

## **Isolamento e semissíntese de compostos derivados da própolis verde com aplicações biológicas**

**Autores: Íris Fraioli Reis da Silva<sup>1</sup>, Vanessa Leiria Campo<sup>2</sup>**

**Colaboradores: Débora Munhoz Rodrigues<sup>3</sup>, Felipe Tanaka Leite<sup>4</sup>**

**<sup>1,2,4</sup> Centro Universitário Barão de Mauá**

**<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)**

*iris.fraioli@hotmail.com (Farmácia), vanessa.campo@baraodemaua.br*

### **Resumo**

Ácido p-cumárico, artepelin C e bacarina, contituintes da própolis verde, apresentam importantes propriedades biológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Desta forma, neste trabalho será apresentado o isolamento destes constituintes, bem como a semissíntese do derivado triazólico do ácido p-cumárico (p-AC), também oriundo da própolis verde.

### **Introdução**

Diferentes tipos de própolis são encontrados em território brasileiro, as quais podem ser classificadas em doze grupos distintos, conforme critérios de similaridade físico-químicos. Dentre os diversos tipos está à própolis verde, oriunda da espécie *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), planta nativa brasileira, amplamente distribuída

em São Paulo e Minas Gerais (PARK *et al.*, 2004). Os principais constituintes da própolis verde são representados por derivados prenilados do ácido cinâmico, tais como o Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e a Bacarina (ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico), os quais apresentam importantes atividades biológicas, tais como Antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (LUSTOSA *et al.*, 2008). Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral. (SOARES, 2020).

Os compostos fenólicos oriundos de produtos naturais têm apresentado importantes atividades biológicas reportadas na literatura. (NAGEM *et al.*, 1992; GAMACH *et al.*, 1993; IVANOVA *et al.*, 1997; AZIZ *et al.*, 1998; FERNANDEZ *et al.*, 1998; (HOLLMAN; KATAN, 1998). O *p*-AC é um ácido hidroxicinâmico que pertence a uma classe importante de metabólitos secundários amplamente encontrados em plantas superiores e também em bebidas, como chás, vinhos e café (TEODORO *et al.*, 2015). Grande parte do interesse no *p*-AC está relacionada às suas atividades antioxidante e antitumoral (FERREIRA, 2020).

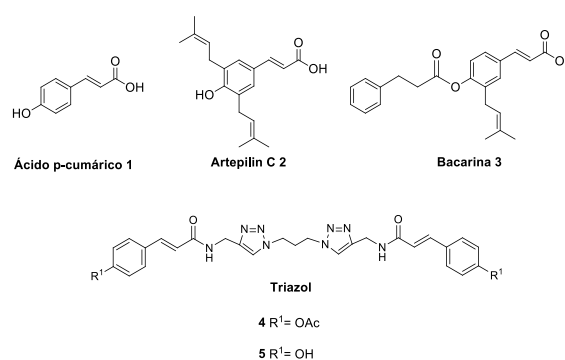
Portanto, o isolamento de componentes da própolis verde, bem como a semissíntese dos seus derivados, é de fundamental importância para a otimização das atividades biológicas supradescritas, bem como para a descoberta de novas propriedades.

### Objetivos

Este trabalho teve como objetivo, em uma primeira fase, o isolamento dos constituintes da própolis verde ácido *p*-cumárico **1**, artepilin C **2** e bacarina **3**, e posteriormente, a semissíntese do derivado triazólico

do ácido *p*-cumárico (*p*-AC) **4,5**. (Figura 1). Os compostos obtidos serão submetidos a ensaios para avaliação das atividades antitumoral e anti-inflamatória, bem como em modelos de distúrbios neurocomportamentais.

**Figura 1. Estruturas dos compostos ácido *p*-cumárico **1**, artepilin C **2**, bacarina **3** e derivado triazólico do *p*-AC **4,5**.**



Fonte: os autores

### Material e Método

O processo de isolamento do ácido *p*-cumárico **1**, artepilin C **2** e bacarina **3** foi realizado no laboratório de produtos naturais da FCFRP-USP e a semissíntese do derivado triazólico de *p*-AC foi realizada em laboratório de síntese orgânica. As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para comprovação das estruturas obtidas foram realizadas no equipamento BrukerAdvance DPX 400 (400 MHz) da FFCLRP-USP.

## **Isolamento do ácido *p*-cumárico, artepilin C e bacarina.**

Os compostos, ácido *p*-cumárico, bacarina e artepelin C, foram obtidos a partir de 300g de própolis verde que foi congelada e pulverizada com solução hidroalcoólica 7:3, seguida de percolação, a cada três dias, por três vezes consecutivas. A solução hidroalcoólica obtida foi devidamente filtrada e evaporada em rotaevaporador e, em seguida, liofilizada com a finalidade de se obter o extrato hidroalcoólico bruto. O extrato obtido foi posteriormente submetido tanto à cromatografia líquida a vácuo (CLV), quanto à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC–*High Speed counter current Chromatography*). As frações obtidas foram reunidas e purificadas em sistema preparativo CLAE-UV (Shimadzu), utilizando a coluna preparativa C8 (Shimadzu Shim-pack prep.-ODS) e sistema de eluição por gradiente MeOH/água. (PEDERSEN *et al.*, 2001), (SILVA, 2011; MOTTA, 2014).

## **Semissíntese de derivado triazólico de ácido-*p*-cumárico (*p*-AC)**

### Síntese de acetil-*p*-AC

O composto *p*-AC 1 (500mg, 164,04 mmol) foi acetilado com piridina (8ml) e anidrido acético (8mL) sob agitação por cerca de 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi rotaevaporada a pressão reduzida e purificada em coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (EtOAc/Hex5:5, 7:3 a 10:0 v/v).

### Síntese de propargil-acetil-*p*-AC

O composto *p*-AC acetilado 6 (100mg, 0,49mmol) foi solubilizado em DMF e tratado com DIPEA (170µl, 0,98mmol) e propargilamina (54µl, 0,98mmol), juntamente com os reagentes de acoplamento PyBop (255mg, 0,49mmol) e HOBt (66mg, 0,49mmol) (CARVALHO *et al.*, 2013). A reação foi agitada por cerca de 20h à temperatura ambiente, sendo posteriormente rotaevaporada e purificada por coluna clássica cromatográfica com eluição por gradiente (MePh/EtOAc 4:1 v/v).

## **Síntese do derivado triazólico de *p*-AC**

### Síntese do di-azido propano

Cerca de 420 µL do reagente dicloropropano (4,46 mmol, 1Eq) foi solubilizado em DMF, e colocado para reagir com 5 Eq de azida de

sódio (22,3 mmol). A mistura foi mantida sob agitação por 72h à temperatura ambiente.

### Síntese dos dímerotriazólicos do *p*-AC

O propargil-acetil-*p*-AC (33,2mg, 0,135mmol, 1 Eq) e o di-azido propano (34mg, 0,27mmol, 2Eq) foram solubilizados em DMF e tratados com ascorbato de sódio (54mg, 0,27mmol, 2Eq) e solução 10% CuSO<sub>4</sub> (0,2Eq), sendo a mistura agitada à temperatura ambiente por cerca de 4h, (CAMPO *et al.*, 2015). A reação foi monitorada por CCD (Hex/AcOEt, 8:2 v/v), o solvente foi removido por pressão reduzida e a mistura foi purificada em coluna clássica cromatográfica por gradiente de eluição (SiO<sub>2</sub>, Hex/AcOEt<sub>2</sub>:8 e DCM/MeOH 9:1). Como etapa futura, parte do dímero triazólico acetilado do *p*-AC **4** obtido será solubilizado em MeOH e misturado em 5Eq de solução 10% KOH. A reação será agitada sob refluxo a 70 °C por cerca de 4h e monitorada por CCD (DCM/MeOH 9:1 v/v). Após resfriamento e extração com éter etílico a mistura será neutralizada com HCl (aq) 1M, sendo a fase aquosa extraída e

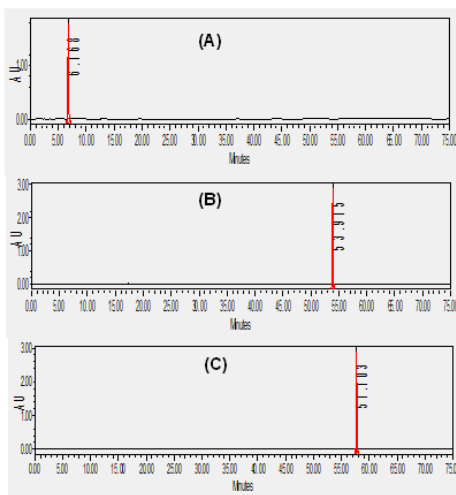
concentrada a vácuo (YASHIRO *et al.*, 2015).

## **Resultados e Discussão**

### **Isolamento do ácido *p*-cumárico, artepelin C e bacarina**

As técnicas cromatográficas CLV e HSCCC originaram um total de 207 e 87 frações, as quais foram reunidas em 21 e 15 subfrações, respectivamente, conforme a semelhança entre os perfis cromatográficos em camada delgada (CCD). Posteriormente, cada reunião, rica na substância desejada, foi purificada por cromatografia preparativa CLAE-UV e confirmadas quanto à pureza e identidade por análises em CLAE-DAD analítico a partir da comparação entre o tempo de retenção e do perfil de absorção em 275 nm com padrões autênticos isolados pelo nosso grupo de pesquisa. Assim, obteve-se de compostos puros cerca de 500 mg de ácido *p*-cumárico, 400 mg de artepelin C e 200 mg de bacarina. Os cromatogramas do ácido *p*-cumárico, artepelin C e da bacarina estão apresentados na Figura 2, e a pureza relativa calculada em 275nm foi de 99%, 97% e 98%, respectivamente.

**Figura 2. Cromatogramas das substâncias isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD). A: Ácido *p*-cumárico 6,7 min; B: Artepelin C – 54,1 min; C: Bacarina – 57,7 min.**



Fonte: os autores

### Síntese de acetil-*p*-ACe propargil-acetil-*p*-AC

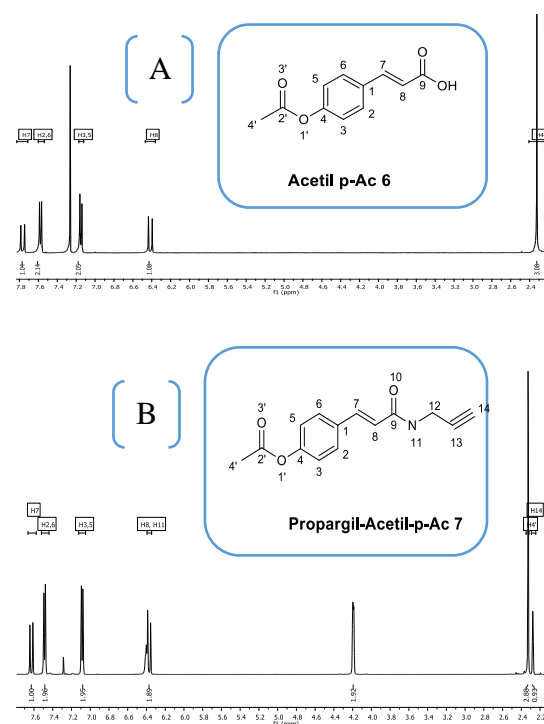
A acetilação da hidroxila fenólica do *p*-Ac foi realizada na presença de piridina/ $\text{Ac}_2\text{O}$ , tendo como objetivo principal aumentar a estabilidade da molécula para as reações subsequentes. O produto acetilado do *p*-Ac **6** foi obtido como um sólido branco com rendimento de 73%.

Na etapa posterior, realizou-se a síntese do derivado alcino do acetil-*p*-AC a partir do produto acetilado **6** e do composto propargilamina, utilizando-se os reagentes de acoplamento PyBOP, HOBT e a base DIPEA (CARVALHO *et al.*, 2013). Desta forma, foi possível isolar o produto propargil-acetil-*p*-Ac

**7** como um óleo ambar com rendimento de 80% após purificação cromatográfica.

Ambas as estruturas foram devidamente confirmadas por análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , conforme Figura 3.

**Figura 3. Estruturas e espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) dos compostos acetil-*p*-Ac **6** (A) e propargil-acetil-*p*-Ac **7** (B).**



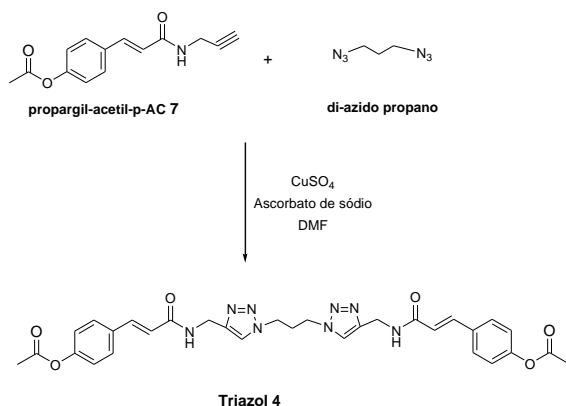
Fonte: os autores

### Síntese do derivado triazólico de *p*-AC

Inicialmente sintetizou-se o derivado di-azido propano, o qual foi obtido como um óleo translúcido com rendimento de 80% em atmosfera inerte pelo tratamento do reagente dicloropropano com azida de sódio em DMF anidro.

Posteriormente, após obtenção dos precursores de alcino **7** e azido citados, realizou-se a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar (“*click chemistry*”) catalisada por Cu(I)-CuAAC, utilizando o sistema catalítico CuSO<sub>4</sub>/ascorbato de sódio em DMF (CAMPO *et al.*, 2015), para obtenção do dímero triazólico acetilado do *p*-AC **4** (Esquema 1), o qual ainda será purificado e confirmado por análise de Ressonância Magnética Nuclear. Como próxima etapa, pretende-se ainda sintetizar e isolar o dímero triazólico desprotegido do *p*-AC **5**.

**Esquema 1. Reação de ciclo-adição 1,3-dipolar (“*click chemistry*”) para obtenção do dímero triazólico acetilado do *p*-AC **4**.**



Fonte: os autores

**Conclusões**

Ambas as técnicas cromatográficas se mostraram adequadas ao isolamento dos três produtos naturais desejados, ácido *p*-

cumárico, artepelin C e baccarina, todos em quantidades suficientes para a realização da semissíntese.

As sínteses do *p*-Ac **6**, do propargil-acetil-*p*-Ac **7** e do dímero triazólico protegido do ácido *p*-cumárico **4** foram realizadas de forma satisfatória a partir dos métodos sintéticos utilizados. Como próxima etapa, pretende-se obter o dímero desprotegido do ácido *p*-cumárico **5**. Os produtos naturais isolados, bem como o derivado triazólico do ácido *p*-cumárico deverão, em breve, ser submetidos a ensaios para avaliação das atividades antitumoral e anti-inflamatória, bem como em modelos de distúrbios neurocomportamentais.

**Referências**

Campo, V. L *et al.* Click chemistry oligomerisation of azido-alkyne-functionalised galactose accesses triazole-linked linear oligomers and macrocycles that inhibit *Trypanosoma cruzi* macrophage invasion. **Tetrahedron** vol. 71, 39, p. 7344-7353, 2015. DOI: 10.1016/j.tet.2015.04.085.

FERREIRA, PAULA SCANAVEZ. Sistema líquido-cristalino como potencial estratégia para administração vaginal de ácido *p*-cumárico no tratamento de candidíase vulvovaginal. **Dissertação de mestrado** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Araraquara, 2020.



Cap. 1. Disponível em:  
<http://hdl.handle.net/11449/192317>

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, ed. 3, p. 447-454, 2008. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000300020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>

MACHADO A. R. M. C. Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf: otimização adextração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais. **Dissertação** (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2011. DOI: 10.11606/D.60.2011.tde-05012012-091655. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.60.2011.tde-05012012-091655>.

MARISTELA B. MARTINS-TEIXEIRA, VANESSA L. CAMPO, MONICA BIONDO, RENATA SESTI-COSTA, ZUMIRA A. CARNEIRO, JOÃO S. SILVA, IVONE CARVALHO.  $\alpha$ -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, Issue 7, p. 1978-1987, 2013. ISSN 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.027>.

MOTTA, E. V. S. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas *Copaifera langsdorffii*. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. DOI: 10.11606/D.60.2014.tde-09042014-084231. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.60.2014.tde-09042014-084231>.

MUSTAFA A., BICAK, T. C., PULIDO, B. A., NUNES, S. P., YAGCI, Y Post modification of acetylene functional poly (oxindolebiphenylene) by photoinduced CuAAC. **European Polymer Journal**, v. 100, p. 298-307, 2018. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2018.02.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.009>

PEDERSEN, D. S., ROSENBOHM, C. Dry column vacuum chromatography. **Synthesis**, v. 16, p. 2431-2434, 2001. DOI: 10.1055/s-2001-18722. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2001-18722>

RODRIGUES, D. M., DE SOUZA, M. C., ARRUDA, C., *et al.* The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, p. 150-162, 2020. DOI: 10.1007/s10886-019-01141-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01141-w>.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81,

Publicado pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas, jan 2002. DOI: 10.1590/S1415-52732002000100008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>

YASHIRO K., HANAYA K., SHOJI M., SUGAI T. New synthesis of artemisinic acid, a prenylated phenol, utilizing lipase-catalyzed regioselective deacetylation as the key step. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 79, p. 1926-19302, 2 dec 2015. DOI:10.1080/09168451.2015.1058704. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058704>