

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ISOLAMENTO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EXTRAÍDO DA ESPÉCIE VEGETAL *Rosmarinus officinalis* LINN

Giulia Stavrakas Miranda, João Victor Andrade, Cecília Fernandes Patta Muller Marques, Leonardo Bindelli Verly, Mário Ferreira Conceição Santos.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitario, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, giustavarakas@gmail.com, joao.andrade.75@ufes.com.br, ceciliafernandespmm@gmail.com, leonardo.verly@edu.ufes.br, mariosantos408@gmail.com.

Resumo

O uso de compostos vegetais tem sido uma estratégia amplamente empregada no combate a diversas doenças humanas. Por exemplo, o ácido rosmarínico, um composto fenólico bioativo comumente encontrado em plantas de alecrim (*Rosmarinus officinalis Labiatae*), possui múltiplos benefícios terapêuticos em diversas doenças, como o câncer. Na presente pesquisa, o ácido rosmarínico foi isolado e identificado através de técnicas físico-químicas como a separação em coluna de Sephadex LH-20 e a análise dos espectros de ressonância magnética nuclear. Alguns estudos demonstram a inibição da elastase pelo ácido rosmarínico, o que pode levar ao desenvolvimento de novos inibidores de enzimas a partir dessa molécula que podem servir de inspiração para o desenvolvimento de uma série de medicamentos, incluindo medicamentos contra o câncer.

Palavras-chave: Composto fenólico. Produto natural. Alecrim.

Área do Conhecimento: Farmacologia.

Introdução

O ácido rosmarínico, com forma molecular $C_{18}H_{16}O_8$, é um éster derivado do ácido cafeico e do ácido (R)-(+)-3-(3,4-dihidroxi fenil), pertencente à classe dos compostos fenólicos. Na natureza, as fontes primárias de ácido rosmarínico são plantas medicinais pertencentes à família Boraginaceae (NADEEM *et al.* 2019) e Lamiaceae (PETERSEN *et al.* 2003), como as plantas de alecrim, manjerição sagrado e perilla (AHMED *et al.* 2022). Na medicina popular, o alecrim (*Rosmarinus officinalis Labiatae*) e o manjerição sagrado (*Ocimum tenuiflorum Labiatae*) aliviam dores reumáticas, contusões, dismenorrea, controlam a diabetes e infecções cutâneas. (HOSSAN *et al.* 2014).

Vários estudos associam o ácido rosmarínico à atividade biológica destas plantas (MARCHEV *et al.* 2021). Portanto, o ácido rosmarínico tem várias propriedades biológicas significativas, incluindo antibacteriana, antioxidante, antiviral, hepatoprotetora, cardioprotetora, antialérgica, antidepressiva, antiinflamatória e anticâncer (SANTOMAURO *et al.* 2018; NADEEM *et al.* 2019; ZAPPALÀ *et al.* 2021; SILVA *et al.* 2022; STANKOVIĆ *et al.* 2022; AFSHAR *et al.* 2022).

Assim, as evidências atuais incentivam a exploração do ácido rosmarínico como um agente terapêutico promissor contra vários distúrbios no corpo humano (NADEEM *et al.* 2019). Estudos anteriores indicam que o ácido rosmarínico pode agir de forma diferente e exercer atividades biológicas e farmacológicas inovadoras. Portanto, é necessária uma análise profunda de suas características e mecanismo de ação em relação à sua atividade de inibição.

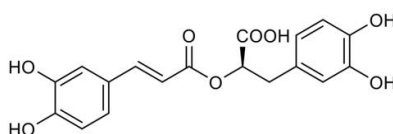
Metodologia

As partes aéreas da espécie vegetal *R. officinalis* Linn. foram coletadas pelo Prof. Doutor Wagner A. Bernardes, em sua propriedade que fica situada no perímetro urbano do município de Patrocínio, na porção oeste do estado de Minas Gerais. O Prof. Doutor Milton Groppo ficou encarregado pela identificação do espécime no Departamento de Botânica da FFCLRP-USP. Um dos espécimes foi depositado no Herbário do Departamento da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil, com número de identificação (#SPFR 11912).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Em seguida, a obtenção do ácido rosmarínico ocorreu através do pó das folhas da espécie vegetal *R. officinalis* (200,0g). Estas foram submetidas a um processo de extração por maceração durante o período de sete dias, utilizando uma solução de água/ácido acético (85:15 v/v). O produto da maceração obtido foi filtrado e o seu pH foi ajustado à 10 por meio da adição de uma solução de hidróxido de cálcio. A alcalinização resultou na formação de um precipitado (27g), que foi purificado em uma coluna de Sephadex LH-20, resultando no produto final (7,5g). O rendimento foi de aproximadamente 28% e o composto é caracterizado como um material sólido de coloração amarelada codificado como AR, que foi identificado através da comparação com um padrão autêntico. Sua identificação foi efetuada com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . A molécula do ácido rosmarínico está representado na figura 1.

Figura 1 – Estrutura molecular do ácido rosmarínico.

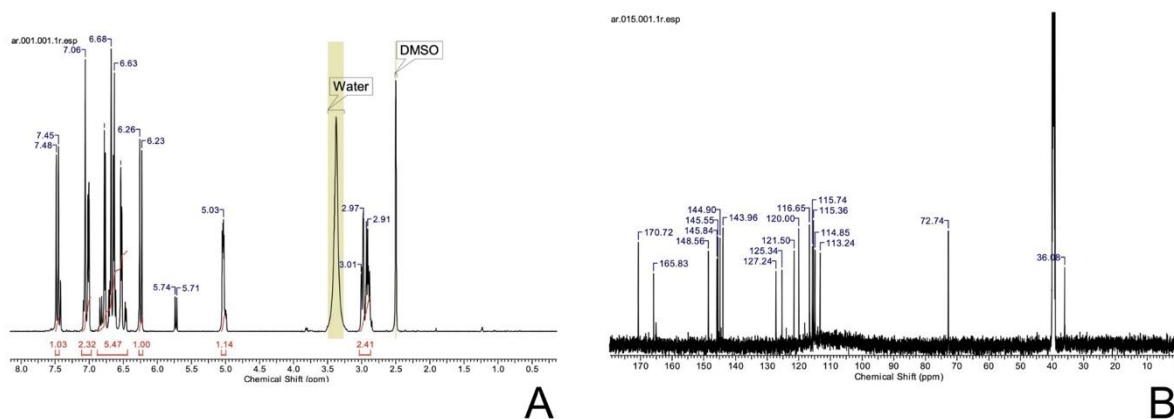


Fonte: Os autores.

Resultados

O pó e *R. officinalis* (200g) foi macerado durante sete dias, utilizando água/ácido acético (85:15 v/v), em seguida, foi realizada a filtração e o ajuste de pH, fornecendo o resíduo (27g). O produto resultante da maceração foi passado por filtração, e pH foi modificado para 10 mediante a incorporação de uma solução de hidróxido de cálcio. Isso originou a formação de um resíduo (27g), o qual foi posteriormente refinado utilizando uma coluna Sephadex LH-20, culminando na obtenção de 7,5g de uma substância sólida de coloração amarela identificada sob o código AR, com o rendimento de aproximadamente 28%. Os resultados da análise de RMN (dados suplementares) e dados da literatura confirmaram a estrutura do composto (MURATA et al., 2010). A figura 2 mostra o espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C obtido durante as análises. No espectro referente à análise de ^1H , os sinais de deslocamento entre 6.23 e 6.68 correspondem aos hidrogênios dos dois anéis aromáticos localizados nas extremidades da molécula. Os sinais entre 7.06 e 7.48 correspondem aos hidrogênios da ligação dupla. O sinal de deslocamento em 5.03 corresponde ao carbono ligado ao grupo ácido carboxílico. E, por fim, os sinais de deslocamento entre 2.9 e 3.01 se referem aos hidrogênios metilênicos próximos ao anel aromático. O espectro de ^{13}C confirmou todos os grupos observados no espectro de hidrogênio.

Figura 2 – Espectros de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) do ácido rosmarínico obtido.



Fonte: Os autores.

Discussão

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Os produtos naturais tais como o ácido rosmarínico fornecem oportunidades ilimitadas para novos inibidores de proteases. As plantas produzem uma enorme variedade de compostos químicos, e muitos deles tem apresentado atividade inibidora de serina proteases (WINK, 1988; CUCCILIONI *et al.*, 2009; NEWMAN E CRAGG, 2016; JAKIMIUK *et al.*, 2021). Polifenóis como inibidores de serina proteases, incluindo tripsina e elastase, são descritos por vários autores (WITTENAUER *et al.*, 2015; JAKIMIUK *et al.*, 2021). Proteases serina, como a elastase, são a classe de enzimas mais amplamente estudadas, e a busca por compostos que são capazes de inibir a enzima elastase é essencial no descobrimento de novas possíveis drogas para diversas doenças, como o câncer (MURI *et al.*, 2005).

O ácido rosmarínico é um derivado hidroxicinâmico, conhecido por ser um composto fenólico não flavonóide, consistindo em um ester do ácido cafeico e do ácido 3,4 – dihidroxifenilato (PETERSEN e SIMMONDS, 2003). Diversas atividades biológicas são associadas a este composto, tais como antimicrobiana, antioxidante, antiapoptótico, hepatoprotetora, neuroprotetora, anti-inflamatória, gastroprotetora e anticâncer. Assim, é evidente a importância deste composto na busca por formulações de novos produtos terapêuticos (SILVA, 2017). Dessa forma, se torna essencial a busca por fontes de ácido rosmarínico e os estudos sobre sua extração e isolamento. O presente estudo realizou a extração do ácido rosmarínico de folhas da planta de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) através da maceração em uma mistura de água/ácido acético (85:15 v/v) e posterior filtração. O isolamento ocorreu através do ajuste do pH do filtrado para 10, gerando um precipitado, que foi fracionado em uma coluna de Sephadex LH-20. Através de 200 gramas de folhas maceradas de *R. officinalis* foi possível extrair 7,5 gramas de ácido rosmarínico, demonstrando ser uma boa fonte deste composto. Em comparação com outros trabalhos desenvolvidos na área, o presente método apresentou uma boa porcentagem de rendimento (28%). No trabalho realizado por Oliveira (2010), no qual foi utilizada a cromatografia circular centrífuga, a autora obteve um rendimento entre 4,3 e 5,5%. Contudo, pode-se encontrar metodologias, como a utilização do Soxhlet, para o isolamento do ácido rosmarínico que pode apresentar rendimento de 96% (AKOURY, 2017). Por fim, a metodologia desenvolvida neste trabalho pode ser utilizada para a extração e isolamento do ácido rosmarínico a fim de utilizá-lo em outros estudos e/ou formulações terapêuticas devido à relativa facilidade e menor custo.

Conclusão

Em termos gerais, o ácido rosmarínico, um composto fenólico presente em plantas como o alecrim e o manjeriço, e apresenta um potencial notável enquanto agente terapêutico multifacetado, um composto fenólico não flavonoide derivado do ácido cafeico e do 3,4-dihidroxifenilato, presente em plantas medicinais como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e o manjeriço (*Ocimum tenuiflorum*). A retirada e o isolamento bem-sucedidos do ácido rosmarínico das folhas de *Rosmarinus officinalis* demonstraram ser um método eficiente. Os resultados apresentados demonstram que uma parte significativa desse composto pode ser obtida a partir de uma quantia relativamente pequena do material vegetal, o que o torna uma fonte promissora para futuras formulações e estudos. Os estudos presentes neste artigo ressaltam ainda mais a importância da pesquisa contínua sobre o ácido rosmarínico e seu potencial.

Referências

AFSHAR, M.; SHARAREH, N.; MOHSEN, R. Seasonal variation on the major bioactive compounds: total phenolic and flavonoids contents, and antioxidant activity of rosemary from shiraz. **Natural Product Research**, v. 36, n. 16, pág. 4287-4292, 2022.

AHMED, H. M.; AL-ZUBAIDY, A. M.; OTHMAN-QADIR, G. Biological investigations on macro-morphological characteristics, polyphenolic acids, antioxidant activity of *Perilla frutescens* (L) Britt. grown under open field. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5, pág. 32-36, 2022.

AKOURY, E. Isolation and Structural elucidation of Rosmarinic Acid by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **American Research Journals of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 17-23, 2017.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CUCCIOLONI M, MOZZICAFREDDO M, ONFILI L, CECARINI V, ELEUTERI AM, ANGELETTI M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. **Chem Biol Drug Des**, v. 74, p. 1-15, 2009.

HOSSAN, M. S.; RAHMAN, S.; BASHAR, A.; JAHAN, R.; AL-NAHAIN, A.; RAHMATULLAH, M. A review of its anticancer action. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 9, pág. 57-70, 2014.

JAKIMIUK K, GESEK J, ATANASOV AG, TOMCZYK M. Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 36, n. 1, p. 1016-1028, 2021.

MARCHEV, A. S. Rosmarinic acid-From bench to valuable applications in food industry. **Trends in Food Science & Technolog**. p. 182-193, 2021.

MURATA, T. et al. Hyaluronidase Inhibitors from Takuran, *Lycopus lucidus*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 394-397, 1 jan. 2010.

MURI EMF, GOMES JR M, COSTA JS, ALENCAR FL, SALES JR A, BASTOS ML, HERNANDEZ-VALDES R, ALBUQUERQUE MG, CUNHA EFF, ALENCASTRO RB, WILLIAMSON JS, ANTUNES OAC. N- t-Boc-amino acid esters of isomannide: potential inhibitors of serine proteases. **Amino Acids**, v. 27, n. 2, p. 153-159, 2005.

NADEEM, M.; IMRAN, M.; ASLAM GONDAL, T.; IMRAN, A.; SHAHBAZ, M.; MUHAMMAD AMIR, R.; MARTINS, N. Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. **Applied Sciences**, v. 9, n. 15, pág. 3-6, 2019.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OLIVEIRA, K. B. Determinação do Ácido Rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação da sua toxicidade e influência na melanogênese. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, 2010.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, pág. 121-125, 2003.

SANTOMAURO, F.; SACCO, C.; DONATO, R.; BELLUMORI, M.; INOCENTI, M.; MULINACCI, N. The antimicrobial effects of three phenolic extracts from *Rosmarinus officinalis* L., *Vitis vinifera* L. and *Polygonum cuspidatum* L. on food pathogens. **Natural product research**, v. 32, n. 22, pág. 26-45, 2018.

SILVA, A. R. R .A. **Investigação fitoquímica e quantificação de ácido rosmarínico por CLAE-DAD em *Cordia rufescens* A.DC.** 2017. 52 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2017.

SILVA, M.; LUCARINI, R.; DOS SANTOS, F. F.; MARTINS, C. H.; PAULETTI, P. M.; JANÁRIO, A. H.; CUNHA, W. R. Hypoglycemic effect of rosmarinic acid-rich infusion (RosCE) from *Origanum vulgare* in alloxan-induced diabetic rats. **Natural Product Research**, v. 36, n. 17, pág. 4-10, 2022.

STANKOVIĆ, M.; ICKOVSKI, J. D.; LJUPKOVIĆ, R. B.; STOJANOVIĆ, G. S. The effects of *Artemisia* methanol extracts and ferulic acid, rutin, rosmarinic acid, and quercetin on micronucleus distribution on human lymphocytes. **Natural Product Research**, v. 36, n. 17, pág. 10-25, 2022.

WINK M. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens an herbivores. **Theoretical Applied Genetics**, v. 75, p. 225-233, 1988.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

WITTENAUER J, MÄCKLE S, SUSSMANN D, SCHWEIGGERT-WEISZ U, CARLE R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**, v. 101, p. 179-87, 2015.

ZAPPALÀ, A.; VICARIO, N.; CALABRESE, G.; TURNATURI, R.; PASQUINUCCI, L.; MONTENEGRO, L.; PARENTI, C. Neuroprotective effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract in oxygen glucose deprivation (OGD)-injured human neural-like cells. **Natural Product Research**, v. 35, n. 4, pág. 669-675, 2021.