

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLÓGICO DOS CONSTITUINTES DE *POLYGALA*
CYPARISSIAS ST. HILL & MOQ.**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA
ORGÂNICA**

TÂNIA ROSELY PINHEIRO

Florianópolis, Janeiro de 1996

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLÓGICO DOS CONSTITUINTES DE *POLYGALA CYPARISSIAS* ST.
HILL. & MOQ.

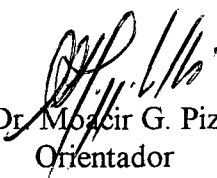
TÂNIA ROSELY PINHEIRO


ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL
PELO ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA ORGÂNICA


Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti
Orientador



Prof. Dr. Adilson Curtius
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti
Orientador


Prof. Dr. Franco D. Monache
Univ. Cattolica Del Sacro Cuore-Roma


Prof. Dr. Ricardo J. Nunes
UFSC


Prof. Dr. Rosendo A. Yunes
UFSC

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Moacir G. Pizzolatti pela orientação e empenho na busca de recursos para a realização desta dissertação, bem como pela amizade.

Ao Prof^o Franco D. Monache pela colaboração na obtenção dos espectros e também pela participação como membro da banca.

Aos Prof^o Rosendo A. Yunes e Ricardo J. Nunes pela participação como membros da banca examinadora.

Ao Prof^o João B. Calixto e aos colegas Adair e Zulma pela realização dos testes farmacológicos.

A Prof^o Leila G. Amaral pela identificação da espécie vegetal.

Aos colegas Obdúlio e Cechinel que iniciaram o estudo desta planta, e também aos colegas Jacir e Renata pelo auxílio na parte experimental.

Ao Sr. Emílio Cecconi de Urussanga-SC por coletar e enviar a primeira amostra desta planta ao nosso laboratório.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Química que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Paulo D. Pinheiro e Irma P. Pinheiro pelo apoio moral e material que me proporcionaram.

Ao José Francisco, em especial, pela paciência, incentivo, auxílio e carinho.

Enfim, agradeço a todos os amigos os quais mantive contato enquanto aluna de pós-graduação e que colaboraram para o sucesso desta etapa vencida.

A Deus

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Objetivos.....	2
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - Considerações Gerais sobre a Família e o Gênero das Poligalaceas..	3
2.2 - Considerações Gerais sobre a Espécie <i>Polygala cyparissias</i>	4
2.2.1 - Distribuição Geográfica.....	4
2.2.2 - Descrição Botânica.....	6
2.2.3 - Posição Sistemática.....	7
2.3 - Revisão sobre o Estudo Químico das Xantonas.....	7
2.3.1 - Biossíntese das Xantonas.....	8
2.3.2 - Classificação das Xantonas.....	13
2.3.3 - Atividade Biológica e Farmacológica.....	18
CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.1 - Introdução.....	19
3.2 - Materiais e Métodos.....	19
3.3 - Coleta e Identificação da Espécie Vegetal.....	21
3.4 - Análise Fitoquímica Preliminar.....	22
3.5 - Preparo dos Extratos Vegetais.....	22
3.6 - Obtenção dos Princípios Ativos.....	22
3.6.1 - Extração e Análise do Óleo Essencial.....	22
3.6.2 - Fracionamento do Extrato Bruto de Hexano.....	23
3.6.2.1 - Isolamento de H-44 (α -Spinasterol).....	24
3.6.2.2 - Isolamento de H-29 (Ácido Salicílico).....	24
3.6.3 - Fracionamento do Extrato Bruto de Acetato de Etila.....	25

3.6.3.1 - Isolamento e Purificação das Xantonas.....	26
3.6.3.2 - PC 01 (1,3-dihidroxi-7-metoxixantona).....	29
3.6.3.3 - PC 02A (1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona)...	29
3.6.3.4 - PC 03 (1,7-dihidroxidoxi-2,3-dimetoxixantona).....	30
3.6.3.5 - PC 05 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona)...	30
3.6.3.6 - PC 06 (1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona).....	31
3.6.3.7 - PC 07 (1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona).....	31
3.7 - Testes Farmacológicos e Microbiológicos.....	31
3.7.1 - Modelo de dor induzida pelo Ácido Acético [27].....	32
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 - Ensaio Preliminares e Pesquisa dos Princípios Ativos.....	33
4.2 - Quantificação e Identificação do Óleo Essencial.....	35
4.3 - Identificação dos Compostos Separados.....	38
4.3.1 - H-44 (α -Spinasterol).....	38
4.3.2 - H-29 (Ácido Salicílico).....	46
4.3.3 - PC 01 (1,3-dihidroxi-7-metoxixantona).....	52
4.3.4 - PC 02A (1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona).....	63
4.3.5 - PC 02B.....	76
4.3.6 - PC 03 (1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona).....	78
4.3.7 - PC 05 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona).....	89
4.3.8 - PC 06 (1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona).....	98
4.3.9 - PC 07 (1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona).....	107
4.4 - Avaliação do Potencial Farmacológico e Microbiológico.....	115
4.4.1 - Resultados dos Testes com os Extratos Brutos.....	115
4.4.2 - Resultado dos Testes com os Compostos Isolados.....	116
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	118
5.1 - Aspectos Químicos.....	118
5.2 - Aspectos Farmacológicos.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

→ Pf	Ponto de Fusão
→ IV	Infravermelho
→ UV	Ultravioleta
→ EM	Espectro de Massa
→ RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
→ RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
→ DEPT	Acoplamento Distorcido por Transferência de Polarização
→ DIFNOE	Acoplamento Espacial de Próton
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CGMS	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massa
→ TLC → C.C.D	Cromatografia em Camada Delgada
→ HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Resolução
→ Rf	Mobilidade relativa do composto em relação ao solvente
DI ₅₀	Dosagem Inibitória de 50 %
IM	Inibição Máxima
→ i.p.	intraperitoneal
Co-A	Coenzima-A
→ nm	nanômetro
→ cm ⁻¹	unidade de número de onda
d.i.	diâmetro interno
→ δ	absortividade molar
→ ppm	parte por milhão da frequência aplicada
→ λ _{máx}	comprimento de onda máximo
→ ν _{máx}	frequência máxima
→ CDCl ₃	clorofórmio deuterado
C ₆ D ₆	benzeno deuterado
→ C ₅ D ₅ N	piridina deuterada
CD ₆ CO	acetona deuterada
AcOEt	acetato de etila
Benz	benzeno
→ MeOH	metanol
Hex	hexano
→ OMe	metoxila

RESUMO

Polygala cyparissias St. Hill. & Moq., conhecida popularmente como "pinheirinho-da-praia", "avenca-da-praia" ou "timutu", é uma planta característica do litoral sul do Brasil usada na medicina popular como anestésico local devido a alta concentração de Salicilato de Metila contido nas raízes.

Estudos farmacológicos usando cada uma das partes desta planta mostraram inicialmente a atividade analgésica utilizando o Modelo de Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético 0.6 %, via intraperitoneal (i.p.), em camundongos. Estes estudos objetivaram a identificação dos compostos responsáveis pela atividade observada nos extratos brutos.

A extração do óleo essencial foi realizada em Clevenger a fim de quantificar a porcentagem de Salicilato de Metila presente no óleo.

A separação cromatográfica por coluna do extrato hexânico levou ao isolamento de um esteroide incomum (α -Spinasterol) e do Ácido Salicílico, ambos identificados através de dados espectrais de IV, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , APT, DEPT, Massa e por comparação com os dados de literatura.

Do extrato bruto de acetato de etila foram isoladas seis xantonas que compreendem 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona (PC 01); 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (PC 02A); 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (PC 03); 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona (PC 05); 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona (PC 06) e 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (PC 07). Estes compostos foram identificados pela análise espectroscópica de UV (deslocamento bacterocrômico com AlCl_3 e HCl), IV, RMN ^1H e ^{13}C , APT, DEPT, DIFNOE e por comparação com dados de literatura.

As xantonas PC 02A, PC 05 e PC 06 são inéditas para produtos naturais e foram isoladas pela primeira vez em *Polygala cyparissias*. As demais xantonas são inéditas na espécie em estudo.

Os Testes Farmacológicos preliminares mostraram que o extrato hidroalcoólico desta planta apresentou potente efeito analgésico, inibindo dose-dependentemente as contorções com $\text{DI}_{50} < 10 \text{ mg/Kg}$. A atividade analgésica observada por duas xantonas (PC 02A e PC 03) mostra que estes compostos apresentam 77 e 94 % de inibição respectivamente, sugerindo que estes compostos são, em parte, os responsáveis pelo efeito analgésico mostrado no extrato hidroalcoólico de *Polygala cyparissias*.

ABSTRACT

Polygala cyparissias St. Hill & Moq., popularly known as “pinheirinho-da-praia”, “avenca-da-praia”, or “timutu”, is a typical plant of Brazil south coast, used in folk medicine as anesthetic due to the large concentration of methyl salicylate in its roots.

However, pharmacological studies using a hydroalcoholic extract of each one of all parts of this plant, preliminary showed an analgesic activity in abdominal constriction response caused by acetic acid (0.6 %) in mice. So, it was important to analyse their chemical constituents and pharmacological effects.

The hexanic extract, submitted to a column chromatographic permitted the isolation of a very uncommon sterol (α -Spinasterol), and salicylic acid both identified by IR, UV, ^1H and ^{13}C -NMR, APT, DEPT, mass spectroscopy and also by comparison with literature data.

From the ethyl acetate extract, it was isolated six xanthenes; 1,3-dihydroxy-7-methoxyxanthone(PC 01), 1,7-dihydroxy-2,3-methylenedioxyxanthone (PC 02 A), 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone (PC 03), 1,3,6,8-tetrahydroxy-2,7-dimethoxyxanthone (PC 05), 1,3,7-trihydroxy-2-methoxyxanthone (PC 06) and 1,3,6-trihydroxy-2,7-dimethoxyxanthone (PC 07). These compounds were identified by UV (bathochromic shifts with AlCl_3 and HCl), IR, ^1H and ^{13}C -NMR, APT, DEPT, DIFNOE spectroscopy and by comparison with literature data.

Xanthenes PC 02 A, PC 05 and PC 06 are new compounds and were firstly isolated from *Polygala cyparissias*.

Preliminary pharmacological studies showed that hydroalcoholic extract of this plant exhibited potent analgesic activity, inhibiting dose-dependent acetic acid induced nociception in mice ($\text{DI}_{50} < 10 \text{ mg/Kg}$). Analgesic evaluation of two xanthenes (PC 02A and PC 03) showed that these compounds caused about 77 and 94 % of inhibition of acetic acid induced nociception respectively, suggesting that are, at least in part, responsible for the analgesic effects show by hydroalcoholic extract of *Polygala cyparissias*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos é intensa a busca de remédios que atuem especificamente nas diversas moléstias já descobertas. Devido aos vários efeitos colaterais apresentados pelos fármacos convencionais, bem como sua ineficácia perante alguns casos, tornou-se necessária a busca de fontes alternativas de medicamentos, encaminhando-se pesquisas sobre novas drogas de origem natural. As fontes abundantes de recursos naturais encontram-se espalhadas principalmente na Região Amazônica, contendo uma variedade enorme de compostos orgânicos de origem natural com ação biológica e/ou farmacológica ainda desconhecida pelos cientistas. É com este objetivo que Botânicos, Biólogos, Médicos, Químicos, Bioquímicos, Farmacólogos entre outros, dedicam-se sob diferentes aspectos ao estudo e aproveitamento de espécies da Flora Brasileira.

Os compostos orgânicos de origem natural formam um grande grupo conhecido como produtos naturais ou metabólitos secundários. Para esclarecer a origem biossintética dos metabólitos secundários faz-se necessário conhecer a origem dos metabólitos primários.

A notável capacidade que os vegetais possuem em produzir durante a fotossíntese os metabólitos primários, faz com que os mesmos sejam amplamente distribuídos, podendo encontrá-los em todos os organismos vivos, sendo considerados metabólitos essenciais. Podemos citar como exemplos desta classe de compostos os açúcares, aminoácidos, lipídios, etc...[1]

Os metabólitos secundários compreendem uma grande porcentagem dos princípios ativos das plantas, sendo denominados de metabólitos específicos, tendo como exemplos alcalóides, flavonóides, esteróides, etc... Estes compostos são considerados como indispensáveis nas espécies que os produzem, sendo que ainda são desconhecidas suas diversas funções nas espécies vegetais. Outra característica dos metabólitos secundários é a sua importância na quimiotaxonomia de Famílias e Gêneros das espécies vegetais.

Deve-se dar atenção especial ao uso popular de plantas medicinais, pela maneira como as informações sobre suas propriedades curativas são transmitidas. Partindo de crenças e tradições seculares algumas investigações científicas estão sendo realizadas com plantas ainda desconhecidas quimicamente.

O objetivo é confirmar a atividade biológica e/ou farmacológica conferida à esses vegetais.

A investigação da espécie vegetal *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq., objeto de nosso trabalho, deve-se não só ao fato de seu emprego na medicina popular, como será descrito posteriormente, como também do estudo químico e farmacológico, sendo este último inédito para esta espécie.

1.1 - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo efetuar estudos sobre a espécie vegetal *Polygala cyparissias* St. Hill. & Moq. Pesquisa realizada em Chemical Abstract mostrou que a espécie vegetal possui poucos compostos identificados, e entre estes nenhum foi analisado sob o aspecto farmacológico.

Visamos portanto:

- 1 - Determinar preliminarmente no extrato bruto alguns grupos químicos de interesse farmacológico;
- 2 - Extração e isolamento dos constituintes químicos, buscando aqueles compostos responsáveis pelo efeitos farmacológicos encontrados nos extratos;
- 3 - Identificação dos compostos isolados por métodos físicos como ponto de fusão (Pf), e espectroscópicos (UV, IV, EM, RMN¹H, RMN¹³C, etc.);
- 4 - Análise farmacológica do extrato bruto e dos compostos purificados.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 -Considerações Gerais sobre a Família e o Gênero Polygalaceae

Com o intuito de realizar estudos químicos e farmacológicos da espécie vegetal *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq., iniciamos uma ampla pesquisa bibliográfica sobre a família Polygalaceae, principalmente do gênero Polygala.

A família Polygalaceae compreende treze gêneros de ampla distribuição em todo o mundo. A maioria é constituída de plantas herbáceas, sendo raras as arbustivas ou trepadeiras. Alguns exemplos representantes da flora brasileira são:

Polygala : erva dos campos, matas e das dunas da praia.

Securidaca e Bredemeyera : trepadeiras.

Monnina: erva campestre com frutos alados característicos [2].

O gênero Polygala contém cerca de 700 espécies, as quais estão distribuídas nas regiões temperadas, tropical e subtropical de todos os continentes, com excessão da Austrália. Várias espécies de Polygala também são conhecidas popularmente devido a ação medicinal que possuem, sendo estas indicadas como expectorante, sedativa, diurética, cicatrizante, tônico, vomitiva e anestésico local.

Análises químicas de espécies do gênero mostram a presença de metabólitos secundários característicos para as várias espécies, como saponinas [3], sapogeninas [T.Q. Chou, J. Am. Pharm. Assoc. Sci., V 36, p 241, 1947], isoflavonas [4], lignanas [J. Hokanson, J. Nat. Prod., V 41, p 497, 1978], cumarinas [5][W.D. Ollis, Ann. Acad. Brazil. Cienc., V 42, suplement 9-23, 1970], flavonóides glicosilados [6][S. Ghosal, Biochem. J., V 1, p 64, 1974] e xantonas [7] [8] [9]. Dentre estes compostos destacamos as xantonas devido sua grande importância quimiotaxonômica para o gênero Polygala e por serem descritas como substâncias responsáveis por grande parte da atividade biológica do gênero.

Várias espécies do gênero Polygala foram investigadas quanto sua composição micromolecular, sendo muito frequente a presença de xantonas, como

mostra os dados de literatura das espécies *Polygala arillata*, *Polygala macradenia*, *Polygala paenaea*, *Polygala spectabilis*, *Polygala tenuifolia*, *Polygala triphylla* e *Polygala virgata* [6] [9].

2.2- Considerações Gerais sobre a Espécie *Polygala cyparissias*

Polygala cyparissias St. Hill. & Moq., sinônima de *Polygala corisioides* St. Hill & Moq.[3], conhecida popularmente pelos nomes de "pinheirinho-da-praia", "avenca-da-praia" ou "timutu" [10], é uma planta característica do litoral sul do Brasil, desenvolvendo-se num sistema radicular extenso, onde cresce para cima e para todos os lados na superfície da areia, elevando-se segundo as necessidades e por tolerância dos fortes ventos do mar carregados de borifos salgados. Compõe a vegetação típica de dunas.

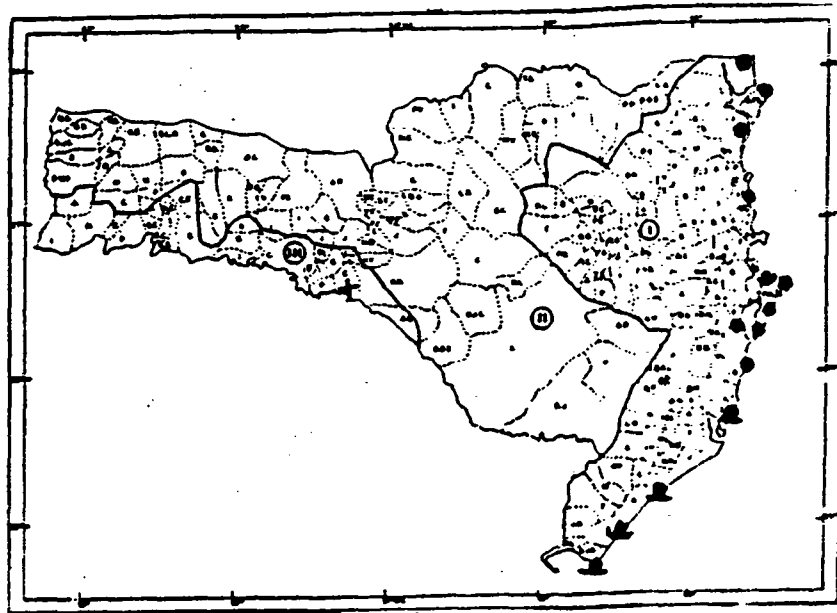
Possue grande semelhança com a *Polygala* da Virgínia - Estados Unidos (*Polygala senega*) devido ao seu valor terapêutico.

A espécie é utilizada na medicina popular com o mesmo propósito que a pomada GELOL, ou seja, tem uma nítida ação anestésica local que é atribuída a uma concentração relativamente alta de salicilato de metila, isolado anteriormente por Wasicky [3]. O salicilato de metila é responsável pelo odor característico encontrado principalmente nas raízes do vegetal.

2.2.1. - Distribuição Geográfica

Polygala cyparissias, St. Hill. & Moq., erva muito ramosa com as partes aéreas geralmente prostradas por sobre a superfície da areia, característica e exclusiva da restinga litorânea no sul do Brasil, apresentando vasta e expressiva dispersão por todo o litoral de Santa Catarina, abundante e frequente, sobretudo nos agrupamentos vegetais herbáceos situados nas ante-dunas.

As áreas de dispersão do vegetal em Santa Catarina (Fig. 1) situam-se nos municípios de Araquari, Florianópolis, Garopaba, Garuva, Itajaí, Jaguaruna, Palhoça e São Francisco do Sul. Também pode ser encontrada no Brasil desde a Paraíba até Rio Grande do Sul, e em outros países como o Uruguai e o norte da Argentina [10].



Localização das Plantas Catarinenses

- local onde foi encontrada a espécie
- ▲ local onde foi preservada a espécie

Regiões Fitogeográficas

- I Mata Tropical Atlântica
- II Mata de Araucária e Campos
- III Mata Subtropical do Rio Uruguai

FIGURA 1 - Distribuição de *Polygala cyparissias* no Estado de Santa Catarina

2.2.2. - Descrição Botânica

ERVA gabra, normalmente muito ramosa desde a base, às vezes também subumbeladamente ramosa acima, os râmulos quadrados e 12 - 50 cm de comprimento. Folhas alternas, numerosas, mais ou menos reflexas; lâmina 4 - 8 mm de comprimento, 0,4 - 0,8 mm de largura., linear e mucronulada, subcarnosa; pecíolo obscuro com cerca de 0,2 mm de comprimento.

INFLORESCÊNCIA subcapitada até curto-clíndrica, 1 - 2 cm de comprimento e 1 - 1,2 cm de largura, densamente floral; brácteas cerca de 1,5 mm de comprimento, lanceadas, como as bractéolas cêdo-caducas; bractéolas triangulares, 0,3 - 0,4 mm de comprimento; pedicelos 1,2 - 1,8 mm de comprimento.; algo deflexos na frutificação. Floresce de agosto até maio.

FLORES 4,5 - 5 mm de comprimento; brancas até roxas ou aniladas; sépalos exteriores 1,7 - 2,2 mm de comprimento; oblongo-elípticos, carenados no ápice, alas oblongo-elípticas, largamente agudas no ápice, subapialmente mucronuladas, carenadas, levemente (cerca de 0,3 mm) ultrapassando os pétalos laterais e o ápice da crista; crista da carena 1 - 1,3 mm de comprimento, de 2 - 3 pares de lobos apicalmente 2 - 4 fidos (lobos últimos cerca de 12 - 16).

FRUTO uma cápsula cerca de 2,5 - 3 mm de comprimento e ovado-orbicular com margens curtamente (0,2 - 0,3 mm) aladas.

SEMENTE com um corpo subglabro e cerca de 1,5 mm de comprimento, moderadamente pubérulo, arilo córneo e cerca de 0,4 mm além do ápice do corpo da semente, com um apêndice estreitamente bilobado igualando ou algo (até 0,3 mm) ultrapassando o corpo da semente [10]. A espécie pode ser observada na Figura 2.

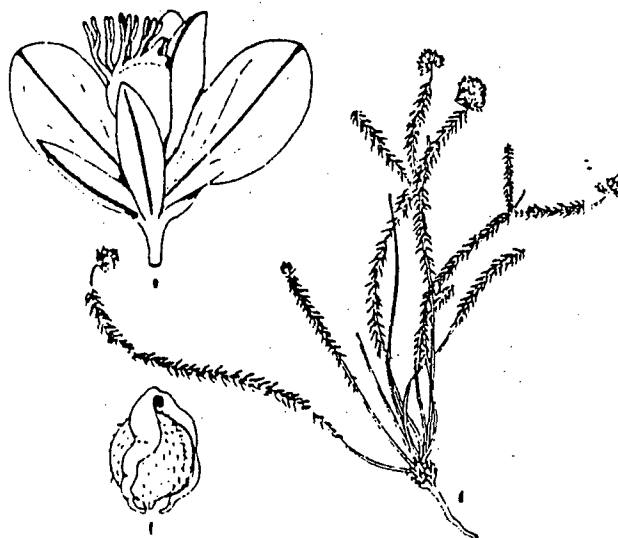


FIGURA 2 - Planta x 1/2(d); - Flor x 10 (e); - Semente x 10 (f)

2.2.3. - Posição Sistemática de *Polygala cyparissias* St. Hill. & Moq. [11]

DIVISÃO	Angiospermae
CLASSE	Dicotyledoneae
SUB-CLASSE	Archichlamydeae
ORDEM	Rutales
FAMÍLIA	Polygalaceae
GÊNERO	Polygala
ESPÉCIE	<i>Polygala cyparissias</i>
SINÔNIMO VULGAR	pinheirinho-da-praia, avenca-da-praia ou timutu

2.3 - Revisão sobre o Estudo Químico das Xantonas

Devido a obtenção de várias xantonas isoladas da espécie *Polygala cyparissias*, considerou-se oportuno apresentar uma rápida revisão destes compostos. Em 1968 O.R. Gottlieb [Phytochem., V 7, p 411, 1968] mencionou o isolamento de 60 xantonas de plantas superiores e 7 como metabólitos de fungos. As famílias botânicas Gentianaceae e Guttiferae são as principais fontes de xantonas com diferentes padrões de oxigenação [7]. Excluindo-se estas duas famílias, a ocorrência é dada em famílias do tipo Hypericaceae, Lythraceae, Leguminosae, Iridaceae, Polypodaceae, Polygalaceae, Malpigiaceae, Hippocrateaceae, Flacourtiaceae, Sapotaceae, Convolvulaceae, Gramineae, Malvaceae, Bignoniaceae, Liliaceae e Anacardiaceae [9].

Xantonas compreendem uma importante seção de heterociclos oxigenados, os quais possuem um esqueleto carbonado disposto numa configuração $C_6 - C_1 + 3C_2$ [1], que correspondem a dois anéis aromáticos (anéis A e B), como demonstra a Figura 3

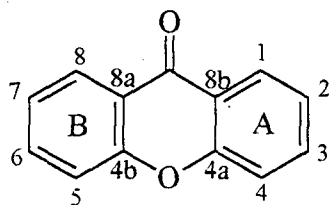


FIGURA 3 - Esqueleto carbonado de xantonas

Pela natureza simétrica dos núcleos das xantonas, bem como da origem biogenética das plantas superiores, designou-se que os carbonos devem ser numerados de acordo com a convenção biossintética. Carbonos 1 a 4 formam o anel A e são derivados da rota biossintética acetato-malonato, e carbonos 5 a 8 formam o anel B e são derivados da rota biossintética do ácido shikímico [8].

Observando a numeração específica que é demonstrada na estrutura química das xantonas, leva-se em consideração a necessidade de conhecer melhor sua formação biossintética, bem como sua classificação devido as substituições dos anéis, como será descrito posteriormente.

2.3.1 - Biossíntese das Xantonas

Uma observação importante no que diz respeito a biossíntese de metabólitos secundários é sua formação a partir dos metabólitos primários, como os α -aminoácidos, acetil-CoA, ácido mevalônico e intermediários do ácido shikímico [12]. Um grande número de xantonas de ocorrência natural foi isolado de plantas superiores (Angiospermae) como também de fungos e líquens, ganhando assim considerável importância. Em 1963 sugeriu-se que xantonas provenientes de plantas eram provavelmente derivadas de benzofenonas por acoplamento oxidativo, e que xantonas provenientes de metabólitos de fungos eram produzidas por ciclização intramolecular de benzofenonas 2,2'- dioxigenadas [13][H.D.Locksley, Tetrahedron, V 23, p 2229, 1967].

A rota biossintética mais frequentemente aceita considera que as xantonas são produzidas a partir de dois precursores biogenéticos distintos: Ácido Shikímico e Malonil-CoA. Isso leva a formação de um intermediário comum, a benzofenona, com um núcleo proveniente da rota do Ácido Shikímico e outro da rota do Malonil-CoA, conforme apresentado na Figura 4.

A proposição direta de meta-hidroxilação do benzoato foi sugerida devido a uma pobre incorporação de precursores para-substituídos. Um estudo biossintético limitado de xantonas 1,3,7 - trioxigenadas indicam a formação dos derivados do acetato (anel A)[H.G. Floss, Naturforsch, V 19B, p 1103, 1964], e da unidade C6-C1 (anel B) que provêm do ácido shikímico, formando assim a 2,3',4,6 - tetrahidroxibenzofenona [J.E. Atkinson, Chem. Comm., p 1386, 1968].

Pelas posições dos substituintes da 2,3',4,6 - tetrahidroxibenzofenona, ocorre a formação biossintética das xantonas com quatro modelos diferentes de oxigenação (1,3,5 - / 1,3,7 - / 1,3,6,7 - e 1,3,5,6), vistos na Figura 5.

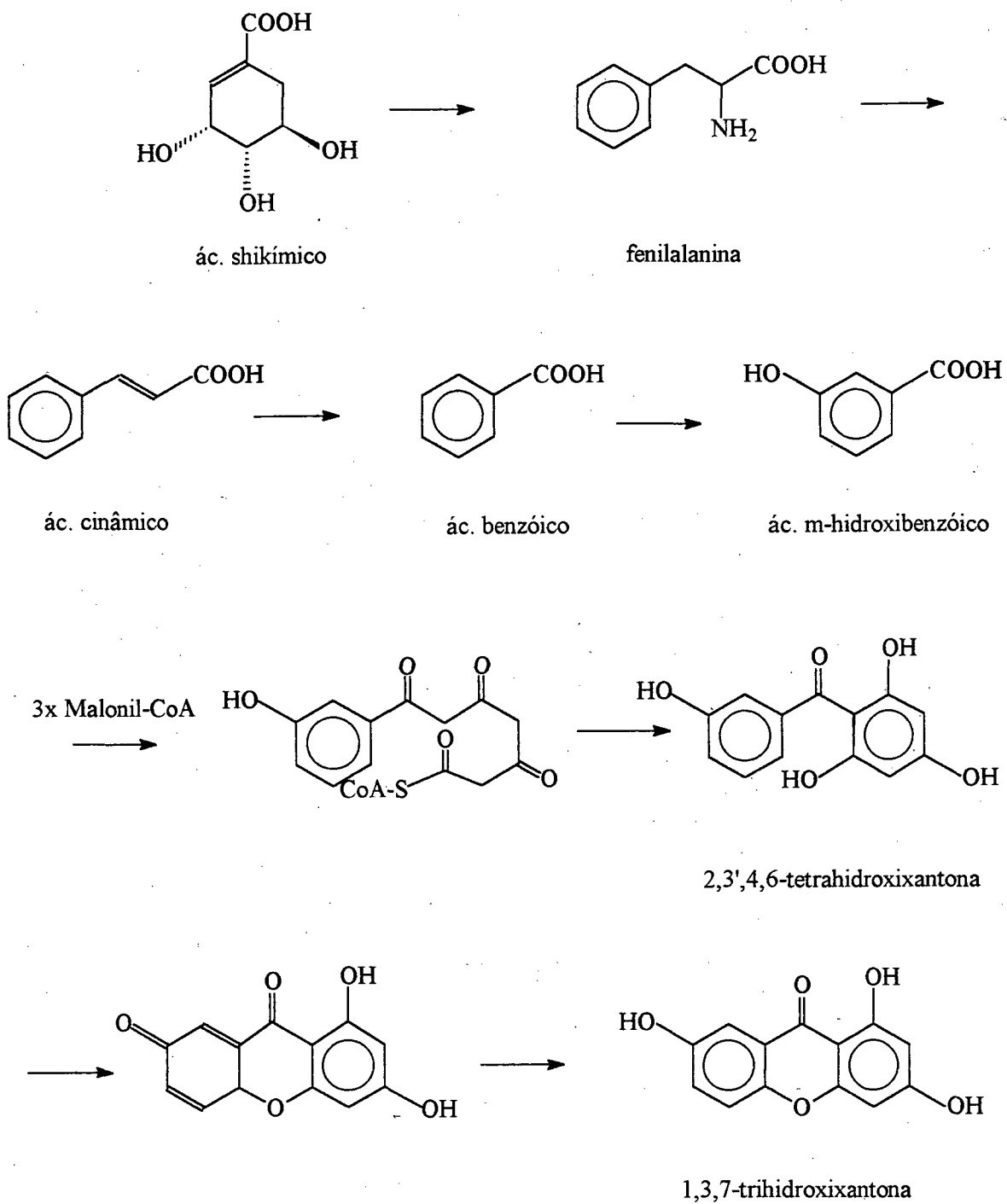
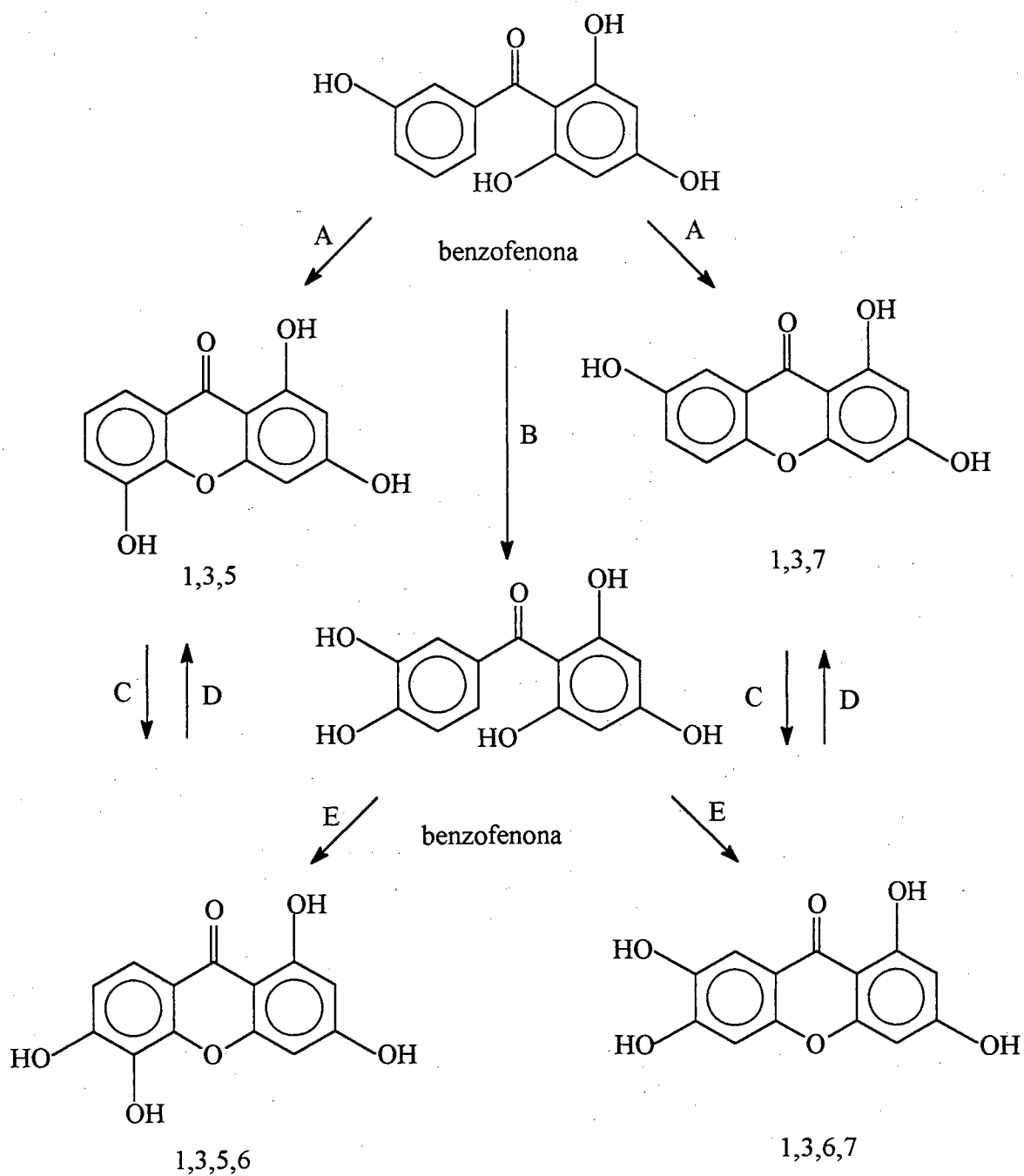


FIGURA 4 - Rota biossintética shikimato-malonato para a formação de xantonas



ETAPA A e E: acoplamento oxidativo da benzofenona;

ETAPA B: hidroxilação da posição 4';

ETAPA C: oxidação da posição 6 da xantona;

ETAPA D: redução da posição 6 da xantona;

FIGURA 5 - Rota biossintética para a formação de xantonas oxigenadas (substituição em 1,3,5 ; 1,3,7 ; 1,3,5,6 e 1,3,6,7)

Vários mecanismos sugerem a transformação de benzofenonas polioxygenadas em xantonas polioxygenadas. Entre eles citam-se:

I) Acoplamento oxidativo direto de benzofenonas via radical intermediário (Etapa E da Figura 5) [J.R. Lewis, Proc. Chem. Soc., p 373, 1963].

II) Adição intramolecular de grupos hidroxila em intermediários quinonoides (Figura 6) [R.C. Ellis, Chem. Comm., p 803, 1967].

III) Desidratação entre grupos hidroxila dos derivados acetato e shikimato via 2,2'- dihidroxibenzofenona (Figura 7) [S. Neelakantan, Current Soc., V 30, p 90, 1961][K.R. Markham, Tetrahedron, V 21, p 3687, 1965].

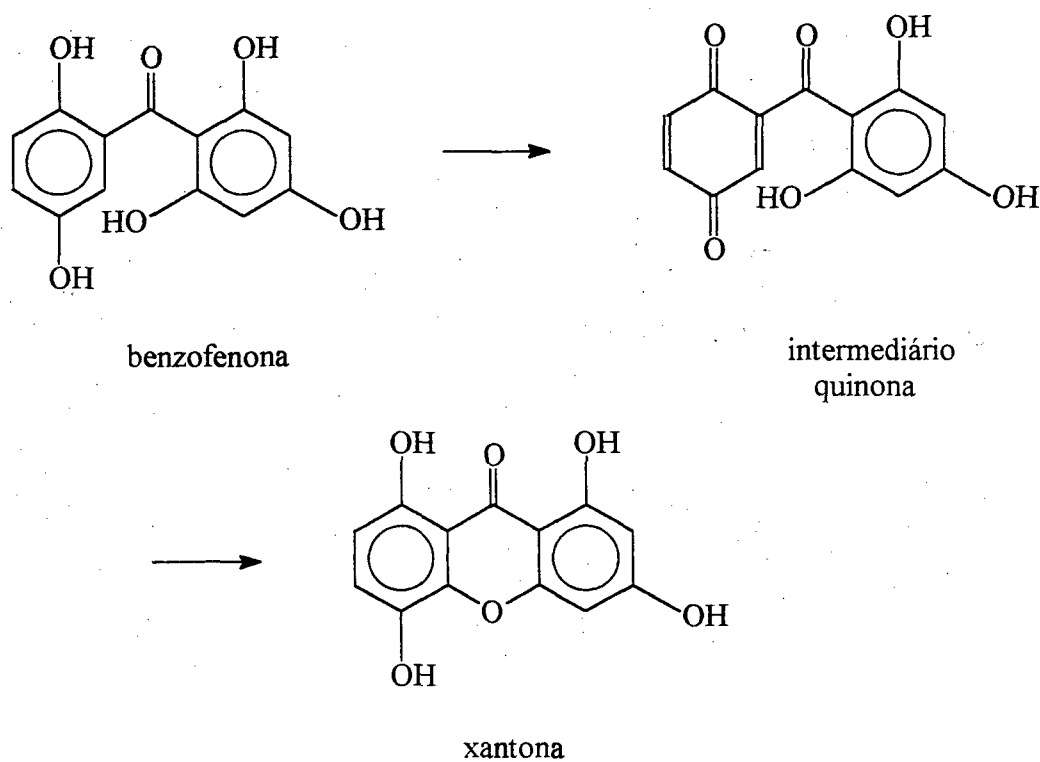


FIGURA 6 - Transformação de benzofenonas em xantonas via intermediários quinonóides

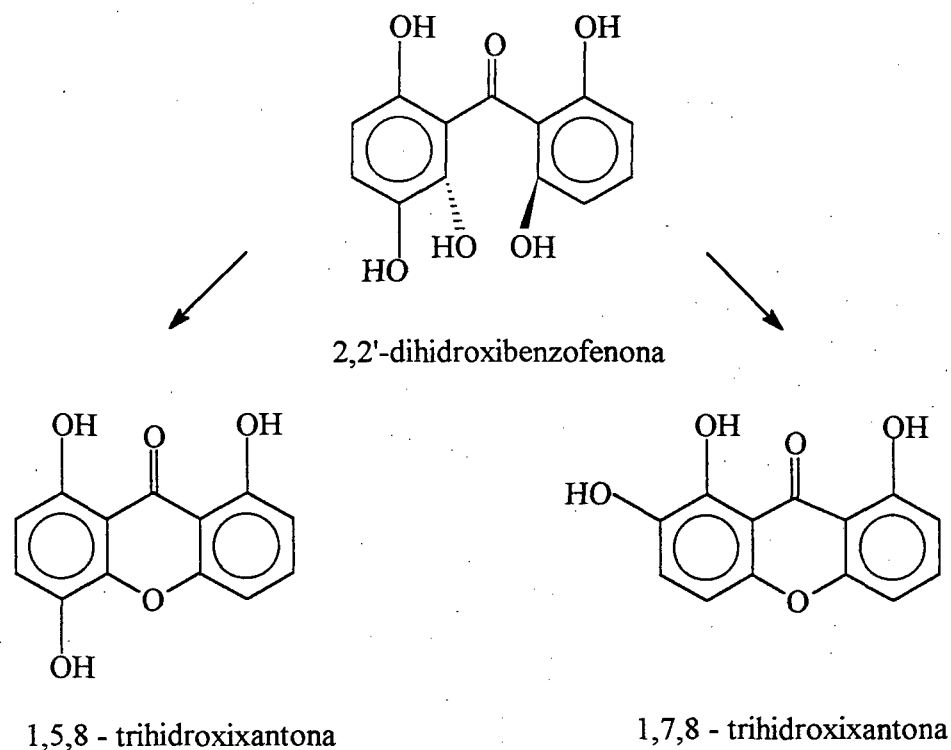


FIGURA 7 - Transformação de benzofenonas em xantonas via 2,2'-dihidroxiacetofenona

Outras transformações associadas a biossíntese de xantonas naturais são a metilação de um ou mais grupos hidroxil levando à xantonas metoxiladas ou com grupos metilendioxi. Há casos registrados na literatura da co-ocorrência de xantonas e benzofenonas (seu precursor mais imediato), ambas em proporções variadas como por exemplo na espécie *Gentiana lutea* [14]. Todas as xantonas da família Polygalaceae demonstraram oxigenação nas posições 1-, 2- e 3-, sendo poucas as espécies de Polygala que não mostram a presença de xantona.

É bastante comum a formação de xantonas preniladas e glicosiladas. A prenilação ocorre preferencialmente após a formação do esqueleto da xantona [W.D. Ollis, Tetrahedron, V 21, p 1453, 1965] e a glicosilação ocorre preferencialmente no intermediário benzofenona [15].

2.3.2. - Classificação das Xantonas

As xantonas podem ser classificadas segundo o grau de substituição nos anéis. Assim as xantonas são divididas em cinco grandes grupos:

- 1) Xantonas de Simples Oxigenação
- 2) Xantonas Glicosiladas
- 3) Xantonas Preniladas
- 4) Xantonolignóides
- 5) Xantonas Mistas

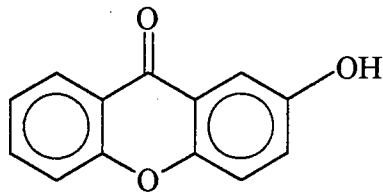
1) Xantonas de Simples Oxigenação

As xantonas de simples oxigenação são subdivididas em seis grupos, de acordo com o grau de oxigenação:

- A) Mono-oxigenadas
- B) Di-oxigenadas
- C) Tri-oxigenadas
- D) Tetra-oxigenadas
- E) Penta-oxigenadas
- F) Hexa-oxigenadas

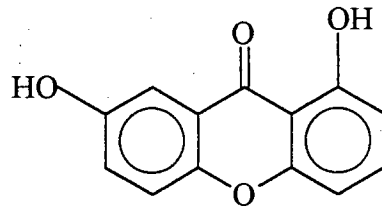
As xantonas de simples oxigenação geralmente apresentam como substituintes os grupos hidroxila e/ou metoxila, sendo exceção o grupo metilenodioxi, que é característico da família Polygalaceae. A substituição nos anéis é determinada pela biogênese de cada gênero ou espécie. Alguns exemplos de xantonas de simples oxigenação são apresentadas na Figura 8.

Mono-oxigenada



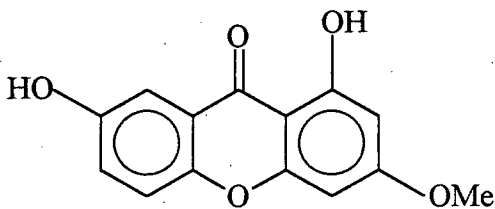
* *Hypericum mysorense*

Di-oxigenada



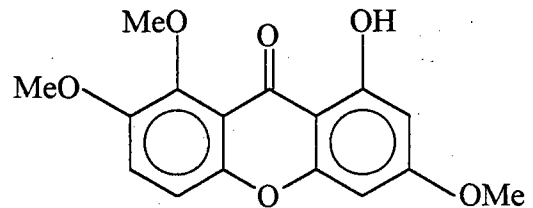
* *Vismia guaramirangae*

Tri-oxigenada



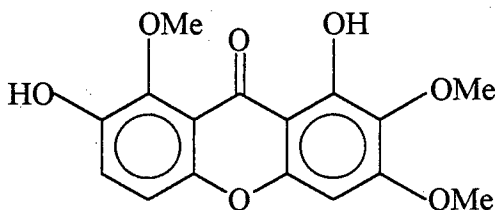
* *Swertia davida*

Tetra-oxigenada



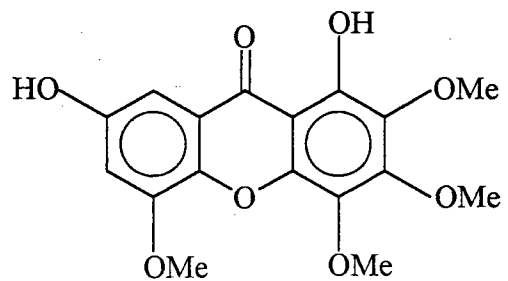
* *Centaurium pulchellum*

Penta-oxigenada



* *Swertia mussotti*

Hexa-oxigenada



* *Halenia elliptica*

* Espécie vegetal onde foi encontrada a respectiva xantona

FIGURA 8 - Exemplo de xantonas de simples oxigenação

2) Xantonas Glicosiladas

As xantonas desta classe podem ser sub-divididas em O-glicosiladas e C-glicosiladas, dependendo da natureza da ligação glicosídica.

Xantonas O-glicosiladas apresentam um padrão de oxigenação comum, sendo estas 1,3,5,8 - tetraoxigenadas. Existe também di-O-glicosídeos envolvendo as posições 6:8, 2:7 e 2:6. Mais de 50% dos O-glicosídeos apresentam o açúcar (glucose) substituído na posição 1 do núcleo das xantonas, o que é difícil de se explicar devido ao grupo carbonila influenciar estericamente a referida posição [9].

Comparado com os O-glicosídeos a ocorrência de C-glicosídeos é muito limitada, sendo um caso muito particular de xantonas. A primeira xantona C-glicosilada foi denominada mangiferin, isolada em 1908 de *Mangifera indica* [W. Wiechowski, Lotos, V 56, p 61; 1908]. Dilatin é um outro exemplo relevante de xantonas C-glicosiladas e foi a primeira C-alose isolada de produtos naturais [9] (Figura 9).

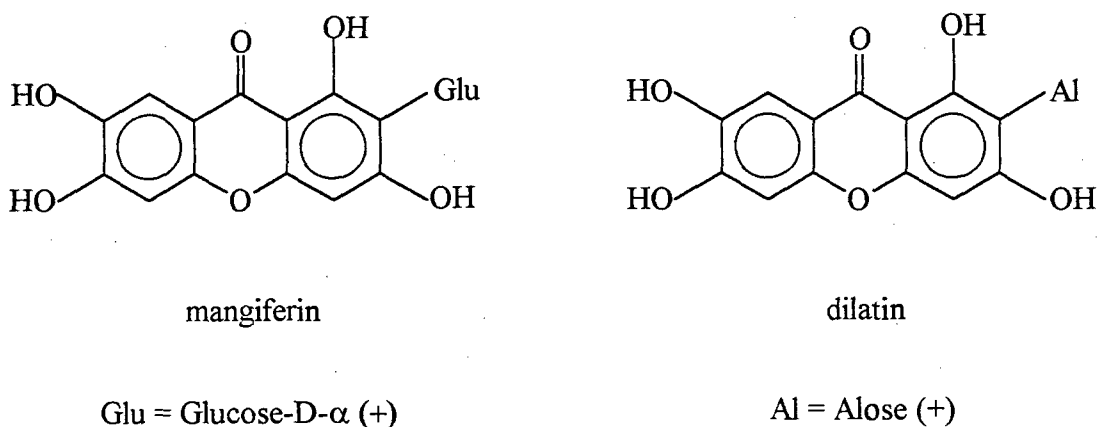


FIGURA 9 - Exemplos de xantonas C-glicosiladas

3) Xantonas Preniladas

A presença de grupos prenil em xantonas pode ter valor quimiotaxonômico, e um grande número delas já foi caracterizada nas décadas passadas.

Uma característica marcante do substituinte prenil é a ciclização oxidativa com um grupo hidroxila em posição orto formando um anel cromeno, e estas são denominadas de piranoxantona (Figura 6).

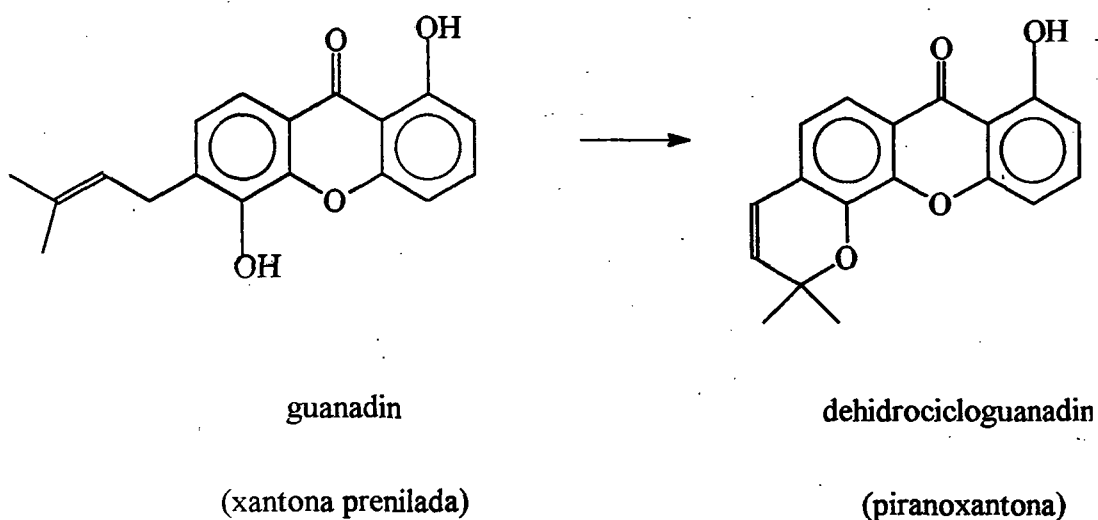
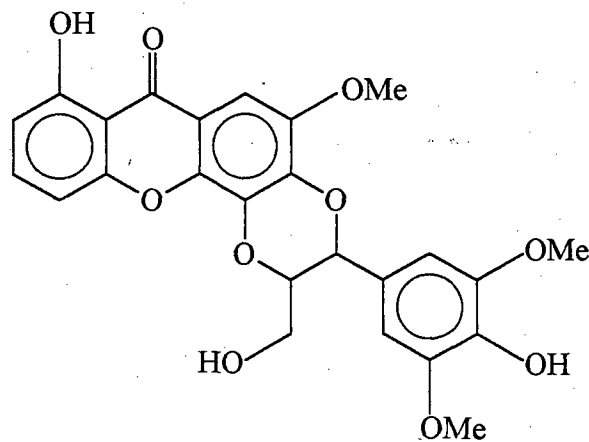


FIGURA 10 - Exemplos de xantonas preniladas

A ocorrência de piranoxantonas e xantonas preniladas tem contribuído na posição quimiotaxonômica das famílias Moraceae, Guttiferae, Hypericaceae e Bignoniaceae [9].

4) Xantonolignóides

Constituem uma classe diferenciada de produtos naturais. Monache et al.[17] isolaram o quarto xantonolignóide (Cadensin C) da espécie *Vismia guaramirangae* (Figura 11).



Cadensin C

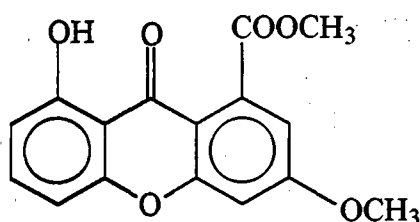
FIGURA 11 - Exemplo de uma estrutura de xantonolignóide

Biogeneticamente, xantonolignóides são formados pelo acoplamento do álcool cinamílico com uma orto-dihidroxi-xantona.

Somente onze xantonolignóides foram isolados até o presente, e seu modelo estrutural foi confirmado por estudos espectroscópicos e por comparação com compostos análogos.

5) Xantonas Mistas

Algumas xantonas com substituições diferentes das citadas anteriormente, tem sido isolada de diferentes plantas e também de líquens, sendo que as mesmas não são classificadas de maneira usual. Estes compostos são agrupados como xantonas mistas. Um exemplo destes compostos pode ser observado na Figura 12.



8-hidroxi-3-metoxi-1-carboxilato

FIGURA 12 - Exemplo de xantona mista

2.3.3. - Atividade Biológica e Farmacológica

Nos anos recentes, a ocorrência de xantonas naturais tem dado grande importância para a classe de compostos orgânicos que possuem atividade biológica e/ou farmacológica.

Observações feitas com produtos de plantas, as quais tem um uso regular como agentes quimioterápicos, contém xantonas como seus constituintes ativos. Os derivados de xantonas tem-se mostrado eficientes como inibidores de alergias, broncodilatadores no tratamento da asma [W.D. Jones, J. Medicinal Chem., V 20, p 594, 1977], além de atividade "in vivo" em sistemas de tumor no colo e nas mamas, anti-microbial, anti-inflamatório, anti-hepático, anti-viral (herpes), bactericida, fungicida, anti-úlceras, e no controle da elevação da pressão sanguínea[8].

Destacam-se as xantonas glicosiladas por confirmar a ação diurética e cardiotônica, sendo observados em ratos um efeito antiespasmódico[7].

CAPÍTULO 3

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Introdução

Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram baseados em técnicas próprias de separação de produtos naturais tais como extração, recristalização e os vários tipos de cromatografia. No que concerne a identificação das substâncias isoladas, foram adotados os métodos físico-químicos de análise a saber: P.f., EM, UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C e outras técnicas de ressonância necessárias para a determinação estrutural. Também foi necessária a realização de algumas modificações estruturais para a confirmação de certas estruturas. As técnicas empregadas visaram basicamente permitir o estabelecimento de uma metodologia capaz de caracterizar xantonas quanto ao seu isolamento por cromatografia, bem como sua identificação por métodos espectrométricos e cromatográficos.

3.2 - Materiais e Métodos

Na separação por cromatografia em camada delgada (TLC) empregou-se placas de vidro de 2.5 cm por 7.5 cm, revestidas com sílica gel GF₂₅₄ (Merck) para o monitoramento das frações obtidas dos extratos brutos. Os compostos foram aplicados em pontos equidistantes de 0.5 cm e a 1.0 cm da extremidade inferior da placa cromatográfica. Para a análise dos compostos mais purificados utilizou-se placas cromatográficas de alta resolução (HPTLC) de sílica-gel PF₂₅₄ em folhas de alumínio (Merck). O sistema de solvente utilizado em TLC foi Hexano/Acetato de Etila (70:30). Em HPTLC utilizou-se Benzeno/Acetato de Etila (3:1) [16].

Nas colunas cromatográficas utilizou-se sílica-gel 60, de granulação 70-230 mesh (0.063-0.2 mm) para o fracionamento dos extratos brutos. Para as colunas de purificação do extrato hexânico utilizou-se sílica-gel 35-70 mesh (0.2-

0.5 mm). Na purificação das xantonas utilizou-se a técnica de "Cromatografia Flash"[18], a qual utiliza sílica-gel de granulometria 40-60 μm (400 mesh) e eluição com sistema de solvente único sob pressão e fluxo constantes. As colunas cromatográficas para o fracionamento dos extratos brutos foram eluidas com gradiente Hexano: Acetato de Etila: Metanol. Nas cromatografias para a purificação das xantonas os sistemas de solventes utilizados foram Hexano/Acetato de Etila e Benzeno/Acetato de Etila na proporção requerida para cada caso.

As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram reveladas sob radiação UV usando MINERLIGHT 254 e 365 nm. Outro método utilizado empregou reagentes com o auxílio de um pulverizador manual ou spray com ar comprimido, numa distância de 15 a 20 cm, onde as placas são posteriormente aquecidas em estufa à 120 °C. O reagente utilizado para as frações hexânicas foi a solução de anisaldeído-ácido sulfúrico[19]. Para as frações do extrato de Acetato de Etila utilizou-se a revelação em câmara de iodo [20].

Os solventes utilizados para as acetilações dos compostos (Anidrido Acético, Ácido Acético e Piridina) foram todos P.A. Os solventes utilizados nas colunas cromatográficas dos extratos brutos foram pré-destilados antes do seu uso. Já as colunas cromatográficas de purificação foram eluidas com solventes P.A.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em aparelho de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução SHIMADZU-CG 14A com detector de ionização de chama e registrador Chromatopac SHIMADZU-C-R6A. As separações foram em coluna capilar de sílica fundida, 25 m comprimento, 0.25 mm d.i. e revestida internamente com uma película de 0.25 μm da fase estacionária OV-01, utilizando H_2 como gás de arraste e nas condições cromatográficas indicadas em cada experimento.

As determinações dos pontos de fusão das substâncias puras foram realizadas com Aparelho de Ponto de Fusão APF - 301 da marca Microquímica, e não sofreram correções.

As análises elementares de CHN foram feitas em Analisador Elementar CHN Perkin Elmer 2400.

Os espectros de absorção na região do Ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis HITACHI U-2000, utilizando-se metanol como solvente. Os comprimentos de onda foram registrados em escala de nanometro (nm).

Os espectros de absorção na região de Infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT Perkin Elmer 16 PC, com as substâncias incorporadas em pastilhas comprimidas de Brometo de Potássio (KBr) anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetro recíprocos (cm^{-1}).

Os espectros de Massa foram obtidos no espectrômetro de Massa SHIMADZU-CGMS-QP-2000 A, sob impacto de feixe eletrônico a 70 eV por inserção direta, PROB (xantonas) e/ou acoplado ao Cromatógrafo Gasoso de Alta Resolução SHIMADZU-CG 14A (α -spinasterol e óleo essencial).

Foram obtidos espectros de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker AC-200F; espectros de ^1H , ^{13}C , APT e DIFNOE foram elaborados em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian Gemini VXR-300F. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais δ (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados foram piridina, clorofórmio, benzeno e acetona, todos deuterados. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais são indicadas como segue: s = singlete; d = dublete; dd = duplo dublete; t = triplete e m = multiplete.

3.3 - Coleta e Identificação da Espécie Vegetal

A espécie vegetal *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq. foi primeiramente coletada em março de 1992 nas dunas da praia da Esplanada, no município de Jaguaruna, Estado de Santa Catarina. A identificação foi realizada pela botânica Prof.ª Leila G. Amaral e registrada sob número 22.744 no Herbário Flôr da Universidade Federal de Santa Catarina. Uma nova coleta foi realizada em abril de 1993 na praia de Jurerê Internacional, município de Florianópolis - S.C. onde 1 Kg do vegetal foi empregado na preparação dos extratos.

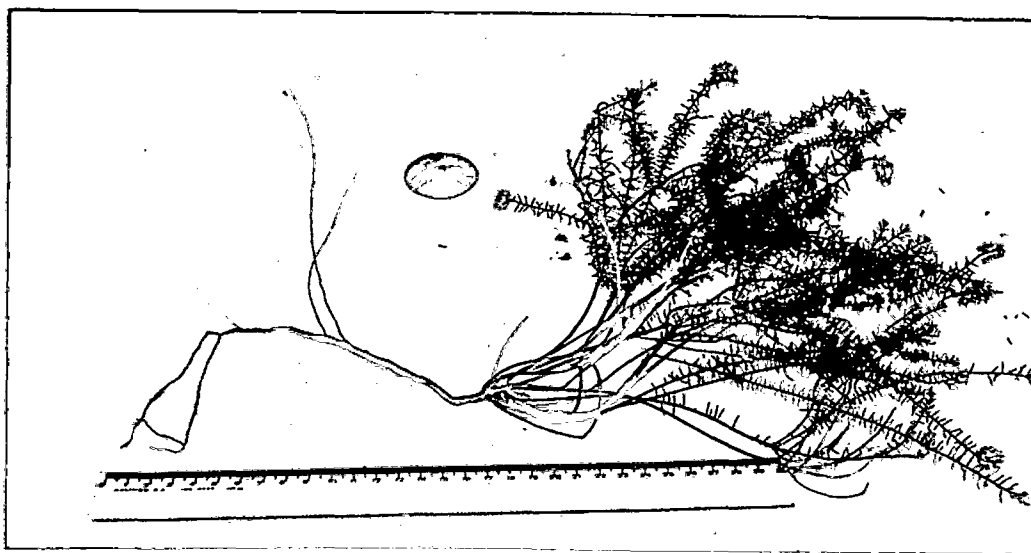


FIGURA 13 - Exposição do tamanho médio das raízes de *Polygala cyparissias*

3.4 - Análise Fitoquímica Preliminar

Foram realizadas análises fitoquímicas de *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq., com o intuito de determinar preliminarmente grupos químicos específicos, ou algum indício dos mesmos na espécie. Estas análises seguiram a marcha sistemática de Análises em Fitoquímica descrita por Moreira [21] [22].

3.5 - Preparo dos Extratos Vegetais

O material vegetal após secagem à temperatura ambiente por uma semana foi moído e submetido a processo de extração exaustiva, por maceração, em Hexano durante 15 dias, com repetidas reposições de solvente. O extrato foi concentrado a 1/3 do seu volume em evaporador rotatório sob pressão reduzida, fornecendo um material de coloração marrom pesando 4.42 g, correspondendo à 0.44 % do vegetal. Este extrato recebeu a denominação de Extrato Bruto de Hexano.

Após a extração em Hexano, o material foi submetido aos mesmos processos descritos acima, sendo macerado em Acetato de Etila, obtendo um extrato de coloração verde-escuro pesando 7.26 g, correspondendo à 0.73 % da planta. Este extrato foi denominado de Extrato Bruto de Acetato de Etila.

O processo de extração foi repetido com metanol, obtendo um extrato de coloração marrom pesando 29.25 g, correspondendo à 2.93 % da planta. Este extrato foi denominado de Extrato Bruto de Metanol.

3.6 - Obtenção dos Princípios Ativos

3.6.1 Extração e Análise do Óleo Essencial

Raízes de *Polygala cyparissias* recentemente coletadas nas primeiras horas da manhã (100 g), foram submetidas a extração durante 5 horas em Chevenger resultando na separação de 0.3 ml de um óleo denso (mais denso que a água) e de coloração branca. O óleo essencial foi submetido a análise por CGAR (Fig.17)

usando coluna capilar de sílica fundida, 25 m, 0.25 mm de diâmetro interno e revestida com filme de 0.25 µm de OV-1 com programação linear de temperatura 40-250 °C, 10 °C/min, com a temperatura do injetor e do detector de 300 °C e 310 °C, respectivamente. Desta análise observamos a presença do principal constituinte do óleo essencial, o éster Salicilato de Metila.

3.6.2 - Fracionamento do Extrato Bruto de Hexano

O extrato bruto de hexano (17.68 g) na forma de pastilha, foi submetido a um fracionamento através de coluna cromatográfica com dimensões de 80 cm de altura por 5 cm de diâmetro, tendo como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh. A eluição foi iniciada com Hexano, com uma vazão de 2ml/min, sendo posteriormente eluída com gradiente de polaridade crescente de Hexano, Acetato de Etila e Metanol, como mostra a Tabela 1.

TABELA 1 - Sistema de Eluição utilizado no fracionamento do extrato bruto de Hexano

Eluente	%	Frações eluídas	Frações estudadas
Hexano	100	1 - 10	-
Hexano/Ac. Etila	99/1	11 - 33	-
Hexano/Ac. Etila	98/2	35 - 44	H-44
Hexano/Ac. Etila	95/5	47 - 57	-
Hexano/Ac. Etila	90/10	58 - 64	-
Hexano/Ac. Etila	80/20	65 - 77	H-29
Hexano/Ac. Etila	70/30	78 - 82	H-29
Hexano/Ac. Etila	50/50	83 - 84	-
Ac. Etila	100	85	-

Coletou-se 85 frações de 100 ml, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida para um volume de 5 ml, monitoradas por TLC e reunidas conforme o perfil apresentado. Desta forma agrupou-se as frações de número 15-31 como uma mistura de substâncias oleosas; as frações 36-44 que apresentaram um composto de coloração branca, e as frações 50-63 e 65-82 que apresentaram um aspecto amorfo, com uma mistura de vários compostos.

3.6.2.1 - Isolamento de H-44 (α -Spinasterol)

As frações 36-44, eluídas com Hexano/Acetato de Etila (98/2), foram reunidas numa única fração denominada H-44. A recristalização feita em acetona forneceu 37 mg de cristais brancos na forma de agulha. Uma amostra de H-44 foi submetida à cromatografia gasosa (CGAR) em coluna capilar de sílica fundida, 25m, 0.25 mm d.i. e revestida com filme de 0.25 μ m de OV-1 com programação linear de temperatura de 80°C até 280 °C, 10 °C/min. com temperatura do injetor e do detector de 280 °C e 290 °C, respectivamente.

3.6.2.2 - Isolamento de H-29 (Ácido Salicílico)

As frações 65-82 foram reunidas (4.3 g) e recromatografadas através de uma coluna de dimensões de 40 cm de altura por 2 cm de diâmetro. A fase móvel foi iniciada com clorofórmio e posteriormente com clorofórmio/metanol em proporções de ordem crescente de polaridade (Tabela 2), com uma vazão de 3 ml/min. Coletou-se 64 frações de 5 ml, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas da seguinte maneira: 6-25; 26-29; 31-56. A mistura das frações obtidas corresponde a uma complexidade de compostos, sendo que somente a fração 26-29 apresentava-se como um único composto de coloração branca, pesando 12 mg, sendo identificado como H-29 (Ácido Salicílico).

TABELA 2 - Sistema de Eluição utilizado na purificação das frações 65-82 (H-29) do extrato de Hexano

Eluente	%	Frações eluídas	Frações estudadas
CHCl ₃	100	1 - 5	-
CHCl ₃ /Metanol	99/1	6 - 13	-
CHCl ₃ /Metanol	97/3	14 - 17	-
CHCl ₃ / Metanol	95/5	18 - 22	-
CHCl ₃ /Metanol	90/10	23 - 37	H - 29
CHCl ₃ /Metanol	80/20	38 - 45	-
CHCl ₃ /Metanol	70/30	46 - 56	-
CHCl ₃ /Metanol	50/50	57 - 60	-
Metanol	100	61 - 64	-

3.6.3 - Fracionamento do Extrato Bruto de Acetato de Etila

O extrato bruto de Acetato de Etila (29.04 g), na forma de pastilha, foi submetido a uma coluna cromatográfica com dimensões de 80 cm de altura por 5 cm de diâmetro, tendo como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh. Foi eluída inicialmente com Hexano, numa vazão de 2 ml/min, sendo posteriormente eluída com gradiente de polaridade crescente de Hexano, Acetato de Etila e Metanol (Tabela 3).

TABELA 3 - Sistema de Eluição utilizado no fracionamento do extrato bruto de Acetato de Etila

Eluente	%	Frações eluídas	Frações estudadas
Hexano	100	1 - 20	-
Hexano/Ac. Etila	98/2	21- 24	-
Hexano/Ac. Etila	95/5	25 - 46	-
Hexano/Ac. Etila	90/10	47 - 65	-
Hexano/Ac. Etila	85/15	66 - 74	PC 01
Hexano/Ac. Etila	80/20	75 - 81	PC 02 e PC 03
Hexano/Ac. Etila	75/25	82 - 97	PC 03 e PC 05
Hexano/Ac. Etila	70/30	98 - 121	PC 06 e PC 07
Hexano/Ac. Etila	60/40	122 - 123	-
Ac. Etila	100	124 - 126	-
Metanol	100	127	-

Foram coletadas 127 frações de 100 ml, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida para um volume de 5 ml, monitoradas por HPTLC e reunidas conforme o perfil cromatográfico apresentado. Mostra-se assim a reunião das referidas frações como segue: 14-27; 30-58; 67-75; 76-78; 79-81; 82-86; 87-89; 103-106.

As frações 14-27 e 30-58 apresentaram-se em pequena quantidade e numa mistura de vários compostos, inviabilizando a separação e elucidação das mesmas pelos métodos convencionas disponíveis, portanto foram guardadas para posteriores análises com o intuito de separá-las com quantidade superior do vegetal coletado.

As frações 67-75 (A), apresentaram uma mistura de três compostos de cor amarela, que foram reunidas e concentradas até a secura e reservadas para purificação posterior.

As frações 76-78 (B), apresentaram uma mistura de dois compostos amarelos, os mesmos presentes na fração anterior (A).

As frações 79-81 (C), apresentam uma mistura de quatro compostos, sendo que dois estão presentes na fração B. Estas frações seguem o mesmo procedimento descrito para a fração A.

As frações 82-86 (D), mostraram-se como dois compostos, estando presentes nas frações C e E, sendo purificados como descrito para a fração A.

As frações 87-89 (E), apresentaram uma mistura de três compostos amarelos, seguindo o padrão de purificação descrito para a fração A.

As frações 103-106 (F), apresentaram uma mistura de dois compostos amarelos. Esta mistura segue o mesmo procedimento descrito para a fração A.

Podemos observar, na Figura 14, o perfil cromatográfico das frações agrupadas acima (frações A à F) numa placa de cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC), onde o R_f das respectivas substâncias está indicado ao lado. Estas substâncias foram denominadas de PC 01 (para o primeiro composto) até PC 07 (último composto), e posteriormente identificadas como xantonas, como será discutido no Capítulo 4.

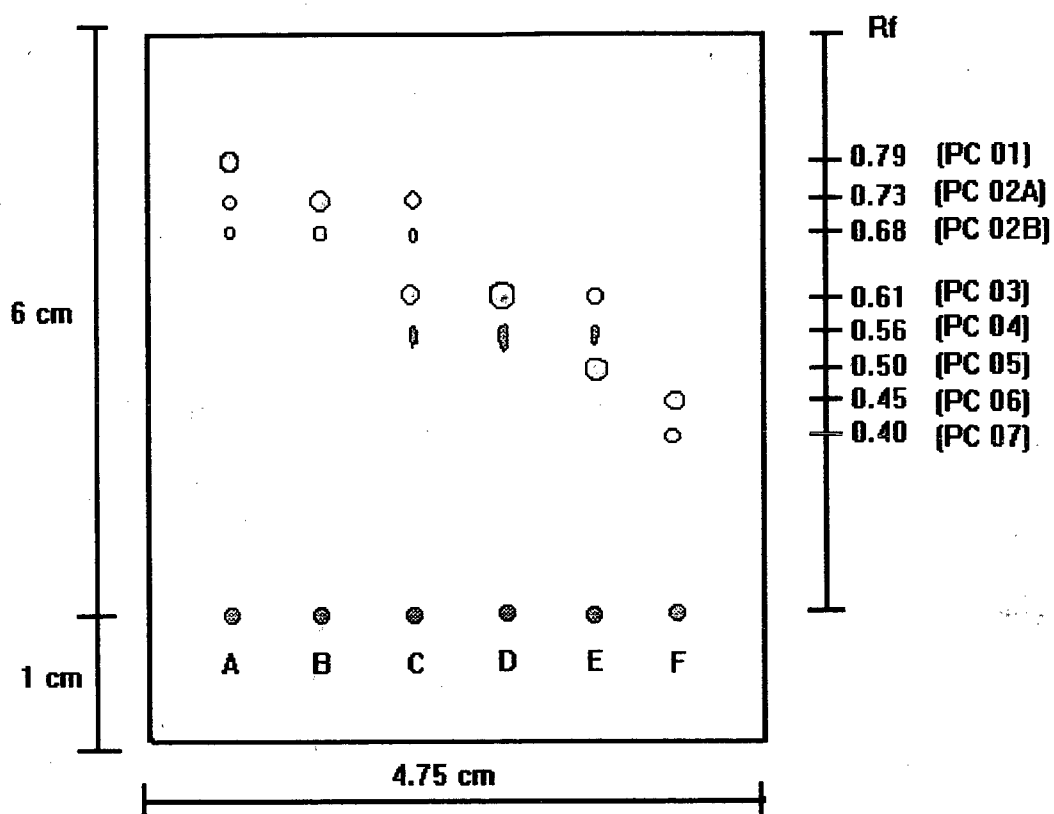
3.6.3.1 - Isolamento e Purificação das Xantonas

O isolamento das xantonas presentes nas frações A, B, C, D, E e F, resultantes do fracionamento do extrato de Acetato de Etila, foi obtido através de sucessivas Cromatografias Flash.

Cada uma das frações (A à F) foi recromatografada em coluna Flash com sílica-gel 400 mesh como fase estacionária e eluída sob pressão de 2 atm com um sistema isocrático de solvente escolhido conforme orientação dada por HPTLC. As frações resultantes foram concentradas e analisadas por HPTLC.

O fluxograma da Figura 15 permite uma visão global das xantonas isoladas usando esta metodologia.

As condições utilizadas na Cromatografia Flash por cada uma das frações estão reunidas na Tabela 4.



- A - fração 67 - 75
- B - fração 76 - 78
- C - fração 82 - 86
- D - fração 87 - 89
- F - fração 103 - 106

Fase Estacionária: placa de HPTLC (Merck)
 Fase Móvel: Benzeno/Acetato de Etila (3:1)
 Revelador: Câmara de Iodo e UV (ondas curtas)

FIGURA 14 - Perfil cromatográfico das frações obtidas do extrato bruto de Acetato de Etila

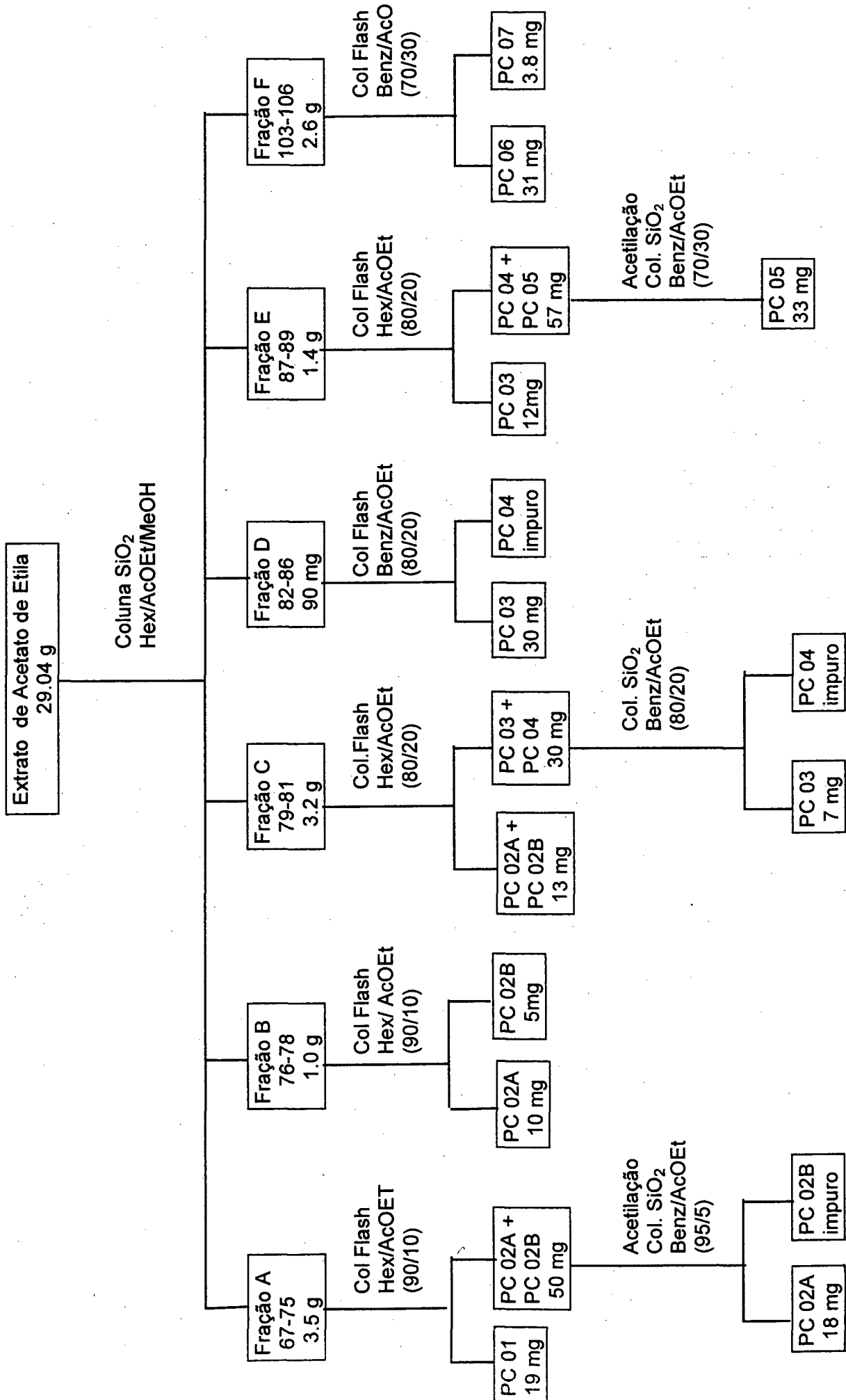


FIGURA 15 - Fluxograma de purificação das frações do Extrato Bruto de Acetato de Etila de *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq.

TABELA 4 - Condições utilizadas para a purificação das frações do extrato de Acetato de Etila por Cromatografia Flash

Frações	Diâmetro da coluna (cm)	Volume de eluente (ml)	Vazão (ml/min)	Nº de frações coletadas
A	5.0	1000	33.4	48
B	4.0	600	21.3	27
C	5.0	1000	33.4	49
D	2.0	200	5.3	10
E	4.0	500	21.3	23
F	5.0	1000	33.4	49

Após a Cromatografia Flash alguns compostos ainda foram purificados em coluna cromatográfica de 30 cm de altura por 1 cm de diâmetro, tendo como fase estacionária sílica-gel 400 mesh. O sistema de solventes utilizado foi Benzeno/ Ac. Etila em três proporções: 95/5; 80/20; 70/30; conforme a polaridade crescente das frações.

Os compostos separados foram analisados por HPTLC para verificar seu grau de pureza, e posteriormente submetidos a análises espectroscópicas e a testes farmacológicos.

3.6.3.2 - PC 01 (1,3-dihidroxi-7-metoxixantona)

A purificação da fração **A** (3.5 g) por Cromatografia Flash forneceu 50 mg da mistura de PC 02A e PC 02B e o isolamento de 19 mg de 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona (PC 01).

3.6.3.3 - PC 02A (1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona)

A fração **B** (1.0 g) contendo uma mistura de dois compostos foi purificada por Cromatografia Flash resultando em duas xantonas PC 02B (5 mg) e PC 02A (10 mg), sendo que esta última, identificada por 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona é inédita tanto para a espécie como produtos naturais.

A mistura de PC 02A e PC 02B obtido da purificação da fração A foi acetilada. A acetilação foi realizada com 50 mg da mistura sendo adicionado a uma solução de 5 ml de Anidrido Acético, 5 ml de Ácido Acético em piridina. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 12 horas à temperatura ambiente [23]. A acetilação foi acompanhada por HPTLC. Após a acetilação a mistura foi recromatografada em coluna de sílica-gel 400 mesh, sendo eluída com Benzeno/Ac. Etila na proporção de 95/5 %, obtendo-se 18 mg de PC 02A acetilada e PC 02B impuro. PC 02A foi submetida à análises espectrométricas sendo que estas mostraram que a acetilação ocorreu nas duas hidroxilas.

3.6.3.4 - PC 03 (1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona)

A purificação da fração C por Cromatografia Flash resultou na separação de duas misturas sendo que uma delas possui 13 mg de PC 02A e PC 02B, já identificada anteriormente. A outra mistura (30 mg) possui de PC 03 e PC 04. Esta mistura foi recromatografada em coluna de sílica-gel 400 mesh com eluição de Benzeno/Ac. Etila (80/20 %), resultando em 7 mg de 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (PC 03). O composto PC 04 não foi obtido com grau de pureza e nem em quantidade suficiente para realizar análises espectrométricas. Na purificação da fração D também obtivemos a separação de 30 mg de PC 03.

3.6.3.5 - PC 05 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona)

A fração E foi purificada resultando em 12 mg de PC 03, já identificado anteriormente e 57 mg de uma mistura de PC 04 e PC 05. Esta mistura foi recromatografada em coluna de sílica-gel 400 mesh eluída com Benzeno/Ac. Etila (70/30 %) rendendo 33 mg de uma xantona inédita para produtos naturais, sendo esta 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona (PC 05)

O composto PC 05 foi acetilado pesando-se 5 mg do mesmo sendo adicionado a uma solução de 0.5 ml de Anidrido Acético, 0.5 ml de Ácido Acético em piridina, com agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente [23]. A acetilação foi confirmada HPTLC.

3.6.3.6 - PC 06 (1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona)

A fração F (2.6 g) foi cromatografada por coluna Flash, eluída com Benzeno/Ac. Etila (70/30 %) resultando em 3.8 mg de PC 07 (item 3.6.3.7) e 31 mg do composto denominado 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona (PC 06), sendo que este composto é inédito, tanto para a espécie como no âmbito dos produtos naturais.

3.6.3.7 - PC 07 (1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona)

Da fração F (2.6 g) obteve-se a separação de PC 06 e PC 07 com 3.8 mg sendo identificado por 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona.

3.7 - Testes Farmacológicos e Microbiológicos

Foram realizados testes farmacológicos e microbiológicos em *Polygala cyparissias* St. Hill & Moq. com o intuito de verificar o potencial terapêutico desta espécie vegetal. Para tanto foram preparados extratos hidroalcoólicos, separadamente, das partes aéreas, das raízes e da planta toda. Estes extratos foram submetidos a ensaios farmacológicos testando seus efeitos como antiespasmódico no íleo isolado de cobaia, contraído pela acetilcolina [24].

Os mesmos extratos foram submetidos ao teste bactericida contra vários microorganismos frequentemente encontrados em infecções do trato urinário[25], como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, usando o método de difusão radial em agar nutriente descrito por Bauer [26].

Para o teste de analgesia em relação às contorções abdominais induzidas pelo Ácido Acético 0.6 % foi preparado um extrato bruto hidroalcoólico total do vegetal, variando-se as doses aplicadas. Um outro aspecto foi observado com a preparação de vários extratos das partes do vegetal como raízes, partes aéreas e da planta toda. Esses extratos juntamente com o óleo essencial foram submetidos ao mesmo teste com o propósito de comparar em qual das partes do vegetal a atividade mostra-se mais significativa. O mesmo teste também foi aplicado com os compostos isolados a fim de verificar se os mesmos eram os responsáveis pela atividade observada nos extratos.

3.7.1 - Modelo de dor induzida pelo Ácido Acético [27]

Camundongos suíços machos (25-30 g) foram acondicionados em sala a temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e mantidos em ciclos de 12 horas ao abrigo e exposição da luz. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de Ácido Acético 0.6%. Estas respostas consistem em contrações do músculo abdominal do animal.

Os animais foram tratados com o extrato hidroalcoólico da planta e com os compostos purificados, por via intraperitoneal em várias dosagens (10, 30 e 60 mg/Kg), 30 e 60 minutos antes da injeção de Ácido Acético respectivamente.

Após a injeção da substância irritante, pares de animais foram colocados em box separados e analisado o número de contorções por um período de 20 minutos. A atividade analgésica foi demonstrada pela diminuição do número de contorções entre os animais controle e aqueles pré-tratados com o extrato e com os compostos isolados da planta em estudo.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Ensaio Preliminares e Pesquisa dos Princípios Ativos

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares são apresentados na Tabela 5. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na investigação química preliminar dos extratos aquoso e alcoólico.

TABELA 5 - Resultado dos Ensaio Preliminares de *Polygala cyparissias*

Pesquisa realizada	Resultado
Olfativa	salicilato de metila
Extrato Aquoso	
cor	avermelhado
sabor	adstringente
odor	chá preto
pH	± 5
Extrato Alcoólico	
cor	verde-escuro
sabor	adstringente
odor	mascarado pelo álcool
pH	± 5

TABELA 6 - Resultado da Investigação Química Preliminar de *Polygala cyparissias*

EXTRATO AQUOSO

TESTES	RESULTADOS
ácidos fixos	-
ácidos voláteis	+
gomas e mucilagens	+
heterosídeos antociânicos	+
heterosídeos saponínicos	+
taninos condensados	-
taninos hidrolisáveis	-

EXTRATO ALCOÓLICO

TESTES	RESULTADOS
ácidos orgânicos	+
alcalóides	-
cumarinas	-
esteróides e/ou triterpenos	+
fenóis c/ posição orto e meta livres	-
fenóis c/ posição para livre	-
heterosídeos flavônicos	+

- = resultado negativo

+ = resultado positivo

4.2 - Quantificação e Identificação do Óleo Essencial

A extração, por arraste a vapor, de 100 g de raízes frescas de *Polygala cyparissias* rendeu 0.3 % do óleo essencial. A análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (Fig.17) e CGAR-MS mostrou que o principal componente do óleo essencial é o Salicilato de Metila (96 %), confirmado pelo seu espectro de Massa (Fig. 18), sendo seus fragmentos apresentados a seguir:

* CGMS (70 eV) m/z (%): 152 [M⁺] (41); 120 [M-CH₃OH] (100); 92 [M-CO] (63); 65[M-CO] (28)

O esquema abaixo (Fig. 16) mostra a fragmentação do Salicilato de Metila, onde podemos observar a perda de Metanol do íon molecular resultando no íon m/z 120, com 100 % de intensidade. Na sequência ocorre a perda de CO originando os íons m/z 92 e 65.

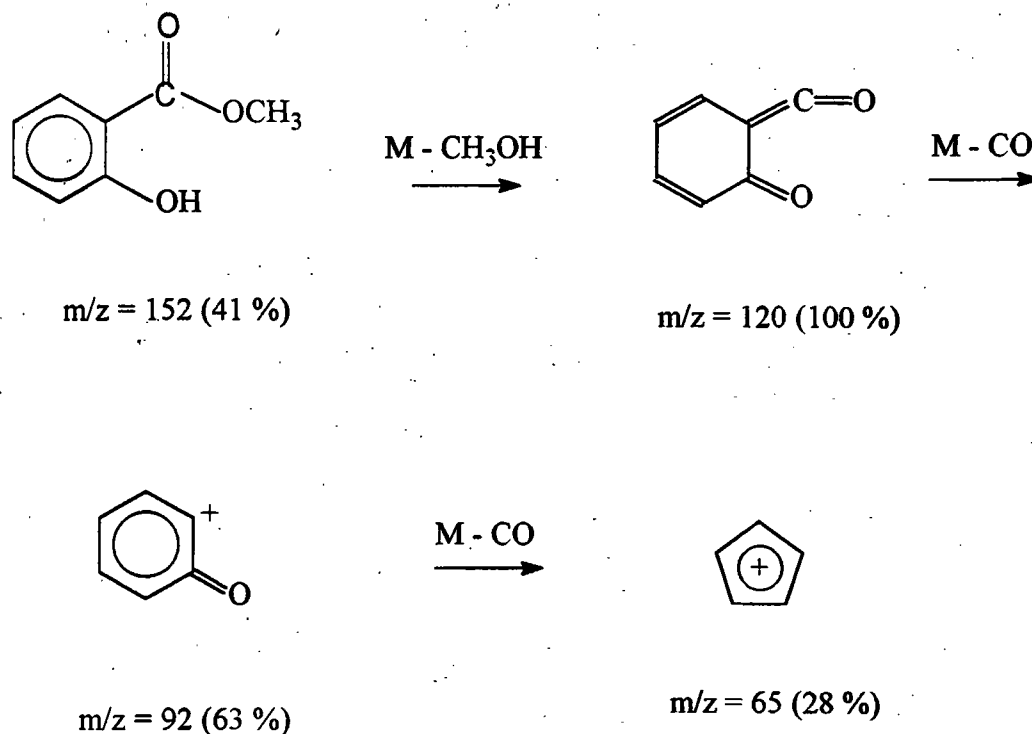


FIGURA 16 - Fragmentação dos principais íons do Salicilato de Metila

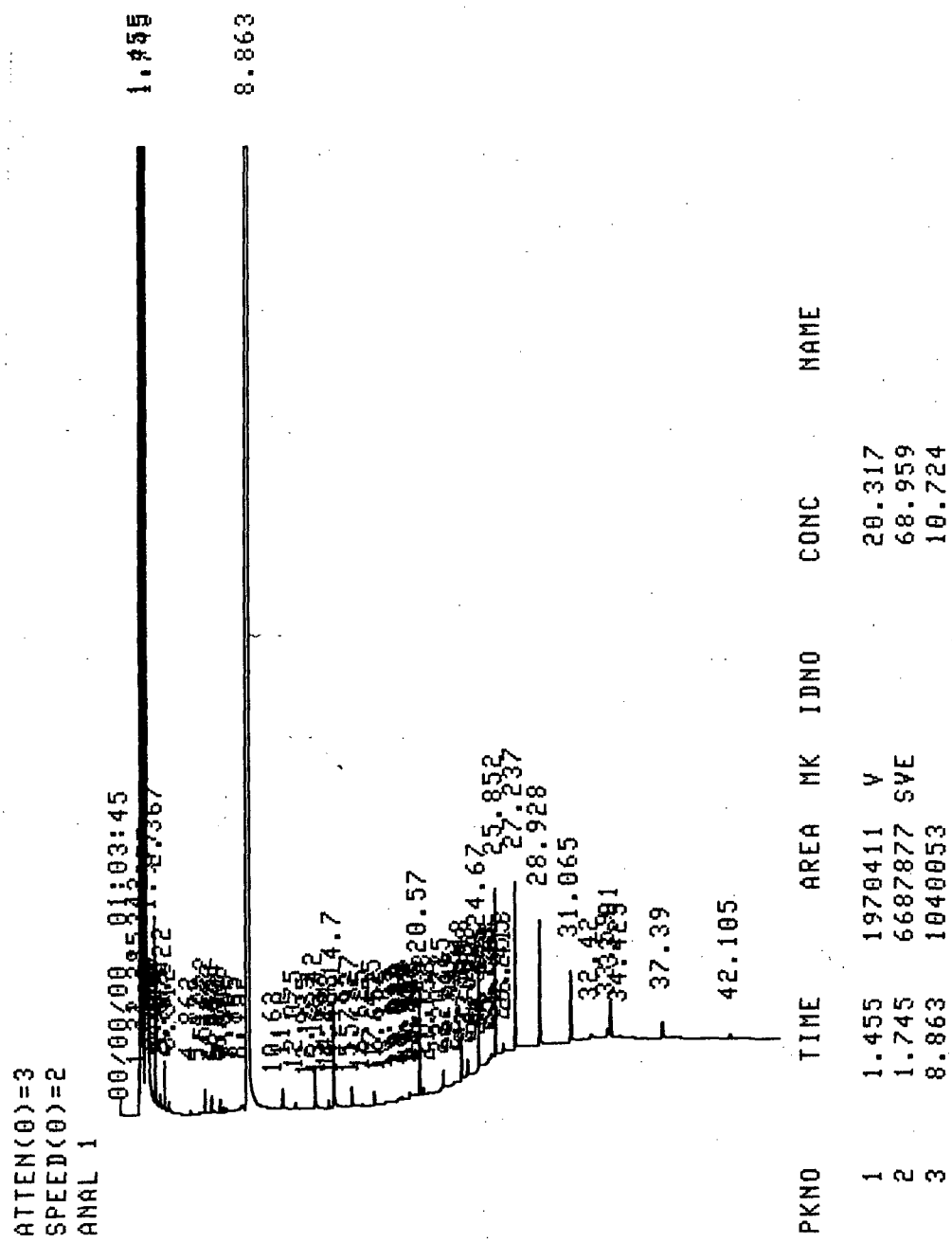


FIGURA 17 - Cromatograma do Óleo Essencial obtido na coluna OV-1 (25m x 0.25 mm d.i.; 0.25 µm), 40 - 250 °C, 10 °C/min., H₂.

Mass Spectrum File: oleoes.01 95-05-04 15:56

Comment: Moacir - Oleo Essencial

Scan: 157 (0- 0) R.T.: 14.23min Base Peak: 120.0 Int:160900(=100%)
100.0%

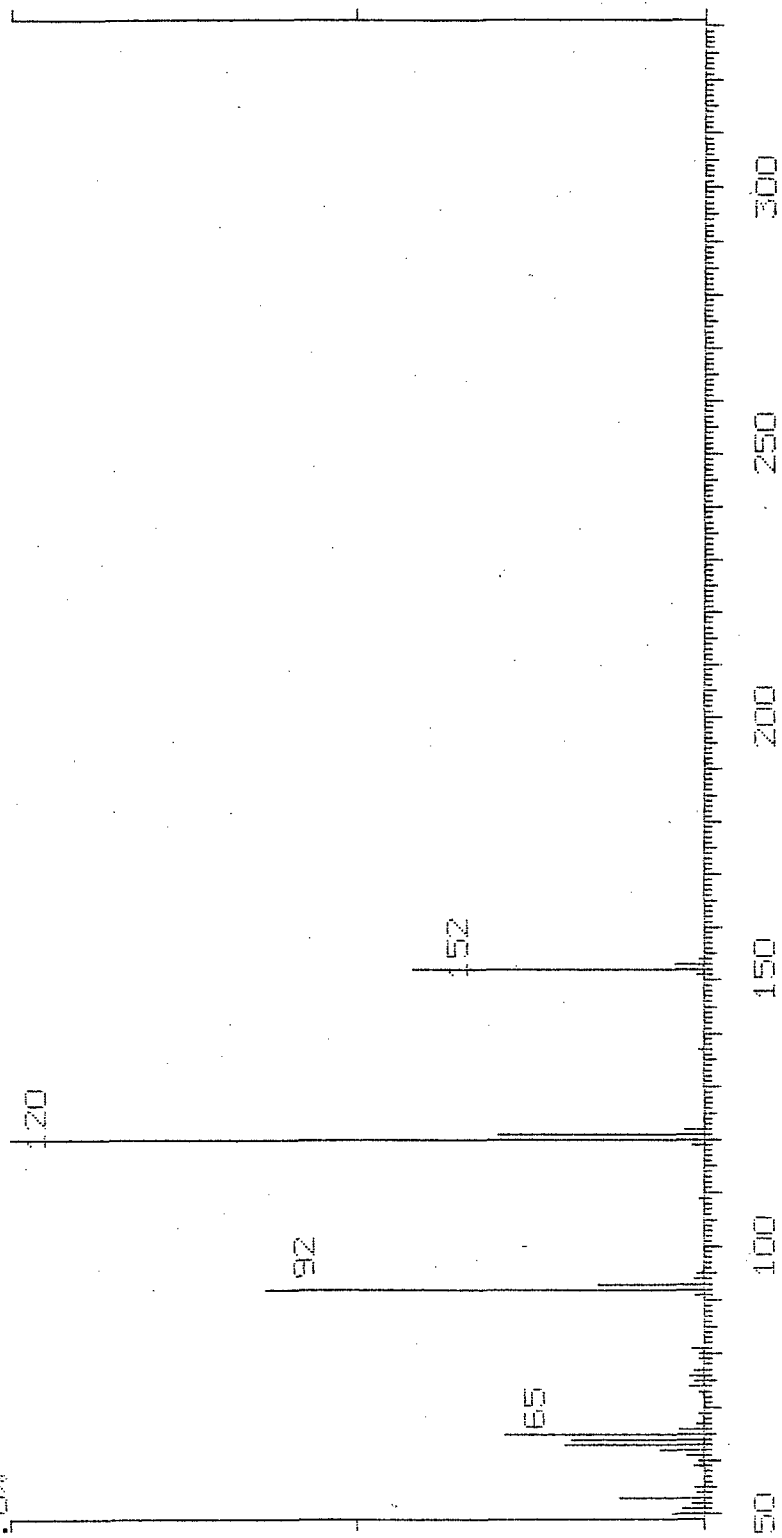


FIGURA 18 - Espectro de Massa do Salicilato de Metila

X

4.3 - Identificação dos Compostos Separados

4.3.1 - H-44 (α -Spinasterol)

O espectro de IV do composto H-44 (Fig.20) apresenta uma forte absorção na região de 3446 cm^{-1} , correspondendo a bandas de vibração de deformação axial da ligação OH. Observa-se também duas bandas intensas na região de 2920 e 2848 cm^{-1} correspondendo a bandas de deformação axial de CH alifático. As absorções em 1706 e 1466 cm^{-1} correspondem a estiramento de ligação C=C não conjugado e vibração de deformação de CH_2 e CH_3 respectivamente [16].

O espectro de Massa (Fig.21) mostra pico molecular m/z 412 (23 %) correspondendo a fórmula molecular de $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$, para uma estrutura contendo 6 insaturações. A fragmentação do espectro de Massa, apresenta entre outros, os fragmentos m/z 300 (26 %) da perda do anel A através de uma retro Diels-Alder no anel B, definindo assim uma dupla ligação nos carbonos C-7 e C-8; m/z 271(100 %) indicando a perda da cadeia lateral [28].

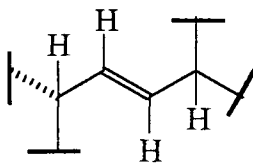
O espectro de RMN^1H (Fig.22 e 23) apresenta um perfil característico de esteróides. Podemos observar:

* duas metilas singlete a 0.55 ppm (Me-18) e 0.79 ppm (Me-19); três metilas dublete a 0.85 ppm (Me-26) com $J=6.3$ Hz, 0.80 ppm (Me-27) com $J=6.4$ Hz e 1.02 ppm (Me-21) com $J=6.6$ Hz; uma metila triplete a 0.80 ppm (Me-29) com $J=7.3$ Hz.

* um multiplete em 3.59 ppm referente a um próton carbinólico em C-3;

* dois duplos dubletes em 5.03 ppm (H-23) e 5.16 ppm (H-22) com constante de acoplamento vicinal ($J=8.52$ Hz) e trans (15.2 Hz) definindo a presença de uma dupla ligação trans-dissubstituída na cadeia lateral como mostra a estrutura parcial "A" observada abaixo.

* um sinal em 5.14 ppm referente ao próton H-7 indicando uma ligação dupla tri-substituída.



Estrutura parcial "A"

A Tabela 7 compara os dados de RMN^1H de H-44 com os dados de literatura para α -Spinasterol [29].

TABELA 7 - Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN ^1H (δ , ppm) de H-44 (300 MHz) e de α -Spinasterol (400 MHz)[29], ambos feitos em CDCl_3 .

PRÓTONS	H-44	α -SPINASTEROL [29]
H-3	3.59 m	3.59 m
H-7	5.14 m	5.15 m
Me-18	0.55 s	0.55 s
Me-19	0.79 s	0.80s
Me-21	1.02 d (6.6 Hz)	1.02 d (6.5 Hz)
H-22	5.16 dd (15.2 Hz)	5.15 dd (15.9 Hz)
H-23	5.03 dd (15.2 Hz)	5.02 dd (15.9 Hz)
Me-26	0.85 d (6.3 Hz)	0.85 d (6.5 Hz)
Me-27	0.80 d (6.4 Hz)	0.80 d (6.5 Hz)
Me-29	0.80 t (7.3 Hz)	0.80 t (7.5 Hz)

Os espectros de RMN ^{13}C e APT (Fig. 24) confirmam a presença de seis metilas (CH_3); nove metilenos (CH_2); oito carbonos metínicos (CH), sendo um deles (71.03 ppm) ligado ao oxigênio em C-3 e dois carbonos C quaternários. O deslocamento químico dos carbonos indica a presença de duas ligações duplas: uma dupla trissubstituída definida pelos sinais 117.42 ppm (CH -7) e 139.52 ppm (C-8), uma dupla trans-dissubstituída pelos sinais 138.16 ppm (CH -22) e 129.37 ppm (CH -23). Assim H-44 foi identificado como sendo α -Spinasterol (Fig. 19). A confirmação destes resultados foi feita através da comparação dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C do composto H-44 com os dados de literatura (Tab. 8). O α -Spinasterol é um esterol incomum e tem sido descrito em poucas espécies de plantas superiores como *Prunella vulgaris* [29], *Amarthospermum schmburghinana* [30] e *Bredemeyera floribunda* [31]. O rendimento do esterol foi de 0.0037 % em relação a 1 Kg do vegetal.

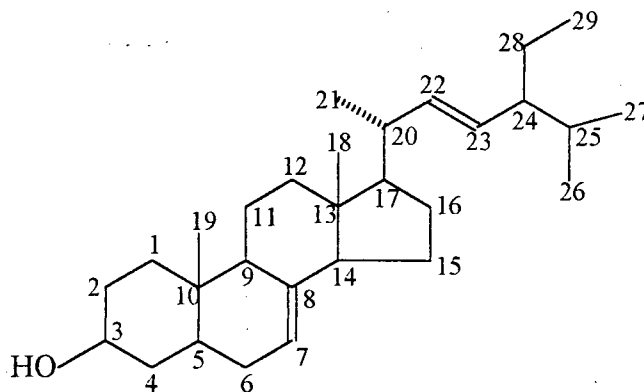


FIGURA 19 - Estrutura do α -Spinasterol

TABELA 8 -Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) de H-44 (75 MHz) e α -Spinasterol (100 MHz) [29], ambos feitos em CDCl_3 .

CARBONOS	H-44	α -SPINASTEROL [29]
C1 - CH_2	37.09	37.1
C2 - CH_2	31.41	31.4
C3 - CH-O	71.03	71.0
C4 - CH_2	37.92	38.0
C5 - CH	40.20	40.2
C6 - CH_2	29.59	29.6
C7 - $=\text{CH}$	117.42	117.4
C8 - $=\text{C}$	139.52	139.5
C9 - CH	49.38	49.4
C10 - C	34.17	34.2
C11 - CH_2	21.51	21.5
C12 - CH_2	39.41	39.4
C13 - C	43.24	43.3
C14 - CH	55.08	55.1
C15 - CH_2	22.99	23.0
C16 - CH_2	28.50	28.5
C17 - CH	55.82	55.8
C18 - CH_3	12.03	12.0
C19 - CH_3	13.03	13.0
C20 - CH	40.83	40.8
C21 - CH_3	21.36	21.4
C22 - $=\text{CH}$	138.16	138.7
C23 - $=\text{CH}$	129.37	129.4
C24 - CH	51.21	51.2
C25 - CH	31.85	31.9
C26 - CH_3	21.09	21.1
C27 - CH_3	18.96	19.0
C28 - CH_2	25.38	25.4
C29 - CH_3	12.24	12.3

Os dados espectroscópicos do composto H-44 são apresentados a seguir:

* Pf: 150 °C (literatura 168-169 °C)

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3446 (OH); 2920; 2848 (CH alif); 1706; 1466 (C=C)

* CGAR-MS (70 eV) m/z (%): 412 [M+] (23); 397 (15); 368 (18); 300 (26); 271 (100); 255 (54); 107 (28); 81 (60); 69 (38)

* CHN (%) : C=77.97; H=10.76; N=0.88; O=10.39

Calculado (%) : C=84.47; H=11.65; O=3.88 (C₂₉H₄₈O + 2 H₂O)

* RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.55 s (3H, Me-18); 0.80 d (3H, J=6.4 Hz, Me-27); 0.80 t (3H, J=7.3 Hz, Me-29); 0.85 d (3H, J=6.3 Hz, Me-26); 1.02 d (3H, J=6.6 Hz, Me-21); 3.59 m (1H, H-3); 5.03 dd (1H, J=15.2 Hz, H-23); 5.16 dd (1H, J=15.2 Hz, H-22); 5.14 m (1H, H-7)

* RMN¹³C/APT (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12.03 (CH₃-18); 12.24 (CH₃-29); 13.03 (CH₃-19); 18.96 (CH₃-27); 21.09 (CH₃-26); 21.36 (CH₃-21); 21.51 (CH₂-11); 22.99 (CH₂-15); 25.38 (CH₂-28); 28.50 (CH₂-16); 29.59 (CH₂-6); 31.41 (CH₂-2); 31.85 (CH-25); 34.17 (C-10); 37.09 (CH₂-1); 37.92 (CH₂-4); 39.41 (CH₂-12); 40.20 (CH-5); 40.83 (CH-20); 43.24 (C-13); 49.38 (CH-9); 51.21 (CH-24); 55.08 (CH-14); 55.82 (CH-17); 71.03 (CH-3); 117.42 (=CH-7); 129.37 (=CH-23); 138.16 (=CH-22); 139.52 (=C-8)

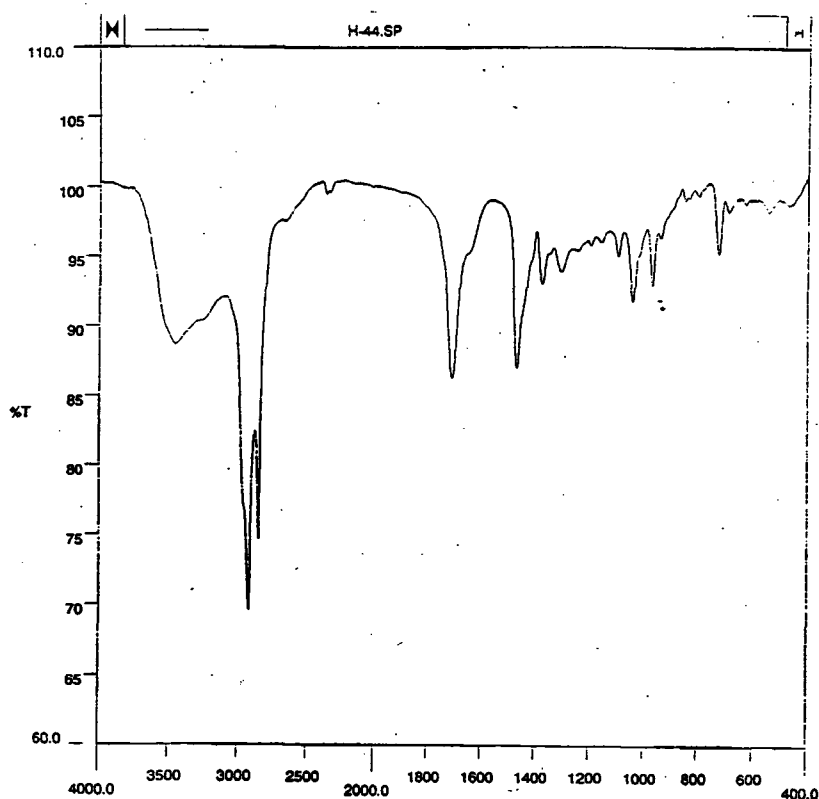


FIGURA 20 - Espectro de Infravermelho do composto H-44

Mass Spectrum File: pch44 .02 95-04-19 12:20
Comment: EGS Input: pch44 .01 moacir - pc-h-44

Scan: 3 (330- 325) R. T.: 27.00min Base Peak: 55.0 Int: 8120(=100%)

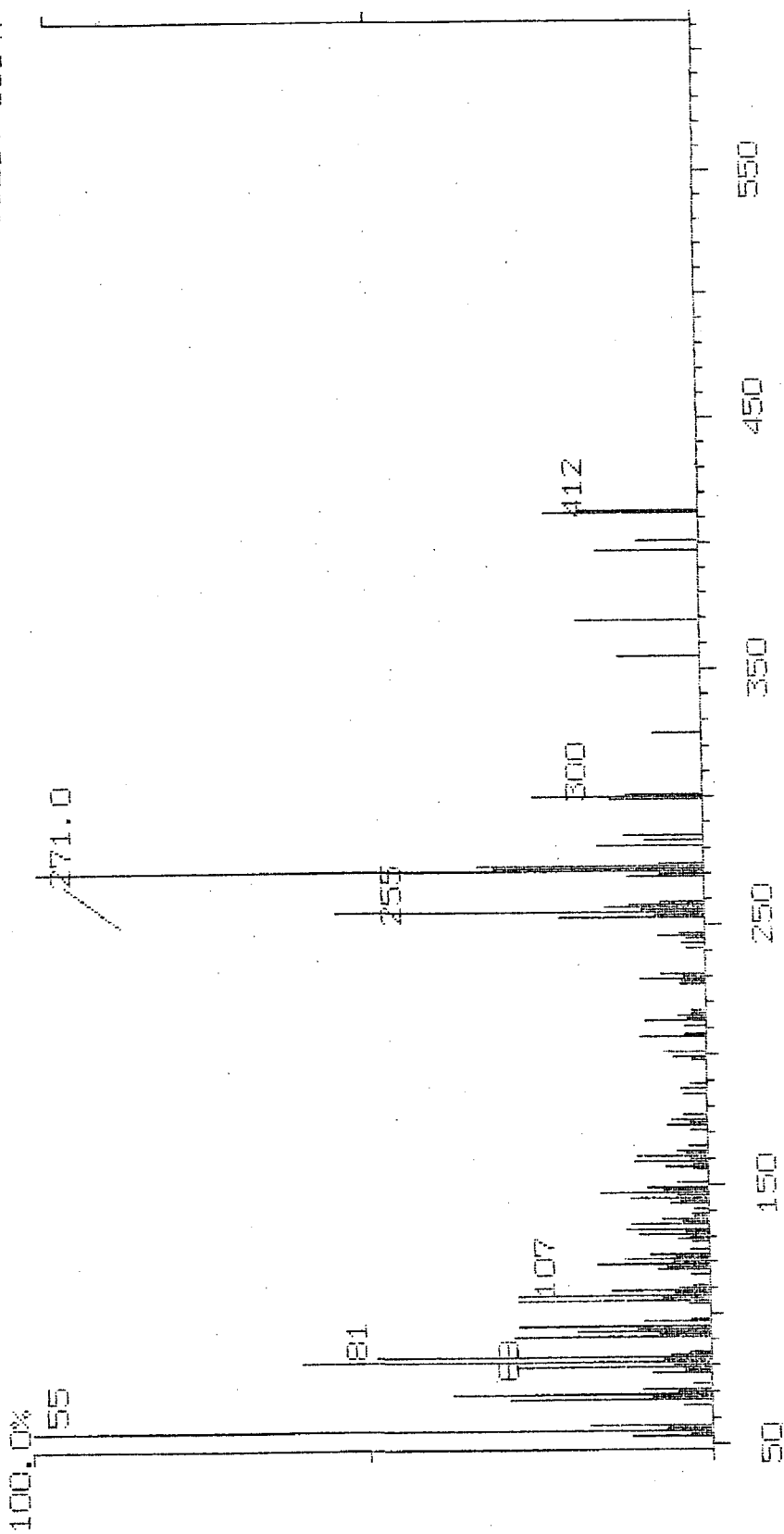


FIGURA 21 - Espectro de Massa do composto H-44

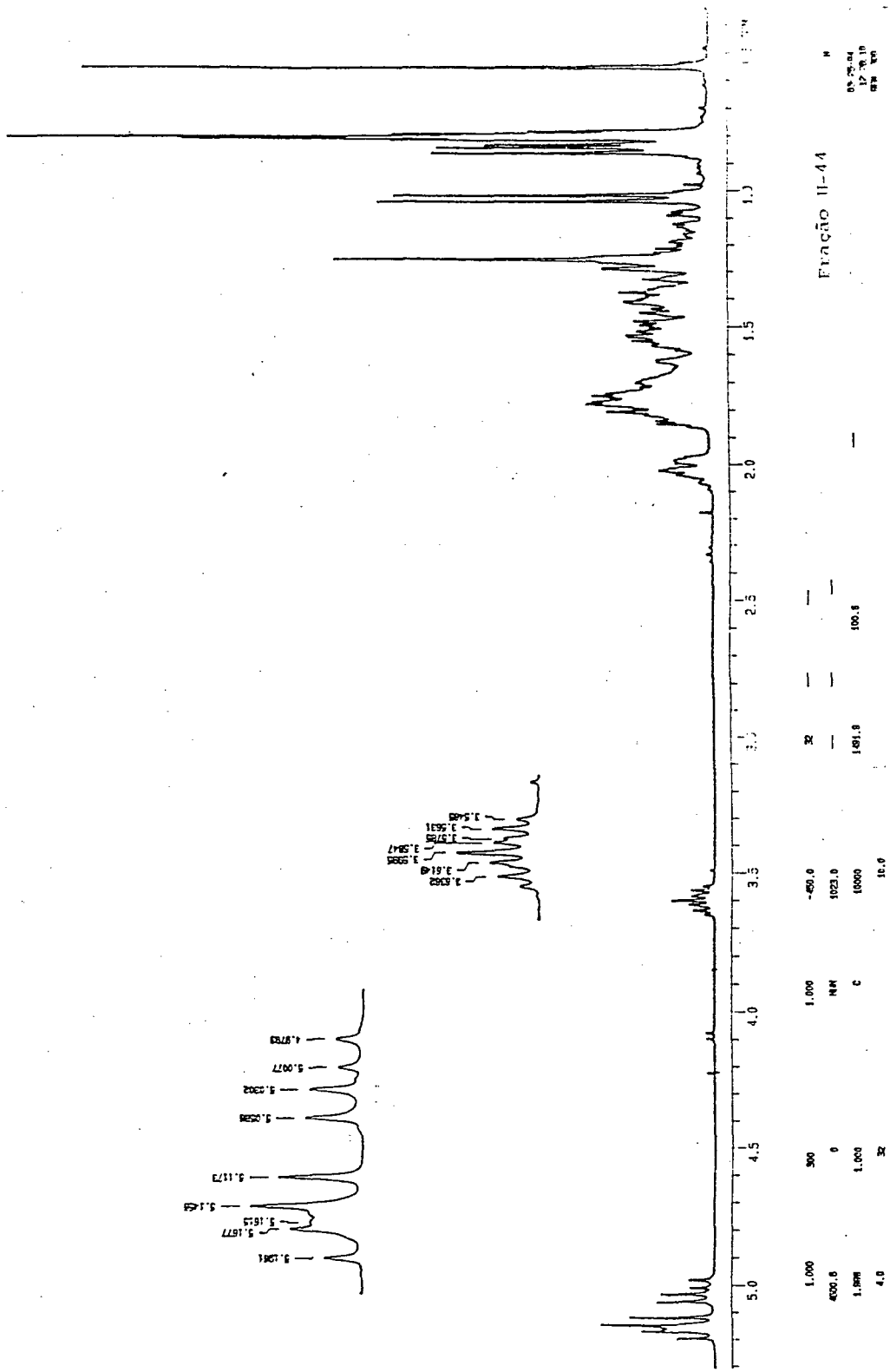
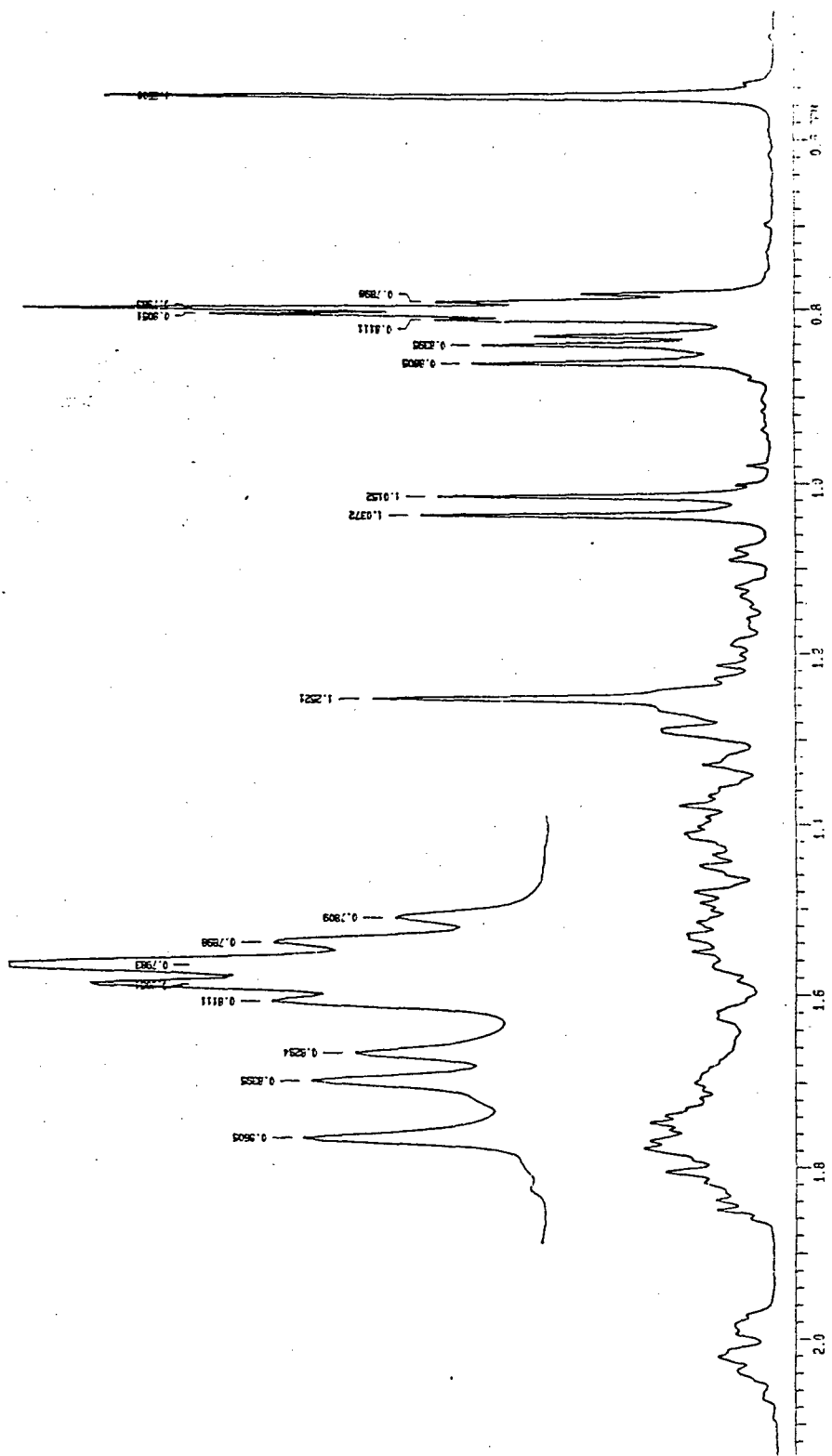


FIGURA 22 - Espectro de RMN ¹H do composto H-44 em CDCl₃



Fracionamento II-44

FIGURA 23 - Espectro de RMN ¹H expandido na região de 0.5 a 2.0 ppm do composto H-44 em CDCl₃

4.3.2 - H-29 (Ácido Salicílico)

Analisando o espectro de IV de H-29 (Fig.25) podemos observar uma banda de estiramento de ligação OH em 3236 cm^{-1} . Na região de 3004 cm^{-1} observa-se uma banda de deformação axial do CH aromático. Um pico intenso em 1660 cm^{-1} indica deformação axial de grupo carboxila COOH. Em 1484 cm^{-1} observa-se um pico intenso atribuídos às deformações axiais das ligações C=C de anel aromático. A análise elementar CHN sugere a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$.

O espectro de próton (Fig. 27) mostra um padrão de sinais para um composto aromático orto-dissubstituído.

- * um multiplete em 6.98 ppm equivalente a dois prótons aromáticos;
- * um triplete em 7.53 ppm equivalente a um próton aromático;
- * um duplo dublete em 7.94 ppm equivalente a um próton aromático;
- * um singlete em 10.37 ppm equivalente a um próton de hidroxila (OH).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 29) e DEPT-135 (Fig.30) mostra sete sinais, que juntamente com os dados do espectro de próton confirmam a fórmula molecular. Um carbono em 174.97 ppm referente a uma carboxila, dois carbonos quaternários sendo um ligado a oxigênio (162.20 ppm) e quatro carbonos CH. A comparação destes dados com a literatura [32] [33] permitiu a identificação de H-29 como sendo o Ácido Salicílico. O rendimento do composto H-29 foi de 0.0046 % para 1 Kg do vegetal. O Ácido Salicílico é indicado como o precursor do Salicilato de Metila. Abaixo seguem os dados espectroscópicos do composto H-29:

* P.f.: $156\text{ }^\circ\text{C}$ (Literatura $159\text{ }^\circ\text{C}$)

* IV $\cup_{\text{max}}^{\text{KBr}}\text{ cm}^{-1}$: 3236 (OH); 3004 (CH arom.); 1660 (C=O); 1484 (C=C)

* CHN (%): C=61.10; H=4.10; N=0.35; O=34.45

Calculado (%): C=60.87; H=4.35; O=34.78 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$)

*RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.98 m (2H, Ha e Hb); 7.26 s (1H, OH); 7.53 t (1H, J=1.5 e 7.9 Hz, Hc); 7.94 dd (1H, J=1.5 e 8.0 Hz, Hd); 10.37 s (1H, OH)

* RMN ^{13}C /DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 111.29 (C-COOH); 117.86 (CH-b); 119.63 (CH-a); 130.97 (CH-d); 137.04 (CH-c); 162.20 (C-OH); 174.97 (C=O)

Obs: Os prótons e carbonos designados de a,b,c,d podem ser vistos na figura 28.

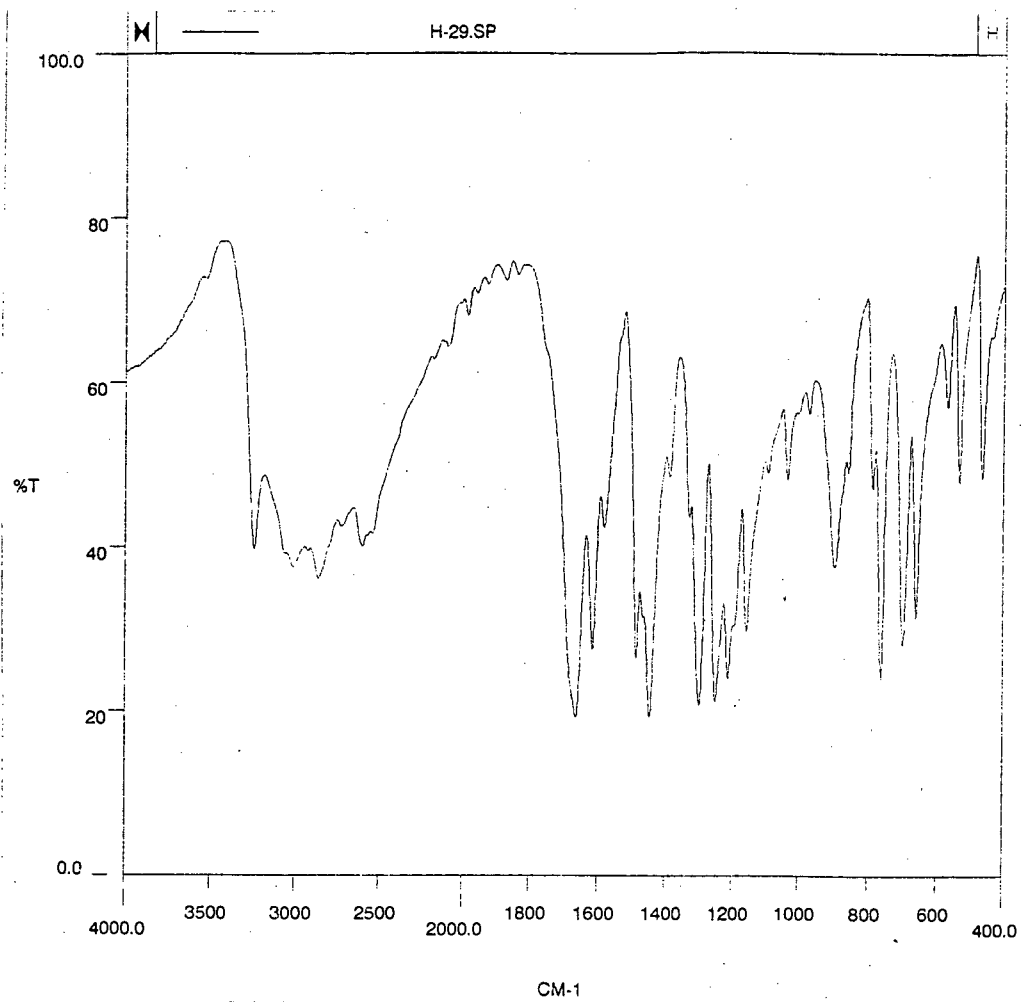


FIGURA 25 - Espectro de Infravermelho do composto H-29

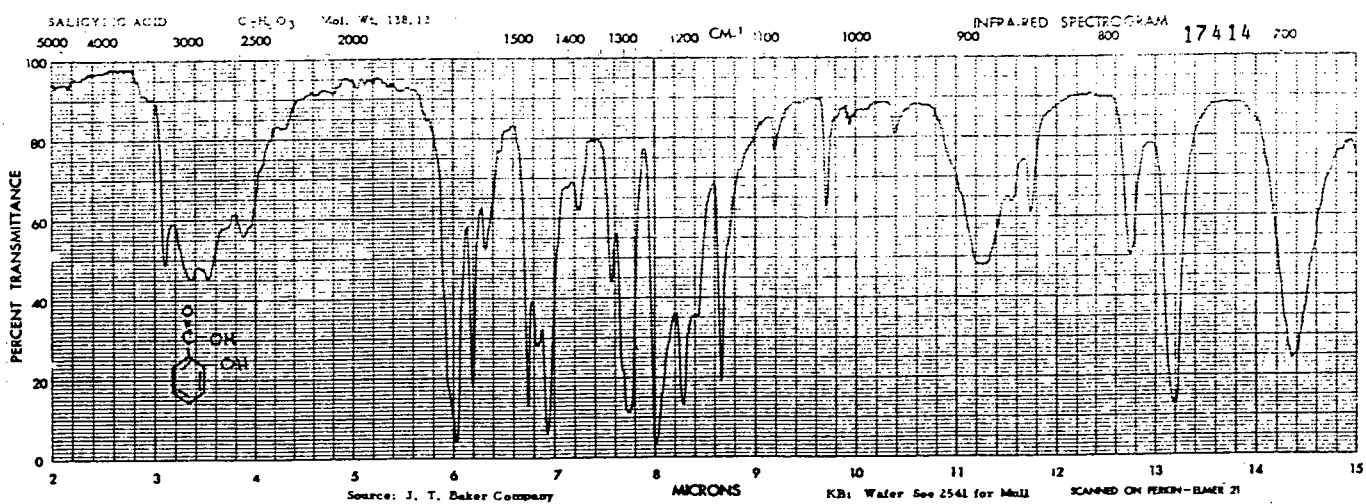
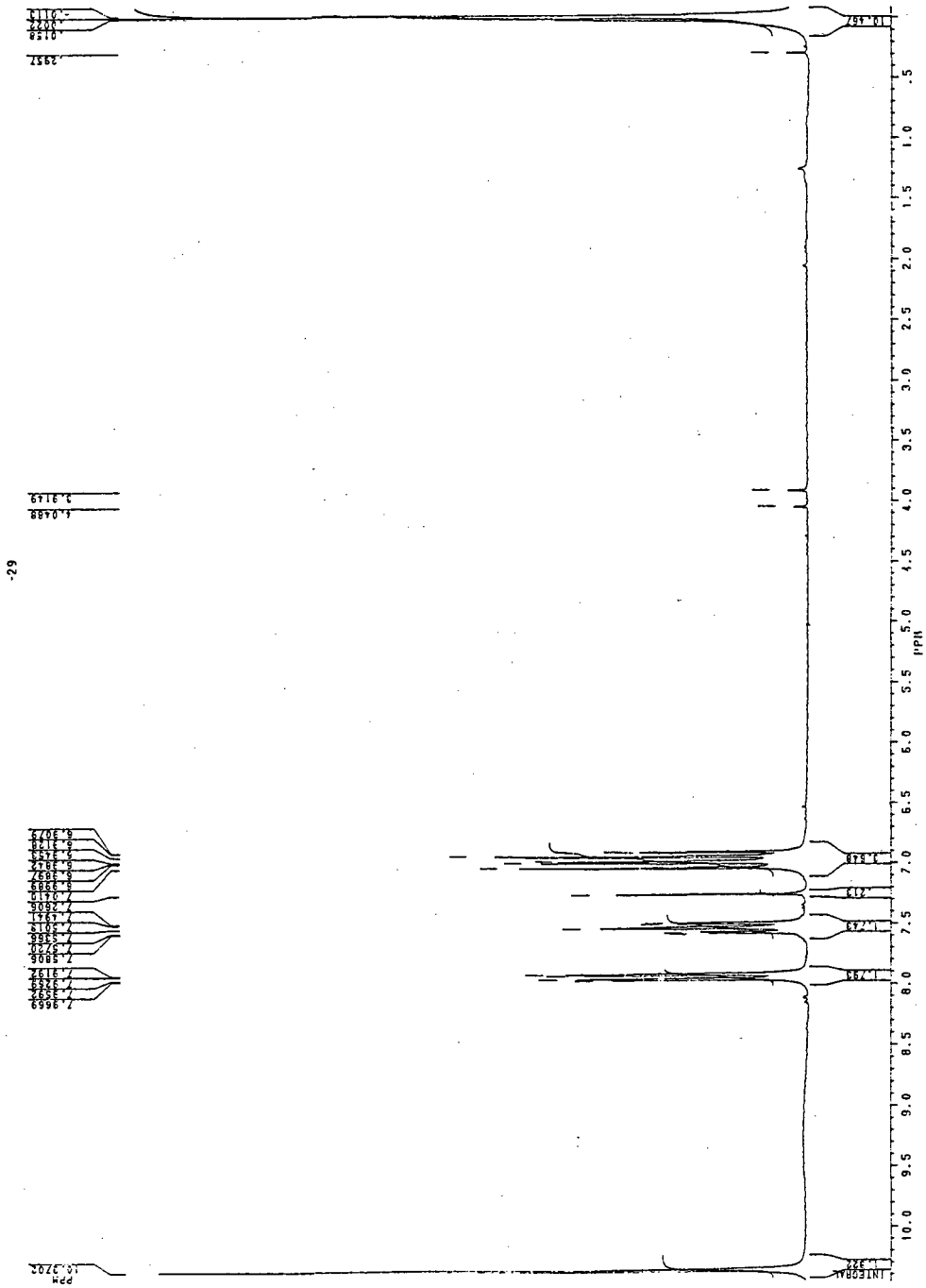


FIGURA 26 - Espectro de Infravermelho do Ácido Salicílico



-29

FIGURA 27 - Espectro de RMN ¹H do composto H-29 em CDCl₃

SALICYLIC ACID

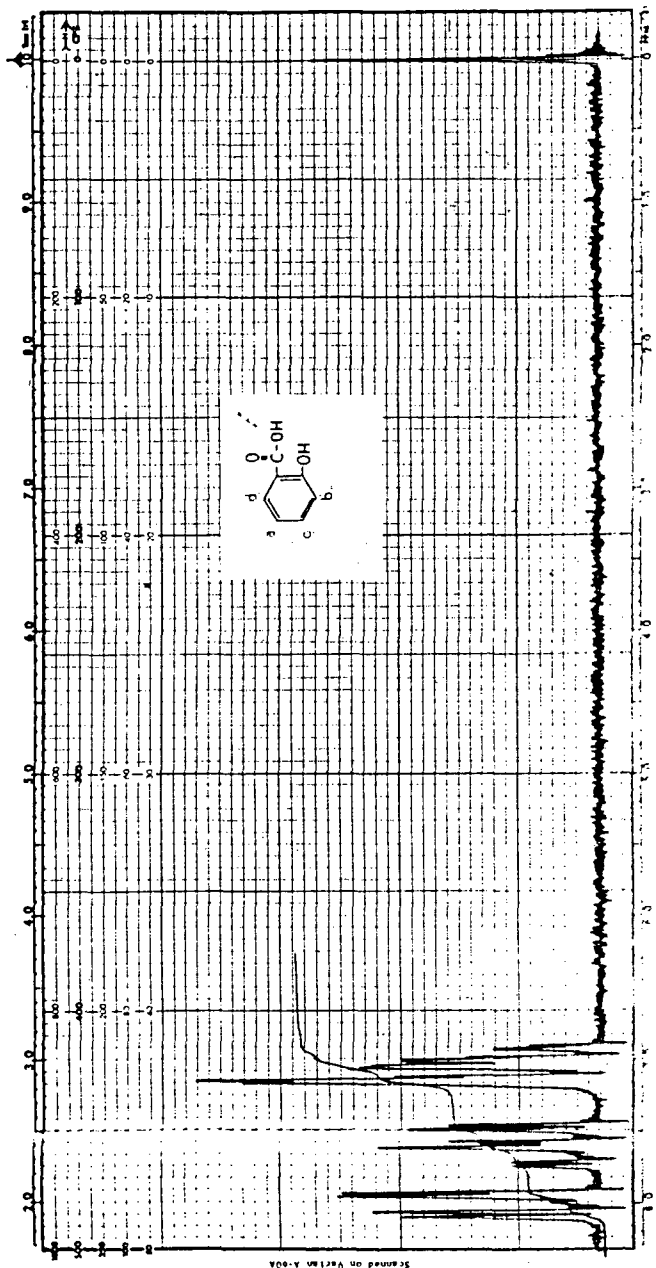
IR 2541; 17414

C₇H₆O₃ Mol. Wt. 138.12 M. P. 159°C
 Source: J. T. Baker Chemical Company,
 Phillipsburg, N. J.



Filter bandwidth 4 cps
 Sweep time: 250 sec
 Sweep width: 500 cps
 Sweep offset: 80 cps
 Spectrum amp: 80 (spec. amp. 10)
 Integral amp: 80 (spec. amp. 10)
 Conc. 60mg/0.5ml Trifluoroacetic acid

ASSIGNMENTS	
a	7.02
b	7.09
c	7.59
d	8.00
e	
f	
g	
OH's are unobserved	



6246 M

FIGURA 28 - Espectro de RMN ¹H do Ácido Salicílico

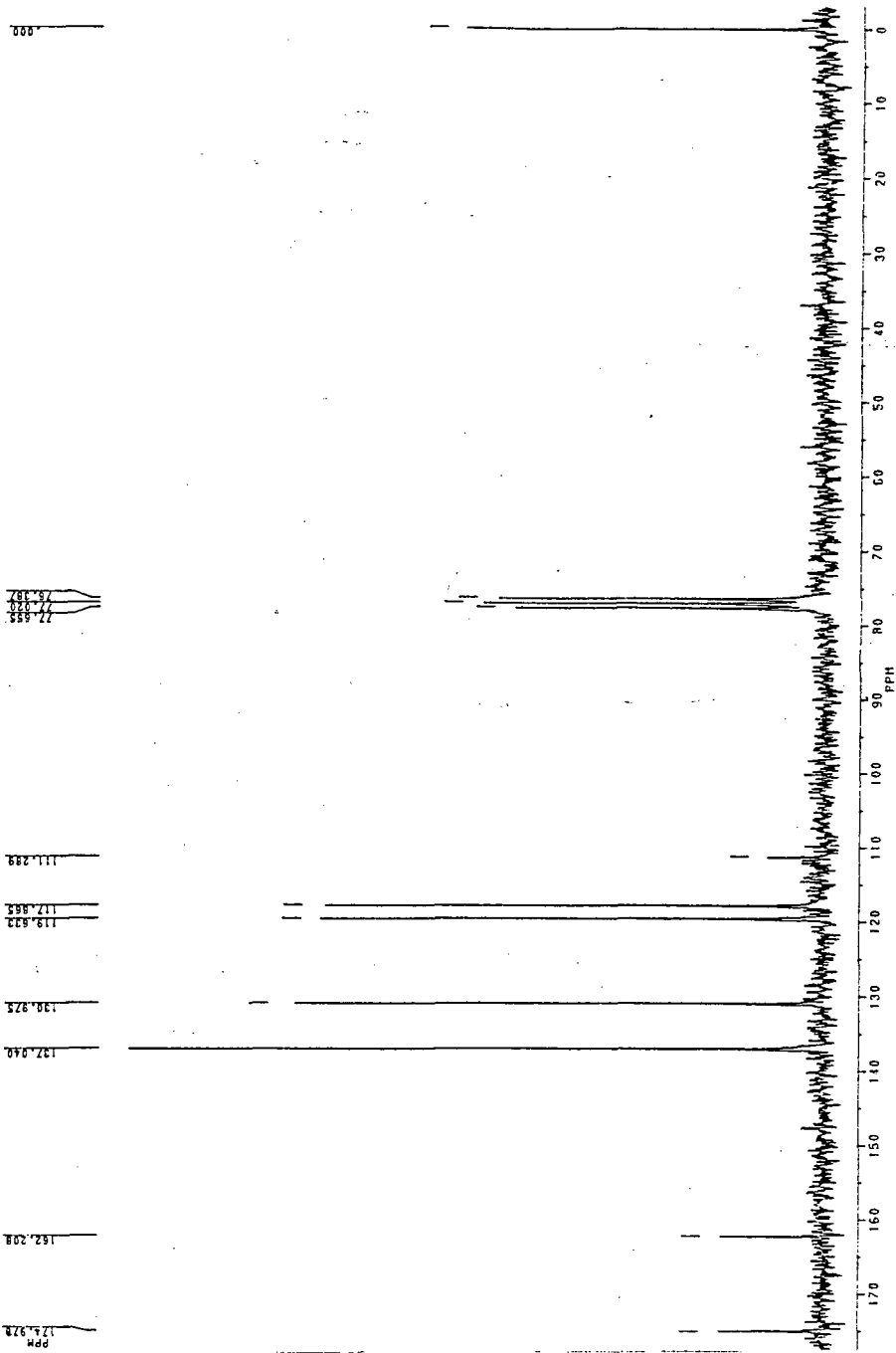


FIGURA 29 - Espectro de RMN ^{13}C do composto H-29 em CDCl_3

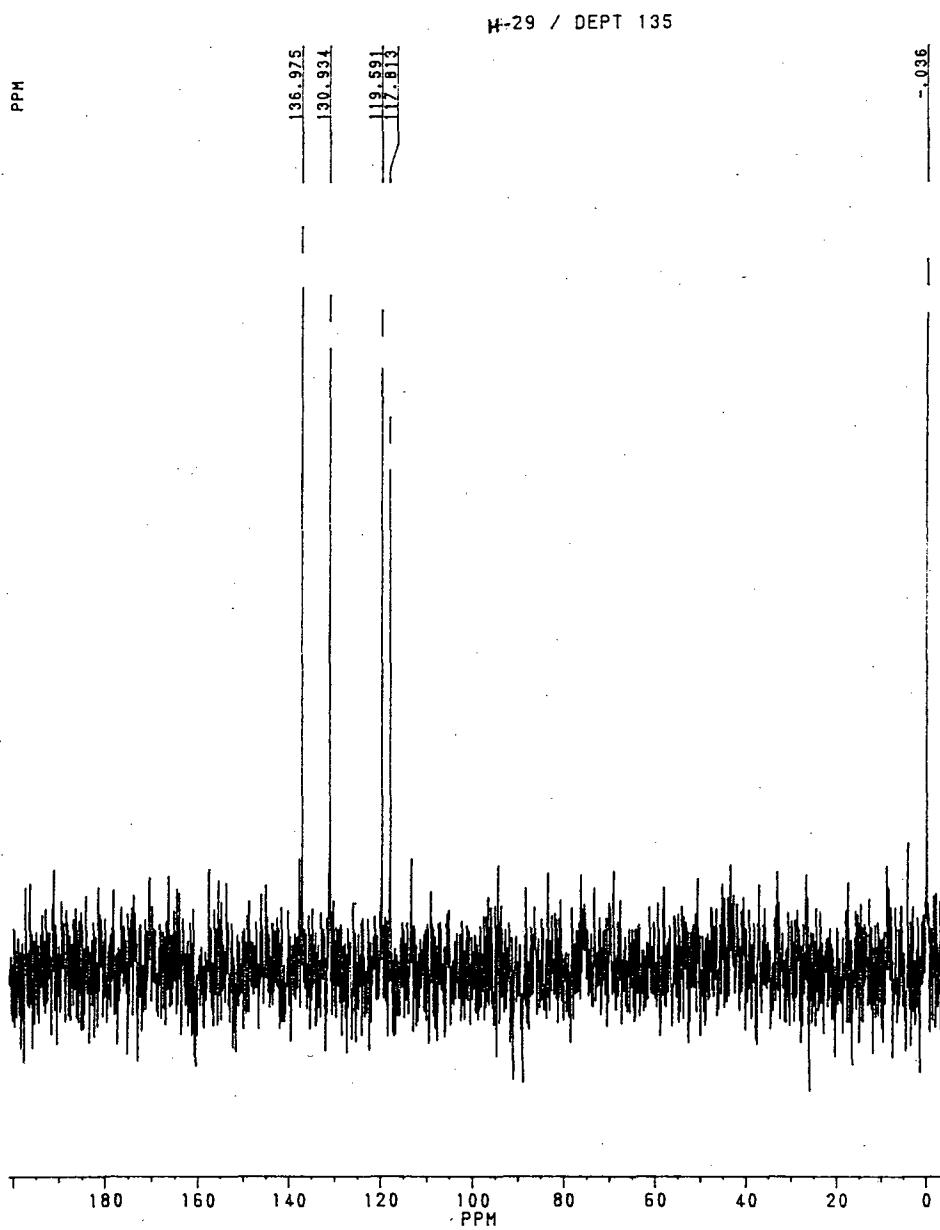


FIGURA 30 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135$ do composto H-29 em CDCl_3

4.3.3 - PC 01 (1,3-dihidroxi-7-metoxixantona)

O espectro de UV em MeOH (Fig.32) exibiu quatro bandas de absorção em 234.5; 255.2; 306.3 e 366.0 nm características de uma xantona. Deslocamentos batocrômicos foram observados na presença de reagentes usuais de deslocamento.

Os dados obtidos no espectro de IV de PC 01 (Fig.33) mostraram uma forte absorção em 3366 cm^{-1} característica da vibração de deformação axial de ligação OH. As bandas de absorção em 3096 e 2926 cm^{-1} indicam a presença de deformações axiais de ligação CH de carbono aromático e alifático, respectivamente. Em 1642 cm^{-1} apresenta um sinal intenso característico de carbonila conjugada (C=O). Em 1604 , 1578 e 1484 cm^{-1} observa-se sinais intensos correspondendo a deformações axiais das ligações C=C de anel aromático no sistema conjugado.

O espectro de RMN¹H (Fig.34), obtido em C₅D₅N mostra um singlete em campo baixo (13.60 ppm) referente a um grupo hidroxila quelado, indicando a presença de um grupo OH na posição C-1 da estrutura de uma xantona. Um singlete em 3.71 ppm com intensidade para três prótons indica a presença de um grupo metoxila.

Na região de prótons aromáticos, observa-se sinais referentes a cinco prótons em dois padrões distintos de acoplamento aromático:

* um par de dubletes centrados em 6.71 ppm (H-4) com constante de acoplamento meta $J=2.13\text{ Hz}$ e em 6.75 ppm (H-2) com constante de acoplamento meta $J=2.13\text{ Hz}$, definindo o padrão de substituição do anel A nas posições 1 e 3.

* um dublete centrado em 7.79 ppm com constante de acoplamento meta $J=2.85\text{ Hz}$ define o próton H-8 sob a influência do cone de desproteção anisotrópica da carbonila e indica conseqüentemente uma substituição em C-7. O duplo dublete centrado em 7.36 ppm ($J=2.85$ e 9.0 Hz) com constantes de acoplamento orto e meta é atribuído ao próton H-6 e o dublete centrado em 7.41 ppm ($J=9.0\text{ Hz}$) com constante de acoplamento orto refere-se ao próton H-5, confirmando o padrão de substituição do anel B na posição C-7.

Os espectros de RMN¹³C e APT (Fig. 35), obtido em C₅D₅N confirmam a presença de um grupo metoxila através do sinal em 55.81 ppm e dos cinco carbonos CH aromáticos em 94.91 ppm (CH-4), 99.26 ppm (CH-2), 106.15 ppm (CH-8), 119.43 ppm (CH-5) e 124.71 ppm (CH-6). Mostra cinco carbonos quaternários C aromáticos oxigenados em 151.03 ppm (C-4b), 156.46 ppm (C-4a),

158.64 ppm (C-7), 164.46 ppm (C-3) e 167.53 ppm (C-1), sendo que estes valores podem ser interconversíveis. Apresenta também dois carbonos aromáticos quaternários em campo mais alto 103.32 ppm (C-8b) e 121.44 ppm (C-8a). Finalmente em 180.65 ppm pode ser observado o sinal para a carbonila conjugada.

Estes dados estão de acordo com a estrutura de uma xantona 1,3,7-trioxigenda.

A posição do grupo metoxila foi deduzida inicialmente por experimentos de Ultravioleta usando reagentes de deslocamento. Assim deslocamentos bactocrômicos foram observados sob a adição de $AlCl_3$ (Fig.36), que forma um complexo de Alumínio englobando dois Oxigênios, neste caso um do grupo carbonila e o outro necessariamente deve ser da posição 1, indicando a presença de um grupo hidroxila (OH) na posição C-1 da estrutura da xantona. A adição de gotas de HCl na solução de $AlCl_3$ indica que a hidroxila da posição 1 não possui vizinhança a outra hidroxila, sendo que esta última deve necessariamente estar na posição C-2. Assim o deslocamento bactocrômico observado com $AlCl_3$ permanece inalterado com a adição de HCl, podendo este ser observado na Figura 37, indicando que não há hidroxila na posição 2 da referida estrutura, condizendo assim com uma substituição 1,3 do anel A observada no espectro de próton.

A confirmação do grupo hidroxila na posição 3 foi feita através de experimentos de irradiação em $RMN^1 H$ usando a técnica DIFNOE [34] (Fig. 38 e 39) obtendo-se os seguintes resultados:

*irradiação do próton H-4 (6.71 ppm) = DIFNOE negativo;

*irradiação do próton H-8 (7.79 ppm) = DIFNOE positivo, destacando somente a absorção da metoxila em 3.71 ppm;

*irradiação da metoxila (OMe-7) em 3.71 ppm = DIFNOE positivo, destacando somente o sinal referente a H-8 em 7.79 ppm.

O espectro de Massas de PC 01 (Fig.40) mostrou o pico molecular a m/z 258, sendo compatível com a estrutura mostrada na Figura 31. Os principais caminhos de fragmentação do espectro de Massas de PC 01 estão sugeridos na Figura 41, onde podemos observar a formação do íon benzotropílio, característico de xantonas hidroxiladas e/ou metoxiladas [35].

Os dados espectrais de PC 01 confirmam a estrutura 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona com os dados de literatura para a xantona iso-gentisin isolada anteriormente de *Gentiana lutea* [14] e *Swertia petiolata* [36], porém descrita pela primeira vez em *Polygala cyparissias* no presente trabalho.

Obtivemos como rendimento desta xantona 0.0019 % , sendo este valor calculado em relação a 1 Kg do vegetal.

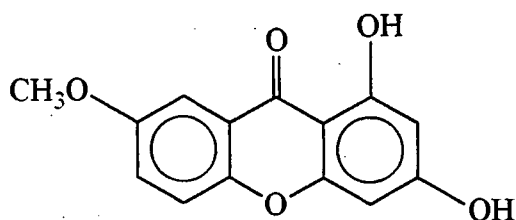


FIGURA 31 - Estrutura de PC 01 (1,3-dihidroxi-7-metoxixantona)

Os dados espectroscópicos do composto PC 01 são vistos abaixo:

* Pf: 218 °C (Literatura 245-246 °C)

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 234.5; 255.2; 306.3; 366.0

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{AlCl}_3}$ nm: 210.2; 229.7; 271.7; 326.4; 418.4

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{HCl}}$ nm: 211.0; 229.5; 272.0; 325.4; 417.9

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3366 (OH); 3096 (CH arom); 2926 (CH alif); 1642 (C=O); 1604; 1578; 1484 (C=C)

* EM (70 eV) m/z (%): 258 [M⁺] (100); 243 [M-CH₃] (25); 228 [M-CH₂O] (23); 215 [M-CO] (2.7); 187 [M-CO] (29); 69 (28)

* RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 3.71 s (3H, OCH₃); 6.71 d (1H, dd (1H, J=2.85 e 9.12 Hz, H-6); 7.79 d (1H, J=2.85 Hz, H-8); 13.60 s (1H, OH) J=2.13 Hz, H-4); 6.75 d (1H, J=2.13 Hz, H-2); 7.41 d (1H, J=9.0 Hz, H-5); 7.36

* RMN ¹H - DIF NOE (300 Mhz, C₅D₅N) δ (ppm):
irradiação 7.79 (H-8) : sinal em 3.71 (OCH₃);
irradiação 3.71 (OCH₃) : sinal em 7.79 (H-8) e 7.36 (H-6)

* RMN ¹³C - APT (75 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 55.81 (OCH₃); 94.91 (CH-4); 99.26 (CH-2); 103.32* (C-8b); 106.15 (CH-8); 119.43 (CH-5); 121.44* (C-8a); 124.71 (CH-6); 151.03* (C-4b); 156.46* (C-4a); 158.64* (C-7); 164.46* (C-3); 167.53* (C-1); 180.65 (C=O)

* os valores podem ser interconversíveis

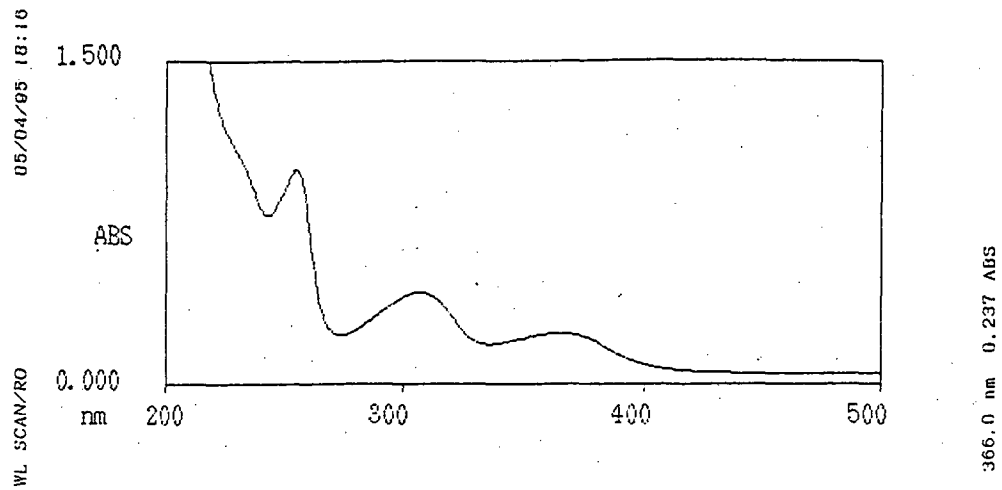


FIGURA 32 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 01

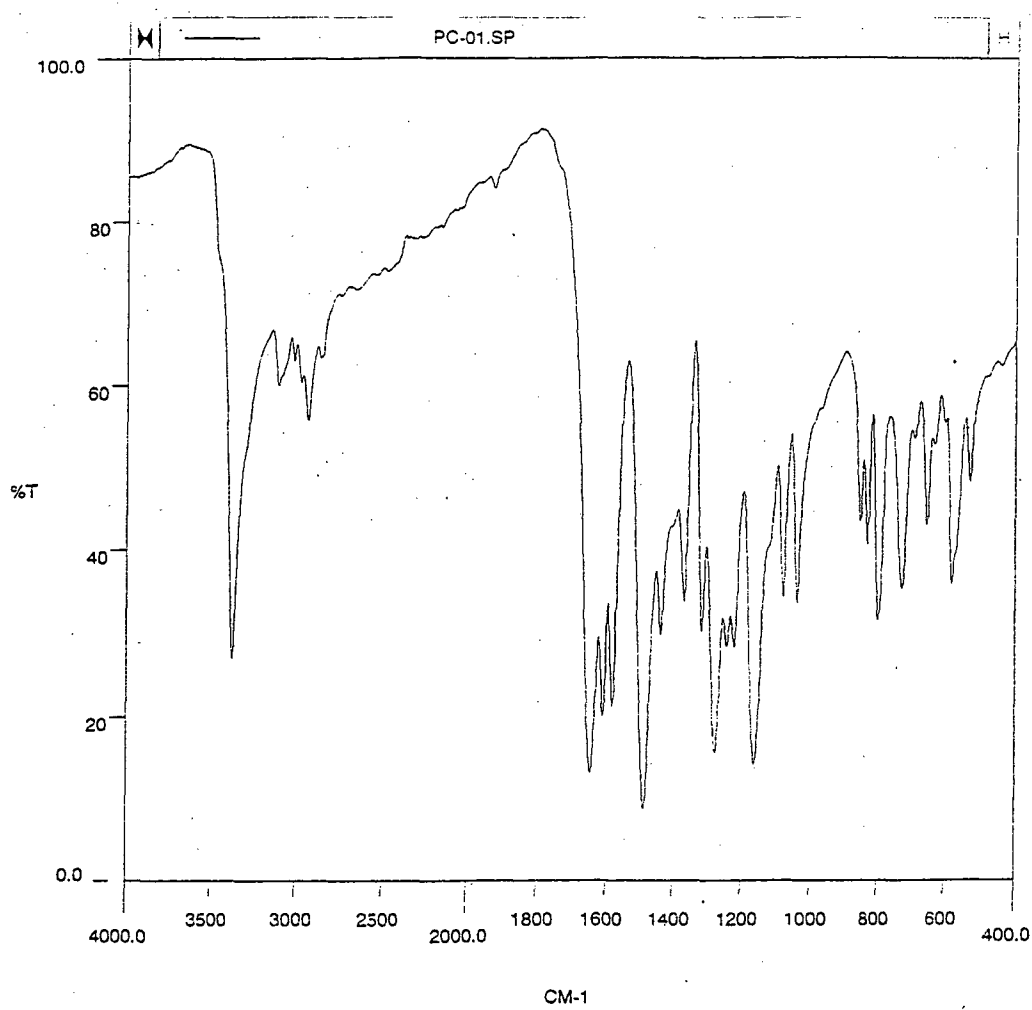


FIGURA 34 - Espectro de Infravermelho do composto PC 01

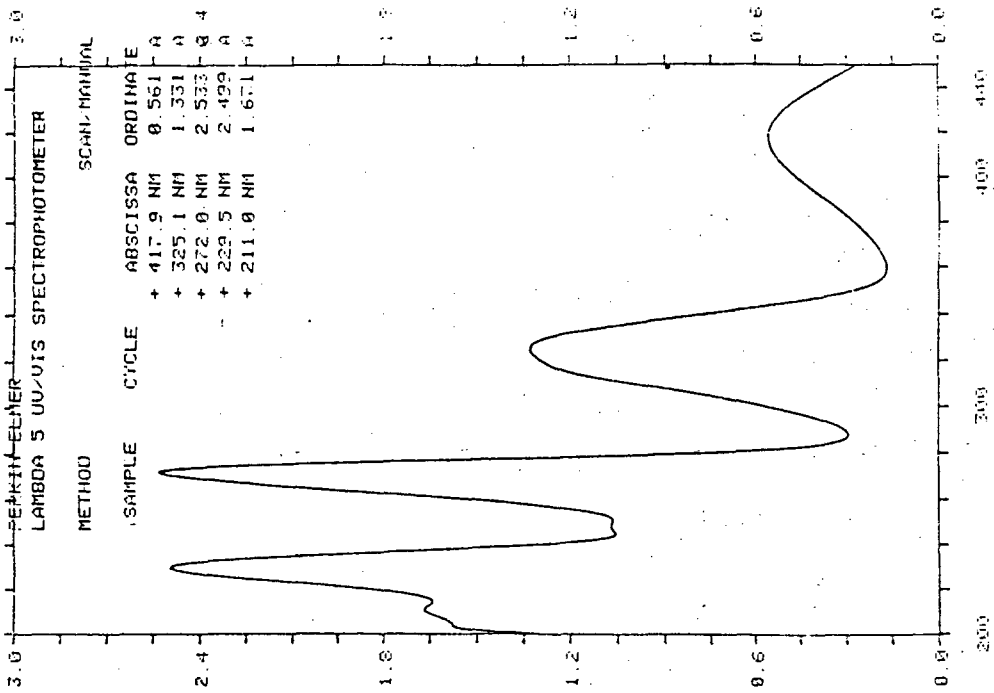


FIGURA 37 - Espectro de UV em AlCl_3 + HCl de PC 01

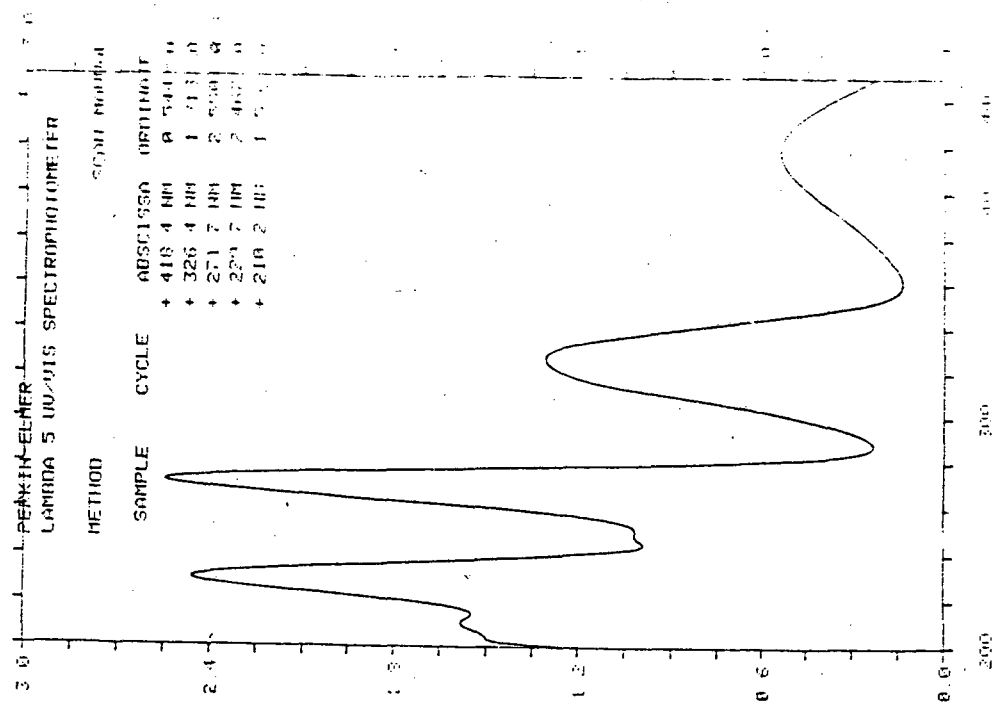


FIGURA 36 - Espectro de UV em AlCl_3 de PC 01

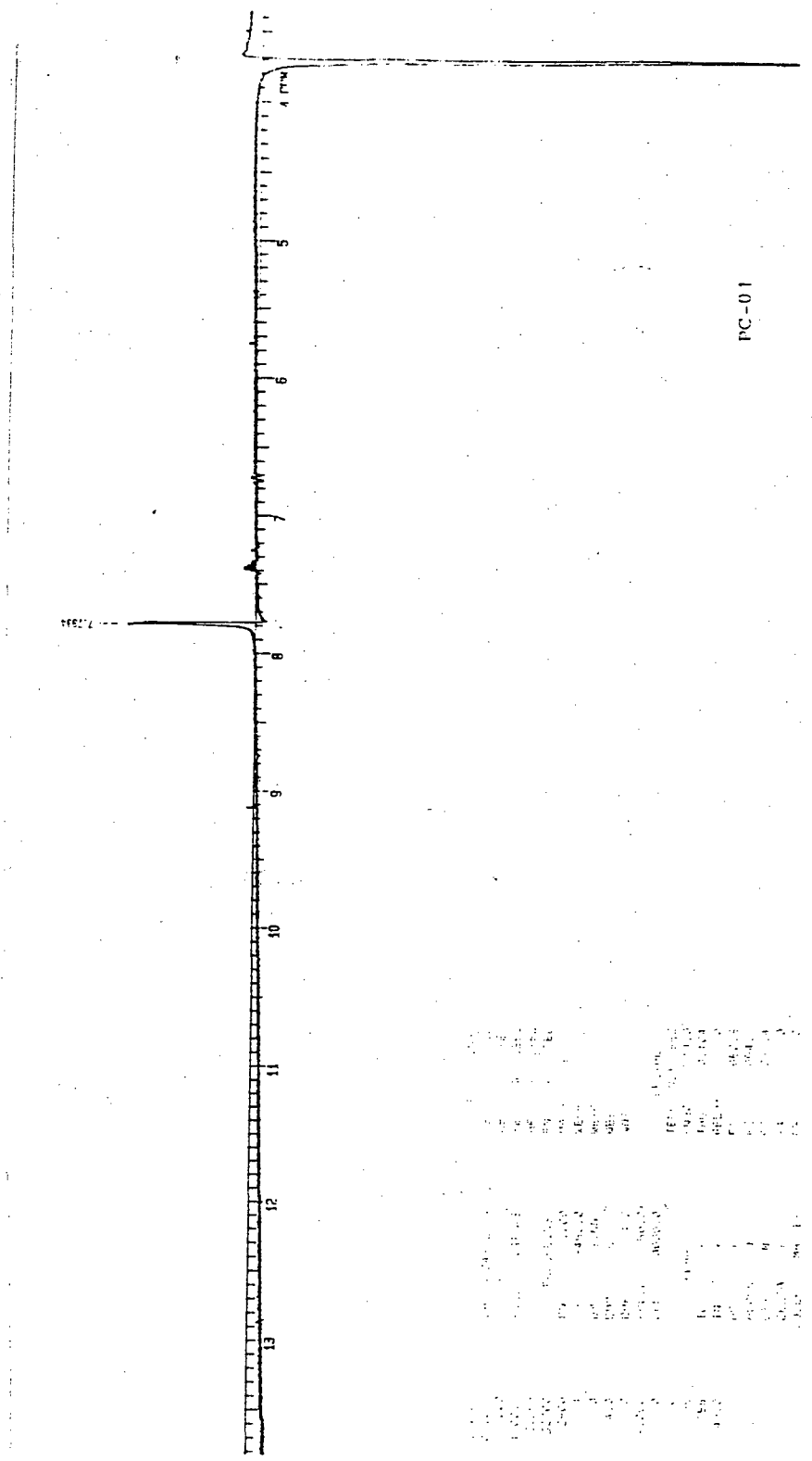


FIGURA 38 - Espectro de RMN ^1H /DIFNOE (irradiação em 3.71 ppm) do composto PC 01

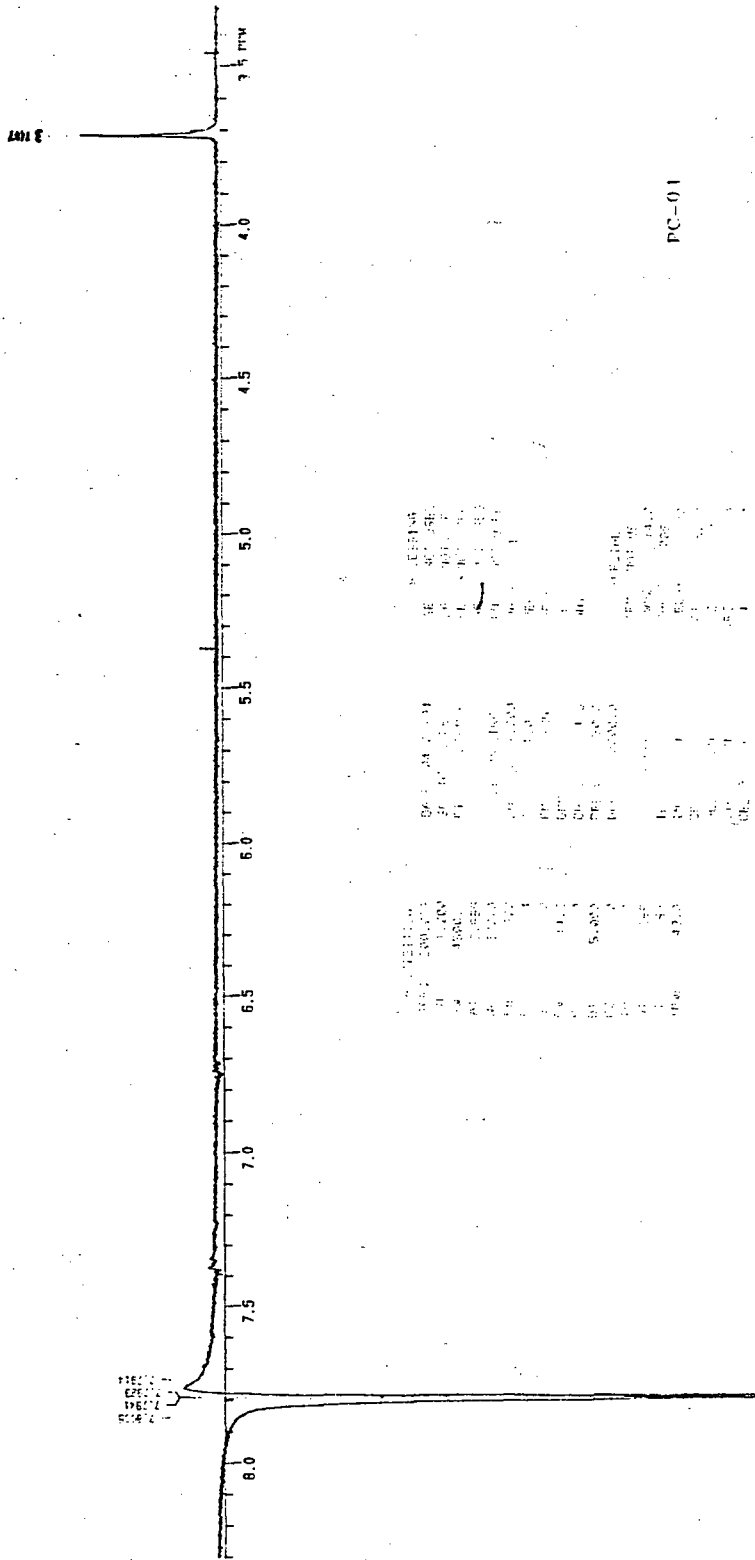


FIGURA 39 - Espectro de RMN ¹H/DIFNOE (irradiação em 7.79 ppm) do composto PC 01

Mass Spectrum File: PC-01 .01 95-04-20 10:29
Comment: moacir - amostra pc-01

Scan: 215 (D- 0) R.T.: 7.23min Base Peak: 258.0 Int: 61000 (=100%)
100.0%

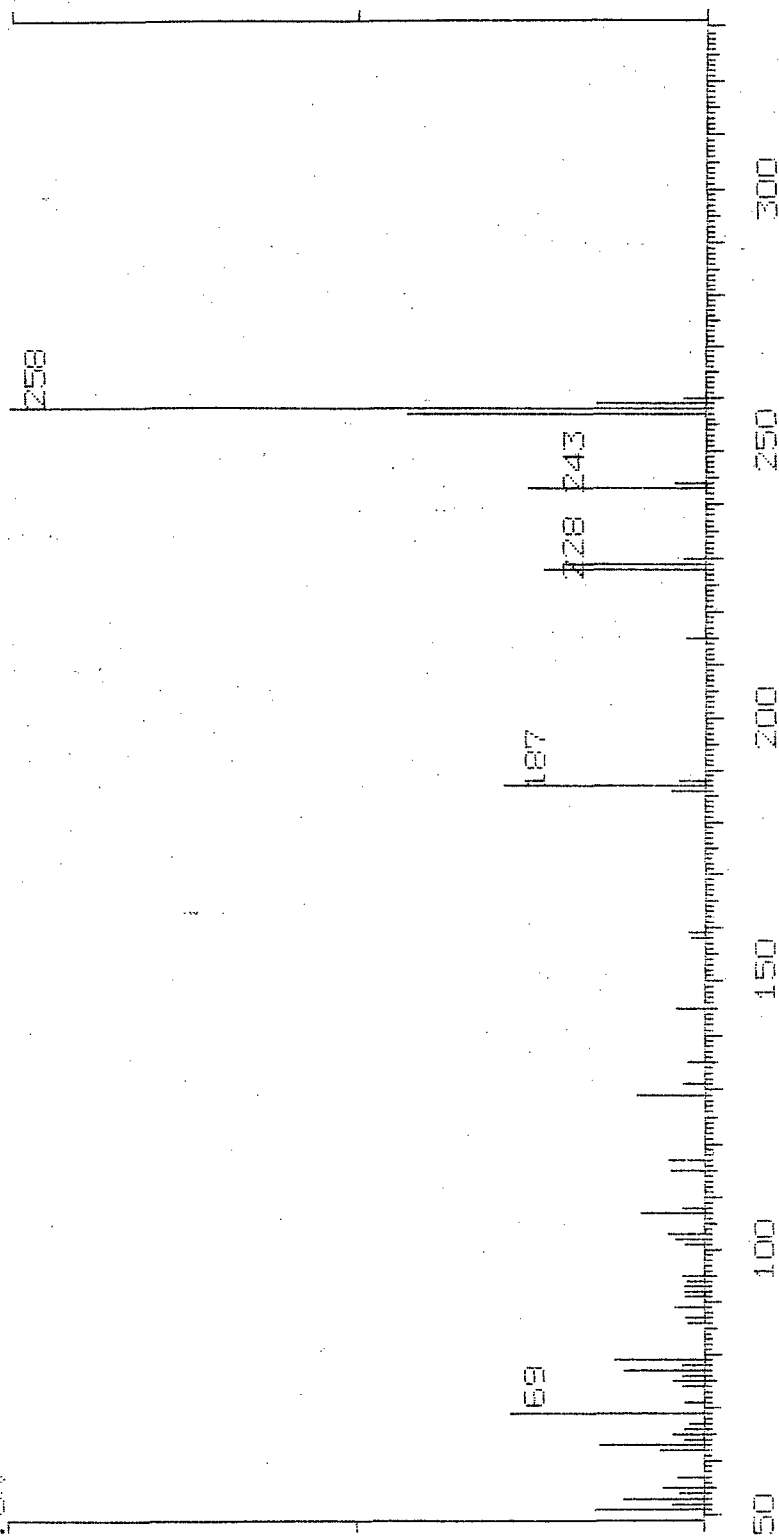


FIGURA 40 - Espectro de Massa do composto PC 01

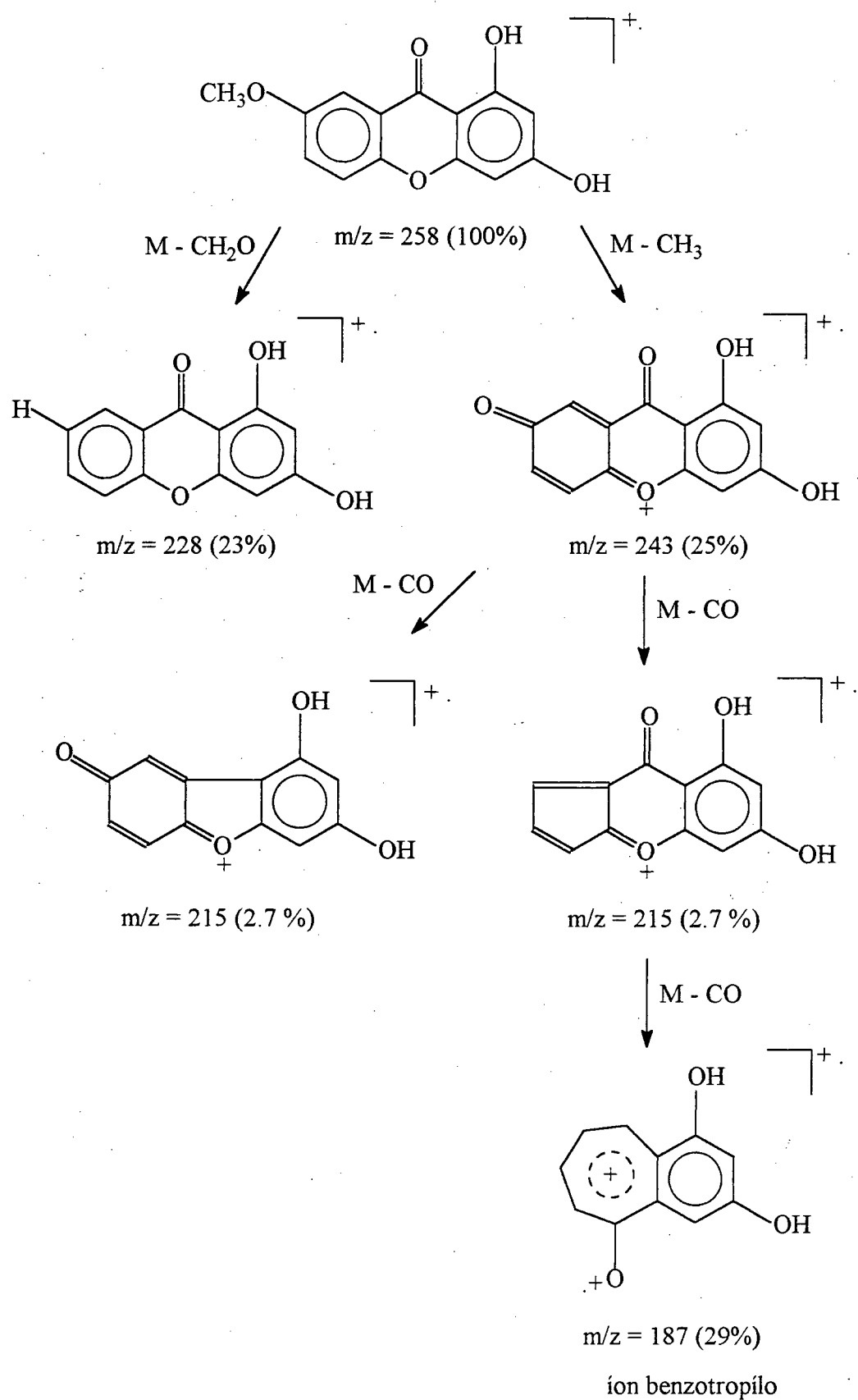


FIGURA 41 - Proposta de fragmentação dos principais íons do Espectro de Massa do composto PC 01

4.3.4 - PC 02A (1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona)

O espectro na região do UV (Fig.43), obtido em metanol, exibiu bandas de absorção em 212.5 nm, 245.3 nm, 295.4 nm, 326.6 nm e 377.0 nm, indicando a presença de grupos cromóforos característicos de uma xantona.

O espectro na região do IV (Fig.44) mostra uma absorção em 3376 cm^{-1} característica de deformação axial da ligação OH. Em 1676 cm^{-1} aparece uma banda intensa atribuída a deformação axial de uma carbonila conjugada (C=O). O grupo de sinais intensos em 1616, 1572 e 1478 cm^{-1} indicam a presença de ligações C=C de anel aromático. Absorções em 928 cm^{-1} indicam deformações axiais de C-O sugerindo o grupo metilenodioxi [16].

No espectro de RMN¹H (Fig.45 e 46), obtido em C₅D₅N, observa-se um singlete em 13,4 ppm referente a uma hidroxila quelada em C-1. O singlete em 6.14 ppm com intensidade para dois prótons caracteriza a presença de um grupo metilenodioxi (OCH₂O); juntamente com o singlete em 6.66 ppm atribuído ao próton aromático em C-4, definem o padrão de substituição do anel A de uma xantona com grupo metilenodioxi.

O sinal para o próton aromático em campo mais baixo, na forma de um dublete centrado em 8.0 ppm (J=2.82 Hz), com constante de acoplamento meta é característico do próton H-8 que está sob a influência do cone de desproteção anizotrópico da carbonila. O próton H-8 mostra apenas acoplamento meta implicando numa substituição em C-7. Este sinal juntamente com o dublete em 7,44 ppm (J=9,06 Hz) e o duplo dublete centrado em 7.56 ppm (J=9.17 e 2.92 Hz), atribuídos respectivamente aos prótons H-5 orto relacionado e H-6 orto-meta relacionado, definem o padrão de substituição do anel B.

A análise preliminar do espectro de RMN ¹³C/DEPT 135 (Fig. 47, 48, 49), obtidos em C₅D₅N mostrou a presença de 14 carbonos, sendo quatro metínicos (CH), um metilênico (CH₂) e os nove restantes carbonos quaternários.

O grupo metilenodioxi (OCH₂O) foi caracterizado pelo sinal em 103.31 ppm. O sinal em campo mais alto situado em 89.60 ppm é típico de um carbono aromático di-orto oxigenado, sendo atribuído a CH-4, e os demais C-H aromáticos são observados em 108.79 (CH-8), 119.37 (CH-5) e 125.47 (CH-6).

Dos oito carbonos quaternários seis são carbonos aromáticos oxigenados atribuídos pelos sinais 129.52 (C-2), 143.48 (C-3), 150.06 (C-4b), 153.96 (C-1), 154.65 (C-4a) e 155.69 (C-7) ppm; e os demais foram assinalados para C-8b (105,52 ppm) e C-8a (121,09 ppm), sendo que estes valores podem ser

interconversíveis. Finalmente a presença da carbonila foi indicada pelo sinal em 181.67 ppm.

O espectro de Massa (Fig.50) mostrou o íon molecular a m/z 272 (100%) que juntamente com os dados espectrais de RMN¹ H e ¹³ C conferem a fórmula molecular C₁₄H₈O₆ para uma xantona 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxi. A Figura 51 apresenta uma proposta dos caminhos fragmentação para os principais íons, os quais estão de acordo com a estrutura proposta desenhada na Fig.42.

Dados de literatura referente a xantona 1,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxi [37] apoiam a nossa proposta estrutural para PC 02A.

Com objetivo de confirmar a estrutura proposta e isolar PC 02 A de PC 02 B, procedeu-se a acetilação com Anidrido Acético em piridina. No espectro de RMN¹ H do derivado acetilado, obtido em benzeno deuterado (Fig.52), pode-se observar o desaparecimento das absorções em 13.4 e 5.10 ppm mostrando claramente que as respectivas hidroxilas em C-1 e C-7 foram acetiladas. A diacetilação é confirmada pelo aparecimento de dois singletes com intensidade para três prótons em 2.23 e 2.55 ppm característicos de grupo acetil.

O demais sinais tiveram seus deslocamentos químicos alterados devido as influências previstas pela introdução de grupos acetilas. Assim, o sinal referente aos dois hidrogênios do grupo metilenodioxi é observado em 6.19 ppm e o próton H-4 em 6.95 ppm. Os hidrogênios aromáticos do anel A são observados por um dublete em 7.42 ppm ($J=9.0$ Hz) referente ao próton H-5 acoplado com o próton H-6 com constante de acoplamento orto. Um duplo dublete centrado em 7.56 ppm ($J=9.0$ e 2.82 Hz) referente ao próton H-6 com acoplamento orto em relação ao H-5 e meta em relação ao H-8. Um dublete em 8.18 ppm ($J=2.82$ Hz) referente ao próton H-8 com constante de acoplamento meta em relação a H-6.

O espectro de RMN¹³C em C₅D₅N (Fig 53) confirma a di-acetilação através dos sinais em 20.88 e 21.09 ppm característicos de grupos acetil e pelos sinais de duas carbonilas (C=O) em 169.33 e 169.56 ppm.

Os quatro carbonos metínicos (CH) são observados em 96.49 ppm (CH-4), 118.52 ppm (CH-8), 119.29 ppm (CH-5) e 128.95 ppm (CH-6) mostrando que a acetilação influenciou nos deslocamentos químicos dos carbonos C-4, C-8 e C-6. O carbono do grupo metilenodioxi praticamente não foi afetado pela acetilação permanecendo em 104.41 ppm. O efeito da acetilação também foi sentido nos carbonos aromáticos oxigenados, mostrando seus deslocamentos químicos em 147.52 ppm (C-1), 137.99 ppm (C-2), 152.94 ppm (C-3), 154.51 ppm (C-4a), 150.36 ppm (C-4b) e 154.71 ppm (C-7); nos demais carbonos aromáticos quartenários em 122.75 (C-8a) e 110.39 (C-8b) ppm; e da carbonila (C=O) em 174.57 ppm. O rendimento do composto PC 02 A foi de 0.0048 %.

Com base nos dados apresentados, propomos para PC 02A a estrutura mostrada na Figura 42, uma xantona inédita como produto natural isolada pela primeira vez da espécie *Polygala cyparissias*.

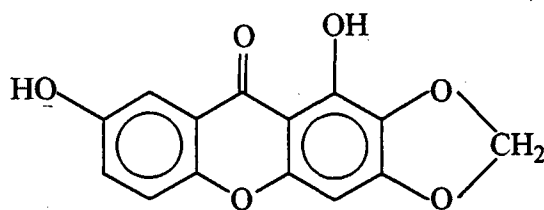


FIGURA 42 - Estrutura do composto PC 02A (1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona)

Abaixo estão os dados espectroscópicos para o composto PC 02A

* Pf: 243 °C

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 212.5; 245.3; 295.4; 326.6; 377

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3376 (OH); 1676 (C=O); 1616; 1478 (C=C); 928 (C-O)

* EM (70 eV) m/z (%): 272 [M⁺] (100); 243 [M-CHO] (8); 214 [M-CHO] (30); 186 [M-CO] (14); 158 (5); 136 (24); 121 (15); 77 (30); 53 (28)

* RMN¹ H (200 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 6.14 s (2H, OCH₂O); 6.66 s (1H, H-4); 7.44 d (1H, J=9.06 Hz, H-5); 7.56 dd (1H, J=2.92 e 9.17 Hz, H-6); 8.0 d (1H, J=2.82 Hz, H-8); 13.4 s (1H, OH)

* RMN¹³ C/DEPT 135 (50 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 89.60 (CH-4); 103.31 (OCH₂O); 105.52* (C-8b); 108.79 (CH-8); 119.37 (CH-5); 121.09* (C-8a); 125.47 (CH-6); 129.52* (C-2); 143.48* (C-3); 150.06* (C-4b); 153.96* (C-1); 154.65* (C-4a); 155.69* (C-7); 181.67 (C=O)

Acetilação

* RMN¹ H (300 MHz, C₆D₆) δ (ppm): 2.23 s e 2.55 s (3H cada de CH₃); 6.19 s (2H, OCH₂O); 6.95 s (1H, H-4); 7.42 d (1H, J=9.0 Hz, H-5); 7.56 dd (1H, J=9.0 e 2.82 Hz, H-6); 8.18 d (1H, J=2.8 Hz, H-8)

* RMN ¹³ C - APT (50 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 20.88 (OCOCH₃); 21.09 (OCOCH₃); 96.49 (CH-4); 104.41 (OCH₂O); 110.39* (C-8b); 118.52 (CH-8); 119.39 (CH-5); 122.75* (C-8a); 128.95 (CH-6); 137.99* (C-2); 147.52* (C-3); 150.36* (C-4b); 152.94* (C-1); 154.51* (C-4a); 154.71* (C-7); 169.33 (C=O de OCOCH₃); 169.56 (C=O de OCOCH₃); 174.57 (C=O)

* os valores podem ser interconvertíveis

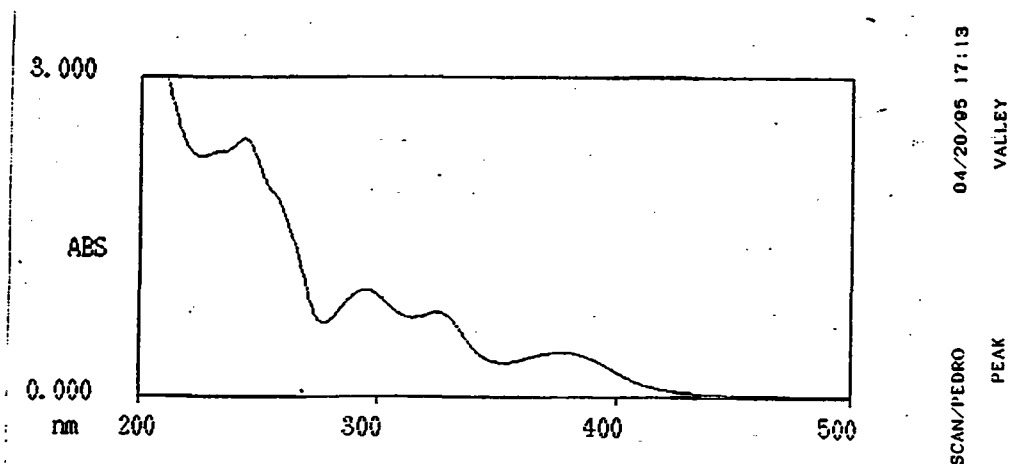


FIGURA 43 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 02A

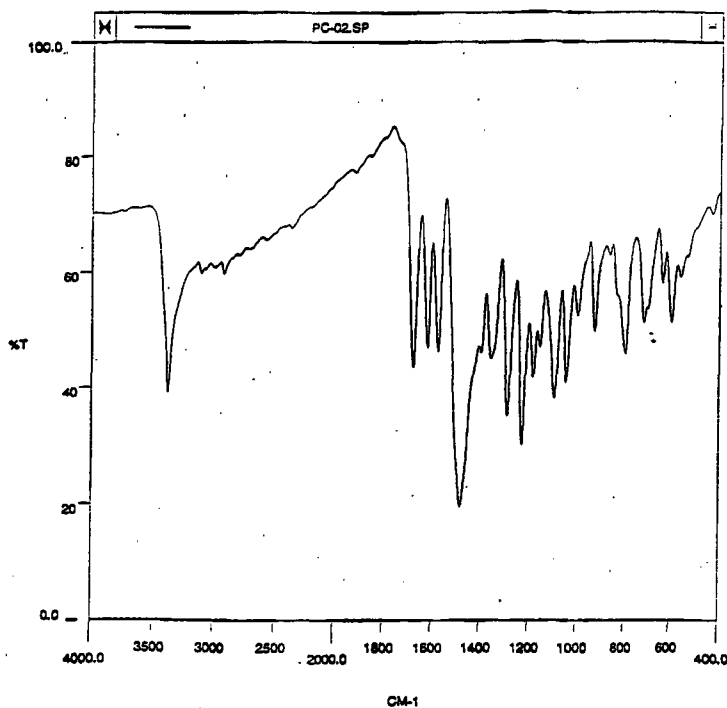


FIGURA 44 - Espectro de Infravermelho do composto PC 02A

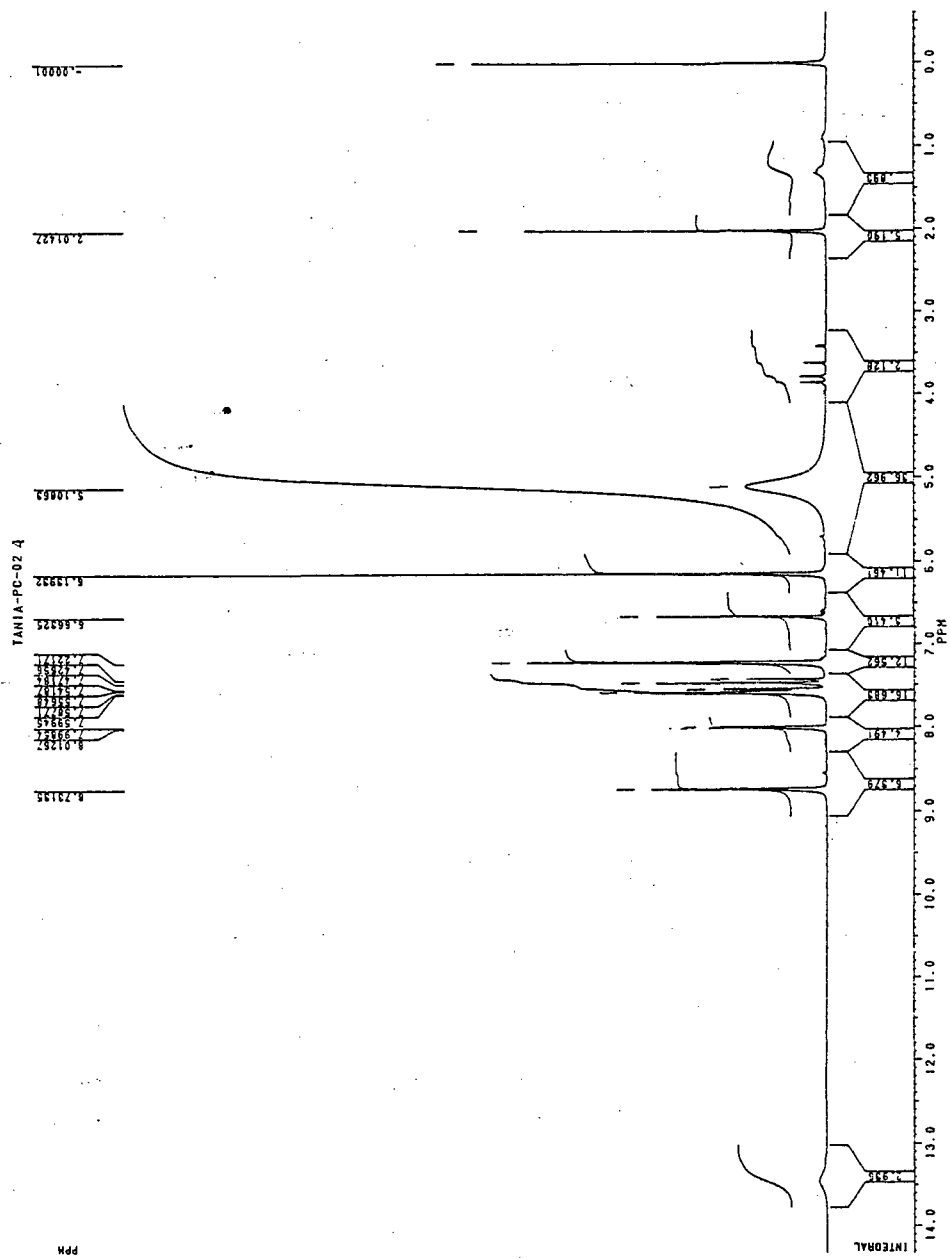


FIGURA 45 - Espectro de RMN ^1H do composto PC 02A em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

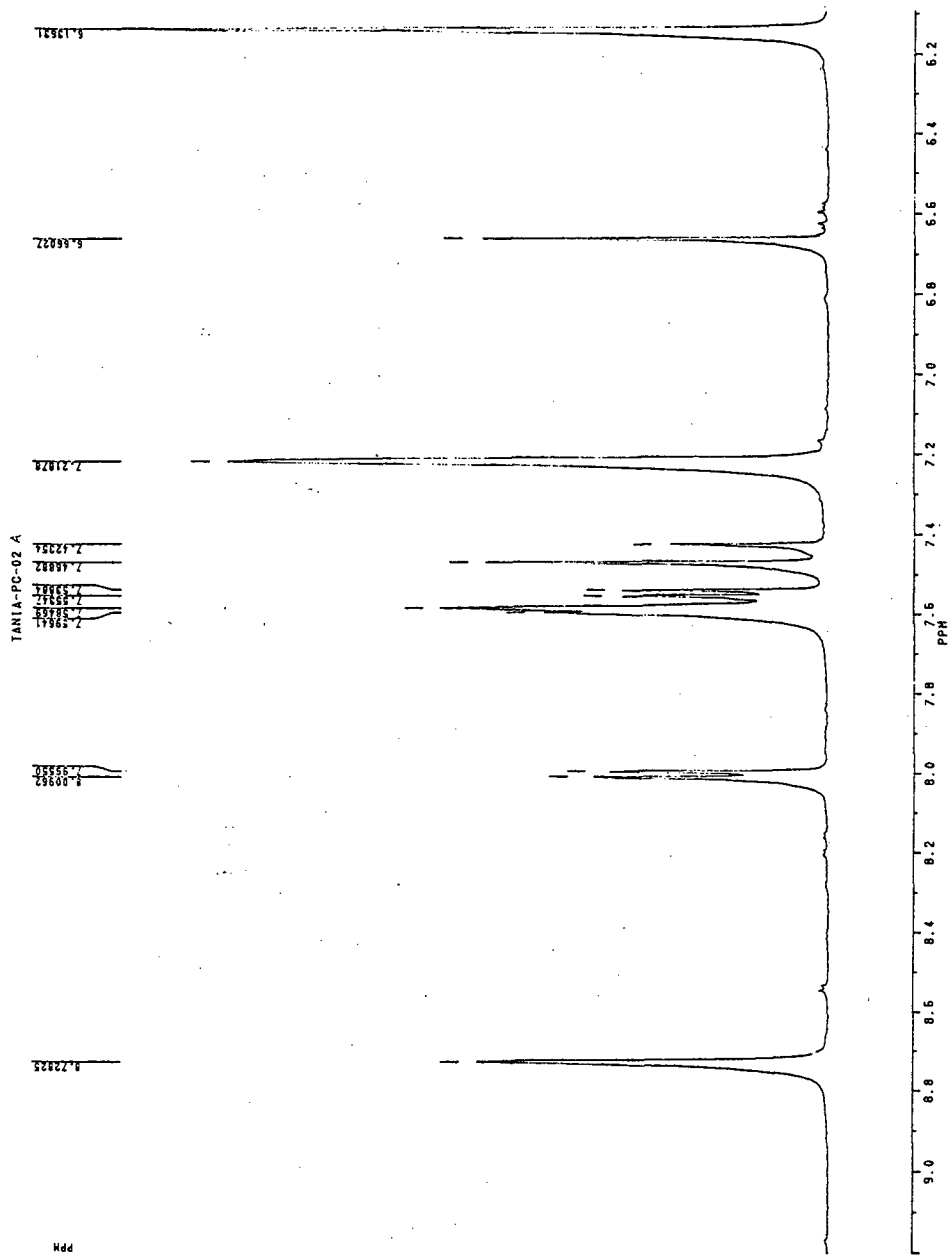


FIGURA 46 - Espectro de RMN ^1H expandido na região de 6.0 a 9.0 ppm do composto PC 02A em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

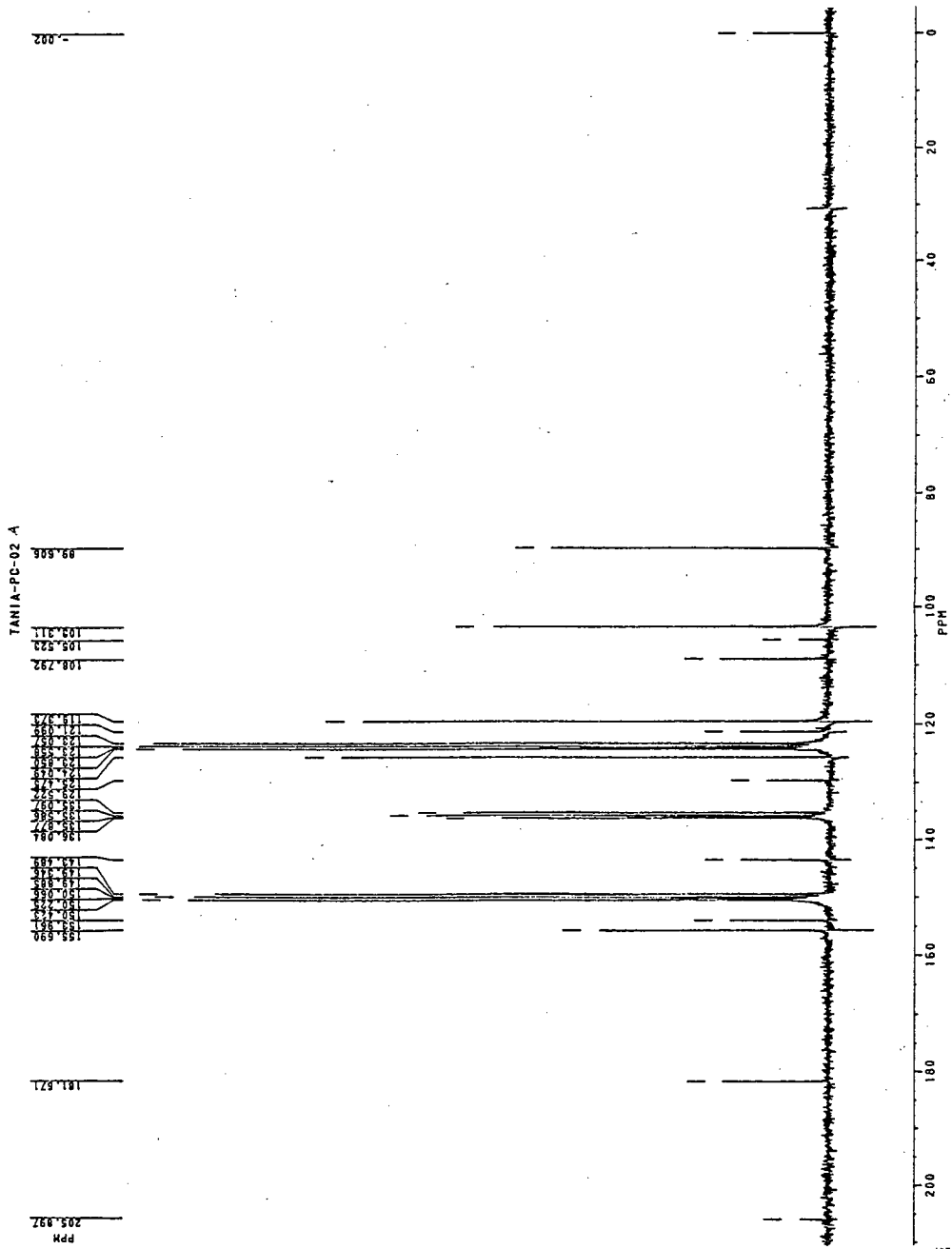


FIGURA 47 - Espectro de RMN ^{13}C do composto PC 02A em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

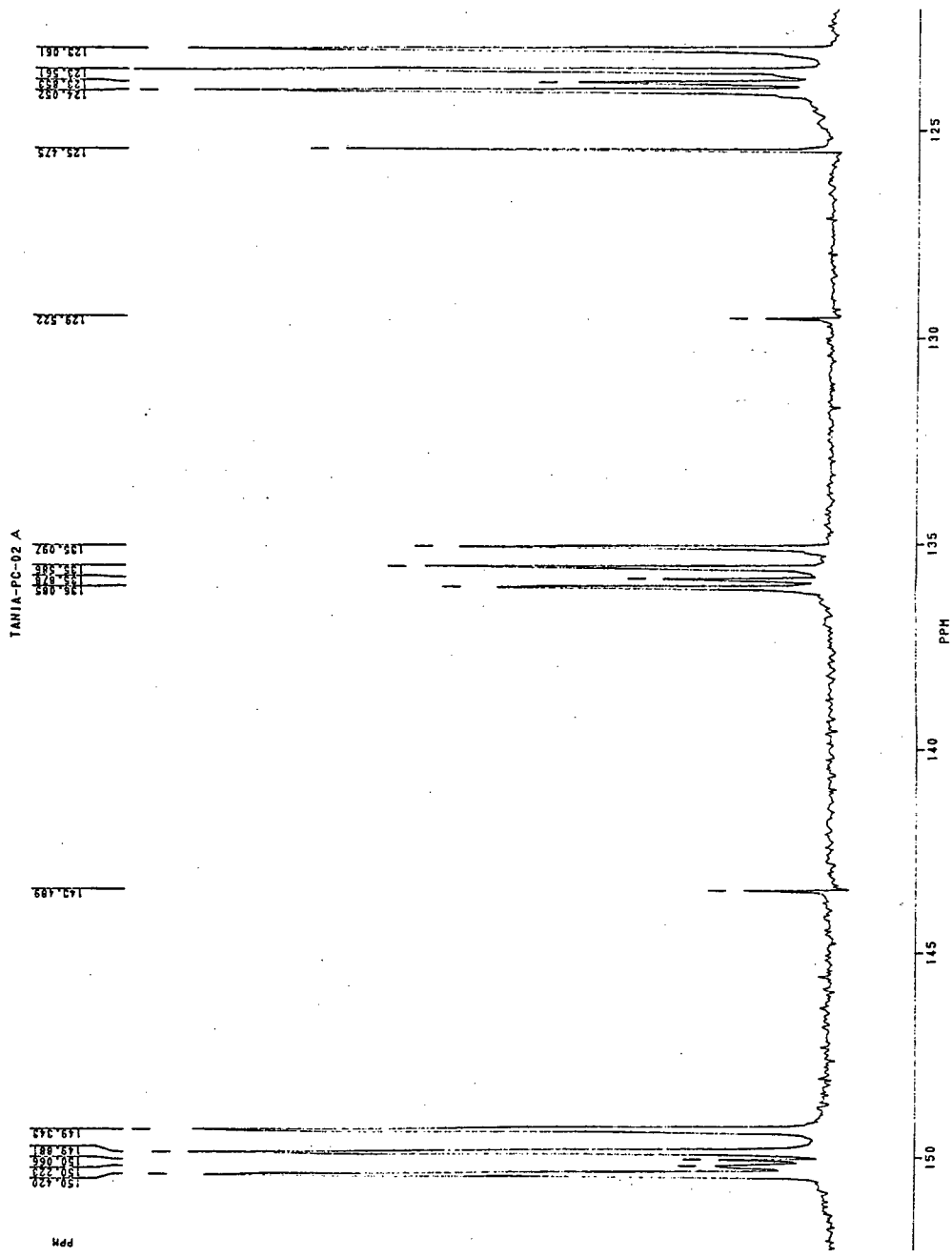


FIGURA 48 - Espectro de RMN ¹³C expandido em 120 a 150 ppm do composto PC 02A em C₅D₅N

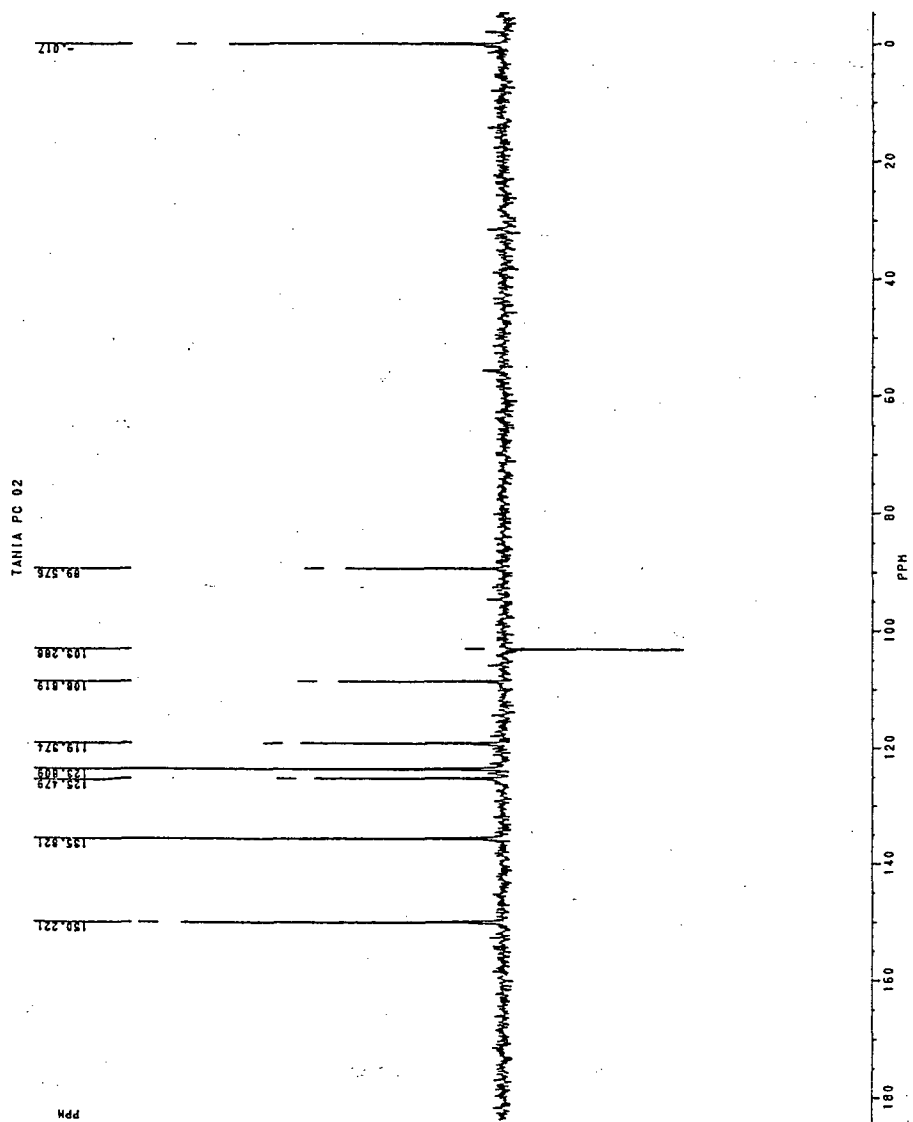


FIGURA 49 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 do composto PC 02A em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Mass Spectrum File: PC-02A.01 95-04-28 11:42
Comment: Tania - PC - 02A

Scan: 324 (0- 0) R.T.: 10.88min Base Peak: 272.0 Int: 44500(=100%)
100.0%

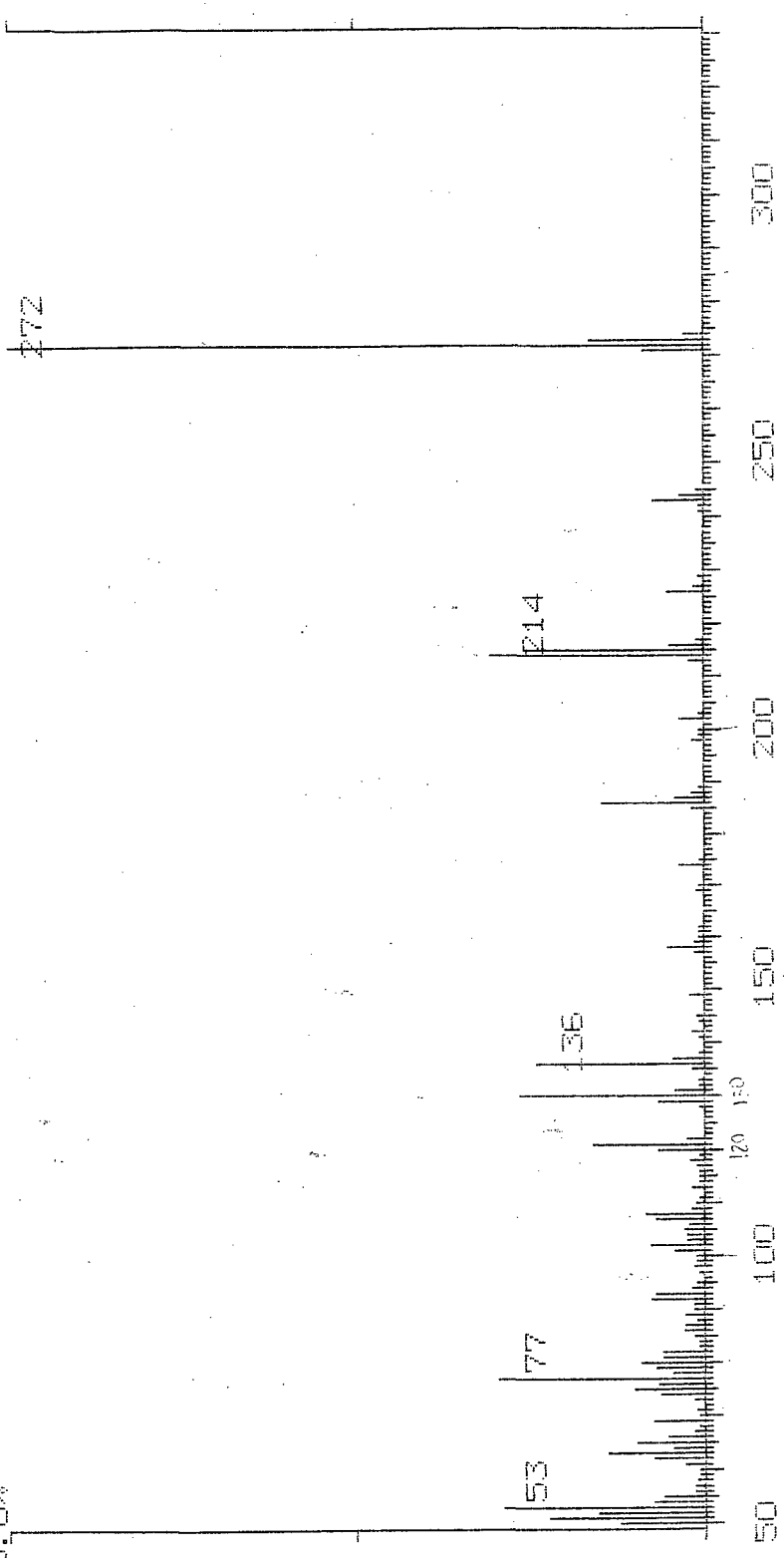


FIGURA 50 - Espectro de Massa do composto PC 02A

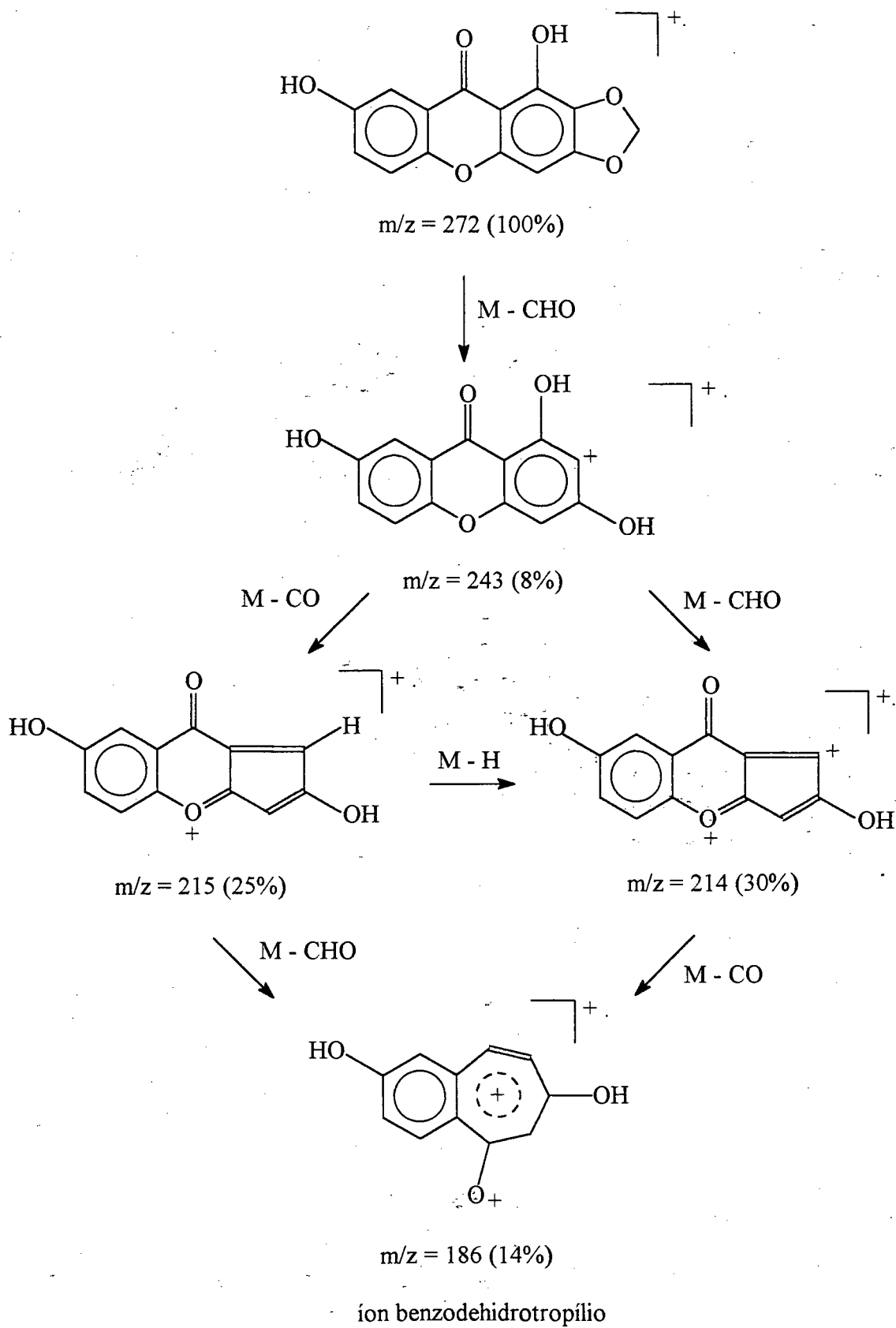


FIGURA 51 - Proposta de fragmentação dos principais íons do Espectro de Massa do composto PC 02A

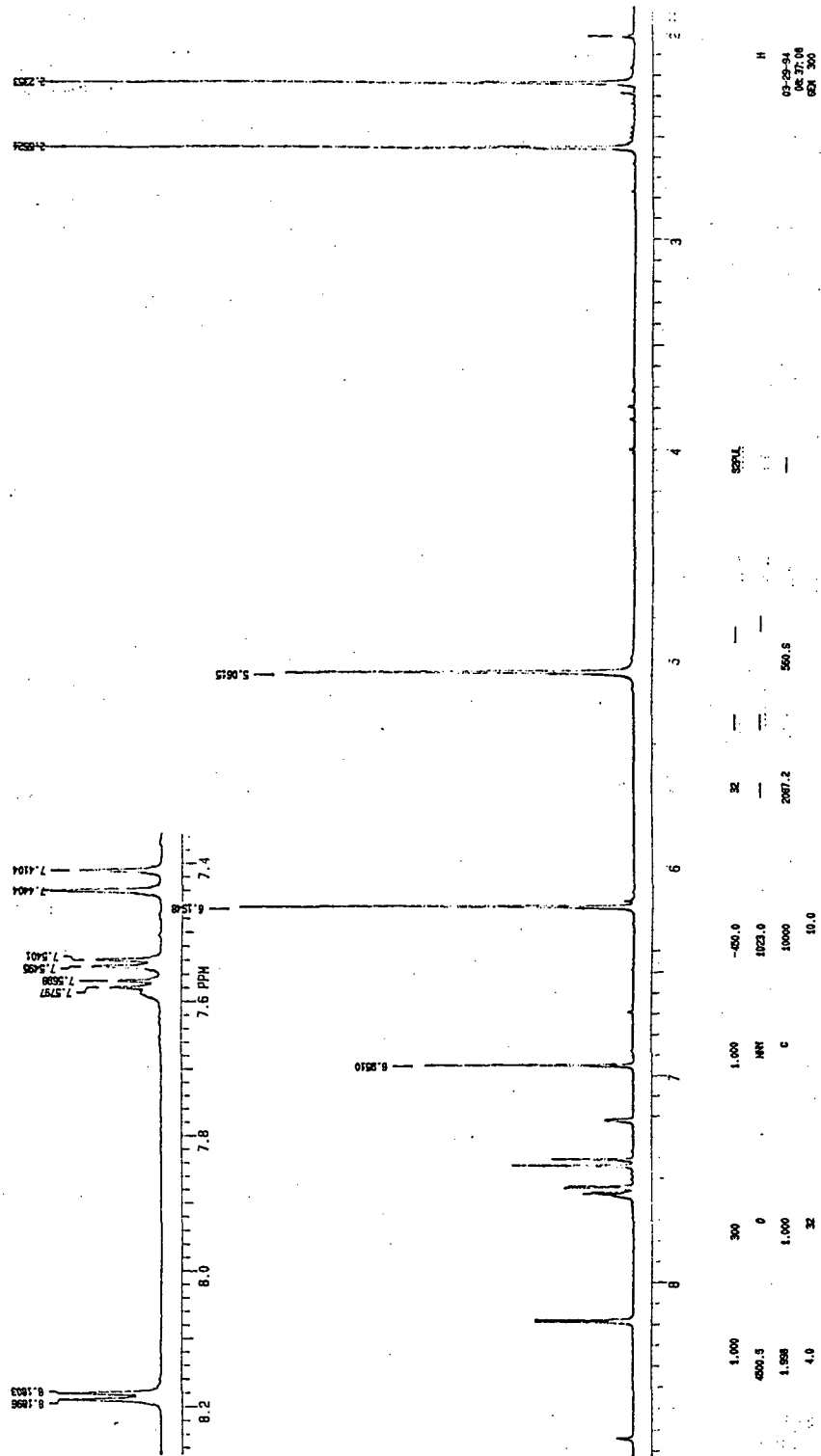


FIGURA 52 - Espectro de RMN ^1H do composto PC 02A diacetilado em C_6D_6

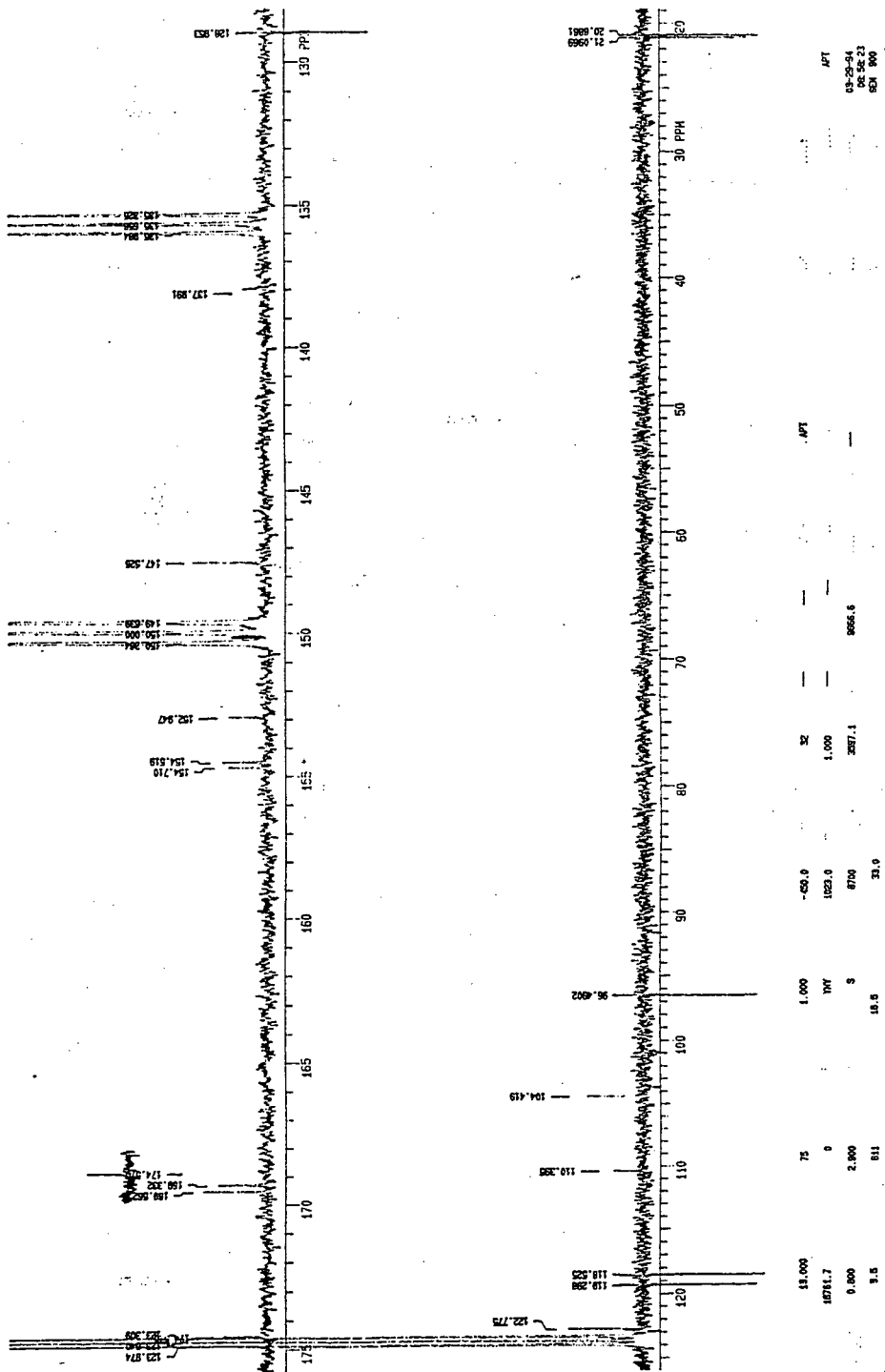


FIGURA 53 - Espectro de RMN ¹³C/APT do composto PC 02A diacetilado em C₅D₅N

4.3.5 - PC 02B

Pela pequena quantidade obtida do composto PC 02B (5 mg) não foi possível obter dados suficientes para determinar sua estrutura. Do espectro obtido por IV (Fig 54) propõe-se que o composto também se trata de uma xantona com muitas posições substituídas, pois o espectro de Massa (Fig.55) através do pico molecular m/z 330 indica a presença de mais de quatro substituintes oxigenados.

O rendimento do composto PC 02B foi de 0.0005 % em relação a 1 Kg do vegetal.

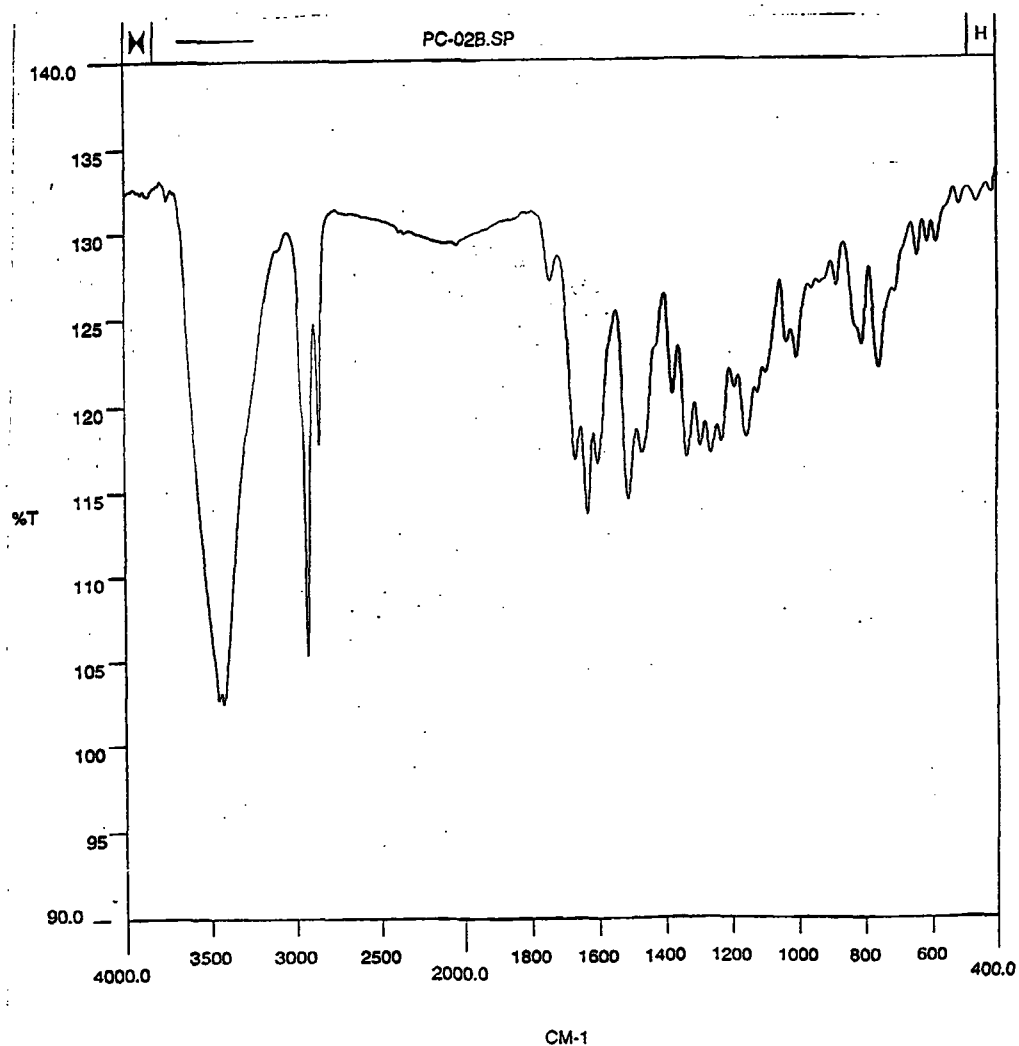


FIGURA 54 - Espectro de Infravermelho do composto PC 02B

Mass Spectrum File: PC-02B.01 95-05-03 10:28
Comment: Tania - PC-02B

Scan: 283 (0- 0) R.T.: 9.50min Base Peak: 330.0 Int: 46700(=100%)
100.0%

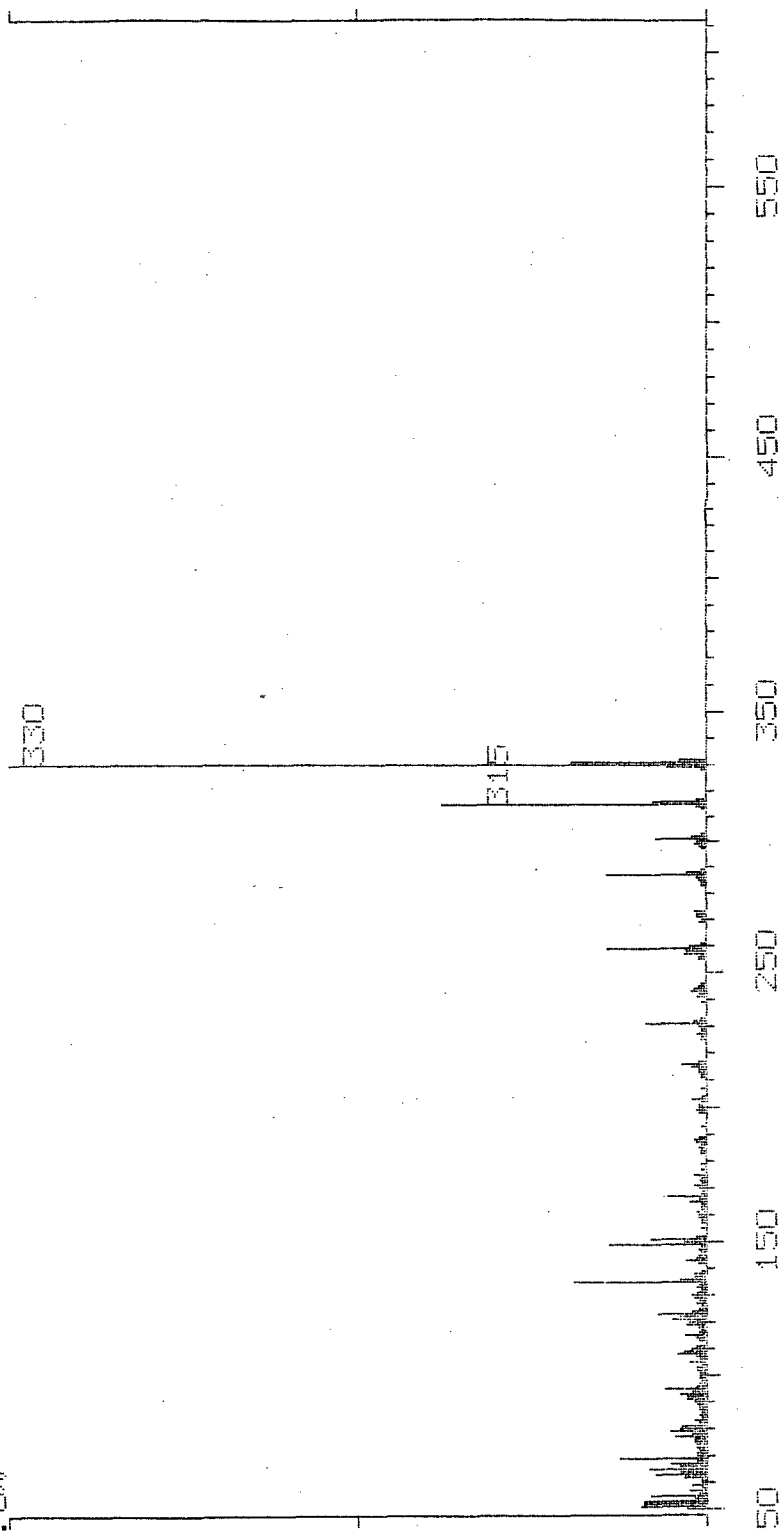


FIGURA 55 - Espectro de Massa do composto PC 02B

4.3.6 - PC 03 (1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona)

O espectro na região do UV (Fig.57), obtido em metanol, exibiu bandas de absorção em 226.0 nm, 256.5 nm, 297.8 nm e 373.9 nm, indicando a presença de grupos cromóforos característicos de uma xantona.

O espectro de IV (Fig.58) apresenta uma banda característica de estiramento de ligação OH em 3412 cm^{-1} . Em 1650 cm^{-1} pode-se observar deformações axiais do grupo carbonila conjugado (C=O). Em 1478 cm^{-1} observa-se uma banda referente a deformações axiais de ligações C=C de anel aromático.

Na análise do espectro de RMN¹H (Fig.59) em C₅D₅N observou-se dois singletes em 3.87 e 3.99 ppm, com intensidades para três prótons cada, referentes a dois grupos metoxila (OMe). O singlete em 13.4 ppm mostra a presença de uma hidroxila quelada em C-1 juntamente com o singlete em 6.62 ppm referente a um próton CH aromático atribuído ao próton (H-4) são indicativos do anel A 1,2,3-trissubstituído. O anel B, substituído em C-7, foi deduzido pelos deslocamentos químicos e acoplamentos dos três prótons aromáticos como segue:

*um dublete em 7.53 ppm ($J=8.8\text{ Hz}$), com constante de acoplamento orto, referente ao próton H-5 acoplado com o próton H-6;

*um duplo dublete centrado em 7.60 ppm ($J=9.0$ e 2.9 Hz) atribuído ao próton H-6 orto-meta relacionado com os prótons H-5 e H-8;

*um dublete em campo mais baixo, centrado em 8.05 ppm ($J=2.6\text{ Hz}$) com constante de acoplamento meta, mostrando o próton H-8 sob a influência do campo de desproteção anisotrópica da carbonila.

Na análise dos espectros de RMN¹³C (Fig.60) e APT (Fig. 61) pode-se observar os deslocamentos químicos referentes as duas metoxilas em 55.51 ppm e 60.72 ppm. O valor do deslocamento químico 60.72 ppm indica que a referida metoxila situa-se numa posição orto-dissubstituída. Assim, considerando a análise do espectro de RMN¹H feita anteriormente, este sinal refere-se seguramente a metoxila em C-2. Dos sinais característicos aos carbonos CH aromáticos, o de campo mais alto localizado em 91.30 ppm indica um carbono orto-dioxigenado, referindo-se portanto ao carbono C-4. Os demais são observados em 109.13 (CH-8), 119.50 (CH-5) e 125.58 (CH-6) ppm. Os dois carbonos aromáticos quaternários das posições C-8b e C-8a apresentam seus deslocamentos químicos em 104.39 e 121.43 ppm respectivamente; e os seis carbonos aromáticos oxigenados são observados em 132.20 (C-2), 150.16 (C-4b), 153.92 (C-3), 154.72 (C-4a), 155.73 (C-7) e 160.71 (C-1) ppm. Finalmente a carbonila (C=O) em 181.55 ppm. Estes dados estão de acordo com o padrão de substituição proposto para os anéis A e B.

Com base na análise dos dados espectrais acima sugere-se a estrutura de uma xantona 1,2,3,7-tetraoxigenada com uma das hidroxilas na posições C-1 e uma das metoxilas em C-2. A posição da metoxila (3.87 ppm) e da outra hidroxila foi deduzida através de experimentos de irradiação em RMN¹ H usando a técnica DIFNOE (Fig. 62 e 63):

*irradiação do próton H-8 (8.05 ppm) resultou em DIFNOE negativo para a metoxila 3,87 ppm, indicando que a posição C-7 está ocupada por uma hidroxila;

*irradiação do próton H-4 (6.62 ppm) resultou em DIFNOE positivo destacando a absorção referente a metoxila em 3.87 ppm, sugerindo a presença da metoxila em C-3;

*irradiação em OMe-3 (3.87 ppm) resultou em DIFNOE positivo destacando o sinal referente ao próton H-4 em 6.62 ppm, confirmando assim a estrutura de uma xantona 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi [38] apresentada na Fig.58.

O espectro de Massa (Fig.64) apresentou o pico molecular a m/z 288 compatível com a fórmula molecular C₁₅H₁₂O₆ e um padrão de fragmentação característico de xantonas observado na Figura 65.

O rendimento do composto PC 03 foi de 0.0049 % em relação a 1 Kg do vegetal.

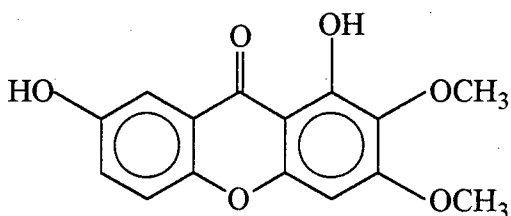


FIGURA 56 - Estrutura do composto PC 03 (1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona)

Os dados espectroscópicos do composto PC 03 são vistos abaixo:

* Pf: 227 °C (Literatura 245-246 °C)

* UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 226; 256.5; 297.8; 373.9

* IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3412 (OH); 1650 (C=O); 1588; 1478 (C=C)

* EM (70 eV) m/z (%): 288[M⁺] (70); 273[M-CH₃] (100); 245[M-CO] (78); 202[M-CO+CH₃] (27); 174 (20); 136 (25); 108 (8); 93 (14); 77 (12); 63 (15)

* RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 3.87 s (3H, OCH₃-3); 3.99 s (3H, OCH₃-2); 6.62 s (1H, H-4); 7.53 d (1H, J=8.8 Hz, H-5); 7.60 dd (1H, J=9.0 e 2.9 Hz, H-6); 8.05 d (1H, J=2.6 Hz, H-8); 13.4 s (1H, OH)

* RMN ¹H - DIF NOE (300 MHz, C₅D₅N) δ (ppm):
irradiação 6.62 (H-4) : sinal em 3.88 (OCH₃-3)
irradiação 3.88 (OCH₃-3) : sinal em 6.62 (H-4)

RMN ¹³C - APT (75 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 55.51 (OCH₃-3); 60.72 (OCH₃-2); 91.30 (CH-4); 104.39 (C-8b); 109.13 (CH-8); 119.50 (CH-5); 121.43* (C-8a); 125.58 (CH-6); 132.20* (C-2); 150.16* (C-4b); 153.92* (C-3); 154.72* (C-4a); 155.73* (C-7); 160.71* (C-1); 181.55 (C=O)

* os valores podem ser interconvertíveis

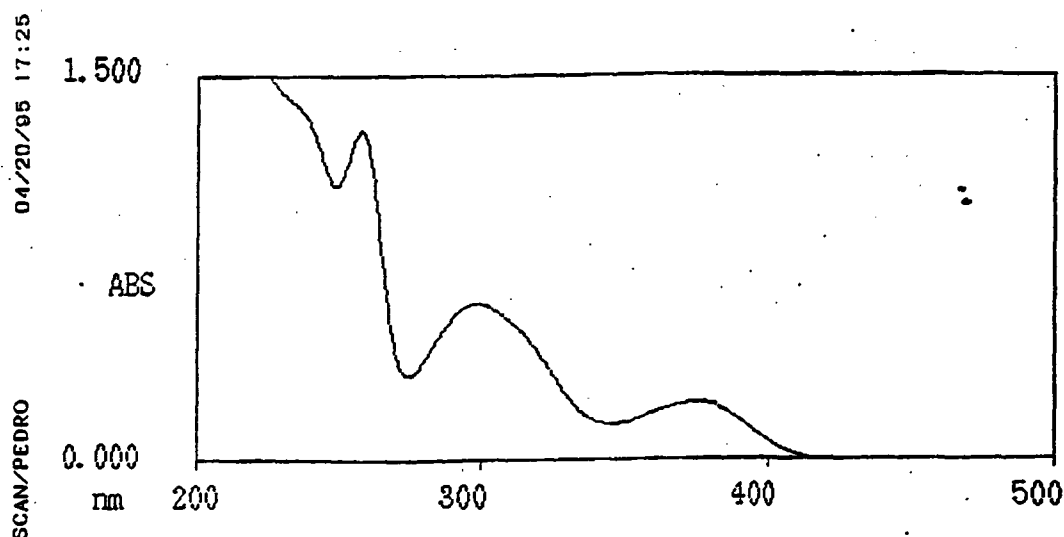


FIGURA 57 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 03

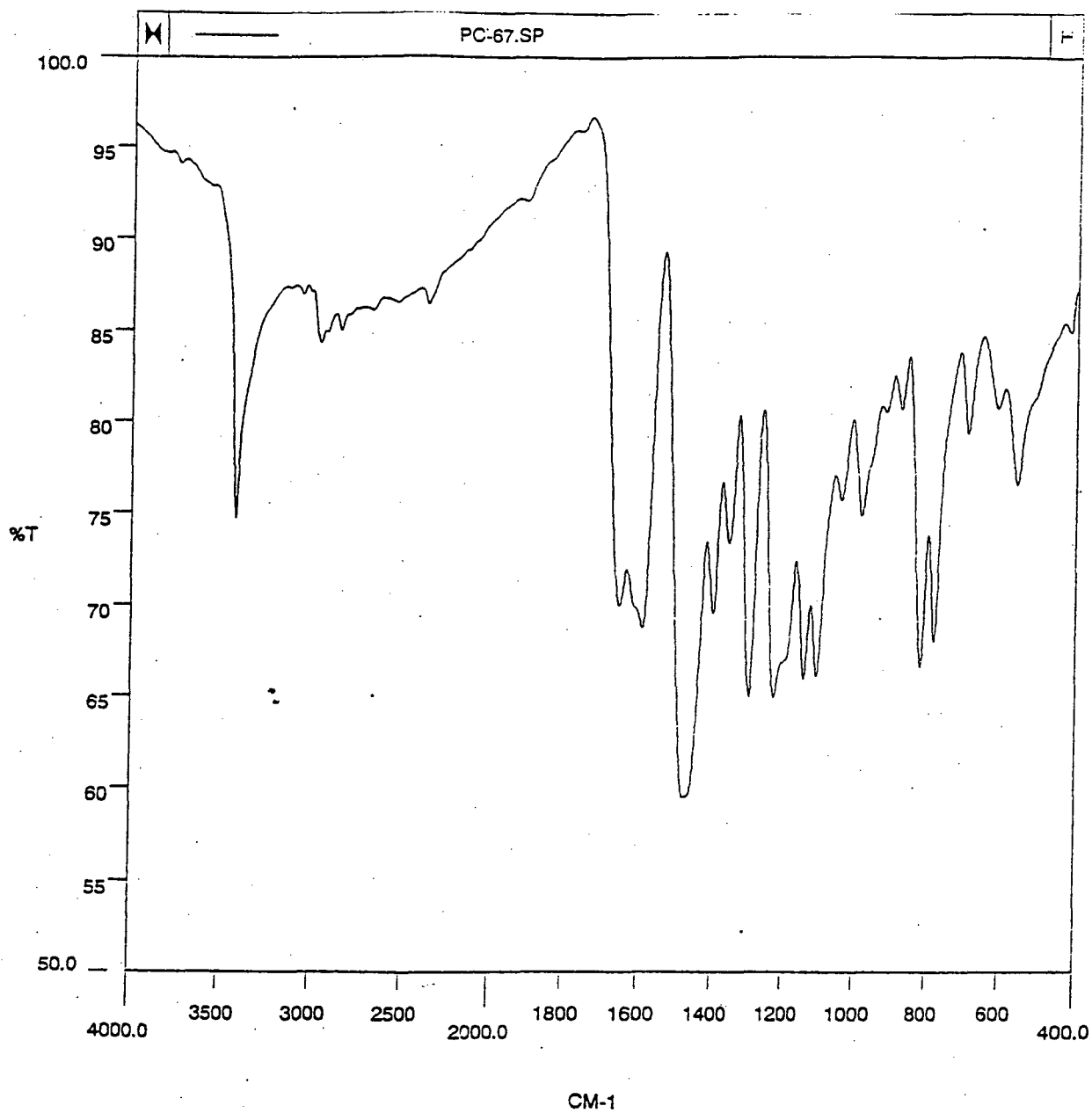


FIGURA 58 - Espectro de Infravermelho do composto PC 03

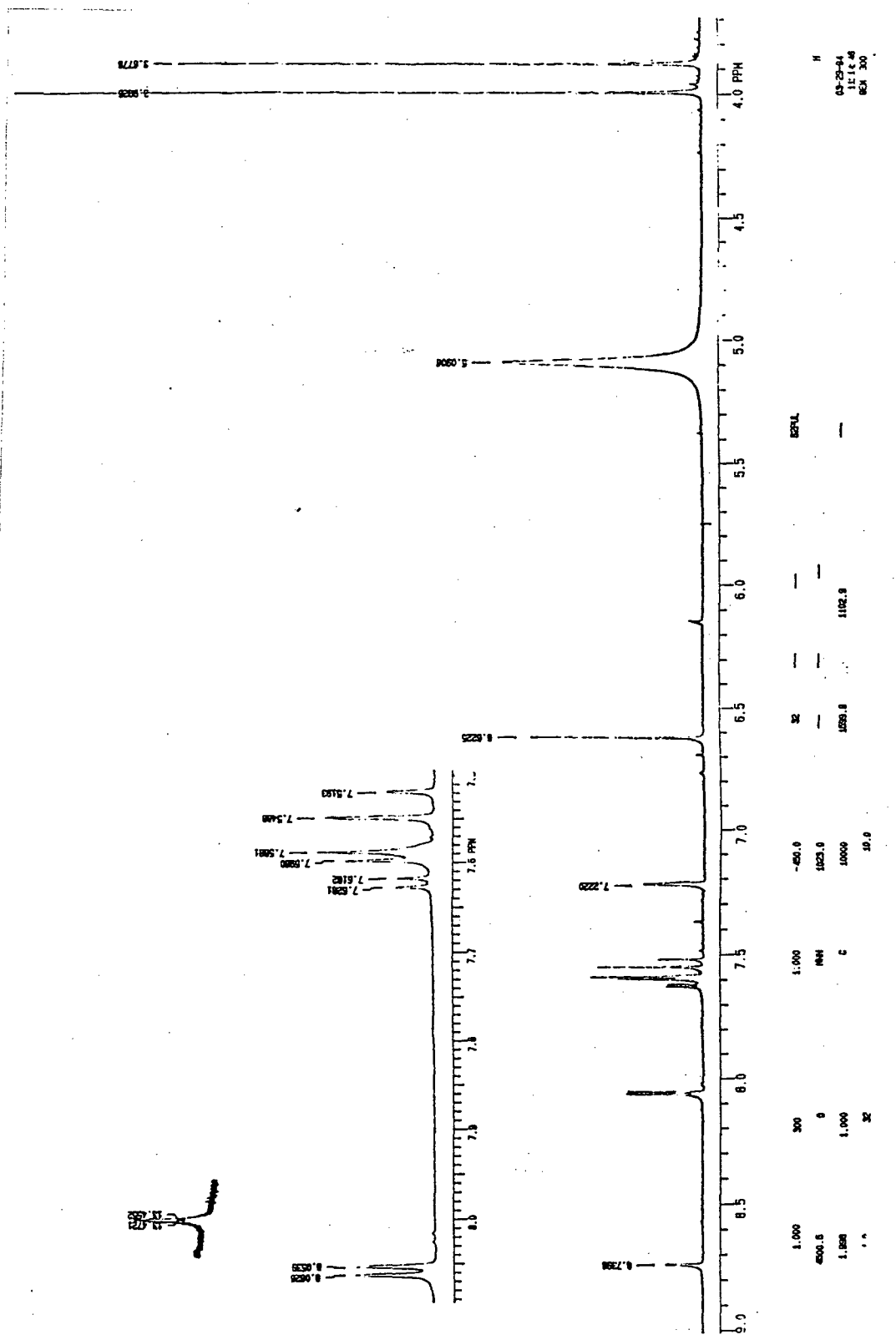


FIGURA 59 - Espectro de RMN ¹H do composto PC 03 em C₅D₅N

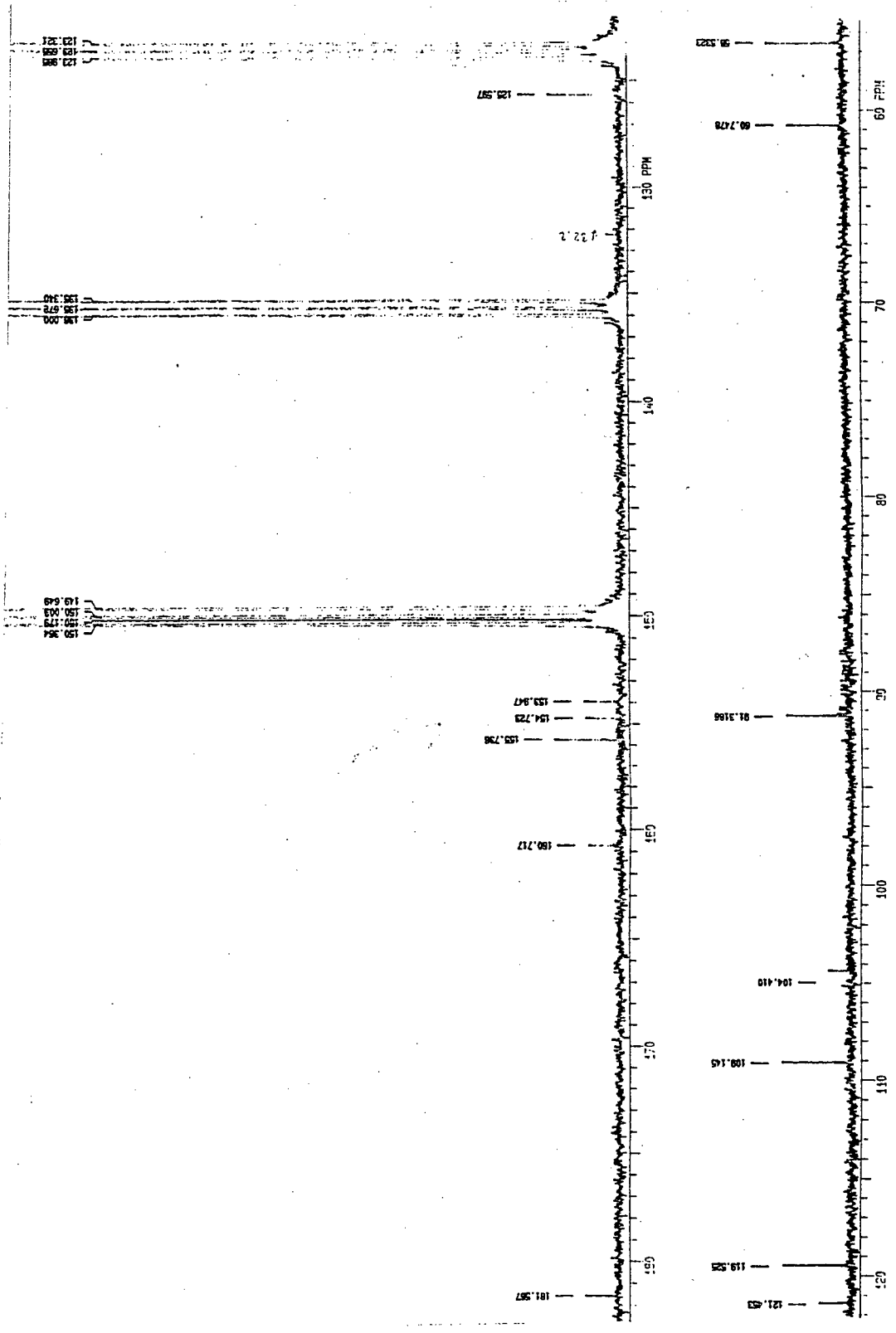


FIGURA 60 - Espectro de RMN ¹³C do composto PC 03 em C₅D₅N

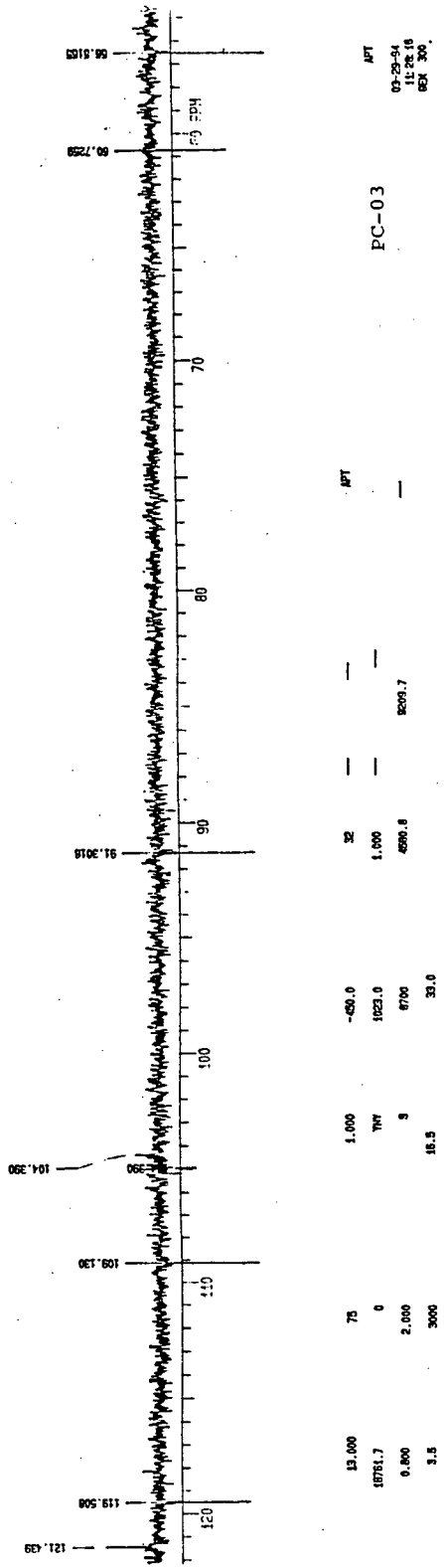
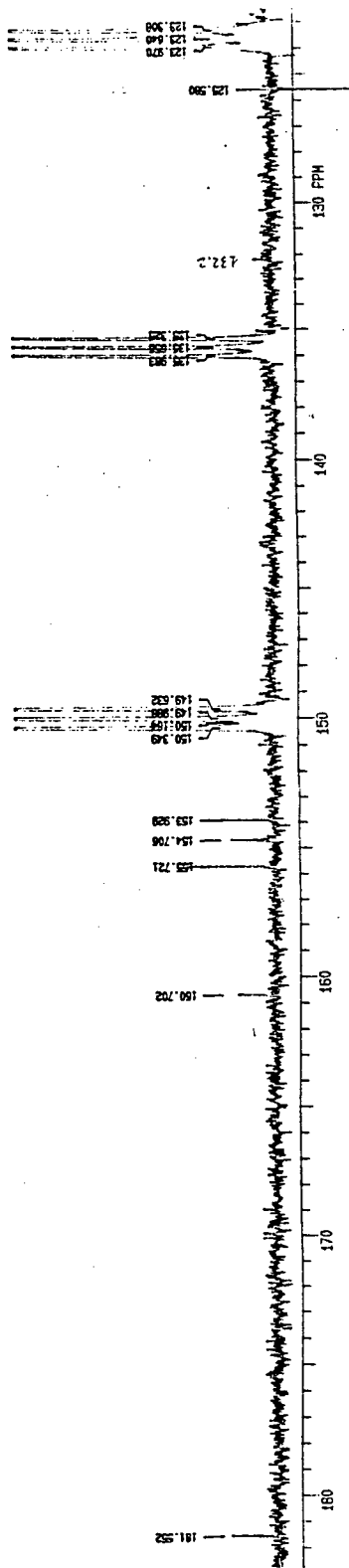


FIGURA 61 - Espectro de RMN ¹³ C/APT do composto PC 03 em C₅D₅N

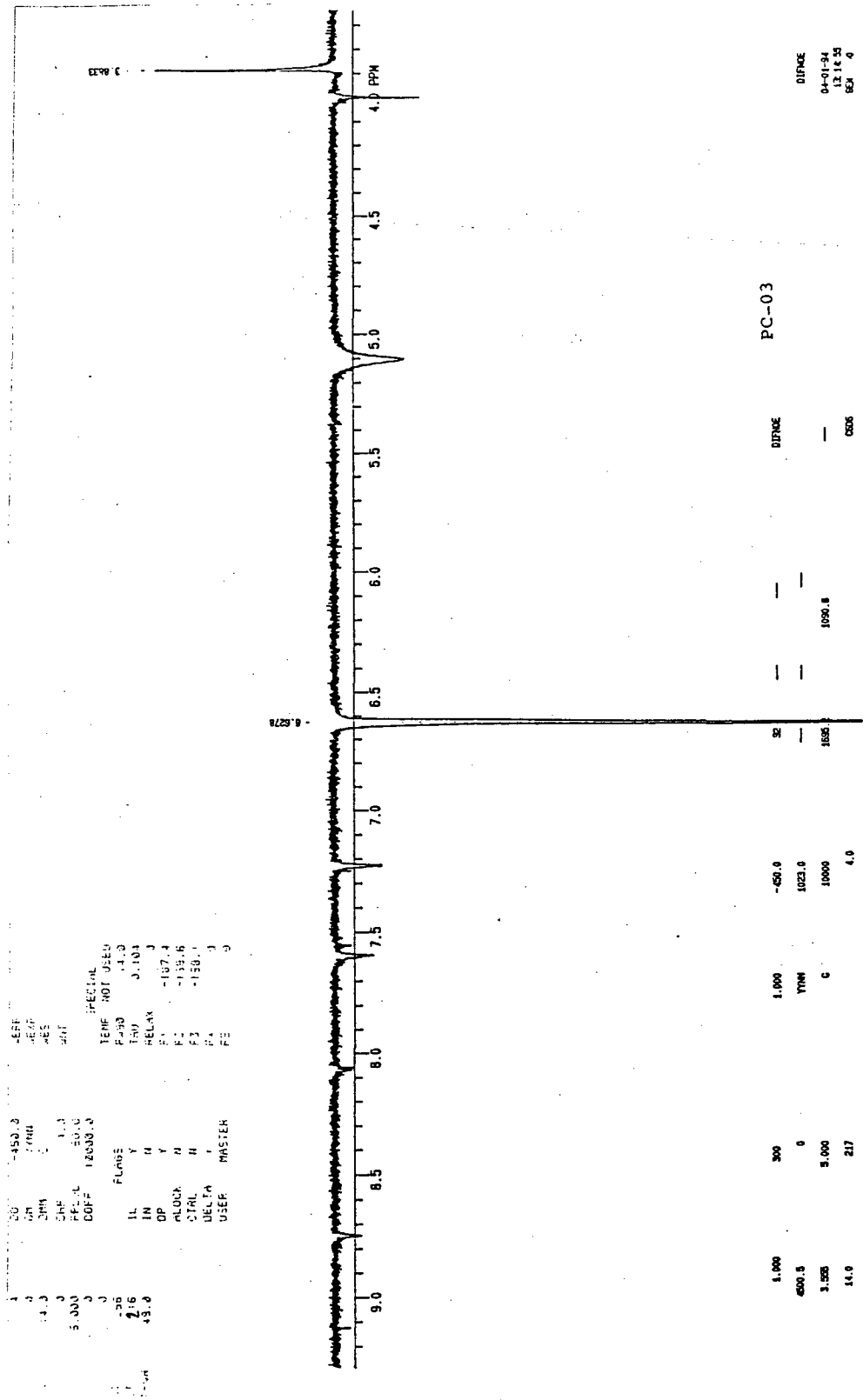


FIGURA 62 - Espectro de RMN ¹ H/DIFNOE (irradiação em 6.62 ppm) do composto PC 03 em C₅D₅N

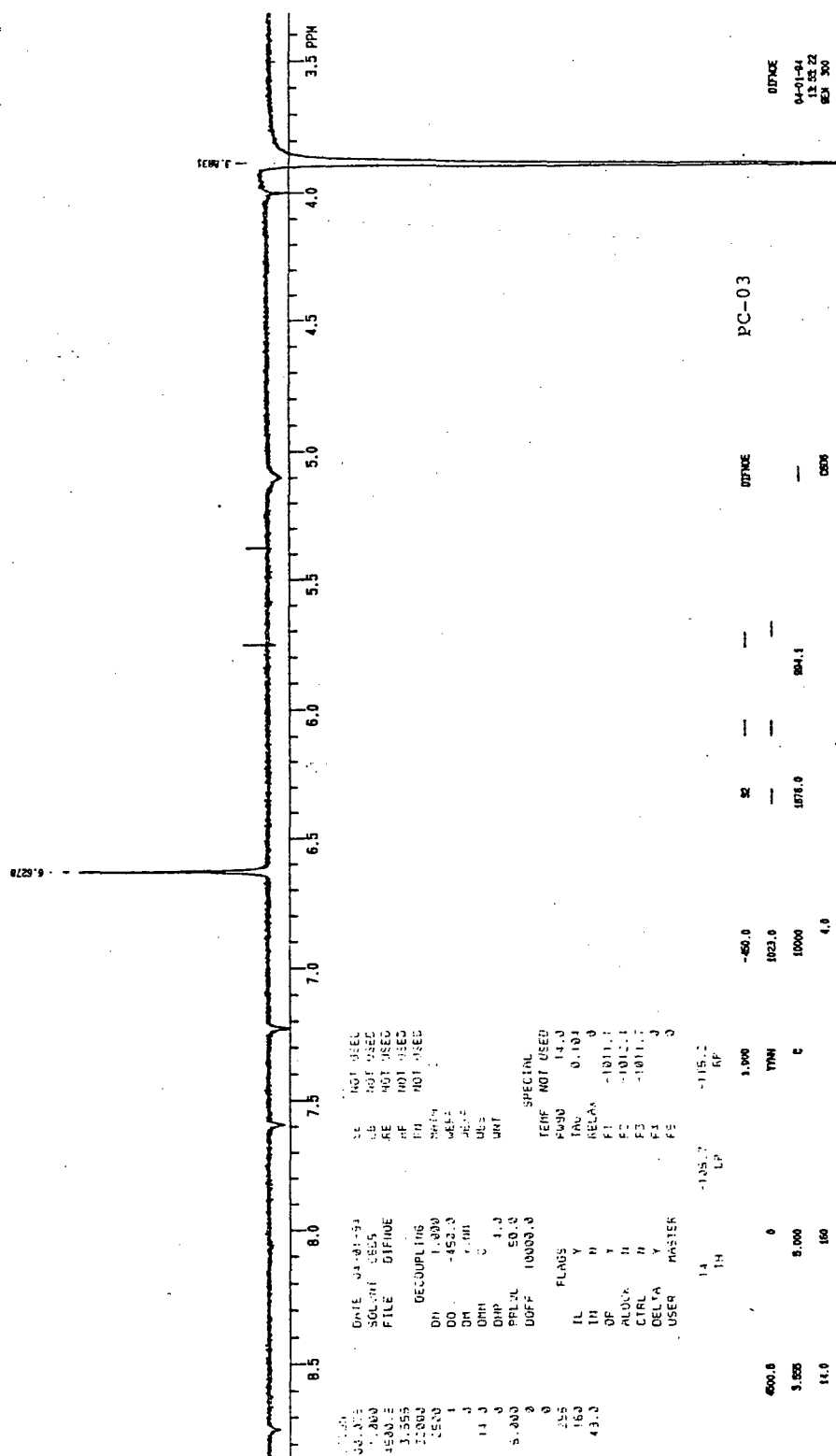


FIGURA 63 - Espectro de RMN ¹H/DIFNOE (irradiação em 3.38 ppm) do composto PC 03 em C₅D₅N

Mass Spectrum File: PC-3 .01 95-04-25 15:09
Comment: moacir - PC-3

Scan: 295 (0- 0) R.T.: 9.90min Base Peak: 273.0 Int: 32260(=100%)
100.0%

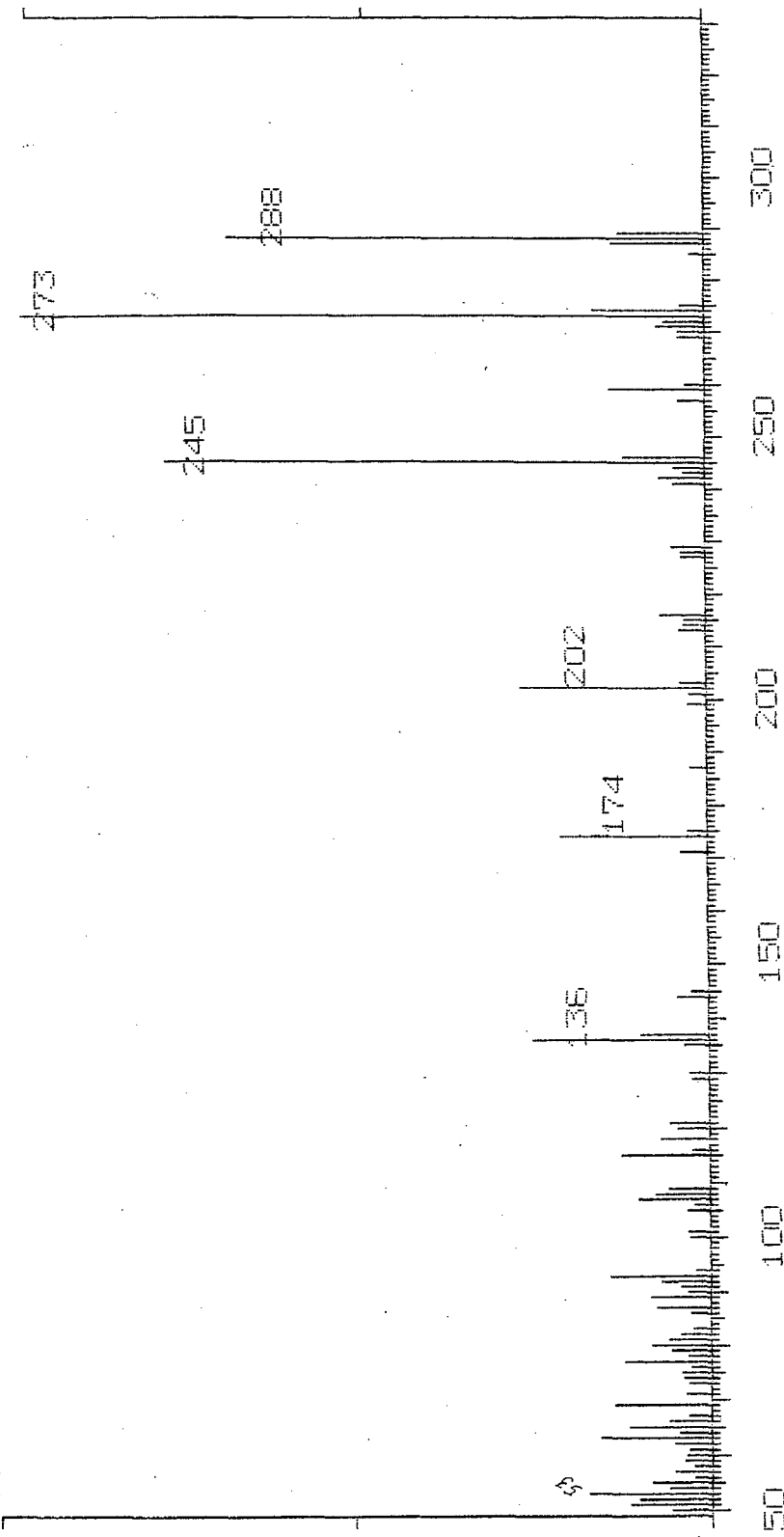


FIGURA 64 - Espectro de Massa do composto PC 03

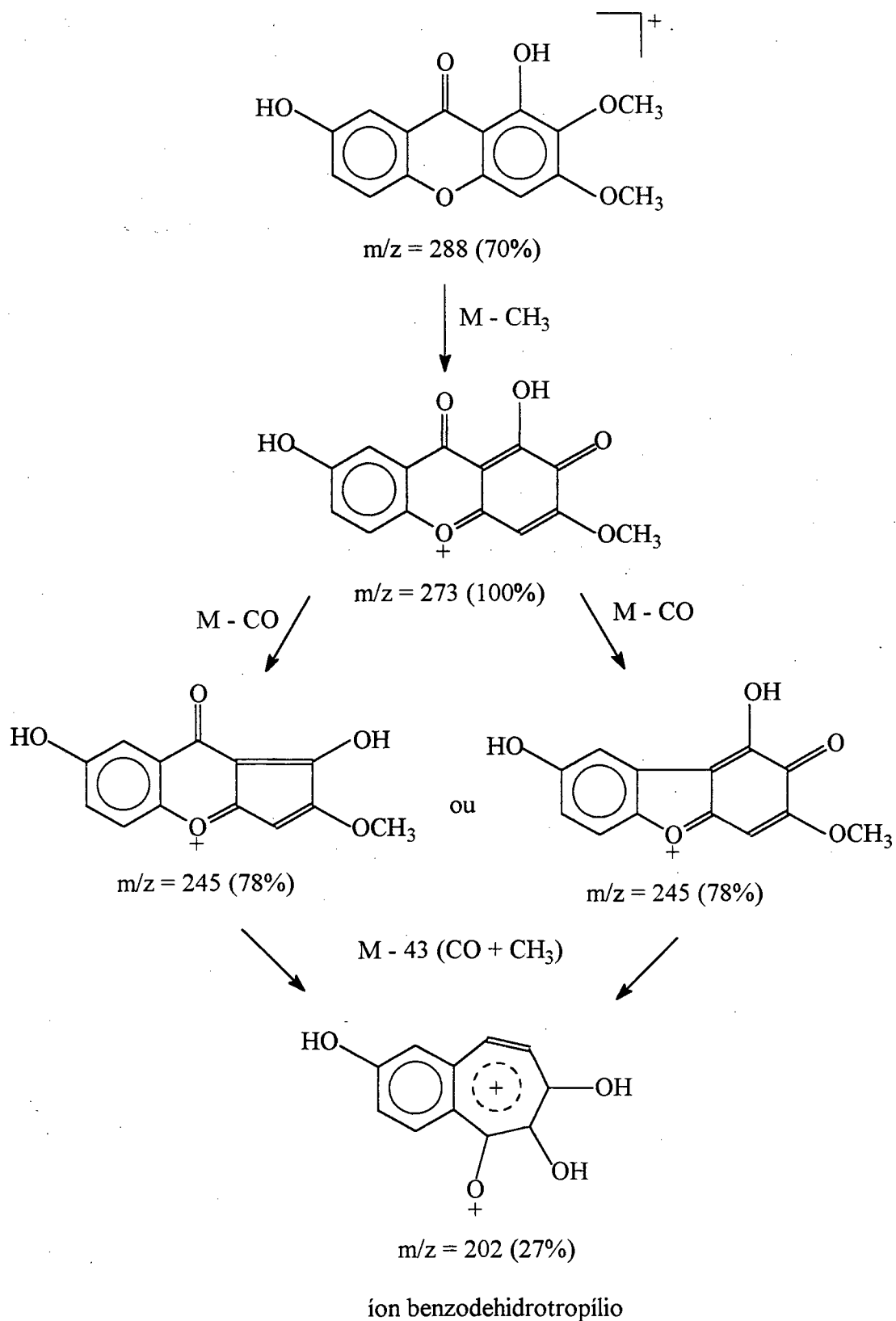


FIGURA 65 - Proposta de fragmentação dos principais íons do espectro de Massa do composto PC 03

4.3.7 - PC 05 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona)

O espectro de UV (Fig.67) de PC 05 apresenta um grupo de absorções com máximos em 209.7 nm, 234.8 nm e 254.3 nm, característico de xantonas.

As informações obtidas do espectro de IV (Fig.68) indicam um padrão de absorções característicos de xantonas, mostrando entre outras, uma absorção intensa em 3386 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação OH. Apresenta também uma absorção em 1630 cm^{-1} caracterizando uma carbonila conjugada (C=O); e na região de 1452 cm^{-1} são observadas absorções devido as deformações axiais das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de Massas (Fig 69) apresentou o pico molecular a m/z 320 sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_8$ compatível com uma xantona hexaoxigenada e um padrão de fragmentação característico de xantonas (Fig. 70).

O espectro de RMN^1H (Fig.71), obtido em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, apresentou apenas três sinais simples com intensidades relativas 1:1:3, que juntamente com a presença de apenas oito sinais no espectro de RMN^{13}C e considerando a fórmula molecular sugerida no espectro de Massa, trata-se de uma estrutura simétrica.

O singlete em 4.00 ppm com intensidade relativa para três prótons foi atribuído a presença de dois grupos metoxilas. Um singlete em 12.61 ppm com intensidade relativa 1 (um) indica a presença de duas hidroxilas queladas que deverão situar-se necessariamente nas posições C-1 e C-8. A oxigenação em C-8 é confirmada pela ausência de sinais para prótons aromáticos em campo baixo. O singlete em 6.78 ppm também com intensidade relativa 1 (um) refere-se aos prótons CH aromáticos.

A análise dos espectros de $\text{RMN}^{13}\text{C/APT}$ (Fig.72) indica inicialmente a presença de uma carbonila (C=O) em 183.93 ppm. O sinal em 60.52 ppm refere-se a duas metoxilas simétricas (OMe-2 e OMe-7), cuja posição foi deduzida pelo valor de seu deslocamento químico típico de metoxila aromática ortodissubstituída.

Os carbonos aromáticos quaternários C-8a e C-8b mostram seu deslocamento químico em 101,69 ppm e os quatro carbonos aromáticos oxigenados em 132.17 ppm (C-2 e C-7), 153.76 ppm (C-4a e C-4b), 154.69 ppm (C-3 e C-6) e 160.51 ppm (C-1 e C-8).

A análise dos dados espectrais mostrados acima leva a proposição de uma xantona simétrica 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxi, cuja estrutura proposta pode ser observada na Figura 66. Concordando com esta proposta estrutural, a Figura 70 apresenta os caminhos de fragmentação para os principais íons mostrados no espectro de Massa de PC 05.

A acetilação de PC 05 com Ácido Acético em piridina levou a formação de vários derivados acetilados, sendo o de menor RF o produto majoritário, como mostrou análise por HPTLC. Esta mistura resultante da acetilação de PC 05 foi submetida a separação por cromatografia Flash levando ao isolamento do produto majoritário.

O espectro de RMN ^1H do produto acetilado (Fig.73), obtido em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, mostrou um singlete em 2.60 ppm com intensidade para três prótons característicos do grupo acetil e um singlete em 13.94 ppm referente a uma hidroxila quelada. Estes dados mostram que a xantona PC 05 foi mono-acetilada e que a acetilação ocorreu na hidroxila em C-8 ou C-1. Este espectro também mostra o efeito sobre o deslocamento químico dos demais prótons da estrutura causado pela presença de um grupo acetil na molécula:

* singlete atribuído às metoxilas em C-2 e C-7 (4.00 ppm) foi desdobrado para dois singletes em 3.94 e 3.97 ppm ;

* singlete atribuído aos prótons aromáticos em C-4 e C-5 (6.78 ppm) foi desdobrado em dois singletes centrados em 6.67 e 7.01 ppm.

O resultado da análise do espectro de próton do derivado mono-acetilado de PC 05 confirma a simetria desta xantona contribuindo também para a confirmação da estrutura proposta. O rendimento de PC 05 foi de 0.0033 %.

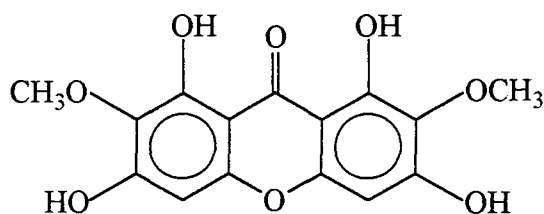


FIGURA 66 - Estrutura do composto PC 05 (1,3,6,8-tetrahydroxi-2,7-dimetoxixantona)

A seguir podemos observar os dados espectroscópicos do composto PC 05

* PF: 235 °C

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 209.7; 234.8; 254.3; 326.5

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3386 (OH); 1630 (C=O); 1452 (C=C)

* EM (70 eV) m/z (%): 320 [M+] (100); 305 [M-CH₃] (83); 277 [M-CO] (81); 262 [M-CH₃] (13); 234 [M-CO] (58); 206 (19); 167 (18); 131 (14); 98 (14); 77 (11); 69 (58)

* RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 4.00 s (6H, OCH₃-2 e 7); 6.78 s (2H, H-4 e 5); 12.61 s (2H, OH-1 e 8)

* RMN ¹³C - APT (75 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 60.52 (OCH₃ -2 e 7); 95.45 (CH-4 e 5); 101.69 (C-8a e 8b); 132.17* (C-2 e 7); 153.76* (C-4a e 4b); 154.69* (C-3 e 6); 160.51* (C-1 e 8); 183.93 (C=O)

* os valores podem ser interconvertíveis

Acetilação

* RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 2.60 s (3H, OCOCH₃); 3.94 s (3H, OCH₃); 3.97 s (3H, OCH₃); 6.67 s (1H, H-5); 7.01 s (1H, H-6); 13.9 s (1H, OH)

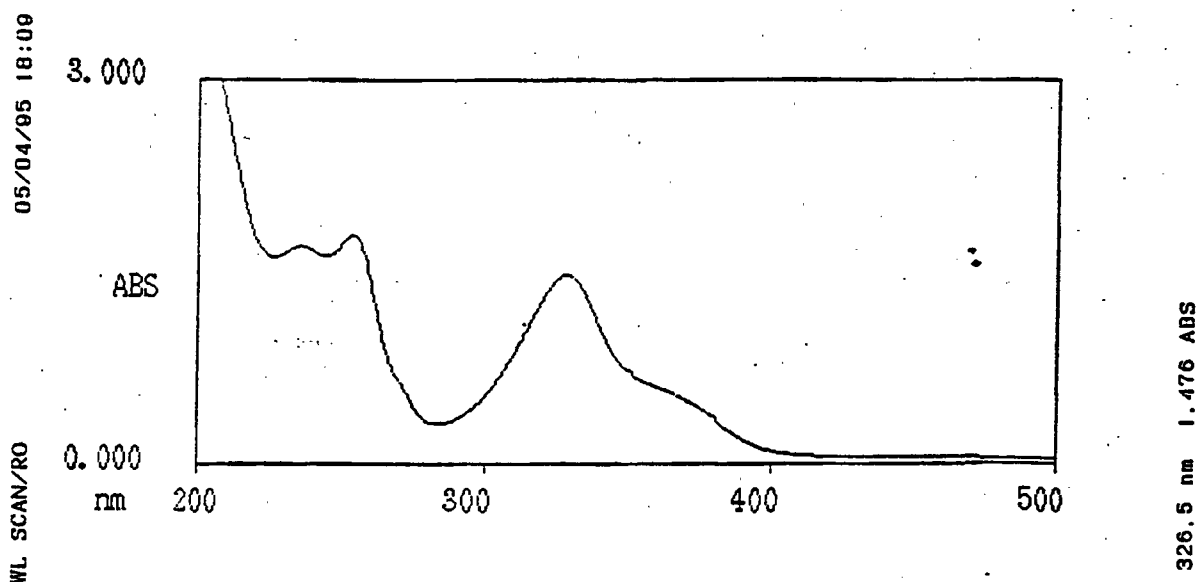


FIGURA 67 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 05

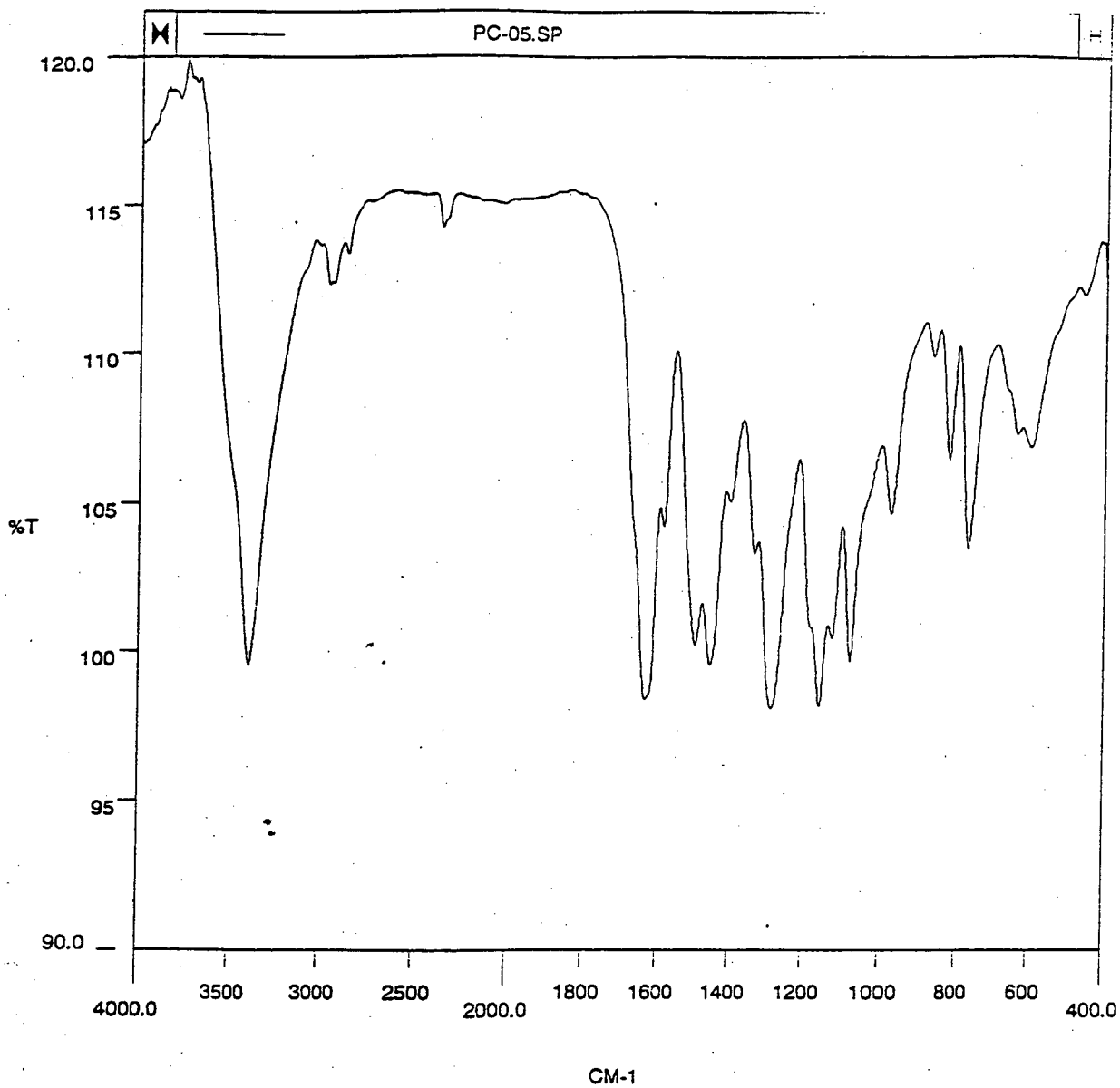


FIGURA 68 - Espectro de Infravermelho do composto PC 05

Mass Spectrum File: PC-05 .01 95-04-25 16:44
Comment: moacir - PC05

Scan: 206 (0- 0) R.T.: 6.93min Base Peak: 320.0 Int: 19210 (=100%)
100.0%

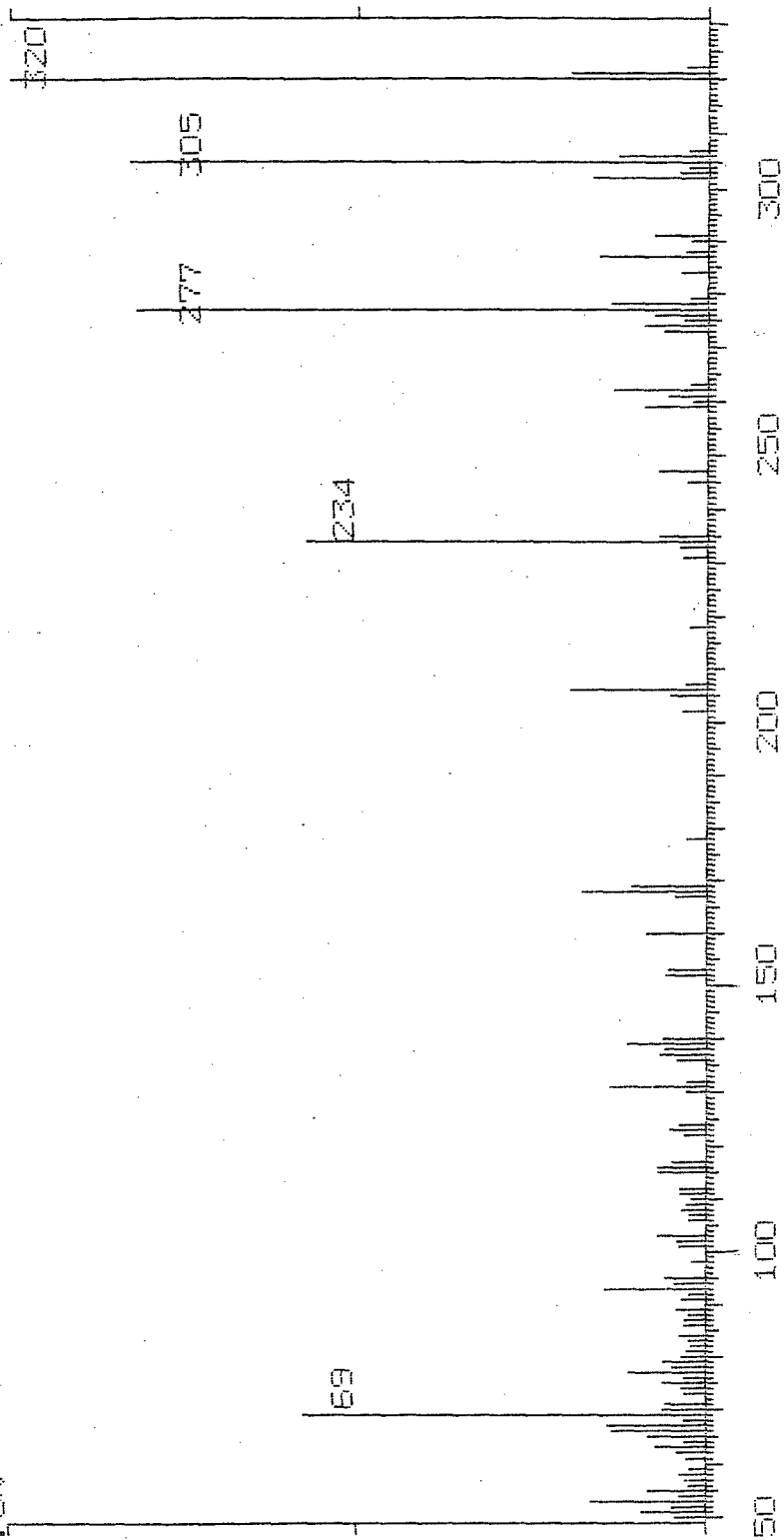


FIGURA 69 - Espectro de Massa do composto PC 05

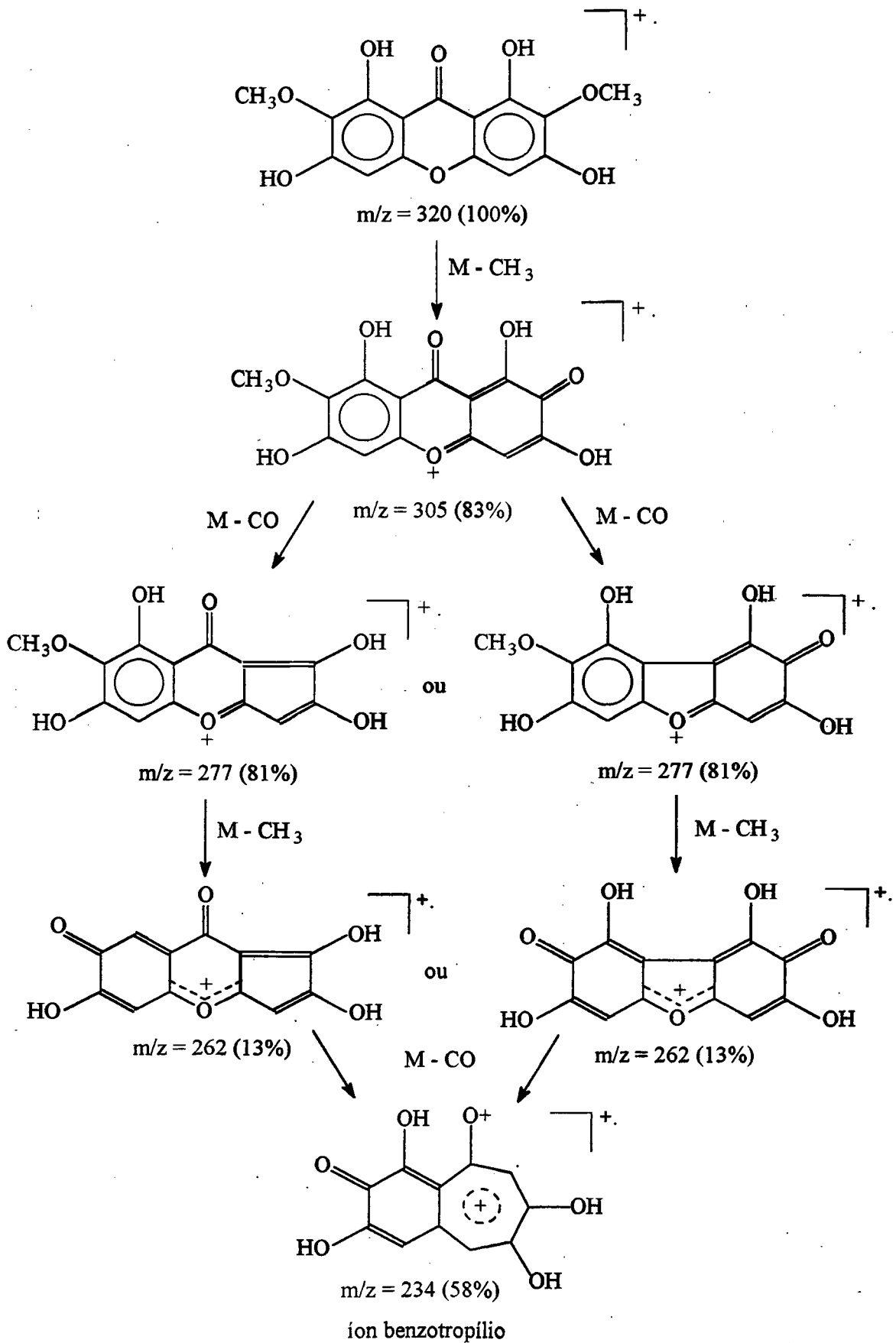


FIGURA 70 - Proposta de fragmentação dos principais íons do espectro de Massa do composto PC 05

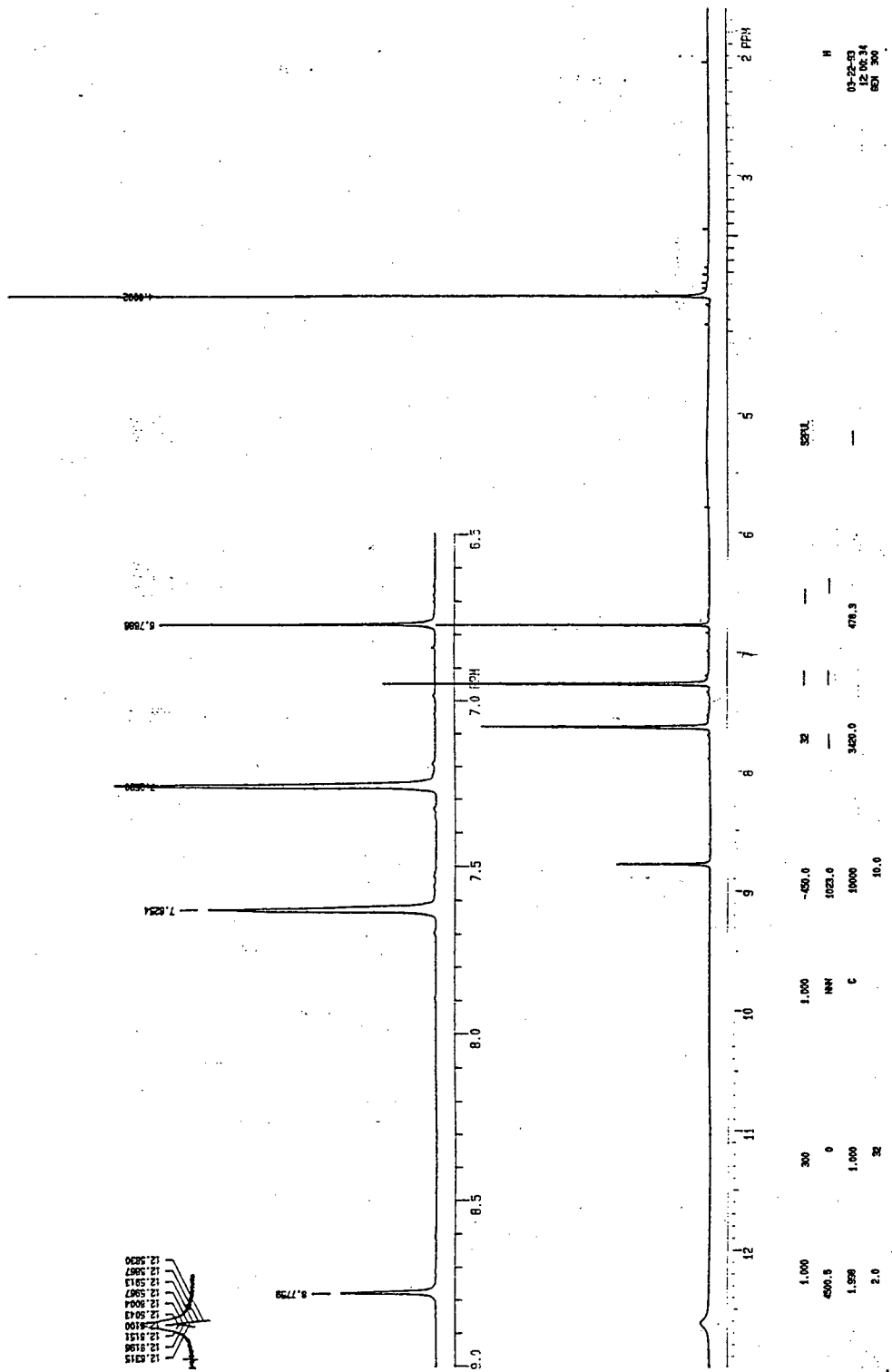


FIGURA 71 - Espectro de RMN ^1H do composto PC 05 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

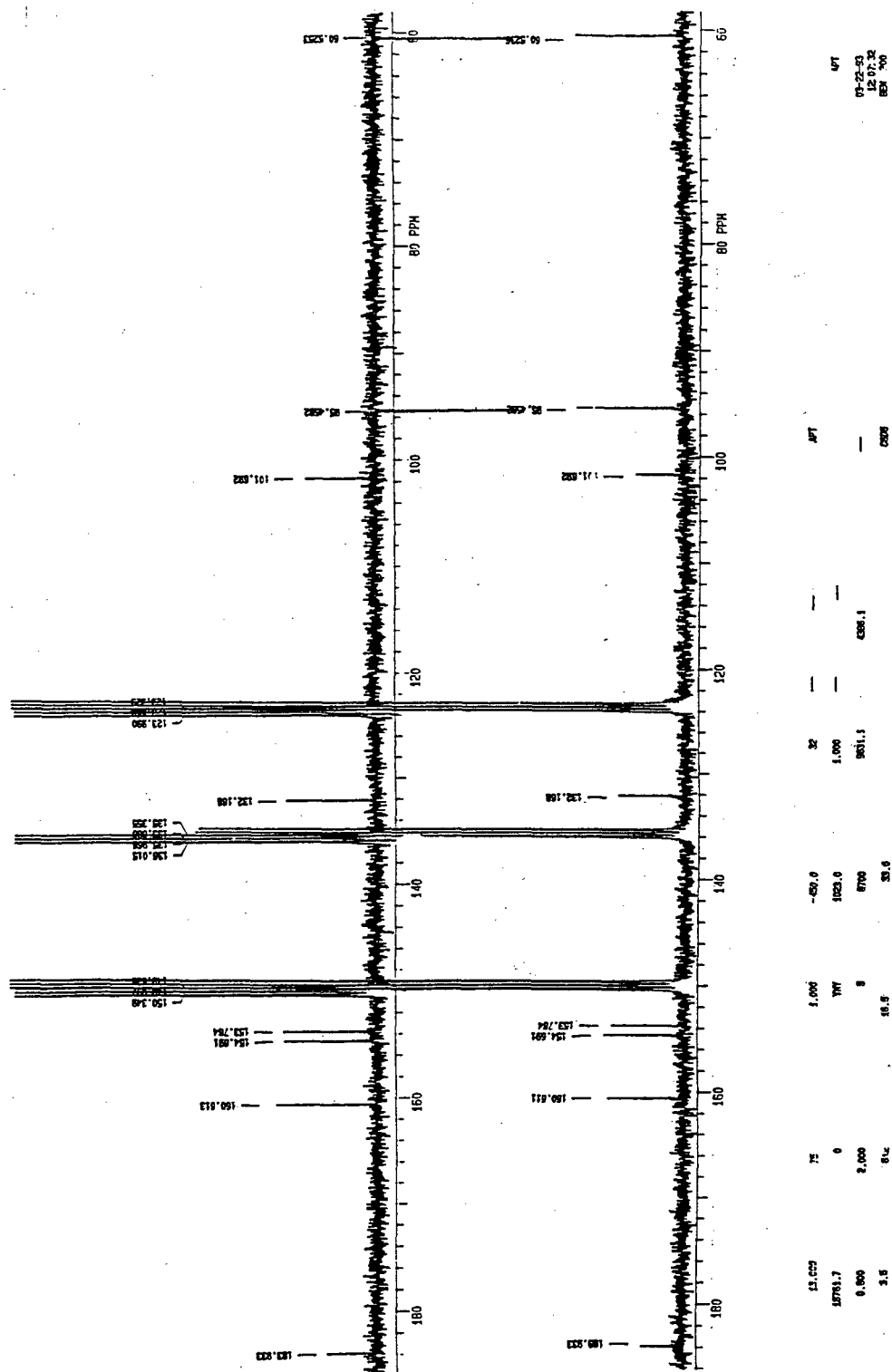


FIGURA 72 - Espectro de $^{13}\text{C}/\text{APT}$ do composto PC 05 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

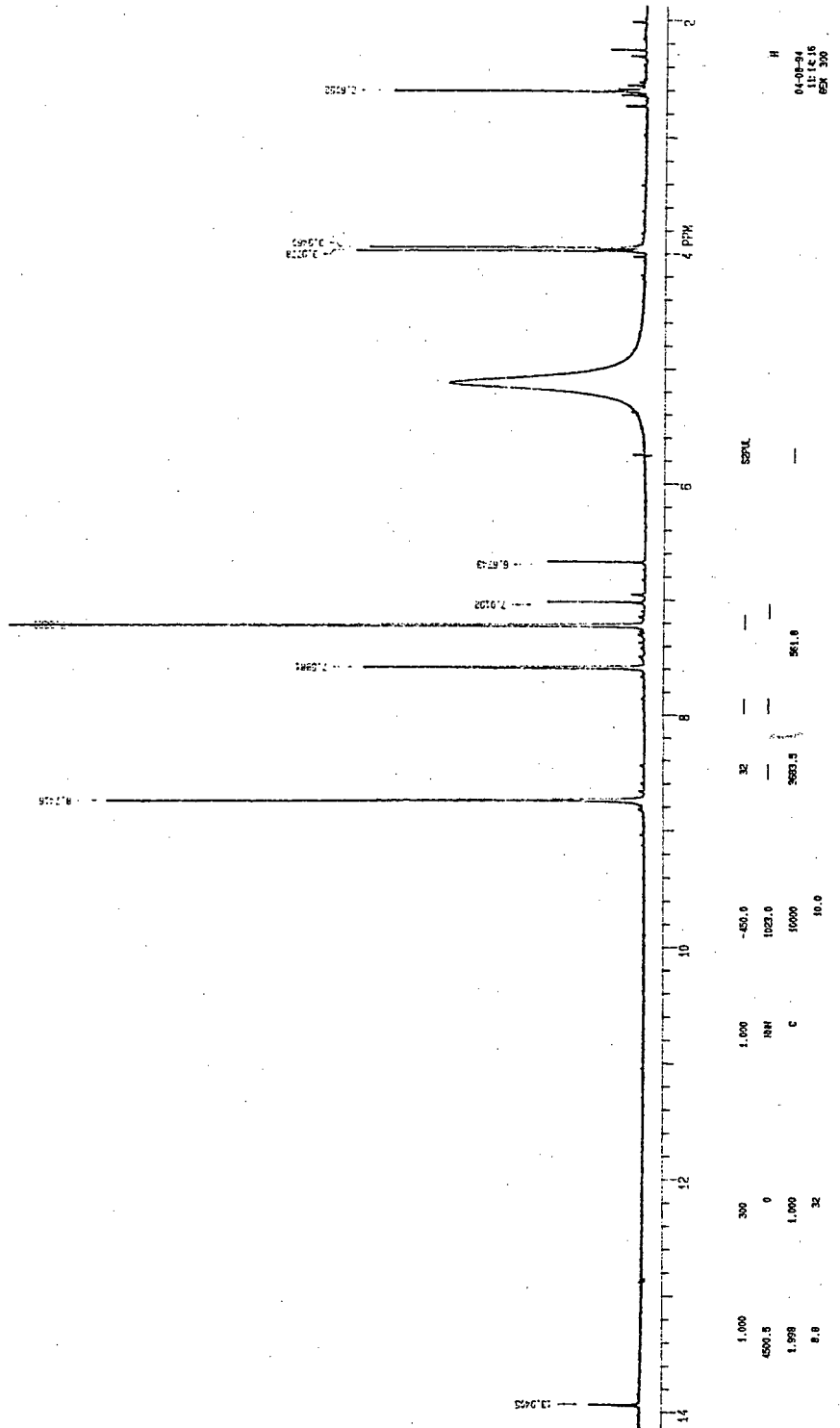


FIGURA 73 - Espectro de ^1H RMN do composto PC 05 monoacetilado em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

4.3.8 - PC 06 (1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona)

O espectro de UV (Fig. 75) apresenta absorções máximas em 226.6 nm, 257.7 nm, 307.7 nm e 374.0 nm, características da presença de grupos cromóforos para xantonas.

No espectro de IV (Fig.76) pode-se observar a presença de estiramento de ligação OH em 3390 cm^{-1} . Uma banda intensa em 1652 cm^{-1} indica deformação axial do grupo carbonila conjugado (C=O). Em 1582 cm^{-1} observam-se deformações axiais de C=C de anel aromático em sistemas conjugados.

O espectro de próton (Fig.77) feito em CD_6CO apresenta um singlete em 3.87 ppm com intensidade relativa para três prótons referente ao grupo metoxila. Outro singlete é observado na região de 13.16 ppm sendo característico de uma hidroxila quelada em C-1. O singlete na região dos prótons aromáticos em 6.49 ppm indica que o anel A possui substituição em três posições.

No anel B pode-se observar uma substituição em C-7 de um grupo hidroxila, sendo esta deduzida pelos deslocamentos químicos e acoplamentos de três prótons aromáticos:

*um dublete em 7.46 ppm ($J=8.8\text{ Hz}$) com constante de acoplamento orto, referente ao próton H-5 acoplado com o próton H-6;

*um duplo dublete em 7.37 ppm ($J=9.0\text{ e }3.0\text{ Hz}$) atribuído ao próton H-6. Este próton está orto-meta relacionado com os prótons H-5 e H-8

*um dublete em campo mais baixo, em 7.58 ($J=3.1\text{ Hz}$) com constante de acoplamento meta referente ao próton H-8, que está sob influência do campo de desproteção anisotrópica da carbonila.

Os espectros de RMN ^{13}C (Fig. 78 e 79) e DEPT-135 (Fig. 80) feito em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ apresenta o deslocamento químico referente a metoxila em 60.37 ppm indicando que a mesma situa-se em posição relativa orto-dissubstituída. Assim, considerando a análise do espectro de próton, este sinal refere-se ao grupo metoxila em C-2. Podemos concluir ainda que o próton aromático em 6.49 ppm está localizado na posição C-4 do anel A.

O carbono CH aromático do anel A apresenta um sinal em campo mais alto, localizado em 94.94 referente a CH-4. Os carbonos metínicos restantes são observados em 109.17 (CH-8), 119.26 (CH-5) e 125.11 (CH-6) ppm, todos referentes ao anel B.

A existência de seis carbonos quaternários oxigenados, localizados em 131.69 (C-2), 150.1 (C-4b), 154.03 (C-4a), 155.28(C-7), 155.39 (C-3) e 160.46 (C-1) ppm, indicam que na posição C-3 temos a substituição de um grupo hidroxila. Os

carbonos quaternários restantes são C-8b e C-8a com deslocamentos químicos em 103.43 e 121.32 ppm, respectivamente. Finalmente, podemos observar o sinal de uma carbonila (C=O) em 181.26 ppm.

O pico molecular M+ 274 u.m.a. do espectro de Massas (Fig. 81) permite escrever a fórmula C₁₄H₁₀O₆. O padrão de fragmentação característico de xantonas (Fig. 82), juntamente com o resultado das análises espectrocópicas acima, induzem a estrutura de uma xantona 1,3,7-hidroxi-2-metoxi substituída (Fig.74), apresentando um rendimento de 0.0031 %. Esta xantona é inédita tanto para a espécie *Polygala cyparissias* como no âmbito de produtos naturais, sendo isolada pela primeira vez no presente trabalho.

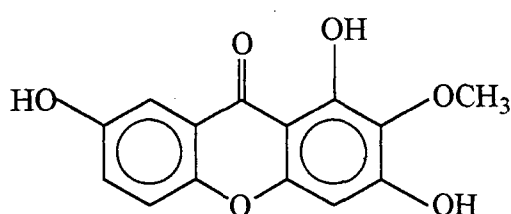


FIGURA 74 - Estrutura do composto PC 06 (1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona)

A seguir podemos observar os dados espectroscópicos:

* Pf : 240 °C

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 226.6; 257.7; 307.7; 374.0

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ : 3390 (OH); 2924; 1652 (C=O); 1582 (C=C)

* EM (70 eV) m/z (%): 274 [M+] (61); 259 [M-CH₃] (54); 231 [M-CO] (100); 202 [M-CHO] (10); 174 (4); 147 (8); 137 (11); 93 (13); 77 (9); 65 (16)

* RMN ¹H (300 Mhz, CD₆CO) δ (ppm): 3.87 s (3H, Ome-2); 6.49 s (1H, H-4); 7.37 dd (1H, J=3.0 e 9.0 Hz, H-6); 7.46 d (1H, J=8.8 Hz, H-5); 7.58 d (1H, J=3.1 Hz, H-8); 13.16 s (1H, OH-1)

* RMN ¹³C/DEPT 135 (50 MHz, C₅D₅N) δ (ppm): 60.37 (OCH₃-2); 94.94 (CH-4); 103.43*(C-8b); 109.17 (CH-8); 119.26 (CH-5); 121.32* (C-8a); 125.11 (CH-6); 131.59* (C-2); 150.10* (C-4b); 154.03* (C-4a); 155.28* (C-7); 155.39* (C-3); 160.46* (C-1); 181.26 (C=O)

* os valores podem ser interconversíveis

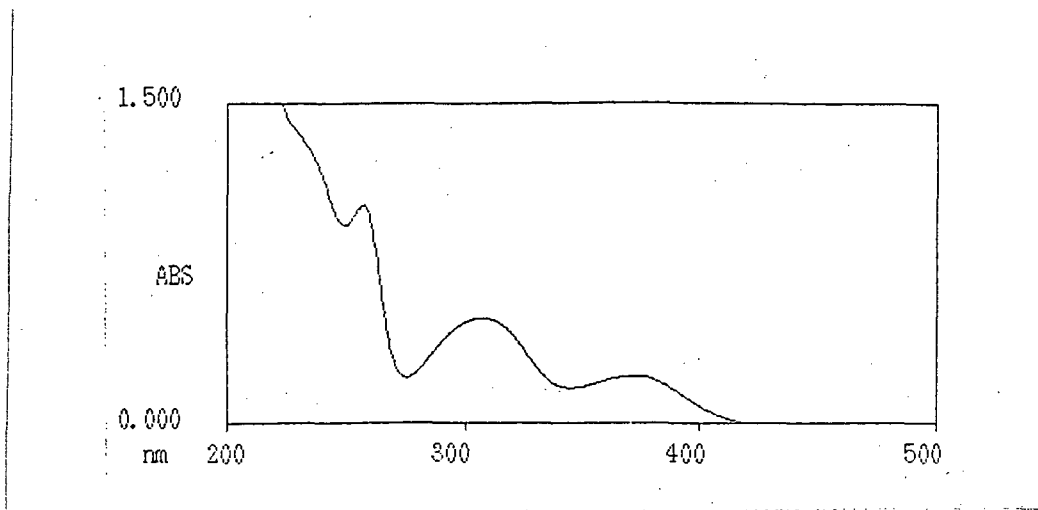


FIGURA 75 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 06

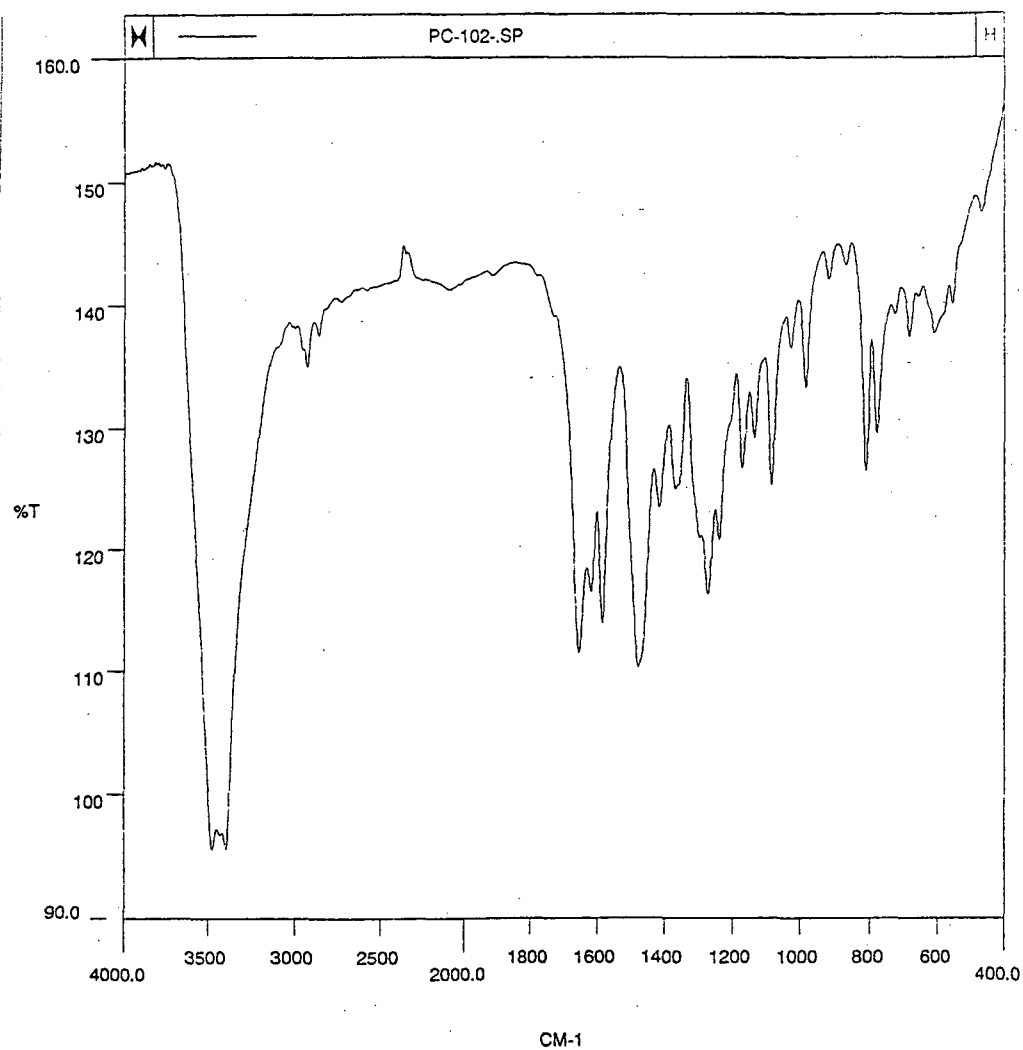


FIGURA 76 - Espectro de Infravermelho do composto PC 06

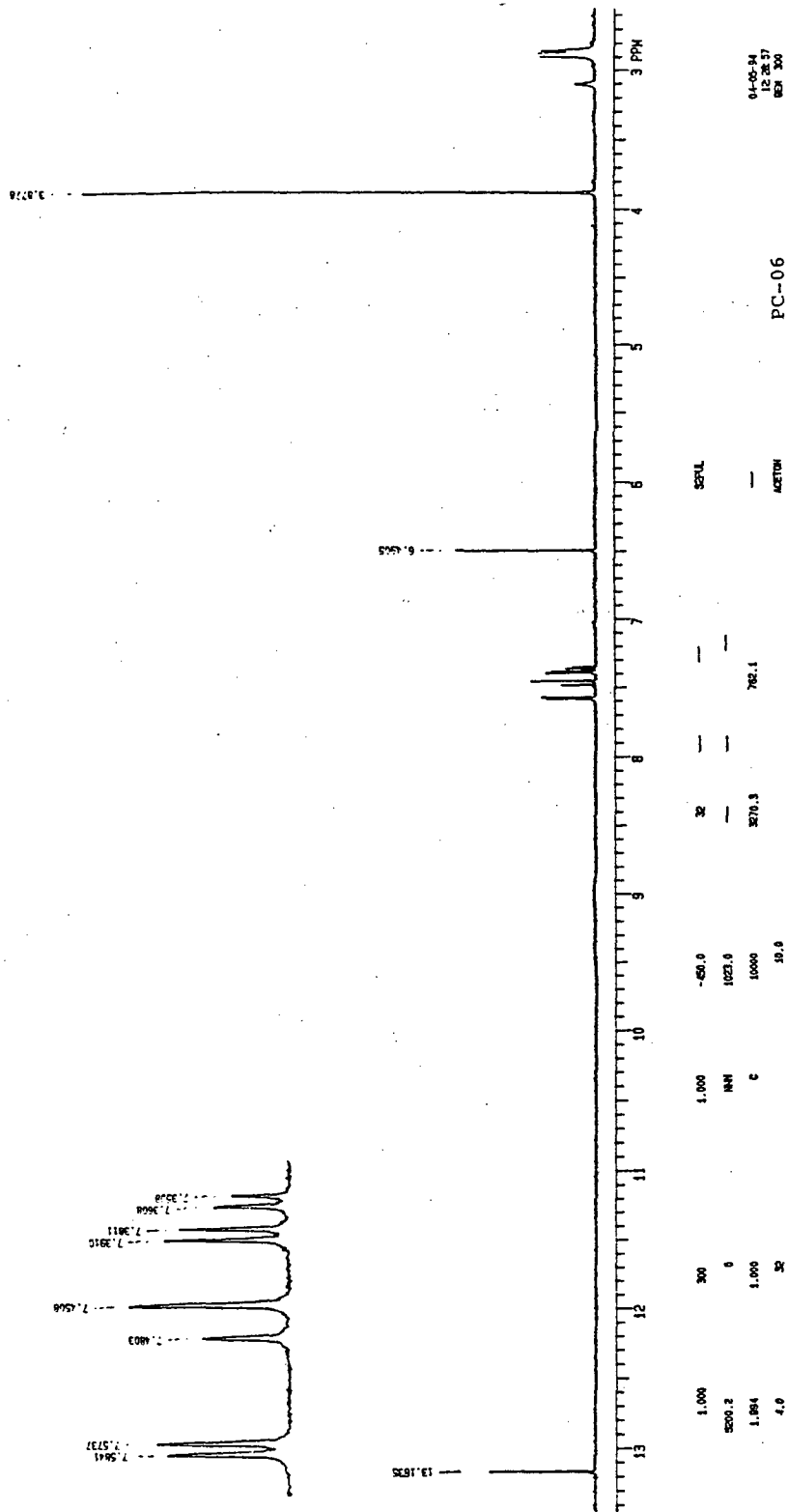


FIGURA 77 - Espectro de RMN ¹H do composto PC 06 em CDCl₃

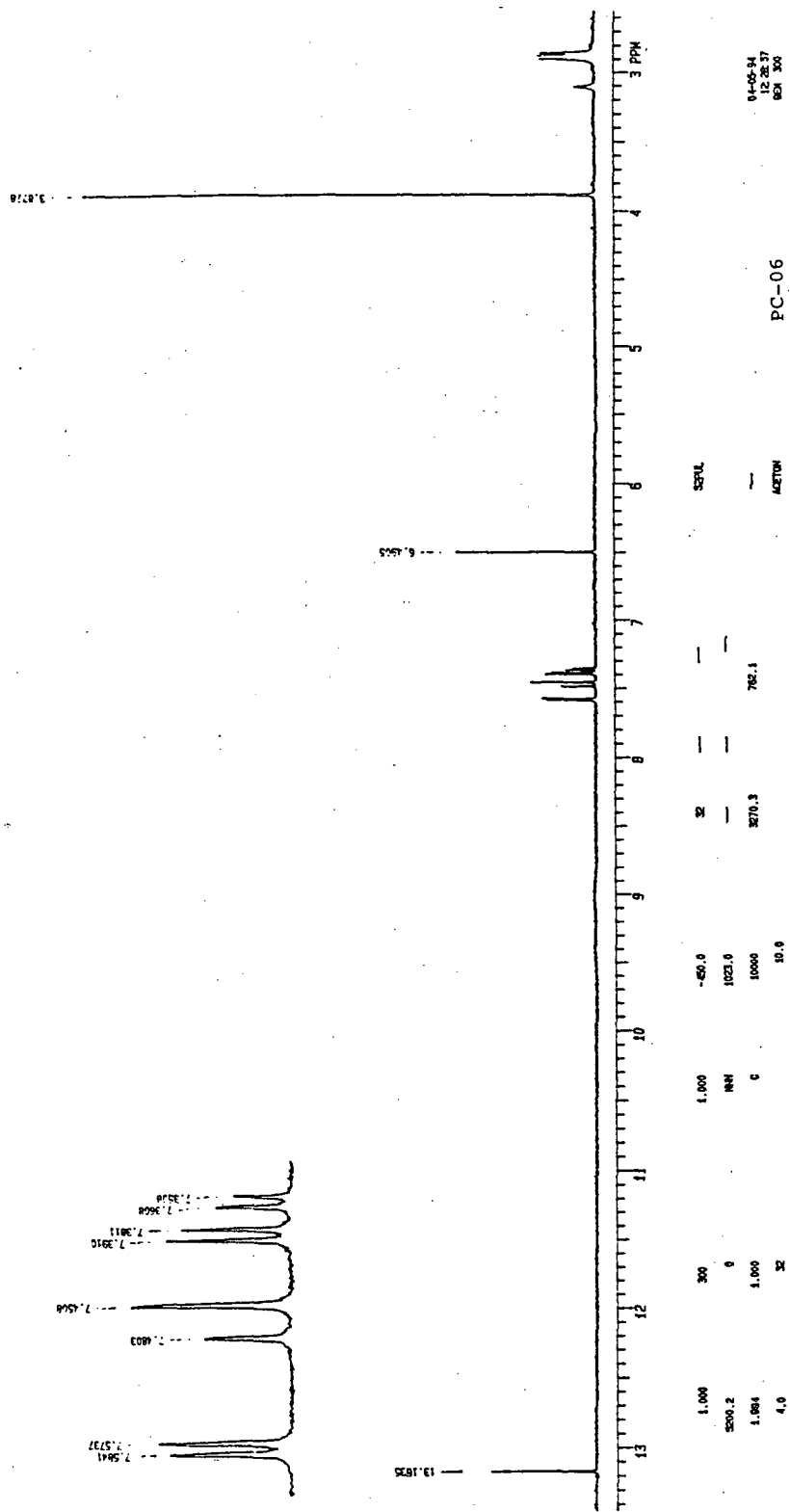


FIGURA 77 - Espectro de RMN ¹H do composto PC 06 em CDCl₃

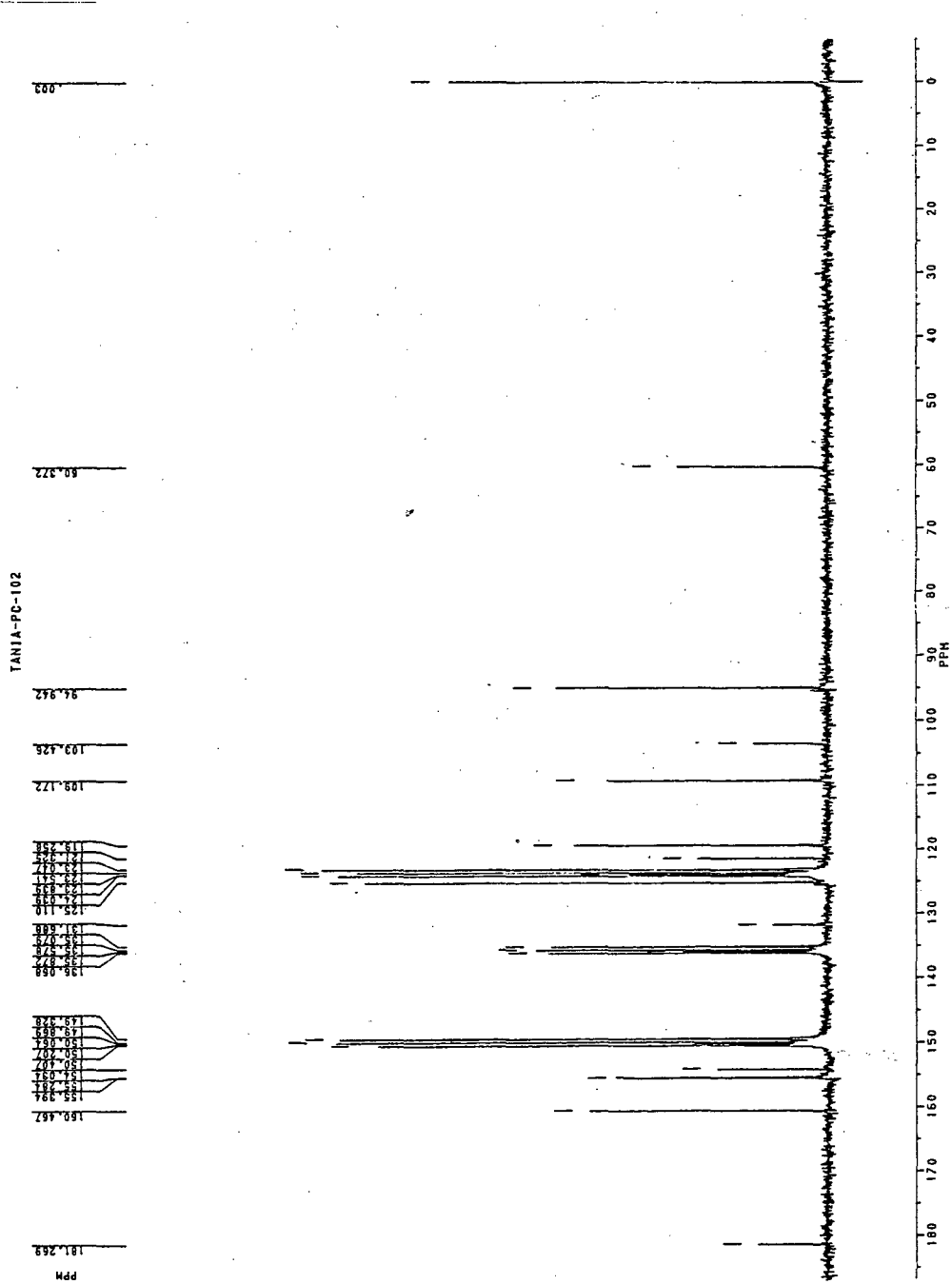


FIGURA 78 - Espectro de RMN ¹³C do composto PC 06 em C₅D₅N

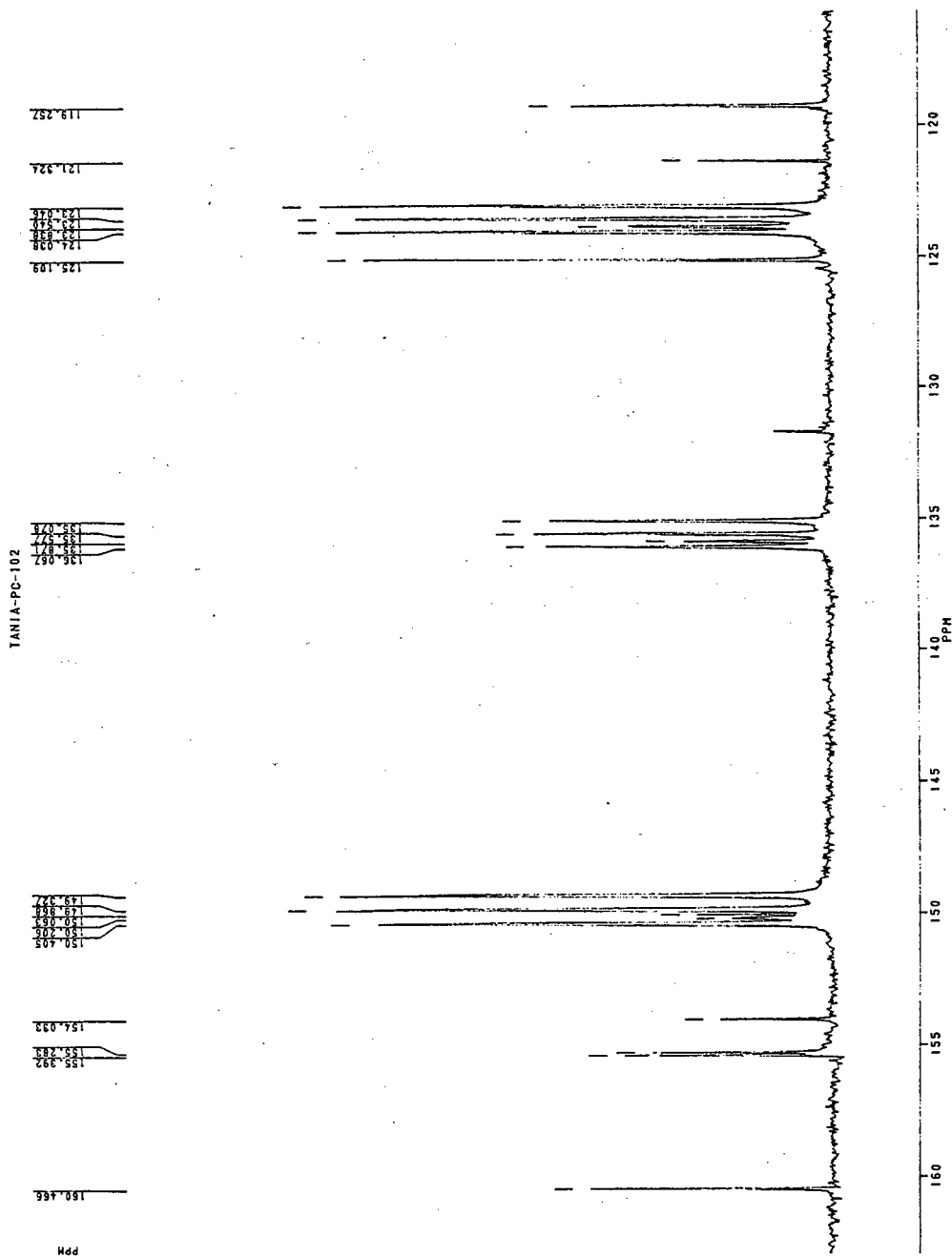


FIGURA 79 - Espectro de RMN ¹³C expandido em 115 a 160 ppm do composto PC 06 em C₅D₅N

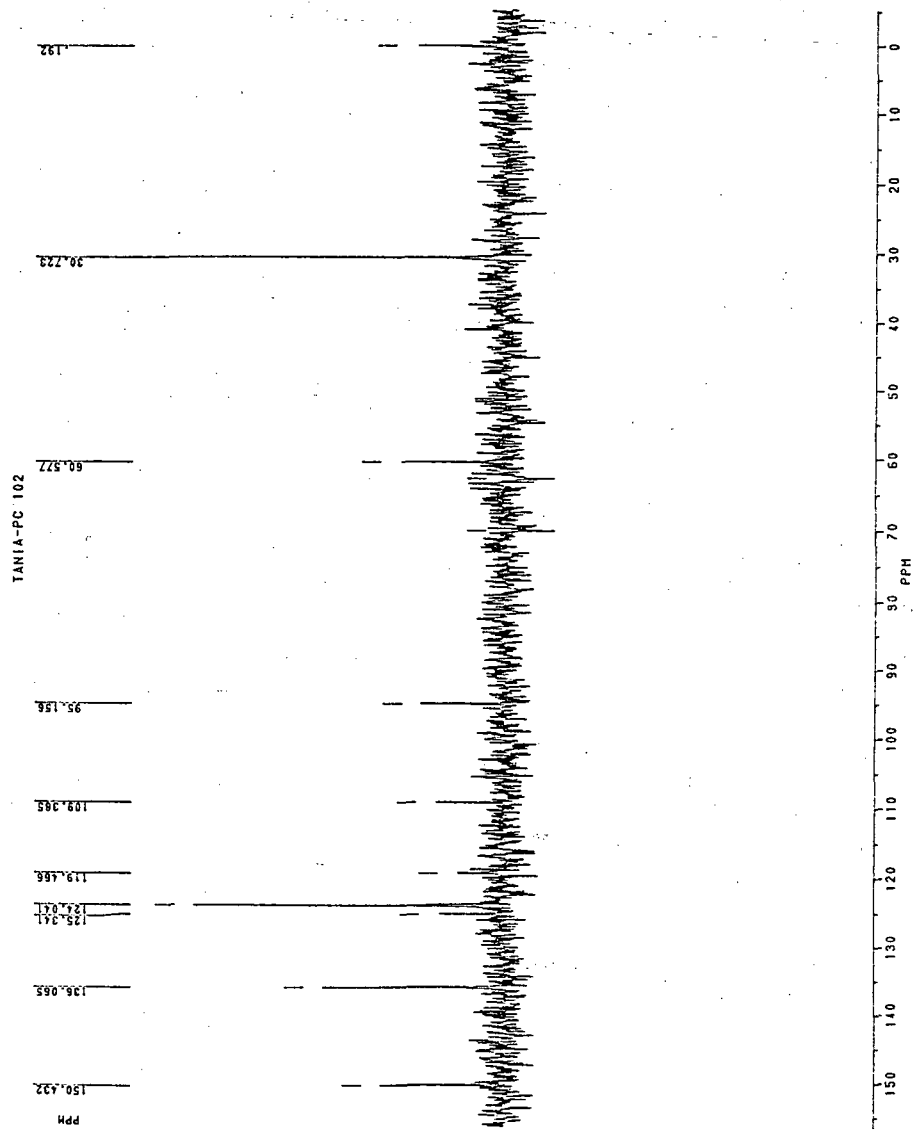


FIGURA 80 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 do composto PC 06 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Mass Spectrum File: PC-06 .01 95-04-20 15:16
Comment: moacir - amostra pc-06

Scan: 208 (0- 0) R.T.: 7.00min Base Peak: 231.0 Int: 54000(=100%)
100.0%

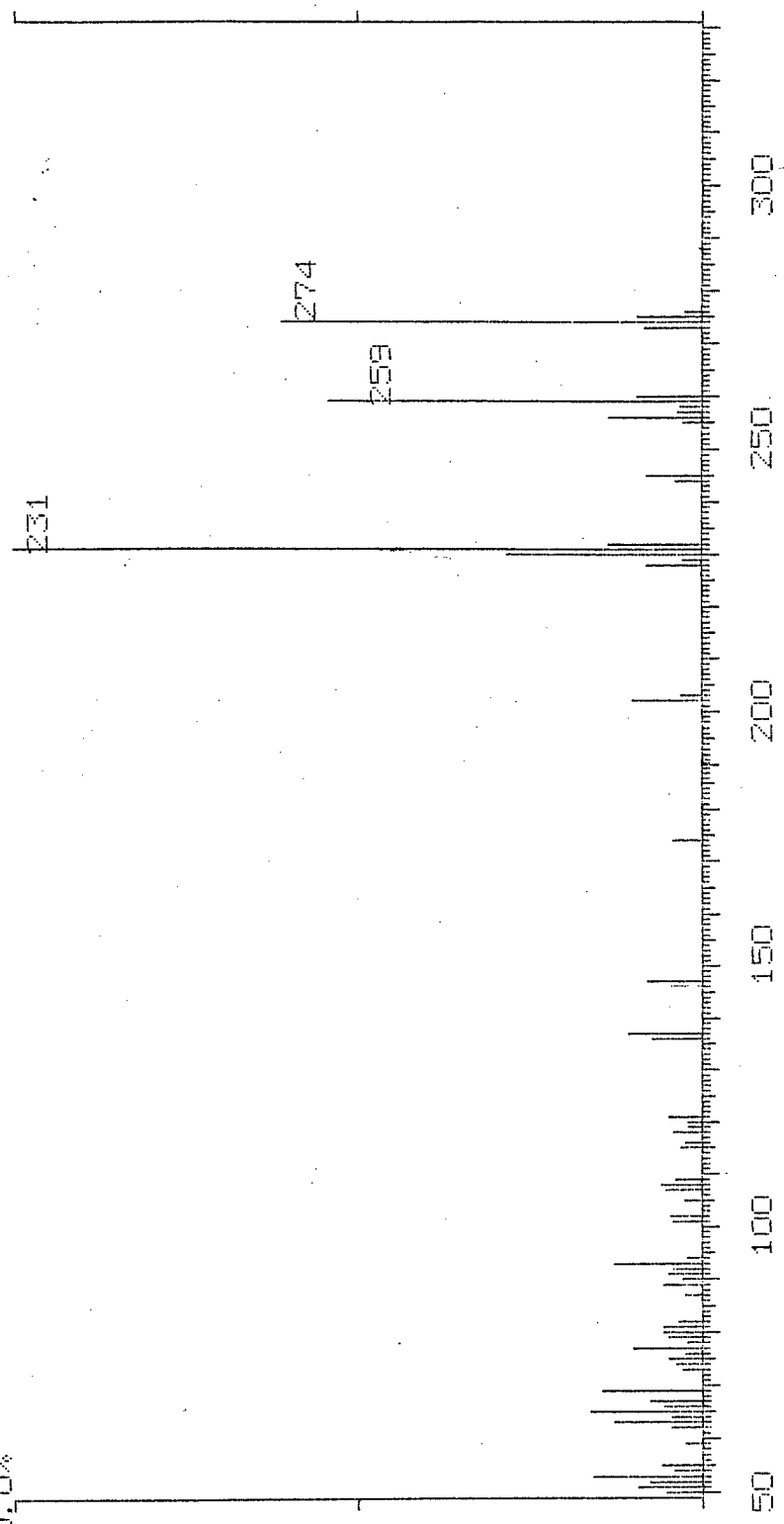


FIGURA 81 - Espectro de Massa do composto PC 06

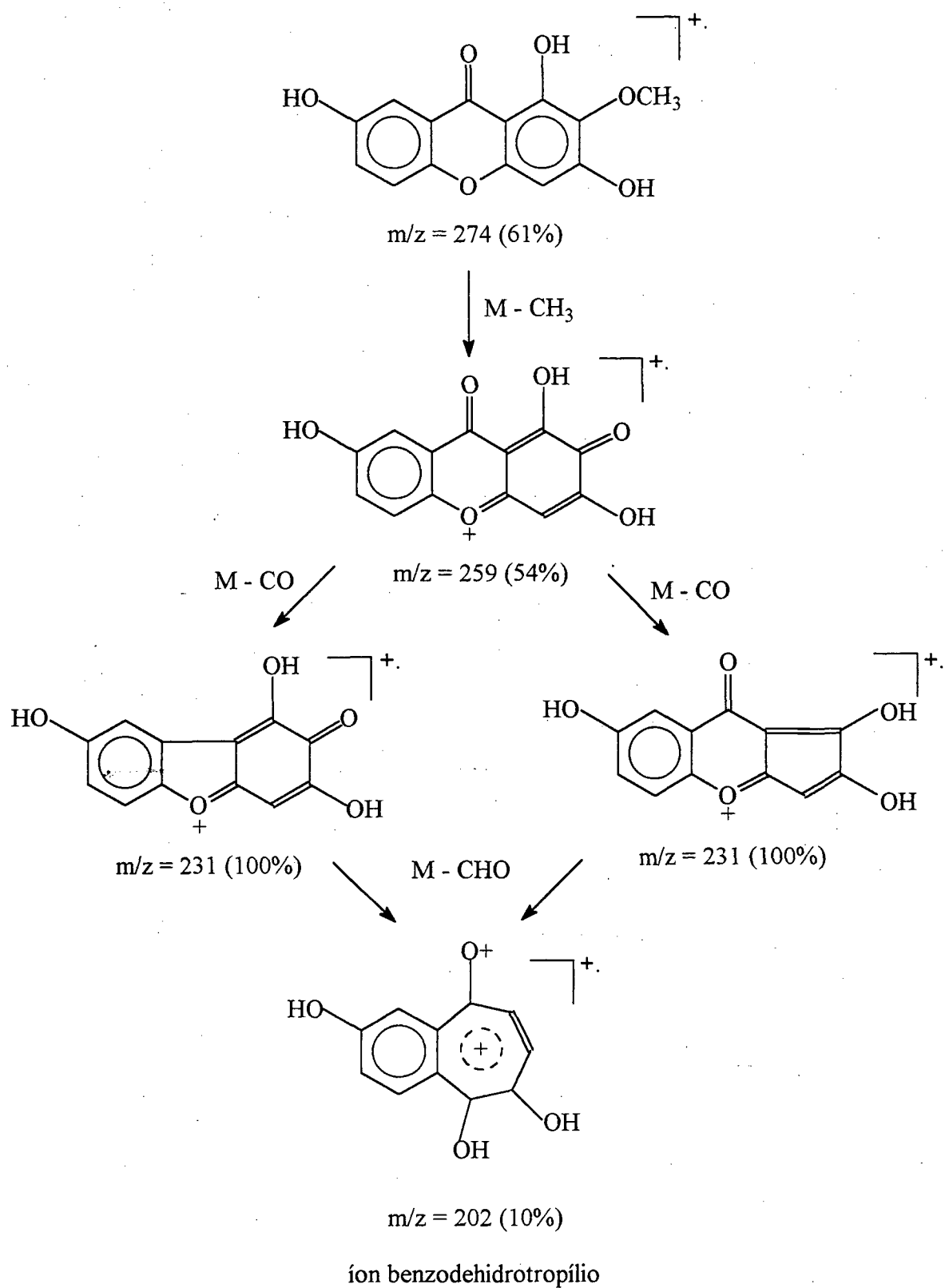


FIGURA 82 - Proposta de fragmentação dos principais íons do espectro de Massa do composto PC 06

4.3.9 - PC 07 (1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona)

No espectro de UV (Fig.84) podemos observar absorções em 220.0 nm, 252.2 nm, 317.7 nm e 358.0 nm indicando a existência de grupos cromóforos condizentes com uma estrutura de xantona.

O espectro de IV (Fig. 85) mostra uma banda larga em 3390 cm^{-1} indicando deformação axial da ligação OH. Em 1650 cm^{-1} podemos observar a intensa absorção referente ao grupo carbonila conjugado (C=O). Deformações axiais de ligações C=C de anel aromático conjugado podem ser vistas em 1616 e 1576 cm^{-1} .

O espectro de próton (Fig.86) obtido em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ foi analisado, tendo consciência de que o mesmo apresenta-se impuro. Podemos observar dois singletes em 3.75 e 3.99 ppm indicando a presença de dois grupos metoxilas. Apresenta também um singlete em 14.10 ppm indicando a presença de um hidroxila quelada na posição C-1.

Na região de prótons aromáticos observa-se três singletes em 6.78 ppm, 7.18 ppm e 7.83 ppm, sendo que o último próton aparece em campo mais baixo referindo-se ao CH-8, que está sob influência do campo de desproteção anisotrópica da carbonila. Assim a posição do CH singlete em 7.18 ppm deve obrigatoriamente estar no carbono C-5.

Os espectros de RMN ^{13}C /APT (Fig.87) feito em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ apresentam deslocamentos químicos em 55.9 e 60.37 ppm indicando a presença de dois grupos metoxila, lembrando que o valor 60.37 ppm é típico de metoxila ortodissubstituída.

O sinal em campo mais alto localizado em 94.89 ppm refere-se ao carbono aromático CH-4 do anel A. Assim, de acordo com a análise do espectro de próton, os dois carbonos CH aromáticos restantes são 103.86 ppm referindo-se a CH-5 e 105.34 ppm referindo-se a CH-8.

A presença de dois carbonos quaternários em 112.29 ppm e 103.10 ppm são referentes aos carbonos C-8a e C-8b, respectivamente. Os deslocamentos químicos de sete carbonos quaternários oxigenados podem ser observados em 131.77 ppm (C-2), 146.92 ppm (C-7), 153.40 ppm (C-6), 153.85 ppm (C-1), 155.33 ppm (C-3), 156.35 ppm (C-4b) e 159.52 ppm (C-4a), e por fim uma carbonila em 180.47 ppm, indicando desta forma uma xantona pentaoxigenada.

Com base na análise dos espectros de RMN propõe-se uma xantona 1,2,3,6,7 substituída, com uma hidroxila em C-1. A definição dos demais substituintes foi proposta com dados de literatura comparando os sinais de próton (Tabela 9) e de RMN ^{13}C (Tabela 10) confirmando a estrutura de PC 07 como

1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona, isolada anteriormente de *Polygala tenuifolia* [39] e *Bredemeyera floribunda* [31].

TABELA 9 - Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) de próton de PC 07 (300 MHz) e 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (500 MHz)[39], ambos feitos em C_5D_5N .

PRÓTON	PC 07	XANTONA [39]
1 - OH	14.10 (s)	14.09 (s)
2 - OMe	3.99 (s)	4.00 (s)
3 - OH	-	-
H - 4	6.78 (s)	6.78 (s)
H - 5	7.18 (s)	7.17 (s)
6 - OH	-	-
7 - OMe	3.75 (s)	3.77 (s)
H - 8	7.83 (s)	7.81 (s)

Entre parênteses estão as multiplicidades dos sinais.

O resultado do espectro de Massa foi obtido com o monitoramento durante o aquecimento para a volatilização da amostra, pois a mesma não estava pura e assim forneceu vários espectros, sendo que o de maior intensidade mostrou o pico molecular m/z 304 (68 %) (Fig. 88), para a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_7$ e um padrão de fragmentação característico de xantonas. A análise dos fragmentos na Figura 89 constitui a estrutura proposta da Figura 83, onde o rendimento de PC 07 foi de 0.0014 %.

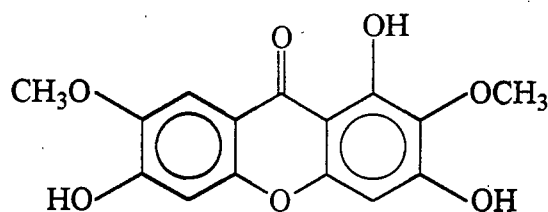


FIGURA 83 - Estrutura do composto PC 07 (1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona)

TABELA 10 - Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) de RMN ^{13}C de PC 07 (75 MHz) e 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (125 MHz) [39], ambos realizados em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

CARBONOS	PC 07	XANTONA [39]
C-1	153.85	153.8
C-2	131.77	131.7
C-3	155.33	155.2
C-4	94.89	94.8
C-4a	159.52	159.4
C-4b	156.35	156.3
C-5	103.86	103.8
C-6	153.40	153.4
C-7	146.92	146.8
C-8	105.34	105.3
C-8a	112.29	112.2
C-8b	103.1	103.1
C-9	180.47	180.4

Os dados espectroscópicos de PC 07 são observados a seguir:

* Pf: 210 °C

* UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 220.0; 252.2; 317.7; 358.0

* IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3390 (OH); 2944; 1650 (C=O); 1616; 1576 (C=C); 1290

* EM (70 eV) m/z (%) : 304 [M⁺] (68); 289 [M-CH₃] (78); 216 [M-CO] (100); 246 [M-CH₃] (38); 231 [M-CH₂O] (25); 217 [M-CHO] (13); 203 [M-CO] (8); 123 (7); 93 (10); 77 (15); 69 (59); 53 (25)

* RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm): 3.75 s (3H, OCH₃-7); 3.99 s (3H, OCH₃-2); 6.78 s (1H, H-4); 7.18 s (1H, H-5); 7.83 s (1H, H-8); 14.10 s (1H, OH-1)

* RMN ^{13}C /APT (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm): 55.95 (OCH₃-7); 60.37 (OCH₃-2); 94.89 (CH-4); 103.10 (C-8b); 103.86 (CH-5); 105.34 (CH-8); 112.29 (C-8a); 131.77 (C-2); 146.92 (C-7); 153.40 (C-6); 153.85 (C-1); 155.33 (C-3); 156.35 (C-4b); 159.52 (C-4a); 180.47 (C=O)

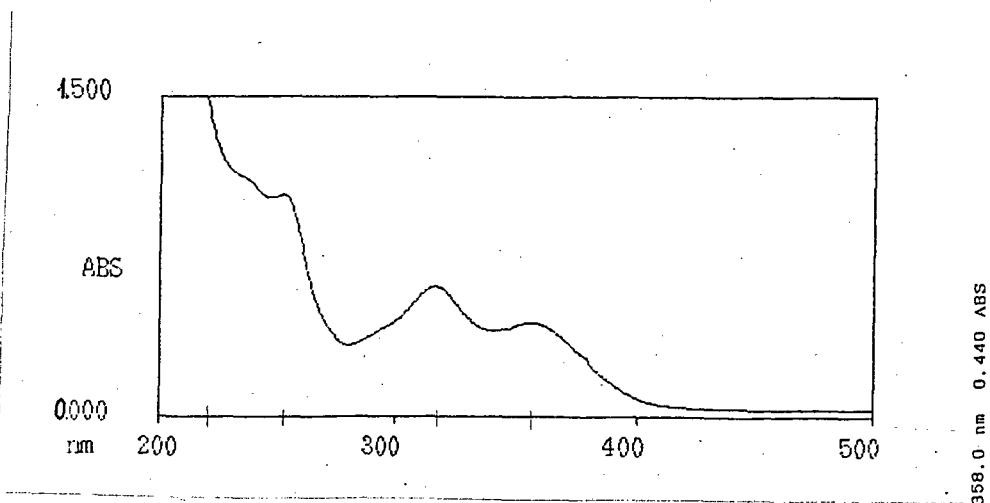


FIGURA 84 - Espectro de Ultravioleta do composto PC 07

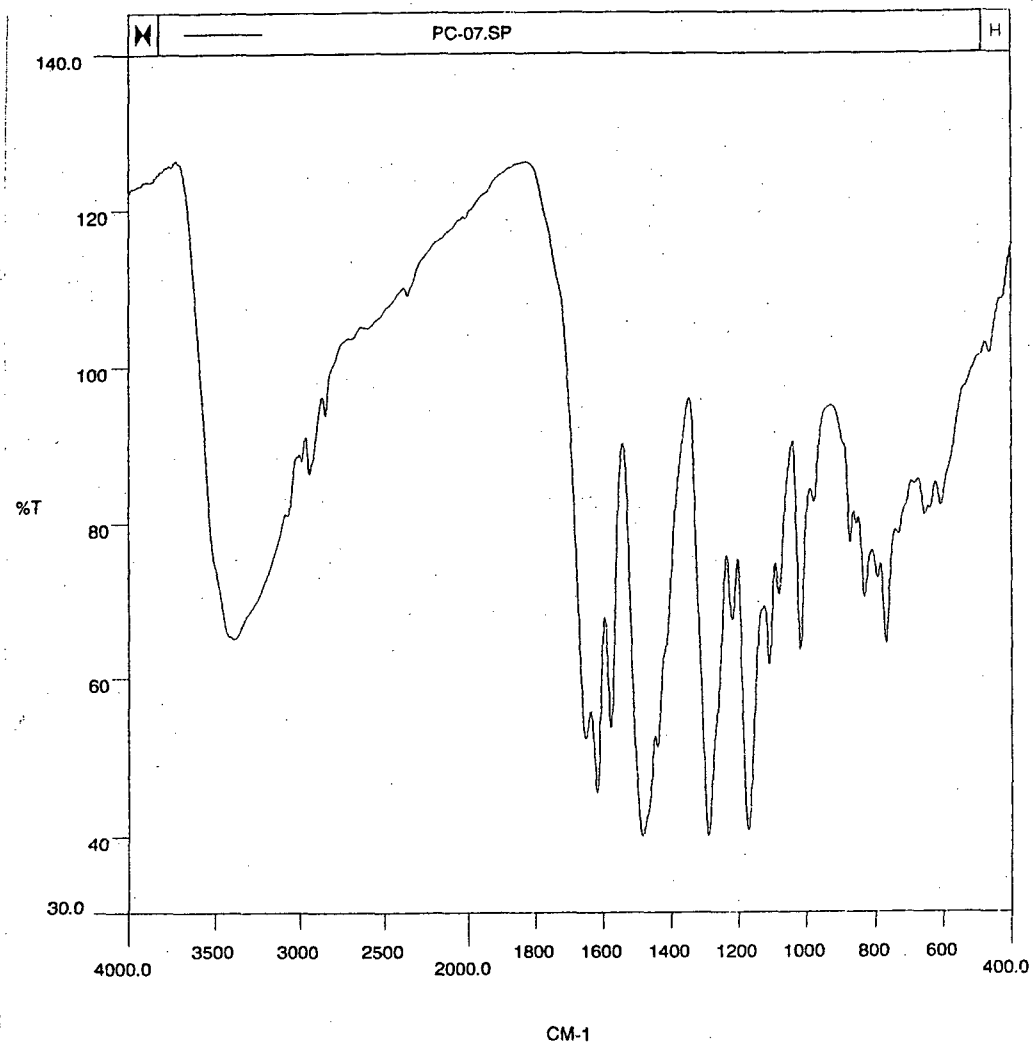


FIGURA 85 - Espectro de Infravermelho do composto PC 07

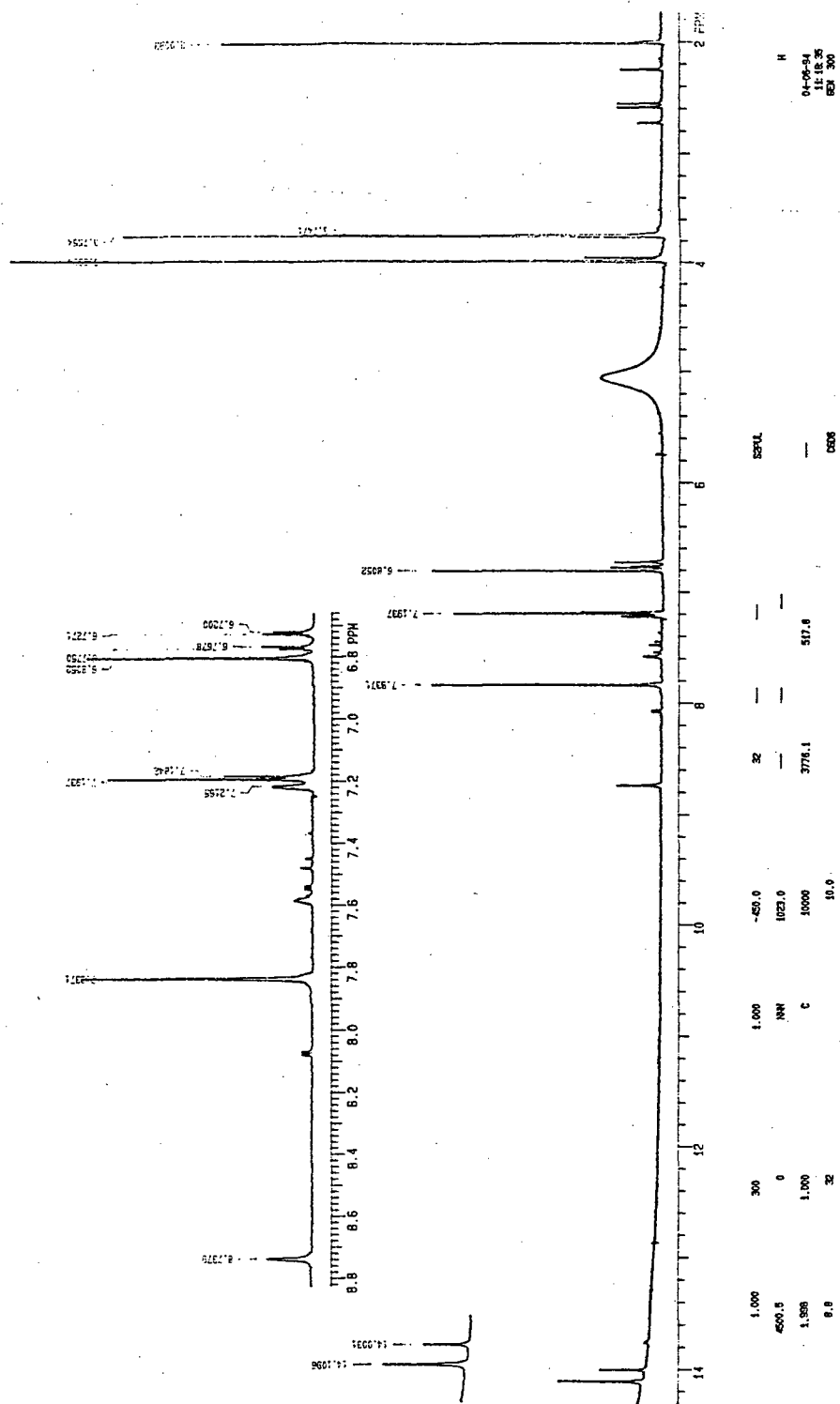


FIGURA 86 - Espectro de RMN ¹H do composto PC 07 em C₅D₅N

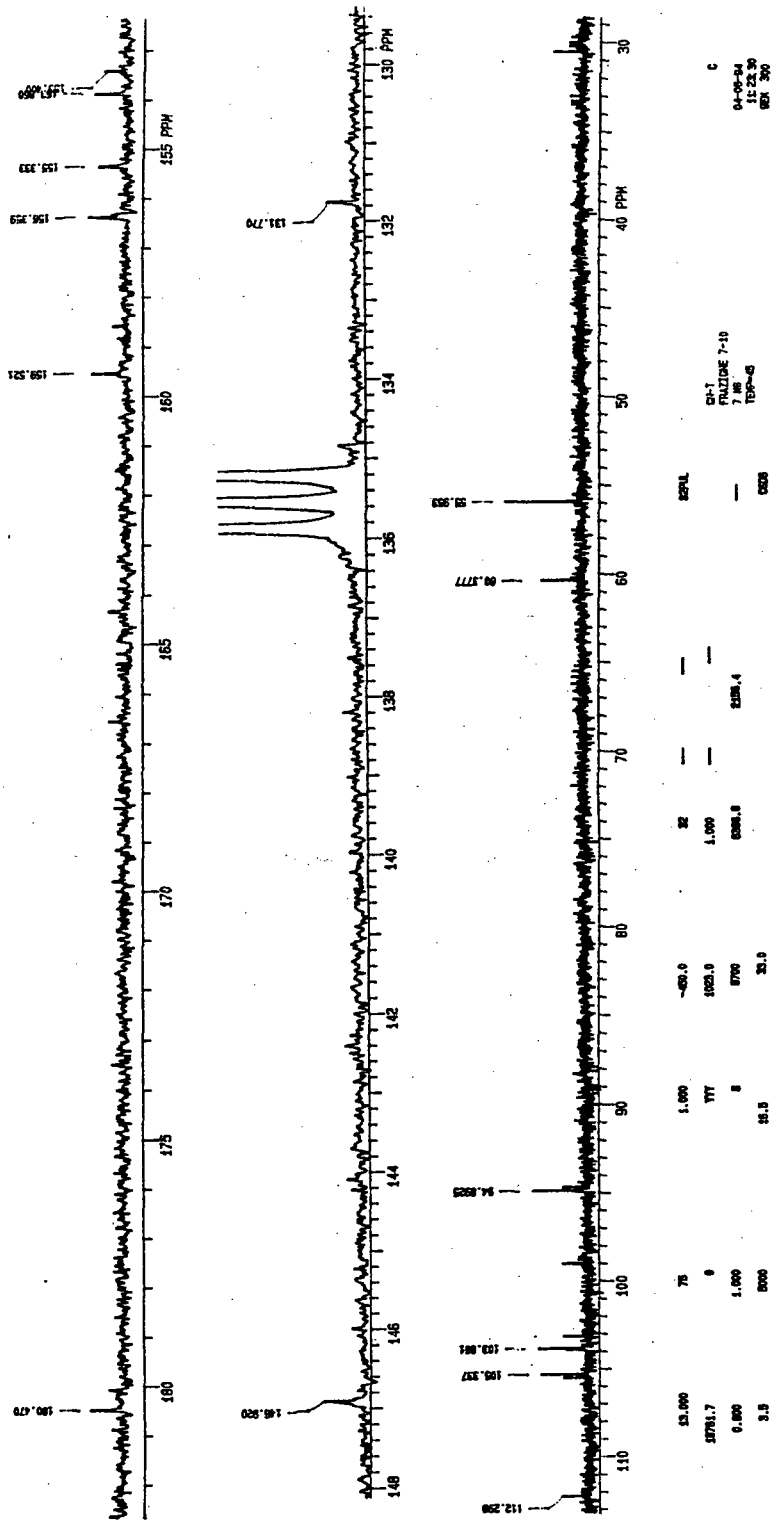


FIGURA 87 - Espectro de RMN ^{13}C do composto PC 07 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Mass Spectrum File: PC-07 .01 95-04-26 10:39

Comment: moacir - PC-07

Scan: 175 (0- 0) R.T.: 5.90min Base Peak: 261.0 Int: 21710(=100%)
100.0%

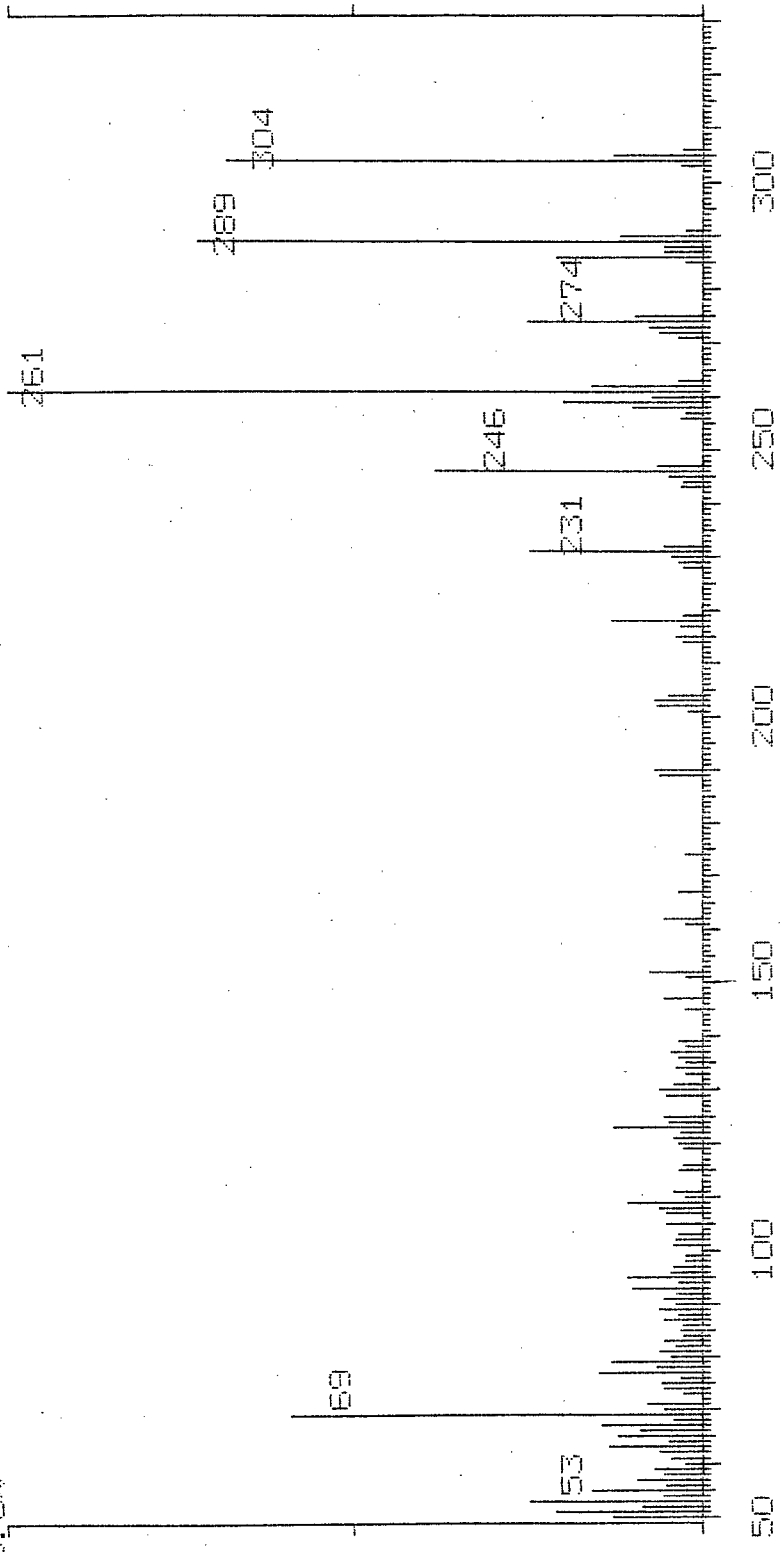


FIGURA 88 - Espectro de Massa do composto PC 07

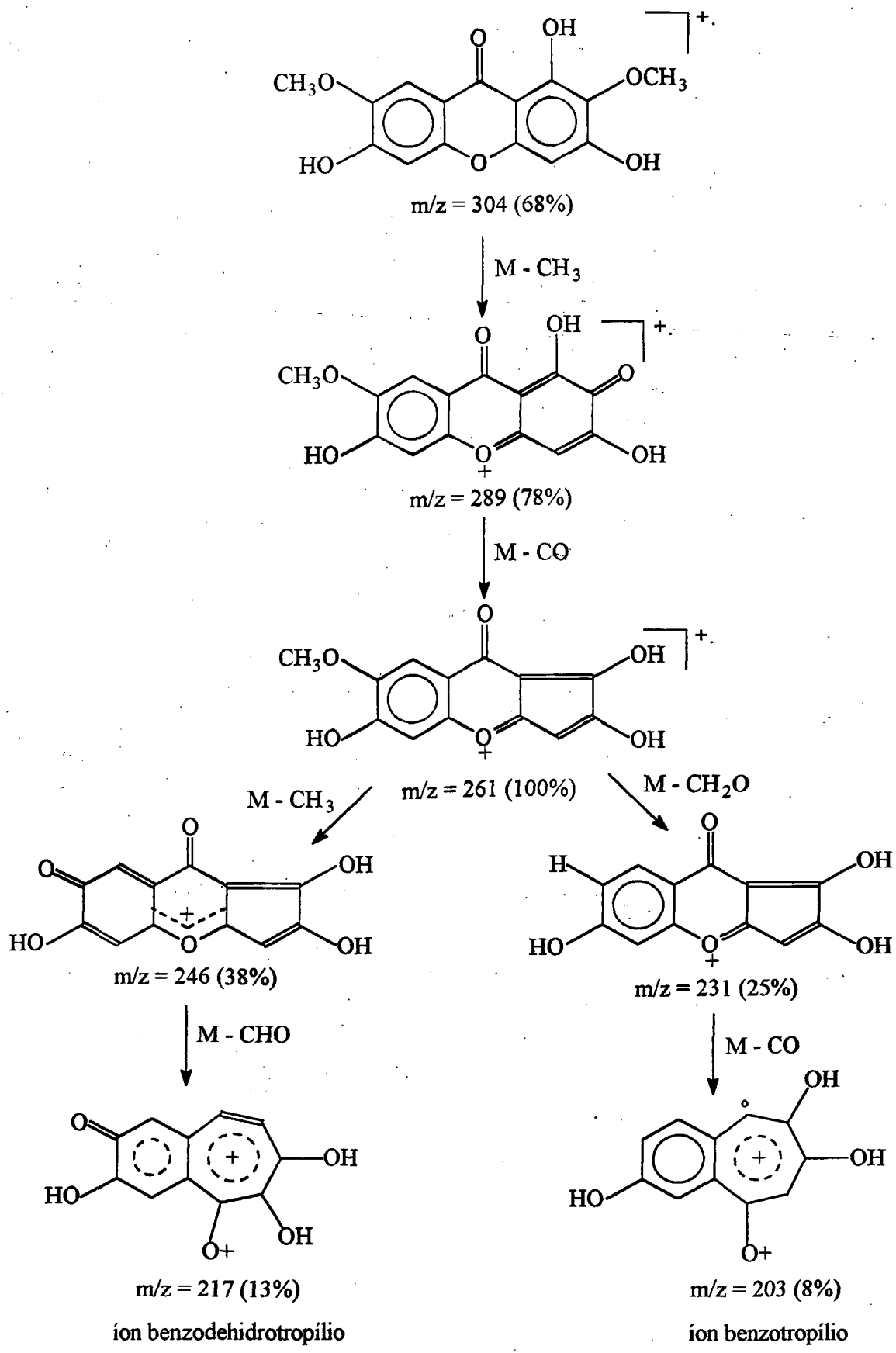


FIGURA 89 - Proposta de fragmentação dos principais íons do espectro de Massa do composto PC 07

4.4 - Avaliação do Potencial Farmacológico e Microbiológico

4.4.1 - Resultado dos Testes com os Extratos Brutos

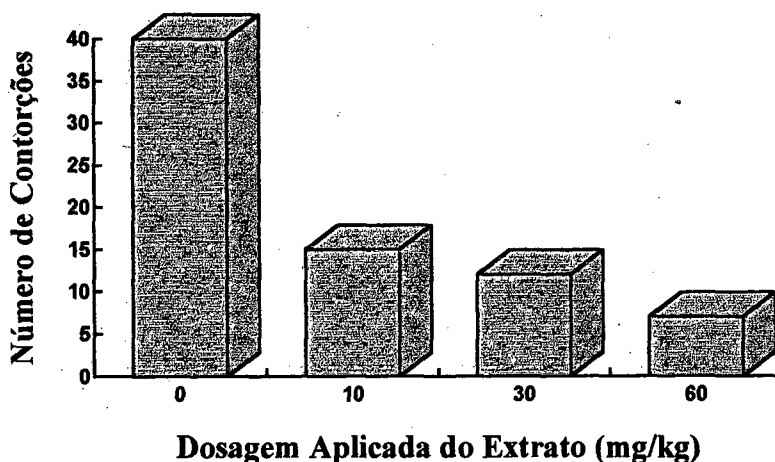
O extrato alcoólico das partes aéreas e das raízes de *Polygala cyparissias* foi testado no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina, conforme descrito anteriormente [26], cujos resultados mostraram que esta planta, no modelo testado, não apresenta efeito antiespasmódico significativo até a dose máxima de 250 µg/ml.

Os ensaios realizados para verificar a ação bactericida também não demonstraram efeito na dose máxima testada (2.5 mg/ml) contra os microorganismos citados na parte experimental.

Os resultados dos ensaios farmacológicos preliminares, com o Modelo de dor do Ácido Acético, demonstraram que a injeção intraperitoneal do extrato bruto total em camundongos (10 - 60 mg/Kg) 30 minutos antes, causou inibição dose dependente as contorções abdominais induzidas pelo Ácido Acético. Conforme mostra o Gráfico 1 a dose inibitória de 50 % das contorções abdominais (DI₅₀) é menor que 10 mg/Kg, significando uma importante ação analgésica.

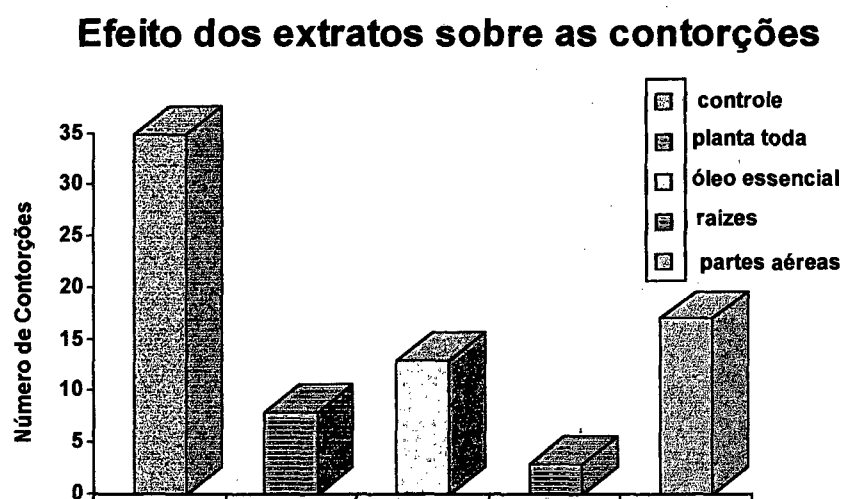
GRÁFICO 1

Efeito da Dosagem do Extrato sobre as Contorções



Com o objetivo de verificar em qual das partes do vegetal a atividade é mais pronunciada, foram testados separadamente os extratos das raízes e das partes aéreas, incluindo também o óleo essencial. Os resultados mostrados no Gráfico 2 indicam que na dose de 60 mg/Kg, i.p., o extrato total apresentou Inibição Máxima (IM) de 84.2 %; enquanto que o extrato das raízes mostrou 92.6 % de IM. As partes aéreas mostraram 53.3 % de IM e o óleo essencial apresentou 64.4 %. O efeito mostrado no óleo essencial foi atribuído ao Salicilato de Metila, cuja ação analgésica é reconhecida clinicamente. Como o efeito da planta toda foi equipotente ao das raízes, mas apresentou um rendimento muito mais elevado, optou-se por estudar fitoquimicamente este extrato. Os resultados indicam que além de Salicilato de Metila, há outros compostos com atividade analgésica, motivo pelo qual esta planta é utilizada na medicina popular.

GRÁFICO 2



4.4.2 - Resultado dos Testes com os Compostos Isolados

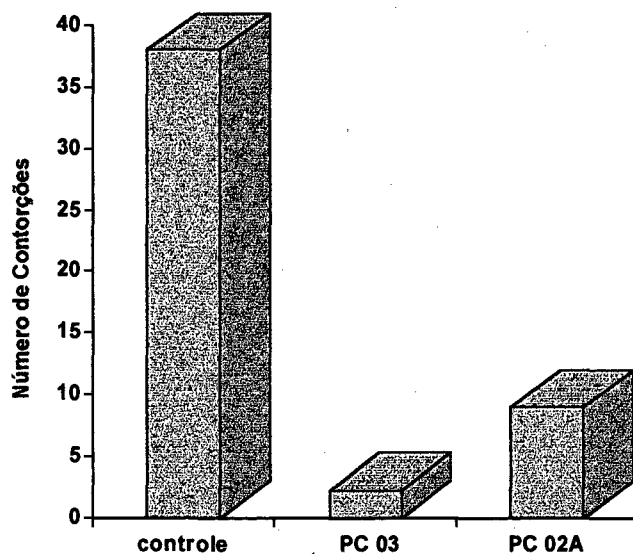
Iniciando a avaliação farmacológica quanto a ação analgésica das xantonas, foram testados os compostos PC 02A e PC 03, isso devido ao maior rendimento apresentado, ambos no Modelo de dor induzida pelo Ácido Acético.

Os resultados farmacológicos preliminares mostraram que na dosagem de 30 mg/Kg o composto PC 02A apresentou IM de 77 %, enquanto que o composto PC 03, na mesma dosagem apresentou IM de 94 % (Gráfico 3), confirmando a atividade analgésica apresentada inicialmente pelos extratos brutos.

Estes resultados preliminares colocam as xantonas polioxigenadas numa posição importante para estudos de analgesia, atribuindo uma nova perspectiva na obtenção de drogas alternativas.

GRÁFICO 3

Efeito da Dose (30 mg/kg) dos compostos puros sobre as contorções



CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1 - Aspectos Químicos

Pela análise realizada sobre os dados experimentais do presente trabalho, podemos concluir:

1 - O óleo essencial extraído das raízes de *Polygala cyparissias* St. Hill. & Moq. possui como principal constituinte o Salicilato de Metila.

2 - O extrato hexânico de *Polygala cyparissias* apresentou dois compostos que foram isolados e purificados por métodos cromatográficos. O composto H-44 foi identificado como 24-etil-5 α -colesta-7,22-dien-3 β -ol, conhecido como α -Spinasterol; e o composto H-29 identificado como Ácido Salicílico.

3 - Do extrato de acetato de etila foram isoladas por Cromatografia Flash seis xantonas, sendo que todas são inéditas na espécie e três são inéditas para produtos naturais.

4 - A primeira xantona isolada (PC 01) foi identificada como 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona, também conhecida como iso-gentisin. A posição do grupo metoxila foi determinada por RMN ¹H/DIFNOE.

5 - O composto PC 02A, inédito para produtos naturais, foi identificado como 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona, sendo a única xantona a apresentar grupo metilenodioxi, característico para esta Família .

6 - PC 03 foi identificado como 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona, sendo que a posição do grupo metoxila em C-3 foi determinada por RMN ¹H/DIFNOE.

7 - O composto PC 05, inédito para produtos naturais, foi identificado como 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona, tendo como particularidade uma estrutura simétrica. Esta simetria foi comprovada pela acetilação de PC 05.

8 - O composto PC 06, também inédito para produtos naturais, foi identificado como 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona.

9 - A xantona que apresentou polaridade mais alta (PC 07) foi identificada como 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona, também isolada de *Bredemeyera floribunda*, gênero pertencente a Família Poligalaceae.

5.2 - Aspectos Farmacológicos

A potente atividade analgésica observada nos extratos brutos foi confirmada pelos compostos isolados, tanto pelo óleo essencial como principalmente pelas xantonas testadas. Estes resultados atribuem uma posição importante destes compostos no âmbito dos estudos farmacológicos visto sobre o aspecto analgésico, abrindo assim novas perspectivas na obtenção de medicamentos de origem fitoterápica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GROS, E.G.; POMÍLIO, A.B.; SELDES, A.M.; et al. Introducción al estudio de los productos naturales. Facultad de ciencias exactas y naturales Universidad de Buenos Aires - Argentina; 1985, p 1
- [2] JOLY, A. B. Botânica. introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Ed. USP, 1978, p 360
- [3] WASICKY, R. As raízes de *Polygala cyparissias* A. St. Hil. um sucedâneo de pleno valor das raízes de *Polygala senega* L. (Polygala de Virgínia, Senega) ANAIS DA FACULDADE DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA, São Paulo: USP, Faculdade de Farmácia e Odontologia, V 4, p 189-209, 1944
- [4] BASHIR, A.; HAMBURGER, M.; MSONTHI, J.D.; et al. Isoflavones and xanthonones from *Polygala virgata*; Phytochemistry, V 31, p 309-311, 1992
- [5] HAMBURGER, M.; GUPTA, M. and HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*; Planta Med., V 51, p 215-217, 1985
- [6] GHOSHAL, S.; BAUMATARI, P.C.; BANERJEE, S. 1,2,3-Trioxxygenated glucosyloxyxanthonones from *Polygala triphylla*. Phytochemistry, V 20, p 489-492, 1981
- [7] SULTANBAWA, M.U.S. Xanthonoids of tropical plants. Tetrahedron, V 36, p 1465-1506, 1980
- [8] BENNETT, G.J.; LEE, H.H. Xanthonones from Guttiferae Phytochemistry, V 28, p 967-998, 1989 OK Xanthonones (7 (solus) Taty
- [9] MANDAL, S.; DAS, P.C.; JOSHI, P.C. Naturally occurring from terrestrial flora. J. Indian Chem. Soc., V 69, p 611-636, 1992
- [10] WURDACK, J.J.; SMITH, L.B. Flora ilustrada catarinense. Polygalaceas. Pt I: As plantas, fascículo polygala. Itajai - SC; 1971, p 49-51

- [11] SCHULTZ, A. Introdução à botânica sistemática. 6° ed., Porto Alegre: Ed. Sagra, V 2, 1990, p 179
- [12] HERBET, R.B. The biosynthesis of secondary metabolites. 2° ed., 1989, p 2
- [13] GUPTA, P.; LEWIS, J.R. Biogenesis of xanthones in *Gentiana lutea*. J. Chem. Soc C, p 629-631, 1971
- [14] ATKINSON, J.E.; GUPTA, P.; LEWIS, J.R. Some phenolic constituents of *Gentiana lutea*. Tetrahedron, V 24, p 1507-1511, 1969
- [15] FUJITA, M.; INOUE, T. Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: hidroxylation of the shikimate-derived ring. Phytochemistry, V 20, p 2183-2185, 1981
- [16] UGAZ, O.L. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2° ed., Peru: Fondo Editorial, 1994, p 179.
- [17] MONACHE, F.D.; MAC-QUHAE, M.M.; MONACHE, G.D.; et al. Xanthones, xanthonolignoides and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. Phytochemistry, V 22, p 227-232, 1983
- [18] STILL, C.W.; KANN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. J. Org. Chem., V 43, p 2923-2925, 1978
- [19] MERCK. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel; E. Merck, Darmstadt (R.F. de Alemania), p 27, 1958?
- [20] BARRET, G.C. Iodine as a "non-destructive" colour reagent in paper-and thin-layer chromatography. Nature, V 194, p. 1171-1172, 1962
- [21] MOREIRA, E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zarhlb e *Lobelia stefedli*. Trib. farm., V 47, n. 1, p 12-23, 1979
- [22] MIGUEL, O.G. Componentes químicos de *Sebastiania schottiana* Muel. Arg., hipóteses sobre a correlação entre estrutura e atividade farmacológica.

Florianópolis, 1987. Dissertação (Mestrado em Química)- Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina

- [23] THEILHEIMER, W. Synthetic methods of organic chemistry. 1952, V 6, p 79
- [24] CECHINEL F., V.; MIGUEL, O.G.; NUNES, R.J.; et al. Antispasmodic activity of xanthoxylone derivatives. Structure-activity relationships. J. Pharm. Sci, V 84, n 4, p 475-477, 1995
- [25] ANDRIOLE, V.T. Infecções do trato urinário. Rio de Janeiro: Ed. Interlivros, 1987, p 20
- [26] BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. The American Journal of Clinical Pathology, V 45, p 493-496, 1966
- [27] NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos de *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura-atividade, Florianópolis, 1993. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina
- [28] BROOKS, C.J.W.; HORNING, E.C.; YOUNG, J.S. Characterization of sterols by gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers. Lipids, V 3, n. 5, p 391-402, 1968
- [29] KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry, V 29, p 2351-2355, 1990
- [30] BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, H.E.; MOURÃO, A.P. 3- β -O- β -D-Glicopiranosilespinasterol, um novo glicosídeo esteroidal isolado de *Amarthospermum schomburghiana* (Miq.) Baehni. An. Acad. Brasil. Ciênc., V 58, n.3, p 363-368, 1986
- [31] FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ FILHO, R. Constituição química de *Bredemeyera floribunda*. ANAIS DO 17º ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Minas Gerais, 1994

- [32] SADTLER STANDARD SPECTRA, Infrared. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1970, V 17, 17414
- [33] SADTLER STANDARD SPECTRA, NMR. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1970, V 6, 6246
- [34] IINUMA, M.; TOSA, H.; TANAKA, T.; et al. Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*. Phytochemistry, V 35, p 527-531, 1994
- [35] ARENDS, P.; HELBOE, P. Mass spectrometry of xanthenes-I: the electron-impact-induced fragmentation of xanthenes, monohydroxy-and monomethoxyxanthenes. Org. Mass Spectrometry, V 7, p 667-681, 1972
- [36] KHETWAL, K.S.; JOSHI, B.; BISHT, R.S. Tri- and tetraoxygenated xanthenes from *Swertia petiolata*. Phytochemistry, V 29, p 1265-1267, 1990
- [37] FUJITA, T.; LIU, D.Y.; UEDA, S.; et al. Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. Phytochemistry, V 31, p 3997-4000, 1992
- [38] DREYER, D.L.; BOURELL, J.H. Xanthenes from *Frasera albomarginata* and *Frasera speciosa*. Phytochemistry, V 20, p 493-495, 1981
- [39] IKEYA, Y.; SUGAMA, K.; OKADA, M.; et al. Two xanthenes from *Polygala tenuifolia*. Phytochemistry, V 30, p 2061-2065, 1991