

FERNANDA RODRIGUES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
PLECTRANTHUS ORNATUS EM DIFERENTES IDADES DA PLANTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N244a
2014 Nascimento, Fernanda Rodrigues, 1975-
Avaliação da atividade biológica de extratos de
Plectranthus ornatus em diferentes idades da planta / Fernanda
Rodrigues Nascimento. – Viçosa, MG, 2014.
xv, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.47-56.

1. *Plectranthus ornatus*. 2. Boldo. 3. Antioxidante.
4. Antibacteriano. 5. Antitumoral. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 615.321

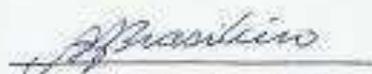
FERNANDA RODRIGUES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
PLECTRANTHUS ORNATUS EM DIFERENTES IDADES DA PLANTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 24 de fevereiro de 2014


Anésia Aparecida dos Santos


Beatriz Gonçalves Brasileiro


Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

A Deus;

Aos meus pais Fernando Nascimento (in
memoria) e Maria Rodrigues do
Nascimento

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

A Deus pela benção da Vida;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar este trabalho;

À minha orientadora Marisa Nogueira Diaz pela dedicação e atenção dispensados por todo este tempo e pelo orientação e conselhos nesta caminhada;

Às minhas co-orientadoras Virgínia Ramos Pizziolo e Beatriz Brasileiro pelo apoio e as orientações. Sem vocês boa parte deste trabalho não seria realizado;

Ao meu amigo Mateus Gandra pela paciência e dedicação ao passar seus conhecimentos e ajudar nos experimentos. Sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador Álvaro Viana, pela atenção;

À minha mãe e a meus irmãos pelo apoio incondicional a este projeto;

À todos os meus amigos que de uma maneira ou de outra contribuíram de forma efetiva para que este trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

Fernanda Rodrigues Nascimento, filha de Fernando Nascimento (In memoria) e Maria Rodrigues do Nascimento, nasceu na cidade de Juiz de Fora, em 06 de Junho de 1975.

Em 1994 completou o ensino médio no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais em Juiz de Fora

Em março de 1995, ingressou no curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, graduando-se em 2000.

Ingressou no programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola em março de 2012, em nível mestrado na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 24 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Produtos naturais	2
2.1.1. Antibióticos e produtos naturais	3
2.1.2. Atividade antioxidante e produtos naturais	4
2.1.3. Câncer e produtos naturais	6
2.2. Gênero <i>Plectranthus</i>	7
2.2.1. Atividades biológicas do gênero <i>Plectranthus</i>	8
2.2.2. Diterpenos isolados do gênero <i>Plectranthus</i>	9
2.2.3. <i>Plectranthus ornatus</i>	10
2.2.4. Características botânicas do <i>Plectranthus ornatus</i>	10
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Obtenção do material vegetal	12
4.2 Preparação dos extratos de <i>Plectranthus ornatus</i>	13
4.3 Bioensaio para atividade antibacteriana	13
4.3.1 Microorganismo indicador	13
4.3.2 Preparo dos microorganismos indicadores	14
4.3.3 Preparo das soluções de extratos e do controle positivo	14
4.3.4. Avaliação da atividade antibacteriana	14
4.3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	15
4.4. Bioensaio de Peroxidação em Lipossomos- TBA	16
4.4.1. Preparo dos lipossomos	16
4.4.2. Teste de peroxidação em lipossomos	16

4.5 Avaliação da atividade antitumoral	17
.4.5.1 Cultura de células.....	17
4.5.2 Tripsinização	18
4.5.3 Contagem do número de células viáveis.....	18
4.5.4 Criopreservação	19
4.5.5 Descongelamento	19
4.5.6 Teste de concentração de células por poço	19
4.5.7 Teste de citotoxicidade do DMSO	19
4.5.8 Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT	20
4.6. Análise estatística.....	23
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Obtenção dos extratos.....	24
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana	25
5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	31
5.3 Determinação da atividade antioxidante.....	34
5.4 Determinação da atividade antitumoral	37
6 CONCLUSÃO.....	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos diterpenos	9
Figura 2. <i>Plectranthus ornatus</i>	11
Figura 3: Mapa de placas para os testes com extratos.....	22
Figura 4: Mapa das placas para os testes com o controle positivo.....	22
Figura 5: Porcentagem dos halos de inibição <i>S.aureus</i> ATCC 29213	29
Figura 6: Porcentagem dos halos de inibição <i>S.aureus</i> 4075.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Rendimentos dos extratos.....	24
Gráfico 2: Halos de inibição de <i>P.ornatus S.aureus</i> 4075.	28
Gráfico 3: Halos de inibição de <i>P.ornatus S.aureus</i> ATCC 292013.....	28
Gráfico 4: Inibição da peroxidação lipídica	35
Gráfico 5: Teste de citotoxicidade do DMSO	38
Gráfico 6: IC ₅₀ para o controle positivo VP16	38
Gráfico 7: IC ₅₀ para o controle positivo ARC	39
Gráfico 8: IC ₅₀ DM1: extrato de diclorometano da 1 ^a coleta (90 dias).....	39
Gráfico 9: IC ₅₀ DM2: extrato de diclorometano da 2 ^a coleta (120 dias).....	40
Gráfico 10: IC ₅₀ DM3: extrato de diclorometano da 3 ^a coleta (150 dias).....	40
Gráfico 11: IC ₅₀ .EP1: extrato de éter de petróleo da 1 ^a coleta (90 dias).....	41
Gráfico 12: IC ₅₀ EP2: extrato de éter de petróleo da 2 ^a coleta (120 dias).....	41
Gráfico 13: IC ₅₀ EP3: extrato de éter de petróleo da 3 ^a coleta (150 dias).....	42
Gráfico 14: IC ₅₀ ET1: extrato etanólico da 1 ^a coleta (90 dias)	42
Gráfico 15: IC ₅₀ ET2: extrato etanólico da 2 ^a coleta (120 dias).....	43
Gráfico 16: IC ₅₀ ET3: extrato etanólico da 3 ^a coleta (150 dias).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano	26
Tabela 2: CIM: <i>S.aureus</i> ATCC 29213 e <i>S. aureus</i> 4075.	31
Tabela 3: Porcentagem de inibição de peroxidação lipídica	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B16F10	Linhagem de melanoma murino
BHI	Caldo infusão de cérebro-coração
BHT	Di-terc-butilmetilfenol
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EP1	Extrato de éter de petróleo coleta 1
EP2	Extrato de éter de petróleo coleta 2
EP3	Extrato de éter de petróleo coleta 3
DM1	Extrato diclorometano coleta 1
DM2	Extrato diclorometano coleta 2
DM3	Extrato diclorometano coleta 3
ET1	Extrato etanólico coleta 1
ET2	Extrato etanólico coleta 2
ET3	Extrato etanólico coleta 3
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
IC50	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
LB	Lurian Bertani
MH	Müeller Hinton

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidade formadora de colônia

RESUMO

NASCIMENTO, Fernanda Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Avaliação da atividade biológica de extratos de *Plectranthus ornatus* em diferentes idades da planta** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Munoz, Virgínia Ramos Pizzolo, Beatriz Gonçalves Brasileiro, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira

Plectranthus ornatus pertence à família Lamiaceae. É uma planta utilizada na medicina popular africana e em algumas regiões do Brasil, onde é popularmente conhecido por “Boldo miúdo ou Boldinho”, para distúrbios digestivos e como antibióticos em algumas outras localidades brasileiras. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana, a atividade antioxidante e a atividade antitumoral de extratos de *Plectranthus ornatus* obtidos por ultrassom com os solventes: éter de petróleo (EP); diclorometano (DM) e etanol (ET). A planta foi coletada com idades de 90, 120 e 150 dias, originando os seguintes extratos: éter de petróleo 1 (EP1 obtido da planta com 90 dias); éter de petróleo 2 (EP2 obtido da planta com 120 dias); éter de petróleo 3 (EP3 obtido da planta com 150 dias); diclorometano 1 (DM1 obtido da planta com 90 dias); diclorometano 2 (DM2 obtido da planta com 120 dias); diclorometano 3 (DM3 obtido da planta com 150 dias); etanol 1 (ET1 obtido da planta com 90 dias); etanol 2 (ET2 obtido da planta com 120 dias) e etanol 3 (ET3 obtido da planta com 150 dias). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de hole plate e a atividade antioxidante pelo método de peroxidação lipídica. Já a atividade antitumoral foi pesquisada em células B16F10 de melanoma murino. Somente os extratos éter de petróleo e diclorometano apresentaram atividade antimicrobiana nas 3 coletas analisadas com concentração inibitória mínima (CIM) de EP1 = 0,7 mg/mL; EP2 = 0,7 mg/mL; EP3 = 0,5 mg/mL; DM1 = 0,6 mg/mL; DM2 = 0,7 mg/mL para as duas cepas de *S. aureus* testadas (ATCC 29213 e 4075). O DM3 apresentou CIM igual a 0,6 mg/mL para a *S. aureus* ATCC 29213 e para a *S. aureus* 4075 apresentou CIM igual 0,8 mg/mL. Todos os extratos testados apresentaram atividade antioxidante, com destaque para o extrato de diclorometano que apresentou melhor desempenho nas 3 coletas com índices próximos ao controle positivo sintético BHT, além de ter

apresentado a maior inibição de peroxidação no extrato DM3 = 81,96%. Para a atividade antitumoral os destaques foram os extratos éter de petróleo e etanólico que apresentaram os seguintes resultados de concentração que inibi 50% das células (IC₅₀): EP1= 9,0 µg/mL, EP2 = 10,0 µg/mL, EP3 = 2,0 µg/mL, ET1 = 1,21 µg/mL e ET2 (IC₅₀) = 0,5 µg/mL. O extrato ET3 não apresentou um bom resultado atitumoral, assim como os extratos diclorometano. Os resultados apresentados neste estudo demonstram a capacidade dos extratos de *P.ornatus* como agente antibacteriano, antioxidante e antitumoral, sendo que mais estudos se fazem necessários para elucidar as estruturas responsáveis por estas atividades biológicas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Fernanda Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Biological evaluation activity of extracts *Plectranthus ornatus* in different ages of plant.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Gaspar Diaz Munoz, Virgínia Ramos Pizzolo, Beatriz Gonçalves Brasileiro, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira.

Plectranthus ornatus come from the Lamiaceae family. Is common used in the african popular medicine and in some regions of Brasil, where is popular known as “Boldo or Boldinho”, for digestive disturbance and antibiotal. The present study evaluated the antitumoral activity from the extract of *Plectranthus ornatus* obtained using ultrasound whit the solvents: petroleum ether(PE); dichloromethane(DM) and ethanol(ET). The plant was collected in the ages of 90, 120 and 150 days, originating the following extracts: petroleum ether 1 (PE1 obtained from the pant in 90 days); petroleum ether 2 (PE2 obtained from the plant in 120 days); petroleum ether 3 (PE3 obtained from the plant in 150 days); dichloromethane 1 (DM1 obtained from the plant in 90 days); dichloromethane 2 (DM2 obtained from the plant in 120 days); dichloromethane 3 (DM3 obtained from the plant in 150 days); ethanol 1 (ET1 obtained from the plant in 90 days); ethanol 2 (ET2 obtained from the plant in 120 days); ethanol 3 (ET3 obtained from the plant in 150 days). The antimicrobial activity was realized whit the hole plate method and the antioxidant activity whit the lipid peroxidation method. However the antitumoral activity has been researched in cells B16F10 of murine melanoma. Only the extracts of petroleum ether and dichloromethane presented antimicrobial activity on 3 analyzed samples whit a minimum inhibitory concentration (MIC) of PE1 = 0,7 mg/mL; PE2 = 0,7 mg/mL; PE3 = 0,5 mg/mL; DM1 = 0,6 mg/mL; DM2 = 0,7 mg/mL for two strains of *S. aureus* tested (ATCC 29213 and 4075). The DM3 presented MIC equal 0,6 mg/mL for the *S. aureus* ATCC 29213 and for the *S. aureus* 4075 presented MIC equal 0,8 mg/mL. All tested extractus presented antioxidant activity, especially the dichloromethane that presented a better performance on 3 collections whit rates close to the synthetic positive control BHT, also presented the greater inhibition of peroxidation in the extract DM3= 81,96%. For antitumor activity highlights were the extracts of petroleum ether and ethanol which have the following results of

concentration that inhibited 50% of the cells (IC₅₀): PE1= 9,0 µg/mL, PE2 = 10,0 µg/mL, PE3 = 2,0 µg/mL, ET1 = 1,21 µg/mL e ET2 (IC₅₀) = 0,5 µg/mL. The ET3 extract did not presented a good result antitumor as well as dichloromethane extracts. The results presented in this study demonstrate the ability of extracts *P.ornatus* as antibacterial, antioxidant and antitumor, and more studies are needed to elucidate the structures responsible for these biological activities.

1. INTRODUÇÃO

A humanidade utiliza as plantas medicinais desde a antiguidade para o alívio de suas doenças. Os primeiros relatos do uso de plantas medicinais pelo homem foram encontrados nas escrituras sagradas e no papiro de Erbes que pertencia à dinastia egípcia que reinou entre 1550 a.C e 1295 a.C. (PINTO et al., 2002)

As plantas medicinais são aquelas usadas para combater as enfermidades. São capazes de curar patologias ou mesmo aliviar seus sintomas, pois possuem substâncias com ação farmacológica. (SIMÕES et al., 2007). O conhecimento empírico popular incentivou muitos pesquisadores a estudarem as plantas medicinais, levando à descoberta de novos princípios ativos. (ALMASSY et al., 2005, SIMÕES et al., 2007).

O desenvolvimento da química orgânica proporcionou uma nova maneira de obtenção de novos fármacos através da síntese, semi-síntese ou o planejamento dos mesmos a partir de estruturas isoladas de plantas medicinais. (YUNES & FILHO, 2007). Como exemplo podemos citar a salicina, isolada da casca do *Salix alba*, planta utilizada popularmente para dor e febre e que posteriormente deu origem ao ácido acetil salicílico (SIMÕES et al., 2007).

As sínteses químicas de medicamentos começaram no final do Século XIX, mas até meados do Século XX a base da terapêutica medicamentosa eram as plantas medicinais. (BRANDÃO et al., 2010)

Nas décadas de 30 e 40 a descoberta de novas substâncias antibacterianas diminuiu drasticamente a mortalidade decorrente de infecções bacterianas e trouxe novos rumos para a prática médica. Estas descobertas estimularam a busca por novas substâncias antimicrobianas que até os dias de hoje são utilizadas com sucesso (BUTLER & BUSS, 2006). São exemplos a penicilina descoberta em 1939, a actinomicina em 1942, a estreptomicina em 1943, o cloranfenicol em 1947, a neomicina em 1949 e a eritromicina A em 1950 (YUNES & FILHO, 2007).

No período entre 1981 a 2002 mais da metade dos medicamentos que ganharam o mercado são derivados de plantas. Destes 28% são compostos isolados diretamente de plantas ou semi-sintetizados e 24% são sintéticos com grupamentos químicos derivados de produtos naturais (BRANDÃO et al., 2010).

Considerando o período de 2000 a 2006 26 novas moléculas deram origem a novos medicamentos lançados no mercado mundial, como por exemplo a galantamine para a doença de Alzheimer originado da planta *Galanthus nivalis* (SAKLANI & KUTTY, 2008)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produtos naturais

Os produtos naturais possuem papéis importantes na medicina atual. Eles podem servir de protótipo ou modelo para a síntese de novos medicamentos. Alguns podem possuir atividade biológica pequena, mas que ao sofrerem modificações químicas ou biológicas podem se transformar em drogas potentes, como por exemplo o taxol (SIMÕES et al., 2007).

Os produtos naturais também possuem importância econômica principalmente pelo uso como corantes. Um exemplo é o índigo isolado de plantas do gênero *Indigofera*, que no final do século XX passou a ser sintetizado a partir do antraceno e mais tarde a partir de hidrocarbonetos isolados do carvão (CARVALHO et al, 2010).

O estudo dos produtos naturais abrange várias áreas do conhecimento como: farmacologia, química, biologia, bioquímica, biofísica. Tradicionalmente a pesquisa de produtos naturais está inserida na biologia e na química, sendo as plantas e os microrganismos cultiváveis uma das fontes principais de exploração dos mesmos (PUPO & GALLO, 2007). O tratamento das doenças infecciosas e a oncologia são as áreas mais contempladas com a descoberta de novos princípios ativos. No período entre 2005 a 2010 dezenove novas drogas obtidas a partir de produtos naturais foram aprovadas para a comercialização. Destas sete receberam a classificação de produtos naturais, dez são produtos de semi-síntese e duas são derivadas de produtos naturais.(MISHRA & TIWARI, 2011)

As plantas medicinais, sem dúvida, são as maiores fontes de produtos naturais e são utilizadas pela humanidade desde a antiguidade para a cura de diversas patologias. (SIMÕES et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependam diretamente de plantas medicinais para tratar de seus problemas de

saúde Portanto, recomenda a valorização da utilização de plantas medicinais na atenção básica à saúde principalmente. (OMS, 2002) No Brasil algumas iniciativas de aproveitamento do conhecimento popular e científico sobre plantas medicinais tiveram sucesso, como é o caso do projeto Farmácia Viva da Universidade Federal do Ceará. Este projeto inclui o uso de plantas medicinais na atenção básica a saúde. (MATOS, 1998)

O sistema único de saúde (SUS), através da portaria 971, de 2006, publicou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) que recomenda a implantação e implementação de ações no SUS que incluem, entre outras práticas, a fitoterapia na atenção básica à saúde. (BRASIL, 2006) Em consonância com esta portaria, em 2007 o Programa Nacional de Plantas Mediciniais, através do Programa de Plantas Mediciniais permite o acesso seguro da população à plantas medicinais e fitoterápicos, pois se preocupa com a qualidade da produção dos mesmos.(BRASIL, 2009)

2.1.1. Antibióticos e produtos naturais

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, um produto natural derivado de um fungo, revolucionou o tratamento de infecções, pois essa se mostrava mais eficaz que os demais compostos antibacterianos disponíveis na época. Entre os anos de 1940 – 1960 varias substâncias derivadas de produtos naturais foram estudadas para avaliar o potencial antimicrobiano e muitas deram origem a classes de antibacterianos que são usados até os dias de hoje na terapêutica contra infecções. Podemos citar os β -lactâmicos; aminoglicosídeos; tetraciclina; macrolídeos; peptídeos entre outros. No período de 1980 – 2000 houve uma diminuição da triagem de antimicrobianos de origem natural. Na mesma época ocorreu um aumento na resistência bacteriana. A partir de 2000 houve uma retomada da pesquisa de antibióticos de fontes naturais (GUIMARÃES et al., 2010)

O uso de produtos naturais como protótipo de novas drogas tem motivado muitas pesquisas para a descoberta de novos antimicrobianos. A diversidade química encontrada na natureza é enorme o que aumentam as chances de novas drogas com potencial antimicrobiano serem encontradas (ORTHOLAND & GANESAN, 2004). Antibióticos provenientes de semi-síntese, análogos aos antibióticos naturais já existentes, entraram no mercado no

período entre 1960-1980, como os derivados β -lactâmicos: cefalosporina, ácido clavulânico, análogos de penicilina, aztreonam. Também se enquadram nesta categoria os análogos da tetraciclina e os derivados aminoglicosídeos (GUIMARÃES et al., 2010) Estes eram mais potentes e mais resistentes à inativação por enzimas bacterianas ou sua ligação no alvo bacteriano era mais forte (FERNANDES, 2006)

No início da década de 80 a indústria farmacêutica apresentou dificuldades para sintetizar novos compostos. (FERNANDES, 2006). A busca por novos antibióticos, foi realizada neste período, utilizando a genômica e as triagens de coleções de compostos. As coleções de compostos são um conjunto de produtos sintéticos não encontrados na natureza com ação antibacteriana (WALSH, 2003). No início do século XXI foram retomadas a buscas por novos antimicrobianos provenientes de fontes naturais (GUIMARÃES et al., 2010). E entre 2005 e 2007 13 novos princípios diferentes tiveram seu uso aprovado e outros cem estão em fase de estudo clínico (HARLEY, 2008)

A diversidade de novas substâncias encontrada nas triagens com produtos naturais despertou novamente o interesse na exploração de produtos naturais que possam servir de protótipos de novos medicamentos. (ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

2.1.2. Atividade antioxidante e produtos naturais

A ação antioxidante de algumas substâncias tem chamado à atenção da comunidade científica, pois os radicais livres estão relacionados a muitas doenças, entre elas o câncer. Sua produção ocorre em processos fisiológicos normais de oxidação nas células (KYUNG-A et al., 2011).

São chamados de radicais livres as espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como radical hidroxila; ânion radical superóxido; e hidroperoxila. Estas substâncias atacam lipídeos, proteínas e DNA causando sua oxidação A peroxidação lipídica das membranas celulares tem início com o ataque nos ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidos e do colesterol que retira um hidrogênio do grupo metileno bis *alílico*. O radical de carbono formado pode reagir com o oxigênio formando radicais peroxila que podem atacar novos ácidos graxos e reiniciar o processo. O ataque ao DNA ocorre também pela

formação de aldeídos (malonaldeído; acroleína; crotonaldeídos) e epóxidos formados a partir da reação dos hidroperóxidos com metais (VALKO et al 2004)

As células controlam a concentração dos radicais por diversos compostos antioxidantes que podem ser produzidos por elas mesmas, tais como a superóxido desmutase ou podem ser ingeridos pelos seres vivos, entre estes se destacam a vitamina C; vitamina E; polifenóis; selênio e carotenoides (VALKO et al 2004)

Uma substância antioxidante é aquela capaz de impedir os danos causados por compostos oxidantes. São classificadas em antioxidante primário e secundário. Os antioxidantes primários são aqueles capazes de neutralizar totalmente ou parcialmente o radical oxidante doando elétrons para o mesmo, tornando-o estável. Os antioxidantes secundários podem agir por alteração da valência, por conversão em hidroperóxidos; não radicais ou absorção de radiação ultravioleta UV (VALKO et al 2004).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em plantas e apresentam em sua estrutura vários anéis benzênicos com substituinte hidroxila. Esses compostos são os responsáveis pela ação antioxidante em planta. Agem doando hidrogênio ou elétrons e os anéis benzênicos estáveis impedem a oxidação, principalmente de lipídeos. Os principais compostos fenólicos encontrados em plantas são: flavonoides; cumarinas; estilbenos; taninos condensados; hidrolisáveis; lignanas e lignina. (CLOSE et al 2005).

A maior fonte de compostos fenólicos são as plantas. Estes são responsáveis pela proteção das mesmas contra os danos causados pelos raios ultravioletas e também contribuem de modo positivo também nas condições de estresse (CLOSE et al 2005). A atividade antioxidante atribuída aos compostos fenólicos deve-se a sua capacidade de quelar metais de transição, bem como neutralizar ou sequestrar radicais livres. Os intermediários resultantes da ação antioxidante de compostos fenólicos são estáveis em decorrência da ressonância do anel aromático presente nesta estrutura (SOARES, 2002)

Os carotenoides são outro grupo de substâncias com ação antioxidante e que também são encontrados em plantas. Estes são caracterizados como poliisoprenóides e podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenoides hidrocarbonos, que possuem apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura (Ex: licopeno e β -caroteno) e o grupo da xantofilas, que possuem

oxigênio em sua estrutura (EX: Luteína e zeaxantina). A atividade antioxidante deste grupo ocorre pelos grupos terminais cíclicos que em conjunto com o oxigênio podem absorver os radicais livres (QUIRÓS et al 2006)

A redução da incidência de algumas doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer foi observada quando ocorria um aumento na ingestão de compostos fenólicos (BONOLI et al., 2004). Os carotenoides também possuem ação contra doenças cardíacas e degeneração macular. (KOTAKE-NARA & NAGAO, 2011)

2.1.3.Câncer e produtos naturais

O câncer é o crescimento desordenado de células e pode ocorrer em qualquer tecido por razões diversas. Acomete pessoas de diversas idades, mas as com idade avançada estão mais susceptíveis. As células cancerígenas possuem uma semelhança muito grande com as células normais, portanto é um desafio para a medicina moderna encontrar drogas que possuam seletividade para atacar somente as células doentes (INCA, 2012).

As plantas são utilizadas como fontes de novas drogas para o tratamento de câncer a muito tempo. Cerca de 60% das drogas anticâncer utilizadas comercialmente provém de fontes naturais. (NEWMAN & CRAGG, 2007). O estudo de plantas com potencial antitumoral levou a importantes descobertas como a vincristina e vimblastina, derivadas de compostos isolados da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, que são utilizadas no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil. Outra descoberta importante deriva do gênero *Podophyllum*, substâncias isoladas das espécies *P. peltatum* e *P. emodii* deram origem ao otoposídeo (VP16) e o tenitoposídeo que são utilizados na terapêutica de leucemias. O taxol é um diterpeno, isolado das cascas *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt , que originou o Paclitaxel, um dos compostos mais importantes como anticancerígenos, pois foi eficaz contra câncer de mama e ovário resistentes à terapia convencional (BRANDÃO et al, 2010).

O melanoma ocorre em células da pele denominadas melanócitos. Estas células produzem melanina, que é uma substância responsável pela proteção da pele contra os raios solares, principalmente os raios ultra- violeta (UV). Em

condições normais ocorre a formação de uma unidade de melanina composta por melanócitos e queratinócitos. Cada melanócito transfere melanossomas para os queratinócitos através de seus dentritos. E a melanina contida nestes melanossomas realizam a proteção contra os raios ultra-violeta absorvendo os mesmos e evitando dano ao DNA e este equilíbrio só é quebrado quando ocorre um melanoma (HASS & HERLYN, 2005)

A sinalização PI3Kinase/AKT/mTOR é uma das principais vias de sinalização celular estudadas em vários tipos de câncer. Vários estudos demonstram a importância desta via no crescimento celular e na prevenção de apoptose, originando tumores e metástases. Em 60% dos melanomas ocorre o aumento da expressão de AKT, o que leva a uma desativação das vias apoptóticas Bad e caspases-9 (JAZIREHI et al 2012). Já 96% dos melanomas possuem mutações no DNA em CDKN2A/p16, CDKN2B/p15, CDK4 e CCND1/cyclin D1(WALKER et al, 1998)

Os melanomas são classificados da seguinte forma: nível I (crescimento intra-epidérmico); nível II (invasão da derme papilar); nível III (chega ao limite entre a derme papilar e reticular); nível IV (invasão da derme reticular); nível V(invasão da derme subcutânea) (GON et al, 2001),

A principal causa deste tipo de câncer são os raios UVA e UVB que provocam a perda dos mecanismos de controle de crescimento celular. (SOUZA et al, 2009). Este tipo de câncer de pele é a principal doença fatal que acomete este órgão. Em números mundiais representa cerca de 3% dos tipos de câncer e de 1 a 2% das mortes por câncer.(LAPA et al, 2002)

2.2. Gênero *Plectranthus*

O gênero *Plectranthus* pertence à família Lamiaceas e suas espécies são amplamente distribuídas pela África, Ásia e Austrália. São registradas cerca de 300 espécies, sendo que a falta de critérios claros de classificação dificulta a distinção entre elas. As espécies que compõem este gênero são ricas em diterpenos e possuem uma ampla utilização na medicina popular para tratar distúrbios digestivos, problemas de pele, distúrbios respiratórios, infecções e febre, entre outras. As espécies *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus amboinicus* são as que mais possuem atribuição de usos populares (LUKHOBBA et al., 2006). *P. barbatus* é uma das espécies mais importantes do

gênero por possuir compostos com atividade farmacológica comprovada (ALBUQUERQUE et al., 2007). Já o *P. amboinicus* é utilizado para problemas odontológicos, dores de garganta, tosse, bronquite e problemas ginecológicos (OLIVEIRA et al., 2007)

No Brasil a espécie *Plectranthus ornatus* é utilizada pela população como anti pirético; diurético; analgésico; antibiótico; adstringente; depurativo; anti-inflamatório; anti úlcera entre outros (BRASILEIRO et al., 2006).

2.2.1. Atividades biológicas do gênero *Plectranthus*

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais é objeto de estudo de muitas pesquisas, pois muitos apresentam comprovada atividade farmacológica. Os metabólitos secundários tais como os terpenos e compostos fenólicos são os responsáveis por esta atividade biológica (ADAM et al 1998). Do *P. gradidentatus* foi isolado um diterpeno capaz de apresentar atividade antimicrobiana frente *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *S. aureus*.. Do extrato de partes aéreas do *P. elegans* dois novos diterpenos abietanóides foram descobertos e apresentaram efeito biológico contra *Cladosporium cucumerinum*, pois inibiram a germinação de seus esporos, e ainda apresentaram atividade antibacteriana frente a cepas de bactérias gram positivas. (VICHKANOVA et al., 1966). Já a espécie *P. crassus* foi estudada por Grayer e colaboradores em 2003 e seu extrato bruto bem como diterpenos isolados apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Cladosporium herbarum*.

Os radicais livres são formados naturalmente nas reações biológicas do organismo, mais em altas concentrações podem causar injúria tecidual e patologias. A busca por substâncias antioxidantes é o tema principal de muitos trabalhos científicos e algumas espécies do gênero *Plectranthus* apresentam bons resultados. Um teste de DPPH foi realizado com extrato etanólico da espécie *P. barbatus* e o mesmo apresentou retirada de radicais livres de 71,7% na concentração de 5mg/mL em comparação com o padrão vitamina C na mesma concentração (TIWARI et al., 2010) . O extrato aquoso do *P. barbatus* apresentou efeito protetor da membrana de mitocôndrias contra peroxidação lipídica por provável quelação do ferro. Este efeito pode ser atribuído aos compostos fenólicos contidos no extrato (MAIOLI et al 2010).

A avaliação do extrato aquoso ocorreu com a espécie *Plectranthus amboinicus* que apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em vivo e em vitro (CHUI et al, 2012). Esta mesma espécie também apresentou atividade anti-tumoral em preparações de extrato hidro alcoólico contra sarcoma in vitro e carcinoma em vivo (GURGEL et al 2009).

2.2.2.Diterpenos isolados do gênero *Plectranthus*

No genero *Plectranthus* é comum o aparecimento das estruturas de diterpenos: o labdano (I), clerodano (II), caurano (III) e abietano (IV)

Os diterpenos mais comumente isolados são do tipo abietano, são extremamente modificados, gerando uma subclassificação: roileanonas, acil-hidroquinonas, quinomametídeos, abietenóides primaranos, espirocoleonas, 6, 20- epóxiabietenóides, abietenóides dimeros. (DEWICK, 2002.;GASPAR-MARQUES *et al.*, 2005.; MANN, 2005).

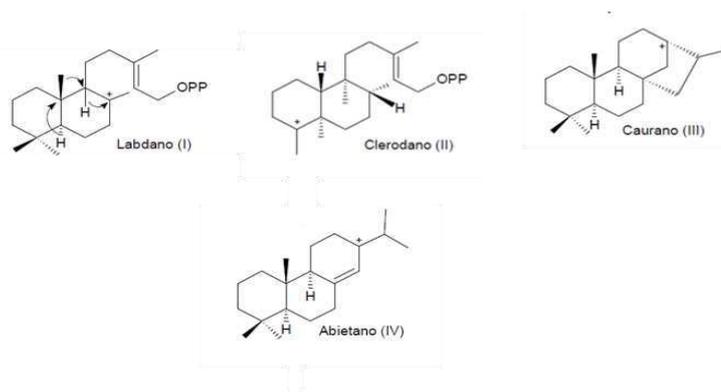


Figura 1. Estrutura dos diterpenos mais comuns encontrados no genero *Plectranthus*. Fonte: DEWICK, 2002.

Muitas substâncias encontradas no gênero *Plectranthus* possuem atividade biológica significativa, sendo que os diterpenóides do tipo Labdanos são os responsáveis por esta ação em espécies como *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus ornatus* (LUKHOBA *et al.*, 2006). *P. barbatus* possui em sua maioria diterpenóides do tipo Labdanos, sendo que a fosfokina um dos exemplos destes compostos com atividade biológica relevante. Esta substância tem ação sobre o músculo liso das vias aéreas de cobaias *in vitro* e *in vivo*. Na espécie *P. ornatus* foram encontrados três novos diterpenos no extrato de acetona, sendo dois deles labdanos e um clerodano (OLIVEIRA *et al* 2005). Outro estudo utilizando também extrato de acetona três novos diterpenos foram

isolados, sendo que estes possuem estrutura muito semelhante à fosfokina (RIJO et al, 2005).

2.2.3. *Plectranthus ornatus*

Esta espécie é utilizada na medicina popular africana e em algumas regiões da Etiópia (BEKALO et al.,2009), onde é popularmente conhecido “Boldo miúdo ou Boldinho”, para distúrbios digestivos (MAURO et al.,2008) e como antibióticos em algumas outras localidades brasileiras. Resultados de pesquisas etnobotânicas mostram que esta espécie é preparada por infusão ou decocção gerando um extrato aquoso (BRASILEIRO et al.,2006) Um screening com seis extratos de *Plectranthus ornatus* de diferentes polaridades demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas para os extratos de acetona e metanol-água (RIJO et al, 2011). Em um outro trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* de 8 diterpenos isolados anteriormente do gênero *Plectranthus* e somente os que apresentaram quinona em sua estrutura apresentaram atividade (RIJO et al 2010). Rijo et al 2012, avaliaram a inibição de Cox-1 de 3 diterpenos diferentes isolados de *P. ornatus*. São eles ácido rhinocerotoico, halimane, plectronatin C.Os resultados apresentados neste estudo mostram que apenas o primeiro apresenta leve inibição da Cox-1. Mais estudos estão sendo feitos para determinar se os mesmo inibem a Cox-2 e assim comprovar seu efeito anti-inflamatório.

2.2.4. Características botânicas do *Plectranthus ornatus*

Plectranthus ornatus (Figura 2) pertence à família Lamiaceae originária do continente africano e trazida para o continente Americano pelos portugueses (LUKHOBBA et al.,2006).

Plectranthus ornatus Codd é uma espécie perene, herbácea, ereta quando jovem e decumbente após 1 ou 2 anos. Possui folhas simples, opostas, ovaladas de bordos denteados, pilosas, de sabor muito amargo, sendo mais espessas e suculentas quando frescas (Figura 2A). As flores azuis são dispostas em inflorescências racemosas que se desenvolvem na parte terminal do ramo (Figura 2B). (MAURO et al 2008).

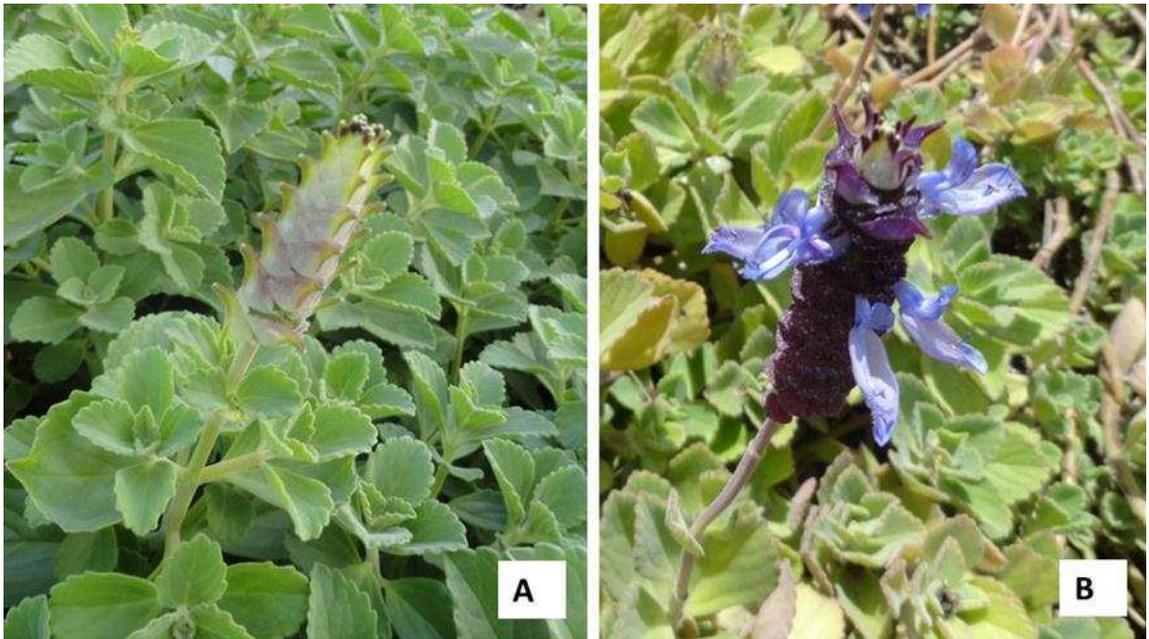


Figura 2. *Plectranthus ornatus* Cood: A- aspecto geral da planta com inflorescência; B- detalhe da inflorescência com flores abertas. Fonte: Acervo pessoal

O limbo das folhas em corte transversal apresenta a epiderme uniseriada com células pequenas e compactadas cobertas por uma cutícula grossa e lisa. Existem também tricomas tectores em abundância e tricomas glandulares em menor quantidade. Já o mesófilo foliar é homogêneo. Os estômatos são do tipo anomocítico. Os tricomas glandulares sésseis estão em número menor em relação os pedicelados (MAURO et al 2008).

O pecíolo é revestido por uma derme unisseriada com cutícula espessa. Existem duas ou três camadas de colênquima angular na porção cortical abaixo da epiderme e muitos tricomas tectores unisseriados pluricelulares. O feixe vascular é colateral fechado, com 2 feixes menores nas 2 extremidades. A região cortical mostra-se rodeada por parênquima homogêneo isodiamétrico.

O caule é revestido de por epiderme unisseriada com a existência de tricomas tectores em caules jovens. Possui parênquima comum com meatos na regiões cortical e medular. Mostra xilema secundário bem desenvolvido em estrutura secundária, formados por muitas fibras esclerenquimáticas e escassos elementos de vaso (MAURO et al 2008).

3. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a atividade biológica de diferentes extratos de *Plectranthus ornatus* obtidos de partes aéreas da planta colhida em 3 estágios de desenvolvimento;
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante;
- ✓ Avaliação da atividade antimicrobiana ;
- ✓ Avaliação da atividade antitumoral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

O material botânico foi coletado no campus da Universidade Federal de Viçosa no mês de maio de 2012 e identificado pela Prof.^a Dr.^a Flávia Cristina Pinto Garcia, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, estando depositada uma exsicata de nº 39644 no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras de *Plectranthus ornatus* Codd. foram obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação do departamento de fitotecnia da UFV. As plantas foram propagadas por estacas, pré-enraizadas em substrato comercial (Plantmax®) e o plantio feito em vasos de polietileno com capacidade de 6 L, tendo como substrato terra, areia e esterco, na proporção de 3:2:1.

A colheita das plantas ocorreu aos 90, 120 e 150 dias contados a partir do transplante das mudas. As mudas foram transplantadas em 18/05/12, e os cortes foram feitos nas seguintes datas: **13/08; 13/09; 13/10**. As partes aéreas das plantas foram cortadas e todo o material vegetal aproveitado. Este foi seco em estufa de ar forçado por 20 dias, à temperatura de 40°C e após este período triturado em moinho de facas até a total pulverização das amostras referentes as três coletas. Após esta etapa todo o material foi armazenado em

potes plásticos protegidos da luz devidamente etiquetados com a data da coleta e o nome científico da planta.

4.2 Preparação dos extratos de *Plectranthus ornatus*

O material obtido em cada corte foi utilizado para a preparação dos extratos brutos através do método de ultrassom.

Foram usados 3 solventes com polaridade crescente (éter de petróleo diclorometano; etanol) sendo obtidos um total de nove extratos da seguinte forma: 40 g de planta pulverizada foi misturada com 400 mL do solvente éter de petróleo em erlemmeyer protegido da luz por um papel alumínio. Em seguida esta mistura foi sonicada por 60 minutos. Logo após o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro e o filtrado armazenado em frasco âmbar devidamente identificado com o nome do filtrado (Ex: filtrado de éter de petróleo). Esta operação foi repetida 5 vezes. A torta (material vegetal que restou após a última extração) foi colocada na capela de exaustão por 24 horas para a evaporação do resíduo do solvente. Após este procedimento 400 mL do solvente diclorometano foi adicionado à esta torta e em seguida sonicado por 60 minutos. O filtrado foi armazenado em um frasco âmbar devidamente identificado (filtrado de diclorometano), esta operação foi realizada por 5 vezes. A torta foi colocada em capela de exaustão por 24 horas e após este período 400 mL de etanol 92°GL foi adicionado e toda a operação descrita anteriormente para os outros dois solventes foi repetida para este. Ao final da última extração com etanol a torta foi descartada após evaporação total do solvente. Todas as etapas do procedimento descrito anteriormente foram repetidas para o material vegetal das 3 coletas realizadas. Todos os extratos obtidos foram concentrados em rota evaporador e os extratos armazenados em frascos protegidos da luz devidamente identificados e acondicionados em geladeira.

4.3 Bioensaio para atividade antibacteriana

4.3.1 Microorganismo indicador

Foram utilizados como microorganismos indicadores para atividade antibacteriana, cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* 4075, sendo que esta foi obtida de espécimes clínicos de mastite bovina provenientes da

Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, MG e a cepa ATCC foi gentilmente cedida pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Foram considerados resultados de inibição de crescimento bacteriano halos maiores ou iguais a 7mm (NASCIMENTO et al, 2000).

4.3.2 Preparo dos microorganismos indicadores

As bactérias a serem testadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3-4 mL de meio LB líquido, previamente esterilizado, e cresceram em estufa *overnight* a 37°C. Simultaneamente, foi preparado o branco para leitura em espectrofotômetro. Verificou-se a eficácia do crescimento com a turvação do meio quando comparado ao branco. Foram transferidos 1 mL do inóculo de cada bactéria e 1 mL do branco para eppendorfs distintos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. O branco foi utilizado para calibrar o aparelho e prosseguir com a leitura da absorção dos meios contendo as bactérias. As amostras que não apresentaram absorção entre 0.100 a 0.190 foram diluídas em série, até obter a leitura descrita. Obtido a absorção desejada, realizou-se duas diluições seriadas 1:10, afim de se obter a concentração ideal (10^6 bactérias/ mL) para o plaqueamento das bactérias.

4.3.3 Preparo das soluções de extratos e do controle positivo

Os extratos foram pesados com auxílio de uma espátula em balança analítica e transferidos para um eppendorf contendo DMSO a uma concentração final de 200 mg/mL. A amostra foi sonicada por 20 minutos para garantir melhor diluição do extrato. Para o controle positivo, soluções do antibiótico ciplopiroxolamina foram preparadas a uma concentração de 5 mg/mL e armazenadas a -20 °C.

4.3.4. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*. O meio Müller Hinton foi previamente autoclavado e quando este atingiu a temperatura de 40 °C as bactérias (concentração de 10^6 bactérias/mL) foram adicionadas ao meio (134 µL de bactérias para cada 20 mL de meio)., sendo cada bactéria colocada em meios

separados.. Logo após o meio ,contendo as bactérias, foi vertido em placas de petri devidamente autoclavadas até a formação de um filme contínuo sobre o fundo de cada placa. Após solidificação do meio, furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar. Os poços formados foram preenchidos com 8 µL de extrato vegetal, DMSO e ciclopiroxolamina (5 mg/mL diluído em DMSO) , sendo que cada substância foi colocada em apenas um poço. O controle positivo foi o ciclopiroxolamina e o controle negativo foi o DMSO.

As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, *overnight*. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata. A percentagem da ação antibacteriana dos extratos foi realizada usando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano das doses de extratos avaliadas e o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano do controle positivo com ciclopiroxolamina.

$$\% \text{ Ação Antibacteriana} = \frac{\text{Halo de Inibição Dose Testada}}{\text{Halo de Inibição Controle Positivo}} \times 100$$

4.3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Após os resultados do teste qualitativo somente os extratos que apresentaram atividade antibacteriana passaram para a etapa quantitativa, ou seja a determinação da concentração inibitória mínima de cada extrato. Este teste foi realizado em microplacas de 96 poços estéreis. Foram utilizadas as mesmas bactérias (*S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* 4075) do teste qualitativo. Os extratos foram preparados (diluídos em DMSO) para que as concentrações finais em cada poço fossem as seguintes: 5 mg/mL; 4 mg/mL; 3 mg/mL; 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,9 mg/mL; 0,8 mg/mL; 0,7 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL. Para a ciclopiroxolamina (diluída em DMSO) as concentrações finais obtidas em cada poço foram: 0,7 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,09 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,07 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,03 mg/mL

Os poços das placas foram preparados da seguinte maneira: 100 µL de meio de cultura + 5 µL das diferentes concentrações dos extratos a serem testados + 100 µL de suspensão bacteriana a 10⁶ UFC/mL. A microplaca foi mantida a 37 °C por 24 h em estufa de crescimento. Para a determinação da CIM após as 24 horas de incubação todos os poços receberam 20 µL de uma solução de MTT na concentração de 5 mg/mL em metanol e em seguida as placas foram novamente incubadas por 20 minutos a 37°C em estufa de crescimento. Logo após procedeu-se a leitura visual das placas. O crescimento bacteriano nos poços foi evidenciado pela coloração azul. (LECHNER et al, 2004) A CIM do antibiótico sobre os isolados foi feita utilizando o mesmo procedimento. O Meio Müller- Hinton (Himedia[®]) acrescido de DMSO foi utilizado como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata. .

4.4. Bioensaio de Peroxidação em Lipossomos- TBA

4.4.1. Preparo dos lipossomos

Os lipossomos foram preparados utilizando 77 mg de fosfatidilcolina de soja em 10 mL de água destilada. A solução foi agitada em vórtex por 5 minutos .

4.4.2. Teste de peroxidação em lipossomos

A metodologia utilizada para avaliar o efeito antiperoxidativo das plantas foi descrita por Conforti e colaboradores (2002), com algumas modificações.

Foram utilizados 5 tubos de ensaio com as seguintes identificações: branco; amostra, *Gingko biloba*; BHT; DMSO. A cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL da solução de lipossomos (10 mM) ,2,5 mL de água destilada e 1 mL de ácido ascórbico. Logo após os tubos identificados como amostra, *Gingko biloba*, BHT e DMSO receberam respectivamente, 100 µL dos extratos (0,2 mg/mL) dissolvidos em DMSO, 100 µL de *Gingko biloba* dissolvido em DMSO, 100 µL de BHT (di-terc-butilmetilfenol) e 100 µL de DMSO. O tubo identificado como branco recebeu 100 µL de água. O BHT foi o controle positivo sintético, o *Gingko biloba* foi o controle positivo natural (planta conhecida antioxidante) e o DMSO foi o controle negativo.

. A peroxidação lipídica foi induzida adicionando-se 125 µL de cloreto férrico FeCl₃ (0,2 mM) em todos os tubos de ensaio. Posteriormente estes foram incubados em *shaker* durante 60 minutos a 40°C. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,375%) em todos os tubos de ensaio sob aquecimento em banho termostático a 80°C por 15 minutos. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos, e em seguida foi realizada a leitura do sobrenadante de todas as espécies em espectrofotômetro UV/visível a 532 nm, contra o branco: água, cloreto férrico, ácido ascórbico e TBA. O padrão antioxidante sintético BHT foi testado na mesma concentração das amostras vegetais a fim de ser utilizada como controle positivo para ação antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo utilizada a média das triplicatas para cálculo dos resultados. O índice de peroxidação em TBA foi expresso em termos da porcentagem de inibição de peroxidação de cada extrato.

A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada utilizando a absorvância do controle negativo e a absorvância da amostra de acordo com a expressão algébrica:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{abs. do controle negativo} - \text{abs. da amostra})}{\text{abs. do controle negativo}} \times 100$$

4.5 Avaliação da atividade antitumoral

.4.5.1 Cultura de células

As linhagens celulares de B16F10 (estabelecida a partir de células de melanoma murino) foram cultivadas em meio de cultura completo ("Dulbecco's Modified Eagles Medium" - DMEM - suplementado com 10 % de soro fetal bovino e glutamina 2 mM/mL), em frascos de cultura de 25 ou 75 cm², de poliestireno, em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Quando as culturas atingiram a semiconfluência, as células foram tripsinizadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido, e alíquotas foram congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade do experimento.

4.5.2 Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37°C com solução de tripsina a 0,25% e 0,05% de EDTA até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. A reação de tripsinização foi interrompida pela adição de 5,0 mL de meio completo. A suspensão celular foi então coletada em tubo de centrifuga, esterelizado e centrifugada a 1500 r.p.m., por 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células ressuspendidas em meio completo. Após efetuar a contagem celular na câmara de Neubauer, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivadas contendo o número desejado de células viáveis.

4.5.3 Contagem do número de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocítmetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada. Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37°C. Células hípidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis} \times 100}{\text{Número total de células}}$$

Para determinação da quantidade de células viáveis por cm³ ou mililitro, foi calculada a média aritmética entre o número de células vivas dos quatro quadrantes de um dos compartimentos da câmara. O número encontrado foi multiplicado por 10⁴ e pelo valor de diluição feita para se colocar as células na câmara. Foram contadas somente as células que se encontrarem ao menos parcialmente na parte central da câmara de Neubauer.

4.5.4 Criopreservação

Ao final do experimento alíquotas de células foram congeladas após tripsinização rotineira de culturas semiconfluentes. A interrupção da reação de tripsinização foi realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação a 1500 r.p.m.. As células foram, então, ressuspensas em meio completo contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos de até 1,8 mL, que permaneceram durante a noite a - 80°C e serão posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196° C), onde foram armazenados até que seja necessário o descongelamento novamente.

4.5.5 Descongelamento

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse foram mantidos a 37°C, durante 5 minutos. A suspensão celular foi então lavada com 10 mL de meio completo por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 3 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção do DMSO utilizado no congelamento. As células foram ressuspensas em meio completo, após descarte do sobrenadante, e subcultivadas em frasco de cultura de 25 cm²

4.5.6 Teste de concentração de células por poço

Antes de iniciar os ensaios com os extratos foi realizado um teste para determinar qual seria a quantidade de células ideal por poço a ser utilizada. Foram colocadas as seguintes concentrações celulares: 3×10^3 , 6×10^3 , 4×10^4 , 8×10^4 , 5×10^5 , 8×10^5 com meio de cultura incompleto juntamente com 5% de soro fetal bovino. O microscópio invertido foi utilizado para a observação do crescimento celular de 24 a 112 horas. A melhor concentração encontrada foi a de 3×10^3 células /poço, pois nesta concentração o crescimento celular ao final das 112 horas não foi suficiente para se ter uma super população celular em que ocorresse a morte celular. Os testes foram feitos com 4 repetições.

4.5.7 Teste de citotoxicidade do DMSO

Este teste também foi realizado antes de começar o experimento com o intuito de determinar qual a concentração máxima de DMSO as células

suportariam. Para tanto foi utilizada uma placa de 96 poços preenchidos com células na concentração de 3×10^3 células/poço com meio de cultura incompleto adicionado de 5% de soro fetal bovino. Foram testadas as seguintes concentrações de DMSO: 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2,0%. Todas as concentrações foram avaliadas em quadruplicata. A leitura foi realizada utilizando a técnica do MTT relatada anteriormente. Colocou-se MTT nos seguintes intervalos de tempo 24, 48, 72 h após as primeiras 48 horas de adaptação das células ao ambiente e verificou-se que a máxima concentração suportada foi 0,4% de DMSO no poço. A partir deste ensaio as concentrações dos extratos no poço foram calculadas para conterem no máximo 0,4% de DMSO no poço.

4.5.8 Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT

Células em crescimento exponencial foram tripsinizadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços. Após a realização de um teste de crescimento celular nos poços observou-se que a concentração ideal de células por poço foi de 3×10^3 células/poço. Foi colocado em cada poço as células na concentração de 3×10^3 células/poço juntamente com meio completo. Após 48 h o meio foi substituído por meio de cultura completo adicionado com extratos. Diferentes concentrações dos 9 extratos de *Plectranthus ornatus*, foram obtidas a partir de uma solução mãe com concentração de 200mg/mL através de diluição em meio completo. As diluições foram feitas em tubos estéreis separados e identificados. As seguintes concentrações finais nos poços foram obtidas: 2µg/mL; 4µg/mL; 8µg/mL; 16µg/mL; 32µg/mL; 64µg/mL; 128µg/mL; 256µg/mL; 512µg/mL. As soluções finais obtidas possuíam no máximo 0,4% de DMSO. As soluções de meio de cultura e extratos foram adicionadas aos poços em triplicata (200 µL/poço) após a retirada do meio completo. As células foram incubadas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. durante 72 h. Como controle positivo foi utilizado VP16 e Arac. Estes controles foram utilizados nas seguintes concentrações finais nos poços: 9×10^{-4} MM/mL; 2×10^{-3} MM/mL; 9×10^{-3} MM/mL; 2×10^{-2} MM/mL; 9×10^{-2} MM/mL; 2×10^{-1} MM/mL; 9×10^{-1} MM/mL; 2,0 MM/mL. E o modo de aplicação nas placas foi o mesmo utilizados com os extratos. O controle positivo VP16 (otoposideo) foi utilizado neste estudo por ele já ter sido utilizado por Munari et al 2014 no estudo da atividade antitumoral

de um alcalóide de *Solanum lycocarpum* em B16F10. Este antitumoral tem origem nas espécies *P. peltatum* e *P. emodii* utilizado por populações nativas da América e Ásia para o combate de verrugas e câncer de pele (BRANDÃO et al.,2010) . O agente 1-β-D-arabinofuranosylcytosine(araC) foi escolhido por apresentar boa atividade antitumoral contra várias células tumorais humanas (MATSUDA & SASAKI, 2004). Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura com as células. A leitura foi feita com MTT em aparelho de ELISA no comprimento de onda de 450nm. Após o intervalo de incubação de 72 h com o meio adicionado com os extratos o meio de cultura contendo os extratos e os controles foram retirados e os poços lavados cuidadosamente com tampão PBS. Após este procedimento 50 µL de sal de tetrazolium (MTT, 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium bromido: 0,5mg/mL) foi adicionado às células e estas incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 4 h,. Após as 4h de exposição das células ao MTT o mesmo foi retirado e em seguida foi adicionado 100 µL de DMSO a cada poço, As placas foram incubadas por mais 2h, a 37°C em 5% de CO₂. Sob essas condições, o MTT foi reduzido pelo NADH e NADPH em um produto insolúvel azul, o formazam, determinando assim, a viabilidade celular. A leitura foi feita em leitor ELISA a 570 nm e a concentração inibitória de 50% calculada (IC₅₀). Pelo programa PRISMA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
C		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
D		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
E		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
F		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
G		512	256	128	64	32	16	8	4	2	C.Neg	
H												

Figura 3: Mapa de placas para os testes com extratos. Em cada placa foram colocados 2 extratos e as concentrações finais nos poços estão em µg/mL. Todos os testes foram feitos em triplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
C			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
D			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
E			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
F			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
G			2,0	9×10^{-1}	2×10^{-1}	9×10^{-2}	2×10^{-2}	9×10^{-3}	2×10^{-3}	9×10^{-4}	C.Neg	
H												

Figura 4: Mapa das placas para os testes com o controle positivo. Em cada placa foram colocados os 2 controles positivos e as concentrações finais nos poços estão em MM/mL. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.6. Análise estatística

Os tratamentos foram compostos por três extratos (diclorometano, éter de petróleo e etanol) realizados em três épocas de coletas diferentes (1ª coleta: 90 dias; 2ª coleta: 120 dias; 3ª coleta: 150 dias) dispostos em esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados do rendimento dos extratos; atividade antibacteriana e inibição da peroxidação lipídica foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando evidenciado efeitos significativos suas médias foram submetidas ao teste tukey ($P \leq 0,05$).

Os resultados dos coeficientes de inibição em 50% (IC50) das células tumorais foram analisados pelo programa GraphPad Prism ® 5.0, segundo metodologia indicada pelo manual do programa. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way ($p < 0,05$). A comparação das diferentes concentrações de DMSO com o grupo controle foi feita utilizando o pós-teste de Dunnett, sendo os valores de α menores que 0,05 a condição para as diferenças serem consideradas estatisticamente significativas.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos extratos

Os rendimentos dos extratos obtidos estão contidos no gráfico 1.

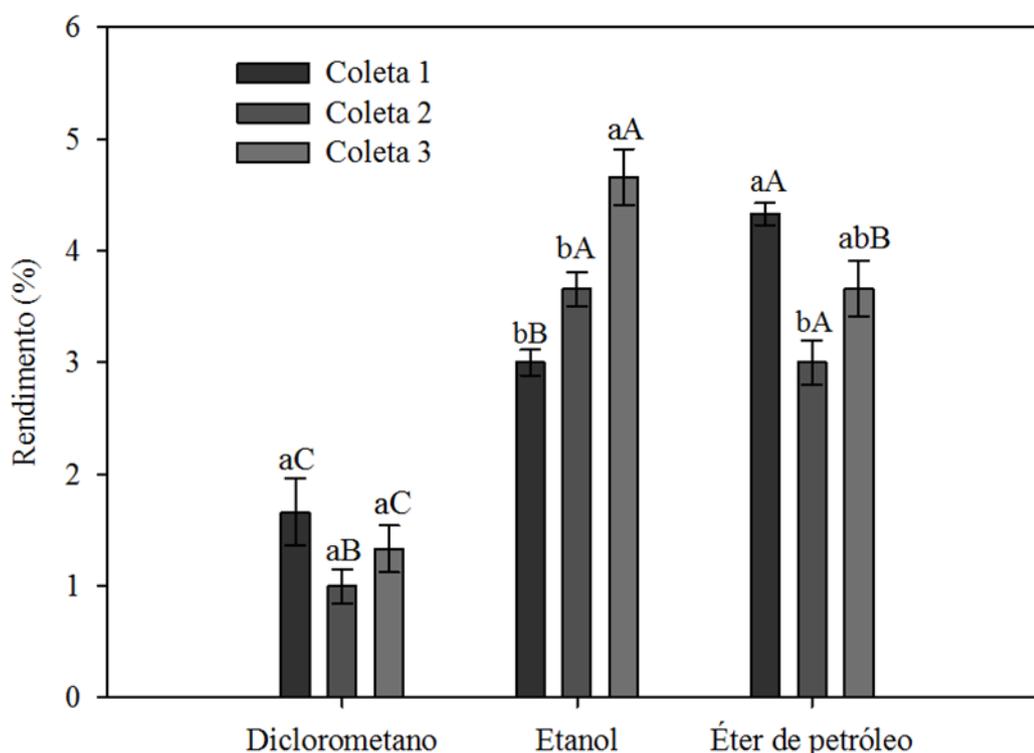


Gráfico 1: Rendimentos dos extratos. Coleta 1: realizada com 90 dias; coleta 2: realizada com 120 dias; coleta 3: realizada com 150 dias. . Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre mesmos extratos e maiúsculas entre mesmas coletas diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Quando analisamos o mesmo tipo de extrato nas diferentes coletas observamos que os extratos de diclorometano não apresentaram diferença estatística entre si Para este extrato as diferentes idades da planta não afetou o seu rendimento Os extratos etanólicos não apresentaram diferença estatística entre os extratos obtidos na 1ª e 2ª coletas, mas o obtido na 3ª coleta mostrou-se superior. Nos extratos de éter de petróleo fica evidenciada a diferença estatística entre a 1ª e a 2ª coleta. Entretanto a 3ª coleta não demonstra diferença estatística em comparação às demais coletas. Rijo et al (2011), trabalhando com a mesma espécie obteve em seu estudo 6 extratos diferentes: hexano; diclorometano; acetato de etila; metanol; metanol-água (7:3). o extrato de hexano, com polaridade similar ao éter de petróleo apresentou rendimento

de 1,4 %, o de diclorometano de 2,8 % e o extrato de metano-água com polaridade parecida com o etanol mostrou rendimento de 7,1%. Contrariamente, no presente trabalho o extrato de éter de petróleo apresentou rendimento maior e o de diclorometano e etanol apresentaram rendimento menor. Este fato pode se explicar pelo modo diferenciado de obtenção dos extratos. Enquanto os extratos do estudo de Rijo et al (2011) foram obtidos por maceração durante uma semana, os extratos deste trabalho foram obtidos por ultrassom. A utilização do ultrassom permite um maior contato do solvente com o material vegetal, pois o atrito das bolhas leva a uma maior desagregação das células, quebrando de modo eficiente as paredes celulares. Este efeito aumenta a transferência de material vegetal para o solvente. (MASON et al 2011). Além disso os solventes foram colocados em sequência sobre a mesma amostra de planta seca de cada coleta conforme descrito em materiais e métodos.

Ao observarmos os diferentes extratos de uma mesma coleta encontramos na 1ª coleta uma diferença estatística entre os três extratos produzidos, sendo o extrato de éter de petróleo o que apresentou o maior rendimento. Na 2ª coleta os extratos de éter de petróleo e etanol não apresentaram diferença estatística, sendo superiores ao extrato de diclorometano. Quando analisamos a 3ª coleta todos os três extratos apresentam diferenças estatísticas. As diferenças apresentadas entre os solventes utilizados podem ser causadas pelo tipo de substância arrastada em cada extrato, pois as substâncias são arrastadas de acordo com a polaridade do solvente (SIMÕES et al 2007). e também pelo método de extração utilizado, pois o ultrassom aumenta a eficiência de extração em um tempo menor, pois o alto impacto das bolhas com o material vegetal extrai otimiza a extração (SONI et al, 2010)

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A técnica de difusão em ágar utilizando poços foi escolhida para este trabalho por apresentar os melhores resultados quando são testados extratos brutos de plantas. Alves et al (2008) comparou três técnicas de difusão em

agar: por disco, por poço (hole plate) e template. Os melhores resultados, entre as técnicas de difusão em agar, foi apresentado pela técnica utilizando poços, pois proporcionou um maior contato entre os microorganismos e os extratos testados.

Os halos de inibição foram medidos e os que apresentaram diâmetro maior ou igual 7 mm foram considerados como resultado positivo, conforme o trabalho de Nascimento et al (2000).

Tabela 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano dos extratos de partes aéreas de *P. ornatus*

Extratos/Coleta	Zona de inibição (mm)		Legenda: Controle positivo; Controle negativo; Zonas de inibição incluindo bordas ≥ 7 mm de diâmetro. \pm Desvio padrão. 1ª: primeira
	<i>S. aureus</i> 4074	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
Éter de Petróleo 1 ^a	11,3 \pm 1.24 ^a	13,3 \pm 1.24 ^b	
Éter de Petróleo 2 ^a	12,0 \pm 1.41 ^a	13,0 \pm 0.81 ^b	
Éter de Petróleo 3 ^a	13,0 \pm 0.8 ^a	14,3 \pm 1.24 ^b	
Diclorometano 1 ^a	15,0 \pm 0.0 ^a	15,7 \pm 1.24 ^b	
Diclorometano 2 ^a	14,7 \pm 0.94 ^a	13,7 \pm 2.62 ^b	
Diclorometano 3 ^a	14,7 \pm 1.24 ^a	13,3 \pm 0.97 ^b	
Etanol 1 ^a	0,0	0,0	
Etanol 2 ^a	0,0	0,0	
Etanol 3 ^a	0,0	0,0	
Ciclopiroxolamina*	23,0 \pm 0.47	25,0 \pm 0.10	
DMSO**	0,0	0,0	

coleta (90 dias); 2^a: segunda coleta (120 dias); 3^a: terceira coleta (150 dias).

A tabela 1 mostra que os extratos etanólicos provenientes das três coletas não apresentaram halos de inibição, sendo considerados como resultado negativo para atividade antibacteriana frente as bactérias *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* 4075. Em contra partida observa-se resultados positivos para os extratos éter de petróleo e diclorometano nas três coletas. Entretanto, quando comparamos os halos de inibição dos extratos de éter de petróleo nas três coletas não foi observada diferença estatística entre eles. O

mesmo ocorreu quando comparamos os halos de inibição dos extratos de diclorometano. Portanto a época de coleta não influenciou nos resultados qualitativos da atividade antimicrobiana destes extratos.

A produção de metabólitos secundários sofre influencia direta de vários fatores tais como: sazonalidade, idade da planta; teor de nutrientes do solo; ciclo circadiano entre outros (SIMÕES et al 2007). Tecidos mais jovens, geralmente apresentam uma alta taxa metabólica, principalmente as plantas produtoras de óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, alcalóides flavonóides e estibenos. E em períodos de crescimento rápido ocorre uma queda na produção dos componentes derivados de compostos fenólicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Entretanto em algumas espécies a idade da planta não influencia na produção de metabólitos secundários, como no caso da codeína estudada na *Papaver somniferum* (papoula) que praticamente não se altera com a idade da planta (WILLIAN & ELLIS, 1989)

Uma outra análise foi realizada comparando o comportamento dos extratos de éter de petróleo; diclorometano e etanol entre si. Foram utilizadas as médias dos extratos de éter de petróleo; diclorometano e etanol, pois os mesmos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Percebe-se nos graficos 2 e 3 que não ocorreram diferenças estatísticas quando comparamos os halos de inibição dos extratos de éter de petróleo e diclorometano frente a bactérias *S. aureus* 4075 e *S. aureus* ATCC 29213. Portanto os dois extratos apresentam potencial bactericida parecido contra estas bactérias. A *S. aureus* 4075 provém de vacas acometidas com mastite bovina. Esta é uma doença causada por cepas de *S. aureus* que apresenta elevada resistência aos tratamentos convencionais. (HEBERT et al 2000) Isso ocorre em decorrência da formação de um biofilme que dificulta a fagocitose pelas células de defesa e também não permite que alguns antibióticos penetrem e exerçam sua ação (MONZON et al ,2002).

A doença possui uma tendência a se tornar crônica levando grande prejuízo financeiro aos produtores de leite. Os antibióticos convencionais deixam resíduos no leite que podem causar problemas à saúde humana e a busca por novas alternativas de tratamento se faz necessária. (PANDIAN et al, 2006)

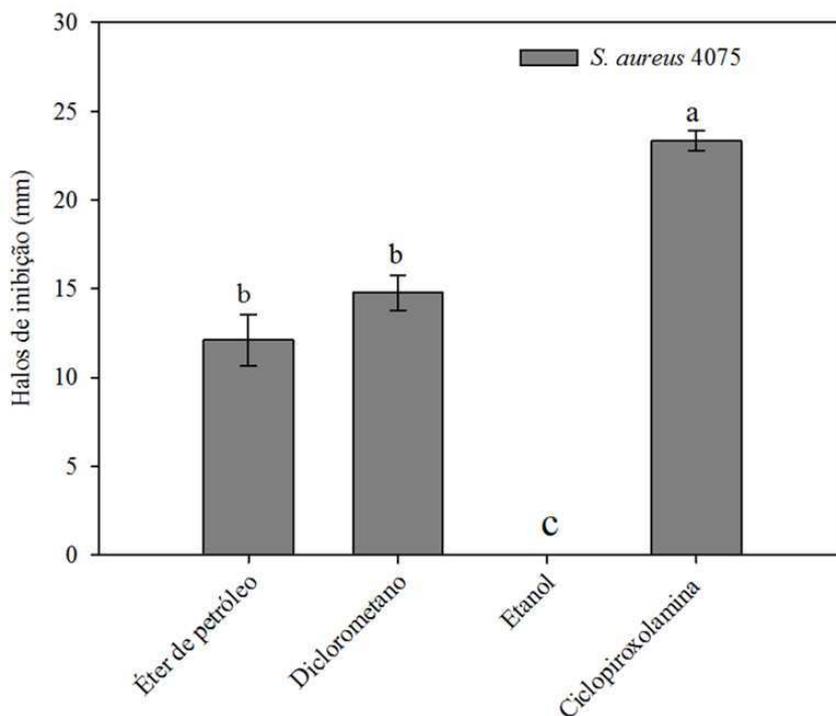


Gráfico 2: Halos de inibição dos extratos de *P.ornatus* frente a bactéria *S.aureus* 4075. Ciclopiroxolamina: controle positivo. Éter de petróleo: média dos halos de inibição dos extratos de éter de petróleo; Diclorometano: médias dos halos de inibição dos extratos de diclorometano; Etano: média dos halos de inibição do extratos etanólicos. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

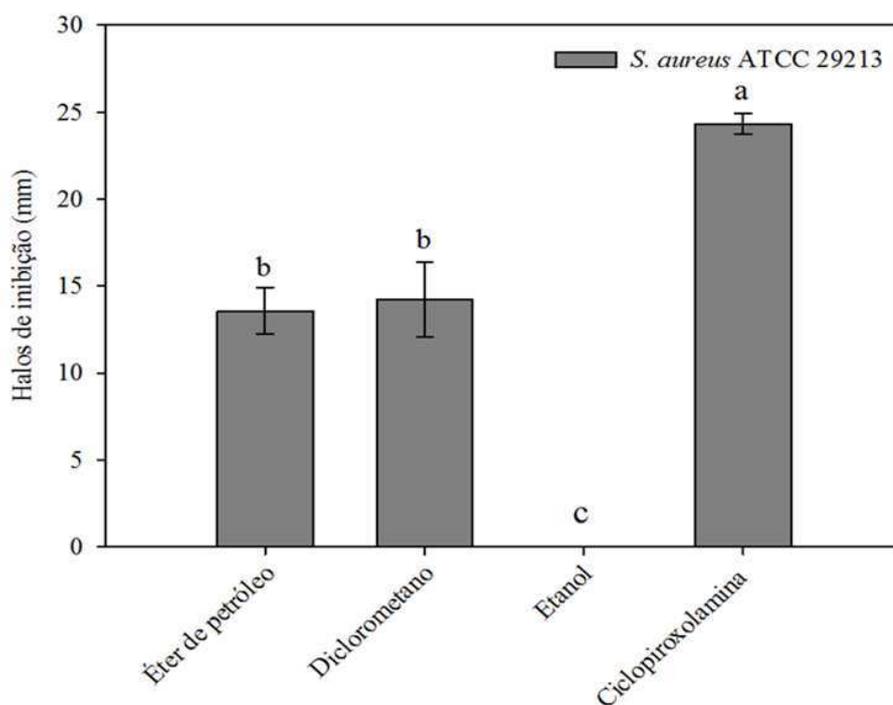


Gráfico 3: Halos de inibição dos extratos de *P.ornatus* frente a bactéria *S.aureus* ATCC 29213. Ciclopiroxolamina: controle positivo. Éter de petróleo: média dos halos de inibição dos extratos de éter de petróleo; Diclorometano: médias dos halos de inibição dos extratos de diclorometano; Etano: média dos halos de inibição do extratos etanólicos Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Halos de inibição *S.aureus* ATCC 29213

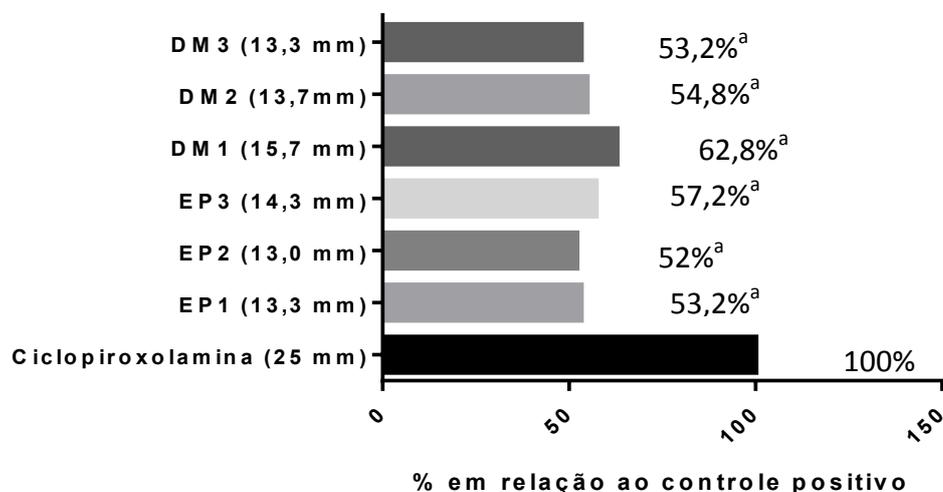


Figura 5: Porcentagem dos halos de inibição em relação ao controle positivo ciclopiroxolamina, *S.aureus* ATCC 29213. DM1: extrato diclorometano 1^a coleta; DM2: extrato diclorometano 2^a coleta; DM3: extrato diclorometano 3^a coleta; EP1: extrato éter de petróleo 1^a coleta; EP2: extrato éter de petróleo 2^a coleta; EP3: extrato éter de petróleo 3^a coleta.

Halos de inibição *S.aureus* 4075

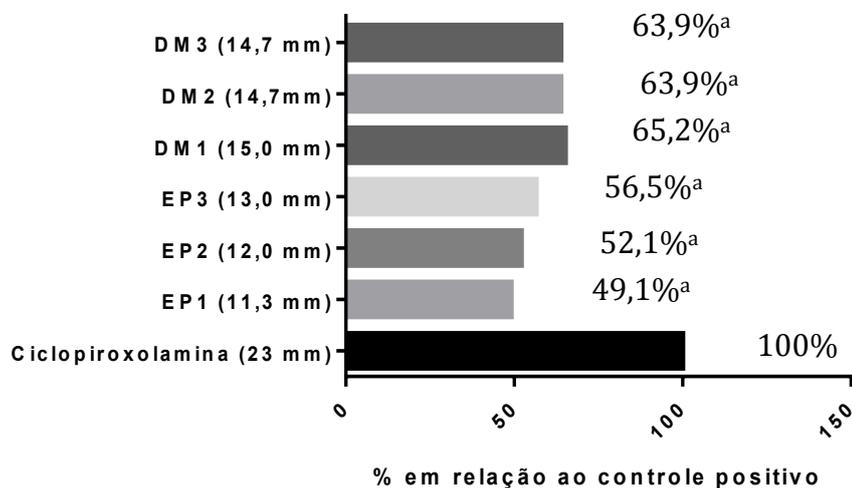


Figura 6: Porcentagem dos halos de inibição em relação ao controle positivo ciclopiroxolamina, *S.aureus* 4075. DM1: extrato diclorometano 1^a coleta; DM2: extrato diclorometano 2^a coleta; DM3: extrato diclorometano 3^a coleta; EP1: extrato éter de petróleo 1^a coleta; EP2: extrato éter de petróleo 2^a coleta; EP3: extrato éter de petróleo 3^a coleta.

Uma terceira análise dos dados foi realizada comparando a porcentagem dos halos de inibição em relação ao halo de inibição da ciclopiroxolamina (controle positivo). Os melhores resultados podem ser atribuídos aos extratos de diclorometano, pois apresentaram as maiores porcentagens de inibição frente as duas bactérias testadas, quando comparados aos extratos de éter de petróleo. Em relação aos extratos de éter de petróleo percebe-se que todos apresentaram halos de inibição próximo de 50%. Rijo et al (2011), trabalhou com seis diferentes extratos de *P.ornatus* preparados com hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e metanol/ água (7:3) por maceração (25 g de planta pulverizada para 250 mL de solvente) durante uma semana. Estes extratos foram testados contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus hirae* CIP 5855, *E.faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607) e também contra bactérias gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Os resultados mostraram que os extratos de acetona e metanol/água apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, e entre elas *S. aureus* ATCC 25923, em comparação com os extratos de n-hexano e diclorometano. Comparando os extratos hexânico (polaridade semelhante à do éter de petróleo) e de diclorometano obtidos no estudo de Rijo et al (2011) com os extratos de éter de petróleo e diclorometano do presente estudo observa-se que a obtenção dos mesmos ocorreu de maneira diferenciada, uma vez que no presente estudo utilizou-se o ultrassom como método de extração. Enquanto o trabalho mencionado anteriormente utilizou a maceração.

BRASILEIRO et al (2006) analisaram o extrato etanólico de *P. ornatus* obtido por maceração a temperatura ambiente contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25985) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Esse extrato não apresentou atividade antibacteriana, concordando com os achados deste estudo. Entretanto, SILVA, 2012 analisou o extrato etanólico de *P. ornatus* obtido por maceração contra as bactérias *S. aureus* 4125 e *S aureus* 3993 e observou halos médios de inibição de 12,5 mm e 9,16 mm respectivamente. Diferentes métodos de avaliação da atividade antimicrobiana, além de fatores como métodos de preparo de extratos e época e local das coletas podem influenciar os resultados de testes desta natureza (HAYDA et al, 2007).

5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes para determinar a concentração inibitória mínima foram realizados somente com os extratos que apresentaram potencial ação antibacteriana pelo teste de difusão em ágar. Este teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul-escuro. Essa conversão indica a atividade mitocondrial que somente as bactérias viáveis possuem (LECHNER et al, 2004).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos ativos de *P.ornatus* frente às bactérias *S.aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* 4075.

Extratos/coleta	<i>S. aureus</i>	
	ATCC 29213	4075
Éter petróleo 1 ^a (EP1)	0,7 mg/mL	0,6 mg/mL
Éter petróleo 2 ^a (EP2)	07 mg/mL	0,6 mg/mL
Éter petróleo 3 ^a (EP3)	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
Diclorometano 1 ^a (DM1)	0,6 mg/mL	0,6 mg/mL
Diclorometano 2 ^a (DM2)	0,7 mg/mL	0,7 mg/mL
Diclorometano 3 ^a (DM3)	0,6 mg/mL	0,8 mg/mL
Ciclopiroxolamine	0.05 mg/mL	0.05 mg/mL

Legenda: Ciclopiroxolamina: controle positivo. 1^a:coleta (90 dias); 2^a coleta (120 dias); 3^a coleta (150 dias).EP1: extrato de éter de petróleo 1; EP2: extrato de éter de petróleo 2; EP3: extrato de éter de petróleo 3; DM1: extrato diclorometano 1; DM2: extrato diclorometano 2; DM3 extrato de diclorometano 3.

A literatura apresenta muitas divergências quanto à ação antibacteriana de extratos de plantas medicinais comparados à antibióticos padrões. Alguns estudos consideram como positivo apenas resultados de CIM parecidos com os antibióticos. Em contra partida outros autores consideram resultados maiores que os encontrados para os antibióticos (DUARTE, 2006).

No presente trabalho foi utilizada uma classificação de CIM para extratos de plantas proposta por Aligianis et al, (2001.) Esta classificação considera como forte inibição extratos com CIM até 0,5 mg/mL; inibição moderada com CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL e fraca inibição de CIM acima de 1,6 mg/mL. Sendo assim podemos considerar os extratos EP1 e EP2 , que apresentaram CIM de 0,7 mg/mL, com ação inibitória moderada frente à bactéria *S. aureus* ATCC 29213 e o EP3, com CIM de 0,5 mg/mL, com potencial inibitório forte frente a mesma bactéria. Quando observamos a CIM para a bactéria *S. aureus* 4075 dos mesmos extratos encontramos EP1 e EP2 com valores de 0,6 mg/mL, sendo classificados com potencial de inibição moderado. Já o EP3, com 0,5 mg/mL, apresentando potencial de inibição forte. Os extratos de diclorometano apresentaram-se todos com potencial médio de inibição frente a duas bactérias. Quando testados contra a bactéria *S. aureus* ATCC 29213 o DM1 e o DM3 apresentaram a mesma CIM, (0,6 mg/mL) e o DM2 apresentou 0,7 mg/mL. Ao observar o teste com a bactéria *S. aureus* 4075 o DM1 mostrou CIM de 0,6 mg/mL, o DM2 de 0,7 mg/mL e o DM3 de 0,8 mg/mL. O destaque nesta avaliação foi o extrato de éter de petróleo da 3ª coleta (EP3) que mostrou possuir forte potencial de inibição contra as bactérias testadas. Rijo et al (2011) realizou um screening com 6 extratos de *P. ornatus* obtidos por maceração durante uma semana e entre os extratos obtidos estão o hexânico, que possui polaridade similar ao do éter de petróleo, e o de diclorometano. Foram utilizadas concentrações de 500 µg/mL à 0,48 µg/mL. Os mesmos apresentaram CIM maior ou igual 125,00 µg/mL não sendo considerados como bons resultados pelos critérios do artigo. Mais se os mesmos forem considerados segundo os critérios do presente estudo os dois extratos apresentam forte potencial de inibição, concordando com os achados deste trabalho.

A atividade antimicrobiana de óleos e extratos derivados de plantas devem-se aos terpenos, compostos fenólicos, entre eles flavonóides. Estas substâncias são classificadas como metabólitos secundários e as diferenças entre os resultados de atividade antimicrobiana de plantas medicinais descrita na literatura pode estar relacionada à quantidade destas substâncias nos extratos estudados. (FERNANDES et al 2011) Os diterpenos que podem apresentar ação antimicrobiana isolados do *P.ornatus* são um derivado neoclerodane plectronatin A e dois derivados labdanos plectronatins B e C. O

plectronatin B mostrou-se inativo contra bactérias, mais os outros dois apresentaram fraca atividade contra *Candida albicans*. Mas um novo diterpeno halimane foi encontrado o 11 - acetoxyhalima - 5 ,13 - dien - 15 – óico que apresentou atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus* e *Enterococcus* com MIC 15,62-62,50 µg / mL respectivamente (RIJO et al 2011).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos de plantas medicinais contra bactérias causadoras de mastite bovina é tema de muitos trabalhos. Dal Pozzo et al (2011) estudaram os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gingibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), e de suas frações majoritárias, carvacrol e timol, frente a 32 isolados de *Staphylococcus spp*, oriundos de rebanhos leiteiros bovinos. Todos os óleos estudados e suas frações apresentaram atividade antibacteriana. Em outro estudo foi realizado um screening com extratos das plantas: *Artemisia absinthium* L.; *Cymbopogon nardus* L. Rendle ; *Symphytum officinale* L.; *Baccharis dracunculifolia* DC.; *Solanum asperolanatum* Ruiz & Pav.; *Salvia officinalis* L; *Bauhinia forficata* Link; *Calendula officinalis* L e *Chenopodium ambrosioides* L.. Foram obtidos extratos com os solventes hexano, diclometano e etanol de todas as plantas e estes foram testados contra 15 cepas de *Staphylococcus aureus* de animais com mastite bovina. As plantas que se destacaram como possíveis agentes antimicrobianos contra *S.aureus* causador da mastite bovina foram *Senna macranthera*, *Artemisia absinthium*, *Cymbopogon nardus* e *Baccharis dracunculifol* (DIAZ et al, 2010)

5.3 Determinação da atividade antioxidante

As tabelas 3 e gráfico 4 apresentam o resultado do teste antioxidante realizado pelo método de peroxidação lipídica.

Tabela 3: Porcentagem de inibição de peroxidação lipídica dos extratos de partes aéreas de *P.ornatus*

Extratos	Coletas	% Inibição
Eter Petróleo	1 ^a	59,4 ± 6,42 ^{bc}
	2 ^a	79,5 ± 2,07 ^{bc}
	3 ^a	70,9 ± 9,15 ^{bc}
Diclorometano	1 ^a	79,9 ± 4,55 ^b
	2 ^a	70,8 ± 5,70 ^b
	3 ^a	81,96 ± 4,93 ^b
Etanol	1 ^a	50,9 ± 6,40 ^c
	2 ^a	61,2 ± 6,75 ^c
	3 ^a	57,3 ± 13,44 ^c
<i>G.biloba</i> **		39,5 ± 5,52 ^c
BHT*		96,1 ± 5,51 ^a

Legenda: BHT (di-terc-butilmetilfenol) é um controle positivo sintético; ***Ginkgo biloba* é um controle positivo natural. 1^a coleta: 90 dias; 2^a coleta: 120 dias; 3^a coleta: 150 dias.

Analisando a tabela 3 observamos que os extratos provenientes do mesmo solvente nas três coletas não apresentam diferenças estatísticas entre si, portanto a idade da planta não influenciou na capacidade antioxidante do extrato. A maior inibição da peroxidação lipídica ocorreu com o extrato da 3^a coleta de diclorometano, que alcançou 81,96%, muito próximo do controle positivo BHT sintético, puro e extremamente eficiente. O solvente com menor índice de inibição de peroxidação foi o extrato etanólico, mas ainda assim possui boa atividade antioxidante, pois os dados mostram valores de 50,9%, 61,2% e 57,3%, respectivamente para a 1^a, 2^a e 3^a coletas. Os resultados mostram que o melhor desempenho, nas 3 coletas, na inibição da peroxidação lipídica também ocorreu com os extratos de diclorometano em suas três

épocas de coleta. Os valores de inibição de peroxidação, na 1ª coleta = 79,9%; na 2ª coleta= 70,8% e na 3ª coleta = 81,96%, foram mais próximos do antioxidante sintético BHT utilizado como um controle positivo. Ocorre um aumento de inibição da peroxidação na 1ª e 3ª coletas e uma queda na 2ª coleta, sugerindo mudança na composição do extrato da 2ª coleta. Já os valores encontrados para o extrato de éter de petróleo para a 1ª coleta foi 59,4%; para a 2ª coleta ,79,5% e para a 3ª coleta 70,9% ,sendo a 1ª coleta superior ao controle vegetal *G. Biloba* que foi utilizado também como um padrão positivo já que classicamente esta planta é conhecida por seu poder antioxidante, sendo um parâmetro mais próximo dos extratos utilizados

Neste caso o aumento da inibição de peroxidação ocorreu na 2ª e 3ª coletas, sugerindo um aumento das substâncias responsáveis pela ação antioxidante da 1ª para a 3ª coletas, com um pico da produção das mesmas na 2ª coleta. Quando observamos os valores encontrados para o extrato etanólico o evento encontrado no extrato de éter de petróleo se repete ou seja, aumento gradativo das substâncias responsáveis pela inibição da peroxidação da 1ª à 3ª coletas com pico de produção na 2ª coleta.

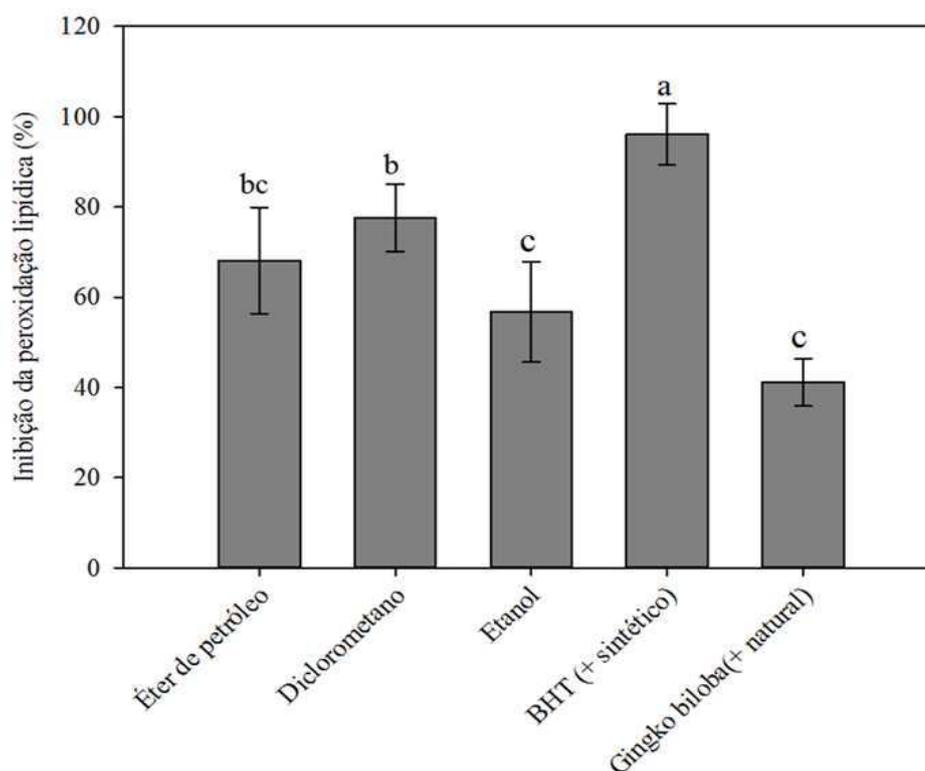


Gráfico 4: Inibição da peroxidação lipídica BHT (di-terc-butilmetilfenol) é um controle positivo sintético; *Ginkgo biloba* é um controle positivo natural. Éter de petróleo: média das porcentagens de inibição dos extratos de éter de petróleo; Diclorometano: média

das porcentagens de inibição dos extratos de diclorometano; Etanol: média das porcentagens de inibição dos extratos etanólicos. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Uma segunda análise foi feita comparando os diferentes extratos entre si e com os controles positivos sintético e natural. Os extratos de éter de petróleo e diclorometano não apresentam diferenças estatísticas entre si. O mesmo ocorreu com os extratos de éter de petróleo e etanol. Entretanto os extratos de diclorometano e etanol apresentam diferenças estatísticas entre si. Os extratos de etanol e éter de petróleo não demonstraram diferença estatística quando comparados ao controle positivo natural *G.biloba*. Mas os extratos de diclorometano foram os que mais se destacaram pois alcançaram potenciais de inibição de peroxidação lipídica próximo do controle positivo sintético. Portanto todos os extratos avaliados apresentaram –se com potenciais para serem substâncias antioxidantes.

O teste de TBA (Teste do ácido 2- Tiobarbitúrico) é muito utilizado para determinação da atividade antioxidante, acontece com a reação do ácido tiobarbitúrico com produtos de degradação de hidroperóxidos, sendo o principal deles malonaldeído (MA) formando um complexo avermelhado com leitura espectrofotométrica em 532 a 535 nm. Contudo este método apresenta limitações e alguns pontos devem ser observados: a especificidade do método é considerada baixa, uma vez que se o MA encontrar-se em concentrações muito pequenas o TBA pode reagir com outros aldeídos. Além disso o MA não é o único aldeído a reagir com TBA outros, como 4-hidroxisalcenais reagem também e formam cromógeno. Por outro lado o MA não reage com TBA se estiver complexado à proteínas por exemplo. Mas este método apresenta uma simulação das membranas celulares e portanto os resultados são mais fiéis à realidade, quando comparados ao método DPPH (SILVA et al., 1999).

Diferentes extratos de *P.amboicus* (hexânico, acetato de etila, acetona, metanol) foram analisados quanto à sua ação antioxidante pelo método de DPPH e o destaque foi o extrato de acetato de etila rico em polifenóis (BHATT & NEGI, 2012). Outro trabalho com diferentes extratos de *P.amboicus* com extrato etanólico e aquoso com extrações feitas sucessivamente com éter de petróleo, clorofórmio anterior ao etanol e a água, demonstraram um aumento gradativo da ação antioxidante à medida que ocorreu o aumento da

concentração dos extratos, chegando à próximo de 70% para os dois extratos quando se atingiu a concentração de 250 µg/mL (PATEL et al., 2010). Twari et al, 2010 fez um screening para atividade antioxidante com extratos etanólicos de plantas medicinais usadas no combate à malária na Índia e entre estas o *P. barbatus* apresentou atividade antioxidante variando de 79,6 a 71,7 % com concentrações do extrato de 5 mg/mL no teste de DPPH.

O teste de DPPH apesar de ser muito utilizado pela sua facilidade de execução e rapidez necessita que alguns pontos sejam considerados. Em determinações que possuam substâncias com espectros de absorção próximos do espectro do DPPH pode acontecer interferência na determinação da ação antioxidante. Outro problema pode ocorrer com substâncias que apresentam moléculas pequenas que possuem o sítio do radical com acesso mais fácil. Isso pode acarretar aumento aparente da atividade antioxidante em relação à moléculas maiores (ALVES et al., 2010).

O extrato aquoso de *P. barbatus* também apresentou um efeito de proteção da membrana mitocondrial contra peroxidação lipídica provocada pelos ions Fe^{+2} chegando a apresentar uma quelação dos ions Fe^{+2} de 50 µM com uma concentração de 75 µg/mL. Este efeito foi atribuído aos compostos fenólicos presentes nesta espécie, como os ésteres de ácido caféico (MAIOLI et al., 2010).

Os extratos utilizados neste estudo apresentaram boa inibição da peroxidação lipídica e portanto podem ser considerados candidatos à futuros antioxidantes que poderam ser empregados

5.4 Determinação da atividade antitumoral

Antes de iniciar a determinação da atividade antitumoral foi realizado o teste de tolerância das células B16F10 ao DMSO. Este teste foi realizado para determinar a maior quantidade de DMSO que poderia ser utilizada nas concentrações dos extratos sem causar morte celular.

Atividade citotóxica do DMSO

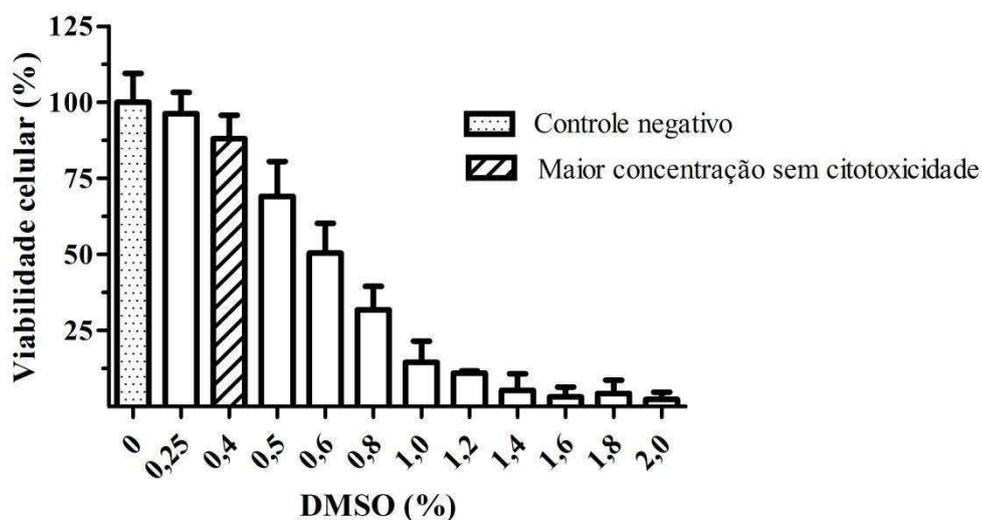


Gráfico 5: Teste de citotoxicidade do DMSO. Controle negativo: células sem DMSO. Maior concentração sem citotoxicidade: maior concentração de DMSO com menor mortalidade celular. As amostras apresentaram valores estatisticamente significativos na análise de variância ($P < 0,0001$; $F = 30,98$; $R^2 = 0,9342$). Na concentração de 0,4% de DMSO ($88,02 \pm 7,66$), não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($100 \pm 9,42$) ($q = 1,206$; $p < 0,05$)

Observando o gráfico 5 percebemos que a maior concentração de DMSO com maior viabilidade celular acontece com a concentração de 0,4% .

VP16 / 72 horas

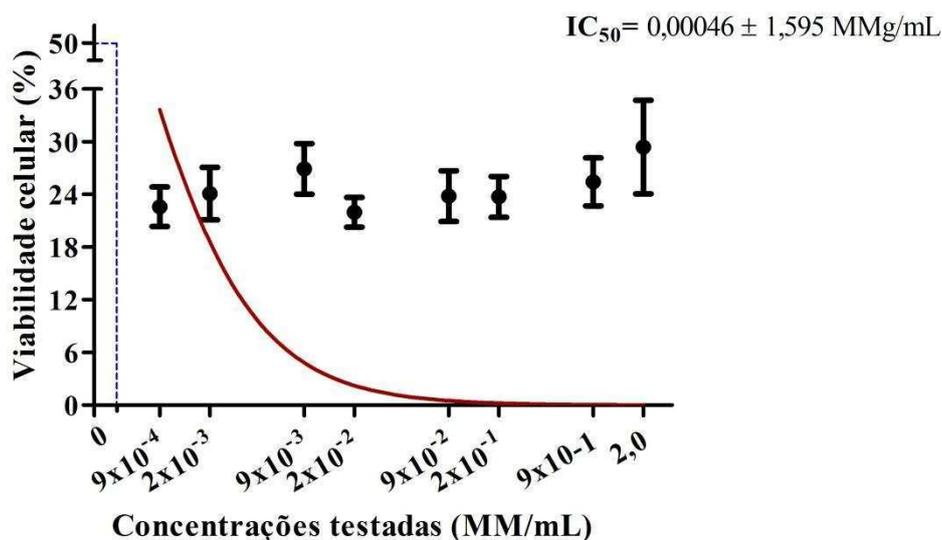


Gráfico 6: IC_{50} (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular) para o controle positivo VP16 incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism® 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way ($p < 0,05$)

ARC / 72 horas

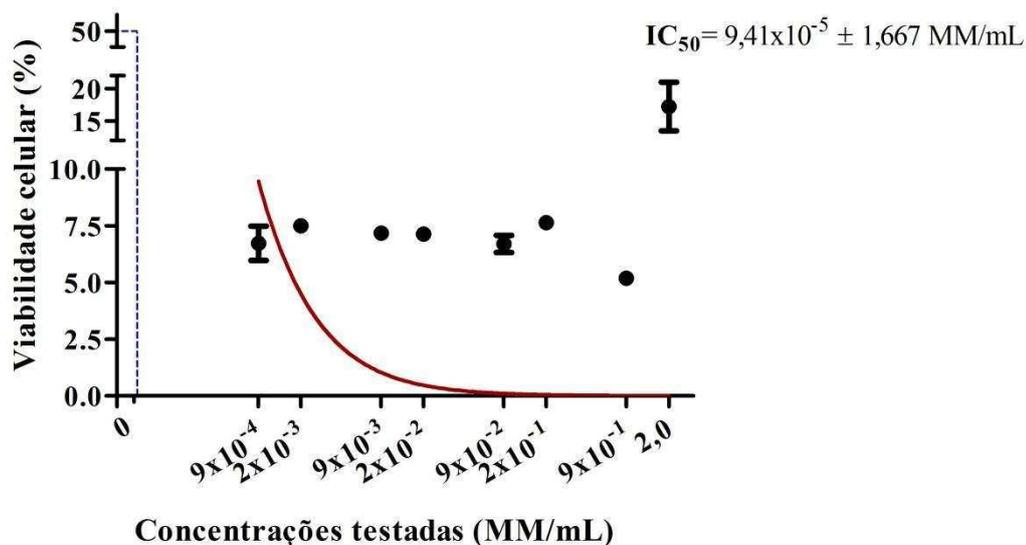


Gráfico 7: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular) para o controle positivo ARC Incubado com as células com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism® 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05)

DM1 / 72 horas

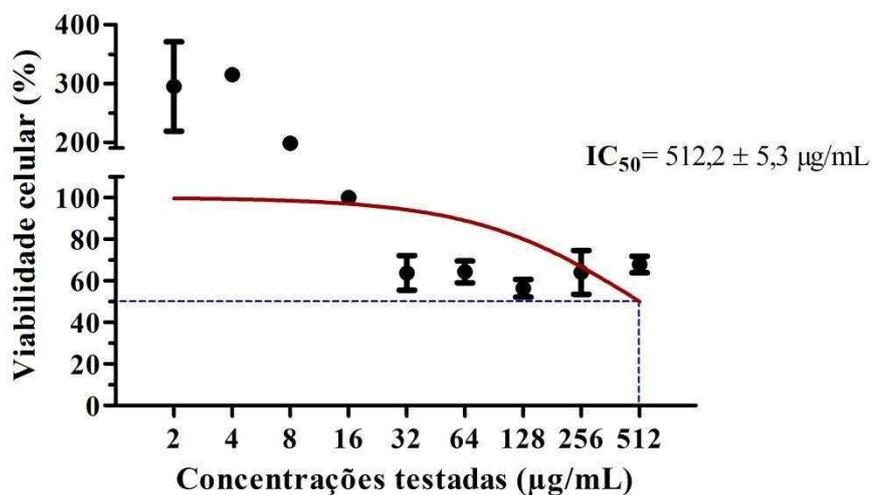


Gráfico 8: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular). DM1: extrato de diclorometano da 1ª coleta (90 dias) das partes aéreas de *P. ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism® 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05)

DM2 / 72 horas

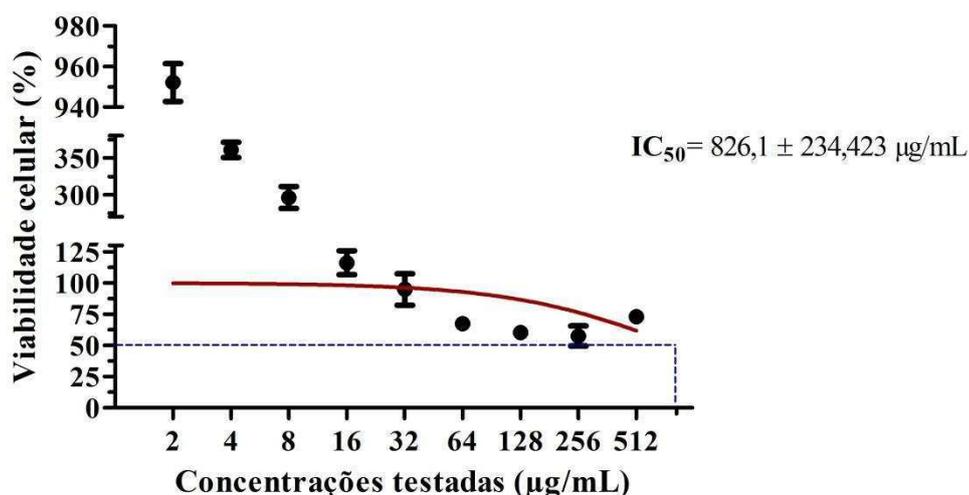


Gráfico 9: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular);DM2: extrato de diclorometano da 2ª coleta (120 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas.Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05)

DM3 / 72 horas

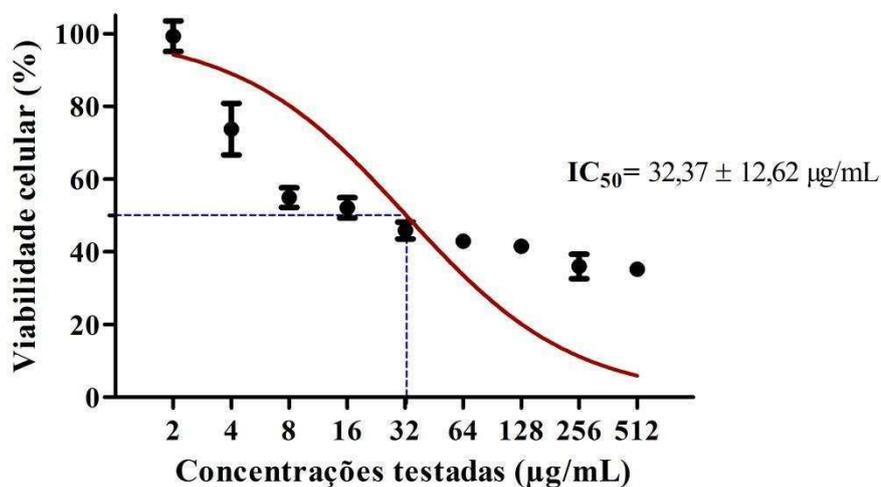


Gráfico 10: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular);DM3: extrato de diclorometano da 3ª coleta (150 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas.Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05).

EP1 / 72 horas

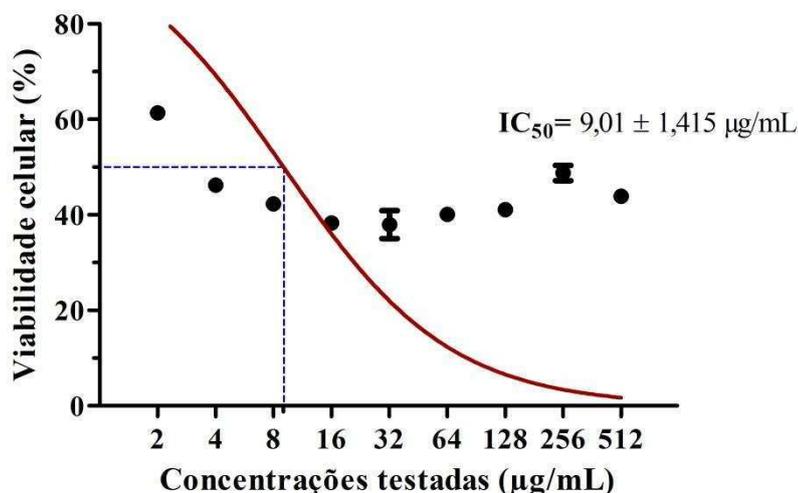


Gráfico 11: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular).EP1: extrato de éter de petróleo da 1ª coleta (90 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas.Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05).

EP2 / 72 horas

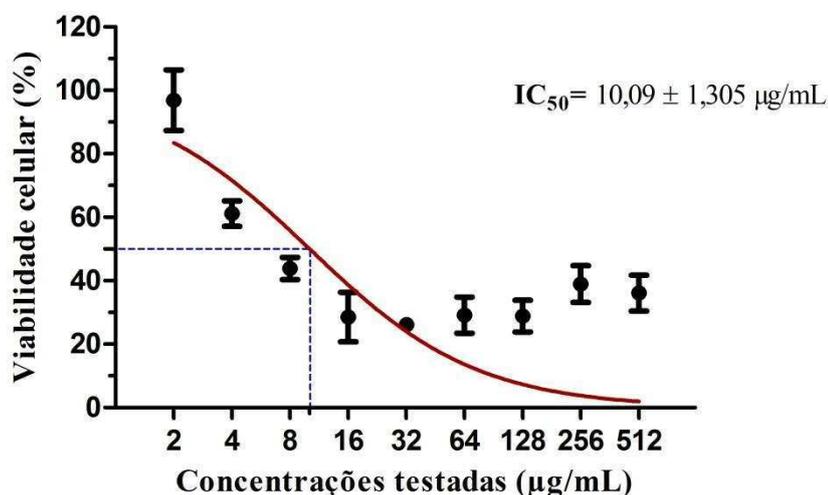


Gráfico 12: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular);EP2: extrato de éter de petróleo da 2ª coleta (120 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas.Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05).

EP3 / 72 horas

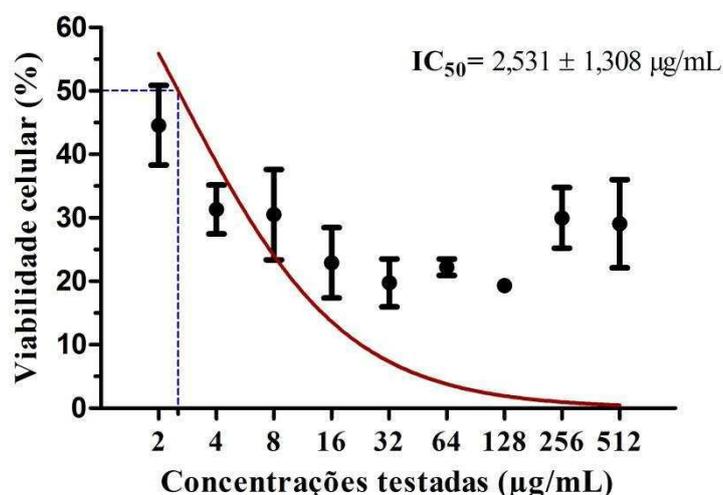


Gráfico 13: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular);EP3: extrato de éter de petróleo da 3ª coleta (150 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05).

ET1 / 72 horas

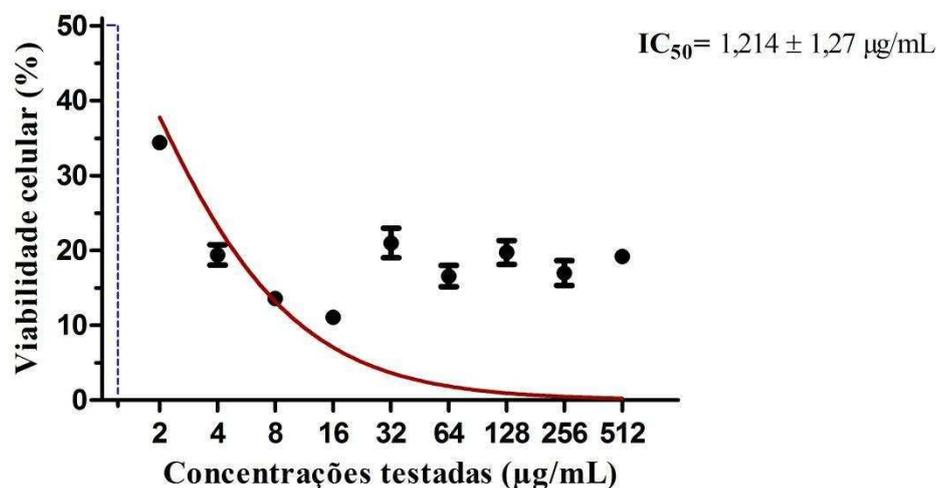


Gráfico 14: IC₅₀ (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular);ET1: extrato etanólico da 1ª coleta (90 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas.Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0.As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way (p<0,05).

ET2 / 72 horas

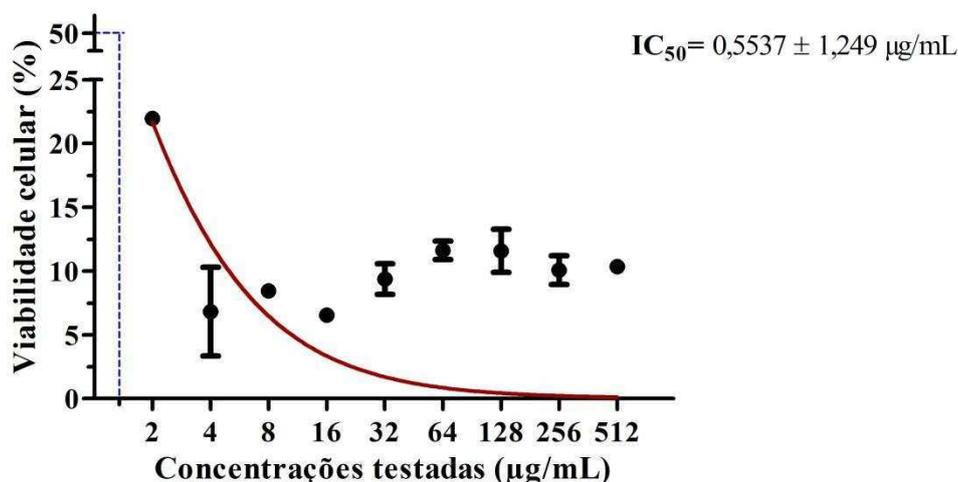


Gráfico 15: IC_{50} (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular); ET2: extrato etanólico da 2ª coleta (120 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way ($p < 0,05$).

ET3 / 72 horas

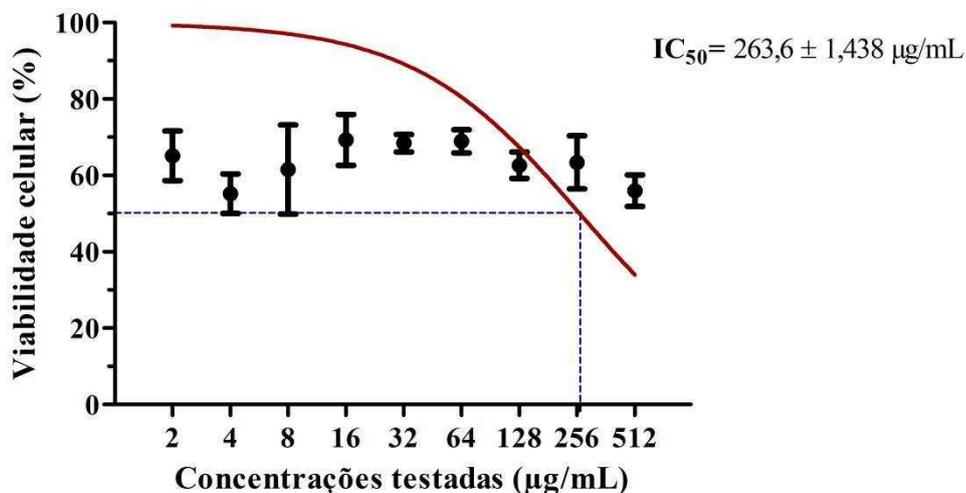


Gráfico 16: IC_{50} (coeficiente de inibição de 50% do crescimento celular); ET3: extrato etanólico da 3ª coleta (150 dias) das partes aéreas de *P.ornatus*. Foi incubado com as células por 72 horas nas concentrações indicadas. Determinado pelo programa GraphPad Prism ® 5.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por ANOVA one-way ($p < 0,05$).

Os parâmetros que podem ser considerados para uma droga antitumoral efetiva não apresentam um consenso. Itharat et al (2004) considera uma droga com potencial antimorral aquela que apresentar $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$. Já o Instituto Nacional do Cancer dos Estados Unidos (NIC) estabelece como parâmetro em suas seleções de drogas candidatas à antineoplásicos $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$. Os resultados deste estudo, segundo os critérios de Itharat et al (2004), mostram que todos os extratos de éter de petróleo podem ser considerados com potencial atitumoral, uma vez que os valores de IC_{50} do mesmos são: EP1(IC_{50})= 9,0 $\mu\text{g/mL}$, EP2 (IC_{50}) = 10,0 $\mu\text{g/mL}$, EP3 (IC_{50}) = 2,53 $\mu\text{g/mL}$. Mas se forem considerados os valores prgonizados pelo NIC apenas o EP3 apresenta valores que o podem classificar como candidato a antineoplásico. Quando observamos os resultados dos extratos de diclorometano percebemos que considerando qualquer dos dois critérios anteriores todos os extratos apresentam-se inativos como drogas antitumorais. Dos resultados apresentados nos extratos etanólicos , apenas os ET1(IC_{50}) = 1,21 $\mu\text{g/mL}$ e ET2 (IC_{50}) = 0,5 $\mu\text{g/mL}$ podem ser considerados com potencial anticancer, pelos dois parâmetros apresentados. Mas o ET3 (IC_{50}) = 263,6 $\mu\text{g/mL}$ mostra-se sem atividade antitumoral. Drogas com IC_{50} muito elevados podem ser considerados sem potencial contra células cancerígenas, pois um medicamento que para ser efetivo necessite de doses altas *in vitro* apresenta baixa especificidade contra estas células. Além de o custo de produção ser muito alto, considerando que para cada mg testado em *in vitro*, no máximo 300 vezes pode ser utilizado *in vivo* (LOTZE et al, 2001).

Estudos sobre a atividade antitumoral de extratos brutos derivados de espécies do gênero *Plectranthus* são muito escassos. Gurgel et al (2009), realizou um trabalho com a espécie *P. amboinicus* avaliando a atividade antitumoral e antiinflamatória do extrato hidro alcoólico (etanol 70% v/v), preparado por maceração durante 72 horas. Os testes foram realizados *in vivo* e *in vitro* com sarcoma-180 e carcinoma Ehrlich ascite e o extrato mostrou-se efetivo na redução do crescimento dos tumores. Burmistrova et al 2013, realizou um estudo com 30 diterpenos abietanos e halimane previamente isolados de vários extratos do gênero *Plectranthus* frente a várias linhas de células tumorais humanas: HL-60 (Leucemia), U 937(Linfoma) , Molt-3 (Leucemia), SK-MEL-1(Melanoma humano), and MCF-7 (Adenocarcinoma). Os diterpenos tipo abietanos apresentaram citotoxicidade contra as células

leucêmicas, sendo que na linhagem HL-60 alguns compostos induziram a apoptose.

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre atividade antitumoral com extratos da espécie *P.ornatus*. Portanto neste estudo o experimento foi delineado na forma de screening com leitura final em 72 horas. No tratamento contra câncer são utilizados agentes antineoplásicos alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, agentes diversos e hormônios e antagonistas, que podem ser naturais, sintéticos e semi-sintéticos (GILMAN *et al.*, 2005). No caso do tratamento do melanoma metastático utilizam-se como medicamentos de escolha agentes alquilantes (dacarbazina), análogos da platina, nitrosouréias (fotemustina) e toxinas tubulares (vinblastina) (LOTZE *et al.*, 2001).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a capacidade dos extratos brutos de *P.ornatus* em apresentarem atividade antibacteriana, antioxidante e antitumoral. Sendo assim esta espécie pode ser considerada com potencial para ser um planta candidata para *screening* de estudos para novas drogas antibacteriana, antioxidante e antitumoral.

Perspectivas Futuras

- ✓ Estudo fitoquímico dos extratos ativos para elucidação das estruturas responsáveis pelas efeitos antioxidante e antitumoral.
- ✓ Estudo *in vivo* dos extratos e compostos ativos

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, K; Sivropoulou, A; Kokkini, S; Ianaras, t; Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare subsp. hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food chem.* 46: 1739-1745.

Albuquerque, R L; Kentopff, M. R; Machado, M. I. L; Silva, M. G. V; Matos, F. J. A. 2007 Abietane diterpenoids isolated from *Plectranthus barbatus andrews*. *Quim. Nova.* 30:1882-1886.

Aligianis, N; Kalpoutzais, E; Mitaku, S; Chinou, J.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170.

Almassy júnior,A; Lopes, R.C; Armond, C; Da silva, F; Casali, W.D. 2005. Folhas de chá – plantas medicinais na terapêutica humana. Ed. UFV: Viçosa.

Alves, C.Q; David, J.M; David, J.P; Bahia, M.V; Aguiar, R.M. 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova.* 33: 2202-2210.

Alves, E.G; Vinholis, A. H.C; Casemiro,L.A;.Furtado, J.N.A; Silva, M.L.A; Cunha, W. R; Martins, C.H.G. 2008. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova.*31: 1224-1229.

Bekalo, T.H, Woodmatas, s.d., woldemariam, Z.A. 2009 An ethnobotanical study of medicinal plants used by local people in the lowlands of konta special woreda, southern nations, nationalities and peoples regional state, ethiopia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 5:26.

- Bhatt,P; Negi,P.S. 2012. Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of indian borage (*plectranthus amboinicus*). *Food and nutrition sciences*, , 3: 146-152
- Bonoli, M; Marconi, E; Caboni, M. F. 2004. Free and bound phenolic compounds in barley (*hordeum vulgare l.*) Flours evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of chromatography* .1057: 1–12.
- Brandão, H.N; David,J.P; Couto, R.D.; Nascimento, J.A.P. David,J.M. 2010 Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova*. 33: 1359-1369.
- Brasil. 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília. DF.: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.
- Brasil. Portaria nº 971. 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União; 4 maio.
- Brasileiro, B.G; Pizziolo,V.R; Raslan, D.S.; Jamal,C.M; Silveira,D. 2006 Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*. 42:195-201.
- Burmistrova, O; Simões, M.F; Rijo, P; Quintana, J; Bermejo, J. 2013. Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. *J. Nat. Prod*. 76: 1413–1423
- Butler,M.S; Buss, A.D. Natural products 2006. The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem.Pharmac*. 71: 919-929.

Carvalho, M.C.G; Pires,R.L; Florindo, W. S; Cavalcanti, S.S. 2010 Evidências para o uso de *Indigo naturalis* no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. 8:127-131.

Chiu, Y-J; Huang,T-H; Chiu,C-S; Lu,T-C; Chen,Y-W; Peng, W-H, Chen,C-Y. 2012. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus (lour.) Spreng.* Both in vitro and in vivo. *Evidence-based complementary and alternative medicine.*

Close, D.C; McArthur, C; Hagerman, A.E; Fitzgerald, H. 2005. Differential distribution of leaf chemistry in eucalypt seedlings due to variation in whole-plant nutrient availability. *Phytochemistry* .66: 215–221.

Conforti, F; Statti,G.A; Tundisa,R; Menichinia,F; Houghtonb, P. 2002. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hipericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia* 73:479–483

Dewick, P. M., 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd: England, 507 p.

Diaz, M. A.N; Rossi, C.C.; Mendonça, V.R; Silva, D.M; Ribon, A.O.B; Aguiar, A.P; Muñoz, G.D. 2010. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 20: 724-728

Duarte, M.C.T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência.* 7

Fernandes, A.P; Ribeiro, G.E; Rufino, L.R.A; Silva, L.M; Boriollo, M.F.G; Oliveira, N.M.S; Fiorini, J.E. 2011. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “*in vivo*”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “*in vitro*”. *Rev Med Minas Gerais.* 21:272-279.

Fernandes, P. 2006. Antibacterial Discovery and development-the failure of success? *Nat. Biotech.* 12: 1497-1503

Gaspar-Marques, C.; Simões, F. M.; Rodríguez, B. 2005. A trihomooabietane diterpenoid from *Plectranthus grandidentatus* and na unusual addition of acetone to the ortho-quinone system of cryptotanshinone. *J. Nat. Prod.* 68: 1408-1411

Gilman, A.G; Hardman, J.G.; Limbird, L.E. 2005 Goodman & Gilman :As bases farmacológicas da terapêutica Rio de janeiro. 10ª ed.: 502-22.

Gobbo-Neto, L; Lopes, N.P. 2007. plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova.* 30: 374-381

Gon , A.S; Minelli, L; Guembarovski, A.L. 2001. Melanoma cutâneo primário em Londrina. *An Bras Dermatol.*76:413-26.

Grayer, R. J; Eckert, M. R; Veitch, N. C; Kite, G. C; Marin, P. D; Kokubun, T; Simmonds, M. S. J; Paton, A. J. 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry.* 64: 519-528.

Guimarães, D.O; Momesso, L.S; Puppo,M.T. 2010 Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova.* 33: 667-679.

Gurgel, A.P.A.D; Silva, J.G; Grangeiro,A.R.S; Oliveira, D.C., Lima, C.M.P, Silva, A.C.P; Oliveira, R.A.G; Souza, I.A. 2009 *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (lour.) Spreng (lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology.* 12: 361–363

Haass, L.M; Herlyn,M. 2005. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma, *J Investig Dermatol Symp Proc* .10:153–163.

Haida, K.S; Pazianello, L; Werner, S; Garcia, D.R; Inácio, C.V. 2007. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Cien. Sal. Unip.* 11

Harley,A.L. 2008. Natural products in drug Discovery. *Drug Disc. Tod.* 13:894-901

Hebert, A; Sayasith, K; Senechal, S; Dubreuil, P; Lagace, J. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *Microbiol Lett.*193: 57-62

Instituto nacional do câncer. 2012.Estimativa 2012: incidência de câncer no brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 10 junho, 2012

Itharat, A; Houghton,P.J; Eno-Amooquaye, E; Burke, P.J; Sampson, J.H; Raman, 2004 A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of ethnopharmacology.*90:.33-38.

Jazirehi, A.R; Wenn, P.B; Damavand, M. 2012. Therapeutic implications of targeting the pi3kinase/akt/ mtor signaling module in melanoma therapy. *Am j cancer res.*2:178-191

Kotake-Nara, E; Nagao, 2011. Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Mar. Drugs.* 9: 1024-1037.

Kyung-A, H; Yu-Jin, H; Dong-Sik, P; Jaehyun, K; Ae-Son,O. 2011 In vitro investigation of antioxidant and anti-apoptotic activities of korean wild edible vegetable extracts and their correlation with apoptotic gene expression in HepG2 cells. *Food chemistry.*125: 483-487.

Lapa, M.S; Guedes, K.F; Schalch, F.O; Landman, G.2002. Melanomas malignos cutâneos tratados no Hospital do Câncer de São Paulo: estudo retrospectivo para avaliação de distribuição, fatores prognósticos e sobrevida. *An Bras Dermatol* 77:313-320.

Lechner,D; Stravi, M; Oluwatuyi,M; Pereda-Miranda,R; Gibbons,S. 2004.The anti-staphylococcal activity of *Angelica Dahurica* (Bai Zhi). *Phytochemistry*.65:331-335

Lotze, M.T; Dallal, R.M; Kirkwood, J.M; Flickinger, J.C. 2001 Melanoma: Cutaneous melanoma. (editors: Devita, V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A) In: Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6ed., Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins.

Lukhoba, C.W; Simmonds, M.S.J; Paton, A.J. 2006 *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of ethnopharmacology* 103:1–24.

Maioli, M.A; Alves,L.C;Campanini, A.L; Lima, M.C; Dorta, D.J; Groppo, M; Cavalheiro, A.J; Curti, C;Mingatto, F.E. 2010. Iron chelating-mediated antioxidant activity of *Plectranthus barbatus* extract on mitochondria. *Food Chemistry*. 122: .203-208.

Mann, J. 2005. Secondary metabolism, 2^a edição.

Mason, T; Clemat, F; Vinatoru, M. 2011. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*. 15: 237-247.

Matos, F.J.A. 1998. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará.

Matsuda, A; Sasaki, T. 2004. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci*. 95: 105-111.

Mauro,C; Silva, C.P; Missima, J; Ohnuki,T; Rinaldi,R.B; Frota, M. 2008 Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus codd*. E malvariço, *Plectranthus amboinicus (lour.) Spreng*. – Lamiaceae. *Revista brasileira de farmacognosia* 18: 608-613.

Mishra, B.B.; Tiwari, V.K. 2011. Natural products: An evolving role in future drug Discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* . 46: 4769- 4807

Monzon, M; Oteiza, C; Leiva J; Lamata, M; Amorena, B. 2002. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 319-324

Nascimento, G. G. F; Locatelli, J; Freitas, P. C; Silva, G. L. 2000 Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*. 31:247-256.

NCI Nacional cancer institute. Disponível em: <http://www.cancer.gov/>. Acesso em 16 de julho de 2013.

Newman, D.J; Cragg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 70:461–477

Oliveira, F. Q.; Gobira, B.; Guimarães, C.; Batista, J.; Barreto, M.; Souza, M. 2007. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. bras. Farmacogn.* 17: 466-476

Oliveira,P.M; Ferreira, A.A; Silveira, D; Alves,R.B; Rodrigues, G.V. 2005. Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.*, 68: 588-591

Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Geneva: Organización Mundial de la Salud.

Ortholand, J.Y.; Ganesan,A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*. 8:271–280

Pandian, M.R; Banu,G.S; Kumar,G. 2006. A study of antimicrobial activity of *Alangium salviifolium*. *Indian J Pharmacol* 38: 203-204

Patel, R.D; Mahobia, M.K; Singh,M.K; Singh,A; Sheikh, N.W; Alam, G; Singh,S.K. 2010. Antioxidant potential of leaves of *Plectranthus amboinicus* (lour) spreng. *Scholars research library der pharmacia lettere*, 2: 240-245.

Pinto, A. C.; Silva, O. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova* 25: 45-61.

Pozzo, M.D.; Santurio, D.F.; Rossatto, A.C.; Vargas, S.H.; Alves, E.S.; Loreto, J.V. 2011. Activity of essential oils from spices *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine mastites. *Arq Bras Med Vet Zootec.*63:1229-1232

Puppo, M.T; Gallo, M.B.C. 2007. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Quim. Nova.* 30: 1446-1455.

Quirós,A.R-B; Costa, H.S. 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review . *Journal of Food Composition and Analysis* .19 :97–111

Rijo, P.M; Simões, F; Rodriguez, B. 2005. Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. *Magn. Reson. Chem.* 43: 595–598

Rijo, P; Rodríguez, B.; Duarte, A; Simões, F.M. 2011. antimicrobial properties of *Plectranthus ornatus* extracts, 11-acetoxyhalima- 5,13-dien-15-oic acid metabolite and its derivatives. *The natural products journal.* 1: 57-64.

Rijo, P; Simões, F.M; Francisco, A.P; Rojas, R; Gilman, R.H; Vaisberg, A.J; Rodriguez, R; Moitero, C. 2010. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*: royleanone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chemistry & biodiversity* . 7: 922-932.

Rijo, P; Fernandes, A.S; Simões, F; Pinheiro, L. 2012. Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitors. *Biomedical and Biopharmaceutical Research.* 9: 111-118.

Saklani, A , . Kutty, S.K. 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today.* 13: 161-171

Silva, D.M. 2012. Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

Silva, F.A. M; Borges, M.F.M; Ferreira, M. A. 1999 Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím. nova*, 22: 94-103

Simões, C. M. O; Schnkel, E.P; Gosmann, G; Mello, J.C.P; Mentz, L.A; Petrovick, P.R. 2007 Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed 6ª, Editora da Universidade Federal de Santa Catarina.

Soares, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.* 15:71-78.

Soni, M; Patidar, K; Jain, D; Jain, S. 2010. Ultrasound assisted extraction (UAE): A novel extraction technique for extraction of nutraceuticals from plants *Journal of Pharmacy Research*. 3:636-638

Souza, R.J.P; Mattedi, A.P; Rezende, M.L; Correa, M.P; Duarte, E.M. 2009 Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no estado de São Paulo. *An bras dermatol*. 84:237-43.

Tiwari, N; Chaudhary, A; Mishra, A. 2010 Phytochemical screening and antioxidant activities of some indian medicinal plants used for malaria therapy. *Scholars research library der pharmacia lettre*. 2: 335-340

Valko, M; Izakovic, M; Mazur, M; Rhodes, C.J; Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266: 37–56.

Vichkanova, S. A.; Rubinchik, M. 1966. Antimicrobial properties of a plectrin diterpene from *Plectranthus glaucocalyx*. *Parmakologiya i Toksikologiya*, vol. 29: 605-609.

Walker, G.J; Flores,J.F; Glendening,J.M; Lin, A.H; Markl, I.D. Fountain JW. 1998. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level with in CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets, *Genes Chromosomes Cancer* . 22: 157–163.

Walsh,C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol*.1:65-70.

Williams,R.D; Ellis, B.E. 1989. Age and tissue distribution of alkaloids in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* . 28: 2085-2088

Yunes, R. A.; Filho, V. C. 2007. Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. Santa Catarina: Univali, .11- 32,