



I Congresso Nacional On-line de Pesquisa e Inovação em **FARMACOLOGIA**

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PELOS MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROSCOPIA DE MASSAS DO ÓLEO EXTRAÍDO DA RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana Shaw*) E ANÁLISE DE POTÊNCIAS APLICABILIDADES TERAPÊUTICAS

JOÃO VICTOR DE SOUSA COUTINHO, NATAN LOPES CHANCA, JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA XAVIER E OTONIEL DE AQUINO AZEVEDO.

RESUMO

Os compostos bioativos estão presentes em toda a natureza, e possuem a habilidade de modular certas funções fisiológicas e bioquímicas no corpo humano, viabilizando a terapêutica de diversas doenças. A sua aplicação necessita de evidencição científica, de modo que a dosagem aplicada seja efetiva na terapêutica objetivada. O óleo da rã touro (*Rana catesbeiana Shaw*) é rico de lipocompostos bioativo, com uma série de propriedades terapêuticas. Todavia, a dieta dessa espécie interfere diretamente na composição do seu corpo gorduroso, logo torna-se essencial o processo de caracterização química, com o fim de determinar com exatidão os componentes graxos presentes nessa estrutura. O método de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas é um aliado nesse processo de caracterização, e viabiliza a previsão de aplicações. O objetivo dessa obra deu-se em caracterizar quimicamente ácidos graxos da espécie citada, e analisar potenciais aplicações desses. Para tal realizou-se a extração, por método a frio, com auxílio do n-Hexano, sendo purificado em rotaevaporador. Posteriormente submeteu-se a amostra a técnica de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas, e comparou-se os achados com descritos na literatura visando elucidar as propriedades dos lipocomponentes caracterizados. Após o processo foram encontrados diversos ácidos graxos, como o Mirístico, Palmítico, Esteárico, Oléico, Linoléico, Linolênico, Palmitoleico, Eicosapentaenóico-EPA, Docosaenaenóico-DHA, Araquidônico. Esses possuem funções como cicatricial, antioxidante e anti-inflamatório. Logo é possível que o presente óleo seja aplicado em formulações com enfoque antioxidante, como cosméticos rejuvenecedores, e capsulas gelatinosas nutracêuticas para o uso oral. Ademias, há a possibilidade do desenvolvimento de produtos cicatriciais e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Rã-touro, cromatografia gasosa, espectroscopia de massas e química farmacêutica

1 INTRODUÇÃO

Os nutracêuticos constituem uma variedade de compostos bioativos procedentes de alimentos e organismos vivos, que são capazes de participar de tratamentos e agir de forma preventiva em uma diversidade de doenças (DANTAS, 2020). Esses possuem o potencial de modular determinadas funções no organismo, de modo a otimizar essas atividades e/ou contribuir para a redução do risco de doenças (PIMENTEL; ELIAS; PHILIPPI, 2019).

Destarte Pimentel, Elias e Philippi (2019) apud Oliveira e Bastos (2011), tais compostos

podem ser de origem animal, como ácidos graxos da família ômega-3 e ácidos graxos conjugados; vegetal, a exemplo de carotenoides, fitosteróis, terpenos e compostos fenólicos; ou oriundos de microrganismos.

De forma geral, conforme expõem Pimentel, Elias e Philippi (2019) apud Horst e Lajolo (2012), os compostos bioativos são metabólitos secundários. São substâncias produzidas em pequenas quantidades principalmente pelo sistema de defesa dos vegetais e animais. Por existirem milhares de compostos bioativos, cada um deles tem uma estrutura diferente e é característico de um determinado grupo de alimentos. Assim, podem ser subdivididos em grupos com milhares de configurações estruturais diferentes.

É importante classificar quimicamente tais compostos, pois, assim pode-se compreender melhor seus efeitos na saúde em desfechos específicos, além de aplicações tecnológicas que visem ao desenvolvimento de produtos mais saudáveis e sustentáveis (PIMENTEL; ELIAS; PHILIPPI, 2019).

A rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw) possui em sua estrutura anatômica uma região de depósito adipocitário, denominado de corpo gorduroso, essa região é rica em compostos bioativo lipomoleculares, com potencial atividade farmacológica. Porém, tratando acerca de sua estrutura bioquímica e fisiológica, a quantidade de ácidos graxos essenciais para a rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw) ainda é desconhecida. Aparentemente, também há a biossíntese de ácidos graxos nas rãs, pois, os animais que receberam as dietas contendo inclusão dos óleos de oliva e milho, que possuem maiores quantidades de ácidos oleico e linolênico, obtiveram maiores quantidades de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados na composição da carne (MORAIS, 2021).

Os animais que receberam o óleo de soja não apresentaram esse mesmo comportamento de acúmulo na carne, mesmo a dieta tendo altas quantidades dos ácidos graxos essenciais. É possível que os ácidos graxos da dieta tenham influenciado o metabolismo lipídico dos animais, pois o fígado cumpre inúmeras funções além de ser o principal local do metabolismo lipídico (MORAIS, 2021 apud ZHANG *et al.*, 2016).

Apesar de haver poucos dados na literatura sobre a utilização de óleos vegetais nas dietas de rãs, foi possível perceber que, geralmente, a utilização de óleos vegetais na dieta de peixes não interfere no crescimento; entretanto, pode afetar a composição dos tecidos, o metabolismo de ácidos graxos e sobretudo a aceitabilidade dos filés pelos consumidores. Mediante ao exposto torna-se essencial a caracterização química dessa matriz lipídica, visando quantificar e qualificar os ácidos graxos presentes no corpo gorduroso (MORAIS, 2021 apud LOSEKANN *et al.*, 2008).

De acordo com Amorim (2019), a cromatografia pode ser definida como um método físico-químico de separação, que viabiliza tal classificação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. Esta migração diferencial se deve a diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária. A cromatografia pode ser usada na identificação de compostos, por comparação com padrões previamente testados, na purificação de substâncias, separando-se as indesejáveis e na separação de componentes em uma mistura.

Um princípio básico fundamental na cromatografia de partição é: “semelhante separa semelhante”, ou seja, substâncias apolares dissolvem-se e são separadas em fases apolares. Já substâncias polares demandam fases estacionárias ainda mais polares (AMORIM, 2019).

Ainda segundo Amorim (2019) a Cromatografia Gasosa acoplada ao equipamento de Espectrometria de Massas (CG-MS) foi uma das primeiras técnicas associadas, sendo, ainda hoje, uma das técnicas mais empregadas para a identificação de compostos. Essa combinação é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas.

O objetivo do presente estudo consiste em determinar os constituintes lipídicos do óleo

de rã-touro (*Rana catesbeiana Shaw*) pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas, e com base nos achados avaliar as potenciais aplicações terapêuticas desse, em diferentes formas de uso.

2 METODOLOGIA

O trabalho consiste em uma pesquisa exploratória, de natureza experimental, que abordará os possíveis usos do óleo extraído a partir do corpo gorduroso de rã-touro (*Rana catesbeiana Shaw*). A extração deste insumo foi realizada a frio a partir do emprego de solvente orgânico n-hexano, num sistema de vácuo em evaporador rotativo. A caracterização dos ácidos graxos, presentes no óleo, foi feita através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.

Além da pesquisa experimental foram analisados trabalhos completos publicados em bases de dados consolidadas tais como PubMed, SciELO e Lilacs. Após a realização da pesquisa, iniciou-se a etapa de leitura para a seleção de artigos pertinentes ao tema, dentre os 42 encontrados. Destes, 13 artigos foram selecionados por possuírem maior relevância com o tema proposto. Tal seleção foi feita a partir da leitura do resumo dos artigos encontrados. Foram utilizados descritores em ciências da saúde (DeCS's) "*Rana catesbeiana Shaw*"; "Compostos bioativo"; "Ácidos Graxos". Tais obras serão avaliadas, seguindo critérios de inclusão e exclusão, sendo admitidos trabalhos completos, revisados por pares, nos idiomas português, inglês e espanhol. E serão excluídos trabalhos que falem de óleos de outros anfíbios.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processo de extração e o emprego das técnicas de cromatografia gasosa e espectroscopia de massas foi possível determinar os constituintes lipídicos presentes no óleo analisado, sendo possível visualiza-los na tabela 01. Na presente tabela também é realizado um comparativo composicional com descritos literários, e comparações quantitativas, com as obras de Martin (2006), Silva (2004) e Lopes (2010) e todos os colaboradores desses autores. Salienta-se que grande parte desses compostos são oriundos da alimentação, não sendo biossintetizados em rotas bioquímicas do animal, logo a presença desses sofre variações de acordo com os padrões alimentares. Com base nessa realidade, é possível modular os quantitativos lipomoleculares presentes no corpo gorduroso da espécie em estudo com rações e alimentos especiais, visando uma obtenção mais proveitosa de tal insumo.

Dentre os achados, foi possível constatar a presença de compostos classificados como ômega 3, sendo esses o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) e estudos envolvendo culturas de células e modelos animais de inflamação mostram que o esses são metabolizados em eicosanóides e outros mediadores lipídicos que inibem a migração do neutrófilo polimorfonucleado (PMN) para locais inflamados, atuar na redução da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias (MACHADO, 2020).

Alguns estudos em humanos relatam menor resposta quimiotática de PMNs de sangue total após apenas 4 semanas de terapia oral com EPA DHA em indivíduos saudáveis. Após a ingestão e rápida incorporação nas membranas celulares, esses compostos são metabolizados em mediadores lipídicos que são quimioatraentes fracos para PMNs. O aumento dos níveis de EPA e DHA também demonstrou reduzir os níveis de ácido araquidônico, precursor inflamatório que sofre ação das ciclooxygenases ((MACHADO, 2020).

Além disso, há evidências de que a união desses compostos diminuem a expressão gênica real de citocinas pró-inflamatórias nas células, bloqueando a atividade do fator nuclear kappa B (ALLAM-NDOLU *et al.*, 2016). Experimentos *in vivo* em um modelo murino de peritonite, após desafio com zymosam, indicaram que a resolvina D3 derivada de DHA reduz

a transmigração de PMN em 45% (DALLI *et al.*, 2013).

TABELA 01: Compostos graxos presentes no óleo da *Rana caterbeiana* Shaw

COMPONENTES GRAXOS	(AUTORES, 2022)	(MENDEZ, <i>al.</i>, 1998)	<i>et</i>(SILVA, <i>al.</i>, 2004)	<i>et</i>(LOPES <i>et al.</i>, 2010)
Mirístico (14:0)	1,64	2,7	2,77	2,8
Palmítico (16:0)	17,52	18,1	11,91	18,5
Esteárico (18:0)	3,21	4,1	2,34	3,2
Oléico (18:1 n-9)	34,96	31,7	37,6	36,3
Linoléico (18:2 n-6)	21,80	12,9	23,78	25,0
Linolênico (18:3 n-3)	1,27	1,4	1,97	2,1
Palmitoleico (16:1 n-7)	6,28	8,0	17,0	9,4
Eicosapentaenóico-EPA (20:5 n-3)	20,50,12	1,5	0,46	-
Docosaexaenóico-DHA (22:6 n-3)	0,28	4,7	0,91	0,1
Araquidônico AA (20:4 n-6)	-	-	0,74	0,6

(AUTORES, 2022)

Outrossim, detectou-se a presença de ácidos graxos do grupo ômega 6, como o linoléico e outro do grupo ômega 3, sendo o alfa-linolênico. Em humanos esses são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Tais ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese de novo (MARTIN *et al.*, 2006 apud YEHUDA *et al.*, 2002).

Os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, pela ação de enzimas alongase e dessaturase. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (MARTIN *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, as investigações científicas têm comprovado que as dietas com quantidades adequadas desses compostos desempenham papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, doenças inflamatórias, inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária, no crescimento fetal e desenvolvimento neural, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre a prevenção do câncer, e participação nas funções imunomoduladoras (PERINI *et al.*, 2010).

Em modelo de células endoteliais, o ácido mirístico ativa especificamente a eNOS de maneira dependente do tempo, dependente da dose e dependente do AMPc. O ácido mirístico interagiria, sem miristoilação comprovada, com o receptor CD36, também localizado nas cavéolas, e ativaria uma cascata de reações (BEAUCHAMP; RIOUX; LEGRAND, 2009).

Eles também sugerem que o ácido mirístico exógeno absorvido via CD36 pode ser direcionado especificamente para a miristoilação de certas proteínas. De fato, no mesmo modelo, o endereçamento de Fyn, uma quinase da família Src, em direção à membrana, após sua miristoilação, é interrompido se a captação de ácido mirístico pelo CD36 for inibida, mesmo

pela adição de C14:0 exógeno à cultura médio. Esses dois estudos demonstram que o ácido mirístico livre pode ter uma ação específica, em baixas concentrações (entre 10 e 50 μM), na célula endotelial (BEAUCHAMP; RIOUX; LEGRAND, 2009).

In vivo, em ratos alimentados por 2 meses com dietas contendo doses crescentes de ácido mirístico, a concentração do precursor do ácido α -linolênico aumenta em todos os tecidos de forma dose-dependente, e derivados de cadeia muito longa da família ômega 3, incluindo EPA e DHA, aumento no cérebro e glóbulos vermelhos (BEAUCHAMP; RIOUX; LEGRAND, 2009 apud PORTA; AUVIN, 2009). Tanto o ácido mirístico quanto o ácido α -linolênico são substratos para a β -oxidação. Uma β -oxidação preferencial do ácido mirístico parece poupar a do ácido α -linolênico. Este efeito poupador de precursores é, sem dúvida, adicionado ao efeito ativador do ácido mirístico na biossíntese de derivados altamente insaturados.

4 CONCLUSÃO

Alguns dos compostos detectados nesse estudo carecem de estudos que determinem a sua atividade biológica. Entretanto, bom base nos achados, é possível ter noções de aplicação em terapias rejuvenecedoras em cosméticos, em métodos de cocção como um substituto de azeites e óleos, em produtos com enfoque cicatricial e anti-inflamatório. Ademais, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas aplicadas visando determinar com exatidão as propriedades viáveis desse insumo, e a aplicação de tecnologias, como as de nanoestruturação, com o objetivo de potencializar os efeitos desses compostos em determinadas formas farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

ALLAM-NDOUL, Lucas *et al.* Anti-Inflammatory Activity of Bullfrog Oil Polymeric Nanocapsules: From the Design to Preclinical Trials. **International Journal of Nanomedicine**. Vol 16, p. 7353-7367. 2016.

AMORIM, Antônia Fádá Valentim. Métodos Cromatográficos. **ABEU**. Fortaleza. 2019.

BEAUCHAMP; RIOUX; LEGRAND, 2009. **Extração, caracterização e avaliação da atividade antioxidante do óleo de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw)**. 2018. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG, 2018.

DALLI, H. A. **Extração e caracterização de óleo de vísceras de rã-touro (Rana catesbeiana)**. 2016. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo- PR, 2013.

DANTAS, Dalyane Laís da Silva. A importância da utilização de compostos bioativos no combate à espécies virais, como a COVID. **Revista Diálogos em Saúde**. 2020.

HIPÓLITO, Marcio; FILHO, Oswaldo Pinto Ribeiro; BACH, Erna Elisabeth. Aspectos bioquímicos em fígados de *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802) submetida a diferentes dietas. **Conscientiae Saúde**. 2007.

LOPES, V. S. **Óleo de rã-touro: um estudo físico-químico com aplicabilidade farmacologia**. 2010. Dissertation (Master). Chemical Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal.

MARTIN, Clayton Antunes et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**. Vol. 19. ed. 6. p. 761-770. Campinas. 2006.

MACHADO, L. A. et al. Bullfrog oil (*Rana catesbeiana* Shaw) induces apoptosis, in A2058 human T melanoma cells by mitochondrial dysfunction triggered by oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [s. l.], v. 117, Sept. 2019.

MENDEZ, E. et al. Fatty acid composition, extraction, fractionation and stabilization of bullfrog oil (*Rana catesbeiana*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 1, p. 67-71, 1998.

MORAIS, Layara Santos. Fontes de óleos vegetais na dieta de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): composição centesimal de ácidos graxos. **Universidade Federal da Grande Dourados Faculdade de Ciências Agrárias**. Mato Grosso do Sul. 2021.

PERINI, João Ângelo de Lima *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**. Vol 23. ed 6. p. 1075-1086. Campinas. 2010.

PIMENTEL, Carolina Vieira de Mello B.; ELIAS, Maria F.; PHILIPPI, Sonia T. Alimentos funcionais e compostos bioativos. **Editores Manole**. 2019.

SILVA, V. S. et al. Obtenção de um Tensoativo Aniônico a Partir de Óleo de *Rana catesbeiana* Shaw. *Revista Brasileira Ciências da Vida*. São Paulo- SP, v. 30, n. 2, p. 85-97, 2004.