

ÁCIDO CANÁRIO (3,4-SECO DERIVADO DO LUPANO) EM PRÓPOLIS DO CEARÁ**Irineu L. de Albuquerque, Leonardo A. Alves, Telma L. G. Lemos* e Francisco J. Q. Monte**Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60451-970 Fortaleza – CE, Brasil
Raimundo Braz-Filho

Setor de Produtos Naturais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-600 Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil

Recebido em 23/3/06; aceito em 6/9/06; publicado na web em 26/3/07

CANARIC ACID (3,4-SECO-LUPANE DERIVATIVE) ISOLATED FROM PROPOLIS OF CEARÁ. Phytochemical investigation of a propolis sample from Alto Santo - Ceará, Brazil, allowed identification of triterpenes (lupeol, lupenone, germanicone, canaric acid) and flavonoids (quercetin, kaempferol and acacetin), which were identified by spectroscopic data (IR, MS, and NMR, including 2D techniques). This is the first report of canaric acid in propolis. Propolis extract and flavonoids showed antioxidant activity using a DPPH radical scavenging assay.

Keywords: propolis; flavonoids; canaric acid.

INTRODUÇÃO

A palavra própolis, de origem grega, significa guardar a cidade¹. O material conhecido como própolis contém um conjunto de substâncias naturais armazenadas em produtos resinosos e balsâmicos. Tais substâncias são colhidas diretamente de diferentes partes e exsudados de plantas, que são acrescidas pelas produzidas através das secreções salivares das abelhas, cera e pólen para formação do produto final². Assim, a própolis se apresenta frequentemente como resinas constituídas por misturas complexas de substâncias naturais produzidas biogeneticamente pelas plantas e pelas abelhas, com a função de selar as colméias e proteger contra predadores.

Diversas atividades biológicas comprovadas já foram relatadas para própolis em diferentes regiões do planeta, tais como antiviral, antiinflamatória, antioxidante, anticancerígena. Tais resultados comprovam a consagração do uso popular e justificam o seu consumo no mundo inteiro como auxiliar no tratamento das mais diversas doenças, entre as quais problemas cardíacos, diabetes, câncer e processos inflamatórios³.

A composição química da própolis está diretamente relacionada com o tipo de vegetação da região onde é bioproduzida. Portanto, as substâncias naturais presentes se encontram diretamente relacionadas com a região de coleta da própolis, podendo conter mais de uma dezena de substâncias com diversas funções adicionais ainda desconhecidas pelo homem^{4,5}.

Várias classes de substâncias naturais já foram isoladas e identificadas em própolis brasileira, destacando-se flavonóides⁶, flavanonas preniladas⁷, benzopirano⁸, benzofenona⁹, éster do ácido caféico¹⁰, triterpenóides (cicloartano¹¹, alcanosatos de lupeol¹², ácido moronico¹³ e 3 β -acetato de bauereno¹⁴), derivados dos ácidos cinâmico e benzóico¹⁵ e epóxidos de naftoquinonas¹⁶.

Tais informações serviram como estímulo adicional para enfrentarmos o desafio investigativo da composição química da própolis do Ceará, já que contribui significativamente para a aquisição de conhecimento adicional da flora visitada pelas abelhas e para comparação fitoquímica. A amostra de própolis utilizada para investigação foi coletada no Município de Alto Santo-Ceará, região onde a vegetação

predominante é a “caatinga”. Assim, do extrato etanólico foram isolados e caracterizados os triterpenos conhecidos por ácido canário (ácido 3,4-*seco* derivado do lupano (1), lupeol (2), lupenona (3) e germanicon (4) e os flavonóides quercetina (5), canferol (6) e acetina (7). O ácido canário (1) foi isolado anteriormente da resina de *Canarium muelleri*¹⁷ e, mais recentemente, de *Rugea jasminoides*¹⁸, sendo este o primeiro registro desta substância em própolis.

PARTE EXPERIMENTAL**Procedimentos experimentais gerais**

Nas análises cromatográficas de adsorção em coluna foi utilizada gel de sílica. O comprimento e o diâmetro das colunas foram estabelecidos com base nas quantidades das amostras e de gel de sílica utilizadas. Nas cromatografias de camada delgada (CCD) foram usadas cromatoplasmas de sílica gel GF₂₅₄. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, usando-se pastilhas de KBr. Os espectros de RMN¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro modelo Avance DRX-500, usando-se CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno. O espectro de massa foi obtido em espectrômetro Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV. As leituras de Ultra-violeta foram feitas em equipamento modelo U-2000, Hitachi.

Coleta da amostra

A amostra de própolis usada para estudo foi produzida pela espécie *Apis mellifera*, coletada no município de Alto Santo - Ceará, Brasil, e mantida sob refrigeração.

Extração e isolamento

A amostra de própolis (750 g) foi extraída exaustivamente com EtOH. O resíduo obtido após a destilação do solvente (EBEP, 170 g) foi cromatografado em coluna (CC) filtrante de gel de sílica, sendo utilizados como eluentes, solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, CHCl₃, AcOEt e metanol. A fração CHCl₃ foi subme-

*e-mail: tlemos@dqi.ufc.br

tida a sucessivas CC em gel de sílica, tendo como eluentes misturas binárias de Hex:AcOEt em ordem crescente de polaridade. A análise das frações através de CCD permitiu reuni-las em grupos frações e o isolamento subsequente de **1** (45 mg), lupeol **2** (500 mg), lupenona **3** (45 mg) e germanicona **4** (30 mg). Cromatografias sucessivas da fração AcOEt, com mistura binária Hex:AcOEt em ordem crescente de polaridade, possibilitaram o isolamento de quercetina **5** (120 mg), canferol **6** (120 mg) e acacetina **7** (60 mg) (Figura 1).

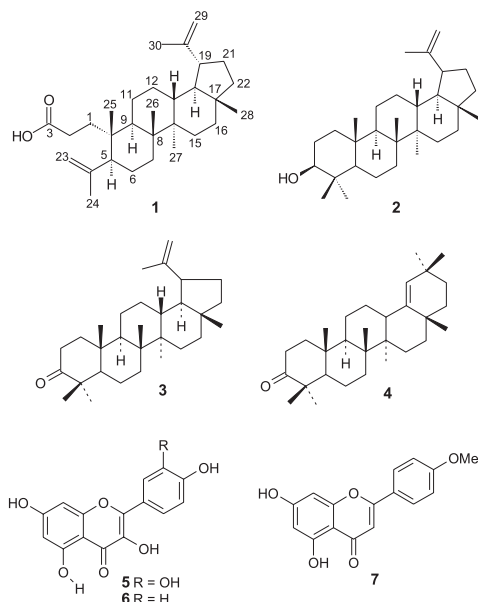


Figura 1. Substâncias de **1-7** isoladas de amostra de própolis de Alto Santo – Ceará

Atividade antioxidante pelo método de seqüestro de radical DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método de seqüestro de radical DPPH e comparação com padrões positivos, usando a metodologia proposta por Hegazy e El-Hady¹⁹. Amostras do extrato etanólico de própolis (Extpr) e das substâncias **1-7** nas concentrações de 1,00; 0,05 e 0,025 g/L, foram dissolvidas em 1,0 mL de etanol e adicionadas a uma solução etanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60 µM. Foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, no tempo inicial e após 30 min. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra.

Os resultados mostrados na Tabela 2 representam a média aritmética de 3 leituras. Como padrões positivos de referência utilizaram-se Trolox e BHT.

Propriedades físicas

Ácido canárioico (**1**) - sólido, p.f. 208-210 °C, $[\alpha]_D^{25} + 31^\circ$ [1,0; CHCl₃]; I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹) - 1641, 1703, 3487; EM-IE, 70 eV, *m/z* 440. RMN ¹³C e ¹H, ver Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os triterpenos lupeol (**2**), lupenona (**3**), germanicona (**4**) e os flavonoides quercetina (**5**), canferol (**6**) e acacetina (**7**) foram identificados através de métodos espectroscópicos envolvendo a comparação com dados da literatura²⁰⁻²⁴.

O triterpeno **1** apresentou no espectro de IV absorções referentes à presença de ligação dupla C=C (ν_{\max} 1641 cm⁻¹) e de grupos carboxila (ν_{\max} 1703 cm⁻¹) e hidroxílico (ν_{\max} 3487 cm⁻¹). O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EM-IE) revelou o pico correspondente ao íon molecular em *m/z* 440, compatível com a fórmula molecular C₃₀H₄₈O₂.

A análise comparativa dos espectros de RMN¹³C{¹H} e RMN¹³C-DEPT 135° de **1** permitiu identificar 30 sinais (Tabela 1) correspondentes a sete átomos de carbono não hidrogenados [três sp²: δ_C 181,00 (COOH); 152,42; 149,18; quatro sp³: δ_C 44,83; 44,59; 42,13 e 40,79], cinco metínicos (todos sp³: δ_C 51,97; 49,82; 49,56; 42,32 e 39,70), doze metilênicos [dois sp²: δ_C 114,99 (CH₂-24) e 111,06 (CH₂-29); dez sp³: δ_C 41,56; 37,07; 35,48; 34,34; 31,40; 29,77; 29,05; 26,61; 26,27 e 23,06] e seis metílicos (δ_C 24,81; 21,69; 20,88; 19,59; 17,56 e 16,06) e classificar como um triterpeno tetracíclico contendo um grupo carbonila de ácido (δ_C 180,00) e duas ligações olefínicas terminais [(C=CH₂)₂: δ_C 149,18 (C-4) e 114,99 (CH₂-24); e δ_C 152,42 (C-20) e 111,06 (C-29)].

A análise do espectro de RMN¹H confirmou a presença de quatro átomos de hidrogênio olefínicos em duplas terminais pelos sinais simples em δ_H 4,66 e 4,85 (2H-24) e em δ_H 4,58 e 4,70 (2H-29). Os deslocamentos químicos dos sinais simples em δ_H 1,73 e 1,70 foram atribuídos aos dois grupos metílicos ligados a átomos de carbono sp² (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de RMN¹H e ¹³C de **1** [CDCl₃], incluindo-se resultados de correlação heteronuclear ¹H-¹³C-COSY-¹J_{CH} (HMQC) e ¹H-¹³C-COSY-ⁿJ_{CH} (HMBC). Deslocamentos químicos em δ_C e δ_H (ppm) e constantes de acoplamento (*J*, entre parênteses) em Hz

	HMQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	² J _{CH}	³ J _{CH}
1	35,48	1,62(m); 2,33 (m)	2H-2	3H-25
2	29,77	2,20 (m); 2,35 (m)	-	
3	181,00		2H-2	
4	149,18		3H-23	
5	51,97	1,94 (d, 10,5)		H-1b; 2H-24; 3H-23; 3H-25
6	26,27	1,35 (m); 1,65 (m)		
7	34,34	1,48-1,35 (m)		3H-26
8	42,13		3H-26	3H-27
9	42,32	1,41 (m)		3H-25; 3H-26
10	40,79		H-5; 3H-25	
11	23,06	1,24 (m); 1,30 (m)		
12	26,61	1,05 (m); 1,70 (m)		
13	39,70	1,68 (m)		3H-27
14	44,83		3H-27	3H-26
15	29,05	1,05 (m); 1,70 (m)		3H-27
16	37,07	1,40 (m); 1,50 (m)		3H-28
17	44,59		3H-28	
18	49,82	1,40 (m)	H-19	3H-28
19	49,56	2,37 (m)		H-29a
20	152,42		H-19; 3H-30	
21	31,40	1,35 (m); 1,90 (m)		
22	41,56	1,20 (m); 1,38 (m)		3H-28
23	114,99	4,66 (s); 4,85 (s)		3H-23
24	21,69	1,73 (s)		
25	24,81	0,85 (s)		
26	17,56	1,08 (s)		-
27	16,06	0,97 (s)		-
28	19,59	0,80 (s)		-
29	111,06	4,58 (s); 4,70 (s)		H-19; 3H-30
30	20,88	1,70 (s)		H-19; 2H-29

Estas deduções e as informações adicionais obtidas pela interpretação dos espectros de massas (Figura 2) e de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, em CDCl_3), (DEPT 135°) e 2D de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HMQC e HMBC), envolvendo inclusive a comparação com dados da literatura^{17,18}, permitiram caracterizar a estrutura do triterpeno ácido 3,4-*seco*-derivado do lupano (ácido canário, **1**) e estabelecer a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 1). Análise detalhada do espectro de HMBC, mostrou correlações entre C-5 (δ_{C} 51,97) com 2H-24, 3H-23, 3H-25 e H-1b, e do C-9 (δ_{C} 42,32) com 3H-25, e 3H-26.

A estereoquímica relativa de **1** foi deduzida com base nos dados de interação dipolar-dipolar revelada pelo espectro 2D ^1H - ^1H -NOESY. Nesse espectro foi observado forte efeito NOE entre os átomos de hidrogênio: H-9 (δ_{H} 1,41) e 3H-27 (δ_{H} 0,97) e H-5 (δ_{H} 1,94); 3H-23 (δ_{H} 1,73) e H-24a (δ_{H} 4,85); H-29a (δ_{H} 4,70) e H-19 (δ_{H} 2,37); H-5 (δ_{H} 1,94) e H-24b (δ_{H} 4,66); 3H-25 (δ_{H} 0,85) com 3H-26 (δ_{H} 1,08); 3H-26 (δ_{H} 1,08) com o H-13 β ; 3H-28 (δ_{H} 0,80) com 3H-26 e H-13b; 3H-27 (δ_{H} 0,97) com H-18 (δ_{H} 1,40); 3H-30 (δ_{H} 1,70) com H-29b (δ_{H} 4,58).

Apesar de ser uma substância descrita anteriormente em espécies vegetais, este é o primeiro registro deste triterpeno em própolis. Uma proposta de fragmentação de **1** no espectrômetro de massas encontra-se resumida na Figura 2. Os fragmentos m/z 189 (62%) e m/z 203 (59%), picos importantes no espectro, foram originados por quebra das ligações $\text{C}_8-\text{C}_{14}/\text{C}_{12}-\text{C}_{13}$ e $\text{C}_8-\text{C}_{14}/\text{C}_9-\text{C}_{11}$ respectivamente, de acordo com a literatura²⁵.

Os compostos **2** e **3** apresentaram dados de RMN ^{13}C e ^1H compatíveis com triterpenos com esqueleto tipo lupano: δ_{H} 4,54 (dl, 1H), 4,67 (dl, 1H) e 1,68 (sl, 3H), δ_{C} 151,00 (C) e 109,59 (CH_2). Todas estas absorções caracterizam o grupo isoprenila presente nesse esqueleto. Para o composto **2** observou-se absorção em δ_{C} 79,08 (CH) relativa de C-3 em triterpenos 3β -OH, enquanto que o composto **3**, apresentou uma carbonila em δ_{C} 218,20. Os dados apresentados são compatíveis com lupeol e lupenona²¹⁻²³.

O espectro de RMN ^{13}C do composto **4** exibiu sinais em δ_{C} 142,77 (C) e 130,08 (CH) indicativos de ligação olefínica de triterpeno oleanano. Em adição, um sinal em δ_{C} 218,11 (C=O) e comparação com dados de RMN ^1H e ^{13}C , IV com aqueles registrados na literatura permitiram caracterizar **4** como o triterpeno olean-18-en-3-ona, conhecido como germanicon²¹⁻²³.

Os compostos **5**, **6**, e **7** exibiram nos espectros de RMN ^{13}C quinze sinais na região de carbonos sp^2 , compatíveis com a unidade $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$ característica de flavonóides. A mistura binária constituída de **5** e **6**, permitiu identificar em **5** a presença de cinco carbonos não hidrogenados, oxigenados em (C-3, C-5, C-7, C-3', e C-4'), referente a carbonos contendo grupos hidroxila e apenas quatro absorções de carbonos oxigenados em **6** (C-3, C-5, C-7, e C-4'). Análise detalhada dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H , de **5** permitiu sua identificação como sendo 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavone, enquanto o composto **6** apresentou somente quatro carbonos sp^2 oxigenados, sendo identificado como 3,5,7,4'-tetraidroxiflavone. O espectro de RMN ^{13}C do composto **7** apresentou três sinais de carbonos sp^2 oxigenados, dois contendo grupos hidroxila e um com metoxila em (δ_{C} 58,00) na posição C-4', dedução corroborada através do espectro de RMN ^1H pelos sinais de hidrogênios aromáticos de um sistema *para*-substituído, e possibilitaram sua identificação como sendo 5,7-diidroxí-4'-metoxiflavone. Comparação dos dados espectroscópicos obtidos para os compostos **5-7** com os registrados na literatura permitiu a identificação destes constituintes como sendo quercetina, canferol e acacetina, respectivamente²⁴.

O extrato etanólico de própolis (Extpr) e as substâncias **1-7** foram submetidas a teste de atividade antioxidante, utilizando-se o

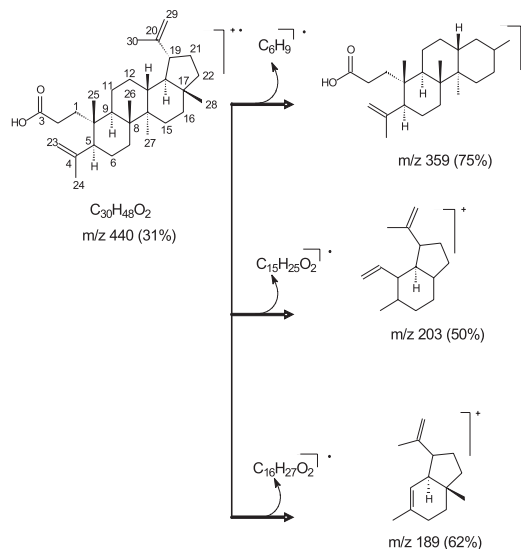


Figura 2. Fragmentos propostos para justificar os picos principais observados no espectro de massas (EM) do triterpeno **1**. Reproduzida da ref. 25, com permissão da ACS

método de seqüestro de radicais DPPH¹⁶. Através dessa metodologia foi observada atividade significativa para os flavonóides quercetina **5**, canferol **6** e acacetina **7**, que apresentaram redução da formação de radicais na concentração de 1,00 mg de 70, 68 e 53% e na concentração de 0,25 mg, inibição de 70, 59 e 19%, respectivamente. Estes dados estão compatíveis com as estruturas, verificando-se que os flavonóides com maior número de hidroxilas, como a quercetina e canferol, apresentaram maior percentagem de inibição. Para o ácido canário observou-se fraca atividade de inibição, com redução de apenas 26% na concentração de 1,00 mg/mL e ausência de atividade para os triterpenos **2-4**, cujos resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antioxidante por seqüestro de radical DPPH de extrato etanólico de própolis e das substâncias **1, 5-7**

Substâncias	Concentração (mg/mL)		
	1,00	0,05	0,025
	%		
Extpr	66	50	45
1	26	25	22
5	70	70	70
6	68	60	59
7	53	29	19
BHT	100	98	97
Trolox	100	95	90

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FUNCAP e FAPERJ pelas bolsas e auxílios concedidos e ao CENAUREMN-UFC pelas oportunidades disponibilizadas para obtenção dos espectros de RMN.

REFERÊNCIAS

- Ghisabert, E. L.; *Bee World* **1979**, 60, 59.
- Marcucci, M. C.; *Apidologie* **1995**, 26, 83.
- Marcucci, M. C.; *Quím. Nova* **1996**, 19, 529; Hegazi, A. G.; *Bee Informed* **1998**, 5, 22; Matsushige, K.; Basnet, P.; Kadota, S.; Namba, T.; *J. Traditional Medicines* **1996**, 13, 217.

4. Custódio, A. R.; Ferreira, M. M. C.; Negri, G.; Salatino, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 354.
5. Menezes, H.; *Arq. Ins. Biol.* **2005**, *72*, 405.
6. Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J. K.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 503.
7. Matsuya, M.; Saito, M.; Matsuyuki, Y.; Morikawa, J.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1998**, *53*, 1037.
8. Rubio, O. C.; Cuellar, A. C.; Rojas, N.; Castro, H. V.; Rastrelli, L.; Aquino, R.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1013.
9. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1277.
10. Nagaoka, T.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S.; *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 487.
11. Silva, M. S. S.; Citó, A. M. G. L.; Chaves, M. H.; Dantas, J. A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 801.
12. Pereira, A. S.; Nascimento, E. A.; Neto, F. R. A.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2002**, *57*, 721.
13. Ito, J.; Chang, F. R.; Wang, H. K.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K. H.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1278.
14. Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 245.
15. Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negri, G.; Message, D.; *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2005**, *2*, 33.
16. Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; Pasin, F. R.; Tsvetkova, I.; *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2006**, *3*, 249.
17. Carman, R. M.; Cowley, D. E.; *Tetrahedron Lett.* **1964**, *12*, 627.
18. Lopes, M. N.; Mazza, F. C.; Young, M. C. M.; Bolzani, V. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 237.
19. Hegazi, A. G.; El Hady, F. K. A.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2002**, *57*, 395.
20. Patra, A.; Mukhopadhyay, A.; Mitra, A. K.; *Org. Magn. Reson.* **1981**, *17*, 166; Pinheiro, M. L. B.; da Rocha, A. F. I.; Fernandes, M. A.; Monte, F. J. Q.; Villar, J. D. F.; Cruz, E. R.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 188.
21. Roshan, C. C.; Sotheeswaram, S.; Uvais, M.; Sultanbawa, S.; Ternai, B.; *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14*, 462.
22. Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 278.
23. Ahmad, V. U.; Arman, A. U.; *Handbook of natural products data: Pentacyclic triterpenoids*, Elsevier Science: Netherland, 1994.
24. Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier: Netherlands, 1989; *Studies in Organic Chemistry*, 1989, vol. 39.
25. Dallavalle, S.; Jayasinghe, L.; Kumarihamy, B. M. M.; Merlini, L.; Musso, L.; Scaglioni, L.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 911.