

Citotoxicidade e Ação Antioxidante de uma Fração Extraída da Planta *Plectranthus neochilus* (Boldo-gambá)

Cytotoxicity and Antioxidant Action of Fraction Extracted from the *Plectranthus neochilus* Plant (Boldo-gambá)

Thaís Araújo Canuto^{ab}; Karine Beatriz Costa^c; Marcelo Ottoni^a; Alyson Torres de Barros^d; Patrícia Machado de Oliveira^d; Roqueline Rodrigues Silva^d; Gustavo Eustáquio Alvim Brito Melo^a; Bethânia Alves de Avelar Freitas^{ab*}

^aUniversidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Laboratório de Imunologia CIPQ-Saúde. MG, Brasil.

^bInstituto de Ciência e Tecnologia. MG, Brasil.

^cUniversidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Laboratório de Biologia do Exercício. MG, Brasil.

^dUniversidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Química. MG, Brasil.

*E-mail: bethania.avelar@ict.ufvjm.edu.br

Resumo

Plectranthus neochilus é uma erva aromática conhecida popularmente como boldo-gambá, usada na medicina popular para tratar dispepsia e insuficiência hepática, usada também com efeito analgésico e anti-inflamatório. Tendo em vista o uso popular da planta, torna-se importante a investigação farmacológica dos compostos isolados de *P. neochilus*. A avaliação da Citotoxicidade em plantas é de extrema importância para posterior utilização em medicamentos. O objetivo deste trabalho é avaliar concentrações não citotóxicas de 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina um composto isolado análogo a forskolina oriundo do extrato hidroalcoólico das folhas e caules de *P. neochilus* e avaliar se este diterpeno possui capacidade antioxidante. Para o teste de citotoxicidade foi utilizado o ensaio de viabilidade com sangue total, foi feita a coleta de sangue de 5 voluntários hígidos, e confeccionadas 6 culturas, sendo a primeira controle a segunda um controle de DMSO, que foi utilizado como solvente para o diterpeno e 4 culturas em concentrações diferentes do diterpeno, 40, 20, 10 e 5 µg/ml, seguiu-se o protocolo de lise de hemácias com cloreto de amônio e marcou-se com azul de tripan, posteriormente, foi feita a leitura por citometria de fluxo. Também foi analisada a capacidade antioxidante do diterpeno por meio da determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) em que é analisada a produção do íon Fe²⁺ a partir da redução do íon Fe³⁺ presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando ocorre a redução, há alteração de cor na solução, a avaliação é realizada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 593 nm. Os resultados demonstraram que nas concentrações testadas, 40, 20, 10 e 5 µg/ml o diterpeno extraído da planta *P. neochilus* não apresentou citotoxicidade seletiva a nenhuma população leucocitária avaliada (linfócitos, monócitos e neutrófilos) e ainda apresentou grande capacidade antioxidante. Mais estudos devem ser realizados evidenciando os potenciais farmacológicos da planta *P. neochilus*, bem como de substâncias isoladas a partir de extratos da planta.

Palavras-chave: Diterpeno. Citotoxicidade. Antioxidante

Abstract

Plectranthus neochilus is an aromatic herb popularly known as boldo- opossum, used in folk medicine to treat dyspepsia and hepatic insufficiency, also used as analgesic and anti-inflammatory. In view of the popular use of the plant, it becomes important the pharmacological investigation of the compounds isolated from *P. neochilus*. The evaluation of plant cytotoxicity is of extreme importance for subsequent use in medicinal products. The objective of this study is to evaluate non-cytotoxic concentrations of 1,6-di-O-acetyl-9-deoxyphosphine an isolated compound analogous to forskolin from the hydroalcoholic extract of *P. neochilus* leaves and stems and to evaluate whether this diterpene has antioxidant capacity. For the cytotoxicity test, the whole blood viability assay was performed, blood was collected from 5 healthy volunteers, and 6 cultures were made, the second control being a DMSO control, which is the diterpene solvent and 4 cultures at different concentrations of diterpene, 40, 20, 10 and 5 µg / ml, followed by the protocol of red blood cell lysis with ammonium chloride and labeled with tripan blue, and then read by flow cytometry. The antioxidant capacity of diterpene was also analyzed by means of the determination of the iron ion reduction power (FRAP) in which Fe²⁺ ion production is analyzed from the Fe³⁺ ion present in complex 2, 4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ). When the reduction occurs there is a color change in the solution, turning to an intense purple, the evaluation is performed by spectrophotometer at wavelength of 593 nm. The results demonstrated that at the tested concentrations, 40, 20, 10 and 5 µg / ml diterpene extracted from the plant *P. neochilus* did not present selective cytotoxicity to any leukocyte population evaluated (lymphocytes, monocytes and neutrophils) and still presented a great antioxidant capacity. Further studies should be performed evidencing the pharmacological potentials of the plant *P. neochilus*, as well as of substances isolated from extracts of the plant.

Keywords: Diterpene, Cytotoxicity, Antioxidant .

1 Introdução

A planta *P. neochilus* Schltr, pertencente à família Lamiaceae, conhecida popularmente como “boldo” e “boldo gambá” é uma erva perene, com galhos suculentos. Sua infusão é um tônico amargo utilizado no tratamento de males de fígado e problemas de digestão (DUARTE e LOPES,2007). O óleo essencial da planta foi estudado e as principais substâncias

voláteis encontradas foram α-terpenilacetato, α-tujona, β-cariofileno cariofileno, β-pineno e α-pineno (MOTA *et al.*, 2014). O óleo essencial também apresentou *in vitro* atividade contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e, ainda, reduziu de forma dose-dependente o número e a porcentagem do desenvolvimento de ovos do parasita (CAIXETA *et al.*, 2011). O óleo essencial da planta também já demonstrou

efeito antimicrobiano contra diversas bactérias cariogênicas, especialmente, o *Streptococcus mutans* (CREVELIN *et al.*, 2015).

Mota *et al.* (2013) identificaram que a composição volátil de *P. neochilus* apresenta forte odor desagradável, cor amarela clara e composição complexa. Revelaram também que as espécies *Plectranthus* cultivadas em Portugal possuíam composições de óleos essenciais diferentes das espécies já estudadas colhidas na África e no Brasil.

Poucos são os estudos de avaliação do efeito de extratos do boldo-gambá, sobretudo, extratos de média e alta polaridade, que se aproximariam do uso popular da planta. O extrato metanólico de *P. neochilus* apresentou toxicidade para a espécie *Leishmania chagasi* (ANTINARELLI *et al.*, 2015). O extrato etanólico apresentou toxicidade para *Artemia salina*, a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples para triagem de compostos bioativos. O extrato hidroalcoólico de *P. neochilus* demonstrou efeito analgésico no controle da dor pós-operatória em gatas (SILVA *et al.*, 2012). Há evidências, portanto, de que extratos de média e alta polaridade da planta, assim como o óleo essencial, apresentam atividades biológicas importantes para controle de doenças e analgesia. Os principais metabólitos secundários descritos, sobretudo, do óleo essencial da planta são terpenoides. Barros (2014) realizou estudo químico de *P. neochilus* e conseguiu isolar em um precipitado o diterpeno análogo a forskolina, 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina, assim o objetivo do presente trabalho foi investigar a toxicidade do diterpeno encontrado em *P. neochilus* frente aos leucócitos humanos *in vitro*, assim como avaliar a atividade antioxidante não enzimática de 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina isolado de *P. neochilus*.

2 Material e Métodos

Esse trabalho foi realizado em parceria com os pesquisadores do Departamento de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Desta forma, não foi objetivo deste trabalho o isolamento de 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina a partir de *P. neochilus*, e sim a realização dos testes de toxicidade e atividade antioxidante. Portanto, nesta seção se faz uma descrição resumida incluindo coleta da planta e identificação do diterpeno. Em síntese, a espécie *P. neochilus* foi cultivada no Campus JK da UFVJM (18º 14' S, 43º 36' W), Diamantina/MG, sendo seu plantio através de propagação vegetativa utilizando os galhos da planta, provenientes de Belo Horizonte /MG. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Prof. Dr. Carlos Victor de Mendonça Filho do Departamento de Ciências Biológicas da FCBS/UFVJM, sendo depositada uma exsiccata do material no Herbário DIAM da UFVJM, sob o registro número 1720. A

investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas e caules de *P. neochilus* forneceu um precipitado contendo um diterpeno análogo a forskolina, o 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina. A elucidação estrutural da substância se baseou na análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e por comparação com dados encontrados na literatura. Todos os testes descritos abaixo foram realizados com a fração extraída de *P. neochilus*, a qual continha a substância isolada 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina. O material foi identificado conforme Barros (2014) e, então, cedido para os testes de citotoxicidade e atividade antioxidante.

2.1 Citotoxicidade aos leucócitos do sangue periférico *in vitro*

Para análise da toxicidade da fração extraída *P. neochilus* foram realizados testes de viabilidade celular em culturas de leucócitos. As análises foram realizadas com sangue total de cinco voluntários hígidos (n =5). Tendo em vista a utilização de células humanas, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM, certificado de apresentação para apreciação ética número CAAE 28665514.2.0000.5108, e o parecer tem registro nº 1.018.204. Foram confeccionadas para cada voluntário 6 culturas em câmara de fluxo, sendo a primeira controle, contendo apenas célula e meio de cultura, a segunda um controle do solvente que continha DMSO (1% v/v), célula e meio de cultura. As outras quatro culturas foram realizadas com a fração de *P. neochilus* em diferentes concentrações, 40, 20, 10 e 5µg/ml. As culturas foram encubadas por 4 horas, e seguiram o protocolo de lise de hemácias com solução de cloreto de amônio (1,6% p/v). Passaram por duas etapas de adição de solução de lise seguida de incubação no gelo, centrifugação 240g por 10 min, e desprezo de sobrenadante. Foi realizada também uma etapa de limpeza com a solução tampão PBS (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40). Após a etapa de lavagem foi realizada a marcação com azul de trypan (0,002% p/v), conforme Freitas *et al.* (2014), seguida da leitura em citômetro de fluxo. Seguindo parâmetros de tamanho e complexidades internas foram selecionadas as populações leucocitárias para análise da viabilidade de linfócitos, monócitos e neutrófilos frente às diferentes concentrações da fração.

2.2 Capacidade antioxidante não enzimática

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), de acordo com Benzie e Strain (1996). Foi analisada a capacidade do extrato em reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺ e reagir juntamente com 2,4,6-Tri(2-Piridil)-5-Triazina (TPTZ) resultando no complexo Fe⁺²-TPTZ. Quando ocorre a redução há alteração de cor na solução, a avaliação é realizada por

espectrofotômetro em comprimento de onda de 593 nm. Para a confecção do reagente FRAP, foram adicionados 25 ml de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6), 2,5 ml de TPTZ (10 mM) e 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Duas amostras de 528 μL (cada) do reagente FRAP foram adicionadas 72 μL do extrato e a 72 μL de DMSO. As misturas foram homogêneas e incubadas no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 min, e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em equivalentes de Fe^{2+} , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de sulfato ferroso. Os resultados foram expressos como μM de sulfato ferroso/g de extrato.

O extrato hidroalcoólico foi diluído em DMSO, portanto o FRAP foi realizado também para o solvente. Foi obtida uma média dos valores de absorbância em duplicata, repetições independentes, tanto para o extrato quanto para o solvente, respectivamente 317, 292 e 70, 62,5 μM . Para que fosse analisado somente o efeito do extrato. O valor da média da absorbância do solvente foi diminuído do valor do extrato, resultando em 246, 667 μM . O extrato tinha, inicialmente, a concentração de 4 mg/ml, sendo corrigida então a concentração pelo volume utilizado no ensaio que era de 72 ml. A nova concentração foi expressa em 0,29 mg. Para se obter então o poder antioxidante foi preciso dividir o valor da média de absorbância sem o solvente pela nova concentração. O valor obtido foi então dividido por 100 para obtenção do valor padrão.

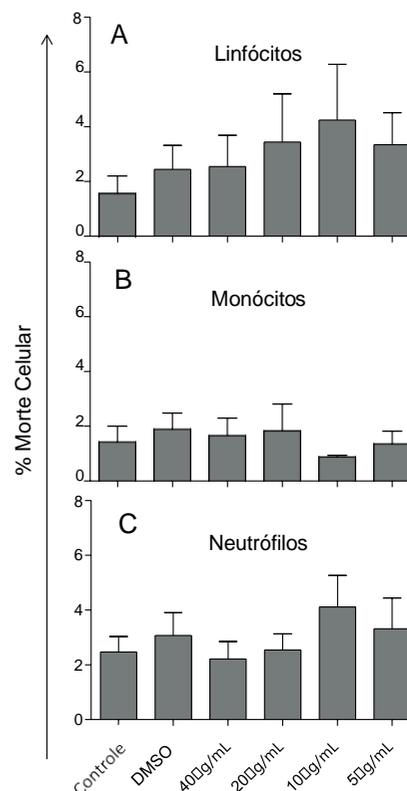
2.3 Análise estatística

Inicialmente, os resultados foram analisados de forma descritiva. As diferenças entre os dados no teste de citotoxicidade foram avaliadas utilizando o teste ANOVA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas, quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.

3 Resultados e Discussão

No presente trabalho, a fração do extrato hidroalcoólico de *P. neochilus*, contendo um diterpeno análogo a forskolina, o 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina teve sua citotoxicidade avaliada, para cada população leucocitária, em diferentes concentrações. Através de citometria de fluxo e marcação com azul de tripan (Figura 1).

Figura 1 - Percentual de Células mortas nas culturas controle, controle do solvente (DMSO 1% v/v) e nas culturas tratadas com diferentes concentrações da fração extraída de *P. neochilus* (40, 20, 10 e 5 $\mu\text{g/ml}$) nas populações leucocitárias de linfócitos (A), monócitos (B) e neutrófilos (C). As barras seguem o mesmo padrão nas figuras A, B e C. O teste estatístico realizado foi ANOVA (n=6).



Fonte: Dados da pesquisa.

O percentual de viabilidade celular em todas as culturas foi superior a 92%, o que é desejável em culturas celulares. Não foi observada ação tóxica seletiva a nenhuma população linfocitária (Figura 1).

Segundo Antinarelli *et al.* (2014), *P. neochilus* apresentou alta atividade antileishmanial contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, com concentração necessária para reduzir a viabilidade em 50% (CI_{50}) igual a 14 $\mu\text{g/ml}$. No presente estudo, tal concentração não foi tóxica aos leucócitos humanos. Estes autores avaliaram também a CI_{50} de monócitos murinos que foi superior a 111 $\mu\text{g/ml}$, no presente trabalho a maior concentração testada foi de 40 $\mu\text{g/ml}$ e esta concentração apresentou baixa toxicidade para todos os leucócitos humanos testados, incluindo monócitos.

Arcanjo *et al.* (2012) relataram que as folhas secas de *P. neochilus* possuem odor característico, sendo usadas como chá ou como fragmento aquoso. O estudo ainda apontou que a salmoura induzida pelo extrato etanólico da planta demonstrou uma indicação de atividade antitumoral, ainda não relatada na literatura, com IC_{50} de 210.31 $\mu\text{g/ml}$. No presente trabalho, concentrações maiores do que 40 $\mu\text{g/ml}$ não foram testadas. É importante salientar que este estudo foi realizado com uma fração do extrato de média/alta polaridade da planta *P.*

neochilus, e a fração avaliada foi extraída de extrato também de alta polaridade.

O diterpeno 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina utilizado nos testes é um análogo da forscolina. A forscolina é um diterpeno, também com baixa toxicidade, que é um ativador da enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMP cíclico intracelular (SAITOH *et al.*, 1988; ALASBAHI; MELZIG, 2012). A forscolina inibe alguns mecanismos de morte celular, como a apoptose, morte celular programada (KAMATA *et al.*, 1996; PASSERON *et al.*, 2009), e também citotoxicidade celular mediada por anticorpos (SAITOH *et al.*, 1988). No entanto, mais estudos precisam ser realizados, a fim de comparar as atividades da forscolina com o diterpeno análogo avaliado neste trabalho.

3.1 Capacidade Antioxidante total do plasma (FRAP)

O método FRAP consiste na redução do ferro em presença de meio ácido, ocorrendo uma mudança de coloração, quando existe antioxidante na amostra. O método foi desenvolvido, especificamente, para analisar a capacidade antioxidante do plasma, porém podem ser utilizados em extratos brutos, tecidos, amostras biológicas, frutas e vegetais (BERGAMASHI, 2010).

Observou-se que uma fração do extrato hidroalcoólico de *P. neochilus* apresentou um alto poder antioxidante 0,850 µmol/mg. Os resultados foram expressos como µmol de sulfato ferroso/mg de extrato. O valor obtido é considerado alto, segundo Bergamashi (2010), que usando a mesma metodologia em extratos vegetais polares, porém de outras espécies, película de amendoim e talo de beterraba, encontrou valores de 1,605 e 0,619 µmol/mg como seus maiores poderes redutores. O trabalho de Bergamashi (2010) foi citado, tento em vista de ter utilizado a mesma metodologia do FRAP com extratos vegetais, sendo que o mais comum é se encontrar o uso da metodologia em avaliações para testes em plasma sanguíneo. O poder antioxidante de *P. neochilus* já havia sido testado por Ramborger *et al.* (2017), pela metodologia do DPPH, (método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), por terem utilizado metodologia diferente, a comparação entre os ensaios não é possível, no entanto, foi notada uma atividade antioxidante para a planta após fitorremediação com herbicida.

A ação da forscolina sobre o estresse oxidativo foi avaliada em modelo animal, após administração crônica do diterpeno por 8 semanas em ratos. O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) em amostras de urina de 24 horas. Os resultados indicaram que a administração crônica de forscolina não reduziu, de forma significativa, a 8-OHdG, não se mostrando antioxidante *in vivo* pela metodologia avaliada (RÍOS-SILVA *et al.*, 2014).

4 Conclusão

A 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina, um diterpeno análogo da forscolina oriundo do extrato hidroalcoólico das folhas

e caules de *P. neochilus* nas concentrações 40, 20 e 1 0µg/ml não apresentou toxicidade seletiva a nenhuma população leucocitária, evidenciando uma baixa toxicidade da planta. E apresentou um bom resultado como redutor de Fe³⁺ para Fe²⁺, mostrando alto poder antioxidante. Mais estudos devem ser realizados evidenciando os potenciais farmacológicos da planta *Plectranthus neochilus*, bem como de substâncias isoladas, a partir de extratos da planta.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) no programa de Iniciação Científica em parceria com a UFVJM e financiamento (APQ-00581-11).

Referências

- ALASBAHI, R.H.1; MELZIG, M.F. Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Pharmazie*, v.67, n.1, p. 5-13, 2012.
- ANTINARELLI, L. M. *et al.* Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *Anais Acad. Bras. Ciênc.*, v.87, n.3, p.733-742, 2014.
- ARCANJO, D.D.R. *et al.* Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.*, v.72, n.3, p.505-509, 2012.
- BALBACH, A. *As plantas curam*. Itaquaquecetuba: Vida Plena, 1993.
- BARROS, A.T. Estudo químico e das atividades antioxidante e citotóxica de *Plectranthus neochilus* schltr (Lamiaceae). Diamantina: UFVJM, 2014.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP Assay. *Anal. Biochemistr.*, v.239, p.70-76, 1996.
- BERGAMASCHI, K.B. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. Piracicaba: USP, 2010.
- COSTA, K.B. Efeito do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos swiss submetidos a uma sessão de exercício máximo. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.
- FREITAS, B.A. *et al.* Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.4, n.47, p.307-315, 2014. doi: 10.1590/1414-431X20143437
- KAMATA H.1. *et al.* Nerve growth factor and forskolin prevent H2O2-induced apoptosis in PC12 cells. by glutathione independent mechanism. *Neurosci Lett.*, v. 212, n.3, p.179-182, 1996.
- LUKHOB, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.*, v.103, p.1-24, 2006.
- MANTEL, S.H.; MATTHEUS, J.A.; McKEE, R.A. *Princípios de biotecnologia em plantas*: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 1994.
- MOTA, L. *et al.* Volatile-oils composition, and bioactivity of the essential oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal. *Chemistr. Biodiversity*, v.11, p.719-732, 2013.

- PASSERON T.1., *et al.* Forskolin protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis and increases DNA repair independent of its effects on melanogenesis. *J Invest Dermatol.* v. 162, n. 1, p.162-166, 2009.
- RAMBORGER, B.P. *et al.* The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. *Chemosphere*, v.188, n.1, p.231-240, 2017. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.164
- RÍOS-SILVA, M. *et al.*, Effect of chronic administration of forskolin on glycemia and oxidative stress in rats with and without experimental diabetes. *Int J Med Sci*, v.11, n.5. p. 448-52, 2014. doi: 10.7150/ijms.8034.
- SAITOH R, M.Y. *et al.* The inhibitory effect of forskolin on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity using Chang liver cells as target cells. *Life Sci* v. 43, n.3, p.239-45, 1988.
- SILVA, N.S. *et al.* Utilização do extrato hidroalcoólico de *Plectranthus neochilus* no controle da dor pós-operatória em gatas. *Rev. Verde Agroecol. Desenvol. Sustentável.*, v.7, n.5, p.34-40, 2012.