



Síntese do análogo da capsaicina *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida para futura aplicação tecnológica

Synthesis of the capsaicin analog *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)butanamide for future technological application

Gabriela Cassim Rissi¹, Clara Cristina Ansolin¹, Alexandre Engel Visentin², Alessandra Machado-Lunkes³

RESUMO

A capsaicina é um composto presente na pimenta, que possui propriedades anticancerígenas, analgésicas, antioxidantes e anti-inflamatória. Entretanto, a sua aplicação é limitada devido a sua toxicidade e alta pungência, assim, para se utilizar das propriedades biológicas benéficas da capsaicina se faz necessário a síntese de seus análogos que não apresentem efeitos nocivos e indesejáveis. O objetivo do estudo foi sintetizar o análogo da capsaicina *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida, caracterizar o produto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e purificar por meio da técnica de cromatografia em coluna aberta. Para a síntese utilizou-se o método de condensação de vanililamina e cloreto de ácido em um sistema bifásico. A reação obteve um rendimento bruto de 64,94%, um rendimento consideravelmente baixo que pode ser atribuído a uma baixa agitação, que resultou em má formação do sistema bifásico. O cromatograma indicou que o produto obtido corresponde à *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida e que o procedimento de purificação foi capaz de reduzir significativamente as impurezas, apresentando uma pureza de 98%.

PALAVRAS-CHAVE: Análogo da capsaicina; síntese química, cromatografia líquida.

ABSTRACT

Capsaicin is a compound found in chili peppers that has anticancer, analgesic, antioxidant and anti-inflammatory properties. However, its application is limited due to its toxicity and high pungency, so in order to make use of capsaicin's beneficial biological properties, it is necessary to synthesize its analogs that do not have harmful or undesirable effects. The aim of this study was to synthesize the capsaicin analog *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)butanamide, characterize the product by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and purify it using the open column chromatography technique. For the synthesis, the vanillylamine and acid chloride condensation method was used in a two-phase system. The reaction obtained a gross yield of 64.94%, a considerably low yield that can be attributed to poor stirring, which resulted in poor formation of the biphasic system. The chromatogram indicated that the product obtained corresponds to *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)butanamide and that the purification procedure was able to significantly reduce impurities, showing a purity of 98%.

KEYWORDS: Capsaicin analog; chemistry synthesis, liquid chromatography

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no interesse dos consumidores por alimentos mais naturais, com baixa presença de conservantes, o que impulsionou um aumento nas pesquisas relacionadas a esse tema. Atualmente, esses estudos estão concentrados na investigação de compostos de origem natural e extratos de plantas que possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, com o objetivo de manter a

¹ Bolsista voluntariado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: gabrielacassimrissi@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6309266067430826, E-mail: claraansolin@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2613460257302753.

² Bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: alexandrevisentin@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7471224421657930.

³ Docente do Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: amachado@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9970617360931344.



estabilidade dos lipídios nos produtos que os contêm (ROSA *et al.*, 2002; XIANG *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a pesquisa sobre capsaicínoides tem se intensificado. Estes são compostos encontrados na pimenta, em plantas do gênero *Capsicum*. O capsaicoide mais comum na pimenta é a capsaicina, seguida pela diidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina e homocapsaicina (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2020). Atualmente, o número de pesquisas relacionadas à capsaicina tem crescido devido às suas amplas aplicações e benefícios, que incluem propriedades anticancerígenas, analgésicas, antioxidantes e anti-inflamatórias (MELGAR-LALANNE *et al.*, 2017).

Entretanto, a aplicação da capsaicina é limitada devido à sua toxicidade e alta pungência, que estão associadas à presença de uma ligação amida conectada a um anel vanilila e a uma cadeia acila (SZOLCSANYI *et al.*, 1975; DIAZ-VIDAL *et al.*, 2020). Estudos anteriores demonstraram que análogos com uma cadeia de carbono contendo menos de seis átomos e/ou com uma cadeia de carbono variando entre 14 e 20 átomos não exibem pungência (CASTILLO *et al.*, 2007, WATANABE *et al.*, 1993). Portanto, para aproveitar as propriedades benéficas da capsaicina, é necessário sintetizar análogos que não apresentem efeitos nocivos e indesejáveis (WANG *et al.*, 2009).

Com isso, o presente estudo tem como objetivo sintetizar o análogo da capsaicina *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida. O produto obtido será caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e purificado por meio da técnica de cromatografia em coluna aberta.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAS

Os reagentes cloridrato de 4-hidróxi-3-metóxi-benzilamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e cloreto de butanoíla (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foram adquiridos por importação. Os demais reagentes no comércio nacional: bicarbonato de sódio (Dinâmica, Brasil), clorofórmio (Dinâmica, Brasil), sílica gel 60 (0,040 - 0,063 mm), solução de ácido clorídrico a 2%, solução salina a 20%, sulfato de magnésio anidro (ISOFAR, Brasil), hexano (NEON, Brasil), e acetato de etila (ALPHATEC, Brasil). Os equipamentos e vidrarias utilizados foram: rota-evaporador Fisatom (Brasil), coluna de 36 cm (SPORTLABOR, Brasil), funil de separação (FORTLABOR, Brasil) e condensador de Graham (FORTLABOR, Brasil).

MÉTODOS

Síntese da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida

Combinou-se o cloridrato de 4-hidróxi-3-metóxi-benzilamina, bicarbonato de sódio e água destilada em um balão acoplado a um condensador de Graham, mantendo agitação constante e temperatura a 20 °C durante trinta minutos. Após esse período, adicionou-se o clorofórmio e deixou-se sob agitação por mais quinze minutos. Em seguida, adicionou-se uma solução de clorofórmio com cloreto de butanoíla em gotejamento com agitação alta e deixou-se por mais trinta minutos. Após esse intervalo, aqueceu-se gradualmente na faixa de temperatura entre 35 °C e 40 °C, continuando até a conclusão da reação (WANG *et al.*, 2009). O progresso da reação foi monitorado por meio de cromatografia em camada



delgada (CCD), e a detecção das substâncias presentes nas placas foi realizada utilizando uma lâmpada de ultravioleta (UV).

Para a extração do produto bruto, transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação e realizou-se a lavagem utilizando clorofórmio. Após as lavagens, observou-se uma fase orgânica e outra aquosa dentro do funil. Lavou-se a fase orgânica com clorofórmio, seguida por ácido clorídrico a 2% e, por fim, a última lavagem com solução salina a 20%. Após essa etapa, adicionou-se sulfato de magnésio para capturar a água e, por fim, evaporou-se a fase orgânica em um rota-evaporador (WANG *et al.*, 2009).

Caracterização química e purificação por cromatografia

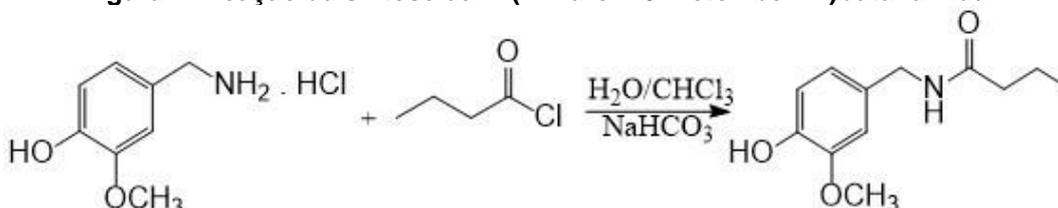
O produto bruto foi submetido à caracterização utilizando um cromatógrafo líquido de alta performance modelo Dionex U300, localizado nas instalações do laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A análise foi conduzida empregando uma coluna de fase reversa Vydac 218 TP C18 analítica, com dimensões de 0,45 x 25,0 cm, partículas de sílica de 5 μm e poros com um diâmetro de 300 \AA .

Foi utilizado o método de cromatografia em coluna para a purificação do análogo. Para o procedimento, adicionou-se uma pasta de sílica gel adsorvida do produto bruto na coluna cromatográfica aberta e, em seguida, hexano para eluição. Foram feitas adições constantes da fase móvel, utilizando como solventes uma mistura de acetato de etila e hexano, aumentando gradativamente a proporção de acetato de etila. A fase móvel eluída foi fracionada em diferentes frascos coletores de 5 mL. As frações foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD), com o eluente sendo uma mistura de acetato de etila e hexano. As frações que correspondiam ao produto foram rotavaporadas, e utilizou-se a análise em CLAE para a confirmação do produto purificado (COLLINS, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Procedeu-se à síntese do análogo *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida utilizando o procedimento descrito Wang *et al.*, (2009) pelo método de condensação de vanililamina e cloreto ácido em um sistema bifásico composto por água (H_2O) e clorofórmio (CHCl_3), como representado na reação da figura 1.

Figura 1: Reação da síntese da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida.



Fonte: Adaptado (WANG *et al.*, 2009).

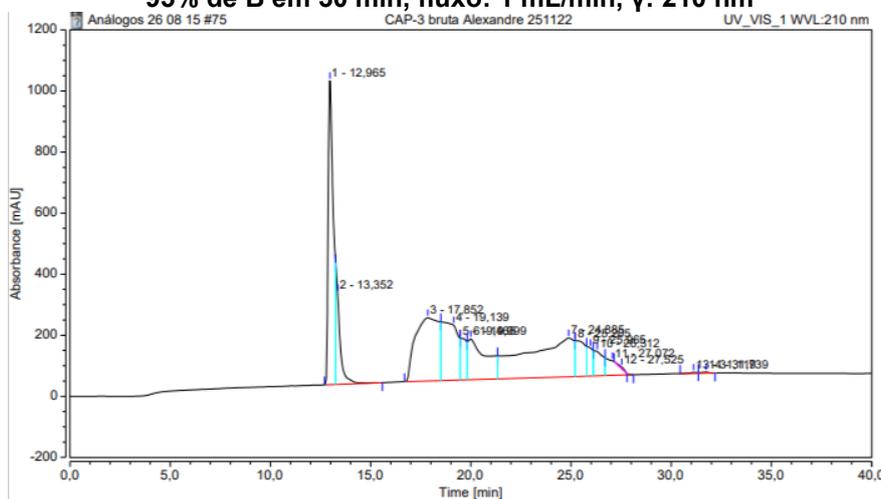
A reação obteve um rendimento bruto de 64,9%. Segundo os resultados apresentados por Wang *et al.*, (2009), que na qual também utilizaram a aminólise de cloretos ácidos, o rendimento encontrado foi de 92,9%. Dessa forma, o resultado obtido está consideravelmente abaixo do relatado. Acredita-se que o cloreto de butanoíla, com o passar do tempo, tenha alterado sua composição devido à reação com a umidade do ar, afetando assim o rendimento. Já em comparação com o trabalho realizado por Zanotto



(2016), o rendimento final foi de 69%. Isso demonstra a necessidade de correção das condições experimentais para melhorar os resultados de rendimento bruto e obter rendimentos superiores para o material purificado.

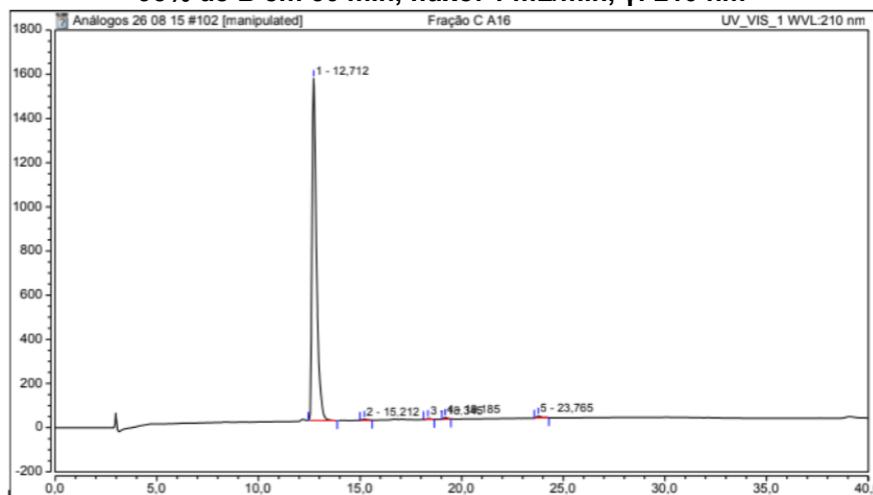
As figuras 2 e 3 abaixo apresentam o cromatograma do produto bruto e da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida purificada, respectivamente. O resultado obtido através do cromatograma indica um tempo de retenção de 12,95 min. Em comparação com os dados do trabalho de Zanotto (2016), no qual obteve um tempo de 14 min, o produto obtido corresponde à *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida. A diferença de 1,05 min no tempo de retenção pode estar relacionada às colunas diferentes utilizadas durante a análise, Zanotto utilizou em seu trabalho a coluna de fase reversa ACE 221-2546 C18-300 analítica (0,45 x 25,0 cm, tamanho da partícula de 4,6 μ m e poro de 300 Å).

Figura 2: Cromatograma da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida bruta. Condições experimentais: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, γ : 210 nm



Fonte: Os autores (2023)

Figura 3- Cromatograma da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida bruta. Condições experimentais: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, γ : 210 nm



Fonte: Os autores (2023)



Observando o cromatograma do produto bruto e do produto purificado, o procedimento de purificação foi capaz de reduzir significativamente as impurezas apresentando pureza de aproximadamente 98%. No entanto, o tempo de retenção apresentou uma diminuição de 253 segundos, um tempo relativamente baixo e que não descaracteriza que temos a *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida purificada.

O baixo rendimento da síntese pode ser atribuído a uma agitação insuficiente, o que resultou na má formação do sistema bifásico. Isso, por sua vez, pode ter ocasionado a hidrólise do cloreto ácido (WANG *et al.*, 2009). A ineficiência na agitação pode estar relacionada à quantidade de material no meio reacional e ao tamanho do balão utilizado, ao aumentar o volume reacional notou-se uma diminuição na eficiência da agitação.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a síntese realizada da *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida não alcançou rendimentos elevados, o que indica a necessidade de melhorias no processo e síntese. No entanto, é importante ressaltar que a amida desejada foi obtida com uma pureza de 98%, tornando-a adequada para as etapas posteriores de determinação das suas propriedades biológicas.

Agradecimentos

Agradecemos ao servidor João Paulo Fernando Mileski pela colaboração durante as análises de CLAE, a UTFPR-FB e ao Laboratório de Análises (LabAna) pela disponibilização do espaço físico e apoio técnico.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

CASTILLO, Edmundo *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1202-1208, 2007.

COLLINS, Carol. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 107–114, 2011.

DIAZ-VIDAL, Tania *et al.* A series of novel esters of capsaicin analogues catalyzed by candida antarctica lipases. **Biotechnology and bioprocess engineering: BBE**, v. 25, n. 1, p. 94–103, 2020.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Talía. *et al.* Capsicum annum (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 19, n. 6, p. 2972–2993, 2020.



MELGAR-LALANNE, *et al.* Oleorresinas de *Capsicum* spp.: métodos de extração e bioatividade. **Tecnologia de Bioprocessos Alimentares**, v. 10, p. 51–76, 2017.

ROSA, Antonella *et al.* Antioxidant Activity of Capsinoids. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7396-7401, 2 nov. 2002. American Chemical Society (ACS).

SHARMA, Surinder Kumar *et al.* Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1-3, p. 55-62, nov. 2013.

SRINIVASANS, Krishnapura. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1488–1500, 2015.

WANG, Bo *et al.* Highly efficient synthesis of capsaicin analogues by condensation of vanillylamine and acyl chlorides in a biphasic H₂O/CHCl₃ system. **Tetrahedron**, v. 65, n. 27, p. 5409–5412, 2009.

WATANABE Tatsuo *et al.* K Effects of capsaicin analogs on adrenal catecholamine secretion in rats. **Life Sciences**, v. 54, n. 5, p. 369-374, 1993.

XIANG, Qunran. *et al.* Capsaicin—the spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 755–765, 2021

ZANOTTO, Aline Wasem. **EMPREGO DE COMPOSTOS AMÍDICOS PARA O CONTROLE DE PENICILLIUM EXPANSUM EM MAÇÃ**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2016.