

Estudo químico de espécies do gênero *erythroxyllum* (erythroxyllacea)

Evelise Costa Mesquita¹
Hélder Nagai Consolaro²

Rosy Iara Maciel de Azambuja
Ribeiro³
Richele Priscila Severino⁴

Resumo: Ao longo dos anos, a natureza e sua diversidade se fazem indispensáveis na busca de recursos destinados principalmente à sobrevivência humana. A família Erythroxyllacea é encontrada no Cerrado e é composta por 4 gêneros, compreendendo cerca de 250 espécies. Utilizando técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) e de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, realizou-se um mapeamento dos diferentes tipos de metabólitos secundários presentes nas espécies do gênero *Erythroxyllum*: *E. campestre*, *E. deciduum*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*. Além disso, verificou-se o potencial citotóxico de *E. deciduum* frente a células 4T1 (carcinoma mamário), mostrando-se promissor quando comparado com a cisplatina (controle positivo).

Palavras-chave: *Erythroxyllum*. Erythroxyllacea. Perfil químico. Citotoxicidade.

-
- 1 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química. Contato: evelisemesquita@gmail.com. Bolsista Pós-Graduação - CAPES.
 - 2 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia. Contato: helderconsolaro@gmail.com
 - 3 Universidade Federal de São João del-Rei – *Campus* Centro-Oeste Dona Lindu. Contato: rosyiara@gmail.com
 - 4 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química. Contato: richeleps@yahoo.com.br

1 Introdução

A natureza e sua diversidade se faz responsável por despertar curiosidade e fascínio devido à variedade de recursos que podem ser ofertados, destinados principalmente a sobrevivência (BOLZANI & VIEGAS JR., 2006). Reconhecendo essa importância, pesquisadores buscaram ao longo dos anos, compreender o seu processo evolutivo, destacando diferentes aplicações para as substâncias extraídas da natureza, que além de garantir o sustento de uma sociedade, podem ser utilizadas como medicamentos, além também de apresentar toxicidade (FERREIRA & PINTO, 2010).

Dentre a biodiversidade em que podem ser extraídas essas substâncias, o reino vegetal possui maior variedade química, que contribui significativamente para o estudo e conhecimento da Química de Produtos Naturais e constitui atualmente uma importante alternativa de produção de fármacos e medicamentos (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Autores como Barreiro & Mansur (2008), Rezende et al. (2003), Montanari & Gaudio (2011), vem enfatizando a importância dos produtos naturais no processo de descoberta de novos fármacos (BOLZANI & VIEGAS JR., 2006). A destacada atividade biológica reportada para a química dos produtos naturais, deriva especialmente de metabólitos secundários, colaborando no desenvolvimento de medicamentos que podem ser utilizados para patologias, como doenças infecciosas (bacteriana, fúngica, parasitária e viral), imunológicas, cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias, oncológicas, entre outras (MISHRA & TIWARI, 2011).

O Cerrado abriga espécies de plantas que possuem metabólitos secundários de diferentes classes, os quais podem possuir atividade biológica considerável, entretanto, ainda são pouco exploradas do ponto de vista químico e farmacológico (NASCIMENTO, 2014). A literatura reporta muitas espécies que contribuem para os estudos que visam o descobrimento de novos fármacos, o que confirma a importância da Química dos Produtos Naturais (MACHADO et al., 2004; LIRA, 2007, & MENDONÇA, 2008).

A família Erythroxylacea é encontrada no Cerrado e é composta por árvores, arbustos ou subarbustos, abrangendo 4 gêneros e compreendendo cerca de 250 espécies. Têm-se seus principais centros de diversidade na Venezuela, Madagascar e Brasil, sendo que neste último país foram listadas 25 espécies nativas, cujos habitats variam de floresta a Cerrado (ALBUQUERQUE et al., 2014). Dos quatro gêneros pertencentes a esta família (*Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl., *Pinacopodium* Exell, *Erythroxylum* P. Browne), apenas o *Erythroxylum* tem ocorrência no Brasil (BARBOSA et al., 2014).

O gênero *Erythroxylum*, mais conhecido pela espécie *Erythroxylum coca* (fonte de cocaína), é o maior entre os quatro gêneros pertencentes à família Erythroxylaceae e compreende cerca de 97% de suas espécies, que estão distribuídas por regiões tropicais e subtropicais, os quais apresentam propriedades farmacológicas relevantes (RIBEIRO et al., 2013). Este gênero é conhecido pelas espécies que são empregadas na medicina popular, assim como pela ocorrência de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas relevantes, tais como alcaloides do tipo tropano, flavonoides e terpenoides (Figura 1) (NAKAMURA, 2003).

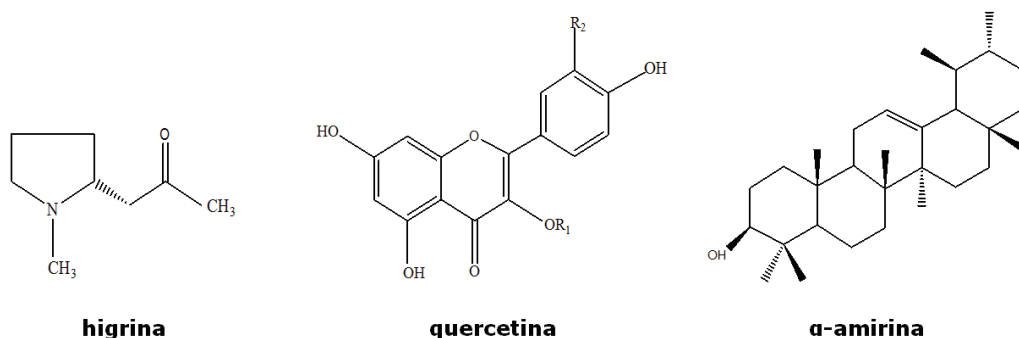


Figura 1 Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*.

Dentre essa variedade de espécies vegetais, muitas ainda não foram estudadas ou possuem poucas informações sobre sua bioatividade. Neste contexto, selecionou-se para estudo as espécies *E. campestre*, *E. deciduum*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*, sendo essas encontradas em todos os gradientes de cerrado, desde cerradão até campo limpo, sendo mais comuns em cerrado aberto. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo do perfil químico das folhas dessas espécies do gênero *Erythroxylum*, utilizando métodos cromatográficos de alta eficiência e ressonância magnética nuclear de hidrogênio. O extrato etanólico de *E. deciduum* também foi avaliado quanto ao potencial citotóxico.

2 Metodologia

2.1 Coleta do material vegetal

As folhas das quatro espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. campestre*, *E. deciduum*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*) foram coletadas nas dependências da fazenda da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão (UFG/RC), no muni-

cípio de Catalão – GO, sob a Autorização nº 010698/2013-2 CNPq. Os dados e as coordenadas de GPS foram armazenados para coletas futuras, sendo esta parte do trabalho auxiliada pelo Hélder Nagai Consolaro, o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo.

2.2 Preparação dos extratos

Após a secagem do material coletado, realizou a moagem e pesagem das folhas de cada espécie. Em seguida, para preparar os extratos foi utilizado um homogeneizador dispersor do tipo ultra turrax, com 10 g de material vegetal e 150 mL de solventes com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado, obtendo-se 16 extratos (quatro extratos de cada espécie vegetal).

2.3 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com F254 ($\varphi = 0,2$ mm), em folhas de alumínio, marca Fluka. As placas cromatográficas foram reveladas em: (i) câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, marca *Spectroline*, modelo CM-26 UV; (ii) solução ácida de vanilina; (iii) solução de cloreto férrico; (iv) solução de Dragendorff.

2.4 Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD)

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência as amostras foram filtradas em membrana 0,22 μm PFE (Millex) e posteriormente injetadas em um equipamento de CLAE *Agilent Technologies*, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor manual e software *EZChrom Edition*, equipado com coluna de C18 (*Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18* 5 μm , 150 x 4,6 mm). A fase móvel usada para análise foi gradiente metanol/água de 0-100%, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, durante 60 minutos de análise e monitorada em 217, 220, 240, 254 e 365 nm.

2.5 Análise dos extratos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em um equipamento da marca Bruker, modelo Avance III - 11,7 Tesla (500 MHz para ¹H). Os experimentos foram

realizados em colaboração com o Luciano Morais Lião do Instituto de Química da UFG - Regional Goiânia, Goiânia – GO.

2.6 Preparação do extrato etanólico de *E. deciduum*

Preparou-se o extrato etanólico de *E. deciduum* a fim de realizar ensaios de citotoxicidade. As folhas desta espécie foram coletadas, secas, moídas e submetidas à percolação em etanol (200 g de folha em 450 mL de solvente) a temperatura ambiente, sendo realizadas três extrações de sete dias cada. Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à baixa pressão, sendo obtidos o extrato bruto etanólico das folhas da *E. deciduum*. Além disso, o extrato foi submetido a teste citotóxico.

2.7 Ensaios de citotoxicidade

Para o teste citotóxico, foram adicionadas 2×10^4 cels/poço de células 4T1 usando meio RPMI suplementado com 10% de SFB. A placa contendo as células foi incubada por 24h em estufa umidificada à 5% de CO₂ e 37 °C. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e adicionado novo meio contendo as amostras a serem testadas nas concentrações: 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado tratamento com cisplatina a 30 µg/mL. O controle negativo consistiu em meio de cultura contendo 1% de DMSO. Após 24 horas em tratamento o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS (*phosphate buffered saline*). Em seguida, foi adicionado MTT (tetrazolium - 2,5 mg/mL) e a placa encubada em estufa por 2,5 horas. Após este período o MTT foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO em cada poço, e realizada a leitura de absorbância à 570 nm.

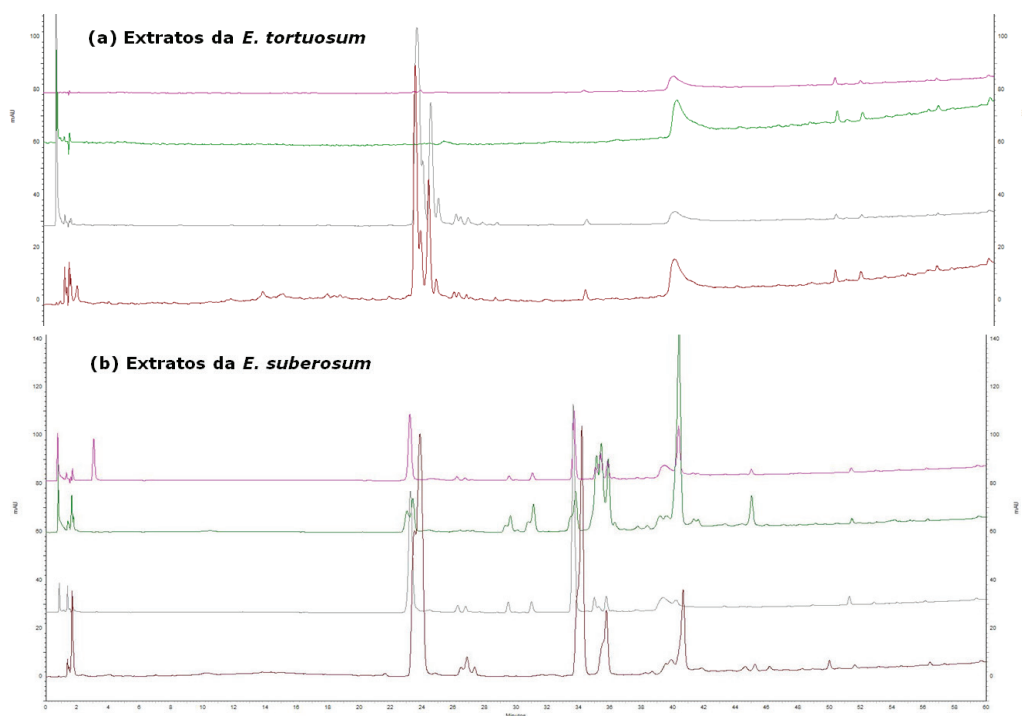
3 Discussão e resultados

Os 16 extratos (Tabela 1) obtidos das quatro espécies do gênero *Erythroxylum* foram submetidos a análise por CCD e quando revelados por irradiação de luz ultravioleta e solução ácida de vanilina, apresentaram a eluição de uma mistura bastante complexa de substâncias de diferentes polaridades. Além destes reveladores, as quatro espécies mostraram teste positivo frente ao revelador de Dragendorff, que sugere a presença de alcaloides quando apresentar manchas escuras (NASCIMENTO, 2014).

Tabela 1 Massa de material seco e dos extratos obtidos de espécies do gênero *Erythroxylum*.

Espécie	Material vegetal seco (g)	Extratos			
		hexano (mg)	diclorometano (mg)	acetato de etila (mg)	metanol (mg)
<i>E. campestre</i>	12,1	188,0	86,1	85,0	1823,9
<i>E. deciduum</i>	8,0	80,5	33,0	44,1	1041,3
<i>E. tortuosum</i>	10,1	93,9	56,8	74,7	2413,2
<i>E. suberosum</i>	12,6	237,2	162,7	123,2	1882,7

Uma alíquota (1 mg) de cada extrato foi dissolvida em 1 mL de uma mistura metanol:água (1:1 v/v) e analisada por CLAE-UV/DAD. Os perfis cromatográficos obtidos para cada m dos extratos estão representados na Figura 2 e é possível observar uma vasta variabilidade de absorções.

**Figura 2** Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD em 254 nm dos extratos de *Erythroxylum*. (Continua)

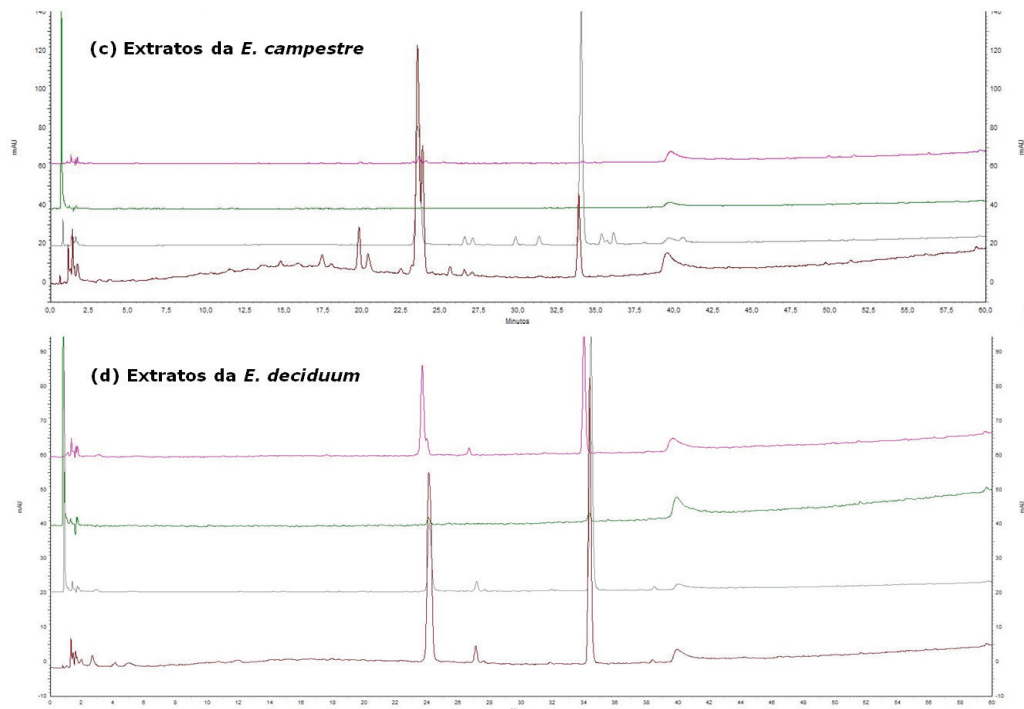


Figura 2 Cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD em 254 nm dos extratos de *Erythroxylum*. (Continuação)

Vale ressaltar que foi possível observar nos extratos das quatro espécies a presença de uma mesma substância com tempo de retenção de aproximadamente 34 minutos, podendo ser um marcador taxonômico para este gênero.

O comprimento de onda escolhido para a apresentação dos cromatogramas de CLAE-UV/DAD foi em função de um maior número substâncias apresentarem absorções em 254 nm, apresentando picos distribuídos em tempos de retenção intermediários entre os iniciais, que normalmente são compostos muito polares, e os finais que podem ser ácidos graxos (ANDRADE et al., 2013). Além disso, os extratos de *E. tortuosum* (extratos em hexano e diclorometano) e *E. campestre* (extrato em diclorometano) não apresentaram absorções significativas, evidenciam a ausência de substâncias ricas em cromóforos.

Já no cromatograma do extrato etanólico das folhas da *E. deciduum* (Figura 3), verificou-se que a constituição do extrato é praticamente a mesma observada para os extratos em hexano + diclorometano + acetato de etila + metanol (extração via ultra turrax), evidenciando a equivalência geral dos métodos utilizados para a preparação dos extratos.

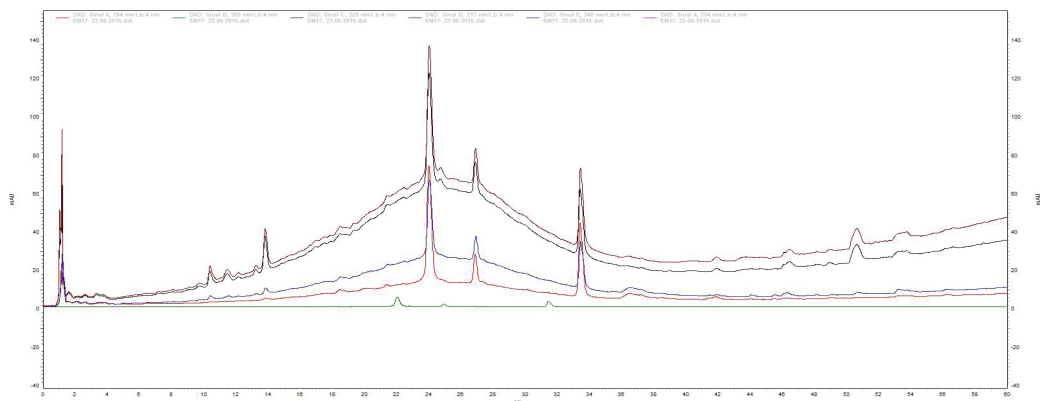


Figura 3 Cromatograma de *E. deciduum* obtido por CLAE-UV/DAD com detecção em 217, 220, 240, 254, 365 nm.

Todos extratos foram submetidos a análise por RMN de ^1H (500 MHz) e a partir dos resultados foi possível aferir informações sobre a composição química dos mesmos.

Na Figura 4 é possível observar que os espectros referentes aos extratos de *E. deciduum* apresentam uma grande quantidade de sinais em campo baixo, que correspondem aos hidrogênios mais desblindados. Nos quatro extratos, há a presença de sinais na região de δ_{H} 0,72 a 2,1 com multiplicidades não resolvidas (que podem ser característicos de metilas) e ausência da região dos aromáticos no caso do extrato hexânico, sugerindo a presença de terpenoides. Nos outros extratos há presença de sinais na região de δ_{H} 3,0 a 5,4 que indicam hidrogênios característicos de substâncias glicosiladas, e sinal próximo ao δ_{H} 4,01 caracterizando a presença metoxilas (ALBUQUERQUE et al., 2014). No extrato metanólico, além dos deslocamentos mencionados, há sinais característicos de hidrogênios aromáticos na região de 7 ppm e hidrogênios bastante desblindados em torno de 9 ppm sendo estes sinais característicos de hidrogênios nitrogenados, como os alcaloides característicos do gênero.

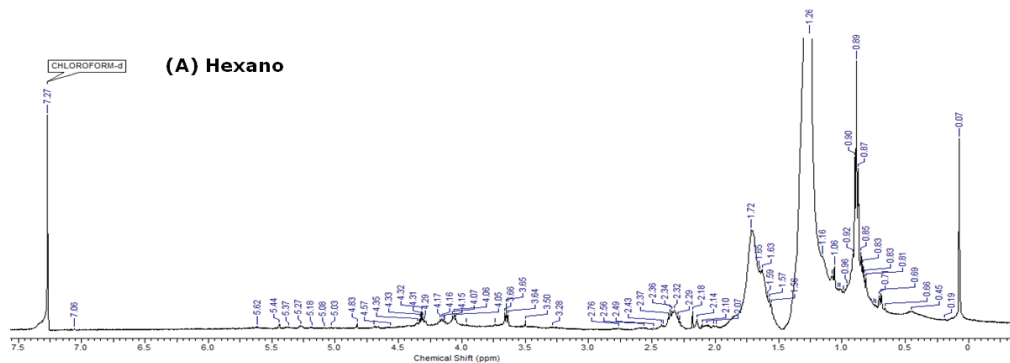


Figura 4 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) para os extratos obtidos de *E. deciduum*. (Continua)

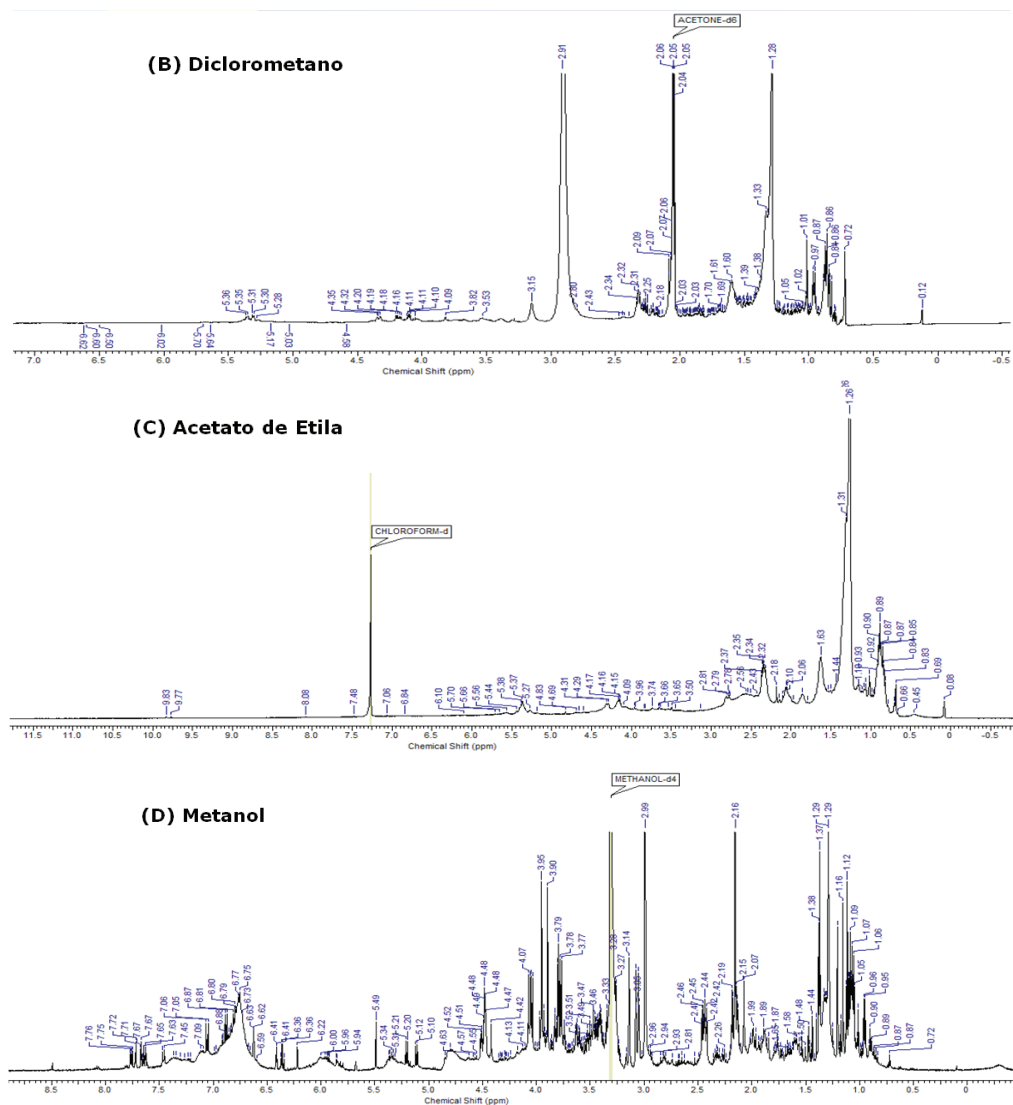


Figura 4 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) para os extratos obtidos de *E. deciduum*. (Continuação)

Os extratos de *E. campense* e *E. tortuosum* possuem majoritariamente flavonoides glicosilados, sendo a raminose um dos glicosídeos presentes. Já os extratos de *E. deciduum* e *E. suberosum* apresentaram espectros bastante heterogêneos, sendo possível observar sinais característicos de compostos aromáticos, terpenoides e hidrogênios desblindados, podendo sugerir a presença de alcaloides.

Embora os deslocamentos apresentados indicam que a maioria são sinais complexos, provenientes de extratos brutos, puderam ser comparados com o apresentado na literatura conforme Naidu et al. (2012) & Nascimento et al. (2012).

Os resultados do teste citotóxico *in vitro* (Tabela 2) frente a células tumorais de câncer de mama mostraram-se promissores, comparando-os com Guedes (2016). O estudo realizado com o extrato etanólico de *E. deciduum* em células do tipo 4T1 durante 24 horas, destacou o impedimento do crescimento das células cancerígenas. A cisplatina utilizada como controle positivo, avaliou a sensibilidade da linhagem celular e os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento). Portanto, conforme observado no teste de citotoxicidade, nas concentrações de 25,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu inibição do crescimento das células tumorais, equivalente ao resultado observado para cisplatina que é utilizada como controle positivo. Os resultados são bastante promissores uma vez que esse extrato ainda apresenta uma mistura complexa de metabólitos que estão em pequena concentração molar, mas que confere ao extrato capacidade citotóxica (PLUIM et al., 2004).

Tabela 2 Análise dos resultados de citotoxicidade do extrato etanólico *E. deciduum* frente a células tumorais de câncer de mama (4T1).

Concentração EE ($\mu\text{g/mL}$)	Média	SD
Controle negativo	100%	14%
5,0	78%	11%
10,0	18%	4%
25,0	11%	1%
50,0	10%	1%
75,0	15%	4%
100,0	11%	0%
Cisplatina 30 $\mu\text{g/mL}$	11%	7%

Assim, como abordado por Souza (2013), a investigação de novos fármacos de origem vegetal que possuam capacidade antitumoral compreende associação de técnicas fitoquímicas a testes biológicos. Portanto, a investigação química se torna importante, pois não há relatos desta espécie que enfatizam a associação a atividade citotóxica (*in vitro*).

4 Considerações finais

A partir das técnicas utilizadas, foi possível traçar um perfil químico das espécies pertencentes ao gênero *Erythroxylum*, mas destaca-se a diversidade de

composição química. Observou-se similaridade entre alguns dos constituintes, podendo estes serem utilizados como marcadores químicos de interesse. Além disso, o extrato etanólico da *E. deciduum* apresentou promissora capacidade citotóxica frente as células tumorais 4T1 (câncer de mama), destacando o interesse e a importância no isolamento e caracterização dos metabólitos secundários presentes.

Referências

- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARESA, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S. GONÇALVES; G. F., COSTA, V. C. O., AGRAC, M. F.; PESSOA, H. L. F.; SILVA, M. S. Flavonoides Glicosilados de *Erythroxyllum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxyllaceae). *Química Nova*, v. 37, n. 4, p. 663-666, 2014.
- ANDRADE, M. R. Alcaloides de Rutaceae: química e atividade biológica. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 216 p.
- BARBOSA, C.C.; SILVA, F. D.; SANTOS, A. M.; VAZ, M. R. F.; NÓBREGA F. F. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxyllum*. *Revista Saúde e Ciência On-Line*, v. 3, n. 3, p. 207-216, 2014.
- BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, C. A. M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Art Méd. Editora Ltda: Porto Alegre, p. 161-178, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, n. 3, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BOLZANI, V. S.; VIEGAS JR, C. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.
- LIRA, W. M. Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*. 2007. 182 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.
- MACHADO, R.B.; RAMOS, M.B.; HARRIS, M.B.; LOURIVAL, R.; AGUIAR, L. M. S. 2004. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado.

In: Anais IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. p. 29-38. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Brasil.

MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA JÚNIOR, M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, T.S., NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. Flora vascular do cerrado: Checklist com 12.356 espécies. In Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa-CPAC, Planaltina, p.417-1279, 2008.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. “Natural products: an evolving role in future drug discovery”. Eur. J. Med. Chem., 46: 4769-4807, 2011. MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. “Estratégias e princípios do planejamento molecular de fármacos”. IN: Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. MONTANARI, C. A. (Org.). 1ed. São Paulo, EDUSP, p. 292-311, 2011.

MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. “Estratégias e princípios do planejamento molecular de fármacos”. IN: Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. MONTANARI, C. A. (Org.). 1ed. São Paulo, EDUSP, p. 292-311, 2011.

NASCIMENTO, M. N. G. Estudo Químico de *Erythroxylum soberosum* (Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Departamento de Química, Goiás, 2014.

GUEDES, P. M. Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de transimidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato III de imidazólio (NAMI-A) em células de carcinoma mamário (4T1). 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Universidade de Brasília, Planaltina – DF, Departamento de Química, 2016.

NAKAMURA, A.T. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, 2003.

NAIDU, P.V.S.; KINTHADA, P.M.M.S.; KALYANI, P.; MURALIDHAR, P. “Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anticancer drugs”. *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.*, v. 3, p. 25, 2012.

- NASCIMENTO C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. “Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxyllum suberosum*”. *Phytochem. Lett.*, v. 5, p. 401-406, 2012.
- PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R. C.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 54, n. 1, p. 71-78, 2004.
- RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M. X. & DAVID, J. P. “A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxyllum rimosum* (Erythroxyllaceae)”. *Phytochem Lett.*, v. 6, p. 232-235, 2013.
- REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; GARCEZ, F. R.; EPIFANIO, R. A. Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova*, v. 26, n.6, p. 966-971, 2003.
- SOUZA, S. M. Estudo fitoquímico e atividade antitumoral de extrato de folhas de *Austroplenckia populnea* Reissek, 2013. Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFOP. Dissertação de Mestrado, p. 96.

