CG - EM dos esteróis da esponja *Tedania ignis* e espectrometria de massa dos derivados do colesterol.

ROSA TOYOKO SHIRAISHI
Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Luís Guillermo Bravo Navarrete
CAMPINAS - SÃO PAULO
1978
Ao meu pai (in memoriam) e à minha mãe, a eterna gratidão.
Aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo.
A autora deseja expressar seu agradecimento:

Ao Prof. Dr. Luís Guillermo Bravo Navarrete, pela orientação deste trabalho.

À Direção do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por proporcionar condições para a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos auxílios concedidos.

À CNPq, pelos auxílios concedidos.

À Prof. Dra. Ruizsa V.F. de Bravo, pela disponibilidade na obtenção do espectro MIKE, pela sua valiosa ajuda na discussão dos espectros e na montagem deste trabalho.

Ao Prof. Lawrence T. Nielsen, pela disponibilidade na obtenção dos espectros de massa a 70 eV (MAT 311 A).

Ao Prof. Dr. Pierre C.G. Montouchet (Instituto de Biologia - Unicamp), pela disponibilidade na coleta e identificação da esponja Tedania ignis.


Ao Sr. Nelson Frighetto (Rhodia), pela disponibilidade na realização das análises elementares.

Aos amigos e colegas que compartilharam as alegrias e tristezas, pelo incentivo e pela convivência saudável durante a realização deste trabalho.

À Srta. Rosalina Mazzarotto, pela sua valiosa ajuda na correção do português deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química (UNICAMP) pela dedicação e particularmente ao Sr. William Kalaf pelo excelente trabalho de datilografia.
Resumo

A esponja vermelha, coletada em Ubatuba (S.P.), na Praia da Ribeira, foi classificada como *Tedania ignis* (Duchassaing & Michelotti) Verrill., pelo Prof. Dr. Sarà da Universidade de Gênova (Gênova - Itália).

A mistura esterólica foi estudada por um sistema Finnigan de cromatógrafo de gás (mod. 9500) - espectrômetro de massa (mod. 1015 S/L) - computador (mod. 6100); e através desta análise propomos as estruturas para seis componentes, como sendo: desmosterol; colesterol (componente mais abundante); brassicasterol; 22,23-dihidrobrassicasterol; estigmasterol ou poriferasterol e 8-sitosterol.

Foram feitos estudos, por espectrometria de massa, dos derivados do colesterol com substituintes no anel A do esqueleto esteroidal. Algumas das fragmentações foram confirmadas por "MIKES" (Espectros de energia cinética dos íons analisados por massa).
Abstract

A red sponge collected on the Ribeira beach in Ubatuba, São Paulo, was classified as *Tedania ignis* (Duchassaing and Michelotti) Verrill., by Professor Sarà of Gênova University, Gênova, Italy.

This sponge was extracted with various organic solvents. The fractions containing sterols were then studied by gas chromatography (Finnigan 9.500) coupled with mass spectrometry (Finnigan 1015 S/L) coupled with a computer (Finnigan 6100). On this basis, it was possible to identify the following sterols in the mixture: desmosterol; cholesterol (the most abundant component); brassicasterol; 22,23-dihydrobrassicasterol; stigmasterol or poriferasterol and β-sitosterol.

A mass spectra study of six cholesterol derivatives with substitution in the A ring was also undertaken. The effect of substitution on the fragmentation pattern is discussed. In several cases, the fragmentation was also studied by MIKES (Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Spectra).
Índice Geral

1ª Parte

<table>
<thead>
<tr>
<th>I. Introdução</th>
<th>Pag.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Revisão do constituinte esteroidal das esponjas</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>Cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro - de massa na análise de misturas esterólicas extraídas de tecidos vivos</td>
<td>12</td>
</tr>
</tbody>
</table>

II. Objetivos                         | 16   |

III. Parte Experimental               | 17   |

A. Informações gerais                 | 17   |
B. Coleta e identificação das esponjas | 18   |
C. Extração                           | 19   |
D. Isolamento do constituinte esteroidal do extrato TEP | 24   |
E. Isolamento do constituinte esteroidal do extrato acêtônico | 29   |
F. Caracterização dos esteróis        | 31   |
G. Estudos com CG acoplado ao EM      | 36   |

IV. Resultados e Discussão            | 43   |

V. Conclusão                          | 69   |

2ª Parte

<table>
<thead>
<tr>
<th>I. Introdução</th>
<th>Pag.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Objetivos</td>
<td>80</td>
</tr>
</tbody>
</table>

III. Resultados e Discussão           | 82   |

IV. Parte Experimental                | 117  |

V. Conclusão                          | 131  |
Bibliografia                          | 133  |
Apêndice                              | 136  |
Índice de Figuras, Tabelas e esquemas

Figura 1. Esterôis "classicos" encontrados nas esponjas ...

Figura 2. Diagrama esquemático de um sistema CG-EM-Compuñador

Figura 3. Cromatograma de gás em SE-30 (3%) dos acetatos dos esterôis (Axinella cannabina)

Figura 4. Espectro no I.V. do extrato éter de petróleo

Figura 5. Espectro no I.V. do extrato acetônico

Figura 6. Espectro no I.V. do extrato CHCl₃-MeOH (2:1)

Figura 7. Cromatograma da mistura esterólica da T. ignis

Figura 8. Espectro no I.V. da mistura esterólica TA

Figura 9. Espectro de RMN da mistura esterólica TA

Figura 10. Espectro no I.V. do acetato da mistura esterólica

Figura 11. Espectro de RMN do acetato da mistura esterólica

Figura 12. Comparação dos cromatogramas da mistura esterólica

Figura 13. Comparação dos cromatogramas do acetato da mistura esterólica

Figura 14. Espectro de massa do pico A da mistura esterólica da T. ignis (20 eV e 70 eV)

Figura 15. Espectro de massa do acetato de pico A (70 eV)

Figura 16. Espectro de massa do pico C da mistura esterólica da T. ignis (20 eV e 70 eV)

Figura 17. Espectro de massa do acetato do pico C (70 eV)

Figura 18. Espectro de massa do pico D da mistura esterólica da T. ignis (20 eV e 70 eV)

Figura 19. Espectro de massa do acetato do pico D (70 eV)

Figura 20. Espectro de massa do pico E da mistura esterólica da T. ignis (20 eV e 70 eV)

Figura 21. Espectro de massa do acetato do pico E
Figura 22. Espectro de massa do pico F da mistura esterólica da *T. ignis* (20 eV e 70 eV) ........................................ 60
Figura 23. Espectro de massa do acetato do pico F .................. 61
Figura 24. Espectro de massa do pico G da mistura esterólica da *T. ignis* (20 eV e 70 eV) ........................................ 63
Figura 25. Espectro de massa do acetato do pico G ............... 64
Figura 26. Espectro de massa do pico H da mistura esterólica da *T. ignis* (20 eV e 70 eV) ........................................ 65
Figura 27. Espectro de massa do acetato do pico H ............... 66
Figura 28. Espectro no U.V. do 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona ......................................................... 126
Figura 29. a) Espectro de massa do acetato de colesterol .......... 72
b) Espectro de massa do colesterol .................................. 72
Figura 30. Espectro de massa do colest-5-en-3-ona (48) .......... 84
Figura 31. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (49) .............. 87
Figura 32. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (50) ............... 92
Figura 33. EM de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (51) 95
Figura 34. Espectro MIKE do íon m/e 410 de 2-diazo-4,4-dime-
tilcolest-5-en-3-ona (51) ........................................... 96
Figura 35. Espectro MIKE do íon m/e 395 de 2-diazo-4,4-dime-
tilcolest-5-en-3-ona (51) ........................................... 97
Figura 36. Espectro de massa de 2-oximino-4,4-dimetilcolest5-en-3-ona (52) ................................................. 99
Figura 37. Espectro MIKE do íon m/e 441 do composto (52) 100
Figura 38. EM de 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona (53) ....... 103
Figura 39. Espectro MIKE do íon m/e 456 do composto (53) .... 106
Figura 40. Espectro MIKE do íon m/e 439 do composto (53) .... 109
Figura 41. Espectro MIKE do íon m/e 438 do composto (53) .... 110
Figura 42. Espectro MIKE do íon m/e 425 do composto (53) .... 113
Figura 43. Espectro MIKE do íon m/e 426 do composto (53) .... 114
Figura 44. Espectro no I.V. do composto (48) ..................... 120
Figura 45. Espectro no I.V. do composto (49) ................. 123
Figura 46. Espectro no I.V. do composto (52) ................. 127
Figura 47. Espectro no I.V. do composto (51) ................. 129
Figura 48. Espectro no I.V. do composto (53) ................. 130
Figura 49. Diagrama esquemático de um analisador quadrupolar ........................................ 138
Figura 50. Diagrama esquemático do espectrômetro de massa MIKES (geometria de Nier-Johnson inversa) .... 140

Tabela 1. Esteróis "clássicos" encontrados nas esponjas .... 5 e 6
Tabela 2. Extração com etanol de petróleo da T.ignis ...... 20
Tabela 3. Extração com acetona da T.ignis .................... 22
Tabela 4. Extração com CHCl₃-MeOH (2:1) da T.ignis .... 24
Tabela 5. Frações agrupadas da cromatografia líquida em coluna, do extrato TEP (I) ......................... 29
Tabela 6. Fracionamento do extrato acetônico (TA) ........... 31
Tabela 7. Análise dos espectros no I.V. da mistura esterólica TA e do acetato da mistura TA ................. 44
Tabela 8. Princípios Íons do espectro de massa dos esteróis da T.ignis ................................. 67
Tabela 9. Princípios Íons do espectro de massa dos acetatos da mistura esterólica da T.ignis .......... 68
<table>
<thead>
<tr>
<th>Esquema 1</th>
<th>Pag. 22</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Esquema 2</td>
<td>Pag. 25</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 3</td>
<td>Pag. 26</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 4</td>
<td>Pag. 28</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 5</td>
<td>Pag. 53</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 6</td>
<td>Pag. 74</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 7</td>
<td>Pag. 75</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 8</td>
<td>Pag. 77</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 9</td>
<td>Pag. 77</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 10</td>
<td>Pag. 79</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 11</td>
<td>Pag. 83</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 12</td>
<td>Pag. 85</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 13</td>
<td>Pag. 89</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 14</td>
<td>Pag. 90</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 15</td>
<td>Pag. 93</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 16</td>
<td>Pag. 94</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 17</td>
<td>Pag. 98</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 18</td>
<td>Pag. 101</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 19</td>
<td>Pag. 105</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 20</td>
<td>Pag. 107</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 21</td>
<td>Pag. 108</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 22</td>
<td>Pag. 111</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 23</td>
<td>Pag. 112</td>
</tr>
<tr>
<td>Esquema 24</td>
<td>Pag. 115</td>
</tr>
<tr>
<td>Símbolo</td>
<td>Abreviação</td>
</tr>
<tr>
<td>---------</td>
<td>------------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>CG</td>
<td>Cromatografia gasosa</td>
</tr>
<tr>
<td>EM</td>
<td>Espectrometria de massa</td>
</tr>
<tr>
<td>Fig.</td>
<td>Figura</td>
</tr>
<tr>
<td>I.V.</td>
<td>Infravermelho</td>
</tr>
<tr>
<td>RMN</td>
<td>Ressonância magnética nuclear de prótons</td>
</tr>
<tr>
<td>U.V.</td>
<td>Ultravioleta</td>
</tr>
<tr>
<td>P.F.</td>
<td>Ponto de fusão</td>
</tr>
<tr>
<td>MIKES</td>
<td>Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Spectra (Espectro de energia cinética dos íons analisados por massa).</td>
</tr>
<tr>
<td>$M^{+}$</td>
<td>Íon molecular</td>
</tr>
<tr>
<td>Me</td>
<td>Metila</td>
</tr>
<tr>
<td>Et</td>
<td>Etila</td>
</tr>
<tr>
<td>AcOH</td>
<td>Ácido acético</td>
</tr>
<tr>
<td>ppm</td>
<td>partes por milhão</td>
</tr>
<tr>
<td>δ</td>
<td>deslocamento químico em ppm</td>
</tr>
<tr>
<td>m/e</td>
<td>Relação massa/carga</td>
</tr>
<tr>
<td>max</td>
<td>máximo</td>
</tr>
<tr>
<td>Δ</td>
<td>Insaturação na cadeia carbonada</td>
</tr>
</tbody>
</table>
1° PARTE
I. Introdução

A química das substâncias derivadas de plantas, fungos e bactérias tem recebido, durante várias décadas, uma atenção muito grande dos químicos de produtos naturais. Com a crescente necessidade de se obter substâncias de interesse econômico ou biologicamente ativas, há atualmente, numerosos estudos sobre a atividade química das substâncias obtidas a partir da imensa variedade da fauna e flora marinhas.

Devido às condições biossintéticas, do meio ambiente marinho, serem totalmente diferentes daquelas encontradas em terra, esta diferença fundamental deverá favorecer a descoberta de novas substâncias com grandes propriedades benéficas. Além disso, muitos organismos marinhos mantiveram ou adquiriram um estágio evolutivo diverso daquele atingido por plantas e animais terrestres aumentando as possibilidades de descoberta de novas atividades biológicas e de substâncias ainda desconhecidas.

Um dos maiores problemas que os químicos de produtos naturais marinhos enfrentam é a dificuldade de identificar os organismos marinhos dos quais os compostos são obtidos. Isto é particularmente verdadeiro para a identificação das esponjas, já que os taxonomistas, frequentemente, falham ao fazê-la.

As esponjas constituem o filo Porífera, que é o mais primitivo dos animais multicelulares. Sua natureza animal foi reconhecida em 1765, mas seu lugar no Reino Animal continuou incerto até cerca de 1857. Não apresentam verdadeiros tecidos ou órgãos, e as células apresentam considerável grau de independência. Todos os membros deste grupo são sésseis e exibem movimento muito pouco detectável.
A maioria das esponjas é marinha, vivendo da linha de maré baixa até profundidades de 6000 metros, em forma de colônias. Algumas são de coloração cinzenta ou parda, outras são brilhantemente vermelhas, alaranjadas, azuis, violáceas ou pretas. Há somente uma família na água doce\(^2\). O esqueleto interno de sustentação pode ser de espículas cristalinas ou fibras irregulares de espongia, ou ambas, porém sempre presente.

A classificação das esponjas tem sido uma tarefa difícil para os taxonomistas de invertebrados. Para a finalidade desta introdução, podemos classificá-las\(^3\) em:

**Classe 1**

**Calcárea** (Calciospongiae). Esponjas calcáreas. Apresentam espículas calcáreas; monoaxiais ou com 3 ou 4 raios. A superfície do corpo cerdosa, cores apagadas e geralmente com menos de 15 cm de comprimento.

**Classe 2**

**Hexactinellida** (Hyalospongiae). Esponjas de vidro. Apresentam espículas silicosas; com 6 raios (hexactinas), separadas ou unidas em rede, alguns esqueletos assemeinham-se a fios de vidro. A massa do corpo, geralmente cilíndrica ou em forma de funil; sem epitélio na superfície e coanócitos somente em camadas digitiformes; comprimento de até um metro. São exclusivamente marinhas à profundidade da linha de maré baixa até 6000 metros.

**Classe 3**

**Demospongiae.** Apresenta esqueleto de espículas silicosas ou de esponginas, ou de ambas e pode até mesmo estar ausente. As espículas quando presentes são de 6 raios.
A. Revisão do constituinte esteroidal das esponjas

Os esteróis compreendem um grupo de produtos naturais que têm como esqueleto base, um esqueleto tetracíclico substituído(1). O esterol mais abundante, de origem animal, é o colesterol(2). Muitos outros estão relacionados estruturalmente à 2; e entre esses estão aqueles que foram extraídos de invertebrados marinhos. Estes esteróis são produtos metabolizados através de processos biológicos, e capazes de se transformarem em outras substâncias necessárias à vida dos organismos. Alguns deles são utilizados como materiais de partida para as sínteses de hormônios esteroidais farmacologicamente ativos.

A química da esponja começou com o trabalho pioneiro de Bergmann(4) sobre os esteróis da esponja Microciona prolífera. Des de então, as esponjas foram reconhecidas como constituintes da maior variedade de esteróis do Reino Animal(5). Em 1972, surgiram as modernas reinvestigações sobre os esteróis das esponjas confirmando-se a complexidade da composição esteroidal no filo e descobriu-se esteróis totalmente novos.

Na Figura 1 e Tabela 1 estão os esteróis "clássicos" (isola dos das esponjas), que têm o núcleo tetracíclico com 19 átomos de carbono e a cadeia lateral com 8 átomos de carbono ou modificada
Figura 1. Esteróis "clássicos" encontrados nas esponjas. Os nomes sistemáticos e as referências a literatura científica estão apresentados na Tabela 1.


<table>
<thead>
<tr>
<th>Composto</th>
<th>Nome comum</th>
<th>Nome sistemático</th>
<th>Ref.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>2</td>
<td>colesterol</td>
<td>colest-5-en-3β-ol</td>
<td>7,11</td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>colestanol</td>
<td>24-norcolesta-22-en-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>22-dehidrocolestanol</td>
<td>24-norcolesta-5,22-dien-3β-ol</td>
<td>7,11</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>latosterol*</td>
<td>5α-colest-22-en-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>Δ8(9)-colestenol*</td>
<td>5α-colest-7-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>22-dehidrocolesterol</td>
<td>5α-colest-8(9)-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>Δ7,22-colesteno*</td>
<td>colest-5,22-dien-3β-ol</td>
<td>7,11</td>
</tr>
<tr>
<td>9</td>
<td>7-dehidrocolesterol*</td>
<td>colest-5,7,22-trien-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>22,23-dihidrobrassicasterol</td>
<td>(24S)-24-metilcolesta-5-en-3β-ol</td>
<td>7,11</td>
</tr>
<tr>
<td>11</td>
<td>Δ7-ergosteno*</td>
<td>24-metilcolesta-7-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>12</td>
<td>22,23-dihidrobrassicasterol</td>
<td>(24S)-24-metilcolesta-8(9)-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>13</td>
<td>neopongosterol</td>
<td>5α-(24S)-24-metilcolesta-22-en-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>14</td>
<td>24-metilenolestanol</td>
<td>5α-24-metilcolesta-24(28)-en-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>15</td>
<td>22,23-dihidroergosterol*</td>
<td>24-metilcolesta-5,7-dien-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>16</td>
<td>5,6-dihidroergosterol*</td>
<td>24-metilcolesta-7,22-dien-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>17</td>
<td>brassicasterol</td>
<td>(24S)-24-metilcolesta-5,22-dien-3β-ol</td>
<td>7,11</td>
</tr>
<tr>
<td>18</td>
<td>24-metilenolestanol</td>
<td>24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3β-ol</td>
<td>7,9,11</td>
</tr>
<tr>
<td>19</td>
<td>ergosterol</td>
<td>(24S)-24-metilcolesta-5,7,22-trien-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>20</td>
<td>elionasterol</td>
<td>(24S)-24-estilcolesta-5-en-3β-ol</td>
<td>7,10,11</td>
</tr>
<tr>
<td>21</td>
<td>β-sitosterol</td>
<td>(24S)-24-estilcolesta-5-en-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>22</td>
<td>α-sitosterol</td>
<td>24-estilcolesta-7-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>23</td>
<td>*</td>
<td>24-estilcolesta-8(9)-en-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>24</td>
<td>*</td>
<td>24-estilcolesta-5,7-dien-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Tabela 1 - Continuação

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Nome</th>
<th>Estrutura</th>
<th>Referência</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>28</td>
<td>poriferasterol</td>
<td>(24R)-24-etilcolesta-5,22-dien-3β-ol</td>
<td>7,10,11</td>
</tr>
<tr>
<td>29</td>
<td>condrilasterol</td>
<td>(24R)-24-etilcolesta-7,22-dien-3β-ol</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>30</td>
<td>fucosterol</td>
<td>24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3β-ol</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>31</td>
<td>*</td>
<td>24-etilcolesta-5,7,22-trien-3β-ol</td>
<td>8</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* Esteroídos identificados por C.G.L./E.M., e não foram isolados.
pela adição de um ou dois átomos de carbono em C-24⁶.

Em 1972, Erdman e Thomson⁷ aludiram à reinvestigação dos esteróis das esponjas Cliona celata e Hymeniacidon perleve. A Cliona celata continha uma mistura de 8 esteróis: colesterol (2, componente predominante); 24-norcolesta-5,22-dien-3β-ol(4); 22-deidrocolesterol(9); 24-metilenocolesterol(21); brassicasterol(20); 22,23-diidrobrassicasterol(13); puriferasterol(28) e clionasterol (23). Em Hymeniacidon perleve, o colestanol(5) era o esterol predominante, acompanhado de mais sete esteróis em quantidades menores, incluindo três novos estanóis marinhas: 24-norcolesta-22-en-3β-ol(3); 22-deidrocolestanol(6) e 24-metilenocolestanol(17).

Uma análise dos esteróis da Axinella cannabina, pelo grupo de Fattorusso⁸, revelou a presença de quinze componentes incluindo esteróis 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 31; juntamente com o colesterol (2%). Encontraram também uma mistura de 5,8-peróxidos, dos quais o 5,8-epidioxicoleta-6,22-dien-3β-ol¹²(32) era de maior quantidade. Sheikh e Djerassi¹³ isolaram uma série de 5α,8α-peróxidos (33.a até 33.d) juntamente com 2,24-propilidenocolesta-5-en-3β-ol(34), da esponja Tethya aurantia.

Todas as espécies Verongia estudadas continham, como componentes principais, dois novos esteróis designados aplisterol(35) e 24,28-dideidroaplisterol(36), com um padrão de alquilação "normal" da cadeia lateral em C-24 e uma adição "extra" de um grupo metila em C-26. Outros esteróis, sem o grupo metila em C-26, também foram encontrados em menor quantidade (1% do conteúdo esterólico) em quase todas estas espécies.

Outro padrão de alquilação da cadeia lateral foi encontrado no esterol denominado calisterol, componente principal da esponja Calix nicaensis. A estrutura (37) do esterol foi proposta pelo
grupo de Fattorussolo\textsuperscript{15}, baseando-se nos dados espectroscópicos (EM e RMP) do acetato e nas degradações químicas. O mesmo grupo também descobriu dois outros esteróis novos, (38) e (39); este último é o primeiro exemplo de um esteróide com função acetilênica.

O componente esteroidal da \textit{Axinella polypoides} é uma mistura de estanôis tendo o núcleo 19-norcolestanol(40) com cadeia lateral saturada e C\textsubscript{7}(24-nor), C\textsubscript{8}, C\textsubscript{9} e C\textsubscript{10} mono-insaturada\textsuperscript{16}.

\textit{Axinella verrucosa}\textsuperscript{17} contém uma série de estanôis com um nú
(35), aplisterol

(36); 24,28-didehydroaplisterol

(37); calisterol

(38)

(39)

cleo 3β-hidroxi-A-nor-5α-colestano(41) e a cadeia lateral com C₈, C₉ e C₁₀.
Recentemente foi relatada a ocorrência de um número de derivados de pregnana na mistura esterólica isolada da esponja *Haliclona rubens*\(^\text{18}\). Esta esponja contém (42): 3β,20β-dihidroxi-17β-pregn-5-eno\(^{(43)}\) e 3β,20α-dihidroxi-17β-pregn-5-eno\(^{(44)}\) juntamente com outros ceto-esteróis ainda não identificados. Esta é a primeira comunicação da ocorrência de esteróis livres derivados de pregnana no ambiente marinho.

Da esponja *Petrosia ficiformis*\(^\text{19}\) isolou-se o esterol 23,28-cicloestigmast-5-en-3β-ol\(^{(45)}\), componente mais abundante) denomina do petrosterol. Sua estrutura difere daquela do calisterol\(^{(37)}\)
somente pela ausência da ligação dupla em C_{23,24}.

Estoriferasterol(46) é um novo esterol marinho, com uma ligação dupla na cadeia lateral, isolado da esponja Jaspis stolifera. Sua estrutura é baseada no RMN e espectrometria de massa (fragmentações características dos esteroides com insaturação no C_5 e na cadeia lateral)^20.
B. Cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de massa na análise de misturas esterôlicas extraídas de tecidos vivos.

A cromatografia gasosa, por si só, é capaz de detectar, separar e caracterizar parcialmente os compostos, usando-se quantidades extremamente pequenas. Por outro lado, a espectrometria de massa pode proporcionar informações estruturais, também com quantidades mínimas. A associação destas duas técnicas constitui um dos sistemas mais úteis na identificação de compostos, presentes nas misturas bem complexas, tanto naturais quanto sintéticas.

O sistema básico de um CG-EM consiste de várias partes. As fundamentais são: o cromatógrafo de gás (A) e o espectrômetro de massa (C) (Figura 2). Existe uma diferença de pressão bastante alta entre estes dois sistemas. O cromatógrafo de gás (A) opera a uma pressão de aproximadamente 1 atmosfera (760 Torr). Por outro lado, o espectrômetro de massa (C) opera à pressão na faixa de $10^{-6}$ a $10^{-4}$ Torr. Por esta razão, é necessário uma interface (B) entre os dois sistemas. Em geral, a interface reduz a pressão utilizando-se o princípio da diferença na velocidade de efluência das moléculas, com pesos moleculares diferentes$^{21}$:

$$\frac{V_1}{V_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}}$$
E=Registrador potenciométrico para CG.
----- Limite de zonas aquecidas.
        Caminho da amostra.
        Caminho dos dados.
CRT= Tubo de raios catódicos.
ADC= Conversor análogo ao digital.
DAC= Conversor digital ao análogo.

Figura 2. Diagrama esquemático de um sistema CG-EM-Computador.
Assim, se o gás de arraste é o Hélio (P.M. = 2), a velocidade de efusão dele será muito maior que a velocidade de efusão de qualquer outro gás de um composto orgânico. O resultado é que, usando-se um sistema de bombardeamento rápido, pode-se concentrar a amostra em relação ao gás de arraste, e ao mesmo tempo reduzir a pressão total.

A técnica CG-EM tem sido extensivamente utilizada no estudo das composições esteroidais de animais marinhos, bem como nos estudos biossintéticos. Por exemplo, a esponja marinha *Axinella cannabina* continha pelo menos 16 esteróis quando analisados por CG-EM. Primeiramente, a mistura esterólica foi acetilada e a seguir foi cromatografada numa coluna de Al₂O₃-AgNO₃ (2:1). Foram isolados três componentes puros (2, 7, 14) na forma dos seus derivados acetatos. Devido à complexidade da mistura, foram selecionadas cinco frações da coluna cromatográfica de Al₂O₃-AgNO₃, e estas foram examinadas por CG-EM (Figura 3). Outros treze compo

Figura 3. Cromatograma de gás em SE 30(3%) dos acetatos do esterol obtidos após uma separação preliminar por coluna cromatográfica de Al₂O₃-AgNO₃.
Nenhum foram identificados, através das análises dos seus derivados acetatos, baseando-se principalmente nos padrões de fragmentações comuns dos esteróis e comparados com aqueles de amostras autênticas.

Como podemos notar, o método de cromatografia líquida de baixa pressão, além de ser trabalhoso não é muito eficiente, principalmente quando se trata de uma mistura esterólica tão complexa. Por outro lado uma seleção, das colunas utilizadas e das condições ideais de operação do cromatógrafo de gás, proporciona uma separação bastante razoável permitindo a identificação de cada componente através da análise dos espectros de massa correspondentes a cada pico do cromatograma de gás.
II. Objetivos

A extensa pesquisa de Bergmann sobre os esteróis das esponjas foi iniciada antes da introdução de eficientes métodos cromatográficos. Ele sabia que muitos dos dados acumulados, provavelmente, se referiam à mistura de esteróis e não aos compostos puros. Tendo-se em mente esta dificuldade de separação dos esteróis das esponjas, decidimos iniciar o estudo da mistura esterólica da esponja Tedania ignis com três objetivos principais:

a) Usar a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) para comprovar a existência e o número de esteróis na Tedania ignis;

b) Verificar a presença ou não de esteróis totalmente novos, devido às condições do meio ambiente serem totalmente diferentes daquelas esponjas já estudadas (geralmente do Mar Mediterrâneo e Oceano Pacífico);

c) E propor uma estrutura para os esteróis encontrados.
III. Parte Experimental

A. Informações gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros das marcas Fischer, Merck e Carlo Erba.

Os pontos de fusão foram determinados em um instrumento Mettler FP5 acoplado ao microscópio FP52, da Carl Zeiss.

As cromatografias em camada delgada foram feitas utilizando-se sílica gel G ou HF_{254} Merck A.G. suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,25 mm sobre placas de 5 x 20 cm, 10x20 cm ou 20 x 20 cm, utilizando-se um aparelho Quickfit. As placas preparativas foram feitas da mesma maneira utilizando-se sílica PF_{254}, distribuída em camada de 1,00 mm. Essas cromatografias foram reveladas em lâmpada ultravioleta Gelman-Camag (254 mm), ou então vapor de iodo reessublimado.

As cromatografias líquidas em coluna foram feitas utilizando-se sílica gel (0,05-0,20 mm) para cromatografia. O diâmetro e comprimento das colunas de vidro utilizadas variaram de acordo com a quantidade de adsorvente utilizado.

Os espectros de absorção no infravermelho foram feitos em pastilhas de KBr (1:100), em um instrumento Perkin-Elmer modelo 337. Foram utilizadas como referência as absorções em 1601 cm^{-1} e 1028 cm^{-1}, de um filme de poliestireno.

Os espectros de ressonância magnética protônica, foram obtidos com um instrumento Varian mod. T-60, usando-se TMS como referência interna. Utilizou-se CDCl_{3} ou CCl_{4} como solvente.

Os espectros de massa foram obtidos com um sistema Finnigan resumido a seguir.
Resumo da instrumentação CG-EM (Figura 2)

Cromatógrafo de gás (CG). Cromatógrafo Finnigan mod. 9500
2 colunas de vidro Pyrex, em forma de U e 2 m x 2 mm de Ø, em paralelas acopladas a 2 detectores:
   a) Detetor de ionização de chama:
      Temperatura do detetor: 280°C
   b) Detecção por espectrômetro de massa
Fase estacionária: 3% de OV-17
Suporte sólido: Gas Chrom Q 60/80 mesh
Gás de arraste: Helio (He)
Fluxo: 30 ml/min
Temperatura das colunas: programada entre 200-250°C, com velocidade de 2°C/min. Ao término da programação a temperatura foi mantida no limite superior.
Quantidade injetada: 2 µl (5 mg da mistura/1 ml de solvente).
Separador: Separador de vidro, a jato, de um único estágio.

Espectrômetro de massa (EM). Espectrômetro Quadrupolar Finnigan mod. 1015 S/L.
   Energia iônica: 20 e 70 eV
   Corrente iônica total: 300 µA
   Sensibilidade: 10⁻⁷ A/mV
Computador: Finnigan mod. 6100
Teletipo: mod. TTY SET
Ploteador: "Zeta Plotter" - série 100

B. Coleta e identificação das esponjas

A coleta foi feita no mês de setembro de 1975, pelos Prof. Dr. Luís Bravo (Química), Prof. Dr. Pierre Montouchet (Biologia),
L.F. Lembo Duarte (Biologia) e E.H. Morgado (Biologia), na enseada do Flamengo, Praia da Ribeira, ao sul da cidade de Ubatuba no estado de São Paulo a baixa maré. As esponjas vermelhas foram cortadas da rocha com uma espátula, à linha da maré baixa e foram semi-congeladas numa caixa de isopor para serem transportadas até a cidade de Campinas (Unicamp). Na Unicamp, elas ficaram estocadas durante cinco dias no congelador (Freezer).

As esponjas foram trituradas num moedor e colocadas em bandejas próprias do liofilizador "Stokes Freeze Dryer. Equip. Div. Pennsalt Chem. Phila.", do ITAL (Instituto Tecnológico de Alimentos). As esponjas foram liofilizadas durante 36 horas, até atingir uma temperatura final de 15°C.

A classificação destas esponjas foi feita pelo Prof. Dr. M. Sarà da Universidade de Cênaova em Itália. Assim, ele confirmou que esta esponja é a *Tetania ignis* que pertence à classe *Demospongiae*.

### C. Extração

Para o início do trabalho foram repartidas aproximadamente três kg de esponjas liofilizadas em dois recipientes, devidamente cobertos com papel escuro, da seguinte maneira:

- **Recipientes 1**: 1500 g de esponjas liofilizadas
- **Recipientes 2**: 1435 g de esponjas liofilizadas

Foi feito três extratos: um com éter de petróleo, outro com acetona e outro com clorofórmio-metanol (2:1)

#### 1. Extração com éter de petróleo

As esponjas (2935 g) liofilizadas foram extraídas com éter
de petróleo, à temperatura ambiente, em 5 etapas conforme indica a Tabela 2.

**Tabela 2. Extração com éter de petróleo (30°-40°) da esponja *Tedania ignis.***

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Quantidade de éter de petróleo-P.A./litros</th>
<th>Tempo de extração (dias)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1a. etapa</td>
<td>28</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>2a. etapa</td>
<td>21*</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>3a. etapa</td>
<td>21*</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>4a. etapa</td>
<td>20*</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>5a. etapa</td>
<td>20*</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior

Após cada extração o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo.

Obteve-se 91,5 g de um material pastoso, vermelho-escuro, denominado **extrato éter de petróleo** (TEP). O espectro no infra-vermelho deste extrato (Figura 4) apresenta picos nas regiões características para hidroxila e estiramento C-H para hidrocarbonetos.

2. **Extração com acetona**

Após a eliminação do éter de petróleo das esponjas do recipiente 1 (1500 g de esponja), prosseguiu-se à extração com acetona. A extração foi realizada em 5 etapas, à temperatura ambiente, conforme a Tabela 3.
Figura 4. Espectro no I.V. do extrato óter de petróleo (TEP).

Após a concentração a baixo vácuo, no evaporador rotativo, resultou uma massa oleosa marron-escuro, que foi submetida a uma extração de partição com éter etílico e água destilada (3 vezes), conforme o Esquema 1.

Obteve-se 18,1 g de extrato etéreo/acetônico, marron-escuro, denominado TA. O espectro de absorção no infravermelho é apresentado na Figura 5. O espectro apresenta picos nas regiões características para carbonila, hidroxila e estiramento C-H de hidrocarbonetos.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Quantidade de acetona - P.A. /litros</th>
<th>Tempo de extração (dias)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1a. etapa</td>
<td>8</td>
<td>10</td>
</tr>
<tr>
<td>2a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>10</td>
</tr>
<tr>
<td>3a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>4a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>19</td>
</tr>
<tr>
<td>5a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>7</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior

**Esquema 1**

**Extrato acetônico**

partição com éter etílico + água destilada

Fase etérea

1. secagem com Na$_2$SO$_4$ anidro
2. evaporação

**Extrato etéreo/acetônico (TA).**

18,1 g

Fase aquosa (abandonada)
Figura 5. Espectro no I.V. do extrato acetônico (TA).

3. Extração com clorofórmio-metanol (2:1)

Após a eliminação do óleo de petróleo, a extração foi prosseguida com clorofórmio-metanol (2:1), para o recipiente 2 (1435 g de esponja). A extração foi feita em 4 etapas conforme a Tabela 4.

Após a evaporação do solvente, no evaporador rotativo, resultou uma pasta escura, que recebeu o tratamento resumido no Es-

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Quantidade de cloroformio-metanol (2:1) - P.A.</th>
<th>Tempo de extração (dias)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1a. etapa</td>
<td>8</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>2a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>3a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>15</td>
</tr>
<tr>
<td>4a. etapa</td>
<td>8*</td>
<td>150</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* incluindo solvente recuperado da etapa anterior.

#### quema 2.

Obteve-se 42,4 g do extrato cloroformio-metanol (2:1)/fase etérea, e o seu espectro de absorção no infracarmelhio é apresentado na Figura 6. O espectro apresenta picos característicos na região de hidroxila, carbonila e estiramento C-H de hidrocarbonetos.

No Esquema 3 apresentamos um resumo dos tratamentos a que as esponjas foram submetidas.

#### D. Isolamento do constituinte esteroidal do extrato TEP

O estudo preliminar do extrato éter de petróleo (TEP) foi feito através de cromatografia gasosa do extrato bruto. Esse teste preliminar nos indicou que o extrato continha os esteróis.

O extrato foi submetido a uma saponificação para obter os esteróis da parte não saponificada.

A saponificação foi feita com 39,0 g do extrato TEP, adicionando-se 700 ml de solução metanólica de KOH (10%). Deixou-se a
Esquema 2

Tedania ignis
Extrato CHCl₃-MeOH (2:1)

partição com éter etílico
+ água destilada

Fase etérea
1. secagem com \( \text{Na}_₂\text{SO}_₄ \)
anidro
2. filtração
3. evaporação

Extrato CHCl₃-MeOH
(2:1)- Fase etérea
42,4 g

Fase aquosa
extração com
AcOEt

Fase aquosa
lavagem com
n-butanol

Extrato CHCl₃-MeOH
Fase AcOEt

Extrato CHCl₃-MeOH
Fase n-butanol

Fase aquosa
(abandonada)
Esquema 3

Tedania ignis
Esponjas congeladas
líoﬁlização

Esponjas lioﬁlizadas
extração com eter de petróleo

Extrato TEP
91,5 g

Esponjas

extração com acetona

solução acetônica

1. evaporação
2. partição eter etílico + água destilada

Extrato TA
18,1 g

solução CHCl₃-MeOH

1. evaporação
2. partição eter etílico + água destilada

Extrato CHCl₃-MeOH
(2:1) - Fase etérea

Fase aquosa

Extrato CHCl₃-MeOH
(2:1) - Fase AcOEt

Fase aquosa

n-butanol

Extrato n-butanol
solução em refluxo durante 6 horas. Após este período de refluxo, evaporou-se o solvente, em evaporador rotativo, e adicionou-se água destilada para fazer partição com éter de petróleo e benzeno, várias vezes. Estas soluções foram combinadas e lavadas com água até que a solução aquosa se tornasse neutra (Esquema 4).

O extrato da parte não saponificada TEP(I), foi fracionado através de cromatografia em coluna de sília gel, com as seguintes condições:

quantidade de sília gel: 450 g

altura da sília gel na coluna: 60 cm
Esquema 4

Tedania ignis
Extrato TEP
saponificação

partição éter de petróleo (brenteno) + água destilada

solução aquosa

não saponificada

(saponificada)

1. secagem com Na₂SO₄
2. evaporação

extrato éter de petróleo (I)

diâmetro interno da coluna: 4,5 cm
quantidade do extrato: 10 g.

Iniciando-se a eluição com hexano, aumentou-se a polaridade misturando-se CH₂Cl₂ ao hexano nas seguintes proporções: 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100% de CH₂Cl₂. Em seguida o CH₂Cl₂ foi misturado com MeOH nas proporções de 10%, 30% e 50% de MeOH.

Coletou-se 307 frações de 250 ml cada uma. As frações foram agrupadas conforme se apresentaram na cromatografia em camada delgada de sílica gel (Tabela 5).

Foram separadas duas frações para um estudo mais detalhado. Estas foram EPI-A (frações 182-202; 1,270 g) e EPI-B (frações 203-238; 3,060 g). Cada uma foi cristalizada e recristalizada em benzeno/metanol. Obteve-se cristais transparentes e bem brilhantes. A fração EPI-A nos forneceu 0,950 g de composto cristalino, de ponto de fusão 131,0-136,0°C, e a fração EPI-B nos forneceu
Tabela 5. Frações agrupadas da cromatografia líquida em coluna do extrato TEP(I), da esponja *Tedania ignis*.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Frações agrupadas</th>
<th>Peso (gramas)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1-6</td>
<td>0,215</td>
</tr>
<tr>
<td>7-8</td>
<td>0,383</td>
</tr>
<tr>
<td>9-13</td>
<td>0,101</td>
</tr>
<tr>
<td>19-45</td>
<td>0,029</td>
</tr>
<tr>
<td>49-114</td>
<td>0,065</td>
</tr>
<tr>
<td>115-157</td>
<td>0,050</td>
</tr>
<tr>
<td>158-181</td>
<td>0,431</td>
</tr>
<tr>
<td>182-202</td>
<td>1,270</td>
</tr>
<tr>
<td>203-238</td>
<td>3,060</td>
</tr>
<tr>
<td>239-257</td>
<td>0,256</td>
</tr>
<tr>
<td>258-301</td>
<td>0,589</td>
</tr>
<tr>
<td>302-306</td>
<td>0,196</td>
</tr>
<tr>
<td>307</td>
<td>1,390</td>
</tr>
</tbody>
</table>

2,245 g de composto cristalino, de ponto de fusão 133,5-138,0°C.

E. Isolamento do constituinte esteroidal do Extrato acetônico

Iniciou-se o estudo do extrato acetônico por meio de cromatografia em camada delgada de sílica gel, usando-se diferentes sistemas de solventes. Baseando-se nos resultados das placas, decidiu-se fazer um fracionamento preliminar, por cromatografia em coluna de sílica gel.

O extrato acetônico (TA, 18,1 g), marron-escuro, foi dividido em duas porções: uma de 11,0 g e outra de 7,1 g. Cada porção foi fracionada em coluna de sílica gel, com as seguintes condições:
diâmetro da coluna: 4,5 cm
altura da coluna de sílica gel: 70 cm
quantidade de sílica gel na coluna: 450 g.

Iniciou-se a eluição com cloreto de metileno. A partir da fração 45 aumentou-se a polaridade misturando-se metanol ao cloreto de metileno nas seguintes proporções: 1%, 5%, 10% e 50%.

Foram coletadas frações de 250 ml cada uma e agrupadas conforme se apresentaram na cromatografia em camada delgada de sílica gel. As frações semelhantes, conforme as placas analíticas de ambas as colunas, foram combinadas (Tabela 6).

E.1. Estudo da fração TA-D

Iniciou-se o estudo da fração TA-D (0,651 g) (Tabela 6) por meio de cromatografia em camada de sílica gel, utilizando-se diferentes sistemas de solventes.

A partir dos dados das placas analíticas, decidiu-se fazer cromatografia em placa preparativa, utilizando-se benzeno/éter etílico (15%) como eluente e aplicando-se aproximadamente 100 mg do composto em cada placa. Destas placas foram obtidas duas faixas principais (f-1 e f-3), sendo f-1 a faixa mais polar.

Da faixa f-1 obteve-se um composto branco, que foi recristalizado em hexano/metanol, dando-se cristais brilhantes em forma de agulha (40,6 mg), denominado D/B, ponto de fusão 132,0-139,0°C.

Com a faixa f-3 (0,137 g) foram feitas placas analíticas em vários solventes e a partir dos resultados das placas decidiu-se fazer cromatografia em coluna de sílica gel. Utilizou-se benzeno como eluente e aumentou-se a polaridade gradativamente com acetato de etila. As frações semelhantes foram agrupadas e o solvente evaporado.
Tabela 6. Fracionamento do extrato acetônico (TA) da esponja *Todania ignis*.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Eluentes</th>
<th>Frações coletadas</th>
<th>Frações combinadas</th>
<th>Denominação</th>
<th>Pesos (g)</th>
<th>Coloração</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>cloreto de metílano</td>
<td>0 a 45</td>
<td>0-2</td>
<td></td>
<td>0,359</td>
<td>laranja</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>3-4</td>
<td></td>
<td>0,356</td>
<td>vermelha</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>5-15</td>
<td></td>
<td>0,251</td>
<td>vermelho-escuro</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>16-29</td>
<td>TA-D</td>
<td>0,651</td>
<td>creme</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>30-45</td>
<td></td>
<td>0,100</td>
<td>verde</td>
</tr>
<tr>
<td>cloreto de metílano-metanol(5%)</td>
<td>45 a 56</td>
<td>46-53</td>
<td></td>
<td>0,384</td>
<td>marron</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>54-56</td>
<td>TA-G</td>
<td>5,177</td>
<td>preto</td>
</tr>
<tr>
<td>cloreto de metílano-metanol(10%)</td>
<td>57 a 66</td>
<td>57-63</td>
<td></td>
<td>0,733</td>
<td>preto</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>64-68</td>
<td></td>
<td>7,050</td>
<td>preto</td>
</tr>
<tr>
<td>cloreto de metílano-metanol(50%)</td>
<td>67 - 68</td>
<td>-</td>
<td></td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Total = 15,064g

(—) quantidade retida na coluna.

O composto creme obtido foi recristalizado em hexano/metanol, dando-se cristais transparentes, finos e bem brilhantes. Este composto (60 mg) foi denominado P-3, ponto de fusão 132,0-135,0°C.

**F. Caracterização dos esteróis**

Foram empregados testes de coloração, cromatografia gasosa, estudos espectroscópicos, preparação do derivado e finalmente cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para a caracterização dos esteróis D/B, F-3, EPI-A e EPI-B.
a) **Teste de coloração.** Para este fim, utilizou-se a reação de Liebermann-Burchard\(^{22}\).

Dissolveu-se cerca de 1 mg de esterol em 0,5 ml de clorofórimo. A esta solução adicionou-se, sucessivamente, 3 gotas de anidrido acético e 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. A solução imediatamente adquiriu uma coloração vermelha que passou para azul e em seguida verde. Esta é considerada uma reação positiva dos esteróis.

Os quatro compostos testados deram resultados positivos de esterol.

b) **Cromatografia gasosa**

Um estudo destes compostos, no cromatógrafo de gás, forneceu cromatogramas onde os quatro compostos apresentavam o mesmo número de picos e tempos de retenção idênticos (Figura 7). Então, decidiu-se reunir estes esteróis e denominou-se mistura esterolíca da *Tedania ignis*.

c) **Dados espectroscópicos**

O espectro de absorção no infravermelho da mistura esterolíca (Figura 8) apresentou as seguintes absorções; \(\nu_{\text{KBr}}^{\text{max}}(\text{cm}^{-1})\): 3420, 2950, 2860, 1470, 1380, 1340, 1050, 960, 840 e 800. O espectro de ressonância magnética protônica da mistura esterolíca (Figura 9); \(\delta (60 \text{ MHz; CDCl}_3)\): 0,70(s), 0,90(s), 1,04(s), 3,50(m), 5,40(m).

d) **Obtenção do derivado**

Acetilação da mistura esterolíca: Dissolveu-se 40 mg da mistura esterolíca em 4 ml de piridina adicionando-se a seguir 4 ml de anidrido acético. A reação foi deixada à temperatura ambiente
Figura 7. Cromatograma da mistura esterólica da Tedania ignis.

a) D/B (4°/min.)  
b) F-3 (4°/min.)  
c) TEP (2°/min.)
por 20 horas.

A mistura adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico 2N, formando-se um precipitado branco. Durante a adição do ácido, a solução foi mantida em banho de gelo. A solução foi extraída três vezes com clorofórmio e as frações combinadas foram lavadas com uma solução de ácido clorídrico 1N para eliminar a piridina. Fez-se a secagem da solução com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, num evaporador rotativo, fornecendo um resíduo que foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (0,05-0,20 mm), coletando-se frações de 10 mL cada.

As frações foram agrupadas conforme a placa analítica. Obteve-se 39,4 mg do acetato da mistura esterólica. Ponto de fusão 123-133°C; espectro de absorção no infravermelho (Figura 10; \( \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \) (cm\(^{-1}\)): 2950, 2850, 1715, 1470, 1370, 1250 e 1040; espectro de ressonância magnética protônica (Figura 11); \( \delta \) (60 MHz; CCl\(_4\): 0,70 (s), 1,00 (s), 1,95 (s), 4,50 (m), 5,40 (m).

G. Estudos com CG acoplado ao EM

A mistura esterólica foi separada com sucesso aplicando-se o cromatógrafo de gás. Após uma separação preliminar usando-se o detetor de ionização de chama, as mesmas condições foram aplicadas para uma análise através do acoplamento entre cromatógrafo de gás e espectrômetro de massa.

A cromatografia auxiliar deve ter as mesmas condições daquela acoplada ao espectrômetro de massa, porque após ter sido determinada as condições ideais de operação, as mínimas variações afetam a separação dos picos de uma mistura bem complexa. Os injetores usados devem ser interiormente cobertos de vidro para evitar
Figura 11. Espectro de RMN do acetato da mistura esterólica da esponja *T. ignis*.
a decomposição da mistura, o que ocorreria se existisse uma superfície metálica quente. O tipo de detetor usado na cromatografia gasosa auxiliar deve ser de ionização de chama (FID), para que se obtenha uma sensibilidade semelhante àquela do espectrômetro de massa.

Foram utilizadas colunas de vidro de 2 mm de \( \varnothing \), e 2 metros de comprimento. Utilizou-se 3% de OV-17, como fase estacionária, sobre Gas Chrom Q 60/80 mesh, como suporte sólido. Tomou-se cuidado de não injetar grande quantidade de solvente (5 a 10 microlitros), pois isto aumenta a pressão gasosa no espectrômetro de massa. As colunas capilares oferecem melhor resolução para este tipo de análise porém, não foram utilizadas por serem caras, aceitarem pequenas quantidades de amostra e requererem tempos de separação muito longos.

Utilizou-se n-hexano como solvente, por não oferecer problemas laterais, como por exemplo não tem a secção transversal de ionização tão grande, que possa causar problemas no sistema de segurança eletrônico do instrumento, como acontece com clorofórmio ou cloreto de metileno. A única desvantagem é que as misturas se solubilizaram com dificuldade. A quantidade máxima injetada foi de 3 \( \mu l \).

Nas análises de CG-EM utilizam-se, geralmente, a temperatura programada. As velocidades de programação de 2\( ^\circ \)/min ou 4\( ^\circ \)/min são as mais comuns. Às vezes, o programa é extendido até o limite superior recomendado para a fase líquida. No nosso caso (OV-17), esta temperatura é de 350\( ^\circ \)C. Nas temperaturas próximas a esta ocorre sangramento da coluna. Em nosso caso isto não foi problema, pois a temperatura máxima utilizada foi de 250\( ^\circ \)C.

Para fazer as análises de CG-EM utilizou-se o sistema CG-EM-
Computador, Finnigan, esquematizado na Figura 2. Uma das aplicações mais importantes do sistema CG-EM-Computador é o uso do computador na aquisição e processamento de uma série de espectros durante uma corrida CG-EM. Foi utilizado o sistema Finnigan modelo 6100 para adquirir os dados. Este sistema adquire e processa dados de duas maneiras: a) Varrida e b) Fragmentografia. A imagem dos dados é mantida no tubo de raios catódicos (CRT) durante a aquisição. Eles são armazenados no disco e podem ser chamados posteriormente.

A operação do CG-EM foi realizada no sistema Finnigan descrito anteriormente. O armazenamento de dados pelo computador é suficiente para conter todas as varridas tomadas durante o processo cromatográfico. O computador pode reconstruir o cromatograma iônico total, após a corrida cromatográfica. O cromatograma iônico total proporciona um registro importante do processo cromatográfico, para compará-lo ao cromatograma obtido previamente (ou simultaneamente) com o detetor de ionização de chama (FID). A sensibilidade específica destas duas maneiras de registro não é a mesma para todos os compostos, mas é muito semelhante a uma comparação direta (10-15% de diferença). Os dois cromatogramas deveriam ser efetivamente os mesmos. Uma comparação entre um cromatograma de ionização de chama e um cromatograma iônico total reconstruído pelo computador da mistura esterólica e do acetato estão apresentadas nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Analisou-se o cromatograma reconstruído e selecionou-se os números das varreduras que correspondem especificamente a cada pico. Geralmente, seleciona-se duas ou três varreduras por pico. Estes números das varreduras são fornecidos ao computador para pedir os espectros de massa correspondentes. Uma vez escolhido o espectro,
a) Cromatograma de gas obtido com um detetor de ionização de chama. As coordenadas são intensidade x tempo (min.).

b) Cromatograma reconstruído pelo computador. As coordenadas são corrente iônica total e número do espectro de massa.

solicita-se o gráfico ao computador. Há a possibilidade de se multiplicar parte do espectro para aumentar a intensidade das regiões de interesse; especialmente aquelas de alta massa. Quando necessário, subtraia-se o "background" que às vezes é a subtração dos espectros adjacentes.

IV. Resultados e Discussão

A esponja vermelha foi coletada em Ubatuba (SP), na Praia da Ribeira. Em seguida, ela foi classificada como *Tedania ignis* (Duchaissaing & Michelotti) Verrill, pelo Prof. Dr. M. Sarà da Universidade de Gênova (Itália). A *Tedania ignis* foi liofilizada e o produto liofilizado foi extraído com etér de petróleo, com acetona e com clorofórmio-metanol (2:1). Os extratos etér de petróleo (TEP) e acetônico (TA) foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em placa preparativa. O extrato clorofórmio-metanol (2:1) não foi estudado.

A purificação dos extratos TEP e TA resultou no isolamento de uma mistura cristalina. Esta mistura compreende os esteróis livres presentes na esponja *Tedania ignis* e apresenta ponto de fusão 132-138°C. A análise do espectro de absorção no infravermelho (Figura 8) sugeriu a presença de um grupo hidroxílico (v OH 3420 cm\(^{-1}\), v C-O 1050 cm\(^{-1}\))\(^{23}\), como mostra a Tabela 7. O espectro de ressonância magnética protônica (Figura 9) apresentou grupos metílicos (δ 0,70 a δ 1,04). A banda larga em δ 3,50, correspondente a um próton, foi atribuída a um hidrogênio do carbono carbinólico. A presença de um próton olefínico pode ser confirmada pela banda múltipla em δ 5,40\(^{24}\).

Alguns derivados da mistura esterólica foram preparados. O espectro no infravermelho do acetato da mistura (Figura 10) apresenta forte absorção em 1715 cm\(^{-1}\) característica de carbonila, indicando que a reação de acetilação foi bem sucedida (Tabela 7). Examinando-se o espectro de ressonância magnética protônica do acetato (Figura 11), pode-se verificar a presença de um pico simples referente à metila do grupo acetoxila (δ 1,95). Pode-se no-
### Tabela 7. Análise dos espectros de infravermelho da mistura esterólica TA e o acetato da mistura TA.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>( v_{\text{max}}^{\text{KBr}} ) (cm(^{-1}))</th>
<th>Grupo funcional correspondente</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>Esterol</strong>&lt;br&gt;TA</td>
<td>3420 (m)</td>
<td>estiramento O-H</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>2950 (F)</td>
<td>estiramento C-H</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>7860 (F)</td>
<td>estiramento simétrico CH(_2)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1470 (m)</td>
<td>dobramento assimétrico CH(_3)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1390 (m)</td>
<td>dobramento simétrico CH(_3)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1050 (m)</td>
<td>estiramento C-O</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>840,800 (f)</td>
<td>dobramento C-H fora do plano</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Acetato</strong>&lt;br&gt;de&lt;br&gt;TA</td>
<td>2950 (F)</td>
<td>estiramento C-H</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>2850 (F)</td>
<td>estiramento simétrico CH(_2)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1715 (F)</td>
<td>estiramento C=O</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1470 (m)</td>
<td>estiramento C=O</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1450 (m)</td>
<td>dobramento assimétrico CH(_3)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1370 (F)</td>
<td>dobramento assimétrico CH(_3)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>1250 (F)</td>
<td>estiramento assimétrico C-O</td>
</tr>
</tbody>
</table>

\( F = \) forte \quad \( m = \) médio \quad \( f = \) fraco

O espectro infravermelho do próton do carbônio carbinólico muda de \( \delta 3,50 \) no álcool para \( \delta 4,50 \) no acetato. Isto indica que este próton está mais desprotegido no último composto. A banda múltipla em \( \delta 5,40 \), correspondente a um próton, foi atribuída ao hidrogênio olefínico. Pela sua posição, podemos dizer que não há nenhum efeito da hidroxila interagindo no seu deslocamento químico, pois se houvesse esta interação, a acetilação da hidroxila deslocaria o próton vinílico para um campo ligeiramente mais alto\(^25\). Com isto, podemos dizer que a hidroxila está na posição be
ta e consequentemente o próton do carbono carbinólico na posição alfa.

A cromatografia em camada delgada de sílica gel da mistura esterólica, em vários solventes, apresentou uma única mancha bem definida. Mas, examinando-se o seu cromatograma de gás (Figura 7) podemos notar que ela é uma mistura de pelo menos oito esteróis, sendo três em maior abundância. Por meio do cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de massa foi possível analisar estes esteróis.

Em geral a maioria das misturas requer uma experimentação preliminar em cromatógrafo de gás. Isto tem como objetivo a seleção das condições cromatográficas ideais antes de efetuar as análises CG-EM. Isto é necessário para evitar a utilização desnecessária do espectrômetro de massa.

Os cromatogramas dos esteróis e dos acetatos obtidos através da coluna de OV-17 são reproduzidos nas Figuras 12 e 15 respectivamente. Em cada cromatograma foram observados oito picos. Mediante a varredura múltipla no espectrômetro de massa, estabeleceu-se a presença de oito esteróis. Isto é confirmado no espectro de massa dos derivados acetatos que apresentam o mesmo perfil cromatográfico.

Na interpretação dos espectros de massa dos esteróis, pode-
se considerar alguns aspectos gerais já conhecidos sobre a espectrometria de massa destes compostos. Estes são:

a) **Peso molecular**: O peso molecular dos esteróis pode ser determinado, precisamente, através do pico de íon molecular, \( M^+ \), que é o pico correspondente à molécula com remoção de um elétron. Este pico pode facilmente ser reconhecido no espectro porque, com exceção dos picos isotôpicos, é o pico de maior massa. Em geral, os íons moleculares de esteróis são detetáveis, apesar de algumas vezes terem baixa abundância.

Os espectros dos acetatos contêm um "pico molecular aparente", localizado a 60 unidades de massa abaixo do "verdadeiro" pico molecular, correspondente à eliminação dos elementos de ácido acético (CH₃COOH). Por exemplo:

![Diagrama de espectro de massa]

Houve especulação de que a ausência do pico correspondente ao íon molecular se devesse, talvez às altas temperaturas empregadas nestes estudos²⁶. Mas, a eliminação do ácido acético envolvendo o hidrogênio alilicamente ativado do C-4 por impacto eletrônico foi confirmada pelo estudo do composto deuterado, utilizando-se a sonda de inserção direta²⁶.

b) **Perda de água.** Os espectros de massa dos esteróides, con
tendo o grupo hidroxila, são caracterizados pela presença de um grande pico a 18 unidades de massa abaixo do pico molecular. Um pico a M-18 é dado também pelos ceto-esteróides, mas em geral este é menor que 10% do pico molecular. Quando o grupo hidroxila está no C-3, o espectro mostra um pico abundante que corresponde à perda dos elementos de água da estrutura inicial. A formação de muitos dos principais ions envolve a perda de água em combinação com os outros mecanismos de fragmentação.

c) Perda de metila. Este tipo de fragmentação, por si só ou em combinação com alguma outra quebra na molécula, é característica de todos os esteróides. Estes radicais expelidos são os grupos metilas angulares; C-18 e C-19.

d) Perda da cadeia lateral. Esta é uma fragmentação muito comum aos esteróis, embora a sua intensidade relativa varie entre os compostos. A presença da ligação dupla no C-5 auxilia este tipo de fragmentação, aumentando-se assim a sua intensidade relativa.

Outra fragmentação muito característica é a perda da cadeia lateral juntamente com outros três átomos de carbono do anel D e um hidrogênio extra, provavelmente do C-14.

e) Presença da insaturação no C₅. A presença da insaturação na posição C-5 do esqueleto esteroidal controla as fragmentações muito complexas, que envolvem a perda do anel A e parte do anel B, através da clivagem das ligações 1-10, 5-10 e 5-6 ou 7-8 levando à formação dos ions (M-85)⁺ e (M-111)⁺. Sua formação está representada a seguir.
Um outro íon, talvez o mais característico dos esteróis com insaturação na posição C-5, é aquele (M-139)$^+$, cuja formação envolve a perda do anel A e B, pela clivagem das ligações 7-8 e 9-10 e a transferência de mais um hidrogênio. Sua formação está representada a seguir:

A presença de um pico de grande intensidade a m/e 271 no espectro dos esteróis indica que o composto provavelmente tem um núcleo $\Delta^5$-3-ol juntamente com uma ligação dupla na cadeia lateral$^{29}$. Na Figura 14, encontra-se o espectro de massa do pico A da mistura esterólica da *Tedania ignis*. Com respeito a este pico A, só podemos dizer que ele corresponde a um esterol de íon molecular m/e 370 (M$^+$); o que é confirmado pela perda dos elementos do ácido acético (m/e 352) do seu derivado acetato (Figura 15). O espectro de massa do derivado acetato apresenta um pico correspondente à perda do grupo metila juntamente com elementos de ácido $\Delta^5$-3-ol.
Figura 14. Espectro de massa do pico A da mistura esterólica. a) 20 eV; b) 70 eV.
cético (m/e 337), e também um pico correspondente à perda da cadeia lateral (m/e 255) a partir do "pico molecular aparente".

Devido à má resolução do pico A no cromatograma (Figura 13), não foi possível caracterizá-lo.

Os espectros de massa do pico C, da mistura esterólica e do seu acetato, encontram-se nas Figuras 16 e 17 respectivamente. Eles apresentam os picos correspondentes às fragmentações básicas dos esteróis como por exemplo: perda do grupo metila, perda de água e perda da cadeia lateral. O espectro na Figura 16 apresenta o pico de m/e 384 como ion molecular e além deste pico observa-se a presença do pico de m/e 271, relativamente grande, que pode sugerir um esqueleto A^5-3-ol juntamente com uma ligação dupla na ca

![Espectro de massa do acetato do pico A (70 eV).](image-url)
   a) 20 eV  b) 70 eV.
deia lateral\textsuperscript{29}. A presença da ligação dupla na cadeia lateral dá origem a novos picos não encontrados nos espectros dos compostos análogos saturados\textsuperscript{29}. Para os esteróis Δ\textsuperscript{24}, observa-se a perda da cadeia lateral envolvendo a quebra da ligação 17-20 e a transferência de dois átomos de hidrogênio, um dos quais é específico do C-17. Forma-se assim o íon alilicamente estabilizado. Um dos prováveis mecanismos proposto por Knights\textsuperscript{30} encontra-se no Esquema 5.

Figura 17 Espectro de massa do acetato do pico C (70 eV).
Baseando-se nestas considerações gerais sobre as fragmentações do esterol, com insaturações nas posições C-5 e C-24, propusemos uma provável estrutura para o esterol correspondente ao pico C, como sendo desmosterol (47) \(^{30}\), (ión molecular m/e 384):
O espectro de massa do pico D da mistura esterólica encontra-se na Figura 18. Este espectro apresenta o pico de m/e 386 correspondente ao íon molecular. Ao lado das fragmentações comuns dos esteróis resultantes da perda do radical metila e/ou perdida de água do seu íon molecular, este espectro apresenta outros picos bastante intensos na região de alta massa. Estes são: o pico de m/e 301 (M-85)$^+$, o pico de m/e 275 (M-111)$^+$ e o pico de m/e 247 (M-139)$^+$, característicos dos esteróis com insaturação na posição C-5. O espectro de massa do acetato do pico D (Figura 19) apresenta um íon molecular aparente de m/e 368 e os picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis. Baseando-se nesses dados de fragmentações, sugerimos uma provável estrutura para o pico D, como sendo colesterol (2). A comparação destes espectros com o de uma amostra autêntica confirmou a nossa proposição de que o pico D corresponde ao colesterol, componente principal da mistura esterólica da Tedania ignis.

O espectro de massa do pico E da mistura esterólica (Figura 20) apresenta um pico de m/e 398 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 21) apresenta o pico
Figura 18 Espectro de massa da mistura esterólica do pico D.
   a) 20 eV;  b) 70 eV.
Figura 19. Espectro de massa do acetato do pico D (70 eV).

Pico D, colesterol (2)

de íon molecular aparente \((m/e \ 380)\) correspondente à perda dos elementos do ácido acético. Estes espectros mostram picos resultantes das fragmentações comuns dos esteróis. Como por exemplo: perda do radical metila, perda de água e perda da cadeia lateral.
**Figura 20** Espectro de massa do pico E da mistura esterólica
da *T. ignis*. a) 20 eV     b) 70 eV

Além destes picos, o espectro da Figura 20 mostra um pico correspondente ao íon \((M-C_6H_{12})^+\) \((m/e \ 300)\). Este tipo de íon é característico do esterol com insaturação na posição C-22. Esta fragmentação envolve uma clivagem vinílica, formalmente muito desfavorável, juntamente com a transferência de um hidrogênio\(^{29}\). Foram propostos prováveis mecanismos de fragmentação com a formação de íons favoravelmente estabilizados, dependendo da origem do hidrogênio transferido, como podem ser vistos a seguir\(^{29}\).
Outro íon também característico dos esteróis com insaturação na posição C-22 é o íon \((M-43)^+\) \((m/e \ 355)\), que corresponde à perda do grupo isopropila terminal (Figura 20). A formação deste íon envolve, simplesmente, uma clivagem alílica\(^{30}\).

A partir destas considerações gerais, sugerimos uma estrutura para o esterol do pico Ε, como sendo brassicasterol (20).

Na Figura 22, encontra-se o espectro de massa do pico Ε da
Figura 22. Espectro de massa do pico $E$, da mistura esterólica da esponja *T. ignis*. a) 20 eV; b) 70 eV.
mistura esterólica da *T. ignis*. Este espectro mostra o pico de m/e 400 correspondente ao íon molecular, o que é confirmado pelo íon molecular aparente (m/e 382) no espectro do seu acetato (*Figura 23*). Estes espectros mostram as fragmentações comuns dos estéroides, e as fragmentações características do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C=5 (m/e 315, m/e 289 e m/e 261). Com estes dados, propusemos a estrutura para o pico F, como sendo 22, 23-diidrobrassicasterol (13).

*Figura 23*, Espectro de massa do acetato do pico F (70 eV).
Na Figura 24, encontra-se o espectro de massa do pico G da mistura esterólica da esponja T. ignis. Este espectro apresenta o pico de m/e 412 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 25) mostra o pico de m/e 394 correspondente ao íon molecular aparentemente resultante da perda dos elementos de ácido acético. Ao lado dos picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis e às fragmentações características do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C-5, há também um pico correspondente à fragmentação característica do esqueleto esteroidal com insaturação na posição C-22 da cadeira lateral. Baseando-se nestas considerações, propusemos a estrutura para o esterol do pico G, como sendo estigmasterol ou poriferasterol (dependendo da configuração do grupo hidroxila no C-3).

![Diagrama do estigmasterol ou poriferasterol](attachment:esterol_diagram.png)

O espectro de massa do pico H, da mistura esterólica da esponja T. ignis encontra-se na Figura 26. Ele apresenta o pico...
Figura 24. Espectro de massa do pico G, da mistura esterólica da *T. ignis*. a) 20 eV; b) 70 eV.
Figura 25 Espectro de massa do acetato do pico G (70 eV).

m/e 414 correspondente ao íon molecular. O espectro de massa do seu acetato (Figura 27) confirma isto, mostrando o pico de m/e 396 resultante da perda dos elementos de ácido acético. Estes espectros apresentam picos correspondentes às fragmentações comuns dos esteróis, como por exemplo: perda do radical metila, perda de água e perda da cadeia lateral. Além destes picos, há também fragmentações características do esterol com insaturação na posição C-5 (m/e 329, m/e 303, m/e 275).

A partir destas considerações propusemos a estrutura para o esterol do pico H como sendo β-sitosterol.

Nas Tabelas 8 e 9 estão resumidos os principais íons do espectro de massa da mistura esterólica e do seu acetato, obtidos
da esponja *Tedania ignis*.

**Figura 27.** Espectro de massa do acetato do pico H (70 eV).

pico H, β-sitosterol
<table>
<thead>
<tr>
<th>Fig. N°</th>
<th>Pico</th>
<th>M⁺</th>
<th>(M-CH₃)</th>
<th>(M-H₂O)</th>
<th>M-(CH₃, H₂O)</th>
<th>M-(cadeia lateral, lat.,H₂O)</th>
<th>M-anel D, H</th>
<th>M-anel D, H, H₂O</th>
<th>Ion a</th>
<th>Ion b</th>
<th>Ion c</th>
<th>M-43</th>
<th>Δ²² ou Δ²⁴</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>14</td>
<td>A 370</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>B</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>16</td>
<td>C 384</td>
<td>369</td>
<td>366</td>
<td>351</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>299</td>
<td>273</td>
<td>245</td>
<td>-</td>
<td>271</td>
</tr>
<tr>
<td>18</td>
<td>D 386</td>
<td>371</td>
<td>368</td>
<td>353</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>301</td>
<td>273</td>
<td>247</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>20</td>
<td>E 398</td>
<td>383</td>
<td>380</td>
<td>365</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>313</td>
<td>287</td>
<td>259</td>
<td>355</td>
<td>300</td>
</tr>
<tr>
<td>22</td>
<td>F 400</td>
<td>385</td>
<td>382</td>
<td>367</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>315</td>
<td>289</td>
<td>261</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>24</td>
<td>G 412</td>
<td>397</td>
<td>394</td>
<td>379</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>327</td>
<td>301</td>
<td>273</td>
<td>369</td>
<td>300</td>
</tr>
<tr>
<td>26</td>
<td>H 414</td>
<td>399</td>
<td>396</td>
<td>381</td>
<td>273</td>
<td>255</td>
<td>231</td>
<td>213</td>
<td>329</td>
<td>303</td>
<td>275</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Fig.</td>
<td>Pico</td>
<td>M⁺</td>
<td>M⁺</td>
<td>M⁺</td>
<td>M⁺</td>
<td>Ion a</td>
<td>Ion c</td>
<td>M⁺</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------</td>
<td>-----</td>
<td>-----</td>
<td>-----</td>
<td>-----</td>
<td>-------</td>
<td>-------</td>
<td>-----</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Nº</td>
<td></td>
<td>-AcOH</td>
<td>-CH₃</td>
<td>-AcOH</td>
<td>-AcOH</td>
<td>-anel D,H</td>
<td>-AcOH</td>
<td>-AcOH</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>15</td>
<td>A</td>
<td>352</td>
<td>337</td>
<td>255</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>B</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>17</td>
<td>C</td>
<td>366</td>
<td>351</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td></td>
<td>245</td>
<td>258</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>19</td>
<td>D</td>
<td>368</td>
<td>353</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td>301</td>
<td>247</td>
<td>260</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>21</td>
<td>E</td>
<td>380</td>
<td>365</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td>301</td>
<td>247</td>
<td>260</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>23</td>
<td>F</td>
<td>382</td>
<td>367</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td>315</td>
<td>261</td>
<td>274</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>25</td>
<td>G</td>
<td>394</td>
<td>379</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td></td>
<td>273</td>
<td>286</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>27</td>
<td>H</td>
<td>396</td>
<td>381</td>
<td>255</td>
<td>213</td>
<td>329</td>
<td>275</td>
<td>288</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
V. **Conclusão**

Após o extenso trabalho de extração e purificação dos esteróis da esponja *T. ignis*, utilizamos a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) para o estudo da mistura esterólica encontrada na *T. ignis*. Através desta técnica foi possível constatar a existência de pelo menos oito esteróis.

Analisando-se os espectros de massa de cada pico da mistura esterólica, encontramos os íons fragmentos comuns aos esteróis, como por exemplo: a perda de água, perda do radical metila, perda da cadeia lateral e perda do anel D.

Os íons $(M-85)^+ (a)$, $(M-111)^+ (b)$ e $(M-C_9H_{15})^+ (c)$, que são considerados característicos dos esteróis com insaturação na posição C-5 e hidroxila em C-3, também estavam presentes em todos os esteróis analisados. Foi possível distinguir os compostos isoméricos, contendo insaturação em C-22 e C-24, por meio de fragmentações características apresentadas por estes compostos.

Baseando-se nestes estudos de fragmentações atribuímos as prováveis estruturas para os seis esteróis, como sendo: desmossterol (pico C), colesterol (pico D, componente principal) brascasterol (pico E), 22,23-diidrobrassicasterol (pico F), estigmasterol ou poriferasterol (pico G) e β-sitosterol (pico H).

Não foi possível caracterizar o pico A devido à sua pequena abundância e o pico B devido à má resolução no cromatograma de gás. A estrutura do colesterol foi confirmada pela comparação com uma amostra autêntica. Os outros componentes não foram confirmados devido à falta das respectivas amostras autênticas.
Podemos dizer que a esponja vermelha Tedania ignis contém uma mistura de esteróis, já conhecidos na literatura, que são comuns no ambiente marinho. Apesar das condições do meio ambiente serem diferentes daquelas esponjas já estudadas e mencionadas na literatura, a esponja T. ignis não continha nenhum esterol novo. Comparado ao estudo da mistura de esteróis já conhecido, esta mistura era relativamente simples.

Concluímos esta parte do trabalho enfatizando a aplicabilidade da técnica de CG-EM nos estudos de esteróis encontrados em tecidos vivos, principalmente porque através dela podemos analisar a mistura de esteróis encontrados em materiais biológicos. Devemos lembrar que as amostras a serem analisadas são em quantidades ínfimas, o que requer uma técnica altamente sensível para detectá-las.
I. Introdução

A aplicação da espectrometria de massa está sendo muito usada para o estudo de esteroides por meio das análises de fragmentações "características" induzidas por impacto eletrônico principalmente na tentativa de identificar aqueles que são mais comuns na natureza e que são biologicamente importantes.

É interessante estudar o grau de alteração que os diferentes substituintes no anel A, do esqueleto esteroidal, podem produzir sobre os mecanismos de fragmentações do colesterol (2). O espectro de massa do colesterol pode servir como base para a interpretação de espectros mais complicados.

O espectro de massa do colesterol (Figura 29.b) apresenta vários picos importantes na região de alto peso molecular. Alguns destes picos se devem às clivagens comuns do esqueleto esteroidal\textsuperscript{28-31}, como por exemplo: a perda da cadeia lateral (m/e 273), o produto de desidratação devido à presença do grupo hidroxila na posição C-3 (m/e 368) e também o pico resultante da perda do radical metila, que é angular, muito comum nos esteróis (m/e 371).

Analogamente à proposição de Djerassi\textsuperscript{32} para o composto colest-5-ene, também foi proposto que a presença da ligação dupla na posição C-5 do colesterol contribui muito na perda da cadeia lateral\textsuperscript{28}, formando-se assim o ion favoravelmente estabilizado, como se acha representado a seguir:
Figura 29. a) Espectro de massa do acetato de colesterol.

b) Espectro de massa do colesterol.
O pico de m/e 247 parece ser bastante característico do colesterol. A sua formação foi proposta, primeiramente por Friedland e mais tarde por Knights, como sendo uma fragmentação que envolve a ruptura das ligações 7-8 e 9-10. O íon m/e 247 resulta da perda dos elementos do anel A e parte do anel B juntamente com mais um átomo de hidrogênio, como se acha representado abaixo:

Mais recentemente, foi confirmado este tipo de clivagem através do estudo de colesterol deuterado. Foram propos tos dois mecanismos de fragmentações para a formação deste íon. Um deles é aquele em que a fragmentação se inicia pela ruptura da ligação alílica 9-10 seguida de duas transferências sucessivas de hidrogênio das posições C-8 e C-14, e da quebra da ligação alílica 7-8 que leva à formação do íon m/e 247 e mais um radical, ambos alilicamente estabilizados (Esquema 6).

O outro mecanismo é aquele em que a fragmentação
Esquema 6

se inicia pela ruptura simultânea das ligações 7-8 e 13-14 segui-
da de uma transferência, de hidrogênio da posição alilica 9a para
o carbono C-7, num estado de transição de 6 membros. Localizando-
se a carga no C-9, pode-se formar a ligação com o radical isolado
do C-13 formando-se assim um anel de quatro membros. Esta etapa
pode ser sincrônica com a transferência de hidrogênio (Esquema 7).
A ruptura da ligação 9-10, duplamente alilica, leva à formação do
Ion m/e 247 e mais um radical favoravelmente estabilizados²⁸ (Es-
quema 7).

Os picos de m/e 301(M-85)+ e m/e 275(M-111)+, de
grande intensidade no espectro de massa do colesterol, parecem ser
comuns a todos os espectros de esteróis com insaturação na posi-
çao C-5 e hidroxila em C-3. Estes ions não apresentam nenhum pico
análogo no espectro de massa do seu acetato²⁶ (Figura 29.a). Quan-
to à formação destes ions, foram propostas as mais diversas frag-
mentações do anel esteroidal. Para o Ion (M-85)+, a fragmentação
proposta envolvia a perda parcial da cadeia lateral³³,³⁴, ou a
perda parcial do anel A e parte do anel B como mais tarde sugeriu
Knights\textsuperscript{30}. Estas proposições estão representadas graficamente a seguir:

Este pico de m/e 301, de grande intensidade, também foi centro de outras proposições especulativas\textsuperscript{35,36}. Uma das proposições é aquela que envolve a clivagem de três ligações, duas das quais são vinílicas\textsuperscript{35} (clivagem C). A outra alternativa é a clivagem das ligações que levam à perda dos elementos do anel A\textsuperscript{36} (clivagem D). Estas duas proposições podem ser graficamente representadas a seguir:
Finalmente, Naqvi\textsuperscript{37} sugeriu uma fragmentação que envolve a ruptura das ligações 1-10, 5-10 e 5-6 e mais a perda de um próton, representada a seguir:

Esta fragmentação foi confirmada através de estudos das fragmentações do colesterol deuterado\textsuperscript{28} e dos análogos deuterados\textsuperscript{38}. Com estas informações, foi elaborado um mecanismo de fragmentação\textsuperscript{28} que envolve as clivagens propostas anteriormente\textsuperscript{37}. O mecanismo sugere a transferência de hidrogênio do C-6 para C-5; a formação do íon m/e 301 se acha representada no Esquema 8. O íon X pode ter dois estereoisômeros no C-6. Considerando-se o estereoisômero em que o grupo ciclopentila está no lado alfa, o hidrogênio a ser transferido pode ser da posição 9α (Esquema 9). Apesar da distância internuclear (entre o hidrogênio 9α e o carbono radicular) ser maior neste caso do que no proposto no esquema anteri-

Esquema 8

or. Os ions m/e 301 formados são idênticos, diferindo apenas na origem dos hidrogênios das posições C-5 e C-6.

Esquema 9

a. m/e 301 (M-85)⁺
O íon m/e 275 (M-111)⁺, de maior intensidade que o íon m/e 301 no espectro de massa do colesterol, também recebeu várias proposições quanto à fragmentação que resultou na formação deste íon. Inicialmente, Friedland⁳¹ propôs uma fragmentação envolvendo as clivagens que causam a perda do anel A e parte do anel B, conforme representação a seguir:

![Diagrama de íon m/e 275 (M-111)⁺)](image)

Outra proposição, de Knights⁳⁰, é aquela que envolve a clivagem de três ligações, duas das quais são alíficas, que leva à perda do anel A e parte do anel B, como se encontra representada a seguir:

![Diagrama de íon m/e 275 (M-111)⁺)](image)

Através da análise do espectro de alta resolução dos íons do colesterol deuterado e dos análogos deuterados⁳⁸ foi confirmada a fragmentação proposta anteriormente⁳⁰. Um provável mecanismo envolve a formação de uma ligação entre as posições C-1 e C-5, no íon molecular, seguida da ruptura da ligaçăo 7-8 e da transferência de hidrogênio da posição 9α para o íon carbônio adjacente. A homólı
se da ligação 5-10 no íon y resulta na formação do íon m/e 275 e mais um radical, alilicamente estabilizados\textsuperscript{28}, como se observa no esquema 10.

\textbf{Esquema 10}

Estes estudos\textsuperscript{28,38} indicaram que a formação dos íons característicos, (M-85)\textsuperscript{+}(a), (M-111)\textsuperscript{+}(b) e o íon m/e 247 (\textsuperscript{2}C, no colesterol), dos esteróis com hidroxila em C-3 e insaturação na posição C-5 provavelmente é controlada pela ligação dupla. Estes íons estão presentes nos espectros de compostos esteroidais que não apresentam outros grupos funcionais que possam controlar estas fragmentações.
II. Objetivo

Os espectros de massa, do colesterol e seu derivado acetato, foram estudados detalhadamente\textsuperscript{26,28}. Os autores constataram que os principais ions do colesterol e dos esteróis relacionados a este sob o impacto elétrônico de 70 eV são: (M-139)\textsuperscript{+} (c), (M-111)\textsuperscript{+} (b) e (M-85)\textsuperscript{+} (a). Estes autores sugerem que as clivagens envolvidas na geração destes íons sejam provavelmente controladas apenas pela ligação dupla na posição C-5. Tendo isto em mente, decidimos estudar seis derivados do colesterol com substituintes no anel A, cujo objetivo é estudar as possíveis influências destes grupos no mecanismo de fragmentação do colesterol.

Para evitar a migração da ligação dupla para a posição C-4, que é uma posição conjugada com a carbonila, decidimos alquilar a posição C-4 com dois grupos metílicos para eliminar esta possibilidade. Assim, podemos ver se a fragmentação é controlada apenas pela ligação dupla em C-5 ou se a ligação dupla em C-4 tem alguma influência.

Foram estudados os seguintes compostos:
III. Resultados e Discussão

A comparação entre o espectro de massa do colest-5-eno e vários esteróis 3β-hidroxilados e insaturação na posição C-5 indica que a fragmentação produz íons característicos destes compostos, e é aparentemente controlada pela ligação dupla. Utilizando-se de vários esteróis deuterados comprovou-se que os íons do colesterol se devem às fragmentações e rearranjos muito complexos\(^{28}\).

Para estudar o efeito produzido por diferentes grupos funcionais, no anel A do esqueleto esteroidal, nas fragmentações do colesterol induzidas por impacto de elétrons, decidimos analisar os compostos de 48 a 53.

O espectro de massa do colest-5-en-3-ona (48, Figura 30) apresenta um íon molecular de \(m/e\) 384 (M\(^+\)), que corresponde ao pico base no espectro. Os principais íons são \(m/e\) 369, \(m/e\) 355, \(m/e\) 342, \(m/e\) 301, \(m/e\) 275, \(m/e\) 271, \(m/e\) 243, \(m/e\) 247, \(m/e\) 229 e \(m/e\) 124. A formação deles está elaborada no esquema 11.

A formação de um íon de \(m/e\) 342, provavelmente envolve a localização da carga no heteroatomo com eliminação de ceteno\(^{39}\) pelo seguinte mecanismo:
Figura 30. Espectro de massa do colest-5-en-3-ona (48) (70eV)

Analogamente aos esquemas de fragmentações do colesterol\textsuperscript{28}, os íons de m/e 301, m/e 275 e m/e 247, característicos dos esteróis 3β-hidroxilados e insaturação na posição C-5, também estão presentes no espectro do composto 48, mas são de menor intensidade.

A formação do íon de m/e 271, que corresponde à perda da cadeia lateral, provavelmente é favorecida pela presença da ligação dupla em C-5 e o íon formado é alilicamente esta-
O pico de m/e 229, de relativa intensidade no espectro, corresponde à perda do anal D. A sua formação, provavelmente, envolve a ruptura da ligação 13-17 (r) com transferência de hidrogênio do C-14 (g) e uma ruptura subsequente da ligação 14-15. O íon resultante poderia ser um carbeno (c') ou um íon carbônio C' ou C'' alilicamente estabilizados. Um provável mecanismo se encontra no esquema 12.

Esquema 12
Tem-se referido na literatura²⁰ que os \( \Delta^5 -3\)-cetoesteróis dão origem ao pico de m/e 124, de grande intensidade. Sua formação parece envolver a ruptura do anel B com dupla transferência de hidrogênio. Este processo é representado de três maneiras, dependendo da origem do hidrogênio que migra em primeiro lugar. A segunda migração é de uma posição alilicamente ativada. Sendo o \( H_8 \) o principal iniciante deste processo, conforme foi confirmado pelo estudo do composto deuterado²⁰.

![Diagrama de ruptura do anel B com migração de hidrogênio](image)

- ou

![Outra representação de migração de hidrogênio](image)

- ou

![Representação final com m/e 124](image)
Analisando-se o espectro do composto 48 encontramos este ion de m/z 124. Apesar do composto ter insaturação no C-5, não é difícil imaginar que o aquecimento na fonte leve à migração da ligação dupla para C-4 numa posição conjugada com a carboxila. Por esta razão encontramos o mesmo tipo de fragmentação citado anteriormente.

Figura 31. Espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (49).
O espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (49, Figura 31) apresenta um íon molecular em m/e 412 (M⁺). Este espectro também mostra íons característicos de esteróis 3 α - hidroxilados e insaturação no C-5 que correspondem aos picos de m/e 247, m/e 275 e m/e 299 (este último corresponde ao m/e 301 do colesterol), mas são de menor intensidade. Outros principais fragmentos são m/e 397 (M-CH₃)⁺, m/e 384 (M-CO), m/e 370 [M-(CH₂= =C=O)] e os picos que representam, provavelmente, a decomposição do íon de m/e 370, como mostra o esquema 13.

Além destes fragmentos, o espectro apresenta um pico de m/e 313 que não foi encontrado no espectro do colest-5-en-3-ona (48). Este íon é formado, provavelmente, pelo processo que envolve a perda dos elementos do anel A por um rearranjo análogo ao rearranjo de McLafferty que é muito importante nos compostos carbonílicos. Um provável mecanismo para sua formação é o seguinte:
O pico de maior intensidade no espectro é de m/e 124. Como este composto tem o C-4 totalmente bloqueado pelas duas metilas, não há a possibilidade de migração da ligação dupla para esta posição. Por esta razão, seguramente este íon de m/e 124 é diferente daquele encontrado no composto 48. Um provável mecanismo proposto envolve o rearranjo com contração do anel A e a migração múltipla de hidrogênio seguida da clivagem do anel A, como se encontra representado no esquema 14. A formação do íon 1 é possível por ser um radical terciário. Por outro lado, a formação direta do íon m é também bastante coerente. A alta intensidade do pico de m/e 124 é devida, provavelmente, à alta estabilidade do íon proposto.

O espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (50, Figura 32) apresenta o íon molecular de m/e 414 (M⁺). Outros principais fragmentos são m/e 399 (M-CH₃), m/e 396 (M-H₂O), m/e 381 (M-CH₃, H₂O), m/e 283 (M-C₈H₁₇, H₂O) e m/e 259 (M-anel D, H). Estes são comuns aos esteróis. Analogamente ao colesterol os íons de m/e 301, m/e 275 e m/e 247 também estão presentes. A formação dos íons estão elaborados no esquema 15.

Um pico na região de alta massa de relativa intensidade (38%) corresponde ao íon de m/e 331. Sua formação, provavelmente, envolve a perda dos elementos do anel A e a transferência de hidroxila para a espécie que retém a carga. Este íon não foi encontrado no espectro do composto 49 e parece representar uma fragmentação específica para o colesterol alquilado no C-4. Um provável mecanismo para sua formação está representado no esquema 16.

Este processo envolve um rearranjo e uma rotação da ligação 4-5, assim o grupo hidroxila no C-3 se situa numa posição favorável à sua transferência ao C-6 com a clivagem conce-
Figura 32. Espectro de massa de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol(50).

mitante da ligação C-O. A clivagem, que envolve a transferência de hidrogênio do C-6 para C-5 com a perda do fragmento de m/e 69, leva à formação do íon de m/e 331 estabilizado por três formas canônicas de ressonância.

O espectro de massa, de 2-diazo-4,4-dimetilcoles -5-en-3-ona (51, Figura 33), apresenta um íon molecular de m/e 438 muito pequeno (1%). Isto se deve, provavelmente, à perda rápida de nitrogênio resultando íon de m/e 410. Esta perda é comumente observada em diazocetonas\(^2\). O pico de m/e 410 aparentemen
te se fragmenta pela perda do radical metila formando o pico ba-
se do espectro em m/e 395. Esta fragmentação é confirmada pela
presença de um pico de grande intensidade a 0,964 E₁ no espectro
de MIKE⁴⁵ deste íon (Figura 34). Estes são os únicos picos de mai-
or intensidade na região de alta massa do espectro deste compos-
to, entretanto o espectro de MIKE do íon m/e 410 (Figura 34) tam-
bém contém um pico pequeno a 0,932 E₁ que corresponde à perda de
CO deste íon resultando m/e 382 que é um pico de intensidade mui-

![Diagrama de espectro de massa](attachment:image.png)

**Figura 33. Espectro de massa de 2-diazox-4,4-dimetilcolesterol-5-en-3-ona (51)**
Figura 34. Espectro MIKE do ion \( m/e \ 410 \) do composto 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (51).

to baixa no espectro de massa.

A intensidade do pico de \( m/e \ 395 \), comparada à intensidade de todos os outros picos, é tão alta que provavelmente este ion apresente uma estrutura bastante estável. No MIKES deste ion de \( m/e \ 395 \) (Figura 35) é possível confirmar várias de suas fragmentações correspondendo:

- \( \text{à } 0,964 \text{ E} \_1 \) \( m/e \ 395 \) \( \text{CH}_3 \rightarrow m/e \ 380 \)
- \( \text{à } 0,928 \text{ E} \_1 \) \( m/e \ 395 \) \( \text{CO} \rightarrow m/e \ 367 \)
- \( \text{à } 0,893 \text{ E} \_1 \) \( m/e \ 395 \) \( \text{C}_3\text{H}_6 \rightarrow m/e \ 353 \)
- \( \text{à } 0,853 \text{ E} \_1 \) \( m/e \ 395 \) \( \text{C}_3\text{H}_5\text{O} \rightarrow m/e \ 337 \)
- \( \text{à } 0,717 \text{ E} \_1 \) \( m/e \ 395 \) \( \text{C}_8\text{H}_16 \rightarrow m/e \ 283 \)
Figura 35. Espectro MIKE do íon m/e 395(M-43) da do composto 2-diazo-4,4-dimetilcolést-5-en-3-ona (51).

Utilizando-se de todos os dados podemos elaborar um esquema de fragmentação (Esquema 17). Pode-se notar que a perda de nitrogênio do íon molecular resulta na formação de um íon de m/e 410, que poderia ter a estrutura de um α-ceto carbano (f). Normalmente os carbenos podem participar de vários tipos de reação42. Entre estes estão os seguintes:

1) Rearranjo de Wolff: o íon f resultará no íon g.

2) Inserção numa ligação C-H para formar uma ligação dupla.

3) Inserção numa ligação C-C resultando num rearranjo do esqueleto carbonado.

No caso do íon m/e 410 (f), um rearranjo do último tipo com trans
ferência de 17 dará o íon H. A perda de metila do íon H resulta na formação do íon de m/e 395. Escolhemos esta estrutura para o íon m/e 395, porque a partir dela são explicadas todas as perdas observadas no MIKES. É possível a perda do radical CH₃ de vários lugares da molécula, a perda de CO pela clivagem das ligações 2-3 e 3-4, a perda de CH₃CH=CH₂ pela clivagem das ligações 1-10 e 2-3, a perda de C₃H₆O pelo rearranjo de dois hidrogênios mais a clivagem das ligações 1-2 e 3-4 e finalmente a perda da cadeia lateral com transferência de um hidrogênio ao anel B.

Figura 36. Espectro de massa de 2-oxímno-4,4-dimetilcolest-5-eno-3-ona(52).
O espectro de massa de 2-oximino-4,4-dimetilcolesto-5-en-3-ona (52, Figura 36) apresenta um ion molecular em m/e 441 (M⁺, 100%). Este composto também apresenta o ion de m/e 247 bastante característico do colesterol. Outros principais fragmentos são m/e 426, m/e 424, m/e 413, m/e 410, m/e 398 e m/e 396. A formação destes ions estão elaboradas no esquema 18. A fragmentação do ion molecular se inicia com a perda do grupo hidroxila confirmada pelo MIKES (Figura 37), que apresenta um pico a 0,961 E₁ correspondente ao ion m/e 424. No MIKES pode-se confirmar também as seguintes fragmentações:

Figura 37. Espectro MIKE do ion m/e 441(M⁺) do composto 52.
à 0,934 E₁ \(\text{m/e } 441\) \(\rightarrow \text{m/e } 412(413)\)

à 0,902 E₁ \(\text{m/e } 441\) \(\rightarrow \text{m/e } 398\)

à 0,866 E₁ \(\text{m/e } 441\) \(\rightarrow \text{m/e } 383\)

Na primeira transição o valor medido indica a perda de 29 unidades de massa porque o pico é muito largo, torna-se difícil a localização do centro. Bate-se-se no espectro de massa de baixa resolução pode-se pensar que o valor corresponda à perda de 28 unidades de massa resultando o íon \(\text{m/e } 413\).

A segunda transição corresponde à perda de 43 unidades de massa que pode equivaler à perda dos elementos CNOH devido à clivagem das ligações 1-2 e 2-3. A última transição envolve a perda de 58 unidades de massa que, provavelmente, resulta do íon molecular rearranjado\(^3,4\)

A formação do íon de \(\text{m/e } 426\) resulta da clivagem de um grupo metila do íon molecular. Esta fragmentação não pode ser confirmada pelo MIKES, no entanto existe um pico metaestável da primeira região livre de campo, então pode-se dizer que pelo menos nessa região ocorre esta fragmentação (ver apêndice).

O íon \(\text{m/e } 424\), resultante da perda do radical hidroxila do íon molecular, apresenta um pico no MIKES à 0,961 E₁ que corresponde à perda do grupo metila resultando no íon \(\text{m/e } 408\).

Uma outra fragmentação de interesse é a formação do íon \(\text{m/e } 410\). Este íon deve-se, provavelmente, à perda de NOH do íon molecular. O íon resultante pode ter uma estrutura idêntica àquela observada para o íon \(\text{m/e } 410\) do composto \(51\). Examinando-se o MIKES do íon \(\text{m/e } 410\), em ambos os compostos, nota-se que os espectros são completamente diferentes. Este é um indício de que as estruturas dos íons \(\text{m/e } 410\) dos compostos \(51\) e \(52\) devem ser diferentes.
Figura 38. Espectro de massa de 4,4-dimetícoleste-5-en-2,3-diona dioxina (53).

O espectro de massa do 4,4-dimetícoleste-5-en-2,3-diona dioxina (53, Figura 38) apresenta um íon molecular de m/e 456 (M⁺). Os principais íons são m/e 439, m/e 438, m/e 426, m/e 425, m/e 423, m/e 409, m/e 325 e m/e 283. Analogamente ao espectro do colesterol 28, o íon m/e 247 também está presente no espectro do composto 53.

Tendo-se em vista o fato de que no composto 52 a perda de OH do íon molecular é confirmada pelo MIKES, não sendo confirmada a perda de água, decidimos estudar alguns íons do composto 53 mais
detalhadamente. Com isso podemos observar se há a perda de água do composto resultando no íon m/e 438 que corresponde ao pico base no espectro. Este íon, de intensidade muito grande no espectro, possivelmente apresenta uma estrutura bastante estável e ele é formado pela perda de H$_2$O através do seguinte mecanismo:

\[
\text{m/e 456 (M$^+$)} 
\]

No MIKES do íon molecular (Figura 39) podemos confirmar as seguintes fragmentações:

- A 0,963 E$_1$ m/e 456 → m/e 439 (M$^+$ - OH$^-$)
- A 0,932 E$_1$ m/e 456 → m/e 425 (M$^+$ - NOH)
- A 0,899 E$_1$ m/e 456 → m/e 410 (M$^+$ - HCOOH)

Como podemos observar, não foi encontrada nenhuma evidência da perda da molécula de água do íon molecular. As fragmentações do íon molecular (m/e 456) estão elaboradas no Esquema 19.

O MIKES do íon fragmento m/e 439 (M-OH)$^+$ (Figura 40) apresenta um pico correspondente:

- A 0,962 E$_1$ m/e 439 → m/e 422

O pico observado é largo. Provavelmente, é o resultado da superposição de dois picos, porém a transição medida é devido à perda de OH$^-$ e a outra transição pode ser devido à perda de CH$_3^-$. Além desta transição, podemos confirmar as seguintes fragmentações:

- A 0,933 E$_1$ m/e 439 → m/e 410 (-CHO)
Figura 39. Espectro MIKE do Íon M⁺ (m/e 456) do composto 53.

À 0,950 E₁ m/e 439 → m/e 397 (-CNO)
À 0,871 E₁ m/e 439 → m/e 382 (-CH₂=NH-CHO)
À 0,746 E₁ m/e 439 → m/e 327 (-C₈H₆)
À 0,718 E₁ m/e 439 → m/e 315 (-C₆H₆N₂O)
À 0,647 E₁ m/e 439 → m/e 284 (-C₈H₁₇, -C₃H₆)

A formação dos íons se encontra no Esquema 20. O Esquema 21 mostra outras prováveis fragmentações do íon m/e 439 que não aparecem no MIKES.

O pico base do espectro de massa é o íon m/e 438. Provavelmente, ele se origina da perda de um átomo de hidrogênio...
Figura 40. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 439, do composto 53.

Íon m/e 439. No MIKES do íon m/e 438 (Figura 41) observa-se um pico largo, que provavelmente é uma superposição de dois picos correspondendo:

- à 0,965 m/e 438 → m/e 423 (-CH₃)
- à 0,960 m/e 438 + m/e 421 (-OH')

Outras transições observadas para o íon m/e 438 são:
Figura 41. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 438 do composto 53.

à 0,934 E₁  m/e 438 → m/e 409 (−CHO)
à 0,745 E₁  m/e 438 → m/e 326 (−C₈H₁₆)

A formação dos íons referidos se encontra no Esquema 22. No Esquema 23 estão propostas outras fragmentações baseadas apenas no espectro de massa.

No MIKES do íon fragmento m/e 425 (Figura 42) pode-se con-
Figura 42. Espectro MIKE do íon fragmento m/e 425 (M⁺-NOH) do composto 53.

firmar várias fragmentações:

- a 0,960 E₁ m/e 425 → m/e 408 (-OH⁺)
- a 0,936 E₁ m/e 425 → m/e 398 (-HCN)
- a 0,930 E₁ m/e 425 → m/e 395 (-NO)
- a 0,898 E₁ m/e 425 → m/e 382 (-43)
Os picos agudos no MIKES são devido às transições na primeira região livre de campo (Apêndice). A formação destes íons se encontra no Esquema 24.

O MIKES do íon fragmento m/e 426 (Figura 43) é muito parecido com o de m/e 425. É provável que este último íon se forme com a perda de um átomo de hidrogênio do íon m/e 426. Assim, as fragmentações são semelhantes podendo-se observar as seguintes transições:

a 0,962 E. \[ m/e \ 426 \rightarrow m/e \ 409 \ (-\text{OH}') \]
à 0,928 \text{ E}_1 \quad m/e \ 426 \rightarrow m/e \ 396 \ (-\text{NO})

à 0,899 \text{ E}_1 \quad m/e \ 426 \rightarrow m/e \ 383 \ (-43)

A formação destes íons se encontra no Esquema 24.
Parte Experimental

A. Informações Gerais

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento, segundo Kofler, instalada em um microscópio modelo Thermoplan (C. Reichert Optische Werke A.G.) e o aparelho Metler FP5 acoplado ao FP52, e não sofreram correções.

Para obter os espectros de massa e de MIKE, empregou-se um espectrômetro MAT 311A cuja voltagem de aceleração é de 3 KV. O aparelho foi operado a 70 eV. Os compostos foram introduzidos via uma sonda de inserção direta, a temperaturas mínimas, para evitar a decomposição térmica. Para obter os espectros de MIKE, utilizou-se um voltímetro digital para medir a voltagem $E_1$ dos íons precursor e as voltagens $E_2$ dos íons fragmentos. Estes espectros foram obtidos da seguinte maneira: varreu-se automaticamente a voltagem $E$ de 2V/seg para se obter a forma do espectro. Em seguida varreu-se manualmente a voltagem $E$ para medir $E_2$ para cada pico, com precisão. Usando-se a relação:

$$m_2 = \frac{m_1 \cdot E_2}{E_1}$$

calculou-se a razão m/e do íon produto.

Os espectros de absorção no infravermelho foram feitos em pastilhas de KBr contendo 1% da amostra. Utilizou-se o instrumento Perkin-Elmer modelo 337.

Os espectros de absorção no ultravioleta foram feitos em etanol, utilizando-se um instrumento Zeiss modelo DMR 21.

As rotações ópticas foram obtidas em um polarímetro fotelétrico (precisão 0,005°) da Carl Zeiss, usando-se cloroformio e etanol como solventes.

Para cromatografia líquida em coluna empregou-se síli-
ca gel (0,05-0,20 mm) e alumínio neutra. Para cromatografia em camada delgada utilizou-se sílica gel tipo C ou fluorescente PF$_{254}$ da Merck A.G. e alumínio neutra para cromatografia em camada delgada.
As placas foram reveladas com lâmpada ultravioleta (254 nm) e com o vapor de iodo ressóbilado.

Foram utilizados solventes e reagentes analiticamente puros das marcas Carlo Erba, Fischer, Eastman e Aldrich. Quando necessários, os solventes foram purificados.

As análises elementares foram realizadas no Centro de Pesquisas da Rhodia-Paulínia, utilizando-se o analisador elementar da Perkin-Elmer modelo 240.

B. Preparação dos compostos

1. Preparação do $\Delta^5$-colesten-3-ona (47,48)

O composto foi obtido em três etapas:

1.a) Preparação do dibrometo de colesterol. Foram dissolvidos 150 g (0,383 moles) de colesterol comercial em 1000 ml de éter etílico absoluto, por breve ebulição. Em seguida uma solução de 5 g (0,061 moles) de acetato de sódio anidro e 68 g (0,851 moles) de bromo em 600 ml de ácido acético foi adicionada, por meio de um funil de separação, à solução esterólica. A mistura foi esfriada num banho de gelo. O precipitado foi coletado no funil de
Buchner e lavado com ácido acético (500 ml) até que o filtrado ficasse incolor.

1.b) Preparação de 5α,6β-dibromocolestan-3-ona. O dibromoeto ainda úmido, obtido em 1.a), ficou suspenso em 21 de ácido acético à temperatura ambiente, num balão equipado com agitador mecânico.

Uma outra solução de 80 g (0,242 moles) de dicromato de sódio dihidratado em 2 litros de ácido acético, pré-aquecida a 90°, foi adicionada à mistura em agitação (a 25°), por meio de um funil de separação. A temperatura da mistura alcançou 55-58° durante a oxidação e todo o sólido dissolveu-se em 3 a 5 minutos. O balão foi acondicionado num banho de gelo para que o composto se cristalizasse. Após este período adicionou-se 400 ml de água gela da. O cristal foi coletado num funil de Buchner e lavado com metanol até que o filtrado ficasse totalmente incolor.

1.c) Preparação do Δ5-colesten-3-ona. Dibromocolestonona ainda úmido de metanol, obtido em 1.b), ficou suspenso em 2000 ml de éter etílico. Com o balão acondicionado num banho de gelo, adicionou-se 25 ml de ácido acético e a mistura foi agitada mecanicamente até que a temperatura atingisse aproximadamente 15°. Removeu-se o banho de gelo e 5 g de zinco em pó foi adicionado com agitação constante. Logo que se iniciou a reação exotérmica de dehalogenação a temperatura foi controlada entre 15-20°, por meio de esfriamento, durante a adição de mais 35 g (total de 0,616 atgs) de zinco em pó. Após este período, removeu-se o banho de gelo e com agitação constante adicionou-se 40 ml de piridina, formando-se assim um precipitado branco.

O precipitado foi coletado num funil de Buchner e lavado com éter etílico. Extraiu-se o filtrado (incolor) com 600 ml
de água destilada, num funil de separação, e foi lavado com 5% de solução aquosa de bicarbonato de sódio (para remover traços de ácido acético). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e concentrada até a metade do seu volume. Adicionou-se metanol e a evaporação foi prosseguida até atingir um volume de 3/4 do total. A solução ficou à temperatura ambiente e resultou um produto cristalino transparente.

Rendimento: 51 g (0,133 moles, 34% do colesterol comercial).

Ponto de fusão: 120-125º

$|\alpha|_D^{25} \text{ (CHCl}_3\text{)}: -2,6º (c:1,0)$

$\nu^\text{KBr}_{\text{max}}$ (Figura 44): 2940, 2850, 1715, 1470, 1375, 1240 e 1140 cm$^{-1}$. $m/e$ 384 (M$^+$) (Figura 30).

Figura 44. Espectro no I.V. do composto 48.
2. preparação do 4,4-dimetilcolest-5-en-3-on(49)\textsuperscript{69,50}

\[
\begin{align*}
\text{C}_8\text{H}_{17} & \quad \text{C}_8\text{H}_{17} \\
0^+ & \quad 0^+ 
\end{align*}
\]

2.a) Preparação do t-butóxido de potássio\textsuperscript{1}

Preparou-se a aparelhagem apresentada acima. Adaptou-se um balão de 3 bocas ao condensador de refluxo (tipo serpentína) e o topo do condensador à uma torneira de três saídas que conduz, por meio de A para um cilindro de nitrogênio com uma válvula de controle fino e dispositivo contendo mercúrio, e por meio de B para uma trompa d'água. Secou-se completamente o balão e o condensador, aquecendo-se com um seccador de cabelo, enquanto o sistema estava a pressão reduzida (a torneira aberta na posição B estava ligada com a trompa d'água). Permitiu-se a entrada de nitrogênio seco na aparelhagem, com a torneira aberta na posição A (passando pelo "trap" de segurança).

No balão, rapidamente esfriado, colocou-se 100 ml (0,941 moles) de álcool t-butilico anidro e 2 g (0,051 atgs) de potássio metálico e adaptou-se novamente na aparelhagem. Interrompeu-se a corrente de nitrogênio e a mistura foi refluxada até que
o potássio dissolvesse completamente. O hidrogênio liberado pas-
sou-se através do dispositivo de mercúrio.

Esfrigou-se a solução à temperatura ambiente, permitin-
do-se a entrada de nitrogênio para igualar a pressão.

2.b) **Preparação do 4,4-dimetilcoleste-5-en-3-ona.**

Em um balão equipado com condensador, tratou-se 11,5
gramas (0,030 moles) de colestenona (preparada em 1.c) com 430 ml
de álcool t-butilico até o reflujo. A solução foi esfriada à tem-
peratura ambiente e vertida sobre a base preparada em 2.a). Conti-
nuou-se o reflujo por mais meia hora.

Esfrigou-se a solução até aproximadamente 40°C, e en-
tão adicionou-se 2,5 ml (0,037 moles) de iodo de metila, de uma
só vez, e a solução foi refluída sob atmosfera de nitrogênio por
mais uma hora.

A mistura foi esfriada e colocada no banho de gelo e
em seguida foi acidificada com HCl concentrado, até pH-5. Adicio-
nou-se um pouco de água destilada para quebrar a turbidez da solu-
ção e o álcool t-butilico foi evaporado a pressão reduzida, num e
vaporador rotativo. A fase orgânica foi extraída com benzeno e o
extrato foi lavado, várias vezes, com água destilada. Evaporou-
se o benzeno e o composto foi cristalizado em clorofórmio-etanol.

**Rendimento:** 6,2 g (0,015 moles, 50%).

**Ponto de fusão:** 175-177°C

| a | 25°C (CHCl₃): +1°C (c:1,0) |

v_{max}^{KBr} (Figura 45): 3000-2850, 1705, 1460 e 1380 cm⁻¹

m/e 412 (M+¹) (Figura 31).

**Análise elementar:** C₉₂H₄₈O

Encontrado: %C=84,35    %H=11,68    %O=3,60

Calculated : %C=84,40    %H=11,70    %O=3,87
Figura 45. Espectro UV I.V. do composto 49.

3. Preparação de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (50)^2

Num balão equipado com condensador de refluxo, tratou-se 100 mg (0,242 mmoles) de 4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona com 10 ml de metanol e adicionou-se, bem lentamente, 300 mg (7,89 mmoles) de boro hidreto de sódio (com agitação constante). A solução foi aquecida até um pouco menos que o ponto de ebulição do sol -
vente. Segui-se o curso da reação através de placa analítica. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo e adicionou-se 10 ml de água gelada. Em seguida, adicionou-se ácido acético, gota a gota para destruir o excesso de borohidrato de sódio.

O composto (branco) foi coletado num funil de Buchner e lavado com água, várias vezes. O produto foi purificado através de uma coluna cromatográfica líquida, utilizando-se o benzeno como solvente. Obteve-se 45 mg de um cristal transparente puro.

Rendimento: 45 mg (0,109 mmoles, 45%).
Ponto de fusão: 144,0-146,0°
m/e 414 (M⁺) (Figura 32).
Análise elementar: C_{29}H_{50}O

Encontrado: %C= 84,00 %H=12,18 %O=3,82
Calculated: %C=83,99 %H=12,15 %O=3,86

4. Preparação de 2-oximino-4,4-dinétildiester-5-en-3-on (52)\textsuperscript{53}

4.a) Preparação do nitrito de n-butila (n-BuNO\textsubscript{2})\textsuperscript{54}.

No balão equipado com agitador mecânico, funil de separação de haste longa e um termômetro, foram colocados 38 g de nitrito de sódio (0,542 moles) e 150 ml de água destilada. O balão foi acondicionado num banho de gelo e a solução foi agitada até atingir uma temperatura de 0°.

Uma mistura de 10 ml de água destilada, 13,6 ml (0,25 moles) de H\textsubscript{2}SO\textsubscript{4} concentrado e 45,7 ml (0,5 moles) de n-butanol foi esfriada até 0°. Esta mistura foi adicionada lentamente, através do funil de separação com a haste que ficasse por baixo da superfície da solução de nitrito em agitação, para evitar a
formação do gas. A temperatura sempre foi mantida em torno de 0-1º, num período de aproximadamente 2 horas.

A mistura resultante foi acondicionada num banho de gelo até que se separasse em camadas. A fase líquida foi decanta
da para um funil de separação e a fase aquosa (a mais densa) foi removida. A camada de nitríto de butila foi lavada com solução de 2 g de bicarbonato de sódio e 25 g de NaCl em 100 ml de água. Secou-se a solução sobre sulfato de sódio anidro, em seguida foi filtrada e guardada no congelador.

4.b) Preparação do 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona.

Com 1,0 g (0,026 atgs) de potássio metálico e 30 ml (0,316 moles) de t-butanol, preparou-se o t-butilxido de potás-
sio. Esfriou-se a solução à temperatura ambiente, e adicionou-se 1,0 g (0,0024 moles) de cetona (4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona). A solução foi refluxada por 90 minutos.

Esfriou-se a solução à temperatura ambiente e com agitação constante adicionou-se 1,0 ml de n-BuNO₂, obtido em 4.a), gota a gota. Deixou-se em agitação durante uma noite. Após este período, o precipitado foi filtrado e lavado com etér etílico. Uma solução aquosa deste sal foi acidificada, com o frasco acondicionado num banho de gelo, e o precipitado foi coletado num fun
il de Buchner. Diluindo-se com água destilada e acidificando o filtrado, obteve-se mais deste composto. O composto impuro foi cristalizado e recristalizado em etanol-agua, dando cristais transparentes, bem finos e brilhantes.

**Rendimento:** 658,3 mg (1,49 mmoleis, 62%).

**Ponto de fusão:** 205,5-207,9º

<table>
<thead>
<tr>
<th>α</th>
<th>25º (EtOH): +72,5º (c:1,0)</th>
</tr>
</thead>
</table>

**EtOH (neutro)**

λ<sub>max</sub> : 234,0 nm

(Figura 28).

λ<sub>max</sub> (EtOH (básico)): 290,4 nm

**v<sub>max</sub> (Figura 46):** 3250, 1705, 1610, 960 e 940 cm<sup>-1</sup>.

**m/e 441 (M<sup>+</sup>) (Figura 36)**

**Análise elementar:** C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub>N

| Encontrado: %C=78,47 %H=10,98 %N=2,97 %O=7,58 |
|---|-----------------------------|
| Calculado: %C=78,85 %H=10,72 %N=3,17 %O=7,24 |
Figura 28. Espectro no U.V. do composto 52 (EtOH neutro e EtOH básico, respectivamente.)
Figura 46. Espectro no I.V. do composto 52.

5. Preparação de 2-diazo-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona(51)\(^{53}\)

Em uma solução de 2-oximino-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ona (100 mg, 0,242 mmol), obtido em 4.b), numa quantidade
mínima de THF, foi adicionado 1,3 ml de NaOH aquoso 4N e 0,5 ml de NH₄OH concentrado. Esfriou-se a solução à 10⁰ (num banho de gelo). Adicionou-se 2 ml de hipoclorito de sódio aquoso (comercial; 5,25% NaOCl) gota a gota, com vigorosa agitação e com o bálcão acondicionado no banho de gelo. A mistura ficou em agitação durante uma noite, à temperatura ambiente.

Diluiu-se a reação com água e o precipitado, ligeiramente amarelado, foi filtrado por sucção. O composto foi dissolvido em clorofórmio e fez-se purificação por coluna cromatográfica líquida de filtração, utilizando-se aluminóxido neutro de atividade I (20 g). Utilizou-se clorofórmio como eluente.

Evaporou-se o solvente à pressão reduzida, num evaporador rotativo, e o composto recristalizado em CHCl₃-MeOH, proporcionando-nos cristais amarelados e bem brilhantes.

Rendimento: 76 mg (0,174 mmoles, 72%).

Ponto de fusão: 123-125⁰

νmax KBr (Figura 51): 2080, 1620 e 1340 cm⁻¹

m/e 438 (M⁺) (Figura 33)

Análise elementar: C₂₉H₄₆O₂N₂

Encontrado: %C=78,92 %H=10,59 %N=6,36

Calculated: %C=79,92 %H=10,56 %N=6,38

6. Preparação de 4,4-dimetilcolest-5-en-2,3-diona dioxima(53)¹⁵⁵
Figura 47. Espectro no I.V. do composto S1.

Uma mistura de 100 mg (0,228 mmoles) do composto oxímino, obtido em 4.b), 100 mg (1,42 mmoles) do cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl), 2 ml de etanol e 0,5 ml de piridina foi mantida em reflu xo, num banho de silicone, por aproximadamente 90 minutos. Neste período, desenvolveu-se uma coloração rosada. Em seguida, o solvente foi destilado à pressão reduzida. Deixou-se o balão sob a corrente de nitrogênio para secar melhor. A seguir, adicionou-se alguns ml de água gelada e os cristais foram moidos, com uma espátula, e filtrados num funil de Buchner. O composto foi recristalizado em etanol-água.
Rendimento: 82 mg (0,179 mmoles, 79%).

Ponto de fusão: 210-212º

$\nu_{\text{KBr}}^\text{max}$ (Figura 48): 3320, 950 e 915 cm$^{-1}$

M/e 456 (M+) (Figura 38).

Análise elementar: C$_{29}$H$_{48}$N$_{2}$O$_{2}$

Encontrado: % C=76,17  % H=10,72  % N=6,33  % O=6,78

Calculado: % C=76,26  % H=10,59  % N=6,13  % O=7,00

Figura 48. Espectro no I.V. do composto 53.
V. Conclusão

Tomando-se como base o espectro de massa do colesterol analisamos os efeitos que os diferentes substituintes no anel A, do esqueleto esteroidal, podem produzir sobre o mecanismo de fragmentação encontrado no espectro base. Para este fim, estudamos os compostos de 48 a 53.

Observando-se os espectros de massa dos compostos 48, 49 e 50 pudemos notar a presença de fragmentações características encontradas no colesterol, formando-se os íons \((M-85)^+\), \((M-111)^+\) (b) e m/e 247 (c, no colesterol).

A presença dos grupos alquila, no C-4 dos compostos 49 e 50, deu origem aos íons não encontrados no composto 48. Propussemos também, que os íons m/e 124 do composto 48 e m/e 124 do composto 49, provavelmente, tem estruturas diferentes devido à presença dos grupos alquila na posição C-4, do composto 49, bloqueando a migração da ligação dupla para a posição conjugada com a carbonila. A formação do íon m/e 331 (do composto 50) se deve à transferência do grupo hidroxila, do C-3 para C-6, que representa uma fragmentação específica para o colesterol alquilado no C-4. Este íon é estabilizado por três formas canônicas de ressonância.

Quando os substituintes eram nitrogenados (51, 52 e 53), os espectros de massa destes compostos não apresentam os íons \((M-85)^+\) (a) ou \((M-111)^+\) (b), mas somente o íon m/e 247 (c, no colesterol) em pequena abundância. O composto α-diazo-cetona (51) apresentou um íon molecular muito pequeno (A.R.=1%), provavelmente devido à perda rápida de nitrogênio, resultando o íon de m/e 410, mas a fragmentação foi suficientemente característica para ser útil na identificação. O íon m/e 410 se fragmenta pela perda do radical metila formando-se o pico base do espectro em m/e 395. Esta
fragmentação foi confirmada pela presença de um pico de grande intensidade à 0,964 E₁ no espectro de MIKE do íon m/e 410. O íon m/e 395 foi analisado por MIKES e algumas de suas fragmentações foram confirmadas.

O espectro de massa do composto 52 apresentou um íon molecular em m/e 441 (que é o pico base no espectro). O espectro de MIKE deste íon confirmou várias fragmentações. Uma fragmentação de interesse foi a formação do íon m/e 410 que se deve, provavelmente, à perda de NOH do íon molecular. O íon resultante pode ter uma estrutura idêntica àquela observada para o íon m/e 410 do composto 51. Examinando-se o MIKES deste íon, em ambos os compostos, notou-se que os espectros eram completamente diferentes. Este é um indício de que as estruturas dos íons m/e 410 dos compostos 51 e 52 devem ser diferentes.

O espectro de massa do composto 53 apresentou um íon molecular de m/e 456. Tendo-se em vista o fato de que no composto 52 não foi confirmada a perda de água (mas somente a perda de OH) do íon molecular, analisamos o íon m/e 456 por MIKES. Como pudemos observar, no espectro, não foi confirmada nenhuma evidência da perda de água do íon molecular. O íon m/e 438 (que é o pico base no espectro) provavelmente se origina da perda de um átomo de hidrogênio do íon m/e 439 (formado pela perda de OH⁺ do íon molecular).

Comparando-se o espectro de massa do colesterol com aqueles dos seus derivados, podemos concluir que a ligação dupla realmente pode controlar a fragmentação destes derivados, mas a presença de outros grupos funcionais (diferentes da ligação dupla) modifica este esquema de fragmentação encontrado no colesterol.
Bibliografia

Os Princípios Gerais da Espectrometria de Massa

No espectrômetro de massa, as substâncias no estado gaseoso estão sujeitas à ionização. Existem várias técnicas para efetuar esta ionização. A maioria dos instrumentos, particularmente aqueles utilizados para medir a abundância isotópica ou a massa de uma molécula (análises químicas, clareamento de estruturas e estudos de ionização e dissociação de moléculas), utiliza a técnica de impacto eletrônico. Nesta técnica, o vapor é introduzido sob baixa pressão na fonte iônica e as moléculas da amostra são bombardeadas por um feixe de elétrons emitidos por um filamento de tungstênio ou rônio.

Se a energia dos elétrons, que vão bombardear a molécula, é menor que o potencial de ionização da molécula (menos que 10 eV para a maioria das moléculas orgânicas) não ocorrerá nenhuma variação aparente nelas. Entretanto, se a energia for gradativamente aumentada até acima do potencial de ionização, a probabilidade de ocorrer uma colisão entre uma molécula e um elétron, para induzir a ionização, também aumentará. O processo é o seguinte:

\[ \text{M} + e^- \rightarrow \text{M}^+ + 2e^- \]

Se a energia do feixe de elétrons for aumentada ainda mais, o excesso de energia será transferido para os íons moleculares resultando na fragmentação de uma porção deles. Na prática usa-se elétrons de 70 eV. Assim, há energia suficiente para quebrar algumas ligações na molécula. Por exemplo, introduzindo-se metanol gaseoso
na fonte iônica e bombardeando-se com um feixe de elétrons, de 70 eV, o processo de ionização e fragmentação resultante será:

\[
\text{CH}_3\text{OH} + e^- \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}^+ + 2e^- \quad \text{ionização}
\]

\[
\text{CH}_3\text{OH}^+ \rightarrow \text{CH}_3^+ + \text{OH}^- \quad 1^{\circ} \text{fragmentação}
\]

\[
\quad \rightarrow \text{CH}_2\text{OH}^+ + \text{H}^+
\]

\[
\text{CH}_2\text{OH}^+ \rightarrow \text{CHO}^+ + \text{H}_2 \quad 2^{\circ} \text{fragmentação}
\]

Todas estas reações ocorrem dentro da fonte dando uma mistura de íons (íons moleculares, íons fragmentos, íons isotópicos). Estes íons são acelerados por um potencial de aceleração \( U \), da fonte ao tubo de analisador.

Os espectrômetros de massa comerciais mais comuns utilizam os seguintes tipos de analisadores:

1. **Deflexão Iônica**. No tubo do analisador os íons estão sujeitos a um campo magnético perpendicular à direção do feixe de íons. Neste campo, eles são defletidos ao longo de um caminho circular de raio \( r \), de acordo com a equação:

\[
\frac{m}{e} = \frac{B^2 r^2}{2U}
\]

onde:

a) a deflexão dos íons depende do potencial de aceleração \( U \), da força do campo magnético \( B \) e da razão massa/carga dos íons.

b) a deflexão causada pelo campo magnético fixo \( B \) é proporcional à razão massa/carga dos íons acelerados por uma voltagem fixa \( U \).

2. **Filtro de Massa Quadrupolar**. Um analisador quadrupolar consiste de um tubo cilíndrico contendo quatro pólos cilíndricos colocados paralelamente (Figura 49). Os íons que entram no tubo,
por um pequeno orifício, estão sujeitos a uma corrente de radio-frequência oscilante. Somente os íons com um certo valor para a razão massa/carga serão capazes de atravessar o caminho ao longo do eixo, enquanto os outros íons oscilarão instavelmente e serão neutralizados quando colidirem com um dos quatro pólos. O espectro será varrido pela variação gradual da voltagem dc e radio-frequência mantendo-se a razão e a frequência de oscilação constantes.

Figura 49. Diagrama esquemático de um analisador quadrupolar. A linha sólida representa o caminho estável de um íon com determinado valor de m/e. A linha pontilhada representa o caminho instável de um íon com um outro m/e. Quando em contato com um dos pólos o íon sofre neutralização.

Atualmente, existem espectrômetros de massa de focalização simples, que utilizam o filtro quadrupolar ou o campo magnético para efetuar a separação dos íons de acordo com a razão massa/carga. Existem também instrumentos de dupla focalização nos
quais há um campo magnético e um campo eletrostático. Tais instrumentos são capazes de discriminar as massas de diferentes partículas, mesmo que esta diferença seja bem pequena (por ex. 1 ppm de uma unidade de massa). Na figura 50 encontra-se um diagrama esquemático deste tipo de instrumento (geometria de Nier-Johnson inversa) no qual o setor magnético precede o analisador elétrico. Neste arranjo, os íons são analisados por massa no setor magnético, antes de serem analisados por energia cinética no setor elétrico. Assim, todos os íons que são detetados têm m/e idênticos e energias cinéticas idênticas.

**Íons metaestáveis:** fragmentações na segunda região livre de campo.

A ionização e a fragmentação das moléculas orgânicas podem ocorrer tanto na fonte de íons como em qualquer parte do espectrômetro de massa. Os íons registrados no espectro de massa comum serão os formados na fonte. Os íons que se fragmentam fora da fonte iônica serão denominados íons metaestáveis.

Em princípio, um íon metaestável pode decompor em qualquer região do seu percurso até o detetor. Se eles se decomporão na região do campo elétrico ou magnético não serão focalizados e não resultarão picos no detetor. Entretanto, se a origem da decomposição estiver na região livre de campo, todos os íons poderão ser focalizados pelo campo subsequente e darão "picos metaestáveis" (estes picos não serão devido às espécies metaestáveis em si, mas sim aos produtos de suas decomposições). Particularmente, os íons que se decompoem na segunda região livre de campo de um espectrômetro de massa de dupla focalização com geometria de Nier-Johnson inversa (Figura 50), poderão ser intensivamente analisados. Estes estudos são denominados "MIKES" (Mass Analyzed
Figura 50. Diagrama esquemático do espectrômetro de massa MIKES (geometria de Nier-Johnson inversa).

a. Fonte de Ions; b. Primeira região livre de campo; M. Analisador magnético; c. Segunda região livre de campo (região MIKES); E. analisador eletrostático (filtro de energia); d. Detetor.

Ion Kinetic Energy Spectra - Espectro de energia cinética dos ions analisados por massa).

A segunda região livre de campo não contém todos os ions formados e acelerados na fonte de ions. Aí só chegam aqueles que já passaram pelo campo magnético, cuja função é selecionar os ions pela massa. Todas as outras partículas serão defletidas para a parede do aparelho e serão eliminadas. Portanto, quando ocorrer a decomposição de ions metaestáveis na segunda região livre de campo, eles se originarão de ions que foram selecionados pelo cam
po magnético.

No potencial inicial do campo eletrostático, $E_1$, o íon precursor ($m_1$) passa por este campo com a energia cinética ($1/2 \ m_1 v^2$)

$$\frac{m_1 v^2}{2} = eE_1$$

$$\frac{m_1 \cdot v^2}{e} = E_1$$

Quando ele se decompõe, a energia cinética é dividida entre o íon fragmento ($m_2$) e a partícula neutra. A energia cinética do fragmento é $1/2 \ m_2 v^2$. O potencial do campo eletrostático, $E_2$, necessário para permitir a passagem do fragmento será:

$$\frac{m_2 \cdot v^2}{e} = E_2$$

Combinando estas equações, podemos determinar a relação entre $m_2$, $E_1$, $E_2$ e $m_1$:

$$m_2 = m_1 \cdot \frac{E_2}{E_1}$$

Assim, sabendo-se a massa do precursor ($m_1$), o potencial inicial ($E_1$) e modindo-se o potencial no qual pode-se observar a passagem do produto ($E_2$) é possível calcular a sua massa ($m_2$).

**Ions metaestáveis:** fragmentações na primeira região livre de campo.

Se a decomposição do íon metaestável ocorrer na pri-
meira região livre de campo, o ion produto será em seguida analisado pelo campo magnético. Neste caso, como o produto \( m_2 \) não tem energia cinética dos iones de mesma massa formados na fonte iônica ele será transmitido pelo setor magnético com uma massa aparente \( m^* \) onde:

\[
m^* = \frac{m_2^2}{m_1}
\]

Assim, se a massa de um ion estudado por MIKES tem valor idêntico a \( m^* \), um pico agudo será observado à medida que o campo elétrico for diminuído. Este pico metaestável \( m^* \) formado na primeira região livre de campo é um pico difuso que inclui uma faixa de valores de massas. Se o ion estável com massa \( m^* \) atravessa o campo elétrico com certo potencial, \( E_1 \), o ion produto de massa \( m_2 \) será transmitido numa voltagem, \( E_2 \), onde:

\[
m_2 = m^* \cdot \frac{E_1}{E_2}
\]

Os valores de \( m^* \) e \( E_1 \) são conhecidos, \( E_2 \) é medido; portanto \( m_2 \) pode ser calculado. Para se encontrar o precursor \( m_1 \) é necessário saber o valor de \( m^* \) exatamente. Este pode ser medido fazendo-se a varredura de ambos os campos juntos.