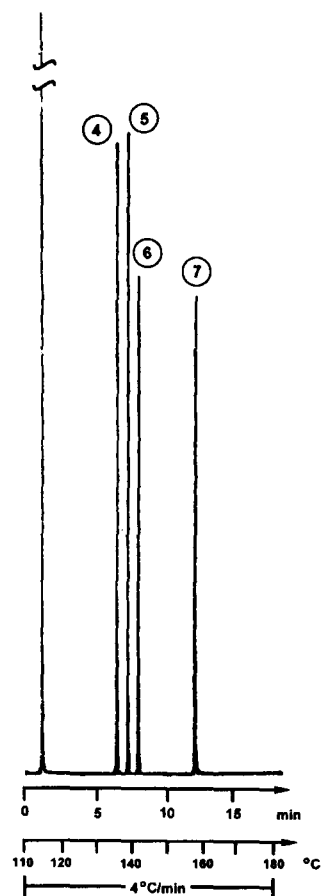


Figura 2. Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões sesquiterpênicos (fase estacionária SE-54).

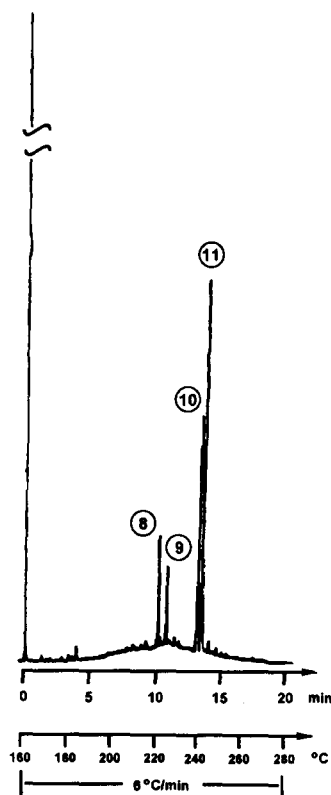


Figura 3. Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões diterpênicos (fase estacionária SE-54).

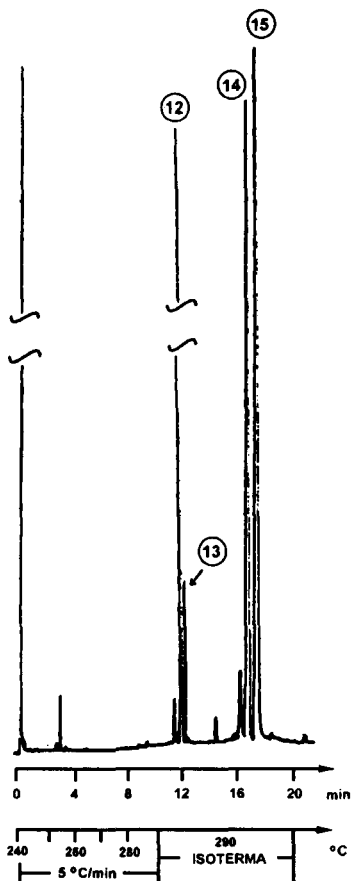


Figura 4. Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões triterpênicos (fase estacionária SE-54).

A programação estabelecida para análise cromatográfica da mistura-padrão e dos extratos brutos foi aplicada ao extrato hexânico bruto de *Protium strumosum* (Burseraceae) de composição química desconhecida. As informações disponíveis sobre

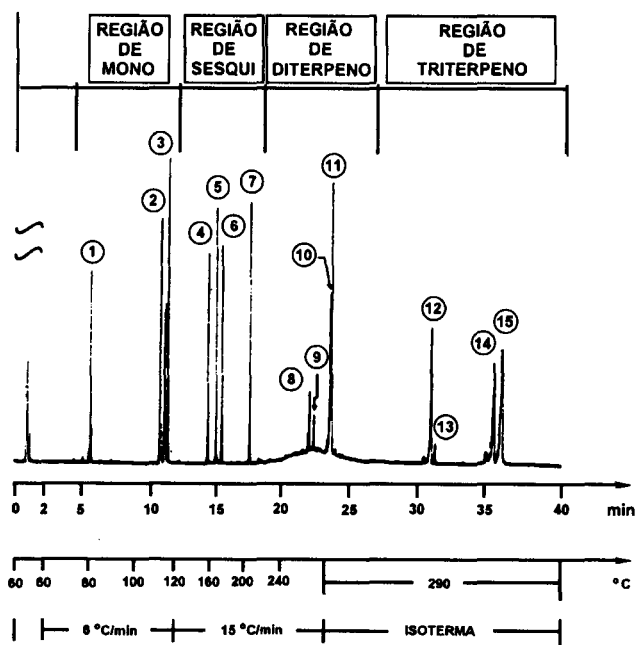


Figura 5. Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões terpênicos (fase estacionária SE-54).

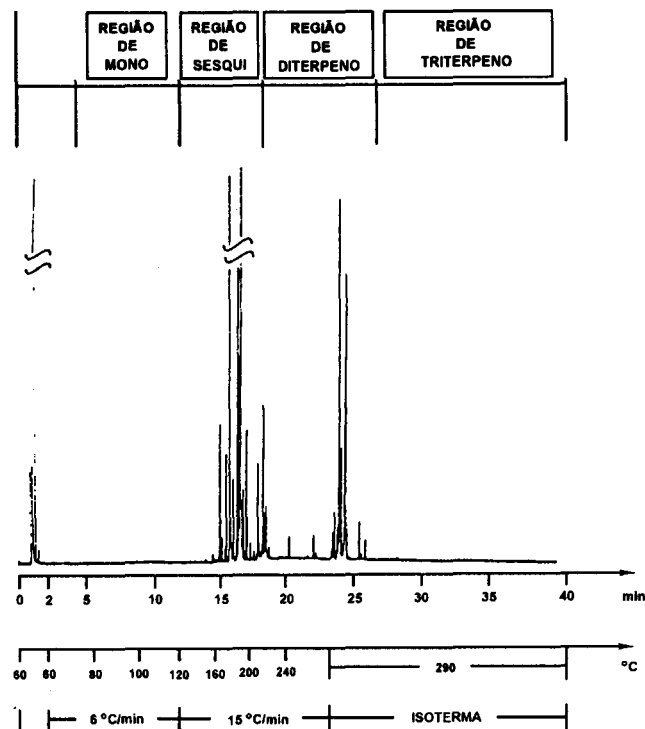


Figura 6. Cromatograma (CGAR) do óleo bruto de Copaíba comercial (fase estacionária SE-54).

esta espécie botânica se relacionam com trabalhos que descrevem a composição química de espécies do gênero *Protium* e, em maior extensão, de espécies da família Burseraceae<sup>12</sup>. Este extrato quando analisado por CGAR apresentou perfil cromatográfico (Figura 9) semelhante ao da mistura de padrões terpênicos. Logo, numa primeira análise pode-se suspeitar da

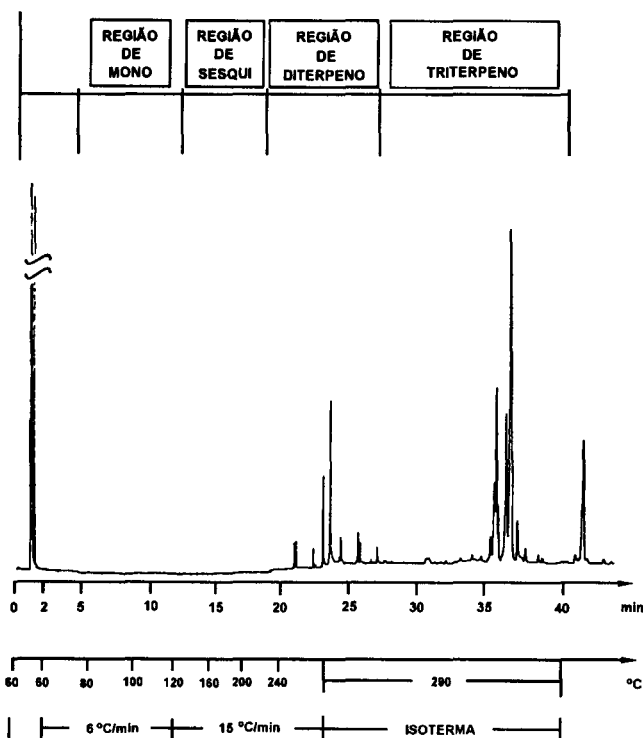


Figura 7. Cromatograma (CGAR) do extrato hexânico bruto de *Vellozia stipitata* (fase estacionária SE-54).

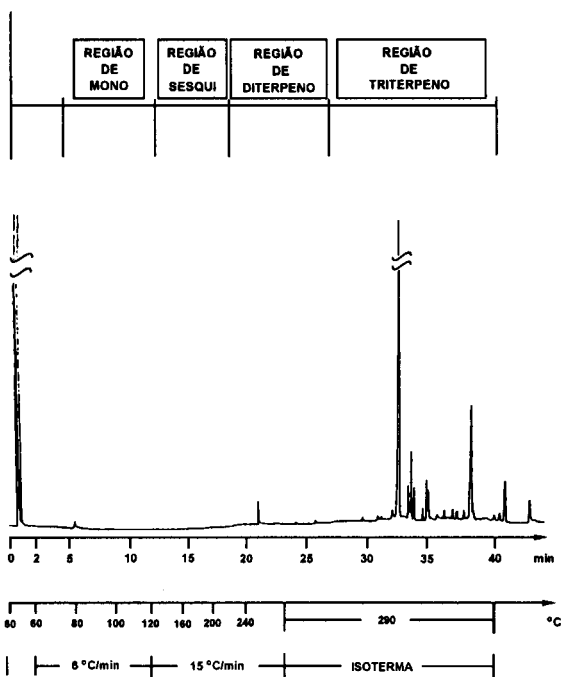


Figura 8. Cromatograma (CGAR) do extrato hexânico bruto de *Polygodium miniscifolium* (fase estacionária SE-54).

presença de tais classes de substâncias. A detecção da composição química majoritária desta espécie como sendo de mono, sesqui e triterpenos foi confirmada pela obtenção de espectros de massas (CGAR-EM) e comparação automática com a biblioteca de espectros de massas NBS e Wiley. No intervalo de tempo de retenção entre 19 e 27 minutos (região de eluição de diterpenos) foi observado um único pico significativo ( $t_R = 20,9$  min), apresentando íon molecular de  $m/z$  316( $M^+$ ), correspondente à fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_3$ . Os íons de abundâncias

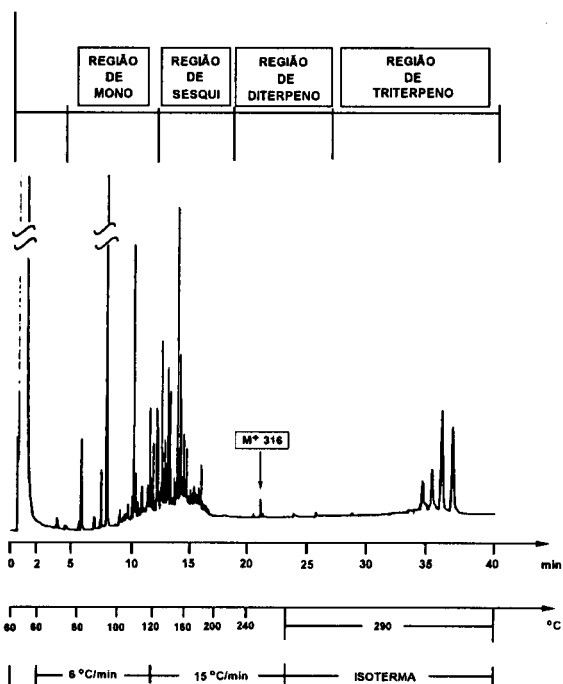


Figura 9. Cromatograma (CGAR) do extrato hexânico bruto de *Protium strumosum* (fase estacionária SE-54).

relativas significativas [ $m/z$  205 (95), 135 (50), 109 (78), 95 (100)] indicaram fragmentações características de diterpenos de esqueleto labdano<sup>13</sup>. Apesar de não se identificar a estrutura desta substância é possível deduzir através de seu  $t_R$  relativo dentro das condições cromatográficas utilizadas e de seus fragmentos no espectro de massas, com certo grau de confiabilidade, sua natureza diterpênica.

## CONCLUSÃO

O estabelecimento de condições cromatográficas específicas para análise de extratos brutos vegetais ou pré-fracionados apolares ou de baixa polaridade, por CGAR, é um método rápido e eficiente que pode ser usado com sucesso para se detectar e distinguir classes de terpenos em plantas que apresentem tais substâncias em sua composição química. O acoplamento de CGAR à espectrometria de massas é necessário para se confirmar a natureza terpênica dessas substâncias, quer seja através de seus íons moleculares, quer seja através de análise de seus fragmentos nos espectros de massas.

Este tipo de trabalho é facilitado quando se utiliza sistemas informatizados que permitem a comparação automática dos espectros obtidos com aqueles armazenados em bibliotecas de espectros de massas (espectroteca). Um fator importante que não pode ser esquecido para a realização de trabalhos que tenham como objetivo a detecção de classes de terpenos em vegetais por CGAR é o conhecimento prévio da composição química da família botânica que se quer estudar. Se a literatura dispuser dessas informações no gênero da planta em estudo, o trabalho fica ainda mais confiável e facilitado.

Neste trabalho, a análise cromatográfica do extrato hexânico bruto de *Protium strumosum*, de composição química desconhecida, ilustra muito bem a potencialidade desta metodologia. No entanto, para a identificação inequívoca de qualquer substância por CGAR em extratos brutos é necessário a co-injeção de padrões autênticos em três colunas capilares de diferentes seletividades<sup>14</sup>.

## DADOS EXPERIMENTAIS

### Análises cromatográficas

CGAR - Cromatógrafo a gás HP-5790A; condições: injetor: 260°C; detector por ionização de chama: 300°C; gás carreador:  $H_2$ ; vazão: 2 ml/min; temperaturas programadas: a) cromatograma padrão para detecção de terpenos: 60°C (2 min) - 60-120°C (6°C/min) - 120-290°C (15°C/min) - 290°C (17 min); b) cromatograma-padrão de monoterpênicos: 60-150°C (5°C/min); c) cromatograma-padrão de sesquiterpenos: 110-180°C (4°C/min); d) cromatograma-padrão de diterpenos: 160-280°C (6°C/min); e) cromatograma-padrão de triterpenos: 240-290°C (5°C/min) - 290°C (15 min); injeção com divisão de fluxo (20:1); coluna capilar de sílica fundida recheada com fase estacionária SE-54 (5% fenil 2% vinil-metil-silicone, 25 m, DE=0,3 mm,  $df=0,25$  nm). CGAR/EM - Cromatógrafo a gás HP-5880 acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupólo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; condições de análise idênticas às de CGAR. Os cromatogramas apresentados nas figuras 1-9 foram copiados dos originais através de Scanner HP.

### Obtenção de padrões

**Monoterpenos:** Cedidos pelo Prof. Márcio C. Mattos - IQ-UFRJ. **Sesquiterpenos:** Cedidos pela Prof<sup>a</sup> Anita Marsaioli - IQ-UNICAMP. **Diterpenos:** (11) - Isolado de *Vellozia leptopetala*<sup>6</sup>. (10) - Produto de redução de (11) por  $NaBH_4$ . (8) - Produto de desidratação de (10)<sup>15</sup>. (9) - Produto de hidrogenólise de (11). **Triterpenos:** (15) - Isolado de *Vellozia leptopetala*.

(14) - Cedido pelo Dr. Antonio Carlos Siani - (INPA-AM). (12 e 13) - Produtos de redução de Wolf-Kishner de (15)<sup>11</sup>.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LADETEC (Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro) pela utilização do Cromatógrafo a gás HP5790A e pela obtenção das análises de CGAR/EM; aos doutores Márcio C. Mattos (IQ-UFRJ), Anita Marsaioli (IQ-UNICAMP) e Antonio Carlos Siani (INPA-AM), as amostras padrões cedidas e ao CNPq, à CAPES e ao CEPG/UFRJ, o apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

1. Ferrari, M.; Pagnoni, U. M.; Pelizzoni, F.; Lukes, V.; Ferrari, G.; *Phytochemistry*, (1971), **10**, 905.
2. Monache, F. D.; Leoncio, A. I. L.; Monache, G. D.; Marini-Betollo, G. B.; *Ann. Chim.*, (1970), **60**, 233.
3. Arrenius, S. P.; Foster, C. E.; Edmonds, C. G.; Langenheim; *Phytochemistry*, (1983), **22**, 471.
4. Pinto, A. C.; Pinchin, R.; Prado, S. K.; *Phytochemistry*, (1983), **22**, 2017.
5. Pinto, A. C.; Borges C.; *Phytochemistry*, (1983), **22**, 2011.
6. Pinto, A. C.; Patitucci, M. L.; Silva, R. S.; Queiroz, P. P. S.; Kelecom, A.; *Tetrahedron*, (1983), **39**, 3351.
7. Pinto, A. C.; Scofield, T. C. V.; Braz Filho, R.; *Tetrahedron Lett.*, (1985), **24**, 5053.
8. Pinto, A. C.; Figueiredo, M. R.; Epifanio, R. A., *Phytochemistry*, (1992), **31**, 1681.
9. Pinto, A. C.; Garcez, W. S., Queiroz, P. P. S.; Fiori, N.; *Phytochemistry*, (1994), **33**, 1115.
10. Murakami, T.; Tanaka, N., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (1988), **54**, 72.
11. Patitucci, M. L., Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; *Phytochemical Analysis*, (1995), **6**, no prelo.
12. Silva, J. R. de A., Tese de Mestrado, (1995), Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas - INPA, Manaus - AM.
13. Balmain, A.; Connolly, J. J.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, (1973), 1247.
14. Pinto, A. C.; Simoni, M. L. P. S. C.; Cunha, M. P. S. C.; Coelho, R. B.; Patitucci, M. L.; *Quím. Nova*, (1994), **17**, 333.
15. Pinto, A. C.; Valente, L. M. M.; Pizzolatti, M. G.; *Phytochemistry*, (1991), **30**, 3136.