



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**Rachel Bedatt Silva**

**ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO HEXÂNICA ORIUNDA DO EXTRATO  
HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Plectranthus neochilus* (SCHLTR)**

**Brasília**  
**2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**Rachel Bedatt Silva**

**ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO HEXÂNICA ORIUNDA DO EXTRATO  
HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Plectranthus neochilus* (SCHLTR)**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a conclusão do curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília.

**Orientadora Prof. Dra. Dâmaris Silveira.**

**Brasília**

**2015**

**Rachel Bedatt Silva**

**ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO HEXÂNICA ORIUNDA DO EXTRATO  
HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Plectranthus neochilus* (SCHLTR)**

Trabalho apresentado como requisito parcial  
para a conclusão do curso de graduação em  
Farmácia da Universidade de Brasília.

**Aprovada em \_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015**

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Dâmaris Silveira  
Universidade de Brasília

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo  
Universidade de Brasília

**Brasília  
2015**

**Silva, Rachel Bedatt**

**Estudo químico da fração hexânica oriunda do extrato hexânico das folhas de *Plectranthus neochilus* (SCHLTR) / Rachel Bedatt Silva; Orientado pela Prof. Dra. Dâmaris Silveira – Brasília: Universidade de Brasília, 2015. 44 f.**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

Este trabalho faz parte do projeto: *Obtenção de compostos agonistas e antagonistas em receptores nucleares presentes em extratos de Plectranthus ornatus (Lamiaceae)*, financiado pela FAP-DF, por meio do edital 06/2008, processo nº 193.000.381/2008. Coordenador do projeto: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni, da Universidade de Brasília, campus Darcy Ribeiro. Também inclui o resultado do Plano de Trabalho desenvolvido por meio do Programa de Iniciação Científica (ProIC)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutica, na Universidade de Brasília.

**Brasília  
2015**

*Dedico este trabalho:*

Aos meus pais e irmão, Arlete, Luis  
Henrique e Henrique,  
que estiveram sempre comigo e me  
apoiaram em todas as conquistas.  
Agradeço por todos os esforços e  
dedicação, eu sei que foram além das  
suas possibilidades. Sem vocês, eu  
jamais teria chegado até aqui.  
Vocês são meus maiores exemplos de  
vida.

## *Agradeço.*

Primeiramente a Deus, por ter me concedido a graça da vida e com ela poder aprender e evoluir todos os dias. Obrigada pelos desafios que o senhor tem me apresentado, acredito que com eles ganhamos forças para continuar vivendo.

Aos meus pais e irmão pelo amor incondicional, companheirismo e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu companheiro e namorado, Emanuel, que sempre me incentivou a vencer os desafios e acreditou na minha capacidade. Agradeço por estar sempre ao meu lado, por toda a paciência, compreensão, carinho, dedicação e amor.

A todos os meus familiares que fazem parte da minha trajetória e que, mesmo distante, tenho consciência que estiveram torcendo por mim e me enviando forças para que eu chegasse até aqui. Agradeço, em especial, às minhas queridas avós, matriarcas da família, Lolita e Geni, que são as grandes responsáveis pela linda família que tenho o prazer de pertencer.

Às minhas amigas Amanda, Gabriela Welter, Luciana, Mariana e Soraya por todo apoio na vida pessoal e profissional.

A todos os professores do curso de Farmácia pela colaboração e disposição por compartilharem sua sabedoria para a minha formação tanto como pessoa, quanto profissional. Em especial para a minha orientadora, Dâmaris Silveira, pela oportunidade e confiança depositada na realização do trabalho. Agradeço pela paciência e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Controle da Qualidade e Produtos Naturais e demais contribuintes para o trabalho, em especial para a Juliana, Patrícia, Ian, Diegue, Yuri e Eveline. Também agradeço ao Paulo Henrique Ribeiro pela ajuda nas análises dos dados espectrométricos.

Aos meus queridos amigos que adquiri ao longo destes seis anos de curso, em especial para Aline, Cibele, Brenda, Danielli, Diogo, Gabriela Marques, Juliana, Kaian, Nãna e Pedro. Agradeço por todo apoio e companheirismo.

Ao Conselho Federal de Farmácia, por me proporcionar momentos únicos de experiência. Em especial, agradeço à farmacêutica Pamela Saavedra, que compartilhou seu conhecimento e experiências para me tornar uma profissional melhor. Agradeço pela confiança no meu trabalho e por ser a grande responsável das minhas conquistas. Você sempre será a minha inspiração de vida.

A todos os meus colegas de Farmácia da UnB que fizeram parte da minha história acadêmica e que contribuíram para minha vida e para a nossa profissão. Em especial, para a equipe da

Jornada Acadêmica de Farmácia, pela confiança, amizade e dedicação ao curso.

Ao CnPQ e FAP-DF por financiarem e apoiarem o projeto, assim como ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) por possibilitar a minha participação de forma voluntária.

*"Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los".*

(Autor desconhecido)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Parte aérea da <i>Plectranthus neochilus</i> , cultivada na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.....	03
Figura 2: Processo de obtenção da fração hexânica das folhas de <i>Plectranthus neochilus</i> .. .....	11
Figura 3: Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) das frações R4 a R11 com revelador Verde de Bromocresol.....	16
Figura 4: Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada das frações RB1 (A), RB2 (B) e RB3 (C).....	18
Figura 5: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB1 (IE, 70eV).....	19
Figura 6: Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB1 (IE, 70eV), em $T_R=49,381$ .....	19
Figura 7: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB2 (IE, 70eV).....	20
Figura 8: Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB2 (IE, 70eV) em $T_R=49,667$ .....	20
Figura 9: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB3 (IE, 70eV).....	21
Figura 10: Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB3 (IE, 70eV), em $T_R=49,341$ .....	21
Figura 11: Porcentagem de larvas mortas de <i>Artemia salina</i> em relação ao aumento da concentração de EHB.....	22
Figura 12: Porcentagem de larvas mortas de <i>Artemia salina</i> em relação ao aumento da concentração de FH.....	23



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Eluentes utilizados na avaliação do perfil químico da fração hexânica por CCD .....	07
Quadro 2: Fase móvel utilizada para o fracionamento em Cromatográfica Líquida Clássica da Fração Hexânica (FH). .....	14
Quadro 3: Reunião das frações obtidas pela coluna cromatográfica da fração hexânica (FH) .....	15
Quadro 4: Fragmentações mais relevantes dos triterpenos $\alpha$ -amirina, friedelina e lupeol.....	22
Quadro 5: Letalidade Média de larvas de <i>Artemia salina</i> de acordo com as concentrações da Fração Hexânica (FH) e Estrato Bruto Hexânico (EHB). .....	23

## RESUMO

*Plectranthus neochilus* é uma planta medicinal frequentemente utilizada para o tratamento de insuficiência hepática e dispepsia na medicina popular, conhecida como “boldinho” ou “boldo-gambá”. Além disso, é amplamente utilizada para fins ornamentais e cosméticos. Estudos anteriores, realizados pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília, mostraram que uma fração do extrato hexânico das folhas de *Plectranthus neochilus* apresenta atividade citotóxica em células de câncer de cabeça e pescoço. A partir desses resultados, o objetivo do presente estudo foi analisar o perfil químico dessa fração. De acordo com os resultados obtidos foi verificada, por análise em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), a presença dos triterpenos friedelina,  $\alpha$ -amirina e lupeol na fração hexânica, assim como a presença de ácidos graxos de cadeia longa, identificados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O extrato hexânico e sua fração ativa apresentaram atividade positiva frente ao teste de *Artemia salina*, o que corrobora com os resultados esperados. Estudos recentes indicaram que ácidos graxos alifáticos de cadeia longa, assim como os que foram detectados a partir das amostras da espécie estudada, podem induzir apoptose em células hepáticas, ou seja, a presença desses compostos pode justificar, ao menos em parte, a ação citotóxica em células patologicamente anormais presentes na boca do paciente.

**Palavras-chave:** *Plectranthus neochilus*; fitoquímica; atividade citotóxica; triterpenos.

## ABSTRACT

*Plectranthus neochilus* is a medicinal plant commonly used for the treatment of liver disturbances and dyspepsia in traditional medicine, known popularly in Brazil as "boldinho" or "boldo-gambá", is a plant widely used for ornamental and cosmetic purposes. Previous studies, conducted by the Natural Products Laboratory of the University of Brasilia, showed that a fraction of the hexane extract from the leaves of *Plectranthus neochilus* has cytotoxic activity in head and neck cancer cells. From these results, the aim of the study was to analyze the chemical profile of this fraction. By analysis in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), it was concluded that the triterpenes friedelin,  $\alpha$ -amyrin and lupeol can be found in hexane fraction, as well as long chain fatty acids. The hexane extract and its active fraction showed positive activity in *Artemia salina* test, which confirms the expected results. Recent studies have indicated that long chain aliphatic fatty acids, as well as those that were detected from the samples of the plant, can also induce apoptosis in hepatic cells. Therefore, at least in part the presence of these compounds may explain the cytotoxic activity in pathologically abnormal cells.

**Keywords:** *Plectranthus neochilus*; phytochemical; cytotoxic activity; triterpene.

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>APG III</b>	Sistema de Taxonomia Vegetal para Angiospermas
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CG-EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração letal a 50% da população
<b>CLC</b>	Cromatografia Líquida Clássica
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EE</b>	Extrato Etanólico
<b>EHB</b>	Extrato Bruto Hexânico
<b>FH</b>	Fração Hexânica
<b>FM</b>	Fase Móvel
<b>HIV/AIDS</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HU</b>	Herbário da UnB
<b>IS</b>	Índice de Similaridade
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RA</b>	Solução Reveladora de Anisaldeído
<b><i>R<sub>f</sub></i></b>	Fator de Retenção
<b>RIV</b>	Irradiação com luz ultravioleta
<b>RVB</b>	Solução Reveladora de Verde de Bromocresol
<b>T<sub>R</sub></b>	Tempo de Retenção

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>3.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....</b>	<b>7</b>
3.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	7
3.1.2. Cromatografia Líquida Clássica (CLC).....	8
3.1.3. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	8
<b>3.2. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>10</b>
3.2.1. Material botânico .....	10
3.2.2. Obtenção do Extrato Bruto Hexânico(EHB) .....	10
3.2.3. Obtenção da fração ativa .....	10
3.2.4. Elaboração da fração hexânica (FH) .....	11
<b>3.3. TESTE DE TOXICIDADE EM LARVAS DE ARTEMIA SALINA.....</b>	<b>12</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
4.1. Frações obtidas a partir da Cromatografia Líquida Clássica (CLC).....	14
4.2. Avaliação do perfil cromatográfico.....	16
4.2.1. Avaliação das frações por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	16
4.2.2. Identificação de terpenos presentes na Fração Hexânica (FH) por CCD .....	18
4.2.3. Análise dos cromatogramas obtidos por CG-EM.....	19
4.3. Avaliação de toxicidade por larvas de <i>Artemia salina</i> .....	22
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para prevenir, tratar e até mesmo curar doenças é uma das terapias mais antigas e utilizadas até os dias de hoje. Levando em conta a menor probabilidade de ocorrência de reações adversas e contra indicações, seu uso mostra ser mais viável e confortável para o paciente (MANTEL et al., 1994; LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 80% da população faz uso de práticas tradicionais para o cuidado da saúde, dentre elas, o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos (OMS, 2013). Atualmente o conhecimento sobre plantas medicinais, principalmente em casos de tratamentos oncológicos é limitado (VANINE et al., 2011).

Considerando o elevado consumo e seu potencial para o tratamento de várias doenças, fitoterápico também possui notável relevância e necessidade de estudos mais precisos e aprimorados, principalmente em casos onde os efeitos adversos dos medicamentos convencionais se mostram desfavoráveis ao paciente (SANTOS et al., 2011).

Os diferentes ecossistemas e os conhecimentos tradicionais encontrados no Brasil permitem uma posição privilegiada em relação aos demais países quando se trata de plantas medicinais, tornando-se assim, uma das floras mais ricas em substâncias bioativas (BRANDÃO, 2010). Pesquisadores e indústrias farmacêuticas estão avançando cada vez mais em busca de conhecimentos sobre plantas medicinais e em produção de fármacos provenientes dessa matéria prima (SACCARO, 2011).

A família Lamiaceae abrange aproximadamente 236 gêneros e mais de 7.000 espécies. São encontradas na forma de ervas, arbustos, cipós e, com uma menor frequência, árvores. De acordo com o sistema APG III (2009), esta família está disposta no clado

Euasteridae I, grupo Lamiídeas e ordem Lamiales, apresentando sete subfamílias. Existem cerca de 500 espécies no Brasil, distribuídas em 38 gêneros. São, em maioria, plantas aromáticas, sendo muito utilizadas em indústrias para a produção de perfumes, cosméticos e, também, de fármacos (CNBH, 2013).

Dentre a vasta biodiversidade encontrada no Brasil, está o gênero *Plectranthus*, pertencente à família Lamiaceae. Plantas deste gênero apresentam cultivos como tubérculos comestíveis, condimentos e também são utilizados como cosméticos (ASCENSÃO et al., 1999). São distribuídas mais de 300 espécies em regiões tropicais da África, Ásia e Austrália e adaptadas a quase todos os *habitats* e altitudes (ABDEL et al., 2002). Sabe-se que 62 espécies de *Plectranthus* são utilizadas para fins medicinais e ornamentais (WALDIA et al., 2011). Suas espécies são comumente utilizadas para tratar cefaleias, dermatites, queimaduras, feridas, alergias, picadas de insetos e, também, como agente antisséptico.

As plantas deste gênero são muito estudadas e a cada dia mais estão revelando novas substâncias bioativas para tratamentos diversos (ROSAL et al, 2011).

Considerado uma fonte rica em óleo essencial, o gênero está se tornando um fator atrativo para pesquisas. As substâncias majoritárias em suas espécies são pertencentes à classe dos terpenos, mais especificamente, os monoterpenos e sesquiterpenos (FREITAS et al, 2014). Já foi comprovado que seu óleo essencial em diversas espécies possui ação analgésica e antidispepsia, mostrando-se assim, um potente agente farmacológico (ABDEL et al., 2002).

O estudo desenvolvido por Almeida e colaboradores (2012), mostrou que a espécie *Plectranthus barbatus*, conhecida popularmente como boldo da terra ou boldo de jardim, é uma das plantas medicinais mais utilizadas por pessoas vivendo com HIV/AIDS. Também é uma espécie muito utilizada para tratar problemas gastrointestinais e dispepsia.

Uma espécie com propriedades terapêuticas muito parecidas com o boldo da terra é *Plectranthus neochilus*, que apresenta semelhanças morfológicas com o *P. barbatus*. É uma planta medicinal muito utilizada para o tratamento de insuficiência hepática e dispepsia na medicina tradicional. Conhecida popularmente como “boldinho” ou “boldo-gambá”, é uma planta apreciada por sua beleza considerável e aroma característico, o que a torna útil para cultivo ornamental e uso cosmético (DUARTE et al., 2007).

Podendo ser cultivada em qualquer época do ano, *Plectranthus neochilus* possui folhas pequenas, pecioladas, apresentando lâminas suculentas, dispostas compactamente, um pouco amargas, de odor forte, inflorescência racemosa de coloração violeta (Figura 1) (CODD, 1985; LORENZI et al., 2002; COUTO, 2006). Apresentam tricomas glandulares e não-glandulares; a grande maioria é multicelular, porém há uma pequena porção unicelular. A secreção destes tricomas apresenta caráter lipofílico (DUARTE et al., 2007).



**Figura 1: Parte aérea da *Plectranthus neochilus*, cultivada na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Estudos comprovaram que a ação no tratamento de doenças hepáticas e dispepsia são oriundas de compostos terpênicos, muito presentes no óleo essencial da *P. neochilus*. De acordo com Bocardi (2008) e Bandeira (2011), uma das substâncias majoritárias no seu



óleo essencial é o trans-cariofileno, encontrado num teor próximo de 20%. O cariofileno é um sesquiterpeno, muito presente em plantas medicinais conhecidas, que apresenta atividade contra dores estomacais (BARBOSA, 1998). Alguns estudos como de Nunomura e colaboradores (2012) e de Teixeira (2003) encontraram cariofileno em extrato hexânico de outras plantas medicinais.

O uso de fitoterápicos para fins odontológicos, pelo Cirurgião-Dentista, no Brasil, foi reconhecido e regulamentado somente no dia 19 de novembro de 2008, por meio da Resolução n° 082/2008-CF. Atualmente, existem estudos para a utilização de extratos de plantas para ação antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica e anestésica, porém ainda há a necessidade de estudos para tratamentos oncológicos bucais. (SILVA et al., 2006; AGRA et al., 2007)

Não há estudos publicados a respeito do uso de *P. neochilus* para fins odontológicos, porém existem estudos iniciais para a utilização de extratos de plantas com ação antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica e anestésica, mas é possível notar a carência de estudos para tratamentos oncológicos bucais (SILVA et al., 2006; AGRA et al., 2007). Vale ressaltar o estudo de Crevelin (2015), no qual o óleo essencial extraído de folhas de *P. neochilus* apresentou atividade promissora contra bactérias causadoras de cáries, em especial, teve atividade contra *Streptococcus mutans*.

*Artemia salina* Leach, é uma espécie de microcrustáceos utilizada para detectar compostos bioativos em extratos de plantas e já apresentaram uma boa correlação com a atividade tumoral (MCLAUGHLIN & ROGERS, 1988). O Instituto Nacional do Câncer mostrou que este teste é significativo, pois pode ser correlacionado com a inibição do crescimento *in vitro* de linhas de células tumorais humanas (KB) e pode funcionar como uma pré-triagem para pesquisa de fármacos antitumorais (ANDERSON et al., 1991). Além

disso, apresenta correlação com as atividades contra *Trypanosoma cruzi* protozoário causador de doença de chagas (ALVES et al. 2000; ZANI et al. 1995).

As vantagens do uso de *Artemia salina* para estes testes é a sua disponibilidade comercial, pois os ovos destes microcrustáceos permanecem viáveis durante vários anos, além de serem produzidos em larga escala, o que faz deste teste, ser econômico. São testes rápidos, porém muito sensíveis (ARCANJO, 2012).

O presente estudo faz parte do projeto: *Obtenção de compostos agonistas e antagonistas em receptores nucleares presentes em extratos de Plectranthus ornatus (Lamiaceae)*, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni, da Universidade de Brasília, *campus* Darcy Ribeiro. Estudos mostraram que a fração do extrato hexânico das folhas de *Plectranthus neochilus* apresentou atividade citotóxica em células de câncer de cabeça, boca e pescoço.

Considerado o elevado consumo e seu potencial para o tratamento, esta planta possui notável relevância e necessidade de mais estudos sobre suas atividades.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil químico da fração hexânica oriunda do extrato bruto hexânico das folhas de *Plectranthus neochilus* e sua atividade citotóxica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar os compostos majoritários da fração hexânica das folhas de *P. neochilus*.
- Avaliar a potencial atividade citotóxica do extrato bruto hexânico e fração hexânica das folhas de *P. neochilus* frente às larvas de *Artemia salina*.
- Relacionar o efeito dos compostos encontrados com o efeito citotóxico detectado.
- Identificar outros compostos presentes na fração hexânica desta espécie.

### 3.1.MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para avaliar o perfil cromatográfico, foram utilizados os métodos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida Clássica (CLC) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

#### 3.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada foi realizada em placas de vidro com sílica gel 60G (Dinâmica-Reagentes analíticos) em camadas de 0,3 mm e 0,7mm de espessura, previamente ativadas a 105 °C, durante 1 hora.

##### 3.1.1.1. Eluentes

Os eluentes, ou fase móvel (FM), utilizados na avaliação do perfil químico da fração hexânica por CCD estão apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1: Eluentes utilizados na avaliação do perfil químico da fração hexânica por CCD.**

Código de referência	Eluente
FM1	Hexano:AcOEt (9:1)
FM2	Hexano:AcOEt (7:3)
FM3	Hexano:AcOEt (1:1)
FM4	Hexano:AcOEt (4:6)
FM5	Hexano:AcOEt (2:8)
FM6	Hexano:AcOEt (1:9)

AcOEt: Acetato de Etila

##### 3.1.1.2. Técnicas de revelação

**Irradiação com luz ultravioleta (RIV):** A cromatoplaça foi colocada em uma câmara fechada em aparelho Prodicil® sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 365 nm.

**Solução reveladora de Anisaldeído (RA):** A cromatoplaça foi revelada com soluções de Anisaldeído e ácido sulfúrico (A e B). Após borrifar as soluções na cromatoplaça, esta foi seca com o auxílio de um secador.

Solução A: 2 mL de anisaldeído em 98 mL de ácido acético

Solução B: 20 mL de ácido sulfúrico em 80 mL de etanol.

**Solução reveladora de Verde de Bromocresol (RVB):** A solução foi borrifada sobre toda a placa cromatográfica, esperando que esta fique com a coloração azul e onde há a presença de ácidos graxos de cadeia longa atinja a coloração amarela. Foi utilizado 0,1 g de verde de bromocresol solubilizados em 100 mL de metanol e alcalinizado com solução 1 mol/L de NaOH até a solução apresentar uma coloração azul intensa.

### **3.1.1.3. Padrões utilizados**

Foram utilizadas quatro amostras autênticas para comparação, sitosterol, lupeol,  $\alpha$ -amirina e friedelina..

### **3.1.2. Cromatografia Líquida Clássica (CLC)**

Foi utilizada coluna de vidro com um diâmetro de 4 cm e altura de 41 cm, eluída sob pressão atmosférica, com sílica gel 60 MERCK® (0,063-0.200mm). A eluição foi realizada com uma gradiente de polaridade crescente, utilizando os solventes: hexano, acetato de etila e metanol, respectivamente, sendo coletadas frações de 500 mL. As frações obtidas foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e reunidas em grupos semelhantes.

### **3.1.3. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

As reuniões que apresentaram maior pureza e rendimento adequado foram selecionadas para serem identificadas por meio da comparação com padrões em CCD e análise espectrométrica por CG-EM.

O equipamento utilizado para a análise foi o cromatográfico SHIMADZU® CGMS-QP2010 Plus do Instituto de Química da Universidade de Brasília. Os espectros foram comparados com o banco de dados: Catálogo de espectro de massas NIST, National Institute of Standards and Technology, do Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO), do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

A porcentagem de pureza é disponibilizada pelo equipamento, no qual se realiza uma relação entre a área do pico e o total de área obtida pelo cromatograma. A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação entre os valores do índice de similaridade (IS) com dados presentes no banco de dados NIST ( $IS \geq 90\%$ ) e, por fim, comparado com os dados disponíveis na literatura.

**Método utilizado (Silva, 2007):**

Coluna: DB-5 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (5% fenil, 95% metilsiloxano)

Injetor: 250°C, modo splitless

Injeção: 2  $\mu\text{L}$  de amostra 1 mg/mL em clorofórmio

Hélio: 0,6 mL/min modo fluxo constante

Forno (Duas rampas): 60°C 1min, 40°C/min até 140°C, 4°C/min até 300°C em 10min;

Linha de Transferência: 280°C.

Espectrômetro de Massa: Fonte de íons: 250°C;

Tempo de início: 5min;

Polaridade: positivo;

Modo de scan: full scan;

Intervalo de massa: 50-600.

## **3.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. Material botânico**

As partes aéreas de *P. neochilus* foram coletadas no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, em janeiro de 2011. A amostra é idêntica à exsicata depositada no Herbário da UnB (HU), sob o número 913. Após a separação de folhas e caules, o material vegetal foi secado à temperatura ambiente.

### **3.2.2. Obtenção do Extrato Bruto Hexânico(EHB)**

O material vegetal pulverizado (folhas, 978,66 g) foi extraído por maceração, primeiro com hexano, seguido de etanol, sendo submetido ao processo de rotaevaporação à pressão reduzida, fornecendo os extratos brutos hexânico (EHB, 49,87g de folha g, 5,09% de rendimento) e etanólico (EE, 61,43g, 6,27% de rendimento). Apenas o EHB foi trabalhado neste estudo.

### **3.2.3. Obtenção da fração ativa**

Parte do extrato hexânico das folhas de *P. neochilus* (EHB, 35,0 g) foi incorporado à sílica e submetido à filtração em sílica gel 60 (MERCK®) com o auxílio de um funil de vidro sinterizado. Foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas com proporção 1:1 em ordem crescente de polaridade. Desse procedimento foram obtidas cinco frações (Figura 2) e em seguida, foram rotaevaporadas.

Das 5 frações obtidas pela filtração, apenas a fração que apresentou atividade contra células tumorais (FH) foi submetida aos procedimentos cromatográficos e avaliação de citotoxicidade. As demais frações não foram trabalhadas.

### 3.2.4. Elaboração da fração hexânica (FH)

A fração ativa FH apresentou uma coloração alaranjada, com odor característico, um pouco doce e com a aparência de cera. Para o fracionamento de FH, foram utilizados 20g da fração, seguindo o método descrito no item 3.1.2 para Cromatografia Líquida Clássica (CLC) em coluna de sílica gel (Figura 2).

As frações obtidas foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), seguindo o método descrito no item 3.1.1 e reunidas em grupos semelhantes. As reuniões que apresentaram maior pureza e rendimento adequado foram selecionadas para serem identificadas por meio da comparação com padrões em CCD e análise espectrométrica por CG-EM.

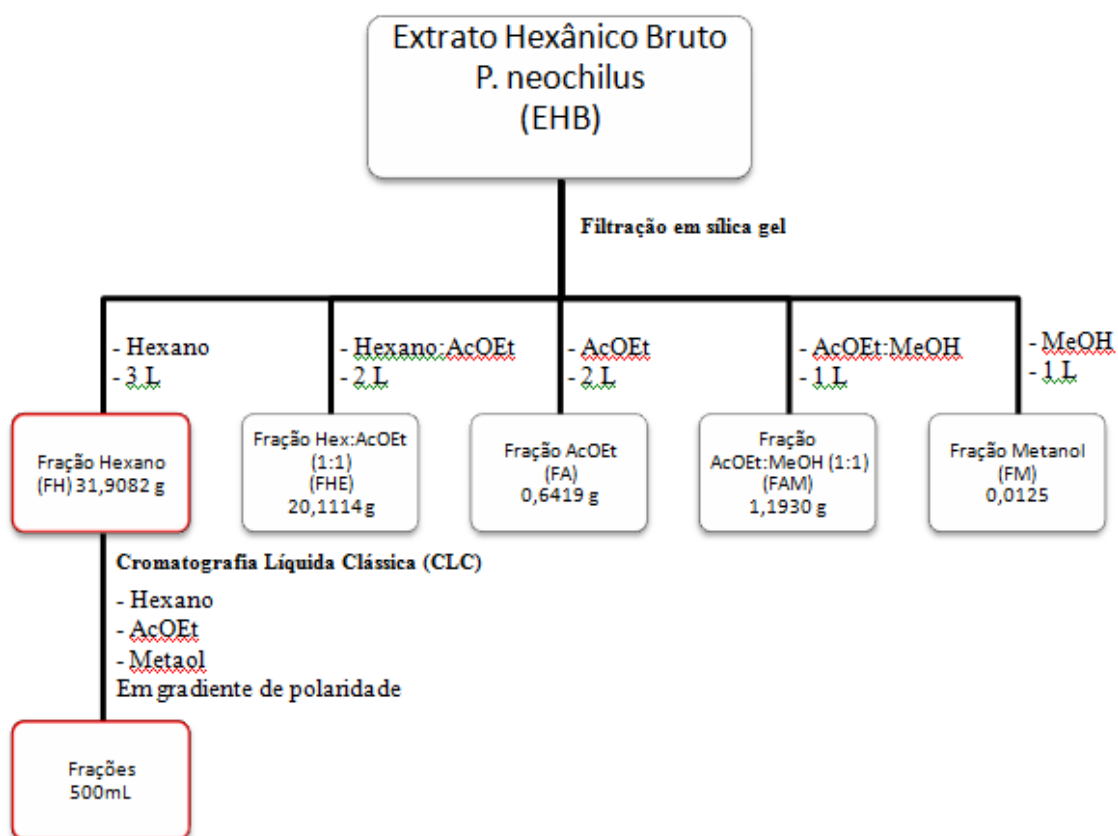


Figura2: Processo de obtenção da fração hexânica das folhas de *Plectranthus neochilus*.



### 3.3. TESTE DE TOXICIDADE EM LARVAS DE *ARTEMIA SALINA*

A metodologia utilizada para avaliar a toxicidade da fração hexânica a partir de larvas de *Artemia salina* foi adaptada com base na metodologia descrita por Matthews (1995).

**Preparação da solução salina:** A solução de sal marinho, com concentração de 36 g/L, foi preparada e ajustada, com uma solução 0,1 M de NaOH, até pH 8-9. Esta solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *A. salina* e para o preparo das diluições.

**Eclosão dos ovos:** Os ovos de *A. salina* foram deixados eclodirem em solução salina por 48 horas, sob aeração constante e expostos a luz, por lâmpada incandescente.

A cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*. Os tubos foram mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 horas.

**Preparo da amostra:** Foram utilizados 20 mg da fração hexânica obtida pela filtração em sílica (FH) e do extrato bruto hexânico (EHB), estes foram solubilizados em 0,2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e o volume foi completado para 20 mL com a solução salina (Solução 01). Desta, 10 mL foram transferidos para outro frasco e completados para 20 mL com solução salina (Solução 02). Uma terceira solução foi preparada, a partir da solução 02, seguindo o mesmo método. As diluições foram elaboradas em triplicata. A cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *Artemia salina*.

**Controle positivo e negativo:** No controle positivo, foram utilizados 2 mg de dicromato de potássio e submetidos às mesmas condições da amostra a ser analisada. No controle negativo, foram utilizados tubos contendo apenas solução salina, DMSO e larvas de *A. salina* nas mesmas condições de análise.

**Bioensaio:** Os tubos foram mantidos sob iluminação e as larvas mortas foram contadas após 24 horas. A porcentagem de letalidade (%) para cada concentração testada foi estimada pelo número de larvas mortas em relação ao total de larvas no tubo. Depois foi feita a média das porcentagens de letalidade obtidas pelas triplicatas para cada concentração testada.

O cálculo da  $CL_{50}$  (Concentração letal a 50% da população) foi estimado pela concentração de extrato responsável por matar 50% da população de larvas e analisado por método gráfico, por equação linear simples.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Frações obtidas a partir da Cromatografia Líquida Clássica (CLC)

Foram obtidas 216 frações, utilizando as respectivas fases móveis indicadas no Quadro 2, sendo estas frações coletadas em um volume de 500 mL e, em seguida, rotaevaporadas.

**Quadro 2: Fase móvel utilizada para o fracionamento em Cromatográfica Líquida Clássica Fração Hexânica (FH).**

FASE MÓVEL	FRAÇÃO
Hexano	01-28
Hexano: AcOEt (9:1)	29-48
Hexano:AcOEt (8:2)	49-67
Hexano:AcOEt (7:3)	68-84
Hexano:AcOEt (6:4)	85-99
Hexano:AcOEt (1:1)	100-110
Hexano:AcOEt (4:6)	111-121
Hexano:AcOEt (3:7)	122-137
Hexano:AcOEt (2:8)	138-151
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (9:1)	152-166
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (8:2)	167-182
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (6:4)	183-192
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (3:7)	193-200
CH <sub>3</sub> OH	204-216

AcOEt: Acetato de Etila; CH<sub>3</sub>OH: Metanol.

Estas frações foram monitoradas por CCD e reunidas em 24 grupos de acordo com suas características químicas como observado no Quadro 3.

**Quadro 3: Reunião das frações obtidas pela coluna cromatográfica da fração hexânica (FH).**

<b>REUNIÃO</b>	<b>FRAÇÃO</b>	<b>MASSA (g)</b>	<b>*FASE MÓVEL (CCD)</b>
<b>R1</b>	1	0,04	FM1
<b>R2</b>	2	0,0876	FM1
<b>R3</b>	3	0,2895	FM1
<b>R4</b>	4 - 8	8,08	FM1
<b>R5</b>	9 - 21	2,81	FM2
<b>R6</b>	22 -31	0,31	FM2
<b>R7</b>	32-43	0,8	FM3
<b>R8</b>	44-46	0,01	FM3
<b>R9</b>	47-59	0,01	FM3
<b>R10</b>	60-64	0,04	FM3
<b>R11</b>	65-66	0,1	FM3
<b>R12</b>	67-77	0,06	FM3
<b>R13</b>	78-90	0,01	FM3
<b>R14</b>	91-105	0,03	FM3
<b>R15</b>	106-113	0,02	FM3
<b>R16</b>	114-120	0,05	FM4
<b>R17</b>	121-125	0,02	FM4
<b>R18</b>	126-141	0,03	FM5
<b>R19</b>	142-151	0,01	FM5
<b>R20</b>	152-156	0,01	FM6
<b>R21</b>	157-160	0,01	FM6
<b>R22</b>	161-181	0,01	FM6
<b>R23</b>	182 - 189	0,03	FM6
<b>R24</b>	190-216	0,92	FM6

\* A Fase móvel utilizada para a construção do gráfico é referente à utilizada no monitoramento por CCD das respectivas reuniões.

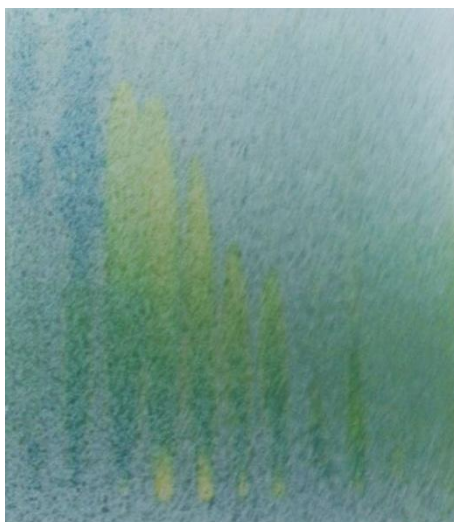
\*\*As fases móveis estão definidas no quadro 1 do item 3.1.1.1.

As frações R15, R16 e R17 apresentaram relativa pureza quando monitoradas por CCD. Estas foram trabalhadas posteriormente. Os outros grupos obtidos apresentaram uma composição complexa, não sendo possível purificá-los e analisá-los.

## 4.2. Avaliação do perfil cromatográfico

### 4.2.1. Avaliação das frações por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Por meio do monitoramento por CCD, foi possível observar que as frações R6 a R10 apresentaram ácidos graxos de cadeia longa com o auxílio do revelador Verde de Bromocresol (RVB , item 3.1.1.2), que em contato com estas substâncias, revela coloração amarelada (Figura 3).



**Figura 3: Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) das frações R4 a R11 com revelador Verde de Bromocresol.**

**R15(0,02 g):** Apresentou como um sólido amorfo de coloração esverdeada, solúvel em hexano e acetato de etila. Este foi lavado sucessivas vezes com hexano: acetato de etila (8:2) e posteriormente com clorofórmio, fornecendo um sobrenadante amarelo e um precipitado branco que foi separado por decantação.

O sólido resultante foi submetido a CCD (FM2, RA, item 3.1.1). Foi constatada a presença de uma substância majoritária de coloração violácea. Esta substância teve aparência de um sólido branco solúvel em acetato de etila e foi denominada **RB1**.

**R16(0,05 g):** Apresentou como um sólido amorfo de coloração esverdeada, solúvel em hexano e acetato de etila. Este foi lavado sucessivas vezes com hexano: acetato de etila (7:3), diclorometano, seguido de clorofórmio, fornecendo um sobrenadante esverdeado e um precipitado branco que foi separado por decantação.

O sólido resultante foi submetido à cromatografia em camada delgada em sílica gel (FM3, RA, item 3.1.1). Foi constatada a presença de uma substância majoritária de coloração rosada. Esta substância teve aparência de um sólido branco solúvel em acetato de etila e foi denominada **RB2**.

**R17(0,02 g):** Apresentou como um sólido amorfo de coloração esverdeada, solúvel em hexano e acetato de etila. Este foi lavado sucessivas vezes com hexano: acetato de etila (6:4) e diclorometano, resultando num sobrenadante esverdeado e um precipitado branco que foi separado por decantação.

O sólido resultante foi submetido à cromatografia em camada delgada em sílica gel (FM3, RA, item 3.1.1). Foi constatada a presença de uma substância majoritária de coloração rosada. Esta substância teve aparência de um sólido branco solúvel em acetato de etila e foi denominada **RB3**.

As características de RB1, RB2 e RB3 apresentaram certa similaridade, deste modo, foi preciso fazer uma análise comparativa entre elas por CCD com ponto misto. No qual foi comprovado, por meio do Fator de Retenção (*R<sub>f</sub>*), que não se tratavam da mesma substância. Em seguida, foram comparadas com os seguintes padrões de terpenos: Lupeol,  $\alpha$ -amirina, friedelina e sitosterol.

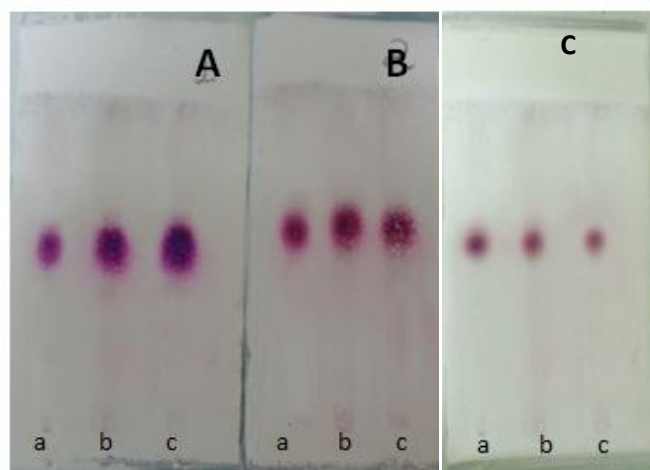
#### 4.2.2. Identificação de terpenos presentes na Fração Hexânica (FH) por CCD

A comparação com padrões permitiu observar que RB1, RB2, RB3 apresentaram um perfil semelhante aos padrões lupeol, friedelina e  $\alpha$ -amirina, respectivamente, podendo ser observado na Figura 4.

**RB1 (0,0098 g)** apresentou-se como um sólido branco amorfo. Quando comparado com o padrão de lupeol por meio de CCD de ponto misto (FM2, RA, item 3.1.1), apresentou coloração violácea e o mesmo *Rf* (Fator de Retenção) que o padrão (*Rf* ~ 0,545). (Figura 4)

**RB2 (0,018 g)** apresentou-se como um sólido branco amorfo. Quando comparado com o padrão de friedelina por meio de CCD de ponto misto (FM3, RA, item 3.1.1), apresentou coloração rosada e o mesmo *Rf* (Fator de Retenção) que o padrão (*Rf* ~ 0,562). (Figura 4)

**RB3 (0,0014 g)** apresentou-se como um sólido branco amorfo. Quando comparado com o padrão de  $\alpha$ -amirina por meio de CCD de ponto misto (FM3, RA, item 3.1.1), apresentou coloração violácea e o mesmo *Rf* (Fator de Retenção) que o padrão (*Rf* ~ 0,584). (Figura 4)



**Figura 4: Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada das frações RB1 (A), RB2 (B) e RB2 (C).** Revelador: Anisaldeído, solução A e B. Placa A(RB1)– (a) Padrão de lupeol; (b) Ponto misto de RB1 e padrão de lupeol (c) RB1. Placa B (RB2) – (a) Padrão de friedelina; (b) Ponto misto de RB2 e padrão de friedelina (c) RB2. Placa C (RB2) – (a) Padrão de  $\alpha$ -amirina; (b) Ponto misto de RB3 e padrão de  $\alpha$ -amirina; (c) RB3.

### 4.2.3. Análise dos cromatogramas obtidos por CG-EM

Os grupos RB1, RB2 e RB3 foram submetidos à Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), seguindo o método descrito no item 3.1.3.

A análise por CG-EM do cromatograma de **RB1** mostrou que a substância majoritária foi o triterpeno lupeol, com 72% de pureza e Índice de Similaridade (IS) de 93% (Figura 5). Os dados fornecidos pelo espectro de massa (Figura 6), referente ao Tempo de Retenção ( $T_R$ ) 49,381 min, foram comparados com o banco de dados NIST, que sugeriu a presença de lupeol. Comparado com a literatura, o espectro de massas encontrado apresentou o mesmo padrão de fragmentação do lupeol, com fragmentos característicos em  $m/z$  234,  $m/z$  219,  $m/z$  207 e  $m/z$  189, assim como íon molecular de  $m/z$  426. Além disso, os fragmentos  $m/z$  135,  $m/z$  121 e  $m/z$  107, confirmam a presença desse composto (Silva, 2007).

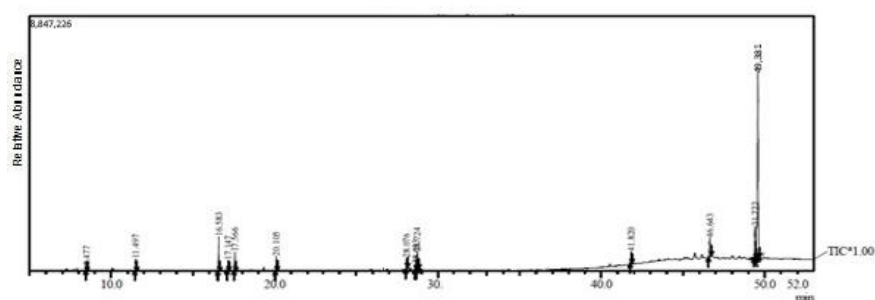


Figura 5: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB1 (IE, 70eV)

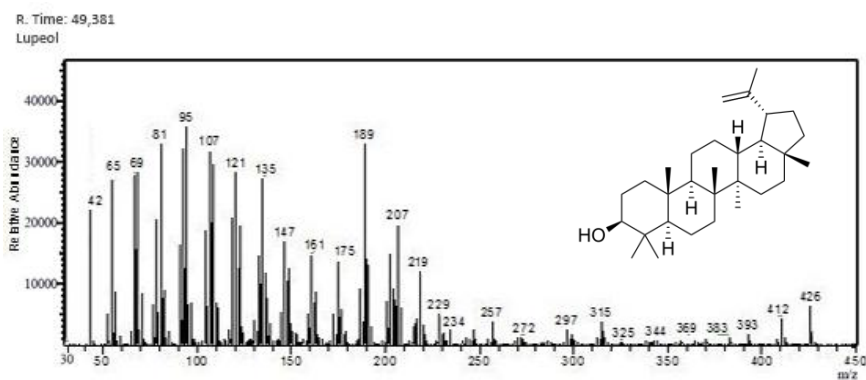
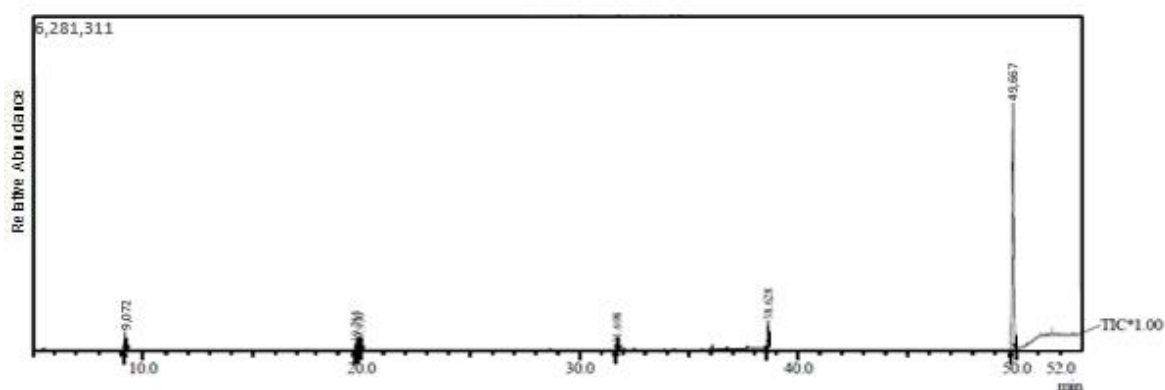


Figura 6: Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB1 (IE, 70eV), em  $T_R=49,381$ .

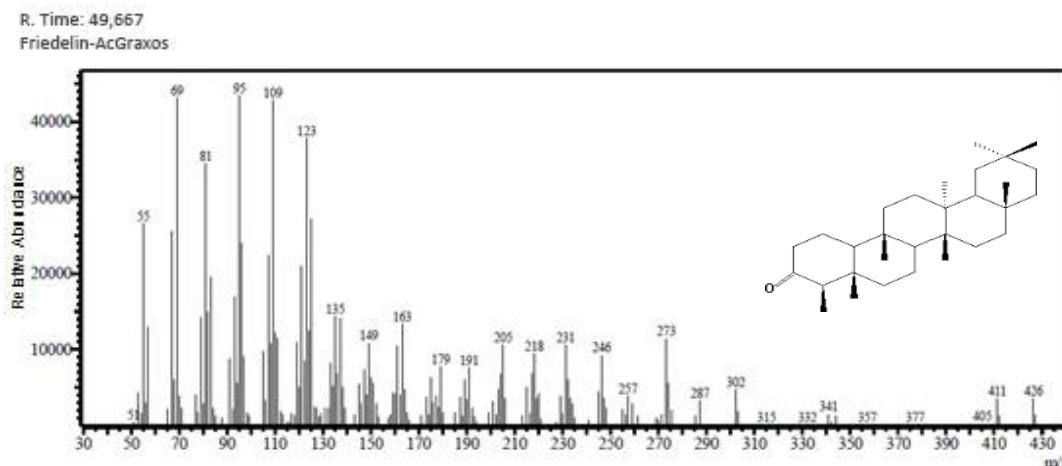


**RB2** também foi analisada por CG-EM, no qual constatou a presença de uma substância predominante em seu cromatograma, com 81% de pureza e IS de 95% (Figura 7).

O espectro de massas referente ao  $T_R = 49,667$  min encontrado desta substância apresentou o mesmo padrão de fragmentação da friedelina, com fragmentos característicos em  $m/z$  69,  $m/z$  205 e  $m/z$  273, assim como íon molecular de  $m/z$  426 (Figura 8) (Almeida, 2011), o que foi confirmado pela biblioteca NIST com . Também foi identificada presença de ácidos graxos.



**Figura 7:** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB2 (IE, 70eV).



**Figura 8:** Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB2 (IE, 70eV), em  $T_R = 49,667$ .

A análise do cromatograma obtido por **RB3** identificou uma substância predominante, com 87% de pureza e IS de 92% (Figura 9). De acordo com a biblioteca NIST, otriterpeno identificado pela análise espectrométrica de RB3 apresentou grande similaridade com  $\alpha$ -amirina (Figura 10).

Os picos de fragmentos de RB3 referentes ao  $T_R=49,341$ min foram comparados com os picos de fragmentos característicos de  $\alpha$ -amirina encontrados na literatura. O espectro da substância pode ser visualizado na figura 10. Os fragmentos mais relevantes correspondentes à  $\alpha$ -amirina também se mostraram presentes em RB3, são estes  $m/z$  218,  $m/z$  207,  $m/z$  203 e  $m/z$  189, assim como íon molecular de  $m/z$  426. Por apresentar um sinal referente à  $m/z$  189 menos intenso que o sinal  $m/z$  203, característica de derivados ursanos, os dados sugerem que o espectro de massas apresentado na Figura 10, corresponde à  $\alpha$ -amirina. Também foi identificada presença de ácidos graxos.

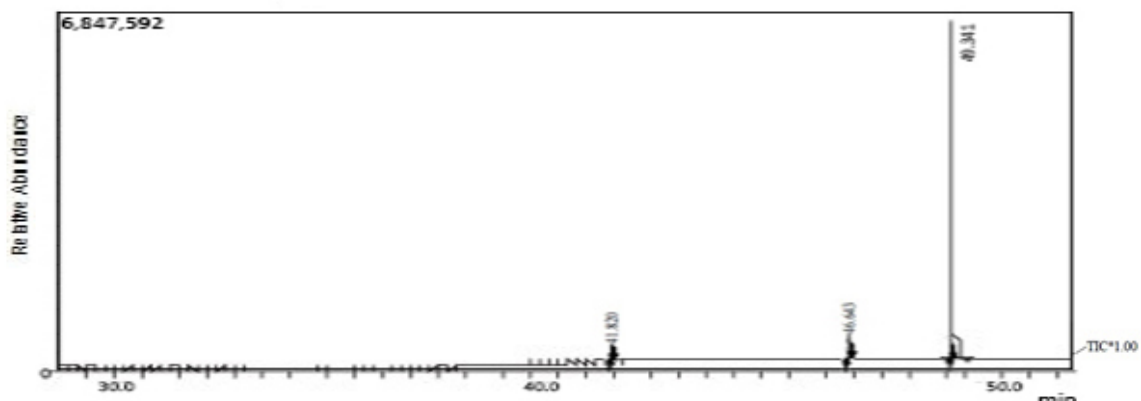


Figura 9: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de RB3 (IE, 70eV).

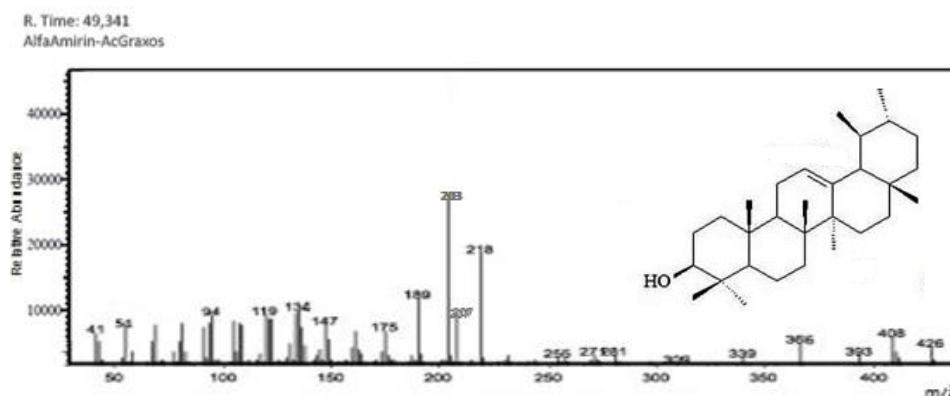


Figura 10: Espectro de massas correspondente ao cromatograma de RB3 (IE, 70eV), em  $T_R=49,341$ .

O Quadro 4 mostra os sinais de fragmentação mais abundantes dos triterpenos encontrados em FH segundo a literatura.

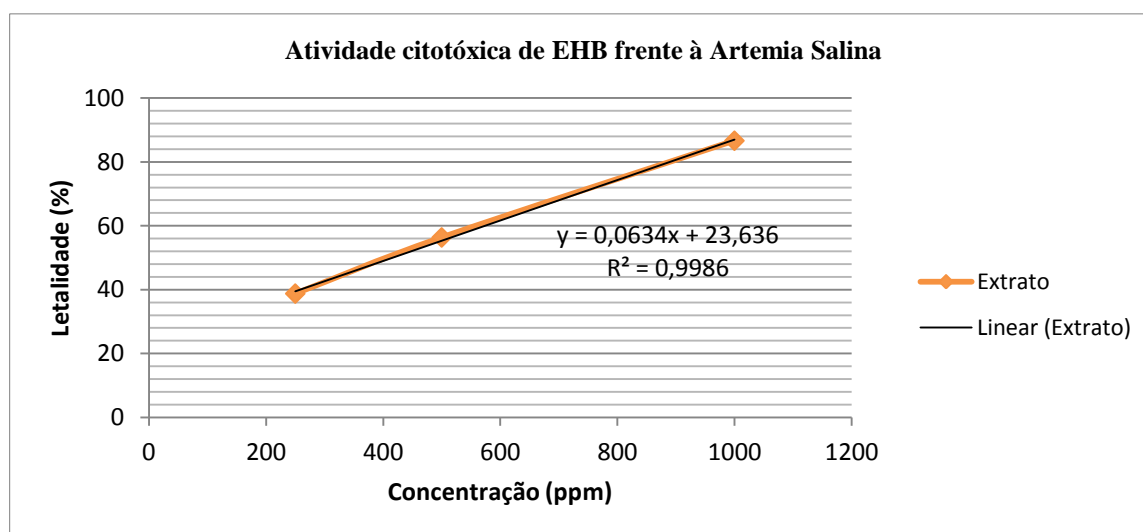
**Quadro 4: Fragmentações mais relevantes dos triterpenos  $\alpha$ -amirina, friedelina e lupeol.**

TRITERPENO	FRAGMENTAÇÃO (m/z)
$\alpha$ -amirina	426 (M+), 218, 207, 203, 189
Friedelina	426 (M+), 218, 207, 203 e 189
Lupeol	426 (M+), 234, 219, 207, 189, 135, 121, 107

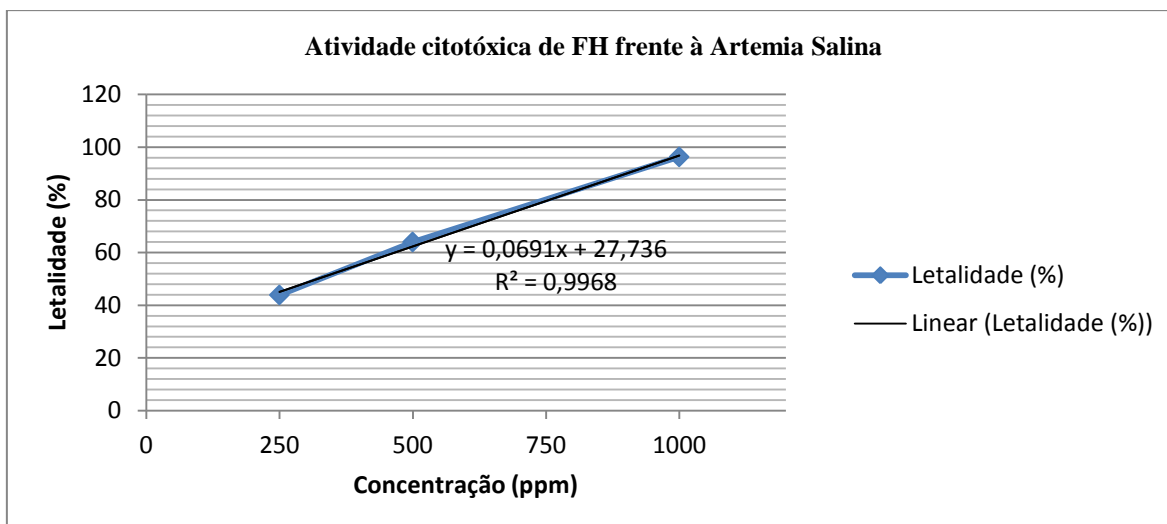
SILVA, 2007; VIANA, 2011.

#### 4.3. Avaliação de toxicidade por larvas de *Artemia salina*

A atividade citotóxica testada em larvas de *Artemia salina* pelo EHB foi calculada a partir da CL<sub>50</sub>, que consiste na concentração mínima de extrato capaz de matar 50% das larvas, no qual resultou em 425,3 ppm. Já no caso de FH, foi possível observar uma CL<sub>50</sub> de 329,4 ppm. Os resultados foram calculados por regressão linear (Figura 11 e 12).



**Figura 11: Porcentagem de larvas mortas de *Artemia salina* em relação ao aumento da concentração de EBH, evidenciada pelos pontos no gráfico. A CL<sub>50</sub> (Concentração letal do extrato para 50% da população) é observada em 425,3 ppm.**



**Figura 12:** Porcentagem de larvas mortas de *Artemia salina* em relação ao aumento da concentração da Fração Hexânica (FH) das folhas de *Plectranthus neochilus*, evidenciada pelos pontos no gráfico. A CL<sub>50</sub> (Concentração letal da fração para 50% da população) é observada em 329,4 ppm.

Segundo a Meyer (1982), são consideradas substâncias tóxicas, todas as que apresentarem valores de CL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina*. A CL<sub>50</sub> encontrada pelo controle negativo foi de 1,25 ppm.

Neste caso, as duas substâncias apresentaram citotoxicidade moderada, porém FH apresentou-se 10% mais tóxica que EHB. O Quadro 5 mostra a comparação dos dados obtidos por meio da letalidade das duas amostras.

**Quadro 5:** Letalidade Média de larvas de *Artemia salina* de acordo com as concentrações da Fração Hexânica (FH) e Extrato Bruto Hexânico (EHB).

Concentração (ppm)	FH		EHB	
	Letalidade (%)	Desvio Padrão	Letalidade (%)	± Desvio Padrão
250	44	5	39	2
500	64	6	56	10
1000	96	6	87	15

EHB: Extrato Bruto Hexânico de *P. neochilus*; FH: Fração Hexânica de *P. neochilus*.

## 5. DISCUSSÃO

O triterpeno lupeol apresenta uma potente atividade farmacológica contra inflamação, artrite, diabetes, doenças do coração, assim como toxicidade hepática. Atualmente, os estudos desta molécula estão focados em sua atividade anti-inflamatória e sua relação com a atividade antitumoral (SIDDIQUE & SALEEM, 2011).

A atividade antitumoral do lupeol apresentou-se relevante quando testada em células de câncer *in vitro* e *in vivo*. Essa atividade mostrou ser dependente de concentração ao longo do tempo e aprimorada quando o lupeol foi associado a vesículas lipossomais, de forma a agir seletivamente em células de câncer (SALEEM, 2009).

A friedelina é um triterpeno pentacíclico que apresenta várias atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiulcerogênica, antiproliferativa, pro-apoptótica, anti-inflamatória, analgésica e antipirética (BRASIL, 2013).

As propriedades farmacológicas encontradas nos diversos triterpenos encontrados em FH são muito semelhantes. Destas propriedades, as atividades anti-inflamatória e antitumoral estão apresentando um maior destaque, como já descritas anteriormente sobre o lupeol e a friedelina. O que não é diferente para a  $\alpha$ -amirina, a atividade desta substância está relacionada, principalmente, para a ação anti-inflamatória de artrites, quando age em conjunto com a  $\beta$ -amirina (BANDEIRA et al., 2007; DIAS et al., 2011).

Alguns ácidos graxos alifáticos de cadeia longa podem induzir apoptose em células hepáticas (SILVA et al., 2014). Dessa forma, a presença desses compostos pode, ao menos em parte, justificar a atividade citotóxica observada da fração ativa.

A presença destes compostos na fração hexânica de *P. neochilus* reforça o resultado encontrado por VIANA (2011), o qual constatou a presença de  $\alpha$ -amirina e friedelina no extrato hexânico das folhas e caules desta espécie. Também encontrou uma mistura de esteroides, sitosterol e estigmasterol, que não foi encontrada no atual estudo.

Alguns flavonoides e diterpenos são metabólitos secundários de maior ocorrência nas espécies de *Plectranthus*, já existindo na literatura o isolamento de flavonas, flavonóis e flavanonas (VIANA, 2011). No entanto, não foi possível isolar compostos pertencentes a estas classes.

A diferença de toxicidade, por meio do teste utilizando larvas de *Artemia salina*, observada em EHB e FH sugere que há atividade concomitante de substâncias presentes em EHB que possa impedir a ação citotóxica, o que diminui sua atividade. O isolamento destes compostos pode justificar a maior atividade citotóxica de FH.

A respeito da atividade citotóxica, em um estudo elaborado por Arcanjo e colaboradores (2012) foi avaliada a bioatividade frente à *Artemia salina* de algumas plantas medicinais utilizadas na medicina popular na região do nordeste. Uma das plantas utilizadas foi a *P. neochilus*, no qual seu extrato bruto etanólico apresentou uma indicação de atividade antitumoral. O que sugere mais estudos a respeito.

Atualmente, há um número limitado de estudos desta espécie de planta medicinal, porém os que já existem, estão apresentando resultados promissores. Com a finalidade de reforçar a importância de pesquisas sobre plantas medicinais de uso popular, o presente estudo pode contribuir para os avanços de pesquisas e desenvolvimento de futuros fitoterápicos.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da fração ativa do extrato hexânico de folhas de *Plectranthus neochilus* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) permitiu a identificação de quatro triterpenos, que foram caracterizados como friedelina,  $\alpha$ -amirina e lupeol.

O presente estudo foi o primeiro a identificar o triterpeno lupeol na espécie *Plectranthus neochilus*.

Por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando o revelador Verde de Bromocresol (Item 3.1.1.2), foi possível detectar a presença de ácidos graxos de cadeia longa em FH.

O espectro fornecido pelo CG-EM ainda é um método complementar para a identificação de substâncias. Portanto, é necessário utilizar outros métodos analíticos confirmatórios, como a análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para concluir a identificação destas moléculas em FH.

O resultado positivo para a citotoxicidade de *Artemia salina* confirma que *P. neochilus* tem uma atividade moderada sobre linhas de células tumorais humanas (KB), que são linhas de células tumorais correlacionadas com o teste em *Artemia salina*.

A atividade farmacológica dos três triterpenos identificados na fração ativa pode justificar, ao menos em parte, a atividade citotóxica encontrada pela fração hexânica.

Os resultados encontrados contribuem para a caracterização fitoquímica e biológica da espécie, porém são necessários mais estudos para auxiliar e justificar a atividade citotóxica para células tumorais, assim como atividade biológica desta espécie, já que se trata de uma planta com uso popular difundido e com poucas evidências científicas para o seu uso.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABDEL, M.M.; ALBAR, H.A.; BATTERJEE, S.M. **Chemistry of the Genus *Plectranthus***. *Molecules*, v.7, p. 271-301, 2002.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 114-40, 2007.
- ALMEIDA, F.M. et al. **Uso de plantas com finalidade medicinal por pessoas vivendo com HIV/ AIDS em terapia antirretroviral**. *Saúde e Sociedade*, v. 21, n. 2, p. 424-434, 2012.
- ALMEIDA, M.F.O. et al. **Constituintes químicos e atividade Leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae)**. *Química Nova*, v. 34, n. 7, 2011.
- ALVES, T.M.A. et al. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol.95, p. 367-373, 2000.
- ANDERSON, J.E. et al. **A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens**. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 107-111, 1991.
- APG III. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, n. 161, p.105-121, 2009.
- ARCANJO, D.D.R. et al. **Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine**. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.



- ASCENSÃO L., et al. **Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry.** Annals of Botany, v. 84, p. 437-447, 1999.
- BANDEIRA, J.M et al. **Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*.** Revista Brasileira Plantas Mediciniais, v. 13, n. 2, 2011.
- BANDEIRA, P.N. et al . **Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica alfa- e beta-amirina.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 2, p. 204-208, 2007.
- BARBOSA, L.C.A. **Química orgânica: uma introdução para as ciências agrárias e biológicas.** Viçosa: UFV, 354p, 1998.
- BOCARDI, J.M.B. **Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr.** **Dissertação.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2008.
- BRASIL, D.F.B. **Estudo químico e análise gastroprotetora dos principais constituintes das cascas das raízes de *Maytenus robusta* REISS (*Celastraceae*).**2013. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Itajaí, Santa Catarina. 2013.
- CODD, L. E. Lamiaceae. In: LEISTNER OA. (ed.). **Flora of Southern Africa.** Pretoria: Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply, v. 28, n. 4, p. 137-151, 1985.

CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA BELO HORIZONTE, 2013. Minas Gerais. *Anais...* Belo Horizonte: **A família Lamiaceae no complexo de serras da Bocaina e de Carrancas**, Minas Gerais, 2013.

COUTO, M.E.O. **Coleção de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília: Embrapa, 2006.

CREVELIN, E.J. et al. **Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2, 2015.

DIAS, M.O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A.C. **Separação semipreparativa de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência**. Química Nova, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DUARTE, M.R.; LOPES, J.F. **Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr. Lamiaceae**. Revista Brasileira Farmacognosia, v. 17, n. 4, 2007.

FREITAS, M.A.C. et al. **Crescimento e tolerância à salinidade em três espécies medicinais do gênero *Plectranthus* expostas a diferentes níveis de radiação**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 16, n. 4, p. 839-849, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora, 544p, 2002.

MANTEL, S.H.; MATTHEUS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 333p, 1994.

- MATTHEWS, R.S. **Artemia salina** s a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 18, n. 5, p. 919-22, 1995.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, v. 32, p. 513-524, 1988.
- NUNOMURA, R.C.S. et al. Constituintes químicos dos galhos de *Simaba guianensis* subesp. ecaudata (Cronquist). *Química Nova*, v. 35, n. 11, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SÚDE. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. World Health Organization, Geneve. 2013.
- CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião- dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal. Resolução nº082, de 19 de novembro de 2008. Distrito Federal.
- ROSAL, L.F. et al. **Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos**. *Revista Ceres*, v. 58, n. 5, 2011.
- SALEEM, M. Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. *Cancer Letters*, v. 2, n. 285, p.109–115, 2009.
- SACCARO JUNIOR N.L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. *Ambiente & Sociedade*, v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.

SANTOS, R.L. et al. **Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde.** Revista Brasileira de Plantas medicinais, v. 13, n. 4, 2011.

SEMINÁRIO DE ECONOMIA MINEIRA, 14, 2010. Minas Gerais. *Anais...* Belo Horizonte: **Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais**, 2010. p 1-10.

SIDDIQUE H.R.; SALEEM M. **Beneficial health effects of lupeol triterpene, a review of preclinical studies.** Life Sciences, v. 88, p. 285-293, 2011.

SILVA, C.A.M. et al. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapataceae).** 2007. 197f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SILVA, F.C.; Duarte, L.P.; VIEIRA FILHO S.A. **Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica.** Revista Virtual de Química, vol. 6, n. 4, 2014.

SILVA, M.I.G. et al. **Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.4, p. 455-462, 2006.

TEIXEIRA, D.F. **Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira-branca) em *Aedes aegypti*.** 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

VANINE, M. et al. **Utilização de plantas medicinais por pacientes oncológicos e familiares num centro de radioterapia.** Revista Electrónica Trimestral de Enfermaría, n. 21, 2011.

VIANA, A.J.S. **Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae).** 2011. 104 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

WALDIA S. et al. **The genus *Plectranthus* in India and its chemistry.** Chemistry and Biodiversity, v. 8, n. 2, p. 244-52, 2011.

ZANI, C.L. et al. **Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity.** Phytomedicine, vol. 2, p. 47-51, 1995