

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPOSTA DE SEPARAÇÃO RACÊMICA  
DO 8-HIDROXIMETIL-7,10-DIOXANOCUMARINA

**LARISSA FERREIRA MANHÃES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

DEZEMBRO – 2016

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPOSTA DE SEPARAÇÃO RACÊMICA DO 8-  
HIDROXIMETIL-7,10-DIOXANOCUMARINA

**LARISSA FERREIRA MANHÃES**

Monografia apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologia da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título  
de Licenciatura em Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

DEZEMBRO – 2016

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPOSTA DE SEPARAÇÃO RACÊMICA DO 8-HIDROXIMETIL-7,10-DIOXANOCUMARINA

**LARISSA FERREIRA MANHÃES**

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciatura em Química.”

Aprovada em Dezembro de 2016.

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>o</sup>: Diego Rangel Cardoso Silva (D. Sc., Ciências Naturais) - UENF

---

Prof<sup>o</sup>: Marco Antônio Guimarães Barbosa Gomes (D. Sc., Ciências Naturais) - UENF

---

Prof<sup>o</sup>: Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D. Sc., Química Orgânica) – UENF  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, persistência, saúde e sabedoria para chegar até aqui.

Aos meus pais por todo amor, dedicação e apoio nessa jornada.

Ao meu irmão Vinícius pelo carinho, amizade e caronas dadas até a UENF.

Ao meu orientador, Rodrigo de Oliveira, pela orientação, não só profissional, e todo conhecimento partilhado.

Ao Diego , pelos conhecimentos partilhados e amizade.

Aos amigos de laboratório, Adriana Lima, Amaro Ramos, Ana Livia Pepe, Carol Ramos, Isabela Pereira, Luana Batista, Marcelo, Queitilane pelo convívio agradável, pelas trocas de conhecimento e todo apoio físico e emocional.

Aos colegas de turma da UENF pelo incentivo e apoio mútuo nas aulas e atividades do curso de licenciatura em química.

Aos amigos da Universidade de Coimbra que se tornaram uma família após 2 anos de muito estudo, sofrimentos e alegrias.

Aos amigos que acompanharam todo meu esforço durante esse período de graduação aguentando meus longos dias de mau humor.

Aos professores, pelo conhecimento compartilhado e incentivo para chegar até aqui.

A Capes , por ter sido a instituição de fomento dessa pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que atingisse esse objetivo.

## RESUMO

MANHÃES, Larissa Ferreira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro, 2016. Síntese, caracterização e proposta de separação racêmica do 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina. Prof. Orientador: Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

A indicumina é um cumarinolignoide, substância rara encontrada na natureza, formada por acoplamento oxidativo entre uma cumarina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) e um derivado aril propanoide (álcool coniférico). Sua estrutura é caracterizada pela presença da hidroxila terminal que proporciona a funcionalização do seu esqueleto básico. Além das indicuminas, as cleomiscosinas, malloapelininas e aquilochinas apresentam essas características e são encontradas em poucas espécies vegetais como: *Cleome viscosa*, *Mallotus apelta*, *Rhododendron collettianum* e *Solanum indicum* L. Relatos da literatura para essa classe mostram que essas substâncias possuem atividade hepatoprotetora, imunomoduladora, e anticancerígena. Nas últimas pesquisas realizadas com o extrato da semente de *S. indicum* foram identificadas quatro novas indicuminas, que exibiram uma importante atividade anti-hepatite B. A busca de novas substâncias antivirais e antibacterinas motivou a elaboração de uma rota sintética para obtenção de um precursor da cumarinolignoide, o 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina que foi sintetizado a partir da 7,8-dihidroxicumarina. Testes preliminares de formação do anel dioxano no o-catecol funcionaram muito bem e apresentou um ótimo rendimento, o que motivou o acoplamento dessa estrutura a cumarina. A cumarina, utilizada nessa rota sintética, foi sintetizada a partir do 1,2,3-benzenotriol com o uso de ácido propiônico como reagente, em meio catalisado por  $ZnCl_2$ . A 7,8-dihidroxicumarina obtida foi submetida à reação com a epícloridrina em piridina e o produto reacional foi analisado pelas técnicas espectroscópicas de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , além da espectrometria de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. A análise dos dados espectrais mostra a formação de dois isômeros de posição devido a assimetria da cumarina e, cada isômero possui o seu correspondente enantiomérico. O estudo sobre colunas quirais mostrou que a CLAE-FEQ Chiracel OD<sup>®</sup> será uma alternativa

para a separação de isômeros quirais além de isômeros com semelhanças estruturais com 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina.

Palavras-chave: síntese orgânica de produtos naturais, cumarinolignoide, cumarinas.

## ABSTRACT

MANHÃES, Larissa Ferreira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. December, 2016. Synthesis, characterization and proposed racemic separation of 8-hydroxymethyl-7,10-dioxanocoumarin. Supervisor: Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

Indicumine is a coumarinolignoid, a rare substance found in nature, formed by oxidative coupling between a coumarin (7,8-dihydroxy-6-methoxycoumarin) and an aryl propanoid derivative (coniferous alcohol). The structure is characterized by the presence of the terminal hydroxyl that provides the functionalization of its basic skeleton. Besides the indicuminas, cleomiscosinas, malloapelinas and ellochinas present these characteristics and are found in few vegetal species as *Cleome viscosa*, *Mallotus apelta*, *Rhododendron collettianum* and *Solanum indicum* L. Reports of the literature for this class show that these substances have hepatoprotective, immunomodulatory activity, and anticancer. In the last research performed with the *S. indicum* seed extract, four new indicumines were identified, which exhibited an important anti-hepatitis B activity. The search for new antiviral and antibacterial substances motivated the elaboration of a synthetic route to obtain a precursor of 8-hydroxymethyl-7,10-dioxanocoumarin, which was synthesized from 7,8-dihydroxycoumarin. The preliminary tests for the formation of the dioxane ring in *o*-catechol worked very well and had an excellent yield, which motivated coupling the coumarin with this structure. The coumarin, used in this synthetic route, was synthesized from 1,2,3-benzotriol with propiolic acid as a reagent in presence of  $ZnCl_2$  as catalyzed. The 7,8-dihydroxycoumarin had reacted with epichlorohydrin in pyridine and the product of the reaction was analyzed by  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectroscopic techniques, in addition to the gas chromatography spectrometry coupled to the mass spectrometer. Analysis of the spectral data shows the formation of two position isomers due to coumarin asymmetry and each isomer has its relative enantiomeric. The study about chiral column showed that chiral-HPLC Chiracel-OD<sup>®</sup> will be an alternative for the separation of chiral isomers, in addition to isomers with structural similarities with 8-hydroxymethyl-7,10-dioxanocoumarin.

Key words: organic synthesis of natural products, coumarinolignoids, coumarins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esqueleto básico das benzo- $\alpha$ -pirona e benzo- $\delta$ -pironas .....	15
<b>Figura 2:</b> Mecanismo das reações de formação de cumarinas com $\beta$ -cetoésteres .	15
<b>Figura 3:</b> Mecanismo das reações de formação de cumarinas com $\beta$ -cetoésteres..	16
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de reação do fenol utilizando propiolato de etila e cloreto de zinco para formação da cumarina. ....	16
<b>Figura 5:</b> Rota biossintética da cumarina. ....	18
<b>Figura 6:</b> Estruturas das 7,8-dihidroxicumarina e 6,7-dihidroxicumarina. ....	19
<b>Figura 7:</b> Derivados benzodioxanos com atividade biológica relacionada à acetilcolina. ....	19
<b>Figura 8:</b> Cumarinas tri e tetraoxigenadas isoladas da <i>Pterocaulon purpurascens</i> ..	20
<b>Figura 9:</b> Estrutura das indicuminas identificadas. ....	21
<b>Figura 10:</b> Interação da fase estacionário quiral Chirocel OD com $\beta$ – bloqueadores. ....	24
<b>Figura 11:</b> Rota sintética da cumarina precursora. ....	27
<b>Figura 12:</b> Reação de condensação entre cumarina precursora e epiclorigrina.....	28
<b>Figura 13:</b> Ampliação do espectro de RMN 1H da 7,8-dihidroxicumarina utilizando o solvente MeOD. ....	30
<b>Figura 14:</b> Estrutura da 7,8-dihidroxicumarina .....	30
<b>Figura 15:</b> Mecanismo da reação de obtenção da 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina a partir da condensação 7,8-dihidroxicumarina com a epiclorigrina em meio básico. ....	31
<b>Figura 16:</b> Cromatograma obtido por CG-EM da reação de obtenção dos isômeros 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina. ....	31
<b>Figura 17:</b> Fragmentograma de massas dos isômeros B e A.....	32

<b>Figura 18:</b> Estrutura dos isômeros de posição 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina e seus respectivos nomes de acordo com IUPAC. ....	33
<b>Figura 19:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente CDCl <sub>3</sub> . ....	34
<b>Figura 20:</b> Mapa de correlação HSQC da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente CDCl <sub>3</sub> . ....	35
<b>Figura 21:</b> Mapa de correlação a longa distância HMBC da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente CDCl <sub>3</sub> . ....	35
<b>Figura 22:</b> Interação da 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina com Chiracel OD® ....	36

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Algumas colunas quirais derivados de carbamatos de polissacarídeos disponíveis no mercado .....23

**Tabela 2:** Correlação entre os deslocamentos químicos entre os átomos.....33

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\delta$	Deslocamento químico em partes por milhão
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG/MS	Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FEQ	Fase estacionária quiral
G	gramas
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum correlation”
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
kPa	Quilopascal
m/z	Relação massa/carga
MeOD	Metanol deuterado
Min	minutos
mL	mililitro
Nm	Nanômetros
Ppm	Partes por milhão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultravioleta

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. Síntese de cumarinas .....	15
1.2. Biossíntese de cumarinas .....	17
1.3. Atividade biológica das cumarinas.....	18
1.4. Separação de enantiômeros.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.2. Objetivos gerais.....	25
2.3. Objetivos específicos .....	25
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	26
<b>3.1 Materiais, vidrarias, reagentes, solventes e equipamentos</b> .....	26
3.1. MATERIAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE .....	26
3.1.1. Reagentes e solventes .....	26
3.1.2. Instrumentação .....	26
3.1.2.1 <u>Cromatografia gasosa</u> .....	26
3.1.2.2 <u>Ressonância magnética nuclear (RMN)</u> .....	26
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.2.1. Síntese da cumarina precursora .....	27
3.2.2. Síntese da 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

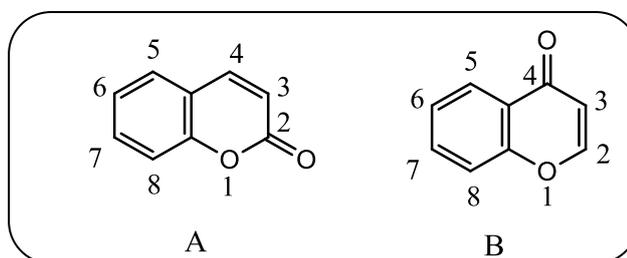
Os recursos naturais, principalmente plantas e fungos, produzem substâncias, oriundas do seu metabolismo especial, que desempenham um papel fisiológico e ecológico de grande importância para a sobrevivência desses organismos. Esses metabólitos são considerados como joias preciosas para a indústria farmacêutica por fazerem parte de inúmeros fármacos anticoagulantes, antibióticos, anti-hipertensivos e outros (CURIR, et al. 2007). Além de possuir atividades farmacológicas comprovadas, os produtos naturais vem sendo utilizado como modelo em diversas síntese, tendo como objetivo gerar produtos mais ativos e com baixa toxicidade. O potencial dos produtos naturais tem sido reconhecido desde a antiguidade, proveniente da cultura dos povos primitivos (SOUZA, 2005). A convivência com os mais diferentes grupos étnicos contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa e assim obteve-se a relação entre a estrutura química de um determinado substância e suas propriedades farmacológicas (VIEGAS, et al. 2006).

As plantas são capazes de sintetizar e acumular metabólitos especiais por possuir rotas enzimáticas responsáveis por converter o metabolismo primário, blocos estruturais para formação de diferentes classes de substâncias, em substâncias funcionalizadas e, conseqüentemente, estocá-las em diferentes tecidos (DEWICK, 2004).

As substâncias fenólicas, por exemplo, possuem duas rotas biossintéticas distintas, a primeira é o resultado do acoplamento oxidativo de unidades de coenzima-A acetilada e a segunda que passa por um processo de condensação entre o 4- fosfato de eritrose e o fosfoenolpiruvato (DEWICK, 2004). Essas substâncias, pertencentes a diferentes classes do metabolismo especial, resultantes de processos evolutivos, estão localizadas em diferentes órgãos e tecidos vegetais e desempenham papel de fotoproteção, de defesa frente aos ataques de microrganismos, insetos e outros animais e de interação biológica entre espécies. Além das funções biológicas para o vegetal, substâncias contendo porções fenólicas são importantes para a dieta humana por prevenir e combater diversas doenças relacionada a geração de radicais livres (DOMINGO, 2003).

As cumarinas são benzopironas de origem natural, com estrutura formada por um anel benzeno acoplado ao anel pirona. As benzopironas podem ser subdivididas

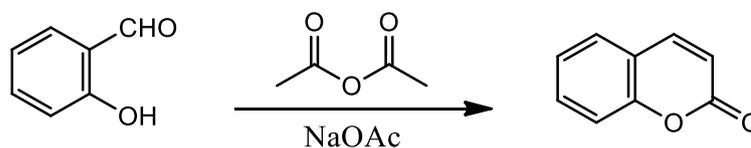
em benzo- $\alpha$ -pirona (A), na qual se encontra as cumarinas, e em benzo- $\delta$ -pironas (B) (Figura 1) (LACY & O'KENNEY, 2007).



**Figura 1:** Esqueleto básico das benzo- $\alpha$ -pirona e benzo- $\delta$ -pironas.

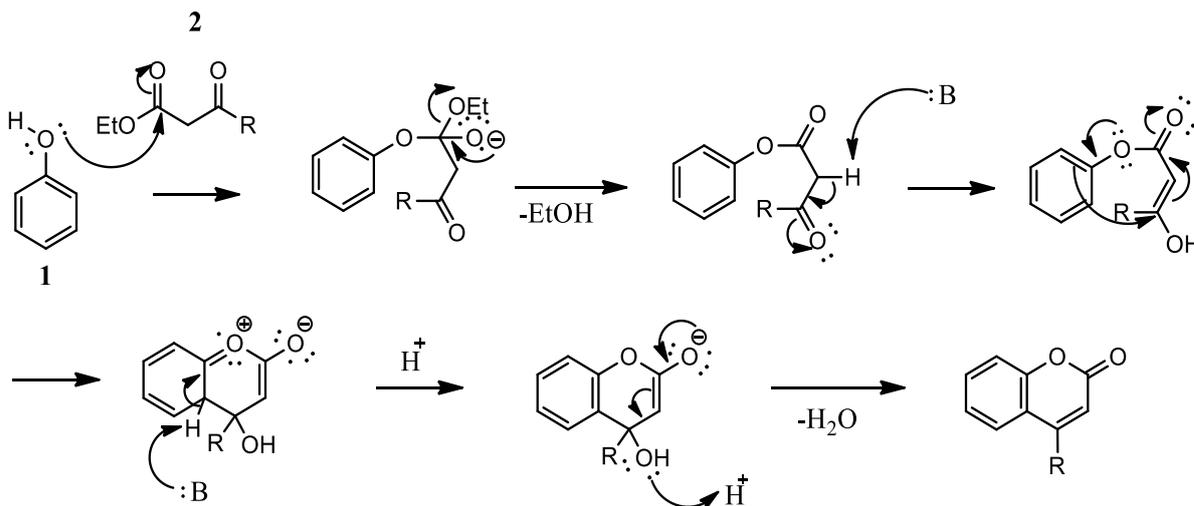
### 1.1. Síntese de cumarinas

As primeiras cumarinas foram isoladas de uma espécie de feijão em 1820, combinadas com glicose, que a primeira síntese dessa classe somente foi realizada em 1868, pelo químico inglês Sir William Henry Perkin, que consiste na condensação aldólica do orto-hydroxibenzaldeído e anidrido na presença de uma base (Esq. 1) (BORGES, et al. 2005)



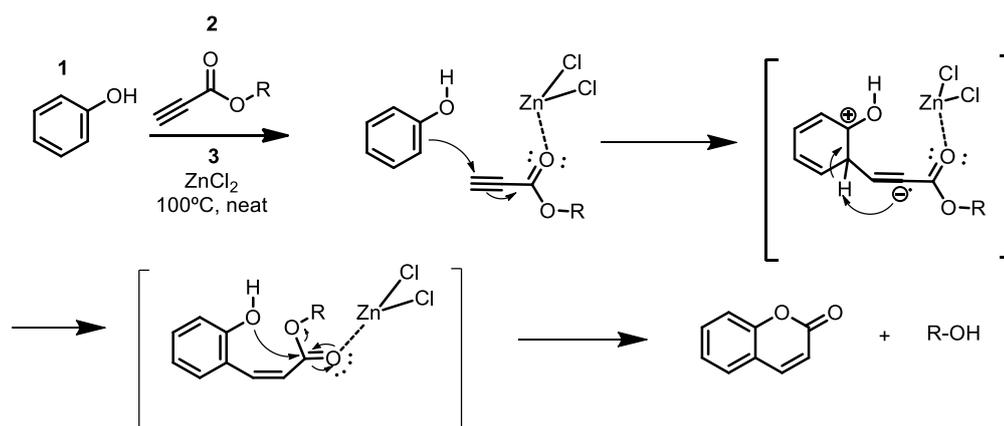
**Figura 2:** Esquema de reação geral da condensação de Perkin.

Essas substâncias também podem ser sintetizadas pelas reações de Pechman, utilizando  $\beta$ -cetoésteres e fenóis em um mecanismo catalisado por um ácido de Lewis (Figura 2). Nessa reação, o grupo nucleofílico hidroxila do fenol (1) ataca a carbonila referente ao grupo funcional éster do  $\beta$ -cetoésteres (2). Após esse ataque, o  $\beta$ -cetoésteres ligado a estrutura fenólica sofre um processo de enolização, seguido por uma ciclização e formação do anel pirano da cumarina (VIANNA, 2011).



**Figura 3:** Mecanismo das reações de formação de cumarinas com  $\beta$ -cetoésteres.

Outro mecanismo para obtenção da cumarina é uma variação da síntese de Pechman que substitui o  $\beta$ -cetoésteres pelo reagente propiolato de etila (2) com em presença do ácido de Lewis, cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) (3), por meio de uma substituição eletrofílica. Primeiramente, ocorre um ataque dos elétrons  $\pi$  do anel aromático ao carbono terminal do reagente (2), ativado pela presença do cloreto de zinco que se coordena com o oxigênio da carbonila desse reagente. Em seguida, ocorre a ciclização do anel lactona pelo ataque da hidroxila do anel do fenol (1), levando à formação da estrutura cumarínica (LEÃO, et al. 2011). O esquema abaixo ilustra todos os ataques que ocorrem durante essa síntese:



**Figura 4:** Mecanismo de reação do fenol utilizando propiolato de etila e cloreto de zinco para formação da cumarina.

Os dois procedimentos são importante por sintetizar cumarinas funcionalizadas com ou sem substituintes no anel pirona, aumentando a possibilidade de estudos de correlacionando estrutura e atividade farmacológica.

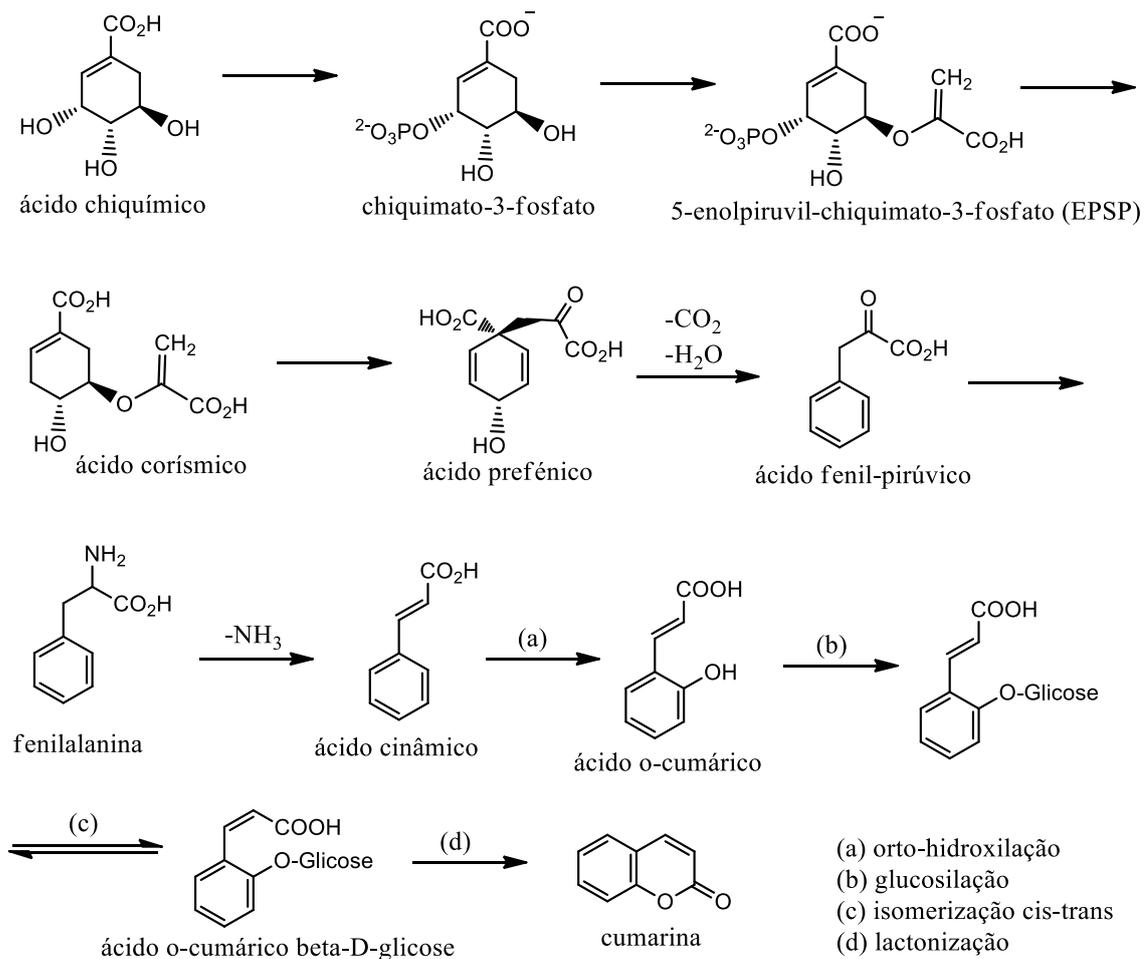
## 1.2. Biossíntese de cumarinas

As cumarinas são metabólitos secundários encontradas em algumas espécies de plantas, como já foi citado, e a sua rota biossintética é pela via do ácido chiquímico. O ácido chiquímico é formado pela condensação do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, que são metabólitos da glicose. A junção do ácido chiquímico à uma molécula de fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico. Dando continuidade à via biossintética, O ácido corísmico por sua vez gera os ácidos aminados aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina). A fenilalanina ao sofrer a ação da fenilalaninaamônio-liase (PAL), a qual retira o grupamento amina da sua estrutura, forma o ácido cinâmico. A PAL é regulada por fatores ambientais como a luz, nível nutricional e infecção por fungos.

O ácido cinâmico sofre uma *orto* hidroxilação seguido por uma glicosilação e isomerização *trans/cis*. A isomerização enzimática para uma forma menos estável e o processo de *orto* glicolização são importantes para o processo de lactonização, visto que após hidrólise enzimática da glicose a estrutura imediatamente cicliza gerando um produto aromático. (CZELUSNIAK, et al. 2012; MIRANDA, 2001). A Figura 5 (pág.18) mostra com detalhes a biossíntese da cumarina.

## 1.3. Atividade biológica das cumarinas

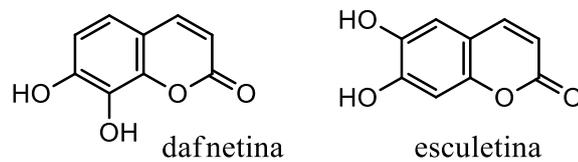
Dentre os metabólitos encontrados nas plantas, as cumarinas e seus derivados representam uma importante classe de produtos naturais de interesse farmacológico por apresentar atividade anticoagulante, anti-tuberculose, anti-inflamatória, hepatoprotetora e citotóxica (CURIR, et al., 2007; AHMED, et al., 2003). Sua ação antimicrobiana é conhecida, principalmente, sobre diversas linhagens de bactérias, incluindo a *Mycobacterium tuberculosis* responsável pela tuberculose. Essa atividade está relacionada com a capacidade dessas substâncias em intercalarem com as bases pirimidínicas do DNA, inibindo assim a sua expressão gênica e a replicação (SOUZA, 2005).



**Figura 5:** Rota biossintética da cumarina.

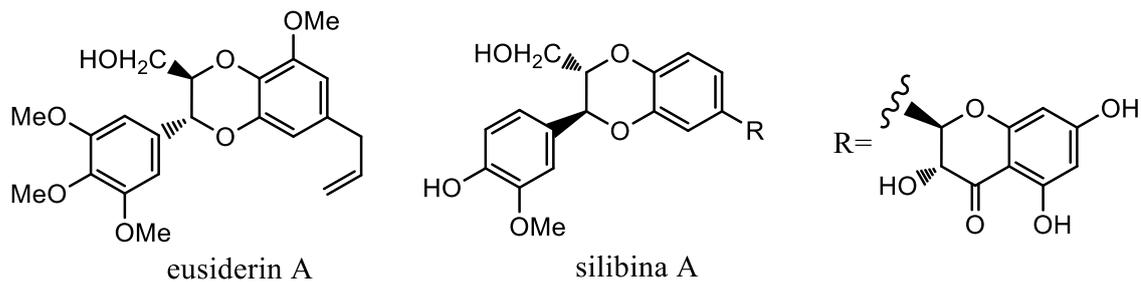
A dafnetina (7,8-dihidroxicumarina) e esculetina (6,7-dihidroxicumarina) (Fig.2), por exemplo, são metabólitos secundários presente em plantas medicinais como *Angelica decursiva*, *Artemisia capillaris* e *Daphne papyracea* (ALI, et al. 2016; HAN, et al. 2016) . A 7,8-dihidroxicumarina é utilizada para tratamento de artrites reumatoide, desordem na coagulação sanguínea, malária e antitérmico (KUMAR, et al. 2016; LIANG, et al. 2016) . Outra atividade biológica importante apresentada nesta substância é na antiproliferação de diferentes células tumorais por interferir na angiogênese (KUMAR, et al. 2016). Pesquisas demonstram que a esculetina e a dafnetina apresentam importante habilidade em inibir a enzima acetilcolinesterase que é responsável pela hidrólise da acetilcolina no neurotransmissor. Uma das

hipóteses utilizadas para descrever a patologia da Doença de Alzheimer está relacionada à diminuição desse neurotransmissor no cérebro (ALI, et al. 2016).



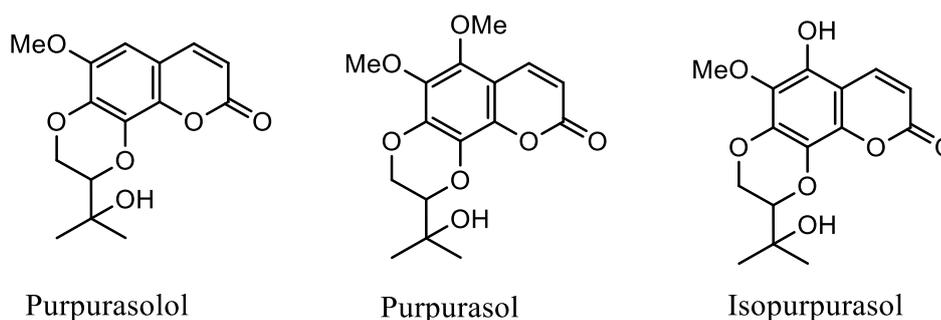
**Figura 6:** Estruturas das 7,8-dihidroxicumarina e 6,7-dihidroxicumarina

Alguns derivados benzodioxanos (Figura 7) também apresentaram atividade neurológica relacionada à acetilcolina. Logo, cumarinas com anel benzodioxano também são alvos de pesquisas relacionadas à neurotransmissão (PARELLA, R. 2015).



**Figura 7:** Derivados benzodioxanos com atividade biológica relacionada à acetilcolina.

As cumarinas com anel benzodioxano foram identificadas em grande quantidade nas plantas medicinais do gênero *Pterocaulon*. Este gênero encontra-se amplamente distribuído no nordeste da Argentina e no sul do Brasil e do Paraguai. Um exemplo é a espécie *Pterocaulon purpurascens*, utilizada na medicina popular como inseticida e contra veneno de cobra, por apresentar uma grande concentração de cumarinas benzodioxano tri e tetraoxigenadas (Figura 8) (MAES et al. 2006).

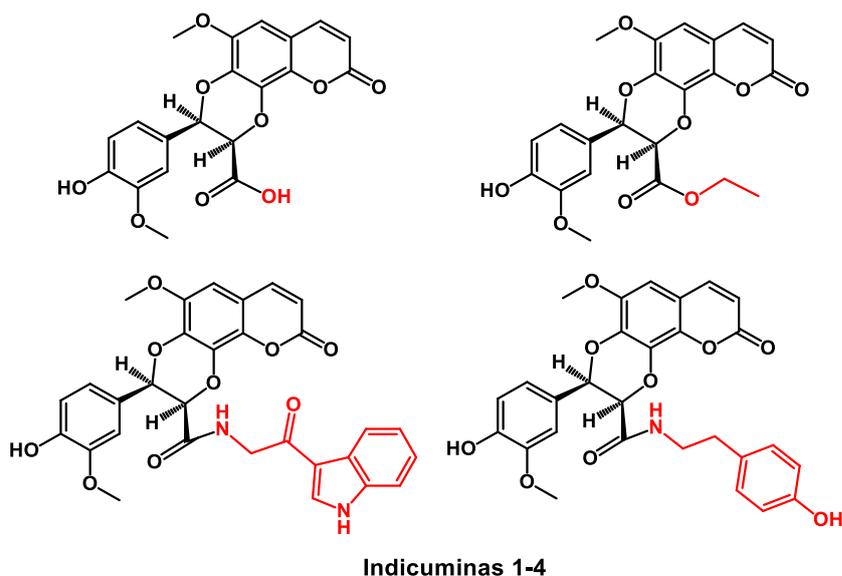


**Figura 8:** Cumarinas tri e tetraoxigenadas isoladas da *Pterocaulon purpurascens*

Devido à atividade biológica apresentada pelas cumarinas com anel dioxano, estudos relacionados à síntese das mesmas passaram a ser frequentes. Uma possível rota sintética seria a condensação da cumarina com a substância epiclorigrina, na presença de um catalisador básico. Esta rota teve como base uma síntese feita anteriormente utilizando o bezenodiol e a epiclorigrina que apresentou bom rendimento (STEPHENSON, 1954).

Outro grupo de cumarinas com grandes atividades biológicas são as cumarinolignoides. As cumarinolignóides são raras e encontradas em poucas espécies vegetais como *Cleome viscosa*, *Mallotus apelta*, *Rhododendron collettianum* e *Solanum indicum* L. A indicumina é um tipo de cumarinolignoides formada por acoplamento oxidativo entre uma cumarina e um derivado ácido coniférico. Sua estrutura é caracterizada pela presença hidroxila terminal que proporciona a funcionalização do seu esqueleto básico (Figura 9, pág. 21).

Relatos da literatura para essa classe mostram que essas substâncias possuem atividade hepatoprotetora, imunomoduladora, e anticancerígena. Nas últimas pesquisas realizadas com o extrato da semente de *S. indicum* foram identificadas quatro novas indicuminas, que exibiram uma importante atividade anti-hepatite B. A busca de novas substâncias antivirais e antibacterinas motivou a elaboração de uma rota sintética para obtenção da cumarinolignóide funcionalizada tendo como base a estrutura da indicumina (YIN, H. et al., 2013).



**Figura 9:** Estrutura das indicuminas identificadas

#### 1.4. Separação de enantiômeros

A separação de um par de enantiômeros exige técnicas mais aperfeiçoadas do que as utilizadas em outros tipos de isômeros. Isto ocorre por causa da semelhança das propriedades físicas e químicas das substâncias. A separação desse tipo de mistura tem se tornado fácil após o surgimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ) (COLLIN, et al., 2006).

A CLAE tradicional é uma técnica de separação que consegue separar misturas complexas de substâncias similares. Esta técnica baseia-se na distribuição dos componentes de uma mistura em duas fases imiscíveis. Há diferentes mecanismos de separação pela CLAE e um deles é formado pela Fase Estacionária Quiral (FEQ). Ao final da análise de CLAE há a etapa de detecção e quantificação dos componentes da mistura que são separados gerando um cromatograma. (COLLIN, et al., 2006).

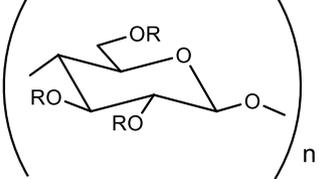
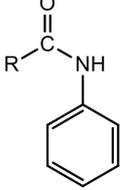
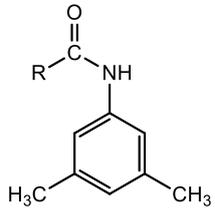
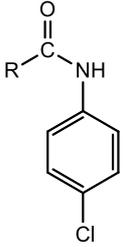
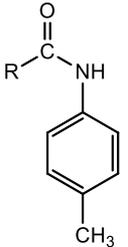
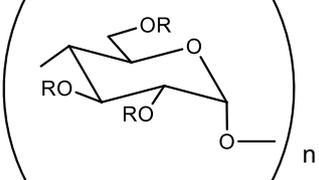
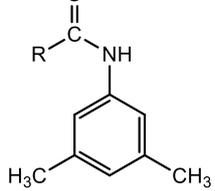
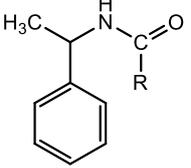
Uma fase estacionária quiral (FEQ) consiste de uma matriz aquiral, como sílica porosa com ligantes quirais unidos quimicamente ou fisicamente. Os enantiômeros são resolvidos pela formação de complexos diastereoisoméricos entre o soluto e as moléculas quirais as quais estão ligadas à sílica (SINGH, et al., 2006).

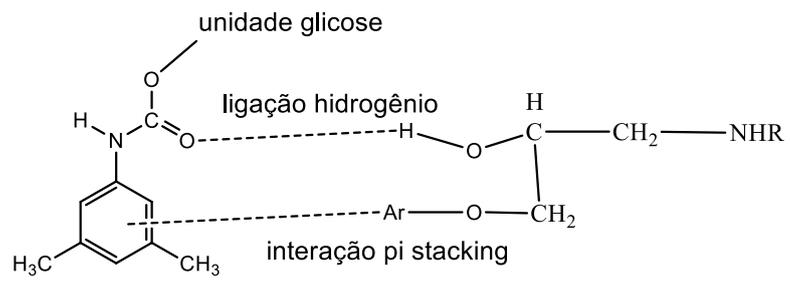
Existem várias teorias que envolvem o mecanismo dessa separação. Mas o princípio básico é o de interação entre a fase estacionária e os enantiômeros. Forças eletrostáticas e hidrofóbicas, fatores estéricos, ligações de hidrogênio e interações de transferência de carga são as principais interações que podem conduzir à separação (COLLIN, et al., 2006). Acredita-se que para ter uma separação mais eficiente a molécula quiral e a FEQ tem que estar ligados por pelos menos três pontos (3 pontos de interação) (SILVÉRIO, 2011) .

Polímeros helicoidais são muito utilizados como fase estacionária quiral. A celulose e a amilose são polímeros naturais, também chamados de polissacarídeos. Esses polímeros podem ser convertidos em uma variedade de derivados como tris-benzoatos, tris-cinamatos e tris-arilcarbamatos adsorvidos em sílica em gel. As reações de preparação destes derivados normalmente são simples e atualmente são comercializadas pela indústria japonesa DIACEL Chem. Ind. (Tabela 1, pág. 23) (CASS, et al., 1997).

Os átomos eletronegativos, oxigênio, nitrogênio e halogênios, são responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio com os enantiômeros. Os anéis benzênicos da FEQ e dos enantiômeros promovem uma interação  $\pi$ - $\pi$  quando na mistura a ser separada há compostos aromáticos (SILVÉRIO, 2011). A Figura 10 (pág. 24) mostra como ocorre essa interação da Chirocel OD com um  $\beta$  – bloqueadores que é uma classe de medicamentos para tratamento de doenças cardiovasculares (SINGH, et al., 2006).

**Tabela 1:** Algumas colunas quirais derivados de carbamatos de polissacarídeos disponíveis no mercado.

Celulose/amilose adsorvida em sílica em gel	R	Nome	Nome comercial
		Trisfenilcarbamato de celulose	Chiracel OC
		Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiracel OD Chiracel OD-R
		Tris(4-clorofenilcarbamato) de celulose	Chiracel OF
		Tris(4-metilfenilcarbamato) de celulose	Chiracel OG
		Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiracel AD
		Trisfeniletilcarbamato de amilose	Chiracel AS



**Figura 10:** Interação da fase estacionário quiral Chirocel OD com  $\beta$  – bloqueadores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.2. Objetivos gerais

- Sintetizar dioxanocumarinas;
- Avaliar possíveis formas de separação racêmica.

### 2.3. Objetivos específicos

- Sintetizar as substâncias: 7,8-dihidroxicumarina e 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina;
- Caracterizar as substâncias sintetizadas através de análises espectroscópicas de Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ );
- Avaliar possível separação racêmica do 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE**

##### **3.1.1. Reagentes e solventes**

Todos os solventes e reagentes utilizados neste trabalho possuem grau de pureza analítica (P.A.) e foram comprados da LabSynth (São Paulo, Brasil), com exceção apenas da epícloridrina, ácido propiólico e cloreto de zinco que foram comprados da Aldrich (São Paulo, Brasil)

Para a realização dos processos cromatográficos foi utilizada sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm – Merck) para cromatografia em coluna; e sílica gel 60 GF254 (Merck) para TLC (Thin Layer Chromatography).

##### **3.1.2 Instrumentação**

###### **3.1.2.1 Cromatografia gasosa**

O sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é composto pelo cromatógrafo GCMS-QP5050A da marca Shimadzu (Kyoto, Japão).

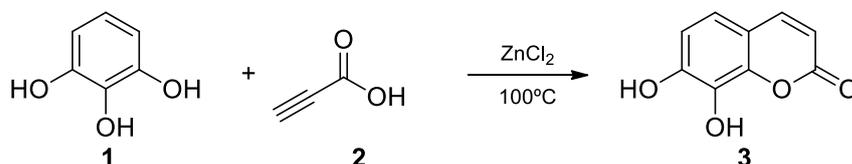
###### **3.1.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Foram utilizados dois aparelhos de RMN sendo um deles modelo Eclipse 400 MHz da marca Jeol (Tóquio, Japão) e outro do modelo DPX-500 da Bruker (Billerica, EUA).

## 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 Síntese da cumarina precursora

Em um balão de 50 mL adicionou-se 1,19 mmol de pirogalol (**1**) e 1,43 mmol de ácido propiólico (**3**). Esperou-se atingir a temperatura de 100 °C e então adicionou-se 2,02 mmol de cloreto de zinco. A reação foi acompanhada por TLC e após 3h verificou-se o término da mesma. Logo em seguida, foram adicionados 30 mL de uma solução ácido clorídrico 5% e foram feitas extrações líquido/líquido com acetato de etila. Por fim, fez-se a secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguida de filtração e evaporação do solvente. Para purificação foi feita uma coluna cromatográfica em sílica em gel com eluente 95:5 diclorometano:metanol. O composto obtido é um sólido de coloração levemente amarronzada e com rendimento de 46%. Dados espectrais <sup>1</sup>H RMN (MeOD, 400 MHz/ppm): 7,83 (d, 1H, CH=C), 7,05 (d, 1H, Ar-H), 6,83 (d, 1H, Ar-H), 6,20 (d, 1H, CH=C).

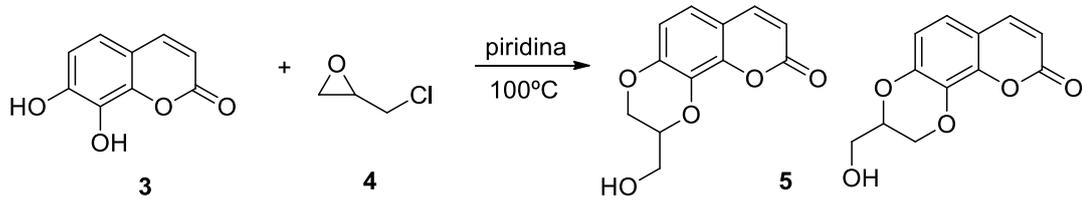


**Figura 11:** Rota sintética da cumarina precursora.

### 3.2.2 Síntese da 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina

Em uma solução contendo 0,34 mmol de 7,8-dihidroxicumarina (**3**) e piridina foi adicionado 0,68 mmol de epicloridrina (**4**). Com o TLC, observou-se que a reação a 100 °C após 4h já teria atingido seu equilíbrio. Em seguida, evaporou-se a piridina da solução obtida e fez-se uma extração líquido/líquido com diclorometano e acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrou-se e evaporou-se o solvente. A purificação foi feita por meio de coluna cromatográfica em sílica em gel com eluente 95:5 diclorometano:metanol. O composto obtido é um sólido de cor branca e

o rendimento obtido foi de 20%. Dados espectrais  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz/ppm) : 7,83 (d, 1H, CH=C), 7,05 (d, 1H, Ar-H), 6,83 (d, 1H, Ar-H), 6,20 (d, 1H, CH=C), 4,44 (m, 1H, OCH), 4,54 - 4,25 (d, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3,97- 4,02 (d, 2H,  $\text{HOCH}_2$ ).



**Figura 12:** Reação de condensação entre cumarina precursora e epiclorigrina

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação da cumarina a partir da reação entre o pirogalol e ácido propiólico ocorreu em baixa quantidade, com um rendimento de 46%. Essa rota sintética foi utilizada após algumas tentativas de síntese da 7, 8-dihidroxicumarina utilizando o propiolato de etila que pouco solubilizava o pirogalol. A baixa solubilidade resultava na formação de uma mistura reacional pastosa que grudava na parede do balão, juntamente com o magneto, impedindo a agitação do meio reacional. Com a adição do ácido propiólico, a formação dessa mistura que impedia a agitação só ocorria depois de um tempo de aquecimento, permitindo que a reação acontecesse.

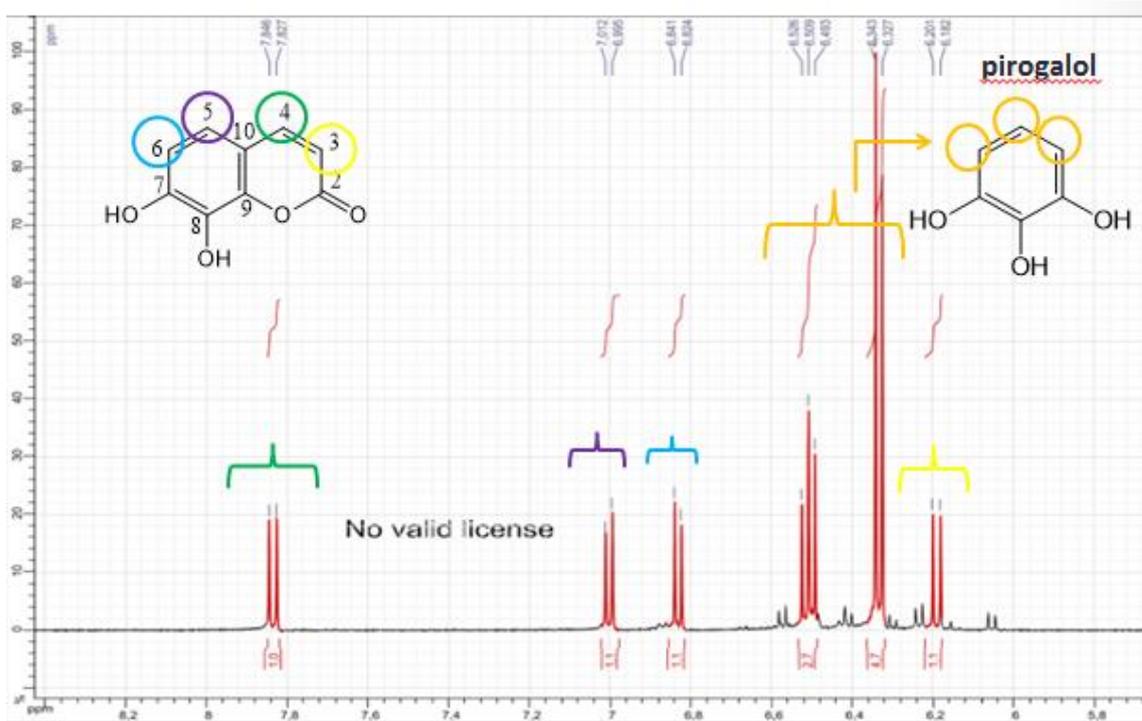
O baixo rendimento da reação pode ser atribuído à hidratação do cloreto de zinco utilizado, liberando ácido clorídrico e, conseqüentemente, reduzindo a sua função como ácido de Lewis.

O produto reacional foi tratado com uma solução ácida, extraído por partição com acetato de etila e, após a remoção do solvente, o mesmo foi submetido à técnica de ressonância magnética de hidrogênio, a fim de confirmar o produto formado.

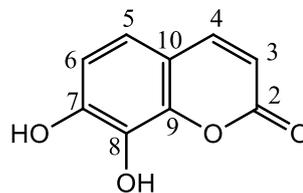
O espectro de RMH  $^1\text{H}$  mostra um conjunto de sinais entre 7,83-6,20 ppm, região característica de átomos de hidrogênio aromáticos. O duplete em 7,83 ppm com constante de acoplamento de 9,5Hz foi atribuído ao átomo de hidrogênio na posição 4. Esse deslocamento químico em frequência mais alta que os demais é atribuído ao efeito de desproteção que esse átomo de hidrogênio sofre devido ao efeito de ressonância com a carboxila da lactona. A constante de acoplamento em 9,5Hz permitiu localizar o átomo de hidrogênio na posição 3 ( $\delta$  6,20, d J= 9,5 Hz). Esses sinais confirmam a porção lactona da cumarina.

Os dupletos em  $\delta$  7,05 e 6,83, ambos com constante de acoplamento de 8,5Hz característico de acoplamento orto em anel benzeno, foram atribuídos aos átomos de hidrogênio na posição 5 e 6, respectivamente. A pequena diferença entre o deslocamento químico desses átomos de hidrogênio é atribuída ao efeito doador por ressonância da hidroxila na posição 7.

No espectro (Figura 13) pode-se observar um conjunto de sinal em 6,50 ppm e em 6,33 ppm que foram atribuídos à estrutura do pirogalol, que não reagiu.

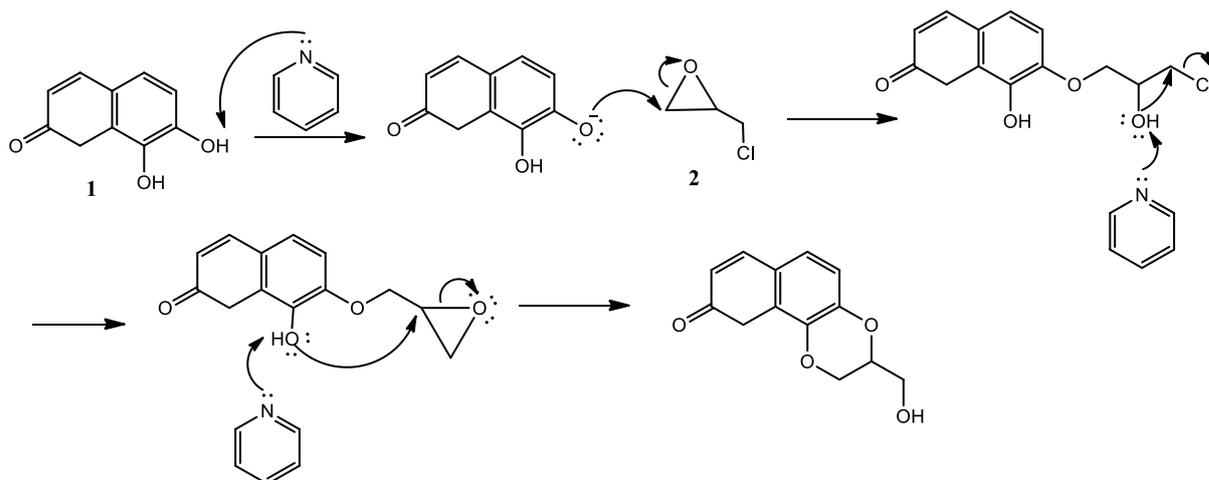


**Figura 13:** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 7,8-dihidroxicumarina utilizando o solvente MeOD.



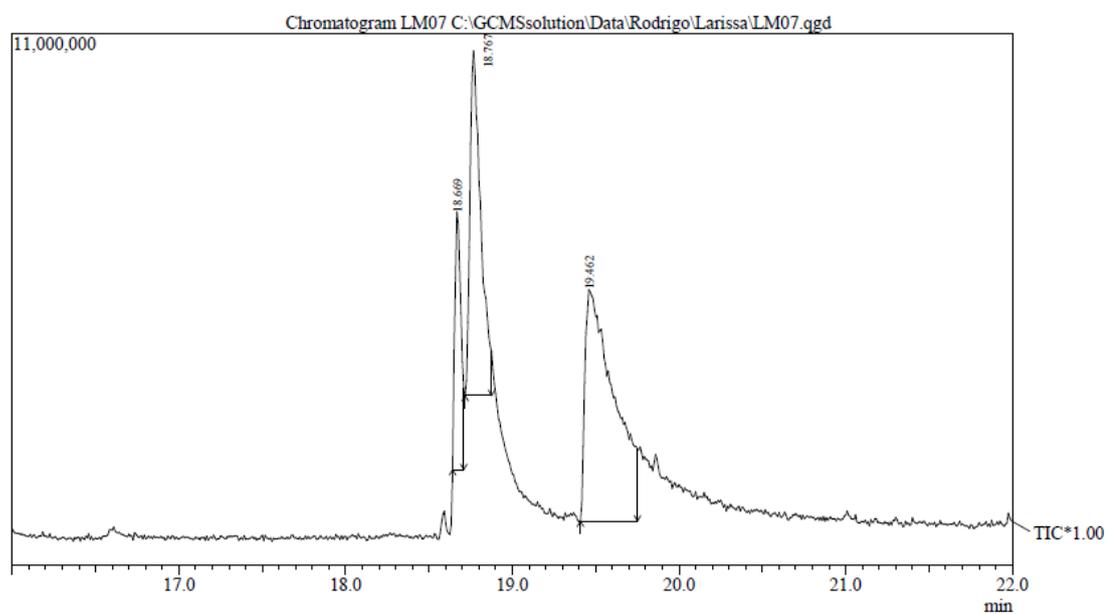
**Figura 14:** Estrutura da 7,8-dihidroxicumarina

A síntese do anel dioxano na estrutura da 7,8-dihidroxicumarina (Figura 15, pág. 31) foi realizada tendo como referência a publicação de Stenphenson em 1954. Nesse trabalho a formação do anel dioxano foi feita pela reação entre o catecol e a epiclorigrina em meio básico. Com essa síntese foi possível obter dois produtos, um com o fechamento de anel e o outro com a substituição de unidades de epiclorigrina nas hidroxilas do catecol. Felizmente a síntese entre a 7,8-dihidroxicumarina (1) e a epiclorigrina (2) somente formou o produto com o fechamento do anel, mas devido à falta de simetria da cumarina esse fechamento ocorreu de duas formas, formando isômeros de posição. Na figura a seguir é representada a formação de um dos isômeros de posição.

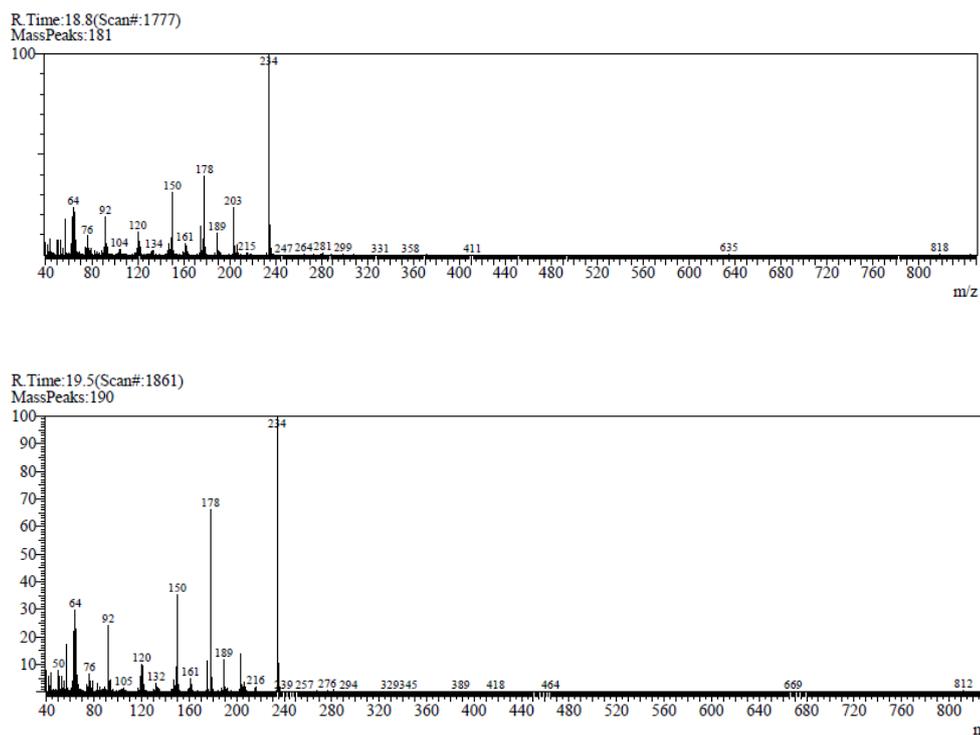


**Figura 15:** Mecanismo da reação de obtenção da mistura de isômeros 8-hidroxi-metil-7,10-dioxanocumarina a partir da condensação 7,8-dihidroxicumarina com a epiclorigidrina em meio básico.

Essa reação de condensação apresentou um rendimento de 20%. Pelo espectro de CG-MS (Figura 16) foi possível observar dois picos com mesma massa, o que comprova a formação dos dois isômeros de posição.



**Figura 16:** Cromatograma obtido por CG-EM da reação de obtenção dos isômeros 8-hidroxi-metil-7,10-dioxanocumarina.



**Figura 17:** Fragmentograma de massas dos isômeros B e A.

O sinal com o tempo de retenção (TR) 18,767 se refere ao isômero 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina B representando 35,20 % e o sinal com o TR em 19,462 se refere ao isômero A representando 27,56%. Ambos com um sinal m/z 234 daltons já que são isômeros de posição. A análise dos espectros de RMN e massas permitiu a identificação do produto confirmando a proposta sintética.

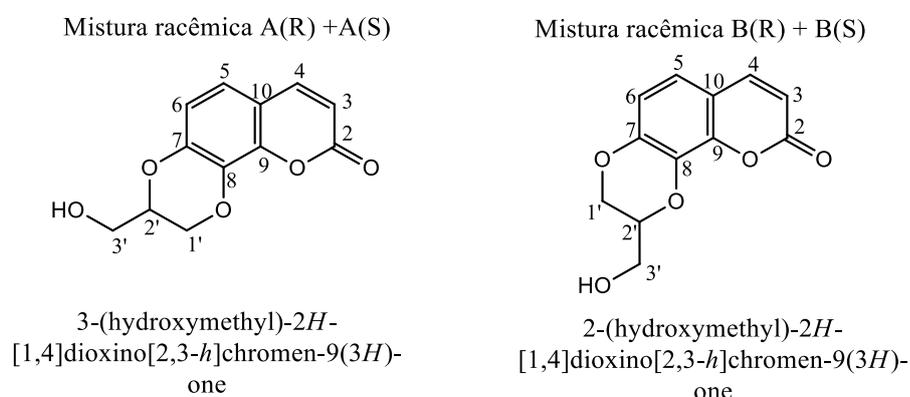
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina mostra uma duplicidade de sinais nas regiões entre 8-6 ppm e 4,50-3,50 ppm referente aos dois isômeros de posição A e B. Essa isomerização ocorreu devido a não simetria da cumarina, possibilitando a formação do anel dioxano com a porção metileno oxílico próximo à lactona e o outro mais afastado. Embora a possibilidade de formação desse anel seja a mesma para ambos os lados, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e no cromatograma obtido pela técnica CG-EM (Figura 16), mostra uma regioseletividade da reação formando o isômero B em maior quantidade que o A.

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e os bidimensionais permitiu a correta atribuição dos sinais referente aos átomos de hidrogênio e a identificação das posições na estrutura (Tabela 2, pág. 33).

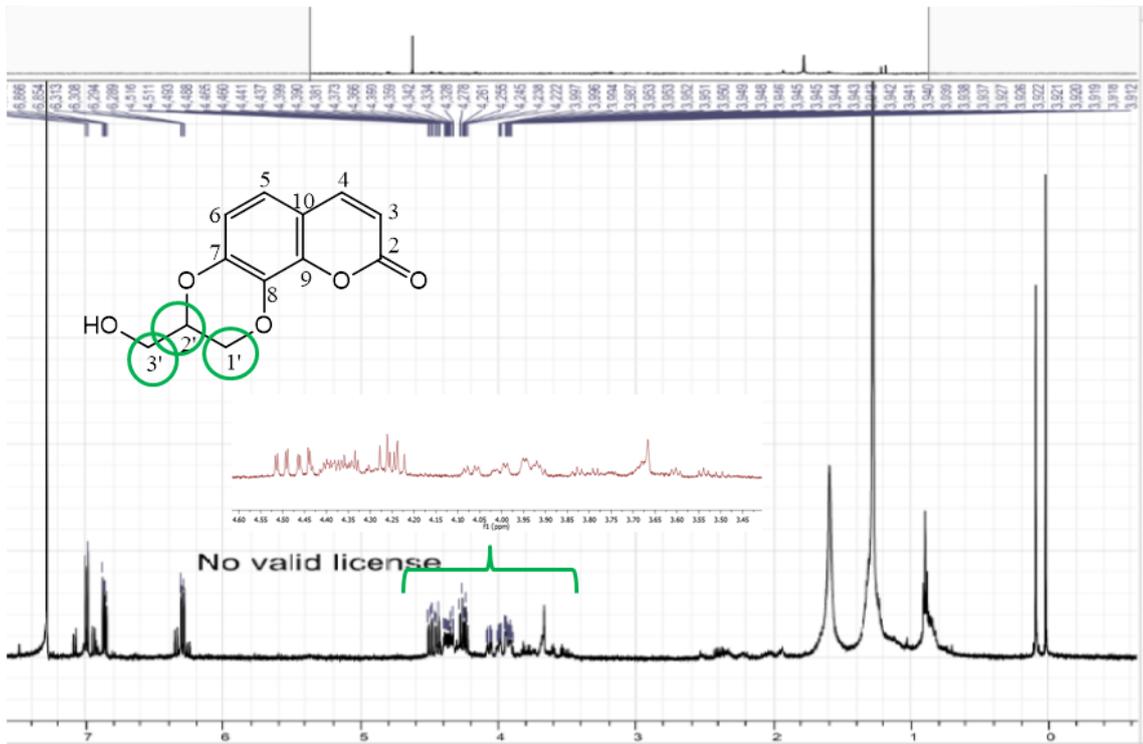
**Tabela 2.** Correlação entre os deslocamentos químicos entre os átomos.

Nº	HSQC		HMBC
	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ C
2	-	160,2	-
3	6,35	113,2	160,0
4	7,64	143,7	160,2 e 119,4
5	7,04	119,4	143,7 e 147,0
6	6,92	113,2	131,3 e 147,0
7	-	147,0	-
8	-	131,3	-
9	-	Não foi possível verificar qualquer correlação entre os átomos de hidrogênio anterior e os átomos de carbono na posição 9 e 10	
10	-		
1'	4,54 e 4,25	65,2	73,8 e 131,3
2'	4,44	73,8	147,0
3'	3,97 e 4,02	61,5	Não mostrou correlação

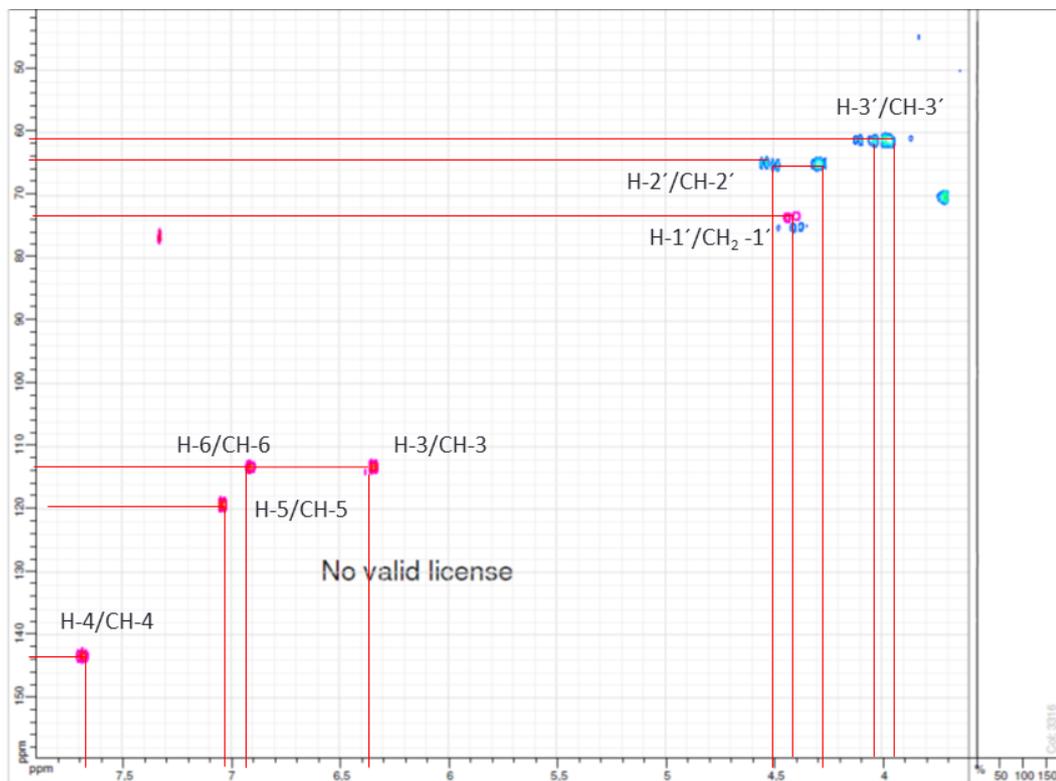
O acoplamento a longa distância entre o átomo de hidrogênio e o átomo de carbono, além de permitir alocar o sinal corretamente, possibilitou a confirmação do anel dioxano e o posicionamento do seu isômero majoritário B. Os outros acoplamentos referentes ao isômero minoritário A não foram observados, devido à pequena quantidade de amostra enviada para análise.



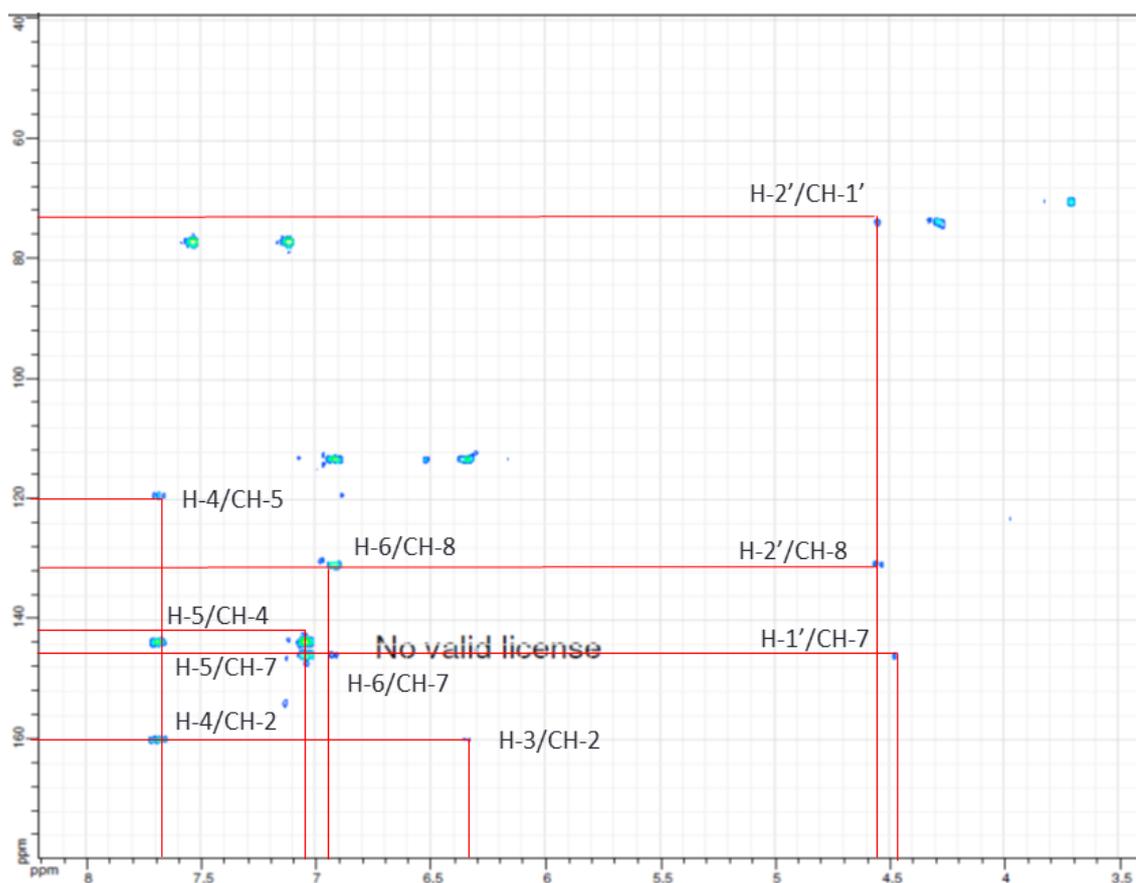
**Figura 18:** Estrutura dos isômeros de posição 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina e seus respectivos nomes de acordo com IUPAC



**Figura 19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente  $\text{CDCl}_3$ .



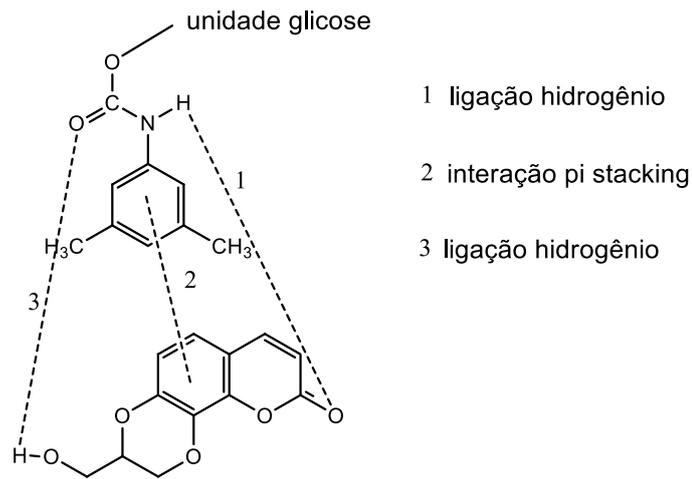
**Figura 20:** Mapa de correlação HSQC da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 21:** Mapa de correlação a longa distância HMBC da substância 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina utilizando o solvente  $\text{CDCl}_3$ .

Os isômeros obtidos nesta última etapa apresentam um carbono quiral e por isso há formação de enantiômeros. A separação de enantiômeros acontece com maior facilidade através da CLAE-FEQ. As substâncias obtidas apresentam anel benzênico, hidroxilas e oxigênios, o que indica ser uma boa estrutura para interagir com FEQ de carbamatos de polissacarídeos como a comercialmente vendida Chiracel OD<sup>®</sup>.

O esquema a seguir (Figura 22, pág. 36) apresenta o possível mecanismo de resolução quiral e as interações envolvidas entre a FEQ e 8-hidroximetil-7,10dioxanocumarina.



**Figura 22:** Interação da 8-hidroximetil-7,10-dioxanocumarina com Chiracel OD<sup>®</sup>

Assim, a mistura enantiomérica ao entrar na coluna da CLAE-FEQ irá interagir com o Chiracel OD<sup>®</sup> formando um complexo diastereoisomérico e o que apresentar maior interação com a fase estacionária terá um tempo de retenção maior na coluna enquanto que o outro, menos estável, apresentará um tempo de retenção menor.

## 5. CONCLUSÃO

A proposta de síntese e separação da substância foi alcançada mesmo que com baixos rendimentos e que não se tenha visto na prática a utilização da FEQ Chiracel OD<sup>®</sup>.

Através das análises do cromatograma, fragmentograma e espectros de RMN <sup>1</sup>H, foi possível observar a formação de isômeros da 8-hidroxi-7,10-dioxanocumarina e que o isômero B está em maior quantidade.

As condições de síntese da cumarina e do 8-hidroxi-7,10-dioxanocumarina precisariam ser aprimoradas para se obter melhores rendimentos e assim dá prosseguimento a novas sínteses de substâncias derivadas da indicuminas com a introdução de grupos arilas na porção dioxana.

A separação dos isômeros 8-hidroxi-7,10-dioxanocumarina é fundamental para a realização de etapas sintéticas futuras, como a introdução de grupos arilas e a oxidação do álcool a ácido carboxílico. Separar substâncias quirais e realizar estudos sobre a atividade biológica de cada substância se tornou de extrema importância para que a mesma possa ser candidata a fármaco e conseqüentemente, comercializada. A mistura racêmica pode apresentar efeitos totalmente diferentes, ao que é atribuído a um enantiômero, podendo assim causar danos à saúde, inviabilizando todo o processo de produção.

## 6. REFERÊNCIAS

- AHMED, B. KHAN, S.A., ALAM, T. (2003). Synthesis and antihepatotoxic activity of some heterocyclic compounds containing the 1,4-dioxane ring system. *Pharmazie*. 58: 173-176.
- ALI, M.Y., JANNAT,S., JUNG, H. A., CHOI, R.J., ROY,A., CHOI, J.S. (2016). Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. v.9. 2:103-111.
- BORGES, F., ROLEIRA, F, MILHAZES, N., SANTANA, L., URIARTE, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*. 12:887-916.
- CASS, Q. B., TIRITAN, M.E., BASSI, A. L., CALAFATTI, S.A., DEGANI, A.L.G. (1997). Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. *Química Nova*. v. 20. 1: 49-57.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. (2006). Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp. p. 325 – 329.
- CURIR, P. et al. (2007). Pavietin, a coumarin from *Aesculus pavia* with antifungal activity. *Journal of Natural Products*. 70: 1668-1671.
- CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L.(2012) Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.14. 2: 400-409
- DEWICK, P.M. (2004). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Editora Wiley. 2ª ed.
- DOMINGO, D. LÓPEZ-BREA, M. (2003). Plantas com acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. v. 16, n. 4, p. 385-393

HAN, Z., XI, Y., LUO, L., ZHOU, C., KUROGI, K., SAKAKIBARA, Y., SUIKO, M., LIU, M. (2016). Sulfate conjugation of daphnetin by the human cytosolic sulfotransferases. *Journal of Ethnopharmacology*. 189:250-252.

LACY, A. O'KENNEDY, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 10: 3797-3811

LEÃO, R. A. C. et al. (2011). Synthesis of coumarins and neoflavones through zinc chloride catalyzed hydroarylation of acetylenic esters with phenols. *Synthesis*. 22: 3692-3696.

LIANG, S., XIA, Y., HOU, J., GE, G., ZHANG, J., HE, Y., WANG, J., QI, X., YANG, L. (2016). Methylation, glucuronidation and sulfonation of daphnetin in human hepatic preparations *in vitro* : metabolic profiling, pathway comparison and bioactivity analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 105:808-816.

MAES, D., SYMGEL, K. V., DEBENEDETTI, S., KIMPE, N. (2006). Synthesis of purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Tetrahedron*. 62: 4426-4429.

MIRANDA, J. A. (2001) Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas. Dissertação em fotoquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 144 páginas.

PARELLA, R. BABU, S.A. (2015) Regio- and estereoselective Pd-catalyzed direct arylation of unactivated  $sp^3$  C(3)-H bonds of tetrahydrofuran and 1,4-benzodioxane systems. *The Journal of Organic Chemistry*. 80: 2339-2355.

SILVÉRIO, V.A. (2011). Separação, obtenção e utilização de enantiômeros puros no controle estereoespecífico de qualidade de medicamentos contendo bisoprolol. Dissertação em produção e controle farmacêutico. Universidade de São Paulo. 125 páginas.

SINGH, A. K., KEDOR-HACHMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M.(2006). Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de

fármacos cardiovasculares. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 42. 4: 554-566.

SOUZA, S. M. de. (2005). Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. Dissertação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal De Santa Catarina-SC, 94 páginas

STEPHENSON, O. (1954). The condensation of epichlorohydrin with monohydric phenols and with catecol. *Journal of the Chemical Society*. 1571-1577.

VIANNA, D, R. (2011). Avaliação in vitro da atividade antifúngica e citotóxica de cumarinas naturais e sintéticas. Dissertação em farmacognosia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 148 páginas.

VIEGAS Jr, C. BOLZONI, V. S. BARREIRO, E. J. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. v. 29. 2: 326-337.

YIN, H. et al. (2013). Four new coumarinolignoids from seeds of *Solanum indicum*. *Fitoterapia*. 84: 360-365.