

Cromatografia em contra-corrente de gotejamento na separação de substâncias fenólicas de *Neuropogon aurantiaco-ater*

Pozzebon, J. M.¹; Vilegas, W.¹; Honda N. K.²

¹Departamento de Química Orgânica, UNESP, C.P. 355, 14800-900 - Araraquara -SP - Brasil, ²Departamento de Química - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, C.P. 549, 79070-900 - Campo Grande - MS - Brasil.

RESUMO: Este trabalho relata a separação de compostos fenólicos presentes no extrato metanólico dos talos de *Neuropogon aurantiaco-ater* (Usneaceae). O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em contra-corrente de gotejamento usando mistura de solventes de alta polaridade (clorofórmio:metanol:água 43:37:20, modo ascendente). A cromatografia resultou na separação dos ácidos úsnico e protocetrário, que foram identificados por CCD, CLAE e RMN.

Palavras-chave : Cromatografia, distribuição contra-corrente, líquens, fenóis.

ABSTRACT: Droplet counter-current chromatography in the separation of phenolic substances from *Neuropogon aurantiaco-ater*. This work reports the separation of phenolic compounds present in the metabolic extract of the lichen *Neuropogon aurantiaco-ater* (Usniaceae). The crude extract was fractionated by droplet counter-current chromatography using a solvent mixture of high polarity (chloroform:methanol:water at 43:37:20, in ascending mode). The separation resulted in the isolation of usnic and protocetratic acid, which were identified by TLC, HPLC, and NMR tests.

Key words: Chromatography, countercurrent distribution, lichens, phenols.

INTRODUÇÃO

Substâncias líquênicas são consideradas aquelas produzidas através do metabolismo secundário de líquens. São ácidos alifáticos, meta- e para-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Alguns desses compostos são produzidos por fungos e por plantas superiores, mas a maior parte é exclusiva de líquens (Elix, 1996; Honda & Vilegas, 1998).

Vários foram os estudos sistemáticos das substâncias químicas obtidas do metabolismo secundário de líquens, resultando em compilações de trabalhos contendo estruturas elucidadas de numerosos compostos, suas sínteses, métodos de microcristalização, isolamento e purificação (Zopf, 1907; Hesse, 1912; Asahina & Shibata, 1954). Estas substâncias possuem várias atividades biológicas, como por exemplo antibiótica (Shibata & Miura, 1948), antitumoral (Lima *et al.*, 1991), analgésica e antipirética (Okuyama *et al.*, 1995) e alelopática (Nishitoba *et al.*, 1987).

Uma das técnicas mais empregadas para a identificação de substâncias líquênicas é a cromatografia. A cromatografia em papel foi a primeira a ser utilizada para a detecção e

identificação de substâncias líquênicas (Wachtmeister, 1952; Mitsuno, 1953), sendo que a cromatografia em camada fina tem sido mais usada pela sua aplicabilidade e por ser uma técnica sensível, rápida e simples (Culberson & Kristinsson, 1970; Culberson, 1972; Culberson & Johnson, 1976; Culberson *et al.*, 1981; Huneck, 1968; Santesson, 1967). Devido à maior resolução, a cromatografia em camada delgada de alta performance é também utilizada para detectar com mais precisão as substâncias presentes em extratos líquênicos (Arup *et al.*, 1993).

A cromatografia gasosa é limitada para análise de extratos líquênicos devido à baixa volatilidade e labilidade térmica dos compostos (Honda & Vilegas, 1998). Por outro lado, pelo fato de que as substâncias líquênicas são, em sua maioria, de média e alta polaridade, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa tornou-se uma ferramenta ideal para separação e identificação de substâncias líquênicas.

A separação em escala preparativa de compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos de líquens muitas vezes torna-se uma tarefa difícil. Alguns compostos dos grupos dos depsídeos e os ácidos úsnicos são bastante solúveis em solventes como clorofórmio, enquanto que as depsidonas são de solubilidade limitada na maioria dos solventes. Misturas contendo ácidos úsnicos e depsídeos solúveis em solventes menos polares, podem ser

separadas por solubilidade diferencial. Devido à presença de grupos polares (-OH fenólico, -COOH, -CHO, -CH₂OH) nas estruturas da maioria dos compostos aromáticos obtidos de líquens, os métodos clássicos de separação por cromatografia de adsorção em coluna ou em camada fina preparativa não são adequados. Dessa forma, a cromatografia em contra-corrente de gotejamento (CCCG) apresenta-se como uma das técnicas alternativas para a separação de substâncias líquênicas por ser um método eficiente no fracionamento em escala preparativa de compostos polares. Embora seja aplicada em muitos fracionamentos de substâncias presentes em extratos de plantas superiores (Cardoso & Vilegas, 1999) e no isolamento de produtos naturais bioativos (Lee, 1989), não há até o momento citação na literatura sobre a separação de compostos líquênicos por CCCG.

Ao contrário dos métodos cromatográficos que envolvem o mecanismo de adsorção, na CCCG não existe o risco de adsorção irreversível, uma vez que a separação por CCCG é baseada em mecanismo de partição líquido-líquido, o que também evita a degradação dos compostos no suporte sólido. Além disso, vários gramas de amostra podem ser aplicados numa única injeção (Kubo *et al.*, 1988; Marston & Hostettmann, 1994).

Para avaliar a possibilidade de aplicação da CCCG na separação dos derivados fenólicos presentes em extratos obtidos de líquens, foi estudado o fracionamento dos componentes do extrato metanólico dos talos de *Neuropogon aurantiaco-ater*. A eficiência do processo de separação foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

MATERIAL E MÉTODO

Amostragem

O líquen *Neuropogon aurantiaco-ater* (Jack.) Lamb. (Usneaceae) foi coletado na área da Baía do Almirantado, localizada na Ilha Rei George, Arquipélago da Shetland do Sul, Península Antártica. A amostra foi coletada sobre rochas em diversos pontos ao lado da Baía do Almirantado, pela Prof^a. Rosalinda Carmela Montone do Instituto Oceanográfico da USP-SP durante a expedição à Antártica no período de dezembro/93 à fevereiro/94. O armazenamento das amostra foi feito em refrigerador à temperatura de 4°C. A identificação do líquen foi realizada pelo Prof. Dr. Marcelo P. Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo.

Obtenção e Preparo de amostras

O material botânico foi seco em estufa por dois dias a 60°C. Em seguida foram separadas em duas partes: apotécio e talo. Os estudos foram realizados com o talo do líquen, o qual foi triturado em liquidificador, obtendo-se 15g da amostra. Foram feitas sucessivas extrações em aparelho de Soxhlet por 8 h com 200 mL dos solventes clorofórmio, acetona e metanol, sucessivamente. Em seguida, os extratos foram evaporados em rota-evaporador a vácuo, fornecendo 125 mg, 80 mg e 350 mg de cada um dos extratos, respectivamente.

Cromatografia em contra-corrente por gotejamento (CCCG)

A separação das substâncias presentes no extrato metanólico dos talos de *Neuropogon aurantiaco-ater* foi realizada em um cromatógrafo modelo DCC 300, Tokyo Rikakikai com 150 colunas (400 x 2 mm i.d.) conectadas em séries. O extrato metanólico (350 mg) foi dissolvido em 10mL de uma mistura de fases móvel e estacionária, e injetado com uma seringa Hamilton dentro do "loop" do equipamento de CCCG. O sistema usado foi clorofórmio:metanol:água (43:37:20), no modo ascendente, com fluxo de 9mL min⁻¹, tendo sido coletadas 93 frações de 9 mL cada. As frações coletadas foram avaliadas por CCD e aquelas que apresentaram a mesma performance foram reunidas e posteriormente analisadas por CLAE.

Análise por CCD

Os extratos obtidos dos talos foram cromatografados juntamente com padrões dos ácidos úsnico e protocetrárico em camada delgada de sílica gel (tolueno:acetato de etila: ácido acético glacial 6:4:1 v/v/v). Para a revelação foi usada mistura de metanol/ácido sulfúrico a 10% ou anisaldeído, seguidos de aquecimento em estufa a 110°C.

Análise por CLAE

Os extratos dos talos foram analisados também por CLAE - SHIMADZU LC-10-AD com coluna Supelcosil C18 (2,5cm x 4,6mm) e partícula de 5 µm e detector foto-diodo SPDM-10 na faixa de 200-400 nm; sistema de solvente MeOH:H₂O (80:20, v/v) e vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Análise por RMN

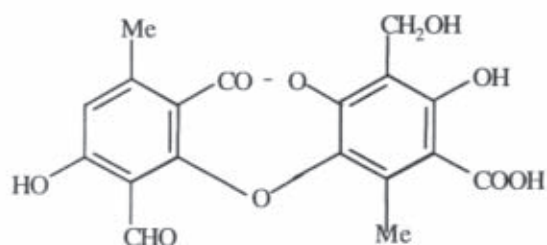
Os espectros de RMN ¹H e de ¹³C foram obtidos em um Espectrômetro Bruker AC 200F operando a 4,7 T originando frequências de 200 MHz

para o próton e de 50 MHz para ^{13}C . Os solventes usados foram CDCl_3 , DMSO-d_6 ou acetona- d_6 e os deslocamentos químicos foram registrados em valores de δ (ppm).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Do fracionamento dos talos de *Neuropogon aurantiaco-ater* por CCCG foram obtidas duas substâncias, de diferentes classes químicas: o ácido protocetrário **1**, que é uma depsidona, e o ácido úsnico **2**, que é um dibenzofurano (Figura 1). A presença dessas substâncias foi constatada através dos dados espectrais de RMN ^1H das frações e

comparação com dados da literatura para os compostos **1** e **2** (Huneck & Yoshimura, 1996). Além disso, as frações obtidas foram analisadas por CCD e CLAE com a utilização de padrões para confirmação de suas identidades e verificação de suas purezas. Os R_f 's e tempos de retenção confirmaram a identidade das substâncias **1** e **2**, mostrando que ambas foram isoladas com grau de pureza maior do que 80% e 50%, respectivamente. As impurezas consistiam em material de natureza alifática, observadas através do pico em 1,2 ppm no espectro de RMN ^1H , e que não foram completamente identificadas.



Ácido protocetrário

FIGURA 1- Compostos isolados e identificados do talo de *Neuropogon aurantiaco-ater*

As duas substâncias foram eluídas do CCCG com grandes diferenças em seus volumes de retenção, de 4,22 mL para **1** (Frações 1- 12) e 11,06 mL para **2** (Frações 60 - 93). A eluição dos compostos reflete, além da solubilidade da molécula na fase móvel, sua polaridade. Os resultados obtidos mostram que, com o sistema utilizado, HCCl_3 : MeOH : H_2O (43:37:20) no modo ascendente, a eluição ocorre em ordem crescente de polaridade, indo do composto menos polar, o dibenzofurano **1**, ao mais polar, a depsidona **2**.

Com relação à quantidade, foram obtidos 180 mg de **1** e 35 mg de **2**, representando cerca de 51% e 10% de recuperação, respectivamente, em relação ao extrato bruto injetado no sistema.

Estes resultados evidenciam o grande potencial da CCCG para a separação em escala preparativa de compostos liquênicos. Assim, o uso de CCCG mostra-se como mais uma alternativa à resolução dos problemas encontrados no fracionamento de substâncias liquênicas.

AGRADECIMENTO

A Capes e a Fapesp pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARUP,U., EKMAN,S., LINDBLOM,L., MATTESSON, J. E. High performance thin layer chromatography (HPTLC), na improved technique for screening lichen substances. *Lichenologist*, v.25, p. 61-71, 1993.
- ASAHINA,Y., SHIBATA,S. *Chemistry of Lichen Substances*. Tokyo: Japan Society from the Promotion of Science, 1954.
- CARDOSO,C.A.L., VILEGAS,W. Droplet counter-current chromatography of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. *Phytochemical Analysis*, v.10, p. 60-3, 1999.
- CULBERSON,C.F., KRISTINSSON,H. A standardized method for the identification of lichen products. *Journal of Chromatography*, v.46, p. 85-93, 1970.
- CULBERSON,C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography*, v.72, p.113-25, 1972.
- CULBERSON,C.F., JOHNSON, A. A standardized two-dimensional thin-layer chromatographic method for lichen products. *Journal of Chromatography*, v.128, p. 253-9, 1976.
- CULBERSON,C.F., CULBERSON,W.L., JOHNSON, A. A standardized TLC analysis of b-orcinol depsidones. *Bryologist*, v.84, p.16-29, 1981.

- ELIX, J.A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH, T.H. (Ed.) **Lichen Biology**. Cambridge: University Press, 1996. p.154.
- HESSE, O. Flechtenstoffe. In: ABDERHALDEN, E. **Biochemisches Handlexikon**. Berlin: Springer, 1912.
- HONDA, N.K., VILEGAS, W. A Química dos líquens. **Química Nova**, v.21, p.110-25, 1998.
- HUNECK, S. Lichen substances. In: REINHOLD, L., LIWSCHITZ, Y. (Orgs.) **Progress in Phytochemistry**. London: Interscience, 1968. p. 223.
- HUNECK, S., YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. Berlin: Springer, 1996.
- KUBO, I., HANKE, F.J., MARSHALL, G.T. Droplet countercurrent chromatography: recent applications in natural products chemistry. **Journal of Liquid Chromatography**, v.11, p.173-89, 1988.
- LEE, Y.W., FANG, Q.C., ITO, Y., COOK, C.E. The application of true countercurrent chromatography in the isolation of bioactive natural products. **Journal of Natural Products**, v.52, n.4, p.706-10, 1989.
- LIMA, M.R.C., NASCIMENTO, S., PEREIRA, E.C., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. **Boletim da Sociedade de Botânica**, v.63, n.24 p.339-48, 1991.
- MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool applications and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v.658, p.315-41, 1994.
- ITSUNO, M. Paper chromatography of lichen substances. **Japanese Pharmaceutical Bulletin**, v.1, p.170, 1953.
- NISHITOBA, Y., NISHIMURA, H., NISHIYAMA, T., MIZUTANI, J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, v. 26, n.12, p.3181-5, 1987.
- OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., HINOSHITA, Y., YAMAMOTO, Y. Usnic and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. **Planta Medica**, v.61 p.113-5, 1995.
- SANTESSON, J. Chemical studies on lichens. 4. Thin layer chromatography of lichen substances. **Acta Chemica Scandinavica**, v.21, p.1162-72, 1967.
- SHIBATA, S., MIURA, Y. Antibacterial effects of lichen substances. I. Comparative studies of various lichen substances. **Japanese Medical Journal**, v.1, p.518, 1948.
- WACHTMEISTER, C.A. Formation of a tetracyclic furan derivate from usnic acid and diazomethane. **Acta Chemica Scandinavica**, v.6, p.818-25, 1952.
- ZOPF, W. **Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung**. Jena: G. Fischer, 1907.