

ATIVIDADE ANTICARCINOGÊNICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS FRESCAS DA ESPÉCIE *Allophylus edulis* (SAPINDACEAE)

Beatriz Isabel Mota do Carmo¹
Waldemar Alves Ribeiro Filho²

Aluno do CST em Processos Químicos; e-mail: beatriz.carmo@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: *Allophylus edulis*. Atividade Anticarcinogênica. Perfil Químico. Potencial Cítotóxico.

INTRODUÇÃO

Analizar espécies vegetais que ainda não tenham sido estudadas ou aprofundar o conhecimento sobre aquelas das quais já são conhecidos alguns resultados é uma forma apropriada de contribuir para o inventário de plantas que possam se tornar um ponto de partida para a prospecção de novos fármacos (RIBEIRO FILHO, 2014).

A *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., A. Juss. & Campess.) Radlk., comumente conhecida como Chal-Chal, planta selecionada para este estudo, tem sido empregada cotidianamente com base na tradição popular; alguns estudos anteriores já comprovaram sua baixa toxicidade, além de efetivo potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (TREVIZAN *et al.*, 2016). Entretanto, não tem ainda uma significativa quantidade de estudos sobre a composição química e a atividade biológica de seus metabólitos, principalmente no que se refere aos extratos obtidos de suas folhas, os quais podem apresentar moléculas capazes de atuar como agente anticarcinogênico.

Apesar das drogas sintéticas constituírem ainda a principal fonte de medicação da atualidade, por conta de sua atividade biológica, os produtos à base de plantas vêm se tornando cada vez mais relevantes para o tratamento das doenças, devido à grande diversidade de espécies e à grande diversidade estrutural encontrada nos metabólitos secundários que são sintetizados pelas plantas (BRANDÃO, 2010). Ademais, fármacos naturais podem promover eficiência de tratamento com menores efeitos colaterais.

OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo realizar um estudo químico e biológico com as folhas frescas da espécie vegetal *Allophylus edulis*, com a finalidade de identificar compostos com relevante potencial anticarcinogênico frente às linhagens de células tumorais e não tumorais de adenocarcinoma mamário e tumorais de adenocarcinoma de próstata. O projeto abrange as seguintes etapas: extração, com diferentes solventes, das folhas de *Allophylus edulis* através da técnica de maceração; separação dos compostos, presentes nos extratos obtidos e no extrato mais promissor, através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e de Cromatografia em Coluna (CC), para verificação do perfil químico; determinação da estrutura das substâncias isoladas a partir de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C; e avaliação do potencial cítotóxico das substâncias isoladas frente às linhagens de células tumorais de MCF-7, MDA-MB231 e PC-3, e não tumorais de MCF-10A.

METODOLOGIA

Folhas frescas de *Allophylus edulis* foram coletadas de um indivíduo localizado no Parque Ecológico Perequê no município de Cubatão, Estado de São Paulo. O material foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de cadastro AACAA268.

O material vegetal colhido foi submetido a lavagem, secagem e Trituração. A extração, obtida através da técnica de maceração estática, foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, todos grau P.A. Em seguida os extratos foram dissolvidos em Banho Ultrassônico e filtrados em bomba de vácuo.

Para realizar os ensaios de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplacas de sílica-gel, sob suporte de alumínio. Após testes em cubas cromatográficas estabeleceu-se que os eluentes mais apropriados para a separação dos componentes das amostras foram as misturas dos solventes hexano e acetato de etila nas proporções 1:1 para análise dos extratos, 2:1 e 1:3 para análise das frações. Sendo que, as placas cromatográficas preparadas para avaliação do perfil químico foram posteriormente reveladas por: luz visível, luz UV, soluções de cloreto de alumínio, cloreto férrico, hidróxido de potássio 10% em etanol, solução indicadora verde de bromocresol, Reagente de Dragendorff, vanilina e vapores de iodo (MARQUES, BORGES, 2012).

Para os ensaios de Cromatografia em Coluna (CC), a fase estacionária usada foi de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm), para a fase móvel foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e álcool butílico, e a solução de ácido acético e água deionizada (1:1), com aumento gradativo da polaridade. O adsorvato foi preparado com 3,02 g de sílica gel e 1,01 g de extrato etanólico, solubilizado em quantidade mínima de solvente, cerca de 5,5 mL de metanol. Deste processo foram recolhidas 233 frações de 5 ml, que após submetidas à dois processos de fracionamento, resultaram em 16 frações finais, das quais duas foram enviadas para avaliação da atividade citotóxica.

Os espectros unidimensionais de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C foram registrados em espectrômetro Bruker UltraShield 300 operando a 300 MHz. Os espectros foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃) contendo 1% de tetrametil-silano - TMS (SigmaAldrich) e colocado para ensaio em uma sonda de 5 mm BBO.

A atividade citotóxica foi avaliada para o extrato etanólico e para as frações AeF7 e AeF8 obtidas no ensaio por Cromatografia em Coluna, frente às linhagens de células tumorais de MCF-7, MDA-MB-231 e PC-3, e não tumorais de MCF-10A.

As linhagens de células foram cultivadas em meio de cultura, suplementadas com RPMI1640 mais soro bovino fetal 5% (ambos Cambras) e 1% glutamina (Sigma). Em seguida, foram incubadas a 37°C com 5% de gás carbônico (CO₂) e umidade relativa do ar em 100%. Na presente análise, as linhagens foram plaqueadas e numeradas para incubação de 1 x 10⁴ células em uma placa padrão de 96 poços.

O produto resultante foi quantificado por espectrofotometria, no qual a densidade ótica celular é determinada através da absorbância medida no comprimento de onda de 570 nm, demonstrando o crescimento celular em 24 horas. As medidas da atividade anticarcinogênica foram feitas utilizando o Kit de Proliferação Celular (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), o qual é projetado para quantificar por espectrofotometria o crescimento celular, a viabilidade e a proliferação celular, podendo ser utilizado como um indicador direto de citotoxicidade e apoptose (MOSMANN, 1983; MONKS, 1991). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos para Doxorrubicina (DOXO; Sigma) e Curcumina (CUR, Sigma), os quais foram usados como droga padrão. O ensaio realizado mede a atividade da redutase mitocondrial em células vivas e se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio para os cristais de formazana azuis / púrpura por células metabolicamente ativas.

Por fim, o software GraphPad Prism versão 7.05 para Windows foi usado para interpretar os resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a massa inicial de material vegetal (212,75 g) e a massa de extrato etanólico obtido (1,81 g), o rendimento médio calculado em porcentagem mássica (% m/m) foi de 0,85%.

Os resultados obtidos na câmara de vapor de iodo e com o revelador KOH em solução etanólica indicam a presença de terpenos. Os reveladores, verde de bromocresol e vanilina confirmam, respectivamente, a presença dos grupos ácido carboxílico e 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. Como de praxe, os carotenoides são facilmente percebidos após revelação na luz visível.

Os sinais observados nos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C do extrato etanólico, bem como, os sinais obtidos nas frações AeF7 e AeF8, confirmam os ensaios realizados por CCD sugerindo a presença de flavonoides, terpenos e provavelmente grupos ácidos no extrato etanólico da espécie *A. edulis*.

A análise citotóxica mostrou que tanto o extrato bruto (AeEB), quanto as frações (AeF7 e AeF8) apresentaram atividade para as quatro linhagens celulares, sendo os resultados particularmente muito significativos para a linhagem de células de MDA-MB-231 (Figura 1).

Figura 1: Resultados para MDA-MB-231.

	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	R ²
Curcumina	4,259 x 10 ⁶	- 0,06371
AeEB	0,03895	0,8684
AeF7	0,002658	0,2116
AeF8	0,01036	0,0351

Fonte: autoria própria, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O etanol e os demais solventes utilizados para realizar a extração e a Cromatografia em Coluna se mostraram eficientes para extraer e separar diferentes compostos conforme sua polaridade nas frações obtidas. Por outro lado, o rendimento obtido na extração das folhas frescas da espécie *Allophylus edulis* foi muito baixo.

O estudo fitoquímico realizado com o extrato etanólico de *Allophylus edulis* permitiu a identificação da presença de diferentes classes de metabólitos secundários evidenciados pelos ensaios com os reveladores usados.

Embora, ainda necessitem de uma análise mais profunda e um estudo de replicação, os espectros de Hidrogênio e de Carbono-13, obtidos pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear para o extrato bruto AeEB e para as frações AeF7 e AeF8, ratificam o perfil químico estabelecido pela Cromatografia em Camada Delgada, pois os sinais de deslocamento químico sugerem a presença de flavonoides e terpenos.

Os ensaios de atividade citotóxica para o extrato etanólico AeEB e para as frações testadas mostram que metabólitos secundários presentes nas folhas frescas de *Allophylus edulis* apresentam atividade frente às linhagens de células de adenocarcinoma mamário não metastático (MCF-7), adenocarcinoma de próstata (PC-3), adenocarcinoma mamário de tecido normal (MCF-10A) e adenocarcinoma mamário metastático (MDA-MB-231).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Química Nova [online]. 2010, vol. 33, n. 6, pp. 1359-1369.

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

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; PAULL, K.; VISTICA, D.; et al. Natl Cancer Institute 1991;83:757.

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

RIBEIRO FILHO, Waldemar Alves. **Óleos Essenciais de Plantas Medicinais**: estudo químico e avaliação da atividade biológica das espécies *alophyllum edulis* e *guarea macrophylla*. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Química, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2014.

TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antiMycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis*. *Journal Of Ethnopharmacology*, Grande Dourados, p. 510-515, 06 set. 2016.

AGRADECIMENTOS

A Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos PIBITI. A Faculdade de Tecnologia de Praia Grande que nos concedeu espaço, material e oportunidade para a realização dessa pesquisa.

A pesquisadora e mestrandona Daniela Cristina Russo, e a professora Dra. Patricia Sartorelli do Laboratório de Química Bio-Orgânica Otto Richard Gottlieb do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da UNIFESP Campus Diadema que dispuseram a ajudar, prontamente, com as análises por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear e a interpretar dados indispensáveis para essa pesquisa. A vocês meu muito obrigada.

A professora Dra. Ivana Barbosa Suffredini, responsável pelo Núcleo de Pesquisas Biodiversidade da Universidade Paulista, pela orientação nas análises de atividade anticarcinogênica. Agradecida!

Ao meu professor orientador Waldemar, pela confiança, paciência, zelo, obstinação e coerência para me orientar da melhor forma possível.