



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**CUMARINAS DO GÊNERO *Polygala*:
ISOLAMENTO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES**

GIULLIANI SACHINELLI GARCIA

Florianópolis
Junho de 2010

GIULLIANI SACHINELLI GARCIA

**CUMARINAS DO GÊNERO *Polygala*
ISOLAMENTO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES.**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof^o. Dr^o. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis

Junho de 2010

GIULLIANI SACHINELLI GARCIA

**CUMARINAS DO GÊNERO *Polygala*
ISOLAMENTO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES.**

Prof^a Dr^a Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química - Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr^o Moacir Geraldo Pizzolatti
Orientador

Prof. Dr^o Miguel Soriano Balparda Caro

Prof. Dr^o Ricardo José Nunes

Dedicatória

**Dedico este trabalho à minha família que
mesmo longe, sempre se fizeram
presentes em toda minha vida.**

*“Não há nenhum segredo para o sucesso.
É o resultado de preparação, trabalho
duro, e aprender com o fracasso.”*
(Gen. Colín L. Powell).

*“O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa o
reflexo de seus próprios pensamentos. A maneira como
você encara a vida é que faz toda diferença.”*
(Luís Fernando Veríssimo)

Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Química pela oportunidade de realização deste trabalho e ao CNPQ.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Pizzolatti, pela orientação, incentivo e liberdade de trabalho.

Aos doutorandos Cristian Soldi, Heros Horst e Alessandro Guedes por todo apoio, orientação e incentivo durante todas as etapas deste trabalho, proporcionando todas as condições para meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao mestrando Leandro Espíndola, pelo incrível companheirismo em todo momento, o qual, sem sua ajuda, nada disso seria possível.

Aos professores Miguel Caro e Ricardo Nunes, por aceitarem serem membros da banca examinadora, e aos demais Professores do Departamento de Química.

Aos meus pais Cristina Sachinelli e Edival Garcia pela educação, apoio e incentivo durante toda minha vida, mas principalmente à minha mãe, que é meu exemplo de vida, uma guerreira que busca com todas as forças o que quer, sempre alegre, amiga e presente nas melhores ou mais difíceis horas.

Às minhas amigas Ana Carolina Zanatta, Karin Bolzan e Suelen Stecanella pela alegria e apoio de todos os dias.

Ao Daniel Spudeit, por ter surgido ao meu lado quando eu menos imaginava, e mais precisava de sua companhia para viver intensamente os dias. Palavras são poucas para agradecer todo carinho e compreensão durante todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais: Andressa Gilioli, Gabriela Mafra, Gustavo Queiroz, Henrique Moresco, Luciana Tavares, Lizandra Bretanha e Tiago Schambach, que com certeza deixaram importantes contribuições e aprendizados para minha vida.

Aos grandes amigos que fiz nesses quatro anos, de dentro e fora do Departamento de Química, pela alegria em vários momentos.

*Obrigada a todos,
Giulliani*

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Classificação sistemática | 2 |
| 2.2 Constituintes micromoleculares | 3 |
| 2.2.1 Preniloxicumarina | 3 |
| 2.2.2 Escopoletina | 3 |
| 2.2.3 Espinasterol | 4 |
| 2.2.4 Dihidroestiril-pirona e estiril-pirona | 4 |
| 2.2.5 Proto-hipericina | 5 |
| 2.3 Atividades farmacológicas | 5 |
| 2.3.1 Efeitos do metilmercúrio induzido em ratos | 5 |
| 2.3.2 Efeito antinociceptivo | 6 |
| 2.3.3 Efeito anticonvulsivante e ansiolítico | 7 |
| 2.3.4 Atividade tripanocida | 8 |
| 3. OBJETIVOS | 9 |
| 4. METODOLOGIA | 10 |
| 4.1 A coleta e os cuidados | 10 |
| 4.2 Extração | 10 |
| 4.3 Cromatografia em coluna | 11 |
| 4.3.1 Adsorventes | 11 |
| 4.3.2 Solventes | 13 |

| | |
|--|----|
| 4.4 Cromatografia em camada delgada..... | 14 |
| 4.5 Isolamento e purificação dos compostos | 15 |
| 4.6 Análises posteriores | 17 |
| 4.7 Obtenção de escopoletina a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina..... | 18 |
| 4.8 Preparo de derivados de escopoletina..... | 19 |
| 4.8.1 <i>Acetilação</i> | 19 |
| 4.8.2 <i>Benzoilação</i> | 21 |
| | |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 23 |
| 5.1 Identificação dos compostos isolados..... | 24 |
| 5.1.1 <i>Preniloxicumarina</i> | 24 |
| 5.1.2 <i>Escopoletina</i> | 25 |
| 5.1.3 <i>Espinasterol</i> | 26 |
| 5.1.4 <i>Proto-hipericina</i> | 27 |
| 5.2 Síntese da escopoletina..... | 28 |
| 5.3 Síntese de derivados da escopoletina..... | 29 |
| 5.3.1 <i>Obtenção de éster alquílico derivado da escopoletina</i> | 29 |
| 5.3.1.1 <u>Acetato de escopoletina</u> | 30 |
| 5.3.2 <i>Obtenção de ésteres benzoílicos derivados da escopoletina</i> | 31 |
| 5.3.2.1 <u>Benzoato de escopoletina</u> | 31 |
| 5.3.2.2 <u>p-clorobenzoato de escopoletina</u> | 32 |
| | |
| 6. CONCLUSÕES..... | 34 |
| | |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 - <i>Polygala sabulosa</i> no seu habitat natural..... | 2 |
| Figura 2 - Labirinto de cruz elevado | 8 |
| Figura 3 - Cromatografia em coluna (A), preparação do leito (B), adição da amostra (C), coluna pronta para eluição (D). | 13 |
| Figura 4 - Polaridade dos solventes | 14 |
| Figura 5 - Fluxograma das colunas feitas ao longo do trabalho | 17 |
| Figura 6 - Reação de obtenção da escopoletina | 18 |
| Figura 7 – Espectro de IV da preniloxicumarina..... | 19 |
| Figura 8 – Espectro de RMN ¹ H da preniloxicumarina | 24 |
| Figura 9 – Espectro de IV da escopoletina..... | 25 |
| Figura 10 – Espectro de RMN ¹ H da escopoletina | 25 |
| Figura 11 – Espectro de RMN ¹ H do espinasterol..... | 26 |
| Figura 12 – Espectro de IV da proto-hipericina | 27 |
| Figura 13 – Espectro de RMN ¹ H da proto-hipericina..... | 27 |
| Figura 14 – Reação de obtenção da escopoletina a partir da preniloxicumarina | 28 |
| Figura 15 – Mecanismo da reação de obtenção da escopoletina..... | 28 |
| Figura 16 – Mecanismo geral para obtenção de derivados da escopoletina..... | 29 |
| Figura 17 – Reação geral para a síntese de ésteres alquílicos..... | 29 |
| Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H do acetato de escopoletina..... | 30 |
| Figura 19 – Reação geral para a síntese de ésteres benzílicos | 31 |
| Figura 20 – Espectro de RMN ¹ H do benzoato de escopoletina..... | 32 |
| Figura 21 – Espectro de RMN ¹ H do p-clorobenzoato de escopoletina..... | 33 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Dados específicos sobre a <i>Polygala sabulosa</i> | 2 |
| Tabela 2 - Adsorventes utilizados nas colunas cromatográficas | 12 |
| Tabela 3 – Típicas proporções dos solventes utilizados em colunas cromatográficas | 13 |

Índice de Abreviaturas e Siglas

AcOEt: acetato de etila

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

CCf: cromatografia em coluna flash

d: dubleto

DMAP: dimetilaminopiridina

EBH: extrato bruto hidroalcoólico

EtOH: etanol

FA: fração aquosa

FAE: fração acetato de etila

IV: infravermelho

J: constante de acoplamento

LCE: labirinto em cruz elevado

MeHg: metilmercúrio

pf: ponto de fusão

Py: piridina

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s: singleto

t: tripleto

THF: tetrahidrofurano

Resumo

A espécie *Polygala sabulosa*, conhecida popularmente como “Timuto Pinheirinho” é uma pequena erva que cresce no planalto serrano do sul do Brasil. As plantas do gênero *Polygala* são utilizadas na medicina folclórica para o tratamento de algumas patologias, incluindo distúrbios intestinais e renais, também como analgésico e expectorante. Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a presença das cumarinas 6-metoxi-7-preniloxicumarina (preniloxicumarina) e 6-metoxi-7-hidroxycumarina (escopoletina) as quais exibiram interessantes efeitos farmacológicos, destacando-se os efeitos analgésico e tripanocida. A cumarina 6-metoxi-7-preniloxicumarina ocorre em grande quantidade nesta espécie vegetal e pode facilmente ser convertida em escopoletina pela hidrólise ácida do grupo preniloxi. Por outro lado, o grupo hidroxil livre da escopoletina permite a introdução de diferentes grupos na molécula, tornando-a um bom modelo para estudos de correlação estrutura atividade. Assim, o presente trabalho teve por objetivo o isolamento de grandes quantidades de 6-metoxi-7-preniloxicumarina para ser usado como material de partida para obtenção de escopoletina e dar início ao preparo de derivados análogos da escopoletina. Paralelamente, foram isolados três outros compostos: escopoletina, proto-hipericina e espinasterol, onde o isolamento e purificação de ambos foram feitos através de cromatografias em coluna (CC), e as caracterizações foram feitas através de cromatografias em camada delgada (CCD), ponto de fusão, e análises de espectros de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H).

1. Introdução e Justificativa

Este trabalho faz parte do estudo fitoquímico sistemático da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae), uma pequena erva comumente chamada de “timuto-pinheirinho” que se desenvolve no Planalto Meridional e que tem sido utilizada na medicina popular como anestésico local e expectorante.

Dentro do nosso objetivo de estudar as plantas medicinais de forma fitoquímica sistemática, buscamos substâncias majoritárias na planta que podem nos servir de material de partida para a obtenção de análogos através de simples transformações estruturais e estudar suas influências na atividade biológica do composto original.

As substâncias majoritárias que pretendemos isolar são os chamados metabólitos secundários. Substâncias que geralmente não estão envolvidas em funções vitais das plantas, não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas. São encontradas apenas em grupos restritos - famílias ou gêneros – de plantas. Os produtos do metabolismo secundário constituem o que chamamos de produtos naturais, e o homem utiliza estes metabólitos como modelo para sintetizar em laboratório, substâncias com as mais diversas propriedades e com grande poder de interação com receptores biológicos.

A contribuição deste projeto é purificar e identificar as substâncias isoladas da espécie vegetal *Polygala sabulosa*. Em seguida, realizar transformações em suas estruturas, visando estudar a reatividade destas substâncias e observar até que ponto pode-se obter sucesso introduzindo novos grupos químicos.

A escolha da espécie vegetal *Polygala sabulosa* como tema deste trabalho foi devido à observação da ocorrência de grande quantidade de uma cumarina com importantes atividades biológicas, como contribuição para o conhecimento desta espécie que já tem vários estudos realizados pelo grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC.

2. Revisão Bibliográfica

2.1) Classificação sistemática

Tabela 1. Dados específicos sobre a *Polygala sabulosa*.

| Posição sistemática da espécie <i>Polygala sabulosa</i> (Polygalaceae)¹ | |
|---|---------------------------------------|
| Divisão: | Angiospermae |
| Classe: | Dicotyledoneae |
| Ordem: | Polygalales |
| Família: | Polygalaceae |
| Gênero: | Polygala |
| Espécie: | <i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennet |
| Sinonímia vulgar: | “Timuto-pinheirinho” |



Figura 1: *Polygala sabulosa* no seu habitat natural [Morro da Antena, município de Rancho Queimado] ²

A família Polygalaceae é constituída por aproximadamente 800 espécies que estão reunidas em 15 gêneros e podem ser encontradas por todo o planeta com exceção da Nova Zelândia e do Ártico. Os gêneros *Polygala* e *Monnina* são os maiores representantes, incluindo cerca de 600 e 150 espécies, respectivamente. As espécies do gênero *Polygala* são ervas, subarbustos e raras vezes árvores com folhas normalmente alternas e flores brancas, esverdeadas, cor de rosa ou roxas. Wurdack e Smith relataram a ocorrência de 19 dessas espécies, incluindo *Polygala sabulosa*, em território catarinense e as descreveram de acordo com suas características morfológicas e ecológicas.¹

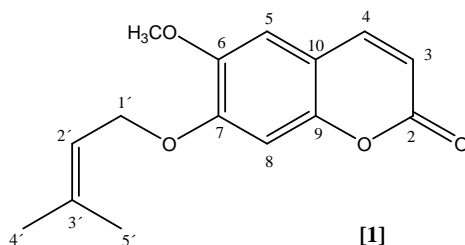
As investigações fitoquímicas realizadas nas últimas três décadas revelaram a ocorrência de um vasto espectro de metabólitos em espécies de *Polygala*, que

inclui: saponinas, esteróides, flavonóides livres e glicosilados, cumarinas, ésteres de ácidos cinâmicos com oligossacarídeos e polissacarídeos, dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas. Contudo, as xantonas são os compostos mais freqüentemente encontrados e por isso podem ser consideradas os verdadeiros marcadores quimiotaxonômicos do gênero.¹

2.2) Constituintes micromoleculares

2.2.1) Preniloxicumarina [1]

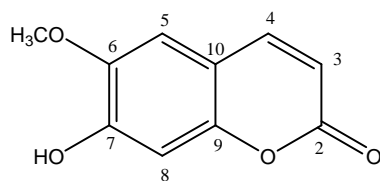
A preniloxicumarina é obtida como um constituinte majoritário da espécie *P. sabulosa*. Dois fatos justificaram a repetição do relato e a apresentação de uma descrição detalhada da identificação desta cumarina. Primeiramente, confirmou-se a presença em quantidades apreciáveis dessa substância nos tecidos vegetais da espécie, indicando que a planta é uma fonte natural do metabólito; em segundo lugar, informações providenciadas por ensaios biológicos, que serão apresentadas em páginas posteriores, comprovaram a potencialidade dessa substância como agente antichagásico.¹



2.2.2) Escopoletina [2]

Estudos precedentes a este trabalho demonstraram que a escopoletina possui uma potente inibição na dor visceral induzida pelo ácido acético em camundongos. No entanto, este efeito não foi observado com a preniloxicumarina. Além disso, dois derivados obtidos a partir da escopoletina, benzoato de escopoletina e acetato de escopoletina, também foram efetivos na diminuição da resposta à dor. Observou-se que a adição do grupo benzoil aumentou as propriedades antinociceptivas, sendo mais potente que a escopoletina. No entanto, a

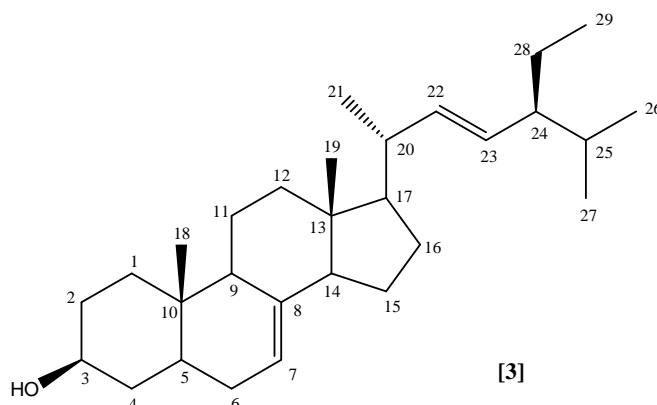
adição do grupo acil, como no acetato de escopoletina, diminuiu as propriedades antinociceptivas, sendo menos potente que a cumarina original.²



[2]

2.2.3) Espinasterol (24-etil-5 α -colesta-7,22-dien-3 β -ol) [3]

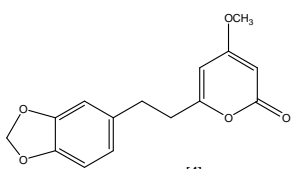
O fitoesterol α -espinasterol, menos freqüente em espécies vegetais, desponta como um constituinte marcante em plantas do gênero *Polygala* distribuídas em território catarinense, considerando-se que a grande maioria das espécies vegetais apresenta o β -sitosterol como esteroel mais comum. O composto α -espinasterol ocorre nas três espécies estudadas da flora local (*P. cyparissias*, *P. paniculata* e *P. sabulosa*).¹



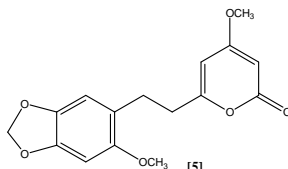
[3]

2.2.4) Dihidroestiril-2-pirona e estiril-2-pirona

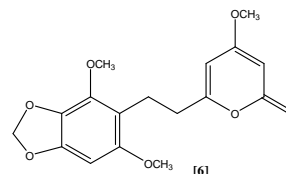
No total, sete estiril-pironas foram isoladas até o momento, sendo três dihidroestiril-2-pironas como dihidroestiril-2-pironas [4], [5] ou [6] e quatro estiril-2-pironas como estiril-2-pironas [7], [8], [9] ou [10].



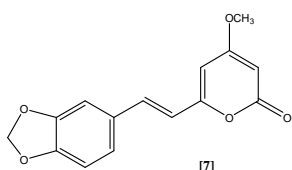
[4]



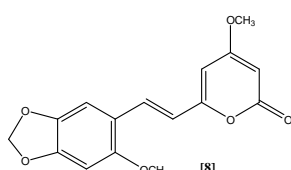
[5]



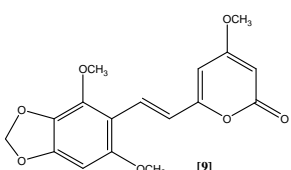
[6]



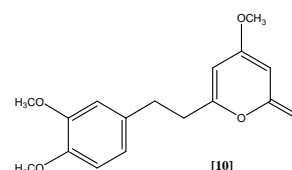
[7]



[8]

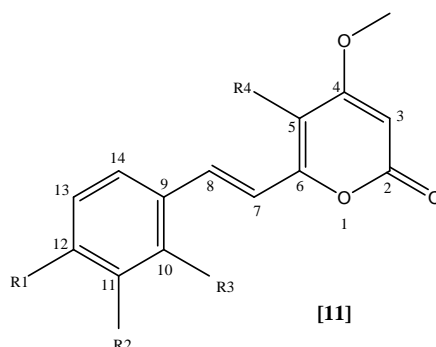


[9]



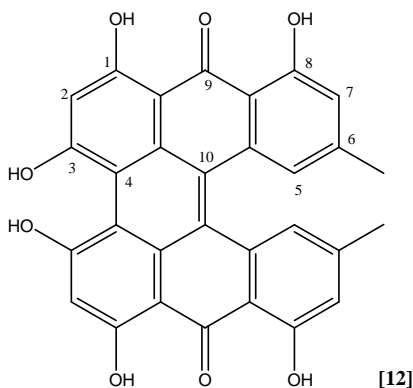
[10]

Como a planta *P. sabulosa* é fonte originária de dihidroestiril-2-pironas (DST) e estilil-2-pironas (STY), cujo esqueleto estrutural é similar às kavalactonas [11], utilizando-se o princípio da similaridade estrutural, podemos ver a espécie *P. sabulosa* como uma planta com potencial atividade no sistema nervoso central, e que poderia servir como fonte de estudos para, quiçá, sua aplicação futura no tratamento da ansiedade.³



2.2.5) Proto-hipericina [12]

Sua presença foi reportada em algumas espécies vegetais do gênero *Hypericum* (Guttiferae). Biogeneticamente, esta dicetona policíclica condensada é considerada o precursor do hipericina, um potente agente antiviral.¹

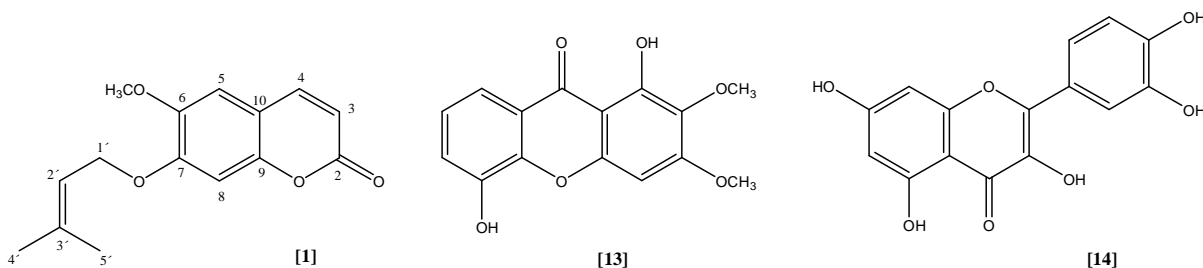


2.3) Atividades farmacológicas

2.3.1) Efeitos do metilmercúrio induzido em ratos.

Plantas do gênero *Polygala* demonstraram possuir efeito protetor contra a morte neuronal e prejuízos cognitivos em desordens neurodegenerativas relacionadas à citotoxicidade. Além disso, tem-se observado efeitos neuroprotetores da planta *Polygala paniculata* contra a neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio

(MeHg). Foi examinado os efeitos potenciais de proteção de três compostos: 6-metoxi-7-preniloxicumarina [1], 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona [13] e quercetina [14] de espécies de *Polygala* contra o rompimento da função mitocondrial sob condições in vitro, induzidas por MeHg e cloreto de mercúrio (HgCl₂), utilizando frações mitocondriais enriquecidas de cérebro do rato.



Em resumo, no estudo sobre a neurotoxicidade sinérgica induzida pelo metilmercúrio em camundongos, observou-se que esta substância é um poluente altamente neurotóxico, cujos mecanismos de toxicidade estão relacionados às suas propriedades pró-oxidantes. Um relatório anterior mostrou sob condições in vivo o efeito neuroprotetor de plantas do gênero *Polygala* contra a neurotoxicidade do MeHg. Além disso, o flavonóide quercetina, isolada da *Polygala sabulosa*, apresentou efeitos benéficos contra o dano oxidativo do MeHg sob condições in vitro. Os resultados indicam que, sob condições in vivo, quercetina e MeHg causam efeitos aditivos pró-oxidantes para os cerebelos de ratos e que esse fenômeno está associado com o déficit motor observado.^{4,5}

2.3.2) Efeito antinociceptivo

Uma investigação sobre a possível ação antinociceptiva do extrato, frações e compostos puros obtidos a partir da planta inteira da *Polygala sabulosa* foi feita num modelo de dor visceral induzida por ácido acético em ratos. A injeção intraperitoneal de animais com o extrato hidroalcoólico e frações (diclorometano, acetato de etila, n-BuOH, fração aquosa) causou uma inibição significativa das dores viscerais induzidas por ácido acético. O diclorometano, acetato de etila e n-frações BuOH foram mais potentes do que o extrato hidroalcoólico e fração aquosa. Os compostos isolados dihidroestiril-2-pironas, estiril-2-pirona, alfa-espinaesterol, escopoletina e dois ésteres da cumarina (escopoletina [2]) obtidos semisinteticamente,

acetilscopoletina e benzoilscopoletina, exibiram um significativo efeito antinociceptivo contra as dores viscerais induzidas por ácido acético. Os resultados distinguiram, pela primeira vez, o extrato, frações e compostos puros obtidos de *P. sabulosa* que produziram grande antinocicepção contra as respostas nociceptivas induzidas por ácido acético, apoiando o uso de medicina popular da *P. sabulosa*.^{6,7}

2.3.3) Efeito anticonvulsivante e ansiolítico

A procura de novos agentes terapêuticos provenientes de plantas medicinais para doenças psiquiátricas tem progredido significativamente. Isso reflete num grande número de preparações herbárias para as quais o potencial psicoterapêutico tem sido avaliado em diversos modelos animais. O intuito é fornecer uma ampla visão das plantas medicinais que apresentam efeitos terapêuticos significantes em modelos animais de doenças psiquiátricas, especificamente os distúrbios da ansiedade. Um considerável número de constituintes herbários cujos efeitos comportamentais e ações farmacológicas têm sido bem caracterizados podem ser bons candidatos para futuras investigações que podem resultar em uso clínico, merecendo, portanto, uma maior atenção em estudos posteriores.^{8,9}

Um estudo foi realizado para avaliar o efeito tipo ansiolítico do EBH, frações e estilipironas isoladas de *P. sabulosa*. Foi utilizado o teste do labirinto de cruz elevado (LCE) (**Figura 2**), onde os animais foram submetidos a diversos tratamentos e após 1 h, cada animal foi colocado no centro da plataforma, de frente a um dos braços fechados, sendo observado por um período de 5 minutos. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: a freqüência de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo gasto em cada braço, o número de imersões de cabeça, número de estiramentos corporais e número de vezes em que o animal chegou até o fim do braço aberto. No teste de hipnose, HE e EA melhoraram a duração do sono induzido por pentobarbital, um efeito hipnosedativo confirmado em éter etílico induzido por hipnose. Estes resultados sugerem que *P. sabulosa* é um produto fitoterápico que possui atividade ansiolítica, hipnosedativa e efeitos anticonvulsivantes, e estes efeitos centrais podem ser atribuídas à presença dos compostos dihidroestiril-2-pirona e estilil-2-pirona.^{10,11}

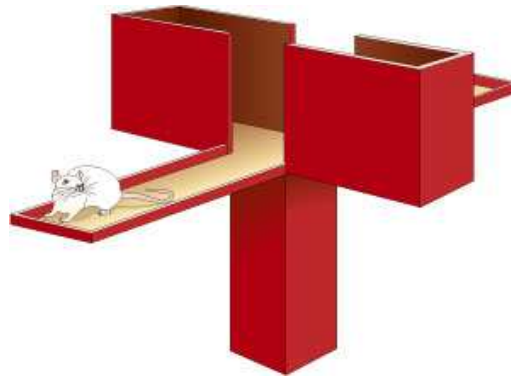


Figura 2: Labirinto de cruz elevado.¹²

2.3.4) Atividade tripanocida

A atividade tripanocida de extratos hidroalcoólicos e frações de 13 espécies de plantas da Mata Atlântica brasileira foram testadas in vitro contra formas epimastigota e tripomastigota sanguínea e amastigota do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. O extrato bruto etanólico com promissora atividade in vitro contra epimastigotas foi fracionado por partição com solvente e testado contra a forma mais corrente do parasita. Atividade contra parasitas sanguíneos foi observada em ambas as frações hexano e diclorometano de *P. sabulosa* e *P. paniculata*. Estes, entre outros resultados mostram, pela primeira vez, a atividade de compostos de *P. sabulosa* contra *T. cruzi*.(AU)^{13,14}

3. Objetivos

Objetivos gerais:

- Dar continuidade ao estudo sistemático da espécie *Polygala sabulosa* buscando o isolamento e caracterização estrutural dos metabólitos secundários majoritários, com vista à obtenção de matéria prima para estudos de suas reatividades químicas e a obtenção de derivados para futuros estudos de correlação estrutura atividade biológica.

Objetivos específicos:

- Extração dos constituintes de polaridade média a partir do extrato bruto hidroalcolólico de *P. sabulosa*, usando como solvente extrator o acetato de etila no modo de extração líquido-sólido;
- Fracionar o extrato acetato de etila obtido anteriormente, usando técnicas de cromatografia em coluna de gel de sílica;
- Proceder ao isolamento dos metabólitos através de purificações, utilizando técnicas cromatográficas e de recristalização;
- Proceder o isolamento da cumarina 6-metoxi-7-preniloxicumarina em maiores quantidades para usar este constituinte como material de partida para estudos químicos e biológicos;
- Determinar as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos isolados;
- Fazer a caracterização estrutural dos compostos isolados através do estudo e interpretação dos espectros de infravermelho e RMN obtidos;
- Realizar uma primeira avaliação da reatividade química das cumarinas isoladas no presente trabalho.

4. Metodologia

4.1) A coleta e os cuidados

A coleta do material a ser submetido ao estudo fitoquímico procede-se de forma a garantir a sua identidade botânica. O material coletado precisa estar livre de contaminação por outras plantas e não estar afetado por doenças causadas pela infecção de fungos, bactérias ou vírus. Cada material precisa ser rotulado com etiqueta protegida, constando os dados necessários à sua identificação no laboratório, como o nome trivial da planta, data da coleta, coletor e localidade.¹⁵

Alguns cuidados necessitam ser tomados após a coleta da planta. Ela precisa ser extraída imediatamente com solvente extrator, ou ser estabilizada, colhendo-a e condicionando-a em uma estufa com circulação de ar, específica para secagem de plantas, fazendo com que a planta seja desidratada, eliminando as atividades enzimáticas, e podendo assim ser guardada por mais tempo.

4.2) Extração

Ao partir para a primeira etapa de extração, a planta foi seca e triturada para obter-se uma maior superfície de contato para ser extraída. Em alguns casos, raiz, caule, folha e flor são extraídos separadamente, porém, no caso da *Polygala sabulosa*, a extração foi feita com o uso de toda a planta.

O material foi imerso em solvente adequado logo após a etapa de coleta, prevenindo oxidações e hidrólise enzimática. Outro procedimento consiste em manter os materiais ricos em água, como folhas, flores e frutos, em sacos plásticos e à temperatura inferior a 10°C, a fim de minimizar as condições de deterioração. Esses procedimentos permitem boas condições para análise do material.¹⁵

Quanto à extração dos constituintes químicos, o material após ser pesado, foi extraído utilizando-se geralmente, a relação de pelo menos três vezes a quantidade

em gramas de solvente, preferencialmente recém-destilados. O álcool etílico, na maioria dos casos, é satisfatório para uma extração preliminar.¹⁵

No presente trabalho, a fração acetato de etila foi obtida por extração líquido-sólido do extrato bruto.

4.3) Cromatografia em coluna (CC)

A separação e a purificação dos constituintes químicos das plantas foram efetuadas utilizando-se uma técnica cromatográfica chamada de cromatografia em coluna, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade, onde dois ou mais compostos em misturas são separados fisicamente pelas suas distribuições entre duas fases:¹⁵

- Fase estacionária: formada por partículas porosas de sílica gel preenchendo um tubo cilíndrico de vidro;
- Fase móvel: um líquido, que flui continuamente pela fase estacionária através da força da gravidade, ou com o auxílio de bombas de baixa ou média pressão, fazendo com que os componentes individuais sejam lentamente eluídos em diferentes velocidades, dependendo da afinidade com a fase estacionária.¹⁵

Esta técnica pode ser dividida em CC normal e CCf (cromatografia em coluna flash). Esta possui este nome por ser considerada rápida, já que a eluição é feita sob velocidade controlada e sob pressão, utilizando para isto, um nebulizador de ar comum e uma válvula de controle da pressão. É utilizada para a separação de componentes de uma mistura com resolução moderada.

4.3.1) Adsorventes

A escolha tanto do sistema de solvente como do adsorvente a ser utilizado na CC foi orientada a partir da observação do comportamento da amostra em CCD. Na **Tabela 2** estão listados os adsorventes comumente utilizados como fase

estacionária de colunas cromatográficas. Neste trabalho, foi utilizada a sílica gel de dois diferentes tipos de granulação: sílica gel 70- 230 mesh para CC normal e 230-400 mesh para CCf.

A quantidade de adsorvente a ser utilizada dependeu da adsorvidade do material, sendo uma boa regra prática se utilizar 30 g de adsorvente por grama de amostra.¹⁵

Tabela 2. Adsorventes utilizados em colunas cromatográficas.

| Adsorvente | Tamanho da partícula (µm) | Comentários |
|---|----------------------------------|--|
| Silicato de magnésio | 75-150 | Adsorvente fraco no caso de compostos com pontes de hidrogênio |
| Alumina (Al ₂ O ₃) | 63-200 | Adsorvente para compostos estáveis |
| Sílica-gel (SiO ₂) | 63-200 | Utilizado no caso de compostos mais sensíveis |
| Celulose em pó | 63-200 | Adsorvente muito fraco |

A construção da coluna cromatográfica efetuou-se pelo preenchimento desta o mais uniforme possível, como pode-se observar pela **Figura 3**, a fim de se aumentar a eficiência das separações entre os componentes da amostra. Dessa forma, o adsorvente foi agitado num frasco com a fase móvel (solvente) e adicionado na coluna contendo um tampão de algodão na extremidade, já contendo 1/3 de seu comprimento com o solvente e na posição vertical. O adsorvente assentou por gravidade, batendo-se na coluna ligeira e continuamente a fim de obter uma homogeneidade no preenchimento da coluna, evitando-se que o adsorvente fique acima da fase móvel. A amostra sólida, chamada de “pastilha”, foi adicionada no topo da coluna. Completou-se vagarosamente com a fase móvel a coluna cromatográfica e efetuou-se a eluição por ação da gravidade, com a vazão de aproximadamente uma gota por segundo, coletando-se o eluente em frações.¹⁵

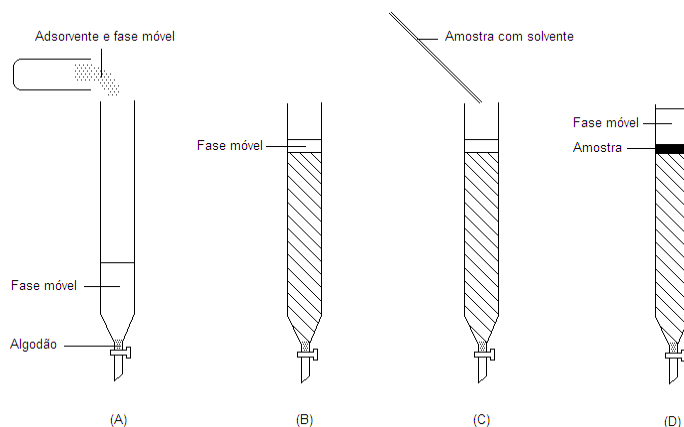


Figura 3: Cromatografia em coluna (A), preparação do leito (B), adição da amostra (C), coluna pronta para eluição (D).

4.3.2) Solventes

Numa CC normal, inicialmente fez-se a eluição com o solvente menos polar, aumentando-se progressivamente a polaridade da fase móvel por adição de um solvente mais polar, como mostra a **Tabela 3**. Numa CCf, utilizou-se um sistema isocrático, onde apenas um tipo de solvente ou um tipo de mistura é utilizado ao longo de todo o processo, ao contrário do gradiente utilizado numa CC normal. O fluxo em ambas precisa ser contínuo, não deixando a coluna secar. Os diferentes componentes da mistura se movem com velocidades distintas dependendo de sua afinidade relativa pelo adsorvente (grupos polares interagem melhor com o adsorvente) e também pelo eluente.

Tabela 3. Típicas proporções dos solventes utilizados nas colunas cromatográficas.

| Hexano : Acetato de etila (% em volume) |
|---|
| 100 : 0 |
| 90 : 10 |
| 80 : 20 |
| 70 : 30 |
| 60 : 40 |
| 50 : 50 |

Tanto na CC normal quanto na CCf, à medida que os compostos da mistura foram separados, bandas ou zonas móveis começaram a ser formadas na coluna, sendo que cada banda pode conter um único composto ou um grupo de compostos de polaridades muito similares. Em geral, os compostos apolares passaram através da coluna com uma velocidade maior do que os compostos polares, porque os primeiros têm menor afinidade com a fase estacionária. Se o adsorvente escolhido interagir fortemente com todos os compostos da mistura, ela não se moverá. Por outro lado, se for escolhido um solvente muito polar, todos os solutos podem ser eluídos sem serem separados. Por uma escolha cuidadosa das condições, praticamente qualquer mistura pode ser separada.

4.4) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a análise dos componentes eluídos da coluna cromatográfica, as frações coletadas da fase móvel foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, reunidas de acordo com a identidade e a pureza dos componentes revelados e concentrados. Na CCD, os componentes foram separados através da migração sobre cromatofolhas de sílica gel Merck com espessura de 0,2 mm. A revelação das substâncias nas placas cromatográficas é realizada por irradiação ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e/ou por exposição a vapores de iodo, e/ou imersão em solução aquosa de sulfato de cério e/ou imersão em solução de anisaldeído sulfúrico seguida de aquecimento a 110°C.

Quanto aos solventes cromatográficos utilizados para eluição, a **Figura 4** os organiza em ordem crescente de polaridade:¹⁵

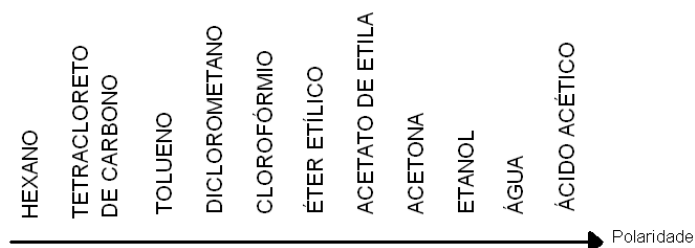


Figura 4: Polaridade dos solventes.

4.5) Isolamento e purificação dos metabólitos secundários da fração acetato de etila

Após a realização da eluição na cromatografia em coluna, as frações coletadas foram evaporadas em rotaevaporador sob vácuo a 50°C até 1/10 de seus volumes iniciais, estocadas em frascos adequados e rotulados, e imediatamente analisadas por CCD. As frações resultantes de processos cromatográficos que continham sólidos foram lavadas com um pequeno volume de um solvente apropriado (geralmente acetona) sob leve aquecimento. Após alguns minutos em repouso, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido até que o sólido apresentava-se livre de pigmentos e óleos. Quando necessário, realizou-se uma efetiva recristalização do material em solvente adequado.

Como pode-se observar na **Figura 5**, diversas cromatografias em coluna foram realizadas até que a preniloxicumarina **[1]** e os outros compostos fossem isolados. A dimensão das colunas variou conforme a quantidade de pastilha que havia sido feita para cada eluição, sendo que as quantidades tanto do extrato bruto quanto das frações seguintes isoladas, não foram pesadas, já que nosso objetivo era trabalhar qualitativamente, e não quantitativamente. A partir da fração acetato de etila, foi feita uma primeira coluna (CC 1) utilizando-se como solvente uma mistura de hexano e acetato de etila, onde a polaridade foi aumentando conforme a eluição se procedia. Desta coluna, duas reuniões de frações tiveram uma maior atenção. Da fração 6-8 (CC 1), outra cromatografia em coluna foi feita (CC 2), também utilizando-se solvente com gradiente crescente de polaridade, de onde conseguiu-se isolar o composto identificado como espinasterol **[3]**, através de análises posteriores.

Espinasterol [3] → pf: 167-169°C. IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3424, 2936, 2868, 1456, 1380, 1040, 970. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) ppm: 5.14 (m, 3H, H-7, H-22 e H-23), 3.60 (m, H-3), 1.03 (d, $J = 6.6$, 21- CH_3), 0.85 (d, $J = 6.0$, 26- CH_3), 0.80 (s, 19- CH_3), 0.80 (d, $J = 6.3$, 27- CH_3), 0.79 (t, $J = 6.2$, 29- CH_3), 0.55 (s, 18- CH_3).

Da fração 13-31 (CC 1), uma terceira cromatografia em coluna (CC 3) com gradiente crescente de polaridade foi feita, de onde mais três compostos foram isolados: preniloxicumarina [1] (20-29 – CC 3), proto-hipericina [12] (30-35 – CC 3) e escopoletina [2] (40-48 – CC 3).

Preniloxicumarina [1] → pf: 79 – 81°C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 1713, 1612, 1561, 1513, 1381, 1280, 1248, 1140, 971, 812. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (ppm): 7,63 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-4), 6,86 (s, 1H, H-8), 6,82 (s, 1H, H-5), 6,26 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-3), 5,49 (t, 1H, $[\text{CH}_3]_2\text{-C=CH-CH}_2$), 4,66 (d, 2H, $[\text{CH}_3]_2\text{-C=CH-CH}_2$), 3,90 (s, 3H, 6-OCH₃), 1,79 (s, 6H, $[\text{CH}_3]_2\text{-C=CH-CH}_2$).

Proto-hipericina [12] → IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3434 , 2907 cm^{-1} , 1724.

Escopoletina [2] → pf: 203 – 204°C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3340, 1709, 1267. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (ppm): 7,60 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 6,91 (s, 1H, H-8), 6,85 (s, 1H, H-5), 6,27 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 6,22 (s, 1H, OH), 3,95 (s, 3H, 6-OCH₃).

As sub-frações 20-29 (CC 3) foram reunidas e submetidas a uma reação de hidrólise para obtermos escopoletina [2] em maior quantidade para as reações de substituição posteriores. Uma quarta coluna cromatográfica (CC 4) foi realizada com sistema de solvente isocrático (hexano : AcOEt, 60:40) para obtermos a escopoletina [2] mais pura, sendo que a reunião das frações 5-6 desta coluna foi submetida a uma nova purificação realizando-se uma quinta coluna (CC 5) com o mesmo sistema isocrático de solvente utilizado na CC 4, encerrando-se o processo de isolamento, e conseguindo-se quantidades satisfatórias de escopoletina [2] para proceder com as reações de substituição. Visualmente, as frações 19-22 e 38-42 da CC 5 pareciam estar mais impuras do que as frações 23-37 que se apresentava numa coloração mais branca, e sendo assim, as reações foram feitas com a escopoletina [2] isolada nas frações 23-37 (CC 5).

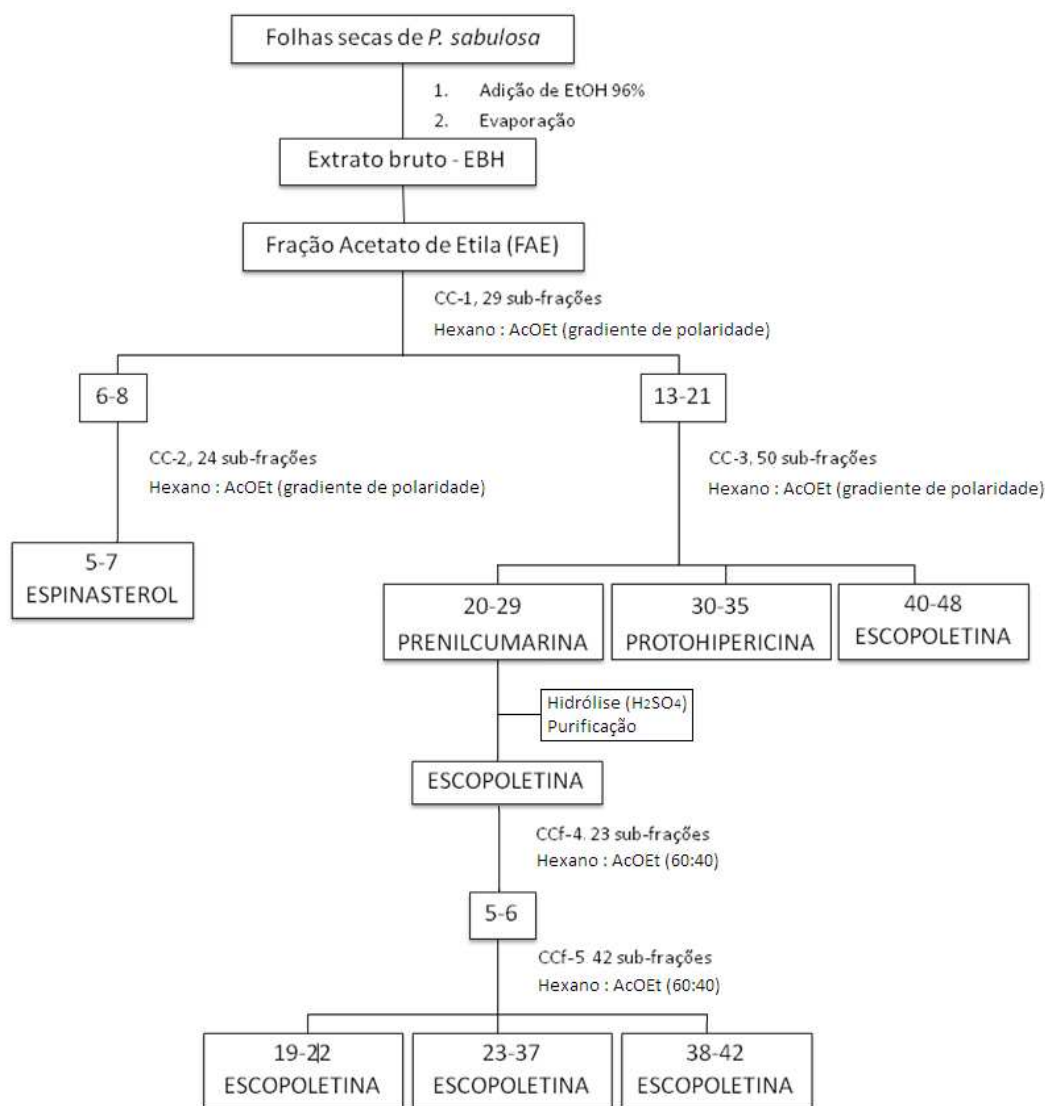


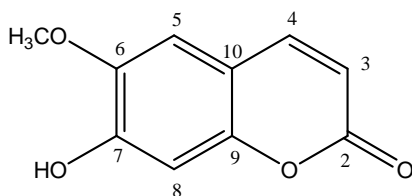
Figura 5: Fluxograma das colunas feitas ao longo do trabalho.

4.6) Análises posteriores

Além da CCD onde foi determinada a quantidade de manchas na placa (um critério de pureza da substância), também foram realizadas determinações de pontos de fusão dos compostos isolados para posterior comparação com aqueles encontrados na literatura, além de serem realizadas análises de espectros de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Através da combinação de resultados desses métodos, chegou-se a elucidação de uma determinada estrutura do composto isolado.

4.7) Obtenção da escopoletina a partir da preniloxicumarina

Um dos componentes majoritários isolados da *Polygala sabulosa* é a preniloxicumarina [1], porém, sua estrutura não permite que reações de substituição sejam efetivas. Isso não ocorre com a escopoletina [2], já que devido à presença de uma hidroxila ligada ao C-7, esta substância revelou-se como um bom modelo para o preparo de análogos através de simples reações de acilação ou benzoilação, permitindo a obtenção de derivados com variações hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas, essenciais para estudos de correlação estrutura *versus* atividade.



[2]

Porém, a pequena quantidade de escopoletina [2] isolada inviabilizaria um trabalho deste tipo. Como a preniloxicumarina [1] é um dos metabólitos secundários majoritário nesta espécie e possui sua cadeia lateral em C-7 oxiprenilada, tomou-se como alternativa obter a escopoletina [2] a partir desta cumarina. Para isso, é feita a seguinte reação da **Figura 6**:

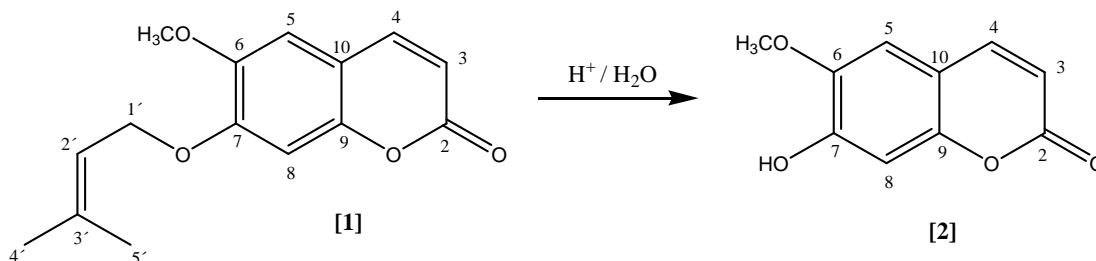


Figura 6: Reação de obtenção da escopoletina [2] a partir da preniloxicumarina [1].

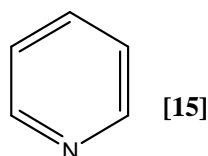
A 1,0 g (3,84 mmol) de preniloxicumarina [1] em etanol, adicionou-se 3 mL de água, e sob vigorosa agitação adicionou-se 2 mL de H₂SO₄ (0,037 mmol) concentrado. O sistema foi mantido em agitação até todo substrato ser consumido. O precipitado formado na reação foi separado através de filtração a vácuo, obtendo-se o produto bruto da reação. Para otimizar o rendimento, o filtrado foi ainda extraído 3 vezes com clorofórmio. A fase orgânica foi seca sob Na₂SO₄ anidro, evaporada, e então reunida ao resíduo sólido, sendo o produto recristalizado em acetona.

Em seguida, foi feita uma purificação através de uma cromatografia em coluna flash, utilizando sistema de solvente isocrático na proporção de 60:40 de hexano : AcOEt. Após a eluição, as frações coletadas foram evaporadas em rotaevaporador, estocadas em frascos adequados e rotulados, e imediatamente analisadas por CCD. Quando necessário, realizou-se uma recristalização do material em solvente adequado, e o produto final foi submetido a análises para posterior utilização nas reações de preparação de derivados da escopoletina [2].

4.8) Preparo de derivados da escopoletina.

4.8.1) Acetilação.

Primeiramente, a piridina [15] foi purificada por destilação simples sob sódio metálico como agente dessecante, para a retirada da água, pois a necessidade de um solvente seco evita que possíveis traços de água diminuam o rendimento da reação.



De acordo com o sistema de destilação apresentado na **Figura 7**, a piridina [15] é colocada num balão sob aquecimento, juntamente com pequenos pedaços de sódio metálico. A destilação é monitorada com a ajuda de um termômetro encaixado na entrada do condensador, sendo que a fração a ser coletada (piridina seca), sairá quando a temperatura for igual ao ponto de ebulição da piridina (115° C). Antes de coletar o destilado para as reações, rejeitou-se a primeira fração de destilado.

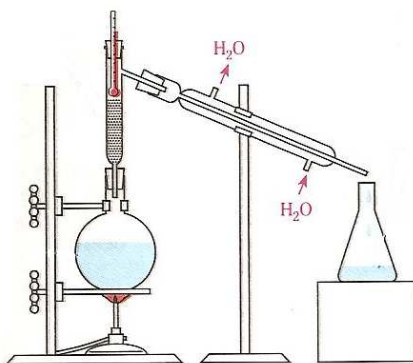
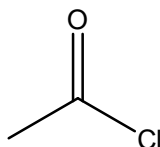


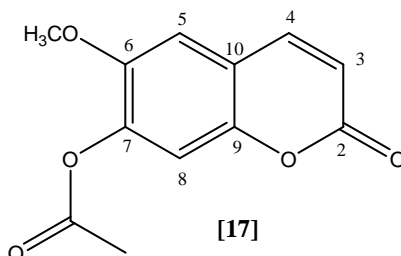
Figura 7: Aparelhagem para destilação.

A escopoletina [2] foi então dissolvida em piridina seca e tratada com excesso de cloreto de acetila [16]. O sistema reacional foi mantido sob refluxo até todo substrato ser consumido. A formação do produto acetato de escopoletina [17] foi monitorada por CCD utilizando a mistura de hexano:AcOEt (9:1 v:v).



[16]

Procedeu-se a extração do excesso de piridina [15] com a adição de 40 mL de CHCl_3 ao sistema em um funil de separação, juntamente com uma solução aquosa pH 2 de HCl (4 X 25 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaHCO_3 a 10% (4 X 25 mL), seca sob Na_2SO_4 anidro e evaporada. A purificação foi feita usando uma coluna de sílica gel, eluída com misturas de hexano:AcOEt (60:40). As frações foram comparadas com padrões através de CCD e então encaminhadas para análise de RMN ^1H .

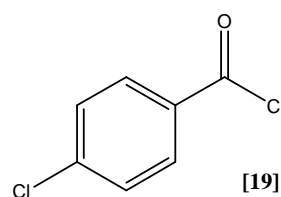
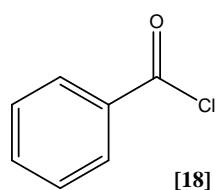


[17]

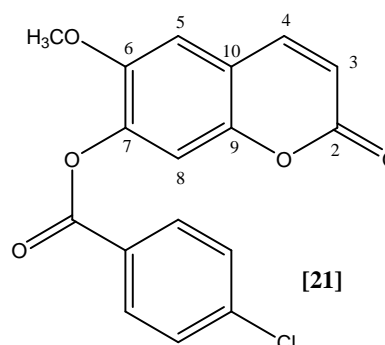
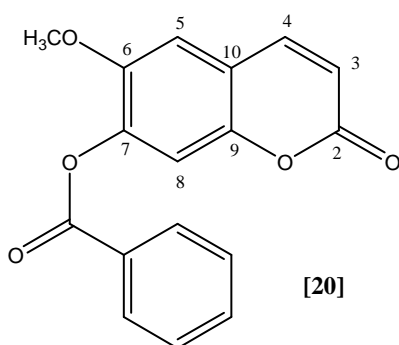
Acetato de escopoletina [17] → Foi obtido na forma de sólidos cristalinos amarelados, com ponto de fusão igual a 183° C. O rendimento da reação foi de 10,32%. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (ppm): 7,59 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,08 (s, 1H, H-8), 6,96 (s, 1H, H-5), 6,26 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 3,87 (s, 3H, 6- OCH_3), 2,34 (s, 3H, CH_3).

4.8.2) Benzoilação.

A piridina purificada como foi descrito no item 4.8.1, foi utilizada nas duas reações de benzoilação que foram feitas. A escopoletina foi dissolvida em piridina e tratada com excesso de cloreto de benzoila [18] ou cloreto de p-clorobenzoila [19]. O sistema reacional foi mantido sob refluxo até todo substrato ser consumido. De acordo com o substrato que foi utilizado, a formação dos produtos benzoato de escopoletina [20] ou p-clorobenzoato de escopoletina [21] foi monitorada por CCD utilizando a mistura de hexano:AcOEt (9:1 v:v).



Procedeu-se a extração do excesso de piridina com a adição de 40 mL de CHCl_3 ao sistema em um funil de separação, juntamente com uma solução aquosa pH 2 de HCl (4 X 25 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaHCO_3 a 10% (4 X 25 mL), seca sob Na_2SO_4 anidro e evaporada. A purificação foi feita usando uma coluna de sílica gel, eluída com misturas de hexano:AcOEt. As frações foram comparadas com padrões através de CCD e então encaminhadas para análise de RMN ^1H .



Benzoato de escopoletina [20] → Foi obtido na forma de sólidos cristalinos amarelados, com ponto de fusão igual a 158-161° C. O rendimento da reação foi de 96%. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (ppm): 8,20 e 1,37 (d, 2H, $J=8,42$ Hz orto e $J=1,37$ Hz meta, H-2',6'), 7,68 (d, 1H, $J=9,39$ Hz, H-4), 7,63 (m, 1H, H-4'), 7,54 (t, 2H,

$J=7,63$ Hz, H-3',5'), 7,21 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,42 (d, 1H, $J=9,39$ Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃).

***p*-clorobenzoato de escopoletina [21]** → Foi obtido na forma de sólidos cristalinos amarelados, com ponto de fusão igual a 150-154° C. O rendimento da reação foi de 80,52%. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) (ppm): 8,14 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H-2',6'), 7,68 (d, 1H, $J=9,59$ Hz, H-4), 7,49 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, $J=9,59$ Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃).

5. Resultados e discussão

Em nosso Laboratório de Produtos Naturais, trabalhos anteriores a este foram realizados com a *Polygala sabulosa*. O extrato hidroalcoólico preparado nestes trabalhos foi feito em grandes quantidades, sendo então possível ser utilizado neste trabalho. Sendo assim, a planta já havia sido macerada exaustivamente em temperatura ambiente com etanol 96%, e o solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C, fornecendo o respectivo extrato bruto hidroalcoólico.

Com base em conhecimentos anteriores, o extrato bruto de *Polygala sabulosa* foi utilizado para o preparo de uma suspensão aquosa que foi submetido à partição sólido-líquido com acetato de etila (3 X). O solvente da fase orgânica foi evaporado sob vácuo a 50°C para obtenção da respectiva fração acetato de etila (FAE).

Partiu-se então para uma etapa de isolamento dos compostos. A fração acetato de etila obtida através de maceração foi submetida ao fracionamento em CC de gel de sílica. A eluição foi realizada com misturas de hexano:AcOEt e AcOEt:EtOH na forma de gradiente de polaridade. A reunião das frações foi realizada conforme os perfis cromatográficos demonstrados, levando-se em consideração os valores do fator de retenção (Rf), fluorescência e coloração após pulverização com reveladores como anisaldeído sulfúrico, vapores de iodo e $Ce(SO_4)_2$. As frações reunidas foram então submetidas a sucessivas CC e CCf e os compostos obtidos purificados através de lavagens e recristalização em solventes apropriados.

Os compostos obtidos em cada coluna foram caracterizados através de suas propriedades físicas, químicas e espectroscópicas tais como ponto de fusão (pf), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H). As análises espectroscópicas foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.1) Identificação dos compostos isolados

5.1.1) Preniloxicumarina [1]

A preniloxicumarina [1] foi obtida na forma de pequenos cristais esbranquiçados, e apresentou ponto de fusão igual a 79-81° C. São características no espectro de IV (KBr) as bandas de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3050 cm^{-1} , 3055 cm^{-1} e 3008 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações C-H aromáticas e olefínicas, $\nu_{\text{máx}}$ 2974 cm^{-1} (C-H alifático) e $\nu_{\text{máx}}$ 1713 cm^{-1} (C=O lactona α,β insaturada). A banda em 3396 cm^{-1} é devido provavelmente à água que a pastilha de KBr pode conter.

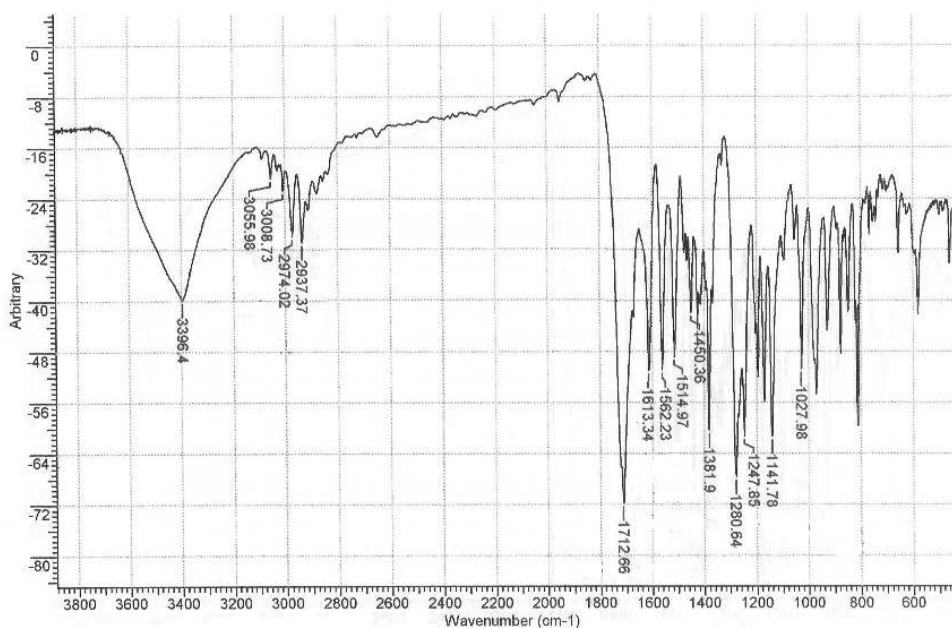


Figura 8: Espectro de IV (KBr) da preniloxicumarina [1].

No espectro de RMN ^1H , observou-se dois dubletos centrados em δ 7,59 e 6,23 ppm, ambos com integração para 1 hidrogênio e $J= 9,3$ Hz, típicos de dupla ligação endocíclica, sendo referentes aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3 respectivamente do anel lactônico. Os dois singletos em δ 6,79 e 6,82 ppm, com integração para 1 hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos (H-8 e H-5 respectivamente). O grupo oxiprenílico foi caracterizado pelo tripleto em δ 5,45 ppm ($J= 6,1$ Hz, 1H, H-2') mostrando o hidrogênio olefínico acoplado ao metileno carbinólico em δ 4,63 ppm ($J= 6,1$ Hz, 2H, H-1'). As duas metilas ligadas ao carbono

olefínico quaternário são representadas por 2 singletos em δ 1,76 e δ 1,74 ppm. Finalmente, a metoxila em C-6 foi identificada pelo singlete em δ 3,87 ppm.

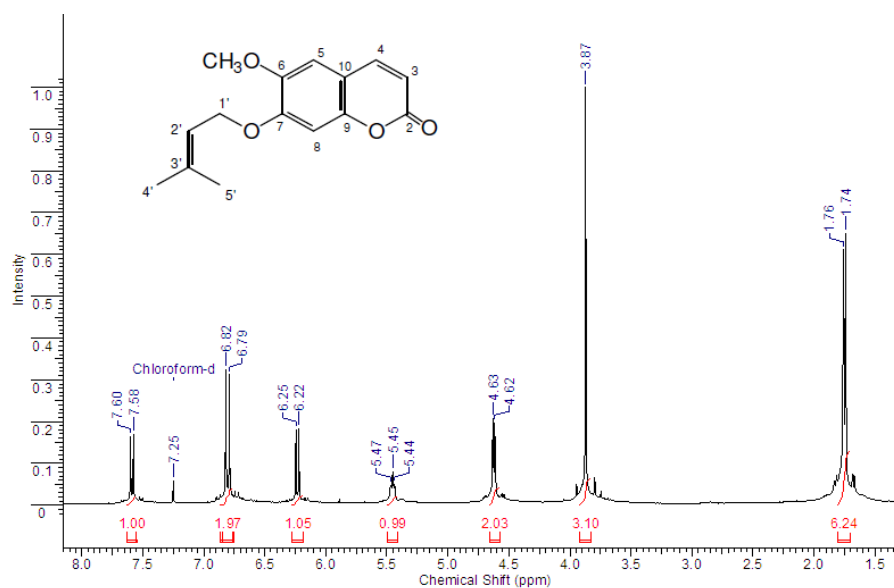


Figura 9: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da prenilocumarina [1].

5.1.2) Escopoletina [2]

A escopoletina [2] foi obtida na forma de pequenos cristais brancos amarelados, com ponto de fusão igual a 203-204° C. No espectro de IV (KBr), a banda de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3337 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento da ligação O-H, $\nu_{\text{máx}}$ 2990 cm⁻¹ (C-H alifático) e $\nu_{\text{máx}}$ 1701 cm⁻¹ (C=O lactona α,β insaturada).

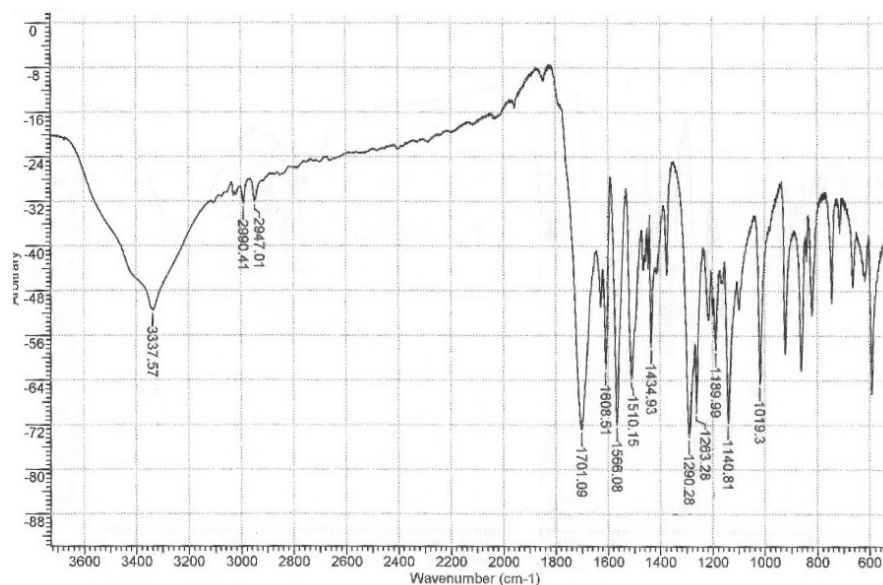


Figura 10: Espectro de IV (KBr) da escopoletina [2].

Através da análise do espectro de ^1H , observou-se dois dubletos em δ 7,59 ppm (1H, $J= 9,6$ Hz) e δ 6,27 ppm (1H, $J= 9,6$ Hz) relacionados respectivamente aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3 da dupla endocíclica. Os dois singletos centrados em δ 6,91 ppm (1H, H-8) e δ 6,83 (1H, H-5) são relacionados aos átomos de hidrogênio aromáticos e o singlete em δ 3,94, com integração para 3 átomos de hidrogênio, referente à metoxila ligada ao C-6. O hidrogênio da hidroxila aparece como um singlete em δ 6,17 ppm. O pico em 1,58 ppm é devido provavelmente à água, indicando que o produto não foi devidamente seco.

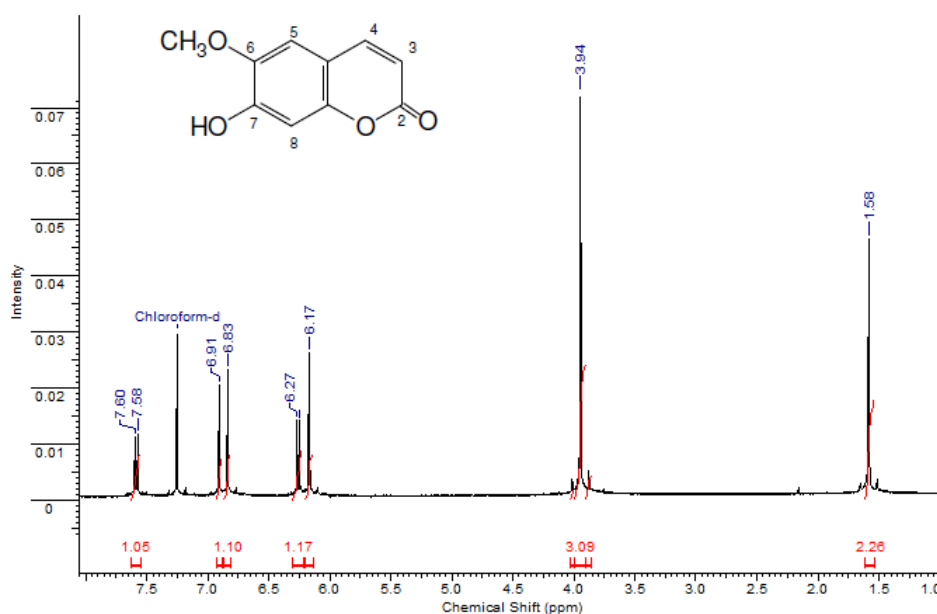


Figura 11: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da escopoletina [2].

5.1.3) Espinasterol [3]

O espinasterol [3] foi obtido na forma de pequenas agulhas brancas com ponto de fusão 167°C - 169°C . O espectro de RMN ^1H apresentou um perfil característico de substância esteroideal.

No espectro de RMN ^1H notou-se sinais em δ 5,14 ppm (H-7) para hidrogênio olefínico, δ 5,02 ppm (H-22 e H-23), δ 3,59 ppm (H-3) para um hidrogênio carbinólico, δ 2,03 ppm (H-6), além de um conjunto complexo de sinais na região de alifáticos, onde foi possível o reconhecimento de duas metilas ligadas a carbono quaternário, em δ 0,54 ppm (3H, s) e δ 0,79 ppm (3H, s), e três metilas dubletos: em 1,03 ppm (21- CH_3), em 0,85 ppm (26- CH_3) e em 0,80 ppm (27- CH_3).

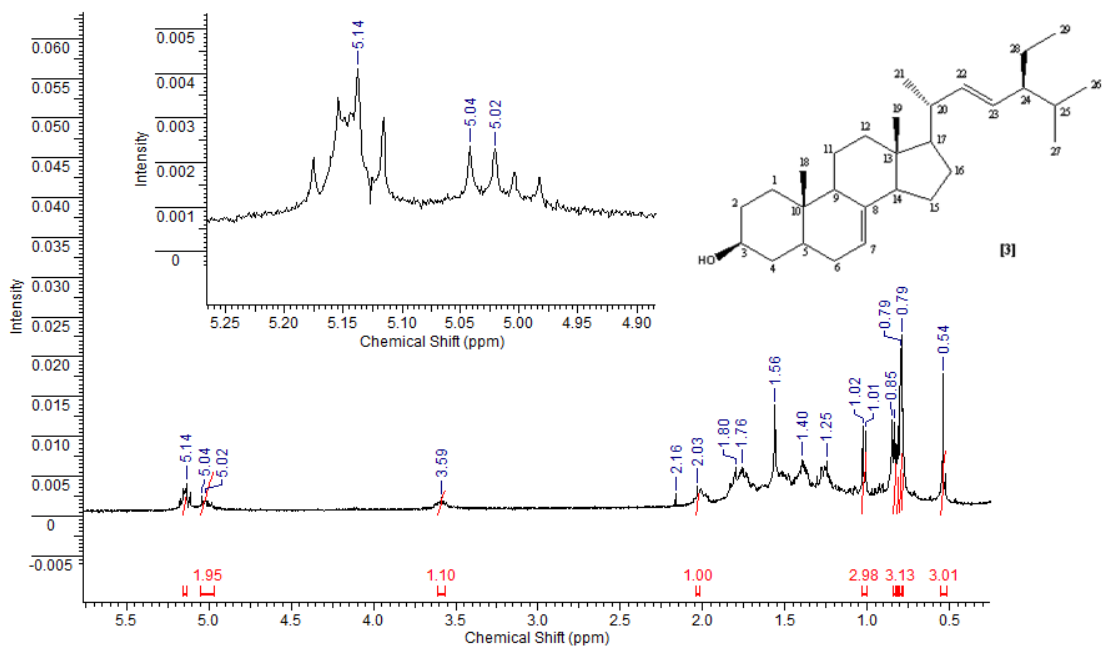


Figura 12: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do spinasterol [3].

5.1.4) Proto-hipericina [12]

A proto-hipericina [12] foi isolada e apresenta características físicas bem definidas, como a coloração laranja avermelhada intensa. A identificação do composto isolado foi feita por comparação das características físicas com um padrão anteriormente isolado desta planta e confirmada por CCD. No espectro de IV (KBr), a banda de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3434 cm^{-1} foi atribuída à ligação O-H, $\nu_{\text{máx}}$ 2907 cm^{-1} (C-H alifático), $\nu_{\text{máx}}$ 3077 cm^{-1} (C-H aromático) e $\nu_{\text{máx}}$ 1724 cm^{-1} (C=O cíclica).

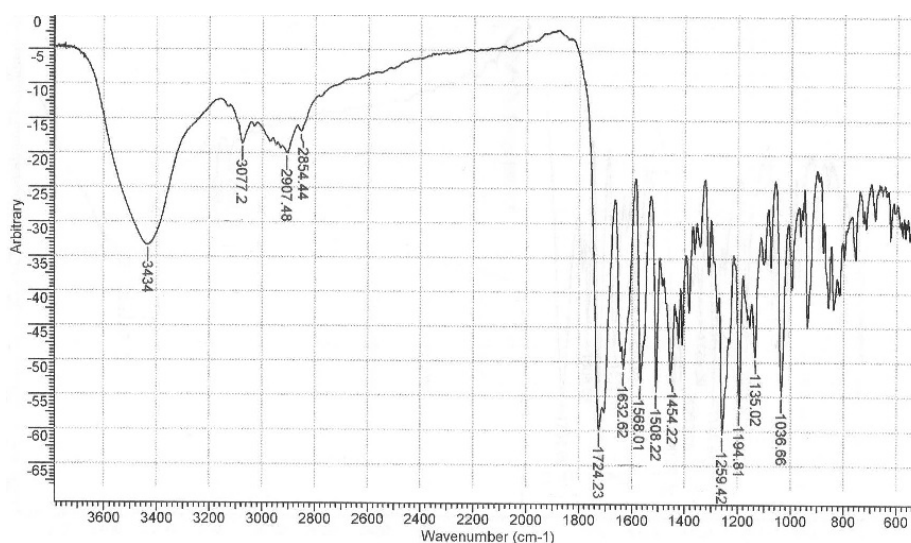


Figura 13: Espectro de IV (KBr) da proto-hipericina.

5.2) Síntese da escopoletina [2]

Sabendo-se através de estudos anteriores das grandes utilizações dos compostos isolados da *Polygala sabulosa*, tivemos interesse na busca de outros derivados cumarínicos a fim de se iniciar estudos de correlação estrutura *versus* atividade frente a diferentes modelos de atividades biológicas. Para a preparação destes derivados, foi necessário obter uma maior quantidade de escopoletina [2] a partir da preniloxicumarina [1].

A ligação C-O do grupo preniloxi ligado ao C-7 da preniloxicumarina [1] foi clivada na presença H_2SO_4 em temperatura ambiente (TA) conforme mostra o esquema da **Figura 14**. A possibilidade de um mecanismo de clivagem via carbocátion possibilitou a regioseletividade da reação devido ao grupo prenil estabilizar o carbocátion formado, como observa-se na **Figura 15**.

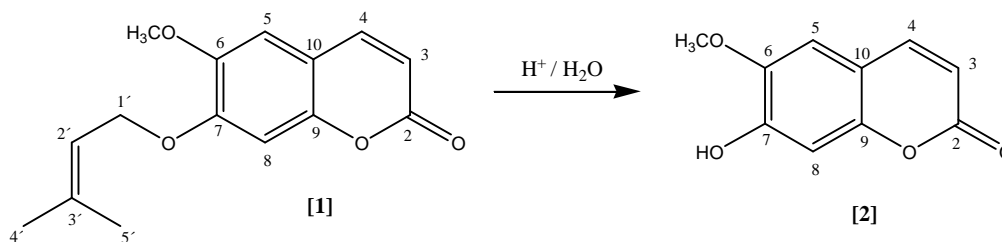


Figura 14: Reação de obtenção da escopoletina [2] a partir da preniloxicumarina [1]

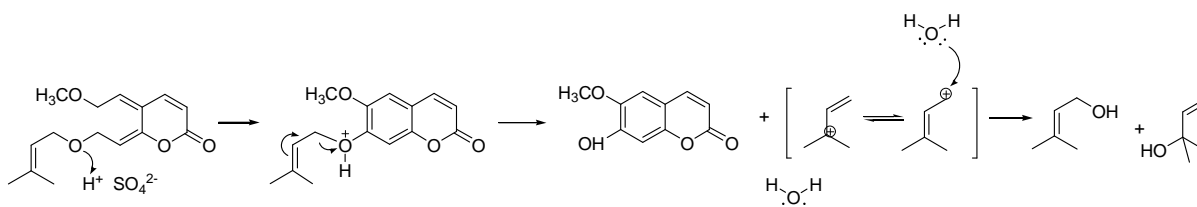


Figura 15: Mecanismo da reação de obtenção da escopoletina [2] a partir da preniloxicumarina [1].

A partir da análise de IV (KBr) do produto da reação, pode-se observar principalmente o aparecimento de uma banda em $\nu_{\text{máx}} 3340 \text{ cm}^{-1}$, própria do grupo hidroxila. Pelo espectro de RMN ^1H , observou-se uma mudança considerável quando comparado ao espectro da preniloxicumarina [1], principalmente pela ausência de sinais na região entre $\delta 4,0$ e $6,0$ ppm, referentes aos átomos de hidrogênio da porção oxiprenílica. Além disso, o desaparecimento do singlete em $\delta 1,78$ ppm referente a duas metilas ligadas ao mesmo carbono sp^2 contribuiu para a

evidência de alteração da molécula, resultando na escopoletina [2].

5.3) Síntese de derivados da escopoletina [2]

Foram preparados dois derivados da escopoletina [2]: um da série de ésteres alquílicos com cadeias lineares de diferentes tamanhos e outro, da série de ésteres benzoílicos com substituintes retiradores e doadores de elétrons, ambos ligados ao C-7.

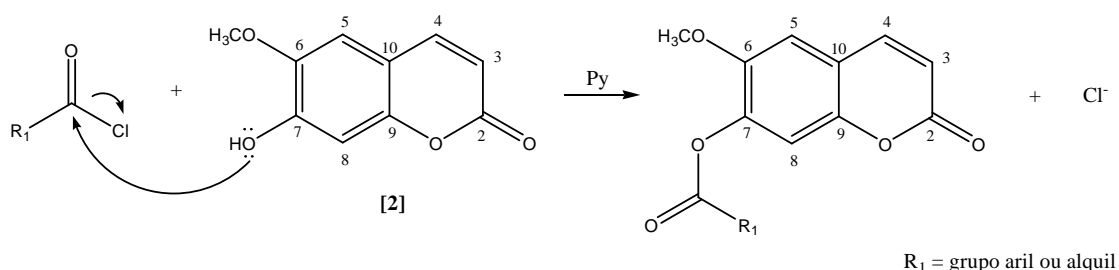


Figura 16: Mecanismo geral para obtenção de derivados da escopoletina [2].

5.3.1) Obtenção de éster alquílico derivado da escopoletina [2]

Sob as mesmas condições das reações anteriores, o derivado acilado da escopoletina [2] foi preparado com o respectivo cloreto de acila em piridina [15].

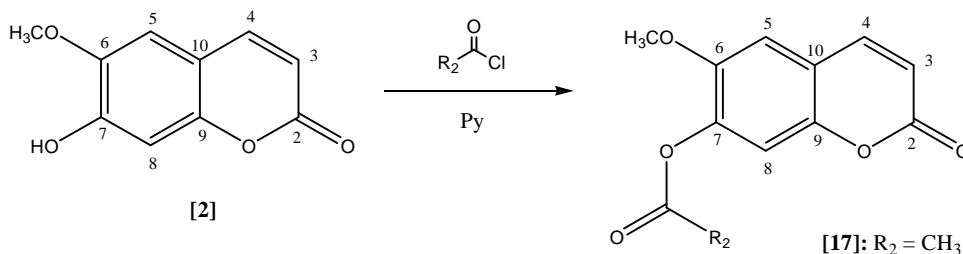


Figura 17: Reação geral para obtenção dos ésteres alquílicos derivados da escopoletina [2].

A identificação do produto desta reação foi realizada observando as seguintes mudanças espectroscópicas:

- No espectro de RMN ^1H , o aparecimento de sinais adicionais abaixo de δ 3,0 ppm referente à cadeia alquílica.

Caso tivesse sido feito um espectro de IV, observaríamos o desaparecimento da banda referente à ligação O-H em $\nu_{\text{máx}}$ 3340 cm^{-1} e o aparecimento da banda referente à carbonila de éster em torno de $\nu_{\text{máx}}$ 1735 cm^{-1} ;

5.3.1.1) Acetato de escopoletina [17]

Através da análise de seu espectro de ^1H , observou-se dois dubletos em δ 7,59 ppm ($J= 9,6$ Hz, 1H) e δ 6,26 ppm ($J= 9,6$ Hz, 1H) relacionados respectivamente aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3 da dupla endocíclica. Os dois singletos centrados em δ 7,08 ppm (1H, H-8) e δ 6,96 (1H, H-5) são relacionados aos átomos de hidrogênio aromáticos e o singlete em δ 3,87, com integração para 3 átomos de hidrogênio, referente à metoxila ligada ao C-6. A metila do grupo acetil mostrou um singlete em δ 2,34 ppm (3H, H-1').

Além disso, algumas observações devem ser feitas: o sinal do H8 sofreu uma leve alteração, passando de 6,94 para 7,08 ppm porque a presença da carbonila do grupo acetato acaba exercendo um efeito anisotrópico sobre este H, deslocando seu sinal para campos mais baixos. Também observa-se a presença de outros sinais em 6,84, 6,91 e 3,94 ppm que são aqueles sinais observados para os H5, H8 e metoxila, como visto no espectro da escopoletina [2]. Especificamente para os picos em 3,94 e 3,87 ppm, pode-se fazer a integração entre eles para calcular o fator de conversão da escopoletina em acetato, sendo que neste caso, observou-se um rendimento de apenas 10%.

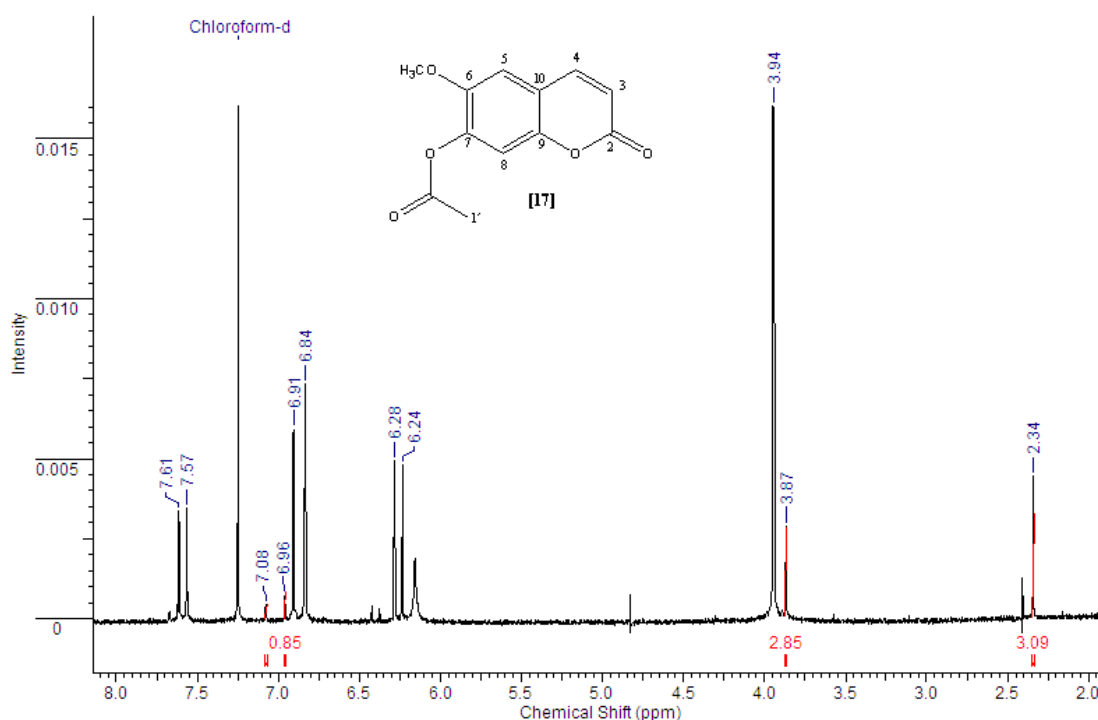


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato de escopoletina [17].

5.3.2) Obtenção de ésteres benzoílicos derivados da escopoletina [2]

A esterificação do grupo OH livre no C-7 ocorreu sob agitação e refluxo entre a escopoletina [2] e os respectivos cloretos de benzoíla em piridina, sendo que neste trabalho foram utilizados o cloreto de benzoíla [18] e cloreto de p-clorobenzoíla [19], seguindo o esquema mostrado na **Figura 19**.

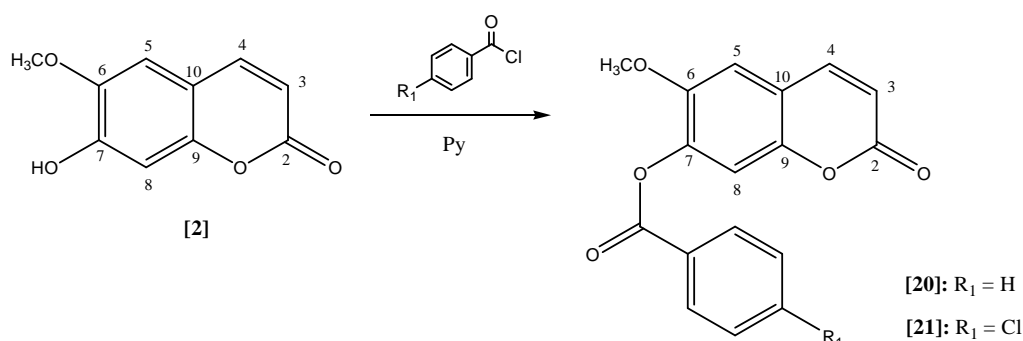


Figura 19: Reação geral para a síntese dos ésteres benzoílicos derivados da escopoletina [2].

A identificação dos produtos destas reações foi realizada observando as seguintes mudanças espectroscópicas:

- No espectro de RMN ¹H, o aparecimento de sinais de átomos de hidrogênio na região de aromáticos.

Caso tivesse sido feito um espectro de IV, observaríamos o desaparecimento da banda de absorção da hidroxila em $\nu_{\text{máx}}$ 3340 cm⁻¹ e o aparecimento de uma banda de absorção para carbonila de éster em $\nu_{\text{máx}}$ 1735 cm⁻¹;

5.3.2.1) Benzoato de escopoletina [20]

A porção benzoílica ligada ao C-7 foi caracterizada pela presença de três sinais na região dos aromáticos: um dublete em δ 8,20 ppm ($J=8,42$ Hz orto, e $J=1,37$ Hz meta, 2H, H-2' e H=6'), um triplete em δ 7,54 ppm ($J=7,63$ Hz, 2H, H-3' e H=5') e um multiplete em δ 7,63 ppm (1H, H-4'). Os demais sinais referentes ao esqueleto cumarínico foram: um par de dubletos em δ 7,68 ($J=9,39$ Hz, 1H, H-4) e 6,42 ppm ($J=9,39$ Hz, 1H, H-3), dois singletos em δ 7,21 (s, 1H, H-8) e 7,01 ppm (s, 1H, H-5) e um singlete em δ 3,85 ppm, atribuído à metoxila ligada ao C-6.

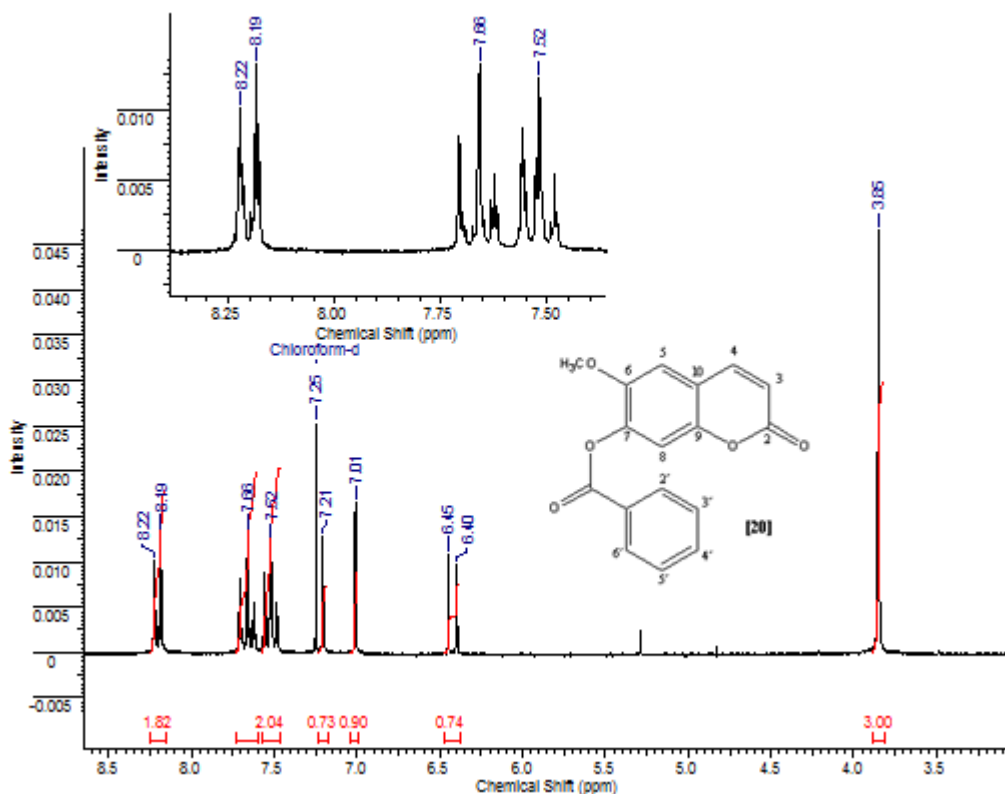


Figura 20: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do benzoato de escopoletina.

5.3.2.2 p-clorobenzoato de escopoletina [21]

A porção benzóica ligada ao C-7 foi caracterizada pela presença de um par de dubletos em δ 8,14 ($J=8,80$, 2H, H-2' e H-6') e 7,49 ppm ($J=8,80$, 2H, H-3' e H-5'). Os demais sinais observados foram o par de dubletos em δ 6,43 ($J=9,59$ Hz, 1H, H-3) e 7,68 ppm ($J=9,59$ Hz, 1H, H-4), dois singletos em δ 7,20 (1H, H-8) e 7,01 ppm (1H, H-5) e um singlete em δ 3,85 ppm atribuído à metoxila ligada ao C-6.

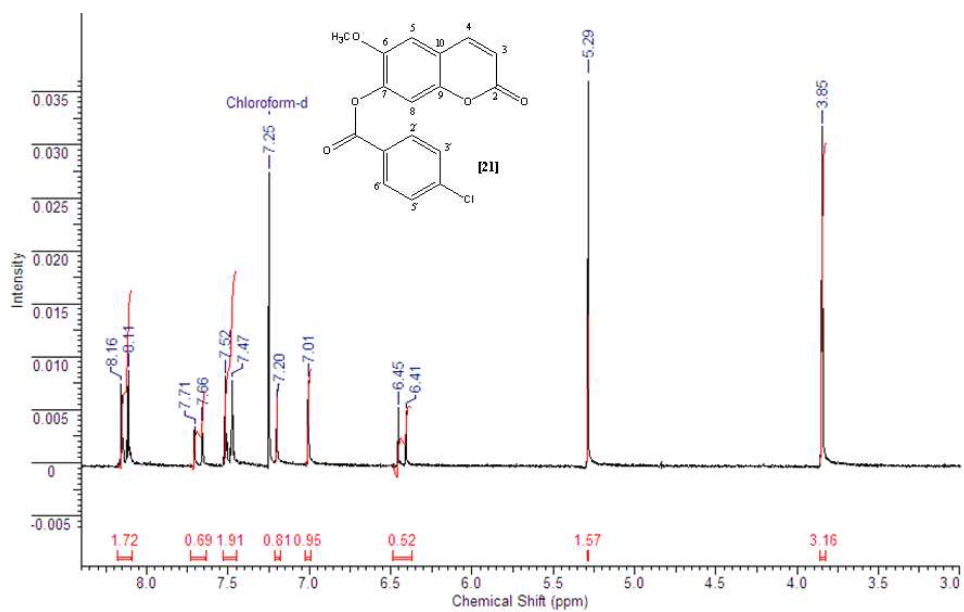


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do p-clorobenzoato de escopoletina [21].

6. Conclusões

As metodologias utilizadas para o isolamento dos constituintes majoritários da *Polygala sabulosa* se mostraram bastante eficientes, com resultados bastante satisfatórios, uma vez que na maioria dos casos foi possível o isolamento do produto esperado com rendimento satisfatório e devidamente caracterizado por métodos espectroscópicos.

Sendo assim, nossos objetivos principais de isolar e purificar a preniloxicumarina foram atingidos com êxito, já que conseguimos grandes quantidades deste composto para serem usadas posteriormente na reação de hidrólise, de onde também obtivemos quantidades satisfatórias de escopoletina (1,32 g) para prosseguirmos às reações de sínteses de seus derivados.

Já a respeito das reações de substituição da escopoletina, podemos dizer que o resultado obtido foi satisfatório para a síntese do benzoato e do p-clorobenzoato de escopoletina, com rendimentos que podem ser considerados bons. No caso do acetato de escopoletina, o resultado ficou muito abaixo do desejável. Isto pode ser explicado pelo uso de uma metodologia inadequada (utilização de cloreto de acila), uma vez que a reação feita com o uso de anidrido acético utilizando DMAP como catalisador apresentaria maior eficiência em relação ao tempo e rendimento da reação.

A sequência do trabalho será realizada através da síntese de outros derivados de escopoletina e posteriores ensaios biológicos para verificar as possíveis atividades farmacológicas, tais como antinociceptiva, ansiolítica, tripanocida entre outras.

7. Referências Bibliográficas

1. CUNHA, A. Jr. Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (POLYGALACEAE). Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Química - UFSC. 2002.
2. MENDES, B. G. *Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estirilpironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Química – UFSC. 2008.
3. DUARTE, F. S. Participação das dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* a.w. bennett (polygalaceae) em roedores. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Química – UFSC. 2007.
4. FRANCO, J. L.; BRAGA, H. C.; STRINGARI, J.; MISSAU, F. C.; POSSER, T.; MENDES, B. G.; LEAL, R. B.; SANTOS, A. R. S.; DAFRE, A. L.; PIZZOLATTI, M. G.; FARINA, M.; **Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: Protective effects of quercetin.** *Chemical Research in Toxicology* 20 (12), pp. 1919-1926, 2007.
5. MARTINS, R. P.; BRAGA, H. C.; SILVA, A. P.; DALMARCO, J. B.; DE BEM, A. F.; SANTOS, A. R. S.; DAFRE, A. L.; PIZZOLATTI, M. G.; LATINI, A.; ASCHNER, M.; FARINA, M.; **Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice.** *Food and Chemical Toxicology* 47 (3), pp. 645-649, 2009.
6. MEOTTI, F. C.; ARDENGHI, J. V.; PRETTO, J. B.; SOUZA, M. M.; D'ÁVILA MOURA, J.; CUNHA JR. A.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; **Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58 (1), pp. 107-112, 2006.
7. SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B.; **Medicinal plants and their bioactive constituents: A scientific review of bioactivity and potential benefits in the anxiety disorders in animal models.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (4), pp. 642-654, 2008.
8. DUARTE, F. S.; MARDER, M.; HOELLER, A. A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; DE LIMA, T. C. M.; **Anticonvulsant and anxiolytic-**

- like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: In vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology* 197 (3), pp. 351-360, 2008.
9. PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C.; MONACHE, F. D.; **Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*.** *Phytochemistry* 55 (7), pp. 819-822, 2000.
10. PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR., A.; PEREIRA, W. S.; DELLE MONACHE, F.; **A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae).** *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (6), pp. 603-606, 2004.
11. DUARTE, F. S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; DE LIMA, T. C. M.; **Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86 (1), pp. 150-161, 2007.
12. CASTRO, V. **Psicobiologia do medo e da ansiedade.** 2006. Disponível em: <<http://fotolog.terra.com.br/neuroscience:37>> Acesso em: 4 nov. 2009.
13. PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; **Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species.** *Phytomedicine* 10 (5), pp. 422-426, 2003.
14. PIZZOLATTI, M. G.; MENDES, B. G.; CUNHA JR. A.; SOLDI, C.; KOGA, A. H.; EGER, I.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; **Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae).** *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (2), pp. 177-182, 2008.
15. DI STASI, L. C.; *Plantas medicinais: arte e ciência.* Editora Unesp, 1996, P. 125, 129-155.