Verificação da presença de ácido gálico e avaliação do potencial antioxidante e antitumoral de diferentes frações do extrato de C*alendula officinalis*

Murillo Alessandro do Nascimento[1], Luciana Lopes Guimarães[2], Daniel Siquieroli Vilas Boas[2]

[12]Faculdade de Farmácia, Universidade Santa Cecília – UNISANTA
E-mail: daniel@unisanta.br
[1]PIBIC-CNPq

Resumo: O câncer se tornou um problema de saúde pública de grande porte, mesmo em países desenvolvidos, sendo a doença representante de cerca de 12% de todas as causas de morte do mundo e responsável por mais de seis milhões de mortes por ano. Entre as diversas etiologias propostas para o surgimento de células cancerosas em indivíduos, destaca-se a relação com os processos de estresse oxidativo. A calêndula (Calendula officinalis L./Asteraceae) trata-se de uma planta medicinal comestível, amplamente utilizada como tempero, chá e agente terapêutico, sendo conhecida por sua biossíntese de polifenóis como flavonoides e ácidos fenólicos, que possuem atividades farmacológicas contra diversos tipos de neoplasias. O presente estudo teve como objetivo a extração e identificação de metabólitos presentes no extrato de *Calendula officinalis*, mais especificamente do ácido gálico, seguido de um levantamento bibliográfico acerca das propriedades deste composto, com ênfase nas propriedades antioxidantes e antitumorais. O extrato bruto foi obtido por turbolização, utilizando etanol a 90% como solvente. Foram realizados os testes preliminares utilizando cloreto férrico e reação de shinoda, que indicaram a presença de compostos flavonoídicos. Realizamos as análises pelo método de Cromatografia em Camada Delgada, cujas placas foram posteriormente analisadas utilizando uma metodologia adaptada no software TLC 120, seguido de análise estatística. Após as análises, encontramos a presença de ácido gálico apenas na fração EHSP (Extrato semi-purificado) visualizada em luz UV 254nm. No tocante ao teste de potencial antioxidante, obtivemos resultado positivo para diferentes frações do extrato, utilizando o radical livre DPPH. Com os resultados obtidos, o extrato vegetal de calêndula apresenta grande probabilidade de ser utilizado como coadjuvante no tratamento de neoplasias malignas.

Palavras-chave: Câncer; Estresse oxidativo; Ácido gálico; *Calendula officinalis*; Cromatografia.

Verification of the presence of gallic acid and evaluation of the antioxidant and antitumoral potential of different fractions of *Calendula officinalis* extract

Abstract: Cancer has become a major public health problem, even in developed countries, with the disease representing around 12% of all causes of death in the world and responsible for more than six million deaths per year. Among the various etiologies proposed for the emergence of cancer cells in individuals, the relationship with oxidative stress processes stands out. Calendula (*Calendula officinalis L./Asteraceae*) is an edible medicinal plant, widely used as a seasoning, tea and therapeutic agent, known for its biosynthesis of polyphenols such as flavonoids and phenolic acids, which have pharmacological activities against various types of neoplasms. The present study aimed to extract and identify metabolites present in *Calendula officinalis* extract, more specifically gallic acid, followed by a bibliographic survey about the properties of this compound, with an emphasis on antioxidant and antitumor properties. The crude extract was obtained by turbolization, using 90% ethanol as solvent. Preliminary tests were carried out using ferric chloride and the Shinoda reaction, which indicated the presence of flavonoid compounds. We carried out the analyzes using the Thin Layer Chromatography method, whose plates were subsequently analyzed using a methodology adapted in the TLC 120 software, followed by statistical analysis. After analysis, we found the presence of gallic acid only in the EHSP fraction (semi-purified extract) visualized under 254nm UV light. Regarding the antioxidant potential test, we obtained positive results for different fractions of the extract, using the free radical DPPH. With the results obtained, the calendula plant extract is highly likely to be used as an adjuvant in the treatment of malignant neoplasms.

Keywords: *Cancer; Oxidative stress; Gallic acid; Calendula officinalis; Chromatography*

Introdução

O câncer se tornou um problema de saúde pública de grande porte, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. A doença representa cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo, sendo responsável por mais de seis milhões de mortes por ano (Guerra, Gallo, Azevedo, & Mendonça, 2005).

Em diversos países desenvolvidos, as taxas de mortalidade pelos principais tipos de câncer vêm diminuindo desde a década de 90. Nesta queda da taxa também estão inclusos os cânceres de pulmão, colo-retal, mama e próstata. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer foram ajustadas por idade para quaisquer formas da doença e para cinco tipos principais para homens e mulheres. Com exceção do câncer de estômago, bem como do câncer do colo do útero, as taxas de mortalidade continuam crescentes (Silva et al. p 1009-18).

Com todas as projeções e dados observados durante os anos, que acabam por ser preocupantes em países menos desenvolvidos, surge a necessidade de alternativas terapêuticas no tratamento de neoplasias, especialmente nas mais comuns. É de extrema importância aumentar a visibilidade de intervenções terapêuticas não-cirúrgicas, menos invasivas e que auxiliem na qualidade de vida do paciente de forma viável tanto na produção quanto na obtenção do tratamento pelo próprio acometido pela doença.

Observando o cenário atual das terapias utilizadas, bem como a qualidade de vida dos pacientes em tratamentos oncológicos, faz-se necessário a elucidação das propriedades químicas de extratos vegetais para verificação da viabilidade de sua utilização como coadjuvantes em tratamentos há muito consolidados.

A calêndula (Calendula officinalis L./Asteraceae) trata-se de uma planta medicinal comestível, amplamente utilizada como tempero, chá e agente terapêutico. É conhecida por sua biossíntese de polifenóis como flavonoides e ácidos fenólicos, que possuem atividades farmacológicas contra diversos tipos de neoplasias. Essa propriedade sugere seu uso como um alimento biofuncional devido a sua grande carga de compostos fenólicos de capacidade antioxidante e possivelmente como base para novos tratamentos. Em destaque, suas flores são uma rica fonte de compostos fenólicos, demonstrando propriedades antioxidantes quando em forma de seus extratos aquoso e hidroalcoólico. Apesar de apresentarem um caráter hepatotóxico demonstram atividade neuroprotetora, já que reduz o estresse oxidativo e produz citocinas pró-inflamatórias (Hernández-Rosas et al. p 55).

O ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, mais conhecido como ácido gálico, é um ácido fenólico amplamente distribuído em espécies vegetais. São diversos os efeitos biológicos atribuídos ao ácido gálico, como por exemplo suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica e anticancerígena. As atividades antioxidante e anticancerígena do AG ocorrem pela característica de doação de elétrons do composto, que neutraliza os radicais livres responsáveis por processos como alguns tipos de câncer, algumas cardiopatias e ao envelhecimento. As propriedades antioxidantes do AG estão na sua característica redutora, que dependem da posição e do número de hidroxilas presentes na molécula. Além disso, atua também na prevenção da oxidação dos fosfolipídios da membrana celular, auxiliando em doenças degenerativas como diabetes, Alzheimer e algumas cardiopatias (Salas et al., 2013).

Em estudos prévios, foram descritas as atuações do ácido gálico em diferentes linhagens celulares, onde ele promove a citotoxicidade, inibe a angiogênese e indução dos processos apoptóticos, assim como reduz a inflamação dos tecidos e a invasão de células tumorais malignas em diversos tipos de câncer (Salas et al., 2013).

1. Objetivo

Frente ao exposto, o presente estudo visou a extração de compostos bioativos presentes na calêndula, seguido da partição em diferentes frações orgânicas. Ademais, realizar a separação e identificação de metabólitos presentes no extrato de Calendula officinalis, mais especificamente do ácido gálico, seguido de um levantamento bibliográfico acerca das propriedades deste composto, com ênfase nas propriedades antioxidantes e antitumorais.

2. Métodos

O extrato bruto foi obtido pelo método de turbolização, utilizando como solvente etanol 90%, dando origem ao EHB (Extrato Hidroalcoólico Bruto). Neste, foram realizados dois testes preliminares para a verificação da presença de compostos flavonóidicos: reação com cloreto férrico a 2% (p/v) e reação de shinoda. Na reação com cloreto férrico, obtivemos resultado positivo para a presença de compostos flavonóidicos, ao passo que a reação de shinoda foi inconclusiva para identificação de classes de flavonóides.

A partir do extrato hidroalcoólico bruto, foi realizada a partição líquido-líquido em tubo de ensaio: o EHB foi seco e ressuspenso em água na concentração de 159mg/mL; após isso, foi realizada a partição utilizando três solventes orgânicos em polaridade crescente: hexano P.A (EFH – Extrato Fração Hexânica), clorofórmio P.A (EFC – Extrato Fração Clorofórmica) e acetato de etila P.A (EFA – Extrato Fração Acetato de etila). Além disso, a fase exaurida da partição também foi utilizada para fins de análise, denominada EHSP (Extrato semi-purificado).

A priori, foram realizadas cromatografias em camada delgada com o resíduo seco ressuspenso (RSR) em metanol do extrato hidroalcóolico bruto, nas concentrações de 1mg/mL, 10mg/mL e 100mg/mL, utilizando como padrão o ácido gálico. Posteriormente, as frações orgânicas obtidas, bem como a fração EHSP, foram secas e ressuspensas em metanol P.A, todas na concentração de 100mg/mL.

O extrato hidroalcóolico bruto e as quatro frações obtidas (EHSP, EFH, EFC, EFA) foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD), também conhecida como Thin Layer Chromatography (TLC), utilizando placas cromatográficas da marca ALUGRAM®, com camada de 0,20mm de Sílica-gel com indicador fluorescente para luz UV de 254nm (UV254). A fase móvel foi constituída por hexano/acetato de etila/ácido fórmico/metanol (90:90:24:6) e o padrão utilizado foi o ácido gálico na concentração de 1mg/mL. Todas as placas foram visualizadas em Luz UV 365nm, Luz UV 254nm e, posteriormente, reveladas com cloreto férrico a 1% (p/v). Uma outra placa foi borrifada com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) para o teste de potencial antioxidante.

Por fim, as placas de CCD foram analisadas por meio da adaptação do software de leitura de imagens de gel de eletroforese TLC 120 (Figuras 2 e 3), obtendo os Rf's (Retection factors – fatores de retenção), para verificação da presença de ácido gálico nas amostras.

3. Resultados e Discussão

Após a obtenção do extrato bruto, foram realizados testes colorimétricos para caracterização prévia do extrato obtido. Os resultados estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Reações de caracterização

Teste	Resultado
Reação com cloreto férrico	Positivo
Reação de Shinoda	Inconclusivo

A reação com cloreto férrico indicou a presença de compostos flavonoídicos,

enquanto a reação de shinoda foi inconclusiva para determinação da classe de flavonoides presente no extrato. Foram realizadas análises das placas no software TLC 120, com o objetivo de verificar a presença do padrão AG (ácido gálico) nas diferentes frações, por meio da visualização em UV365 e UV254, além da revelação por cloreto férrico a 1%.

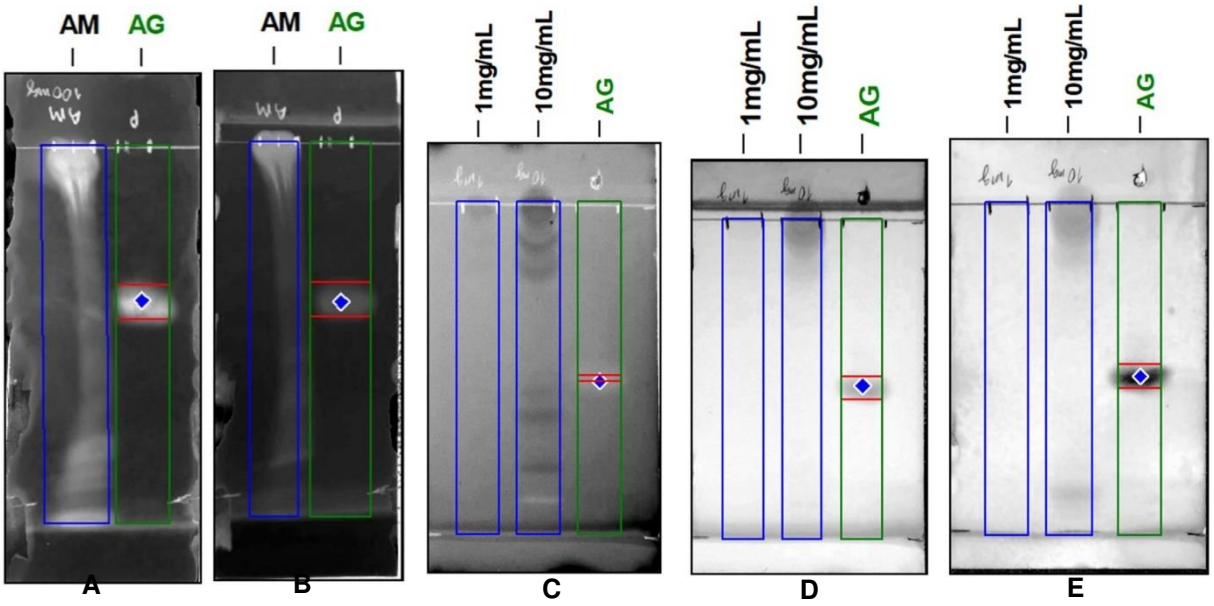


Figura 1: (A) Placa de CCD da amostra de RSR 100mg/mL em luz UV 254nm; (B) Placa de CCD da amostra de RSR 100mg/mL revelada com cloreto férrico; Placas de CCD das amostras de RSR nas concentrações de 1mg/mL e 100mg/mL reveladas em luz UV 365nm (C), 254nm (D) e cloreto férrico (E), respectivamente.

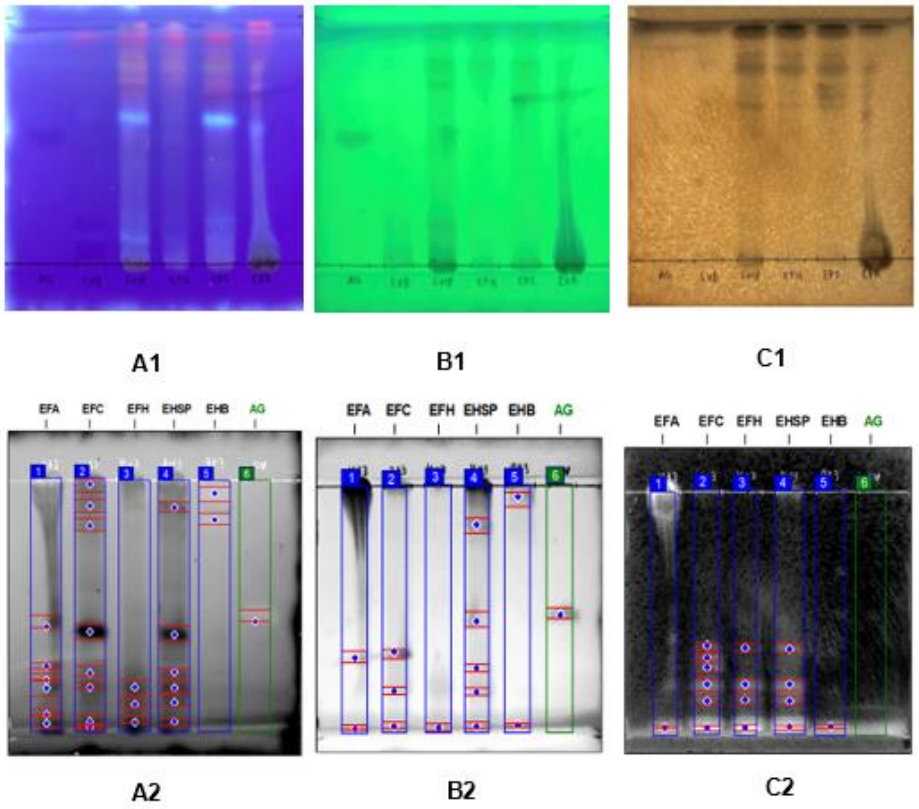


Figura 2: (A1) Placa visualizada em UV365; (A2) Placa UV365 analisada no software TLC 120; (B1) Placa visualizada em UV254; (B2) Placa UV254 analisada no software TLC 120; (C1) Placa revelada em cloreto férrico 1%; (C2) Placa revelada em cloreto férrico analisada no software TLC 120.

Análise estatística para verificação da presença de ácido gálico

O software TLC 120 traz a possibilidade de realizar o bandeamento e obter os valores de Rf de diferentes compostos nas amostras e, também, do padrão de ácido gálico. Entretanto, é importante levar-se em consideração o desvio padrão entre os diferentes valores que o padrão de ácido gálico assumiu nas diferentes visualizações das placas.

Na Tabela 2 é possível observar os valores obtidos para o ácido gálico, bem como a média e o desvio padrão calculados por meio da ferramenta Excel. A sigla EHBF representa todas as frações da Figura 2, que possuem o mesmo Rf para o ácido gálico, já que se trata da mesma placa. Do mesmo modo, RSR 1mg/mL - 10mg/mL representa os valores de Rf para o ácido gálico para as placas representadas na Figura 1.

Tabela 1: Média e DP do Rf do ácido gálico em diferentes visualizações

Amostra/ Fração/ Placa	Visualização/ Revelador	Rf do ácido gálico
EHBF	Luz UV 365nm	0,561
EHBF	Luz UV 254nm	0,527
EHBF	Cloreto férrico 1%	Não visível
RSR 1mg/mL - 10mg/mL	Luz UV 365nm	0,538
RSR 1mg/mL - 10mg/mL	Luz UV 254nm	0,522
RSR 1mg/mL - 10mg/mL	Cloreto férrico 1%	0,526
RSR 100mg/mL	Luz UV 254nm	0,427
RSR 100mg/mL	Cloreto férrico 1%	0,412
PTCA	DPPH 0,2% (p/v)	0,543
MÉDIA		0,507
DESVIO PADRÃO		± 0,055528628

Com os valores obtidos, foi possível observar todas as bandas de cada fração de forma numérica, ou seja, pelo seu fator de retenção. Com esse dado, foi possível verificar estatisticamente a presença ou não de ácido gálico em cada fração. Os resultados foram expressos como *Positivo* ou *Negativo* para a presença de ácido gálico e estão dispostos na Tabela 3. Considerou-se como *Positivo* qualquer fração com qualquer banda cromatográfica em que Rf = 0,507 ± 0,055528628.

Tabela 2: Resultados para presença de ácido gálico nas diferentes frações

Fração	Visualização/Revelador	Resultado
EHB	Luz UV 365nm	Negativo
EHB	Luz UV 254nm	Negativo
EHB	Cloreto férrico 1%	Negativo
EHSP	Luz UV 365nm	Negativo
EHSP	Luz UV 254nm	Positivo
EHSP	Cloreto férrico 1%	Negativo
EFH	Luz UV 365nm	Negativo
EFH	Luz UV 254nm	Negativo
EFH	Cloreto férrico 1%	Negativo
EFC	Luz UV 365nm	Negativo
EFC	Luz UV 254nm	Negativo
EFC	Cloreto férrico 1%	Negativo
EFA	Luz UV 365nm	Negativo
EFA	Luz UV 254nm	Negativo
EFA	Cloreto férrico 1%	Negativo

Teste do potencial antioxidante

Além das placas para separação e obtenção do perfil cromatográfico do extrato bruto em diferentes concentrações e, posteriormente, das frações particionadas, foi realizada uma corrida cromatográfica com o objetivo de testar o potencial antioxidante das frações, utilizando o radical livre DPPH a 0,2% em metanol como revelador. O aparecimento de spots brancos na placa com fundo roxo indica a presença de compostos com característica antioxidante.

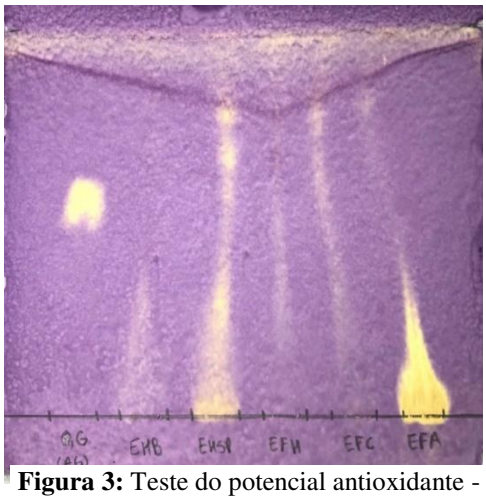


Figura 3: Teste do potencial antioxidante - Revelação com DPPH

É possível verificar o potencial antioxidante das diversas frações analisadas, mais especificamente das frações EFA e EHSP, com marcas mais esmaecidas nas demais frações. O teste foi validado pelo padrão circular branco formado na banda de ácido gálico, que possui atividade antioxidante previamente descrita na literatura.

4. Considerações finais

O emprego de substâncias obtidas de fontes naturais como tratamentos de auxílio que podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes se mostra uma alternativa promissora, especialmente em tratamentos agressivos como a utilização de antineoplásicos. Na literatura, a ação do ácido gálico já foi avaliada experimentalmente em diversas linhagens celulares, onde observou-se uma redução significativa da viabilidade e proliferação das células cancerígenas.

Considerando que o ácido gálico é um ácido fenólico com três hidroxilas em sua estrutura, faz sentido sua afinidade por fases mais polares, que é o caso da água destilada e de outros solventes como, metanol, etanol e acetato de etila. Por este motivo, a fração EHSP, de fase aquosa, ter sido a única fração de resultado positivo para a presença do metabólito condiz com o comportamento químico esperado.

No tocante ao teste de potencial antioxidante, apesar do aspecto arrastado e difuso da placa, impossibilitando a verificação do Rf dos componentes com maior potencial antioxidante dentro de cada fração, o positivo para a banda de ácido gálico valida a utilização do DPPH como revelador da placa e indicador de atividade antioxidante das frações, demonstrando que o extrato possui tal atividade e, se purificado de maneira eficaz, pode ser muito útil na prevenção de doenças relacionadas à processos oxidativos.

Faz-se necessário adaptações na metodologia da cromatografia em camada delgada, no que diz respeito a polaridade da fase móvel, impedindo que as bandas adquiram um aspecto tão difuso, aumentando a migração dos componentes e facilitando a identificação dos metabólitos.

Frente ao exposto, trata-se de um estudo promissor, especialmente com o emprego de análises mais sofisticadas e robustas como HPLC/MS para a identificação e caracterização química do extrato e suas frações mais eficientes em termos de ação antioxidante.

5. Referências Bibliográficas

GUERRA, Maximiliano Ribeiro; GALLO, Cláudia Vitória de Moura; MENDONÇA, Gulnar Azevedo e Silva. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, [*s. l.*], v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

HERNÁNDEZ-ROSAS, Nancy Aline *et al.* Polyphenols profile, antioxidant capacity, and in vitro cytotoxic effect on human cancer cell lines of a hydro-alcoholic extract from Calendula officinalis L. petals. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, [*s. l.*], v. 21, 2018.

LOCATELLI, Claudriana *et al.* Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chemico-Biological Interactions*, [*s. l.*], v. 181, n. 2, p. 175–184, 2009.

SALAS, Mayela Govea *et al.* Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. [*s. l.*], n. 9, 2013.

SILVA, Gulnar Azevedo e *et al.* Tendência da mortalidade por câncer nas capitais e interior do Brasil entre 1980 e 2006. *Revista de Saúde Pública*, [*s. l.*], v. 45, p. 1009–1018, 2011.