

Ivo J. C. Vieira, Luciano M. Lião, Eudes da S. Velozo, Valmir David, Paulo C. Vieira, M. Fátima G. F. da Silva, João B. Fernandes e Edson Rodrigues Fo.

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - CP 676 - 13565-905 - São Carlos - SP

Recebido em 9/3/95; aceito em 16/8/95

ISOLATION OF NATURAL PRODUCTS BY DROPLET COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY. Droplet countercurrent chromatography has shown to be a useful technique in the isolation of natural products mostly the polar ones. In this paper however, we discuss the use of this technique in the isolation of non polar compounds from crude extract of plants belonging to the families Sapotaceae, Rutaceae, Simaroubaceae and Hippocrateaceae.

Keywords: droplet countercurrent chromatography; isolation methods; triterpenoids; alkaloids; anthraquinones.

INTRODUÇÃO

A cromatografia de gotas em contracorrente (CGCC) foi descrita pela primeira vez por Tanimura em 1970¹. O método é fundamentado no coeficiente de distribuição de solutos em duas fases imiscíveis e em contato íntimo ($K_d = Ca/Cb$, onde K_d = coeficiente de distribuição; Ca e Cb são as concentrações de um dado soluto nas fases a e b respectivamente). A técnica CGCC, consiste na passagem de gotas de um líquido através de outro imiscível. Este movimento leva à distribuição dos constituintes de uma mistura em ambas as fases. Um instrumento simples e frequentemente usado para separações via CGCC é mostrado esquematicamente na figura 1, onde a fase móvel pode ser introduzida no modo ascendente ou descendente, conforme sua densidade em relação à fase estacionária.

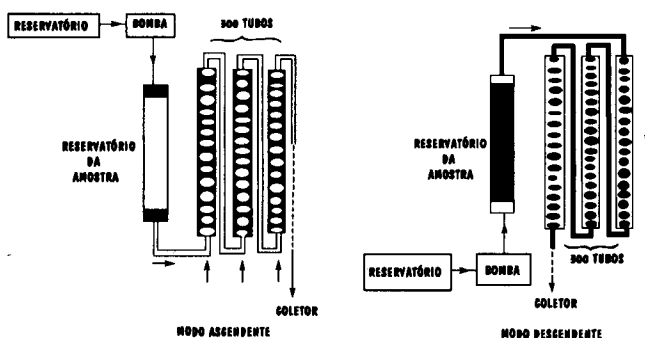


Figura 1. Esquema geral de um aparelho para CGCC, mostrando os dois possíveis modos de eluição: ascendente e descendente (adaptado a partir da ref. 3).

A formação de gotas, fundamental para CGCC, depende dos seguintes fatores: diferença entre as densidades das duas fases líquidas, viscosidade dos solventes, tensão interfacial, fluxo da fase móvel e diâmetro interno das colunas. Os eluentes normalmente utilizados em CGCC, devem ser compostos de um sistema binário, com grande diferença de polaridade e de densidade e ainda solventes auxiliares com polaridades intermediárias. A polaridade das substâncias a serem isoladas determina o tipo de sistema de solventes a ser utilizado. Uma lista de solventes otimizados para classes específicas de produtos naturais, publicada por Hostettman et alii², tem sido de grande auxílio na escolha de fases para CGCC. A otimização do sistema de eluentes e a escolha do modo de eluição (ascendente ou descendente) é feita com base em cromatografia de camada

delgada, utilizando-se a fase orgânica como eluente (caso $R_f > 0,5$ usa-se como fase móvel a orgânica; caso $R_f < 0,5$ a fase móvel será a aquosa)^{2,3}.

Esta técnica tem se mostrado eficiente para a separação de produtos naturais polares (solúveis em meio hidroalcoólico), em escala preparativa⁴⁻⁶, principalmente por evitar os problemas de adsorção irreversível que se observam na cromatografia em sílica gel, levando a considerável perda de massa.

Algumas das vantagens associadas ao uso de CGCC, estão na facilidade de operação, no pequeno volume e baixo custo dos solventes utilizados, na possibilidade de injeção de extratos brutos em quantidades relativamente grandes (4,0 - 6,0 g), e principalmente na recuperação completa do material injetado. Além disso, obtém-se muito boa resolução na separação quando cuidadosamente utilizada. Um exemplo de aplicação da técnica foi a separação de forbóis epiméricos de uma espécie de *Croton*⁷.

Apesar de sua relativa popularidade como técnica de separação de substâncias polares, seu uso para a separação de apolares é ainda bastante restrito. Os solventes ideais para o isolamento de substâncias apolares por CGCC são baseados em sistemas não-aquosos. No entanto, esses sistemas empregam na sua maioria, solventes pouco comuns e muitas vezes inadequados para detecção e recuperação do soluto (ex.: CH_3NO_2 , CH_2ClCH_2Cl). Recentemente, iniciamos o emprego de CGCC para a análise de extratos lipofílicos conseguindo com sucesso o fracionamento de triterpenos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae), bem como o isolamento de um alcalóide de *Almeidea lilacina* St. Hil. (Rutaceae), antraquinonas de *Picramnia glazioviana* Engl. (Simaroubaceae), triterpenos tirucalanos e um alcalóide cantinônico de *Simaba cedron* Planchon (Simaroubaceae) e triterpenos quinona-metídeos de *Salacia campestris* Walp. (Hippocrateaceae).

PARTE EXPERIMENTAL

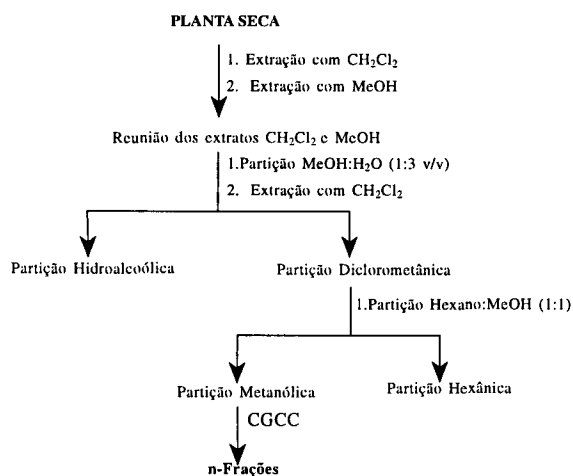
1. Gerais

A CGCC foi efetuada em um cromatógrafo TOKYO RIKAKIKAI CO., equipado com 300 colunas de vidro (3,4 X 400,0 mm) conectadas através de tubos de teflon. Os solventes utilizados foram solventes de grau P.A. ou comerciais, tratados no D.Q. - UFSCar.

2. Obtenção e pré-purificação dos extratos brutos

O material botânico foi seco em estufa de circulação de ar por três dias a 30° e moído em moinho tipo Willey. Foram

feitas sucessivas extrações com CH_2Cl_2 e MeOH para *P. glazioviana* e *S. cedron*, e hexano, CH_2Cl_2 e MeOH para *S. campestris*, *A. lilacina* e *P. torta*. Os extratos obtidos das três primeiras plantas foram trabalhados conforme o esquema 1. De *A. lilacina* e *P. torta*, foram injetados no cromatógrafo para CGCC os extratos brutos, diclorometânico e hexânico respectivamente.



Esquema 1. Partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis.

3. Separações por CGCC

O sistema de solventes utilizado nas análises foi Hex: AcOEt:MeOH:H₂O (5:2:4:1 v/v), sendo a fase aquosa desta mistura a estacionária e a fase orgânica a móvel ou, no caso de *P. torta*, Hex:CH₂Cl₂:CH₃CN (10:3:7 v/v) onde a fase superior foi a móvel do sistema. O modo de eluição foi portanto ascendente em todos os casos. As amostras foram dissolvidas em uma mistura (1:1 v/v) das fases móvel e estacionária, filtradas e injetadas em um reservatório com capacidade de 25 mL.

3.1. Análise de *Almeidea lilacina*

O extrato bruto diclorometânico de *A. lilacina* (3,2 g), foi injetado no cromatógrafo e eluído com um fluxo de 0,8 mL/min. A fase estacionária, contendo pigmentos clorofílicos, foi recuperada e submetida a cromatografia em Sephadex LH-20 eluída com metanol, de onde se isolou na forma pura o alcalóide **1** (29,0 mg)⁸.

3.2. Análise de *Simaba cedron*

Para o isolamento dos constituintes químicos de *S. cedron*, foram injetados 4,9 g da partição hexânica do caule (Esquema 1). Após a coleta de 98 frações (15 mL, 0,7 mL/min) e análise por c.c.d., isolou-se dois triterpenos (**2** e **3**)¹¹ na forma pura. Um alcalóide cantinônico (**4**)¹² ficou retido na fase estacionária e foi purificado por evaporação do solvente e recristalização.

3.3. Análise de *Picramnia glazioviana*

A partição metanólica (1,5 g, Esquema 1) de *P. glazioviana*, forneceu, após eluição completa, um total de 126 frações (15 mL cada) com fluxo de 0,7 mL/min. Estas frações foram monitoradas por c.c.d., e reunidas em 10 novas frações fornecendo duas antraquinonas puras (**5** e **6**). Ainda ficou retida na fase estacionária uma mistura composta de duas outras antraquinonas (**7** e **8**)¹⁰, posteriormente separadas por CLAE.

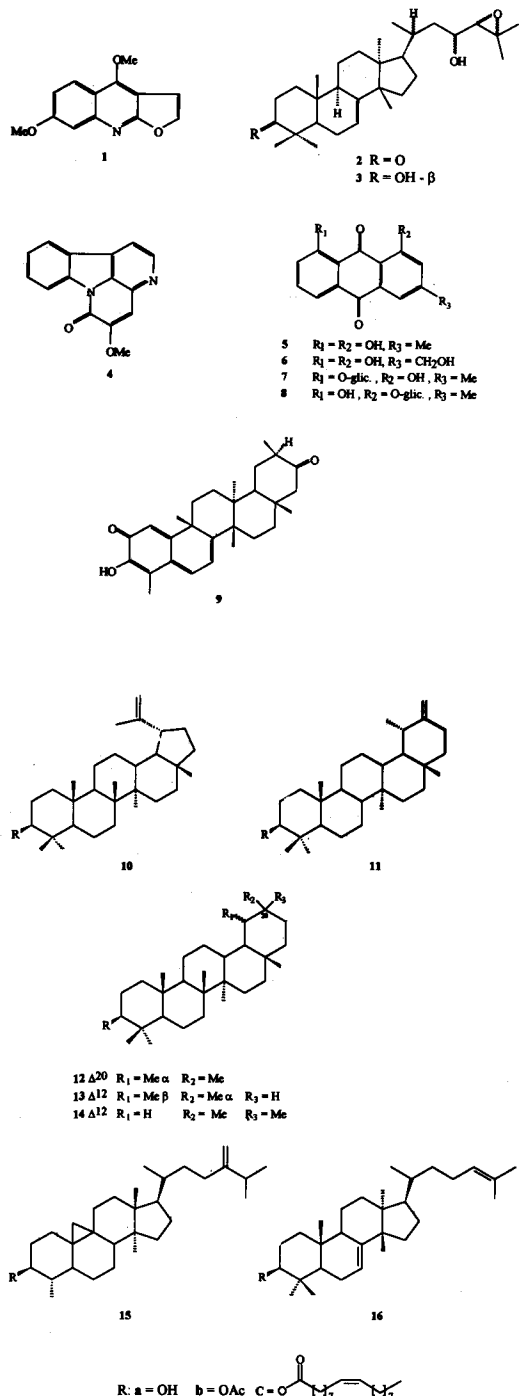
3.4. Análise de *Salacia campestris*

A partição metanólica das raízes (4,2 g, Esquema 1) de *S. campestris*, foi submetida a CGCC coletando-se 250 frações

(12 mL, 0,6 mL/min). Análise por c.c.d. permitiu a reunião dessas frações em 18 novas, das quais a 12 foi identificada como tingemona (**9**)¹³.

3.5. Análise de *Pouteria torta*

Injetou-se 1,5 g do extrato hexânico do caule de *P. torta* no cromatógrafo e eluiu-se com um fluxo da fase móvel de 1 mL/min. Obteve-se 75 frações de 13 mL, que foram analisadas por c.c.d., RMN¹H e ¹³C. As frações 2-7 foram caracterizadas como triterpenos esterificados por ácidos graxos de cadeia longa (**10c-16c**) e as frações 12-21 como acetatos de triterpenos pentacíclicos (**10b-16b**). As frações mais polares (>40), continham os alcóois triterpênicos livres (**10a-14a**, **16a**) juntamente com outros compostos não caracterizados⁹.



DISCUSSÃO

A literatura referente ao uso de cromatografia de gotas em contracorrente, apresenta numerosas citações sobre sua utilização na separação de substâncias polares, principalmente glicosiladas. Os resultados relatados demonstram que a mesma se aplica com sucesso também para algumas classes de produtos naturais apolares. O emprego de fases móveis contendo hexano como um dos solventes, levou a resultados interessantes, pois mesmo partindo de extratos brutos, as substâncias obtidas apresentaram um alto grau de pureza, o que foi comprovado por CLAE e RMN.

O uso do sistema não-aquoso Hex:CH₃CN:CH₂Cl₂ (ascendente) na separação dos triterpenos esterificados de *Pouteria torta* mostrou a eficiência da CGCC em relação à cromatografia em coluna de sílica gel. Na CGCC, os triterpenos esterificados por ácidos graxos (frações 2-7) foram separados dos esterificados por acetato com uma grande diferença de tempo de retenção (frações 12-21). Além disso, houve um fracionamento nítido dos próprios triterpenos esterificados por acetato. As frações 12-21 foram analisadas por RMN, de onde se concluiu que as frações iniciais desse grupo eram constituídas basicamente de acetatos de cicloartano (**15b**), α -amirina (**13b**) e lanostan-7,24-dieno (**16b**) e as frações finais deste grupo foram enriquecidas em acetato de lupeol (**10b**) e apresentaram como compostos minoritários os acetatos de taraxasterol (**11b**) e pseudo-taraxasterol (**12b**). Os triterpenos álcoois foram detectados juntamente com outros compostos não identificados nas frações acima de 55. Esse mesmo extrato, submetido a cromatografia em coluna Lobar (sílica 60; 40-63 μ m), levou a uma separação por tipo de funcionalização no carbono C-3 dos triterpenos, porém o fracionamento de triterpenos com a mesma funcionalização em C-3 não foi tão eficaz quanto por CGCC.

Produtos naturais contendo a função epóxido quase sempre são isolados na forma de dióis quando utilizadas técnicas de cromatografia com fases estacionárias sólidas ácidas (sílica gel e alumina). No entanto, pôde-se isolar os triterpenos epóxidos **2** e **3** estruturalmente intactos de *Simaba cedron* por CGCC utilizando solventes aquosos, porém com fase orgânica baseada em hexano.

Finalmente, podemos concluir que CGCC é um método para separações preparativas muito eficiente em estudos fitoquímicos, levando ao isolamento de substâncias de diferentes classes estruturais, e variadas polaridades. Além disso, o uso de CGCC

conjugada a outras técnicas de separação como CLAE ou colunas de Sephadex, mostra-se como um grande trunfo para os desafios de separações que os químicos de produtos naturais enfrentam frequentemente.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPESP e à FINEP pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Tanimura, T.; Pisano, J. J.; Ito Y.; Bowman, R. L.; *Science* **1970**, *169*, 54.
2. Hostettman, K.; Hostettman, M.; Martson, A.; *Preparative Chromathography techniques. Application in Natural Products Isolation*, Springer-Verlag; Berlin, 1986, p.80.
3. Martson, A; Hostettman, K.; *Nat. Prod. Reports* **1991**, 391.
4. Kubo, I.; Matsumoto, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 687.
5. Kubo, I.; *J. Chromatogr.* **1991**, *538*, 187.
6. Kubo, I.; Hanke, F. J.; Marshall, G. T.; *J. Liq. Chromatog.* **1988**, *11*, 173.
7. Marshall, G. T.; Kinghorn, A. D.; *J. Chromatogr.* **1981**, *206*, 421.
8. Moulis, C.; Wirasutisna, K. R.; Gleye, J.; Loiseau, P.; Stanislas, E.; Moretti, C.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2095.
9. David, V.; Aplicação de Técnicas Cromatográficas na Separação e Determinação de Triterpenos e Hidrocarbonetos Presentes nas Flores, Frutos e Xilopódio de *Pouteria torta*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, (1993).
10. Kubo, I.; Murai, Y.; Iwang, S.; Soediro, S.; Soelaksono, S.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1063.
11. Gray, A. I.; Brandari, P.; Waterman, P. G.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1805.
12. Ohmoto, T.; Koike, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1204.
13. Gunatilaka, A. A. L.; Fernando, H. C.; Kikuch, T.; Tezuka, Y.; *Mag. Res. in Chem.* **1989**, *27*, 803.

Publicação financiada pela FAPESP