



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8º ENEPE UFGD • 5º EPEX UEMS

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NOVOS DERIVADOS CARBOXAMIDAS OBTIDAS DO ÁCIDO GÁLICO

Thiago Santos Duarte¹; Anelise Samara Nazari Formagio²;

UFGD/FCA – Caixa Postal 533, 79.804-970 – Dourados – MS, E-mail: thiagosantos948@gmail.com

¹Acadêmico do curso de Química-licenciatura e bacharelado, Bolsista de Iniciação Científica UFGD;

²Orientadora, Pesquisadora UFGD-FCA, Bolsista PQ CNPq.

RESUMO

Nos últimos anos vários estudos têm caracterizado diferentes atividades biológicas da *Schinus terebenthifolius* Raddi, entre elas se destacam a atividade adstringente, antioxidante, anti-inflamatória, depurativas e diurética. *Schinus terebenthifolius* Raddi, Anacardiaceae, é uma espécie nativa do Brasil, Argentina e Paraguai. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para a obtenção de derivados com diferentes substituintes, visando um estudo de relação estrutura/atividade. Assim, o objetivo desse trabalho foi sintetizar novos derivados carboxamidas a partir do ácido gálico, e posteriormente realizar ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante destes compostos obtidos. A obtenção dos derivados carboxamidas foi realizada pela reação de esterificação do ácido gálico, seguida pela reação de substituição nucleofílica com várias aminas. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH. Todos os compostos foram obtidos com alto rendimento e caracterizados por cromatografia em camada delgada.

Palavras-chaves: *Schinus terebenthifolius* Raddi, Síntese, Carboxamidas

INTRODUÇÃO

terebenthifolius Raddi, Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira-vermelha, pimenta rosa, é nativa do Brasil, Argentina e Paraguai e vegeta desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. É um fitoterápico largamente empregado no Brasil, e está inserida na relação das sete espécies atualmente selecionadas pelo ministério da saúde, assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para evidenciar suas propriedades

terapêuticas. As partes utilizadas como medicinais são casca, folhas e frutos. São adstringentes, antidiarreicas, anti-inflamatórias, depurativas, diuréticas e febrífugas. As folhas e as cascas são ricas em taninos, em flavonóides e em óleo essencial; as saponinas estão restritas as cascas. Os frutos contém ácidos e triterpenos. As cascas possuem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas em geral. Às folhas e frutos são atribuídos propriedades antibióticas. As atividades antibacteriana e antifúngica do extrato de caules e folhas, possivelmente, estejam associadas à presença de taninos, alcalóides, esteróides, chalconas e urundeuvinas. As folhas contém mircetina, ácido gálico, quercetina, capferol, leucocianindina e b-sitosterol (JAIN et al., 1995; MARTINEZ et al., 1996; SILVA JÚNIOR, 1999; BORNHAUSEN, 2002; DI STASI et al., 2002; DEGÁSPARI et al., 2004; 2005 ; RIBAS et al., 2006;)

A investigação fitoquímica de *S. terebenthifolius* é de grande importância, pois o isolamento de princípios ativos e a modificação química destes podem resultar na descoberta de novos produtos com aplicação terapêutica.

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (HASLAM, 1996; ROESLER et al., 2007).

Os antioxidantes, sejam natural ou sintético, possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular, e por isso desempenham papel fundamental na prevenção à oxidação de substâncias. Sendo assim, os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparado a um substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse substrato (AUST et al., 2001; HANDELMAN, 2001).

Compostos fenólicos têm sido muito estudados, pela sua influência na qualidade dos alimentos e pela sua constituição que apresenta propriedades antioxidantes (SOARES, 2002). Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos alimentos e conseqüentemente ao organismo, sendo, por

isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY *et al.*, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON *et al.*, 1999). A proteção contra doenças por compostos fenólicos é mediada por propriedades antioxidantes (KURODA *et al.*, 1999), por meio da ação de captura de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio.

Compostos fenólicos como ácido gálico, ocorrem naturalmente em plantas como uma molécula livre ou como parte da molécula de ácido tânico e apresentam importantes atividades biológicas em vários estudos, dentre elas anti-inflamatória (BRAGT *et al.*, 1980), antioxidante (SOHI *et al.*, 2003) e antitumoral (MODAL *et al.*, 2001). Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas amplamente encontradas na natureza. Possuem um ou mais átomos de nitrogênio e podem estar presentes em sua estrutura, geralmente na forma de aminas primárias, secundárias ou terciárias. Devido às propriedades do ácido gálico, o objetivo deste trabalho foi sintetizar novos derivados carboxamidas a partir do ácido gálico e realizar ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante.

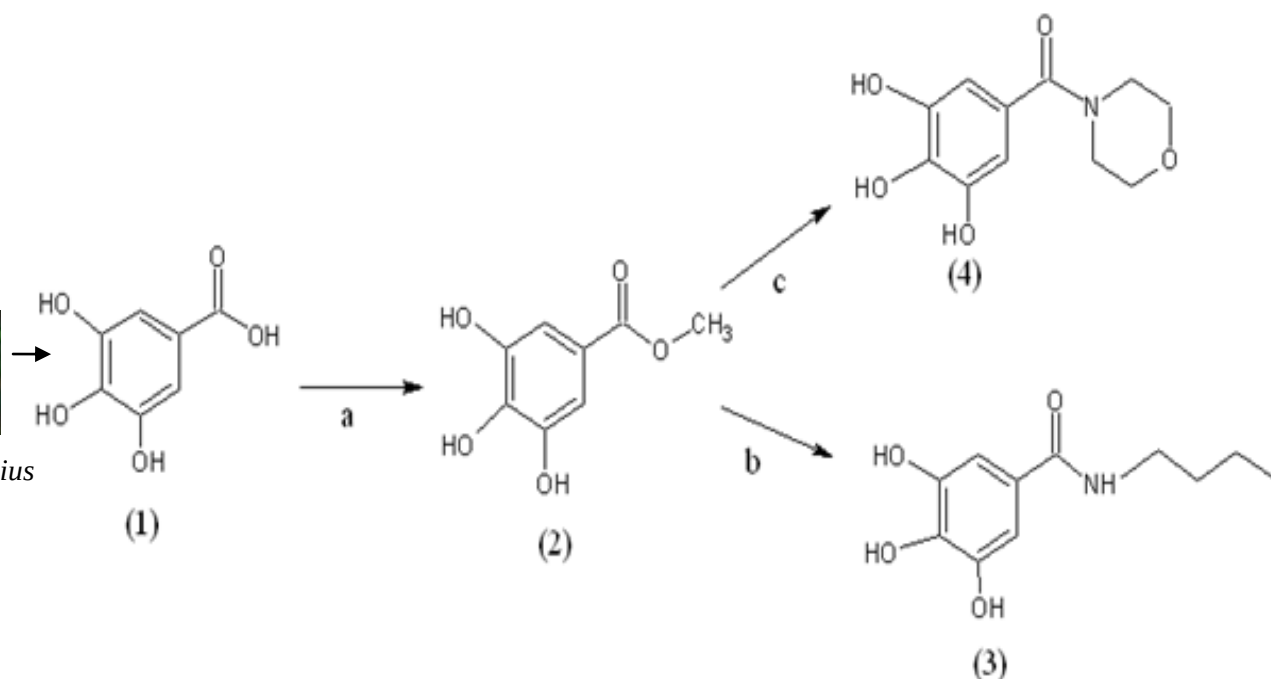
METODOLOGIA

As folhas de *S. terebinthifolius* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFGD. O material vegetal após seco ao ar e moído foi extraído por maceração com metanol a frio. Após filtração e remoção do solvente sob vácuo em evaporador rotativo e temperatura de no máximo 60 °C, foi obtido o extrato metanólico. Em seguida o extrato foi dissolvido em metanol/água 1:1 e particionado sucessivamente em hexano (150,0 mL), clorofórmio (150,0 mL) e acetato de etila (150,0 mL). Após remoção dos solventes têm-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica. Da fração clorofórmio foi isolado o ácido gálico (**1**) por cromatografia em coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano, hexano:clorofórmio em gradiente de polaridade e metanol.

A rota proposta para a síntese dos novos compostos derivados do ácido gálico, mais especificamente, de derivados contendo o grupo carboxamida, estão apresentadas no **Esquema 1**.



S. terebinthifolius



Esquema 1: (a) CH_3OH , H_2SO_4 , reflux. 48h; (b) Galato de metila, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}$, EtOH , reflux. 72h; (c) Galato de metila, $\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$, EtOH , reflux. 72h.

Preparação do metil galato (2)

A uma solução do ácido gálico, em MeOH foi adicionado H_2SO_4 conc. A solução foi mantida sob refluxo e agitação por aproximadamente 48h. Após evaporação de todo metanol, o produto foi neutralizado com uma solução de bicarbonato de sódio 10%. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila, seca com sulfato de sódio anidro e, após filtragem do secante, o solvente foi removido em rotaevaporador.

Preparação dos derivados carboxamidas (3-4)

A uma solução do derivado (2) em etanol, foi adicionado 12 mmol da respectiva amina (3-4). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 72h. O precipitado formado foi filtrado em funil de Büchner e lavado com etanol.

Avaliação da atividade antioxidante

A investigação da atividade antioxidante do extrato metanólico e dos derivados foi realizada pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), utilizando como controle positivo o BHT. O método consiste

no monitoramento do consumo do radical livre DPPH[•] pelas amostras, através do decréscimo da medida de absorbância. Alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH 0,004% e incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância de cada amostra foi realizada no espectrofômetro a 515 nm (BLOIS, 1958). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: % I = (A₀ – A)/A₀ x 100. Onde A₀ é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH.

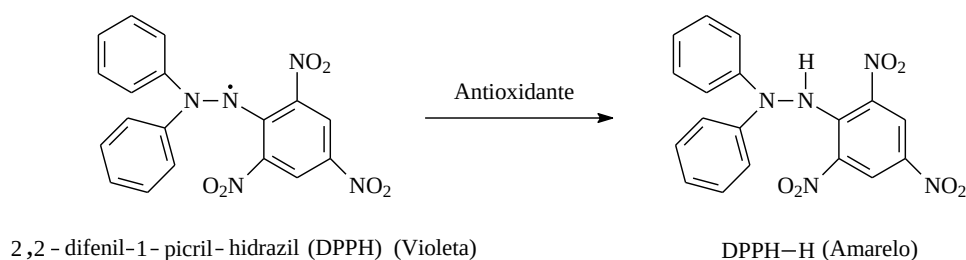


Figura 1- Descoloração do radical livre DPPH

RESULTADOS

O galato de metila (**2**) foi obtido através da esterificação entre o ácido gálico (**1**) e metanol em presença do ácido sulfúrico como catalisador, com 96% de rendimento. A esterificação completa do composto de partida foi visualizada por cromatografia em camada delgada CCD.

A obtenção do composto (**2**) foi confirmada pela presença de um singlete em δ_H 3,73 com integral para três hidrogênios, pelo espectro de RMN ¹H, atribuído à metoxila do éster. Os sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,92 ppm com integral para dois hidrogênios, corresponde aos H2/H6 (Figura 2).

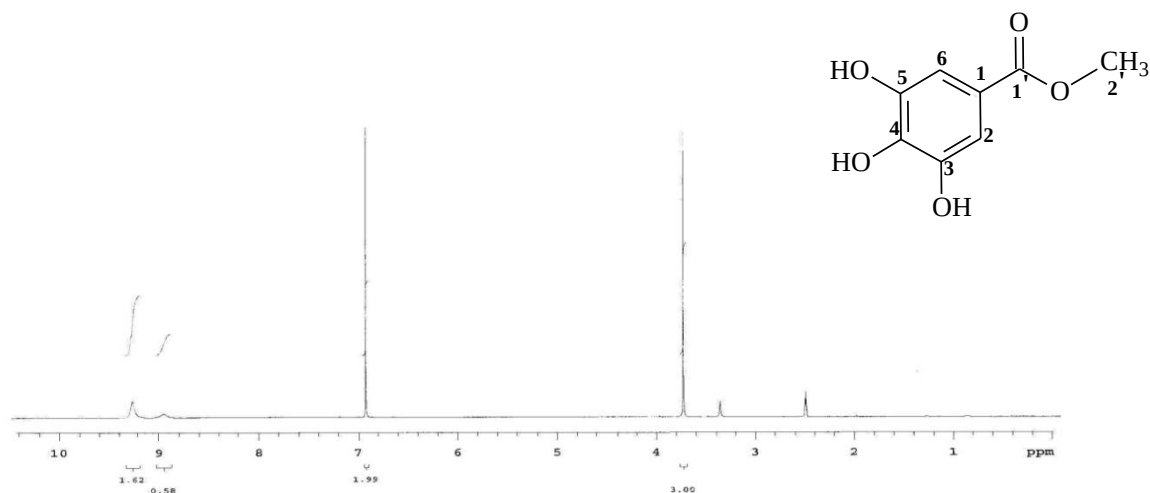


Figura 2 – Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO- d_6) do galato de metila (**II**).

O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais na região de δ_{C} 166,3, característico de carbonila de éster de um carbono oximetílico em δ_{C} 54,9, confirmando a esterificação (**Figura 3**).

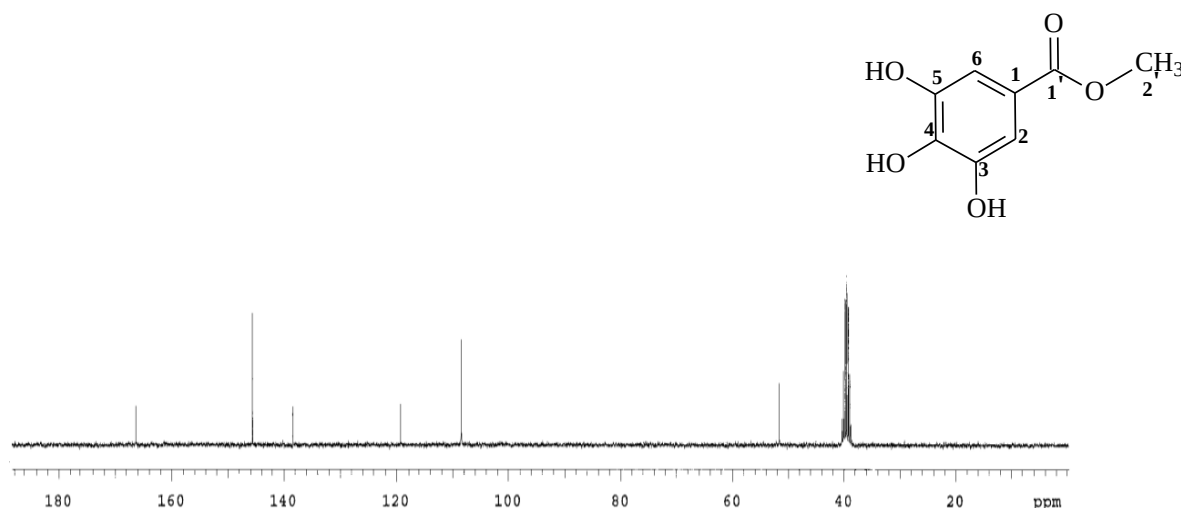


Figura 3 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO) do galato de metila (**II**).

Os derivados butilamina (**3**) e morpholine (**4**) foram obtidos através da reação de esterificação do ácido gálico (**1**), seguida pela reação de substituição nucleofílica ao galato de metila (**2**), com as respectivas aminas. A obtenção do composto (**3**) e do composto (**4**) foi confirmada pela visualização das placas de cromatografia em camada delgada CCD (**Figura 4**).

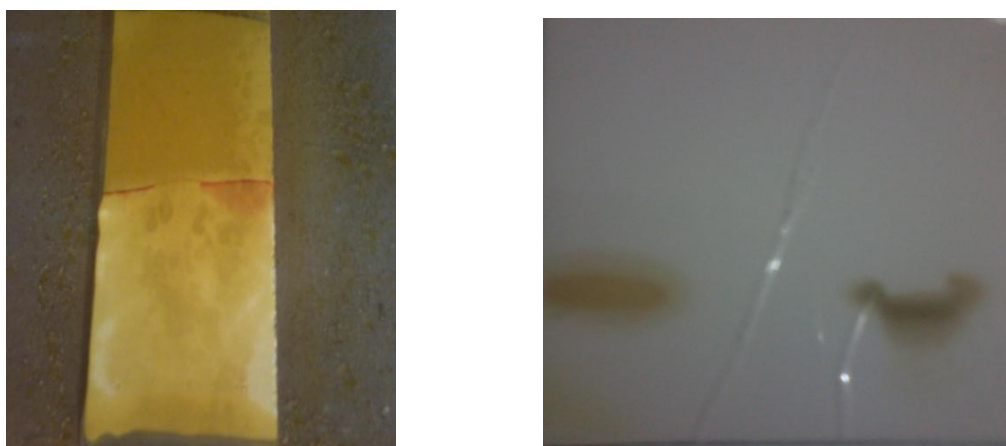


Figura 4- Placas de cromatografia em camada delgada (CCD) do composto (**3**) e do composto (**4**).

Devido a importância da pesquisa de novos agentes antioxidantes, foi realizada a avaliação da atividade antioxidante do substrato e de todos os compostos sintetizados, a fim de tentar realizar um estudo de relação estrutura/atividade.

Os resultados da avaliação antioxidante dos compostos estão apresentados na **Figura 5, Tabela 1.**

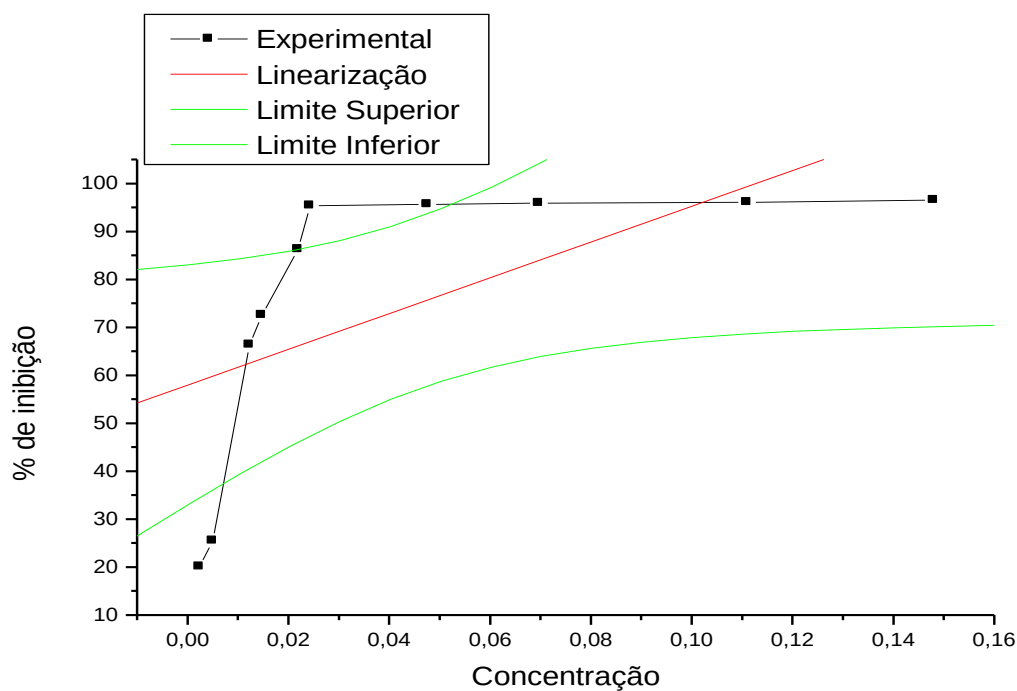


Figura 5 - Resultado da avaliação antioxidante do metil galato (2).

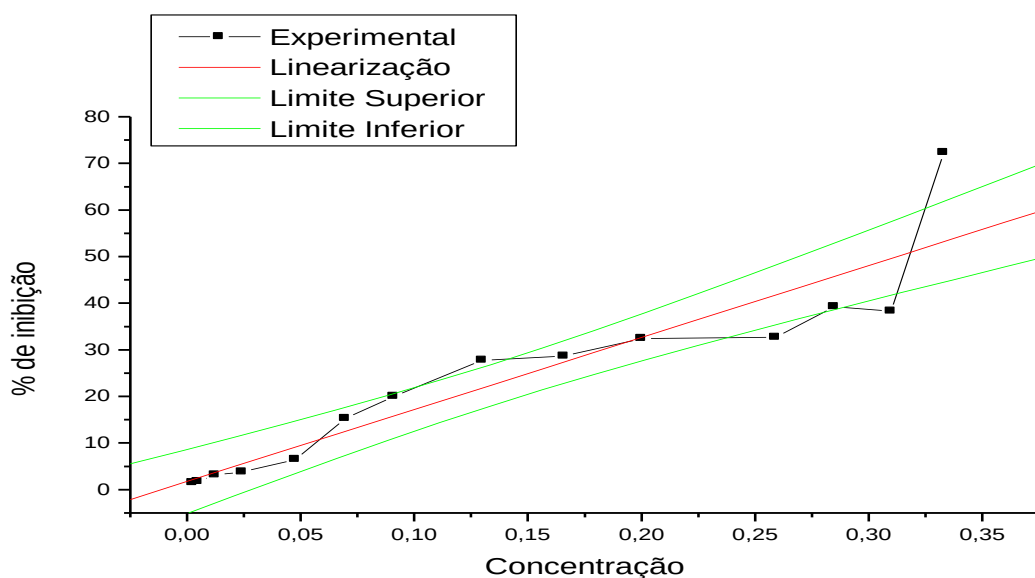


Figura 6- Resultado da avaliação antioxidante da Butilamina (3-a).

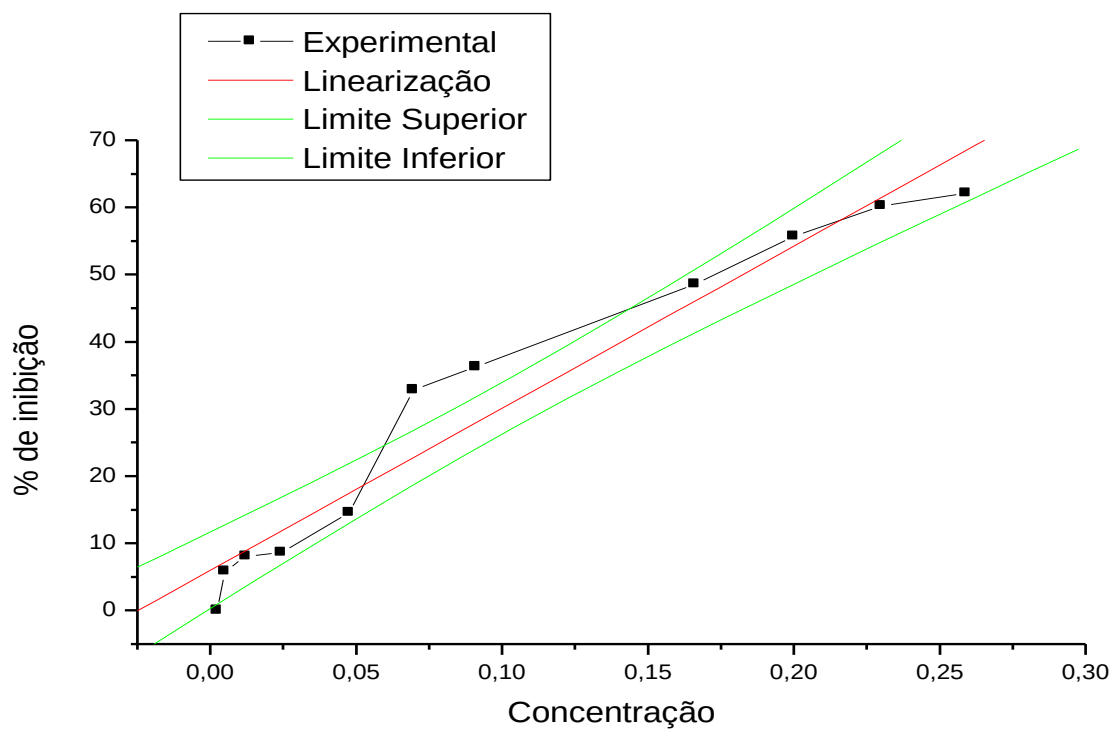


Figura 7 – Resultado da avaliação antioxidante da Butilamina (3-b).

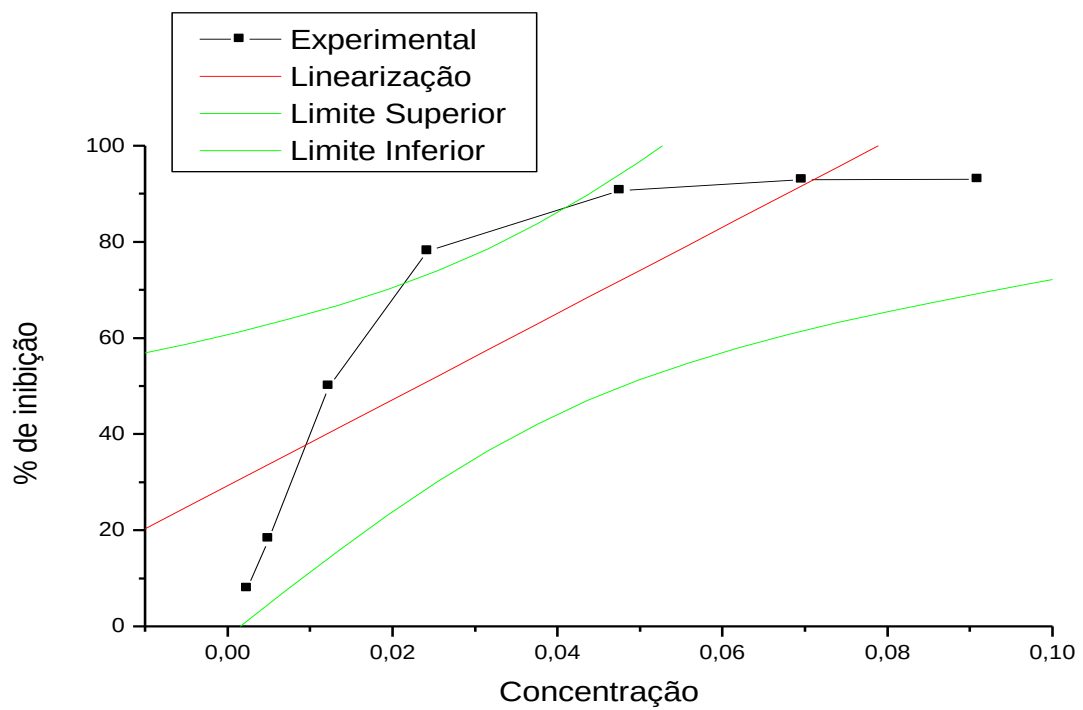


Figura 8- Resultado da avaliação antioxidante da morpholine (4-a).

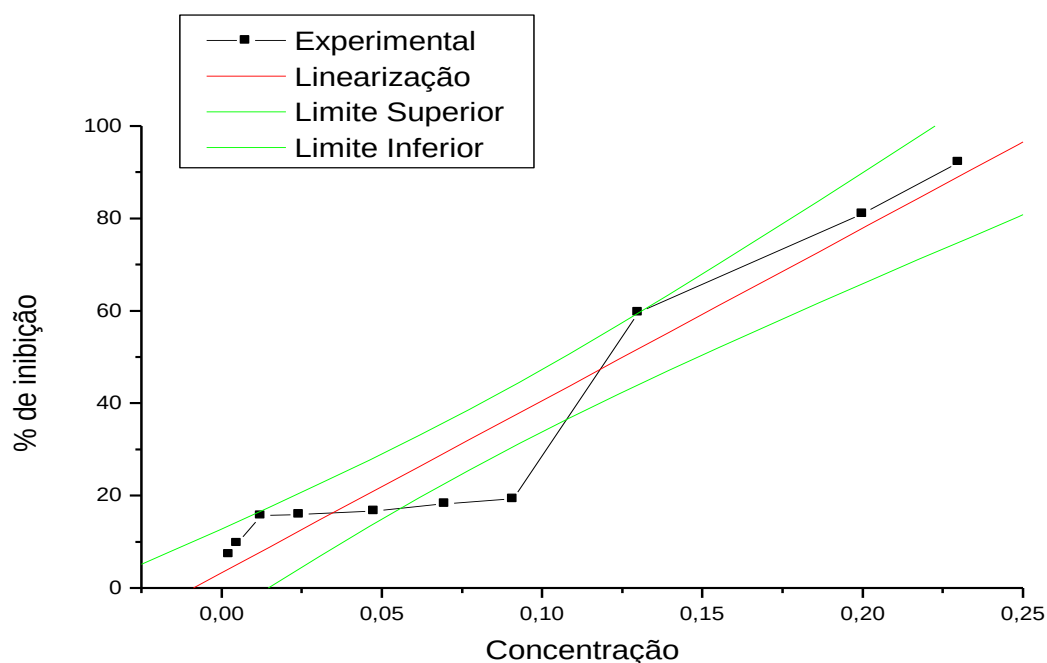


Figura 9- Resultado da avaliação antioxidante da morpholine (4-b).

Tabela 1. Dados da avaliação antioxidante dos compostos 2, 3, 4 e 5.

Composto	IC ₅₀ (μg/ml)
(1) Ácido gálico	6,34
(3-a) Butilamina	3,23
(3-b) Butilamina	3,09
(4-a) Morpholine	1,13
(4-b) Morpholine	2,98
BHT	16,9

A análise dos dados da Tabela 1 da avaliação da atividade antioxidante pelo método de descoloramento do radical livre DPPH, mostrou que o derivado carboxamida com o grupo morfolina (4) foi a mais ativa, com o IC₅₀ = 1,13 μg/ml, apresentando assim maior capacidade “sequestradora” de radicais livres.

O substrato ácido gálico (1) apresentou moderada atividade antioxidante quando comparado com o padrão BHT. O substrato (ácido gálico) é considerado também como composto padrão para avaliação da atividade antioxidante em diversos trabalhos da literatura.

CONCLUSÕES

No presente trabalho foram obtidos e caracterizados vários compostos derivados do ácido gálico, como: metil galato (II), Butilamina (III) e Morpholine (IV), tendo como rendimento 92%, 87% e 76% respectivamente.

A obtenção dos derivados carboxamidas foi realizada pela reação de esterificação do ácido gálico, seguida pela reação de substituição nucleofílica com as respectivas aminas.

Os ensaios para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de descoramento do radical livre DPPH, mostraram que os derivados carboxamidas obtidos, apresentaram potente capacidade seqüestradora de radicais livres, apresentando assim uma boa atividade antioxidante.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Capes e a UFGD-FCA.

REFÊRENCIAS

AUST, O.; SIES, H.; STAHL, W.; POLIDORI, M. C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography**, v. 936, n. 1, p. 83-93, 2001.

BORNHAUSEN, R. Ervas do sítio. Disponível em: <http://www.ervasdositoio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of stable free radicals. **Nature**, v.181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BRAGT P. C.; BANSBERG J. I.; BONTA I. L. Antiinflammatory effects of free radical scavengers and antioxidants. **Inflammation**. v. 4, n. 3, p. 289-299, 1980.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 854, p. 435-442, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. dos. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p.83-90, 2004.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p.69-91, 2002.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 17-25, 1999.

HANDELMAN, G. J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 818-822, 2001.

HASLAM, E. "Natural Polyphenols as drugs: possible modes of action". **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibits low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Research**, v. 436, p. 69-97, 1999.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants activity for antimicrobial. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.171-174, 1996.

MODAL, K. C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B. R. Colorimetric assay method for determination of the Tannin Acyl Hydrolase activity. **Analytical Biochemistry**, V. 295, p. 168-171. 2001.

RIBAS, M. de O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v.21, n.53, p.245-252, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. , p. 53-60, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOHI, K. K.; MITTAL, N.; HUNDAL, M. K.; KHANDUJA, K. L. Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**.v. 49, n. 4, p. 221-227, 2003.