

Catharanthus roseus

Fátima Isabel Antunes Nunes

Caraterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial,
orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Batista e pelo
Professor Doutor Jorge Salvador e apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

janeiro, 2013



Caraterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial,
orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Batista e pelo
Professor Doutor Jorge Salvador e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fátima Isabel Antunes Nunes

janeiro, 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*À minha Mãe,
que foi, é e será sempre a minha estrela guia.*

*Ao meu pai, à minha irmã (minha segunda mãe!) e ao meu sobrinho.
Vocês são a minha força e alegria!*

*Ao João,
meu companheiro de jornada.*

Agradecimentos

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem o apoio de várias instituições e a orientação, compreensão, acompanhamento e incentivo de diversas pessoas, a quem quero expressar o meu sincero reconhecimento.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra (LEM-CEF/UC), nas pessoas da Prof. Doutora Maria Luísa Sá e Melo e Prof. Doutora Maria Teresa Batista, pela oportunidade que me foi dada em trabalhar com o equipamento de massa LCQ Advantage MAX (Thermo Finnigan).

Ao Instituto Pedro Nunes-Labpharm (IPN-labpharm), realçando o Prof. Doutor Jorge Salvador, orientador deste trabalho, pela oportunidade em realizar a minha atividade experimental com a utilização do espectrómetro de massa Polaris Q (Thermo Finnigan).

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo suporte financeiro do nó CEF/UC, integrado na Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEM).

À Prof. Doutora Maria Teresa Batista, orientadora deste trabalho, de forma muito especial, pela disponibilidade, incentivo e revisão cuidada e crítica da presente dissertação. Sem a sua preciosa ajuda, muito deste trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Doutor Jorge Salvador e à Licenciada Ana Sofia Leal pelo trabalho de semi-síntese dos novos derivados e pela possibilidade que me deram de os utilizar para o estudo da elucidação estrutural.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo e camaradagem.

À D. Graça Santiago pelo constante incentivo e amizade.

Trabalho desenvolvido com o suporte financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do nó CEF/UC, integrado na Rede Nacional de Espetrometria de Massa (RNEM).



Resumo

Os triterpenos pentacíclicos pertencem ao grupo dos terpenos e, devido às suas diversas atividades farmacológicas, relacionadas com os seus efeitos hepatoprotetores, anti-oxidante, anti-inflamatório e antitumoral, têm sido alvo de um grande interesse científico.

Contudo, os resultados apresentados na avaliação biológica de alguns dos triterpenos pentacíclicos isolados a partir de produtos naturais, como é o caso do ácido oleanólico e ursólico, têm demonstrado algumas limitações do seu potencial terapêutico. Sendo assim, paralelamente a esta linha de investigação tem existido um crescente interesse, como se pode verificar no volume dos trabalhos recentes, na semi-síntese de derivados, particularmente do ácido oleanólico e ursólico, que tenham um incremento significativo no seu potencial biológico.

Desta forma, a elucidação estrutural deste tipo de compostos, principalmente pela utilização da espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear devido à valiosa e fácil informação que fornecem sobre a estrutura, tem tido um importante papel na atualidade científica.

Neste trabalho pretende-se fazer uma análise estrutural, pela caracterização através da espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, de dezasseis novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico.

Palavras Chave:

Espectrometria de massa; Ressonância magnética nuclear; Triterpenóides pentacíclicos; Ácido Oleanólico; Ácido Ursólico; Derivados semi-sintéticos.

Abstract

Pentacyclic triterpenes belong to the group of terpenes and have been the subject of a large scientific interest because their various pharmacological activities such as: hepatoprotective, anti-oxidant, anti-inflammatory and antitumor.

However, the results presented in biological evaluation of some pentacyclic triterpenes isolated from natural products, such as oleanolic and ursolic acids, have shown some limitations of their therapeutic potential. Therefore, in parallel to this line of research has been a growing interest in the semisynthetic derivatives.

The structural elucidation of such compounds has played an important role, especially the use of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance because their valuable and easy information.

In this work we intend to make a structural analysis using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy of sixteen new semisynthetic derivatives of oleanolic and ursolic acids.

Keywords:

Mass spectrometry; nuclear magnetic resonance; pentacyclic triterpenoids, oleanolic acid, ursolic acid; semisynthetic derivatives.

Abreviaturas

AC	Corrente alternativa
ADP	Difosfato de adenosina
AO	Ácido oleanólico
arb	Unidade arbitrária
ATP	Trifosfato de adenosine
AU	Ácido ursólico
d	Dubleto
Da	Dalton
DC	Corrente direta
dd	Duplo dubleto
<i>DEPT</i>	“ <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> ”
<i>DEPT-135</i>	“ <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> ” com uma largura de impulso de 135°
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila
<i>DI</i>	Infusão direta
<i>DI-ESI-MS</i>	Introdução da amostra, por infusão direta, num espectrómetro de massa com ionização por <i>electrospray</i>
<i>DIP</i>	Introdução direta da amostra com uma <i>Probe</i>
<i>DIP-EI-MS</i>	Introdução direta da amostra, com uma <i>Probe</i> , num espectrómetro de massa com ionização por impacto eletrónico
<i>EI</i>	Ionização por impacto eletrónico

<i>ESI</i>	Ionização por <i>electrospray</i>
FPP	Pirofosfato de farnesilo
FrDA	Fragmentação <i>retro</i> Diels-Alder
<i>GC</i>	Cromatografia gasosa
<i>GC/MS</i>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
<i>GC-MS</i>	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrómetro de massa
GGPP	Pirofosfato de geranylgeranilo
GPP	Pirofosfato de geranilo
IPP	Pirofosfato de isopentenila
<i>IT</i>	<i>Ion trap</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kV	Kilovolt
MEP	2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato
min	Minute
<i>MS</i>	Espectrometria de massa
<i>MSn</i>	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
<i>MS-EI</i>	Espectrometria de massa com ionização por impacto eletrônico
<i>MS-ESI</i>	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i>
<i>MSn-ESI</i>	Espectrometria de massa <i>tandem</i> com ionização por <i>electrospray</i>
MVA	Mevalonato ou ácido mevalónico
<i>m/z</i>	razão massa/carga
NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenine reduzida
NADP ⁺	Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenine na forma oxidada
Q	Quadrupolo

<i>QIT</i>	Quadrupolo <i>Ion Trap</i>
Pg	Picograma
<i>rDA</i>	<i>retro</i> Diels-Alder
Rf	rádio frequência
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
s	Singleto
t	Tripleto
u.m.a.	unidades de massa atômica
V	Volt
δ	Desvio químico

Índice de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1:** Via Mevalonato para a biossíntese de pirofosfato de isopentenilo e pirofosfato de dimetilalilo . 4
- Figura 1.2:** Biossíntese de pirofosfato de isopentenilo e pirofosfato de dimetilalilo via 2-C-D-eritriol-4-fosfato 5
- Figura 1.3:** Biossíntese dos terpenos via MVA e MEP. 6
- Figura 1.4:** Estrutura molecular do esqualeno. 7
- Figura 1.5:** Biossíntese de triterpenos através de ciclização oxidativa e não-oxidativa. 8
- Figura 1.6:** Estruturas moleculares do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos). 9
- Figura 1.7:** Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos. 10
- Figura 1.8:** Estrutura química do ácido oleanólico 10
- Figura 1.9:** Estrutura química do ácido ursólico. 12

Capítulo 2

- Figura 2.1:** Principais locais que conferem bioatividade aos derivados triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano e ursano. 23
- Figura 2.2:** Três novos derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico. 24
- Figura 2.3:** Novos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico. 25
- Figura 2.4:** Elementos básicos de um espectrômetro de massa. 26
- Figura 2.5:** Introdução de amostras, de grau de pureza elevado, com a *Probe (DIP)*. 27
- Figura 2.6:** Sistema de entrada de amostra por infusão direta. 28
- Figura 2.7:** Esquematização do processo da ionização por *electrospray (ESI)*, em modo ião positivo. 29

Figura 2.8: Representação esquemática de um quadrupolo.	30
Figura 2.9: Representação de um <i>Ion trap</i> .	31
Figura 2.10: Analisador de massas Quadrupolo <i>Ion trap</i> .	31
Figura 2.11: Diagrama da Espectrometria de Massa <i>Tandem</i>	32
Figura 2.12: Fragmentação <i>retro</i> Diels-Alder do anel C para triterpenóides pentacíclicos do tipo 12-oleanenos e 12-ursenos.	33
Figura 2.13: Fragmentação <i>rDA</i> do anel C para 11-oxo-12-ursenos.	34
Figura 2.14: Fragmentação <i>rDA</i> do anel C para 12-oxo-oleananos.	34
Figura 2.15: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> , <i>MS3</i>), do composto 1, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	35
Figura 2.16: Proposta de fragmentação do ácido oleanólico por ionização à pressão atmosférica, por <i>electrospray</i> (<i>ESI</i>), em modo ião positivo.	37
Figura 2.17: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 2, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	38
Figura 2.18: Padrão de fragmentação do composto 2.	39
Figura 2.19: Espectro de massa do composto 2, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	40
Figura 2.20: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 3, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	41
Figura 2.21: Padrão de fragmentação do composto 3.	42
Figura 2.22: Espectro de massa do composto 3, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	42
Figura 2.23: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>), do composto 4, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	43
Figura 2.24: Padrão de fragmentação do composto 4.	44
Figura 2.25: Espectro de massa do composto 4, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	45
Figura 2.26: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do ácido ursólico obtido por <i>ESI</i> , em modo ião positivo.	47

Figura 2.27: Proposta de fragmentação do ácido ursólico por ionização à pressão atmosférica, por <i>electrospray (ESI)</i> , em modo ião positivo.	48
Figura 2.28: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> , do composto 6, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	49
Figura 2.29: Padrão de fragmentação do composto 6.	50
Figura 2.30: Espectro de massa do composto 6, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	51
Figura 2.31: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> do composto 7, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	52
Figura 2.32: Padrão de fragmentação do composto 7.	53
Figura 2.33: Espectro de massa do composto 7, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	54
Figura 2.34: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> do composto 8, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	55
Figura 2.35: Padrão de fragmentação do composto 8.	56
Figura 2.36: Espectro de massa do composto 8, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	56
Figura 2.37: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> do composto 9 obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	57
Figura 2.38: Padrão de fragmentação do composto 9.	58
Figura 2.39: Espectro de massa do composto 9, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	58
Figura 2.40: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> do composto 10, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	59
Figura 2.41: Padrão de fragmentação do composto 10.	60
Figura 2.42: Espectro de massa do composto 10, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	61
Figura 2.43: Espectro de massa <i>tandem (MS, MS2 e MS3)</i> do composto 11, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	62
Figura 2.44: Padrão de fragmentação do composto 11.	63

Figura 2.45: Espetro de massa do composto 11, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	63
Figura 2.46: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 12, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	64
Figura 2.47: Padrão de fragmentação do composto 12.	65
Figura 2.48: Espetro de massa do composto 12, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	65
Figura 2.49: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 13, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	66
Figura 2.50: Padrão de fragmentação do composto 13.	67
Figura 2.51: Espetro de massa do composto 13, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	68
Figura 2.52: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 14, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	69
Figura 2.53: Padrão de fragmentação do composto 14.	70
Figura 2.54: Espetro de massa do composto 14, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	71
Figura 2.55: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 15, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	72
Figura 2.56: Padrão de fragmentação do composto 15.	73
Figura 2.57: Espetro de massa do composto 15, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	74
Figura 2.58: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 16, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	75
Figura 2.59: Padrão de fragmentação do composto 16.	76
Figura 2.60: Espetro de massa do composto 16, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	76
Figura 2.61: Espetro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 17, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	77
Figura 2.62: Padrão de fragmentação do composto 17.	78

Figura 2.63: Espectro de massa do composto 17, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	79
Figura 2.64: Espectro de massa <i>tandem</i> (<i>MS</i> , <i>MS2</i> e <i>MS3</i>) do composto 18, obtido por <i>ESI</i> em modo ião positivo.	80
Figura 2.65: Padrão de fragmentação do composto 18.	80
Figura 2.66: Espectro de massa do composto 18, obtido por <i>EI</i> , em modo ião positivo.	81
Figura 2.67: Espectrômetro de ressonância magnética nuclear.	87
Figura 2.68: Espectros de RMN- ¹ H do composto 2.	89
Figura 2.69: Espectros de RMN- ¹ H do composto 3.	89
Figura 2.70: Espectros de RMN- ¹ H do composto 4.	90
Figura 2.71: Espectros de RMN- ¹ H do composto 6.	91
Figura 2.72: Espectros de RMN- ¹³ C do composto 6.	92
Figura 2.73: Ampliação da zona δ 56ppm–13ppm do espectros de RMN- ¹³ C do composto 6.	93
Figura 2.74: Espectro de DEPT-135 do composto 6.	93
Figura 2.75: Espectros de RMN- ¹ H do composto 7.	94
Figura 2.76: Espectros de RMN- ¹³ C do composto 7.	95
Figura 2.77: Ampliação da zona δ 62ppm–15ppm do espectros de RMN- ¹³ C do composto 7.	96
Figura 2.78: Espectro de DEPT-135 do composto 7.	96
Figura 2.79: Espectros de RMN- ¹ H do composto 8.	97
Figura 2.80: Espectros de RMN- ¹³ C do composto 8.	98
Figura 2.81: Ampliação da zona δ 57ppm–14ppm do espectros de RMN- ¹³ C do composto 8.	98
Figura 2.82: Espectro de DEPT-135 do composto 8.	99
Figura 2.83: Espectros de RMN- ¹ H do composto 9.	100

Figura 2.84: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 9.	101
Figura 2.85: Ampliação da zona δ 58ppm–14ppm do espetros de RMN- ¹³ C do composto 9.	101
Figura 2.86: Espetro de DEPT-135 do composto 9.	102
Figura 2.87: Espetros de RMN- ¹ H do composto 10.	103
Figura 2.88: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 10.	103
Figura 2.89: Ampliação da zona δ 61ppm–14ppm do espetros de RMN- ¹³ C do composto 10.	104
Figura 2.90: Espetro de DEPT-135 do composto 10.	104
Figura 2.91: Espetros de RMN- ¹ H do composto 11.	105
Figura 2.92: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 11.	106
Figura 2.93: Ampliação da zona δ 62ppm–14ppm do espetros de RMN- ¹³ C do composto 11.	107
Figura 2.94: Espetro de DEPT-135 do composto 11.	107
Figura 2.95: Espetros de RMN- ¹ H do composto 12.	108
Figura 2.96: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 12.	109
Figura 2.97: Ampliação da zona δ 62ppm–14ppm do espetros de RMN- ¹³ C do composto 12.	109
Figura 2.98: Espetro de DEPT-135 do composto 12.	110
Figura 2.99: Espetros de RMN- ¹ H do composto 13.	111
Figura 2.100: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 13.	112
Figura 2.101: Ampliação da zona δ 55ppm–13ppm do espectro de RMN- ¹³ C do composto 13.	112
Figura 2.102: Espetro de DEPT-135 do composto 13.	113
Figura 2.103: Espetros de RMN- ¹ H dos compostos 14.	114
Figura 2.104: Espetros de RMN- ¹³ C do composto 14.	115

Figura 2.105: Ampliação da zona δ 60ppm–15ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 14.	115
Figura 2.106: Espectro de DEPT-135 do composto 14.	116
Figura 2.107: Espectros de RMN- ^1H do composto 15.	117
Figura 2.108: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 15.	118
Figura 2.109: Ampliação da zona δ 60ppm–12ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 15.	118
Figura 2.110: Espectro de DEPT-135 do composto 15.	119
Figura 2.111: Espectros de RMN- ^1H do composto 16.	120
Figura 2.112: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 16.	121
Figura 2.113: Ampliação da zona δ 60ppm–14ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 16.	121
Figura 2.114: Espectro de DEPT-135 do composto 16.	122
Figura 2.115: Espectros de RMN- ^1H do composto 17.	123
Figura 2.116: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 17.	124
Figura 2.117: Ampliação da zona δ 54ppm–13ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 17.	124
Figura 2.118: Espectro de DEPT-135 do composto 17.	125
Figura 2.119: Espectros de RMN- ^1H do composto 18.	126
Figura 2.120: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 18.	127
Figura 2.121: Ampliação da zona δ 55ppm–14ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 18.	127
Figura 2.122: Espectro de DEPT-135 do composto 18.	128

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 2.1: Características do espectro de massa (<i>ESI</i> e <i>EI</i>) dos derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico.	46
Tabela 2.2: Características do espectro de massa (<i>ESI</i> e <i>EI</i>) dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico.	82
Tabela 2.3: Sinais RMN- ¹ H característicos dos compostos 2 , 3 e 4 .	91
Tabela 2.4: Sinais de RMN- ¹³ C característicos dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (6-18).	129

Índice

Resumo	i
Palavras Chave	i
Abstract	iii
Keywords	iii
Abreviaturas	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xvii
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Terpenos e terpenóides	3
1.2. Triterpenóides pentacíclicos – Estrutura e bioatividade	7
1.2.1. Triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano	10
1.2.2. Triterpenóides pentacíclicos do tipo ursano	11
Referências	12
1.3. Objetivos gerais do trabalho	19
Capítulo 2: Análise estrutural de novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico	21
2.1. A importância da elucidação estrutural na semi-síntese de novos triterpenóides pentacíclicos	23
2.2. Espectrometria de massa de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico	26
2.2.1. Espectrometria de massa – princípios e instrumentação	26
2.2.1.1. Espectrometria de massa <i>tandem</i>	32
2.2.2. Análise estrutural de derivados semi-sintéticos dos ácido oleanólico e ursólico	33
2.2.2.1. Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico	34
2.2.2.2. Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico	47

2.3. Ressonância magnética nuclear de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico	86
2.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – fundamentos	86
2.3.1.1. RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C	87
2.3.2. Análise estrutural de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico	88
2.3.2.1. Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico	88
2.3.2.2. Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico	91
2.4. Conclusões	130
Referências	131
Capítulo 3: Parte Experimental	139
3.1. Equipamentos utilizados	141
3.1.1. Espectrometria de massa	141
3.1.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	141
3.2. Condições usadas na preparação das amostras e aquisição dos espectros	141
3.2.1. Espectros de massa	141
3.2.2. Espectros de ressonância magnética nuclear	142
3.3. Solventes utilizados	142
Referência	143
Anexo: Caracterização estrutural dos compostos referidos no Capítulo 2	145

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. Terpenos e terpenóides

Os terpenos, estruturalmente constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), são uma família de compostos orgânicos, de estrutura muito diversa, tendo sido já identificados cerca de 30000 compostos.¹

Biossintetizados por seres procarióticos e eucarióticos, possuem uma ocorrência generalizada na Natureza, sendo que a maioria dos terpenos bioativos têm sido encontrados em plantas superiores.²⁻⁴ A sua aplicabilidade, a nível comercial, distribui-se por áreas diversas como corantes, perfumes, colas, ceras, polímeros, agroquímicos e fármacos.⁵

O início do seu estudo teve como ponto de partida a análise do óleo de terebintina, daí a designação de terpenos dada a estes compostos, em 1818, por Jacques Julien Houtou de La Billardièrre, tendo verificado que os compostos isolados, deste óleo, possuíam uma razão de cinco átomos de carbono para oito de hidrogénio. Cerca de vinte e seis anos depois, em 1833, Jean-Baptiste Dumas determinou a fórmula molecular da cânfora, $C_{10}H_{16}O$.^{6,7}

Otto Wallach, laureado em 1910 com o Prémio Nobel da Química pelos seus trabalhos com compostos acíclicos, nomeadamente terpenos, observou que a maioria dos constituintes dos óleos essenciais tinham $5n$ átomos de carbono, cujo valor de n era, maioritariamente, 2 e 3, mas que também podia ser 4, 5, 6 e 8.^{8,9} estabelecendo a regra que, posteriormente, ficou conhecida como “regra do isopreno”, que foi enunciada, em 1953, por Leopold Ruzicka (prémio Nobel da Química em 1939), no seu trabalho “Biogenetic Isoprene Rule”.^{8,10} Assim, a classificação dos terpenos passou a ser feita, de acordo com o seu número de carbonos, em hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos ou carotenóides (C_{40}) e politerpenos(C_{5n}).¹¹

Apesar da unidade básica dos terpenos ser o isopreno (C_5H_8), estudos de biossíntese demonstraram que este não é o precursor destes compostos, mas sim o ácido mevalónico (MVA, do inglês, mevalonic acid) ou mevalonato, originado através da união de unidades de acetil-CoA – via Mevalonato¹²⁻¹⁴ (Figura 1.1).

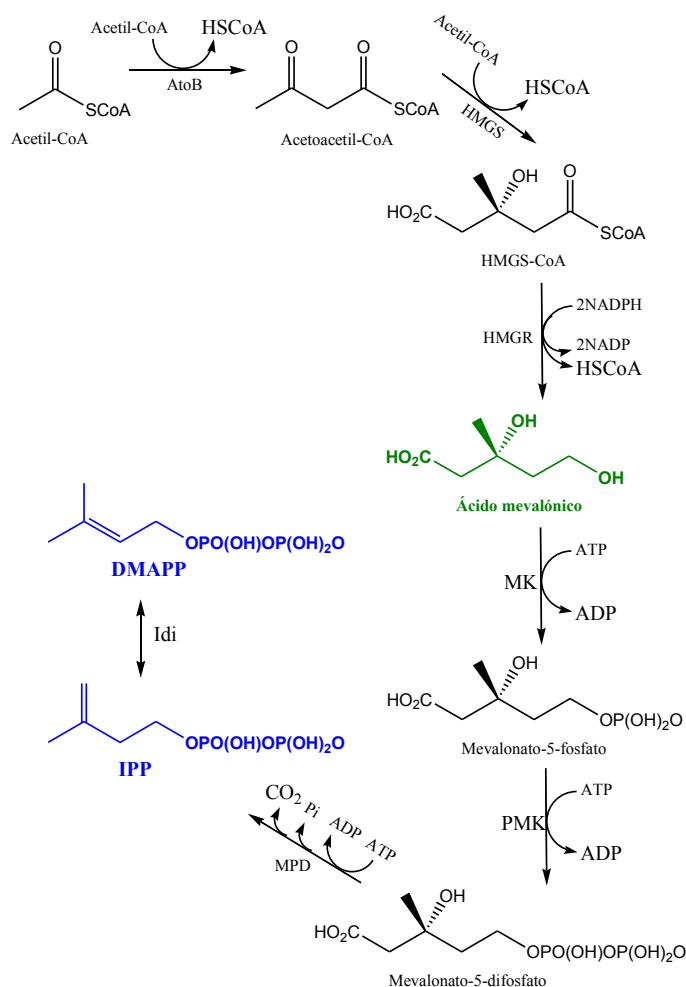


Figura 1.1: Via Mevalonato (MVA) para a biossíntese de pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) (esquema adaptado de Goto *et al.*, 2010). AToB: acetil-CoA-C-acetiltransferase; HMGS:hidroximetilglutaril-CoAsintase; HMGR:hidroximetilglutaril-CoAredutase; MK:mevalonatocinase; PMK: fosfomevalonatocinase; MPD: mevalonatopirofosfatodescarboxilase; Idi: isopentenilpirofosfato isomerase.

No entanto, após estudos por marcação isotópica, realizados por Michel Rohmer^{12,15} e colaboradores, em 1993, verificou-se a existência de uma via alternativa para a biossíntese de terpenos, identificada em bactérias^{12,13,16} e plantas,^{12,13} independente do ácido mevalônico, cujo completo processo ficou estabelecido em 2003 e que se designou por via 2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP), em que unidades de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato são os precursores.¹⁷ (Figura 1.2).

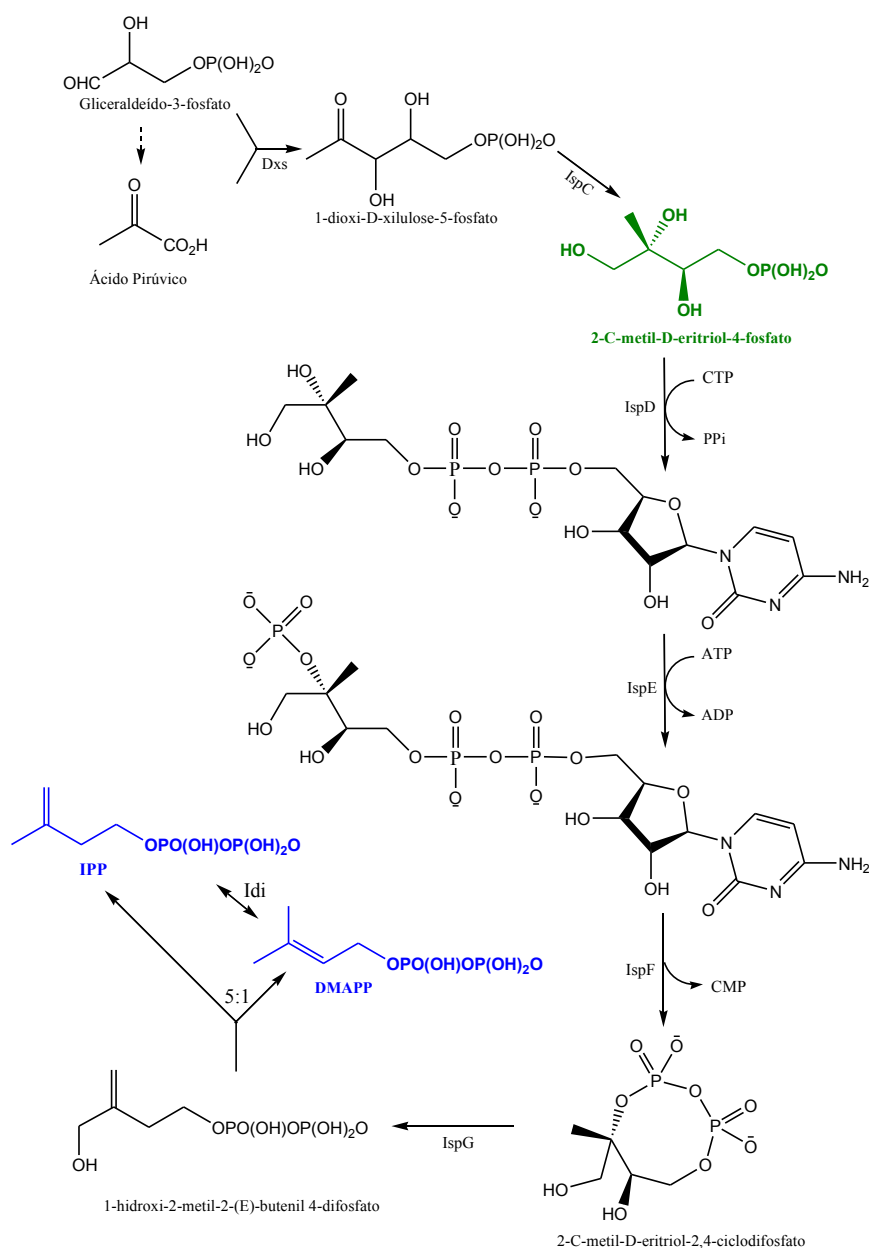


Figura 1.2: Biossíntese de pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) via 2-C-D-eritriol-4-fosfato (MEP) (esquema adaptado de Goto *et al.*, 2010). Dxs: 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato sintetase; IspD: 4-difosfocitidil-2-C-metil-d-eritritol sintetase; IspE: 4-difosfocitidil-2-C-metil-d-eritritol cinase; IspF: 2-C-metil-d-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintetase; IspG: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintetase; Idi: isopentenil pirofosfato isomerase.

Enquanto os mamíferos e algumas leveduras possuem apenas o processo biossintético de terpenos através da via do MVA, as bactérias e plantas possuem as duas vias (MVA e MEP) (Figura 1.3).¹²

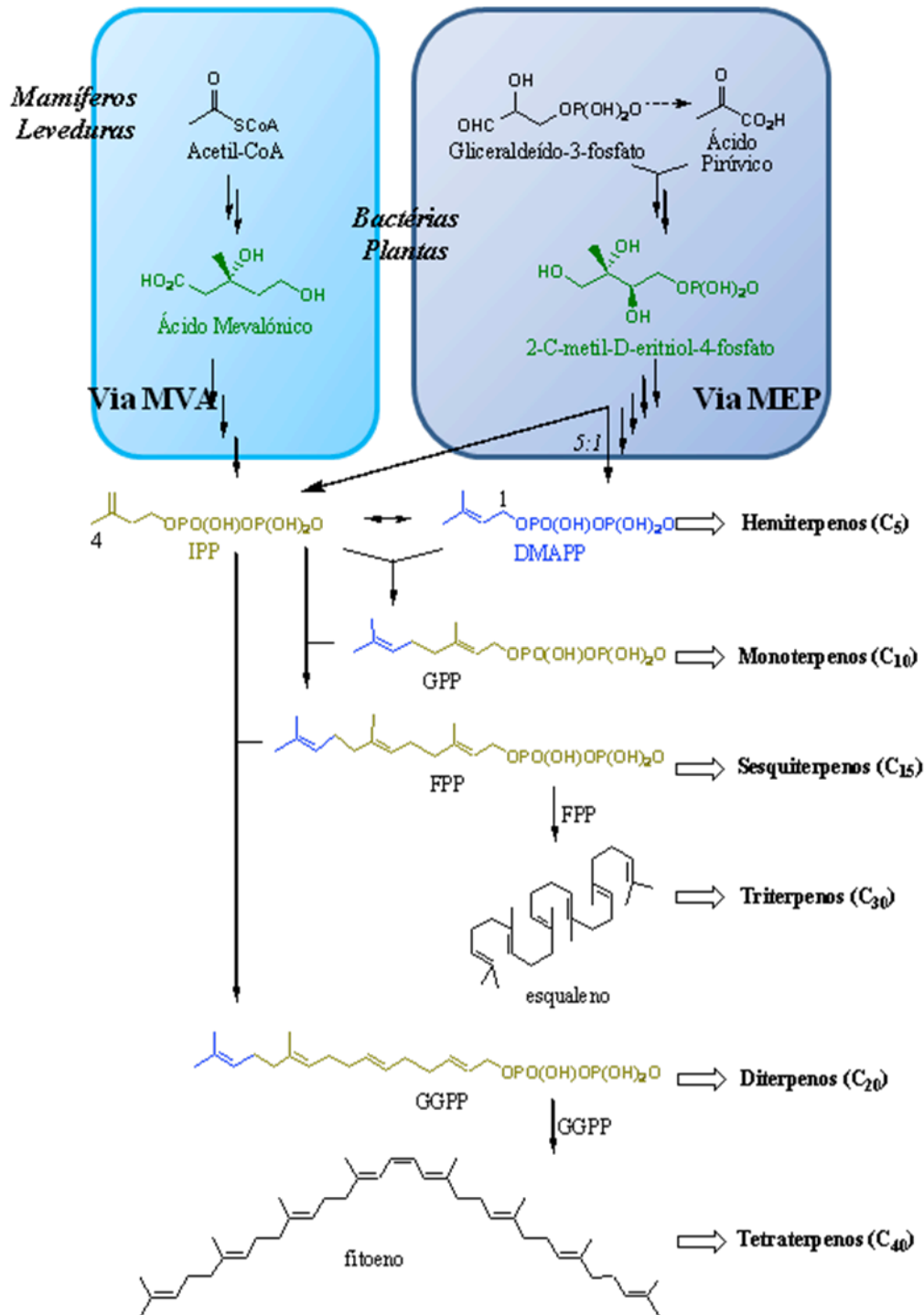


Figura 1.3: Biossíntese dos terpenos via MVA e MEP (esquema adaptado de Goto *et al.*, 2010).

Todavia, independentemente da via utilizada, os produtos finais são os mesmos, pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), os dois precursores imediatos dos terpenos, com cinco átomos de carbono (C5).

A 1'-4 adição sucessiva de unidades de IPP e de DMAPP, na maioria das situações através da condensação "cabeça-cauda", origina as moléculas precursoras dos vários tipos de terpenos existentes na Natureza: pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), esqualeno e o fitoeno.^{12,18-20}

A conformação adotada pela cadeia isoprenóide é que vai determinar a forma final do esqueleto de carbono de cada terpeno, sendo que a sua maioria apresenta forma cíclica com estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e penta-cíclicas,² obtidas por ciclizações sucessivas.

Frequentemente utilizados, de forma imprópria, para descrever o mesmo composto, os termos terpeno e terpenóide possuem uma diferenciação que é importante evidenciar. Enquanto que o primeiro é um termo coletivo indicado para descrever terpenos naturais, terpenóide inclui, igualmente, os produtos de degradação natural, bem como derivados naturais e sintéticos.^{2,21}

1.2. Triterpenóides pentacíclicos – Estrutura e bioatividade

Os triterpenos, de fórmula molecular $C_{30}H_{48}$, cujas principais fontes naturais são os bálsamos e as resinas,²⁻⁴ pertencem ao grupo, biologicamente relevante, dos terpenos, podendo apresentar esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e penta-cíclicas.^{2, 22,23}

O esqualeno (Figura 1.4), considerando a complexidade do seu esqueleto de carbono, é o mais simples triterpeno.

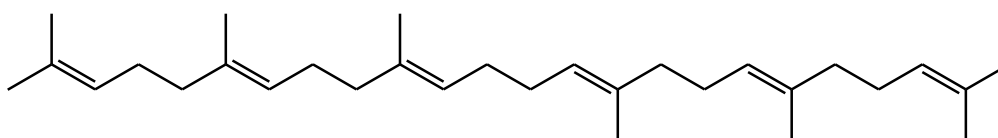


Figura 1.4: Estrutura molecular do esqualeno.

Isolado, pela primeira vez, a partir de óleo de fígado de peixe, pode ser encontrado em óleos vegetais e gorduras de mamíferos.^{24,25} É um precursor do grupo dos triterpenos policíclicos pois, devido às suas ligações insaturadas, possui reatividade e termolabilidade.²

Constituído por duas unidades de pirofosfato de farnesilo (FPP), condensadas segundo um mecanismo “*cabeça-cabeça*”, diferente do mecanismo dos terpenos mais simples “*cabeça-cauda*”,²⁶ a sua ciclização é promovida, maioritariamente, por agentes oxidativos que conduzem à formação seletiva de um epóxido na posição 2, dando origem ao 2,3-óxido de esqualeno. A ciclização é iniciada com a abertura do epóxido e, dependendo da conformação da sua estrutura (em cadeira ou barco), à superfície da enzima, a biossíntese de diferentes núcleos dos triterpenos cíclicos é desencadeada^{22,23} (Figura 1.5). Existem, todavia, situações, apesar de em número muito reduzido, em que a ciclização ocorre por via não oxidativa (Figura 1.5).²²

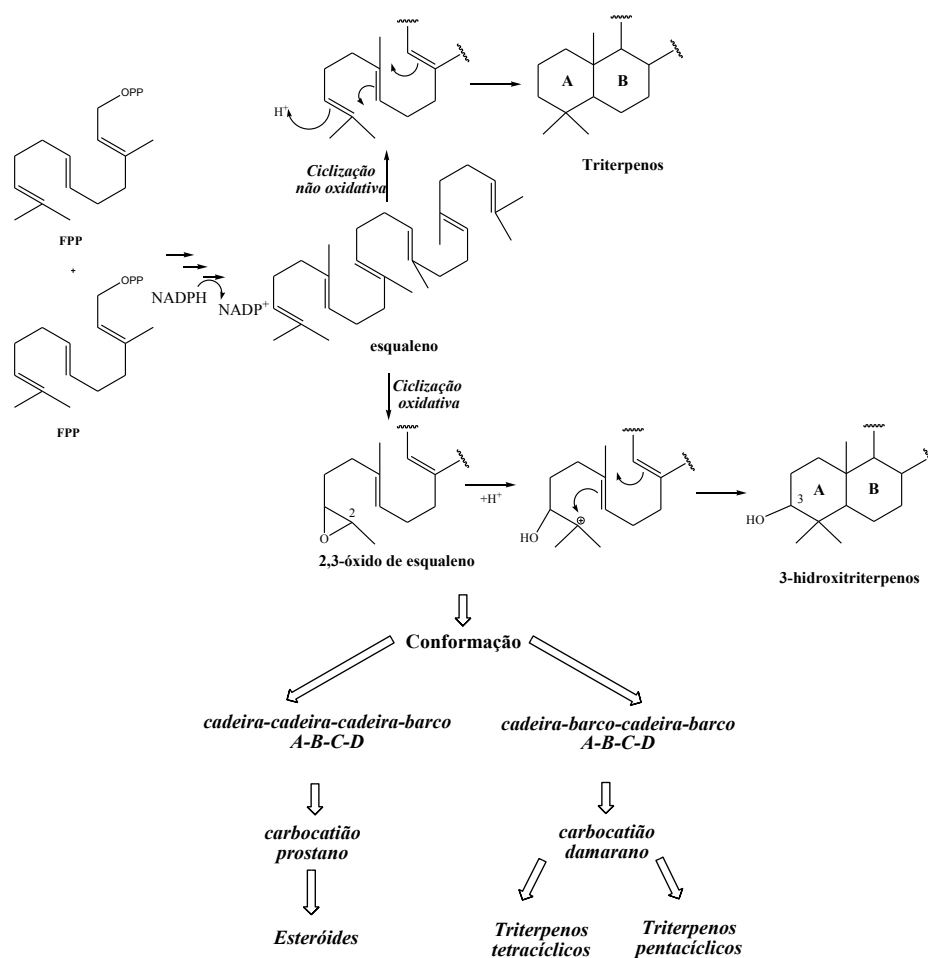


Figura 1.5: Biossíntese de triterpenos através de ciclização oxidativa e não-oxidativa.

Na perspectiva da sua atividade biológica, presume-se que as estruturas triterpênicas mais importantes são aquelas que possuem os esqueletos de carbono do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos)¹ (Figura 1.6).

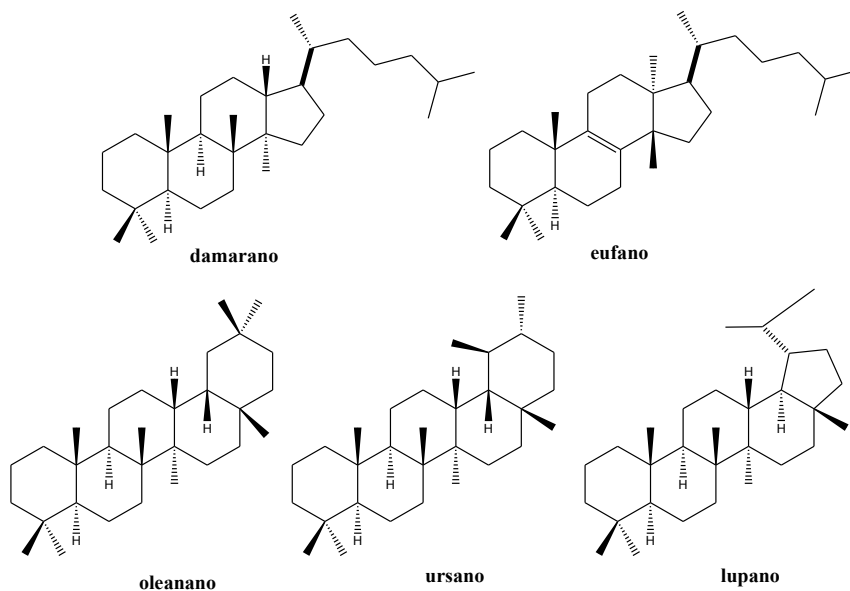


Figura 1.6: Estruturas moleculares do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos).

As propriedades farmacológicas dos triterpenóides são muito diversas, pois podem apresentar efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetores, analgésicos, antibióticos, antimicóticos, imunomoduladores, virostáticos e tónicos. Todavia, a toxicidade devido às suas propriedades hemolíticas e citostáticas conduziu a que, paralelamente à extração e isolamento a partir de produtos naturais exista, atualmente, um número significativo de trabalhos na semi-síntese de novos derivados que apresentem menor toxicidade e maior atividade biológica.¹

Os triterpenos pentacíclicos, estruturas com trinta átomos de carbono e cinco anéis, (Figura 1.7) podem ser divididos em três grandes grupos: oleananos (β -amirin), ursanos (α -amirin) e lupanos. Os dois primeiros (oleananos e ursanos) apresentam cinco anéis hexagonais, com uma estereoquímica dos anéis D/E *cis*, diferenciando-se, entre si, apenas, na posição dos seus grupos metilo: nos oleananos situam-se os dois em C-20, enquanto nos ursanos um metilo encontra-se, também, em C-20 mas o outro está em C-19. Os lupanos, por outro lado, possuem uma estereoquímica *trans* dos anéis D/E, além de que o quinto anel é pentagonal.²⁷

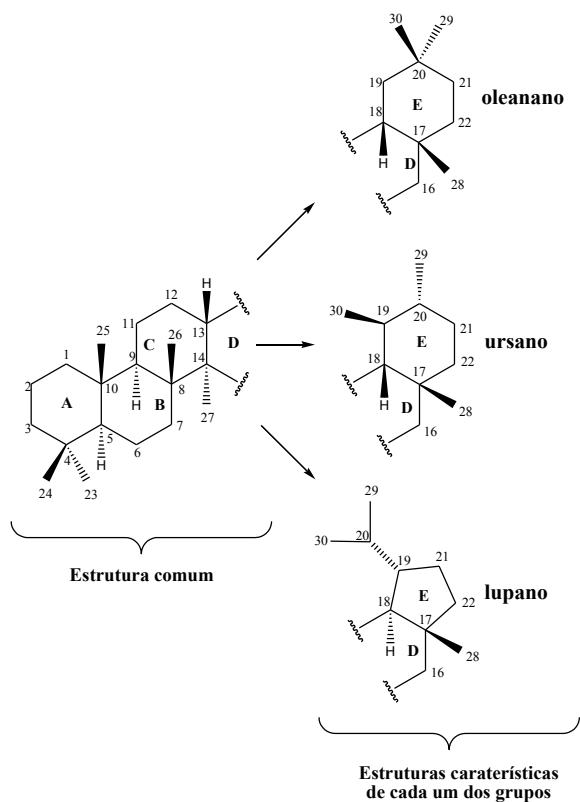


Figura 1.7: Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.

1.2.1. Triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano

O ácido oleanólico (ácido 3-β-hidroxi-olea-12-en-28-óico) – Figura 1.8 - é um triterpeno pentacíclico que pode ser encontrado na natureza, quer na forma de ácido livre ou combinada, como genina precursora de saponinas triterpenóides, numa enorme diversidade de alimentos e plantas, algumas com propriedades medicinais conhecidas.²⁸⁻³¹

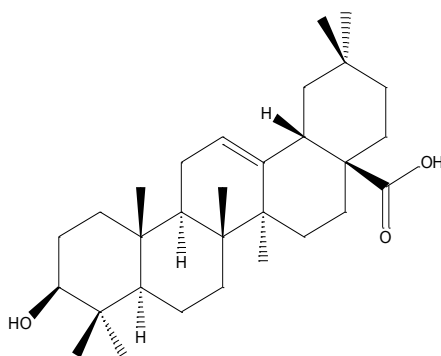


Figura 1.8: Estrutura química do ácido oleanólico.

A sua detecção e elucidação estrutural pode ser feita por diversas técnicas analíticas, sendo a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) a mais utilizada.^{28,32-36}

O ácido oleanólico possui diversas atividades farmacológicas, sendo a hepatoprotetora uma delas. Diversos estudos demonstraram que este triterpeno pentacíclico, para além de ter apresentado um bom efeito no fígado, aquando da lesão hepática aguda induzida, quimicamente; também revelou uma elevada eficácia na fibrose e cirrose causada por doenças crónicas.^{28, 31,37,38}

O seu potencial antioxidante³⁹ é outra das atividades farmacológicas que lhe é atribuída, uma vez que o ácido oleanólico é um captor de radicais livres devido, entre outros fatores, à sua capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigénio.^{28,31}

A atividade antitumoral é outro dos seus potenciais que fazem deste triterpeno pentacíclico um alvo de estudo,⁴⁰ uma vez que possui capacidade de induzir a apoptose e modelar o ambiente do tumor aliando estas características ao seu poder anti-inflamatório, já que a inflamação possui um importante papel no desenvolvimento e progressão do cancro.^{28,41}

Devido à sua atividade farmacológica, facilidade na sua aquisição e baixos custos de produção, o ácido oleanólico é considerado, atualmente, como uma ótima molécula que constitua um ponto de partida na semi-síntese de novos derivados,²⁸ para os quais, alguns dos trabalhos já apresentados, demonstram um aumento, significativo, no potencial terapêutico.⁴²⁻

47

1.2.2. Triterpenos pentacíclicos do tipo ursano

O ácido ursólico (ácido 3- β -hidroxi-urs-12-en-28-óico) (Figura 1.9), isómero do ácido oleanólico, está presente na natureza em vegetais, frutas e plantas.^{31,37}

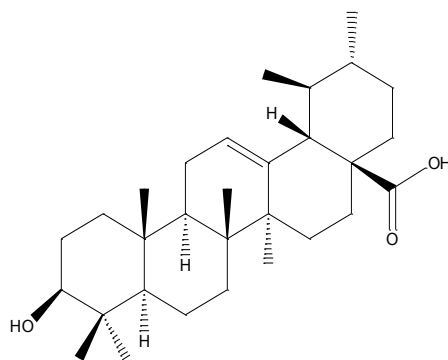


Figura 1.9: Estrutura química do ácido ursólico.

Este triterpeno pentacíclico possui atividades farmacológicas distintas e algumas delas semelhantes às apresentadas pelo seu isômero, o ácido oleanólico. O seu potencial antioxidante,⁴⁸ anti-inflamatório,⁴⁹ antimicrobiano, antidepressivo,⁵⁰ e, especialmente, antitumoral,⁵¹ tem sido estudado nos últimos tempos.

Os resultados apresentados têm vindo a refletir a importância de, tal como acontece com o seu isômero, o ácido oleanólico, se proceder à síntese de derivados semi-sintéticos do ácido ursólico, de forma a maximizar o seu potencial biológico, o que tem sido conseguido, tal como se constata em alguns trabalhos recentes.⁵²⁻⁵⁵

Referências

- 1 Dzubak,P;Hajduch,M.; Vydra, D.;Hustova,A.;Kvasnica,M.; Biedermann,D.; Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications.*Nat.Prod.Rep.***2006**; 23, 394-411.
- 2 Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M. C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry.***2011**, 46, 1–15.
- 3 Gildemeister, E.;Hoffmann, F. Die ätherischen Öle, 1–7, 4thed. Berlin: AkademieVerlag;**1960**.

-
- 4 Sandermann, W..Naturharze, Terpentinöl, Tallöl. Berlin: SpringerVerlag. **1960**.
 - 5 Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **2002**, 130, 1079-1089.
 - 6 Pantarotto, Helder. *Síntese do triterpenobicíclicoent- α -Polipodatetraeno. Confirmação da configuração absoluta do produto natural.* **1996**. Dissertação de Mestrado.
 - 7 Newman, A.A. *Chemistry of Terpenes and Terpenoids.* Academic Press Inc.. London. **1972**.
 - 8 Tesso, Hailemichael; *Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants.* **2005**. Dissertation for the Doctorate Degree
 - 9 Wallach, O..Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischenöle, vierte Abhandlung CVIII. *Liebigs An. Chem.*, **1887**, 238, 78-88.
 - 10 Ruzicka, L.; Eschenmoser, A.; Heuser, H.. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **1953**, 9, 357-367.
 - 11 IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. [doi:10.1351/goldbook](https://doi.org/10.1351/goldbook). (acedido em 5 de setembro de 2012).
 - 12 Goto, Tsuyoshi; Takahashi, Nobuyuki; Hirai, Shizuka; Kawada, Teruo; Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism; *PPAR Research*; **2010**; 1-9.

- 13 Withers, S. T.; Keasling, J. D.; Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules; *Applied Microbiology and Biotechnology*; **2007**, 73, 980–990.
- 14 Penuelas, J.; Munne-Bosch, S.; Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection; *Trends in Plant Science*, **2005**, 10, 166–169.
- 15 Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H.; Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate; *Biochemical Journal*, **1993**, 295, 517–524.
- 16 Grochowski, L. L.; Xu, H.; White, R. H.; *Methanocaldococcus jannaschii* uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate; *Journal of Bacteriology*, **2006**, 188, 3192–3198.
- 17 Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2002**, 99, 1158–1163.
- 18 McCaskill, D.; Croteau, R.; Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **1997**, 55, 108–146.
- 19 Tholl, D.; Chen, F.; Gershenzon, J.; Pickersky, E.; Chapter one *Arabidopsis thaliana*, a model system for investigating volatile terpene biosynthesis, regulation and function; *Recent Advances in Phytochemistry*, **2004**, 38, 1–18.
- 20 Verpoorte, R.; Alfermann, A.; Ed; *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **2000**, 1–30.
- 21 Eggersdofer M.; Terpenes; *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, electronic release. Weinheim: Wiley-VCH, **2005**.
- 22 Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. D. T.; On the origins of triterpenoids skeletal

- diversity, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 261-291.
- 23 Dewick, P. M.; *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- 24 Catchpole, O. J.; von Kamp, J. C.; Greg, J. B. Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem Res.* **1997**, 36, 4318-4324.
- 25 Pietsch, A.; Jaeger, P.; Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2007**, 109, 1077-1082.
- 26 Mann, J.; *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Oxford Chemistry Primers-Oxford Science Publications, **1994**.
- 27 Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; MEntz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6 ed., UFSC, **2007**.
- 28 Pollier, Jacob; Goossens, Alain; Molecules of Interest - Oleanolic acid, *Phytochemistry*, **2012**, 77, 10-15.
- 29 Fai, Y. M.; Tao, C. C.; A review of presence of oleanolic acid in natural products, *Nat. Proda Med.*, **2009**, 2, 77-290.
- 30 Fukushima, E.O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T.; CYP716A Subfamily Members are Multifunctional Oxidases in Triterpenoid Biosynthesis; *Plant & Cell Physiology*, **2011**, 52, 2050-2061.
- 31 Liu, J.; Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid; *J. Ethnopharmacol.*, **1995**, 49, 57-68.
- 32 Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Djerassi, C.; Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85,

3688–3699.

- 33 Burnouf-Radosevich, M.; Delfel, N.E.; England, R.; Gas chromatography–massspectrometry of oleanane- and ursane-type triterpenes – application to *Chenopodium quinoa* triterpenes. *Phytochemistry*, **1985**, 24, 2063–2066.
- 34 Gu, J.-Q.; Wang, Y.; Franzblau, S.G.; Montenegro, G.; Timmermann, B.N.; Dereplication of pentacyclitriterpenoids in plants by GC–EI/MS; *Phytochemical Analysis*, **2006**, 17, 102–106.
- 35 Razboršek, M.I.; Voncina, D.B.; Dolecek, V.; Voncina, E.; Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives; *Chromatographia*, **2008**, 67, 433–440.
- 36 Pollier, J.; Moses, T.; Goossens, A.; Combinatorial biosynthesis in plants: a(p)review on its potential and future exploitation. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 1897–1916.
- 37 Liu, J.; Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives; *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 100, 92–94.
- 38 Reisman, S.A.; Aleksunes, L.M.; Klaassen, C.D.; Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes; *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, 77, 1273–1282.
- 39 Wang, X.; Ye, X.-l.; Liu, R.; Chen, H.-L.; Bai, H.; Liang, X.; Zhang, X.-D.; Wang, Z.; Li, W.-l.; Hai, C.-X.; Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases; *Chem.-Biol. Interact.*, **2010**, 184, 328–337.
- 40 Laszczyk, M.N.; Pentacyclitriterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.*, **2009**, 75, 1549–1560.
- 41 Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F.; Cancer related inflammation; *Nature*, **2008**, 454, 436–444.

- 42 Huang, Z.; Fu, J.; Liu, L.; Sun, Y.; Lai, Y.; Ji, H.; Knaus, E. E.; Tian, J.; Zhang, Y.; Glycosylated diazeniumdiolate-based oleanolic acid derivatives: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation as anti-human hepatocellular carcinoma agents; *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 3882-3891.
- 43 Qian, S ; Wu, Y ; He, YX ; Wang, ZY ; Yang, WY ; Chen, X; Synthesis and Biological Evaluation of Oleanane Triterpenoid with gamma-Lactone Functionality in Ring C; *Chemical Journal of Chinese Universities*, **2012**, 33, 969-975.
- 44 Li, H.; Zou, H.; Gao, L.; et al.; Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B; *Heterocycles*, **2012**, 85, 1117-1139.
- 45 Walter Pertino, M.; Lopez, C.; Theoduloz, C.; et al.; 1,2,3-triazole-substituted oleanolic acid derivatives: synthesis and antiproliferative activity; *Pharmaceutical Biology*, **2012**, 50, 574-574.
- 46 Zhi-Cheng, S.; Shi-Cheng, W.; Qi-Ling; S.; et al.; Synthesis and alfa-Glucosidase Inhibitory Activity of Oleanolic Acid Derivatives; *Chemical Journal of Chinese Universities*, **2012**, 33, 744-749.
- 47 Bernstein, S. H.; Venkatesh, S.; Li, Min; et al.; The mitochondrial ATP-dependent Lon protéase: a novel Target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives; *Blood*; **2012**, 119, 3321-3329.
- 48 Ramachandran, S.; Prasad, N. R.; Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes; *Chemico-Biological Interactions*, **2008**; 176, 99-107.
- 49 Manikrao, A. M.; Khatale, P. N.; Jawarkar, R. D.; Vyas, J. V. ; Mahajan, D. T.; Masand, V. H.; ben hadda, T.; Presuming the Probable Anti-inflammatory Mechanism of Ursolic Acid: a plant derived pentacyclitriterpenoid, using molecular Docking; *J.*

Comput. Method. Mol. Design, **2011**, 2, 9-13.

- 50 Machado, D.G.; Neis, V.B.; Balen, G.O.; Colla, A.; Cunha, M.P.; Dalmarco, J.B.; Pizzolatti, M.G., Prediger, R.D., Rodrigues, A.L.S.: Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **2012** (disponível online <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305712002377> e acedido em 4 de Setembro de 2012).
- 51 Salvador, J. A. R., Ed; *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*, New York: Nova Science Publishers Inc., **2010**.
- 52 Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y.. Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21^{waf1} and NOXA in pancreatic cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 5774-5786.
- 53 Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y.; Semisynthetic Ursolic Acid Fluorolactone Derivatives Inhibit Growth with Induction of p21^{waf1} and Induce Apoptosis with Upregulation of NOXA and Downregulation of c-FLIP in Cancer Cells. *Chem. Med. Chem.* **2012**, 7, 1-13.
- 54 Kalani, K.; Yadav, D. K.; Khan, F.; et al.. Pharmacophore, QSAR, and ADME based semisynthesis and *in vitro* evaluation of ursolic analogs for anticancer activity. *Journal of molecular modeling*, **2012**, 18, 3389-3413.
- 55 Tanaka, K.; Mazumder, K.; Siwu, E. R. O.; et al.; Auxiliary-directed oxidation of ursolic acid by 'Ru'-porphyrins: chemical modulation of cytotoxicity against tumor cell lines; *Tetrahedron Letters*, **2012**, 53, 1756-1759.

1.3. Objetivos gerais do trabalho

Os ácidos oleanólico e ursólico pertencem ao grupo dos triterpenóides pentacíclicos e, apesar de apresentarem propriedades farmacológicas diversas, o seu potencial terapêutico é reduzido. Contudo, estudos de relação estrutura-atividade têm demonstrado que determinadas modificações no seu núcleo podem conduzir a derivados semi-sintéticos com um incremento significativo na sua atividade.

A espectrometria de massa e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, devido à valiosa e fácil informação que fornecem sobre a estrutura, são duas das técnicas mais utilizadas, atualmente, para a elucidação estrutural de novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico.

No presente trabalho pretende-se analisar dezasseis novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico, por espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

O trabalho terá início com a análise por espectrometria de massa *tandem*, através da utilização de um espectrómetro de massa com ionização à pressão atmosférica por *electrospray*, onde se pretende, através de vários ciclos de fragmentação (*MSn*) e por comparação dos resultados obtidos com os precursores (ácidos oleanólico e ursólico), encontrar um perfil de fragmentação dos novos derivados que nos permita, no futuro, uma rápida identificação de novos compostos. Os resultados obtidos irão, depois, ser comparados com a análise dos mesmos derivados mas, desta vez, por *MS* de 1ª ordem e ionização por impacto eletrónico.

De seguida, ir-se-á proceder à caracterização estrutural dos mesmos derivados através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H , ^{13}C e DEPT-135).

Por fim, proceder-se-á à comparação das duas técnicas que foram utilizadas para a elucidação estrutural dos novos derivados, com o intuito de determinar qual a informação que, cada uma delas, nos fornece individualmente e de que forma os dados obtidos podem ser complementares.

CAPÍTULO**2**

**Análise estrutural
de novos derivados
semi-sintéticos dos ácidos
oleanólico e ursólico**

2.1. A importância da elucidação estrutural na semi-síntese de novos triterpenóides pentacíclicos

A compreensão da química dos processos biológicos, à luz dos conceitos atuais, tem permitido identificar novos alvos para agentes terapêuticos, através de um paralelo esforço no isolamento de compostos naturais, elucidação estrutural, obtenção de compostos de síntese e/ou semi-síntese, recurso a metodologias de *screening* de bioatividades¹ e de avaliação da relação estrutura/atividade (*SAR*). Na maioria das situações, o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas e/ou o melhoramento das já existentes foi fundamental na eficaz identificação do alvo e na abordagem dos seus agentes terapêuticos.¹

Os ácidos oleanólico e ursólico, apesar de possuírem propriedades farmacológicas antitumorais, apresentam um potencial terapêutico reduzido. No entanto, estudos de relação estrutura-atividade têm demonstrado que modificações em determinadas zonas dos núcleos destes compostos podem conduzir a novos derivados significativamente mais ativos (Figura 2.1).²

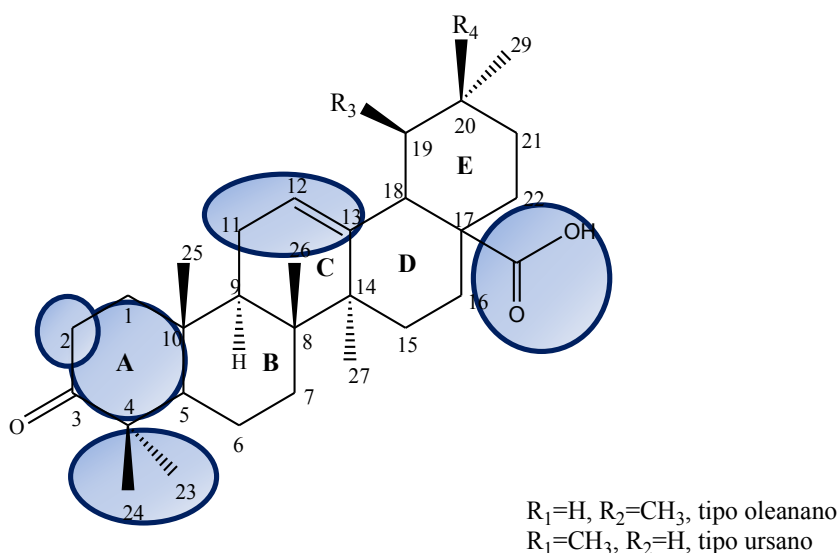


Figura 2.1: Principais locais que conferem bioatividade aos derivados triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano e ursano (figura adaptada de Sun *et al.*, 2006).

Normalmente, a ocorrência de funcionalidades enona no anel A conduz a um aumento, significativo, da atividade antitumoral, verificando-se o mesmo com a presença de grupos carboxilo e metoxicarbonilo na posição C-2.² A substituição do grupo carboxílico em C-17 também pode conduzir a uma alteração do seu potencial terapêutico, da mesma forma que, a introdução de uma insaturação em C-12 e/ou uma função cetona em C-11 no anel C.²

A utilização de anéis heterocíclicos, como substituintes em derivados triterpenóides pentacíclicos, com esqueleto lupano, também tem sido testada quanto à sua relação estrutura-atividade. Trabalhos realizados revelaram um incremento na atividade antiproliferativa destes novos compostos.³⁻⁷ Com o intuito de verificar se esta situação só se observava em núcleos lupano ou também em esqueletos oleanano e ursano, novos derivados semi-sintéticos foram preparados.^{3,8}

A espectrometria de massa e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear surgem então, como duas técnicas valiosas na elucidação estrutural destes novos derivados.⁹

Neste trabalho, procedeu-se à caracterização, por espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, de dezasseis desses novos derivados, três (2-4) semi-sintetizados a partir do ácido oleanólico (1)⁸ (Figura 2.2) e os restantes treze (6-18) derivados do ácido ursólico (5) (Figura 2.3).^{3,8}

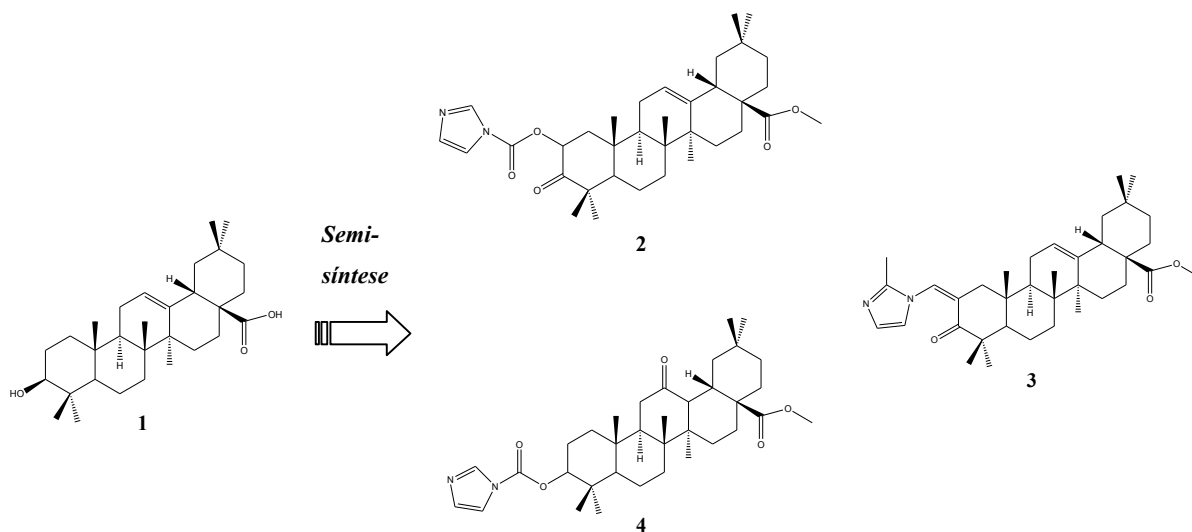


Figura 2.2: Três novos derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico (preparados por Leal, 2012).

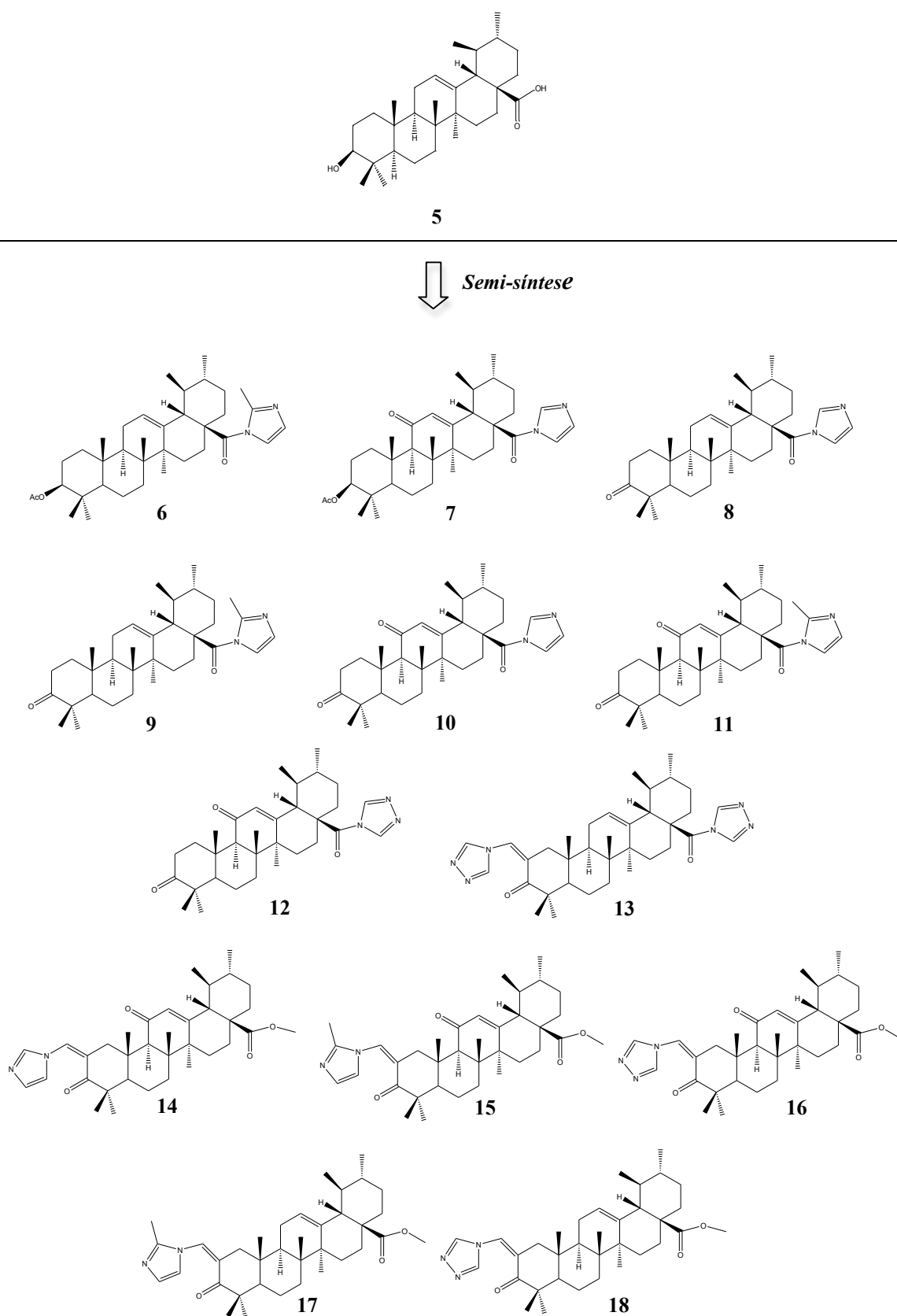


Figura 2.3: Novos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (obtidos por Leal, 2012).

2.2. Espectrometria de massa de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico

2.2.1. Espectrometria de massa – princípios e instrumentação

A espectrometria de massa, cujo aparecimento se deveu aos trabalhos do físico britânico J. J. Thompson quando, em 1898, descobriu o eletrão, é uma metodologia analítica que requer uma mínima preparação da amostra. Através da separação e detecção de iões em fase gasosa e utilizando a sua relação entre a massa e a carga (m/z), fornece, consistentemente, dados reprodutíveis da molécula intacta e/ou dos seus fragmentos específicos, permitindo obter informação relevante para a caracterização e identificação estrutural de uma elevada diversidade de compostos químicos e biológicos.¹⁰

Os equipamentos utilizados para o efeito, os espectrómetros de massa, são de modelos diversos, consoante o tipo de amostras que se pretendem analisar (puras/misturas, sólidas/líquidas, capacidade de vaporização sem decomposição, solubilidade, etc.) e a informação que se pretende obter (fragmentação, ião molecular, elucidação estrutural, etc.). Todavia, geralmente, todos são constituídos por cinco elementos básicos: sistema de introdução da amostra; câmara de ionização; analisador de massas; detetor de iões e sistema para tratamento de dados¹¹ (Figura 2.4).

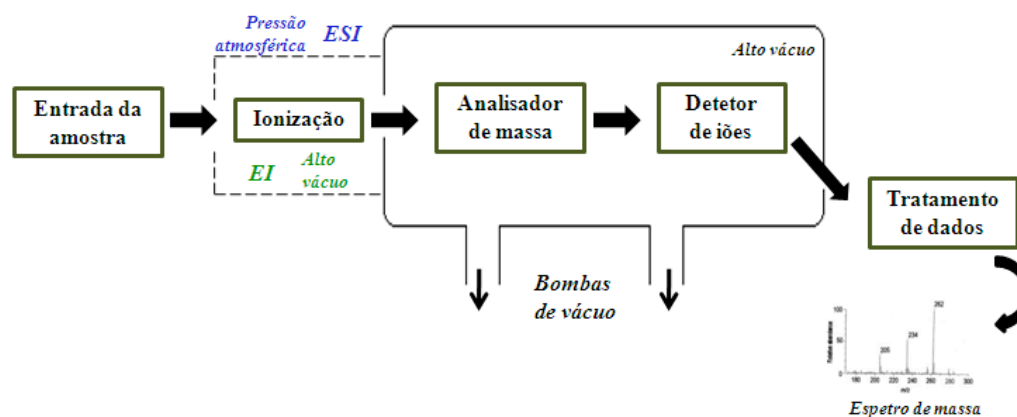


Figura 2.4: Elementos básicos de um espectrómetro de massa. *EI*: impacto eletrónico; *ESI*: ionização por *electrospray*.

Atualmente, a aplicabilidade desta técnica é muito diversa, desde a química forense até à análise ambiental, passando pela química dos alimentos e medicamentos.¹¹

Introdução da amostra

A introdução da amostra no espectrómetro de massa foi sempre, ao longo dos anos, um dos grandes desafios desta técnica, uma vez que esta operação tem de ser feita de tal forma que a pressão no seu interior não sofra alterações. Atualmente, existem muitas formas de o fazer, sendo que para amostras puras provenientes de síntese química, as mais utilizadas são a introdução direta, do composto sólido, com uma *probe* (*DIP*) e a infusão direta de uma solução do composto em análise (*DI*).

A introdução direta com uma *probe* (*DIP*) (Figura 2.5)¹² é, normalmente, a forma mais utilizada em espectrómetros de massa com ionização por impacto eletrónico (*EI*). A amostra, com um grau de pureza elevado (superior a 95%), é colocada num recipiente específico, o *DIP cup*, posteriormente introduzido num compartimento da *probe* que é depois inserido na câmara de ionização do espectrómetro de massa através de um sistema de válvulas. No seu interior, a amostra, por aquecimento direto, é sujeita a um processo de desadsorção de forma a facilitar a vaporização e a ionização.

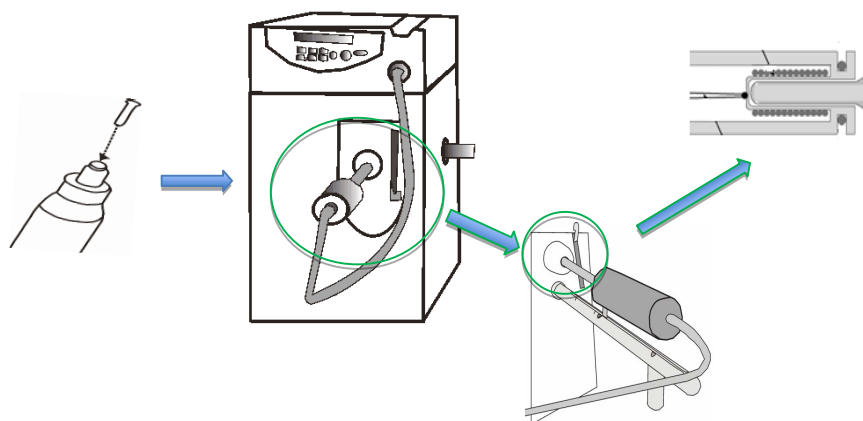


Figura 2.5: Introdução de amostras, de grau de pureza elevado, com a *Probe* (*DIP*) (figura adaptada de Thermo Electron Corporation, 2005).

Na infusão direta (*DI*) (Figura 2.6), usualmente utilizada em espectrómetros de massa com ionização por *electrospray* (*ESI*), a amostra que foi previamente solubilizada num solvente (ou mistura de solventes), é introduzida na câmara de ionização através de um capilar, em

pequenas quantidades, ao longo de um tempo definido e a um fluxo constante.

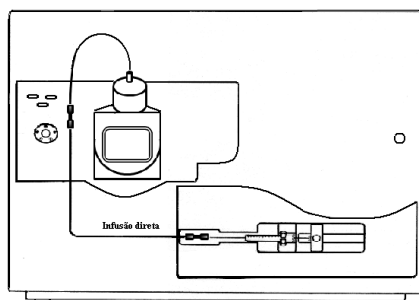


Figura 2.6: Sistema de entrada de amostra por infusão direta.

Ionização

A ionização da amostra é uma das fases fundamentais da espectrometria de massa, podendo ser realizada de várias formas, entre elas, o impacto eletrônico (*EI*) e à pressão atmosférica, por *electrospray* (*ESI*). A escolha do tipo de ionização utilizada tem que ter em conta, entre outros factores, as características da amostra a analisar e o tipo de informação pretendido (ião molecular, perfil de fragmentação).¹¹

O impacto eletrônico (*EI*), o mais antigo tipo de ionização é, sem sombra de dúvidas, a forma mais comum de ionização utilizada.¹¹ Caracterizado por uma elevada reprodutibilidade, os seus espectros são “impressões digitais” dos diferentes compostos e, por essa razão, são normalmente utilizados para comparação com espectros existentes em bibliotecas, permitindo fazer correspondências que, traduzidas em percentagens, podem variar de 0 a 100, sendo 100 a indicação que estamos perante o composto a que corresponde o espectro da biblioteca.^{11,13} Neste tipo de ionização, o vapor do analito é submetido ao bombardeamento por elétrons energéticos (normalmente 70 eV) emitido por um filamento. A maioria dos elétrons são elasticamente espalhados, outros causam excitação na sua interação com as moléculas do analito, existindo ainda aqueles que podem bombardear o analito e causar uma forte ionização, originando os fragmentos da molécula. Por outro lado, embora em menor extensão, pode ocorrer a remoção completa de um elétron da molécula o que leva à formação de um catião radical (M^+) designado por ião molecular.^{11,13}

Outra forma de ionização atualmente muito utilizada é o *electrospray* (*ESI*) que através da obtenção de iões numa fase gasosa, permite que muitas amostras, anteriormente não adequadas para a análise por espectrometria de massa, quer por serem instáveis ao calor ou por possuírem um alto peso molecular, possam ser, desta forma, analisadas.^{14,15} Através de um capilar sob um fluxo co-axial do gás de nebulização - o nitrogénio - a amostra, em solução, entra na fonte de ionização. A ponta do capilar é mantida a um elevado potencial em relação ao eléctrodo de encontro, o que conduz a uma diferença de potencial eléctrico que produz um gradiente e, à saída do capilar, a consequente formação de um aerossol de gotículas carregadas. O fluxo do gás nebulizador direciona o efluente para o espectrómetro de massa¹⁶ (Figura 2.7).¹⁷

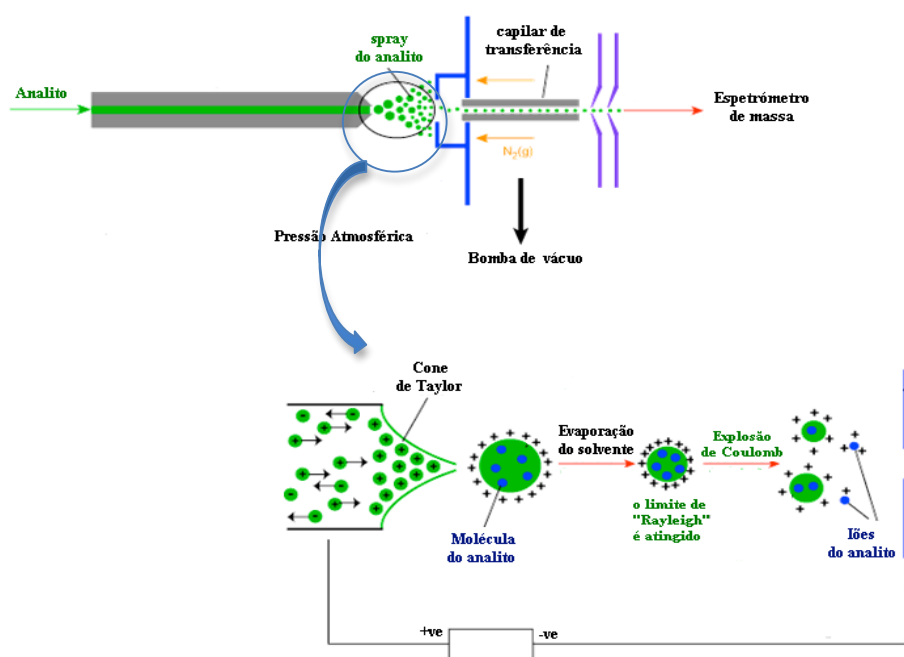


Figura 2.7: Esquemática do processo da ionização por *electrospray* (*ESI*), em modo ião positivo (esquema adaptado de <http://www.bris.ac.uk>).

Analísadores de massa

Ao longo das décadas de setenta, oitenta e noventa, o quadrupolo foi o analisador de massa mais amplamente utilizado. A sua popularidade deveu-se, maioritariamente, ao baixo custo e ao facto dos quadrupolos utilizarem tensões muito mais baixas (2-50 V versus kV) e serem, fisicamente, de menores dimensões do que os restantes analisadores.¹⁸ No quadrupolo, o movimento do ião num campo eléctrico dinâmico (rádio frequência) conduz à separação de

massas e é diretamente dependente da sua razão m/z . A análise das massas é realizada em função das voltagens de rádio frequência (rf) e da corrente direta (DC) aplicadas a quatro cilindros¹⁸ (Figura 2.8).¹⁹

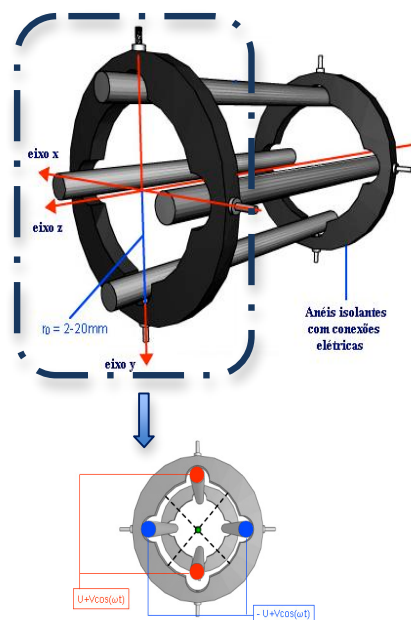


Figura 2.8: Representação esquemática de um quadrupolo (figura adaptada de <http://www.chromacademy.com>). U: voltagem da corrente direta; $V \cos(\omega t)$: rádio-frequência; V: amplitude da rádio-frequência; ω : frequência.

Outro analisador de massas que, atualmente, tem tido uma elevada utilização é o *Ion trap* (Figura 2.9).¹⁸ Num reduzido espaço, através de três elétrodos, com aplicação de correntes alternativas (AC) específicas, este analisador “armadilha” os iões retidos. A gradual variação dessas correntes vai permitir a libertação dos iões, progressivamente, segundo as suas razões m/z (da mais baixa para a mais elevada).²⁰

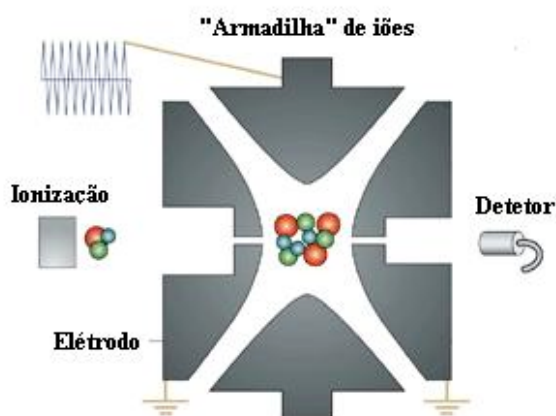


Figura 2.9: Representação de um *Ion trap* (figura adaptada de Glush *et al.*, 2003).

O tamanho compacto, a facilidade de operação, o baixo custo e a capacidade de “armadilhar” e acumular os íons quando se aumenta a relação sinal/ruído são algumas das significativas vantagens deste tipo de analisador.²⁰

Por forma a utilizar a espectrometria de massa na análise de biomoléculas, sem a necessidade de sistemas complexos e de elevado custo, Paule Steinwedel criaram o quadrupolo *ion trap*,^{11,21-23} que anos mais tarde Stafford e colaboradores adaptaram para a empresa Finnigan.^{11,24,25} Este analisador híbrido conjuga o quadrupolo, com campos elétricos nas dimensões x e y, e cujos íons se movem na direção z, perpendicularmente ao campo; com o *ion trap* (“armadilha de íons”), em que o aprisionamento dos íons é devido à presença de um campo elétrico nas três dimensões (x, y e z)¹⁸ (Figura 2.10).²⁰

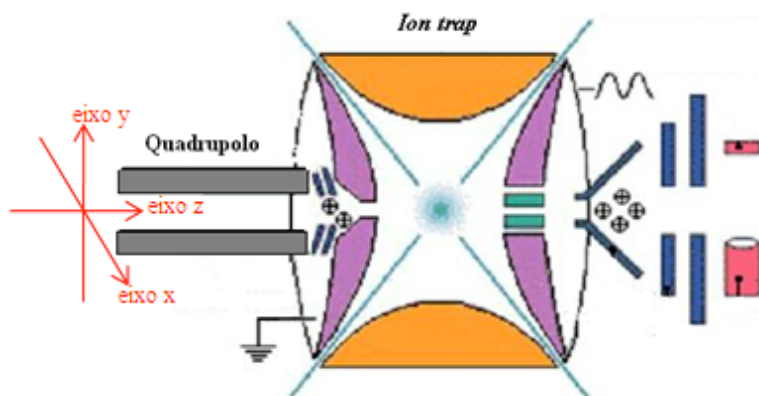


Figura 2.10: Analisador de massas Quadrupolo *Ion trap* (figura adaptada de <http://www.ctu.edu.vn>).

2.2.1.1. Espectrometria de massa *tandem*

A espectrometria de massa *tandem* (Figura 2.11), MS_n , permite a realização de vários estágios de MS consecutivos, cujo valor (n) depende das características do equipamento utilizado. No primeiro espectro de massa, MS de 1ª ordem, ($n=1$), $MS1$, os iões precursores, com a relação m/z que foram previamente escolhidos, são isolados dos restantes enquanto, no segundo estágio, $MS2$ ($n=2$), são submetidos a uma nova fragmentação, resultando novos fragmentos designados por “iões filhos” do ião precursor, anteriormente isolado no $MS1$.^{18,26} Caso haja um terceiro estágio, $MS3$ ($n=3$), os iões com a relação m/z selecionados no $MS2$ são isolados e sujeitos a uma nova fragmentação, dando origem aos “iões netos” dos iões precursores obtidos em MS e aos “iões filhos” dos iões que tinham sido obtidos em $MS2$ e, assim, sucessivamente, até ao número de estágios pretendidos (n).

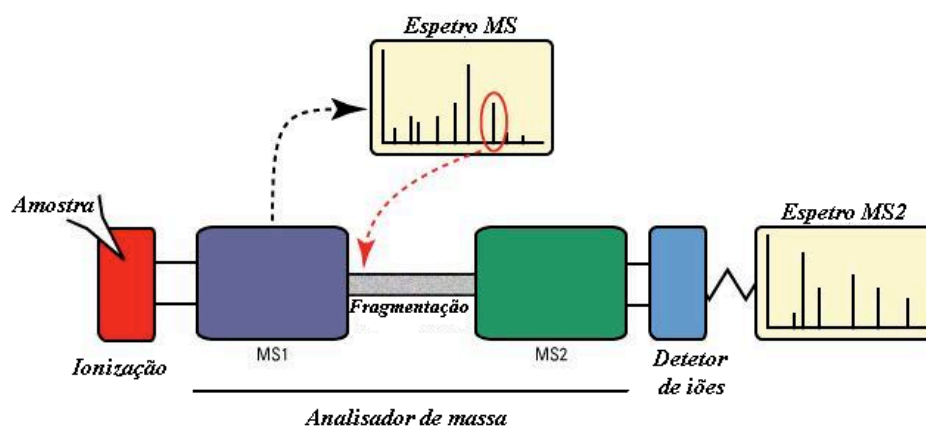


Figura 2.11: Diagrama da Espectrometria de Massa *Tandem* (figura adaptada de <http://www.piercenet.com>).

Esta técnica é particularmente importante na elucidação estrutural de compostos desconhecidos pois, no primeiro estágio de MS ($MS1$), obtém-se o fragmento correspondente ao ião molecular e, no segundo estágio ($MS2$), o espectro de massa do ião que foi isolado no primeiro estágio da fragmentação.¹⁸ Desta forma, através dos sucessivos estágios de MS (MS_n) recolhe-se informação estrutural, como se “da construção de um *puzzle* se trate”, o que permitirá, de forma mais fácil, a identificação do composto.

2.2.2. Análise estrutural de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico

Desde as primeiras experiências de Wilson, em 1962, com a utilização de espectrometria de massa para elucidação estrutural e estereoquímica de triterpenóides pentacíclicos insaturados,²⁷ diversos trabalhos nesta área têm sido realizados observando-se, nos últimos anos, um incremento significativo no volume de publicações.^{9, 28-45}

Trabalhos de elucidação estrutural de compostos triterpênicos com esqueleto oleanano e ursano, provenientes de fontes naturais, revelaram que, dependendo da funcionalização do anel C, se observa a presença de sinais característicos a m/z 203, 217 e 219 resultantes da fragmentação *retro* Diels-Alder (FrDA), respectivamente, dos 12-oleanenos ou 12-ursenos (Figura 2.12)^{9,38-43}, dos 11-oxo-12-ursenos (Figura 2.13)⁴⁴ e dos 12-oxo-oleananos (Figura 2.14).^{9,38}

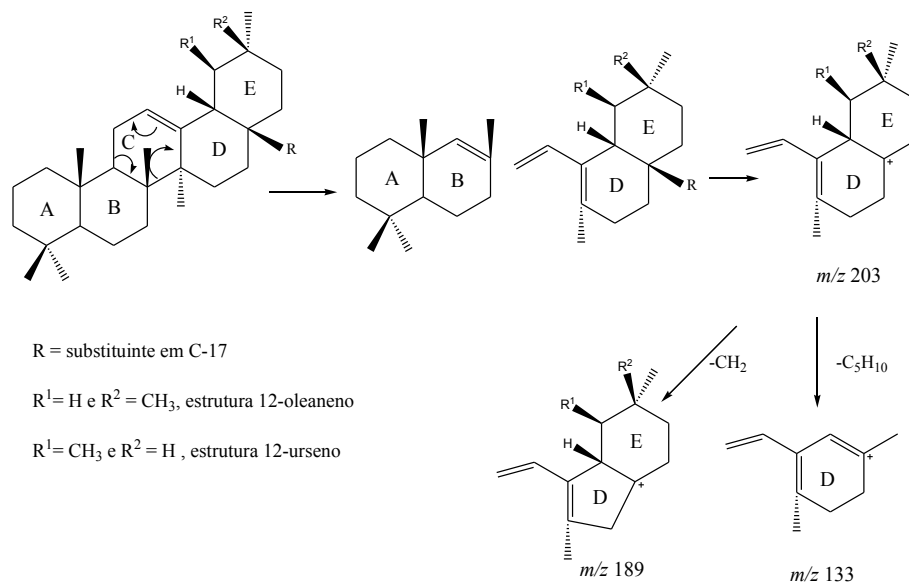


Figura 2.12: Fragmentação *retro* Diels-Alder do anel C para triterpenóides pentacíclicos do tipo 12-oleanenos e 12-ursenos (esquema adaptado de Amir, 2011).

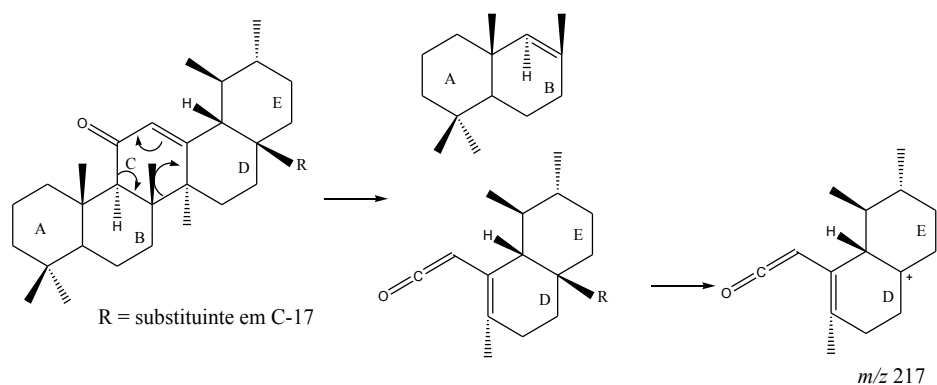


Figura 2.13: Fragmentação rDA do anel C para 11-oxo-12-ursenos (esquema adaptado de Noel *et al.*, 2005).

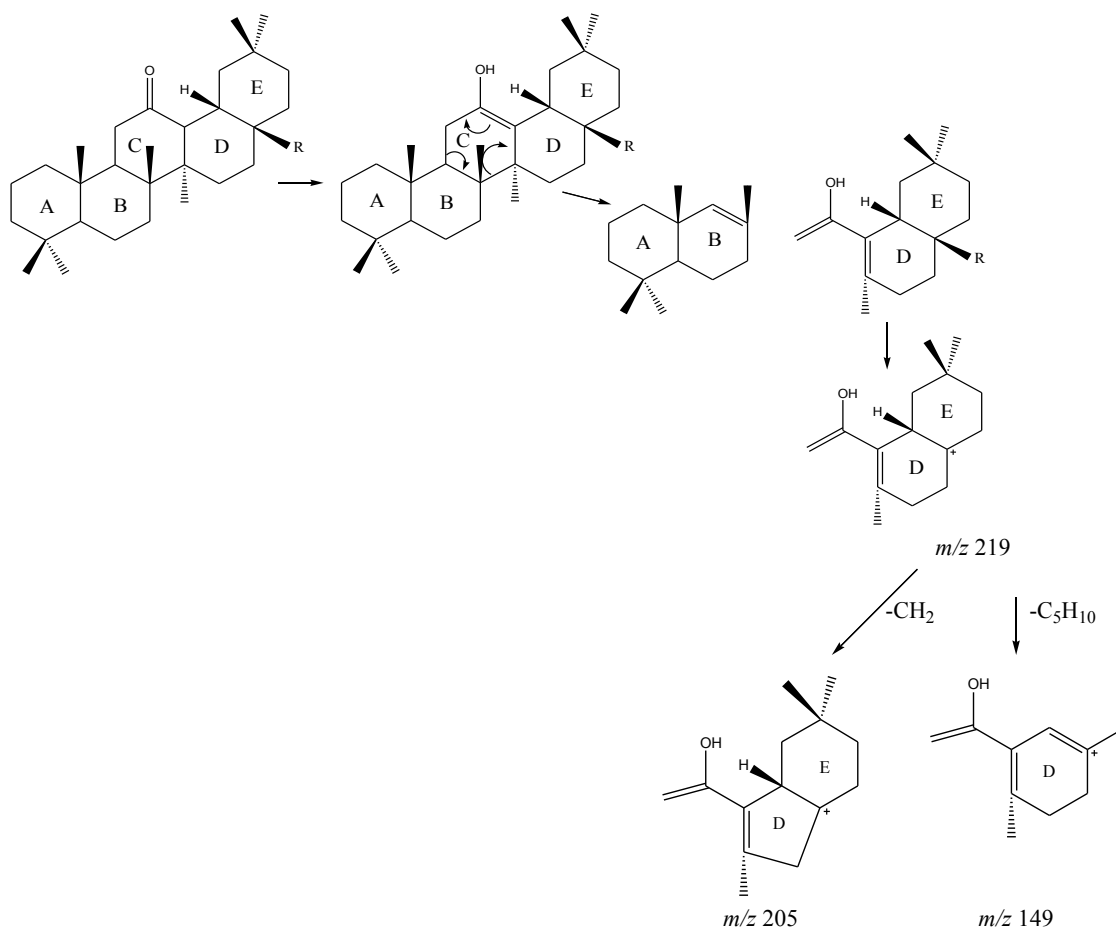


Figura 2.14: Fragmentação rDA do anel C para 12-oxo-oleananos (esquema adaptado de Amir, 2011).

2.2.2.1. Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico

Por forma a determinar o perfil de fragmentação característico para derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico (1), três novos compostos (2, 3 e 4)⁸ foram analisados por espectrometria

de massa, utilizando dois modos de ionização distintos: à pressão atmosférica, por *electrospray* (*ESI*) e por impacto eletrónico (*EI*).

Composto 1 (Ácido 3-β-hidroxi-olea-12-en-28-óico)

O ácido oleanólico (composto 1) foi analisado por espetrometria de massa, com ionização por *electrospray* (*ESI*), em modo ião positivo, e os espectros resultantes são apresentados na Figura 2.15.

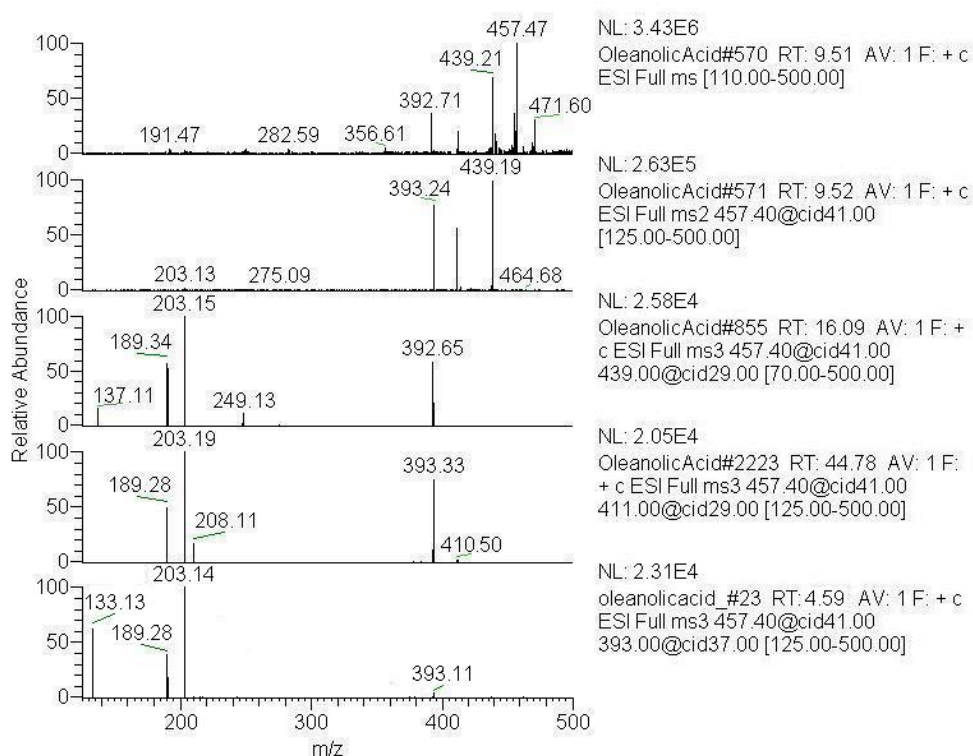


Figura 2.15: Espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2*, *MS3*), do composto 1, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

No primeiro estágio de fragmentação (*MS*), podemos observar o sinal do ião molecular a m/z 457 ($|(M+H)|^+$) e os fragmentos principais a m/z 439, 411 e 393.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*) para o ião molecular obtido no primeiro estágio de *MS* (m/z 457), observamos os sinais a m/z 439(100), 411 e 393 que correspondem, possivelmente, à perda de uma molécula de H_2O (m/z 439: $|(M+H)-H_2O|^+$), de uma molécula de $HCOOH$ (m/z 411: $|(M+H)-HCOOH|^+$) e de uma molécula de H_2O e outra de $HCOOH$ (m/z 393: $|(M+H)-H_2O-HCOOH|^+$), respetivamente.³⁸⁻⁴⁴

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) para o ião maioritário de *MS2*, m/z 439, aparecem cinco sinais a m/z 393, 249, 203(100), 190 e 189, cujo possível padrão de fragmentação poderá corresponder, respetivamente, a uma perda de HCOOH (m/z : 393, $|(M+H)-H_2O-HCOOH|^+$), à FrDA do anel C dos fragmentos a m/z 439 (m/z 249 e m/z 190) e m/z 393 (m/z 203 e m/z 190)^{9, 38-44} e à posterior decomposição de m/z 203 por perda de CH₂ (m/z 189).

Ao ser realizado o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) para m/z 411, outro ião que, embora não maioritário, está presente, também, no *MS2*, verificamos a existência de quatro sinais a m/z 393, 208, 203(100) e 189, que podem corresponder ao seguinte padrão de fragmentação: a uma perda de H₂O (m/z : 393, $|(M+H)-HCOOH-H_2O|^+$), à FrDA do anel C (m/z 208 e m/z 203)^{9, 38-44} e à decomposição de m/z 203 por perda de CH₂ (m/z 189).

Quando realizamos outra terceira fragmentação (*MS3*), mas desta vez para o sinal m/z 393, outro dos fragmentos de *MS2*, verificamos a existência de quatro sinais a m/z 203(100), 190, 189 e 133, cujo padrão de fragmentação poderá corresponder, respetivamente, à FrDA do anel C⁹ (m/z 203 e m/z 190) e à posterior decomposição de m/z 203, por perda de CH₂ (m/z 189) e por clivagem do anel E (m/z 133).

Tendo por base os espectros de massa *tandem* obtidos para o ácido oleanólico (Figura 2.15), o seu possível padrão de fragmentação poderá corresponder ao descrito na Figura 2.16.

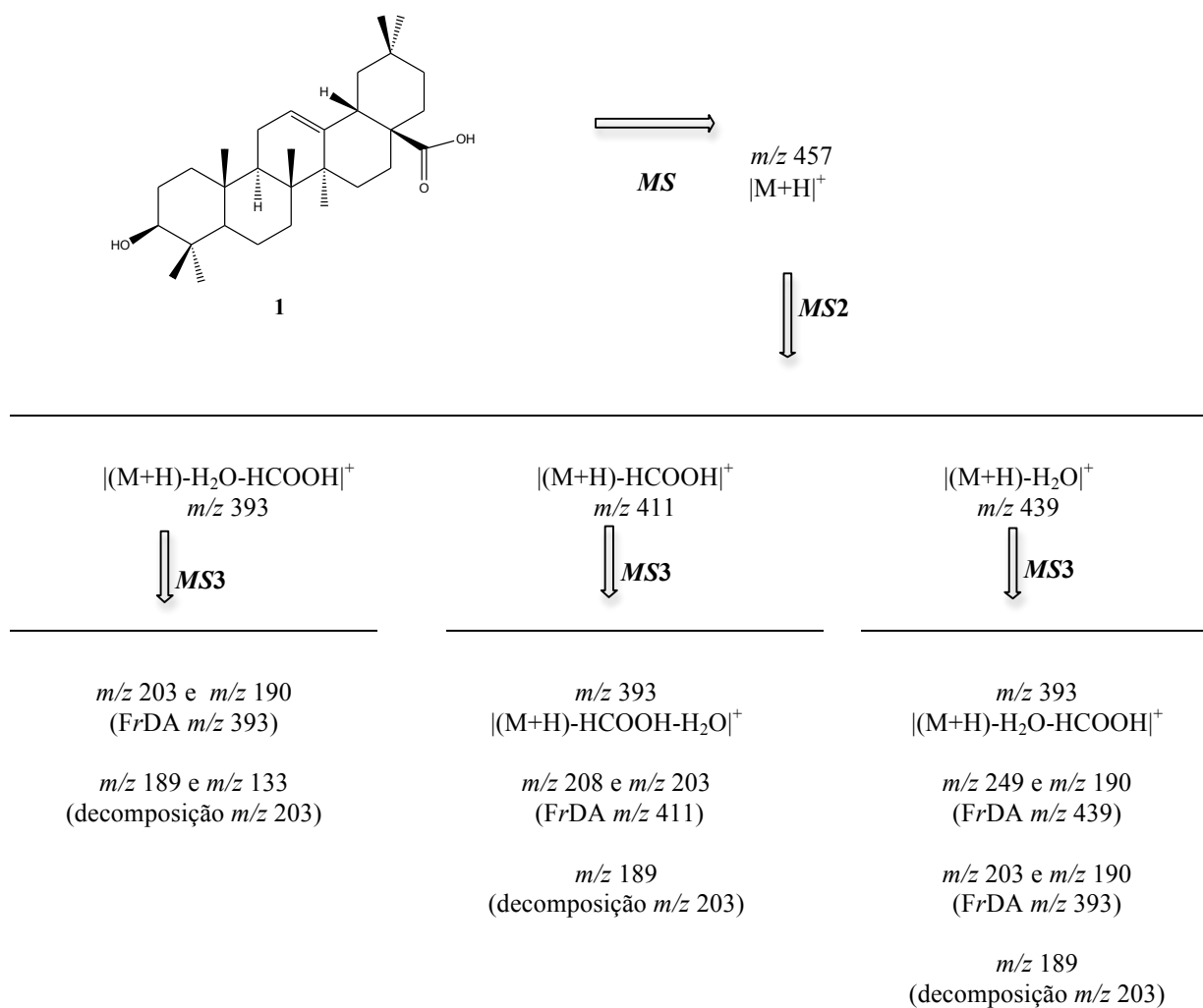


Figura 2.16: Proposta de fragmentação do ácido oleanólico por ionização à pressão atmosférica, por *electrospray* (ESI), em modo ião positivo.

Composto 2 (Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-3-oxo-olea-12-en-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (MS, MS2 e MS3) do composto 2, obtido por ESI, em modo ião positivo, é apresentado na Figura 2.17.

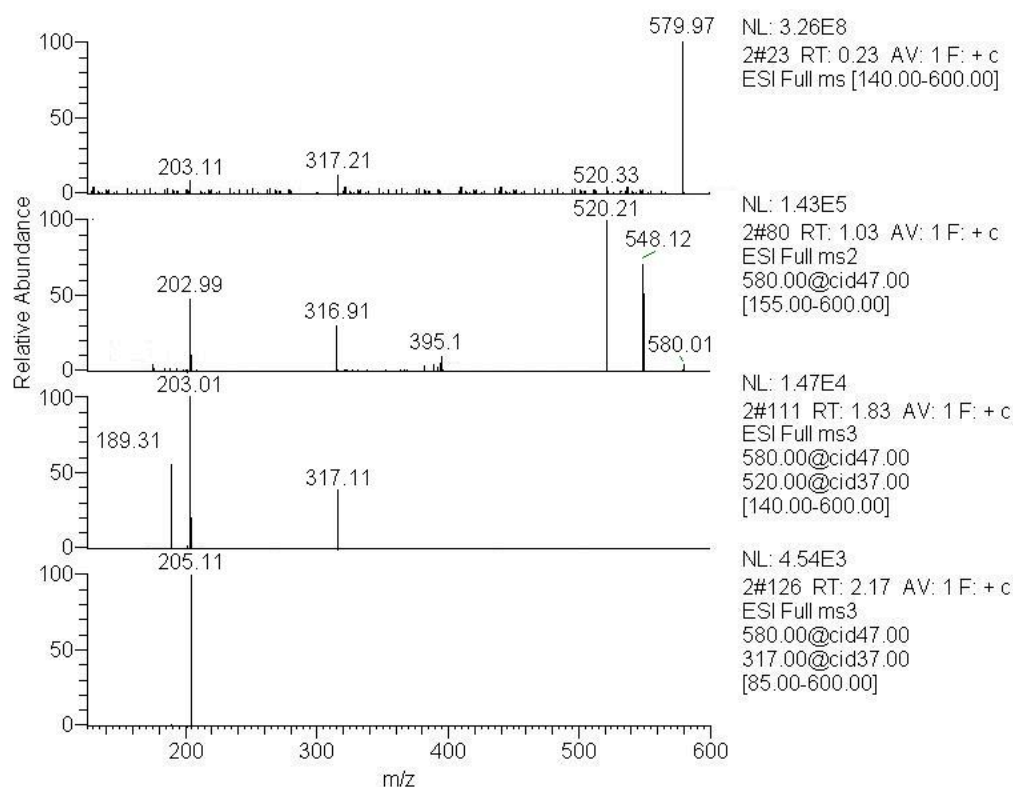


Figura 2.17: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **2**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

No primeiro espectro de *MS*, que nos dá a indicação da relação *m/z* do ião molecular, observamos um sinal com abundância relativa de 100% a *m/z* 580, $[M+H]^+$, o que evidencia um acréscimo de 123 u.m.a. relativamente à molécula do ácido oleanólico.

O segundo espectro (*MS2*), resultante da fragmentação do ião mais abundante em *MS* (*m/z* 580), permite-nos verificar que o ião molecular ao sofrer uma nova fragmentação, conduz à formação dos “iões filhos” a *m/z* 549, 548, 520(100), 317 e 203, nenhum dos quais correspondente à perda de H_2O , e cujo padrão de fragmentação poderá corresponder, respetivamente, à perda de $^-\text{OCH}_3$ (*m/z* 549: $|(M+H)-\text{OCH}_3|^+$), HOCH_3 (*m/z* 548: $|(M+H)-\text{HOCH}_3|^+$), mas principalmente a uma perda de 60 u.m.a., 14 u.m.a. superior à perda no ácido oleanólico, provavelmente correspondente a HCOOCH_3 (*m/z* 520: $|(M+H)-\text{HCOOCH}_3|^+$). A fragmentação deste ião origina os sinais a *m/z* 317 e 203 resultantes da *FrDA* do anel C,^{9, 38-42} tal como é confirmado no *MS3*.

De facto, na terceira fragmentação, em que o “ião filho” mais abundante em *MS2*, a *m/z* 520,

é fragmentado, formaram-se os sinais a m/z 317, 203(100) e 189, eventualmente resultantes de uma FrDA do anel C, sendo o sinal a m/z 317 referente aos anéis A e B e a m/z 203 relacionado com a perda destes mesmos anéis. A m/z 189 ocorre um sinal correspondente à decomposição do fragmento m/z 203 por perda de CH_2 .

Uma nova fragmentação MS3, para o “ião filho” a m/z 317 origina o sinal a m/z 205, resultante de uma perda de 112 u.m.a, que pode corresponder a um substituinte com fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ localizado no anel A.

Conseqüentemente, o acréscimo de massa molecular do composto **2**, relativamente ao ácido oleanólico, pode dever-se à introdução de um substituinte com fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ localizado no anel A, assim como à presença de uma função cetona em C-3, em substituição do grupo hidroxilo presente no ácido oleanólico, para além da presença de uma função éster em C-17, responsável pela ocorrência do fragmento a m/z 520, predominante no MS2, em oposição à função ácido carboxílico do ácido oleanólico nesta mesma posição. Esta hipótese estrutural (Figura 2.18) foi confirmada pela análise do respetivo espectro de RMN- ^1H (Figura 2.68, página 89).

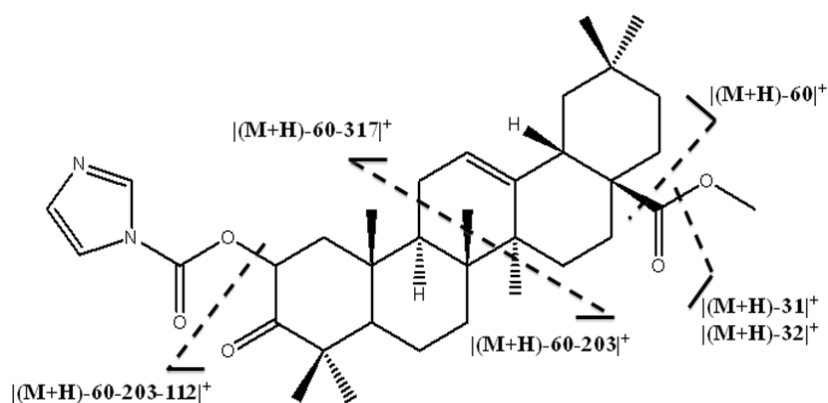


Figura 2.18: Padrão de fragmentação do composto **2**.

Por impacto electrónico, o espectro de massa de 1ª ordem do composto **2**, representado na Figura 2.19, apresenta alguns dos fragmentos de interesse para a elucidação estrutural que foi previamente discutida.

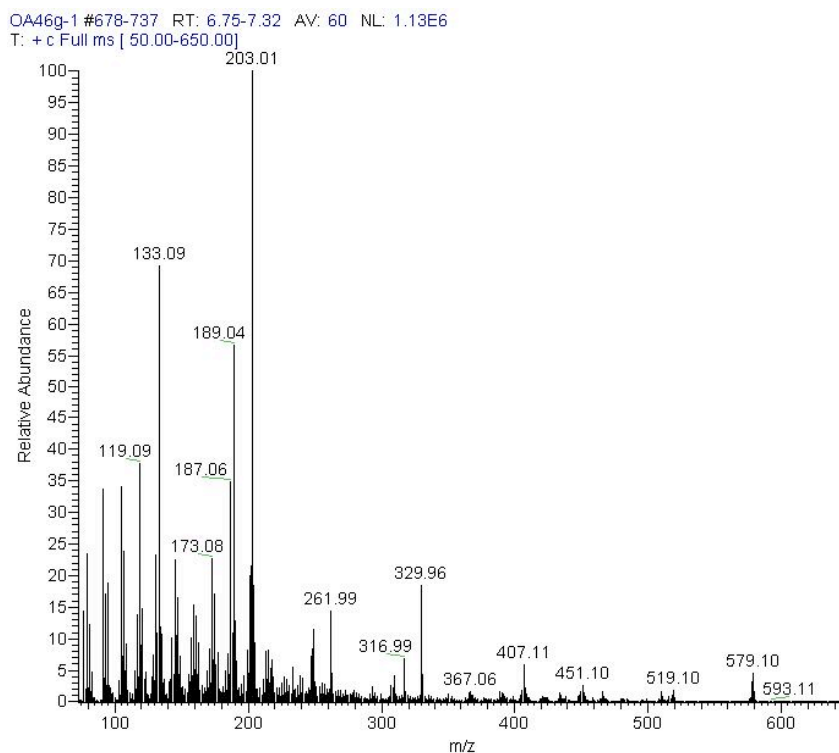


Figura 2.19: Espetro de massa do composto **2**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

Da sua observação, verifica-se a presença do ião molecular a 579 (M^+) e dos sinais a m/z 519, 317, 262, 203(100), 189 e 133 que, de acordo com a análise de massa *tandem* feita, anteriormente, e com o descrito na literatura para compostos similares,⁹ poderá corresponder, respetivamente, a uma perda do grupo $HCOOCH_3$ em C-17 (m/z : 519, $[M-HCOOCH_3]^+$), à fragmentação *rDA* do anel C (m/z : 317 e 262)⁹ e à posterior decomposição dos fragmentos resultantes (m/z 203, 189 e 133).

Com este tipo de ionização não se observam os sinais correspondentes à perda de $-OCH_3$ (m/z 548, $[M-OCH_3]^+$) e $HOCH_3$ (m/z 547, $[M-HOCH_3]^+$), ao contrário do que obtivemos na ionização por *electrospray* (m/z 549 e 548). Tal situação poderá ter como justificação o facto do impacto eletrónico ser um tipo de ionização “mais drástica” e, por isso, produzir um maior número de fragmentos com baixa relação m/z .

Composto 3 (Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxo-olea-12-en-28-oato)

O espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **3**, obtido por *ESI*, em modo ião positivo, é apresentado na Figura 2.20.

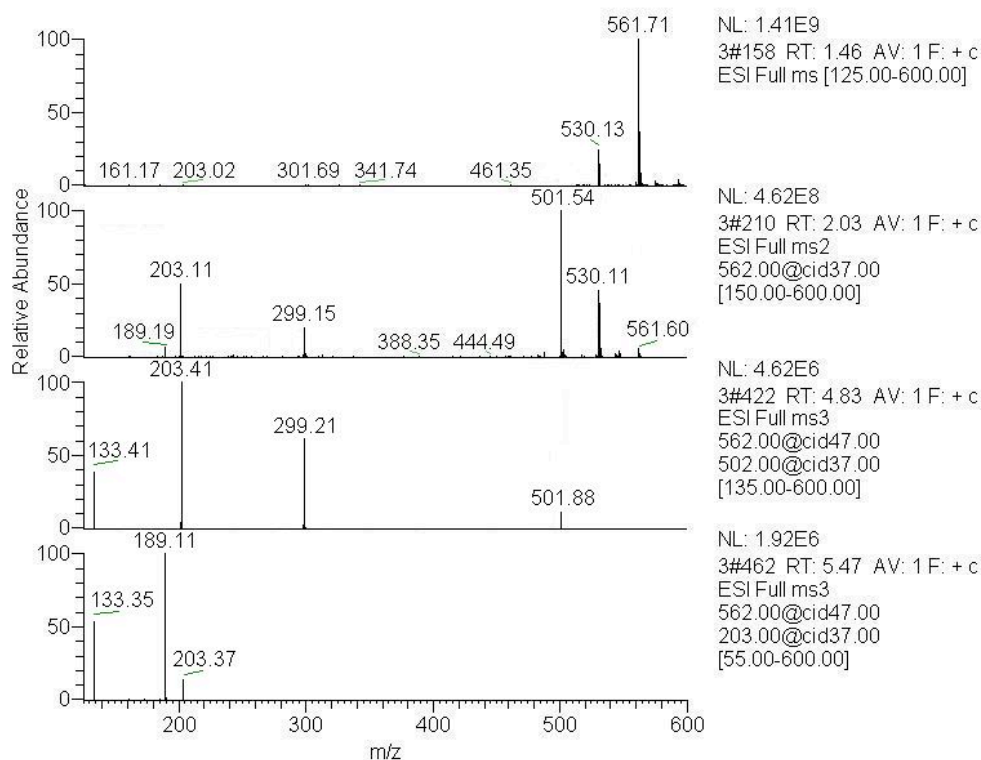


Figura 2.20: Espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **3**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

Da sua observação, podemos ver para primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do ião molecular a m/z 562 ($|(M+H)|^+$), que difere 105 u.m.a. do ácido oleanólico e 18 u.m.a. do composto anterior, não se tendo registado o fragmento correspondente à perda de água.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*) para o ião molecular obtido em *MS*, observamos os sinais a m/z 531, 530, 502(100), 299, 203 e 189 que correspondem, respetivamente, à perda de uma molécula de $-OCH_3$ (m/z 531: $|(M+H)-OCH_3|^+$); de $HOCH_3$ (m/z 530: $|(M+H)-HOCH_3|^+$); de $HCOOCH_3$ (m/z 502: $|(M+H)-HCOOCH_3|^+$), fragmentação igual à do composto **2**; à *FrDA* do anel C (*FrDA* m/z 502: m/z 299 e 203)^{9, 38-45} e à posterior decomposição de m/z 203 por perda de CH_2 (m/z 189).

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) para o ião maioritário de *MS2*, m/z 502, observamos três sinais a m/z 299, 203 e 133 cujo possível padrão de fragmentação poderá corresponder à *FrDA* do anel C,^{9, 38-45} m/z 299 e 203, e à posterior decomposição de m/z 203 por clivagem do anel E (m/z 133), o que é confirmado num novo *MS3* para m/z 203.

É de realçar que na fragmentação *rDA*, apenas o ião correspondente aos anéis A e B (m/z 299) difere do composto **2** (m/z 317), com uma redução de 18 u.m.a., valor igual à diferença dos seus pesos moleculares, o que sugere ser nesta parte da estrutura que ocorre uma substituição diferente que poderá corresponder à presença do substituinte $C_5H_6N_2$ no anel A (Figura 2.21), tendo sido esta hipótese estrutural confirmada pela análise do espectro de RMN- 1H do composto **3** (Figura 2.69, página 89).

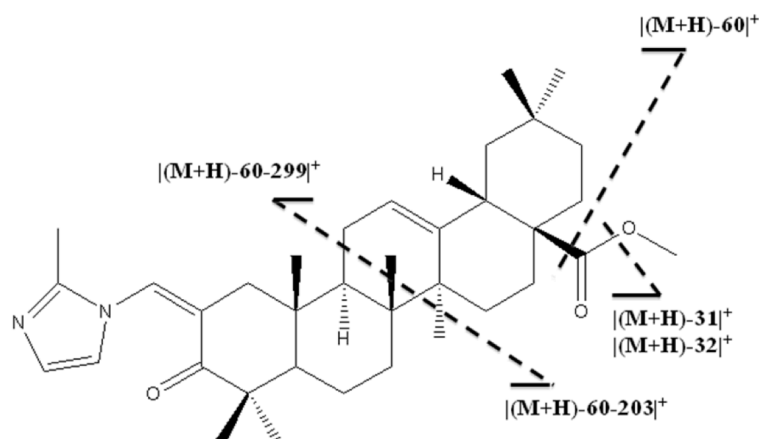


Figura 2.21: Padrão de fragmentação do composto **3**.

Ao realizarmos a análise do composto **3**, por impacto eletrónico, obtém-se o espectro que se pode observar na Figura 2.22.

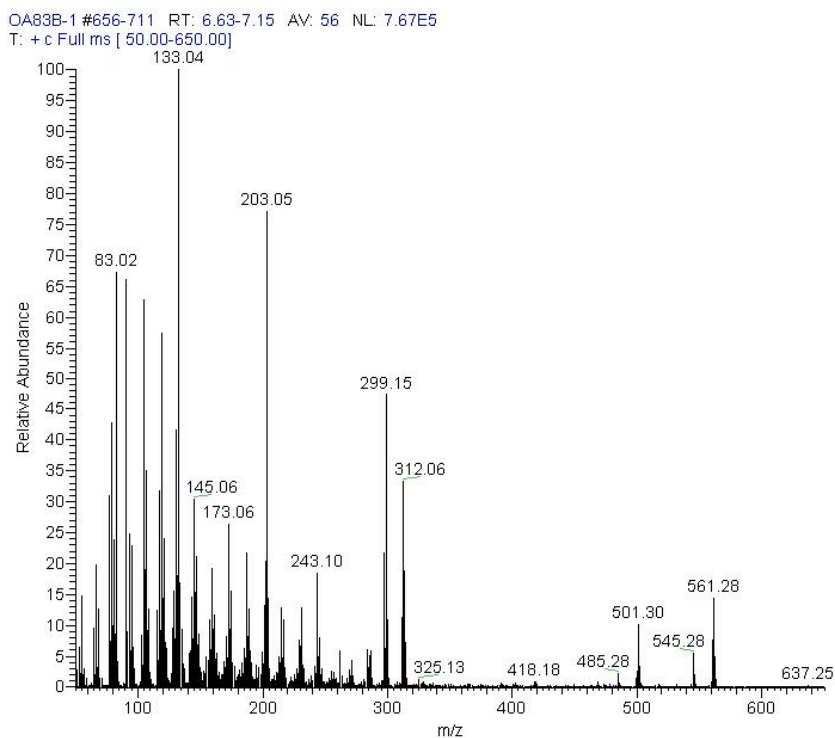


Figura 2.22: Espectro de massa do composto **3**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

A sua observação permite-nos verificar a presença do ião molecular, M^+ , a m/z 561, e dos fragmentos a m/z 501, 299, 203 e 133(100) que, de acordo com o descrito, poderá corresponder, respetivamente, a uma perda do grupo $HCOOCH_3$ em C-17 (m/z : 501, $[M-HCOOCH_3]^+$), à FrDA do anel C (m/z : 299 e 203) e à posterior clivagem do anel E a m/z 203 (m/z 133).

Composto 4 (Metil 3-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-12-oxo-oleanan-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (MS , MS_2 e MS_3) do composto 4, obtido por ESI , em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.23.

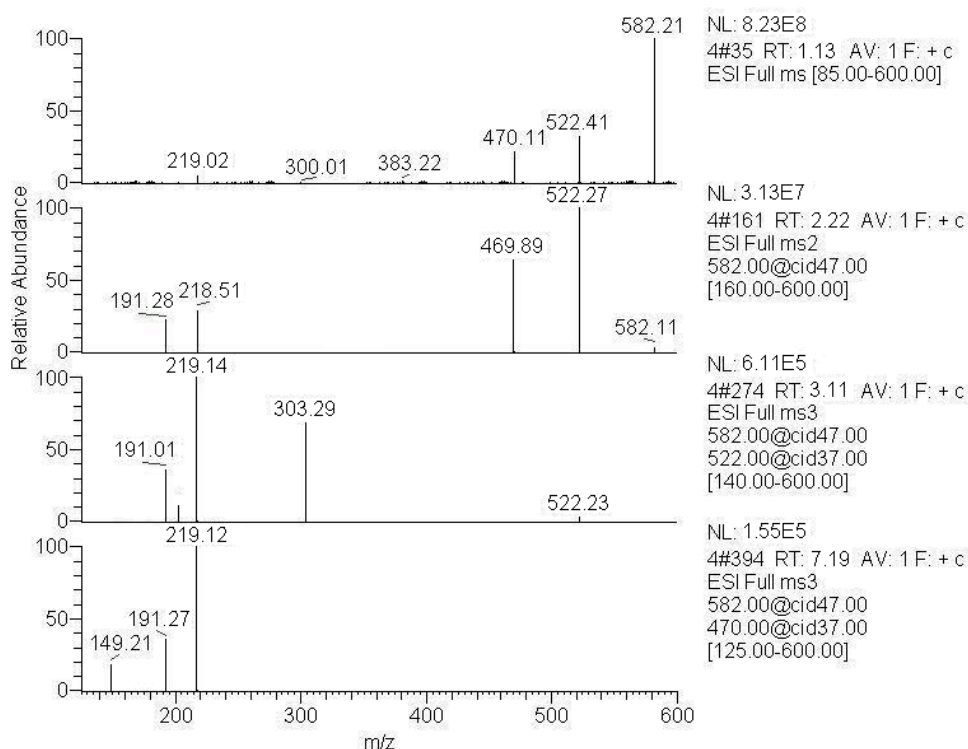


Figura 2.23: Espectro de massa *tandem* (MS , MS_2 e MS_3), do composto 4, obtido por ESI em modo ião positivo.

No primeiro ciclo de fragmentação (MS), o sinal do ião molecular a m/z 582 ($[M+H]^+$) difere do composto 2 em 2 u.m.a. e do ácido oleanólico em 125 u.m.a..

Ao fazermos o segundo ciclo (MS_2) para o ião molecular obtido em MS , observamos os sinais a m/z 522, 470, 219 e 191. O primeiro fragmento, com uma intensidade relativa de 100%,

corresponde à perda de 60 u.m.a. (m/z 522: $|(M+H)-HCOOCH_3|^+$), tal como se verificou nos compostos **2** e **3**. Quanto ao fragmento m/z 470, o segundo mais representativo na MS_2 , resulta de uma perda de 112 u.m.a. o que, à semelhança do registado no composto **2**, pode corresponder a um substituinte $C_4H_4N_2O_2$.

Com o terceiro ciclo de fragmentação (MS_3) para o ião maioritário de MS_2 , m/z 522, observamos quatro sinais a m/z 303, 219(100), 205 e 191 cujo possível padrão de fragmentação poderá corresponder à $FrDA$ do anel C (m/z 303 e 219), podendo o sinal a m/z 219 ser indicativo de uma estrutura do tipo 12-oxo-oleanano.⁹ Os outros dois sinais correspondem à decomposição dos fragmentos de m/z 303 e 219 por perda, respetivamente, do seu substituinte $C_4H_4N_2O_2$ (m/z 303 \rightarrow m/z 191) e CH_2 (m/z 219 \rightarrow m/z 205).

Um novo MS_3 , desta vez para m/z 470, conduziu à formação dos sinais a m/z 219(100), 191 e 149, o que poderá corresponder à $FrDA$ do anel C (m/z 219 e 191) e à posterior decomposição de m/z 219 por clivagem do seu anel E (m/z 149).

A ausência do fragmento correspondente à perda de H_2O no composto **4**, em contraste no que se observa no ácido oleanólico, e a diferença de 14 u.m.a. resultante da $FrDA$ do composto **4** (m/z 191), relativamente à do composto **2** (m/z 205), são indicativas, respetivamente, da ausência dos grupos hidroxilo e cetona em C-3. Por outro lado, o acréscimo de 16 u.m.a. no fragmento resultante da $FrDA$ do composto **4**, que inclui os anéis D e E (m/z 219), em relação à do ácido oleanólico e do composto **2** (m/z 203) é indicativo da presença de uma função cetona adicional. Esta fragmentação sugere a estrutura ilustrada na Figura 2.24.

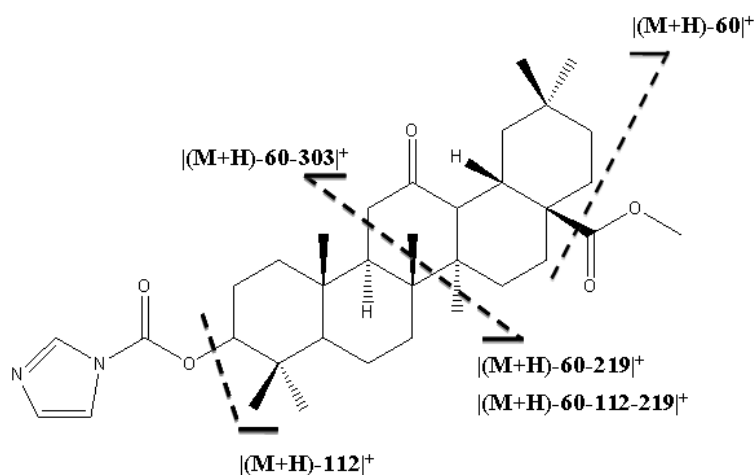


Figura 2.24: Padrão de fragmentação do composto **4**.

O espectro de massa, por impacto eletrônico, do composto **4** está representado na Figura 2.25.

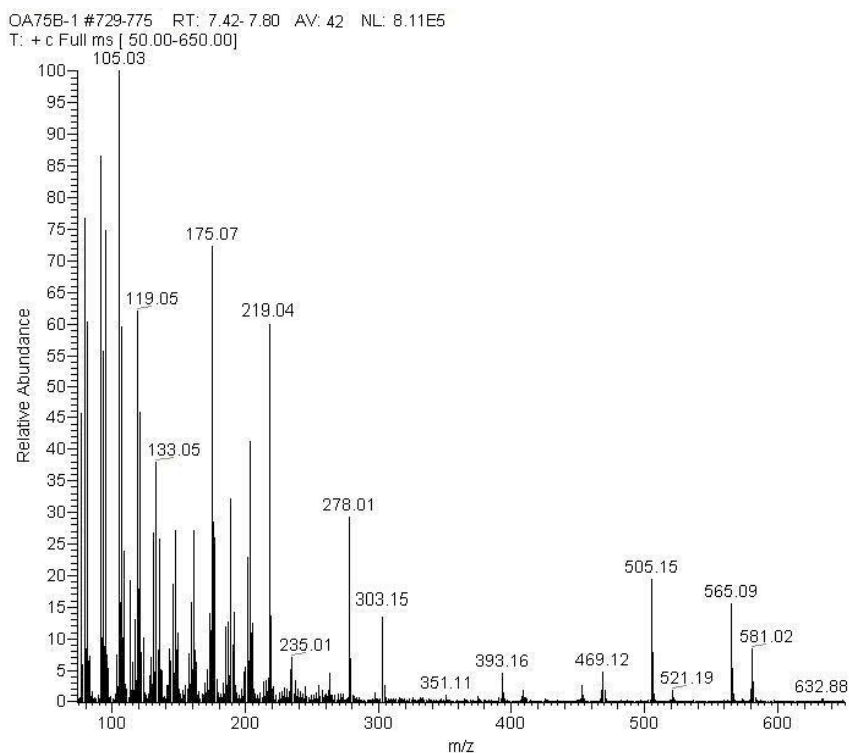


Figura 2.25: Espectro de massa do composto **4**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

A sua análise permite-nos verificar a presença do ião molecular a 581 (M^+) e os fragmentos a m/z 521, 469, 303, 278 e 219, o que está de acordo com o observado nos espectros de massa *tandem* para o mesmo composto.

Na tabela 2.1 são apresentados os sinais m/z característicos dos espectros de massa, por *ESI* e *EI*, em modo ião positivo, do ácido oleanólico (**1**) e dos seus três derivados semi-sintéticos (**2-4**).

Tabela 2.1: Características do espectro de massa (*ESI* e *EI*) dos derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico.

	Fragmentação	Caraterização estrutural
1 (AO)	<i>ESI</i>	
	<i>MS</i> : 457 (100) $[M+H]^+$	<i>m/z</i> 439 (perda de H ₂ O <> OH em C-3)
	<i>MS2</i> (457): 439 (100), 411 (56), 393 (78), 203 (3)	<i>m/z</i> 411 (perda do substituinte em C-17)
	<i>MS3</i> (457, 439): 393 (60), 249 (11), 203 (100), 190 (55), 189 (59)	FrDA <i>m/z</i> 439 (<i>m/z</i> 249 e 190)
	<i>MS3</i> (457, 411): 393 (75), 208 (19), 203 (100), 189 (49)	FrDA <i>m/z</i> 411 (<i>m/z</i> 208 e 203)
	<i>MS3</i> (457, 393): 203 (100), 190 (19), 189 (43) e 133 (63)	FrDA <i>m/z</i> 393 (<i>m/z</i> 203 e 190)
		<i>m/z</i> 203 <> 12-oleaneno
2	<i>ESI</i>	
	<i>MS</i> : 580 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 123 u.m.a. em relação ao AO
	<i>MS2</i> (580): 549 (53), 548 (73), 520 (100), 317 (31), 203 (49)	perda do substituinte em C-17
	<i>MS3</i> (580, 520): 317 (38), 205 (21), 203 (100), 189 (56)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (580, 317): 205 (100)	FrDA <i>m/z</i> 520 (<i>m/z</i> 317 e 203)
		<i>m/z</i> 203 <> 12-oleaneno
<i>EI</i>	<i>MS</i> : 579 (5) M ⁺ , 519 (2), 317 (8), 262 (14), 203 (100), 189 (57), 133 (69)	<i>m/z</i> 205 (perda do substituinte em C-2 de <i>m/z</i> 317)
3	<i>ESI</i>	
	<i>MS</i> : 562 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 105 u.m.a. em relação ao AO
	<i>MS2</i> (562): 531 (24), 530 (46), 502 (100), 299 (21), 203 (50), 189 (7)	perda do substituinte em C-17
	<i>MS3</i> (562, 502): 299 (63), 203 (100), 133 (38)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (562, 203): 189 (100), 133 (53)	FrDA <i>m/z</i> 502 (<i>m/z</i> 299 e 203)
		<i>m/z</i> 203 <> 12-oleaneno
<i>EI</i>	<i>MS</i> : 561 (14) M ⁺ , 501 (10), 299 (48), 203 (77), 133 (100)	
4	<i>ESI</i>	
	<i>MS1</i> : 582 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 125 u.m.a. em relação ao AO
	<i>MS2</i> (582): 522 (100), 470 (65), 219 (29), 191 (23)	perda do substituinte em C-17
	<i>MS3</i> (582, 522): 303 (68), 219 (100), 205 (18), 191 (37)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (582, 470): 219 (100), 191 (35), 149 (18)	FrDA <i>m/z</i> 522 (<i>m/z</i> 303 e 219)
		<i>m/z</i> 219 <> 12-oxo-oleanano
<i>EI</i>	<i>MS</i> : 581 (8) M ⁺ , 521 (2), 469 (5), 303 (12), 278 (29), 219 (59)	<i>m/z</i> 191 (perda do substituinte em C-3 de <i>m/z</i> 303)

Os fragmentos caraterísticos dos três ciclos de *MS* são apresentados a cores diferentes: lilás para o *MS*, azul para o *MS2* e verde para o *MS3*.

- 1 (AO): Ácido 3-β-hidroxi-olea-12-en-28-óico (ácido oleanólico);
 2: Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-3-oxo-olea-12-en-28-oato;
 3: Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxo-olea-12-en-28-oato;
 4: Metil 3-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-12-oxo-oleanan-28-oato.

2.2.2.2. Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico

Por forma a estabelecer a fragmentação característica de derivados preparados através da semi-síntese do ácido ursólico (**5**), treze novos compostos (**6-18**)^{3, 8} foram analisados por espectrometria de massa com dois modos de ionização distintos: à pressão atmosférica por *electrospray* (*ESI*) e por impacto eletrónico (*EI*).

Composto 5 (Ácido 3-β-hidroxi-urs-12-en-28-óico)

O ácido ursólico (composto **5**) foi analisado por espectrometria de massa *tandem*, com ionização por *electrospray* (*ESI*), em modo ião positivo, e os espectros resultantes são apresentados na Figura 2.26.

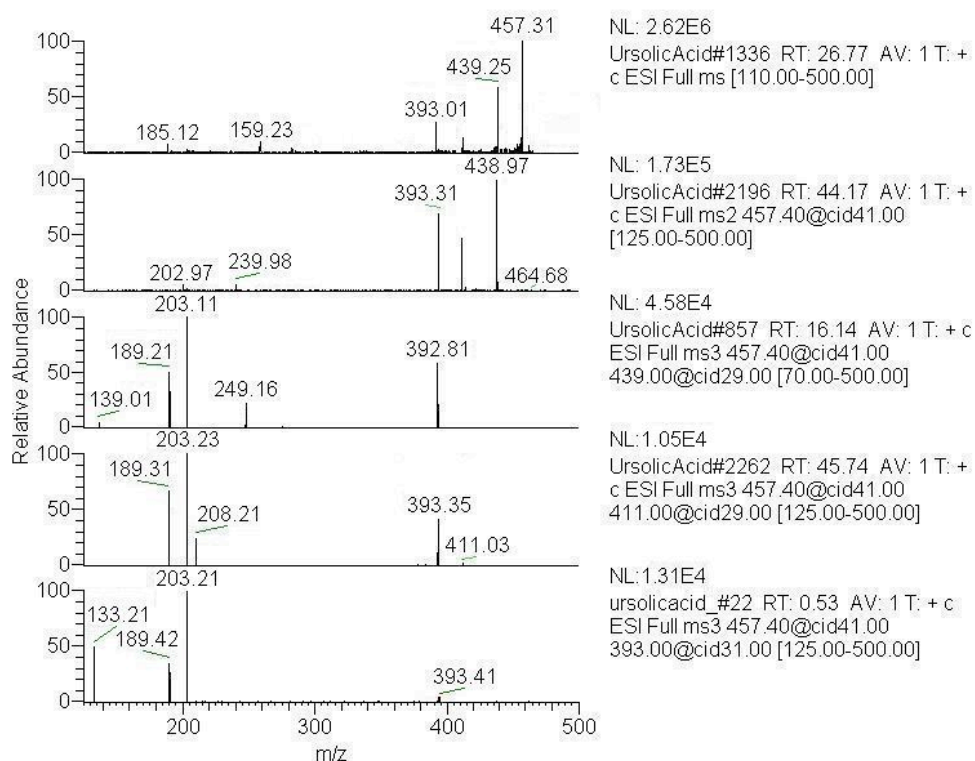
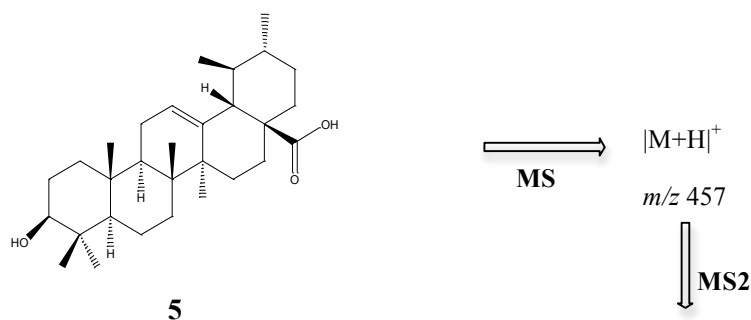


Figura 2.26: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do ácido ursólico obtido por *ESI*, em modo ião positivo.

A sua observação permite-nos verificar um padrão de fragmentação (Figura 2.27) semelhante ao apresentado pelo ácido oleanólico (Figura 2.15, página 35).



$ (M+H)-18-46 ^+$ m/z 393 \Downarrow MS3	$ (M+H)-46 ^+$ m/z 411 \Downarrow MS3	$ (M+H)-18 ^+$ m/z 439 \Downarrow MS3
$ (M+H)-18-46-190 ^+$ m/z 203 $ (M+H)-18-46-203 ^+$ m/z 190 $ (M+H)-18-46-190-14 ^+$ m/z 189 $ (M+H)-18-46-190-70 ^+$ m/z 133	$ (M+H)-46-18 ^+$ m/z 393 $ (M+H)-46-203 ^+$ m/z 208 $ (M+H)-46-208 ^+$ m/z 203 $ (M+H)-46-208-14 ^+$ m/z 189	$ (M+H)-18-46 ^+$ m/z 393 $ (M+H)-18-190 ^+$ m/z 249 $ (M+H)-18-249 ^+$ m/z 190 $ (M+H)-18-46-190 ^+$ m/z 203 $ (M+H)-18-46-203 ^+$ m/z 190 $ (M+H)-18-46-190-14 ^+$ m/z 189

Figura 2.27: Proposta de fragmentação do ácido ursólico por ionização à pressão atmosférica, por *electrospray* (ESI), em modo ião positivo.

No MS de 1ª ordem o sinal com uma abundância relativa de 100%, a m/z 457, corresponde ao ião molecular ($[M+H]^+$), cuja fragmentação em MS2 origina os sinais a m/z 439, 411 e 393, que são indicativos das perdas, respetivamente, de 18 u.m.a. (m/z 439: $|(M+H)-18|^+$), de 46 u.m.a. (m/z 411: $|(M+H)-46|^+$) e de 64 u.m.a. (m/z 393: $|(M+H)-18-46|^+$). O fragmento mais abundante em MS2, m/z 439, ao sofrer um novo ciclo de fragmentação (MS3), origina os sinais a m/z 249, 203, 190 e 189 devido à FrDA do anel C (m/z 249 e 203) e posterior decomposição de m/z 203 por perda de 14 u.m.a. (m/z 189) e 70 u.m.a. (m/z 133).⁴⁴

Composto 6 (3 β -acetoxi-urs-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **6**, obtido por *ESI*, em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.28.

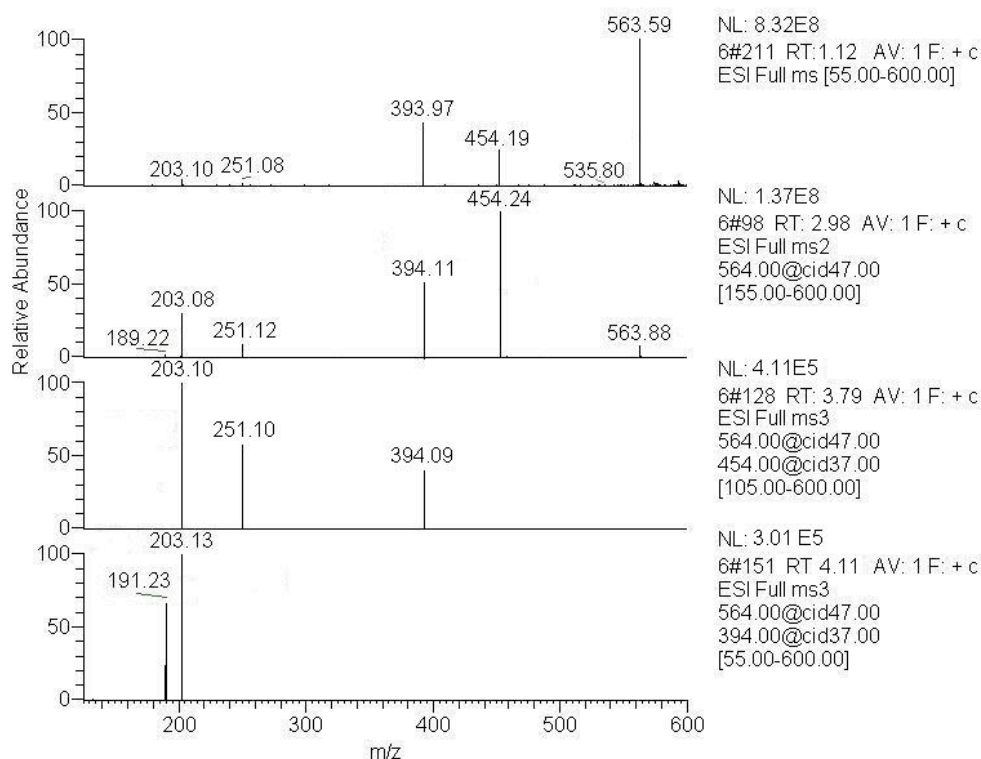


Figura 2.28: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*), do composto **6**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

Da sua observação, podemos ver para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do ião molecular a m/z 564 ($[M+H]^+$) que evidencia um acréscimo de 107 u.m.a. em relação à molécula de ácido ursólico.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*) para o ião molecular obtido em *MS*, não se verificou nenhum sinal resultante da perda de água, sugerindo a ausência do grupo hidroxilo em C-3. De facto, os dois sinais mais significativos são a m/z 454(100) e 394, que correspondem a perdas de, respetivamente, 110 u.m.a e 170 u.m.a. (com uma diferença entre si em 60 u.m.a.) e que podem indicar o seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte com fórmula molecular $C_5H_6N_2O$ (m/z 454), seguida da sua decomposição por perda de H_3CCOOH (m/z 394).

O terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) foi feito para os dois iões mais abundantes em *MS2*, não tendo também conduzido à perda de água, o que pode indicar uma substituição na função carboxilo em C-17, do ácido ursólico. Da fragmentação do ião com m/z 454, registaram-se os sinais a m/z 394, 251 e 203(100) cujo possível padrão de fragmentação poderá corresponder à perda de H_3CCOOH (m/z 394) e à *FrDA* do anel C (m/z 251 e 203). Quanto ao ião a m/z 394, produziu os sinais a m/z 203(100), 191 e 189 que são indicativos da *FrDA* do anel C (m/z 203 e m/z 191) e posterior decomposição de m/z 203 por perda de CH_2 (m/z 189).

A comparação da *FrDA* para os dois fragmentos principais, a m/z 454 e m/z 394, permite-nos verificar, por um lado, a presença comum do sinal a m/z 203 resultante da saída dos anéis A e B, que é indicativo de uma estrutura 12-urseno e, por outro, uma diferença de 60 u.m.a entre os outros dois fragmentos que correspondem aos anéis A e B (m/z 251 e m/z 191), o que sugere a presença do substituinte H_3CCOOH nesta parte da molécula. A perda inicial de 110 u.m.a, observada só em *MS2*, e a presença do sinal a m/z 203 devido à *FrDA* do anel C e à consequente perda dos anéis A e B, sugere, relativamente ao ácido ursólico, a presença, em C-17, do substituinte com fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (Figura 2.29).

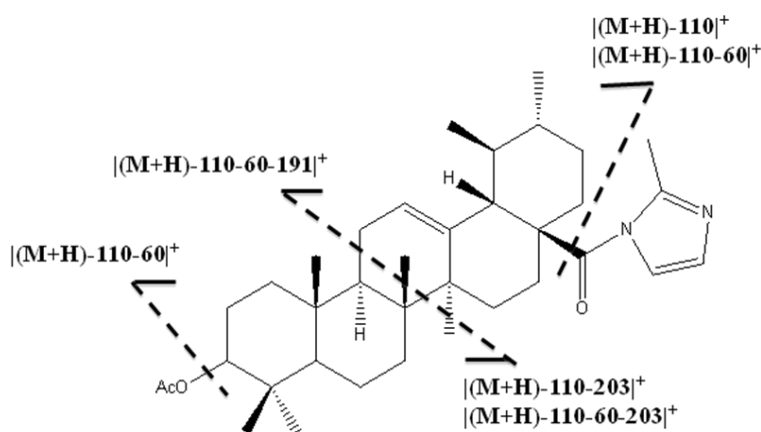


Figura 2.29: Padrão de fragmentação do composto 6.

Ao realizarmos a análise do composto 6, por impacto eletrónico, obtém-se o espetro apresentado na Figura 2.30.

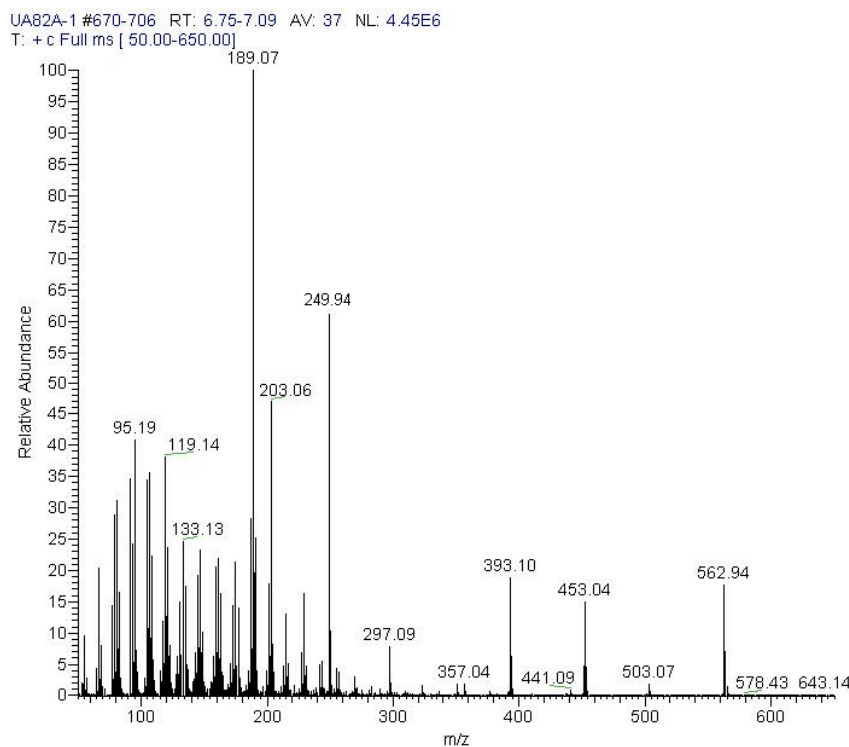


Figura 2.30: Espectro de massa do composto **6**, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

Da sua observação, pode-se verificar a presença do íon molecular a m/z 563 (M^+) e dos sinais a m/z 503, 453, 393, 250, 203, 189(100) e 133 que, de acordo com os dados obtidos com a espectrometria de massa *tandem* poderá corresponder ao seguinte padrão de fragmentação: m/z 503 ($[M-H_3CCOOH]^+$), 453 ($[M-C_5H_6N_2O]^+$), 393 ($[M-C_5H_6N_2O-H_3CCOOH]^+$), à FrDA do anel C (m/z 250 e 203) e posterior decomposição de m/z 203 (m/z 189).

Composto 7 (3 β -acetoxi-11-oxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (MS, MS2 e MS3) do composto **7**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo é apresentado na Figura 2.31.

Para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), observa-se o sinal do íon molecular a m/z 564 ($[M+H]^+$), que difere 107 u.m.a. relativamente ao ácido ursólico e é igual ao do composto **6**.

No entanto, o segundo ciclo (*MS2*) para o íon molecular obtido em *MS*, m/z 564, do composto **7**, origina fragmentos distintos dos do composto **6**, nomeadamente a m/z 504, 468(100) e 408, aos quais correspondem perdas de, respetivamente, 60 u.m.a. (tal como se observou no

composto **6**, que poderá ser indicativo da presença do mesmo substituinte, o H_3CCOOH), e, principalmente, perdas de 96 u.m.a e 156 u.m.a., que diferem entre si em 60 u.m.a..

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), para o ião maioritário de *MS2* (m/z 468), observam-se os sinais a m/z 408, 251, 217(100), 191 e 189 cujo possível padrão de fragmentação poderá corresponder: à perda de H_3CCOOH (m/z 408), à *FrDA* do anel C (m/z 251 e 217), sendo o sinal a m/z 251, igual ao detetado no *MS3* do composto **6**, enquanto o sinal a m/z 217, relativamente aos anéis C e D, regista um acréscimo de 14 u.m.a. Quanto aos restantes sinais, resultam de uma posterior decomposição do fragmento a m/z 217 por perda de C_2H_4 (m/z 217 \rightarrow m/z 189), o que é comprovado pelo *MS3* realizado para m/z 217, e à perda de H_3CCOOH do fragmento a m/z 251 (m/z 251 \rightarrow m/z 191).

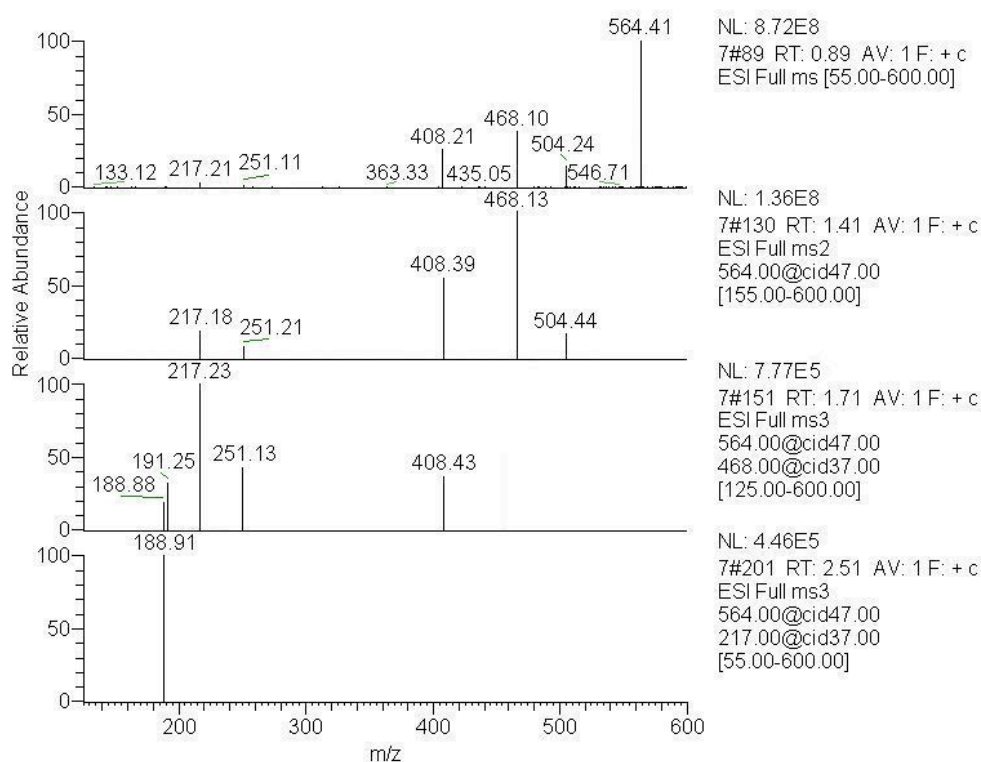


Figura 2.31: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **7**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

A comparação do fragmento proveniente da *FrDA* do anel C, que inclui os anéis A e B, do composto **7** (m/z 251) com o do composto **6** (m/z 251) sugere que esta porção da molécula é igual, ou seja, possui como substituinte o H_3CCOOH (Figura 2.32), o que é apoiado pela perda em *MS2* de 60 u.m.a (m/z 504) e pela diferença de 43 u.m.a. relativamente ao sinal do ácido ursólico para estes mesmos anéis (m/z 208).

Por outro lado, o acréscimo de 14 u.m.a. no outro fragmento resultante da FrDA do composto 7, que inclui os anéis D e E (m/z 217), em relação ao composto 6 (m/z 203) é indicativo da presença de uma função cetona conjugada com a dupla ligação em C-12 (Figura 2.32).

A perda inicial de 96 u.m.a., a que corresponde a presença do sinal mais abundante em MS2 (m/z 468), a existência do sinal a m/z 217 devido à FrDA do anel C e o facto da porção da molécula que inclui os anéis A e B ser igual nos compostos 6 e 7, sugere a presença de um substituinte, na função carboxilo em C-17, com fórmula $C_4H_4N_2O$ (Figura 2.32), tendo sido esta hipótese comprovada pelos dados de RMN- 1H (Figura 2.75, página 94) e RMN- ^{13}C (Figura 2.76, página 95 e Figura 2.77, página 96).

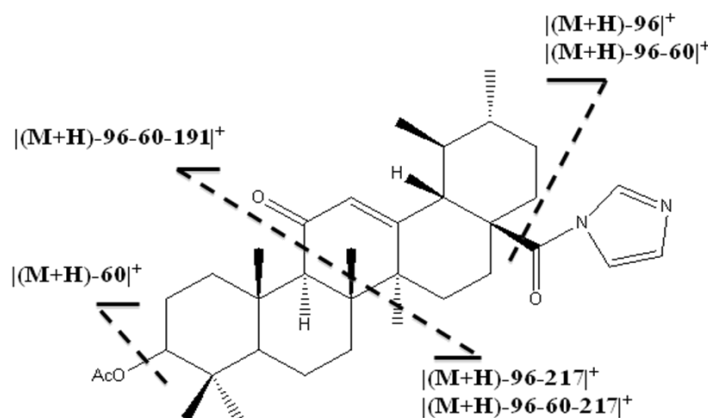


Figura 2.32: Padrão de fragmentação do composto 7.

Ao realizarmos a análise do composto 7, por impacto electrónico, obtem-se o espectro apresentado na Figura 2.33, cuja observação nos permite verificar a presença do ião molecular a m/z 563 (M^+) e dos sinais a m/z 503, 467, 407, 251, 216 e 189(100) que, de acordo com os dados obtidos com a espectrometria de massa *tandem*, poderá corresponder ao seguinte padrão de fragmentação: m/z 503 ($|M-H_3CCOOH|^+$), m/z 467 ($|M-C_4H_4N_2O|^+$), 407 ($|M-C_4H_4N_2O-H_3CCOOH|^+$), m/z 251 e 21 (FrDA do anel C) e à posterior decomposição do fragmento a m/z 216 (m/z 189).

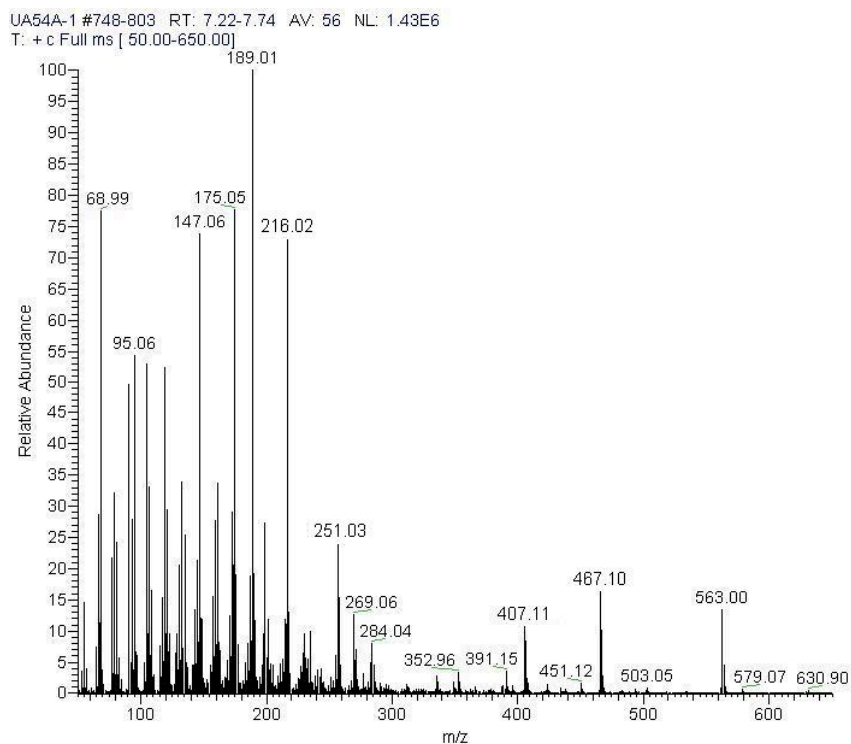


Figura 2.33: Espectro de massa do composto 7, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

Composto 8 (3-oxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto 8, obtido por *ESI*, em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.34.

Da sua observação, podemos ver para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do ião molecular a m/z 506 ($[M+H]^+$), que, em relação ao ácido ursólico e ao composto 6, difere, respetivamente, em mais 49 u.m.a. e menos 58 u.m.a..

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*), para o ião molecular obtido em *MS*, não observamos o sinal correspondente à perda de água, mas sim um com abundância relativa de 100% a m/z 410, a que corresponde uma perda de 96 u.m.a., que poderá ser indicativo da presença de um substituinte com fórmula $C_4H_4N_2O$, em C-17, tal como se verificou no composto 7.

O terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) foi realizado para dois iões distintos, a m/z 410 e m/z 203. O primeiro ião deu origem a três sinais a m/z 207, 203(100) e 189, a que correspondem

perdas de, respetivamente, 203 u.m.a, 207 u.m.a. e 221 u.m.a., sugerindo a FrDA do anel C (m/z 207 e 203) e a posterior decomposição do fragmento a m/z 203 por perda de 14 u.m.a. (m/z 189: $|(M+H)-203-14|^+$). Quanto ao segundo, o ião m/z 203, originou os sinais a m/z 189(100) e 133 a que correspondem perdas de 14 u.m.a. (m/z 189: $|(M+H)-203-14|^+$) e 70 u.m.a. (m/z 133: $|(M+H)-203-70|^+$) e que pode ser indicativo da perda de CH_2 (m/z 189) e à clivagem do anel E (m/z 133).

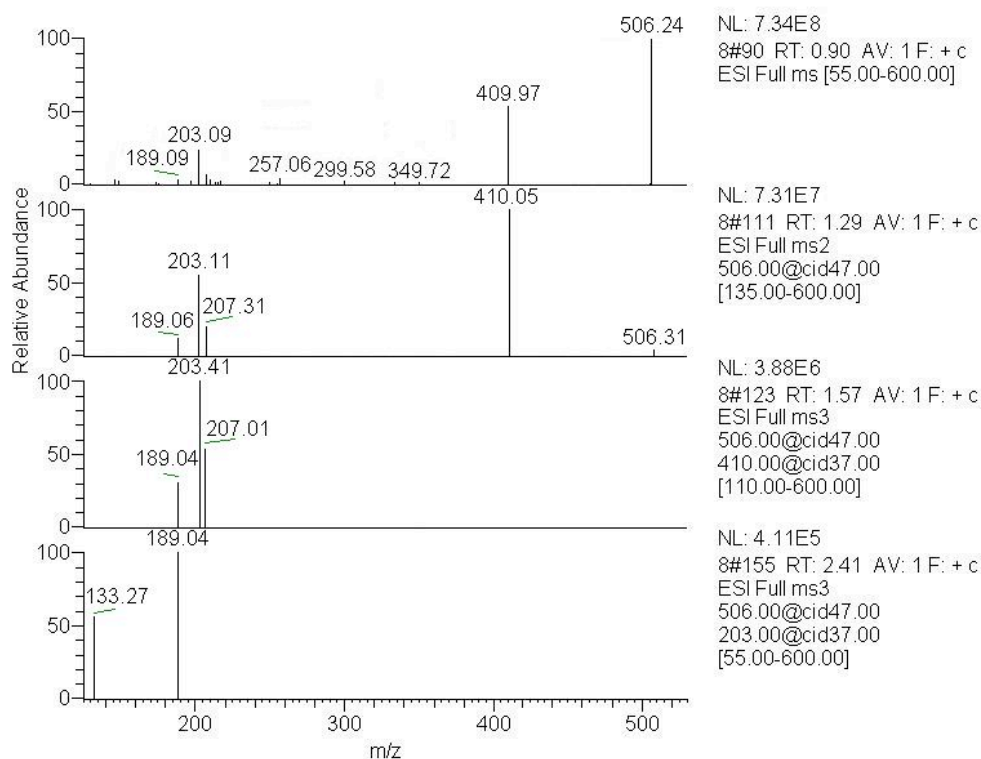


Figura 2.34: Espectro de massa *tandem* (MS, MS2 e MS3) do composto **8**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

Os fragmentos provenientes da FrDA do anel C do composto **8** (m/z 207 e 203), em comparação com os correspondentes do composto **6** (m/z 251 e 203), sugerem que, por um lado, o esqueleto do composto **8** é, tal como o do **6** e do ácido ursólico, um 12-urseno (m/z 203), por outro, a redução de 44 u.m.a. entre os fragmentos que incluem os anéis A e B (m/z 207 para o composto **8** e m/z 251 para o composto **6**) são indicativos da substituição de H_3CCOOH (60 u.m.a) por uma função cetona (16 u.m.a).

A perda inicial de 96 u.m.a, tal como se verificou no composto **7**, e o facto desta só se ter verificado em *MS2*, sugere a presença de um substituinte, em C-17, com fórmula $C_4H_4N_2O$ (Figura 2.35).

A estrutura proposta com base nestes resultados foi confirmada pelos dados de RMN (^1H - Figura 2.79, página 97 e ^{13}C - Figuras 2.80 e 2.81, página 98).

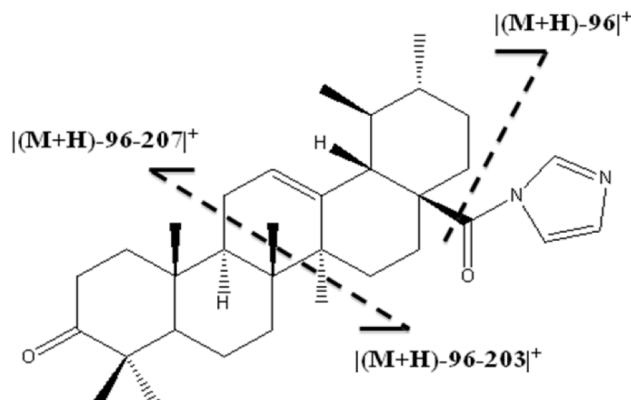


Figura 2.35: Padrão de fragmentação do composto **8**.

Ao realizarmos a análise do composto **8**, por impacto eletrônico, obtem-se o espectro apresentado na Figura 2.36.

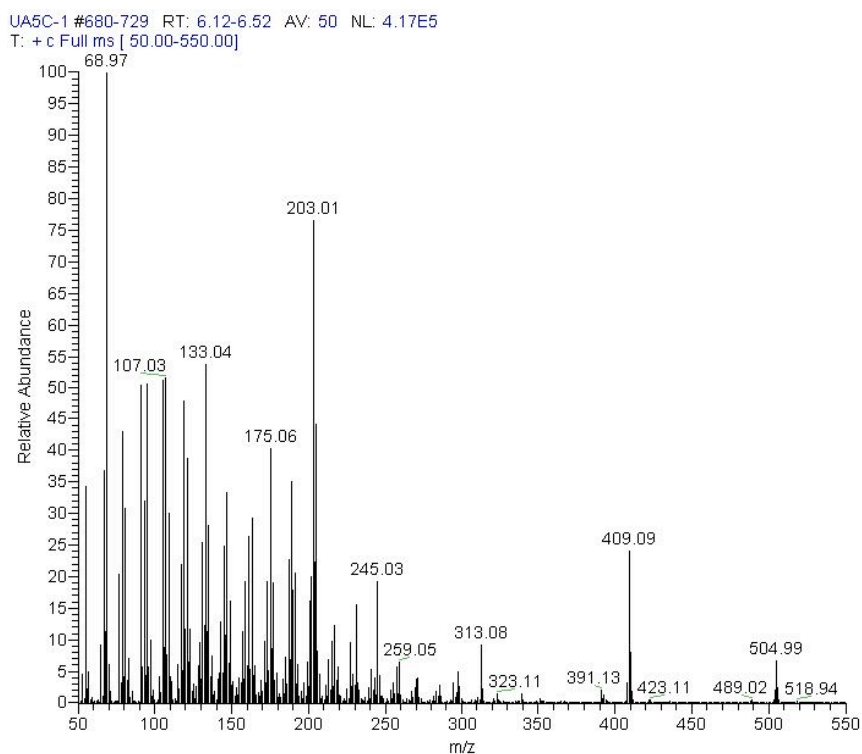


Figura 2.36: Espectro de massa do composto **8**, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

Da sua observação, verifica-se a presença do íon molecular a m/z 505 (M^+) e dos sinais a m/z 409, 203, 189 e 133, o que está de acordo com os dados obtidos com a espectrometria de massa

tandem e que poderá corresponder ao seguinte padrão de fragmentação: m/z 409 ($[M-C_4H_4N_2O]^+$), à FrDA do anel C (m/z 203) e posterior decomposição de m/z 203 por perda de, respectivamente, 14 u.m.a. (m/z 189) e 70 u.m.a. (m/z 133).

Composto 9 (3-oxours-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (MS, MS2 e MS3) do composto 9, obtido por ESI, em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.37.

No primeiro ciclo de fragmentação (MS), observa-se o sinal maioritário a m/z 520, que corresponde ao ião molecular ($[M+H]^+$), apresentando um acréscimo de 14 u.m.a. em relação ao composto 8 e 63 u.m.a. relativamente ao ácido ursólico.

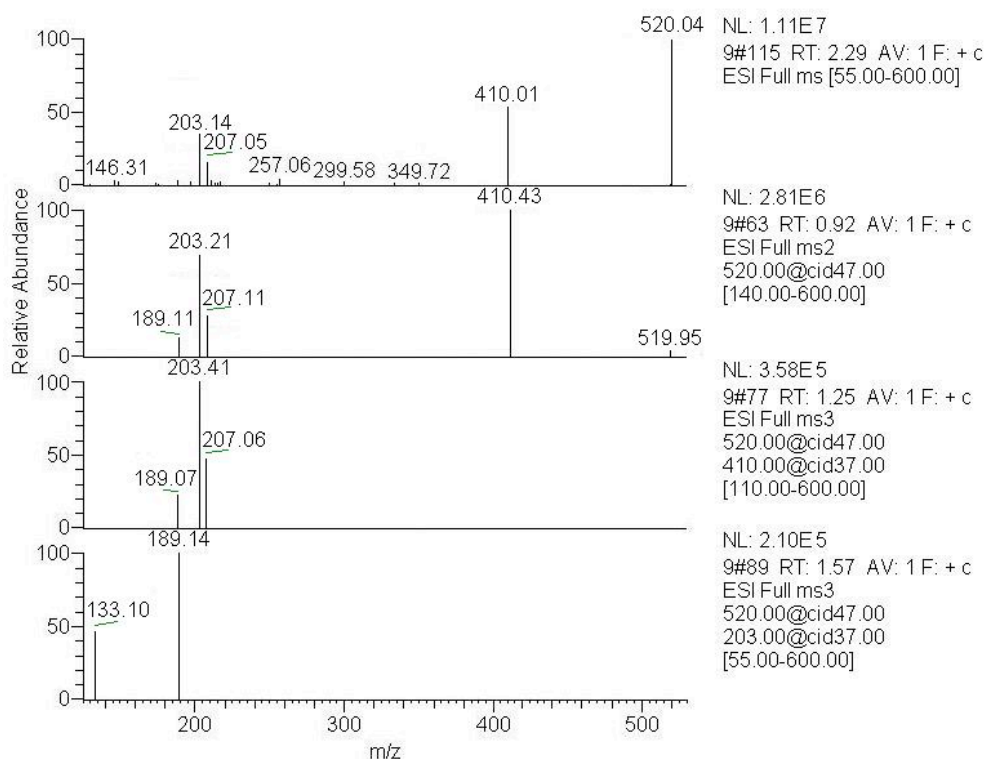


Figura 2.37: Espectro de massa *tandem* (MS, MS2 e MS3) do composto 9 obtido por ESI em modo ião positivo.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (MS2) para o ião molecular, observamos, por um lado, que o sinal principal a m/z 410, corresponde a uma perda de 110 u.m.a., tal como se verificou no composto 6, o que poderá ser indicativo da presença de um substituinte, em

C-17, com fórmula molecular $C_5H_6N_2O$, por outro lado, que os sinais apresentados (m/z 410(100), 207, 203 e 189) são iguais ao MS2 do composto **8**, o que sugere que os dois compostos têm uma estrutura ursólica igual diferindo, apenas, no seu substituinte da posição 17, o que está de acordo com a diferença de 14 u.m.a entre os seus iões moleculares. A semelhança entre os sinais obtidos nos MS3 dos dois compostos (**8** e **9**) e os dados obtidos por RMN- 1H (Figura 2.83, página 100), RMN- ^{13}C (Figuras 2.84 e 2.85, página 101) e DEPT-135 (Figura 2.86, página 102) reforçam esta hipótese estrutural (Figura 2.38).

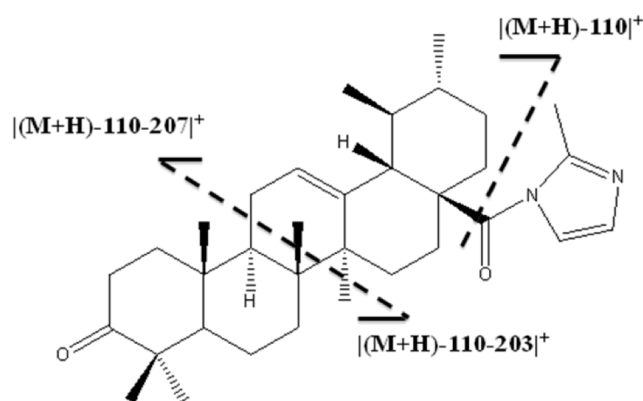


Figura 2.38: Padrão de fragmentação do composto **9**.

Ao realizarmos a análise do composto **9**, por impacto electrónico, obtém-se o espetro que se pode observar na Figura 2.39.

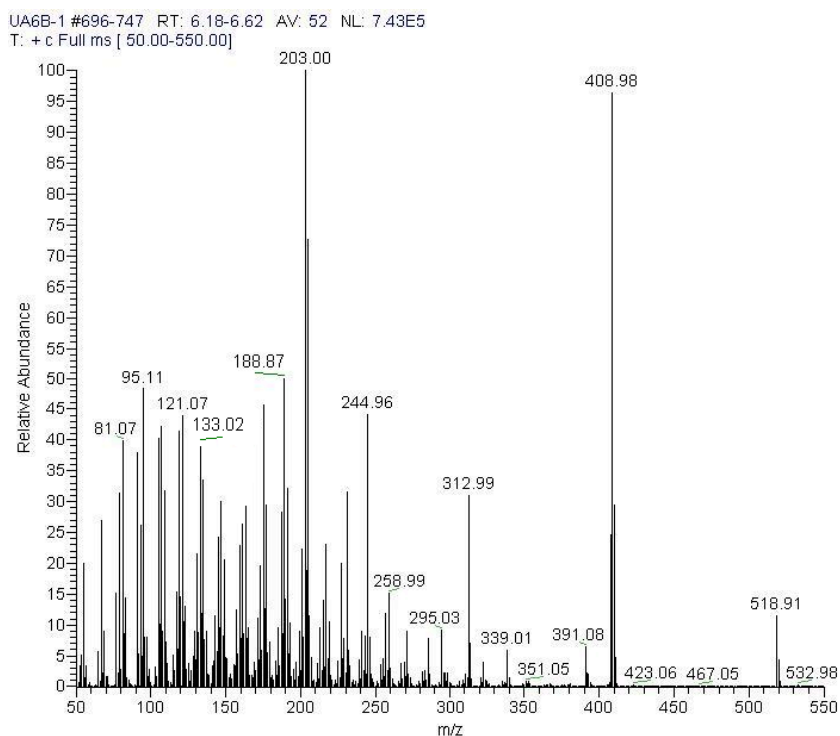


Figura 2.39: Espetro de massa do composto **9**, obtido por EI, em modo ião positivo.

A presença do íon molecular a m/z 519 (M^+) e dos sinais a m/z 409, 313, 203(100), 189 e 133 está de acordo com os dados obtidos com a espectrometria de massa *tandem* e o padrão de fragmentação poderá ser o seguinte: perda do substituinte em C-17 (m/z 409: $|M-C_5H_6N_2O|^+$), FrDA do anel C (m/z 313, 203) e posterior decomposição de m/z 203 (m/z 189).

Composto 10 (3,11-dioxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (MS , MS_2 e MS_3) do composto **10**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo é apresentado na Figura 2.40.

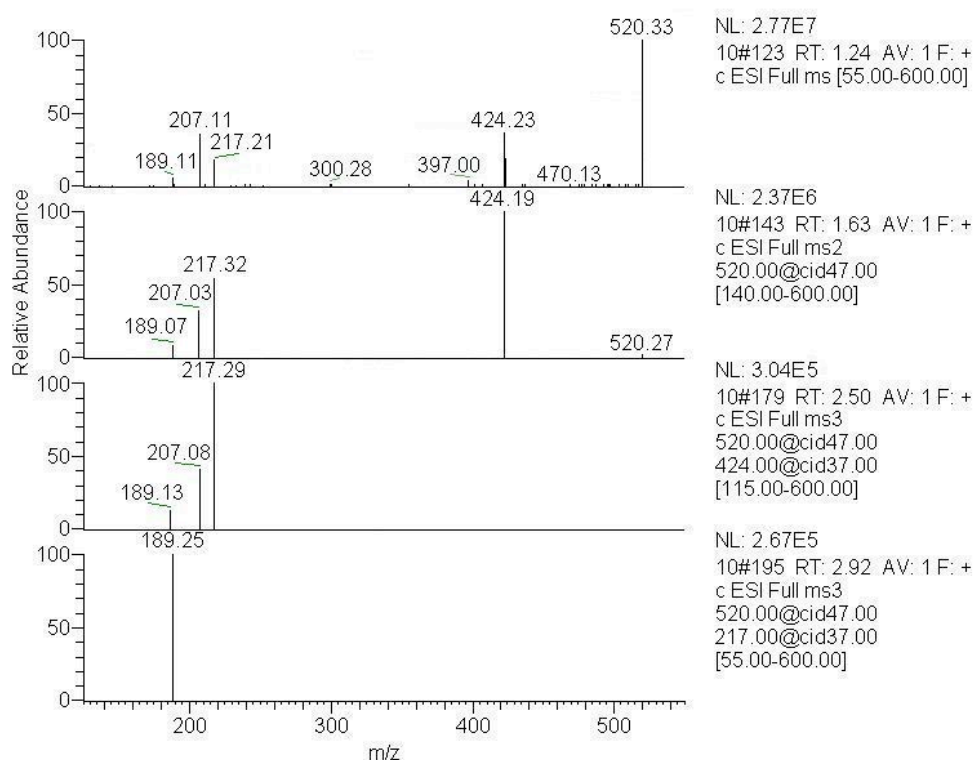


Figura 2.40: Espectro de massa *tandem* (MS , MS_2 e MS_3) do composto **10**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

Para o primeiro ciclo de fragmentação (MS), observa-se o sinal do íon molecular a m/z 520 ($|M+H|^+$), que é igual ao apresentado pelo composto **9**.

No segundo ciclo (MS_2) para o fragmento do íon molecular, m/z 520, observamos o sinal principal a m/z 424, a que corresponde uma perda de 96 u.m.a e não de 110 u.m.a., como

aconteceu com o composto **9**. Este perfil de fragmentação pode ser indicativo da presença do substituinte C₄H₄N₂O em C-17, como ocorrido para o composto **7**.

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), para o ião maioritário de *MS2* (*m/z* 424), são apresentados três sinais a *m/z* 217(100), 207 e 189, que são iguais aos sinais secundários de *MS2*, e que correspondem a perdas de, respetivamente, 207, 217 e 235 u.m.a., sugerindo a *FrDA* do anel C (*m/z* 217: |(M+H)-96-207|⁺ e *m/z* 207: |(M+H)-96-217|⁺) e a posterior decomposição de *m/z* 217 (*m/z* 189: |(M+H)-96-207-28|⁺), o que está de acordo com o apresentado no outro *MS3* que foi realizado para o ião a *m/z* 217.

A comparação dos fragmentos resultantes da *FrDA* do anel C entre os compostos **10** (*m/z* 217(100) e 207) e **9** (*m/z* 207 e 203(100)) é indicativo de que a porção do composto que contém os anéis A e B é igual nos dois compostos (*m/z* 207), enquanto que os fragmentos correspondentes à porção da molécula constituída pelos anéis D e E (*m/z* 217 para o composto **10** e *m/z* 203 para o composto **9**) possuem uma diferença de 14 u.m.a o que sugere a presença de uma função cetona conjugada com a dupla ligação em C-12, como se verifica no composto **7** (Figura 2.41). A estrutura sugerida foi confirmada pelos dados de RMN (¹H – Figura 2.87, página 103, ¹³C – Figura 2.88, página 103 e DEPT-135 – Figura 2.90, página 104).

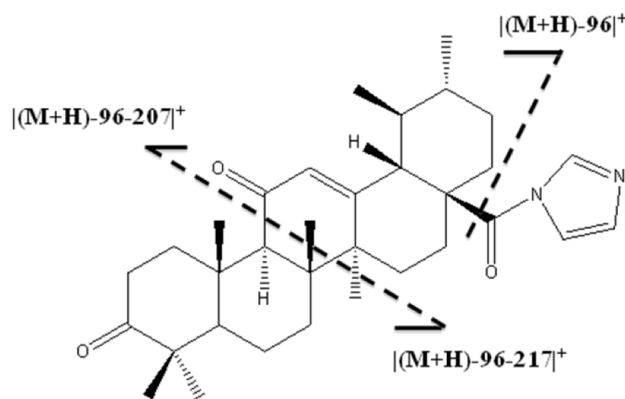


Figura 2.41: Padrão de fragmentação do composto **10**.

Ao realizarmos a análise do composto **10**, por impacto eletrónico, obtém-se o espetro apresentado na Figura 2.42.

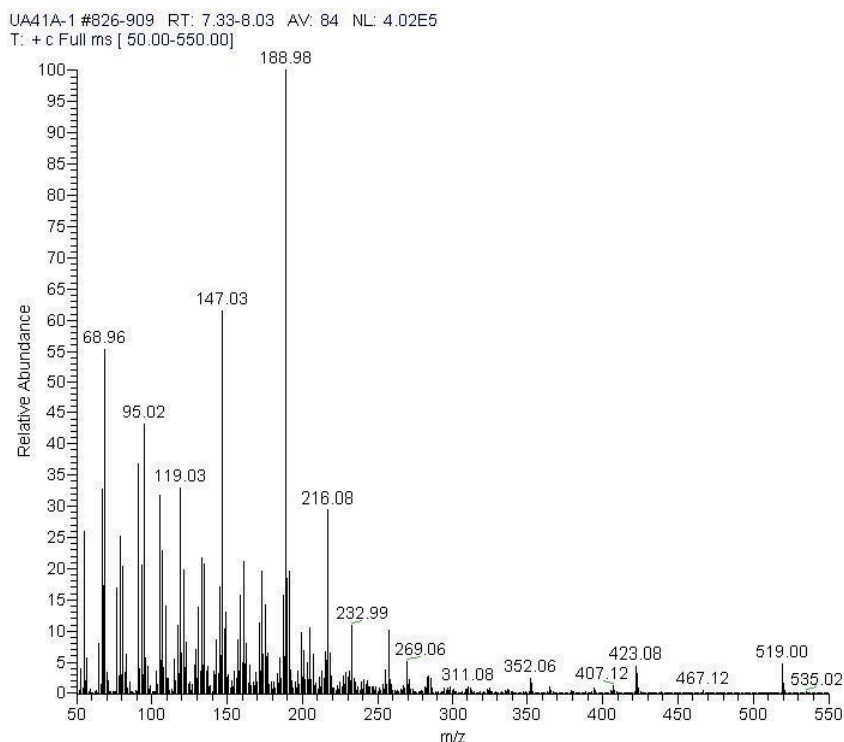


Figura 2.42: Espectro de massa do composto **10**, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

Da sua observação, verifica-se a presença do íon molecular a m/z 519 (M^+) e dos sinais a m/z 423, 216 e 189(100) que, tendo como base os dados obtidos com a espectrometria de massa *tandem*, poderá corresponder ao seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17 (m/z 423: $([M-C_4H_4N_2O]^+)$), *FrDA* do anel C (m/z 216) e posterior decomposição do íon a m/z 216 (m/z 189).

Composto **11** (3,11-dioxours-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **11**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo, é apresentado na Figura 2.43.

No *MS* de 1ª ordem observa-se o sinal do íon molecular a m/z 534 ($[M+H]^+$) a que corresponde um acréscimo de 14 u.m.a., relativamente ao composto **10**, e 77 u.m.a., comparativamente com o ácido ursólico.

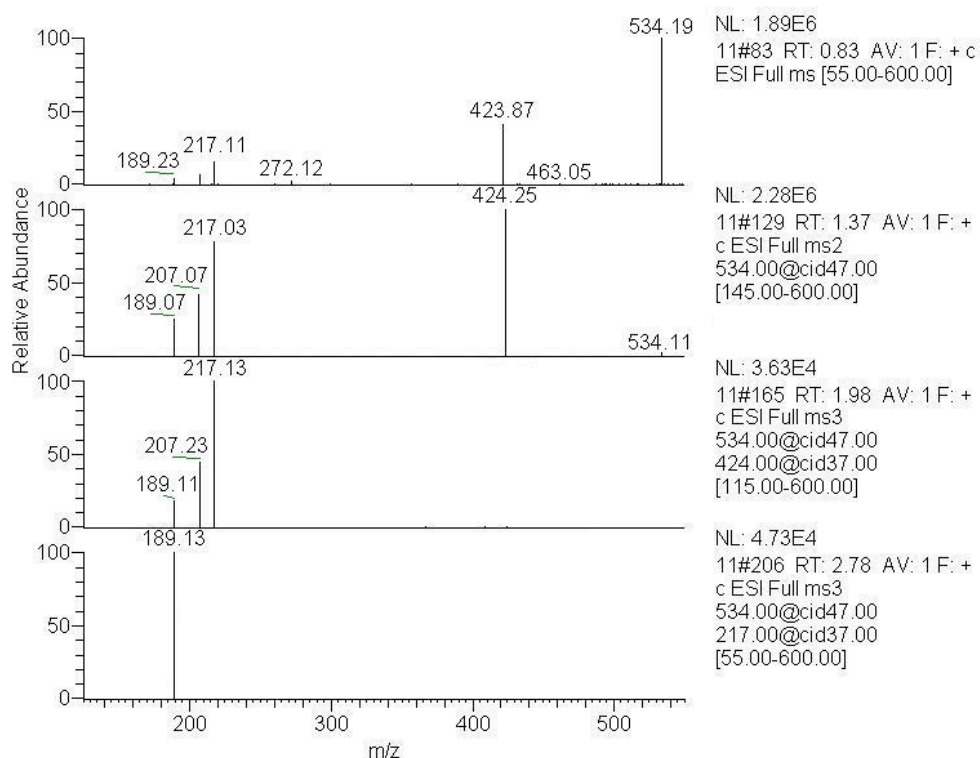


Figura 2.43: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **11**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

No *MS2*, para o fragmento maioritário em *MS*, m/z 534, observamos o sinal de maior abundância relativa a m/z 424 que é indicativo, por um lado, de uma perda de 110 u.m.a, tal como se observou no composto **9**, o que sugere a presença do substituinte, em C-17, com fórmula molecular $C_5H_6N_2O$ e, por outro, ao ser igual ao apresentado em *MS2* para o composto **10** indica que os dois compostos possuem o mesmo esqueleto ursólico diferindo, apenas, nos seus substituintes em C-17 ($C_5H_6N_2O$ para o composto **11** e $C_4H_4N_2O$ para o composto **10**), que possuem uma diferença, entre si, de 14 u.m.a, estando de acordo com o valor correspondente ao acréscimo observado no íon molecular do composto **11** relativamente ao **10** (Figura 2.44).

O terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), realizado para os íões a m/z 424 e 217, está de acordo com a proposta de estrutura anteriormente formulada e, tal como acontece para o composto **10**, os sinais apresentados (m/z 217(100), 207 e 189) correspondem à *FrDA* do anel C (m/z 217 e 207) e à posterior decomposição de m/z 217 por perda de C_2H_4 (m/z 217 \rightarrow m/z 189).

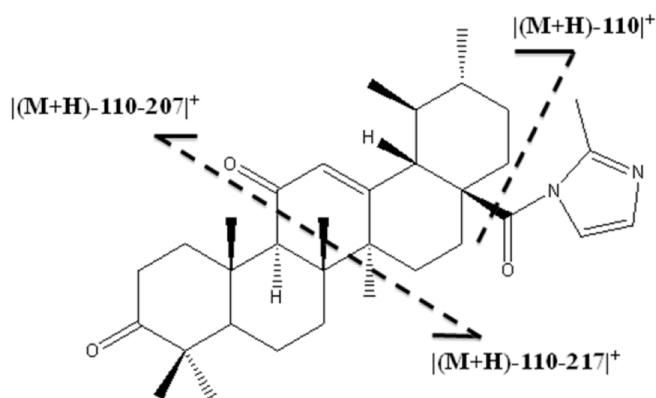


Figura 2.44: Padrão de fragmentação do composto 11.

Ao realizarmos a análise do composto 11, por impacto electrónico, obtém-se o espetro apresentado na Figura 2.45, onde se pode verificar a presença do ião molecular a m/z 533 (M^+) e dos sinais a m/z 423, 216 e 189(100) que estão de acordo com os dados obtidos com a espetrometria de massa *tandem*, em que: m/z 423 corresponde à perda do substituinte em C-17 ($|M-C_5H_6N_2O|^+$), m/z 216 ao fragmento resultante da FrDA do anel C e m/z 189 à decomposição do fragmento m/z 216 (m/z 189).

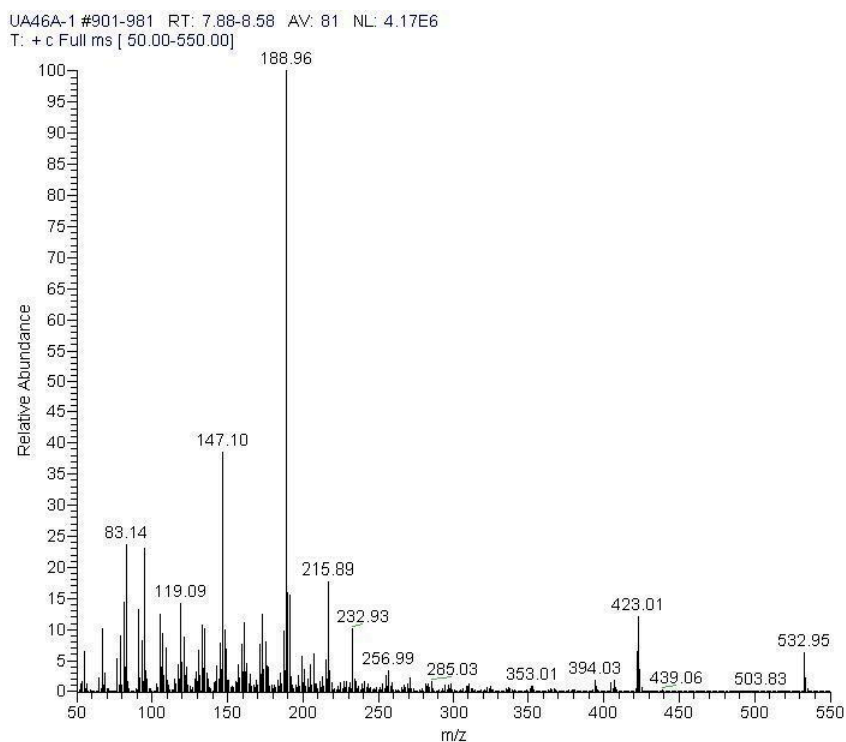


Figura 2.45: Espetro de massa do composto 11, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

Composto 12 (3,11-dioxours-12-en-28-il-4H-triazol-4-carboxilato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **12**, obtido por *ESI*, em modo ião positivo, é apresentado na Figura 2.46, onde se pode observar, para o primeiro *MS*, o sinal maioritário a *m/z* 521, a que corresponde o ião molecular ($[M+H]^+$), e que possui uma redução de 13 u.m.a. relativamente ao composto **11** e acréscimos de 1 e de 64 u.m.a., em comparação com, respetivamente, o composto **10** e o ácido ursólico.

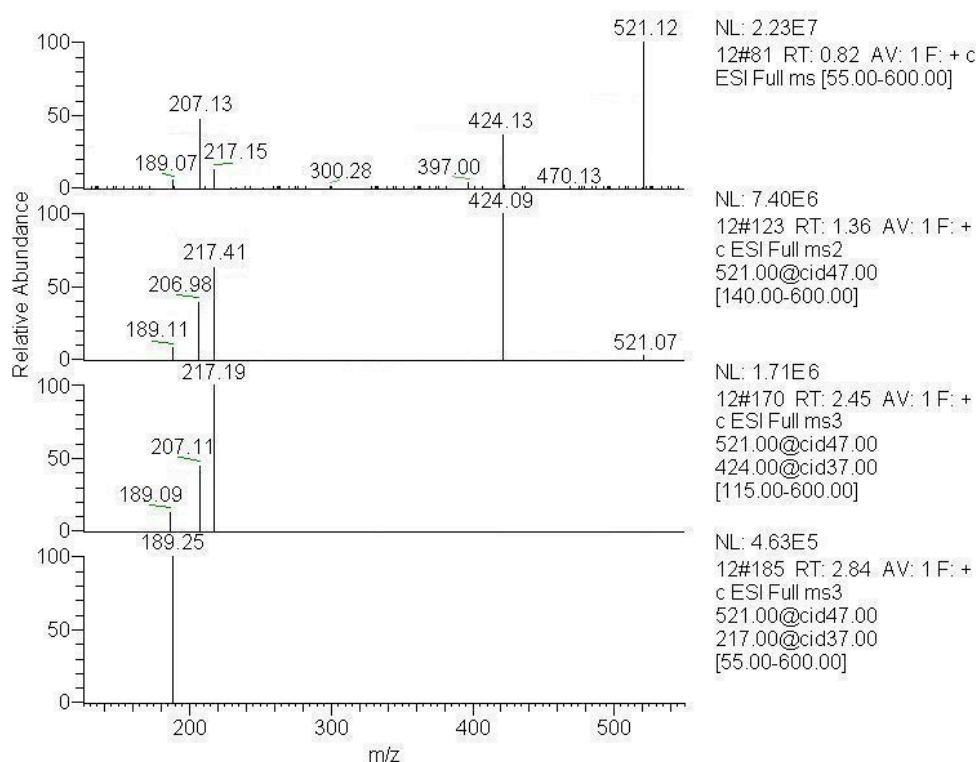


Figura 2.46: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **12**, obtido por *ESI* em modo ião positivo.

No *MS* de 2ª ordem (*MS2*) para o fragmento do ião molecular, *m/z* 521, observamos os sinais a *m/z* 424(100), 217, 207 e/ou 189, comuns aos registados no *MS2* e/ou *MS3* dos compostos **10** e **11**. Este padrão de fragmentação sugere um esqueleto ursólico igual nos três compostos diferindo, apenas, nos seus substituintes em C-17 que, pela perda de 97 u.m.a. do ião maioritário em *MS2* do composto **12** (*m/z* 424), relativamente ao ião molecular (*m/z* 521), deverá corresponder a um substituinte com a fórmula molecular C₃H₃N₃O (Figura 2.47) que difere em menos 13 u.m.a. e mais 1 u.m.a. em relação aos substituintes da mesma posição dos

compostos **11** e **10**, respetivamente, o que está de acordo com o valor de diferença entre os iões moleculares dos três compostos (m/z 521, 534 e 520) (Figura 2.47) e com os dados obtidos por RMN- ^1H (Figura 2.95, página 108), RMN- ^{13}C (Figura 2.96, página 109) e DEPT-135 (Figura 2.98, página 110).

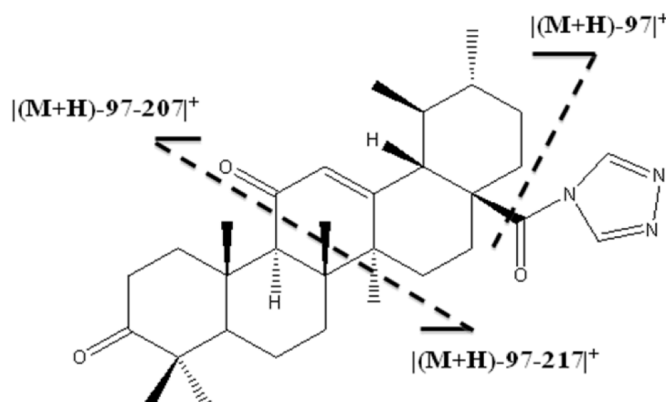


Figura 2.47: Padrão de fragmentação do composto **12**.

Ao realizarmos a análise do composto **12**, por impacto eletrónico, obtém-se o espetro apresentado na Figura 2.48.

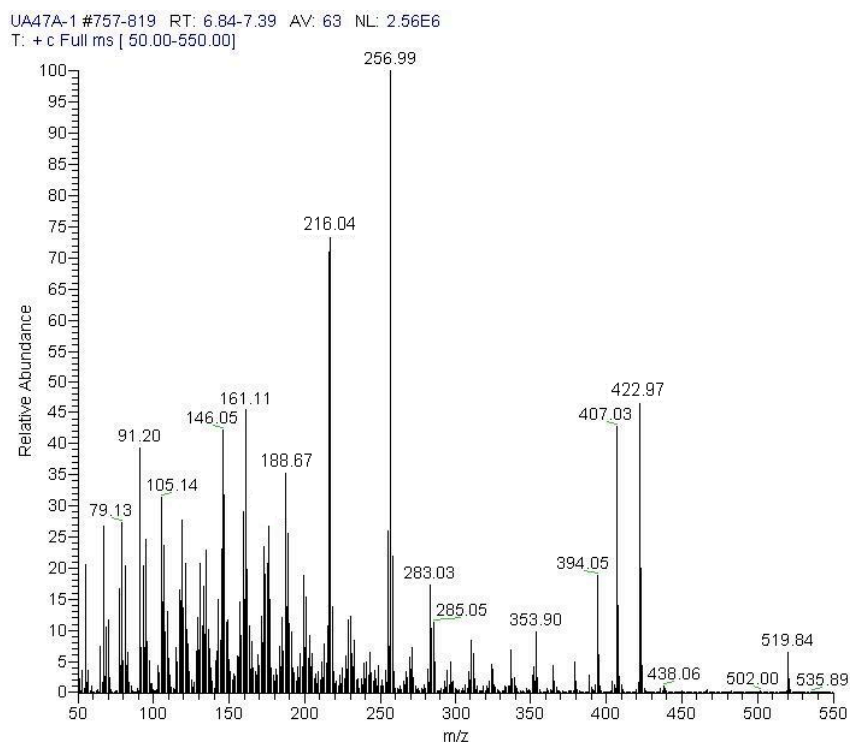


Figura 2.48: Espetro de massa do composto **12**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

A presença do íon molecular a m/z 520 (M^+) e dos sinais a m/z 423, 216 e 189 está de acordo com os dados obtidos com *MS tandem* e são indicativos do seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17 (m/z 423: $|M- C_3H_3N_3O|^+$), FrDA do anel C (m/z 216) e posterior decomposição do fragmento m/z 216 (m/z 189).

Composto 13 (28-(4*H*-triazol-4-il)-3,28-dioxours-12-en-2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **13**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo é apresentado na Figura 2.49.

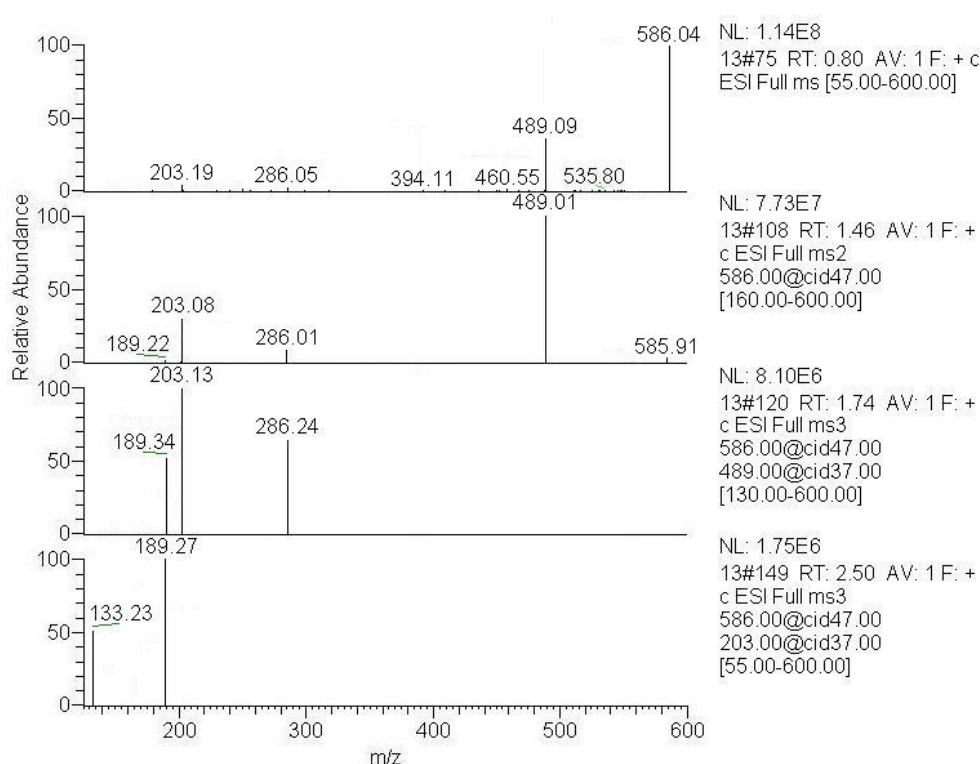


Figura 2.49: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **13**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

Da sua observação, podemos ver para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do íon molecular a m/z 586 ($|M+H|^+$) que difere em 66 u.m.a., relativamente ao composto **9**, e 129 u.m.a., comparativamente com o ácido ursólico.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*) para o íon molecular obtido em *MS*, observamos o sinal maioritário a m/z 489 a que corresponde uma perda de 97 u.m.a., tal como aconteceu no composto **12**, o que sugere a presença do substituinte, em C-17, com fórmula

molecular $C_3H_3N_3O$, o que foi confirmado pelos dados de RMN (1H – Figura 2.99, página 111 ; ^{13}C – Figura 2.100, página 112 e DEPT-135 – Figura 2.102, página 113).

O terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*) foi feito para dois íões distintos; o primeiro para o íão maioritário de *MS2*, m/z 489, dando origem a três sinais a m/z 286, 203(100) e 189, correspondentes a perdas de, respetivamente, 203, 286 e 300 u.m.a. que são indicativas da *FrDA* do anel C seguida pela decomposição de m/z 203 por perda de 14 u.m.a (m/z 189: $|(M+H)-97-286-14|^+$); o segundo para m/z 203 que originou os sinais a m/z 189 e 133, a que correspondem perdas de 14 u.m.a., tal como observado no *MS3* de m/z 489, e 70 u.m.a. (m/z 133: $|(M+H)-97-286-70|^+$).

A comparação dos fragmentos resultantes da *FrDA* do anel C para o composto **13** (m/z 286 e 203) com os do composto **9** (m/z 207 e 203) sugere que os dois são 12-ursenos (m/z 203). Por outro lado, o acréscimo de 79 u.m.a. entre os fragmentos que incluem os anéis A e B dos dois compostos (m/z 286 para o composto **13** e m/z 207 para o composto **9**) pode indicar as presenças, no anel A, da função cetona, tal como acontece no composto **9**, e do substituinte com fórmula molecular $C_3H_3N_3$ (Figura 2.50), o que é confirmado com os dados obtidos por RMN- ^{13}C (Figura 2.100, página 112).

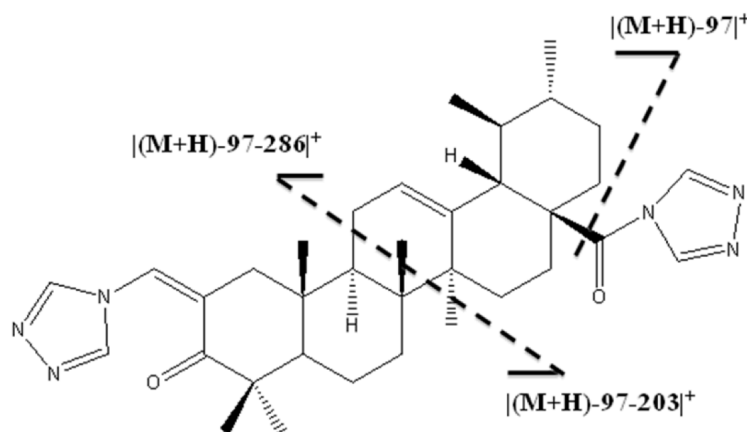


Figura 2.50: Padrão de fragmentação do composto **13**.

A diferença de 66 u.m.a. entre os íões moleculares dos dois compostos (**9** e **13**) está de acordo com a estrutura sugerida para o composto **13**, uma vez que o seu substituinte em C-17 evidencia uma redução de 13 u.m.a. relativamente ao substituinte da mesma posição do

composto **9**, em contrapartida, o substituinte localizado no anel A do composto **13** possui um acréscimo de 79 u.m.a. relativamente ao composto **9**.

Ao realizarmos a análise do composto **13**, por impacto electrónico, obtém-se o espetro que se pode observar na Figura 2.51.

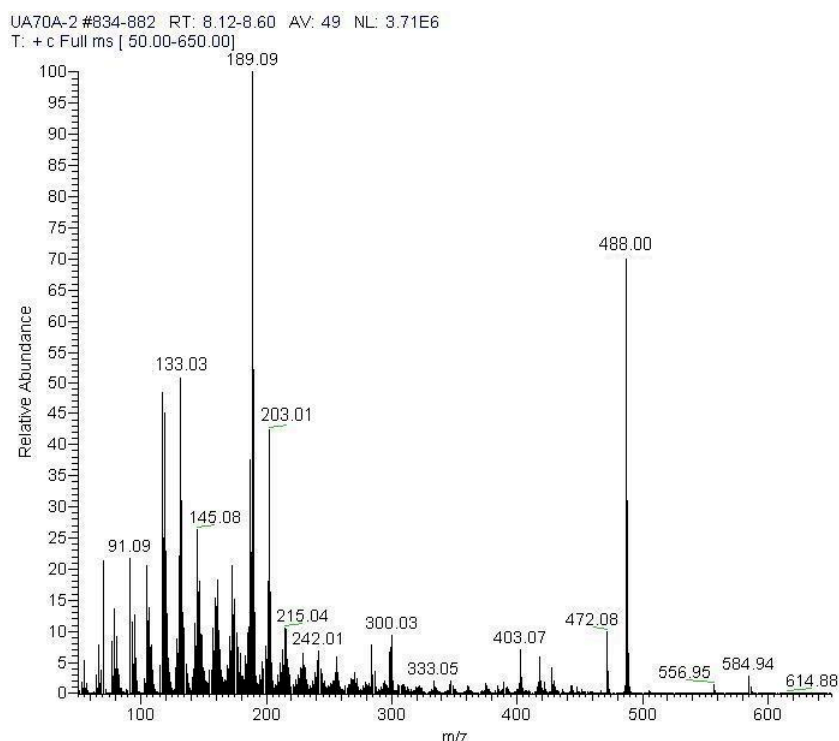


Figura 2.51: Espetro de massa do composto **13**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

A presença do ião molecular a m/z 585 (M^+) e dos sinais a m/z 488, 203, 189 e 133 está de acordo com os dados obtidos com *MS tandem* e sugere o seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17 (m/z 488: $[M-C_3H_3N_3O]^+$), FrDA do anel C (m/z 203) e posterior decomposição de m/z 203 por perda de CH_2 (m/z 189) e por clivagem do anel E (m/z 133).

Composto 14 (Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **14**, obtido por *ESI*, em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.52.

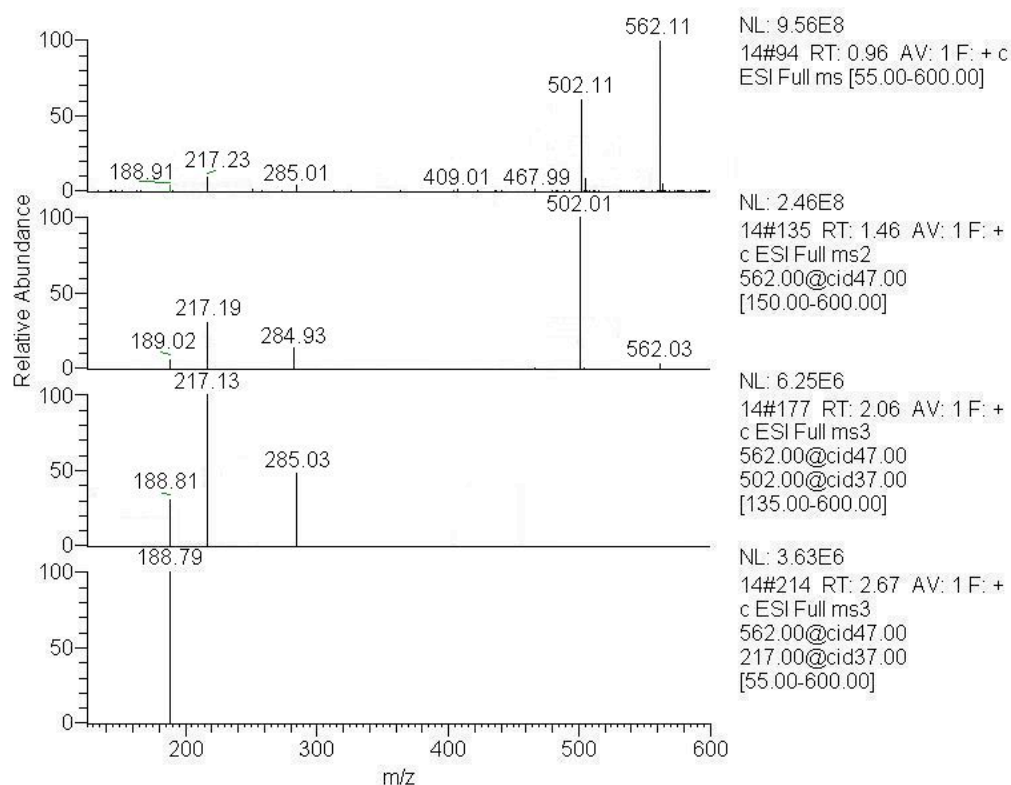


Figura 2.52: Espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **14**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

Para o *MS* de 1ª ordem, observa-se o sinal maioritário a *m/z* 562, que corresponde ao íon molecular $[M+H]^+$, e que evidencia um acréscimo de 105 u.m.a., relativamente ao ácido ursólico, e 42, 28 e 41 u.m.a. comparativamente com os compostos **10**, **11** e **12**, respetivamente.

No segundo ciclo (*MS2*) para o fragmento do íon molecular obtido em *MS*, *m/z* 562, observamos a presença do íon maioritário a *m/z* 502 a que corresponde uma perda de 60 u.m.a., tal como aconteceu nos compostos **2**, **3** e **4**, o que sugere a presença do substituinte $HCOOCH_3$ em C-17.

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), para o íon maioritário de *MS2* (*m/z* 502), aparecem três sinais a *m/z* 285, 217(100) e 189 a que correspondem perdas de, respetivamente, 217, 285 e 313 u.m.a., resultantes da *FrDA* do anel C (*m/z* 285: $|(M+H)-60-217|^+$ e *m/z* 217: $|(M+H)-60-285|^+$) e à posterior decomposição de *m/z* 217 (*m/z* 189: $|(M+H)-60-285-28|^+$), o que é confirmado no *MS3* realizado para o íon *m/z* 217.

Dos fragmentos resultantes da FrDA do anel C (m/z 285 e 217(100)) pode-se inferir que o composto **14** é do tipo 11-oxo-12-urseno (m/z 217), tal como verificado para os compostos **10**, **11** e **12**, e que o acréscimo de 78 u.m.a. do ião correspondente aos anéis A e B do composto **14** (m/z 285) relativamente ao ião dos compostos **10-12** (m/z 207) é devido à presença no anel A, para além da função cetona, comum aos quatro compostos, de um substituinte com fórmula molecular $C_4H_4N_2$ (Figura 2.53), hipótese que foi confirmada com os dados obtidos por RMN- 1H (Figura 2.103, página 114), RMN- ^{13}C (Figura 2.104, página 115) e DEPT-135 (Figura 2.106, página 116).

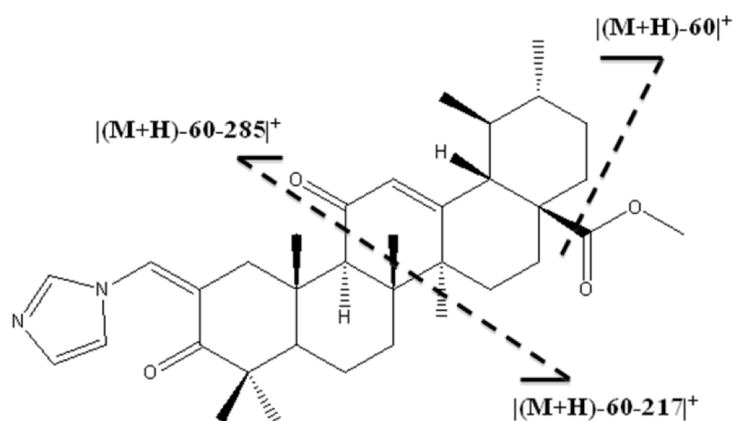


Figura 2.53: Padrão de fragmentação do composto 14.

O acréscimo de 41 u.m.a. entre os iões moleculares dos compostos **14** e **12** é resultado, por um lado, de uma diferença de 37 u.m.a entre os seus substituintes na posição C-17 (inferido pelas perdas de 60 e de 97 u.m.a. por fragmentação do ião molecular dos compostos **14** e **12**, respetivamente) e, por outro, do acréscimo de 78 u.m.a. do substituinte do anel A do composto **14** em relação ao composto **12**. Estes resultados corroboram a estrutura proposta para o composto **14**.

Por outro lado, o fragmento correspondente à FrDA do anel C e que contém os anéis A e B do composto **14** (m/z 285) possui uma redução de 1 u.m.a relativamente ao fragmento correspondente do composto **13** (m/z 286), o que está de acordo com a natureza dos substituintes, $C_4H_4N_2$ (composto **14**) e $C_3H_3N_3$ (composto **13**).

Ao realizarmos a análise do composto **14**, por impacto electrónico, obtém-se o espetro que é apresentado na Figura 2.54.

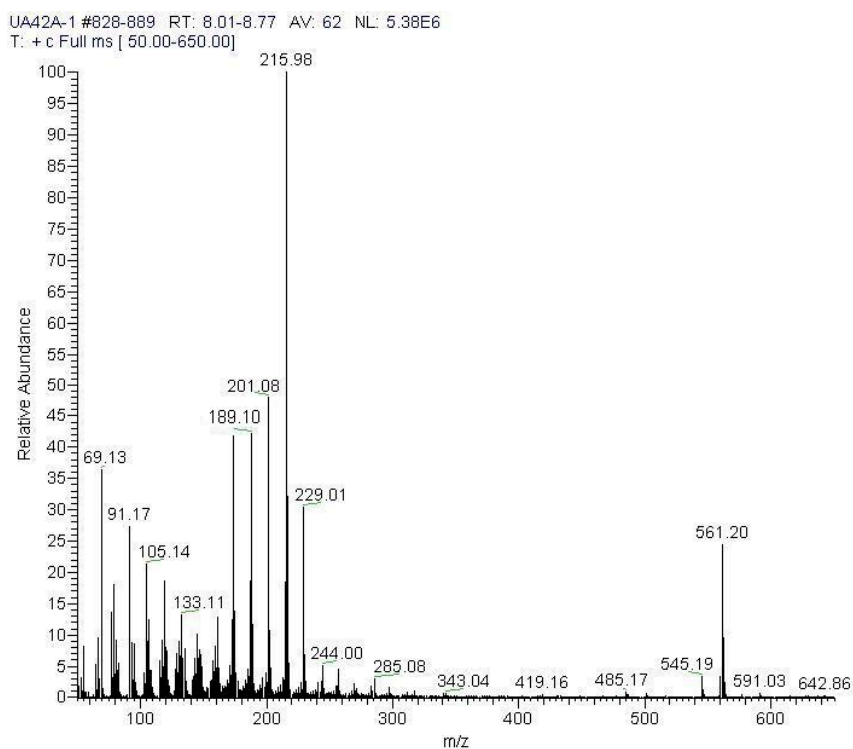


Figura 2.54: Espectro de massa do composto **14**, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

Da sua observação, verifica-se a presença do íon molecular a m/z 561 (M^+) e dos sinais a m/z 501, 285, 216(100) e 189, que estão de acordo com os dados obtidos com *MS tandem* e que são indicativos do seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17 (m/z 501: $[M-HCOOCH_3]^+$), *FrDA* do anel C (m/z 285 e 216) e posterior decomposição do fragmento a m/z 216 (m/z 189).

Composto 15 (Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **15**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo é apresentado na Figura 2.55.

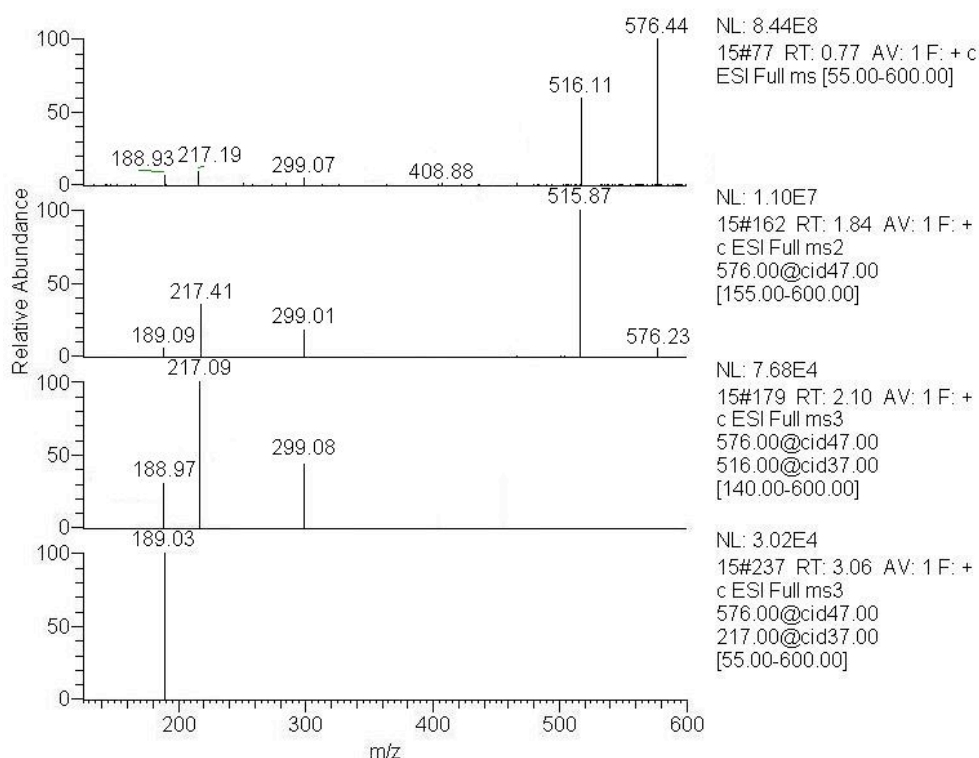


Figura 2.55: Espetro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **15**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

Para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), observa-se o sinal do íon molecular a m/z 576 ($|(M+H)^+$) a que corresponde um acréscimo de 14 u.m.a. relativamente ao íon molecular do composto **14** e de 119 u.m.a. em comparação com o ácido ursólico.

No *MS2* para o fragmento do íon molecular obtido em *MS*, m/z 576, observamos o sinal, com abundância relativa de 100%, a m/z 516 o que evidencia uma perda de 60 u.m.a, tal como acontece no *MS2* do composto **14**, o que sugere a presença do substituinte $HCOOCH_3$ em C-17.

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), para o íon maioritário de *MS2* (m/z 516), temos três sinais a m/z 299, 217(100) e 189 a que correspondem perdas de, respetivamente, 217, 299 e 327 u.m.a., sugerindo a fragmentação *rDA* do anel C (m/z 299: $|(M+H)-60-217|^+$ e m/z 217: $|(M+H)-60-299|^+$) e a posterior decomposição de m/z 217 por perda de C_2H_4 , que é confirmada pelo *MS3* para o íon a m/z 217, (m/z 189: $|(M+H)-60-299-28|^+$).

A observação, nos compostos **15** e **14**, da perda em *MS2* de 60 u.m.a. e a presença do sinal a m/z 217, correspondente ao fragmento da *FrDA* do anel C que contém os anéis D e E, sugere que a parte da molécula constituída pelos anéis C, D e E é igual nos dois compostos (**14** e **15**).

Por outro lado, a diferença entre os fragmentos correspondentes à *FrDA* que contém os anéis A e B, m/z 299 para o composto **15** e m/z 285 para o composto **14**, corresponde a uma diferença de 14 u.m.a, valor igual ao acréscimo do ião molecular do composto **15** em relação ao ião molecular do composto **14**, o que sugere a substituição de $C_4H_4N_2$ do composto **14** por $C_5H_6N_2$, do composto **15** (Figura 2.56), resultado confirmado pelos dados obtidos por RMN- 1H (Figura 2.107, página 117) e RMN- ^{13}C (Figura 2.108, página 118) .

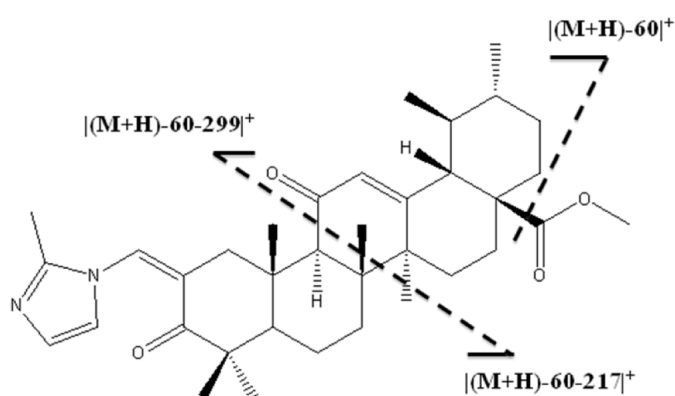


Figura 2.56: Padrão de fragmentação do composto **15**.

Ao realizarmos a análise do composto **15**, por impacto eletrónico, obtém-se o espetro apresentado na Figura 2.57, onde se pode observar a presença do ião molecular a m/z 575 (M^+) e dos sinais a m/z 515, 216 e 189, indicativos do seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17 (m/z 515: $[M-HCOOCH_3]^+$), fragmentação *retro* Diels-Alder do anel C (m/z 216) e posterior decomposição do fragmento m/z 216 (m/z 189), o que está de acordo com os dados obtidos com *MS tandem*.

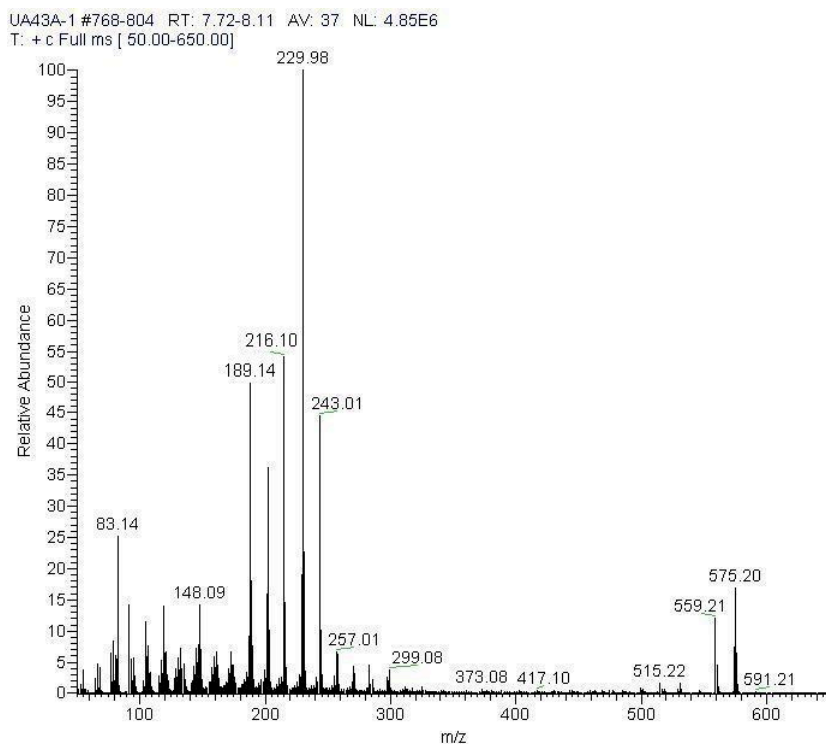


Figura 2.57: Espectro de massa do composto **15**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

Composto **16** (Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **16**, obtido por *ESI*, em modo ião positivo é apresentado na Figura 2.58.

Para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), observa-se o sinal do ião molecular a *m/z* 563 ($[M+H]^+$) o que evidencia uma redução de 13 u.m.a. e de um acréscimo de 1 u.m.a., em relação aos iões moleculares dos compostos **15** e **14**, respectivamente.

No *MS* de 2ª ordem, para o fragmento do ião molecular obtido em *MS*, *m/z* 563, observamos a presença do ião maioritário a *m/z* 503 a que corresponde uma perda de 60 u.m.a., comportamento igual ao apresentado no *MS2* dos compostos **14** e **15**, e que é indicativo da presença do substituinte $HCOOCH_3$ em C-17.

Com o terceiro ciclo de fragmentação (*MS3*), para o ião maioritário de *MS2* (*m/z* 503), aparecem três sinais a *m/z* 286, 217(100) e 189 cujo possível padrão de fragmentação poderá

corresponder à FrDA do anel C (m/z 286 e 217) e à posterior decomposição de m/z 217 por perda de C_2H_4 (m/z 217 \rightarrow m/z 189).

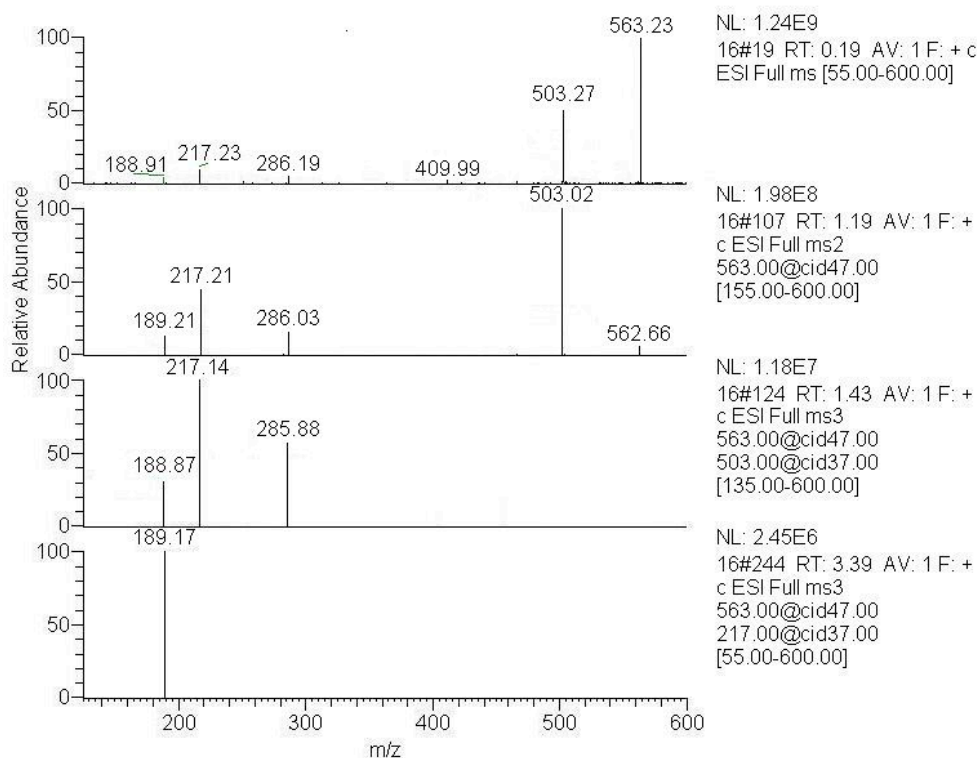


Figura 2.58: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **16**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

As presenças, nos compostos **16**, **15** e **14**, do substituinte $HCOOCH_3$ em C-17, sugerida pela perda, em *MS2*, de 60 u.m.a, e do sinal a m/z 217, correspondente ao fragmento da FrDA do anel C que contém os anéis D e E, são indicativos de uma estrutura, constituída pelos anéis C, D e E, igual nos três compostos.

Todavia, as diferenças observada nos fragmentos dos compostos **16**, **15** e **14**, correspondentes à FrDA que inclui os anéis A e B, m/z 286 (composto **16**), m/z 299 (composto **15**) e m/z 285 (composto **14**), evidenciam substituições diferentes no anel A, o que pode corresponder à introdução de $C_3H_3N_3$ no composto **16** (Figura 2.59), que difere em menos 13 u.m.a. e mais 1 u.m.a. em relação, respetivamente, aos substituintes dos compostos **15** ($C_5H_6N_2$) e **14** ($C_4H_4N_2$), o que está de acordo com as diferenças verificadas nos iões moleculares dos três compostos e com os dados obtidos por RMN- 1H (Figura 2.111, página 120), RMN- ^{13}C (Figura 2.112, página 121) e DEPT-135 (Figura 2.114, página 122).

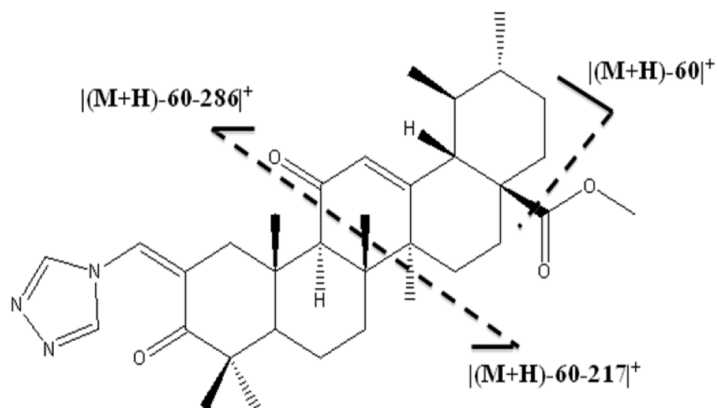


Figura 2.59: Padrão de fragmentação do composto 16.

Ao realizarmos a análise do composto 16, por impacto eletrônico, obtém-se o espectro que se pode observar na Figura 2.60.

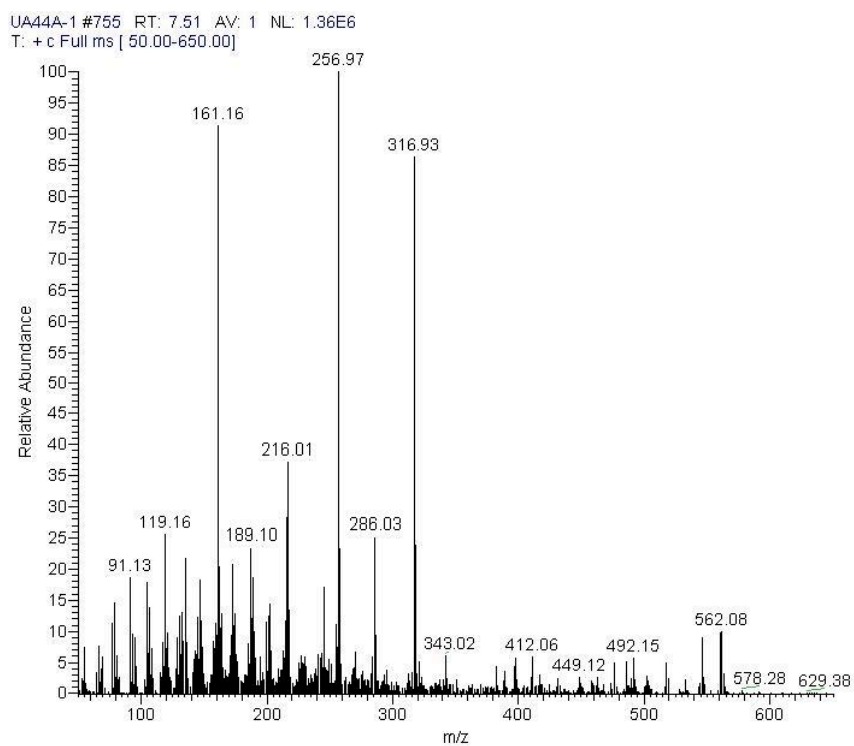


Figura 2.60: Espectro de massa do composto 16, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

O íon molecular a m/z 562 (M^+) e os sinais a m/z 286, 216 e 189 estão de acordo com os dados obtidos pela espectrometria de massa *tandem* e podem ser interpretado da seguinte forma: m/z 286 e 216 são originados devido à *FrDA* do anel C e o sinal a m/z 189 pela decomposição do fragmento m/z 216 (m/z 189).

Composto 17 (Metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **17**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo, é apresentado na Figura 2.61.

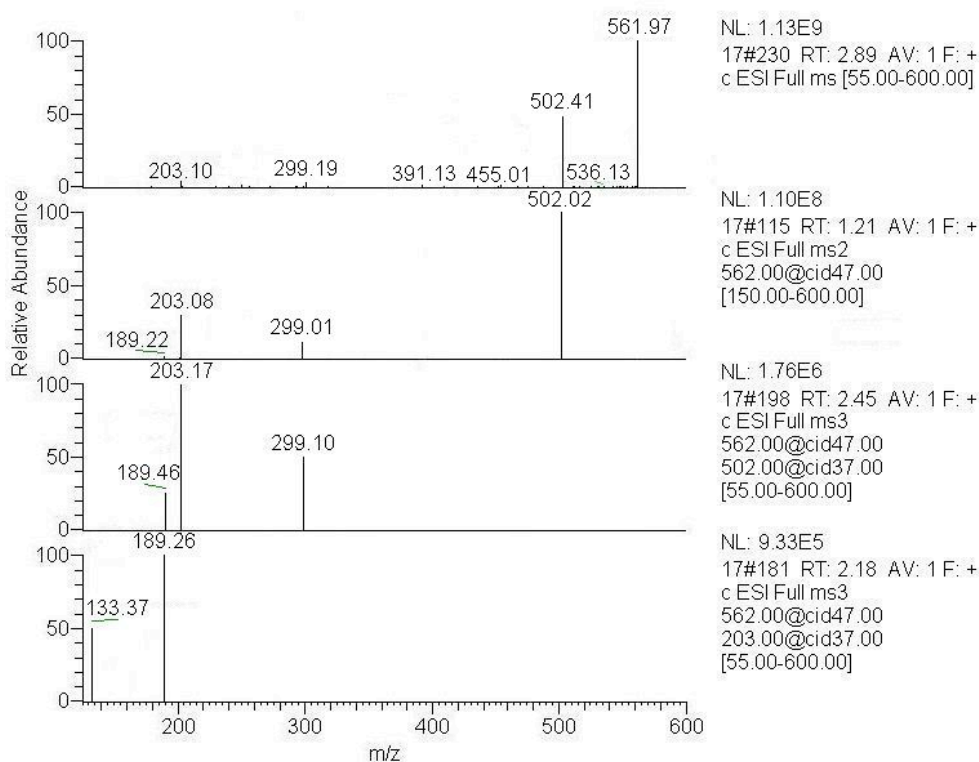


Figura 2.61: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **17**, obtido por *ESI* em modo íon positivo.

Da sua observação, podemos ver para o primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do íon molecular a m/z 562 ($|(M+H)^+$), valor igual ao do composto **14**.

Ao fazermos o segundo ciclo de fragmentação (*MS2*) para m/z 562, observamos o sinal maioritário a m/z 502 que evidencia uma perda de 60 u.m.a., tal como se verificou nos compostos **14**, **15** e **16**, e que pode ser indicativo da presença de $HCOOCH_3$ em C-17.

No *MS3* do íon maioritário de *MS2*, m/z 502, observa-se uma fragmentação distinta da do composto **14**. Ocorrem dois sinais principais a m/z 299 e 203(100), a que correspondem perdas de, respetivamente, 203 e 299 u.m.a., resultantes da fragmentação *rDA* do anel C (m/z 299: $|(M+H)-60-203|^+$, m/z 203: $|(M+H)-60-299|^+$). Um novo *MS3*, mas desta vez para m/z 203,

originou os dois sinais a m/z 189(100) e 133 que são indicativos de perdas de 14 u.m.a. (CH_2) e de 70 u.m.a. (C_5H_{10}), respetivamente.

A FrDA do anel C (m/z 299 e 203) evidencia, por um lado, a presença de uma estrutura 12-urseno (m/z 203), tal como verificado nos compostos **6**, **8**, **9** e **13** e, por outro, um anel A igual ao do composto **15** (m/z 299), com uma função cetona e um substituinte com fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2$ (Figura 2.62), o que está de acordo com os resultados de RMN- ^1H (Figura 2.115, página 123), RMN- ^{13}C (Figura 2.116, página 124) e DEPT-135 (Figura 2.118, página 125) do composto **17**.

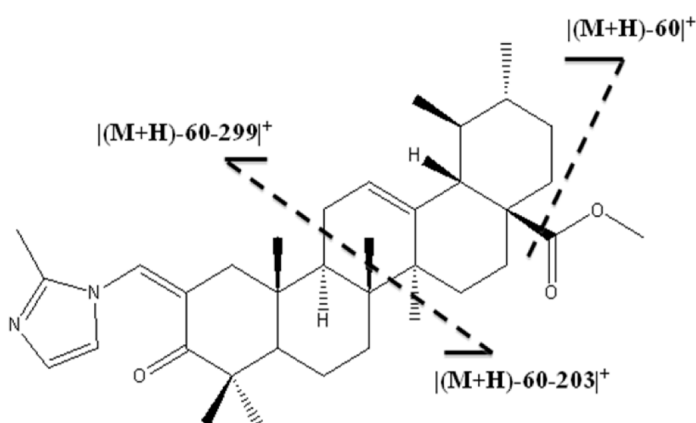


Figura 2.62: Padrão de fragmentação do composto **17**.

Ao realizarmos a análise do composto **17**, por impacto eletrónico, obtém-se o espetro da Figura 2.63, onde se pode observar o ião molecular a m/z 561 (M^+) e os sinais a m/z 501, 298, 203, 189 e 133(100) estão de acordo com a informação obtida com a espetrometria de massa *tandem* e correspondem ao seguinte padrão de fragmentação: perda do substituinte em C-17, m/z 501: $|M-\text{HCOOCH}_3|^+$; fragmentação *retro* Diels-Alder do anel C (m/z 298 e 203) e a posterior decomposição de m/z 203, por perda de CH_2 (m/z 189) e clivagem do anel E (m/z 133).

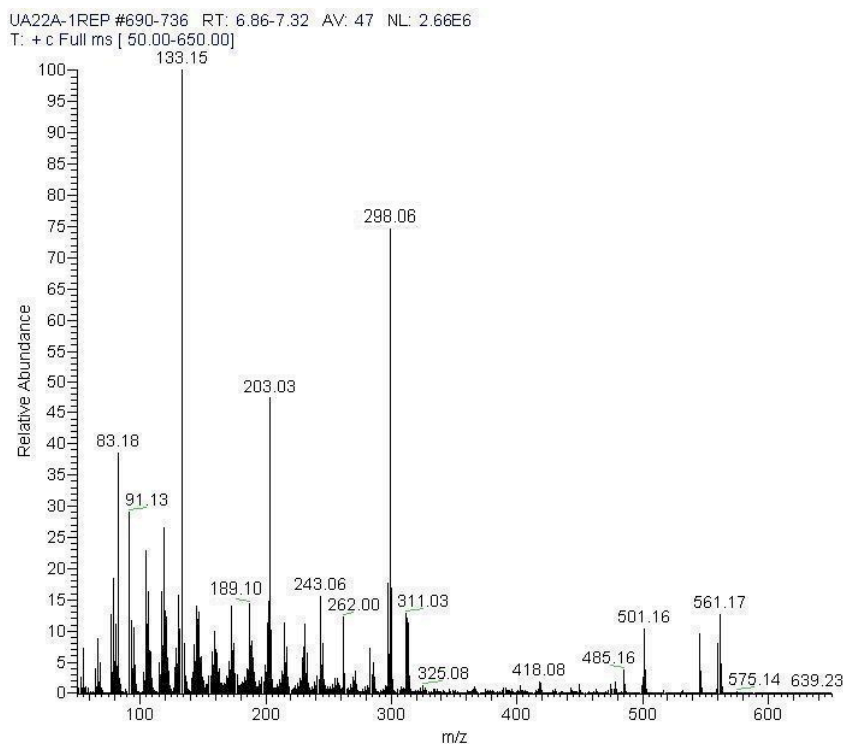


Figura 2.63: Espectro de massa do composto **17**, obtido por *EI*, em modo íon positivo.

Composto 18 (Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato)

O espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **18**, obtido por *ESI*, em modo íon positivo é apresentado na Figura 2.64.

No primeiro ciclo de fragmentação (*MS*), o sinal do íon molecular a m/z 549 ($[M+H]^+$) evidencia uma redução de 13 u.m.a em relação ao íon molecular do composto **17** e um acréscimo de 92 u.m.a. em comparação com o ácido ursólico.

O *MS2* para m/z 549 apresenta um sinal maioritário a m/z 489 a que corresponde uma perda de 60 u.m.a. sugerindo a presença do substituinte $HCOOCH_3$ em C-17, tal como observado nos compostos **14** a **17**.

No *MS* de 3ª ordem, do íon maioritário de *MS2*, m/z 489, observa-se a presença de dois sinais a m/z 286 e 203(100) a que correspondem perdas de, respetivamente, 203 e 286 u.m.a. o que evidencia a *FrDA* do anel C (m/z 286: $[(M+H)-60-203]^+$, m/z 203: $[(M+H)-60-286]^+$).

Um novo *MS3*, mas desta vez para m/z 203, originou os dois sinais a m/z 189(100) e 133 que são indicativos da decomposição de m/z 203 por perda de CH_2 (m/z 189) e de C_5H_{10} (m/z 133).

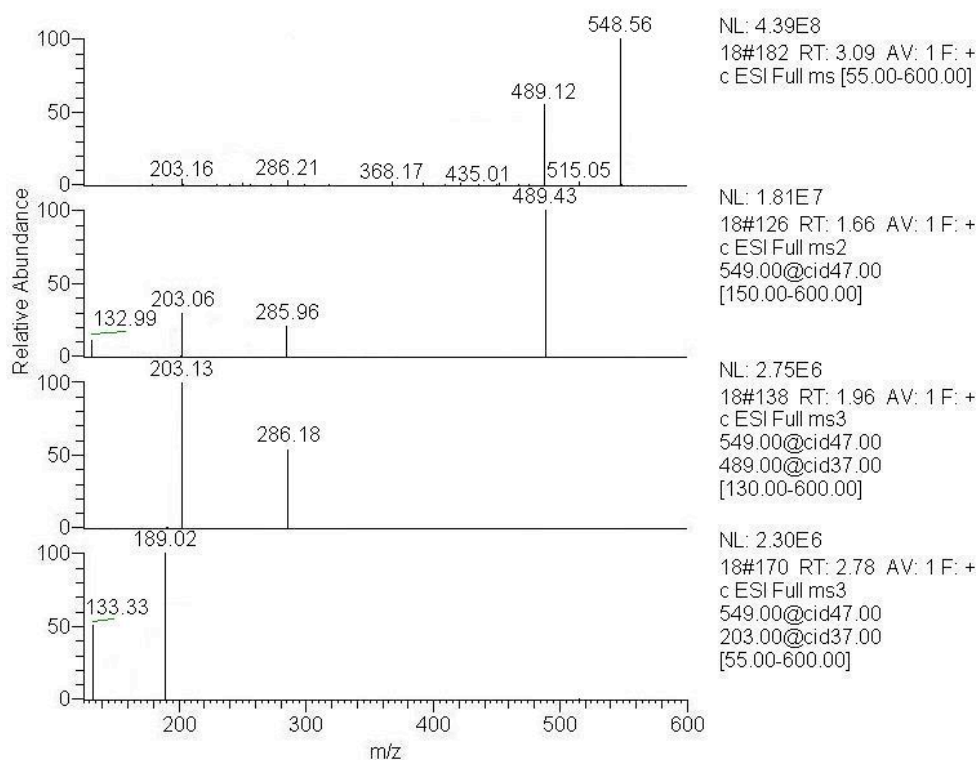


Figura 2.64: Espectro de massa *tandem* (*MS*, *MS2* e *MS3*) do composto **18**, obtido por *ESI* em modo íão positivo.

A fragmentação *rDA* do anel C (m/z 286 e 203) é indicativa, por um lado, da presença de uma estrutura 12-urseno (m/z 203), tal como verificado nos compostos **6**, **8**, **9**, **13** e **17** e, por outro, de um anel A e B igual ao dos compostos **13** e **16**, responsáveis pelo íão a m/z 286, com uma função cetona e um substituinte com fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3$ (Figura 2.65), conclusões corroboradas pelos dados obtidos por RMN- ^1H (Figura 2.119, página 126), RMN- ^{13}C (Figura 2.120, página 127) e DEPT-135 (Figura 2.122, página 128).

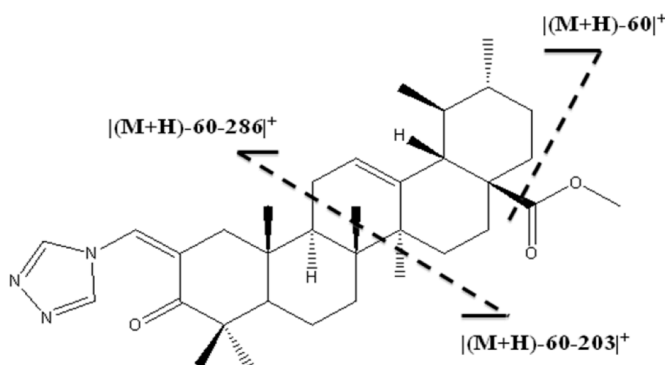


Figura 2.65: Padrão de fragmentação do composto **18**.

Ao realizarmos a análise do composto **18**, por impacto eletrónico, obtém-se o espectro apresentado na Figura 2.66.

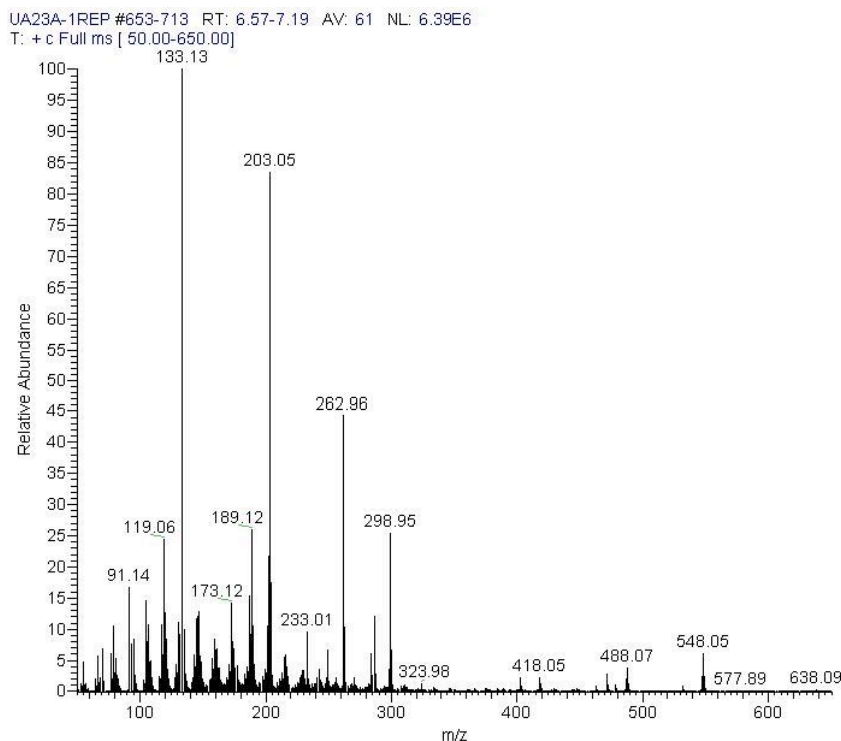


Figura 2.66: Espectro de massa do composto **18**, obtido por *EI*, em modo ião positivo.

Da sua observação, verifica-se a presença do ião molecular a m/z 548 (M^+) e dos sinais a m/z 488, 263, 203, 189 e 133(100) o que está de acordo com os dados obtidos pela espectrometria de massa *tandem* e podem corresponder, respetivamente, à perda do substituinte em C-17 (m/z 488: $([M-HCOOCH_3]^+)$), à *FrDA* do anel C (m/z 263 e 203) e à posterior decomposição de m/z 203, por perda de CH_2 (m/z 189) e por clivagem do anel E (m/z 133).

Os valores de m/z característicos dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico, e as respetivas intensidades relativas, estão resumidos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Características do espectro de massa (*ESI* e *EI*) dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico.

	Fragmentação	Caraterização estrutural
5 (AU)	<i>MS</i> : 457 (100) $[M+H]^+$	<i>m/z</i> 439 (perda de H ₂ O <> OH em C-3)
	<i>MS2</i> (457): 439 (100), 411 (47), 393 (69), 203 (5)	<i>m/z</i> 411 (perda do substituinte em C-17)
	<i>ESI MS3</i> (457, 439): 393 (59), 249 (21), 203 (100), 190 (33), 189 (55)	FrDA <i>m/z</i> 439 (<i>m/z</i> 249 e 190)
	<i>MS3</i> (457, 411): 393 (41), 208 (23), 203 (100), 189 (67)	FrDA <i>m/z</i> 411 (<i>m/z</i> 208 e 203)
	<i>MS3</i> (457, 393): 203 (100), 190 (27), 189 (34) e 133 (48)	FrDA <i>m/z</i> 393 (<i>m/z</i> 203 e 190) <i>m/z</i> 203 <> 12-urseno
6	<i>MS</i> : 564 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 107 u.m.a. em relação ao AU
	<i>MS2</i> (564): 454 (100), 394 (51), 251 (8), 203 (30), 189 (4)	perda do substituinte em C-17
	<i>ESI MS3</i> (564, 454): 394 (39), 251 (58), 203 (100)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (564, 394): 203 (100), 191 (68), 189 (27)	FrDA <i>m/z</i> 454 (<i>m/z</i> 251 e 203) FrDA <i>m/z</i> 394 (<i>m/z</i> 203 e 191) <i>m/z</i> 203 <> 12-urseno
	<i>EI MS</i> : 563 (20) M ⁺ , 503 (2), 453 (15), 393 (19), 250 (61), 203 (47), 189 (100), 133 (24)	<i>m/z</i> 191 (perda do substituinte em C-2 de <i>m/z</i> 251)
7	<i>MS</i> : 564 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 107 u.m.a. em relação ao AU
	<i>MS2</i> (564): 504 (18), 468 (100), 408 (54), 251 (7), 217 (19)	perda do substituinte em C-17
	<i>ESI MS3</i> (564, 468): 408 (37), 251 (43), 217 (100), 191 (33), 189 (18)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (564, 217): 189 (100)	FrDA <i>m/z</i> 468 (<i>m/z</i> 251 e 217) FrDA <i>m/z</i> 408 (<i>m/z</i> 217 e 191) <i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno
	<i>EI MS</i> : 563 (13) M ⁺ , 503 (1), 467 (16), 407 (11), 251 (24), 216 (73), 189 (100)	
8	<i>MS</i> : 506 (100) $[M+H]^+$	acréscimo 49 u.m.a. em relação ao AU
	<i>MS2</i> (506): 410 (100), 207 (21), 203 (54), 189 (13)	perda do substituinte em C-17
	<i>ESI MS3</i> (506, 410): 207 (54), 203 (100), 189 (31)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (506, 203): 189 (100), 133 (54)	FrDA <i>m/z</i> 410 (<i>m/z</i> 207 e 203) <i>m/z</i> 203 <> 12-urseno
	<i>EI MS</i> : 505 (7) M ⁺ , 409 (24), 203 (77), 189 (35), 133 (54)	

Os fragmentos característicos dos três ciclos de *MS* são apresentados a cores diferentes: lilás para o *MS*, azul para o *MS2* e verde para o *MS3*.

5 (AU): Ácido 3-β-hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico);

6: 3β-acetoxi-urs-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato

7: 3β-acetoxi-11-oxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato

8: 3-oxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato

Tabela 2.2: Características do espectro de massa (*ESI* e *EI*) dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (continuação).

	<i>Fragmentação</i>	<i>Caraterização estrutural</i>
9	<p>MS: 520 (100) $[M+H]^+$</p> <p>ESI MS2 (520): 410 (100), 207 (29), 203 (69), 189 (14)</p> <p>MS3 (520, 410): 207 (48), 203 (100), 189 (24)</p> <p>MS3 (520, 203): 189 (100), 133 (47)</p>	<p>acréscimo 63 u.m.a. em relação ao AU</p> <p>perda do substituinte em C-17</p> <p>ausência do sinal correspondente à perda de H₂O <> ausência de OH em C-3</p> <p>FrDA <i>m/z</i> 410 (<i>m/z</i> 207 e 203)</p> <p><i>m/z</i> 203 <> 12-urseno</p>
	<p>EI MS: 519 (13) M⁺, 409 (96), 313 (31), 203 (100), 189 (50), 133 (39)</p>	
10	<p>MS: 520 (100) $[M+H]^+$</p> <p>ESI MS2 (520): 424 (100), 217 (55), 207 (32), 189 (8)</p> <p>MS3 (520, 424): 217 (100), 207 (41), 189 (12)</p> <p>MS3 (520, 217): 189 (100)</p>	<p>acréscimo 63 u.m.a. em relação ao AU</p> <p>perda do substituinte em C-17</p> <p>ausência do sinal correspondente à perda de H₂O <> ausência de OH em C-3</p> <p>FrDA <i>m/z</i> 424 (<i>m/z</i> 217 e 207)</p> <p><i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno</p>
	<p>EI MS: 519 (5) M⁺, 423 (4), 216 (29), 189 (100)</p>	
11	<p>MS: 534 (100) $[M+H]^+$</p> <p>ESI MS2 (534): 424 (100), 217 (79), 207 (42), 189 (26)</p> <p>MS3 (534, 424): 217 (100), 207 (45), 189 (19)</p> <p>MS3 (534, 217): 189 (100)</p>	<p>acréscimo 77 u.m.a. em relação ao AU</p> <p>perda do substituinte em C-17</p> <p>ausência do sinal correspondente à perda de H₂O <> ausência de OH em C-3</p> <p>FrDA <i>m/z</i> 424 (<i>m/z</i> 217 e 207)</p> <p><i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno</p>
	<p>EI MS: 533 (7) M⁺, 423 (12), 216 (18), 189 (100)</p>	
12	<p>MS: 521 (100) $[M+H]^+$</p> <p>ESI MS2 (521): 424 (100), 217 (64), 207 (39), 189 (8)</p> <p>MS3 (521, 424): 217 (100), 207 (44), 189 (13)</p> <p>MS3 (521, 217): 189 (100)</p>	<p>acréscimo 64 u.m.a. em relação ao AU</p> <p>perda do substituinte em C-17</p> <p>ausência do sinal correspondente à perda de H₂O <> ausência de OH em C-3</p> <p>FrDA <i>m/z</i> 424 (<i>m/z</i> 217 e 207)</p> <p><i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno</p>
	<p>EI MS: 520 (6) M⁺, 423 (47), 216 (73), 189 (36)</p>	
13	<p>MS: 586 (100) $[M+H]^+$</p> <p>ESI MS2 (586): 489 (100), 286 (8), 203 (30), 189 (3)</p> <p>MS3 (586, 489): 286 (63), 203 (100), 189 (52)</p> <p>MS3 (586, 203): 189 (100), 133 (51)</p>	<p>acréscimo 129 u.m.a. em relação ao AU</p> <p>perda do substituinte em C-17</p> <p>ausência do sinal correspondente à perda de H₂O <> ausência de OH em C-3</p> <p>FrDA <i>m/z</i> 489 (<i>m/z</i> 286 e 203)</p> <p><i>m/z</i> 203 <> 12-urseno</p>
	<p>EI MS: 585 (4) M⁺, 488 (70), 203 (43), 189 (100), 133 (51)</p>	

Os fragmentos característicos dos três ciclos de *MS* são apresentados a cores diferentes: lilás para o *MS*, azul para o *MS2* e verde para o *MS3*.

9: 3-oxours-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato; 10: 3,11-dioxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato;

11: 3,11-dioxours-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato;

12: 3,11-dioxours-12-en-28-il-4*H*-triazol-4-carboxilato;

13: 28-(4*H*-triazol-4-il)-3,28-dioxours-12-en-2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno

Tabela 2.2: Características do espectro de massa (*ESI* e *EI*) dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (continuação).

	Fragmentação	Caraterização estrutural
14	MS: 562 (100) M+H ⁺	acréscimo 105 u.m.a. em relação ao AU
	ESI MS2 (562): 502 (100) , 285 (14), 217 (31), 189 (6)	perda do substituinte em C-17
	MS3 (562, 502): 285 (49) , 217 (100) , 189 (31)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	MS3 (562, 217): 189 (100)	FrDA <i>m/z</i> 502 (<i>m/z</i> 285 e 217)
	EI MS: 561 (24) M ⁺ , 501 (1), 285 (3), 216 (100), 189 (42)	<i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno
15	MS: 576 (100) M+H ⁺	acréscimo 119 u.m.a. em relação ao AU
	ESI MS2 (576): 516 (100) , 299 (19), 217 (36), 189 (5)	perda do substituinte em C-17
	MS3 (576, 516): 299 (43) , 217 (100) , 189 (29)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	MS3 (576, 217): 189 (100)	FrDA <i>m/z</i> 516 (<i>m/z</i> 299 e 217)
	EI MS: 575 (17) M ⁺ , 515 (2), 216 (54), 189 (50)	<i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno
16	MS: 563 (100) M+H ⁺	acréscimo 106 u.m.a. em relação ao AU
	ESI MS2 (563): 503 (100) , 286 (15), 217 (43), 189 (12)	perda do substituinte em C-17
	MS3 (563, 503): 286 (58) , 217 (100) , 189 (31)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	MS3 (563, 217): 189 (100)	FrDA <i>m/z</i> 503 (<i>m/z</i> 286 e 217)
	EI MS: 562 (10) M ⁺ , 286 (25), 216 (37), 189 (23)	<i>m/z</i> 217 <> 11-oxo-12-urseno
17	MS: 562 (100) M+H ⁺	acréscimo 105 u.m.a. em relação ao AU
	ESI MS2 (562): 502 (100) , 299 (12), 203 (31), 189 (3)	perda do substituinte em C-17
	MS3 (562, 502): 299 (51) , 203 (100) , 189 (26)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	MS3 (562, 203): 189 (100), 133 (50)	FrDA <i>m/z</i> 502 (<i>m/z</i> 299 e 203)
	EI MS: 561 (13) M ⁺ , 501 (11), 298 (75), 203 (47), 189 (15), 133 (100)	<i>m/z</i> 203 <> 12-urseno

Os fragmentos caraterísticos dos três ciclos de *MS* são apresentados a cores diferentes: lilás para o *MS*, azul para o *MS2* e verde para o *MS3*.

14: Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato;

15: Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato;

16: Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato;

17: Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato;

Tabela 2.2: Características do espectro de massa (*ESI* e *EI*) dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (continuação).

	<i>Fragmentação</i>	<i>Caraterização estrutural</i>
18	<i>ESI</i> <i>MS</i> : 549 (100) [M+H] ⁺	acréscimo 92 u.m.a. em relação ao AU
	<i>ESI</i> <i>MS2</i> (549): 489 (100), 286 (21), 203 (32), 133 (12)	perda do substituinte em C-17
	<i>ESI</i> <i>MS3</i> (549, 489): 286 (55), 203 (100)	ausência do sinal correspondente à perda de H ₂ O <> ausência de OH em C-3
	<i>MS3</i> (549, 203): 189 (100), 133 (52)	FrDA <i>m/z</i> 489 (<i>m/z</i> 286 e 203)
	<i>EI</i> <i>MS</i> : 548 (8) M ⁺ , 488 (4), 263 (45), 203 (83), 189 (26), 133 (100)	<i>m/z</i> 203 <> 12-urseno

Os fragmentos caraterísticos dos três ciclos de *MS* são apresentados a cores diferentes: lilás para o *MS*, azul para o *MS2* e verde para o *MS3*.

18: Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato

2.3. Ressonância magnética nuclear de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico

2.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - fundamentos

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), iniciada na década de quarenta do século XX, por trabalhos independentes dos físicos Felix Bloch e Edward Mills Purcell,⁴⁶ é uma técnica analítica que estuda a interação de radiação eletromagnética, na zona da radiofrequência (rf), com a matéria, o que conduz a transições entre níveis energéticos correspondentes às diferentes orientações permitidas do spin nuclear, quando o núcleo se encontra na presença de um elevado campo magnético. A ocorrência de transições pode ser detetada através da captação da radiação emitida quando os núcleos excitados retomam o nível de energia fundamental (de menor valor).^{47,48}

Detetar e medir o spin nuclear são os dois grandes objetivos da ressonância magnética nuclear. Todavia, o que a torna numa técnica preciosa para elucidação estrutural dos compostos, onde se encontram os átomos cujo spin está a ser analisado, é o facto da posição do sinal de ressonância de um núcleo ser influenciada pelo meio onde este está inserido (estrutura da molécula), que se traduz na observação que um núcleo dum determinado elemento pode gerar mais do que um sinal numa região vizinha da sua posição característica.⁴⁷

Os equipamentos utilizados neste método analítico, os espectrómetro de ressonância magnética nuclear (Figura 2.67), apesar de existirem modelos distintos, todos têm de apresentar quatro unidades básicas: um magnete que seja capaz de produzir um campo magnético homogéneo e forte no compartimento onde se coloca a amostra; um emissor de radiofrequência para que haja transições entre níveis energéticos; um recetor de radiofrequência que possibilite a sua deteção e uma unidade de tratamento de dados que permita converter os sinais em espectros.⁴⁶

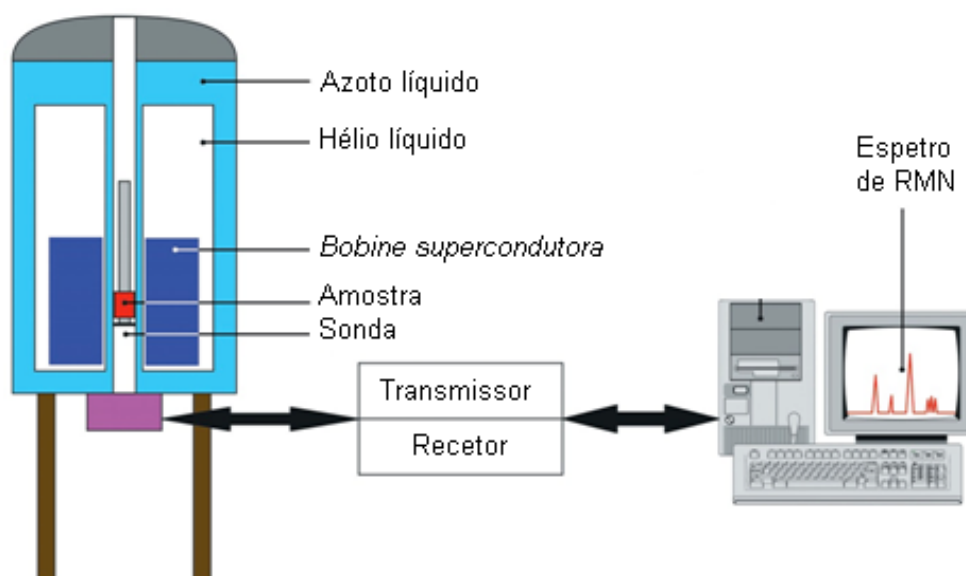


Figura 2.67:Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (figura adaptada de Colnago *et al.*, 2002).

2.3.1.1. RMN- ^1H e RMN- ^{13}C

Considerando o núcleo dos átomos como um pião carregado que roda em torno do seu eixo, criando o seu próprio campo magnético e sabendo que para obter espectros de ressonância magnética nuclear o elemento tem de apresentar um valor de spin diferente de zero, a utilização desta técnica só se torna possível com os núcleos que se comportam como magnetes,⁴⁹ como é o caso do ^1H e do ^{13}C .

Estes dois elementos, apesar de não serem os únicos a poderem ser utilizados para a observação do fenómeno de ressonância magnética, são os mais significativamente utilizados na elucidação estrutural,⁴⁷ uma vez que estão presentes em todos os compostos orgânicos.

Apesar do ^{13}C corresponder a apenas 1,1% do carbono existente, e por isso ser necessário amostras mais concentradas e maior tempo de acumulação de sinal, relativamente ao RMN- ^1H , a sua utilização é justificada pelo facto do isótopo mais abundante (^{12}C) não gerar sinais de RMN por não possuir spin magnético.⁴⁷

2.3.2. Análise estrutural de derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das técnicas mais utilizadas, atualmente, para a elucidação estrutural de compostos orgânicos, em geral, e dos triterpenóides pentacíclicos, em particular.

Desde os primeiros trabalhos de Knight, em 1974, com a utilização desta metodologia analítica para a caracterização estrutural de triterpenóides pentacíclicos,⁵⁰ o volume de publicações nesta área^{3,5-9,51,52} tem vindo a crescer, gradualmente.

2.3.2.1. Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico

Os derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico (**2**, **3** e **4**)⁸ foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN-¹H).

Composto 2 (Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-3-oxo-olea-12-en-28-oato)

O composto **2**, semi-sintetizado a partir do ácido oleanólico, possui o espectro de RMN-¹H apresentado na Figura 2.68.

O conjunto de três sinais na zona aromática do seu espectro: a 8,20 ppm (s, 1H), 7,45 ppm (1H, s) e 7,10 ppm (1H,s) indicam a presença dos prótons aromáticos do anel imidazol. O duplo dubleto (dd) a 5,75 ppm, com uma constante de acoplamento de 19,2 Hz, foi atribuído ao próton de C-12 e é indicativo da presença de uma dupla ligação neste carbono.

O sinal singlete (s) a 3,63 ppm, com uma integração de três prótons, foi atribuído ao grupo metil da função éster em C-17. Já o duplo dubleto (dd) a 2,87 ppm, com uma constante de acoplamento de 16,8 Hz corresponde ao próton de C-18 e indica-nos que estamos perante um derivado com esqueleto oleanano, ou seja, os dois grupos metil estão no C-20.

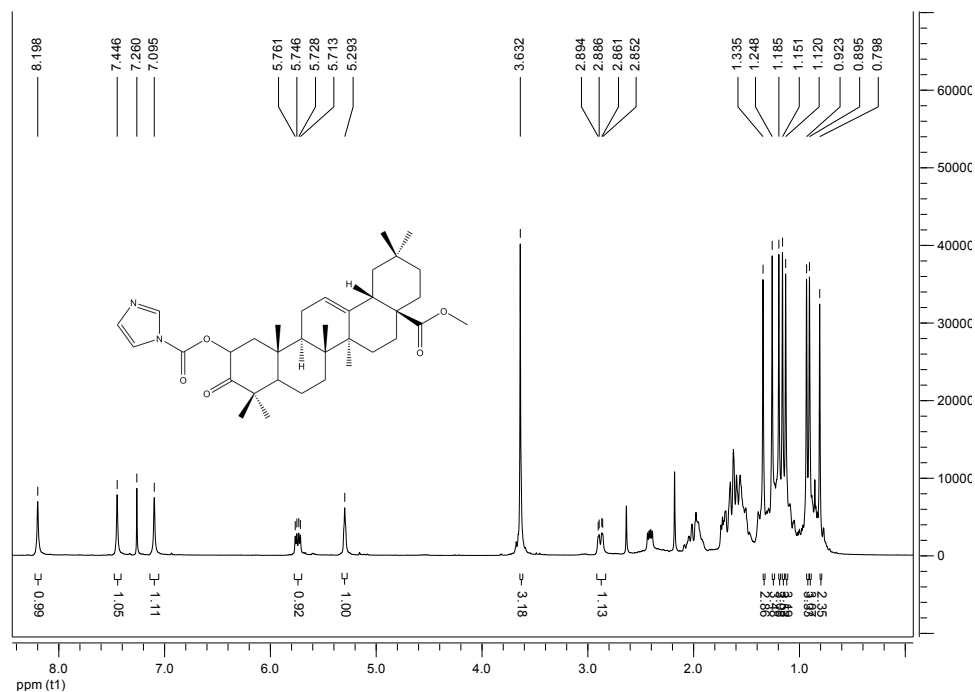


Figura 2.68: Espectros de RMN-¹H do composto 2.

Composto 3 (Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxo-olea-12-en-28-oato)

O espectro de RMN-¹H do composto 3 (Figura 2.69) apresenta dois sinais singletto, cada um com uma integração de um próton, a 7,13 ppm e 6,97 ppm, que correspondem aos dois prótons aromáticos do anel metil-imidazol.

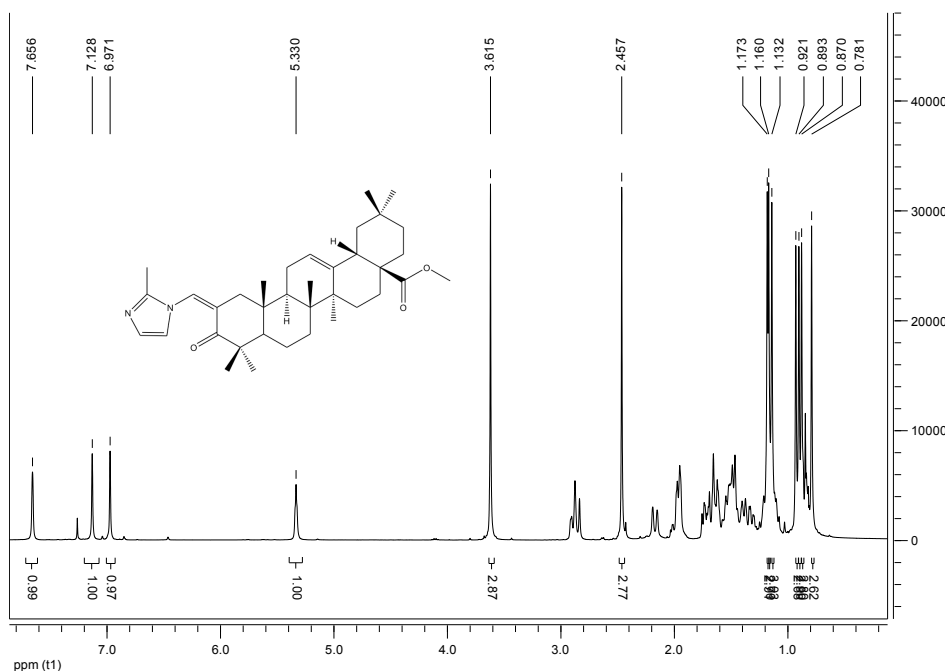


Figura 2.69: Espectros de RMN-¹H do composto 3.

Composto 4 (Metil 3-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-12-oxo-oleanan-28-oato)

O composto 4 foi analisado por RMN-¹H. A observação do seu espectro (Figura 2.70) permite-nos verificar a presença de três sinais, na zona aromática, cada um com integração de um próton, a 8,10 ppm (s), 7,39 ppm (s) e 7,06 ppm (s), que correspondem aos prótons aromáticos do anel imidazol. O duplo dubleto (dd), a 4,66 ppm, com uma constante geminal de 16,4 Hz foi atribuído aos prótons de C-3 e o sinal a 3,67 ppm (3H s) é indicativo da presença do grupo metil da função éster em C-17.

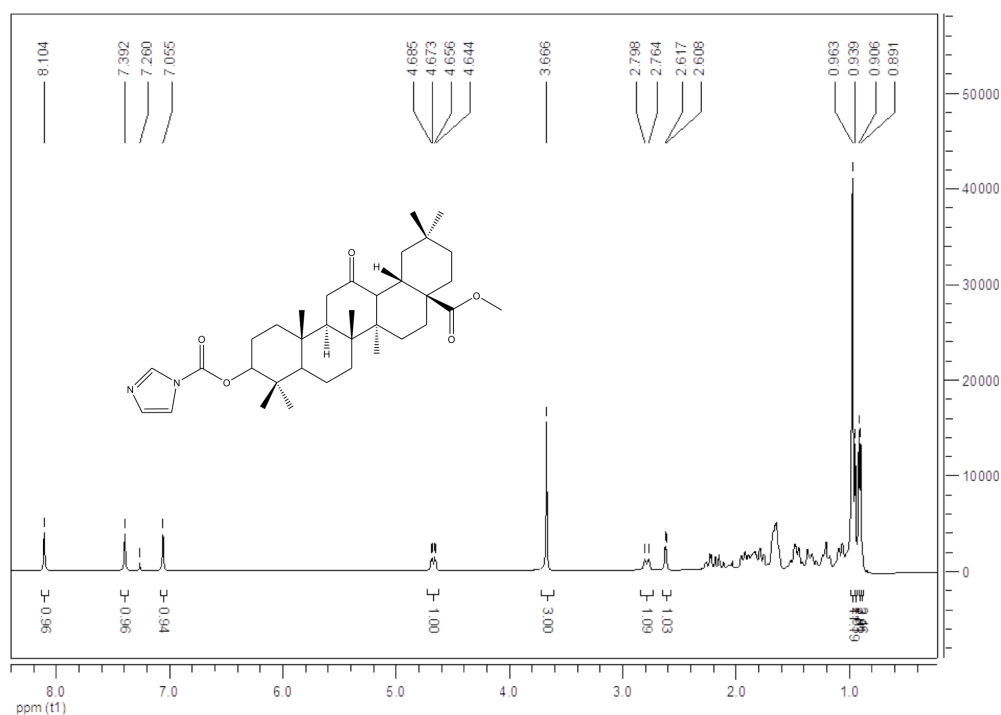


Figura 2.70: Espectros de RMN-¹H do composto 4.

Na tabela 2.4, são apresentados os sinais de RMN-¹H mais característicos de cada um dos compostos 2, 3 e 4 e as respectivas atribuições.

Tabela 2.3: Sinais RMN-¹H caraterísticos dos compostos **2**, **3** e **4**.

Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico	
2	δ= 8,20 (1H s imidazol), 7,44 (1H s imidazol), 7,10 (1H s imidazol), 5,75 (1H dd <i>J</i> 19.2Hz H-12), 3,63 (3H s COCH ₃), 2,87 (1H dd <i>J</i> 16.8Hz H-18)
3	δ= 7,13 (1H s metil-imidazol), 6,97 (1H s metil-imidazol), 5,33 (1H s CH-C ₄ H ₅ N ₂), 3,62 (3H s COCH ₃), 2,46 (3H s CH ₃ -C ₃ H ₂ N ₂)
4	δ= 8,10 (1H s imidazol), 7,39 (1H s imidazol), 7,06 (1H s imidazol), 4,66 (1H dd <i>J</i> 16.4Hz H-3).

2: Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-3-oxo-olea-12-en-28-oato;

3: Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxo-olea-12-en-28-oato;

4: Metil 3-(1*H*-imidazol-1-il)-carboxilato-12-oxo-oleanan-28-oato.

2.3.2.2. Derivados semi-sintéticos do ácido ursólico

Treze novos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (**6-18**)^{3,8} foram caraterizados por ressonância magnética nuclear – RMN ¹H, RMN ¹³C e DEPT-135 “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”.

Composto **6** (3β-acetoxi-urs-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato)

O composto **6** foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.71), RMN-¹³C (Figuras 2.72 e 2.73) e DEPT-135 (Figura 2.74).

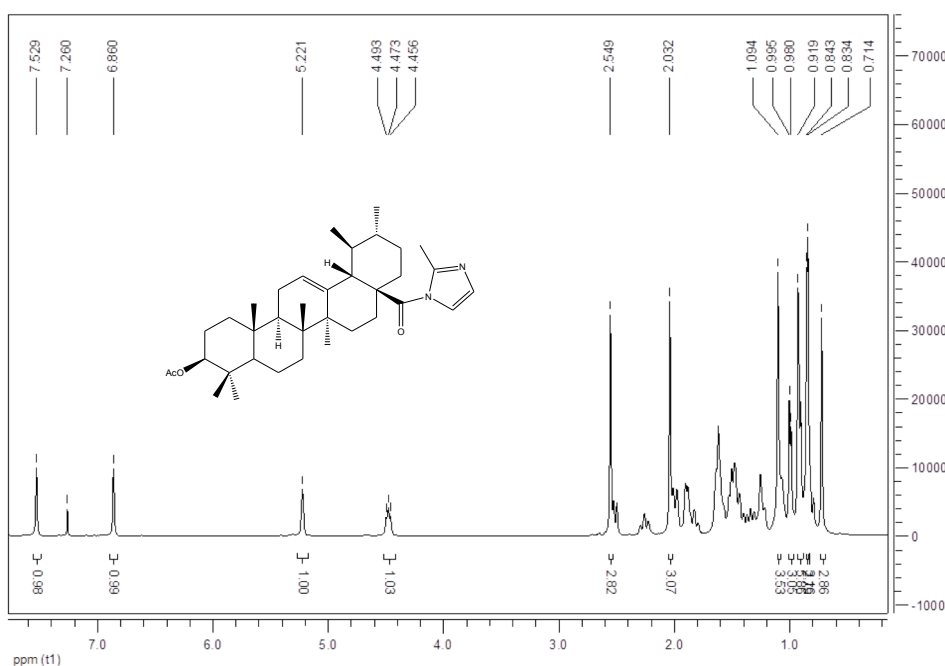


Figura 2.71: Espetros de RMN-¹H do composto **6**.

A observação do seu espectro de RMN-¹H (figura 2.71) revela a presença de dois sinais singlete (s), na zona aromática, cada um com uma integração de um próton, a 7,53 ppm e 6,86 ppm, que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel imidazol. O singlete a 5,22 ppm (1H) corresponde ao próton do C-12 e é indicativo da dupla ligação neste carbono, sendo o tripleto (t) a 4,47ppm, com uma contante de acoplamento de 14,86 Hz, atribuído ao próton α de C-3. Os dois sinais singlete a 2,55 ppm e 2,03 ppm foram atribuídos aos prótons do grupo metil do imidazol em C-28 e do acetato em C-3, respetivamente.

A análise do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.72 e 2.73) que foi realizada, conjuntamente com o DEPT-135 (Figura 2.74), revela a presença de trinta e seis carbonos: nove deles quaternários (sem sinal no DEPT-135), outros nove do tipo CH₂ (sinais negativos no DEPT-135) e os restantes dezoito do tipo CH ou CH₃ (sinais positivos no DEPT-135).

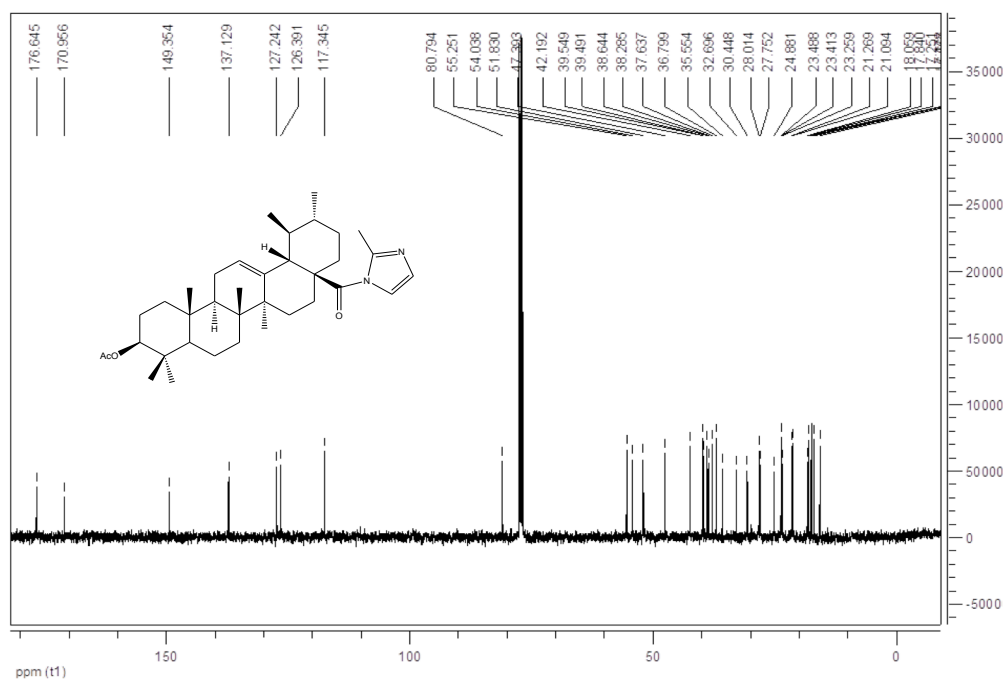


Figura 2.72: Espectros de RMN-¹³C do composto 6.

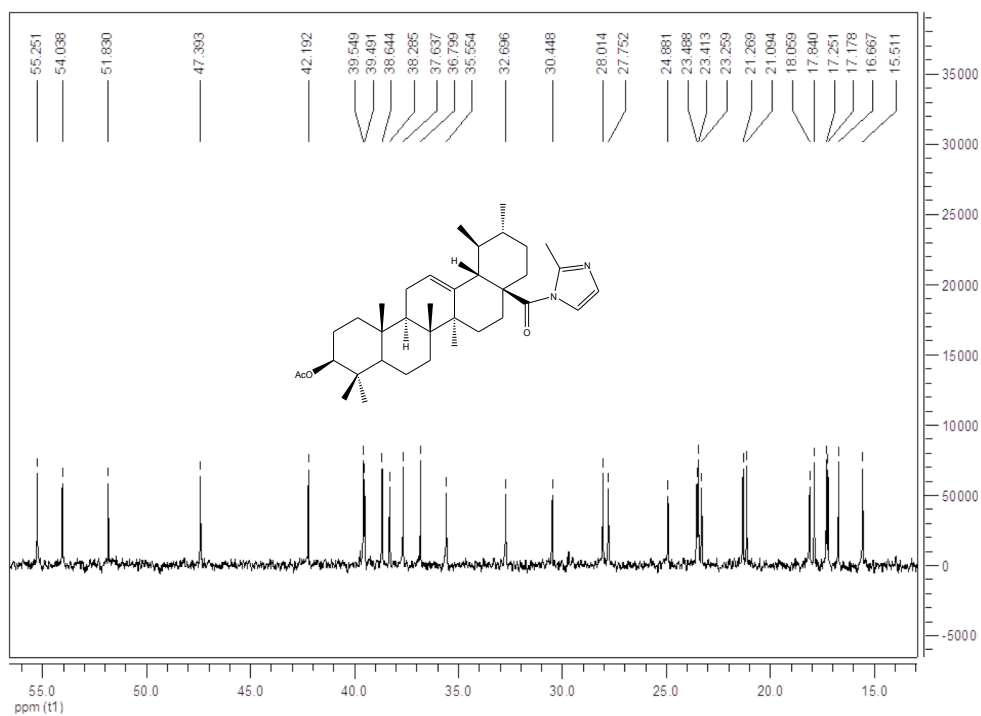


Figura 2.73: Ampliação da zona δ 56ppm–13ppm do espectros de RMN- ^{13}C do composto 6.

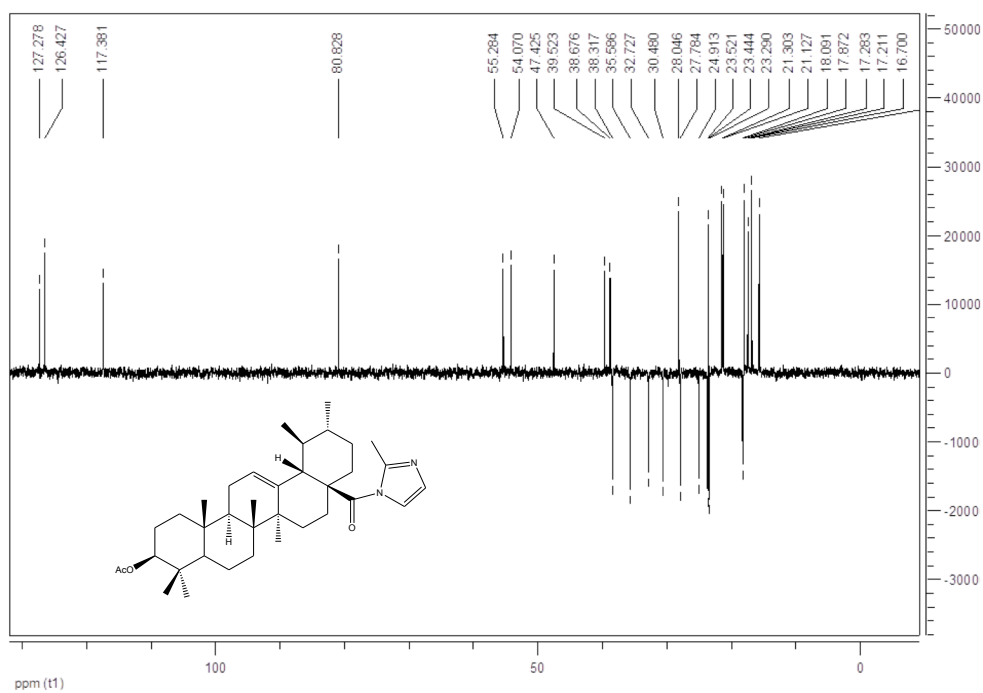


Figura 2.74: Espectro de DEPT-135 do composto 6.

O sinal a δ 176,65 ppm foi atribuído ao carbonilo a C-28 e, por ser menor do que para o ácido livre (δ 180 ppm)^{9;51} indica a presença de um substituinte, o metil-imidazol, a cujos carbonos correspondem os sinais: δ 149,35 ppm (C), δ 127,24 ppm (CH), δ 117,35 ppm (CH) e 15,51 ppm (CH₃).

Os sinais a δ 126,39 ppm e δ 137,13 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura^{9;51-52} foram atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente, enquanto que ao grupo acetato em C-3 correspondem os sinais δ 170,96 ppm (O-C(O)-CH₃) e δ 21,09 ppm (O-C(O)-CH₃).

Composto 7 (3 β -acetoxi-11-oxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato)

O composto 7 foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.75), RMN-¹³C (Figuras 2.76 e 2.77) e DEPT-135 (Figura 2.78).

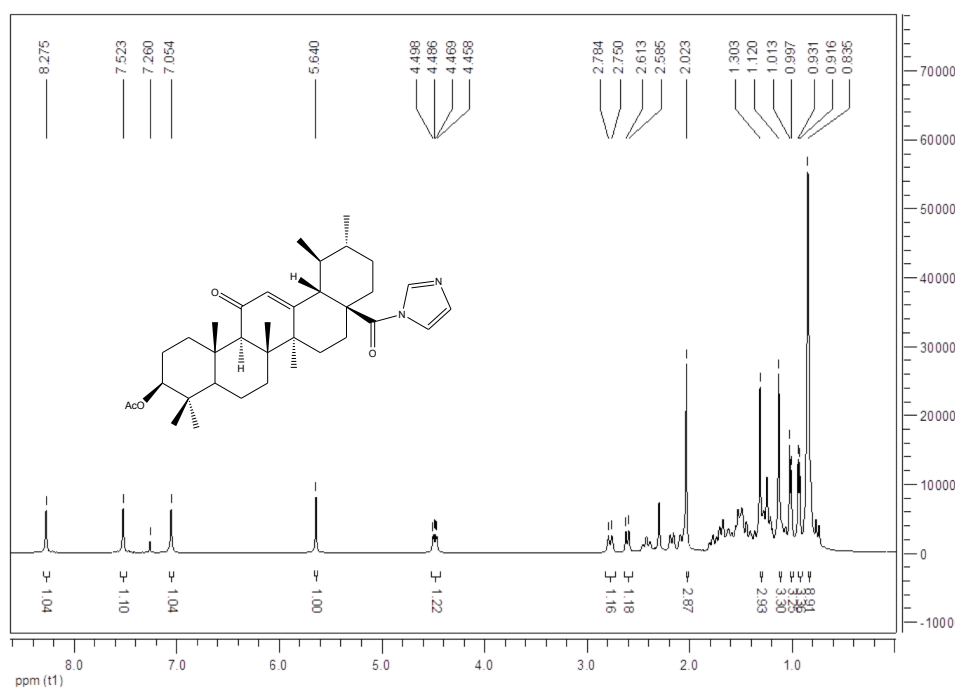


Figura 2.75: Espetros de RMN-¹H do composto 7.

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.75) revela a presença de três sinais na zona aromática: a 8,28 ppm (1H s), 7,52 ppm (1H s) e 7,05 ppm (1H s), indicativos dos três prótons aromáticos do anel imidazol. O singlete a 5,64 ppm (1H) corresponde ao próton de C-12, enquanto que o duplo dubleto (dd) a 4,48ppm, com uma constante de acoplamento geminal de 15,98 Hz, foi atribuído ao próton α de C-3. A 2,77 ppm (1H) observa-se um sinal dubleto (d), com uma constante de acoplamento de 13,55Hz que foi atribuído ao próton de C-18.

A análise conjunta dos seus espectro de RMN ¹³C (Figuras 2.76 e 2.77) e DEPT-135 (Figura 2.78), revela a presença de trinta e cinco carbonos, em que nove deles são quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezoito do tipo CH ou CH₃.

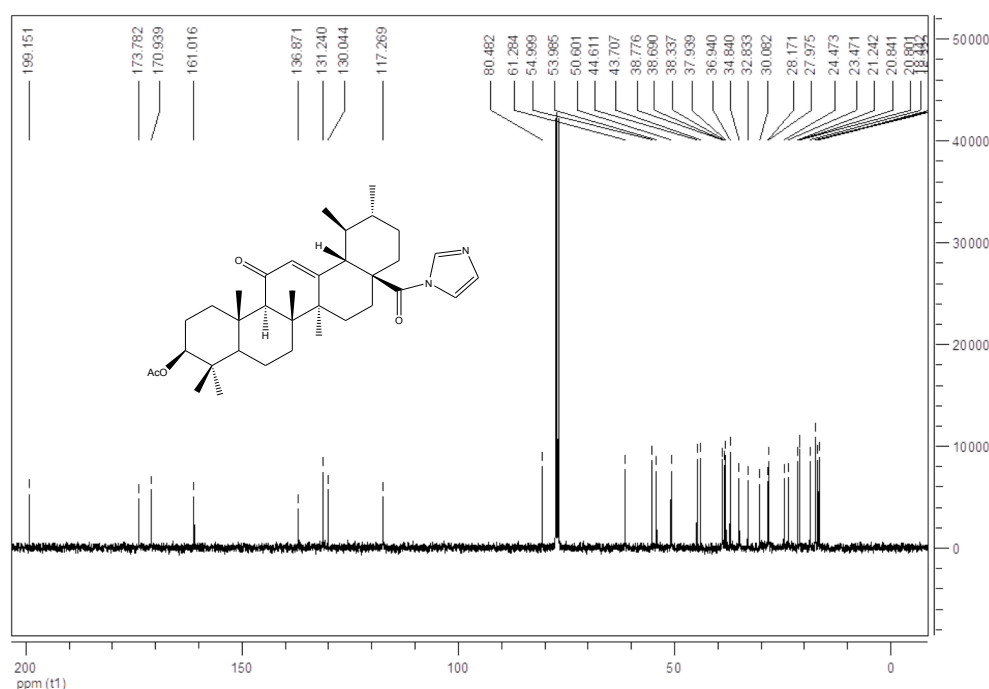


Figura 2.76: Espectros de RMN-¹³C do composto 7.

O sinal a δ 173,78 ppm foi atribuído a C-28^{3, 8, 9} que tem como substituinte o imidazol, a cujos carbonos correspondem os sinais: δ 136,87 ppm (CH), δ 131,24 ppm (CH) e δ 117,27 ppm (CH).

Os três sinais a δ 199,15 ppm, δ 130,04 ppm e δ 161,02 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura⁹ foram atribuídos a C-11, C-12 e C-13, respetivamente, e são indicativos do grupo carbonilo a C-11 e da dupla ligação em C-12.

Ao grupo acetato em C-3 foram atribuídos os sinais δ 170,94 ppm (O-C(O)-CH₃) e δ 21,24 ppm (O-C(O)-CH₃).⁹

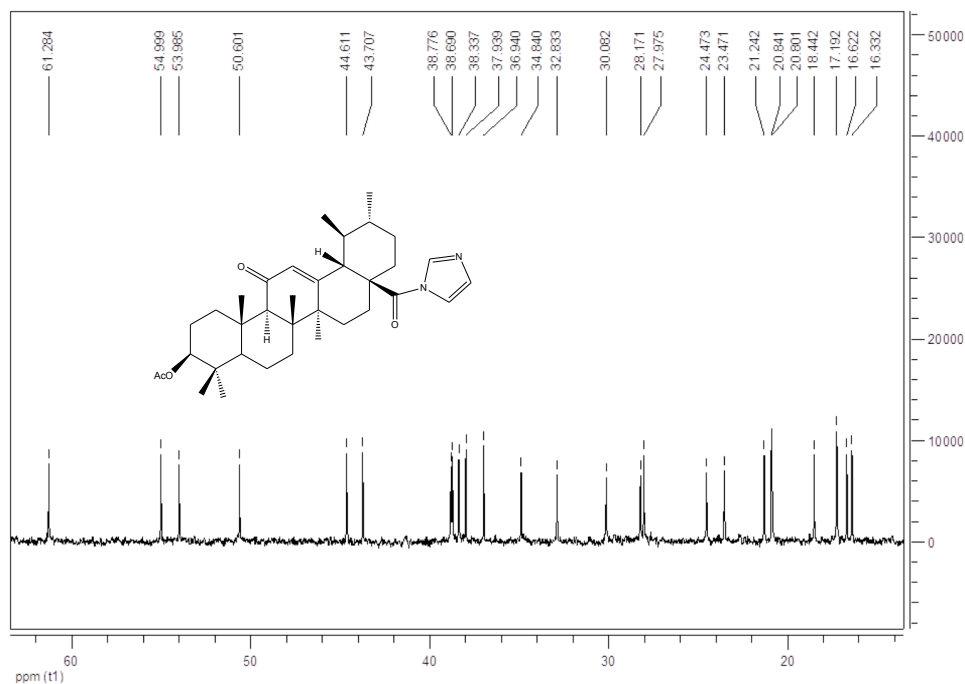


Figura 2.77: Ampliação da zona δ 62ppm–15ppm do espectros de RMN-¹³C do composto 7.

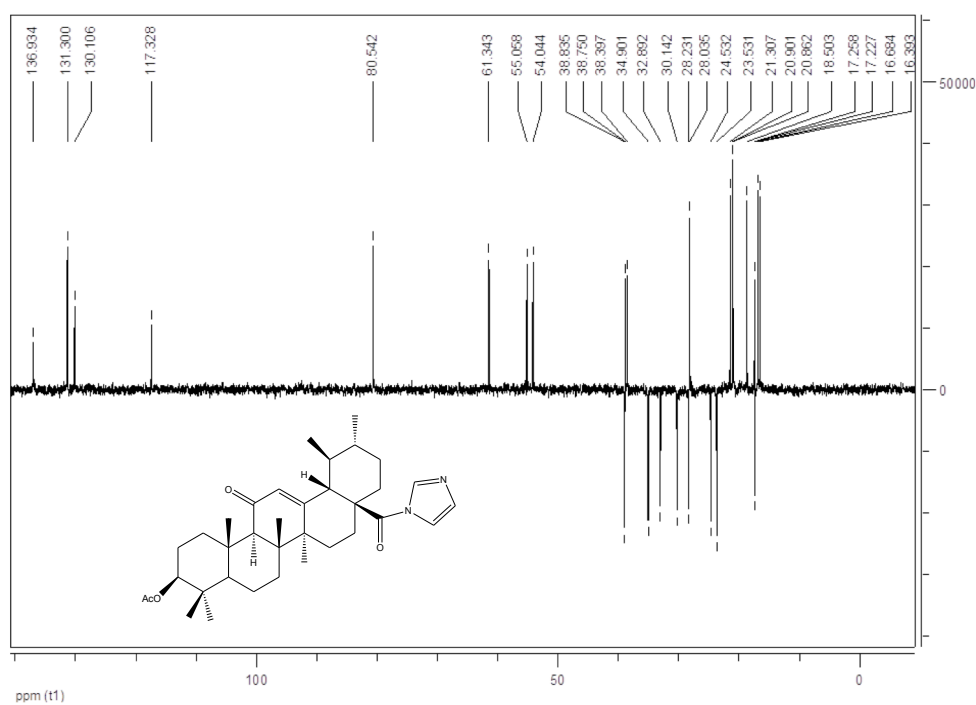


Figura 2.78: Espectro de DEPT-135 do composto 7.

Composto 8 (3-oxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato)

Os espectros de ressonância magnética nuclear do composto **8** são apresentados nas figuras 2.79, 2.80, 2.81 e 2.82.

O espectro de RMN-¹H (Figura 2.79) revela a presença de três sinais singletos (s), cada um com uma integração de um próton, a 8,46 ppm, 7,56 ppm e 7,11 ppm, que foram atribuídos aos três prótons aromáticos do anel imidazol. O tripleto a 5,25 ppm (1H) com uma constante de acoplamento de 7,32 Hz corresponde ao próton do C-12 e é indicativo da presença de uma dupla ligação $\Delta^{12,13}$.

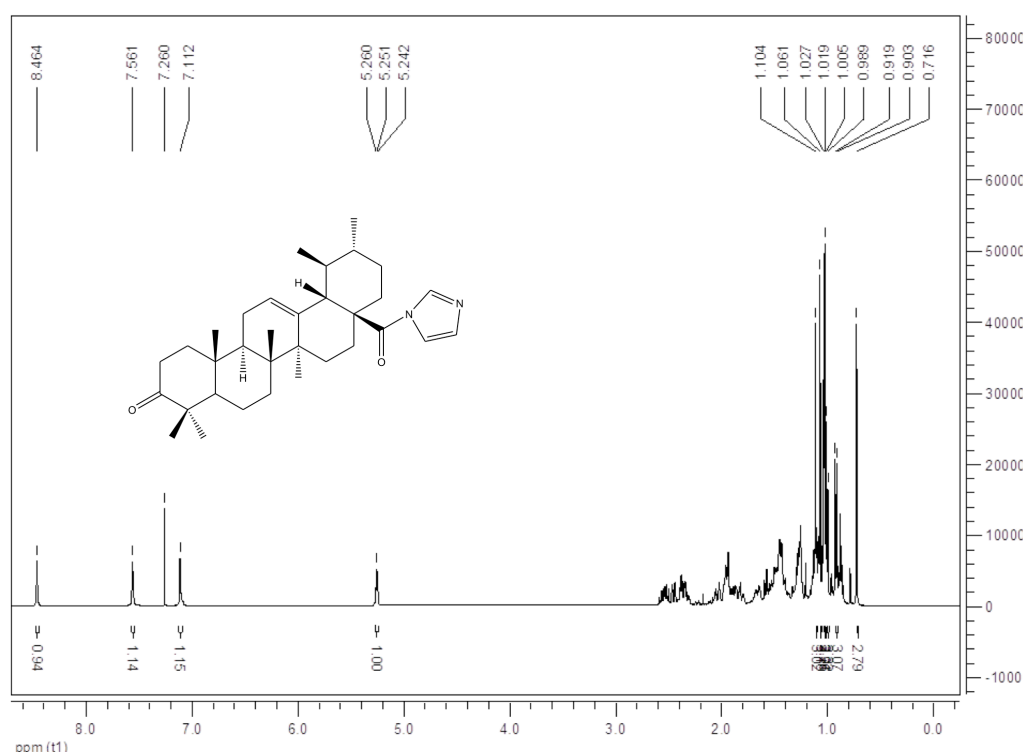


Figura 2.79: Espectros de RMN-¹H do composto **8**.

A análise do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.80 e 2.81) indica a presença de trinta e três carbonos que, segundo a experiência DEPT-135, se distribuem da seguinte forma: oito quaternários (C), nove do tipo CH₂ e os restantes dezasseis do tipo CH ou CH₃.

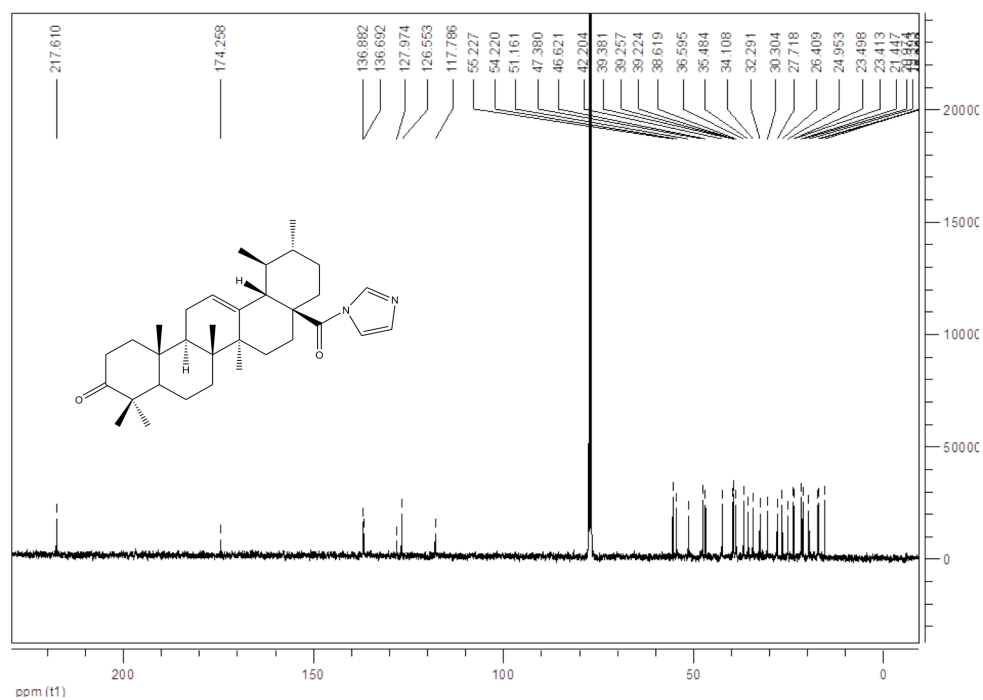


Figura 2.80: Espectros de RMN-¹³C do composto 8.

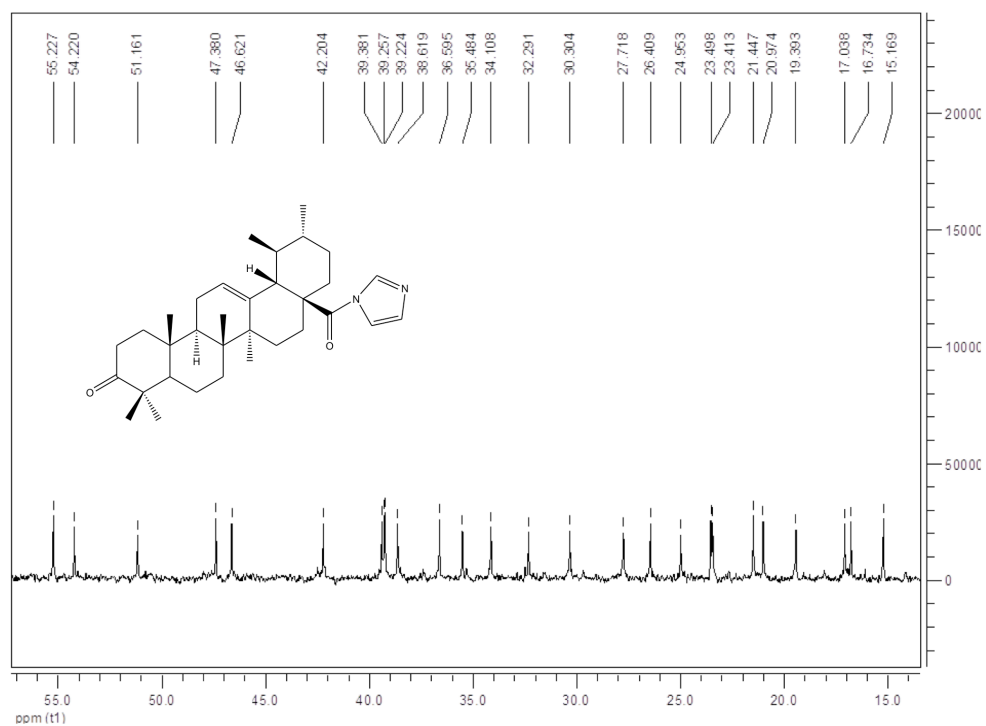


Figura 2.81: Ampliação da zona δ 57ppm–14ppm do espectros de RMN-¹³C do composto 8.

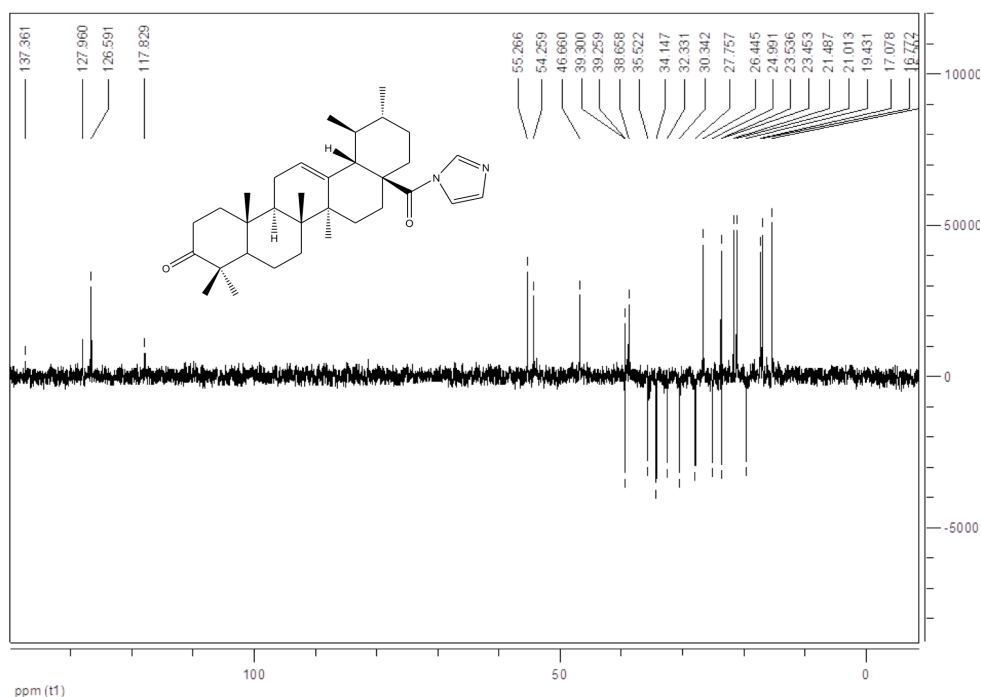


Figura 2.82: Espetro de DEPT-135 do composto **8**.

O sinal a δ 217,61 ppm, foi atribuído a C-3, devido à presença de um grupo carbonilo neste carbono, enquanto que o sinal a 174,28 ppm corresponde a C-28 ($\text{C}=\text{O}$),⁹ que tem como substituinte, o imidazol, a cujos carbonos são atribuídos os sinais: δ 136,69 ppm (CH), δ 127,97 ppm (CH) e δ 117,79 ppm (CH).

Os sinais a δ 126,55 ppm e δ 136,88 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura⁹ foram atribuídos a C-12 e C-13, respetivamente.

Composto **9** (3-oxours-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato)

O composto **9** foi analisado por RMN-¹H, RMN-¹³C e DEPT-135.

O seu espetro de RMN-¹H, apresentado na Figura 2.83 indica-nos a presença de dois sinais singlete (s): a 7,53 ppm (1H) e 6,87 ppm (1H), que correspondem aos dois prótons aromáticos do anel imidazol. O sinal a 5,24 ppm (1H s) foi atribuído ao próton do C-12 e é indicativo da ligação dupla neste carbono.

A 2,56 ppm, o sinal sigleto com uma integração de três prótons, corresponde ao grupo CH_3 do metil-imidazol, substituinte em C-28.

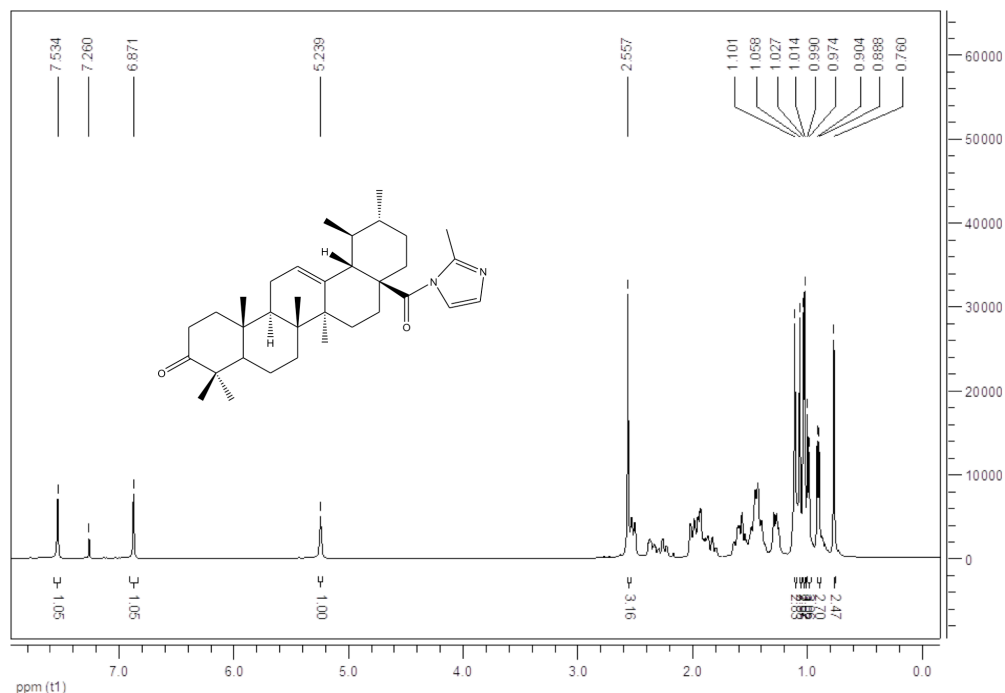


Figura 2.83: Espectros de RMN- ^1H do composto **9**.

A análise do seu espectro de RMN- ^{13}C (Figuras 2.84 e 2.85) que foi realizada, conjuntamente, com o DEPT-135 (Figura 2.86), revela a presença de trinta e quatro carbonos, em que: oito são quaternários (C), nove do tipo CH_2 e os restantes dezassete do tipo CH ou CH_3 .

O sinal a δ 217,53 ppm foi atribuído a C-3, devido à presença de um grupo carbonilo neste carbono, enquanto que o sinal a δ 176,55 ppm correspondente ao carbonilo de C-28 e é indicativo da presença de um substituinte, o metil-imidazol, a cujos carbonos são atribuídos os sinais: δ 149,34 ppm (C), δ 127,04 ppm (CH), δ 117,37 ppm (CH) e 15,18 ppm (CH_3).

A presença da dupla ligação $\Delta^{12,13}$ é confirmada pelos sinais a δ 126,25 ppm (C-12) e δ 137,20 ppm (C-13).⁹

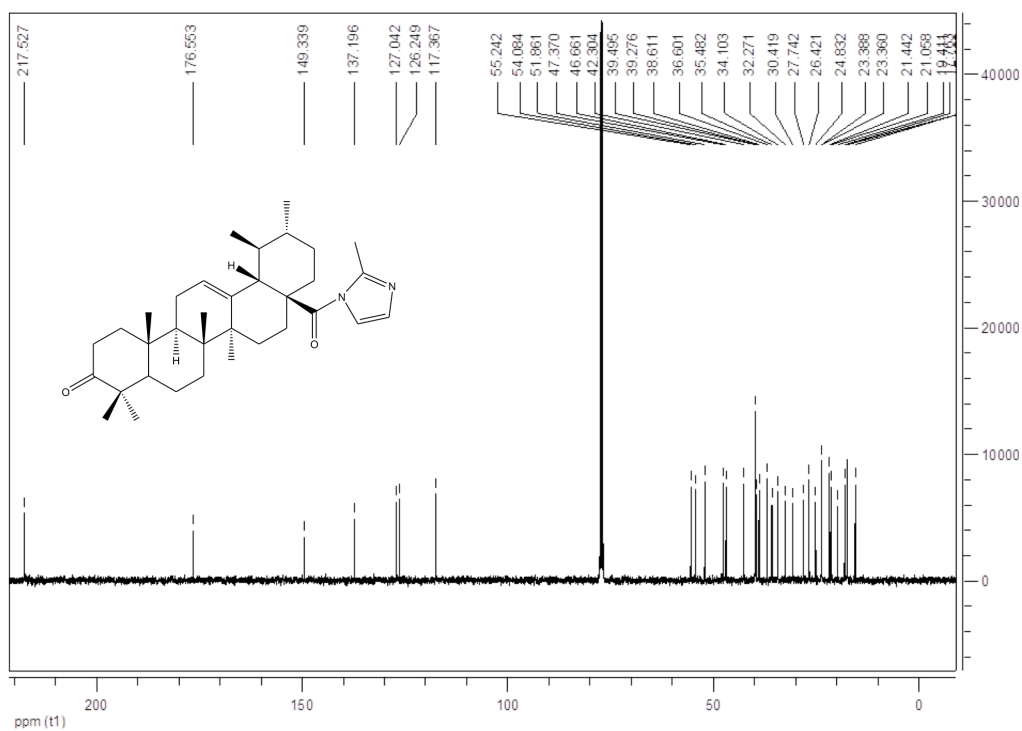


Figura 2.84: Espectros de RMN-¹³C do composto 9.

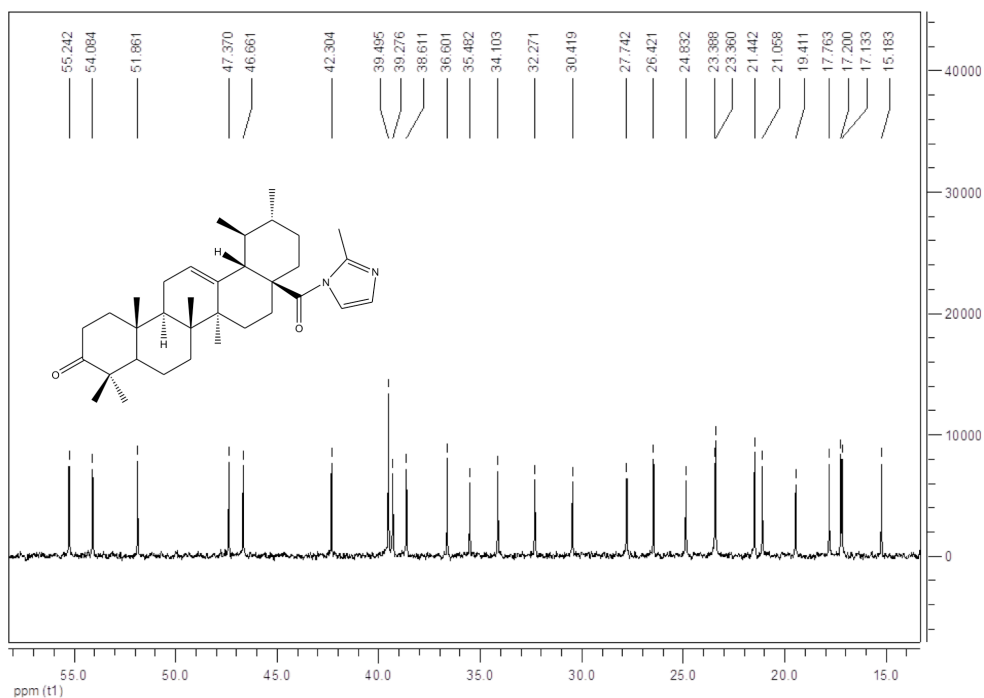


Figura 2.85: Ampliação da zona δ 58ppm–14ppm do espectros de RMN-¹³C do composto 9.

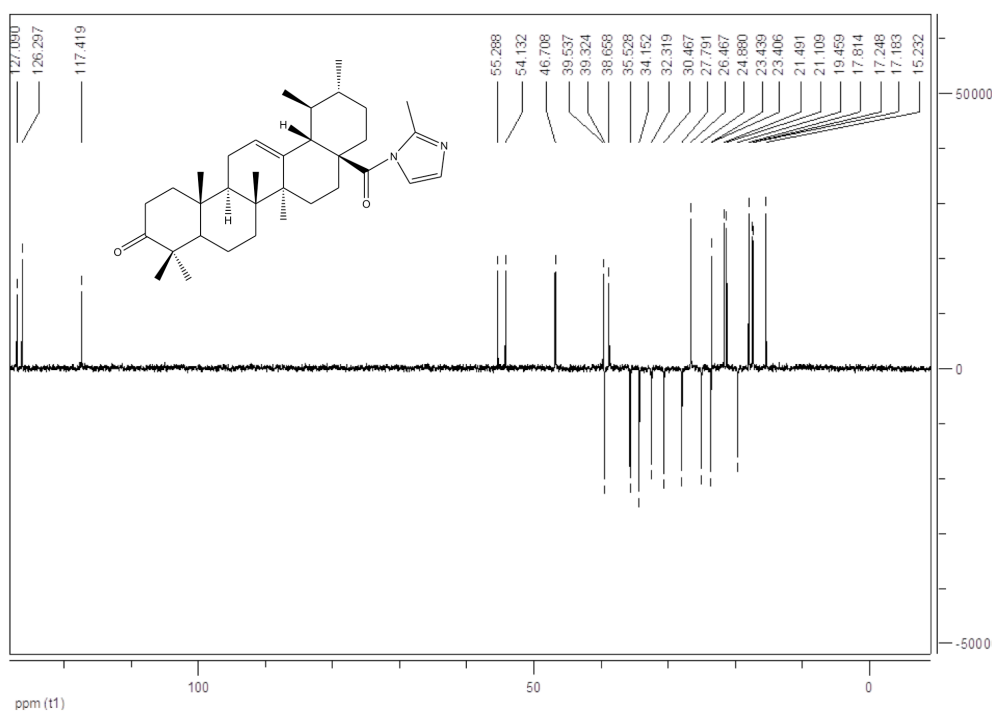


Figura 2.86: Espectro de DEPT-135 do composto 9.

Composto 10 (3,11-dioxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato)

Os espectros de ressonância magnética nuclear do composto 10 são apresentados nas Figuras 2.87, 2.88, 2.89 e 2.90.

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.87) revela a presença de três sinais singletos (s), cada um com uma integração de um próton, a 8,27 ppm, 7,53 ppm e 7,06 ppm, que foram atribuídos aos três prótons aromáticos do anel imidazol. O sinal singletos a 5,68 ppm (1H) corresponde ao próton do C-12 e é indicativo da função cetona em C-11 e da dupla ligação em C-12.

A análise dos espectros de RMN-¹³C (Figuras 2.88 e 2.89) e da experiência DEPT-135 (Figura 2.90), revela a presença de trinta e três carbonos (RMN-¹³C), em que: nove são quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezasseis do tipo CH ou CH₃ (DEPT-135).

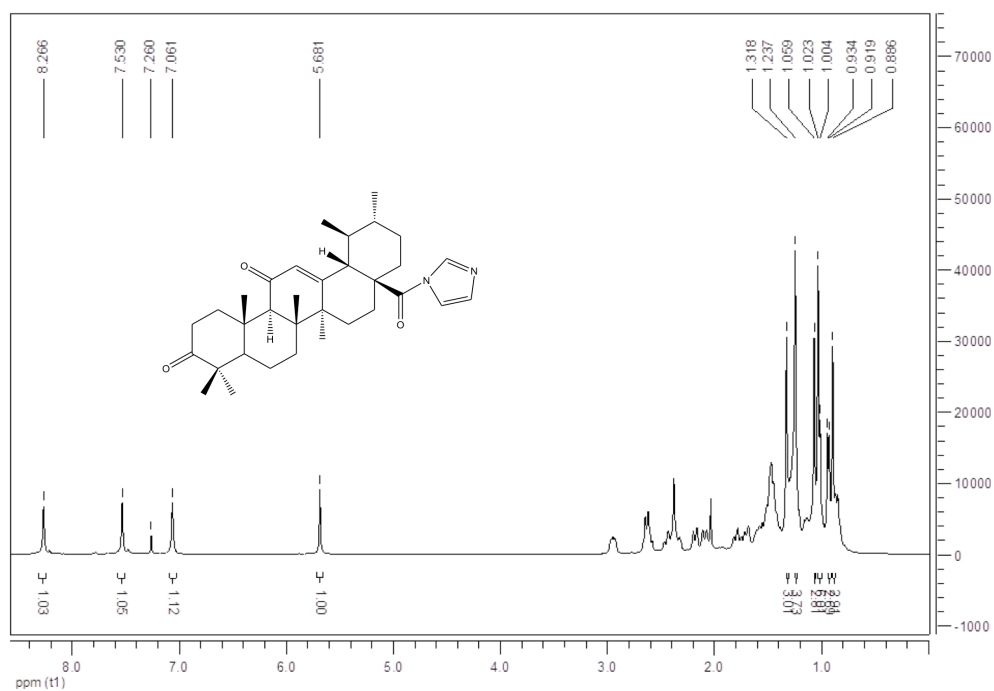


Figura 2.87: Espectros de RMN-¹H do composto 10.

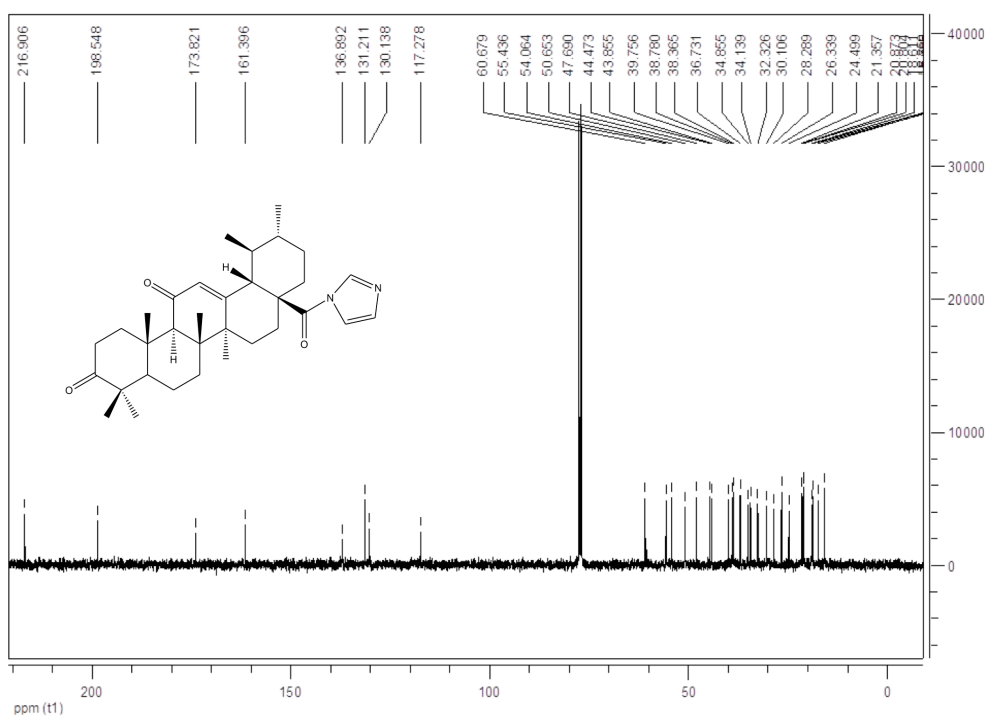


Figura 2.88: Espectros de RMN-¹³C do composto 10.

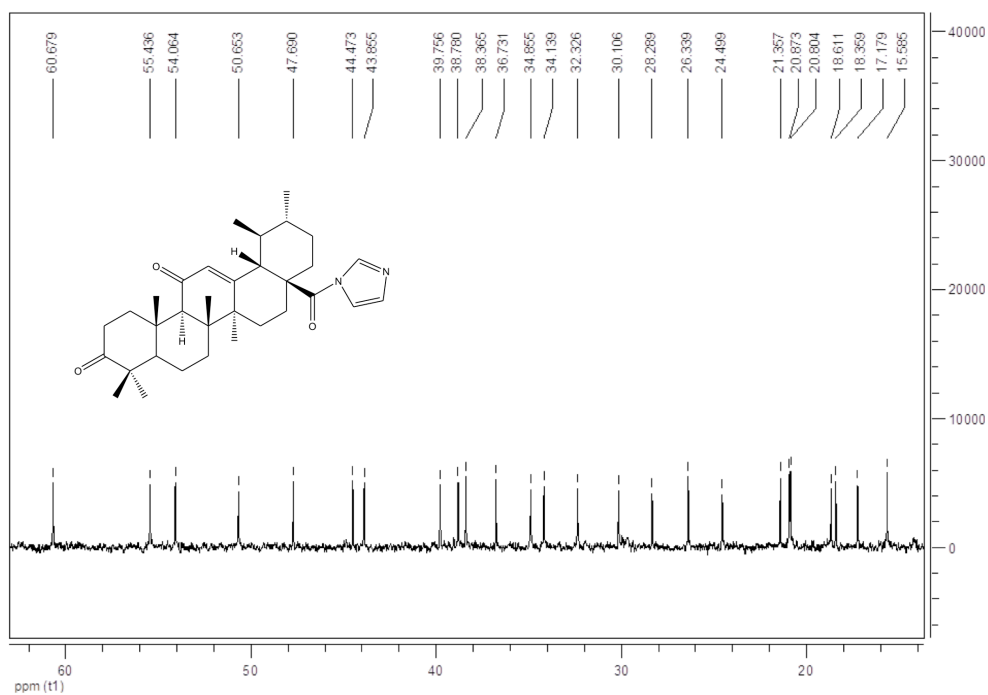


Figura 2.89: Ampliação da zona δ 61ppm–14ppm do espectros de RMN-¹³C do composto 10.

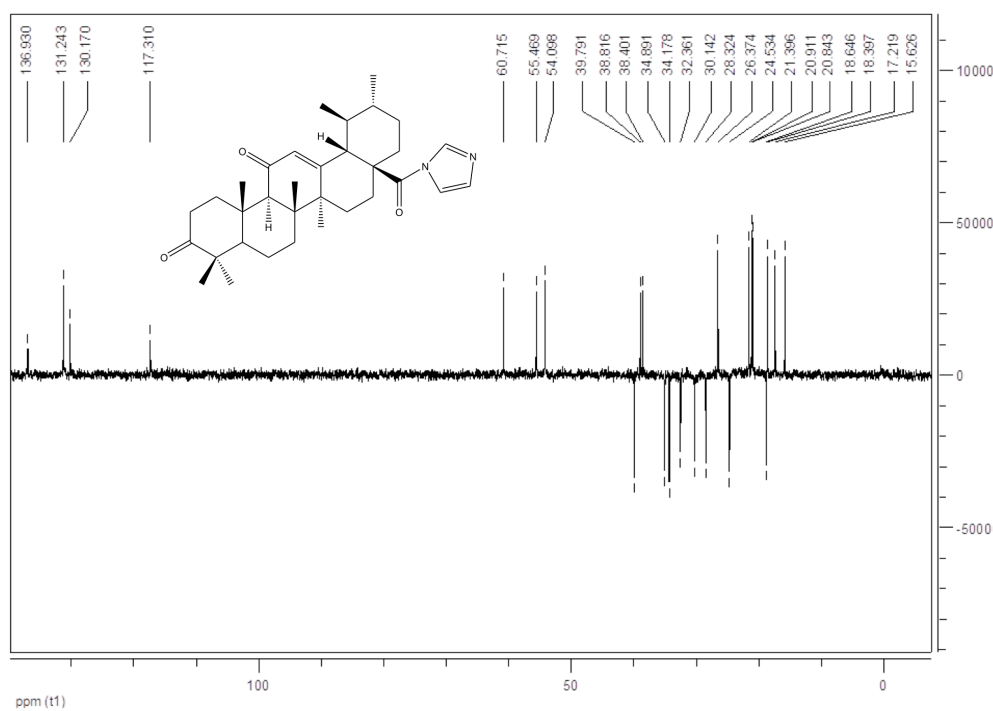


Figura 2.90: Espectro de DEPT-135 do composto 10.

O sinal a δ 216,91 ppm foi atribuído a C-3, devido à presença do grupo carbonilo neste carbono, enquanto que o sinal a δ 173,82 ppm corresponde ao carbonilo de C-28, que possui como substituinte o imidazol, a cujos carbonos são atribuídos os sinais: δ 136,89 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$), δ 130,14 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$) e δ 117,28 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$).

Os sinais a δ 198,55 ppm, δ 131,21 ppm e δ 161,40 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-11, C-12 e C-13, respectivamente, e são indicativos da presença do grupo carbonilo em C-11 e da dupla ligação $\Delta^{12,13}$, o que confirma os dados apurados na análise do espectro RMN-¹H do mesmo composto (Figura 2.87).

Composto 11 (3,11-dioxours-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato)

O composto 11 foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.91), RMN-¹³C (Figuras 2.92 e 2.93) e DEPT-135 (Figura 2.94).

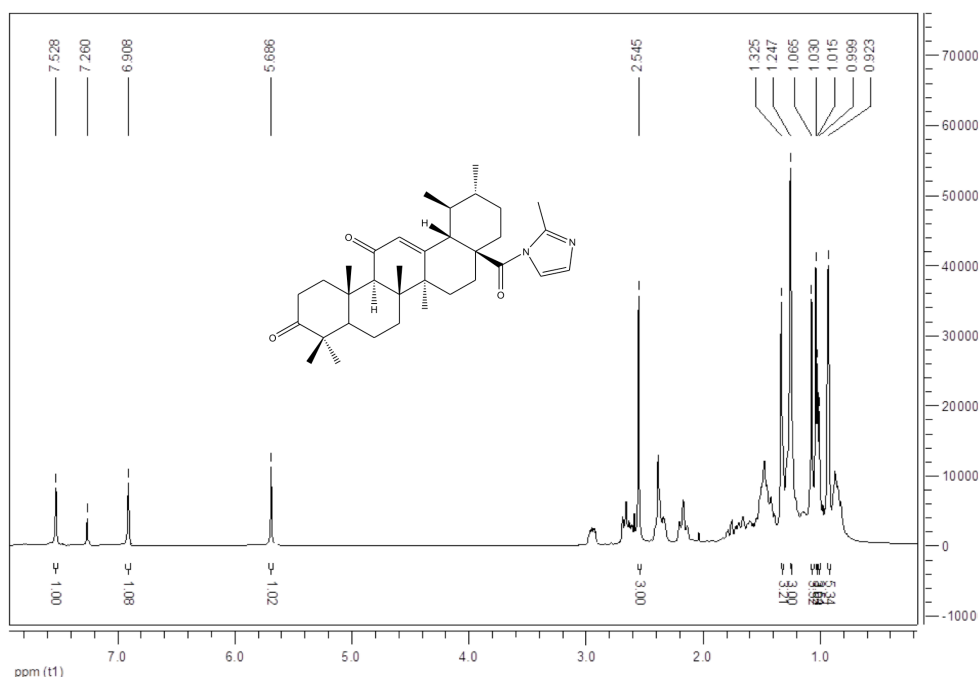


Figura 2.91: Espectros de RMN-¹H do composto 11.

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.91) revela a presença de dois sinais singletos (s), cada um com uma integração de um próton, a 7,53 ppm e 6,91 ppm, que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel imidazol, enquanto que o singletto a 5,69 ppm (1H) corresponde ao próton de C-12.

A análise do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.92 e 2.93) revela a presença de trinta e quatro carbonos que, segundo a experiência DEPT-135 (Figura 2.94), se distribuem da seguinte forma: dez quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezasseis do tipo CH ou CH₃.

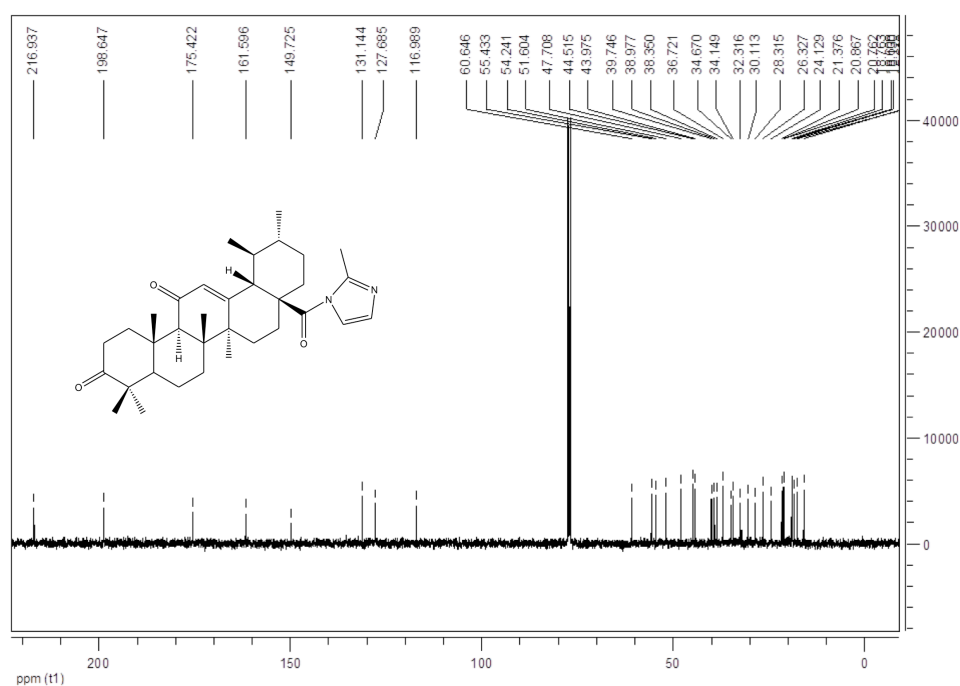


Figura 2.92: Espetros de RMN-¹³C do composto 11.

O sinal a δ 216,94 ppm foi atribuído ao grupo carbonilo de C-3, enquanto que o sinal a δ 175,42 ppm corresponde ao carbonilo de C-28, a cujo substituinte, o metil-imidazol, são atribuídos os sinais: δ 149,73 ppm (C), δ 127,69 ppm (CH), δ 116,99 ppm (CH) e 15,61 ppm (CH₃).

Os três sinais a δ 198,65 ppm, δ 131,14 ppm e δ 161,60 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-11, C-12 e C-13,

respetivamente, e são indicativos da presença de um grupo carbonilo em C-11 e da dupla ligação C12-C13, o que está de acordo com o observado no espectro de RMN-¹H (Figura 2.91), em que o singlete a 5,69 ppm foi atribuído ao próton de C-12.

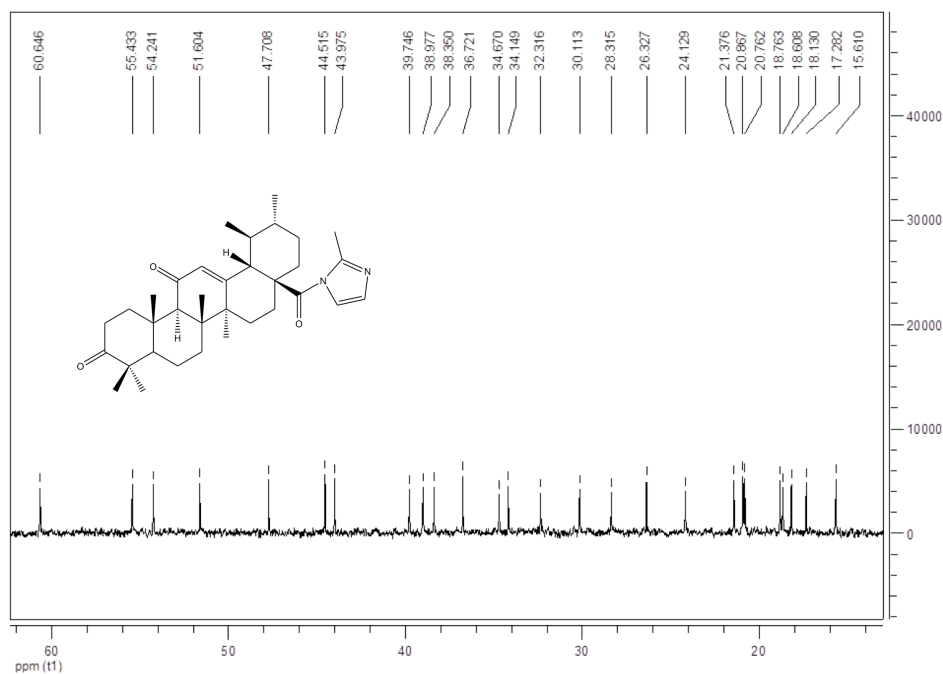


Figura 2.93: Ampliação da zona δ 62ppm–14ppm do espectros de RMN-¹³C do composto **11**.

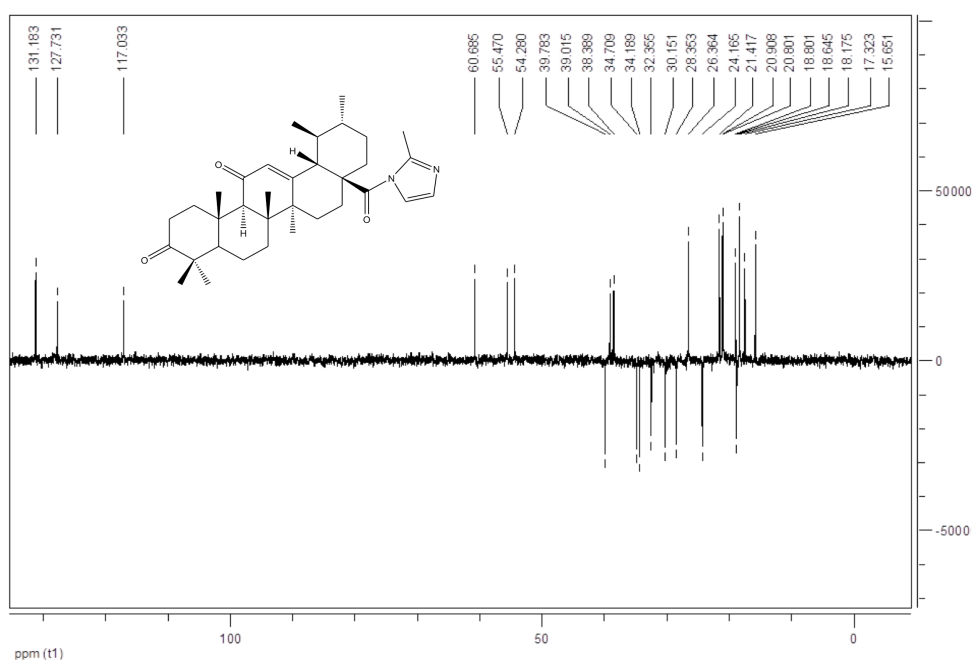


Figura 2.94: Espectro de DEPT-135 do composto **11**.

Composto 12 (3,11-dioxours-12-en-28-il-4H-triazol-4-carboxilato)

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT-135, do composto **12**, são apresentados nas Figuras 2.95, 2.96, 2.97 e 2.98.

O seu espectro de RMN ^1H (Figura 2.95) revela a presença de dois sinais singlete (s), na zona aromática: a 8,84 ppm (1H s) e 8,01 ppm (1H s), que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel triazol, enquanto que o singlete a 5,67 ppm (1H) foi atribuído ao próton de C-12.

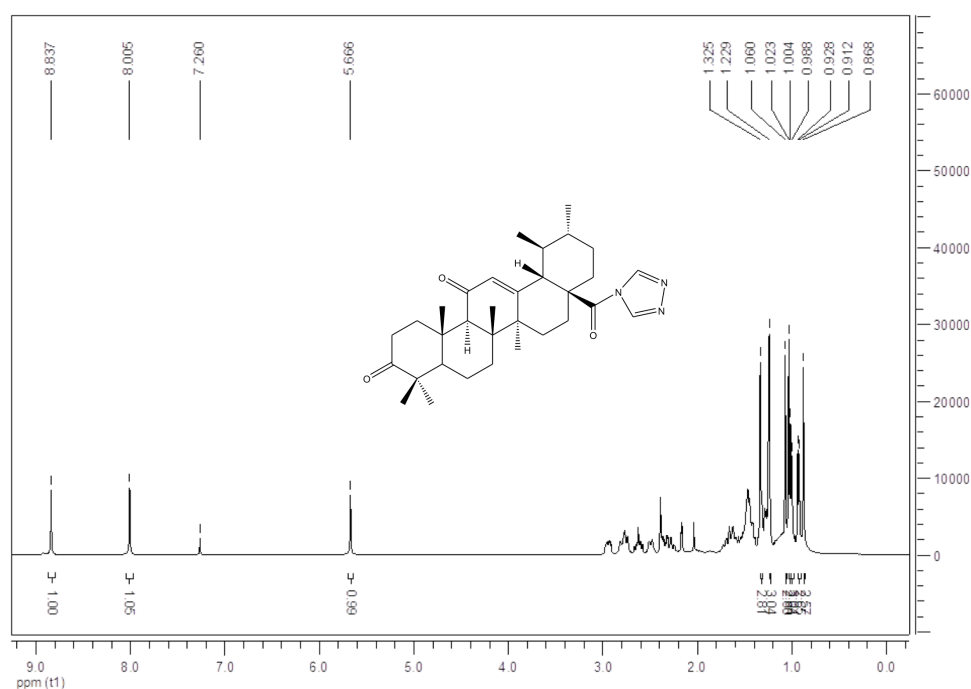


Figura 2.95: Espetros de RMN- ^1H do composto **12**.

A análise do seu espectro de RMN- ^{13}C (Figuras 2.96 e 2.97) que foi realizada, conjuntamente, com o DEPT-135 (Figura 2.98), indica a presença de trinta e dois carbonos: nove quaternários, oito do tipo CH_2 e os restantes quinze do tipo CH ou CH_3 .

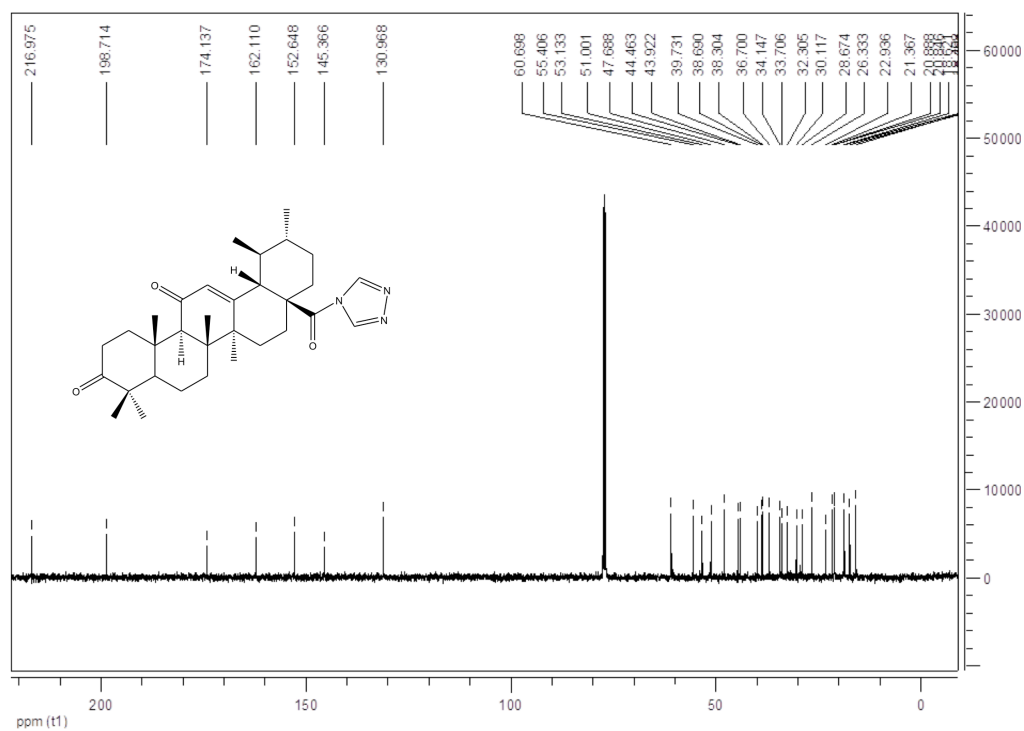


Figura 2.96: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 12.

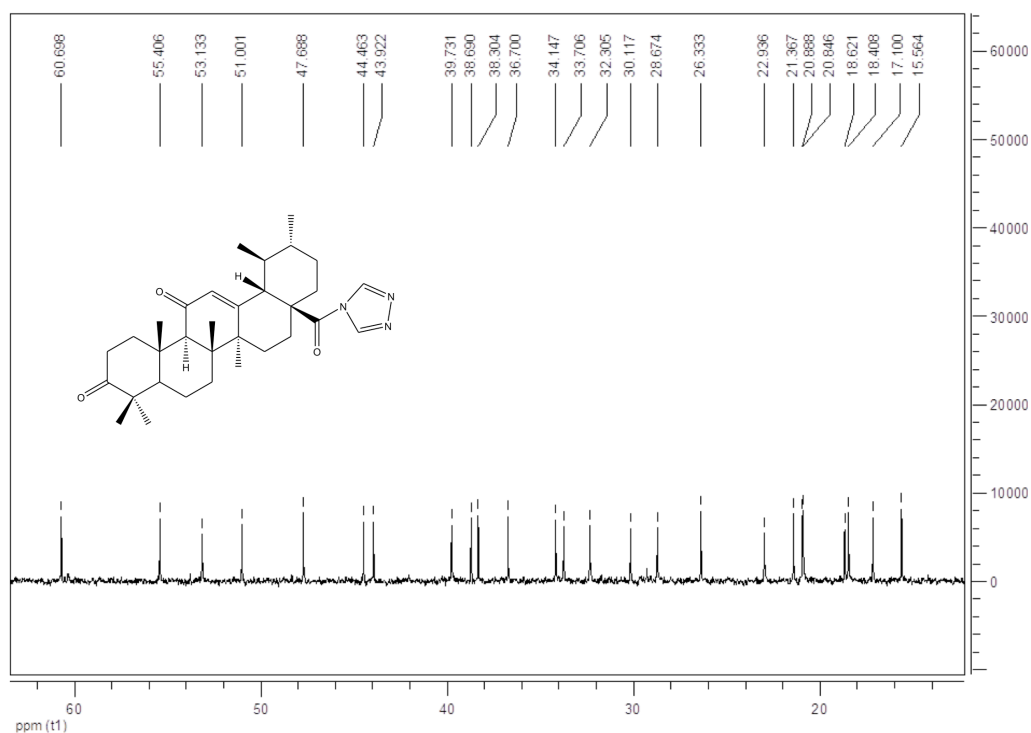


Figura 2.97: Ampliação da zona δ 62ppm–14ppm do espectros de RMN- ^{13}C do composto 12.

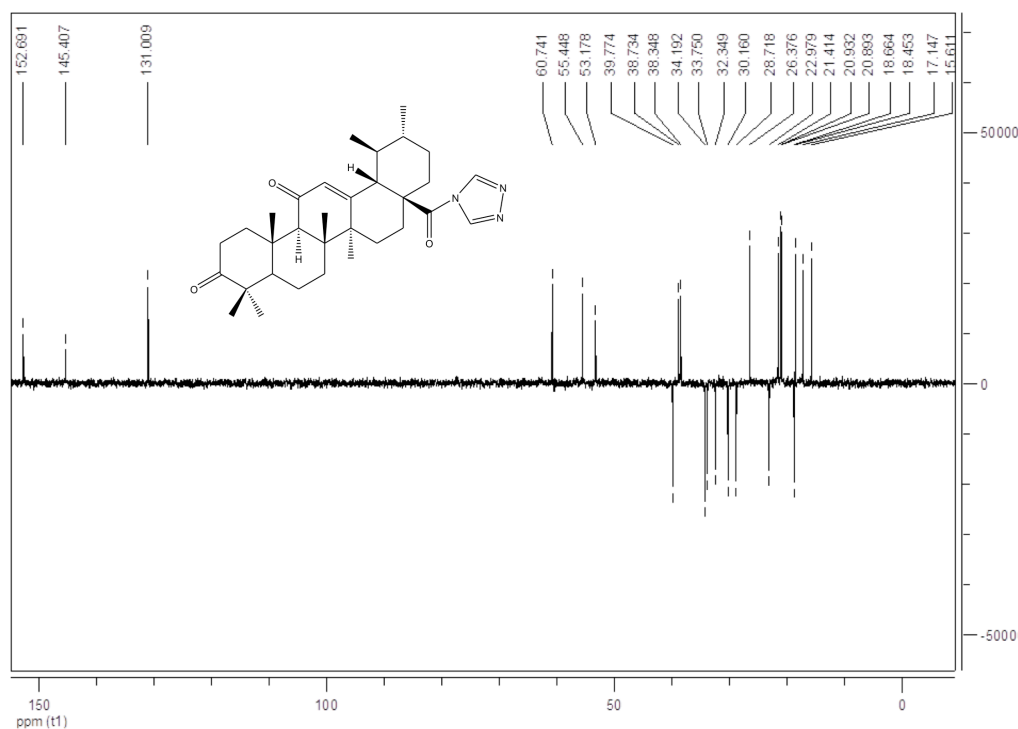


Figura 2.98: Espectro de DEPT-135 do composto **12**.

Os sinais a δ 216,98 ppm e 174,14 ppm correspondem a dois grupos carbonilo e foram atribuídos a C-3 e C-28, respectivamente. Ao substituinte de C-28, o triazol, foram atribuídos os dois sinais: δ 152,65 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$) e δ 145,37 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$).

Os três sinais a δ 198,71 ppm (C-11), δ 130,97 ppm (C-12) e δ 162,11 ppm (C-13) foram atribuídos de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura⁹ e são indicativos da presença do grupo carbonilo em C-11 e da dupla ligação em C-12.

Composto 13 (28-(4*H*-triazol-4-il)-3,28-dioxours-12-en-2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno)

Os espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e DEPT-135 do composto **13** são apresentados nas Figuras 2.99, 2.100, 2.101 e 2.102.

O espectro de RMN-¹H (Figura 2.99) revela a presença de quatro sinais singleto (s), cada um com uma integração de um próton, a 8,37 ppm, 8,10 ppm, 7,99 ppm e 7,80 ppm, que

correspondem aos quatro prótons aromáticos dos dois anéis triazol, substituído em C-2 e C-28.

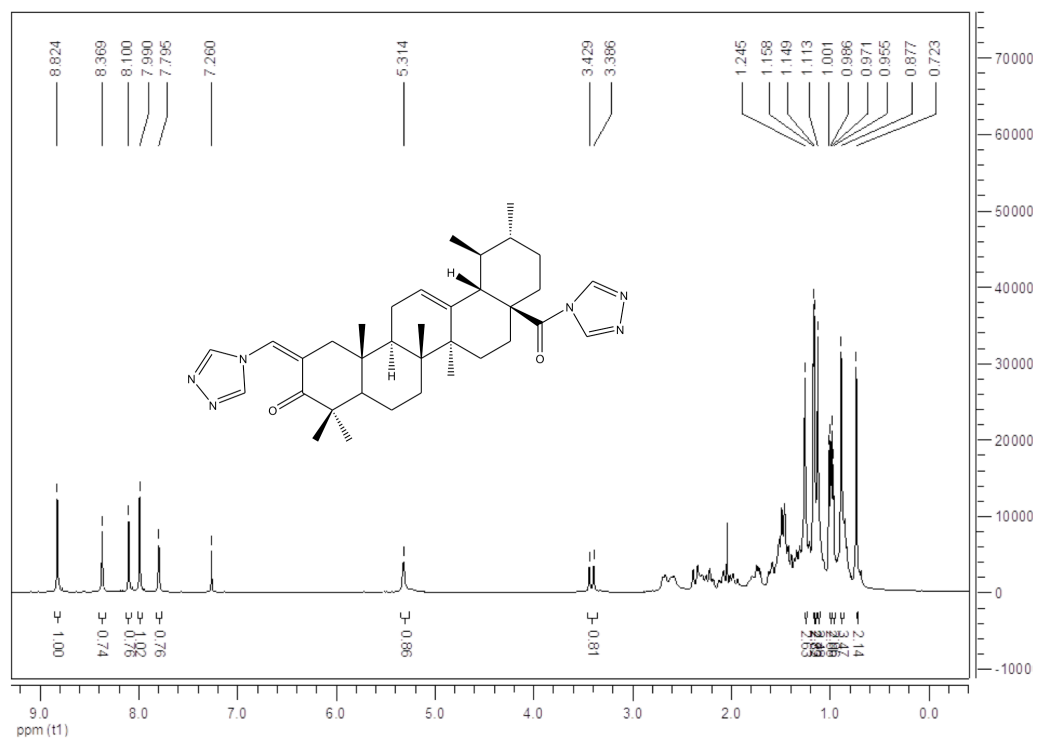


Figura 2.99: Espetros de RMN-¹H do composto **13**.

O singlete a 8,82 ppm foi atribuído ao próton do grupo ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3$), substituído em C-2, enquanto que o sinal a 5,31 ppm (1H s) corresponde ao próton do C-12.

A análise, conjunta, do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.100 e 2.101) e da experiência DEPT-135 (Figura 2.102) revela a presença de trinta e cinco carbonos: nove são quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezoito do tipo CH ou CH₃.

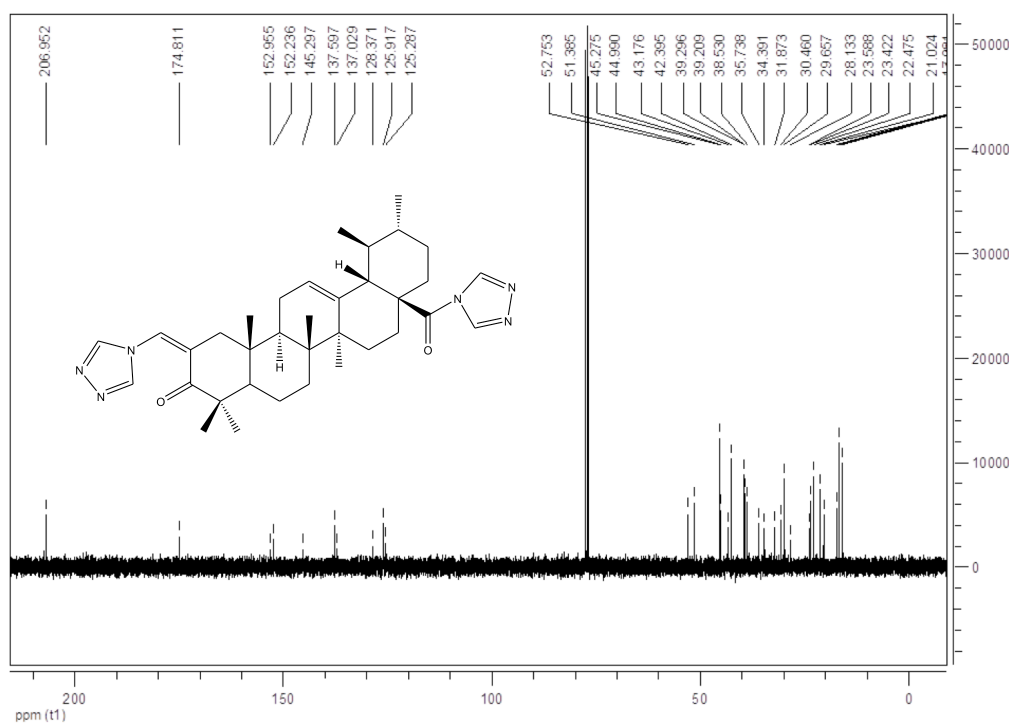


Figura 2.100: Espectros de RMN-¹³C do composto 13.

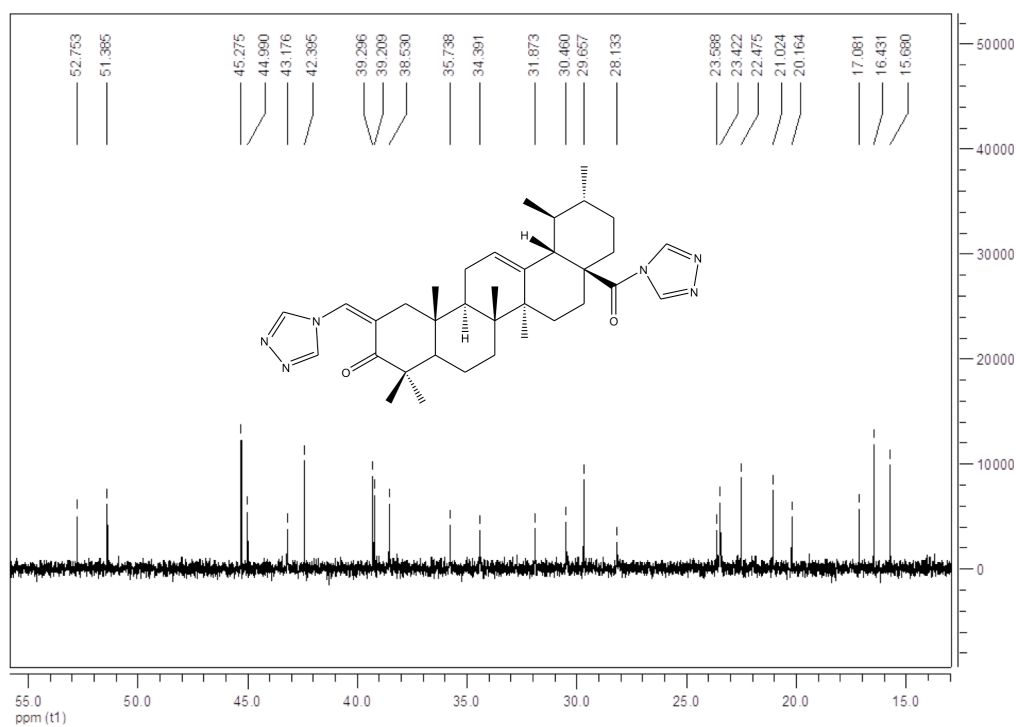


Figura 2.101: Ampliação da zona δ 55ppm–13ppm do espectro de RMN-¹³C do composto 13.

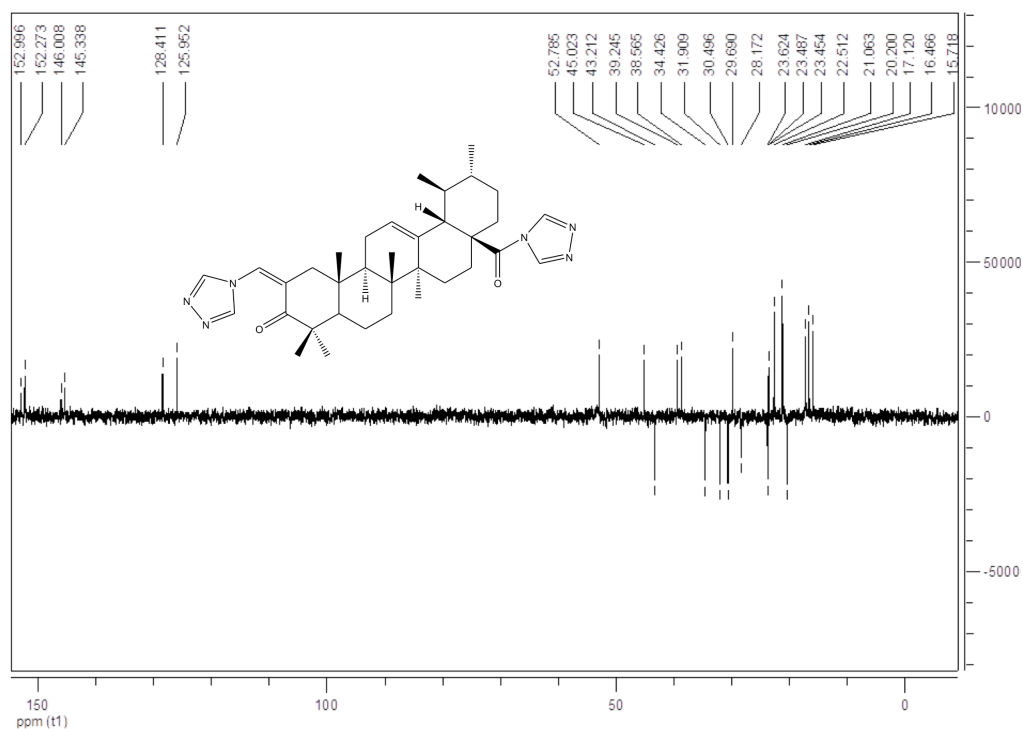


Figura 2.102: Espectro de DEPT-135 do composto **13**.

O sinal a δ 206,98 ppm foi atribuído ao grupo carbonilo de C-3, enquanto que o sinal a δ 174,81 ppm é indicativo do carbonilo de C-28. Os quatro sinais a δ 152,96 ppm, δ 152,24 ppm, δ 145,30 ppm e δ 137,60 ppm foram atribuídos aos quatro carbonos do tipo $\underline{\text{C}}\text{H}$ dos dois grupos triazol, substituintes em C-2 e C-28.

Aos carbonos C-12 e C-13, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos os sinais a δ 125,29 ppm e δ 137,03 ppm, enquanto que a C-2 foi atribuído o sinal δ 128,37 ppm e, ao carbono do seu substituinte ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3$), corresponde o sinal a δ 125,92 ppm.

Composto 14 (Metil 2-(1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O composto **14** foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.103), RMN-¹³C (Figuras 2.104 e 2.105) e DEPT-135 (Figura 2.106).

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.103) revela a presença de três sinais singlete (s), cada um com uma integração de um próton, a 7,65 ppm, 7,35 ppm e 7,14 ppm, que foram atribuídos aos três prótons aromáticos do anel imidazol, enquanto que o singlete, com uma integração de um próton, a 7,84 ppm corresponde ao grupo substituinte em C-2 (=CH-C₃H₃N₂).

O singlete a 5,68 ppm (1H) foi atribuído ao próton do C-12 e o sinal a 3,61ppm (3H s) corresponde aos prótons do grupo metil do substituinte em C-28 (-C(O)-O-CH₃).

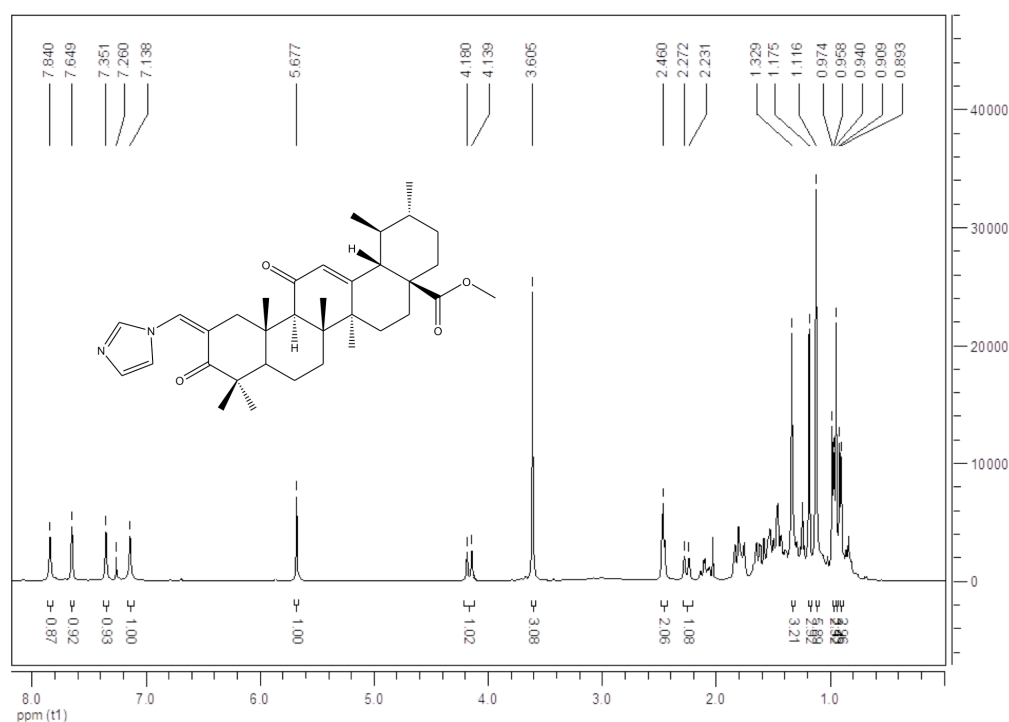


Figura 2.103: Espectros de RMN-¹H dos compostos **14**.

A análise do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.104 e 2.105) revela a presença de trinta e cinco carbonos, dos quais, segundo a experiência DEPT-135 (Figura 2.106): nove são quaternários, sete do tipo CH₂ e os restantes dezanove do tipo CH ou CH₃.

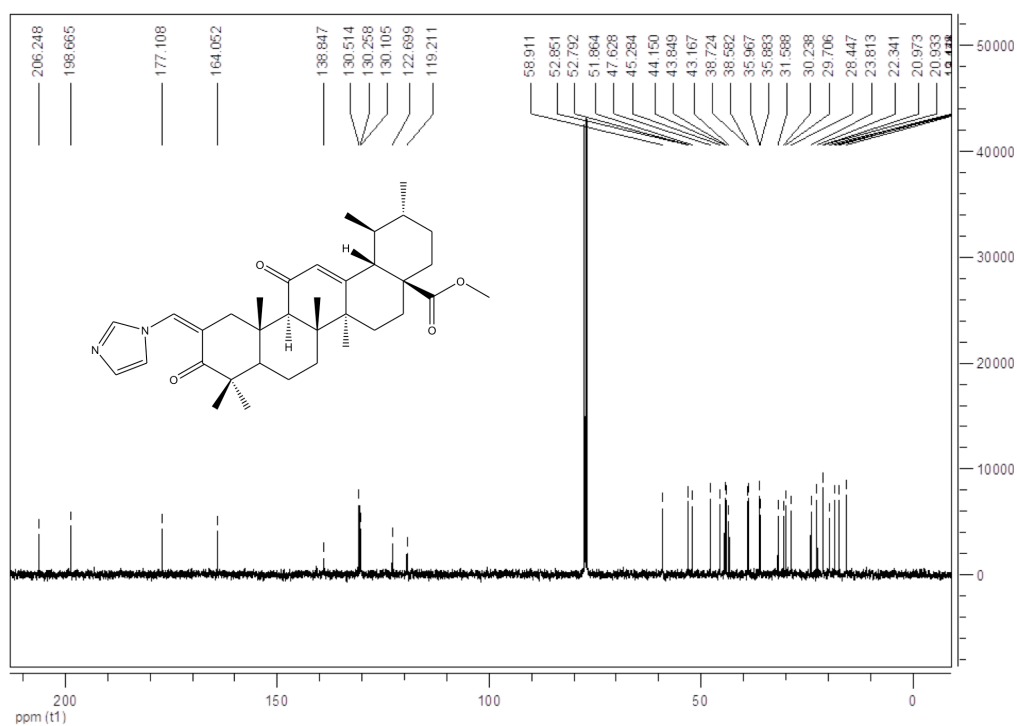


Figura 2.104: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 14.

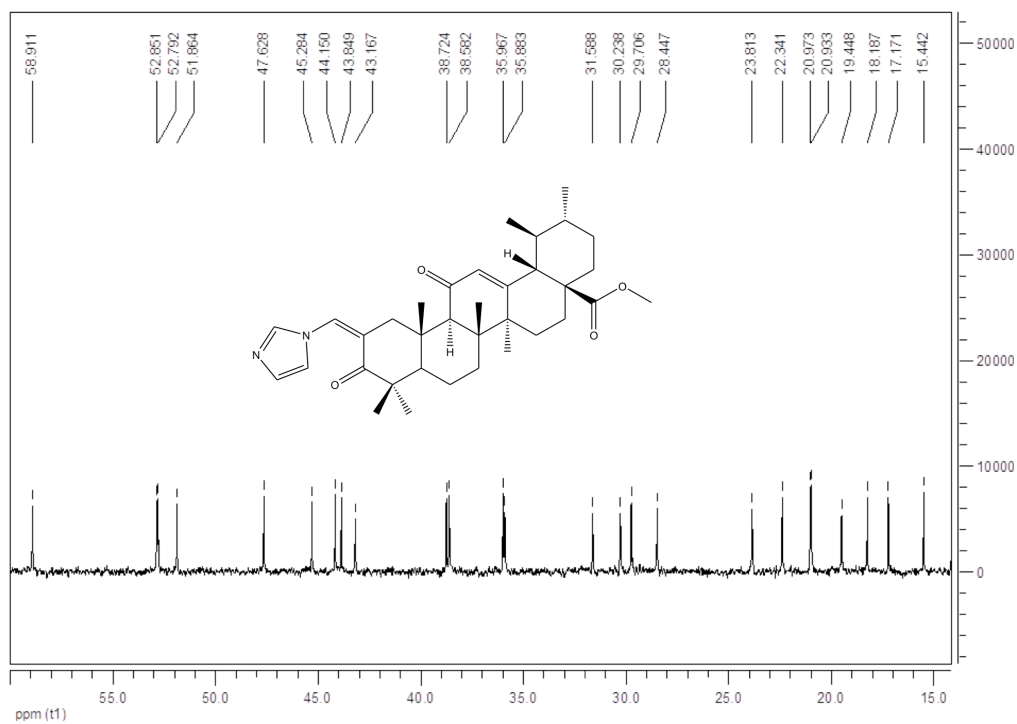


Figura 2.105: Ampliação da zona δ 60ppm–15ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 14.

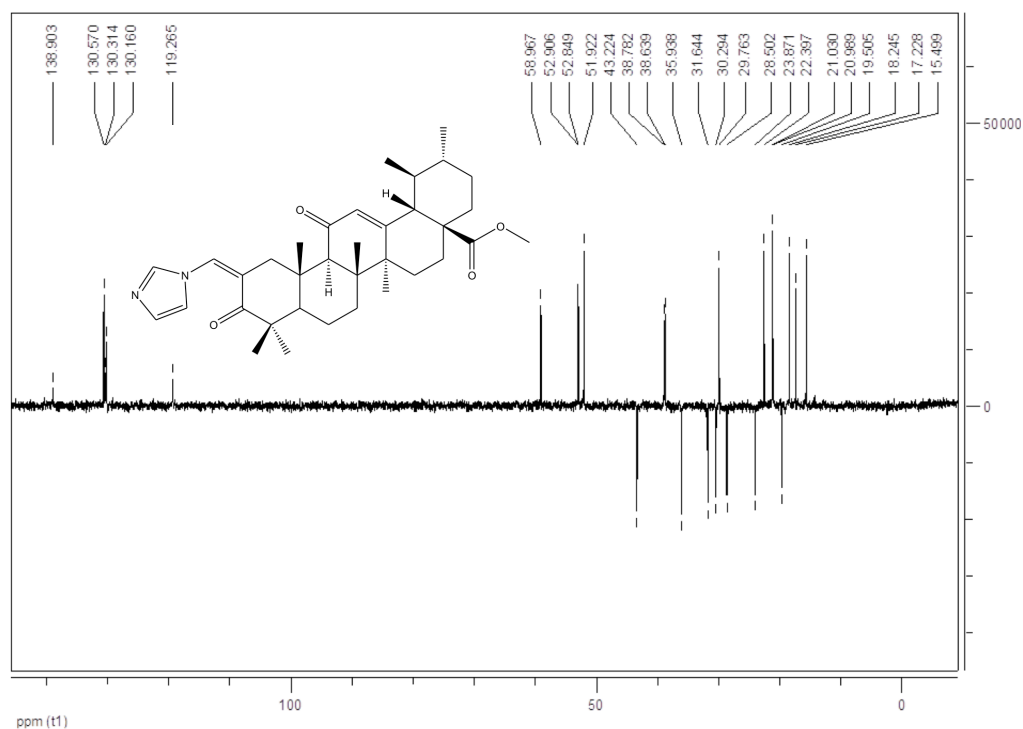


Figura 2.106: Espetro de DEPT-135 do composto **14**.

No espectro de RMN-¹³C, o sinal a δ 206,25 ppm foi atribuído ao grupo carbonilo de C-3, enquanto que o sinal a δ 177,11 ppm corresponde ao grupo C=O de C-28. Os três sinais a δ 130,51 ppm, δ 130,26 ppm e δ 119,21 ppm foram atribuídos aos três carbonos do tipo CH do grupo imidazol, substituintes em C-2, enquanto que o sinal a δ 138,85 ppm corresponde ao carbono da insaturação do substituinte em C-2 (δ 122,70 ppm: =C-C₃H₃N₂).

Os três sinais a δ 198,67 ppm, δ 130,11 ppm e δ 164,05 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-11, C-12 e C-13, respectivamente, e são indicativos da presença do grupo carbonilo em C-11 e de uma dupla ligação Δ ^{12,13}.

Composto 15 (Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O composto **15** foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.107), RMN-¹³C (Figura 2.108 e 2.109) e DEPT-135 (Figura 2.110).

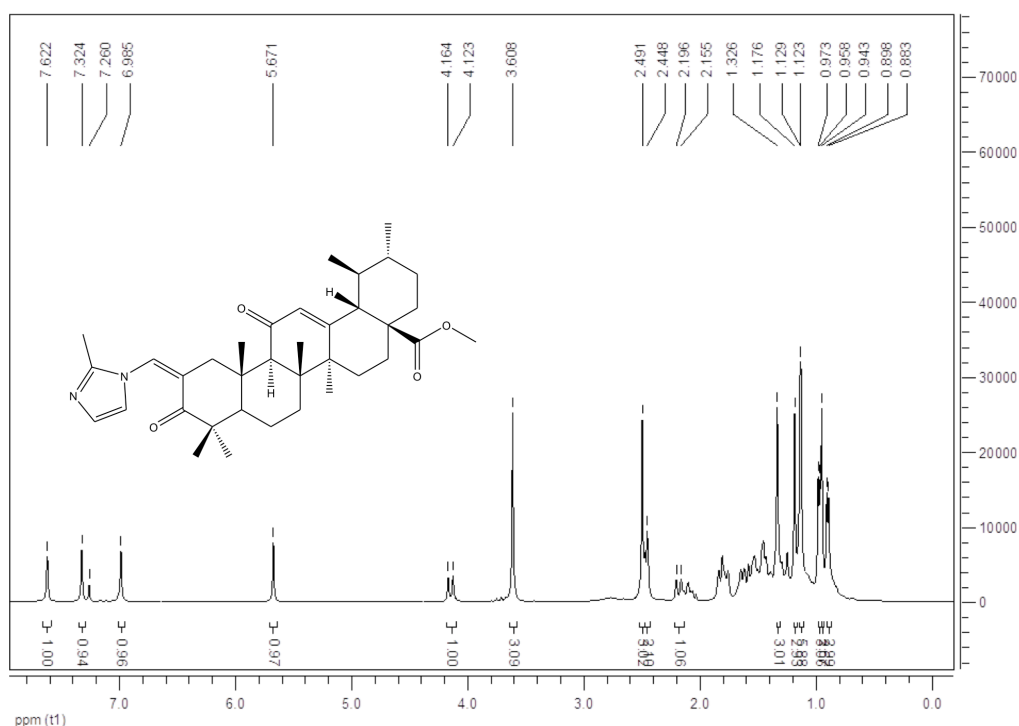


Figura 2.107: Espetros de RMN-¹H do composto **15**.

O espectro de RMN-¹H (Figura 2.107) revela a presença de dois sinais singletto (s), cada um com uma integração de um próton, a 7,32 ppm e 6,99 ppm, que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel imidazol. Os sinais a 7,62 ppm (1H s) e 5,67 ppm (1H s) correspondem, respectivamente, ao próton da insaturação em C-2 (=CH-C₄H₅N₂) e ao próton de C-12.

Os dois singletos a 3,61 ppm e 2,49 ppm, com uma integração de três prótons, foram atribuídos aos prótons do grupo metil, respectivamente, de C-28 (-C(O)-O-CH₃) e do anel imidazol em C-2.

A análise dos espectros de RMN-¹³C (Figuras 2.108 e 2.109) e de DEPT-135 (Figura 2.110), revela a presença de trinta e seis carbonos: onze quaternários, sete do tipo CH₂ e os restantes dezoito do tipo CH ou CH₃.

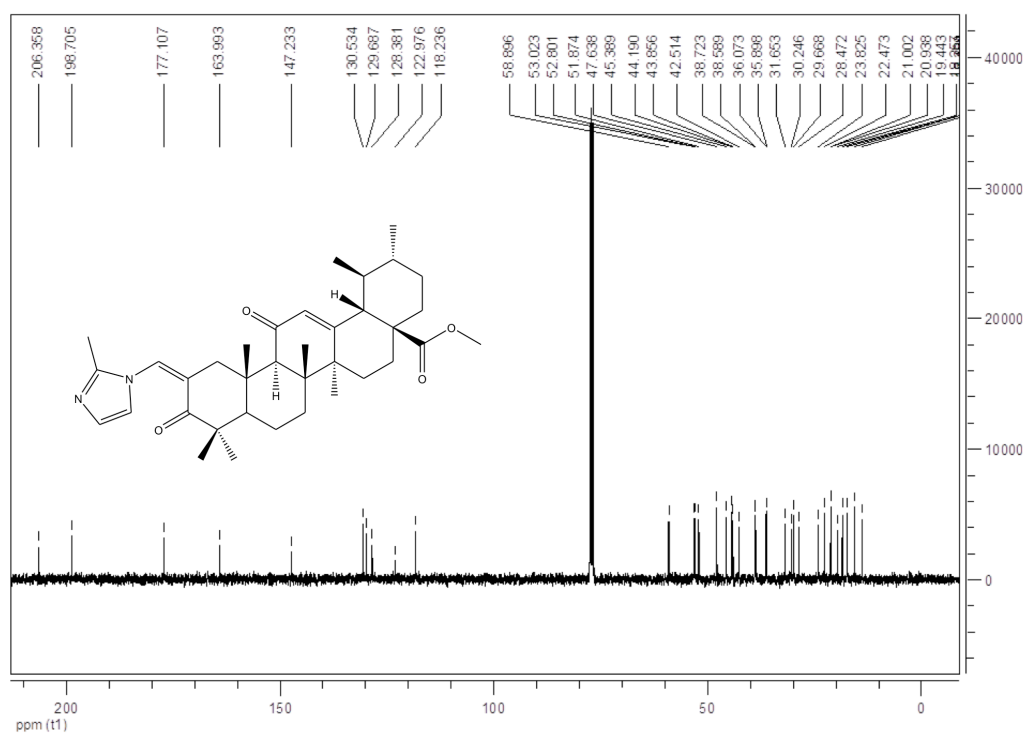


Figura 2.108: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 15.

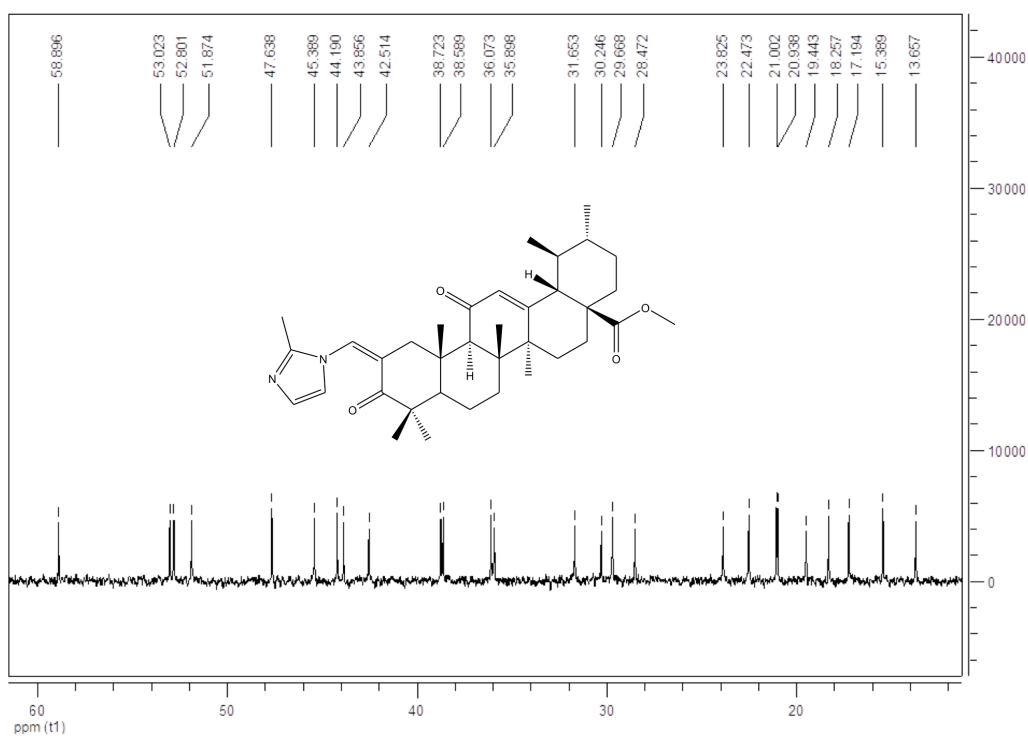


Figura 2.109: Ampliação da zona δ 60ppm–12ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 15.

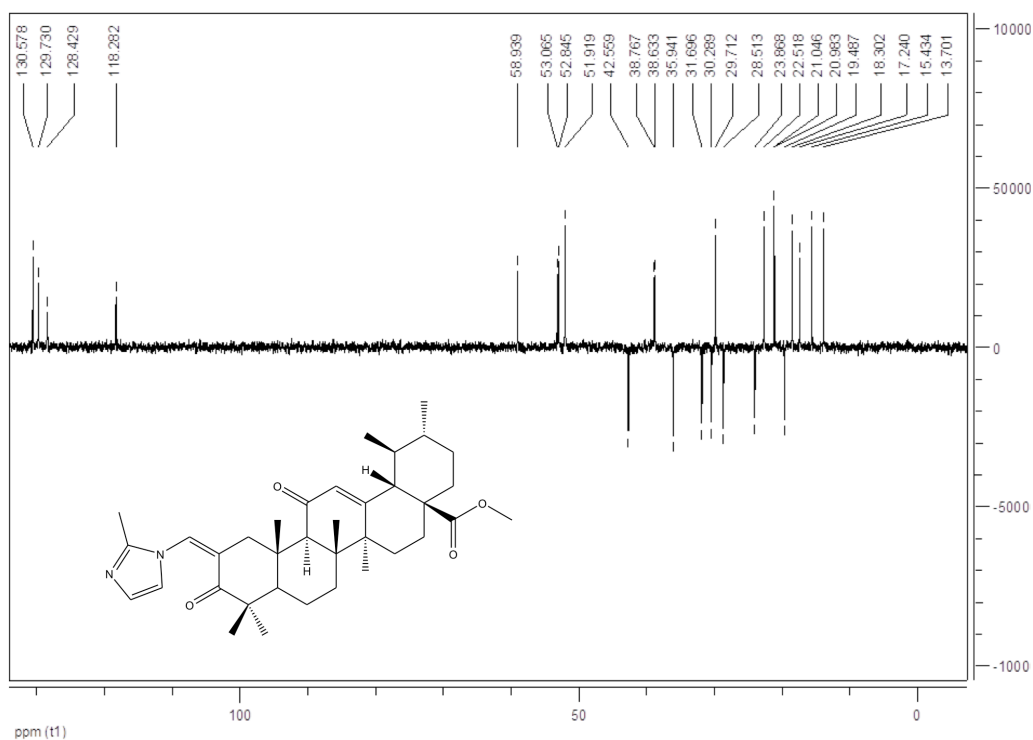


Figura 2.110: Espectro de DEPT-135 do composto **15**.

No espectro de RMN- ^{13}C , o sinal a δ 206,36 ppm foi atribuído ao grupo carbonilo de C-3, enquanto que o sinal a δ 177,11 ppm corresponde ao grupo C=O de C-28. Os três sinais a δ 147,23 ppm, δ 128,38 ppm e δ 118,24 ppm foram atribuídos aos três carbonos do tipo C e CH do grupo metil-imidazol, substituinte em C-2, enquanto que o sinal a δ 129,69 ppm ($=\text{CH}-\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_2$) corresponde ao carbono da insaturação do substituinte em C-2 (δ 122,98ppm).

Os três sinais a δ 198,71 ppm (C-11), δ 130,53 ppm (C-12) e δ 163,99 ppm (C-13), atribuídos de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ revelam a presença de um grupo carbonilo em C-11 e de uma dupla ligação em C-12 ($\Delta^{12,13}$).

Composto 16 (Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato)

O composto **16** foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e DEPT-135).

O espectro de RMN-¹H (Figura 2.111) revela a presença de dois sinais singletos (s), cada um com uma integração de um próton, a 8,08 ppm e 7,79 ppm, que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel triazol.

Os singletos a 8,46 ppm (1H) e 5,68 ppm (1H) correspondem, respectivamente, ao próton da instauração em C-2 (=CH-C₂H₂N₃) e ao próton de C-12.

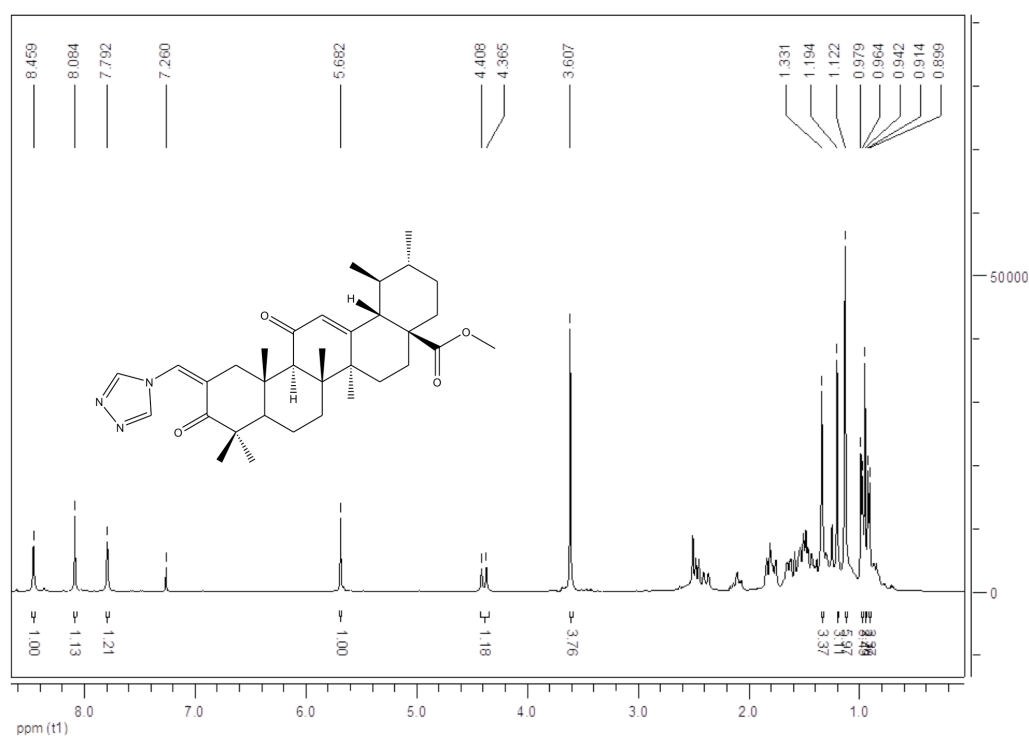


Figura 2.111: Espetros de RMN-¹H do composto **16**.

A análise do seu espectro de RMN-¹³C (Figuras 2.112 e 2.113), realizada em conjunto com o DEPT-135 (Figura 2.114), revela a presença de trinta e quatro carbonos, dos quais: dez são quaternários, sete do tipo CH₂ e os restantes dezassete do tipo CH ou CH₃.

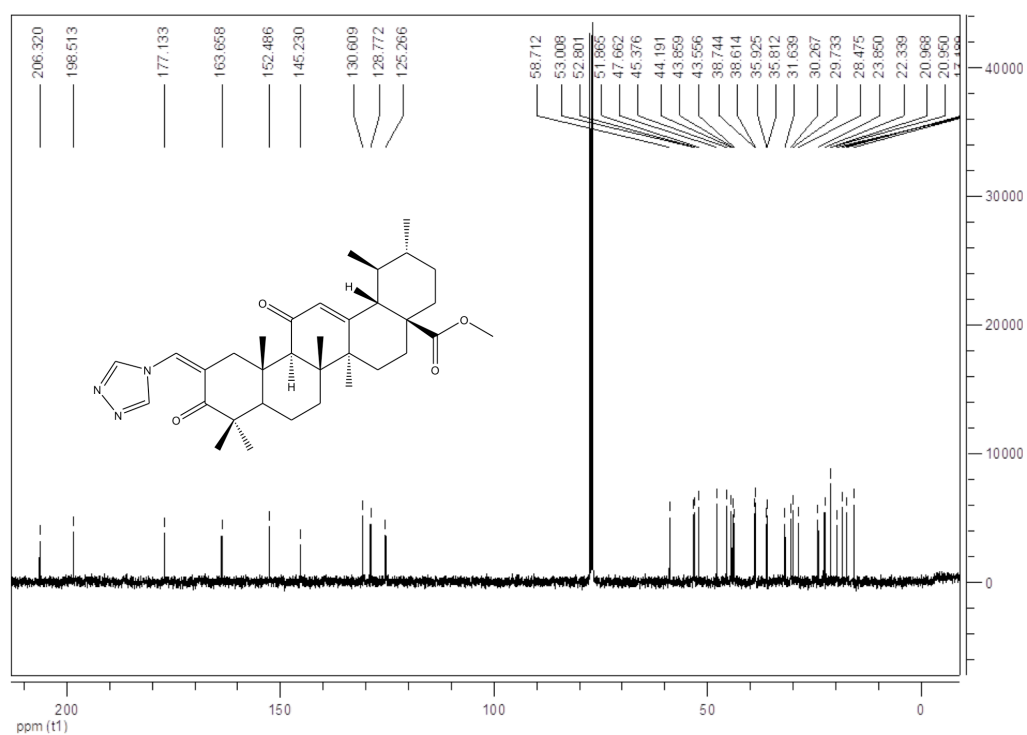


Figura 2.112: Espectros de RMN- ^{13}C do composto 16.

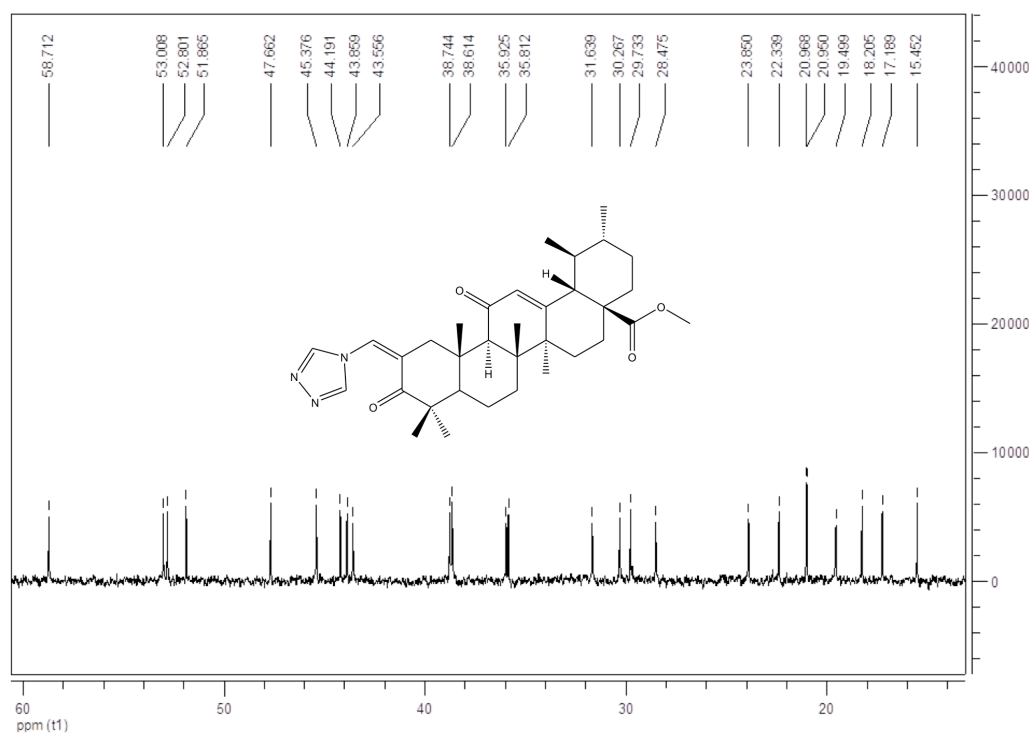


Figura 2.113: Ampliação da zona δ 60ppm–14ppm do espectro de RMN- ^{13}C do composto 16.

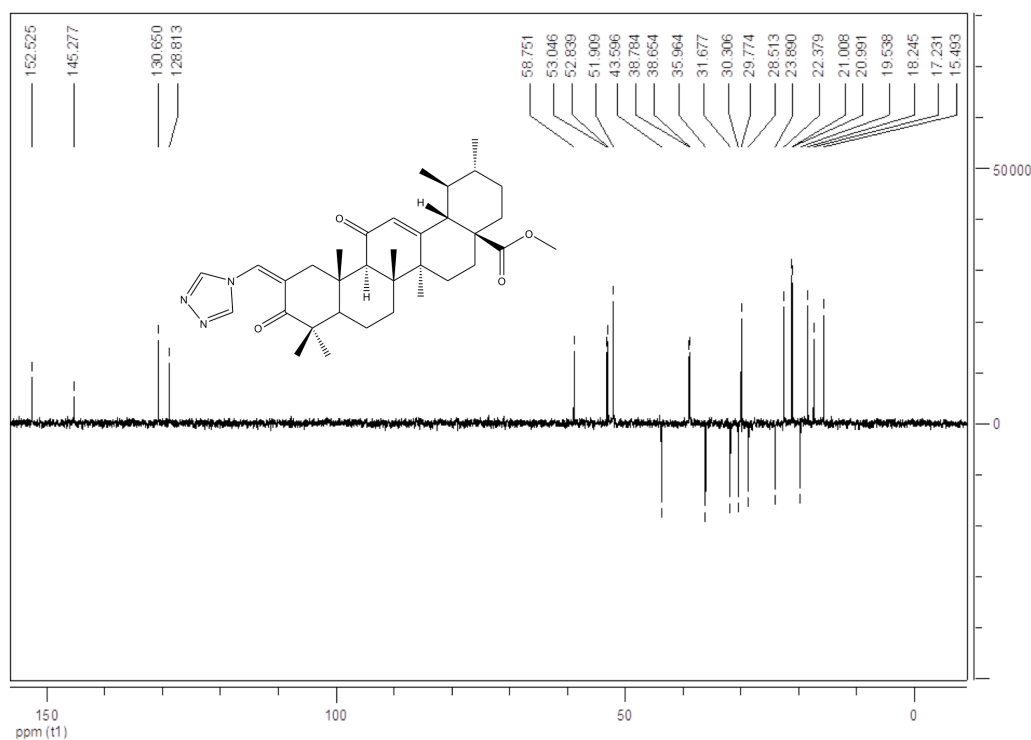


Figura 2.114: Espetro de DEPT-135 do composto **16**.

O sinal a δ 206,32 ppm, no espectro de RMN-¹³C, foi atribuído ao grupo $\underline{\text{C}}=\text{O}$ de C-3, enquanto que o sinal a δ 177,13 ppm corresponde ao carbono carbonilo de C-28. Os dois sinais a δ 152,49 ppm e δ 145,23 ppm foram atribuídos aos dois carbonos do tipo $\underline{\text{C}}\text{H}$ do grupo triazol, substituinte em C-2, enquanto que o sinal a δ 128,77 ppm ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3$) corresponde ao carbono da insaturação do substituinte em C-2 (δ 125,27 ppm).

Os três sinais a δ 198,51 ppm, δ 130,61 ppm e δ 163,66 ppm, são indicativos da presença de um grupo carbonilo e de uma dupla ligação que, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-11, C-12 e C-13, respectivamente.

Composto 17 (Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato)

O composto **17** foi analisado por RMN-¹H (Figura 2.115), RMN-¹³C (Figuras 2.116 e 2.117) e DEPT-135 (Figura 2.118).

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.115) revela a presença de dois sinais singletos (s), cada um com uma integração de um próton, a 7,16 ppm e 7,01 ppm, que correspondem aos dois prótons aromáticos do anel metil-imidazol. O singletto a 5,29 ppm (1H) foi atribuído ao próton do C-12, enquanto que o sinal a 7,66 ppm (1H s) corresponde ao próton da insaturação em C-2 (=CH-C₄H₅N₂). O singletto a 3,60 ppm, com uma integração de três prótons, foi atribuído aos prótons do grupo metil do substituinte em C-28 (-C(O)-O-CH₃).

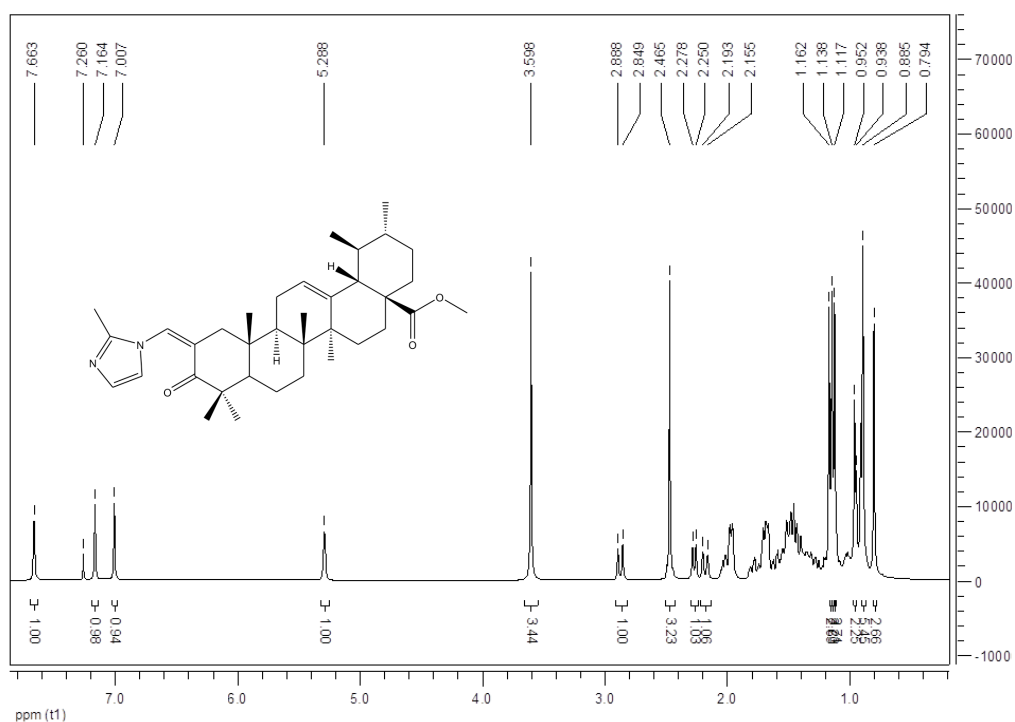


Figura 2.115: Espectros de RMN-¹H do composto 17.

A análise do seu espectro de RMN ¹³C (Figuras 2.116 e 2.117) que foi realizada, conjuntamente, com o DEPT-135 (Figura 2.118), revela a presença de trinta e seis carbonos: dez quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezoito do tipo CH ou CH₃.

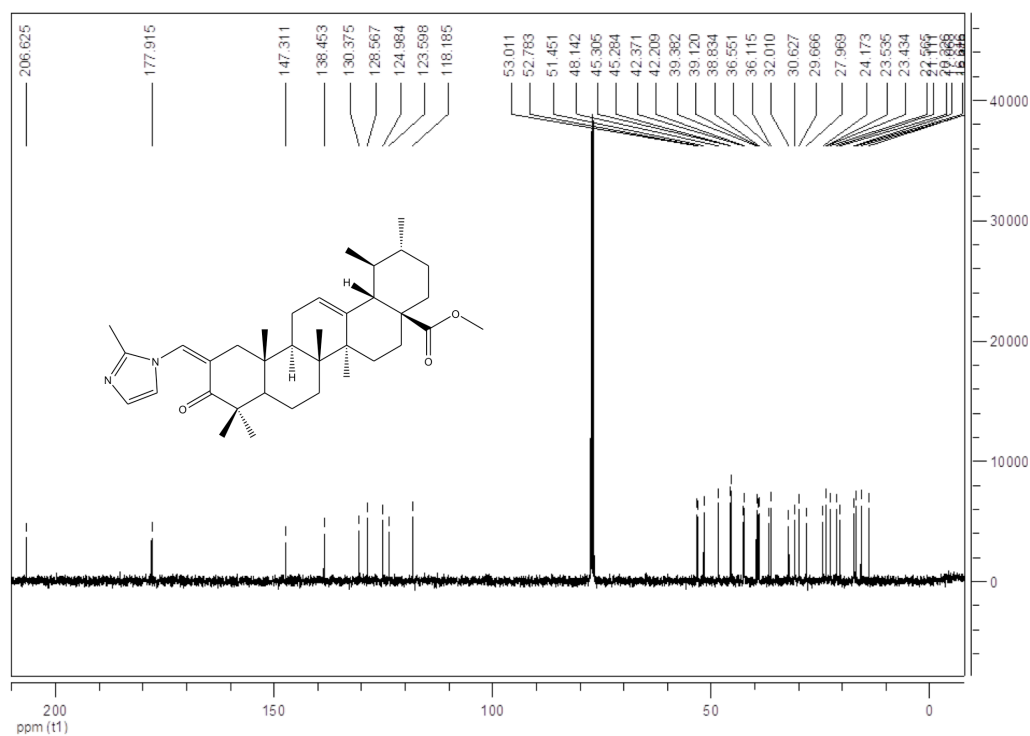


Figura 2.116: Espetros de RMN-¹³C do composto 17.

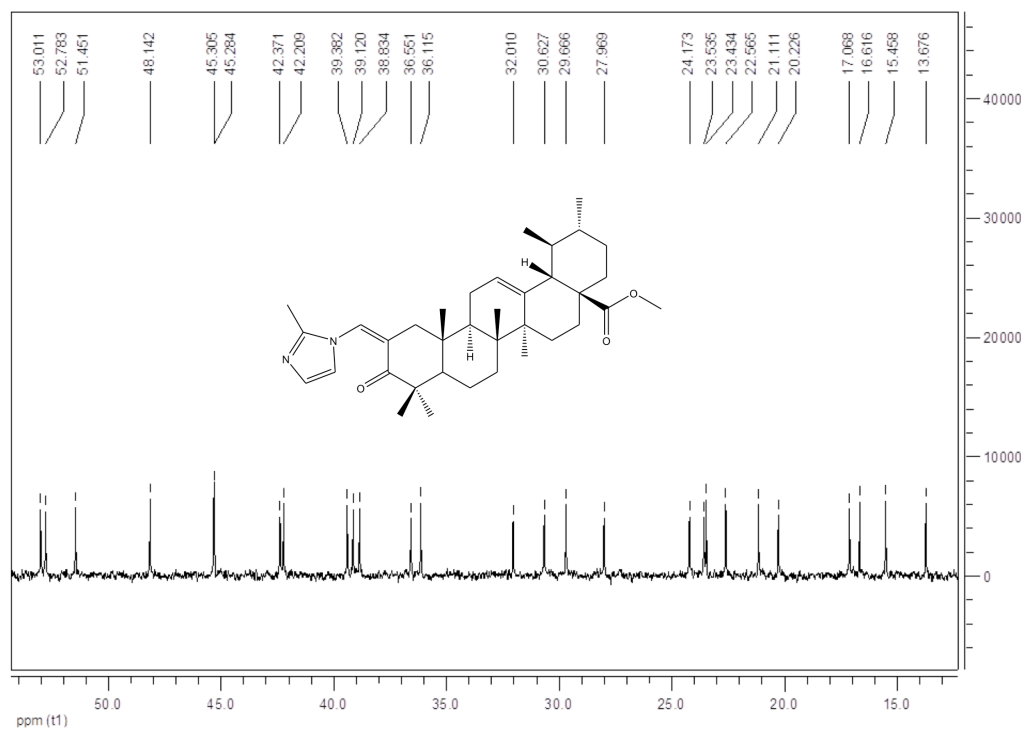


Figura 2.117: Ampliação da zona δ 54ppm–13ppm do espectro de RMN-¹³C do composto 17.

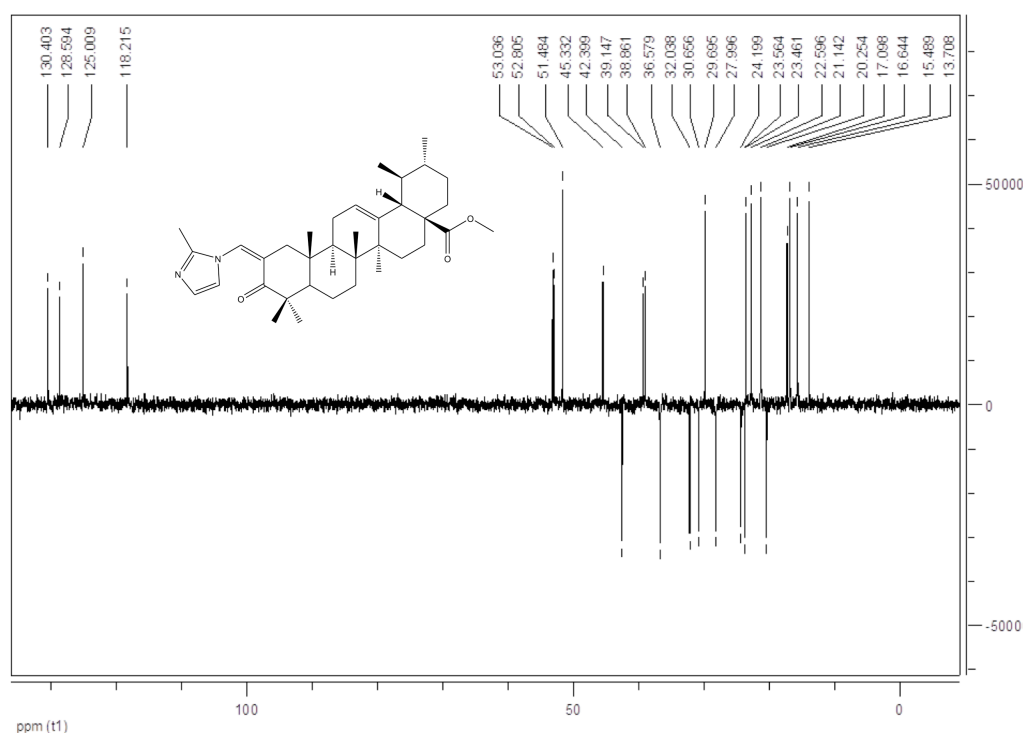


Figura 2.118: Espectro de DEPT-135 do composto **17**.

No espectro de RMN- ^{13}C , o sinal a δ 206,63 ppm foi atribuído a $\text{C}=\text{O}$ de C-3, enquanto que o sinal a δ 177,92 ppm corresponde ao grupo carbonilo de C-28. Os três sinais a δ 147,31 ppm (C), δ 128,57 ppm (CH) e δ 118,19 ppm (CH) foram atribuídos aos três carbonos do grupo metil-imidazol, substituído em C-2, enquanto que o sinal a δ 130,38 ppm ($=\text{CH}-\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2$) corresponde ao carbono da insaturação do substituído em C-2 (δ 123,60 ppm).

Os dois sinais a δ 124,98 ppm e δ 138,45 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente, e são indicativos da dupla ligação $\Delta^{12,13}$.

Composto 18 (Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e DEPT-135) do composto **18** são apresentados nas Figuras 2.119, 2.120, 2.121 e 2.122.

A observação do seu espectro de RMN-¹H (Figura 2.119) revela a presença de dois sinais singlete (s), cada um com uma integração de um próton, a 8,10 ppm e 7,80 ppm, que foram atribuídos aos dois prótons aromáticos do anel triazol. O singlete a 5,32 ppm (1H) foi atribuído ao próton do C-12, enquanto que o singlete a 8,37 ppm (1H) corresponde ao próton da insaturação do grupo substituinte em C-2 (=CH-C₂H₂N₃). O sinal a 3,60 ppm, com uma integração de três prótons, foi atribuído aos prótons do grupo metil do substituinte em C-28 (C(O)-O-CH₃).

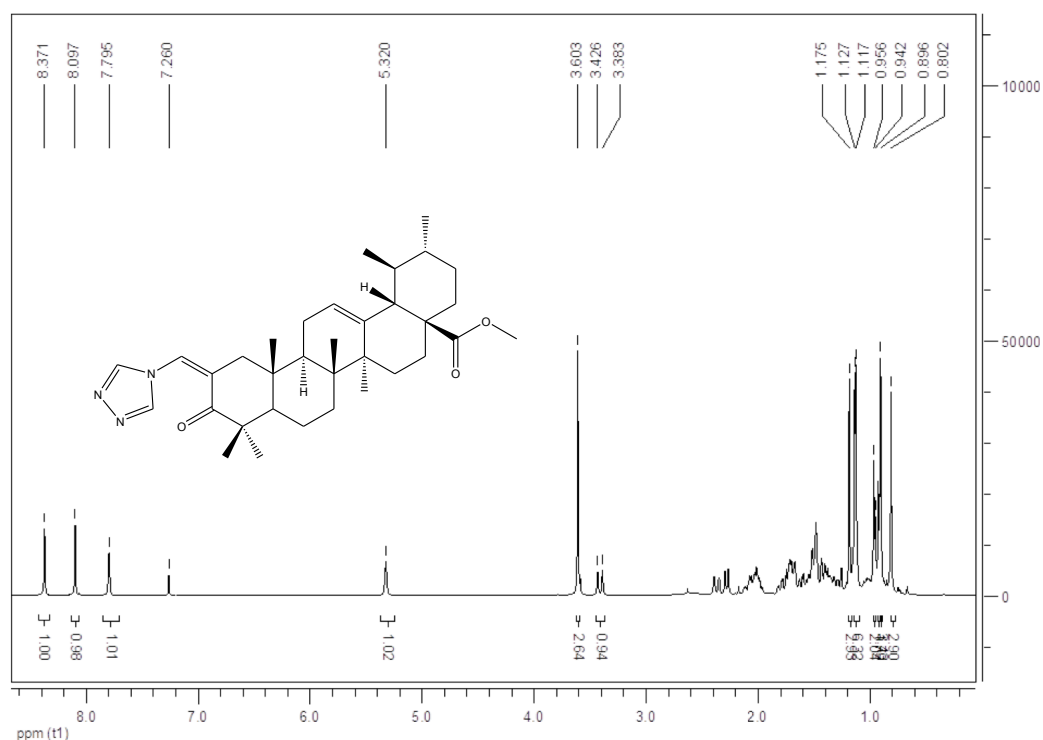


Figura 2.119: Espetros de RMN-¹H do composto 18.

A análise, conjunta, dos espectros de RMN-¹³C (Figuras 2.120 e 2.121) e da experiência DEPT-135 (Figura 2.122) do composto 18 revela a presença de trinta e quatro carbonos, com a seguinte distribuição: nove quaternários, oito do tipo CH₂ e os restantes dezassete do tipo CH ou CH₃.

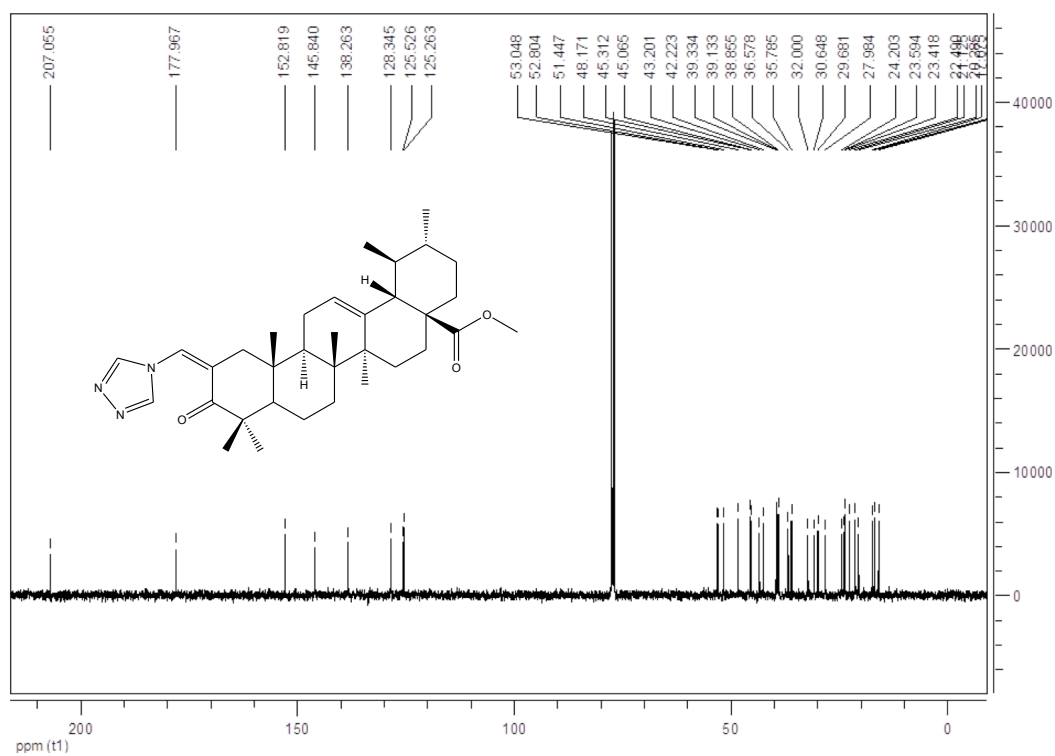


Figura 2.120: Espectros de RMN-¹³C do composto 18.

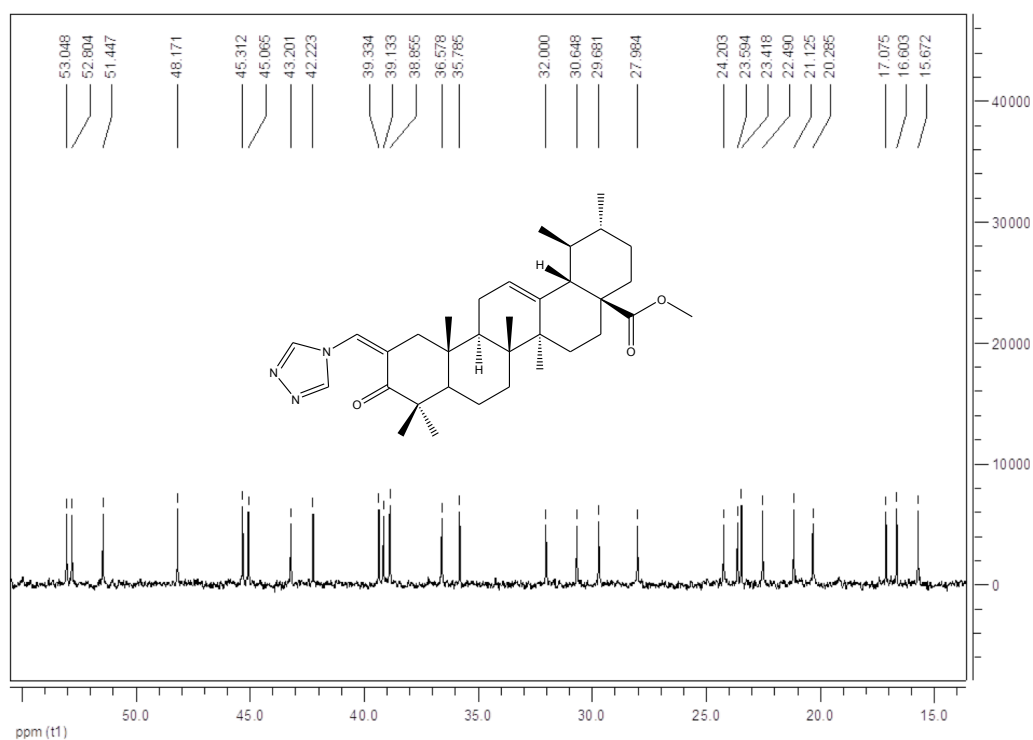


Figura 2.121: Ampliação da zona δ 55ppm–14ppm do espectro de RMN-¹³C do composto 18.

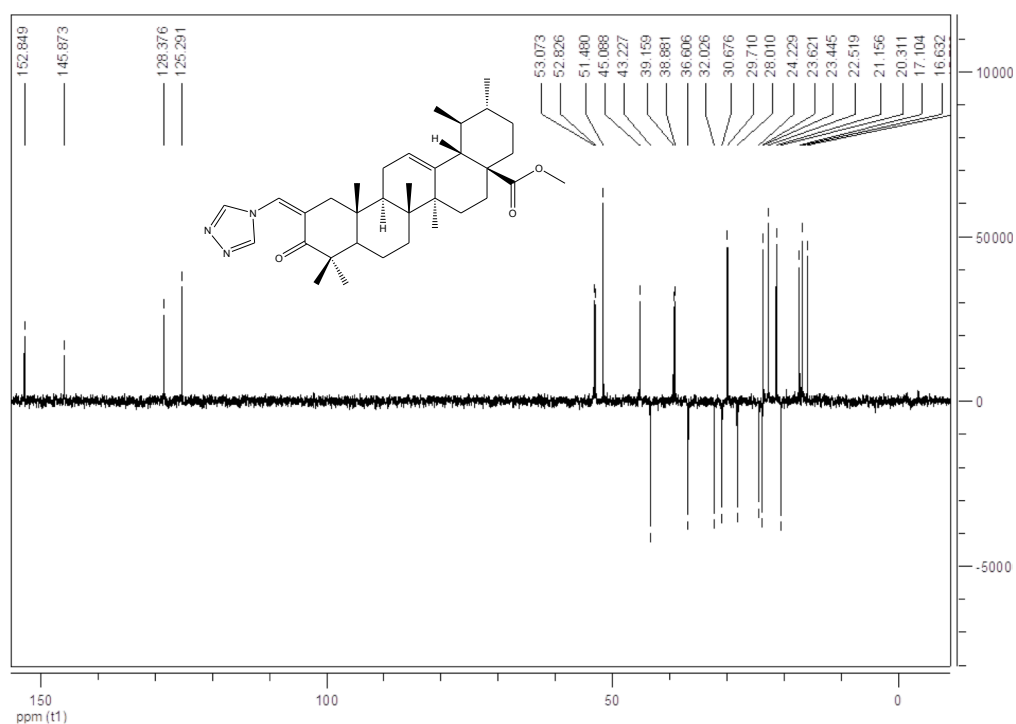


Figura 2.122: Espectro de DEPT-135 do composto 18.

No espectro de RMN- ^{13}C , o sinal a δ 207,06 ppm foi atribuído ao grupo carbonilo de C-3, enquanto que o sinal a δ 177,97 ppm corresponde a $\text{C}=\text{O}$ de C-28. Os dois sinais a δ 152,82 ppm (CH) e δ 145,84 ppm (CH) foram atribuídos aos dois carbonos do grupo triazol, substituinte em C-2, enquanto que o sinal a δ 128,35 ppm corresponde ao carbono da insaturação do substituinte em C-2 ($=\text{CH}-\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3$).

Os dois sinais a δ 125,53 ppm e δ 138,26 ppm, de acordo com o tipo de carbono apresentado no DEPT-135 e a literatura,⁹ foram atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente.

Na tabela 2.4 são apresentados os sinais de RMN- ^{13}C , caraterísticos dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (6 ao 18).

Tabela 2.4: Sinais de RMN-¹³C caraterísticos dos derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (6-18).

Derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico	
6	δ 176,65 (C=O C-28), 170,96 (O-C(O)-CH ₃), 149,35 (C metil-imidazol), 137,13 (C-13), 126,39 (C-12), 127,24 (CH metil-imidazol), 117,35 (CH metil-imidazol), 21,09 (O-C(O)-CH ₃), 15,51 (CH ₃ metil-imidazol).
7	δ 199,15 (C-11), 173,78 (C=O C-28), 170,94 (O-C(O)-CH ₃), 161,02 (C-13), 136,87 (CH imidazol), 131,24 (CH imidazol), 130,04 (C-12), 117,27 (CH imidazol), 21,24 (O-C(O)-CH ₃).
8	δ 217,61 (C=O C-3), 174,28 (C=O C-28), 136,88 (C-13), 136,69 (CH imidazol), 127,97 (CH imidazol), 126,55 (C-12), 117,79 (CH imidazol).
9	δ 217,53 (C=O C-3), 176,55 (C=O C-28), 149,34 (C metil-imidazol), 137,20 (C-13), 127,04 (CH metil-imidazol), 126,25 (C-12), 117,37 (CH metil-imidazol), 15,18 (CH ₃ metil-imidazol).
10	δ 216,91 (C=O C-3), 198,55 (C-11), 173,82 (C=O C-28), 161,40 (C-13), 136,89 (CH imidazol), 131,21 (C-12), 130,14 (CH imidazol) e 117,28 (CH imidazol).
11	δ 216,94 (C=O C-3), 198,65 (C-11), 175,42 (C=O C-28), 161,60 (C-13), 149,73 (C metil-imidazol), 131,14 (C-12), 127,69 (CH metil-imidazol), 116,99 (CH metil-imidazol) e 15,61 (CH ₃ metil-imidazol).
12	δ 216,98 (C=O C-3), 198,71 (C-11), 174,14 (C=O C-28), 162,11 (C-13), 152,65 (CH triazol), 145,37 (CH triazol), 130,97 (C-12).
13	δ 206,98 (C=O C-3), 174,81 (C=O C-28), 152,96 (CH triazol), 152,24 (CH triazol), δ 145,30 (CH triazol), 137,60 (CH triazol), 137,03 (C-13), 128,37 (C-2), 125,92 (=CH-C ₂ H ₂ N ₃ C-2), 125,29 (C-12).
14	δ 206,25 (C=O C-3), 198,67 (C-11), 177,11 (C=O de C-28), 164,05 (C-13), 138,85 (=CH-C ₃ H ₃ N ₂ C-2), 130,51 (CH imidazol), 130,26 (CH imidazol), 130,11 (C-12), 122,70 (C-2), 119,21 (CH imidazol).
15	206,36 (C=O C-3), 198,71 (C-11), 177,11 (C=O de C-28), 163,99 (C-13), 147,23 (C metil-imidazol), 130,53 (C-12), 129,69 (=CH-C ₃ H ₃ N ₂ C-2), 128,38 (CH metil-imidazol), 122,98 (C-2), 118,24 (CH metil-imidazol).
16	δ 206,32 (C=O C-3), 198,51 (C-11), 177,13 (C=O C-28), 163,66 (C-13) 152,49 (CH triazol), 145,23 (CH triazol), 130,61 (C-12) 128,77 (=CH-C ₂ H ₂ N ₃ C-2), 125,27 (C-2).
17	δ 206,63 (C=O C-3), 177,92 (C=O C-28), 147,31 (C metil-imidazol), 138,45 (C-13), 130,38 (=CH-C ₄ H ₅ N ₂ C-2), 128,57 (CH metil imidazol), 124,98 (C-12), 123,60 (C-2), 118,19 (CH metil-imidazol).
18	δ 207,06 (C=O C-3), 177,97 (C=O de C-28), 152,82 (CH triazol), 145,84 ppm (CH triazol), 138,26 (C-13), 128,35 (=CH-C ₂ H ₂ N ₃ C-2), 125,53 (C-12)

6: 3β-acetoxi-urs-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato;
7: 3β-acetoxi-11-oxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato;
8: 3-oxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato;
9: 3-oxours-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato
10: 3,11-dioxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato
11: 3,11-dioxours-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato
12: 3,11-dioxours-12-en-28-il-4H-triazol-4-carboxilato
13: 28-(4H-triazol-4-il)-3,28-dioxours-12-en-2-(4H-triazol-4-il)-metileno
14: Metil 2-(1H-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato
15: Metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato
16: Metil 2-(4H-triazol-4-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato
17: Metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato
18: Metil 2-(4H-triazol-4-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato

2.4. Conclusões

Neste capítulo foi descrita a análise estrutural de novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico através da espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

As análises de espectrometria de massa *tandem* revelaram-se de grande importância na monitorização da semi-síntese de novos derivados dos ácidos oleanólico e ursólico pois, através dos diferentes ciclos de *MS* (*MS1*, *MS2* e *MS3*), foi possível relacionar os sinais apresentados em cada um deles, como se de um *puzzle* se tratasse, e, desta forma, elaborar uma proposta para padrão de fragmentação dos novos compostos, o que seria muito difícil se fosse utilizado só um ciclo de *MS*, como foi o caso dos espectros adquiridos por ionização por impacto electrónico. No *MS* de 1ª ordem é apresentado o valor *m/z* do ião molecular e no *MS2* o fragmento mais abundante corresponde à perda do substituinte em C-17 contudo, caso exista um grupo –OH na posição 3, como é o caso dos ácidos oleanólico e ursólico, além deste sinal no *MS* de 2ª ordem, observa-se outro, que nestas situações é aquele que apresenta uma abundância relativa de 100%, indicativo da perda de água. Por último, no *MS3*, devido à ocorrência de uma fragmentação *retro* Diels-Alder, o valor *m/z* do sinal mais abundante indica-nos o tipo do anel C da estrutura (*m/z* 203 para 12-oleanenos ou 12-ursenos, *m/z* 217 para 11-oxo-12-ursenos e *m/z* 219 para 12-oxo-oleananos), e os restantes sinais o tipo de substituição dos anéis A e B.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear, principalmente o RMN-¹³C e o DEPT-135, aplicada à caracterização dos novos derivados semi-sintéticos dos ácidos oleanólico e ursólico revelou-se com uma elevada especificidade uma vez que, através de uma análise comparativa dos desvios químicos dos novos compostos e a literatura de compostos similares, podemos determinar o tipo de substituintes (anéis aromáticos,...), a sua localização e o tipo de anel C da estrutura.

Os resultados obtidos na caracterização dos novos derivados e o volume de publicações existentes com aplicações farmacológicas para este tipo de compostos demonstram a

importância da utilização conjunta da espectrometria de massa e da espectroscopia de ressonância magnética nuclear na caracterização de triterpenóides pentacíclicos e são um incentivo para um futuro trabalho de elaboração de uma base de dados com informação estrutural de derivados provenientes de isolamento de produtos naturais e/ou semi-síntese, adquirida por estas duas técnicas analíticas, que permita uma rápida identificação de novos compostos por comparação com os dados existentes.

Referências

- 1 Glish, G. L.; Vachet, R. W.. The Basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews*. **2003**, 2, 140-150.
- 2 Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids; *Botanical Studies*, **2006**, 47, 339-368.
- 3 Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y.. Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21^{waf1} and NOXA in pancreatic cancer cells; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 5774-5786.
- 4 Urban, M.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J.. Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 3666-3674.
- 5 Santos, R.C.; Salvador, J.A.R.; Cortes, R.; Pachon, G.; Marin, S.; Cascante, M.. New betulinic acid derivatives induce potent and selective antiproliferative activity through cell cycle arrest at the S phase and caspase dependent apoptosis in human cancer cells. *Biochimie*. **2011**, 93, 1065-.
- 6 Santos, R.C.; Salvador, J.A.R.; Marin, S.; Cascante, M.; Moreira, J.N.; Dinis, T. C. P.. Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate

- and *N*-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2010**, 18, 4385-4396.
- 7 Santos, R. C.; Salvador, J. A. R.; Marin, S.; Cascante, M..Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 6241-6250.
- 8 Leal, A. S.; Preparation and biological evaluation of new triterpene derivatives of ursolic and oleanolic acids. Dissertação de doutoramento apresentada à Universidade de Coimbra. **2012** (em período de avaliação).
- 9 Amir, Faheem. *Structure elucidation of pentacyclitriterpenes*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Deutschland, **2011**.
- 10 info-Ciências digital. <http://infocienciasdigital.fc.ul.pt/noticia.aspx?id=639> (acedido em 4 de setembro de 2012).
- 11 Flarakos, Caroline Ceailles. *Applications of mass spectrometry techniques to the elucidation of novel metabolic pathways of Vitamin D and the quantification of DNA adducts* (2008). Chemistry Dissertations.
- 12 Thermo Electron Corporation - PolarisQ and DSQ, Direct Probe System User's Guide, **Revision E; 2005**.
- 13 Märk, T.D.; Dunn, G.H. *Electron Impact Ionization*; New York: Springer-Verlag, **1985**.
- 14 *Finnigan, Ion Max, API Source – Hardware Manual; Revision A; 2003*.
- 15 Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization - principles and practice *Mass Spectrom. Reviews*. **1990**, 9, 37-70.

- 16 Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th ed.; John Wiley & Sons, **2005**.
- 17 Bristol University – High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html> (acedido em 4 de setembro de 2012).
- 18 Glish, G. L.; Vachet, R. W. The Basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews*. **2003**, 2, 140-150.
- 19 CHROMacademy. <http://www.chromacademy.com/mass-spec-training.html> (acedido em 27 de setembro de 2012).
- 20 mod 2- Mass Spectrometry of peptides and proteins. http://www.ctu.edu.vn/~dvxe/Bioinformatic_course/mod2/mod2_0.html (acedido em 12 de setembro de 2011).
- 21 Paul, W.; Reinhard, H.P.; Frohlich, H.; (Siemens-Schuckertwerke Akt.-Ges.). DE, 1959.
- 22 Paul, W.; Steinwedel, H.Z. *Naturforsch., A: Phys. Sci.* **1953**, 8a, 448-50.
- 23 Paul, W.; Steinwedel, H.; (Siemens-Schuckertwerke Akt.-Ges.): DE, **1956**.
- 24 Stafford, G.J. *Am. Chem. Soc.* **2002**, 13, 589-596.
- 25 Stafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE. Ion Trap Technology. *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* **1984**, 60, 85-98.
- 26 Thermo Scientific, Overview of Mass Spectrometry. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=33C6C4ED-4B0D-49FA-ABD2-23BCB0FADEC0> (acedido em 4 de setembro de 2012)

- 27 Djerassi, C.; Budzikiewicz, H.; Wilson, J. M. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems – unsaturated pentacyclitriterpenoids *Tetrahedron Letters*. **1962**, *7*, 263-270.
- 28 Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M. C.; Haans, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*. **2011**, *46*, 1-15.
- 29 Vicente A.; Alves C.; Monteiro, C. Measurement of trace gases and organic compounds in the smoke plume from a wildfire in Penedono (central Portugal). *Atmospheric Environment*. **2011**, *45*, 5172-5182.
- 30 Goncalves, C.; Alves, C.; Fernandes, A. P. Organic compound in PM(2.5) emitted from fireplace and woodstove combustion of typical Portuguese wood species. *Atmospheric Environment*. **2011**, *45*, 4533-4545.
- 31 Brendolise, C.; Yauk, Y. K.; Eberhard, E. D. An unusual plant triterpenes synthase with predominatalfa-amyrin-producing activity identified by characterizing oxidosqualenecyclases from *Malus x domestica*. *Febs Journal*. **2011**, *14*, 2485-2499.
- 32 Jie, G.; Jianmei, S.; Xiaomeng, L. Differentiation of common diastereoisomericursane-type triterpenoids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **2011**, *25*, 1349-1355.
- 33 Chung-Ru, C.; Min, Y.; Zhi-Yuan, W. Fragmentation pathways of oxygenated tetracyclic triterpenoids and their application in the qualitative analysis of *Ganoderma lucidum* by multistage tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2011**, *25*, 1323-1335.
- 34 Junhong, L.; Lili, L.; Yixiang, W. Characterization and quantification of the triterpenoids in different parts of *Xanthoceras orbifolia* by HPLC-ESI-MS. **2011**, *55*, 259-264.

- 35 Ribechini, E.; Bacchiocchi, M.; Deviese, T. Analytical pyrolysis with in situ thermally assisted derivatisation, Py(HMDS)-GC/MS, for the chemical characterization of archaeological birch bark tar. **2011**, *91*, 219-223.
- 36 Silva, C. F.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F. Chemical Constituents from Branches of *Maytenusgonoclada* (Celastraceae) and Evaluation of Antimicrobial Activity. **2011**, *22*, 943-U190.
- 37 Salvador, J. A. R.; Pinto, R. M. A.; Santos, R. C.; Le Roux, C.; Beja, A. M.; Paixão, J. A. Bismuth triflate-catalyzed Wagner-Meerwein rearrangement in terpenes. Application to the synthesis of the 18 alpha-oleanane core and A-neo-18 alpha-oleanene compounds from lupanes. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2009**, *7*, 508-517.
- 38 Yu, Z.; Cui, M.; Yan, C.; Song, F.; Liu, Z.; Liu, S.; Zhang, H.; Gas phase isomeric differentiation of oleanolic and ursolic acids associated with heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2010**, *45*, 444-450.
- 39 Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta*, **2009**, *78*, 40-48.
- 40 Razborssek, M.; Voncina, D.; Dolecek, V.; Voncina, E.; Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, **2008**, *67*, 433-440.
- 41 Huang, L.; Chen, T.; Ye, Z.; Chen, G.; Use of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization – ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl. *Journal of Mass Spectrometry*. **2007**, *42*, 910-917.

- 42 Development of LC-MS method for determination of ursolic and oleanolic acid: application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* Hemsl.. *Journal of Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 961-.
- 43 Assimopoulou, A. N. & Papageorgiou, V. P.; GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia species*. Part I. *Pistacialentiscus* var. Chia.; *Biomedical Chromatography*, **2005**, *19*, 285-311.
- 44 Noel, M. G.; Dayrit, F. M.; Triterpenes in the Callus Culture of *Vitexnegundo* L., *Philippine Journal of Science*, **2005**, *134*, 5-19.
- 45 Budzikiewicz, H; Wilson, J. M.; Djerassi, C.; Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc*, **1963**, *85*, 3688-3699.
- 46 Colnago, Luiz Alberto; Almeida, Fábio C. L.; Valente, Ana Paula. Espectrometria de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução no Estudo de Macromoléculas Biológicas. *Química Nova na Escola*. **2002**, *16*.
- 47 Gonsalves, António M. d'A Rocha; Pinho e Melo, Teresa M. V. D.. *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, CHYMIOTECHNON, Coimbra, **2000**.
- 48 Abraham, R. J.; Fisher, J.; Loftus, P.. *Introduction to NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, **1991**.
- 49 Luzyanin, Konstatin; Abrantes, Marta; Ressonância Magnética Nuclear – Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Médica. *Boletim da SPQ*. **2010**, *117*.
- 50 Knight, S. A.; C-13 NMR-spectra of some tetracyclic and pentacyclic triterpenoids. *Organic Magnetic Resonance*, **1974**, *11*, 603-611.

- 51 Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R. & Kunert; Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, *41*, 636-638.
- 52 Mahato, S. B., Kundiu, A. P.; ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 1517-1575.

CAPÍTULO 3

Parte Experimental

Neste capítulo descrevem-se todos os procedimentos experimentais realizados ao longo do presente trabalho.

A caracterização dos novos derivados semi-sintéticos^{1,2} (**2-4** e **6-18**) dos ácidos oleanólico (**1**) e ursólico (**5**) foi efetuada através da espectrometria de massa (*MS-EI* e *MSn-ESI*) e da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C e *DEPT-135*).

3.1. Equipamentos utilizados

3.1.1. Espetrometria de massa

Os espectros de massa foram obtidos nos seguintes equipamentos:

- Thermo Finnigan, Polaris Q, com método de ionização por impacto eletrónico (70 eV), introdução direta da amostra através de uma *Probe* de sólidos e analisador de massas *ion trap*;
- Thermo Finnigan, LCQ Advantage MAX, com ionização por *electrospray*, introdução da amostra por infusão direta e analisador de massas híbrido, o quadrupolo-*ion trap* (Q-IT).

3.1.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A caracterização dos compostos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹H, ¹³C e *DEPT-135*) foi obtida no espectrómetro Bruker Avance III (400 MHz).

3.2. Condições usadas na preparação das amostras e aquisição dos espectros

3.2.1. Espectros de massa

Nas análises realizadas no equipamento Thermo Finnigan, Polaris Q, a introdução da amostra foi feita sem nenhuma preparação prévia já que a utilização de uma *DIP probe* permite a introdução de sólidos sem necessidade de solubilização.

Os espectros de *MS* foram obtidos em modos ião positivo e *full scan*, com as seguintes condições: temperatura inicial a 40°C, tempo inicial 20 segundos, velocidade de aquecimento 30°C/min, temperatura máxima 350°C e tempo de espera na temperatura máxima de 50 segundos.

Com o espectrómetro de massa LCQ Advantage MAX (Thermo Finnigan), as amostras foram previamente solubilizadas numa mistura CHCl₃/MeOH (10/90), e depois, microfiltradas por uma membrana durapore (Millipore) com um diâmetro de poro de 0,22 µm. Após este tratamento as soluções foram introduzidas no espectrómetro de massas por infusão direta.

Os espectros de *MS Tandem* foram obtidos em modo ião positivo, em *full scan*, com as seguintes condições da fonte *ESI*: velocidade do fluxo do gás nebulizador a 65 arb., velocidade do fluxo do gás auxiliar de varredura a 5 arb., voltagem do *spray* a 4.50 kV, temperatura capilar a 250 °C e voltagem capilar a 0 V. O gás nebulizador utilizado foi o azoto (N₂) e como gás de colisão o hélio (He). As energias de colisão normalizadas foram distintas para os dois ciclos de *MS*, 47% para *MS2* e 37% para *MS3*.

3.2.2. Espectros de ressonância magnética nuclear

A solubilização das amostras foi feita em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e o padrão interno foi o CHCl₃, δ 7,26 (RMN-¹H) e δ 77,00 (RMN-¹³C). Os valores dos desvios químicos (δ) são apresentados em ppm e das constantes de acoplamento (*J*) em Hz.

3.3. Solventes utilizados

Os reagentes utilizados, no decorrer da presente atividade experimental, foram fornecidos pela Merck Co via VWR Portugal e utilizados diretamente.

Referências

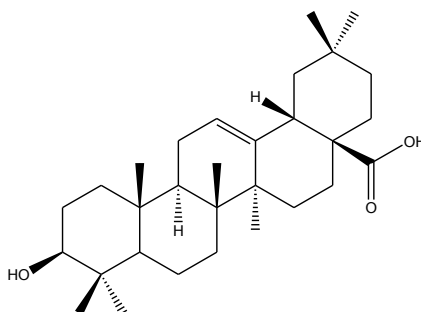
- 1 Leal, A. S.; Preparation and biological evaluation of new triterpene derivatives of ursolic and oleanolic acids. Dissertação de doutoramento apresentada à Universidade de Coimbra. **2012** (em período de avaliação).
- 2 Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y.. Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21^{waf1} and NOXA in pancreatic cancer cells; *Bioorganic&Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 5774-5786.

Anexo

**Caraterização estrutural
dos compostos referidos no
Capítulo 2**

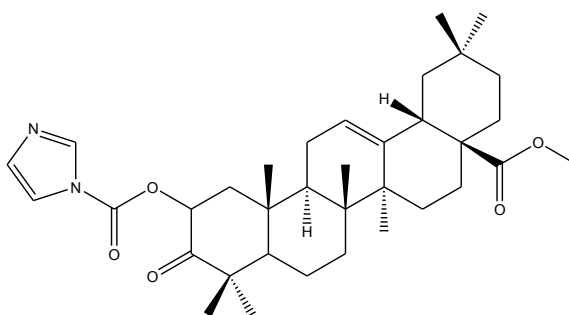
Ácido oleanólico e seus derivados semi-sintéticos

Ácido 3- β -hidroxi-olea-12-en-28-óico (1)



MSn-ESI: MS: m/z 457,47 (100) $[M+H]^+$, MS2 (457,40): m/z 439,19 (100), 411,12 (56), 393,24 (78), 203,13 (3), MS3 (457,40, 439,00): m/z 392,65 (60), 249,13 (11), 203,15 (100), 190,12 (55), 189,34 (59), MS3 (457,40, 411,00): m/z 393,33 (75), 208,11 (19), 203,19 (100), 189,28 (49), MS3 (457,40, 393,00): m/z 203,14 (100), 190,13 (19), 189,28 (43) e 133,13 (63).

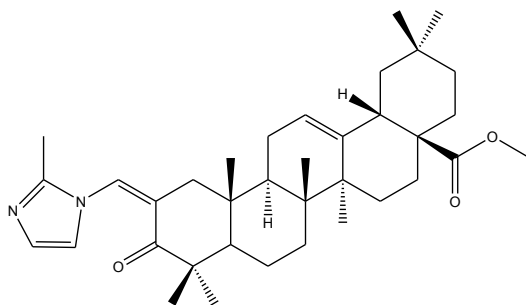
Metil 2-(1H-imidazol-1-il)-carboxilato-3-oxo-olea-12-en-28-oato (2)



MSn-ESI: MS: m/z 579,97 (100) $[M+H]^+$; MS2 (580,00): m/z 549,21 (53), 548,12 (73), 520,21 (100), 316,91 (31), 202,99 (49); MS3 (580,00, 520,00): m/z 317,11 (38), 205,13 (21), 203,01 (100), 189,31 (56); MS3 (580,00, 317,00): m/z 205,11 (100).

MS-EI: m/z 579,10 (5) M^+ , 519,10 (2), 316,99 (8), 261,99 (14), 203,01 (100), 189,04 (57), 133,09 (69).

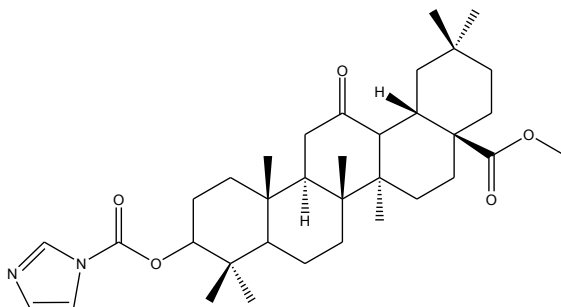
RMN- 1H (400 MHz $CDCl_3$): δ 8,20 (1H s), 7,44 (1H s), 7,10 (1H s), 5,75 (1H dd $J=19,20$), 3,63 (3H s), 2,87 (1H dd $J=16,80$).

Metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3-oxo-olea-12-en-28-oato (3)

MSn-ESI: MS: m/z 561,71 (100) $[M+H]^+$, MS2 (562,00): m/z 531,23 (24), 530,11 (46), 501,54 (100), 299,15 (21), 203,11 (50), 189,19 (7), MS3 (562,00, 502,00): m/z 299,21 (63), 203,41 (100), 133,41 (38), MS3 (562,00, 203,00): m/z 189,11 (100), 133,35 (53).

MS-EI: m/z 561,28 (14) M^+ , 501,30 (10), 299,15 (48), 203,05 (77), 133,04 (100).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,13 (1H s), 6,97 (1H s), 5,33 (1H s), 3,62 (3Hs), 2,46 (3H s).

Metil 3-(1H-imidazol-1-il)-carboxilato-12-oxo-oleanan-28-oato (4)

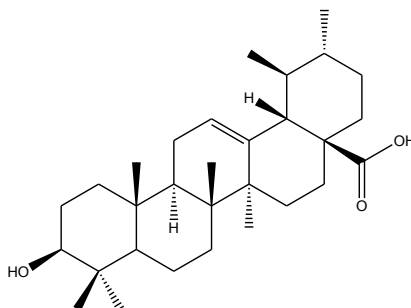
MSn-ESI: MS1: m/z 582,21 (100) $[M+H]^+$, MS2 (582,00): m/z 522,27 (100), 469,89 (65), 218,51 (29), 191,28 (23), MS3 (582,00, 522,00): m/z 303,29 (68), 219,14 (100), 205,03 (18), 191,01 (37), MS3 (582,00, 470,00): m/z 219,12 (100), 191,27 (35), 149,21 (18).

MS-EI: m/z 581,02 (8) M^+ , 521,19 (2), 469,12 (5), 303,15 (12), 278,01 (29), 219,04 (59)

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,10 (1H s), 7,39 (1H s), 7,06 (1H s), 4,66 (1H dd J 16,4).

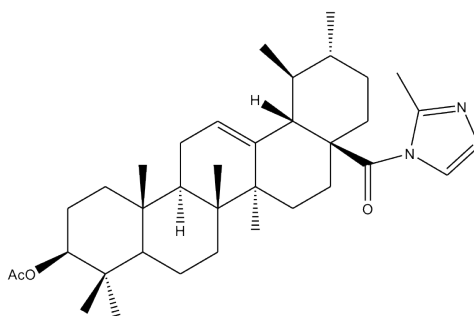
Ácido ursólico e seus derivados semi-sintéticos

Ácido 3-β-hidroxi-urs-12-en-28-óico (5)



MSn-ESI: MS: m/z 457,31 (100) $[M+H]^+$, MS2 (457,40): m/z 438,97 (100), 411,29 (47), 393,31 (69), 202,97 (5), MS3 (457,40, 439,00): m/z 392,81 (59), 249,16 (21), 203,11 (100), 190,09 (33), 189,21 (55), MS3 (457,40, 411,00): m/z 393,35 (41), 208,21 (23), 203,23 (100), 189,31 (67), MS3 (457,40, 393,00): m/z 203,21 (100), 190,11 (27), 189,42 (34), 133,21 (48).

3β-acetoxi-urs-12-en-28-il-2'-metil-1H-imidazol-1-carboxilato (6)



MSn-ESI: MS: m/z 563,59 (100) $[M+H]^+$, MS2 (564,00): m/z 454,24 (43), 394,11 (100), 251,12 (8), 203,08 (30), 189,22 (4), MS3 (564,00, 454,00): m/z 394,09 (39), 251,10 (58), 203,10 (100), MS3 (564,00, 394,00): m/z 203,13 (100), 191,23 (68), 189,09 (27).

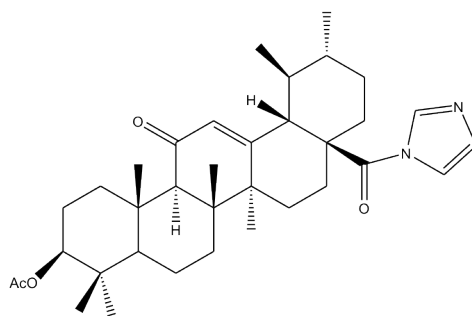
MS-EI: m/z 562,94 (20) M^+ , 249,94 (61), 203,06 (47), 191,08 (25), 189,07 (100), 187,13 (28), 119,14 (38), 107,14 (36), 105,16 (35), 95,19 (41), 91,18 (35), 81,15 (31), 79,14 (29).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,53 (1H s), 6,86 (1H s), 5,22 (1H s), 4,47 (1H t $J=14,86$), 2,55 (3H s), 2,03 (3H s), 1,09 (3H s), 0,99 (3H d $J=6,00$), 0,92 (6H s), 0,84 (3H s), 0,83 (3H s), 0,71 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 176,65, 170,96, 149,35, 137,13, 127,24, 126,39, 117,35, 80,79, 55,25, 54,04, 51,83, 47,39, 42,19, 39,55, 39,49, 38,64, 38,29, 37,64, 36,80, 35,55, 32,70, 30,45, 28,01, 27,75, 24,88, 23,49, 23,41, 23,26. 21,27, 21,09, 18,06, 17,84, 17,25, 17,18, 16,67, 15,51.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 18 x CH e CH₃, 9 x CH₂, 9 x C.

3β-acetoxi-11-oxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato (7)



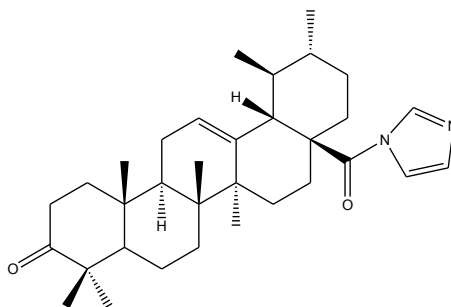
MSn-ESI: MS: *m/z* 564,41 (100) [M+H]⁺, MS2 (564,00): *m/z* 504,44 (18), 468,13 (100), 408,39 (54), 251,21 (7), 217,18 (19), MS3 (564,00, 468,00): *m/z* 408,43 (37), 251,13 (43), 217,23 (100), 191,25 (33), 188,88 (18), MS3 (564,00, 217,00): *m/z* 188,91 (100).

MS-EI: *m/z* 563,00 (13) M⁺, 216,02 (73), 189,01 (100), 175,05 (78), 161,05 (33), 147,06 (74), 133,07 (34), 119,07 (52), 107,06 (33), 105,06 (53), 95,06 (54), 91,06 (49), 79,03 (32), 68,99 (78).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,28 (1H s), 7,52 (1H s), 7,05 (1H s), 5,64 (1H s), 4,48 (1H dd *J*=15,98), 2,77 (1H d *J*=13,55), 2,60 (1H d *J*=11,11), 2,02 (3H s), 1,30 (3H s), 1,12 (3H s), 1,01 (3H d *J*=6,17), 0,92 (3H d *J*=6,24), 0,84 (9H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 199,15, 173,78, 170,94, 161,02, 136,87, 131,24, 130,04, 117,27, 80,48, 61,28, 55,00, 53,99, 50,60, 44,61, 43,71, 38,78, 38,69, 38,34, 37,94, 36,94, 34,84, 32,83, 30,08, 28,17, 27,98, 24,47, 23,47, 21,24, 20,84, 20,80, 18,44, 17,19 (2C), 16,62, 16,33.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 18 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 9 x C.

3-oxours-12-en-28-il-1*H*-imidazol-1-carboxilato (8)

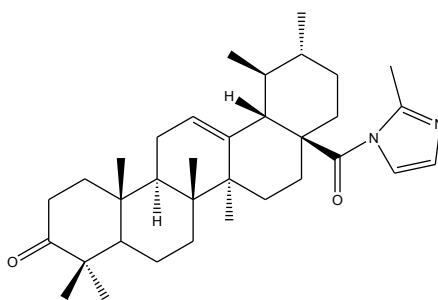
MSn-ESI: MS: m/z 506,24 (100) $[M+H]^+$, MS2 (506,00): m/z 410,05 (100), 207,31 (21), 203,11 (54), 189,06 (13), MS3 (506,00, 410,00): m/z 207,01 (54), 203,41 (100), 189,04 (31), MS3 (506,00, 203,00): m/z 189,04 (100), 133,27 (54).

MS-EI: m/z 504,99 (7) M^+ , 205,00 (44), 203,01 (77), 175,06 (40), 133,04 (54), 119,04 (48), 107,03 (52), 105,04 (51), 95,04 (51), 91,01 (51), 79,00 (43), 68,97 (100).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,46 (1H s), 7,56 (1H s), 7,11 (1H s), 5,25 (1H t $J=7,32$), 1,10 (3H s), 1,06 (3H s), 1,03 (3H s), 1,02 (3H s), 1,00 (3H d $J=6,32$), 0,91 (3H d $J=6,46$), 0,72 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 217,61, 174,26, 136,88, 136,69, 127,97, 126,55, 117,79, 55,23, 54,22, 51,16, 47,38, 46,62, 42,20, 39,38, 39,26, 39,22, 38,62, 36,60, 35,48, 34,11, 32,29, 30,30, 27,72, 26,41, 24,95, 23,50, 23,41, 21,45, 20,97, 19,33, 17,04, 16,73, 15,17.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 16 x CH e CH₃, 9 x CH₂, 8 x C.

3-oxours-12-en-28-il-2'-metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato (9)

MSn-ESI: MS: m/z 520,04 (100) $[M+H]^+$, MS2 (520,00): m/z 410,43 (100), 207,11 (29), 203,21 (69), 189,11 (14), MS3 (520,00, 410,00): m/z 207,06 (48), 203,41 (100), 189,07 (24), MS3 (520,00, 203,00): m/z 189,14 (100), 133,10 (47).

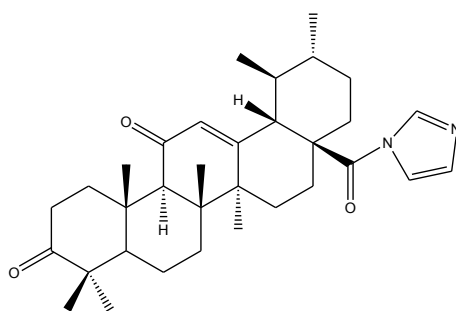
MS-EI: m/z 518,91 (13) M^+ , 408,98 (96), 244,96 (44), 204,95 (73), 203,00 (100), 188,87 (50), 175,06 (58), 121,07 (44), 119,07 (42), 107,08 (42), 105,10 (40), 95,11 (48).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,53 (1H s), 6,87 (1H s), 5,24 (1H s), 2,56 (3H s), 1,10 (3H s), 1,06 (3H s), 1,03 (3H s), 1,01 (3H s), 0,98 (3H d $J=6,25$), 0,90 (3H d $J=6,32$), 0,76 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 217,53, 176,55, 149,34, 137,20, 127,04, 126,25, 117,37, 55,24, 54,08, 51,86, 47,37, 46,66, 42,30, 39,50 (2C), 39,28, 38,61, 36,60, 35,48, 34,10, 32,27, 30,42, 27,74, 26,42, 24,83, 23,39, 23,36, 21,44, 21,06, 19,41, 17,76, 17,20, 17,13, 15,18.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 17 x CH e CH₃, 9 x CH₂, 8 x C.

3,11-dioxours-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato (10)



MSn-ESI: MS: m/z 520,33 (100) $[M+H]^+$, MS2 (520,00): m/z 424,19 (100), 217,32 (55), 207,03 (32), 189,07 (8), MS3 (520,00, 424,00): m/z 217,29 (100), 207,08 (41), 189,13 (12), MS3 (520,00, 217,00): m/z 189,25 (100).

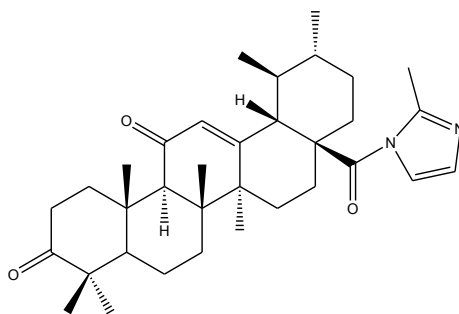
MS-EI: m/z 519,00 (5) M^+ , 216,08 (29), 188,98 (100), 147,03 (62), 133,05 (22), 119,03 (33), 107,03 (23), 105,02 (32), 95,02 (43), 91,01 (37), 81,01 (30), 79,00 (25), 68,96 (55), 66,97 (33), 54,95 (26).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,27 (1H s), 7,53 (1H s), 7,06 (1H s), 5,68 (1H s), 1,32 (3H s), 1,24 (3H s), 1,06 (3H s), 1,02 (6H d $J=7,81$), 0,93 (3H d $J=6,20$), 0,89 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 216,91, 198,55, 173,82, 161,40, 136,89, 131,21, 130,14, 117,28, 60,68, 55,44, 54,06, 50,65, 47,69, 44,47, 43,86, 39,76, 38,78, 38,37, 36,73, 34,86, 34,14, 32,33, 30,11, 28,29, 26,34, 24,50, 21,36, 20,87, 20,80, 18,61, 18,36, 17,18, 15,57.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 16 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 9 x C.

3,11-dioxours-12-en-28-il-2' metil-1*H*-imidazol-1-carboxilato (11)



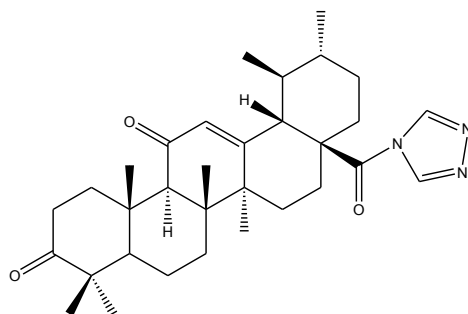
MSn-ESI: MS: m/z 534,19 (100) $[M+H]^+$, MS2 (534,00): m/z 424,25 (100), 217,03 (79), 207,07 (42), 189,07 (26), MS3 (534,00, 424,00): m/z 217,13 (100), 207,23 (45), 189,11 (19), MS3 (534,00, 217,00): m/z 189,13 (100).

MS-EI: m/z 532,95 (7) M^+ , 423,01 (12), 215,89 (18), 190,96 (16), 189,96 (16), 188,96 (100), 173,09 (12), 147,10 (38), 119,09 (14), 105,10 (12), 95,15 (23), 91,12 (13), 83,14 (24), 81,10 (14).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,53 (1H s), 6,91 (1H s), 5,69 (1H s), 2,55 (3H s), 1,33 (3H s), 1,25 (3H s), 1,07 (3H s), 1,03 (3H s), 1,01 (3H d $J=6,18$), 0,92 (6H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 216,94, 198,65, 175,42, 161,60, 149,73, 131,14, 127,69, 116,99, 60,65, 55,43, 54,24, 51,60, 47,71, 44,52, 43,98, 39,75, 38,98, 38,35, 36,72, 34,67, 34,15, 32,32, 30,11, 28,32, 26,33, 24,13, 21,38, 20,87, 20,76, 18,76, 18,61, 18,13, 17,28, 15,61.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 16 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 10 x C.

3,11-dioxours-12-en-28-il-4H-triazol-4-carboxilato (12)

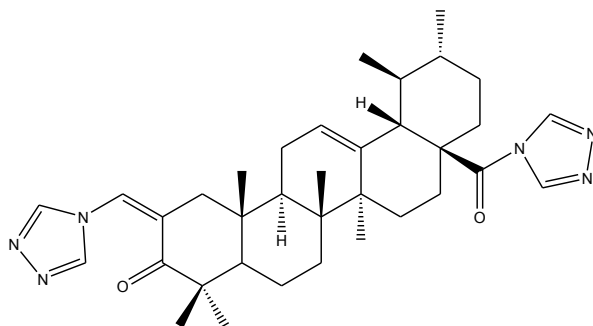
MSn-ESI: MS: m/z 521,12 (100) $[M+H]^+$, MS2 (521,00): m/z 424,09 (100), 217,41 (64), 206,98 (39), 189,11 (8), MS3 (521,00, 424,00): m/z 217,19 (100), 207,11 (44), 189,09 (13), MS3 (521,00, 217,00): m/z 189,25 (100).

MS-EI: m/z 519,84 (8) M^+ , 422,97 (47), 407,03 (43), 256,99 (100), 216,04 (73), 215,04 (71), 188,67 (36), 161,11 (45), 147,07 (32), 146,05 (42), 91,2 (39).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,84 (1H s), 8,01 (1H s), 5,67 (1H s), 1,33 (3H s), 1,23 (3H s), 1,06 (3H s), 1,02 (3H s), 1,00 (3H d $J=6,34$), 0,92 (3H d $J=6,38$), 0,87 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 216,98, 198,71, 174,14, 162,11, 152,65, 145,37, 130,97, 60,70, 55,41, 53,13, 51,00, 47,69, 44,46, 43,92, 39,73, 38,69, 38,30, 36,70, 34,15, 33,71, 32,31, 30,12, 28,67, 26,33, 22,94, 21,37, 20,89, 20,85, 18,62, 18,41, 17,10, 15,56.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 15 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 9 x C.

28-(4H-triazol-4-il)-3,28-dioxours-12-en-2-(4H-triazol-4-il)-metileno (13)

MSn-ESI: MS: m/z 586,04 (100) $[M+H]^+$, MS2 (586,00): m/z 489,01 (100), 286,01 (8), 203,08 (30), 189,22 (3), MS3 (586,00, 489,00): m/z 286,24 (63), 203,13 (100), 189,34 (52), MS3 (586,00, 203,00): m/z 189,27 (100), 133,23 (51).

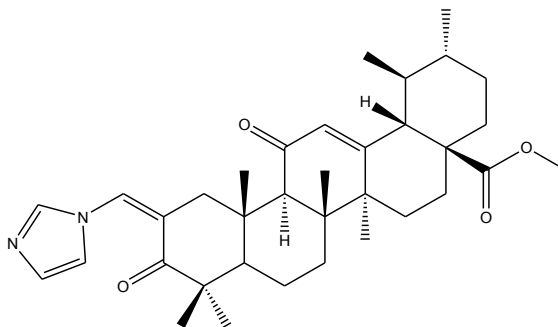
MS-EI: m/z 584,94 (4) M^+ , 489,01 (31), 488,00 (70), 203,01 (43), 190,07 (52), 189,09 (100), 187,13 (38), 134,03 (31), 133,03 (51), 119,05 (45), 117,08 (48).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,82 (1H s), 8,37 (1H s), 8,10 (1H s), 7,99 (1H s), 7,80 (1H s), 5,31 (1H s), 3,41 (1H d $J=17,27$), 1,25 (2H s), 1,16 (3H s), 1,15 (3H s), 1,11 (3H s), 0,99 (3H d $J=6,26$), 0,96 (3H d $J=6,38$), 0,88 (3H s), 0,72 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 206,95, 174,81, 152,96, 152,24, 145,30, 137,60, 137,03, 128,37, 125,92, 125,29, 52,75, 51,39, 45,28 (2C), 44,99, 43,18, 42,40, 39,30, 39,21, 38,53, 35,74, 34,39, 31,87, 30,46, 29,66, 28,13, 23,59, 23,42 (2C), 22,48, 21,02, 20,16, 17,08, 16,43, 15,68.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 18 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 9 x C.

Metil 2-(1H-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato (14)



MSn-ESI: MS: m/z 562,11 (100) $[M+H]^+$, MS2 (562,00): m/z 502,01 (100), 284,93 (14), 217,19 (31), 189,02 (6), MS3 (562,00, 502,00): m/z 285,03 (49), 217,13 (100), 188,81 (31), MS3 (562,00, 217,00): m/z 188,79 (100).

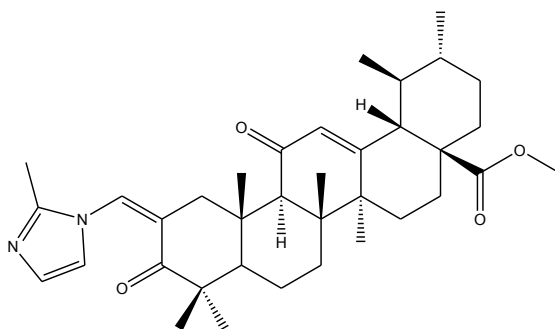
MS-EI: m/z 561,20 (24) M^+ , 229,01 (30), 216,99 (32), 215,98 (100), 201,08 (48), 189,10 (42), 174,13 (42), 105,14 (21), 91,17 (27), 69,13 (36).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,84 (1H s), 7,65 (1H s), 7,35 (1H s), 7,14 (1H s), 5,68 (1H s), 4,16 (1H d $J=16,47$), 3,61 (3H s), 2,46 (2H s), 2,25 (1H d $J=16,45$), 1,33 (3H s), 1,18 (3H s), 1,12 (6H s), 0,97 (3H d $J=6,23$), 0,94 (3H s), 0,90 (3H d $J=6,33$).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 206,25, 198,67, 177,11, 164,05, 138,85, 130,51, 130,26, 130,11, 122,70, 119,21, 58,91, 52,85, 52,79, 51,86, 47,63, 45,28, 44,15, 43,85, 43,17, 38,72, 38,58, 35,97, 35,88, 31,59, 30,24, 29,71, 28,45, 23,81, 22,34, 20,97, 20,93, 19,45, 18,19, 17,17, 15,44.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 19 x CH e CH₃, 7 x CH₂, 9 x C.

Metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato (15)



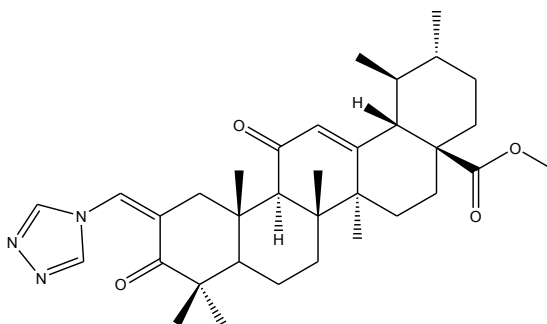
MSn-ESI: MS: *m/z* 576,44 (100) [M+H]⁺, MS2 (576,00): *m/z* 515,87 (100), 299,01 (19), 217,41 (36), 189,09 (5), MS3 (576,00, 516,00): *m/z* 299,08 (43), 217,09 (100), 188,97 (29), MS3 (576,00, 217,00): *m/z* 189,03 (100).

MS-EI: *m/z* 575,20 (17) M⁺, 243,01 (44), 231,00 (23), 229,98 (100), 229,07 (19), 216,10 (54), 202,11 (36), 190,12 (18), 189,14 (50), 83,14 (25).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,62 (1H s), 7,32 (1H s), 6,99 (1H s), 5,67 (1H s), 4,14 (1H d *J*=16,36), 3,61 (3H s), 2,49 (3H s), 2,45 (2H), 2,18 (1H d *J*=16,46), 1,33 (3H s), 1,18 (3H s), 1,13 (3H s), 1,12 (3H s), 0,97 (3H d *J*=6,28), 0,94 (3H s), 0,89 (3H d *J*=6,22).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 206,36, 198,71, 177,11, 163,99, 147,23, 130,53, 129,69, 128,38, 122,98, 118,24, 58,90, 53,02, 52,80, 51,87, 47,64, 45,39, 44,19, 43,86, 42,51, 38,72, 38,59, 36,07, 35,90, 31,65, 30,25, 29,67, 28,47, 23,82, 22,47, 21,00, 20,94, 19,44, 18,26, 17,19, 15,39, 13,66.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 18 x CH e CH₃, 7 x CH₂, 11 x C.

Metil 2-(4H-triazol-4-il)-metileno-3,11-dioxours-12-en-28-oato (16)


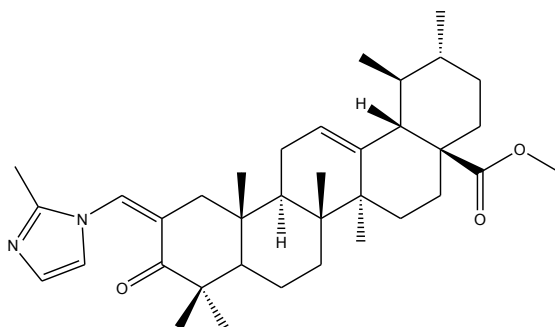
MSn-ESI: MS: m/z 563,23 (100) $[M+H]^+$, MS2 (563,00): m/z 503,02 (100), 286,03 (15), 217,21 (43), 189,21 (12), MS3 (563,00, 503,00): m/z 285,88 (58), 217,14 (100), 188,87 (31), MS3 (563,00, 217,00): m/z 189,17 (100).

MS-EI: m/z : 562,08 (12) M^+ , 317,91 (24), 316,93 (86), 286,03 (25), 258,03 (23), 256,97 (100), 216,01 (37), 215,04 (28), 202,03 (14), 191,10 (19), 189,10 (23), 173,12 (21), 162,07 (20), 161,16 (91), 135,18 (22), 119,16 (26).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,46 (1H s), 8,08 (1H s), 7,79 (1H s), 5,68 (1H s), 4,39 (1H d $J=17,42$), 3,61 (3H s), 1,33 (3H s), 1,19 (3H s), 1,12 (6H s), 0,97 (3H d $J=6,15$), 0,94 (3H s), 0,91 (3H d $J=6,26$).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 206,32, 198,51, 177,13, 163,66, 152,49, 145,23, 130,61, 128,77, 125,27, 58,71, 53,01, 52,80, 51,87, 47,66, 45,38, 44,19, 43,86, 43,56, 38,74, 38,61, 35,93, 35,81, 31,64, 30,27, 29,73, 28,48, 23,85, 22,34, 20,97, 20,95, 19,50, 18,21, 17,19, 15,45.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 17 x CH e CH₃, 7 x CH₂, 10 x C.

Metil 2-(2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato (17)

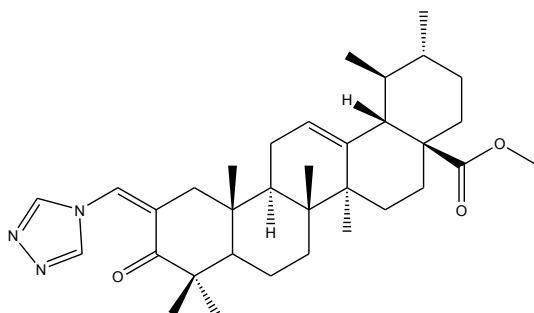
MSn-ESI: MS: m/z 561,97 (100) $[M+H]^+$, MS2 (562,00): m/z 502,02 (100), 299,01 (12), 203,08 (31), 189,22 (3), MS3 (562,00, 502,00): m/z 299,10 (51), 203,17 (100), 189,46 (26), MS3 (562,00, 203,00): m/z 189,26 (100), 133,37 (50).

MS-EI: m/z 561,17 (13) M^+ , 300,07 (17), 298,06 (75), 297,08 (18), 243,06 (16), 203,03 (47), 134,01 (26), 133,15 (100), 131,10 (16), 119,07 (26), 117,09 (16), 107,05 (16), 105,09 (23), 91,13 (29), 83,18 (39), 79,08 (18).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7,66 (1H s), 7,16 (1H s), 7,01 (1H s), 5,29 (1H s), 3,60 (3H s), 2,89 (1H d $J=15,84$), 2,47 (3H s), 2,26 (1H d $J=11,27$), 2,17 (1H d $J=15,49$), 1,16 (3H s), 1,14 (3H s), 1,12 (3H s), 0,95 (3H d $J=5,85$), 0,89 (6H s), 0,79 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 206,63, 177,92, 147,31, 138,45, 130,38, 128,57, 124,98, 123,60, 118,19, 53,01, 52,78, 51,45, 48,14, 45,31, 45,28, 42,37, 42,21, 39,38, 39,12, 38,83, 36,55, 36,12, 32,01, 30,63, 29,67, 27,97, 24,17, 23,54, 23,43, 22,57, 21,11, 20,23, 17,07, 16,62, 15,46, 13,68.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 18 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 10 x C.

Metil 2-(4*H*-triazol-4-il)-metileno-3-oxours-12-en-28-oato (18)

MSn-ESI: MS: m/z 548,56 (100) $[M+H]^+$, MS2 (549,00): m/z 489,43 (100), 285,96 (21), 203,06 (32), 132,99 (12), MS3 (549,00, 489,00): m/z 286,18 (55), 203,13 (100), MS3 (549,00, 203,00): m/z 189,02 (100), 133,33 (52).

MS-EI: m/z 548,05 (8) M^+ , 298,95 (25), 262,96 (45), 204,04 (17), 203,05 (83), 202,08 (22), 189,12 (26), 187,13 (15), 134,05 (40), 133,13 (100), 119,06 (24), 91,14 (17).

RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 8,37 (1H s), 8,10 (1H s), 7,80 (1H s), 5,32 (1H s), 3,60 (3H s), 3,40 (1H d $J=17,43$), 1,18 (3H s), 1,13 (3H s), 1,12 (3H s), 0,95 (3H d $J=5,92$), 0,90 (6H s), 0,80 (3H s).

RMN-¹³C (100 MHz CDCl₃): δ 207,06, 177,97, 152,82, 145,84, 138,26, 128,35, 125,53, 125,26, 53,05, 52,80, 51,45, 48,17, 45,31, 45,07, 43,20, 42,22, 39,33, 39,13, 38,86, 36,58, 35,79, 32,00, 30,65, 29,68, 27,98, 24,20, 23,59, 23,42, 22,49, 21,13, 20,29, 17,08, 16,60, 15,67.

DEPT-135 (100 MHz CDCl₃): 17 x CH e CH₃, 8 x CH₂, 9 x C.