

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SÍNTESE DE DERIVADOS TRITERPÊNICOS
DA MISTURA DE α - E β - AMIRINA ISOLADAS DE ESPÉCIES DE *PROTIUM*
(BURCERACEAE) DA AMAZÔNIA

Bolsista: Orlando Amazonas da Rocha Loureiro Paes, CNPq

MANAUS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB – E – 0017/2008
SÍNTESE DE DERIVADOS TRITERPÊNICOS
DA MISTURA DE α - E β - AMIRINA ISOLADAS DE ESPÉCIES DE *PROTIUM*
(BURCERACEAE) DA AMAZÔNIA

Bolsista: Orlando Amazonas da Rocha Loureiro Paes, CNPq
Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS
2009

Resumo

No ramo farmacológico os ésteres derivados de α - e β - amirina estão demonstrando cada vez mais importância. Na literatura científica há relatos de que estas substâncias possuem atividade antinociceptiva em camundongos. Desta maneira observa-se a necessidade de se realizar novos testes que comprovem outras atividades, assim como sintetizar de novos derivados. Reações com cloretos de acila e por esterificação em meio ácido foram os métodos utilizados na produção destes ésteres de cadeia longa. A esterificação (condensação) foi o método que demonstrou ser mais viável. A formação de derivados através de cloretos de acila provou ser mais demorada e dispendiosa, visto que ocorre em duas etapas e utiliza-se reagente caros. As partições líquido/líquido e com coluna cromatográfica foram empregadas para isolar e purificar os derivados esperados. Análises por espectroscopia em infravermelho foram realizadas de forma a observar e monitorar a formação dos produtos. Ao final, sete reações foram realizadas utilizando métodos diferentes de detalhamento experimental. Estes resultados nos impulsionaram a continuar modificando vertentes (temperatura, tempo), assim como o sistema das reações, de forma a obter produtos que demonstrem bioatividade.

In the pharmacological field, the esters derived from α -and β -amyrin are increasingly showing their importance. At scientific literature can be found papers proving that this kind of substance pursue anti-nociceptive activity in mice. Thus, there is a need to conduct further tests that can prove other activities, as well as the synthesise new derivatives. Reaction with acyl chlorides and by esterification in acid medium were the methods used in the production of the long chain esters. Esterification (condensation) was the method that proved to be more viable. The formation of derivatives by acyl chlorides proved to be costly and time consuming since it occurs in two steps and uses up expensive reagent. Partitions liquid / liquid and chromatography column were employed to isolate and purify the products. Infrared spectroscopy was performed to analyse and detect the products obtained. A total of seven different experimental conditions were performed using different experimental design. These results encouraged us to continue changing aspects (temperature, time) as well as the reaction system, in order to obtain bioactive products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Espectro da α- e β- amirina.</i>	14
Figura 2. <i>Espectro do ácido esteárico.</i>	14
Figura 3. <i>Espectro da fração um da segunda reação.</i>	15
Figura 4. <i>Espectro da fração três da segunda reação.</i>	15
Figura 5. <i>Espectro da sexta reação.</i>	16
Figura 6. <i>Espectro da mistura na sétima reação.</i>	16

LISTA DE SÍMBOLOS

IV – INFRAVERMELHO

°C – GRAUS CELCIUS

KBr – BROMETO DE POTÁSSIO

PCl₃ – TRICLORETO DE FÓSFORO

PCl₅ – PENTACLORETO DE FÓSFORO

CCD – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

KOH – HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

SOCl₂ – CLORETO DE TIONILA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Família Burceraceae	09
2.2 Método de formação de Cloretos de Acila e Ésteres	09
3 METODOLOGIA	
3.1 Isolamento da α- e β- amirina	11
3.2 Reações de Esterificação	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1 Isolamento e Purificação da α- e β- amirina	12
4.2 Premissas para as reações de Esterificação	12
4.3 Síntese do Estearato de α- e β- amirina	13
5 CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CRONOGRAMA EXECUTADO	20

Pesquisas voltadas para a química de produtos naturais vêm crescendo constantemente. Pesquisadores têm buscado em métodos sintéticos a obtenção de diversas substâncias que são difíceis de serem encontradas na natureza ou que não são encontradas de forma alguma. Essa linha de trabalho tem mostrado resultados significativos ao meio científico, possibilitando o descobrimento e aperfeiçoamento de substâncias com importantes atividades biológicas.

Diversos compostos naturais extraídos de plantas localizadas em diversas partes do mundo estão passando por processos de alteração e aperfeiçoamento. Entre as classes mais utilizadas podemos salientar os terpenóides. Estes metabólitos são de considerável valor para a área farmacológica.

Em recente artigo de revisão do gênero *Protium*, pertencente à família Burseraceae, foram descritas várias atividades farmacológicas para os triterpenos e extratos obtidos destas árvores.^[1] Estudos mostrando a relação estrutura química/atividade biológica de triterpenos encontram-se bem representados na literatura, onde modificações estruturais são obtidas objetivando a potencialização da ação farmacológica do triterpeno de partida.^[2] Modificações estruturais nos triterpenos α - e β -amirina foram realizadas utilizando ácidos de cadeia curta e os mesmos apresentaram altas atividades antinociceptivas. Este estudo demonstra a necessidade de realizar sínteses utilizando ácidos de peso molecular elevado buscando avaliar o potencial biológico destas modificações estruturais.

2.1 Família Burseraceae

A família Burseraceae tem alta representatividade na Floresta Ombrófila Amazônica, sendo registrada como uma das mais ricas em espécies,^[3,4,5,6,7] mas em trechos de Floresta Estacional Perenifólia esta família não está entre as mais ricas.^[8]

Alguns gêneros da família Burseraceae (*Elaphrium*, *Icica*, *Canarium* e *Protium*) são produtores de resinas oleosas. Estas resinas são conhecidas genericamente como elemi e são constituídas de triterpenos tetracíclicos, como os ácidos elemadienólico e elemadienônico, e pentacíclicos, como α - e β - amirinas, maniladiol e breína entre outros.^[9,10]

A resina das espécies do gênero *Protium* é utilizada, popularmente, para iluminação e para calafetar canoas, além do uso no preparo da tinta ou verniz preto.^[11,12] As folhas são usadas por serem aromáticas e, em algumas espécies, os frutos são comestíveis.^[13] Além disso, partes das plantas (cascas e folhas) são reconhecidas na medicina popular como antiinflamatório, antitumoral e adstringente.^[14]

2.2 Método de formação de Cloretos de Acila e Ésteres

Os cloretos de acila são os mais reativos dos derivados de ácido, devendo ser utilizados reagentes especiais para prepará-los. Utilizamos também os cloretos de ácidos inorgânicos: o PCl_5 (um cloreto de ácido fosfórico), o PCl_3 (um cloreto de ácido fosforoso), e o SOCl_2 (um cloreto de ácido sulfuroso).^[15]

Todas essas reações envolvem adição nucleofílica-eliminação de um íon cloreto em um intermediário altamente reativo: um clorossulfito de acila protonado, um clorofosfito de acila protonado, ou um clorofosfato de acila protonado. Esses intermediários contêm grupos abandonadores de acila até melhores do que o produto cloreto de acila. O cloreto de tionila, por exemplo, reage com um ácido carboxílico da seguinte maneira:^[15]

O uso do cloreto de tionila (SOCl_2) é particularmente cômodo, em virtude de os resultantes que se formam, além do cloreto de acila, serem gases e, por isso, facilmente separáveis dele. Qualquer excesso de cloreto de tionila é facilmente removido por destilação, dado que este reagente ferve a baixa temperatura (79°C).^[16] Esta reação é muito útil, embora outros grupos funcionais porventura existentes na molécula que

poderiam reagir com o cloreto de tionila ou com o cloreto produzido possam interferir.^[17] Para converter ácidos em ésteres utilizam-se freqüentemente cloretos de acila.^[16]

Os ácidos carboxílicos reagem com álcoois para formar ésteres através de uma reação de condensação conhecida como esterificação:

As esterificações catalisadas por ácido são chamadas de esterificações de Fischer. Elas ocorrem muito lentamente na ausência de ácidos fortes, mas atingem o equilíbrio em questão de poucas horas quando um ácido e um álcool são refluxados com uma pequena quantidade de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico concentrados. Uma vez que a posição do equilíbrio controla a quantidade de éster formada, a utilização de um excesso de ácido carboxílico ou de álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante, assim como a retirada da água formada desloca o equilíbrio no sentido da formação de produtos. Exatamente qual componente escolheremos para utilizar em excesso dependerá da remoção da água da mistura da reação a medida que ela é formada.^[15]

A natureza reversível da reação representa uma desvantagem na preparação dos ésteres diretamente a partir dos ácidos. A preferência pela via indireta através do cloreto de acila deve-se ao fato de ambas as operações — obtenção do cloreto de acila, a partir do ácido, e preparação do éster, a partir do cloreto de acila — serem essencialmente irreversíveis e se produzirem até ao esgotamento dos reagentes. Contudo a esterificação direta tem a vantagem de ser uma síntese de uma só operação.^[16]

2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cromatografia é um processo químico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura.^[18]

Na cromatografia em camada delgada (CCD), a fase estacionária é uma camada fina formada por um sólido granulado (sílica, alumina, poliamida, etc.) depositado sobre uma placa de vidro, alumínio ou outro suporte inerte.^[18-19]

3.1 Isolamento da α - e β - amirina

A resina de Burseraceae do gênero *Protium sp.* foi coletada na Reserva de Campina (INPA) na AM 010. Triturou-se sua óleo-resina manualmente com almofariz e pistilo, transferiu-se 100g para um béquer de um litro e adicionou-se 250mL de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). A mistura permaneceu sob agitação e a uma temperatura de 60°C por cerca 20 minutos. Filtrou-se o extrato em papel de filtro e resfriou-o em temperatura ambiente. Os cristais formados foram transferidos para um recipiente com etanol puro, sendo novamente aquecidos e deixados em repouso. Efetuou-se esta recristalização até os cristais apresentarem coloração branca.

Através de uma bureta com 2cm de diâmetro, sílica impregnada com KOH, diclorometano como a fase móvel e algodão, realizou-se cromatografia em coluna clássica nos cristais obtidos na recristalização. O solvente foi recolhido em três frações sendo a primeira a que continha os terpenos.

3.2 Reações de Esterificação

Foram utilizados dois sistemas, o primeiro foi composto por um balão de três bocas conectado a um condensador e uma chapa aquecedora (A) e o segundo por balão de três bocas, condensador, dean-stark e uma chapa de aquecimento (B).

Tabela 1. Processos e vertentes das reações de esterificação.

	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta	Sexta	Sétima
Método	Esterificação	Esterificação	Halogenação /Esterificação	Esterificação	Esterificação	Esterificação	Esterificação
Reagente	H_2SO_4	H_2SO_4	SOCl_2 /Piridina/ H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4
Meio Reacional	Hexano	Hexano	Hexano	Hexano	Hexano	Tolueno	Tolueno
Temperatura	55°C	55°C	55°C	60°C	100°C	100°C	130°C
Tempo de Duração	5 horas	7h e 30min.	5 horas	7h e 30min.	7h e 30min.	7h e 30min.	7h e 30min.
Método de Partição	Líquido/líquido	Líquido/líquido	Líquido/líquido	Líquido/líquido	Líquido/líquido	CC	CC
Solvente da Partição	DCM/Metanol	DCM/Metanol	Hexano/ H_2O	DCM/Metanol	DCM/Metanol	DCM/Metanol	DCM/Metanol
Aparelhagem	A	A	A	A	A	B	B

4.1 Isolamento e Purificação da α - e β - amirina

O uso do etanol no processo de recristalização se deu por ser um solvente que apresenta uma polaridade (5,2) compatível com a α - e β - amirina e também por só solubilizar a mostra a quente, permitindo deste modo a cristalização dos terpenos desejados. O extrato etanólico ao ser resfriado a temperatura ambiente, apresentou a formação de cristais e estes tiveram que ser purificados para eliminação de agentes contaminantes.

A cromatografia em camada delgada dos cristais recristalizados mostrou um certo grau de impureza. Esta análise nos evidenciou a necessidade de se realizar uma purificação em bureta com sílica empregada com KOH, retendo os ácidos presentes nos cristais.

4.2 Premissas para as reações de Esterificação

As estruturas moleculares dos reagentes (α - e β - amirina e ácidos graxos) apresentavam cadeias carbônicas longas e volumosas, nos indicando a provável ocorrência de impedimentos nos pontos das moléculas onde as reações se processariam. Devido estes fatores os mecanismos de condensação (esterificação) e reações com cloretos de ácido, foram os mais aceitos para as reações, não sendo descartadas possíveis alterações por reações de adição.

Os valores obtidos para os ácidos graxos foram dobrados, com o intuito de gerar um aumento na probabilidade de se efetuar as reações.

Reação: Ácido Esteárico / α - e β - amirina

Massas moleculares: 284,48g/mol ----- 426,73g/mol

Massas a serem pesadas: Xg -----100mg = 0,1g

$X = 66,67\text{mg} \times 2 = 133,34\text{mg}$ de ácido esteárico.

4.3 Discussão das reações de síntese do Estearato de α - e β - amirina

Os espectros de infravermelho da α - e β - amirina e do ácido esteárico possibilitaram-nos utilizar métodos comparativos com os espectros dos produtos obtidos nas reações de síntese. Todos os espectros com exceção de um, demonstraram ser muito similares ao espectro das amirinas. Isso foi visível devido a falta da banda de absorção em $1820-1630\text{ cm}^{-1}$ referente ao forte estiramento da deformação axial da carbonila (C=O). O espectro que foi exceção, apesar de apresentar o forte estiramento característico de carbonilas, se mostrou mais semelhante ao espectro do ácido esteárico do que ao de um possível éster (Figura 3).

As modificações estruturais nas moléculas de ácido esteárico e α - e β - amirina se mostraram difíceis de realizar. O sistema reacional "A" foi o que nos possibilitou a obtenção mais próxima do produto esperado, devido a presença de um aparente pó branco característico de ésteres, todavia, nos dificultou a retirada da água produzida pela esterificação. Já o sistema "B" demonstrou ser eficiente na retirada da água do meio através do dean-stark, mas nos induziu a utilização de um solvente com um ponto de ebulição acima de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ponto de ebulição da água), para compor o meio reacional.

Dentre as reações efetuadas o método de esterificação em meio ácido, demonstrou ser o mais simples, seguro e menos dispendioso se comparado ao método de esterificação com cloretos de ácido, o qual apresentava alto risco, custo e maior número de etapas reacionais. Impedimentos intermoleculares decorrentes de suas cadeias carbônicas longas e volumosas, juntamente com metodologia inviável para tais reações, não nos possibilitaram resultados significativos para a realização dos ensaios biológicos.

As reações de síntese para obtenção do undecelenoato de α - e β - amirina, linoleato de α - e β - amirina e copalato de α - e β - amirina, assim como o isolamento do ácido copálico da amostra de *Copeifera multijuga*, foram interrompidos em decorrência das tentativas de otimização do método inicial que extrapolaram o tempo previsto.

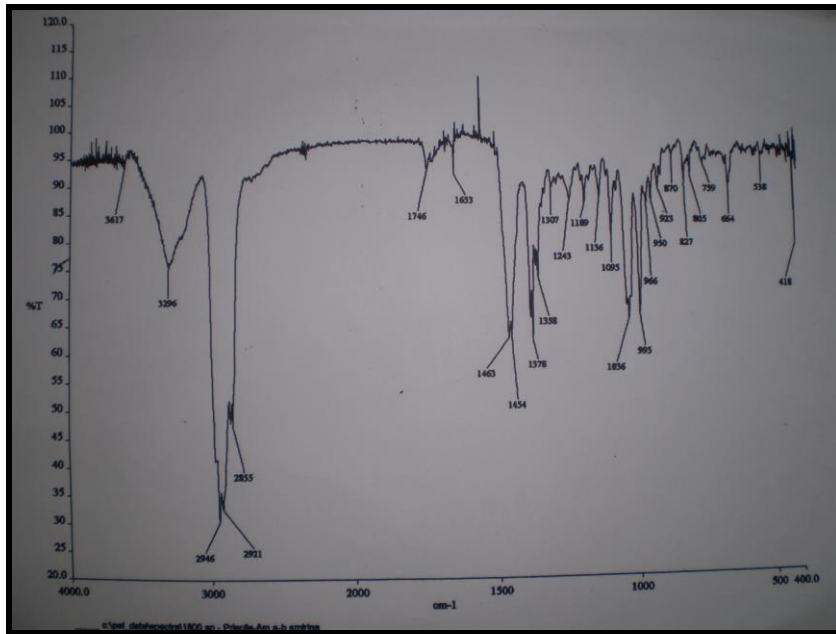


Figura 1. Espectro da α - e β - amirina.

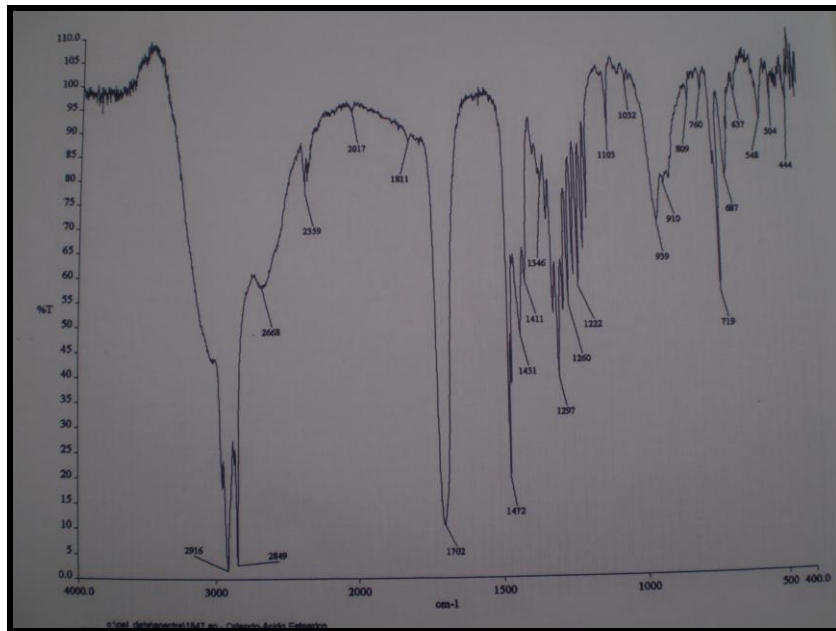


Figura 2. Espectro do ácido esteárico.

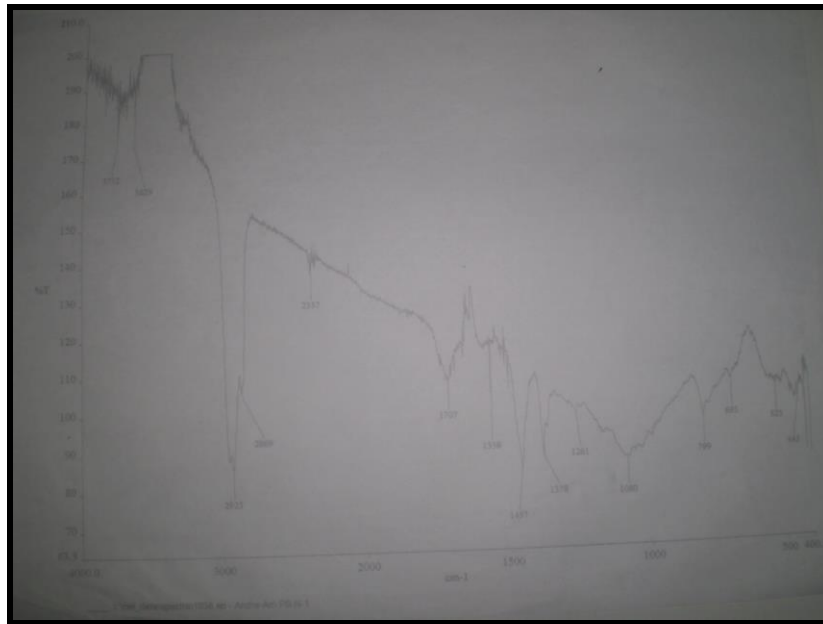


Figura 3. *Espectro da fração um da segunda reação.*

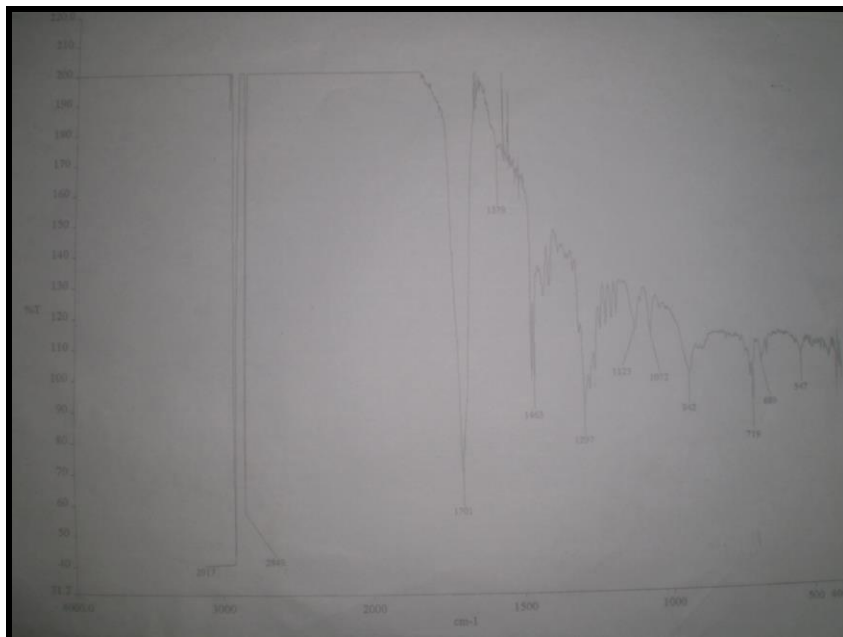


Figura 4. *Espectro da fração três da segunda reação.*

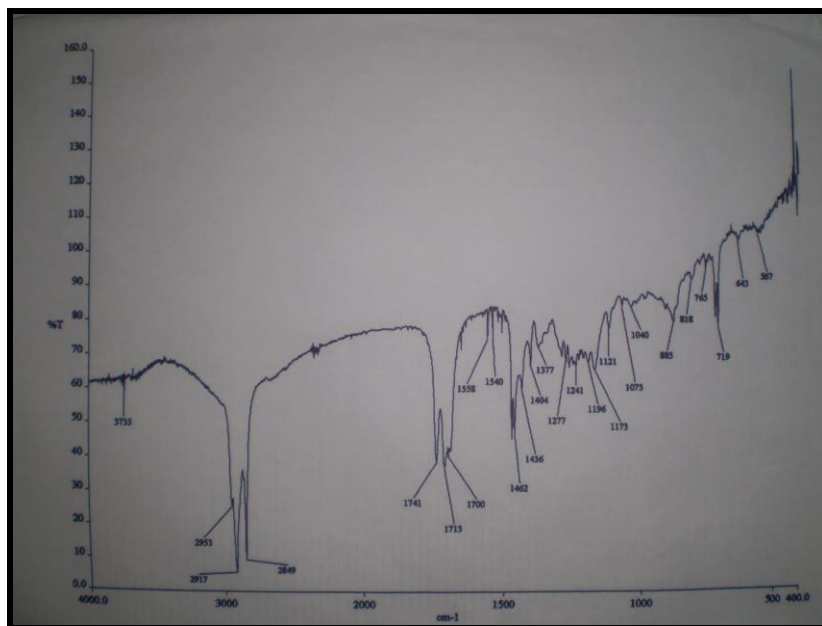


Figura 5. Espectro da sexta reação.

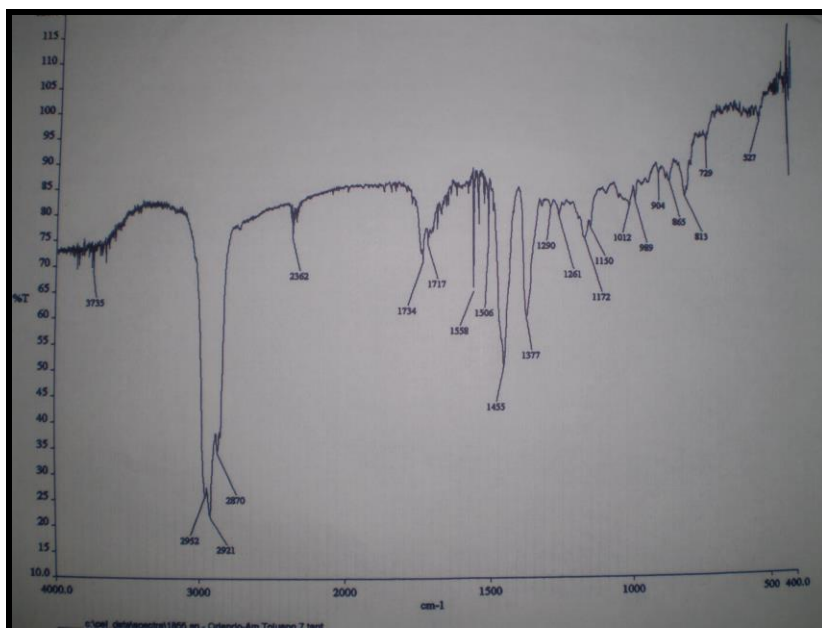


Figura 6. Espectro da mistura na sétima reação.

5. CONCLUSÃO

A síntese dos ésteres a partir de ácidos graxos e álcoois, ambos compostos por cadeias carbônicas longas e volumosas, mostrou-se de difícil obtenção. Os processos realizados não possibilitaram a formação dos produtos esperados. Impedimentos moleculares decorrentes de suas longas cadeias, juntamente com os aparelhos e condições se mostraram insuficientes para essa produção.

Referências Bibliográficas

- [1] RÜDIGER, A.L.; SIANI, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. *The chemistry and pharmacology of the South America genus Protium Burm. f. (Burseraceae)*. **Pharmacognosy Reviews**, v.1, n.1, p.93-104, 2007.
- [2] KAPOOR VK, CHAWLA AS 1986. *Biological significance of triterpenoids*. *J Scien Ind Res* 45: 503-511.
- [3] SILVA, M.F.F.; Rosa, N.A.; SALOMÃO, R.P. 1986. *Estudos botânicos na área do Projeto Ferro Carajás. 3. Aspectos florísticos da Mata do Aeroporto de Serra Norte, Pará*. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**, 2(2): 169-187.
- [4] MORI, S.A.; RABELO, B.V.; TSOU, C.; DALY, D. 1989. *Composition and structure of an eastern amazonian forest at Camaipi, Amapa, Brazil*. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**, 5(1): 3-18.
- [5] MATOS, F.D.A.; AMARAL, I.L. 1999. *Análise ecológica de um hectare em floresta ombrófila densa de terra-firme, Estrada da Várzea, Amazonas, Brasil*. **Acta Amazonica**, 29(3): 365-379.
- [6] LIMA-FILHO, D.A.; MATOS, F.D.A.; AMARAL, I.L.; REVILLA, J.; COELHO, L.S.; RAMOS, J.F.; SANTOS, J.L. 2001. *Inventário florístico de floresta ombrófila densa de terra firme, na região do Rio Urucu-Amazonas, Brasil*. **Acta Amazonica**, 31(4): 565-579.
- [7] OLIVEIRA, A.N.; AMARAL, I.L. 2004. *Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil*. **Acta Amazonica**, 34(1): 21-34.
- [8] IVANAUSKAS, N.M.; MONTEIRO, R.; RODRIGUES, R.R. 2004b. *Composição florística de trechos florestais na borda sul-amazônica*. **Acta Amazonica**, 34(3): 399-413.
- [9] COSTA AF 1996. **Farmacognosia**. 5ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- [10] MAIA RM, BARBOSA PR, CRUZ FG, ROQUE NF, FASCIO M 2000. *Triterpenos da resina de Protium heptaphyllum March (Burseraceae): Caracterização em mistura binárias*. **Química Nova** 23: 623-626.
- [11] COSTA, A. F.; **Farmacognosia**, Fundação Calouste-Gulbenkian, 4ª ed. 1988, p. 840.

[12] SIQUEIRA, J.B.G. 1991. *Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero Protium: P. tenuifolium (Engl.) Engl. e P. laxiflorum Engl. (Burseraceae)*. Manaus, INPA/UFAM, 1991. **Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais)**.

[13] KILLEE, T.J.; GARCÍA, E.E. & BECK, S G. 1993. **Guia de Árvores de Bolívia. La Paz, Bolívia**. Herbário Nacional de Bolívia/Missouri Botanical Garden. p.170-172.

[14] SUSUNAGA, G.S. 1996. *Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie Protium heptaphyllum March. (Burseraceae)*. Manaus, UFAM, 1996. **Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais)**, Universidade Federal do Amazonas.

[15] SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Vol. 2 **Química Orgânica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC. p.111-115, 2006.

[16] MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 13ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Colouste Gulbenkian, p.733-735, 1996.

[17] ALLINGER, Normam L., CAVA, Michael P. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos s.A.. p. 477-479, 1976.

[18] PERES, T. B. **Noções básicas de cromatografia – PALESTRA**. Biológico. São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

[19] SLVERSTEIN, R.M., WEBSTER F.X., KIEMLE D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC. p. 70-71, 2007.

CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	- Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
2	- Obtenção dos triterpenos a- e b-amirina	X	X	X									
3	- Obtenção do ácido copálico				X	X							
4	- Determinação as condições para a síntese dos derivados			X	X	X	X	X					
5	- Sínteses dos ésteres triterpênicos	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
6	- Determinação estrutural dos ésteres através de técnicas espectrométricas				X	X	X	X	X	X	X		
7	- Determinação das atividades biológicas para a mistura de a- e b-amirina e seus derivados								X	X	X	X	
8	- Elaboração de artigo científico para periódico											X	X
9	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)											X	
10	- Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

Realizadas X

Não Realizadas X