

CGAR E CGAR-EM NA ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO EXTRATO HEXANICO DE *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE)

Alexsandro Branco e Moacir G. Pizzolatti*

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis - SC

Recebido em 20/9/00; aceito em 6/7/01

HRGC AND HRGC-MS IN THE ANALYSIS OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS ISOLATED FROM HEXANIC EXTRACT OF *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). The fractionation column with SiO₂ of the hexane extract of *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae) yielded fractions containing hydrocarbons, carboxylic acids, sterols and pentacyclic triterpenes. Besides, one fraction showed the presence of several methyl esters, including four uncommon long chain palmitate esters as minor components. The characterization of these chemical constituents have been done by High Resolution Gas Chromatography (HRGC) and HRGC coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). Campesterol, stigmasterol, b-sitosterol, glutin-5-en-3-ol were identified by HRGC co-injection with standards.

Keywords: *Sebastiania argutidens*; triterpenes; HRGC-MS.

INTRODUÇÃO

A Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) e a CGAR acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR/EM) são ferramentas analíticas poderosas para identificar e/ou monitorar a presença de compostos naturais em extratos brutos^{1,4}. O trabalho de fracionamento de um extrato vegetal, freqüentemente exaustivo devido à presença de resinas e de pigmentos, pode ser abreviado pela obtenção do perfil cromatográfico do respectivo extrato ou fração. Assim, através do tempo de retenção dos compostos eluídos no sistema cromatográfico⁵, o qual é regido por parâmetros intrínsecos (polaridade, peso molecular, entre outros), pode-se avaliar o perfil dos metabólitos secundários do vegetal. Por outro lado, a obtenção dos espectros de massas dos picos presentes no respectivo cromatograma permite inferir sobre os metabólitos presentes, na espécie em estudo, e finalmente fazer a identificação dos mesmos. A escolha da melhor técnica a ser utilizada posteriormente para o isolamento dos compostos majoritários e a detecção dos compostos minoritários, que dificilmente serão identificados pelos métodos espectroscópicos tradicionais (IV, RMN etc), são algumas das vantagens oferecidas pela CGAR e CGAR-EM. Esta metodologia de análise pode ser aplicada no estudo da sazonalidade⁶ de algumas classes de metabólitos secundários, na caracterização de aromas^{7,8}, na rápida identificação de terpenóides⁹⁻¹⁰, entre outros. Entretanto, a CGAR e CGAR-EM, utilizadas rotineiramente nos laboratórios de produtos naturais, apresentam restrições quanto aos compostos com características ácidas e de pouca volatilidade (flavonóides, lignanas entre outros e compostos glicosilados), sendo necessária a obtenção dos respectivos derivados¹¹⁻¹². Assim, a técnica de injeção da amostra diretamente no sistema cromatográfico ("on column")¹³ foi aplicada em extratos polares de *Tephrosia*¹⁴ e de *Croton*¹⁵ com intuito de caracterizar rotenóides e alcalóides, respectivamente. Recentemente, esta técnica auxiliou na prospecção de flavonóides em *Vellozia graminifolia* resultando no isolamento e na identificação de 3,5,4'-trimetoxi-veloqueretina, um flavonol monoisoprenilado inédito na literatura¹⁶.

A família Euphorbiaceae possui aproximadamente 7500 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais, onde os maiores centros de dispersão ficam na América e na África¹⁷⁻¹⁸. Destaca-se o gênero *Croton* que engloba cerca de 2300 espécies e *Phyllanthus*, conhecido como "quebra-pedra" devido sua utilização em afecções renais¹⁹. Através do levantamento bibliográfico²⁰ sobre o gênero *Sebastiania* pôde-se constatar que algumas espécies são utilizadas popularmente contra diarreias (*S. chamaelea*) e eczemas (*S. macrocarpa*), como antibacteriana (*S. chamaelea*) e na eliminação de cálculos renais (*S. schottiana*)²¹⁻²². Por outro lado, estudos químicos revelaram a presença da acetofenona xantoxilina, dos esteróis estigmasterol e β-sitosterol e dos triterpenos glutin-5-en-3-ol, olean-12-en-3-ol e urs-12-en-3-ol em *S. schottiana*²³.

O presente trabalho tem como objetivo, além de contribuir para o estudo químico do gênero *Sebastiania*, mostrar a aplicação da CGAR e CGAR-EM na rápida identificação dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *S. argutidens* (Tajuvinha), uma árvore característica da floresta ombrófila densa da costa atlântica principalmente do sul do Brasil²⁴.

PARTE EXPERIMENTAL

Geral. CC: sílica gel (0,063 a 0,2 mm). CCD: sílica gel (Merck, Kieselgel 60) visualizados em revelador UV (254 e 360 nm), sulfato cérico seguido de aquecimento e exposição a vapores de I₂. Os padrões utilizados nas co-injeções foram isolados e purificados em nossos laboratórios a partir de outros vegetais, pureza aproximadamente 98% e suas estruturas confirmadas inequivocamente por métodos espectroscópicos.

CGAR e CGAR-EM. As análises de CGAR foram realizadas em cromatógrafo a gás marca Hewlett Packard modelo 5790 A (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) e equipado com coluna capilar de vidro (17 m x 0,25 μm) com filme de fase estacionária SE-54 (df = 0,25 μm). Condições analíticas: H₂ como gás carreador e com fluxo de 2 mL/min; temperatura do injetor a 270 °C e detector de ionização de chama (FID) a 300 °C. Modo de injeção: split 1/20. A programação de temperatura utilizada para as análises foi a seguinte: T_{inicial} 120 °C, 8 °C/min, T_{final} 290 °C por 20 min. As análises de CGAR-EM foram

*e-mail: moacir@qmc.ufsc.br

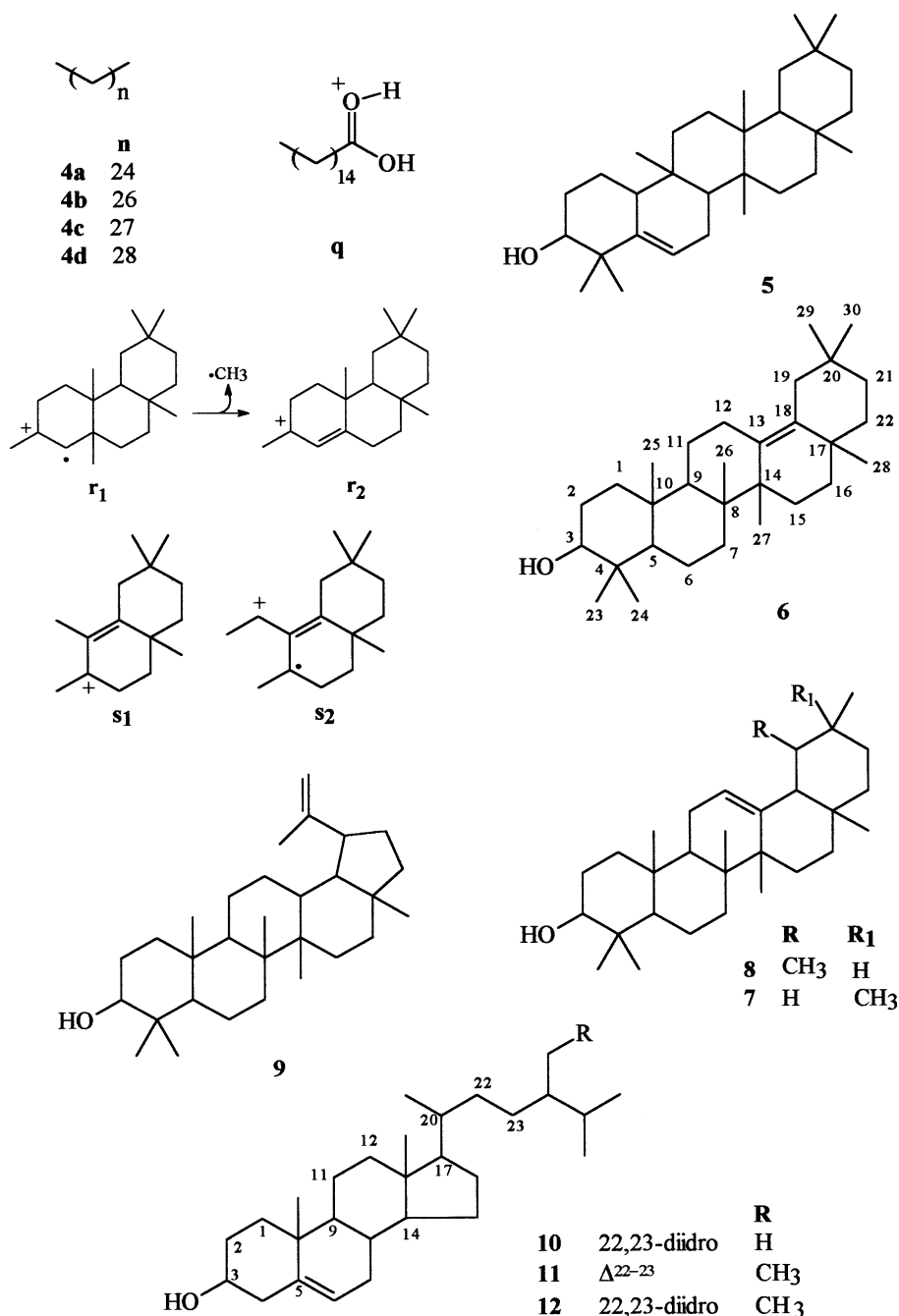
realizadas em espectrômetro marca HP 5987 A e impacto de elétrons como fonte de ionização (70 eV), interface à temperatura de 350 °C e a temperatura da fonte de ions a 300 °C. A programação da temperatura da coluna e o modo de injeção são as mesmas utilizadas em CGAR.

Planta. As partes aéreas de *Sebastiania argutidens* Pox & K. Hoffman foram coletadas na Lagoa do Peri, localizada em Florianópolis (Santa Catarina), Brasil e identificada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina onde se encontra depositada uma exsicata sob o número: Herbário flor 8630.

Extração e purificação. As partes aéreas de *S. argutidens* foram moídas e extraídas com *n*-hexano à temperatura ambiente e após remoção do solvente, sob pressão reduzida, obteve-se 13,7 g de extrato bruto. Este extrato foi misturado a sílica gel para a confecção de uma pastilha (44 g) e cromatografado em coluna recheada com sílica gel (154 g). A eluição foi realizada com misturas de solventes na ordem crescente de polaridade: hexano/AcOEt e AcOEt/MeOH,

perfazendo um total de 39 frações de aproximadamente 80 mL cada. Estas frações foram reunidas com base em análises por CCD. As frações 10-11 (35 mg), eluídas com hexano/EtOAc (4:1), foram reunidas e obteve-se hidrocarbonetos, ácidos e ésteres (fração A). A fração 15 (29 mg), eluída com hexano/EtOAc (2:1) apresentou composição majoritária de hidrocarbonetos e glutin-5-en-3-ol (fração B). As frações 20 a 22 (80 mg) eluídas com hexano/EtOAc (1:1) forneceram, após sucessivas cristalizações em acetona, os triterpenos **6-9** (2 mg) como constituintes da fração C. As frações 24-26 (120 mg) eluídas com EtOAc/MeOH (4:1) conduziram ao isolamento dos esteróis **10-12** (10 mg).

Olean-13(18)-en-3-ol (6). Pf. 112-118°C. IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3450-3250 (OH), 2950-2750 (CH₃, CH₂, CH) e 1480 (C=C). EM (CGAR-EM) 70 eV *m/z* (int. rel.): tabela 1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ_{H} 0.69 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.85 (s, 6H), 0.93 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.00 (s, H), 1.15 (s, 3H), 3.23 (dd, J = 11.8 e 5.22 Hz, 1H-3).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato hexânico das partes aéreas de *Sebastiania argutidens* forneceu quatro frações que foram submetidas a análise por CGAR-EM. Os Cromatogramas de Ions Totais (CIT) obtidos nesta análise encontram-se na Figura 1. A caracterização dos componentes químicos foi realizada pela análise dos espectros de massas dos picos encontrados em seus respectivos CIT (Tabela 1).

Componentes acíclicos

Os ésteres metílicos, os ácidos alifáticos (**fração A**) e os hidrocarbonetos (**fração B**) foram detectados através de comparação do padrão de fragmentação com dados descritos na literatura²⁵.

A Figura 2 mostra a série homóloga de ésteres metílicos obtida através da manipulação computacional, isto é, seleção dos picos que apresentam os íons m/z 74 ($[\text{CH}_2=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$), 87 ($[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$) e 143 ($[(\text{CH}_2)_6\text{COOCH}_3]^+$) no CIT A. Este CIT gerou quinze picos com tempos de retenção em intervalos constantes, concentrações distintas e espectros de massas cujos íons moleculares diferem entre si em 14 unidades de massas. Por outro lado, a presença dos ésteres de cadeia longa derivados do ácido palmítico foi caracterizada pelo fragmento iônico **q** (m/z 257, 100 %), presente em seus respectivos espectros de massas. Este fragmento pode ser formado pela eliminação da cadeia alquílica com transferência de dois átomos de hidrogênio para os átomos de oxigênio do éster palmítico²⁵.

Tabela 1. Espectro de massas dos compostos eluidos no CIT obtidos das frações isoladas de *S. argutidens* (intensidade relativa: entre parênteses).

Pico*	Tempo de Retenção**	Fórmula Molecular	[M] ⁺	Principais fragmentos		Estrutura
Ácidos alifáticos						
1a	12.6	C ₁₄ O ₂ H ₃₂	228(11)	-	185(18)	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CO ₂ H
1b	15.2	C ₁₆ O ₂ H ₃₆	256(29)	-	213(27)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ H
1c	17.5	C ₁₉ O ₂ H ₄₂	284(31)	-	241(21)	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ CO ₂ H
1d	19.6	C ₂₁ O ₂ H ₄₆	312(42)	-	269(12)	CH ₃ (CH ₂) ₁₉ CO ₂ H
Ésteres metílicos						
2a	14.8	C ₁₇ O ₂ H ₃₄	270(14)	239(8)	227(16)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ CH ₃
2b	15.9	C ₁₈ O ₂ H ₃₄	284(10)	253(1)	241(11)	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CO ₂ CH ₃
2c	17.2	C ₁₉ O ₂ H ₃₄	298(19)	267(8)	255(18)	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO ₂ CH ₃
2d	18.2	C ₂₀ O ₂ H ₃₄	312(7)	281(1)	269(6)	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ CO ₂ CH ₃
2e	19.3	C ₂₁ O ₂ H ₃₄	326(18)	295(3)	283(15)	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ CO ₂ CH ₃
2f	20.2	C ₂₂ O ₂ H ₃₄	340(11)	309(2)	297(8)	CH ₃ (CH ₂) ₁₉ CO ₂ CH ₃
2g	21.3	C ₂₃ O ₂ H ₃₄	354(21)	323(2)	311(13)	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ CO ₂ CH ₃
2h	22.2	C ₂₄ O ₂ H ₃₄	368(23)	337(4)	325(7)	CH ₃ (CH ₂) ₂₁ CO ₂ CH ₃
2i	23.1	C ₂₅ O ₂ H ₃₄	382(49)	351(1)	339(21)	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ CO ₂ CH ₃
2j	24.0	C ₂₆ O ₂ H ₃₄	396(29)	365(1)	353(11)	CH ₃ (CH ₂) ₂₃ CO ₂ CH ₃
2l	25.0	C ₂₇ O ₂ H ₃₄	410(21)	379(1)	367(12)	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ CO ₂ CH ₃
2m	26.1	C ₂₈ O ₂ H ₃₄	424(12)	-	381(5)	CH ₃ (CH ₂) ₂₅ CO ₂ CH ₃
2n	27.5	C ₂₉ O ₂ H ₃₄	438(17)	407(2)	395(7)	CH ₃ (CH ₂) ₂₆ CO ₂ CH ₃
2o	29.1	C ₃₀ O ₂ H ₃₄	452(32)	-	409(2)	CH ₃ (CH ₂) ₂₇ CO ₂ CH ₃
2p	31.0	C ₃₁ O ₂ H ₃₄	466(33)	435(2)	423(6)	CH ₃ (CH ₂) ₂₈ CO ₂ CH ₃
Ésteres de cadeia longa do ácido palmítico						
3a	19.8	C ₂₁ O ₂ H ₄₂	340(8)	257(100, q)	239(19)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃
3b	28.0	C ₃₀ O ₂ H ₆₀	452(7)	257(100, q)	229(28)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ (CH ₂) ₁₂ CH ₃
3c	31.7	C ₃₂ O ₂ H ₆₄	480(5)	257(100, q)	224(15)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ (CH ₂) ₁₅ CH ₃
3d	37.2	C ₃₄ O ₂ H ₆₈	508(7)	257(100, q)	239(8)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ (CH ₂) ₁₇ CH ₃
Fração B						
5	27.56	C ₃₀ H ₅₀ O	426(4)	Principais fragmentos 411(3), 274(91, r ₁), 259(100, r ₂), 205(30), 134(52), 95(60)		
Fração C						
6	36.8	C ₃₀ H ₅₀ O	426(32)	411(10), 393(2), 218(76, s ₂), 205(100, s ₁), 189(71), 109(100)		
7	36.9	C ₃₀ H ₅₀ O	426(2)	411(1), 257(1), 218(100), 203(42), 135(10), 69(12)		
8	37.6	C ₃₀ H ₅₀ O	426(13)	411(6), 393(4), 315(5), 257(6), 218(100), 189(38)		
9	39.6	C ₃₀ H ₅₀ O	426(18)	357(12), 315(10), 207(78), 189(100), 134(63), 95(82)		
Fração D						
10	19.0	C ₂₈ H ₄₈ O	400(94)	382(40), 367(38), 315(59), 273(36), 213(52), 43(100)		
11	19.5	C ₂₉ H ₄₈ O	412(80)	397(6), 351(22), 300(32), 271(69), 256(74), 55(100)		
12	20.4	C ₂₉ H ₅₀ O	414(100)	396(41), 329(59), 303(60), 255(43), 213(58), 107(63)		

* Os Cromatogramas de Íons Totais (CIT) estão apresentados na Figura 1

** Tempo de retenção em minutos

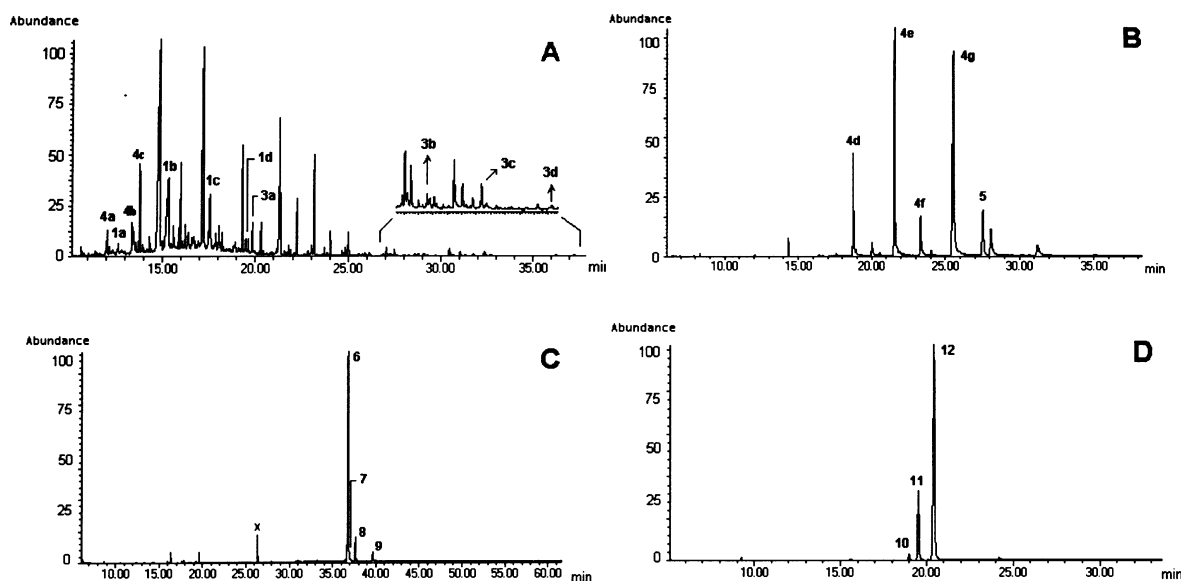


Figura 1. Cromatograma de Ions Totais (CIT) obtidos a partir de frações do extrato hexânico de *S. argutidens*: CIT A e B: contém como composição majoritária ésteres e hidrocarbonetos, respectivamente; CIT C: triterpenos pentacíclicos e CIT D: esteróides.

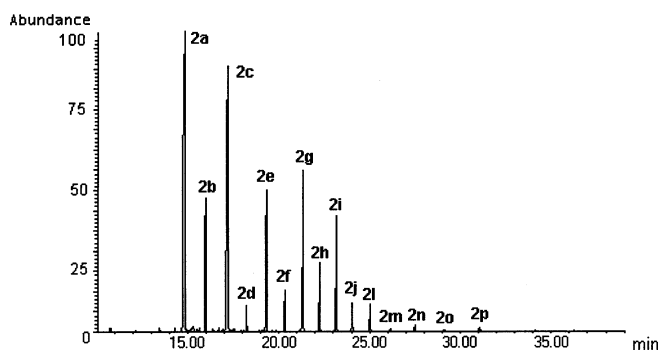


Figura 2. Série homologa de ésteres metílicos obtido através da extração de íons do CIT A. Fragmentos selecionados: m/z 74, m/z 87 e m/z 143.

Componentes cíclicos

O composto eluído em 27,5 minutos na **fração B** apresentou, em seu espectro de massas, íon molecular em m/z 426 (4 %) característico de triterpeno e picos em m/z 274 (91 %) e 259 (100 %) que foram atribuídos aos fragmentos r_1 e r_2 , respectivamente. A identificação deste composto minoritário como sendo glutin-5-en-3-ol (**5**) se deu por co-injeção com padrão. Este triterpeno foi isolado anteriormente de *S. schottiana*²³.

A análise por CGAR da **fração C** revelou um pico majoritário com aproximadamente 96% da área total do cromatograma. Os espectros de massas (tabela 1) mostram tratar-se de uma mistura de triterpenos pentacíclicos da classe dos oleananos²⁶⁻²⁷. O constituinte majoritário apresenta espectro de massas típico de esqueleto com insaturação no anel D²⁸ devido à presença dos picos intensos em m/z 205 e 218. Estes picos foram atribuídos aos fragmentos s_1 e s_2 , formados pela quebra da ligação 8-14 seguido de um rearranjo de hidrogênio e pela quebra das ligações 8-14 e 9-11, respectivamente. Estas análises, juntamente com a ausência de hidrogênio olefínico em seu espectro de RMN ¹H, colaboraram para a dedução de olean-13(18)-en-3-ol para **6**²⁹. Os demais triterpenos da fração C (minoritários) foram caracterizados como olen-12-en-ol (**7**), urs-12-en-3-ol (**8**) e lup-20(29)-en-3-ol (**9**) através do padrão de fragmentação apresentado em seus espectros de massas²⁶.

A análise por CCD da **fração D** apresentou coloração rósea quando revelada por sulfato cérico (teste positivo para esteróis). A identificação dos componentes desta fração (**10-12**) foi realizada pela comparação do padrão de fragmentação com dados descritos na literatura³⁰ e posterior co-injeção com padrões.

AGRADECIMENTOS

As análises de CGAR, bem como as identificações realizadas por co-injeções com padrões certificados, fizeram parte da monografia de iniciação científica apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina pelo primeiro autor com bolsa de iniciação científica cedida pelo Departamento de Apoio a Pesquisa (DAP-UFSC). Agradecimentos ao Prof. Ângelo C. Pinto, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas sugestões e análises de CGAR-EM.

REFERÊNCIAS

- Patitucci, M. L.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 38.
- Lavorenti, A.; Hudson, H. R.; Pianka, M. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 130.
- Veiga Jr., V. F.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 612.
- Schmidt, T. J.; Merfort, I.; Matthiesen, U.; *J. Chromatogr.* **1993**, *634*, 350.
- Pinto, A. C.; Simoni, M. L. P. S. C.; Cunha, M. P. S. C.; Coelho, R. B.; Patitucci, M. L.; Lago, R. C. A.; *Quim. Nova* **1994**, *17*, 333.
- Griffiths, D. W.; Robertson, G. W.; Shepherd, T.; Ramsay, G.; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 607.
- Lopes, D. L.; Fraga, S. R.; Rezende, C. M.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 31.
- Brochini, C. B.; Nunez, C. V.; Moreira, I. C.; Roque, N. F.; Chaves, M. H.; Martins, D.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 37.
- Woerdenbag, H. J.; Pras, N.; Bos, R.; Visser, J. F.; Hendriks, H.; Malingré, T. M.; *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 215.
- Mendes, C. C.; Cruz, F. G.; David, J. M.; Nascimento, I. P.; David, J. P.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 185.
- Nilsson, R.; Liljenberg, C.; *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 259.
- Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastré, R.; *J. Chromatogr.* **1980**, *187*, 255.
- Grob Jr, K.; *J. Chromatogr.* **1984**, *283*, 21.
- Pereira, A. S.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. S.; Andrei, C. C.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 513.
- Pereira, A. S.; Amaral, A. C. F.; Barnes, R. A.; Cardoso, J. N.; Aquino-Neto, F. R.; *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 254.

16. Branco, A.; Pereira, A. P.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; Pinto, A. C.; Braz Filho, R.; *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 266.
17. Pereira, A. S.; Amaral, A. C. F.; Barnes, R. A.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 254.
18. Corrêa, M. P. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
19. Tempesta, M. S.; Corley, D. G.; Beutler, J. A.; Metral, C. J., Yunes, R. A.; Giacomozzi, C. A.; Calixto, J. B.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 617.
20. <http://webofscience.fapesp.br>
21. Samy, R. P.; Ignacimuthu, S.; Sen, A.; *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *62*, 173.
22. Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Neto, A. S. O.; Valle, R. M. R.; Rae, G. A.; *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **1984**, *17*, 313.
23. Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Miguel, O. G.; Monache, F. D.; *Planta Med.* **1990**, *56*, 242.
24. Smith, L. B.; Downs, R. J.; Klein, R. M.; *Flora Ilustrada Catarinense* 1988, Euforbiáceae, HBR, Itajaí-SC, 305.
25. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan, 5ª edição, 1994.
26. Shiojima, K.; Arai, Y.; Masuda, K.; Takase, Y.; Ageta, T. and Ageta, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1683.
27. Ogunkoya, L. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 121.
28. Budzikewich, H.; Wilson, J. M.; Djerassi, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3688.
29. Tanaka, R.; Matsunaga, S.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3579.
30. Bezerra, M. Z. B.; Campelo, P. A.; Machado, M. I. L.; Matos, F. J. A.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **1994**, *17*, 205.