

ATIVIDADE ANTICARCINOGÊNICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS FRESCAS DA ESPÉCIE *Ruta graveolens* (RUTACEAE)

Isabella Bibiano Pedroza Martins¹
Waldemar Alves Ribeiro Filho²

Aluno do CST em Processos Químicos; e-mail: isabella.martins3@fatec.sp.gov.br¹
Professor da FATEC Praia Grande; e-mail: waldemar.ribeiro@fatec.sp.gov.br²

Área do Conhecimento: Química de Produtos Naturais

Palavras-chave: *Ruta graveolens*. Perfil Químico. Atividade Anticarcinogênica. Produtos Naturais.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, o emprego de produtos naturais na medicina popular ocorreu em diversas culturas ao redor do mundo, tanto que as práticas medicinais encontradas na China, Índia, Egito e América do Sul são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde pela tradicionalidade do uso de plantas como recurso terapêutico (SIMÕES, 2017). As pesquisas de plantas medicinais em Química de Produtos Naturais, tradicional ramo da Química no Brasil, possibilitam a investigação de substâncias bioativas que possam ser utilizadas em novos fármacos, com efeitos colaterais reduzidos e tratamentos mais eficientes. A *Ruta graveolens* L. (arruda) é uma planta de interesse de estudo, uma vez que em sua bibliografia é indicada por sua atividade antibacteriana (ORLANDA; NASCIMENTO, 2015) e seu extrato, obtido com solventes orgânicos, contém substâncias das classes de metabólitos secundários, tais como, alcaloides, flavonoides, fenóis, furanocumarinas e cetonas (Ministério da Saúde, 2021). Estudos farmacológicos e ensaios de toxicidade (*in vitro*) de preparações obtidas da espécie mostram resultados promissores de citotoxicidade.

OBJETIVOS

O presente projeto possui como objetivo realizar o estudo químico e biológico das folhas frescas da *R. graveolens*, a fim de identificar compostos úteis como ferramentas de pesquisas biológicas e encontrar substâncias bioativas, além de verificar o potencial anticarcinogênico das substâncias presentes frente à três linhagens de células de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A) e adenocarcinoma de próstata (PC-3).

METODOLOGIA

As folhas de *R. graveolens* foram coletadas, limpas e secas. O material vegetal, devidamente seco, foi triturado e pesado. Foram obtidos 26,52 g das folhas da *R. graveolens*, sendo 24,52 g destinadas a extração com MeOH, e 2,00 g dividido igualmente para extração com os solventes Hex, DCM e AcOEt e Éter. A extração foi realizada por maceração estática com 300 mL de MeOH e 5 mL de cada um dos solventes já citados. Em seguida, foram submetidos ao banho ultrassônico em três períodos de quinze minutos com cinco minutos de intervalo. A seguir, o extrato metanólico foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, retirando o solvente da amostra e obtendo o extrato metanólico de 4,32 g de massa.

Para estabelecer um perfil para uma mistura complexa dos metabólitos obtidos no extrato, a técnica de separação por cromatografia em camada delgada (CCD), foi utilizada (COLLINS et al., 1995). As placas cromatográficas usadas tinham 5 cm de altura e 5 cm de largura e 20 cm de largura e 5 cm de altura, e a fase móvel foi composta por hexano e acetato de etila na proporção 1:1. Os extratos foram aplicados nas placas CCD por tubos capilares em 0,5 cm da base inferior e introduzidos em cubas de vidro contendo o eluente e fechadas com vidro de relógio. A fim de avaliar o perfil químico e revelar metabólitos

incolores na luz visível, as cromatoplasmas foram observadas sob luz UV em comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e, então, foram aplicados os reveladores de soluções de cloreto férrico, cloreto de alumínio, verde de bromocresol, vanilina, hidróxido de potássio, reagente de Dragendorff e vapores de iodo (MARQUES, BORGES, 2012).

Para realizar o ensaio de cromatografia em coluna (CC), foi utilizado 50,00 g de sílica misturada a 200 ml de Hex a fim de montar a fase estacionária da coluna. Para o adsorvato, foram utilizados 1,00 g do extrato metanólico junto a 3,00 g de sílica e solubilizado em 5 ml de hexano. Logo após, foram preparadas soluções com os solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), álcool butílico (BuOH), e ácido acético (HOAc) dissolvido em água (1:1). Foram recolhidas 295 frações de 5 ml deste processo, então, foram realizados testes de CCD para identificar as frações com composição semelhante que poderiam ser agrupadas. Foi possível reunir 11 frações, das quais duas foram enviadas para avaliação de atividade citotóxica.

Na ressonância magnética nuclear, os espectros unidimensionais de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram registrados em espectrômetro Bruker UltraShield 300 operando a 300 MHz. Os espectros foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3) da marca TediaBrasil contendo 1% de tetrametil-silano - TMS (Sigma-Aldrich) e colocado para ensaio em uma sonda de 5 mm BBO.

Para a avaliação da atividade citotóxica foram analisados o extrato metanólico (RgEB) e as frações RgF3 e RgF4 obtidas no ensaio por CC. Os ensaios de avaliação da atividade citotóxica foram realizados frente às linhagens de células tumorais de MCF-7, MDA-MB-231 e PC-3, e não tumorais de MCF-10A. As células, cultivadas em meios de cultura específicos, tiveram seu crescimento controlado e avaliado a cada 24 horas durante dois dias. As linhagens foram plaqueadas e numeradas. Após 24 horas de incubação iniciaram-se os tratamentos com o extrato metanólico e com as frações. Após outras 24 horas foram feitas as medidas de atividade anticarcinogênica e o produto resultante foi quantificado por espectrofotometria, no qual a densidade óptica celular é determinada através da absorbância, demonstrando o crescimento celular em 24 horas. (MOSMANN, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na massa inicial de material vegetal (24,52 g) e a massa de extrato metanólico obtido (4,32 g), o rendimento médio, calculado em porcentagem mássica da extração, foi de 17,62%. A partir do ensaio de cromatografia de camada delgada (CCD), com eluição de Hex e AcOEt, na proporção 1:1, foi possível avaliar o perfil químico dos extratos em Hex, DCM, AcOEt e MeOH. Foi possível a identificação da presença de diferentes classes de metabólitos secundários evidenciados pelos ensaios com os reveladores usados. Os resultados obtidos na câmara de vapor de iodo e com o revelador KOH em solução etanólica indicam a presença de terpenos. O revelador vanilina confirma a presença do grupo álcool entre os metabólitos que compõem o extrato. Os reveladores cloreto férrico e cloreto de alumínio, sugerem, respectivamente, a presença de compostos fenólicos e flavonoides. A presença de alcaloides é indicada pelo resultado positivo com o revelador Reagente de Dragendorff. Os carotenoides foram facilmente percebidos após revelação na luz visível.

Para obter uma indicação das classes de substâncias presentes no extrato metanólico de *R. graveolens* foram realizadas análises por RMN. O clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi usado para solubilizar 10 mg do extrato e apresentou pico de impureza de CHCl_3 , presente em δ_{H} 7,26 ppm no RMN de Hidrogênio e um padrão de três picos centrados presentes em δ_{C} 77 ppm no RMN de Carbono-13. Os sinais entre δ_{H} 3,1 e δ_{H} 4,4 podem estar associados a hidrogênios com um átomo de carbono sp^3 ligado a um oxigênio como em $(-\text{O}-\text{CH}_2-)$ ou $(-\text{O}-\text{CH}_3)$, o que seria compatível com a presença de grupos associados as classes funcionais álcool, éter e éster. A região entre δ_{H} 4,5 e δ_{H} 6,0 normalmente é associada a hidrogênios com um átomo de carbono $\text{C}=\text{C}$ sp^2 sugerindo a presença de alquenos, o que pode estar associado com a presença de terpenos no extrato. Entretanto, esses hidrogênios também podem corresponder a compostos fenólicos (Cf. Figura 1). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 25 sinais mais intensos (Cf. Figura 2).

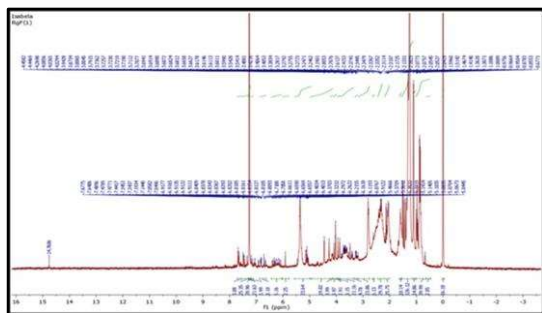


Figura 1. Espectros de RMN de ^1H .
(CDCl_3 , 300 MHz)

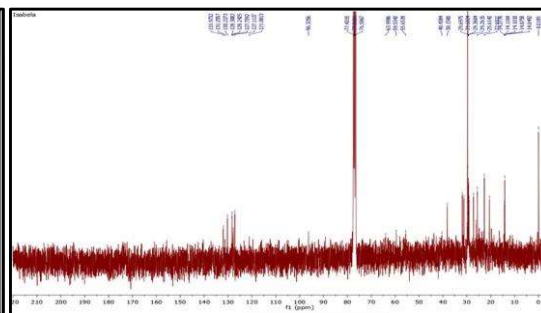


Figura 2. Espectros de RMN de ^{13}C .
(CDCl_3 , 300 MHz)

Os resultados do ensaio de atividade anticarcinogênica foram comparados com os obtidos para Doxorubicina (DOXO; Sigma) e Curcumina (CUR, Sigma), os quais foram usados como droga padrão. Considerando CE_{50} a concentração necessária para reduzir em 50% o número de células tumorais, os resultados de atividade citotóxica para MCF-7 destacam-se para as frações RgF3 e RgF4 uma vez que são bem menores que aquele obtido para o extrato bruto RgEB. Podemos supor que a substância, ou o grupo de substâncias, responsáveis pelo resultado devem estar presentes nessas frações. No ensaio de atividade citotóxica para PC-3 o resultado obtido para a fração RgF4 é um pouco melhor do que aquele obtido para a fração RgF3. No caso do ensaio de atividade citotóxica para MDA-MB-231 o resultado para a fração RgF3 foi excelente, sendo o melhor considerando as quatro linhagens de células analisadas. O ensaio de atividade citotóxica para MCF-10A também apresentou ótimos resultados para as frações RgF3 e RgF4, sendo estes melhores que o observado para o extrato bruto RgEB.

CONCLUSÕES

Levando em consideração que o metanol é um solvente capaz de extrair heterosídeos em geral e que, principalmente, devido a sua alta polaridade, consegue interagir com uma variada quantidade de compostos, sua escolha para ser o ponto de partida neste estudo foi adequada. Os solventes utilizados para realizar a cromatografia em coluna também se mostraram eficientes para separar diferentes compostos conforme sua polaridade nas frações obtidas. O rendimento obtido na extração das folhas frescas da espécie *Ruta graveolens* foi compatível com aquele observado em outros estudos.

O estudo fitoquímico realizado com o extrato metanólico de *Ruta graveolens* permitiu a identificação da presença de diferentes classes de metabólitos secundários evidenciados pelos ensaios com os reveladores usados. Os espectros de Hidrogênio e de Carbono-13, obtidos pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear para o extrato bruto RgEB e para as frações RgF3 e RgF4, ratificam o perfil químico estabelecido pela Cromatografia em Camada Delgada.

Os ensaios de atividade citotóxica para o extrato metanólico RgEB e para as frações testadas mostram resultados positivos de atividade frente às linhagens de células tumorais de adenocarcinoma mamário não metastático (MCF-7), adenocarcinoma de próstata (PC-3), não tumorais de adenocarcinoma mamário de tecido normal (MCF-10A) e adenocarcinoma mamário metastático (MDA-MB-231), em especial, o mais expressivo. Dessa forma, pretende-se dar continuidade a esse estudo, realizando uma análise de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas para o extrato bruto, analisando as demais frações obtidas e, posteriormente, isolando as substâncias presentes nas frações que apresentarem as melhores atividades anticarcinogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 6 ed. p. 45-56, 1995.

MARQUES, J. A. e BORGES, C. P. F. Práticas de Química Orgânica. Campinas: Editora Átomo, 2012, 2ª edição.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 1983, 65, 55–63.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS *Ruta graveolens* L., Rutaceae – Arruda. Brasília, 2021. 76 p.

ORLANDA, J. F França; NASCIMENTO, A. R. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. South African Journal of Botany, [S. l.], p. 103-106, 22 abr. 2015.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. [S. l.]: Artmed, 2017. 848 p.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos PIBITI, e à CAPES. Ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Patricia Sartorelli e à Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini, do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da UNIP, pela colaboração nas análises de RMN e nos ensaios de atividade anticarcinogênica. Ao orientador do projeto Prof. Me. Waldemar Alves Ribeiro Filho e à Fatec Praia Grande – Centro Paula Souza, pelo apoio e por possibilitarem a realização desta pesquisa.