

MÁRCIA ALEXANDRA DOS SANTOS FILIPE

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESPÉCIES DO GÉNERO *PLECTRANTHUS***

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2020

MÁRCIA ALEXANDRA DOS SANTOS FILIPE

ISOLAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÉNERO *PLECTRANTHUS*

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 2 de Outubro de 2020, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º 227/2020 de 17 de Setembro de 2020, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof. Doutor Jaime Coelho

Orientador:

Prof.^ª. Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2020

*“É fazendo que se aprender a fazer
aquilo que se deve aprender a fazer”*

Aristóteles

DEDICATÓRIA

Dedico a presente dissertação à minha família, sem eles não teria chegado ao fim desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com o apoio de importantes pessoas sem as quais não a teria concretizado.

Em primeiro lugar, à minha orientadora, a Professora Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo, por me ter convidado a descobrir mais sobre a área da fitoquímica. A sua orientação, incentivo, disponibilidade e apoio foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Em segundo lugar, sou inteiramente grata aos meus pais, que são a peça fundamental para a concretização desta etapa. Sempre me apoiaram, estiveram presentes nas lágrimas sentidas e nas alegrias vividas. A eles o meu eterno obrigada.

Em terceiro lugar, agradeço às minhas amigas de curso. Não me veria nesta posição sem todo o apoio e carinho que me transmitiram ao longo destes 5 anos. À minha amiga, colega e companheira de casa, Helena Melo, por nunca me ter deixado desistir e por ter estado sempre ao meu lado durante toda esta caminhada. Obrigada amiga, por tudo!

Para finalizar, agradeço a toda a minha restante família e amigos, que estiveram presentes direta ou indiretamente nesta etapa. De uma maneira ou de outra permitiram que tudo acontecesse da melhor maneira possível.

A todos, o meu obrigada!

RESUMO

Os produtos naturais são uma fonte importante de novos compostos com usos terapêuticos. O estudo e isolamento de novos produtos de origem natural pode, consequentemente, desencadear o desenvolvimento de novos fármacos.

Neste trabalho foi realizada a preparação de extratos de duas espécies de plantas, *Plectranthus venter* van Jaarsv. & Hankey e *P. madagascariensis* (Pers.) Benth, ambas pertencentes à família *Lamiaceae*.

Na espécie *P. venter* foi preparado o seu extrato acetónico por um método de ultrassons e determinado o seu rendimento ($\eta = 1,15\%$, m/m). A toxicidade geral do extrato foi determinada recorrendo ao ensaio da *Artemia salina* L. (LC= 46,78%). Por último, foi avaliada a sua atividade antioxidante, pelo método espectralométrico de DPPH (AA= 3%).

Na espécie *P. madagascariensis* foi obtido o óleo essencial cujo isolamento por cromatografia a seco originou o abietano 6,7-dehidrooleanona (DeRoy, $\eta = 47,28\%$). Recorrendo ao modelo da *A. salina* L., o composto isolado demonstrou toxicidade geral (LC= 36,48%).

Estudos futuros devem ser concretizados com base no diterpeno de esqueleto abietano, DeRoy, de modo a dar continuidade a esta pesquisa para a descoberta de novos compostos com atividade biológica de interesse.

ABSTRACT

Natural products are an important source of new compounds with therapeutic uses. The study and isolation of natural products can trigger the discovery of new drugs.

Two *Plectranthus* genus species were used in this project, *P. venteri* and *P. madagascariensis*, both belonging to *Lamiaceae* family.

The acetonic extract of the specie *P. venteri* was prepared by an ultrasonic extraction method (yield= 1,15%, w/w). The general toxicity of the extract was determined using the *Artemia salina* model (LC= 46,78%). Lastly, its antioxidant activity was evaluated by the DPPH method (AA= 3%).

The essential oil was obtained from *P. madagascariensis* and the following isolation of the abietane 6,7-dehydroroyleanone (DeRoy, yield= 47,28%) by *Dry-flash chromatography* was performed. Using *Artemia salina* model, the isolated compound showed general toxicity (LC= 36,48%).

In order to give continuity to this research, futures studies should be made based on this DeRoy molecule, for the discovery of new compounds with interesting biological activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
% (m/m)	Porcentagem massa por massa
% (m/v)	Porcentagem massa por volume
% (v/v)	Porcentagem volume por volume
®	Marca registada
AA	Atividade antioxidante
AcOEt	Acetato de etilo
<i>A. salina</i> L.	<i>Artemia salina</i> L.
Benth.	Bentham (botânico inglês)
DeRoy	Dehidrooleanona
DHR	6,7-dehidrooleanona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EPm	Extrato de <i>Plectranthus madagascariensis</i>
Epv	Extrato de <i>Plectranthus venterii</i>
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
h	Hora
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potássio
L	Litro
LC	Concentração letal
LC ₅₀	Concentração letal para 50% da população exposta
m	Metro
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanómetro
OE	Óleo essencial

<i>P.</i>	<i>Plectranthus</i>
<i>P. madagascariensis</i>	<i>Plectranthus madagascariensis</i>
<i>P. venterii</i>	<i>Plectranthus venterii</i>
ppm	Partes por milhão
TLC	Thin-layer chromatography
UV	Ultra-violeta
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
μL	Microlitro
η	Rendimento
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
$\pm$	Mais ou menos

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XIV
I - INTRODUÇÃO	8
I.1. PLANTAS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS	9
I.1.1. PRODUTOS NATURAIS COM ACTIVIDADE ANTINEOPLÁSICA	9
I.2. GÉNERO <i>PLECTRANTHUS</i>	11
I.3. DITERPENOS	12
I.3.1. DITERPENOS DE ESQUELETO ABIETANO	13
I.3.1.1. ROILEANONAS	14
I.4. <i>PLECTRANTHUS VENTERI</i>	15
I.5. <i>PLECTRANTHUS MADAGASCARIENSIS</i>	17
I.6. <i>ARTEMIA SALINA</i>	19
II- MATERIAIS E MÉTODOS	21
II.1. REAGENTES	22
II.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	22
II.3. MATERIAL VEGETAL	22
II.4. <i>PLECTRANTHUS VENTERI</i>	23
II.4.1. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	23
II.4.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	24
II.4.2.1. ENSAIO QUALITATIVO	24
II.4.2.2. ENSAIO QUANTITATIVO	25
II.4.3. BIOENSAIO DE LETALIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i> L.	26
II.5. <i>PLECTRANTHUS MADAGASCARIENSIS</i>	27

II.5.1. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA PLANTA	27
II.5.2. ISOLAMENTO DA 6,7-DEHIDROROILEANONA	27
III- RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
III.1. PREPARAÇÃO DE EXTRATO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	29
III.2. TOXICIDADE GERAL DE <i>P. VENTERI</i>	31
III.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>P. VENTERI</i>	32
III.4. EXTRATO <i>P. MADAGASCARIENSIS</i>	33
III.5. ISOLAMENTO E RECRISTALIZAÇÃO DA 6,7-DEHIDROROILEANONA	34
III.6. TOXICIDADE GERAL DA 6,7-DEHIDROROILEANONA	36
IV- CONCLUSÃO	37
V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Tronco de <i>Taxus brevifolia</i> (1), <i>Taxus baccata</i> (2), Arilos (maduros e imaturos) e folhagem de <i>Taxus baccata</i> (3). [adaptado de Powell, D. (Bugwood.org); https://pt.wikipedia.org/wiki/Taxus_baccata , visitado a 30/01/2020]	10
Figura 2- Estrutura do Paclitaxel (1) e do Docetaxel (2). [adaptado de (Borozan, 2018)]	11
Figura 3- Esquema da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns. [adaptado de (P. D. de M. Rijo, 2010)]	13
Figura 4- Estrutura molecular da Roileanona. [retirado de (Borozan, 2018)]	14
Figura 5- Flores e folhagem de <i>P. venterii</i> . [adaptado de (McQuillan, 2018)]	15
Figura 6- Estrutura química dos compostos 2-hidroxi-3,4,5,6-tetrametoxi-acetofenona (1) e 2-hidroxi-4,5,6-trimetoxi-acetofenona (2). [adaptado de (Maree et al., 2014)]	16
Figura 7- Flores e folhagem de <i>P. madagascariensis</i> . [adaptado de (Harrower, 2014)]	17
Figura 8- Estrutura química do composto maioritário do extrato de <i>P. madagascariensis</i> : <i>7α,6β-dehidroileanona</i> . [adaptado de (Garcia et al., 2018)]	18
Figura 9- Estrutura química dos principais compostos do extrato de <i>P. madagascariensis</i> : Ácido rosmarínico (1), <i>7α,6β-dehidroileanona</i> (2), <i>7α-formyloxy-6β-hydroxyroyleanone</i> (3), <i>7α-acetoxy-6β-hydroxyroyleanone</i> (4) e coleon U (5). [adaptado de (Matias, Nicolai, Saraiva, et al., 2019)]	18
Figura 10- Observação microscópica de <i>A. salina</i> L. adulto (macho e fêmea). [adaptado de Dumitrascu, 2011]	20
Figura 11- Fases de preparação do extrato.....	23
Figura 12- Esquema da reação que ocorre no método DPPH. [adaptado de (Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, & Borges, 2013)].....	24
Figura 13- Frações obtidas por cromatografia a seco.	27
Figura 14- Resultado TLCs a 254 nm e 366 nm.	30
Figura 15- Resultado do TLC do composto recristalizado.	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da toxicidade geral LC ₅₀ (µg/mL) em <i>A. salina</i> dos extratos acetónicos seleccionados de <i>P. madagascariensis</i>	19
Tabela 2- Resultados das extrações do extrato de <i>P. venterii</i>	29
Tabela 3- Resultado do rendimento do extrato de <i>P. venterii</i>	29
Tabela 4- Resultados da massa e rendimento do óleo essencial extraído da <i>P. madagascariensis</i>	33
Tabela 5- Resultados das frações do extrato de <i>P. madagascariensis</i>	34
Tabela 6- Resultados da junção das frações.	34
Tabela 7- Resultados da massa e rendimento 6,7- dehidrooleanona recristalizada.	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Resultados da percentagem de mortalidade de <i>P. venter</i> em <i>A. salina</i> L....	31
Gráfico 2- Resultados da atividade antioxidante de <i>P. venter</i> à concentração de 10 µg/mL.	32
Gráfico 3- Resultados da percentagem de mortalidade de 6,7-dehidrooleanona (DHR) em <i>A. salina</i> L.	36

I - INTRODUÇÃO

I.1. PLANTAS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

A natureza é uma fonte atrativa para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos, devido à enorme diversidade química que se encontra em espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos. A diversidade química de muitos dos organismos vivos reflete o impacto da evolução na seleção e conservação de mecanismos de autodefesa, utilizados para afastar ou destruir predadores (Da Rocha, Lopes, & Schwartzmann, 2001).

Cerca de 80% dos fármacos anticancerígenos utilizados na medicina moderna são produtos naturais, derivados ou inspirados em produtos naturais. O desenvolvimento de novos produtos a partir de fontes naturais pode ser uma barreira, em comparação com o desenvolvimento a partir de produtos sintéticos. Para um composto natural tem de se obter uma quantidade suficiente de amostra para ser estruturalmente identificado e isolado o princípio ativo de interesse. O que se torna numa tarefa difícil e morosa, tal como a síntese para obter quantidades necessárias. Estas barreiras tornaram-se evidentes em compostos como o paclitaxel e docetaxel que foram e continuam, atualmente a serem fundamentais no tratamento de diversos tipos de cancro (Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2015; Da Rocha et al., 2001).

Atualmente, a síntese total foi alcançada e principalmente a semi-síntese já não é um entrave ao desenvolvimento de novos compostos (Da Rocha et al., 2001).

I.1.1. PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

As substâncias de origem natural com aplicação medicinal com estrutura química de elevada complexidade inviabilizam, de forma geral, a sua obtenção semi-sintética.

Entre os anos 1960 e 1971, foram identificadas e isoladas amostras de planta *Taxus brevifolia* Nutt da família Taxaceae, designadas de “taxol” (Pessoa, 2013).

Após os primeiros estudos realizados ao novo agente antineoplásico foi questionada a viabilidade da sua exploração. Este composto obtido da casca de teixo é, no entanto, um recurso finito. Também o baixo rendimento de isolamento impedia a progressão da aplicabilidade clínica, uma vez que eram necessários mais de 27 000 kg de cascas para a obtenção de 1,9 kg de Taxol® (Maciel, Gomes, E. S.; Pinto, Cólus, & N. S. S.; Grynberg, N. F.; Echevarria, 2007).



Tronco *Taxus brevifolia* (1)



Taxus baccata (2)



Arilos (maduro e imaturo) e
folhagem de *Taxus baccata*

Figura 1- Tronco de *Taxus brevifolia* (1), *Taxus baccata* (2), Arilos (maduros e imaturos) e folhagem de *Taxus baccata* (3). [adaptado de Powell, D. (Bugwood.org); https://pt.wikipedia.org/wiki/Taxus_baccata, visitado a 30/01/2020]

Em 1988, chegou-se ao docetaxel, análogo semissintético derivado das folhas do pinheiro inglês *Taxus baccata*, que apresentava o esqueleto básico e as mesmas funcionalidades do Taxol®. O paclitaxel (Taxol®) é um diterpeno biologicamente ativo com potente ação antineoplásica. O seu efeito anti-mitótico interfere com o funcionamento dos microtúbulos, conduzindo ao bloqueio do ciclo celular e, consequentemente, à morte celular por apoptose. Este fármaco, juntamente com o seu derivado, docetaxel, pertencem ao grupo farmacoterapêutico designado de citotóxicos (Ladeiras D, Monteiro C, Pereira F, Reis C, Afonso C, 2016).

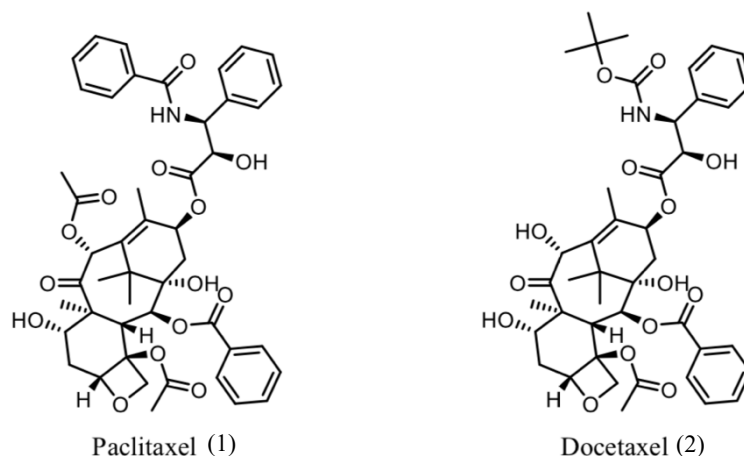


Figura 2- Estrutura do Paclitaxel (1) e do Docetaxel (2). [adaptado de (Borozan, 2018)]

Atualmente são citostáticos de uso clínico no tratamento de vários tumores, tais como: cancro do ovário, mama, pulmão de não-pequenas células, cabeça, pescoço e, também, no sarcoma de Kaposi's. (Pessoa, 2013)

I.2. GÉNERO *PLECTRANTHUS*

O género *Plectranthus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L' Héritier, em 1788. Este género pertence à família *Lamiaceae*. Atualmente, estima-se que existam mais de 300 espécies identificadas e distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de África, Madagáscar, Índia, Austrália e algumas ilhas do Pacífico (Matias, Nicolai, Fernandes, et al., 2019; P. D. de M. Rijo, 2010). À família *Lamiaceae* pertence também géneros como a *Salvia* (*Salviae*) e a *Menta* (*Mentha*) que apresentam grande diversidade de usos etnobotânicos (P. D. de M. Rijo, 2010).

Este género de plantas é utilizado tradicionalmente no tratamento de doenças do sistema respiratório, trato gastrointestinal, sistema nervoso, dor, problemas dermatológicos e diferentes tipos de cancro. Tudo isto é possível devido às suas propriedades medicinais com ações antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica (Gaspar-Marques, Rijo, Simões, Duarte, & Rodriguez, 2006; Gurgel et al., 2009; Kubínová et al., 2014; Lukhoba, Simmonds, & Paton, 2006; Marques et al., 2002).

A designação *Plectranthus* significa spurflower (plectron= esporão, anthos= flor), referindo-se ao esporão característico na base do tubo da corola do primeiro *Plectranthus*

descoberto do género *Plectranthus fruticosus*. O nome não corresponde a todo o género, visto que poucos são os *Plectranthus* que apresentam estas características. Facto que L'Heritier desconhecia em 1788, quando descreveu a planta (Rice, Brits, Potgieter, & Van Staden, 2011).

Algumas das espécies de *Plectranthus* são de difícil identificação, devido à escassez de critérios morfológicos bem definidos para descrever as inúmeras espécies do género. Para além disso, há inúmeros problemas taxonómicos na nomeação de espécies, resultando em espécies colocadas em géneros diferentes, intimamente relacionados, designados de *Coleus*. (Lukhoba et al., 2006)

Estudos outrora realizados na área da fitoquímica demonstraram, em algumas espécies de *Plectranthus*, a presença de uma elevada quantidade de diterpenos quinonas, roileanonas e triterpenos. Os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante presente nestas espécies são os triterpenos (Borozan, 2018; Patrícia Rijo et al., 2012).

I.3. DITERPENOS

Os diterpenos são compostos naturais que constituem a segunda maior classe de terpenos. Estruturalmente, são constituídos por um esqueleto de hidrocarboneto com vinte átomos de carbono, que corresponde a quatro unidades de isopreno. Conhecem-se mais de dois mil compostos, pertencentes a cento e trinta tipos esqueléticos diferentes. A diversidade de ciclização (acíclicos ou lineares, bicíclico, tricíclico, tetracíclico, pentacíclico e macrocíclico) do esqueleto de hidrocarbonetos, juntamente com uma ampla gama de grupos funcionais de oxigénio (carbonilos, epóxidos, quinonas, hidroxilos, ácidos e derivados de ácidos) convergem na multiplicidade de fatores farmacológicos dos diterpenos (Garcia, Teodósio, et al., 2019; P Rijo, Faustino, & Simões, 2013).

Na família *Lamiaceae*, os diterpenos podem ser divididos em noventa e um esqueletos diferentes. O interesse no isolamento destes compostos tem um aumento decorrente da sua atividade biológica, função taxonómica, função ecológica e utilização para síntese. O principal diterpeno presente nas diversas espécies de *Plectranthus* é o esqueleto de abietano. Todavia, existem outros esqueletos como labdano, clerodano, halimano, kaurano, pimarano e beierano (**Figura 3**) (Borozan, 2018; P. D. de M. Rijo, 2010).

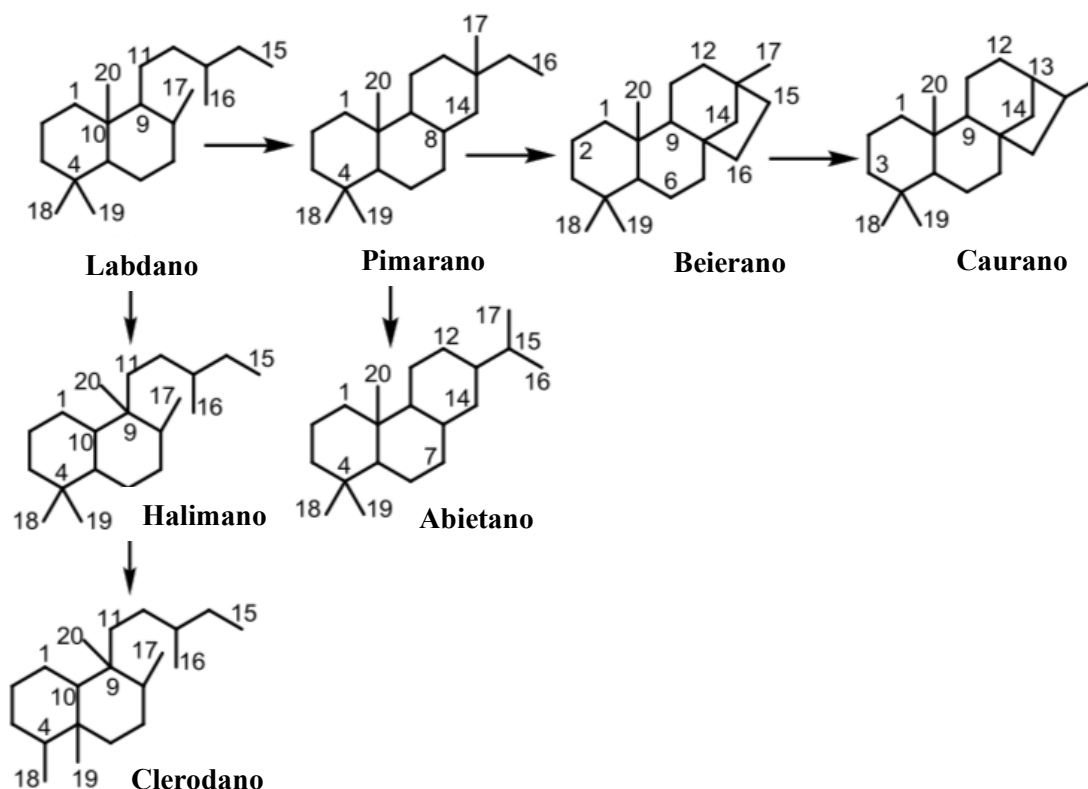


Figura 3- Esquema da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns. [adaptado de (P. D. de M. Rijo, 2010)]

I.3.1. DITERPENOS DE ESQUELETO ABIETANO

Os diterpenos podem ser divididos em dois grupos distintos. O primeiro grupo tem na primeira etapa de formação o ião pirofosfato, enquanto que o segundo grupo é formado por ciclizações, sem recurso ao ião pirofosfato (Taveres, 2019).

Os esqueletos abietano são metabolitos secundários diterpénicos tricíclicos e são os mais vulgarizados na família *Lamiaceae*. Estes são recorrentemente isolados de espécies de *Plectranthus* spp (P Rijo et al., 2013).

Os diterpenóides de abietano ou os seus derivados apresentam um vasto espectro de atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiano, efeito gastroprotetor e, sobretudo, atividade antiproliferativa das linhas celulares de tumores humanos (Areche C, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, 2009).

Devido às propriedades biológicas demonstradas, o esqueleto abietano tem um elevado potencial medicinal e farmacológico para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo, por isso, dos mais estudados (Abdel-Mogib, Albar, & Batterjee, 2002).

I.3.1.1. ROILEANONAS

As roileanonas são diterpenos do tipo abietano com uma fração hidroxil-*para*-quinona (**Figura 4**). Foram assim denominados, em 1962, após o isolamento de um pigmento de cor amarela, derivada da planta *Inula Royleana*.

Geralmente, as roileanonas apresentam um anel C quinoide, um anel B oxidado e podem também ter um anel A oxidado. Os grupos funcionais hidroxil- e carbonil- encontram-se habitualmente em C₁₁, C₇ e C₆ (Garcia, Teodósio, et al., 2019; Ladeiras D, Monteiro C, Pereira F, Reis C, Afonso C, 2016).

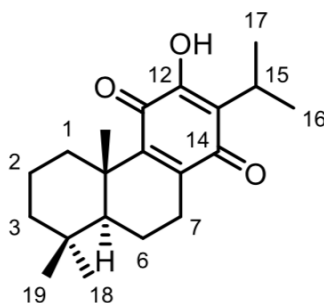


Figura 4- Estrutura molecular da Roileanona. [retirado de (Borozan, 2018)]

A presença do cromóforo 12-hidroxi-11, 14-*p*-benzoquinona no anel C do esqueleto de abietano é responsável, principalmente, pelo seu pigmento natural (Garcia, Teodósio, et al., 2019; Ladeiras D, Monteiro C, Pereira F, Reis C, Afonso C, 2016).

Sabe-se, também, que a capacidade de as quinonas induzirem citotoxicidade exige a sua bioativação, através da redução de um eletrão. Este, corresponde aos radicais livres da semiquinona, sendo o processo mediado por diversas enzimas (Ferreira, Candeias, Simões, Nascimento, & Cruz Moraes, 1997; Garcia, Teodósio, et al., 2019).

I.4. *PLECTRANTHUS VENTERI*

Plectranthus venteri Van Jaarsv. & A. Hankey foi descrita pela primeira vez por Ernst van Jaarsveld e A. Hankey, em 1997. O nome atribuído à espécie foi em homenagem a Fanie Venter, botânica e ecóloga que coletou a espécie em Sekhukhuniland, na província de Limpopo.

P. venteri é muito distinta de outras espécies de *Plectranthus* spp. e é improvável que seja confundido com outras.



Figura 5- Flores e folhagem de *P. venteri*. [adaptado de (McQuillan, 2018)]

A presente espécie caracteriza-se por ser um arbusto ereto, multistemático e aromático com 0,3 a 0,6 m de altura e até 1 m de diâmetro. Todo o arbusto é coberto por pêlos que impedem a entrada de insetos e, quando tocados, estes secretam óleos etéreos que libertam um intenso aroma. As folhas têm uma atraente forma triangular com margens lobadas ou dissecadas. Desde o final do verão até ao outono exibe flores de coloração malva a violenta. A sua corola é tubular, com uma ligeira curvatura e tem cerca de 8 a 10 mm de comprimento. As sementes podem apresentar coloração castanho escuro a preto. É uma planta de crescimento rápido e com uma longa vida. Tradicionalmente, é conhecida por ser um bom repelente de insetos (McQuillan, 2018).

No trabalho de Johanna E. Maree *et al.*, sobre acetofenonas bioativas da *P. venteri*, foi investigada a química desta espécie a partir de extratos diclorometânicos das partes aéreas de *P. venteri*. Foram isolados duas acetofenonas, já anteriormente conhecidas de produtos naturais: 2-hidroxi-3,4,5,6-tetrametoxi-acetofenona (**1**) e 2-hidroxi-4,5,6-trimetoxi-acetofenona (**2**).

Demonstrou uma notável atividade inibitória contra a transferência de plasmídeo bacteriano IncW R7K, num ensaio de inibição de transferência de plasmídeo bacteriano (Maree et al., 2014).

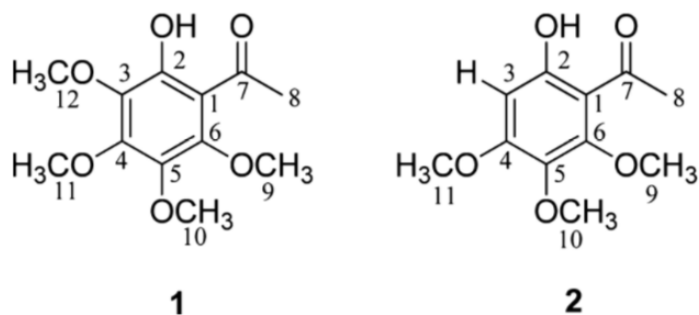


Figura 6- Estrutura química dos compostos 2-hidroxi-3,4,5,6-tetrametoxi-acetofenona (**1**) e 2-hidroxi-4,5,6-trimetoxi-acetofenona (**2**). [adaptado de (Maree et al., 2014)]

I.5. *PLECTRANTHUS MADAGASCARIENSIS*

Plectranthus madagascariensis (pers.) Benth. foi recolhida pela primeira vez em 1775, por Philibert Commerson nas Maurícias. O seu nome científico *madagascariensis*, significa “de Madagáscar” (Harrower, 2014). Atualmente, encontra-se espalhada por todo o mundo.



Figura 7- Flores e folhagem de *P. madagascariensis*. [adaptado de (Harrower, 2014)]

A espécie *P. madagascariensis* é considerada uma erva aromática, utilizada tradicionalmente no tratamento de doenças respiratórias e cutâneas. A sua utilização pode ser feita de duas formas distintas, através da maceração da folhagem da planta usada no tratamento de sarna e pequenas feridas e, recorrendo à infusão de planta inteira, é utilizada no tratamento de tosse, asma e gripes (Borozan, 2018).

Os diterpenos do tipo abietano de *Plectranthus* spp. apresentam atividade antimicrobiana. Para além desta atividade, os extratos acetónicos de *P. madagascariensis* demonstraram, também, capacidade antioxidante e repelente de insetos.

Em estudos anteriormente realizados foi descoberto que o componente maioritário no óleo essencial, o diterpeno abietano 6 α , 7 β -dehidroileanona (**Figura 8**) demonstra propriedades citotóxicas. Este composto é facilmente identificado devido à sua cor característica laranja-avermelhada (Garcia, Ntungwe, et al., 2019; Matias, Nicolai, Fernandes, et al., 2019).

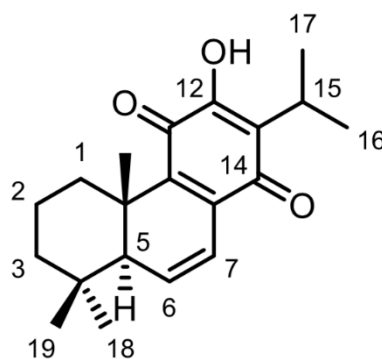


Figura 8- Estrutura química do composto maioritário do extrato de *P. madagascariensis*: 7 α ,6 β -dehidrooleanona. [adaptado de (Garcia et al., 2018)]

No estudo de Diogo Matias *et al.*, sobre a atividade citotóxica de roileanonas na espécie *P. madagascariensis*, foi demonstrado a atividade citotóxica dos principais compostos identificados, ácido rosmarínico e diterpenos do tipo abietano 7 α , 6 β -dehidrooleanona, 7 α -formiloxi-6 β -hidroxi-hidrooleanona, 7 α -acetoxi-6 β -hidroxi-leanona e coleon U em linhas celulares de cancro humano, incluído cancro da mama (MDA-MB-231, MCF-7), cancro do cólon (HCT116) e cancro do pulmão (NCI-H460, NCI-H460 / R). Evidenciou, também, atividade citotóxica em células saudáveis do pulmão (MCR-5).

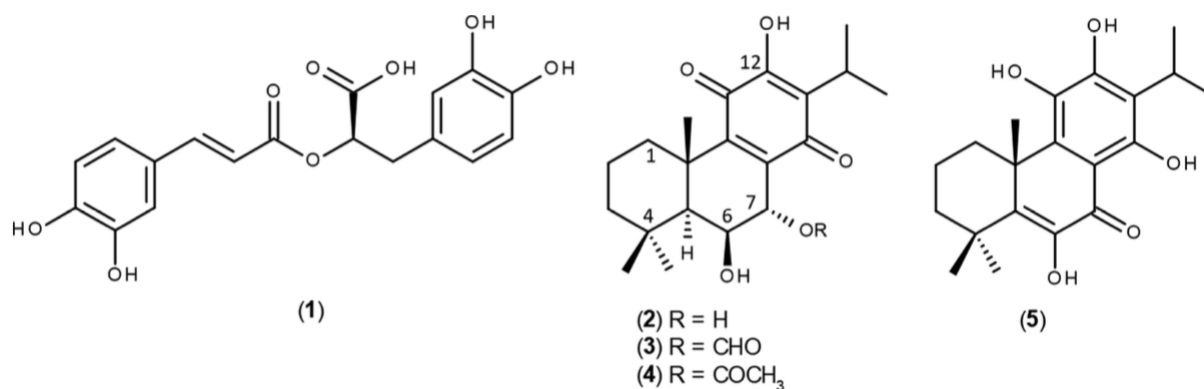


Figura 9- Estrutura química dos principais compostos do extrato de *P. madagascariensis*: Ácido rosmarínico (1), 7 α ,6 β -dehidrooleanona (2), 7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone (3), 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (4) e coleon U (5). [adaptado de (Matias, Nicolai, Saraiva, et al., 2019)]

Os vários extratos de *P. madagascariensis* foram preparados através da utilização de diferentes solventes como acetona, metanol e CO₂ supercrítico e, recorrendo a diversas técnicas de extração como maceração, ultra-extração fluída assistida por som e supercrítica (Matias, Nicolai, Saraiva, et al., 2019).

No trabalho de Catarina Garcia *et al.*, sobre a pesquisa de citotoxicidade de extratos de *Plectranthus*, foi avaliado a toxicidade preliminar de um extrato de *Plectranthus madagascariensis* através da realização do teste de letalidade em *Artemia salina* L. (LC= 9,67% a 100 µg/mL). O método de toxicidade geral em *A. salina* L. foi testado segundo o método de Zhang *et al.* 2012, com ligeiras alterações.

Extratos acetónicos	Mortalidade (%) à Concentração de 100 ppm	LC ₅₀ (µg/mL)
<i>P. madagascariensis</i> var “Lynne”	9,67 ± 0,93	91,7
DMSO	22,50± 3,54	N.A.

N.A. – Não se aplica

Tabela 1- Resultados da toxicidade geral LC₅₀ (µg/mL) em *A. salina* dos extratos acetónicos selecionados de *P. madagascariensis*.

Este estudo reiterou o potencial interesse nestas espécies, mas também determinou a origem da atividade biológica em certos componentes, tais como, no abietane diterpeno de Pavifloron D (Garcia, Ntungwe, *et al.*, 2019).

I.6. ARTEMIA SALINA

Artemia salina, camarão de salmoura, é um microcrostáceo da ordem *Anostraca* (sem carapaça) que vive em lagos e lagoas com elevada salinidade (60 a 300 ppt). Desde o período Triássico que estes crustáceos sofreram poucas modificações. Apresentam um corpo segmentado e ligado a apêndices que se assemelham a folhas. O seu tamanho pode variar consoante o género feminino ou masculino, tendo entre 8-10 mm nos adultos machos e 10-12 mm nas fêmeas. Produzem ovos que tem a capacidade de flutuar na água e que podem evoluir para náuplios (*A. salina* jovem) ou, em caso de condições desfavoráveis, evoluir para cistos (forma de vida dormente) que conseguem sobreviver até 80 anos em condições extremas (Dumitrascu, 2011; Lagarto Parra, Silva Yhebra, Guerra Sardiñas, & Iglesias Buela, 2001; R. Hamidi, Jovanova, & Kadifkova Panovska, 2014).

A. salina é um modelo de crustáceo muito importante utilizado na avaliação preliminar da toxicidade geral de vários compostos, entre eles, extratos de plantas, pesticidas, toxinas fúngicas, nanopartículas inorgânicas e materiais dentários. Este invertebrado pode ser usado em

duas fases da vida para a realização dos testes: como náuplios e no estado adulto (Dumitrascu, 2011).

O ensaio de toxicidade consiste na letalidade de camarões de salmoura na presença de compostos biológicos e/ou químicos, através da estimativa da dose letal para 50% de uma população (LC_{50}). Este ensaio permite, desta forma, um teste simples e financeiramente acessível para a triagem de toxicidade, apresentando resultados altamente reprodutíveis e precisos, uma vez que a *A. salina* possui um ciclo de vida curto (4 semanas) (Anaya-Esparza et al., 2019; Vitorino, Mantovanelli, Zanotto, & Espósito, 2015).



Figura 10- Observação microscópica de *A. salina* L. adulto (macho e fêmea). [adaptado de Dumitrascu, 2011]

Estes crustáceos são reguladores hipo- e hiperosmóticos capazes de manter as concentrações de iões de hemolinfa dentro dos limites estreitos aquando de uma salinidade extrema de 0,26% de NaCl em salmouras supersaturadas (Ates, M.; Daniels, J.; Arslan, Z.; Farah, 2011).

A técnica de bioensaio que utiliza o camarão de salmoura tem ultrapassado largamente o método com camundongos, em termos de sensibilidade, simplicidade e precisão (Rodriguez, Teixeira, Salles, Vital, & Peixoto, 2012).

Deste modo, pode verificar-se o interesse nas plantas do género *Plectranthus* spp. que originou o presente estudo. Adicionalmente este trabalho foi realizado em colaboração no projeto de doutoramento de Catarina Garcia.

II- MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. REAGENTES

Solventes extratores (acetona, acetato de etilo, metanol e *n*-hexano) com grau analítico e obtidos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); DMSO da Merck (Darmstadt, Alemanha); Ácido ascórbico da Sigma-Aldrich; Sal com *Artemia* JBL; Ovos de *Artemia* JBL (JBL GmbH e Co. KG, D- 67141 Neuhausen Alemanha); Sílica gel 60 de alta pureza (1,09385,1000; malha 230-400; Merck KGaA 64271 Darmstadt, Alemanha); Mistura de ácido sulfúrico/metanol (H₂SO₄/MeOH) para revelação das placas de sílica.

II.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Aparelho de ultrassons (VWR); Papel de filtro Whatman N° 5 (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA); Evaporador Rotativo (Sigma-Aldrich, IKA® HBR 4 banho de aquecimento básico, Essen, Alemanha); Cromatografia a seco 07734.1000 (Merck); Cistos de camarão salmoura (obtidos da JBL GmbH e Co. KG, D-67141 Neuhausen Alemanha); Lâmpada UV-visível (254 e 366 nm); Espectrofotómetro (U-1500, Hitachi Instruments); Microscópio óptico (OE, CETI Bélgica); Microplacas de 24 poços; Bomba de ar de aquário (HI-FLO Single® Type 4000); Termóstato AQUA LYTIC®.

II.3. MATERIAL VEGETAL

As plantas *P. madagascariensis* e *P. venterii* foram obtidas através de estacas do Jardim Botânico Nacional de Kirstenbosch (Cidade de Cape, África do Sul). Sendo, posteriormente, cultivadas no Parque do Jardim Botânico da Ajuda (Instituto Superior Agrário, Lisboa).

Os *vouchers specimens* foram depositados no Herbário João de Carvalho e Vasconcelos do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (ISA). As plantas estudadas das espécies *P. madagascariensis* e *P. venterii* apresentam, respetivamente, os *vouchers* 841/2007 e 652/2007.

O material vegetal utilizado foi recolhido entre Junho e Setembro de 2007 e Julho de 2007, respetivamente. Seco à temperatura ambiente e armazenado, protegido da luz e da humidade.

II.4. *PLECTRANTHUS VENTERI*

II.4.1. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O extrato foi preparado a 10% (m/v), através da utilização do método de extração por ultrassons (Ntungwe N et al., 2017; Patrícia Rijo et al., 2014).

Cerca de 10 g de folhas e caules de planta seca foram trituradas em moinho e pesadas. O procedimento de extração foi realizado em triplicado e utilizado o método de ultrassons durante 60 minutos a, aproximadamente 25 °C, usado acetona. As suspensões foram filtradas através do uso de papel de filtro. No final de cada filtração, o solvente foi removido recorrendo ao evaporador rotativo, a uma temperatura entre os 40 e os 50 °C (Ntungwe N et al., 2017; Patrícia Rijo et al., 2014).

Os extratos finais foram pesados e, de seguida, foram colocados em *ependorfs* e dissolvidos em DMSO, até perfazer uma concentração de 10 mg/mL (Ntungwe N et al., 2017).



Figura 11- Fases de preparação do extrato.

O rendimento de extração foi calculado através da utilização da seguinte fórmula descrita na **Equação 1** (Ntungwe N et al., 2017).

$$\text{Equação 1: } \eta \text{ (m/m)(\%)} = \frac{\text{composto obtido (g)}}{\text{planta seca (g)}} \times 100$$

Para finalizar foi concretizada, através de TLC, a análise cromatográfica do extrato, sendo visualizada ao comprimento de onda de 254 nm e 366 nm.

II.4.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

II.4.2.1. ENSAIO QUALITATIVO

A atividade antioxidante pode ser determinada por diversos métodos, sendo um dos mais utilizados o método DPPH• criado por Tepe *et al.*, 2005. Este método consiste na capacidade dos extratos em recaptar radicais livres. O ensaio qualitativo é um método de rastreio rápido, realizado antes do ensaio quantitativo, com o intuito de se obter uma avaliação preliminar da capacidade antioxidante dos compostos em estudo (Ntungwe N et al., 2017; Patrícia Rijo et al., 2012).

O DPPH é um radical livre estável, que ao reagir com um composto antioxidante, doa o seu ião de hidrogénio e é reduzido (**Figura 12**). Com esta reação há uma mudança de coloração que pode ir de um púrpura escuro até um amarelo claro (Patrícia Rijo et al., 2012).

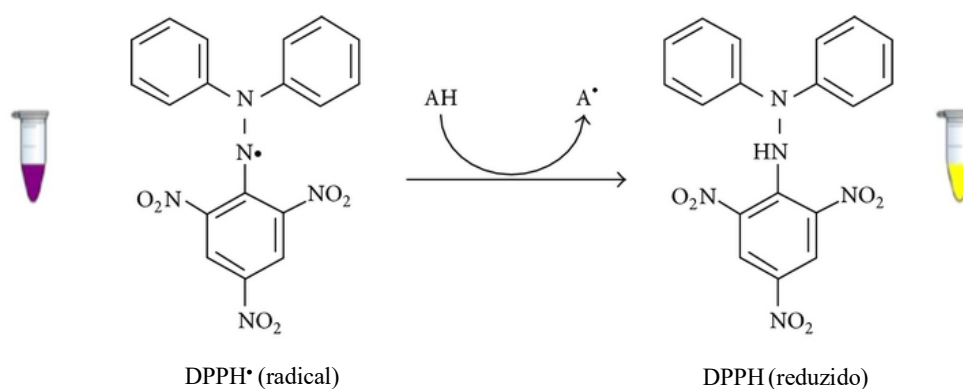


Figura 12- Esquema da reação que ocorre no método DPPH. [adaptado de (Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, & Borges, 2013)]

Os extratos com capacidade antioxidante (reduzir o radical DPPH) apresentaram manchas amarelas contra um fundo púrpura, sendo que quanto mais intensa foi a coloração amarela, maior a atividade antioxidante do extrato (Patrícia Rijo et al., 2012).

II.4.2.2. ENSAIO QUANTITATIVO

O ensaio quantitativo foi realizado de forma a confirmar os resultados observados no ensaio qualitativo. Para avaliar a atividade antioxidante total recorreu-se ao método espectrofotométrico, que consistiu na monitorização da diminuição da absorvância do radical DPPH, aquando da presença de antioxidantes (Ntungwe N et al., 2017).

O extrato acetónico foi testado a uma concentração de 1 mg/mL, sendo realizado em triplicado. Foram utilizados 10 µL de solução do extrato de planta (amostra) a 990 µL de solução de DPPH 0,2% (v/v) em metanol. As soluções foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida ao comprimento de onda de 517 nm, sendo a amostra lida contra o correspondente branco. A atividade antioxidante foi calculada através da (**Equação 2**) (Ntungwe N et al., 2017; Patrícia Rijo et al., 2014).

$$\text{Equação 2: AA (\%)} = \left[\frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \right] \times 100$$

Sendo AA, a atividade antioxidante expressa em percentagem, A_{DPPH} a absorvância do ensaio controlo do DPPH contra o branco e $A_{amostra}$ a absorvância do ensaio realizado com a amostra (extrato) (Ntungwe N et al., 2017; Patrícia Rijo et al., 2014).

A quercetina à concentração de 1 mg/mL foi utilizado como controlo positivo, uma vez que esta apresenta atividade antioxidante comprovada (Baghel, Shrivastava, Baghel, & Rajput, 2012).

II.4.3. BIOENSAIO DE LETALIDADE EM *ARTEMIA SALINA* L.

O método de toxicidade geral em *A. salina* L. foi testado segundo o método de Catarina Garcia, 2019 (Garcia, Ntungwe, et al., 2019), com ligeiras alterações.

Primeiramente à realização do ensaio, os ovos de *A. salina* L. foram colocados a desenvolver. Os cistos foram chocados numa solução de água do mar artificial com concentração de 35 g/L, que consistiu em 500 mL de água da torneira com três colheres de sal (Ntungwe N et al., 2017).

Face ao exposto, existem, ainda, importantes parâmetros que tem que ser respeitados para uma eficiente eclosão dos ovos, como a temperatura constante entre os 28-30°C, o pH da água a 8.0, oxigenação da água e a presença de movimento contínuo (conseguida através da utilização de uma bomba de aquário).

O extrato foi utilizado a uma concentração de 10 mg/L. O DMSO, controlo negativo do solvente, foi usado à concentração de 10 mg/L. O controlo positivo utilizado foi o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e, o controlo negativo do meio, foi a solução salina.

Este método foi realizado numa placa de poços, em triplicado. Cerca de dez a quinze náuplios foram transferidos para uma placa de 24 poços, contendo água do mar artificial, onde foi adicionado 100 µL de extrato.

Após 24 horas a 24 °C foi registado o número de náuplios de *A. salina* L. mortos, com recurso a um microscópio ótico (Ntungwe N et al., 2017). De seguida, adicionou-se 100 µL de $K_2Cr_2O_7$ (100 mg/mL) e voltou a contar-se o número de náuplios mortos.

A percentagem de mortes de náuplios de *A. salina* L. foi calculada utilizando a fórmula descrita na (**Equação 3**) (Ntungwe N et al., 2017).

$$\text{Equação 3: Taxa de mortalidade (\%)} = \frac{\text{Náuplios totais} - \text{Náuplios vivos}}{\text{Náuplios totais}} \times 100$$

II.5. *PLECTRANTHUS MADAGASCARIENSIS*

II.5.1. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA PLANTA

O presente procedimento foi otimizado através do procedimento descrito no artigo *Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroleanone obtained by optimized extraction*, de Catarina Garcia (Garcia, Monteiro, Saraiva, & Bessa, 2016).

Cerca de $46,86 \pm 3,51$ g de planta seca (folhas e caules) foram imersas em 1 L de água destilada e sujeita a hidrodestilação com recurso ao *Clevenger* (destilação a vapor), para se proceder à extração do óleo essencial. Todas as extrações foram realizadas em triplicado e cada hidrodestilação realizada até a exaustão. O OE foi coletado em *n*-hexano e o solvente foi posteriormente evaporado até a secura a 40 ° C no evaporador rotativo. Para finalizar, na análise do extrato foi preparada uma placa de TLC com o objetivo de visualizar o composto maioritário.

II.5.2. ISOLAMENTO DA 6,7-DEHIDROROILEANONA

A amostra de OE obtida pelo aparelho de Clevenger foi dissolvida numa quantidade mínima de *n*-hexano. O fracionamento inicial foi obtido por cromatografia a seco, em sílica gel 60 de alta pureza (25 g), eluído, primeiramente, com *n*-hexano, seguido de uma mistura de *n*-hexano:AcOEt (90:10), AcOEt:MeOH (1:1) e, finalmente, com metanol. Das vinte e quatro frações obtidas, as frações semelhantes foram combinadas para produzir 3 junções de frações (**Tabela 5**). Com base no estudo por cromatografia em camada fina, as frações 11 a 18, (**Tabela 6**) contendo o diterpeno de interesse, foram recristalizadas com metanol.

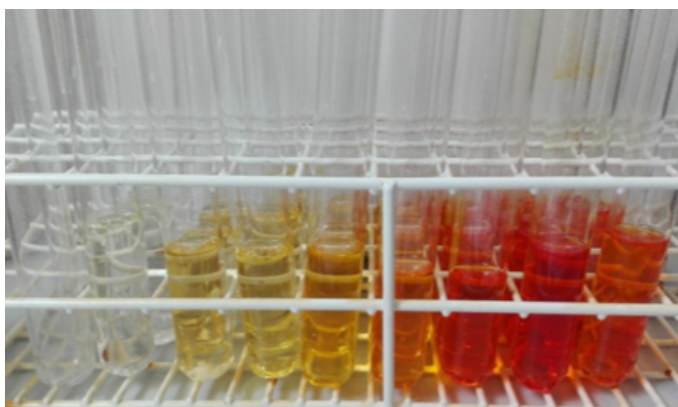


Figura 13- Frações obtidas por cromatografia a seco.

III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. PREPARAÇÃO DE EXTRATO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Existem diversos métodos de extração de produtos naturais. A escolha destes pode interferir com a quantidade e qualidade de composto ativo obtido. É importante escolher o mais eficaz a nível de rendimento, menor tempo de extração, menor quantidade de solvente utilizado e com mínima quantidade de perdas de composto possível e estabilidade (Yang, Wei, & Huang, 2012).

Em *Matias et al., 2019* foram comparados vários extratos (metanólico, acetónico e fluido supercrítico) de *P. madagascariensis*, tendo sido o extrato acetónico que apresentou um melhor rendimento de extração e com maior capacidade de obtenção de diterpenos. No artigo foi demonstrado uma tendência para os solventes mais polares atingirem maiores rendimentos de extração.

Para além disso, foi preparado um extrato acetónico de *P. venterii* exaustiva, com o intuito de estudar a presença de compostos bioativos. Foram realizadas cinco extrações recorrendo ao método de extração de ultrassons.

Extrações	Massa (g)
1 ^a e 2 ^a	1,25
3 ^a	0,04
4 ^a	0,13
5 ^a	0,13

Tabela 2- Resultados das extrações do extrato de *P. venterii*.

Após conclusão das extrações foi calculado o rendimento de extração final, através das massas (g) obtidas.

η (Rendimento)	1,15% (m/m)
-----------------------	-------------

Tabela 3- Resultado do rendimento do extrato de *P. venterii*.

O rendimento obtido foi de 1% (massa de folhas/massa de extração). Não existem estudos realizados em extratos acetónicos desta espécie. Contudo, foram comparados com extratos acetónicos de outras espécies do mesmo género e com extratos aquosos da *P. venterii*.

Em *Matias, Nicolai, Fernandes, et al., 2019* foram estudados dois extratos de espécies pertencentes ao género *Plectranthus*, *P. madagascariensis* e *P. neochilus*. O processo de extração (método ultrassons) e o solvente extrator (acetona) foram os mesmos que os utilizados neste trabalho experimental. Os rendimentos de extração obtidos foram *P. madagascariensis* (6,6%) e *P. neochilus* (7,0%). Os valores de rendimento destas espécies encontram-se na mesma ordem de grandeza do rendimento de *P. venter*.

Em *Brito, 2016*, foi estudada a mesma espécie de *Plectranthus* mas o extrato preparado foi aquoso, tendo sido obtido um rendimento de 2,2%.

Posteriormente às extrações obtidas, foram preparados os respetivos TLCs e analisados cromatograficamente. A revelação foi realizada a dois comprimentos de onda: 254 e 366 nm. Aquando da pulverização de uma mistura de metanol e ácido sulfúrico, foi observado a 366 nm, uma banda rosa no TLC, que correspondente à presença de clorofilas. A presença de polifenóis foi comprovada pela visualização de uma banda de cor azul (**Figura 14**).

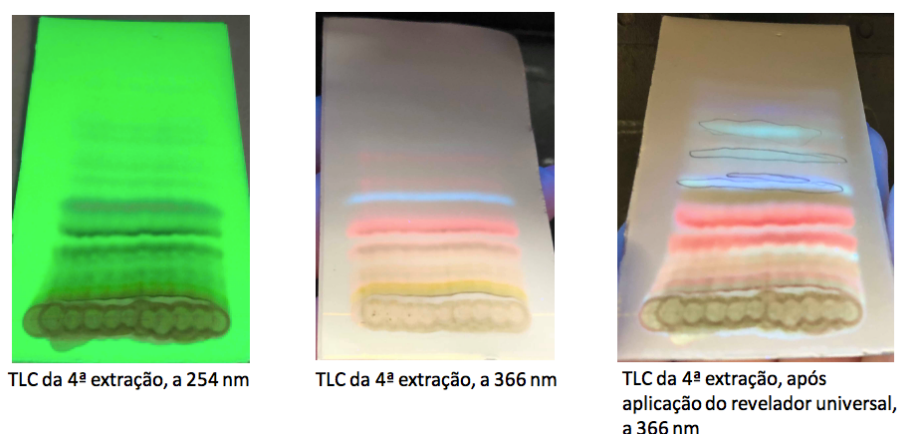


Figura 14- Resultado TLCs a 254 nm e 366 nm.

Tradicionalmente, os extratos de plantas são preparados com água, tais como infusões, decocções e cataplasmas (Rabe & Van Staden, 1997). Não obstante, estudos realizados demonstraram que extratos metanólicos revelem maior conteúdo em compostos fenólicos, quando comparados com os extratos aquosos (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011). Estudos realizados com extratos acetónicos de *P. venter* não são conhecidos. Contudo, este trabalho demonstrou a presença de clorofilas e polifenóis, derivados hidrocinâmicos de interesse biológico.

III.2. TOXICIDADE GERAL DE *P. VENTERI*

O ensaio de letalidade, recorrendo ao microcrustáceo de *A. salina* L., tem como intuito a pesquisa e a avaliação preliminar da toxicidade do extrato vegetal preparado neste estudo. Este método tem sido cada vez mais utilizado, visto apresentar determinadas vantagens, tais como o custo reduzido, técnica simples, rapidez de concretização e não requer equipamentos sofisticados e dispendiosos (Alanís-Garza, González-González, Salazar-Aranda, Waksman de Torres, & Rivas-Galindo, 2007; Meyer, Ferrigni, & Putnam, 1982).

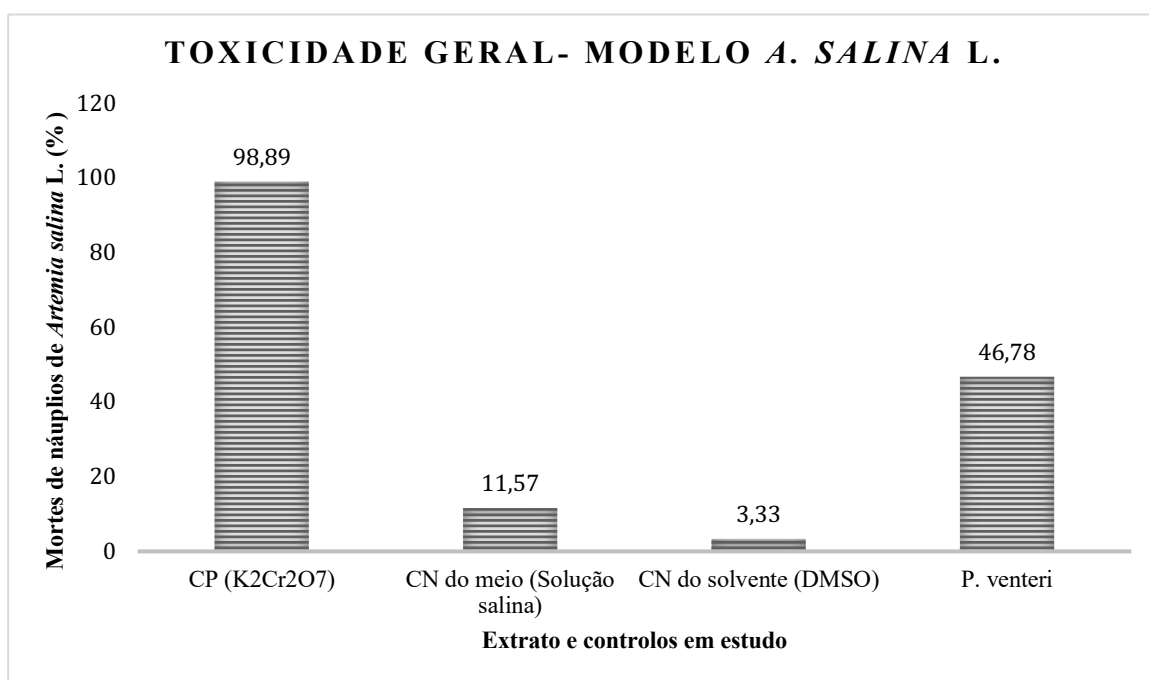


Gráfico 1- Resultados da percentagem de mortalidade de *P. venterii* em *A. salina* L.

Os resultados obtidos, apresentados no **Gráfico 1**, permitem concluir que a espécie *P. venterii* apresentou toxicidade (46,78%).

Não existem estudos de toxicidade geral nesta espécie, contudo em *Garcia et al.* 2018 foi testado a toxicidade geral do extrato da planta *P. madagascariensis*, tendo sido obtido uma taxa de mortalidade de $9,67 \pm 0,93\%$.

III.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *P. VENTERI*

Como método de rastreio rápido para ter uma avaliação preliminar da capacidade antioxidante foi realizado o ensaio qualitativo do extrato de *P. venteri*. O extrato apresentou resultados positivo, demonstrando possuir atividade antioxidante. Para comprovar a sua atividade procedeu-se à determinação quantitativa (Ntungwe N et al., 2017).

O controlo positivo utilizado foi a quercetina a 1 mg/mL (em acetona), uma vez que apresenta atividade antioxidante comprovada e o controlo negativo foi a acetona (Baghel et al., 2012; Patrícia Rijo et al., 2012).

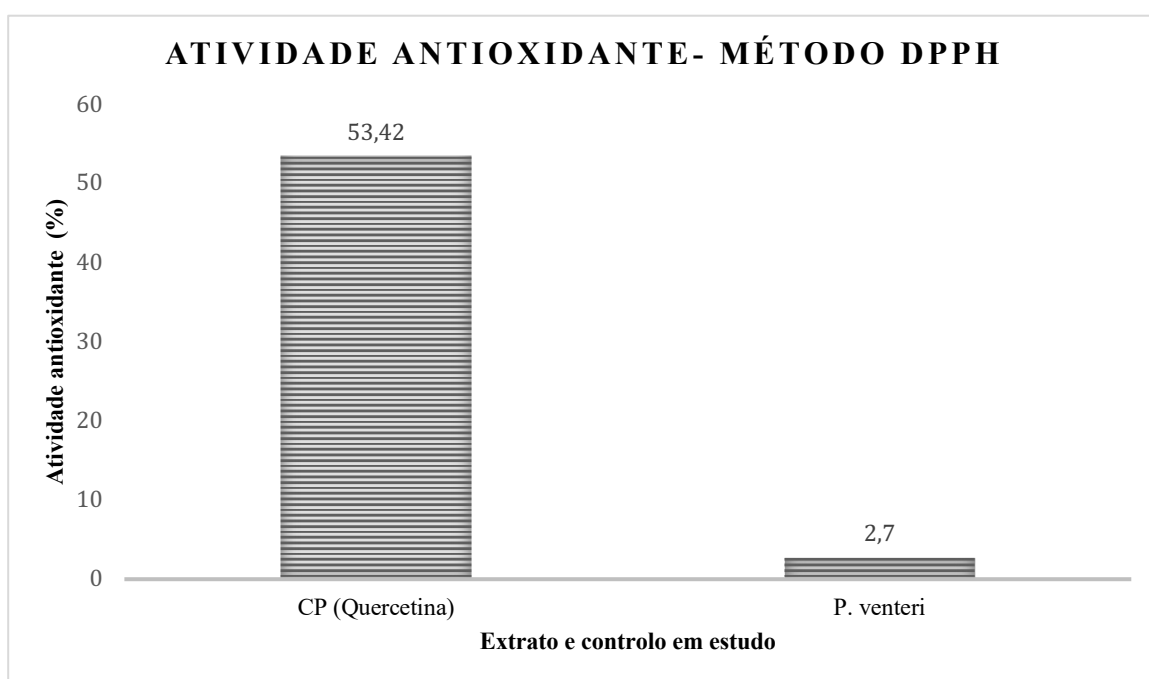


Gráfico 2- Resultados da atividade antioxidante de *P. venteri* à concentração de 10 µg/mL.

De acordo com o **Gráfico 2**, quando comparado o resultado do extrato com o do controlo positivo (53,42%) é possível concluir que *P. venteri* apresenta baixa capacidade de captação do radical livre.

Corroborando a experiência realizada, em *Matias, Nicolai, Fernandes, et al., 2019*, foram testados três extratos de espécies do género *Plectranthus* (*P. madagascariensis*, *P. neochilus* e *P. porcatus*) à concentração de 100 µg/mL, pelo mesmo método realizado. A atividade antioxidante obtida foi de 89,0%, 64,9% e 60,8, respetivamente.

III.4. EXTRATO *P. MADAGASCARIENSIS*

O extrato da planta *P. madagascariensis* foi sujeito as diversas extrações. A massa de planta seca pesada foi imersa em 1 L de água destilada e sujeita a hidrodestilação (destilação a vapor). A extração foi otimizada com o uso de um aparelho do tipo *Clevenger* (Garcia et al., 2018).

<i>Óleo essencial (g)</i>	<i>η (Rendimento) (%)</i>
0,54	1,15 (m/m)

Tabela 4- Resultados da massa e rendimento do óleo essencial extraído da *P. madagascariensis*.

As extrações obtidas foram juntas e, desta junção, foi obtida uma massa de 0,54 g. O rendimento de extração obtido foi 1,15 % (massa de óleo obtido/massa planta seca) (**Tabela 4**).

Em comparação com *Garcia et al.* 2018 ($18,55 \pm 2,00\%$), o rendimento obtido foi diminuto. Contudo, a elaboração da experiência não ocorreu nas mesmas condições, uma vez que a parte da planta mais utilizada neste trabalho foram os caules. Em oposição, a mais usada em *Garcia et al.* 2018 foram as folhas. Em suma, pode concluir-se que os compostos bioativos se encontram em maior concentração nas folhas ao invés dos caules.

III.5. ISOLAMENTO E RECRISTALIZAÇÃO DA 6,7-DEHIDROROILEANONA

O composto 6,7-dehidroroileanona é o principal constituinte do óleo essencial da espécie *P. madagascariensis*.

Para isolamento do composto maioritário foi realizada uma coluna de cromatografia a seco (Garcia et al., 2018; Garcia, Teodósio, et al., 2019).

Frações	Massa (g)
1-3	0,11
4-13	0,63
14-24	0,09

Tabela 5- Resultados das frações do extrato de *P. madagascariensis*.

Recorrendo novamente à cromatografia a seco, foi realizada uma segunda coluna de fracionamento, onde foram obtidas novas frações. Com a nova junção de frações (11-18) foi realizado o processo de recristalização.

Frações	Massa (g)
11-18	0,19

Tabela 6- Resultados da junção das frações.

De seguida, foram pesados os cristais e calculado o rendimento da operação. O rendimento foi calculado em função do peso inicial de planta.

6,7- dehidroroileanona (g)	η (Rendimento) (%)
0,09	47,28

Tabela 7- Resultados da massa e rendimento 6,7- dehidroroileanona recristalizada.

Na reunião das frações obtidas de OE quer deste trabalho quer de Garcia et al. 2018, o rendimento de obtenção de 6,7-dehidroroileanona por recristalização obtido foi de 47,28% (Tabela 7).

Concluindo, foi feita uma análise cromatográfica, através de uma TLC, do composto recristalizado. Como pode ser observado na **Figura 15**, estão presentes os números 0, 1 e 2, que correspondem ao padrão, co-aplicação e à amostra, respetivamente. Desta forma, comprova-se que o composto recristalizado corresponde ao padrão.

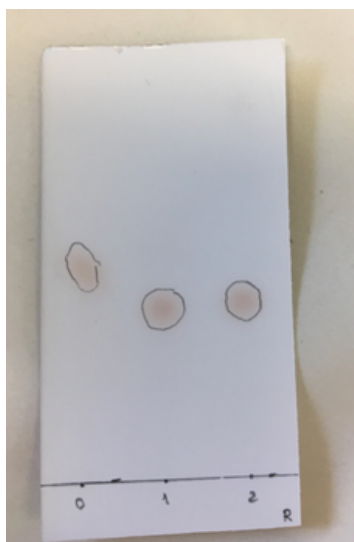


Figura 15- Resultado do TLC do composto recristalizado.

III.6. TOXICIDADE GERAL DA 6,7-DEHIDROROILEANONA

O estudo da toxicidade geral do composto maioritário presente na espécie *P. madagascariensis*, 6,7-dehidroroileanona, foi realizado recorrendo ao ensaio de letalidade em *A. salina* L. Este método é uma eficaz forma de avaliação preliminar de toxicidade, utilizando o pequeno crustáceo como organismo-alvo para deteção de bioativos em extratos de plantas (De Almeida Alves et al., 2000; do Amarante, Müller, Póvoa, & Dolabela, 2011; Ogbole, Segun, & Adeniji, 2017).

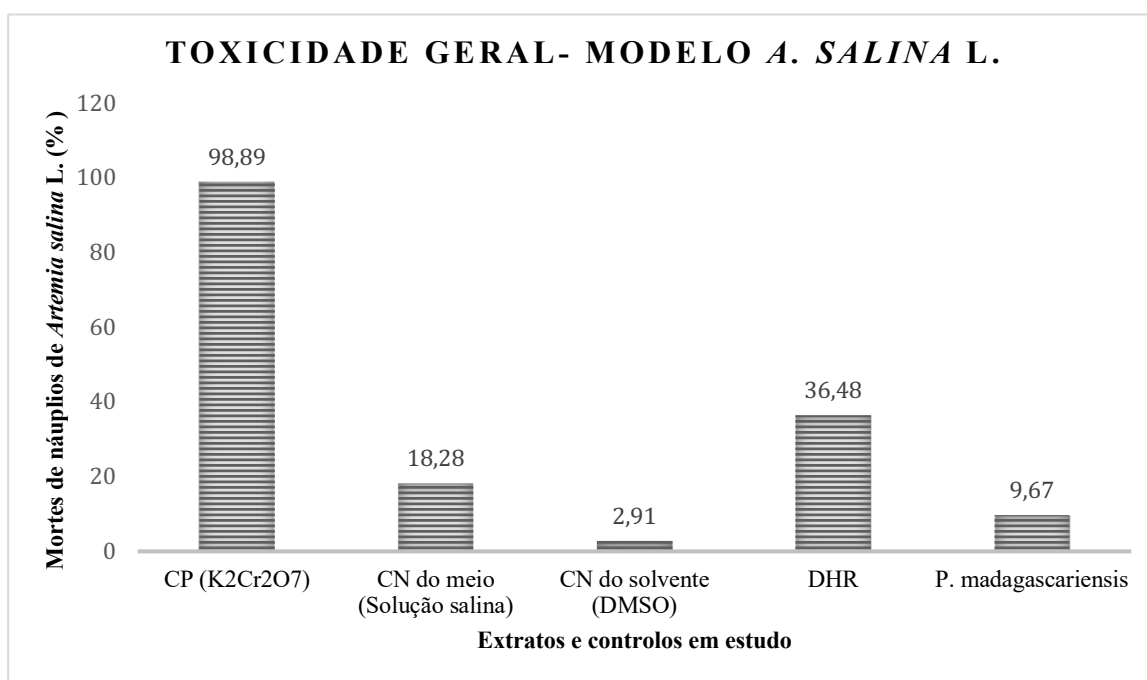


Gráfico 3- Resultados da percentagem de mortalidade de 6,7-dehidroroileanona (DHR) em *A. salina* L.

Os resultados obtidos, apresentados no **Gráfico 3**, permitem concluir que, à concentração de 100 ppm, a 6,7-dehidroroileanona apresentou 36,48% de mortes em *A. salina* L.

Comparando com *Garcia et al.* 2018, no qual foi testado a toxicidade geral do extrato da planta *P. madagascariensis*, foi obtida uma taxa de mortalidade de $9,67 \pm 0,93\%$. Estes dados confirmam que a 6,7-dehidroroileanona é o princípio ativo, uma vez que aumenta a sua atividade.

Em *Borozan, 2018*, os procedimentos executados foram os mesmo que os descritos neste estudo, tendo sido obtido um valor de toxicidade geral igual (LC= 36,68% a 100 ppm).

IV- CONCLUSÃO

Face ao exposto, duas espécies de plantas foram estudadas neste trabalho, *P. venter* e *P. madagascariensis*, ambas pertencentes à família *Lamiaceae*. As espécies foram trabalhadas em paralelo com o intuito de avaliar possíveis utilizações terapêuticas.

O extrato acetónico de *P. venter* (10% m/v) foi preparado pelo método de ultrasons, tendo sido determinado o rendimento de $\eta = 1,15\%$, m/m. A toxicidade geral do extrato foi determinada recorrendo ao ensaio da *A. salina* L. (LC= 46,78%). Como foi obtido um valor consideravelmente elevado de toxicidade geral, o estudo continuou para avaliar a capacidade antioxidante. Para finalizar o estudo da espécie, foi analisada a sua atividade antioxidante pelo método de DPPH (AA= 3%) que demonstrou uma atividade antioxidante fraca.

Do extrato de *P. madagascariensis*, foi obtido o óleo essencial cujo isolamento por cromatografia a seco originou o abietano 6,7-dehidrooleanona ($\eta = 47,28\%$). Recorrendo ao ensaio da *A. salina* L., o composto isolado demonstrou toxicidade geral (LC= 36,48%).

Tendo por base os resultados obtidos relativos ao óleo essencial e ao composto maioritário da *P. madagascariensis*, a 6,7-dehidrooleanona, estudos futuros devem ser realizados de modo a serem descobertos de novos compostos com atividade biológica de interesse, culminando num possível desenvolvimento de novos fármacos.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Mogib, M., Albar, H. A., & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7(2), 271–301. <https://doi.org/10.3390/70200271>
2. Akaberi, M., Mehri, S., & Iranshahi, M. (2015). Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia*, 100, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.11.008>
3. Alanís-Garza, B. A., González-González, G. M., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., & Rivas-Galindo, V. M. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.026>
4. Anaya-Esparza, L. M., González-Silva, N., Yahia, E. M., González-Vargas, O. A., Montalvo-González, E., & Pérez-Larios, A. (2019). Effect of TiO₂-ZnO-MgO Mixed Oxide on Microbial Growth and Toxicity against *Artemia salina*. *Nanomaterials*, 9(7), 992. <https://doi.org/10.3390/nano9070992>
5. Areche C, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, R. J. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.
6. Ates, M.; Daniels, J.; Arslan, Z.; Farah, I. . (2011). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: Assessment of nanoparticles aggregation, accumulation, and toxicity. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
7. Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., & Rajput, S. (2012). I S S N 2278 – 4357 a Review of Quercetin : Antioxidant and Anticancer Properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 146–160.
8. Borozan, A. (2018). *Reactivity study and biological activity of diterpenes from Plectranthus species*.
9. Brito, E. (2016). *Atividades Biológicas de Várias Espécies de Plectranthus e Influência sobre a Estrutura de Proteínas*.
10. Da Rocha, A. B., Lopes, R. M., & Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4), 364–369. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00063-7)
11. De Almeida Alves, T. M., Fonseca Silva, A., Brandão, M., Mesquita Grandi, T. S., Smânia, E. D. F. A., Smânia, A., & Zani, C. L. (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), 367–373.

- <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000300012>
12. do Amarante, C. B., Müller, A. H., Póvoa, M. M., & Dolabela, M. F. (2011). Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, 41(3), 431–434. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>
 13. Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. *Balneo Research Journal*, 2(4), 119–122. <https://doi.org/10.12680/balneo.2011.1022>
 14. Ferreira, R., Candeias, F., Simões, F., Nascimento, J., & Cruz Morais, J. (1997). Effects of horminone on liver mixed function mono-oxygenases and glutathione enzyme activities of Wistar Rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 58(1), 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00073-1)
 15. Garcia, C., Monteiro, C. M., Saraiva, L., & Bessa, C. (2016). Improving the antitumor potential of a diterpenoid through Mitsunobu Reactions, (2006), 13044.
 16. Garcia, C., Ntungwe, E., Rebelo, A., Stankovic, T., Cebola, M., & Pesic, M. (2019). Parvifloron D from *Plectranthus strigosus* : Cytotoxicity Screening of *Plectranthus* spp . Extracts.
 17. Garcia, C., Silva, C. O., Monteiro, C. M., Nicolai, M., Viana, A., Andrade, J. M., ... Rijo, P. (2018). Anticancer properties of the abietane diterpene 6, 7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction. *Future Medicinal Chemistry*, 10(10), 1177–1189. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0239>
 18. Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C., Oliveira, C., Díaz-Lanza, A., Reis, C., ... Rijo, P. (2019). Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 24(36), 4207–4236. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190115144241>
 19. Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. A., & Rodriguez, B. (2006). Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine*, 13(4), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.06.002>
 20. Gurgel, A. P. A. D., da Silva, J. G., Grangeiro, A. R. S., Oliveira, D. C., Lima, C. M. P., da Silva, A. C. P., ... 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*, 125(2), 361–363. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.006>

21. Harrower, A. (2014). *Plectranthus madagascariensis*. Retrieved from <http://pza.sanbi.org/plectranthus-madagascariensis>
22. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
23. Kubínová, R., Pořízková, R., Navrátilová, A., Farsa, O., Hanáková, Z., Bačinská, A., ... Valentová, M. (2014). Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(5), 749–752. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.848204>
24. Ladeiras D, Monteiro C, Pereira F, Reis C, Afonso C, R. P. (2016). Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones.
25. Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., & Iglesias Buela, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. And the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
26. Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>
27. Maciel, M. A. M. ., Gomes, F., E. S.; Pinto, A. C. ., Cólus, I. M. S. . M., & N. S. S.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. (2007). Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos Aspects of Natural Products on the Discovery of New Antitumoral and. *Revista Fitos*, 3(1), 38–59.
28. Maree, J. E., Khondkar, P., Kwapong, A. A., Oyedemi, B. M., Aljarba, T. M., Stapleton, P., ... Gibbons, S. (2014). Bioactive acetophenones from *Plectranthus venteri*. *Phytochemistry Letters*, 10, cxli–cxliv. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.021>
29. Marques, C. G., Pedro, M., Simões, M. F. A., Nascimento, M. S. J., Pinto, M. M. M., & Rodriguez, B. (2002). Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the growth of human cancer cell lines. *Planta Medica*, 68(9), 839–840. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34407>
30. Matias, D., Nicolai, M., Fernandes, A. S., Saraiva, N., Almeida, J., Saraiva, L., ... Rijo, P. (2019). Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization,

- Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Biomolecules*, 9(5), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/biom9050179>
31. Matias, D., Nicolai, M., Saraiva, L., Pinheiro, R., Faustino, C., Diaz Lanza, A., ... Rijo, P. (2019). Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS Omega*, 4(5), 8094–8103.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00512>
32. McQuillan, M. (2018). *Plectranthus venteri*. Retrieved from
<http://pza.sanbi.org/plectranthus-venteri>
33. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., & Putnam, J. E. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1), 31–34.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
34. Ntungwe N, E., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., Teodósio, C., Oliveira, C., ... Roberto, A. (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108.
<https://doi.org/10.19277/bbr.14.1.153>
35. Ogbole, O. O., Segun, P. A., & Adeniji, A. J. (2017). In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2005-8>
36. Pessoa, U. F. (2013). *Fitocompostos com atividade antineoplásica – paclitaxel e seus derivados*.
37. R. Hamidi, M., Jovanova, B., & Kadifkova Panovska, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(01), 9–18.
<https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>
38. Rabe, T., & Van Staden, J. (1997). Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharmacology*, 56(1), 81–87.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01515-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01515-2)
39. Rice, L. J., Brits, G. J., Potgieter, C. J., & Van Staden, J. (2011). *Plectranthus*: A plant for the future? *South African Journal of Botany*, 77(4), 947–959.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.07.001>
40. Rijo, P. D. de M. (2010). Phytochemical Study and Biological Activities of Diterpenes and Derivatives From *Plectranthus* Species, 282.

41. Rijo, P, Faustino, C., & Simões, M. F. (2013). Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants, 922–931.
42. Rijo, Patrícia, Batista, M., Matos, M., Rocha, H., Jesus, S., Simões, M. F., & Rijo, P. (2012). Pesquisa das atividades antioxidantes e antimicrobiana em extratos de plantas do género *Plectranthus*. *Biopharmaceuticals Sciences / Ciências Biofarmacêuticas Biomed Biopharm Res*, 2(9), 225–235.
43. Rijo, Patrícia, Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014). Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 58, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.08.045>
44. Rodriguez, A. G., Teixeira, O. M., Salles, F. G., Vital, J. P., & Peixoto, D. S. (2012). Bioensaio Com Ar Temia Salin a Para Detecção De Toxinas Em Alimentos Vegetais Armando. *Estudos*, 36(5/6), 795–808.
45. Taveres, J. (2019). ISOLAMENTO DE UM DITERPENÓ BIOACTIVO A PARTIR DE *PLECTRANTHUS ORNATUS* CODD.
46. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/251754>
47. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>
48. Vitorino, H. A., Mantovanelli, L., Zanutto, F. P., & Espósito, B. P. (2015). Iron metallodrugs: Stability, redox activity and toxicity against *Artemia salina*. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121997>
49. Yang, Y. C., Wei, M. C., & Huang, T. C. (2012). Optimisation of an ultrasound-assisted extraction followed by RP-HPLC separation for the simultaneous determination of oleanolic acid, ursolic acid and oridonin content in *Rabdosia rubescens*. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 627–636. <https://doi.org/10.1002/pca.2365>