



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Plectranthus ornatus* Codd

FORTALEZA
2015

FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Plectranthus ornatus* Codd

Trabalho submetido à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica
Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Otilia Deusdênia
Loiola Pessoa

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Á972c

Ávila, Fábio do Nascimento.

Contribuição ao conhecimento químico de *Plectranthus ornatus* Codd / Fábio do Nascimento Ávila. – 2015.

149 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Otília Deusedênia Loiola Pessoa.

1. *Plectranthus ornatus*. 2. Diterpenos. 3. Clerodano. 4. abietano. 5. RMN. I. Título.

CDD 540

FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Plectranthus ornatus* Codd

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 26/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Otília Deusdênia Lóiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Para Antonia de Paiva Dias, meu amor, por sua compreensão, paciência e dedicação.

Dedico este trabalho para minha mãe, pelo exemplo de mulher forte, batalhadora e por seu esforço incansável em oferecer sempre o melhor para seus filhos, mesmo em inúmeras situações adversas de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades e conquistas em minha vida.

A Professora Dra. Otília Deusdênia L. Pessoa, por me receber gentilmente em seu laboratório, me permitindo, sob sua orientação, desenvolver o presente trabalho.

Ao Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira, coordenador do CENAURENM e do laboratório fitoquímico de plantas medicinais (LAFIPLAN) por inquestionável colaboração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química que tive a honra e o prazer de compartilhar momentos de aprendizagem em sala de aula.

A professora, Maria Rose Jane R. Albuquerque, professora da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, minha primeira orientadora no mundo acadêmico, que me instrui e me ensinou a importância da pesquisa científica.

A minha avó (in memoriam), que sempre foi o pulso firme de minha família, nós apoiando nas diversas etapas de minha infância.

Ao meu avô, meu exemplo de homem, pai e amigo a ser seguido.

Aos meus irmãos, primos e amigos, que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas na minha vida profissional e pessoal.

Aos meus colegas e amigos da UFC, principalmente os membros da família LAFIPLAN que me receberam com carinho e sempre me ajudaram no decorrer destes dois anos de mestrado.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos órgãos de financiamento a pesquisa: CAPES, FUNCAP, PRONEX e CNPq

RESUMO

O presente trabalho intitulado **CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Plectranthus ornatus* Codd**, descreve o estudo fitoquímico e farmacológico das partes aéreas de *P. ornatus* Codd (*Lamiaceae*), cultivado no Horto de Plantas medicinais da Universidade Federal do Ceara-UFC. *P. ornatus* é uma espécie nativa da Índia e introduzida no Brasil no período das grandes navegações, sendo comumente utilizado na medicina popular para o alívio e tratamento de enfermidades relacionadas ao trato digestivo e aparelho respiratório, sob o nome popular de boldo-gambá, boldo pequeno e novalgina. O estudo fitoquímico do extrato hexânico das partes aéreas de *P. ornatus* foi submetido a inúmeras técnicas cromatográficas, incluindo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), resultando no isolamento de 11 constituintes químicos pertencentes à classe dos diterpenos, dos quais 05 (cinco) estão sendo relatados pela primeira vez na literatura e nomeados como: 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oato de metila, Ácido 11*R*-acetoxi-3,4-dihidroxineocleroda-13*E*-en-15-óico, Ácido 11*R*-acetoxisolidagonal, Ácido 11*R*-acetoxi-solidago-3,15-dióico e Ácido 11*R*-acetoxineocleroda-2,4(18), 13*E*-trien-15-óico, juntamente com os metabólitos já conhecidos: Plectronatina A, Coleon R, Ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-oico, Ácido 11*R*-acetoxi-3 β -hidroxineocleroda-4(18), 13*E*-dien-15-oico e Ácido 11*R*-acetoxi-2-oxo-neocleroda-3,13*E*-dien-15-oico. A determinação estrutural de todos os metabólitos secundários isolados foi realizada através do emprego de técnicas espectrométricas como ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13 (RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução, obtida com ionização por *electrospray* e comparação com dados da literatura. As moléculas obtidas foram testadas frente à atividade citotóxica contra 04 (quatro) linhagens de células cancerígenas: HCT-116, OVCAR-8, HL-60 e SF-295, utilizando o método de análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) - 2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) que permite a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

Palavras-Chaves: *Plectranthus ornatus*. Constituintes químicos. Diterpenos. Clerodano. Labdano. Abietano. RMN.

Abstract

The present work describes the phytochemical and pharmacological study of aerial parts of *Plectranthus ornatus* Codd (*Lamiaceae*), cultivated at Horto de Plantas medicinais da Universidade Federal do Ceara-UFC. *P. ornatus* is a native plant from India, introduced in Brazil during the age of great navigations and used by the folks as a relief and treatment of digestive and respiratory problems by the name of boldo-gambá, boldo pequeno and novalgina. The hexane extract of aerial parts of *P. ornatus* were submitted to successively chromatographic process, including High Performance Liquid Chromatography (HPLC), obtained eleven (11) chemical compounds belonging to diterpene class, which five (05) are described for the first time on literature and named as: Methyl-11*R*-acetoxyneclocleroda-3,13*E*-dien-15-oic, 11*R*-acetoxo-3,4-dihydroxyneclocleroda-13*E*-en-15-oic acid, 11*R*-acetoxysolidagonal acid, 11*R*-acetoxo-solidago-3,15-dioic acid, Pseudo-coleon R and 11*R*-acetoxyneclocleroda-2,4(18), 13*E*-trien-15-oic acid, together with six (06) known compounds: Plectromatin A, Coleon R, *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-oic acid, 11*R*-acetoxo-3 β -hydroxyneclocleroda-4(18), 13*E*-dien-15-oic acid and 11*R*-acetoxo-2-oxo-neoclocleroda-3,13*E*-dien-15-oic acid. The structure determination of all secondary metabolites isolated was performed by spectrometric techniques such as hydrogen-1 and carbon-13 nuclear magnetic resonance (¹H NMR and ¹³C one/two- dimensional), infrared spectrometry (IR), high resolution mass spectrometry and comparison with literature data. Cytotoxic activity of compounds was evaluated against four different human cancer cell lines: HCT-116 (colon adenocarcinoma), HL-60 (leukemia), OVCAR-8 (ovarian carcinoma) and SF-295 (glioblastoma). The cell cultures were regularly maintained at logarithmic phase of growth. IC₅₀ values were determined using the MTT assay and measured IC₅₀ values along with 95% confidence.

Keywords: *Plectranthus ornatus*. Chemical constituents. Diterpenes. Clerodane. Labdane. Abietane. NMR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Foto de <i>Plectranthus ornatus</i> coletada no Horto de Plantas Mediciniais Francisco José de Abreu Matos do Dept. de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.	24
Figura 02 - Foto de <i>Plectranthus ornatus</i> : Descrição anatômica de – (A e B) - Limbo foliar; C- Pecíolo e D - Caule.....	25
Figura 03 - Biossíntese do pirofosfato de geranylgeranila (GGPP)	26
Figura 04 - Biossíntese dos diterpenos de esqueleto labdano, clerodano e abietano ..	27
Figura 05 - Levantamento bibliográfico dos últimos 12 anos acerca do gênero <i>Plectranthus</i>	28
Figura 06 - Diterpenos de esqueleto labdano obtidos a partir de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	29
Figura 07 - Diterpenos de esqueleto halimano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	30
Figura 08 - Diterpenos de esqueleto pimarano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	30
Figura 09 - Diterpenos de esqueleto Kauranos obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	31
Figura 10 - Diterpenos de esqueleto abietano e Cicloabietano obtidos de espécies gênero do <i>Plectranthus</i>	32
Figura 11 - Diterpenos de esqueleto clerodano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	33
Figura 12 - Novos derivados diterpênicos obtidos das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> ...	34
Figura 13 - Fragmentos estruturais mostrando os principais acoplamentos no espectro de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H-COSY de PO-01.....	36
Figura 14 - Estrutura básica do esqueleto de um diterpeno do tipo clerodano	37
Figura 15 - Principais correlações a mais de uma ligação ¹ H, ¹³ C-HMBC observadas para PO-01	37
Figura 16 - Efeito da compressão estérica (<i>γ-gauche</i>) sobre os deslocamentos químicos (ppm) de PO-01 e ác. kolavênico.	38
Figura 17 - Estrutura proposta para PO-01(a) e seu composto de referência ácido kolavênico (b)	38
Figura 18 - Representação estrutural de PO-01 com suas principais correlações ¹ H, ¹ H-NOESY	39
Figura 19 - Representação das estruturas do ácido 11 <i>R</i> -acetoxineocleroda-3,13 <i>E</i> -dien-15-oico (b) e PO-01 (a), isolados de <i>P. ornatus</i>	40
Figura 20 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-01 no modo positivo	42
Figura 21 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) para PO-01.	42

Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-01	42
Figura 23 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-01	43
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-01	43
Figura 25 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-01	44
Figura 26 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-01	44
Figura 27 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-01	45
Figura 28 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-01.....	45
Figura 29 - Expansões do espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-01 na faixa de 0,5 a 3,0 ppm	46
Figura 30 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-01 e expansão na faixa de 0,7 a 2,5 ppm.....	47
Figura 31 - Fragmentos estruturais mostrando os principais acoplamentos no espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-02	49
Figura 32 - Principais acoplamentos a longa distância observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC para PO-02	49
Figura 33 - Principais correlações observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^1H – NOESY para PO-02	50
Figura 34 - Representação estrutural de PO-02	50
Figura 35 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-02 no modo positivo	52
Figura 36 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{max}) (pda-190-500 nm) para PO-02.....	52
Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-02	52
Figura 38 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de PO-02.	53
Figura 39 - Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de PO-02	53
Figura 40 - Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, MeOD) de PO-02	54
Figura 41 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, MeOD) de PO-02	54
Figura 42 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMQC de PO-02.....	55
Figura 43 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02.....	55
Figura 44 - Expansão do espectro 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02 na faixa de 1,0 a 2,5 ppm	56

Figura 45 - Expansão do espectro 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02 na faixa de 3,0 a 6,0 ppm	56
Figura 46 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-02.....	57
Figura 47 - Principais correlações observadas nos espectros de RMN ^1H , ^1H -COSY e HMBC de PO-03.....	59
Figura 48 - Estruturas de PO-03 (a) e seu composto de referência, o ácido solidagonal (b).	60
Figura 49 - Biossíntese proposta para formação de PO-03.....	60
Figura 50 - Correlações observadas no espectro bidimensional ^1H , ^1H - NOESY para PO-03	61
Figura 51 - Representação estrutural para PO-03	61
Figura 52 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-03 no modo positivo.....	63
Figura 53 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) para PO-03	63
Figura 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-03	63
Figura 55 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-03	64
Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-03	64
Figura 57 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-03	65
Figura 58 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (300 MHz, CDCl_3) de PO-03	65
Figura 59 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-03.....	66
Figura 60 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-03.....	66
Figura 61 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-03	67
Figura 62 - Fragmento observado no espectro ^1H , ^{13}C -HMBC para o rearranjo do anel A de PO-03 (a) juntamente com PO-04 (b)	69
Figura 63 - Estrutura proposta para PO-04, apresentando os principais acoplamentos (COSY) e correlações (HMBC) e PO-03.....	69
Figura 64 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-04	70
Figura 65 - Representação estrutural de PO-04	70
Figura 66 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-04 no modo positivo	72
Figura 67 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) para PO-04	72

Figura 68 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-04.	72
Figura 69 - Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de PO-04	73
Figura 70 - Espectro de RMN ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) de PO-04.....	73
Figura 71 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl ₃) de PO-04.....	74
Figura 72 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H-COSY (300 MHz, CDCl ₃) de PO-03	74
Figura 73 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de PO-04.....	75
Figura 74 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de PO-04	75
Figura 75 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-NOESY de PO-04.....	76
Figura 76 - Representação dos efeitos da carbonila no anel A da decalina	77
Figura 77 - Representação estrutural de (a) PO-05 e (b) PO-01 isolados de <i>P. ornatus</i>	78
Figura 78 - Representação estrutural de PO-05 (plectornatina A)	78
Figura 79 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-05 no modo positivo	80
Figura 80 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda) observado entre 190-500 nm para PO-05	80
Figura 81 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-05	80
Figura 82 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de PO-05 e expansão na faixa de 1,0 a 3,0 ppm	81
Figura 83 - Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de PO-05 e expansão na faixa de 5 a 55 ppm.....	82
Figura 84 - Espectro de RMN DEPT 135 (300 MHz, CDCl ₃) de PO-05	83
Figura 85 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de PO-05.....	83
Figura 86 - Representação estrutural do esqueleto básico de um diterpeno labdano .	85
Figura 87 - Representação estrutural de PO-06, ilustrando as principais correlações a mais de uma ligação no espectro ¹ H, ¹³ C-HMBC	85
Figura 88 - Representação estrutural para o ácido <i>ent</i> -labd-13-en-8 β -ol-15-oico	85
Figura 89 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-06 no modo positivo e negativo	87
Figura 90 - Espectro de UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-06.	87
Figura 91 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-06	87

Figura 92 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-06 e expansão da faixa de 0,8 a 2,5 ppm	88
Figura 93 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-06 e expansão da faixa de 15 a 75 ppm	89
Figura 94 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de PO-06 e expansão da faixa de 0,6 a 2,5 ppm	90
Figura 95 - Espectro de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC de PO-06 e expansão da faixa de 0,8 a 2,5 ppm.	91
Figura 96 - Espectro de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC de PO-06 e expansão da faixa 0,6 a 2,5 ppm	92
Figura 97 - Principais acoplamentos observados no espectro 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY par PO-07	93
Figura 98 - Representação estrutural do esqueleto básico de um diterpeno da classe Abietano	95
Figura 99 - Representação estrutural dos principais acoplamentos observados para PO-07 nos espectros COSY e HMBC	95
Figura 100 - Correlações espaciais $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY observados para PO-07.....	95
Figura 101 - Representação estrutural proposta para PO-07	96
Figura 102 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-07 no modo positivo	98
Figura 103 - Espectro de absorção na região do UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) de PO-07.....	98
Figura 104 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-07	98
Figura 105 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-07 e expansão na faixa de 0,5 a 2,5 ppm	99
Figura 106 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-07.....	100
Figura 107 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-07	100
Figura 108 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de PO-07	101
Figura 109 - Espectro de correlação heteronuclear 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC de PO-07	101

Figura 110 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-07 e expansão na faixa de 0,8 a 2,3 ppm	102
Figura 111 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-07 em CDCl_3	103
Figura 112 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-07 em DMSO	103
Figura 113 - Principais acoplamentos observados em ^1H , ^1H -COSY e ^1H , ^{13}C – HMBC para a estrutura proposta de PO-08.	105
Figura 114 - Representação estrutural de PO-08 com suas principais correlações ^1H , ^1H - NOESY.....	105
Figura 115 - Representação estrutural de PO-08	106
Figura 116 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-08 no modo positivo e negativo	108
Figura 117 - Espectro de absorção na região do UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) de PO-08	108
Figura 118 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-08	108
Figura 119 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-08 e expansão na faixa de 0,5 a 2,5 ppm	109
Figura 120 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-08.....	110
Figura 121 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-08	110
Figura 122 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-08	111
Figura 123 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-08	111
Figura 124 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-08 e expansão na faixa de 1,0 a 7,5 ppm	112
Figura 125 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-08 e expansão na faixa de 0,8 a 2,5 ppm	113
Figura 126 - Representação estrutural para PO-09.....	115
Figura 127 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-09 no modo positivo	117
Figura 128 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{max} (pda-190-500 nm) para PO-09.....	117
Figura 129 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-09	117
Figura 130 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PO-09 e expansão na faixa de 0,5 a 3,0 ppm	118
Figura 131 - Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de PO-09.....	119

Figura 132 - Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl ₃) de PO-09.....	119
Figura 133 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H-COSY de PO-09 e expansão na faixa de 0,8 a 2,5 ppm	120
Figura 134 - Representação estrutural proposta para PO-10	122
Figura 135 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-10	124
Figura 136 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-10	124
Figura 137 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de PO-010.....	124
Figura 138 - Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de PO-010	125
Figura 139 - Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, CDCl ₃) de PO-10	125
Figura 140 - Principais acoplamentos e correlações observados para e estrutura proposta para PO-11.....	127
Figura 141 - Representação da estrutura de PO-11	127
Figura 142 - Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-09	129
Figura 143 - Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-11	129
Figura 144 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de PO-011	130
Figura 145 - Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de PO-011	130
Figura 146 - Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, CDCl ₃) de PO-11.....	131
Figura 147 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H-COSY de PO-11	131
Figura 148 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹ H, ¹³ C-HSQC de PO-11	132
Figura 149 - Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de PO-11	132
Figura 150 - Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-NOESY de PO-11.....	133
Figura 151 - Cromatograma de isolamento de PO-02, PO-03 e PO-04	140
Figura 152 - Cromatograma de isolamento de PO-05 e PO-06	141
Figura 153 - Cromatograma de isolamento de PO-07 e PO-08	143
Figura 154 - Cromatograma de isolamento de PO-09, PO-10 e PO-11	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Diterpenos da classe Labdano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	29
Tabela 02 - Diterpenos da classe Labdano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	29
Tabela 03 - Diterpenos da classe Halimano obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	30
Tabela 04 - Diterpenos da classe Kauranos obtidos de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	31
Tabela 05 - Diterpenos da classe Kauranos isolados de espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	31
Tabela 06 - Diterpenos da classe Kauranos isolados do gênero <i>Plectranthus</i>	32
Tabela 07 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-01, comparados com os do ácido kolavênico	41
Tabela 08 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de PO-02.....	51
Tabela 09 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-03 em comparação com dados fornecidos pela literatura	62
Tabela 10 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-04	71
Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-05, comparados com os dados da literatura	79
Tabela 12 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) e literatura de PO-06	86
Tabela 13 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-07 com dados da literatura	97
Tabela 14 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-08, comparados com os dados da literatura	107
Tabela 15 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-09, comparados com dados da literatura	116
Tabela 16 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-10, comparados com os dados da literatura.	123
Tabela 17 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-11	128
Tabela 18 - Dados referentes à obtenção dos extratos de <i>P. ornatus</i>	137
Tabela 19 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHPO ...	137

Tabela 20 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.....	138
Tabela 21 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.4 ...	138
Tabela 22 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.4.3	139
Tabela 23 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7 ..	139
Tabela 24 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7.5	139
Tabela 25 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7.5.3	139
Tabela 26 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII....	141
Tabela 27 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.6	141
Tabela 28 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.8	142
Tabela 29 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.8.5	142
Tabela 30 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-X	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	broad band
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CCD	Cromatografia de camada delgada
CENAUREMN	Centro Nordeste de Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
COSY	Correlation spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
FUNCAP	Fundação cearense de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico
.	
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IES	Ionização por electrospray
IV	Infravermelho
LEMANOR	Laboratório de espectrometria de massa do Nordeste
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
PDA	Photodiode Array Detector
PF	Ponto de Fusão
PPM	Partes por Milhão
PRONEX	Programa de apoio a núcleos de excelência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
tR	Tempo de retenção
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	23
3. LEVANTAMENTO BIBIOGRÁFICO	26
4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Plectranthus ornatus</i> Codd	35
4.1. Determinação estrutural de PO-01	35
4.2. Determinação estrutural de PO-02	48
4.3. Determinação estrutural de PO-03	58
4.4. Determinação estrutural de PO-04	68
4.5. Determinação estrutural de PO-05	77
4.6. Determinação estrutural de PO-06	84
4.7. Determinação estrutural de PO-07	93
4.8. Determinação estrutural de PO-08	104
4.9. Determinação estrutural de PO-09	114
4.10. Determinação estrutural de PO-10	121
4.11. Determinação estrutural de PO-11	126
5. PARTE EXPERIMENTAL	134
5.1. Métodos Cromatográficos	134
5.1.1. Cromatografia de Adsorção	134
5.1.2. Cromatografias de Exclusão	134
5.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	134
5.2. Métodos Físicos	135
5.2.1. Ponto de Fusão	135
5.2.2. Rotação óptica	135
5.3. Métodos Espectroscópicos	135
5.3.1. Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)	135
5.3.2. Espectrometria de Massas (EM)	135
5.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	136
6. MATERIAL BOTÂNICO DE PLECTRANTHUS ORNATUS CODD	137
6.1. Isolamento dos constituintes não voláteis de P. ornatus	137
6.1.1. Fracionamentos cromatográficos de EHPO	137
6.1.2. Isolamento do constituinte químico PO-01	138

6.1.3. <i>Isolamento dos constituintes químicos PO-02; PO-03 e PO-04</i>	139
6.1.4. <i>Isolamento dos constituintes químicos PO-05 e PO-06</i>	140
6.1.5. <i>Isolamento dos constituintes químicos PO-07 e PO-08</i>	142
6.1.6. <i>Isolamento do constituinte químico PO-09; PO-10 e PO-11</i>	143
7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	145
8. CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS	147

1 INTRODUÇÃO

A importância dos produtos naturais (PN) surgiu com o início das primeiras civilizações, quando o homem começou a fazer uso destes em benefício próprio. PN são todas as moléculas produzidas por organismos vivos, tais como plantas, fungos, animais marinhos ou por processos de fermentação causados por bactérias que exercem algum tipo de efeito biológico em outros organismos (Costa-Lotufo, et al., 2009). Uma ideia da importância dos PN pode ser observada na área da saúde, haja vista que atualmente, cerca de 60% de todos os princípios ativos encontrados nas formulações dos medicamentos são originários de produtos naturais originários de diversas fontes. Some-se a isto os derivados sintéticos, muitas vezes construídos tendo como base um Produto Natural (Kiuru, et al., 2014).

As plantas constituem um recurso primário no sustento das comunidades rurais e como fonte de medicamento. É devido às suas propriedades terapêuticas que elas possuem um papel importante no tratamento e cura de várias enfermidades. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial busca na medicina popular, meios para o alívio sintomático dos mais variados tipos de enfermidades, que pode ir de uma simples gripe ao câncer (Brasileiro et al., 2008).

O potencial terapêutico das plantas está associado aos compostos oriundos do metabolismo secundário. De acordo com Campo e colaboradores (2009) a maior parte da flora medicinal é ainda desconhecida, tanto do ponto de vista químico quanto do ponto de vista farmacêutico. Schulz e Grimms (2002) mostraram que uma parcela significativa de todos os medicamentos utilizados na medicina são derivados direto ou indiretamente de princípios ativos isolados de plantas e que a seleção de espécies a partir de informações obtidas da medicina popular, tem se mostrado muito eficaz. Portanto, os estudos de prospecção fitoquímica baseado em informação popular são de fundamental importância para identificação de plantas com potencial medicinal e isolamento de seus princípios ativos.

Segundo Pinto e colaboradores (2002) o Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua fauna e flora, e como detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. Fazendo jus a esta afirmativa, a Química de Produtos Naturais (QPN) tem sido dentro da química brasileira, a área mais antiga e com o maior número de pesquisadores. Entretanto, o Brasil, apesar da forte cultura na utilização de plantas medicinais e de possuir umas das maiores biodiversidades do mundo, ainda apresenta carências na exploração científica de seus recursos naturais. Neste contexto, nosso grupo de

pesquisa tem dedicado esforços no sentido de investigar plantas utilizadas na medicina popular e desta forma contribuir com o conhecimento científico.

O potencial medicinal e econômico apresentado pelas espécies do gênero *Plectranthus* e a sua vasta aplicação na medicina popular, especialmente no tratamento de bronquite, inflamação da pele e do aparelho digestivo além de problemas respiratórios (Matos, F. J. A. 2000; Chen, et al., 2014) faz com que o estudo de plantas deste gênero torne-se relevante e especialmente interessante, particularmente quando se contempla o estudo químico e farmacológico.

Levantamento bibliográfico realizado acerca da química do gênero *Plectranthus* revelou que sua composição química é composta principalmente por terpenoides, destacando-se os diterpenos como principal classe de metabólitos secundários. Estes apresentam uma rica variedade de estruturas que vão desde esqueletos do tipo labdanos, abietanos, kauranos e pimaranos até estruturas menos comuns, tais como os diterpenos halimanos e clerodanos. Outros compostos como flavonoides, sesquiterpenos e triterpenos também tem sido reportado no gênero (Abdel-mogib, et al., 2002).

Diante da importância das plantas do gênero *Plectranthus*, particularmente quanto ao uso etnobotânico, pretende-se, com este trabalho, contribuir com o conhecimento químico de *Plectranthus ornatus* Codd, através de sua prospecção química e investigação farmacológica.

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

A família *Lamiaceae* (antiga *Labiatae*), também conhecida como família da menta, é a sétima maior família das angiospermas, compreendendo cerca de 7.500 espécies organizadas em 236 gêneros (www.kew.org/science-conservation/research-data/.../lamiaceae), dos quais 23 são nativos do Brasil, com aproximadamente 232 espécies que incluem ervas, arbustos e árvores lenhosas (Pereira e Santos, 2013).

Entre os gêneros de plantas pertencentes à família *Lamiaceae*, quatro possuem maior destaque:

- *Salvia*: Composto por mais de 900 espécies que inclui arbustos, plantas perenes e anuais, muitas das quais são utilizadas como condimento, ervas medicinais e como plantas ornamentais (Malaquias et al., 2014).
- *Ocimum*: Compreende mais de 30 espécies de ervas e subarbustos, que se distribuem nas regiões tropicais e subtropicais. São conhecidas popularmente como alfavacas e em geral, despertam grande interesse econômico devido à riqueza de seus óleos fixos e essenciais (Malaquias et al., 2014).
- *Mentha*: Compreende dezenas de espécies popularmente conhecidas como mentas e hortelãs. Suas propriedades medicinais mais comuns são atividade antisséptica e digestiva, sendo utilizados também como expectorantes (Malaquias et al., 2014).
- *Plectranthus*: às vezes confundido com *Coleous* devido a sua difícil taxonomia. Pertencente à subfamília *Nepetoideae*, tribo *Ocimeae* e subtribo *Plectranthinae*, compreendem cerca de 300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e quentes, principalmente da África, Ásia e Austrália (Rice, et al., 2011). A maioria das espécies pertencentes a este gênero é de interesse econômico e medicinal (Rijo, et al., 2005). Seus usos na medicina popular vão desde o tratamento de doenças respiratórias a infecções do sistema digestivo (Rice, et al., 2011), além de serem utilizadas no tratamento de diabete e artrite reumatoide.

Plectranthus ornatus Codd (Figura 1, pág.24) (sin. *P. comosus* Hochst. ex Guerke e *Coleus comosus* Hochst) é popularmente conhecida no Nordeste brasileiro como malva santa, boldo, boldo pequeno, novalgina e boldo-gambá. Na medicina popular é utilizado para o

tratamento de cólicas e mal-estar gástrico e segundo Matos (2000) *P. ornatus* é indicado como substituto de *P. barbatus*.

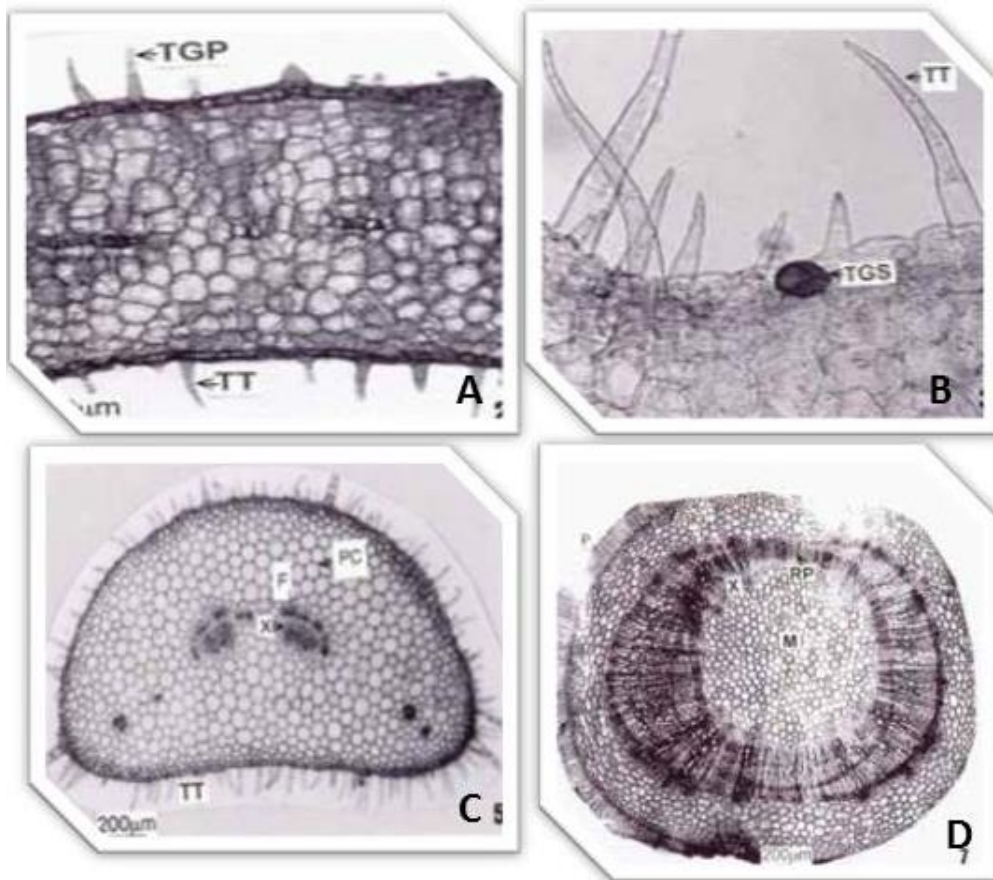
P. ornatus é uma planta originária da Índia, distribuída por todo o mundo. Apresenta folhas pequenas, aromáticas e suculentas. Seu caule é fino e herbáceo com raízes adventícias, crescendo amplamente na forma de pequenas ervas. Apresenta uma epiderme unisseriada, formada por células pequenas, muito compactadas, revestidas por uma cutícula lisa e espessa. Possui tricomas pluricelulares (TT) em abundância e tricomas glandulares pedicelados (TGD), em menor quantidade. O caule em estrutura secundária mostrando um xilema secundário bem desenvolvido, formado por fibras abundantes e relativamente poucos elementos de vaso (Figura 2, pág. 25) (Mauro, *et al.*, 2008). Suas flores apresentam uma coloração azul intenso em forma de espigões com forte odor. Plantas desta espécie florescem em regiões de clima ameno ou serrano, não sendo observado próximo ao litoral (Albuquerque R. L. 2004).

Figura 01. Foto de *Plectranthus ornatus* coletada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos do Dept. de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: Próprio autor

Figura 02. Foto de *Plectranthus ornatus*: Descrição anatômica de – (A e B) - Limbo foliar; C- Pecíolo e D - Caule.



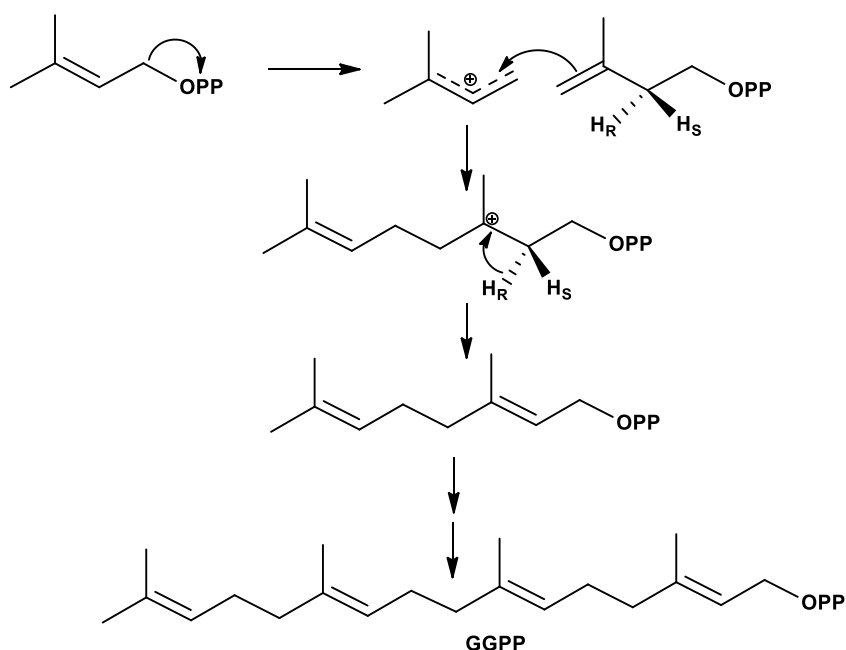
Fotos obtidas de Mauro et al. 2008

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Os terpenóides constituem uma grande e diversificada família de produtos naturais que derivam biogeneticamente do isopreno. Os isoprenos são formados naturalmente pela decomposição de hidrocarbonetos cíclicos naturais, sendo eles, os formadores das estruturas conhecidas como isoprenoides, formando os blocos de construção dos terpenóides sob a forma fosfatada (Dewick M. P. 2002). Eles são classificados ou nomeados de acordo com o número de átomos de carbono ou unidades de isopreno, tais como hemiterpenos (cinco unidades de carbono), monoterpene (dez unidades de carbono) e assim por diante.

Entre os terpenoides se destacam os diterpenos, metabólitos secundários com 20 átomos de carbono, formados a partir de 04 unidades de isopreno, derivados do precursor biogenético pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) (Simões, et al., 2004) como mostrado na Figura 03.

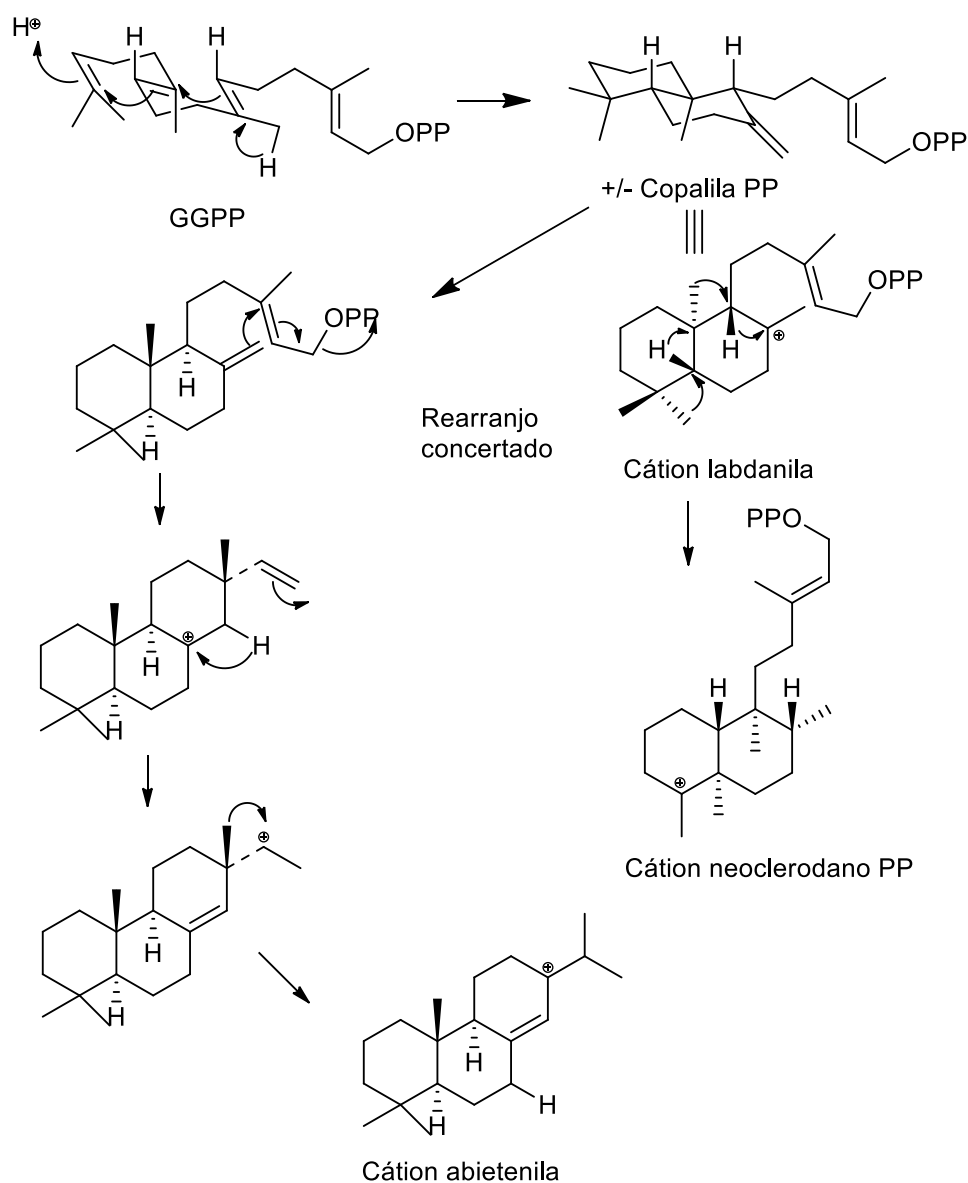
Figura 03. Biossíntese do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP)



Adaptado de (Dewick M. P. 2009)

O gênero *Plectranthus* é conhecido por biossintetizar uma grande variedade de diterpenos, entre os quais se destacam os pertencentes às classes abietano, labdano e, em estudos mais recentes, clerodanos. Essas classes de compostos são formadas a partir do rearranjo concertado de seu precursor biogenético pirofosfato de geranilgeranila (GGPP), como mostra o esquema abaixo.

Figura 04. Biossíntese dos diterpenos de esqueleto labdano, clerodano e abietano.

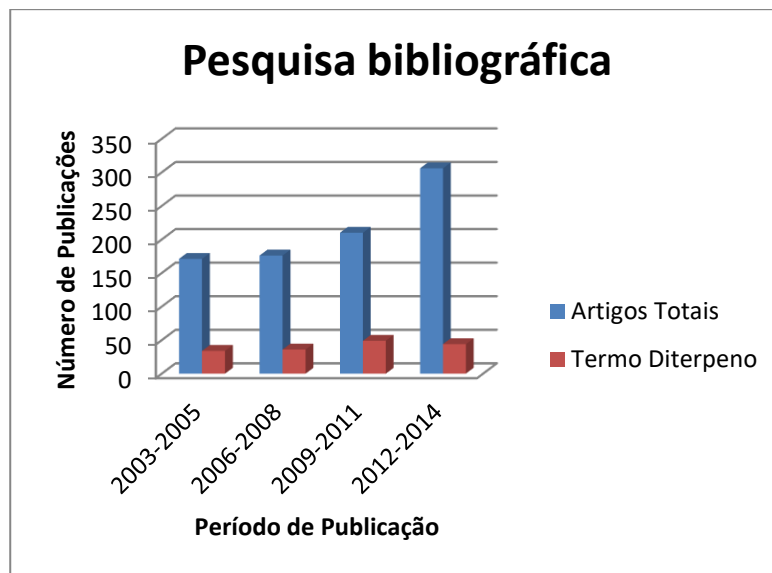


Adaptado de (DEWICK, 2009)

Abdel-Mogib e colaboradores (2002) publicaram um trabalho de revisão acerca dos constituintes não voláteis isolados do gênero *Plectranthus* no último século, no qual apresentou mais de 150 diterpenoides. Diante disso, com o objetivo de atualizar os dados da pesquisa, realizou-se um novo levantamento bibliográfico no banco de dados *scifinder* utilizando como palavra-chave o termo *Plectranthus*. Como resultado foi encontrado para o período de 2003-2014, mais de 800 artigos, incluindo: estudos de síntese, caracterização e isolamento, além de estudos biológicos, farmacológicos e botânicos. Com isto se observa um crescente aumento no número de publicações envolvendo o gênero, possivelmente dada à sua

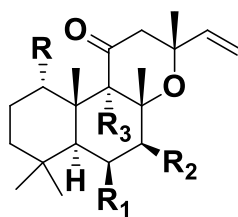
importância como fonte de novos metabólitos. Ao se refinar a pesquisa associando a palavra chave com o termo diterpeno, obteve-se 175 artigos, distribuídos como mostra o gráfico abaixo.

Figura 05. Levantamento bibliográfico dos últimos 12 anos acerca do gênero *Plectranthus*.

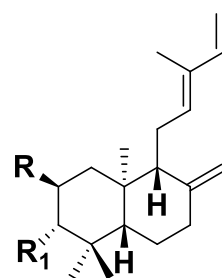


O levantamento mostrou ainda que, no período analisado, houve o isolamento de dezenas de compostos para o gênero, além de mais de 40 compostos isolados pela primeira vez a partir de plantas do gênero *Plectranthus*. Entre os novos metabolitos obtidos, os estudos químicos envolvendo *P. ornatus* foi o mais interessante do ponto de vista químico, pois foram obtidos diterpenos dos tipos clerodano e halimano. Esses dois esqueletos de diterpenos ainda não haviam sido observados neste gênero, sendo que os diterpenos halimanos são muito raros e suas propriedades farmacológicas: anti-inflamatória e antibacteriana. A presença dessas classes de diterpenos é, até o momento, exclusivo para *P. ornatus* em relação às demais espécies do gênero.

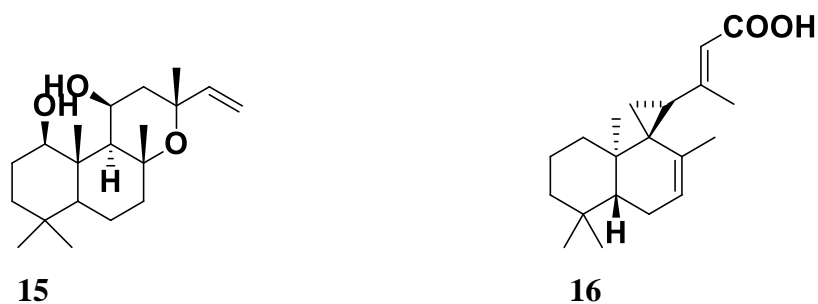
A seguir (Figura 06-12) serão relatadas as estruturas dos diterpenos obtidos do gênero *Plectranthus*, no período de 2003 a 2014.

Figura 06. Diterpenos de esqueleto labdano obtidos a partir de espécies do gênero *Plectranthus*.**Tabela 01.** Diterpenos da classe Labdano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

Nº	R	R ₁	R ₂	R ₃	Nome do composto	Referência
1	OH	OAc	H	H	Plectronatina B	Rijo et al., 2002.
2	OAc	OAc	OAc	H	1,6-Diacetoxi-9-deoxiforskolina	Xu e Cong 2004.
3	OH	OAc	OAc	H	Forskolina G	Xu e Cong 2004.
4	OAc	OAc	H	H	Forskolina H	Xu e Cong 2004.
5	OH	OAc	OAc	OH	Forskolina I	Xu et al., 2005.
6	OAc	OAc	OH	OH	Forskolina J	Xu et al., 2005.
7	Gli	OAc	OH	OH	Forskoditerpenosídeo A	Shan et al., 2007.
8	Gli	OAc	OAc	OH	Forskoditerpenosídeo B	Shan et al., 2007.
9	Gli	OAc	OH	H	Forskoditerpenosídeo C	Shan et al., 2008.
10	Gli	OAc	OAc	H	Forskoditerpenosídeo D	Shan et al., 2008.
11	Gli	OAc	H	H	Forskoditerpenosídeo E	Shan et al., 2008.

**Tabela 02.** Diterpenos da classe Labdano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

Nº	R	R ₁	Nome do composto	Referência
12	OH	H	<i>ent</i> -Labda-8(17),12Z,14-trien-2 α -ol	Gaspar-Marques et al., 2003.
13	OAc	OH	<i>ent</i> -2 α -Acetoxilabda-8(17),12Z,14-trien-3 α -ol	Gaspar-Marques et al., 2003.
14	OH	OAc	<i>ent</i> -3 α -Acetoxilabda-8(17),12Z,14-trien-2 α -ol	Gaspar-Marques et al., 2004.



15. 1*R*, 11*S*-Dihidroxiépoxilad-14-eno (Stavri et al., 2009).

16. Forskoditerpeno A (Shan et al., 2008).

Figura 07. Diterpenos de esqueleto halimano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

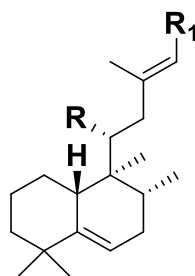
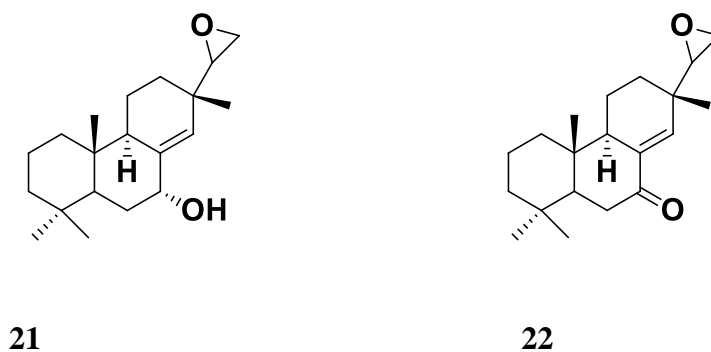


Tabela 03. Diterpenos da classe halimano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

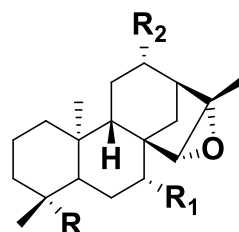
Nº	R	R ₁	Nome do composto	Referências
17	OAc	COOH	Ácido 11 <i>R</i> -acetoxihalima-5,13-dien-15-oico	Rijo et al., 2007.
18	OAc	CH ₂ OH	11 <i>R</i> -Acetoxihalima-5,13-dien-15-oato de metila	Rijo et al., 2007.
19	OAc	COOMe	11 <i>R</i> -Acetoxihalima-5,13-dien-15-ol	Rijo et al., 2007.
20	H	CH ₂ OH	Halima-5,13-dien-11,15-diol	Rijo et al., 2007.

Figura 08. Diterpenos de esqueleto pimarano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

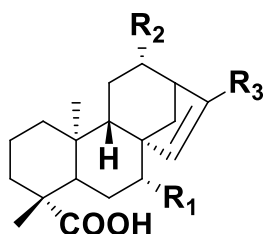


21. 16-Epoxi-7 α -hidroxipimar-8,14-eno (Stavri, et al., 2009).

22. 16-Epoxi-7-oxopimar-8,14-eno (Stavri et al., 2009).

Figura 09. Diterpenos de esqueleto caurano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.**Tabela 04.** Diterpenos da classe caurano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.

Nº	R	R ₁	R ₂	Nome do composto	Referências
23	COOH	H	H	Ácido <i>ent</i> -15 β , 16 β -Epoxicauran-19-oico	Gaspar-marques et al., 2003.
24	CH ₂ OH	H	H	<i>ent</i> -15 β , 16 β -Epoxicauran-19-ol	Gaspar-marques et al., 2003.
25	COOH	H	OAc	<i>ent</i> -12 β -acetoxi-15 β ,16 β -epoxicauran-19-oato de metila	Gaspar-marques et al., 2014.
26	COOH	OH	H	Ácido <i>ent</i> -7 β -hidroxi-15 β , 16 β -epoxicauran-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.

**Tabela 05.** Diterpenos da classe caurano isolados de espécies do gênero *Plectranthus*

Nº	R ₁	R ₂	R ₃	Nome do composto	Referências
27	OH	H	Me	Ácido <i>ent</i> -7 β - hidroxicaur-15-en-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.
28	OH	OAc	Me	Ácido <i>ent</i> -12 β - acetoxi-7 β -hidroxicaur-15-en-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.
29	H	OAc	CHO	Ácido <i>ent</i> -12 β - acetoxi-17-oxocaur-15-en-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.

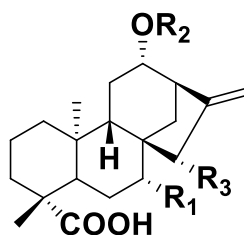
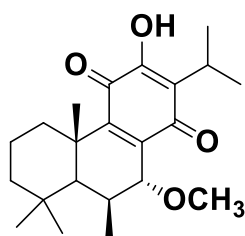


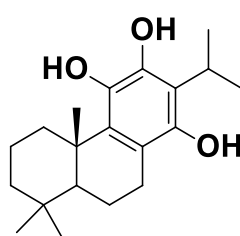
Tabela 06. Diterpenos da classe caurano isolados do gênero *Plectranthus*

Nº	R ₁	R ₂	R ₃	Nome do composto	Referências
30	H	OAc	OH	Ácido <i>ent</i> -7 β - hidroxicaur-15-en-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.
31	OH	OAc	H	Ácido <i>ent</i> -12 β - acetoxi-7 β - hidroxicaur-15-en-19-oico	Gaspar-marques et al., 2014.

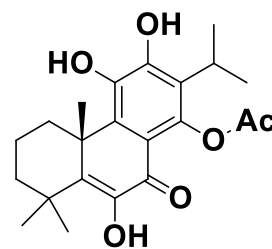
Figura 10. Diterpenos de esqueleto abietano e cicloabietano obtidos de espécies do gênero do *Plectranthus*.



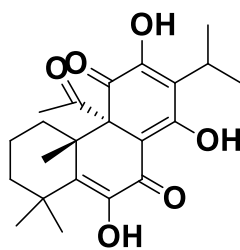
32



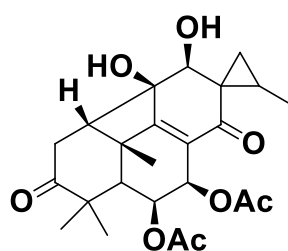
33



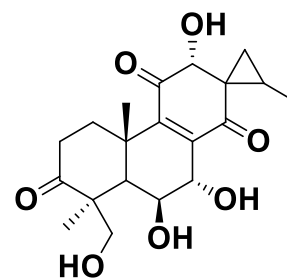
34



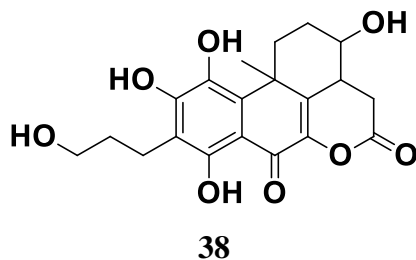
35



36

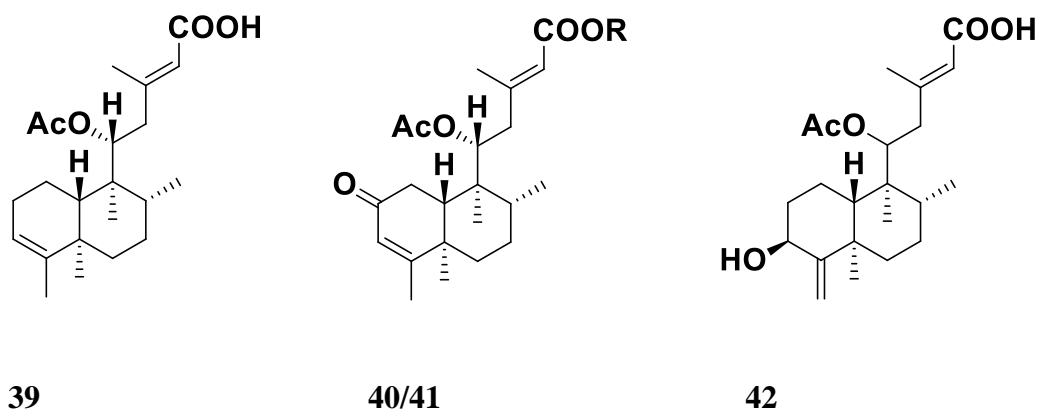


37



- 32.** 6β -Hidroxi- 7α -metoxiabietanona (Syamasundar et al., 2012)
- 33.** Abietano (Kido et al., 2010)
- 34.** Acetil Coleun U (Rijo et al., 2007)
- 35.** 9α -(2-Oxopropil) abietano (Gaspar-Marques et al., 2005)
- 36.** 7β -Acetil-12-deacetoxi-ciclobarbatúsina (Albuquerque et al., 2007)
- 37.** $6\beta,7\alpha,12\alpha,19$ -Tetrahidroxiabietan-11,14-diona (Simoes et al., 2010)
- 38.** 3,11,12,14,19-Pentahidroxi-abieteta-5,8,11,13-en-7-piran[4,6]-16-diona (Kebede et al., 2011).

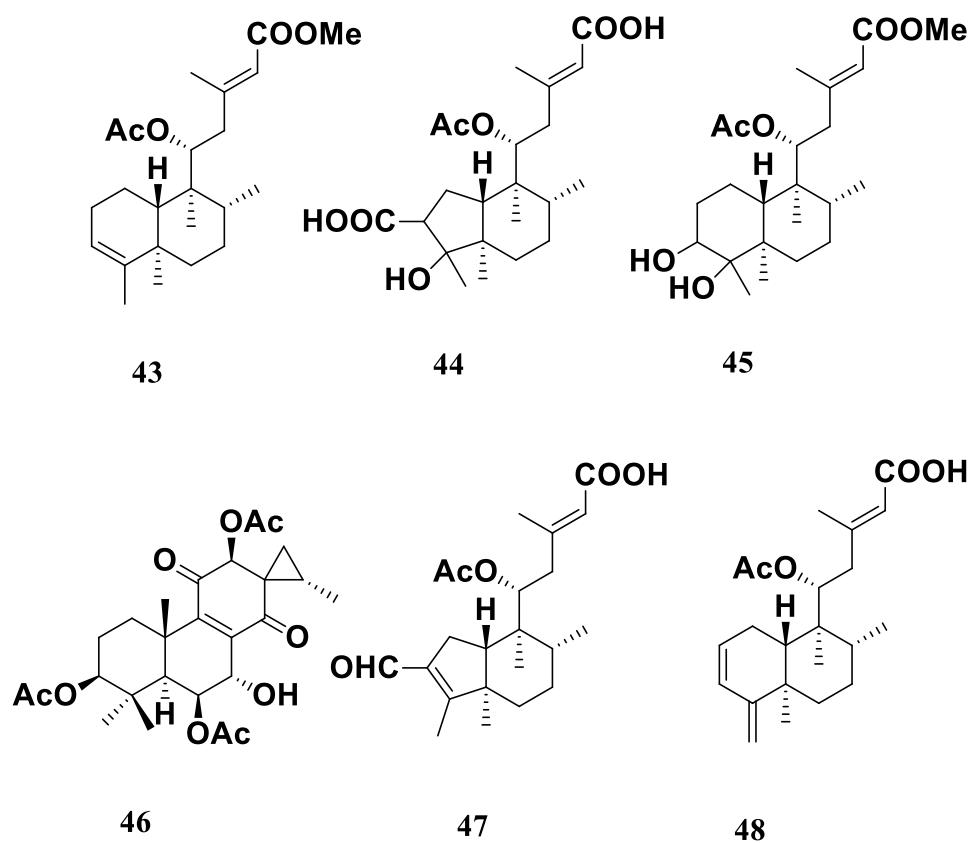
Figura 11. Diterpenos de esqueleto clerodano obtidos de espécies do gênero *Plectranthus*.



- 39.** Ácido 11*R*-acetoxikolavenico (Rijo et al., 2002)
- 40.** R=H - Ácido 11*R* - acetoxi-2-oxokolavenico (Rijo et al., 2002)
- 41.** R=Me - Plectronatina A (Oliveira et al., 2005)
- 42.** Ácido 11-acetoxi- 3β -hidroxineocleroda-4(18), 13*E*-dien-15-oico (Oliveira et al., 2005).

O presente trabalho relata o isolamento e caracterização de seis novos compostos, sendo eles cinco diterpenos de esqueleto clerodano e um Cicloabietano. Além desses compostos outros metabólitos conhecidos na literatura são relatados.

Figura 12. Novos derivados diterpênicos obtidos das partes aéreas de *P. ornatus*



4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Plectranthus ornatus* Codd.

4.1 Determinação estrutural de PO-01

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração A-VI (EHPO), pág. 141, originária do extrato hexânico de *P. ornatus*, culminou no isolamento de 50,7 mg de um óleo viscoso alaranjado, $[\alpha]_D^{20} = -43,96^\circ$, (c 0,1; CH_2Cl_2), UV (MeOH) λ_{max} (pda) 215 nm (Fig. 21, pág. 42), codificado como **PO-01**.

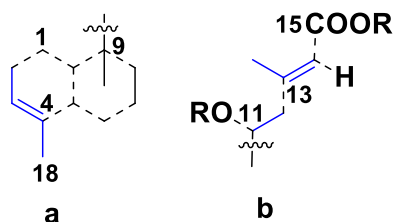
O espectro de massa de alta resolução (EMAR), utilizando a técnica ionização por *electrospray* (ESI), mostrou o pico em m/z 399,2493 (calculada 399,2506; erro -2,76 ppm) referente ao aduto de sódio ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) (Fig. 20, pág. 42), possibilitando a predição da fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_4$ a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a seis.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (IV), de PO-01 (Fig. 22, pág. 42) revelou a presença de duas bandas intensas em 1717 e 1647 cm^{-1} referente a deformações axiais associadas à dupla ligação carbono-oxigênio (C=O) de éster e carbono-carbono (C=C), respectivamente. Outras bandas importantes foram observadas em 1235 e 1152 cm^{-1} características de ligação C-O (Pavia, et al., 2010).

O espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 23, pág. 43), apresentou dois simpletos típicos de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,64 (H-14) e 5,19 (H-3), um duplete em δ_{H} 5,44 (1H-11, $J=10,89$ Hz) associado a um hidrogênio oximetínico, e um simpleto intenso em δ_{H} 3,67 (O-Me). Mostrou também sinais em δ_{H} 2,13 (3H-16, s), 1,99 (3H-OAc, s), 1,57 (3H-18, s), 1,04 (3H-19, s), 0,76 (3H-20, s), 0,97 (3H-17, d, $J=6,1$ Hz) referentes a hidrogênios de grupos metilas, sendo o sinal em δ_{H} 1,99 de uma metila de um grupamento acetoxila (Silvestein, et al., 2007). Além dos sinais descritos, também foram verificados uma série de sinais na faixa de δ_{H} 2,43 a 1,20 relativos a hidrogênios metínicos e metilênicos, evidenciando a natureza terpênica do metabólito em questão.

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (Fig. 26, pág. 44), foram observadas as correlações entre os sinais em δ_{H} 5,19 (H-3) com 1,57 (3H-18) e 2,10 (H-2); de δ_{H} 5,44 (H-11) com 2,41(H-12a) e 2,24 (H-12b), e de δ_{H} 5,64 (H-14) com 2,13 (H-16).

Figura 13. Fragmentos estruturais mostrando os principais acoplamentos no espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-01.

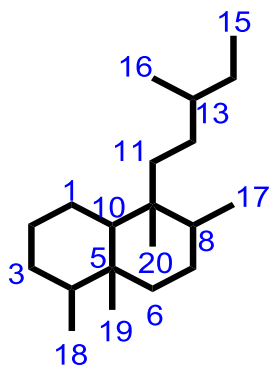


(—) Correlação RMN 2D ^1H , ^1H -COSY;

O espectro de RMN ^{13}C CPD [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 24, pág. 43), mostrou 23 linhas espectrais, revelando ser PO-01 um diterpeno acetilado, comumente isolados de plantas da espécie *P. ornatus* (Rijo et al., 2002). A subtração dos sinais dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 25, pág. 44) possibilitou reconhecer o padrão de hidrogenação de cada átomo de carbono (5 CH, 5 CH_2 , 7 CH_3 e 6 C), enquanto o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (Fig. 27, pág. 45) possibilitou a correlação exata de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono. Na região de campo baixo (desblindagem dos núcleos) do espectro de RMN ^{13}C , foram observados sinais relativos a carbonos metínicos de dupla ligação em δ_{C} 120,6 (C-3) e 118,1 (C-14), além de carbonos carbonílicos de ésteres em δ_{C} 170,9 (11-OAc) e 166,8 (C-15), sendo o último envolvido em conjugação. Também foram observados sinais referentes a carbonos oxigenados em δ_{C} 76,1 (C-11) e 51,1 (O-Me), além de sinais em δ_{C} 18,8 (C-16), 17,9 (C-17), 18,2 (C-18), 20,5 (C-19), 12,1 (C-20) e 21,0 (11-OAc) correspondentes a grupamentos metílicos, corroborando com o espectro de RMN ^1H .

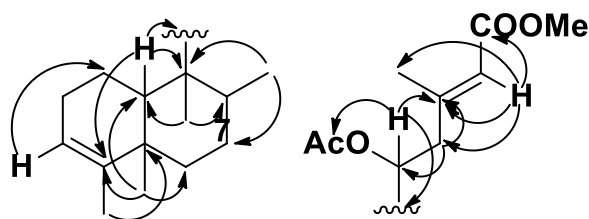
Considerando o número de sinais no espectro de RMN ^{13}C , o número de carbonos metílicos e a multiplicidade destes no espectro de RMN ^1H , aliado as informações de levantamentos bibliográficos realizados acerca dos compostos isolados de plantas do gênero *Plectranthus*, pôde-se assumir que o composto em questão se tratava de um diterpeno de esqueleto clerodano (Fig. 14, pág. 37). Estudos anteriores sobre *P. ornatus* (Rijo et al., 2002a; 2005b; 2007c; 2011d) e (Oliveira, et al., 2005) corroboram com o resultado proposto.

Figura 14. Estrutura básica do esqueleto de um diterpeno do tipo clerodano



Os dados discutidos até o momento foram confirmados através das correlações observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (Fig. 28, pág. 45), destacando-se as correlações entre os sinais em δ_{H} 1,42 (d, $J=17,28$; H-10) com os carbonos em δ_{C} 144,5 (C-4), 176,1 (C-11), 43,4 (C-9), 36,2 (C-8), assim como do sinal dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,04 (H-19) com os carbonos em δ_{C} 144,5 (C-4), 36,9 (C-6) e 47,5 (C-10) os quais fazem parte do sistema decalina. Outras correlações importantes utilizadas para confirmar o esqueleto clerodano para PO-01, bem como as posições das duplas ligações entre C-3 e C-4 e C-13 e C-14, estão sumariadas na Figura 15.

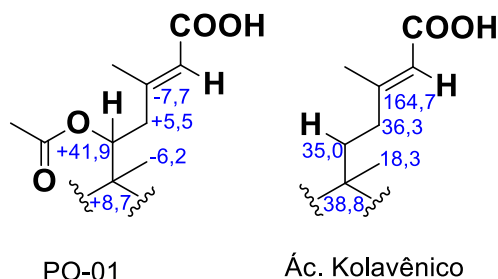
Figura 15. Principais correlações a mais de uma ligação $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC observadas para PO-01.



(\curvearrowright) Acoplamentos a longa distância (2J e 3J) $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC

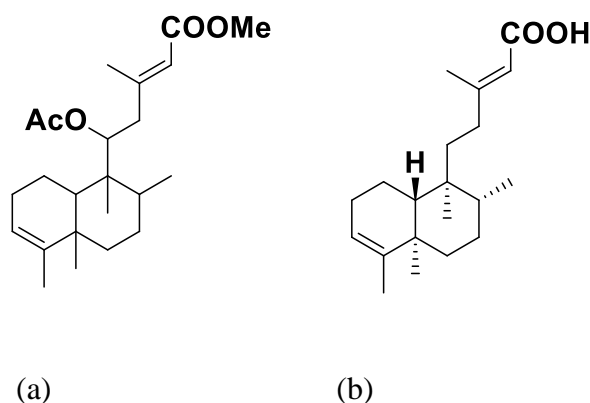
Por fim, foi estabelecida a posição em C-11 para o grupo Acetil. A presença deste grupo causa uma diminuição do deslocamento químico dos carbonos α -posicionado C-9 e β -posicionados C-11 e C-12, bem como um aumento no deslocamento químico dos carbonos γ -posicionados C-13 e C-20, resultado da compressão estérica γ -gauche como ilustrado na Figura 16, pág. 38. Estas informações foram obtidas quando comparado com dados descritos para o ácido kolavênico, já descrito na literatura para a espécie *P. ornatus* (Rijo et al., 2002; Silvestein et al., 2007).

Figura 16. Efeito da compressão estérica (*Y-gauche*) sobre os deslocamentos químicos (ppm) de PO-01 e ácido Kolavênico.



Diante do que foi discutido e levando em consideração os acoplamentos a mais de uma ligação (HMBC) mostrado anteriormente, pode assumir que PO-01 trata-se de um derivado do ácido kolavênico, seu éster metílico.

Figura 17. Estrutura proposta para PO-01(a) e seu composto de referência ácido Kolavênico (b).

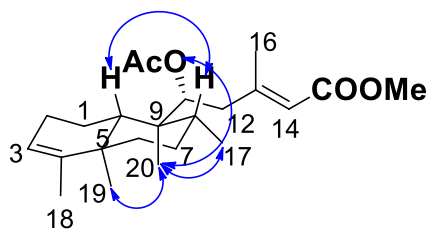


Por fim, a estereoquímica relativa de PO-01, foi estabelecida após análise do seu espectro de correlação espacial $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (Fig. 30, pág. 47). A interação espacial observada entre os sinais das metilas em δ_{H} 1,04 (H-19), 0,76 (H-20), 0,97 (H-17) e 1,99 (H-11-OAc), mostraram que estes grupos estão α -posicionados. A interação espacial entre os sinais de hidrogênio 1,3 β -posicionados em δ_{H} 1,42 (d, $J=17,28$; 1H-10) e 1,54-150 (1H-8), evidenciando a fusão *trans* para os anéis A/B. Através das correlações observadas e partindo do pressuposto que espécies de *Plectranthus* produzem compostos seguindo a rota normal Biosintética piro fosfato de geranilgeranila (Dewick M. P. 2009) (Fig. 03 e 04, pág. 26 -27) pode-se propor com segurança a fusão *trans* para os anéis A/B, assim como o arranjo espacial *cis* para as metilas (H-20/19/17) (Fig. 18, pág. 39). Por último, os deslocamentos químicos dos prótons metílicos e vinílico permitiram assinalar a cadeia lateral C-9 de PO-01 como sendo parte de um sistema *E*-olefínico, somado ao fato de que o sistema de *Z*-olefínico ainda não foi

observado em diterpenos isolados de espécies de plantas oriundas do gênero *Plectranthus* (Oliveira, et al., 2005; Abdel-mogbi et al., 2002).

Levantamento bibliográfico acerca do gênero *Plectranthus* mostrou que quase todos os diterpenos isolados desse gênero que apresentam o sistema decalina com fusão *trans* e arranjo espacial condizentes com o que foi observado no espectro de correlações espacial $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY.

Figura 18. Representação estrutural de PO-01 com suas principais correlações $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY.



(↷) Correlações $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY

De acordo com o que foi discutido anteriormente e com base na comparação dos dados espectrais de PO-01 com os do ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico (Fig. 19a, pg. 40), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -73,3^\circ$, (c 1,7 em CHCl_3), incluindo seus respectivos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C e propriedades físicas, pode-se concluir a completa estrutura de PO-01, incluindo a estereoquímica dos centros estereogênicos, bem como a configuração *E* para a dupla ligação em C-13/14 (Oliveira, et al., 2005; Rijo et al., 2002a, 2005b, 2011d).

Assim, a estrutura de PO-01 foi determinada (Fig. 19a, pág. 40) como sendo 11*R*-acetoxi-neocleroda-3,13*E*-dien-15-oato de metila, o qual se trata de um novo derivado do ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico. A possibilidade de este ser um artefato foi desconsiderada uma vez que em nenhuma das etapas de extração ou isolamento foi utilizado MeOH. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de PO-01, incluindo os dados espectrais de RMN do ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico estão sumariados na Tabela 07, pág. 41.

Figura 19. Representação das estruturas do ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico (b) e PO-01 (a), isolados de *P. ornatus*.

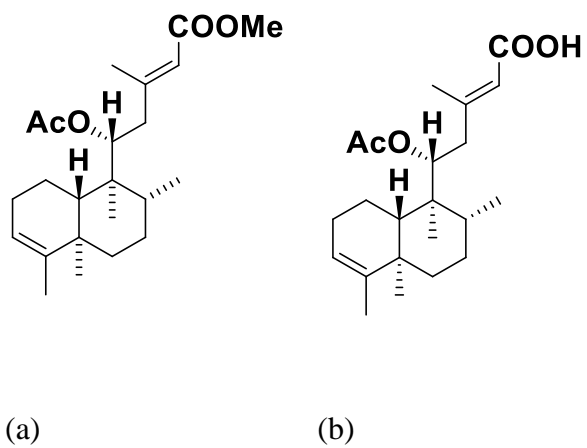


Tabela 07. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-01, comparados com os do ácido Kolavênico. Constante de acoplamento (J) em Hz.

C	^{13}C	Lit. *	^1H	Lit. * (CDCl_3)	HMBC	
					$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	19,5	19,5	1,86; dd ($J=13,5;13,5$) 1,65; d ($J=5,1$)	1,87; m 1,55; m	H-10	-
2	27,3	27,3	2,10; s	2,10; m 1,99; m	-	-
3	120,6	120,6	5,19; s	5,19; s	H-2	H-1/18
4	144,5	144,6	-	-	H-18	H-10/19
5	38,7	38,8	-	-	H-10	H-1/7/18
6	36,9	36,9	1,71; d ($J=12,3$) 1,21-1,11; m	1,73; m 1,19; dd ($J=3,6;$ 9,2)	-	H-19
7	28,3	28,3	1,36; d ($J=4,5$)	1,45; m	-	H-17
8	36,2	36,2	1,54-150; m	1,55; m	H-17	H-11/20
9	43,4	43,4	-	-	H-10/20	H- 7/11/17
10	47,5	47,5	1,42; d ($J=17,2$)	1,40; m	-	H- 6/19/20
11	76,0	76,0	5,44; d ($J=10,8$)	5,44 dd ($J=1,3;$ 9,8)	H-12	H-10/20
12	41,8	42,2	2,41; d ($J=13,0$) 2,24; d ($J=12,3$)	2,44; d ($J=13,2$) 2,28; m	H-11	H-14/16
13	157,0	160,1	-	-	H- 14/12/16	H-11
14	118,1	118,1	5,64; s	5,67; s	-	H-12/16
15	166,7	171,7	-	-	H-14;	H-OMe
16	18,8	19,1	2,13; s	2,16; d ($J=1,2$)	-	H-14/12
17	17,9	17,9	0,97; d ($J=6,1$)	0,98; d ($J=6,4$)	-	-
18	18,2	18,3	1,57; s	1,56; s	-	-
19	20,5	20,5	1,04; s	1,05; s	-	-
20	12,0	12,1	0,76; s	0,77; s	-	H-10/11
OMe	51,0		3,66; s		-	-
AcO	170,8	171,0	-	-	H-OAc	H-11
	21,0	21,0	1,99; s	2,02; s	-	-

*Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos de Oliveira, M. P. *et al.*, 2005.

Figura 20. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-01 no modo positivo.

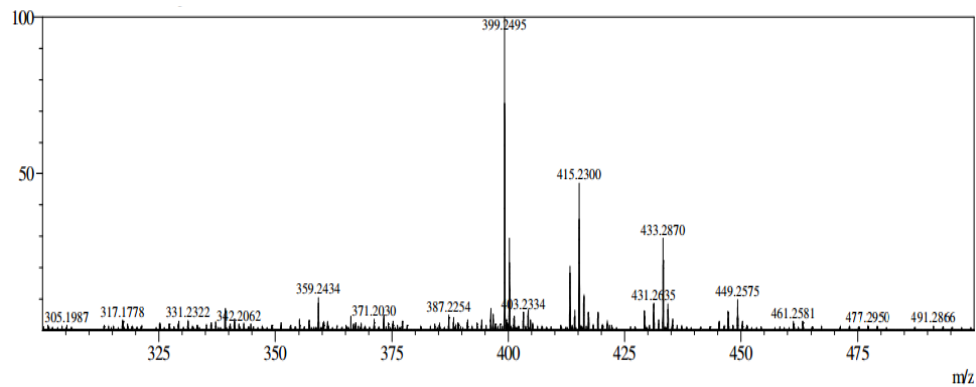


Figura 21. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-01

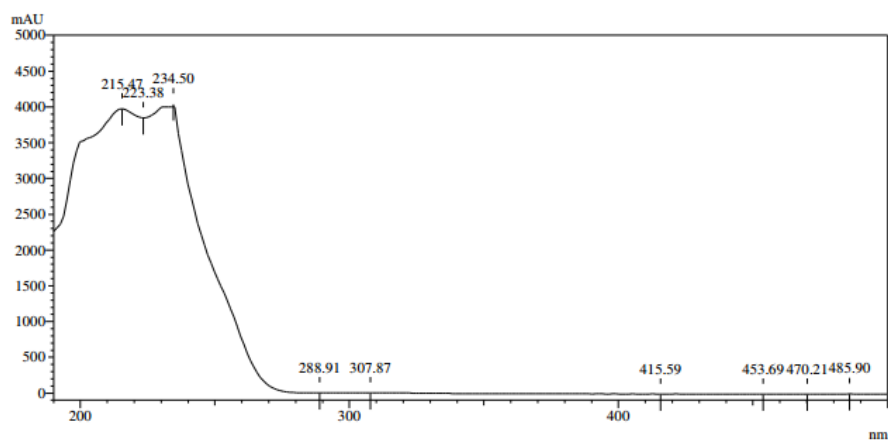


Figura 22. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-01.

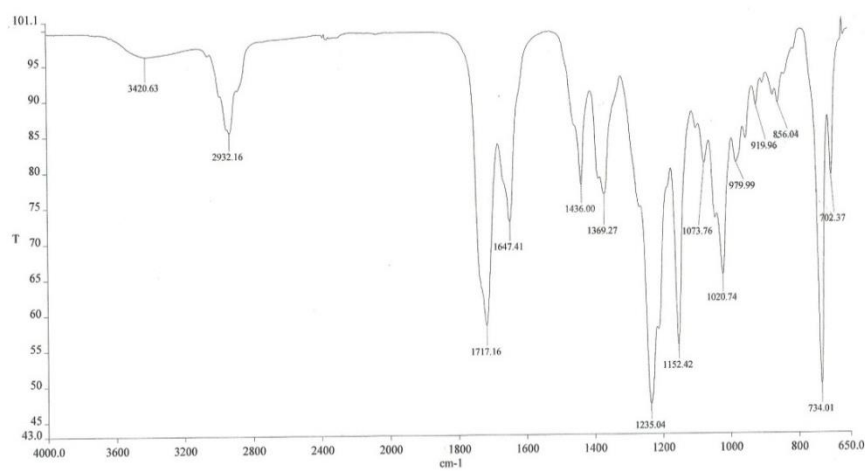


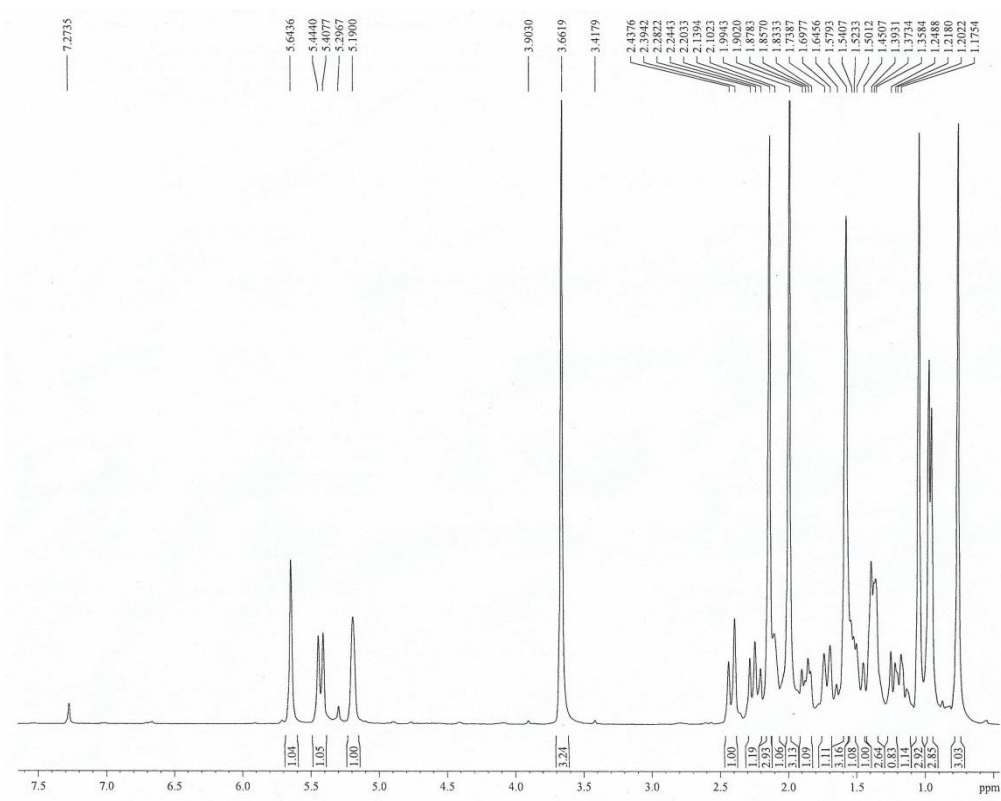
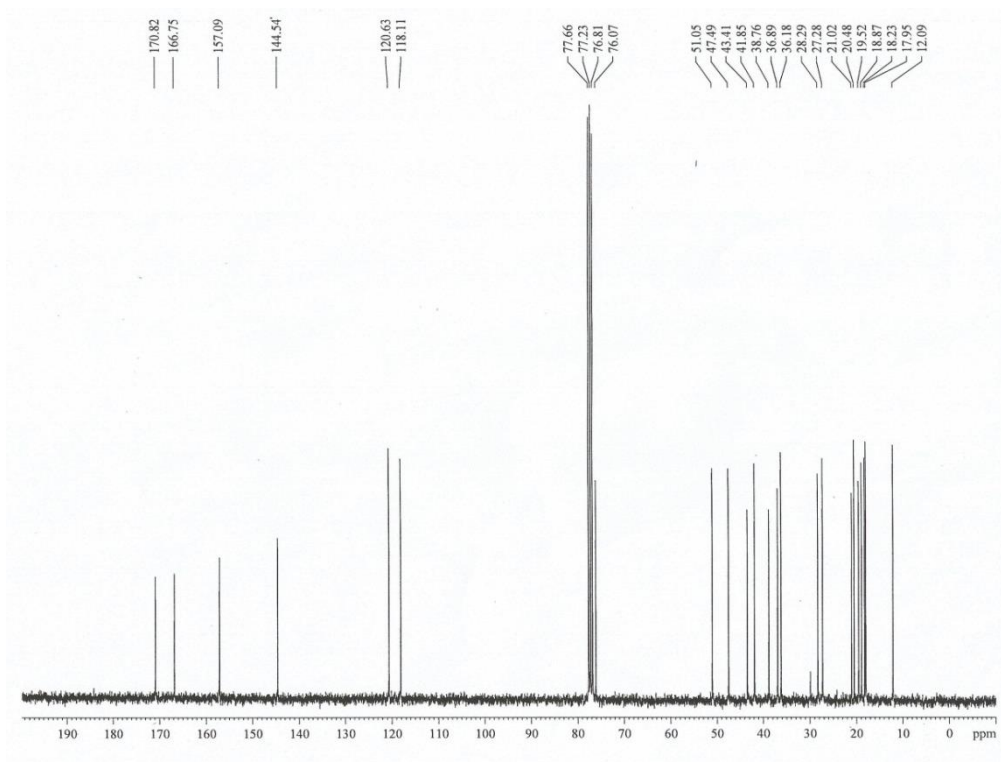
Figura 23. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-01.**Figura 24.** Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-01

Figura 25. Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl₃) de PO-01.

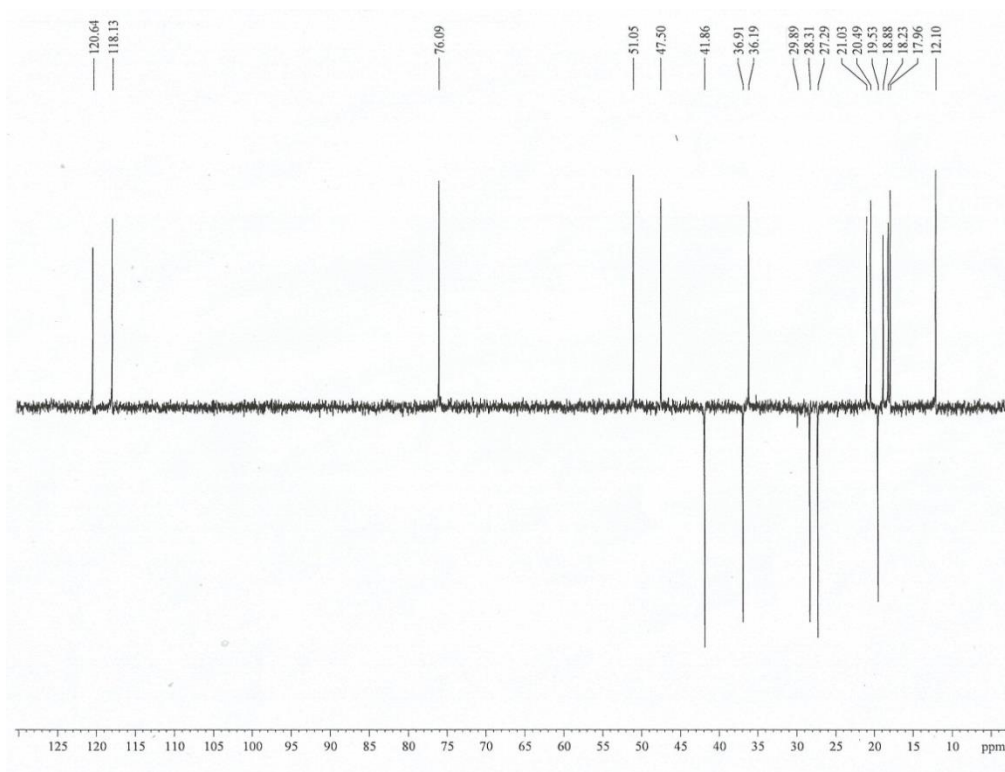


Figura 26. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H-COSY de PO-01.

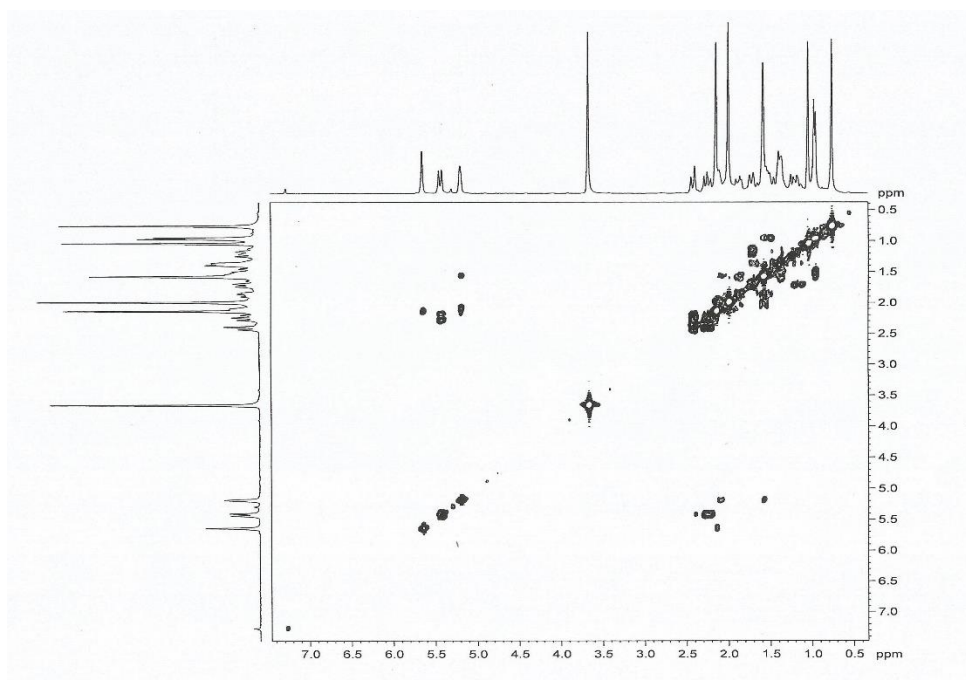


Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-01.

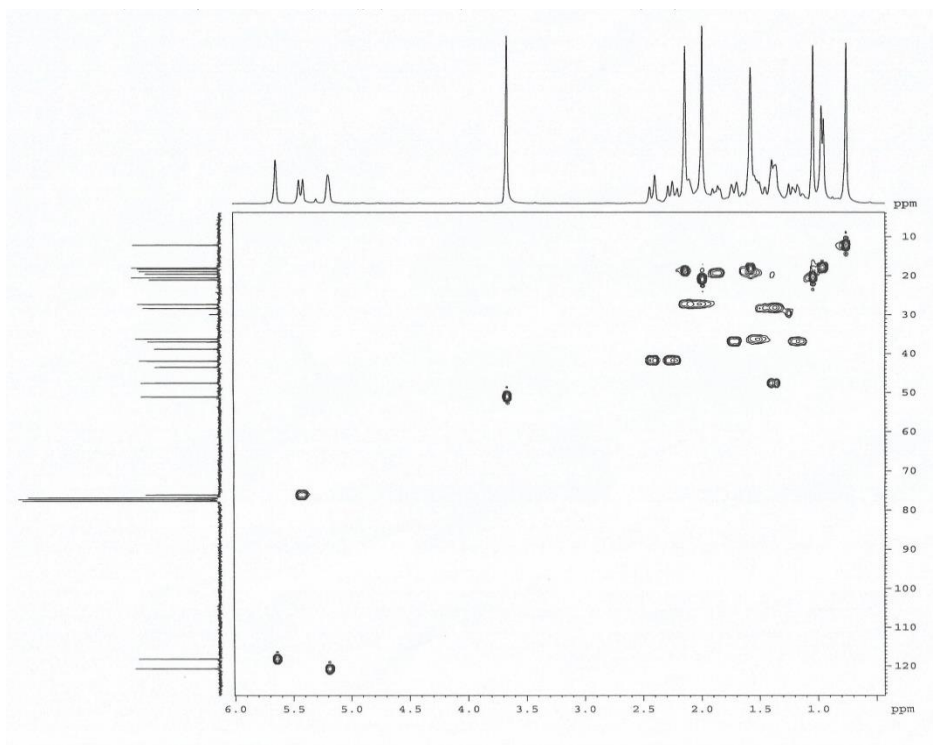


Figura 28. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-01.

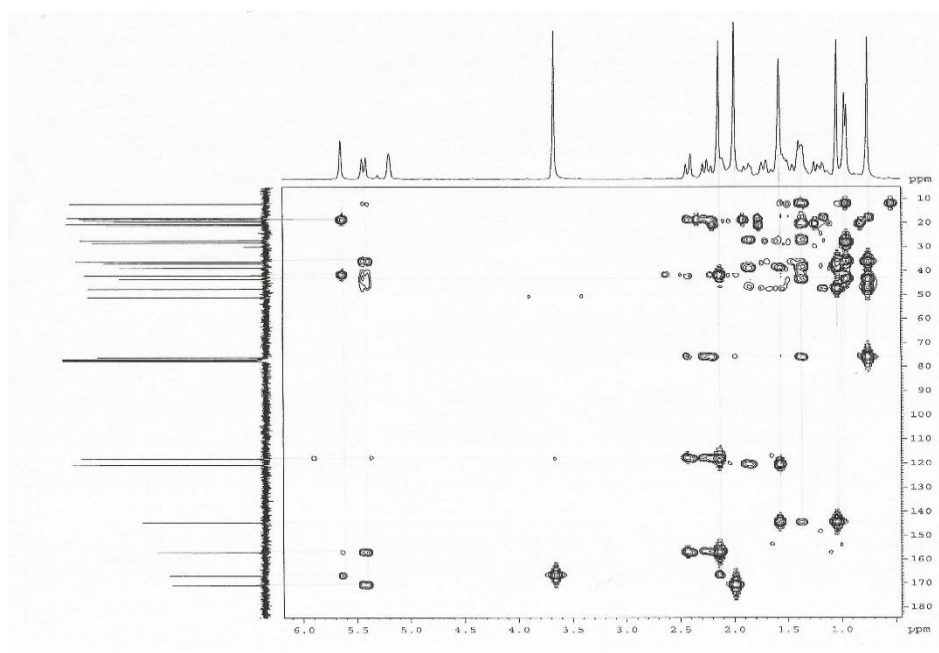


Figura 29. Expansões do espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-01 na faixa de 0,5 a 3,0 ppm.

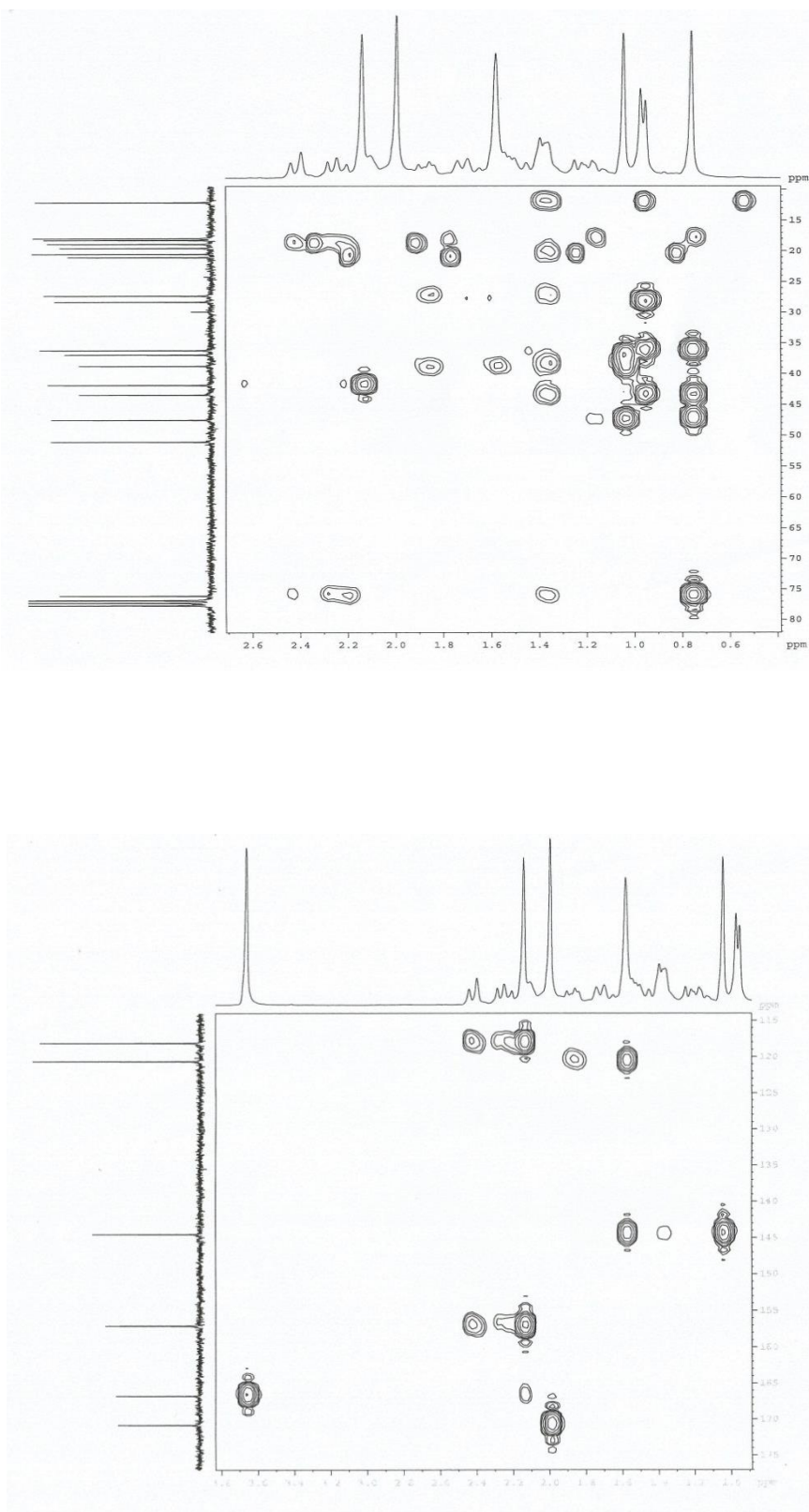
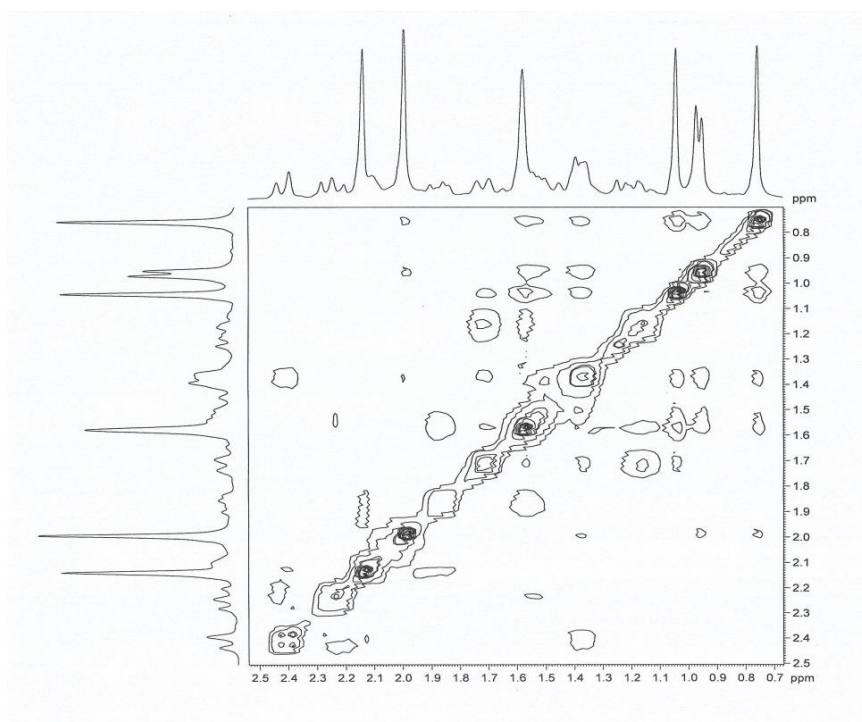
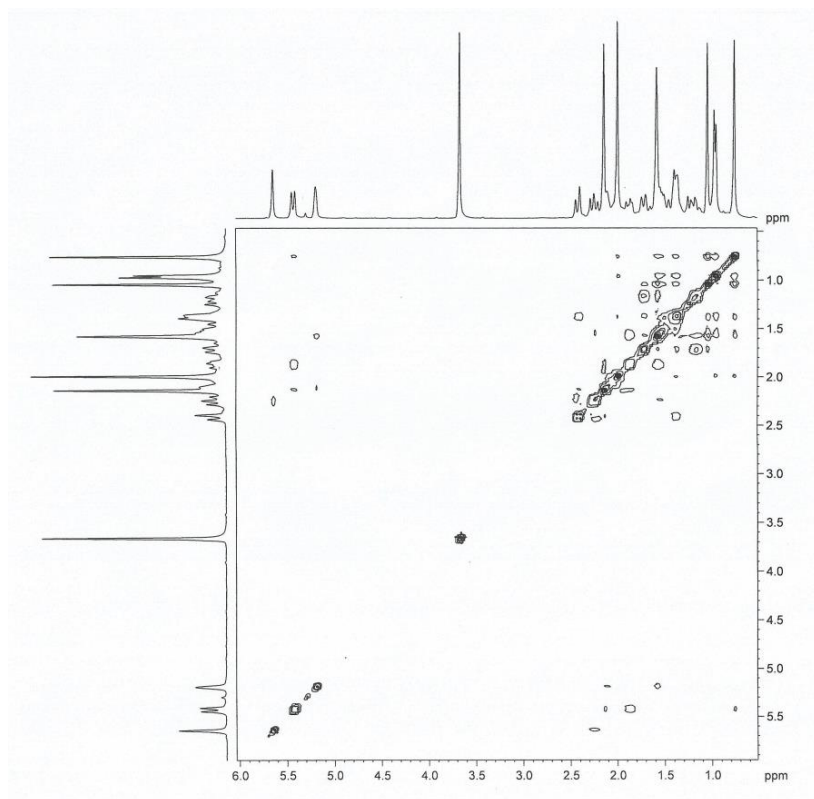


Figura 30. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-01 e expansão na faixa de 0,7 a 2,5 ppm.



4.2 Determinação estrutural de PO-02

Fracionamento cromatográfico da fr. A-VI.7 (pág. 143), usando CLAE coluna semi-preparativa de fase-reversa e fase móvel H₂O/MeOH, levou ao isolamento de 12,0 mg de uma resina esverdeada, $[\alpha]^{22}_D -48.06^\circ$ (*c* 0.1, CH₂Cl₂), UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 217,2 nm (Fig. 36, pág. 52), codificada como **PO-02**.

O espectro EMAR-ESI, mostrou um pico correspondente ao aduto de sódio em *m/z* 419,2403 [M+Na]⁺ (massa calculada, 419.2404, $\Delta - 0,24$ ppm) indicando a fórmula molecular C₂₂H₃₆O₆ a qual mostra grau de insaturação igual a cinco (Fig. 35, pág. 52).

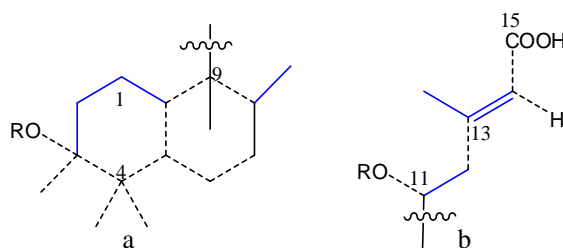
No espectro IV (Fig. 37, pág. 52), observou-se a presença de uma banda de deformação axial larga e intensa em 3436 cm⁻¹ para uma hidroxila, além de bandas em 1711 e 1643 cm⁻¹ característicos de carbonilas e dupla ligação carbono-carbono.

O espectro de RMN ¹H [500 MHz, MeOD] (Fig. 38, pág. 53), apresentou um singlete em δ_H 5,64 (H-14) característicos de próton olefínico, e sinais em δ_H 3,50 (H-3) e 5,40 (H-11, d, *J*=11.2 Hz), indicando prótons ligados a carbono oxigenado. A comparação dos espectros de RMN ¹H de PO-02 com PO-01 mostrou que estes são semelhantes, o que nos fez supor que o composto em questão também se trata de um diterpeno clerodano de estrutura análoga a PO-01. As mais significativas diferenças entre esses compostos foram três: 1) a redução no número de sinais correspondentes a hidrogênios olefínicos, indicando uma possível redução do grau de insaturação de PO-01, 2) a ausência de sinal para hidrogênios de grupo metoxila, indicando que PO-02 é um ácido carboxílico, como corroborado pelo deslocamento químico de C-15 (δ_C 169,7), no espectro de RMN ¹³C. A diferença de aproximadamente de 3,0 ppm é condizente com a presença de um ácido carboxílico conjugado. Finalmente, 3) foi à presença de um singlete largo em δ_H 3,50, inferido a hidrogênio oximetínico.

O espectro de RMN ¹³C BB [500 MHz, MeOD] (Fig. 39, pág. 53) de PO-02 apresentou 22 linhas espectrais, configurando a natureza do composto como um diterpeno. A subtração dos sinais do espectro de RMN ¹³C-BB com o DEPT 135° (Fig. 40, pág. 54), em conjunto com espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C – HMQC (Fig. 42, pág. 55) permitiu a definição do padrão de hidrogenação de PO-02 e a correta associação de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono. Como esperado, a comparação entre os espectros de RMN ¹³C de PO-02 com o composto descrito anteriormente, também se mostrou bastante semelhante. As principais diferenças encontradas foram: o já comentado aumento de 3,0 ppm no deslocamento químico do C-15, a ausência de sinal para grupo metoxila e, mais importante, a presença de três (03) linhas espectrais em torno de 77,0 ppm, típicos de carbono saturado ligado a oxigênio.

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (Fig. 41, pág. 54), exibiu diagrama de contorno que mostram correlações entre os sinais em δ_{H} 5,64 (H-14) com os hidrogênios metílicos em 2,20 (H-16), correlação do hidrogênio em δ_{H} 5,40 (H-11) com 2,27 (H-12) e do hidrogênio em δ_{H} 3,50 (H-3) com 2,04 (H-2), bem como outros acoplamentos ilustrados na figura 31.

Figura 31. Fragmentos estruturais mostrando os principais acoplamentos no espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-02.

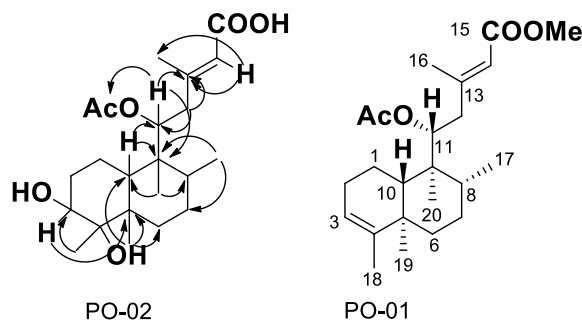


(—) Correlação RMN 2D ^1H , ^1H -COSY;

O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Fig. 43, pág. 57) mostrou correlações entre os sinais em δ_{H} 5,64 (H-14) com os sinais de carbono em δ_{C} 158,6 (C-13) e δ_{C} 19,0 (C-16), confirmando a presença da cadeia alifática em C-9. Além disto, possibilitou atribuir a exata posição de cada substituinte, como por exemplo, as hidroxilas em C-3 e C-4 foram confirmadas através dos acoplamentos entre o hidrogênio δ_{H} 3,50 com o carbono δ_{C} 43,3 (C-5) e δ_{H} 1,20 com δ_{C} 77,6 (C-3), enquanto o grupo acetoxila em C-11 foi confirmado através da correlação entre os sinais de δ_{H} 5,40 com os carbonos em δ_{C} 42,5 (C-10), 158,6 (C-13) e 172,8 (11-ACo). As demais correlações observadas para PO-02 encontram-se disponíveis na figura 32, pág. 49.

De acordo com os dados obtidos nos espectros de RMN 1D e 2D de ^1H , ^{13}C , COSY e HMBC, somados aos experimentos IV e EMAR-ESI, podemos afirmar que PO-02 é um diterpeno de esqueleto clerodano análogo a PO-01, figura 32, pág. 49.

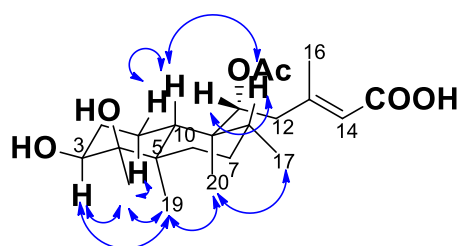
Figura 32. Principais acoplamentos a longa distância observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC para PO-02.



(↷) Acoplamentos a longa distância (2J e 3J) ^1H , ^{13}C -HMBC

A estereoquímica relativa de PO-02 foi obtida a partir da interpretação do espectro de RMN 1D ^1H , ^1H -NOESY (Fig. 46, pág. 57), através das correlações entre hidrogênios das metilas em δ_{H} 0,98 (Me-17), 0,79 (Me-20), 1,20 (Me-18), 1,18 (Me-19) que se apresentam α -posicionados e das correlações dos hidrogênios δ_{H} 1,54 (H-8) e 1,92 (H-10) de forma 1,3-diaxial, confirmando a fusão *trans* para os anéis A e B igual a PO-01, assim como a β -orientação dos grupos hidroxila confirmado através da correlação do sinal do hidrogênio oximetínico δ_{H} 3,50 com as metilas 1,20 (Me-18), 1,18 (Me-19) como observadas são figura abaixo.

Figura 33. Principais correlações observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^1H – NOESY para PO-02.



(↻↻) Correlações ^1H , ^1H -NOESY

Com base no que foi discutido, a estrutura de PO-02 foi estabelecida como Ácido 11*R*-acetoxi-3,4-dihidroxi-neocleroda-13*E*-en-15-oico, um diterpeno o qual está sendo reportado pela primeira vez na literatura. (Figura 34, pág. 50).

Figura 34. Representação estrutural de PO-02

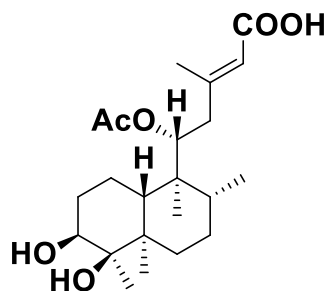


Tabela 08. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD) de PO-02. Constante de acoplamento (J) em Hz.

C	^{13}C	^1H	HMBC	
			$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	31,6	1,90; m 1,70; m	-	-
2	19,0	2,04; m 1,46; d ($J=11,2$)	-	-
3	77,6	3,50; sl	-	H-18
4	76,9	-	-	-
5	43,3	-	H-19	H-3
6	33,8	1,64; d ($J = 13,2$) 1,29; d ($J=10,2$)	-	H-19
7	28,5	1,49; d ($J=15,3$) 1,42; m	-	H-17
8	37,2	1,54; m	H-17	H-20
9	44,6	-	H-10/20	H-11/17
10	42,5	1,92; d ($J=11,2$)	-	H-19/20
11	78,0	5,40; d ($J=11,2$)	H-12	H-10/20
12	42,9	2,63; d ($J=14,3$) 2,27; d ($J=10,2$)	H-11	H-14/16
13	158,6	-	H-14/12/16	H-11
14	119,6	5,64; s	-	H-16
15	169,7	-	-	-
16	19,0	2,20; s	-	H-14/12
17	18,5	0,98; d ($J=6,2$)	-	-
18	21,3	1,20; s	-	-
19	18,2	1,18; s	-	-
20	12,5	0,79; s	-	H-10/11
AcO	172,8/20,9; s	1,99; s	-	H-11

Figura 35. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-02 no modo positivo.

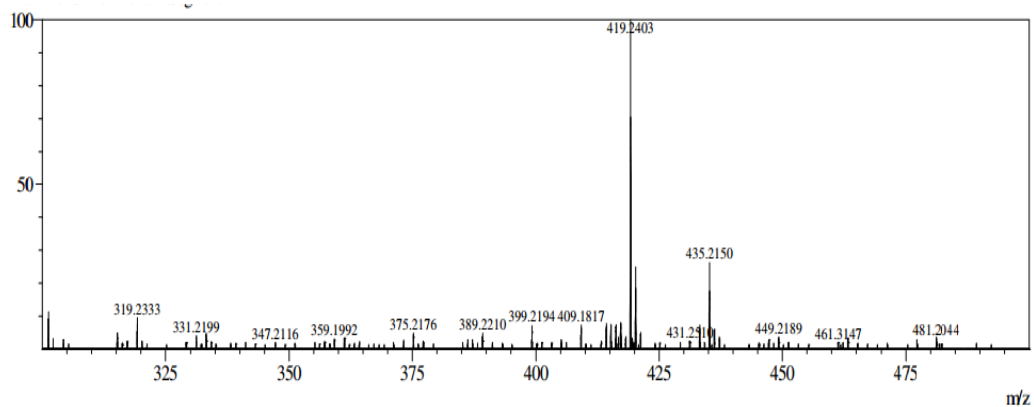


Figura 36. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max}) (pda-190-500 nm) para PO-02.

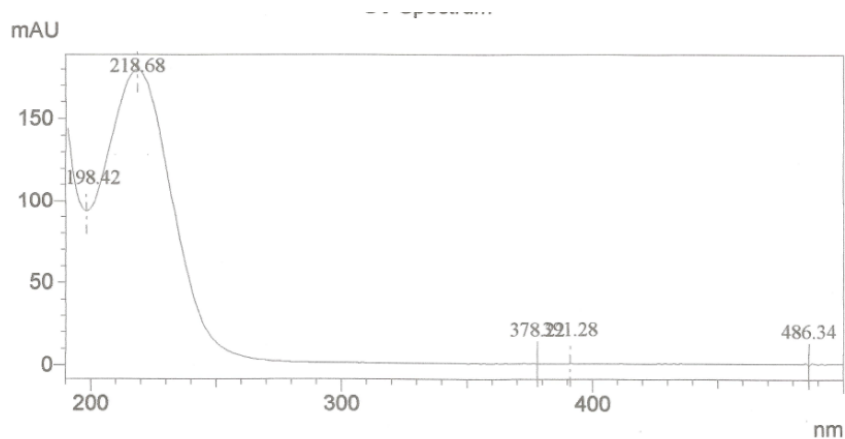


Figura 37. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-02.

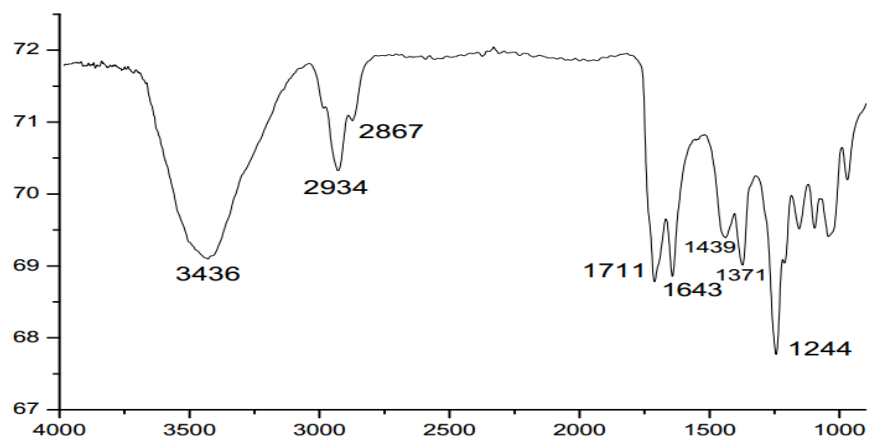


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de PO-02.

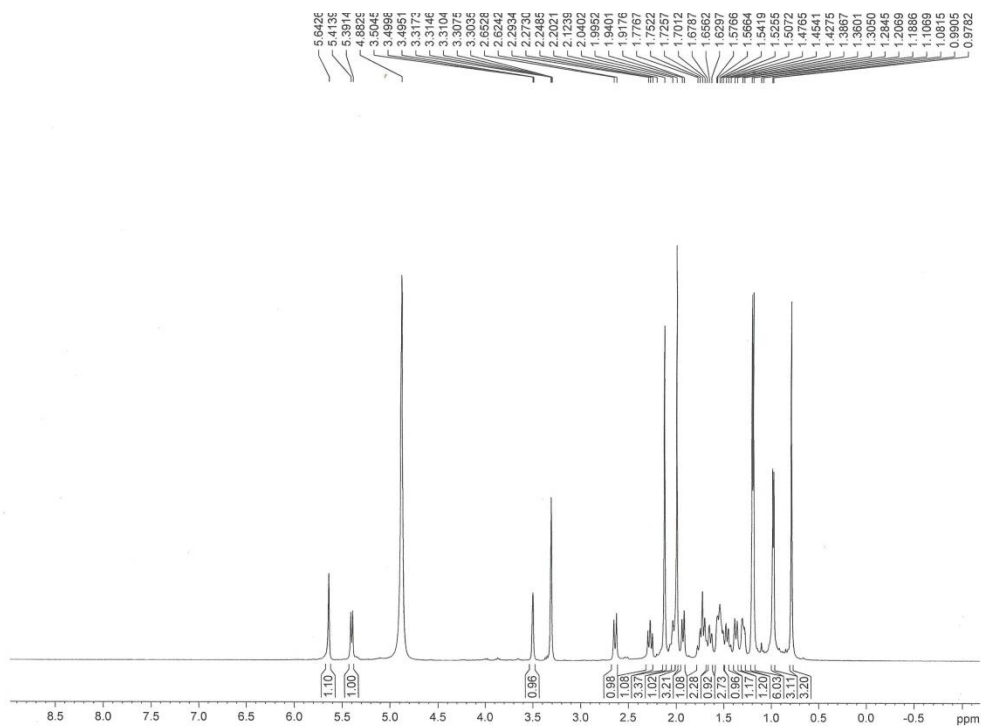


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de PO-02.

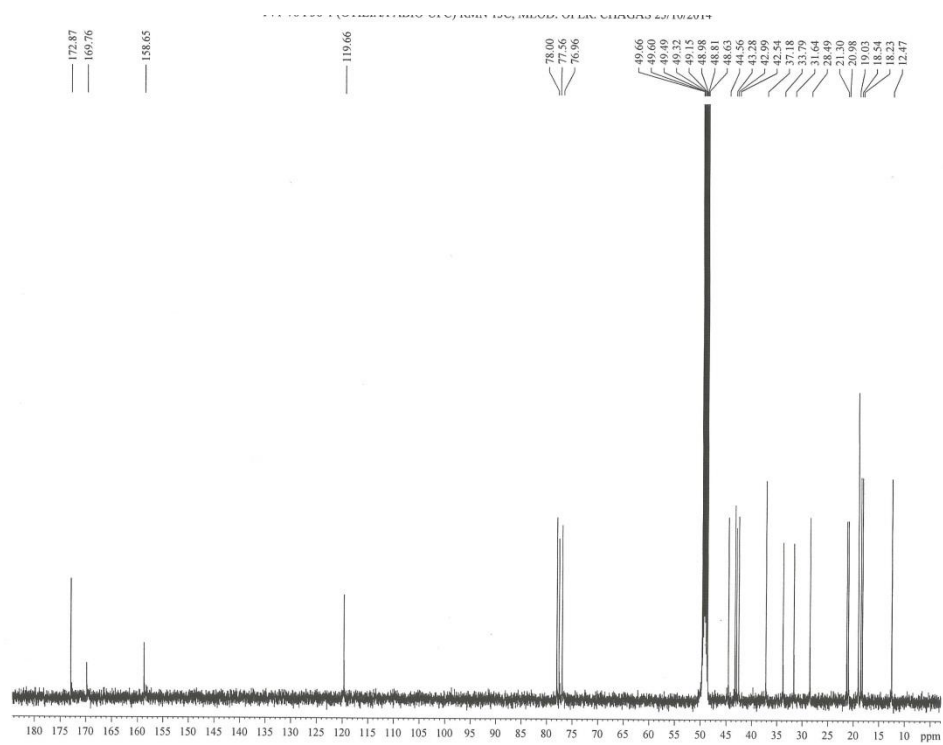


Figura 40. Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, MeOD) de PO-02.

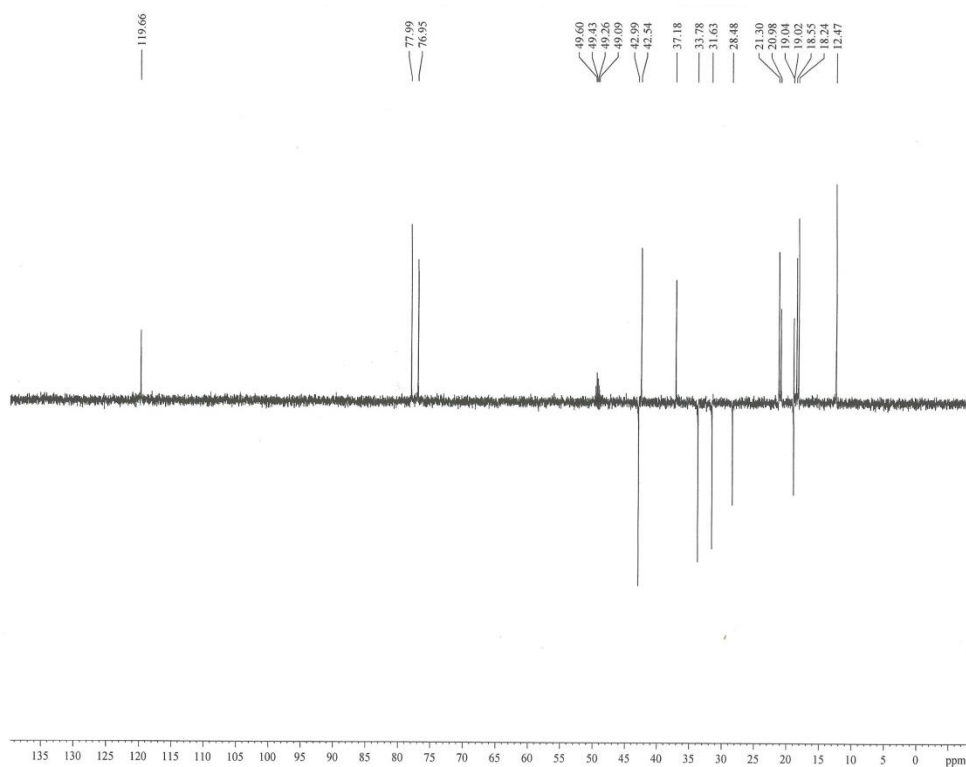


Figura 41. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, MeOD) de PO-02.

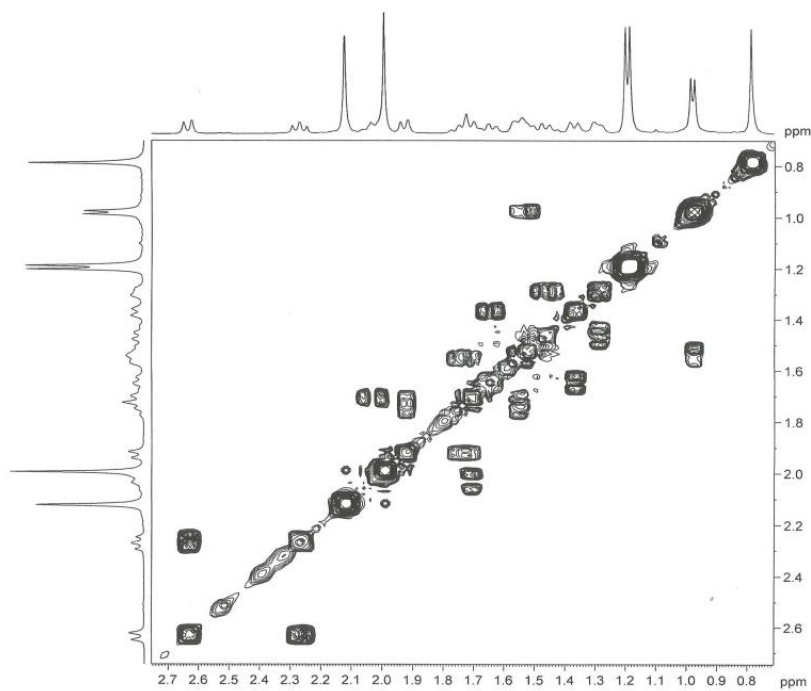


Figura 42. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMQC de PO-02.

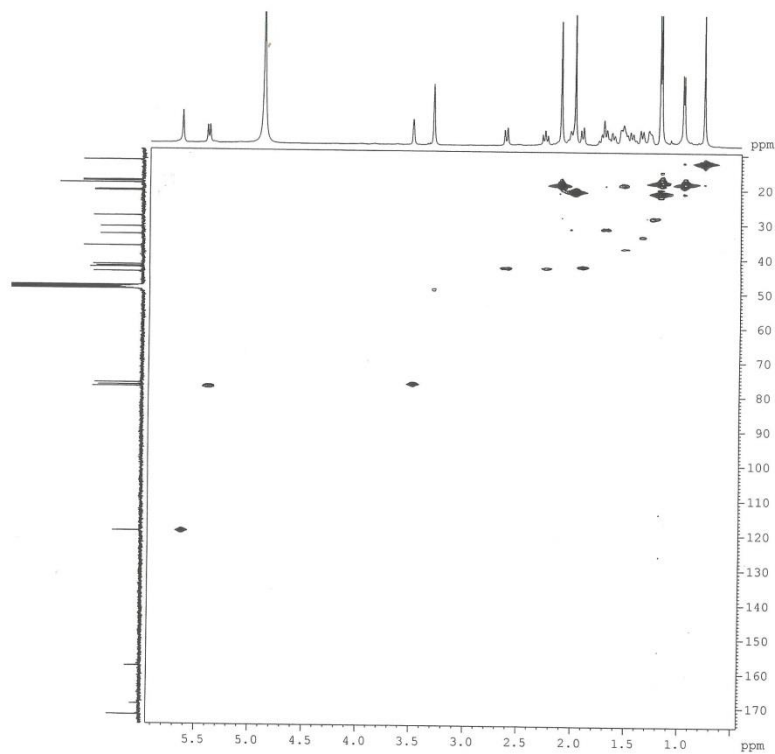


Figura 43. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02.

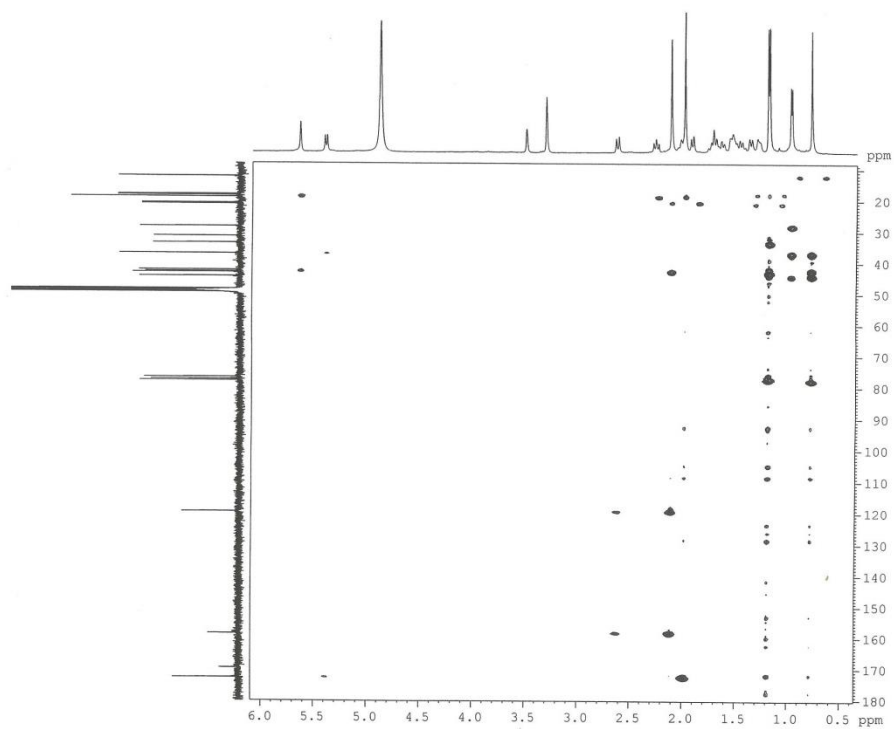


Figura 44. Expansão do espectro 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02 na faixa de 1,0 a 2,5 ppm.

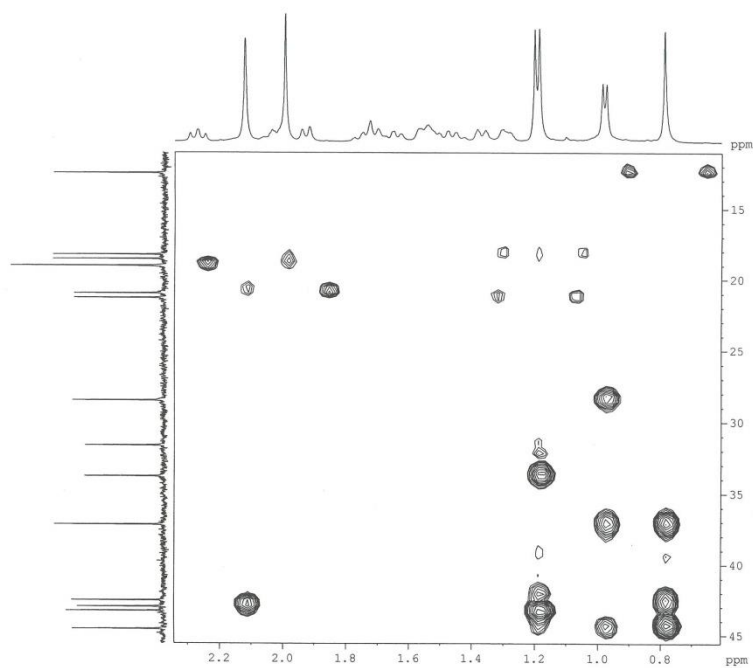


Figura 45. Expansão do espectro 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-02 na faixa de 3,0 a 6,0 ppm.

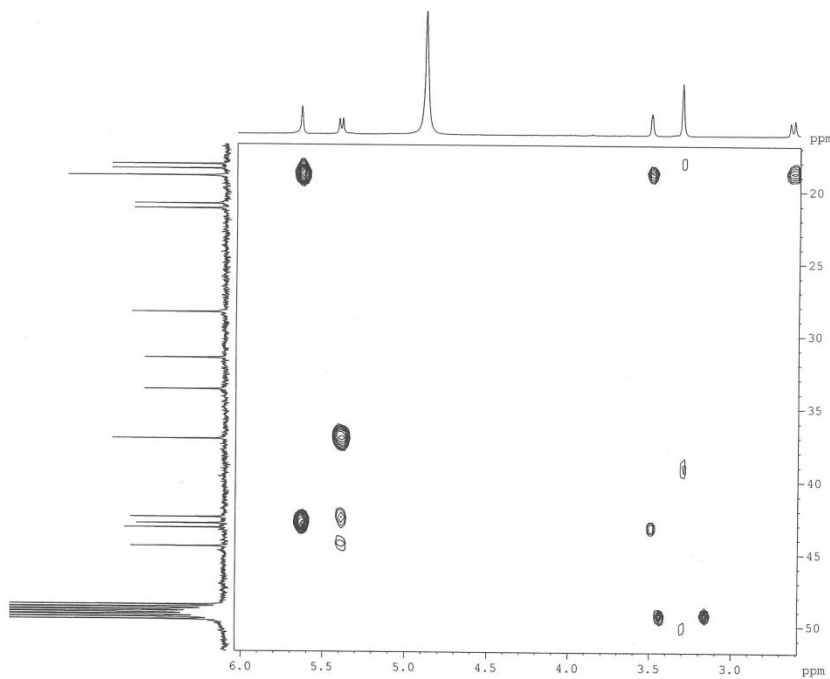
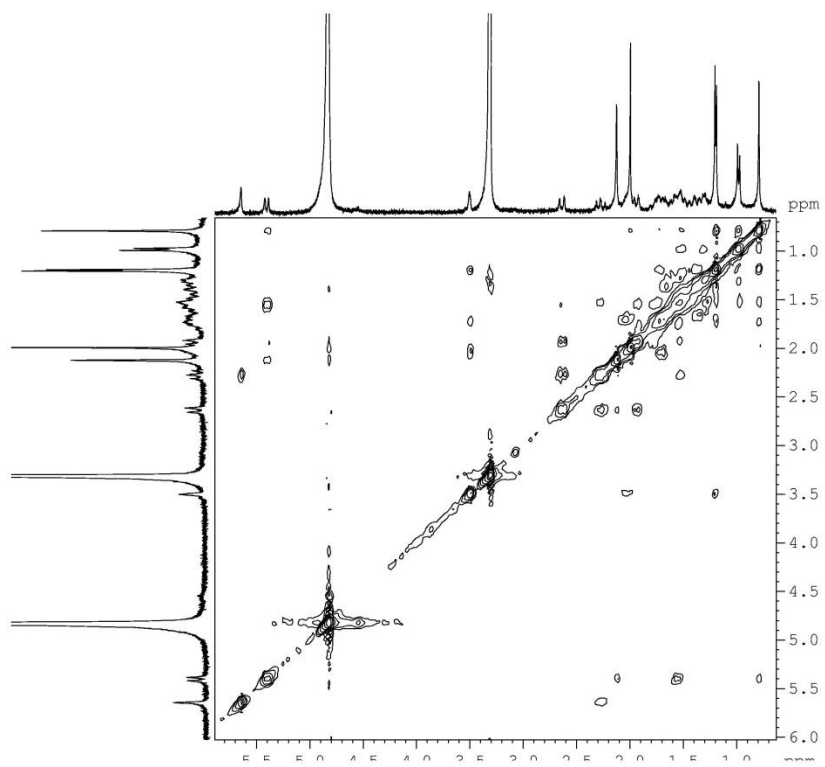


Figura 46. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-02.



4.3 Determinação estrutural de PO-03

Fracionamento da fr. A-VI.7 por CLAE (pág. 143), empregando coluna semi-preparativa de fase-reversa e sistema de solvente H₂O/MeOH, resultou no isolamento de 13,4 mg de um óleo esverdeado, $[\alpha]_D^{22} -47.50^\circ$ (*c* 0.1, CH₂Cl₂); UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 219,4 nm (Fig. 53, pág. 63), codificado como **PO-03**.

A fórmula molecular de C₂₂H₃₂O₅, com índice de deficiência de hidrogênio igual a sete, foi determinada através do pico em *m/z* 399,2149 [M+Na]⁺ (massa calculada, 399,2142, Δ +1,75 ppm), obtido através do espectro EMAR, utilizando a técnica ionização ESI (Fig. 52, pág. 63).

O espectro de IV (Fig. 54, pág. 63) apresentou uma banda em 3452 para grupos hidroxila e bandas em superposição em torno de 1750-1650, relativo à deformação axial de grupos funcionais carbonilados, assim como as bandas de confirmação para carbonila, possivelmente de éster em aproximadamente 1238 e 1149 (Pavia, et al., 2010).

O espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) (Fig. 55, pág. 64), de PO-03 quando comparado àqueles de PO-01 (pág. 35) e PO-02 (pág. 48) mostrou algumas semelhanças, particularmente quanto aos sinais da cadeia lateral ligada em C-9. Na região de campo baixo, apresentou um singleto em δ_H 9,98 característico de hidrogênio aldeído, um singleto em δ_H 5,66 (H-14) indicando a presença de olefina e um duplete em δ_H 5,10 (H-11, *J*=10,3 Hz) para um hidrogênio oximetínico. Além de uma série de sinais na região de campo alto, mostrou também sinais para seis grupos metilas em δ_H 2,12; 1,99; 1,96; 0,88; 0,86 e 0,84.

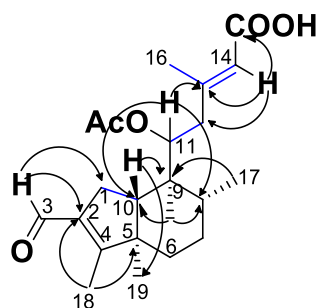
O espectro de RMN ¹³C BB [300 MHz, CDCl₃] (Fig. 56, pág. 64) apresentou 22 linhas espectrais, evidenciando um diterpeno acetilado como os anteriores. A comparação dos sinais dos espectros de RMN ¹³C-BB e DEPT 135° (Fig. 57, pág. 65) possibilitou definir o padrão de hidrogenação de cada átomo de carbono, sendo seis carbonos metílicos, quatro carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e sete carbonos não hidrogenados, dos quais dois são carbonos carbonílicos δ_C 171,4 e 170,8, como observado no espectro de infravermelho. A análise do espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C - HSQC (Fig. 59, pág. 66) possibilitou a correlação exata de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal, inclusive confirmou a presença do grupo funcional aldeído, bem como a correlação inequívoca dos hidrogênios diastereotópicos aos carbonos a eles ligados: 2H-1 (δ_H 2,50 e 2,22/ δ_C 28,2), 2H-6 (δ_H 1,62 e 1,31/ δ_C 33,9) e 2H-12 (δ_H 2,33 e 2,27/ δ_C 42,6), tabela 09, pág. 62.

Como esperado, a comparação dos espectros de RMN ^{13}C de PO-03 com os compostos descritos nas seções anteriores são bastante próximos, com exceção dos dados de RMN relativos ao anel A.

O espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (Fig. 58, pág. 65), apresentou os mesmos acoplamentos observados para os compostos descritos anteriormente, corroborando com a proposta de PO-03 ser um diterpeno clerodano (Fig. 14, pág. 37).

O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 60, pág. 66), exibiu correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 0,88 (Me-19) com δ_{C} 33,9 (C-6) e 51,5 (C-10) demonstrando que o anel B do sistema decalina continua intacto (Fig. 47, pág. 59). Adicionalmente, mostrou a correlação do sinal de hidrogênio aldeídico com os sinais de carbono δ_{C} 28,2 (C-1), 137,9 (C-2), a correlação do sinal da metila em δ_{H} 1,99 (Me-18) com 137,9 (C-2), 51,7 (C-5), assim como a correlação do sinal em δ_{H} 2,50 (2H-1) com δ_{C} 137,9. Estes dados foram compatíveis com um sistema envolvendo um anel de cinco membros e uma porção aldeído α,β -insaturado, que pode ser formado a partir de um rearranjo do anel A, como presente em PO-01 e PO-02.

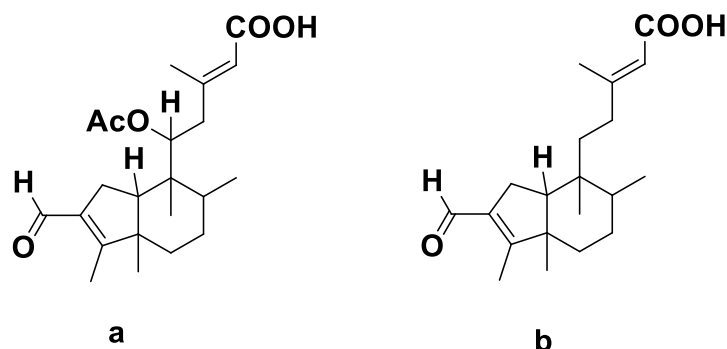
Figura 47. Principais correlações observadas nos espectros de RMN ^1H , ^1H -COSY e HMBC de PO-03.



(—) RMN 2D ^1H , ^1H -COSY; ^1H , (↪) ^{13}C -HMBC

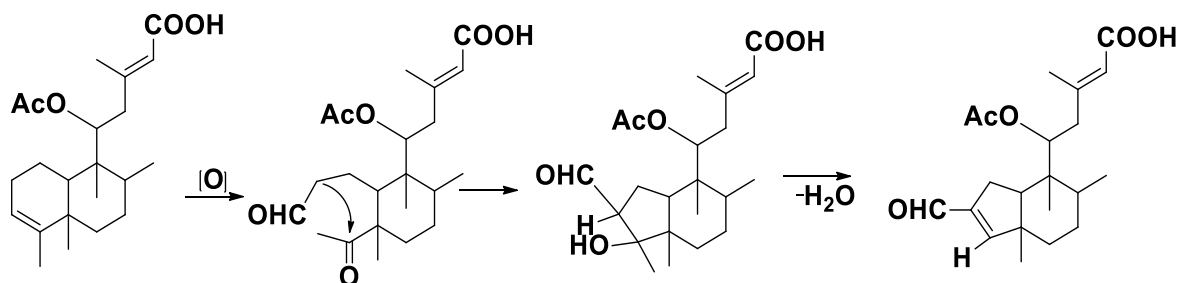
A literatura mostrou vários diterpenos envolvendo o mesmo rearranjo observado em PO-03, sendo que maioria são diterpenos furanoclerodanos (Macias, et al., 2010). Entre estes, o ácido solidagonal (Fig. 48b, pág. 60) que se diferencia PO-03 apenas pela ausência do grupo acetoxila na posição C-11 (Fig. 48a, pág. 60).

Figura 48. Estruturas de PO-03 (a) e seu composto de referência, o ácido solidagonal (b).



Bohlmann (1985) e Macias (2010) propuseram uma rota simplificada de biossíntese para a formação deste rearranjo na qual o composto precursor é o ácido kolavênico (Fig.17, pág. 58). Este sofre um processo de clivagem oxidativa na insaturação localizada entre os carbonos C-3 e C-4, seguido de um processo de ciclização aldólica, e em seguida uma desidratação (Fig. 49, pág. 60). A mesma explicação pode ser utilizada para a biossíntese de PO-03, considerando o ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico, como precursor de PO-03. O ácido 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oico foi previamente isolado de *P. ornatus* (Oliveira, et al., 2005).

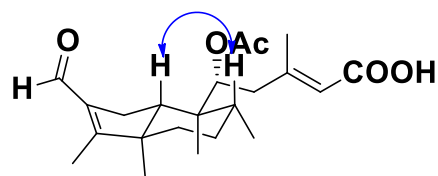
Figura 49. Biossíntese proposta para formação de PO-03.



Adaptado de Bohlmann et al (1985)

Por fim, a estereoquímica relativa de PO-03 foi realizada utilizando RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (Fig. 61, pág. 67). A fusão *trans* para os anéis A e B da decalina foi confirmada através dos acoplamentos espaciais observados entre os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,39 (H-8) com δ_{H} 1,76 (H-10) relevando uma orientação 1,3-diaxial. A correlação entre os hidrogênios dos carbonos metílicos não foi observada devido à sobreposição de seus deslocamentos químicos, nos fazendo propor que uma estereoquímica semelhante ao observado para de PO-01 e PO-02 e com dados da literatura do Ácido solidagonal.

Figura 50. Correlações observadas no espectro bidimensional $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - NOESY para PO-03.



(↪) Correlações $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - NOESY

Diante dos dados obtidos nos espectros de RMN e da literatura, atribui-se a completa estrutura para PO-03, como mostrados na figura abaixo, sendo nomeado como ácido 11*R*-acetoxisolidagonal.

Vale ressaltar que este tipo de rearranjo é pouco comum para diterpenos clerodanos não-furânicos, sendo em muitos casos, classificado como diterpeno do tipo abeo-clerodano. Esse fato revela o grande potencial de *P. ornatus* como produtor de novos metabolitos secundários com estruturas ímpares.

Figura 51. Representação estrutural para PO-03.

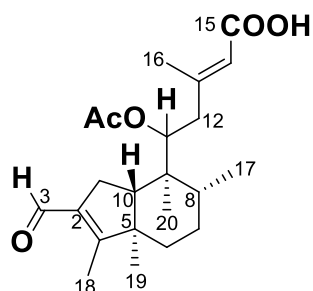


Tabela 09. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-03 em comparação com dados fornecidos pela literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit.*	^1H	^1H Lit.* CDCl_3	HMBC	
					$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	28,2		2,50; dd ($J=14,46$; 6,69) 2,22; m	2, 33; dd 2,17; ddq	-	H-3
2	137,9		-	-	H-1, H-3	H-18
3	188,9		9,93; s	9,96 (s)	-	-
4	159,6		-	-	-	-
5	51,7		-	-	-	H-18
6	33,9		1,62; m 1,31; m	1,65; ddd 1,35; m	-	H-19
7	28,7		1,52; m	1,55; m	-	-
8	37,2		1,39; m	1,45; ddq	-	H-11
9	42,8		-	-	H-10	-
10	51,5		1,76; dd ($J=14,01$; 7,56)	1,56; dd	-	H-11; H- 19
11	75,0		5,09; dd ($J=9,63$; 2,61)	1,40; m	-	-
12	42,6		2,33; m 2,27; m	2,05; ddd 1,96; ddd	H-11	H-14
13	170,7		-	-	-	H-11
14	118,1		5,64; s	5,66; tq	-	-
15	171,4		-	-	H-14	-
16	19,1		2,12; s	2,15; d	-	H-14
17	14,4		0,84; s	0,81; d	-	-
18	9,8		1,99; s	2,02; dd	-	-
19	17,4		0,88; s	0,92; s	-	H-10
20	16,4		0,86; s	0,85; s	-	H-10
11-AcO	170,8				-	H-11
COOCH₃	21,0		1,96; s		-	-

Figura 52. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-03 no modo positivo.

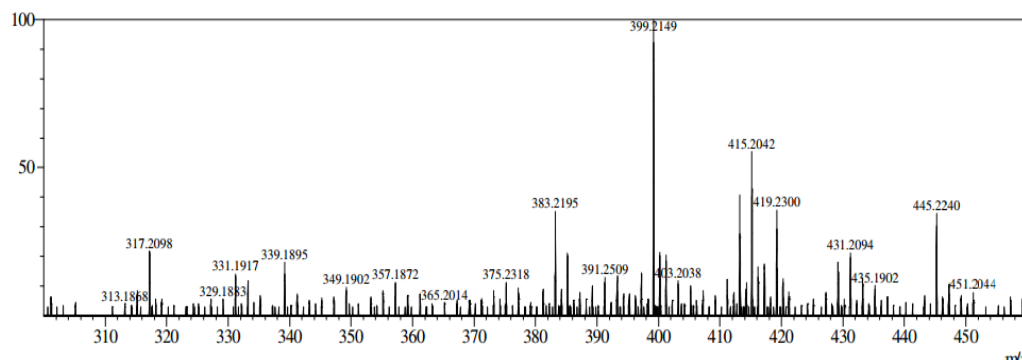


Figura 53. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-03.

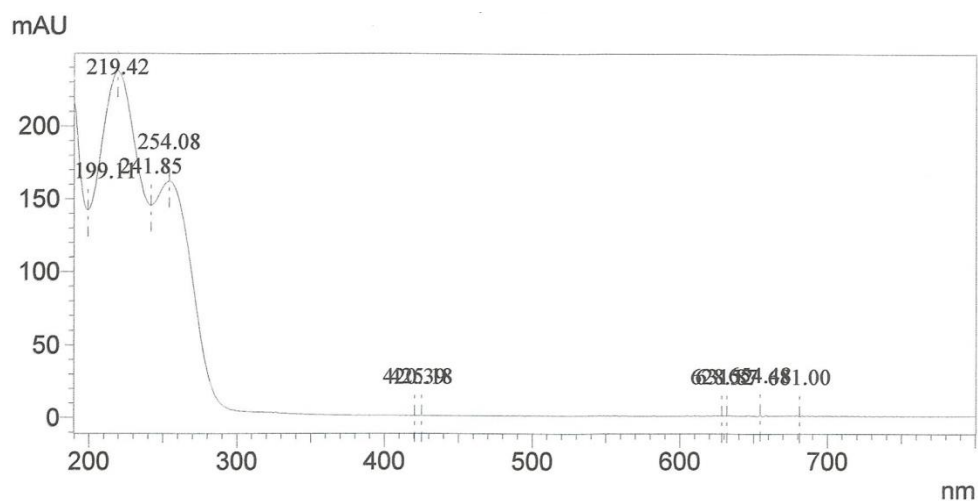


Figura 54. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-03.

Figura 55. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-03.

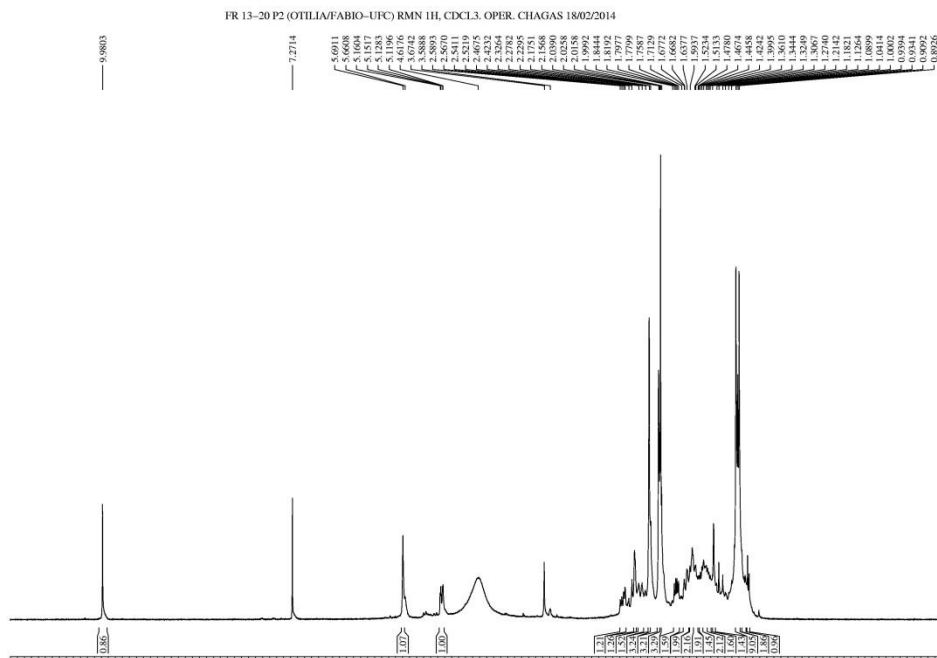


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de PO-03.

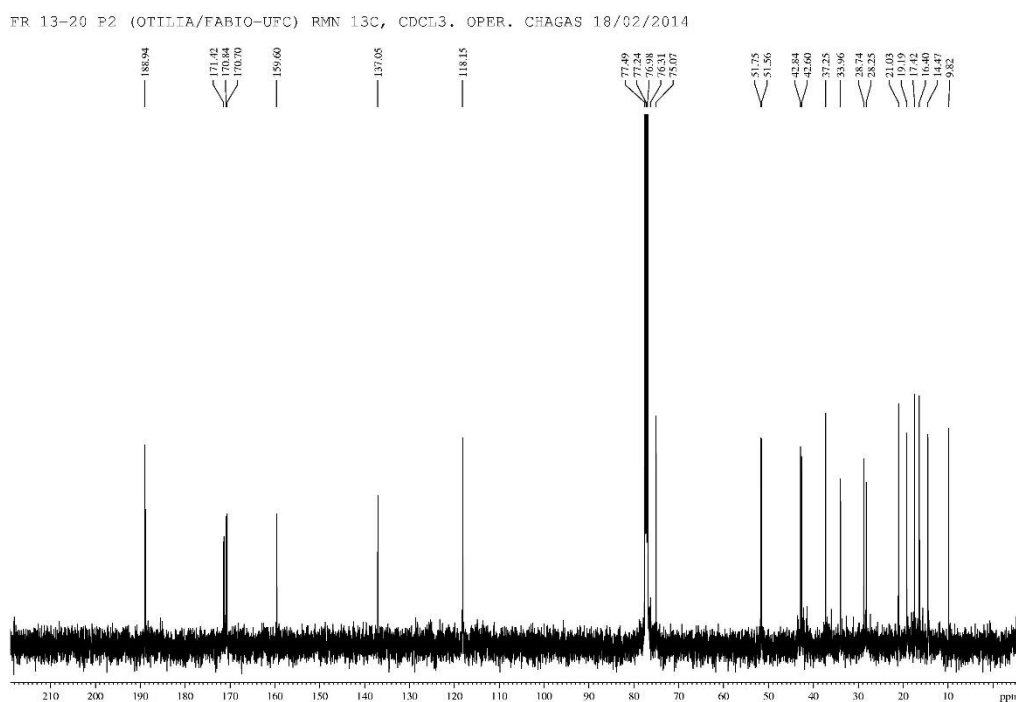


Figura 57. Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl₃) de PO-03.

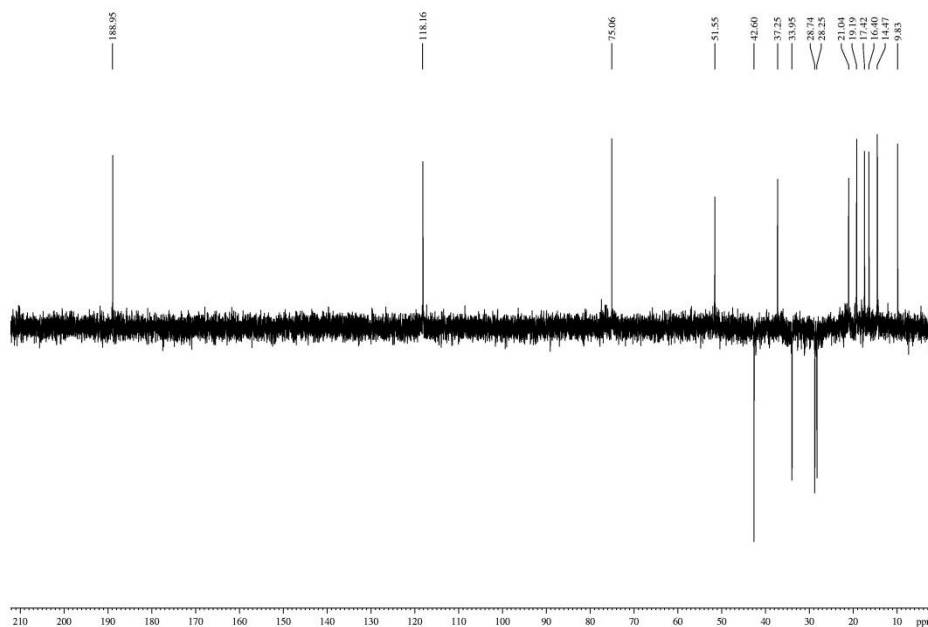


Figura 58. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H-COSY (300 MHz, CDCl₃) de PO-03.

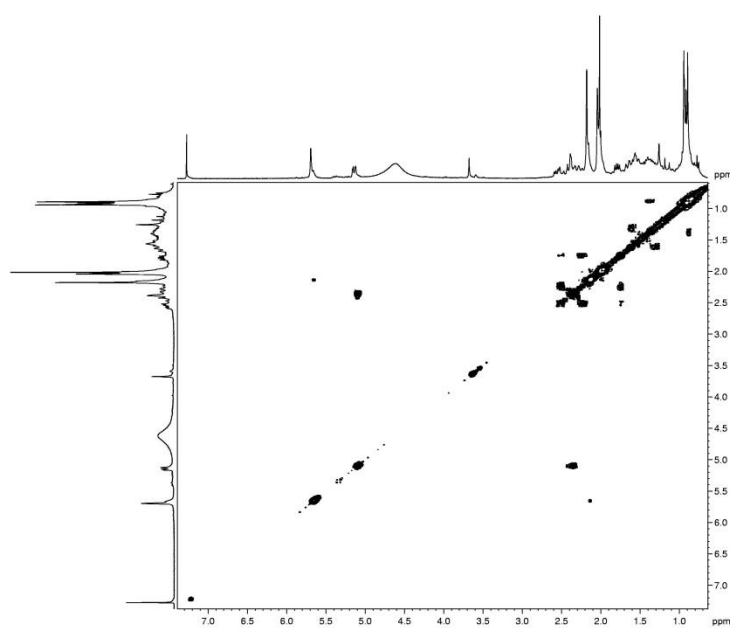


Figura 59. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-03.

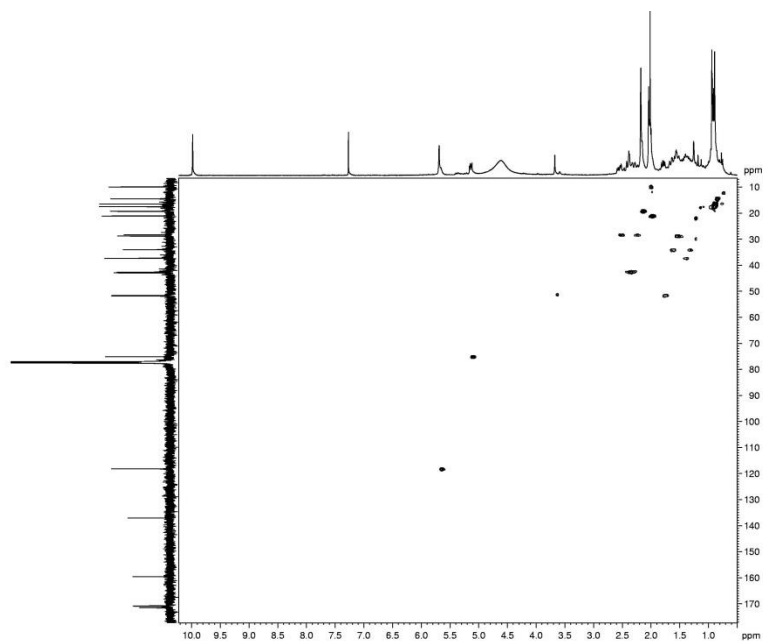


Figura 60. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-03.

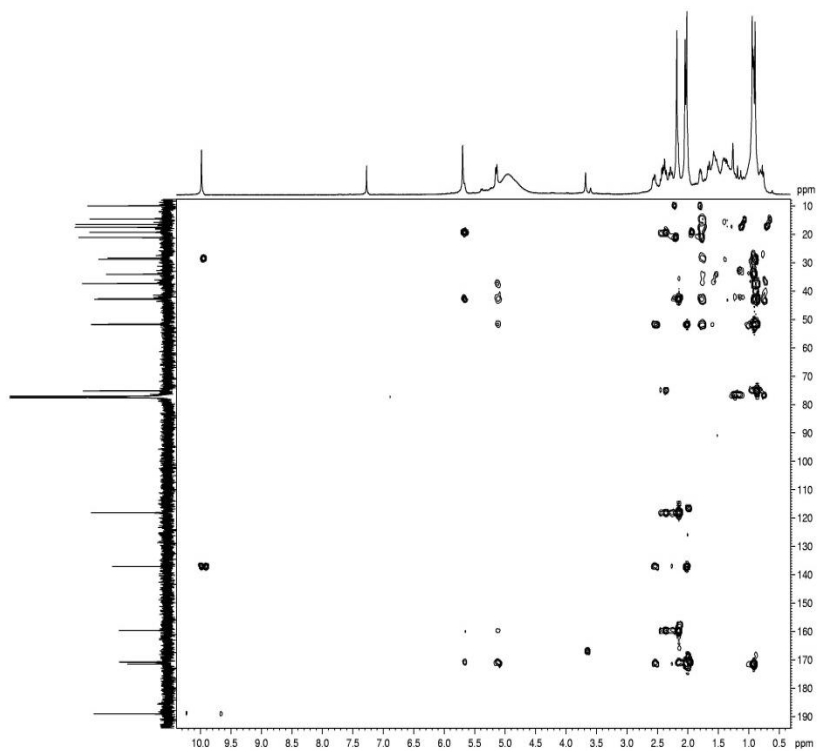
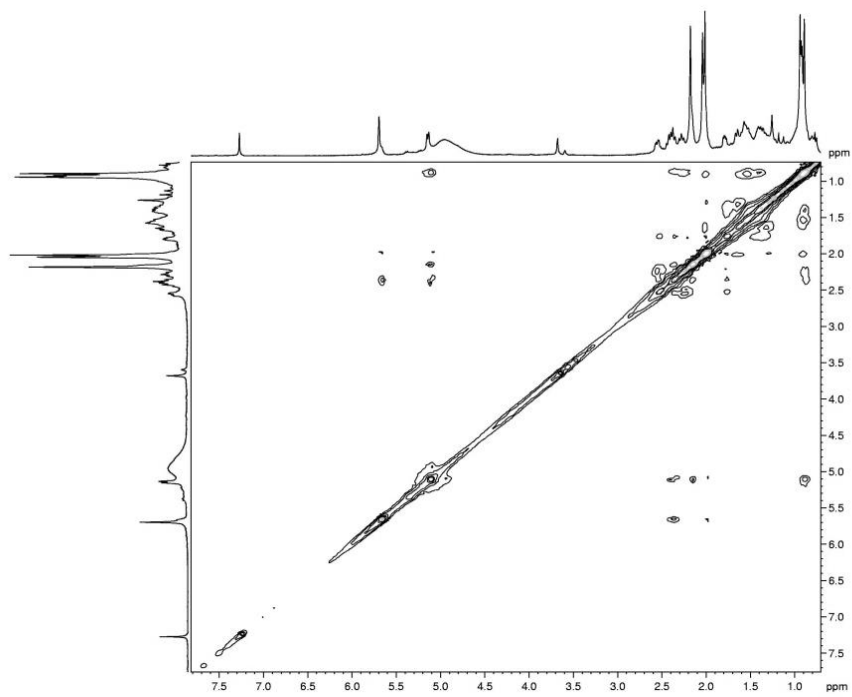


Figura 61. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-03.



4.4 Determinação estrutural de PO-04

A fração A-VI, oriunda do extrato hexânico (EHPO) (pág. 143), foi cromatografada utilizando CLAE, coluna semi-preparativa de fase-reversa e o sistema de solvente H₂O/MeOH 3:7, resultando no isolamento de 11,6 mg de uma resina amarelada, $[\alpha]^{22}_D -34.44^\circ$ (*c* 0,06; CH₂Cl₂); UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 218,6 nm (Fig.67, pág. 72), denominada de **PO-04**.

O espectro de EMAR-ESI (Fig.66, pág. 72), mostrou um pico em *m/z* 433,2199 para o aduto de sódio $[M+Na]^+$ indicando a fórmula molecular C₂₂H₃₄O₇Na (massa calculada, 433,2197, erro +0,46 ppm) a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênios igual a seis.

O espectro de IV (Fig. 68, pág. 72) indicou a presença de bandas de deformação axial em 1690 cm⁻¹, referente a múltiplas ligações carbono-oxigênio de carbonilas, possivelmente de ácido carboxílico e/ou ésteres, assim como bandas de deformação axial de ligação dupla carbono-carbono em 1635 cm⁻¹.

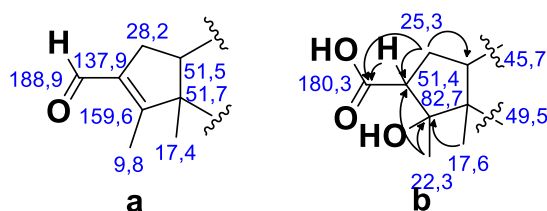
O espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃] (Fig. 69, pág. 73), mostrou semelhança com o de PO-03 descrito anteriormente. A principal diferença foi à ausência do sinal do hidrogênio de aldeído e a presença de um sinal em δ_H 2,95 (dd, *J*=3,5 e 3,3 Hz) correlacionado no espectro HSQC com o sinal de carbono metínico *sp*³ em δ_C 51,4. A desproteção tanto do sinal de hidrogênio como do sinal de carbono indicam uma possível proximidade com um átomo eletronegativo.

O espectro de RMN ¹³C CPD [75 MHz, CDCl₃] (Fig. 70, pág. 73) apresentou 22 linhas espectrais, de maneira análoga a PO-03, entretanto, diferindo quanto a ausência do sinal da carbonila de aldeído e a presença dos sinais em δ_C 180,3 (C-3) e 82,7 (C-4). A análise dos espectros de RMN ¹³C, em associação com o espectro de DEPT 135° (Fig. 71, pág. 74) possibilitou estabelecer o padrão de hidrogenação dos carbonos existentes na molécula, como: 6 CH₃, 4 CH₂, 5 CH e 7 C. Entre os carbonos não-hidrogenados, encontram-se os sinais em δ_C 180,2; 171,5 e 170,8 característicos de carbonos carboxílicos e carbonílicos. O espectro de RMN 2D ¹H,¹³C - HSQC (Fig. 73, pág. 75) possibilitou a correlação exata de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, auxiliando inclusive na atribuição dos sinais de hidrogênios diastereotópicos (Tabela 10, pág. 71).

A análise combinada dos espectros bidimensionais ¹H,¹H-COSY (Fig. 72, pág. 74) e ¹H,¹³C-HMBC (Fig. 74, pág. 75) mostrou que PO-04 é um diterpeno de esqueleto clerodano, análogo a PO-03. Por exemplo, no espectro ¹H, ¹H-COSY foi observado o acoplamento entre os hidrogênios diastereotópicos δ_H 2,15 (1-Ha)/1,80 (1-Hb) com δ_H 2,95 (H-2), bem como a correlações desses hidrogênios com os carbonos em δ_C 51,41 (C-2); 180,26 (C-3) e 45,67 (C-

10) verificada no espectro de HMBC. Adicionalmente verificou-se a correlação entre os sinais de hidrogênios δ_H 1,35 (Me-18) com os carbonos em δ_C 51,4 (C-2); 82,7 (C-4) e com o carbono em δ_C 49,5 (C-5), além do hidrogênio em δ_H 2,95 com o carbono em δ_C 180,26 (C-3). Estes dados mostram a oxidação de aldeído a ácido carboxílico e a hidratação da dupla ligação entre C2-C4. De maneira similar ao observado em PO-03, foi verificada a correlação entre o sinal da Me-18 com C-2, confirmando o rearranjo do anel A de seis membros da decalina, para um de cinco membros.

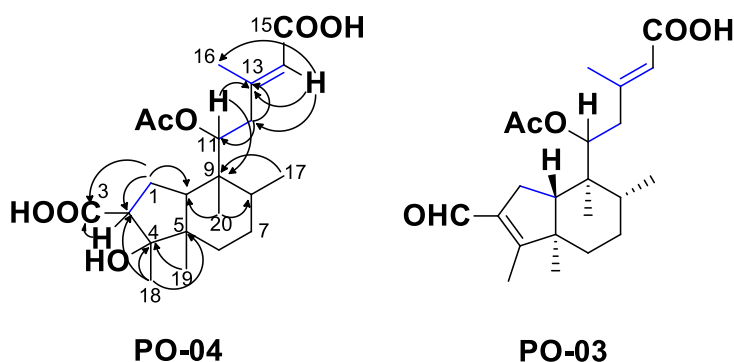
Figura 62. Fragmento observado no espectro 1H , ^{13}C -HMBC para o rearranjo do anel A de PO-03 (a) juntamente com PO-04 (b).



(—) RMN 2D 1H , 1H -COSY; (\curvearrowright) 1H , ^{13}C -HMBC

Em acordo com os dados obtidos a partir dos espectros de RMN uni- e bidimensionais, PO-04 se trata de um diterpeno de esqueleto clerodano com rearranjo no anel A da decalina, semelhante ao do ácido 11*R*-acetoxi-solidagonal (PO-03), como mostrado na figura 63, pág. 69.

Figura 63. Estrutura proposta para PO-04, apresentando os principais acoplamentos (COSY) e correlações (HMBC) e PO-03.

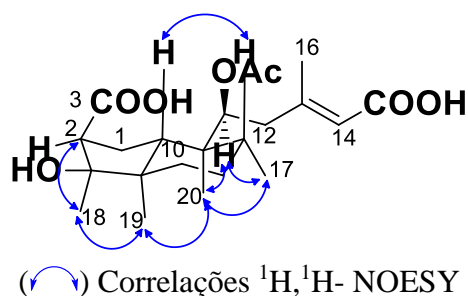


(—) RMN 2D 1H , 1H -COSY; (\curvearrowright) 1H , ^{13}C -HMBC

Por fim, a estereoquímica relativa de PO-04 foi realizada utilizando RMN 2D 1H , 1H -NOESY (Fig. 75, pág. 76), de onde se observou os acoplamentos do sinal em δ_H 2,95 (H-

02) e 1,35 (Me-18), assumindo uma β -orientação para os grupos funcionais COOH e OH. Somados a isso, verificou-se os acoplamentos entre os sinais dos hidrogênios das metilas em δ_H 0,78 (Me-20), 0,87 (Me-19), 0,98 (Me-17), 1,35 (Me-18) com arranjo espacial *cis*. A fusão *trans* para os anéis A e B foi confirmada pelo acoplamento dos sinais de δ_H 2,17 (H-10) e δ_H 1,47 (H-08) 1,3- β -orientados. Por fim a estereoquímica relativa do centro estereogênico C-11 foi estabelecida como sendo 11*S* devido aos acoplamentos apresentados pelo hidrogênio oximetínico δ_H 5,10 (H-11) com Me-17 e Me-20, diferenciando-se dos demais compostos relatados neste trabalho (figura 64).

Figura 64. Espectro de RMN 2D 1H , 1H -NOESY de PO-04.



A completa estrutura de PO-4 foi então estabelecida como Ácido 11*S*-acetoxi-solidago-3,15-dióico, sendo um diterpeno de esqueleto clerodano apresentado pela primeira vez na literatura e mostrado na figura abaixo.

Figura 65. Representação estrutural de PO-04

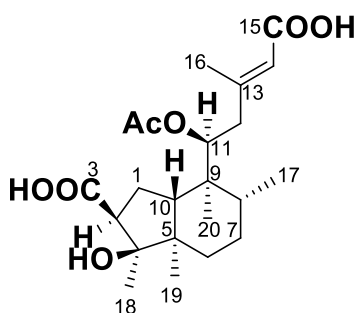


Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-04.

C	^{13}C	^1H	HMBC	
			$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	25,3	2,15; m 1,80; d ($J=11,67$)	H-10	-
2	51,4	2,95; dd ($J= 3,51; 3,27$)	H-1	Me-18
3	180,2	-	H-2	H-1ab
4	82,7	-	Me-18	Me-19
5	49,5	-	Me-19	H-10;Me-18
6	29,9	1,62; m 1,25 (d, $J=12,33$)	-	Me-19
7	28,8	1,47; sl	-	Me-17
8	36,7	1,47; m	Me-17	H-11;Me-20
9	43,2	-	Me-20	Me-20; Me-17
10	45,6	2,17; m	H-1	H-11; Me-19; Me-20
11	76,0	5,10; d ($J=10,29$)	H-12a/b	H-10; Me-20
12	42,6	2,49; d ($J=12,78$) 2,32; d ($J=12,99$)	H-11	H-14; Me-16
13	160,6	-	H-14; H- 12a/b, Me- 16	H-11
14	118,1	5,66 (s)	-	H-12; Me-16
15	171,5	-	H-14;	
16	19,1	2,20 (s)	-	H-14; H-12a/b
17	16,8	0,98; d ($J= 3,87$ Hz)	-	-
18	22,2	1,35; s	-	-
19	17,6	0,87; s	-	-
20	12,8	0,78; s	-	H-10; H-11
11-OAc	170,8	-	H-OAc	H-11
	21,0	2,02; s	-	-

Figura 66. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-04 no modo positivo.

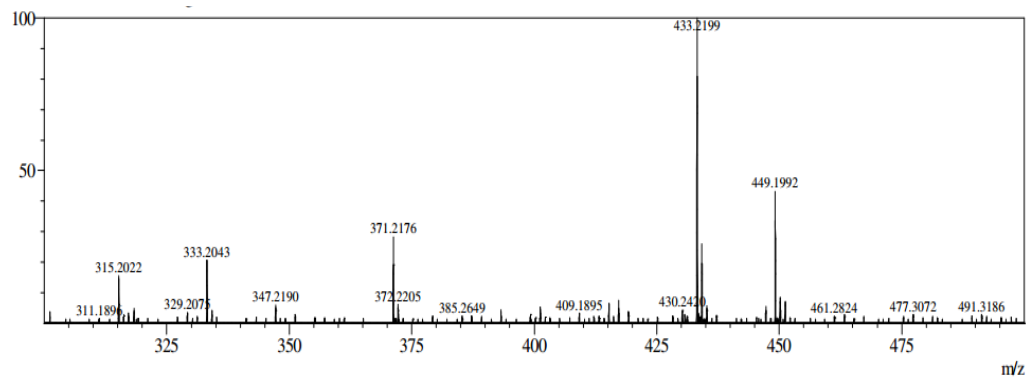


Figura 67. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-04.

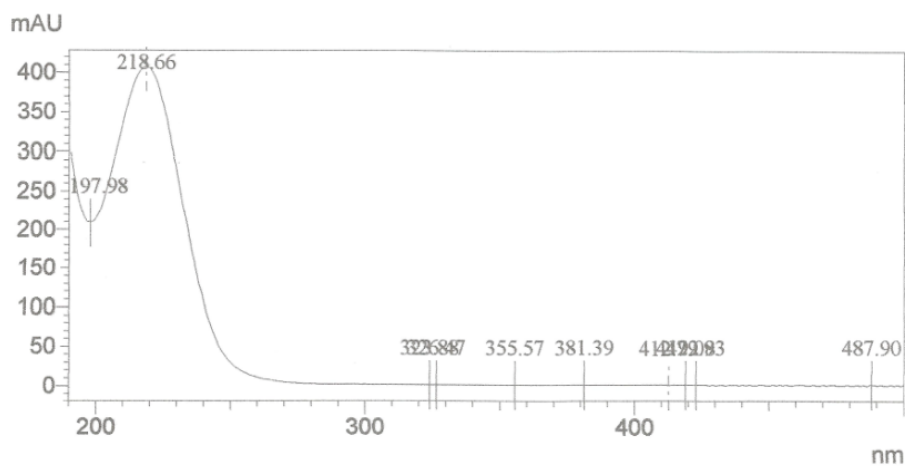


Figura 68. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-04.

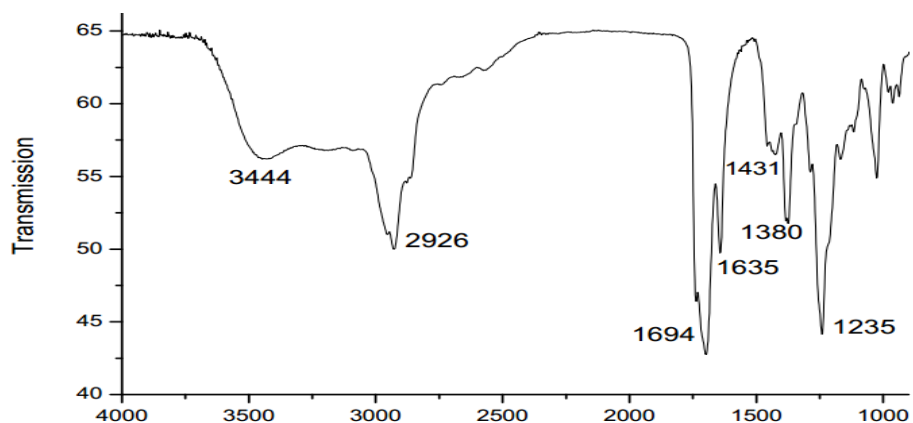


Figura 69. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-04.

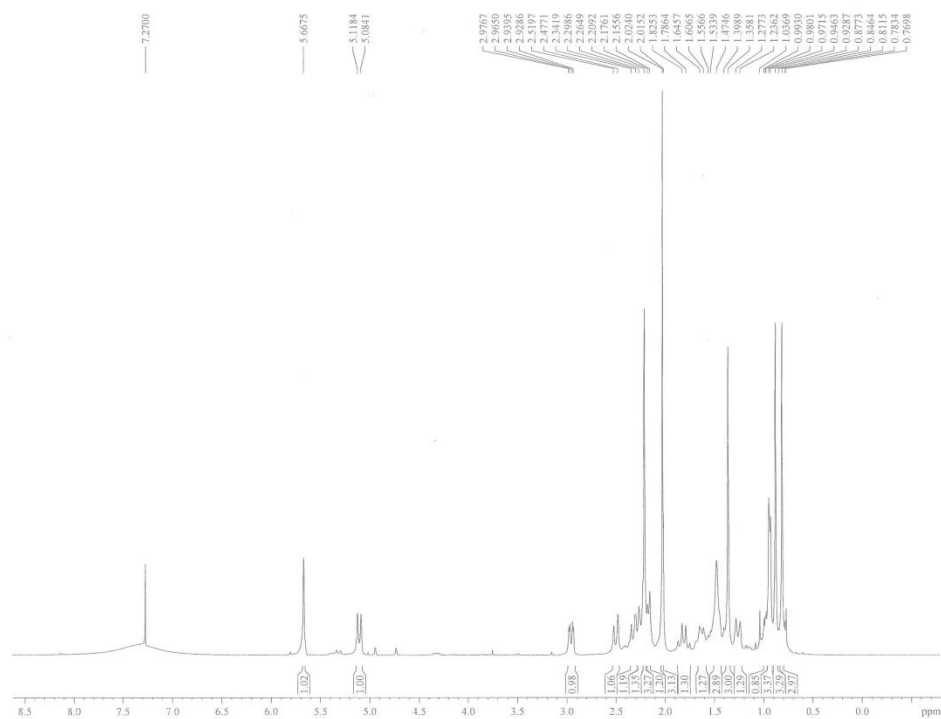


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de PO-04.

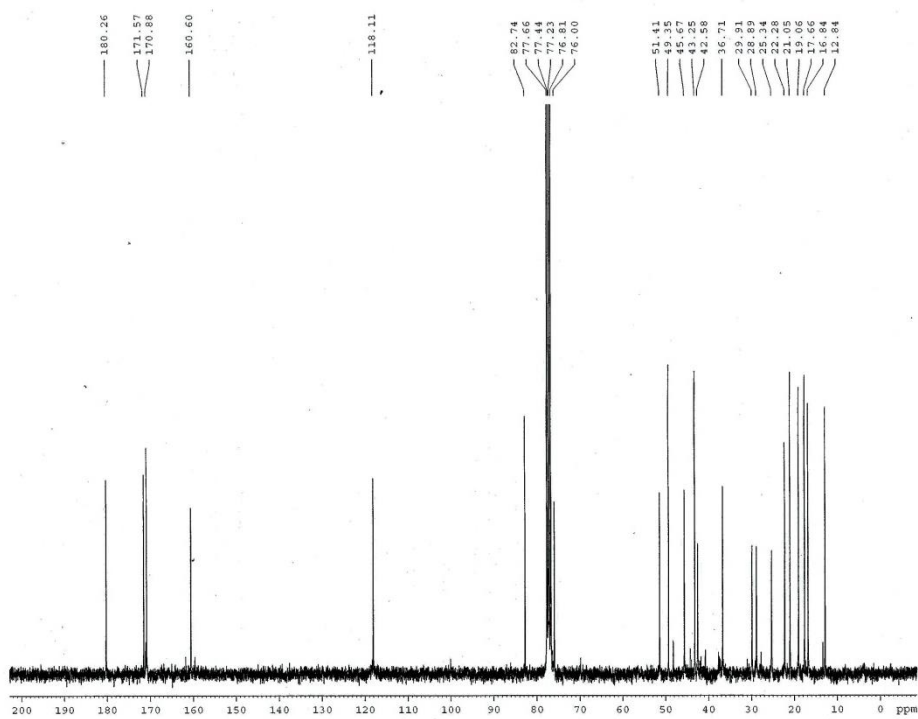


Figura 71. Espectro de RMN DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de PO-04.

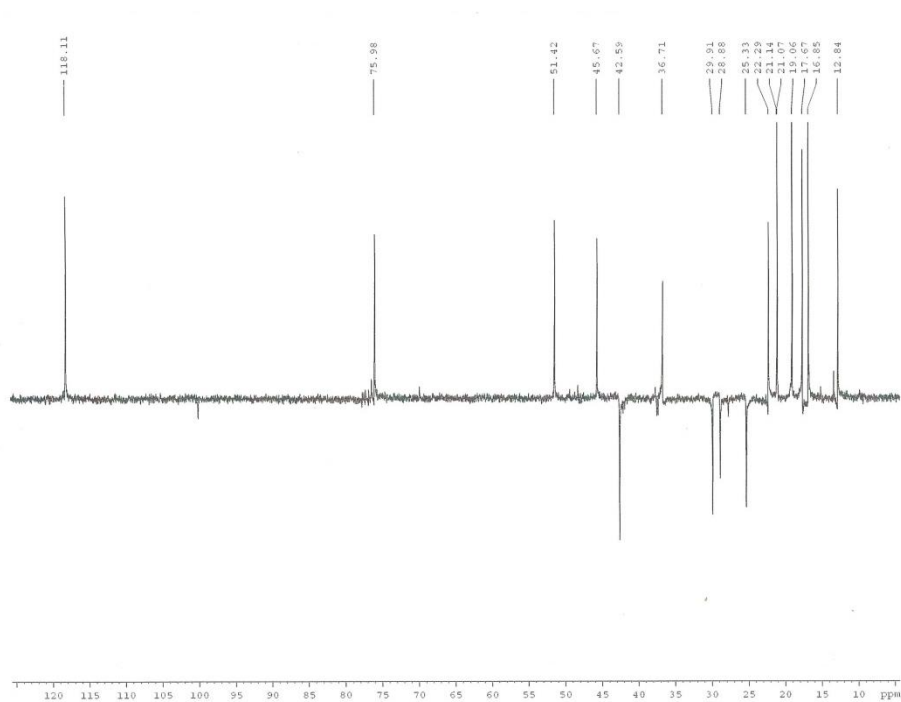


Figura 72. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H-COSY (300 MHz, CDCl₃) de PO-03.

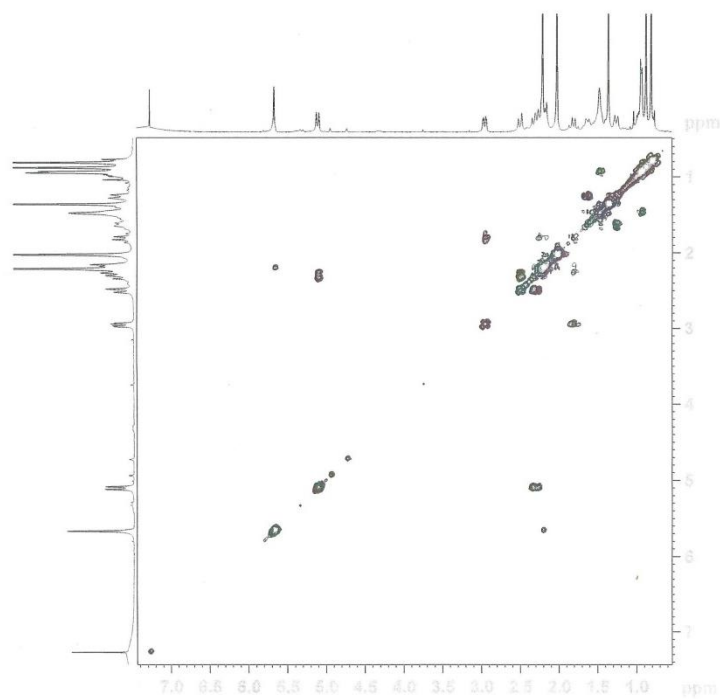


Figura 73. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-04.

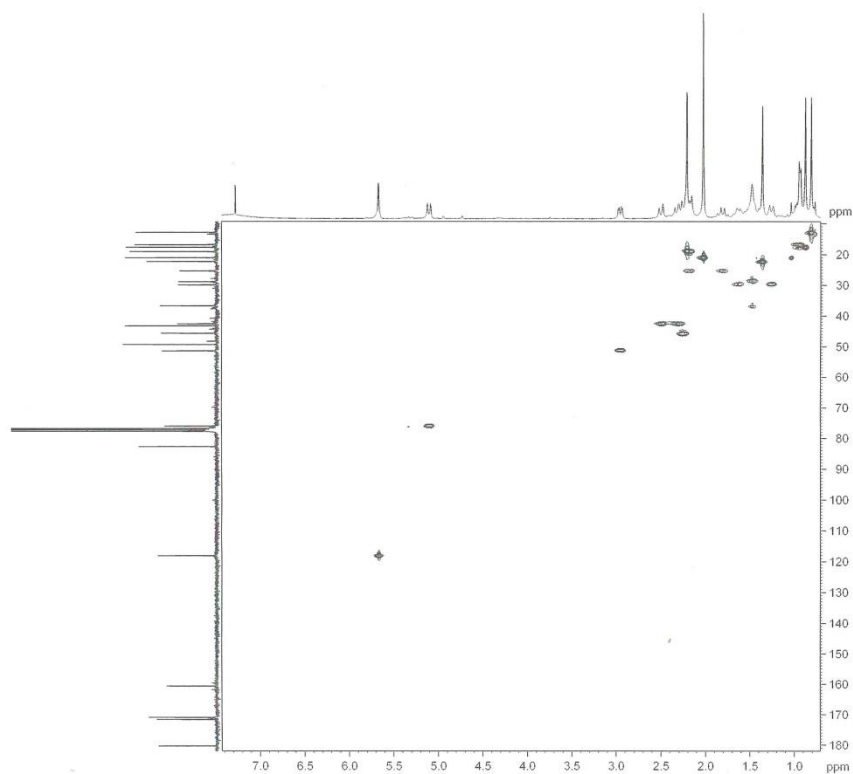


Figura 74. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-04.

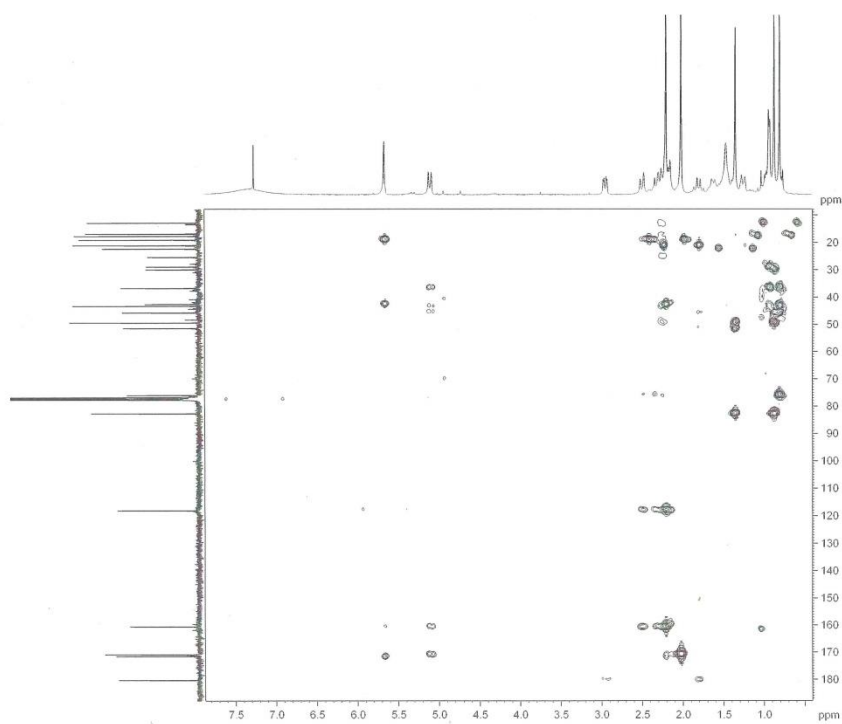
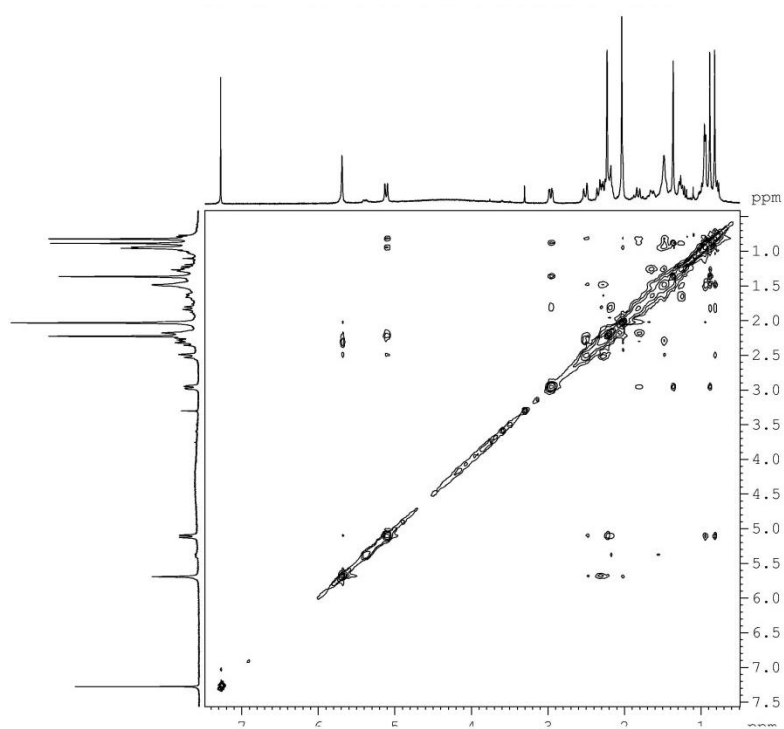


Figura 75. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-04.



4.5 Determinação estrutural de PO-05

O fracionamento cromatográfico da fr. A-VII (pág. 144), inclusive utilizando CLAE, culminou no isolamento de 12,9 mg de um sólido amorfo branco, de p.f. = 168-169 °C e $[\alpha]_D^{20} = -43,96^\circ$, (c 0,1, CH₂Cl₂), UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 136,3 nm (Fig. 80, pág. 80), codificada como **PO-05**.

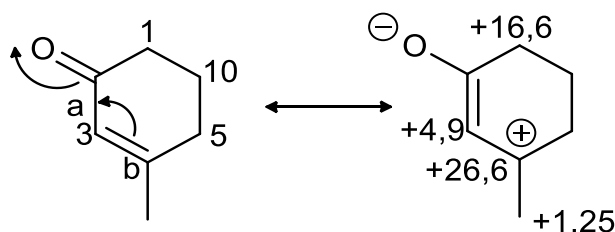
O espectro EMAR, utilizando ESI, mostrou um pico em m/z 413,2296 relativo ao aduto de sódio $[M+Na]^+$, a partir do qual se deduziu a fórmula molecular C₂₃H₃₄O₅ (massa calculada 413,2298; erro -0,48 ppm), a qual exibe grau de insaturação igual a sete (Fig.79, pág. 80).

No espectro de IV (Fig. 81, pág. 80), observou-se a presença de bandas de deformação axial em 1735 e 1710 cm⁻¹ indicando a presença de grupos carbonila, do qual a banda em 1710, juntamente com a banda em 1669 cm⁻¹, são compatíveis com um sistema α,β -conjugado.

A análise do espectro de RMN ¹H (Fig. 82, pág. 81) de PO-05 foi realizada em comparação com os espectros dos compostos descritos anteriormente, revelando uma estreita semelhança com PO-01, exceto pelo aumento de 0,6 ppm no deslocamento químico do sinal do hidrogênio olefínicos de δ_H 5,78 (H-3).

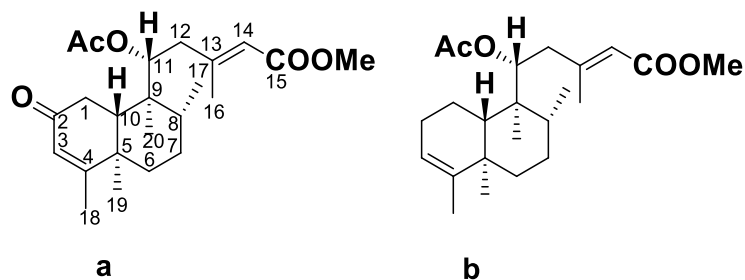
O espectro RMN ¹³C CPD [125 MHz, CDCl₃] (Fig.83, pág. 82) de PO-05 apresentou 23 linhas espectrais, confirmando a natureza do composto como um diterpeno. A comparação entre os espectros de RMN ¹³C de PO-05 com PO-01 apresentou como mudança significativa, o acréscimo de um sinal δ_C 200,3 (C-2) para cetona conjugada no Anel A da decalina, confirmado pelo aumento nos deslocamentos químicos dos carbonos da vizinhança de PO-05 em relação à PO-01, sintetizado na figura 76.

Figura 76. Representação dos efeitos da carbonila no anel A da decalina



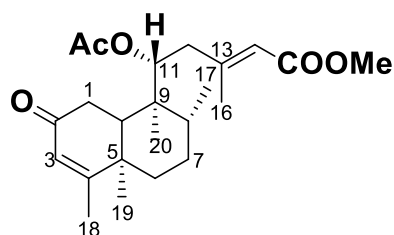
A análise dos dados de PO-05, juntamente com os dados de PO-01, pode-se afirmar, sem equívocos, que PO-05 é um diterpeno de esqueleto clerodano semelhante à PO-01, apenas com o acréscimo de uma carbonila em C-2, comum para os diterpenos encontrados no gênero *Plectranthus* (Abdel-mogib et al., 2002) (figura 77).

Figura 77. Representação estrutural de (a) PO-05 e (b) PO-01 isolados de *P. ornatus*



Pesquisas realizadas na literatura mostraram que esta molécula já isolada (RIJO, *et al.*, 2002) também em *P. ornatus* e nomeado como (11*R*-acetoxi-2-oxoneocleroda-3,13*E*-dien-15-oato de metila, batizada como Plectronatina A [α]_D²² = -60,9° (c 0,651; CHCl₃) (figura 78). Os dados de RMN de ¹³C e ¹H encontram-se sumariados na tabela 11, pág. 79.

Figura 78. Representação estrutural de PO-05 (Plectronatina A)



Estudos acerca de ensaios de atividade biológicas da Plectronatina A mostraram que esta molécula apresentou moderada atividade antifúngica contra *Cândida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. guilliermondii* e atividade antimicrobiana pouco relevante (Rijo et al., 2002).

Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-05, comparados com os dados da literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit.* (CDCl_3)	^1H	^1H Lit.* (100 MHz, CDCl_3)
1	36,1	36,0	2,64; dd ($J=17,75;3,2$) 2,53; dd ($J=17,5;13,7$)	2,61; ddd ($J=17,7; 3,5; 1,3$) 2,49; dd ($J=17,7; 13,7$)
2	199,4	199,0	-	
3	125,7	125,6	5,78; s	5,73; qt ($J=1,3$)
4	170,3	171,9	-	-
5	40,4	40,1	-	-
6	35,5	35,5	1,84; d ($J=12,75$) 1,36; t ($J=12,15;11,85$)	1,82; dt ($J=13,1; 2,9$) 1,34; ddd ($J=13,1; 12,2; 3,6$)
7	27,6	27,5	1,55-1,49; m	1,50; dddd ($J=13,4; 12,2; 11,9; 2,9$) 1,48; dddd ($J=13,4; 4,5; 3,6; 2,9$)
8	36,1	36,2	1,55-1,51; m	1,52; ddq ($J=11,9; 6,2; 4,5$)
9	43,6	43,4	-	-
10	46,0	46,0	1,97; d ($J=3,4$)	1,97; dd ($J=13,7; 3,5$)
11	74,7	74,5	5,28; d ($J=9,05$)	5,28; dd ($J=10,4; 2,1$)
12	41,9	41,7	2,37-2,27; m	2,34; ddd ($J=13,3; 2,1; 0,6$) 2,28 (dd, $J=13,3; 10,4$)
13	156,1	155,9	-	
14	118,5	118,4	5,64; s	5,62; qd ($J=1,1, 0,6$)
15	166,7	166,4	-	-
16	19,0	18,8	2,12; s	2,12; d ($J=1,1$)
17	17,7	17,6	1,00; d ($J= 5,65$)	0,99; d ($J= 6,2$)
18	19,4	19,0	1,91; s	1,88; d, ($J=1,3$)
19	18,8	18,7	1,16; s	1,14; s
20	12,4	12,2	0,87; s	0,85; s
OMe	51,2	50,9	3,67; s	3,65; s
11-COOCH ₃	172,4	170,3	-	-
11-COOCH ₃	20,9	20,7	2,00; s	1,98; s

Dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos de Rijo et al., 2002.

Figura 79. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-05 no modo positivo.

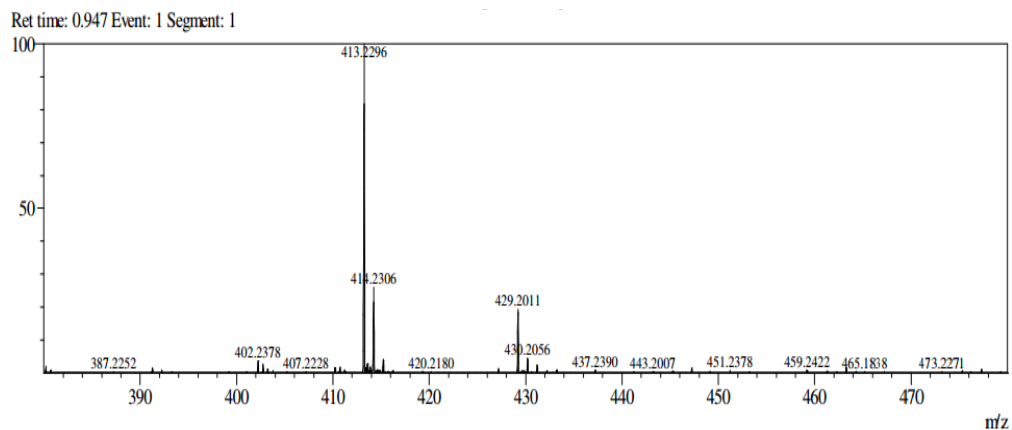


Figura 80. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda) observado entre 190-500 nm para PO-05.

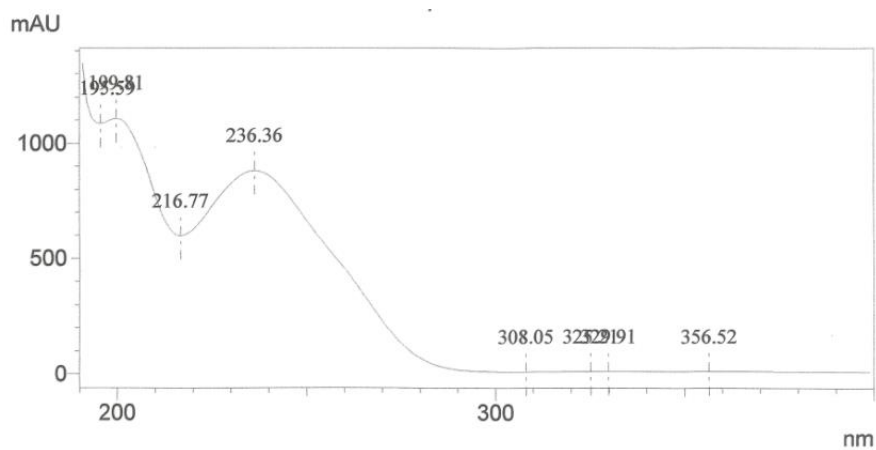


Figura 81. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-05.

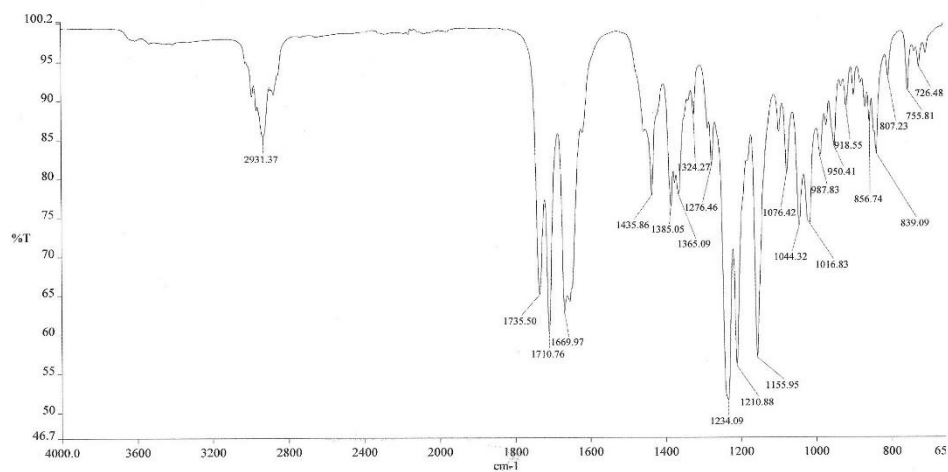


Figura 82. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PO-05 e expansão na faixa de 1,0 a 3,0 ppm.

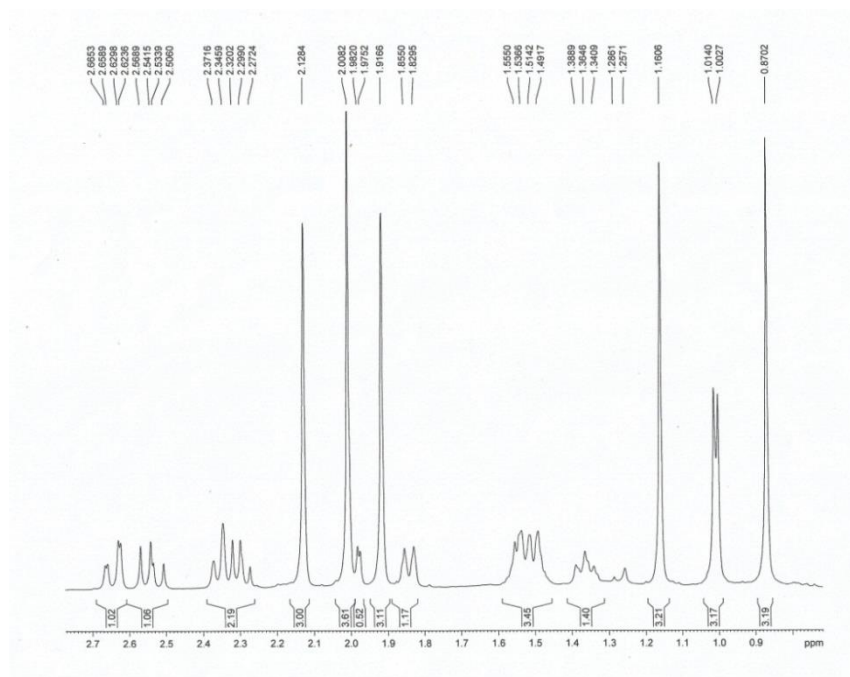
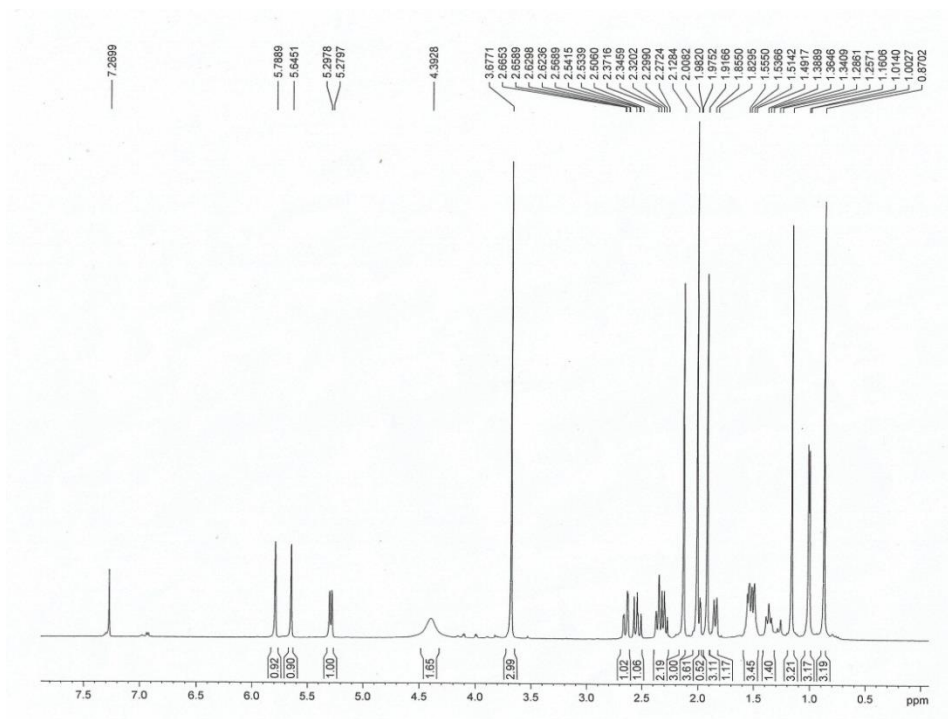


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PO-05 e expansão na faixa de 5 a 55 ppm.

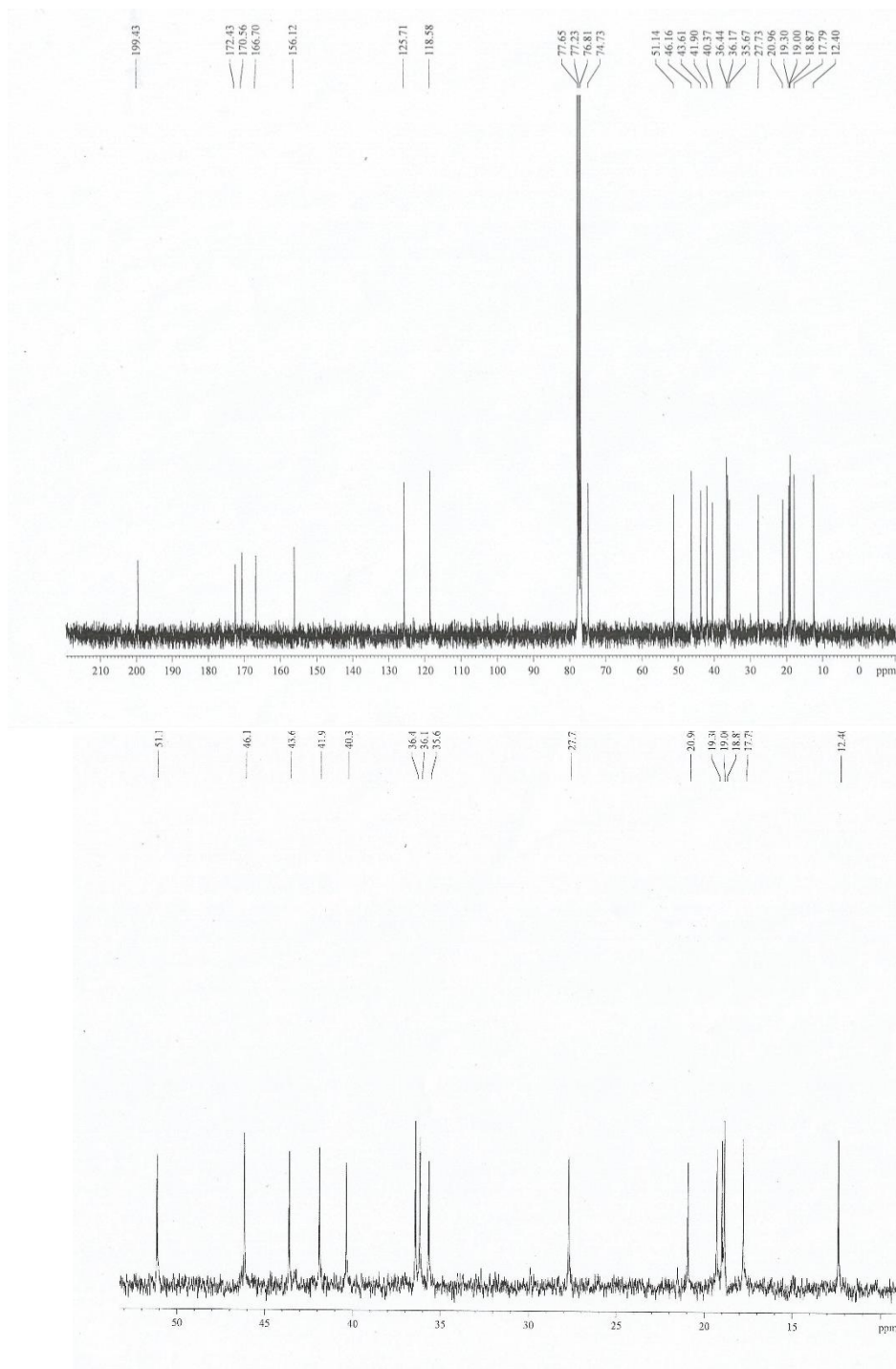


Figura 84. Espectro de RMN DEPT 135 (125 MHz, CDCl₃) de PO-05.

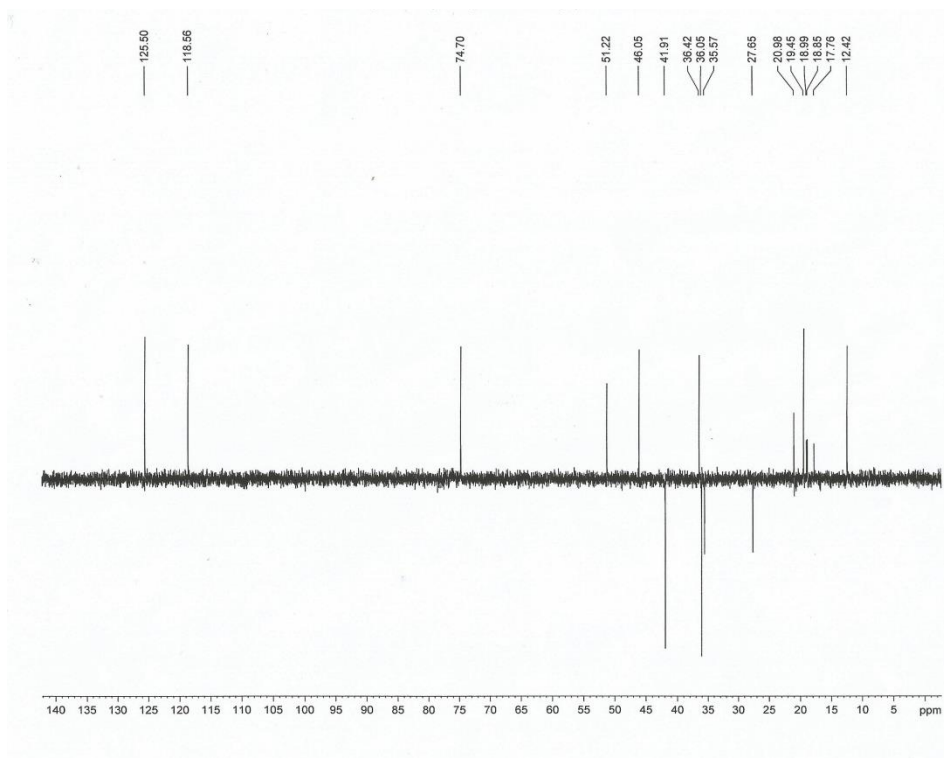
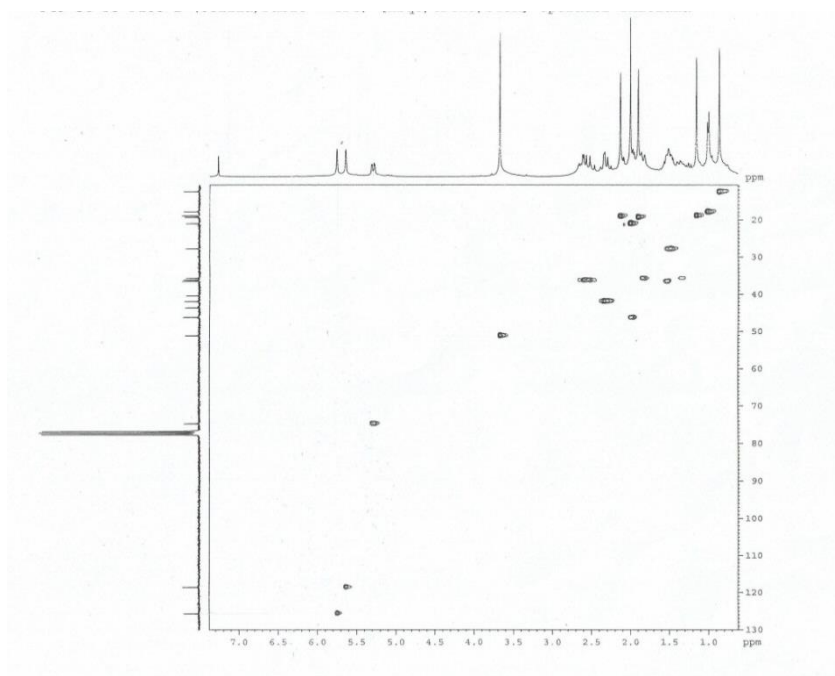


Figura 85. Espectro de correlação heteronuclear 2D ¹H, ¹³C-HSQC de PO-05.



4.6 Determinação estrutural de PO-06

Fracionamentos cromatográficos da fr. A-VIII (pág. 144), incluindo CLAE, conduziu ao isolamento de 6,7 mg de uma resina esverdeada, apresentando $[\alpha]_D^{22} = +22,5$; (c. 0,09, CHCl₃) e UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 219,4 nm (Fig. 90, pág. 87), intitulada como **PO-06**.

O espectro EMAR, utilizando a técnica ESI, mostrou um pico correspondente ao aduto de sódio em m/z 345,2397 indicando a fórmula molecular C₂₀H₃₄O₃ (massa calcd. 343,2400; erro -0,86 ppm), com IDH igual a quatro (Fig. 89, pág. 87).

O espectro de IV (Fig. 91, pág. 87) apresentou uma banda de deformação axial em 3400 cm⁻¹, compatível com grupo hidroxila, além de bandas intensas em 1686 e 1639 cm⁻¹, referentes à carbonila de ácido carboxílico e ligação C=C, respectivamente, compatíveis com um sistema α - β insaturado (Pavia et al., 2010).

O espectro de RMN ¹H [75 MHz, CDCl₃] (Fig. 92, pág. 88), mostrou na região de olefinas apenas um singlete em δ_H 5,72 (H-14) indicando uma dupla ligação trissubstituída. Um sinal largo em δ_H 3,41 característico de hidroxila, além de um elevado número de sinais de hidrogênios em campo alto do espectro, demonstrando a natureza alifática do composto. A comparação do espectro de RMN ¹H de PO-06 com os demais compostos já mencionados não apresentou semelhanças significativas, indicando que este composto pode se tratar de um possível diterpeno de esqueleto ainda não isolado neste trabalho.

O espectro de RMN ¹³C CPD [75 MHz, CDCl₃] (Fig. 93, pág. 89) de PO-06 apresentou 20 linhas espectrais, ratificando a natureza do composto como um diterpeno. Como esperado, a análise comparativa de PO-06 com os espectros de RMN ¹³C dos cinco compostos já apresentados mostrou significativas diferenças. As mais marcantes foram a ausência do sinal atribuído ao grupo acetoxila em C-11, verificado também no espectro de RMN ¹H, e a presença de apenas três sinais com deslocamentos químicos superior a 100 ppm: δ_C 171,2 (C-15), 163,9 (C-13) e 114,7 (C-14).

A análise conjunta dos espectros 2D ¹H, ¹H-COSY (Fig. 94, pág. 90) e ¹H, ¹³C – HMBC (Fig. 96, pág. 92), possibilitou confirmar a existência da cadeia lateral em C-9, como verificada para os demais compostos, entretanto, sem a acetoxila em C-11. As correlações a longa distância observadas no espectro HMBC comprovaram a presença da decalina sugerindo um esqueleto diterpenico do tipo lábdano pelas correlações entre os hidrogênios em δ_H 0,93 (Me-20) com os carbonos δ_C 39,4 (C-10); 39,4 (C-1); 56,1 (C-5) e 59,0 (C-9), bem como de uma hidroxila em C-8, através das correlações entre o sinal da metila em δ_H 1,16 (Me-17) com

os carbonos em δ_C 42,4 (C-7); 73,6 (C-8) e 59,1 (C-9), (Fig. 86, pág. 85) confirmando a estrutura proposta na Figura abaixo.

Figura 86. Representação estrutural do esqueleto básico de um diterpeno labdano

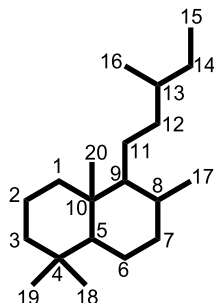
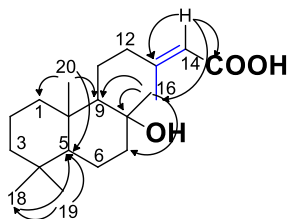


Figura 87. Representação estrutural de PO-06, ilustrando as principais correlações a mais de uma ligação no espectro ^1H , ^{13}C -HMBC.



(—) RMN 2D ^1H , ^1H -COSY; (\curvearrowright) ^1H , ^{13}C -HMBC

A comparação dos dados de RMN de PO-06 com aqueles descritos para o ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-óico mostraram que estes compostos têm a mesma estrutura. O ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-óico foi previamente isolado a partir das espécies *A. cymbifera*, *A. esperanzae*, e *A. galeata* pertencentes ao gênero *Aristolochia* (Lopes e Bolzani, 1988; Pacheco et al., 2009). Apesar de diterpenos serem comuns no gênero *Plectranthus*, de acordo com levantamento realizado na base de dados *ScienceFinder*, este é o primeiro relato do ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-óico neste gênero.

Figura 88. Representação estrutural para o ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-óico

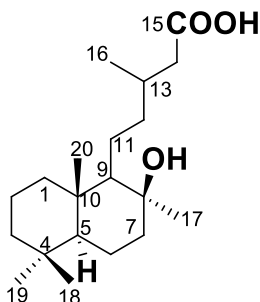


Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) e literatura de PO-06.

C	^{13}C	^{13}C Lit.** (CDCl_3)	^1H	HMBC	
				$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	39,5	39,8	1,72; m 0,88; m*	-	-
2	33,6	-		-	-
3	42,2	41,9	1,34; m 1,16; m*	-	-
4	33,5	-	-	-	-
5	56,1	56,1	0,83; m*	-	H-18/19
6	23,7	23,5	1,53; s 1,44; m	H-7	H-8/10
7	42,4	44,7	1,78 d ($J= 2,7$) 1,53; s	-	H-5
8	73,6	74,4	-	H-17	-
9	59,1	61,3	0,81; m*	-	H-17
10	39,2	39,2	-	-	-
11	18,5	20,5	1,66-164; m 1,49-147; m	-	-
12	45,0	44,5	2,26-2,13; m	H-11	H-14/16
13	163,9	163,9	-	H-16	
14	114,7	114,7	5,72; s	-	H-12/16
15	171,2	171,5	-	H-14	-
16	19,5	19,4	2,20; d, ($J= 0,99$)	-	H-14
17	30,7	24,0	1,16; s	H-8	H-7/9
18	21,8	21,5	0,83; s	-	H-5/19
19	33,5	33,4	0,88; s	-	H-5/18
20	15,3	15,4	0,97; s	-	H-1/9

*Sinais sobrepostos pelas metilas em 0,81 (H-9); 0,83 (H-5); 0,88 (H-1) e 1,16 (H-3) ppm

Figura 89. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-06 no modo positivo e negativo.

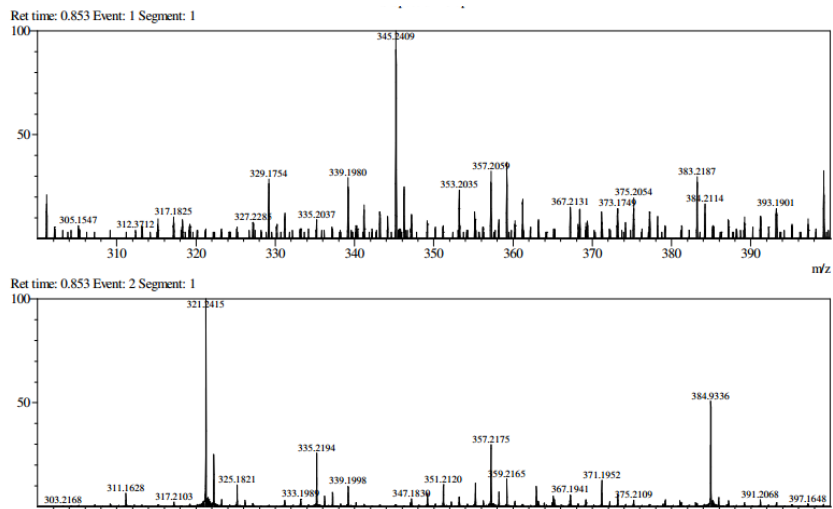


Figura 90. Espectro de UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-06.

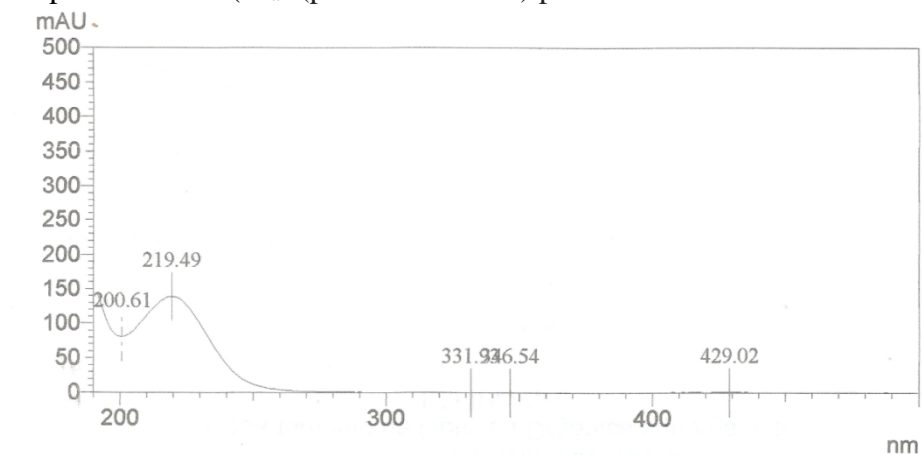


Figura 91. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-06.

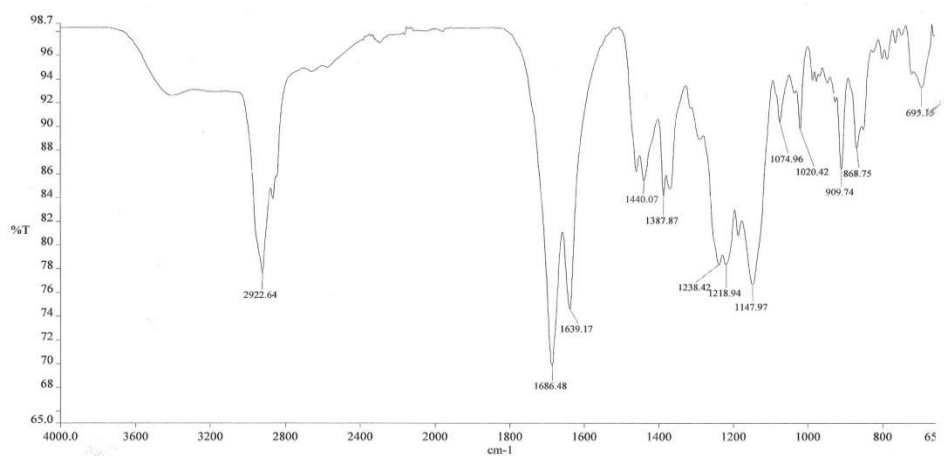


Figura 92. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-06 e expansão da faixa de 0,8 a 2,5 ppm.

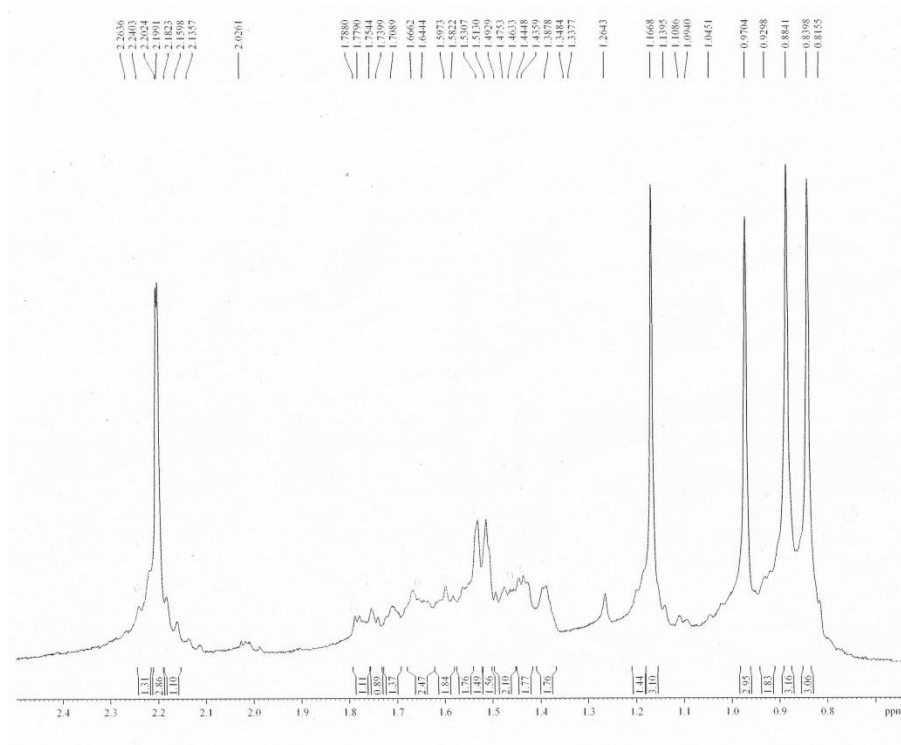
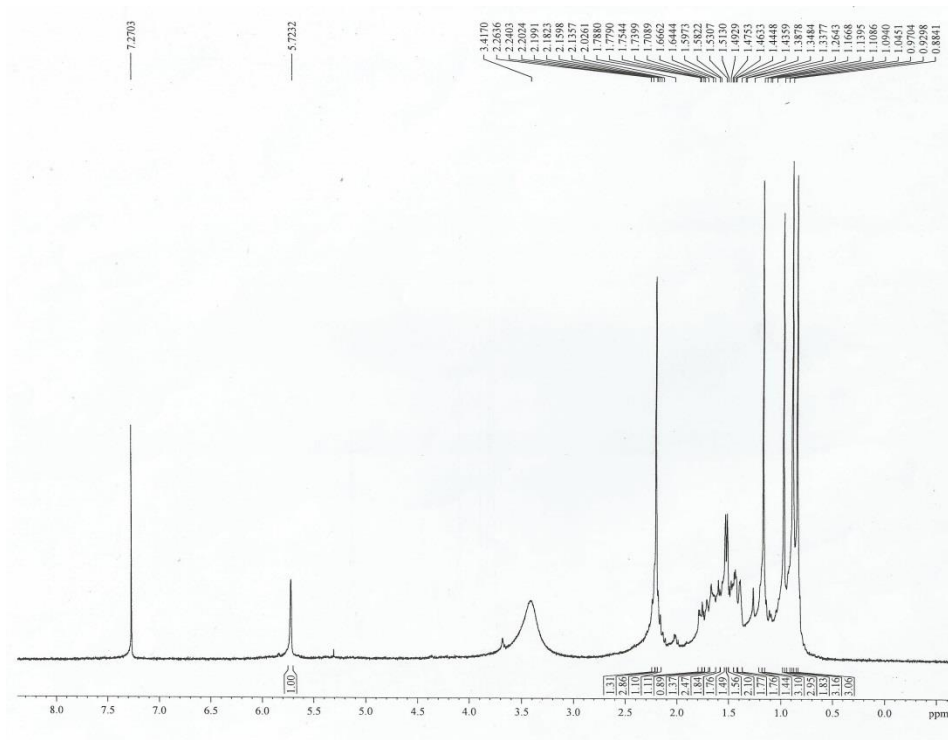


Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de PO-06 e expansão da faixa de 15 a 75 ppm.

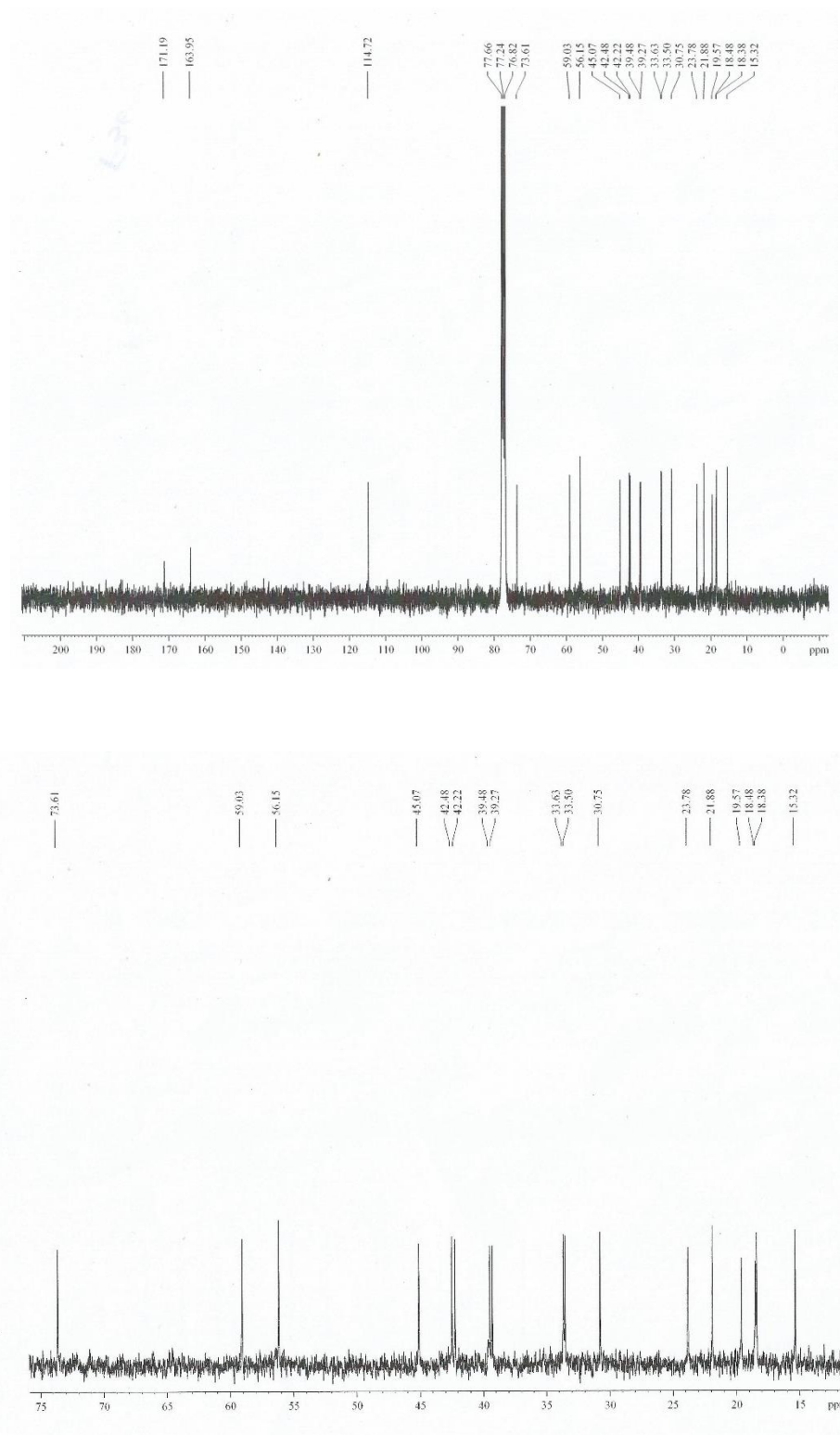


Figura 94. Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de PO-06 e expansão da faixa de 0,6 a 2,5 ppm.

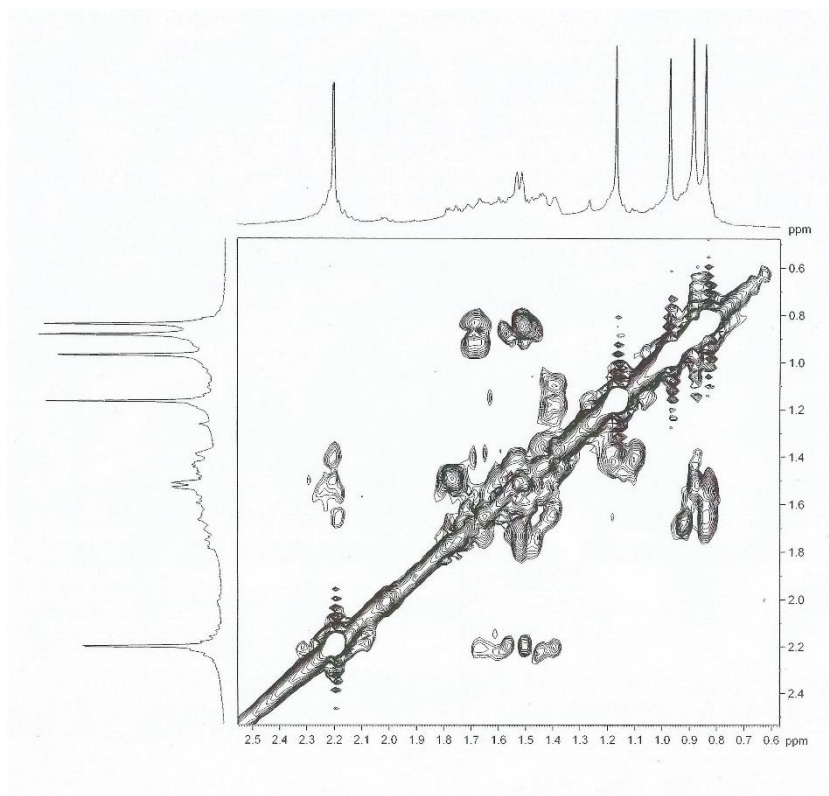
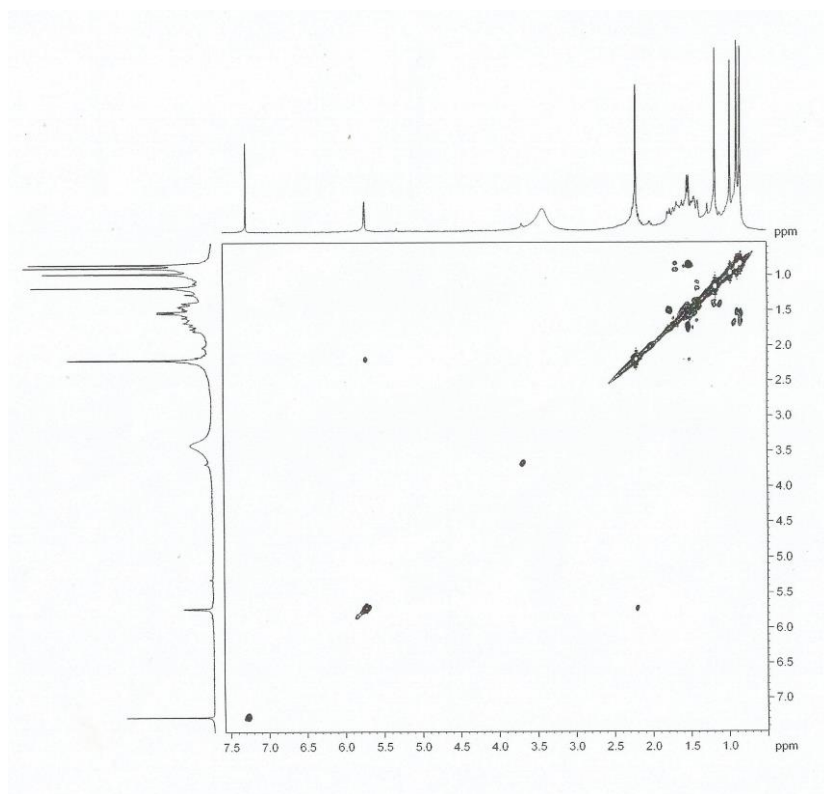


Figura 95. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-06 e expansão da faixa de 0,8 a 2,5 ppm.

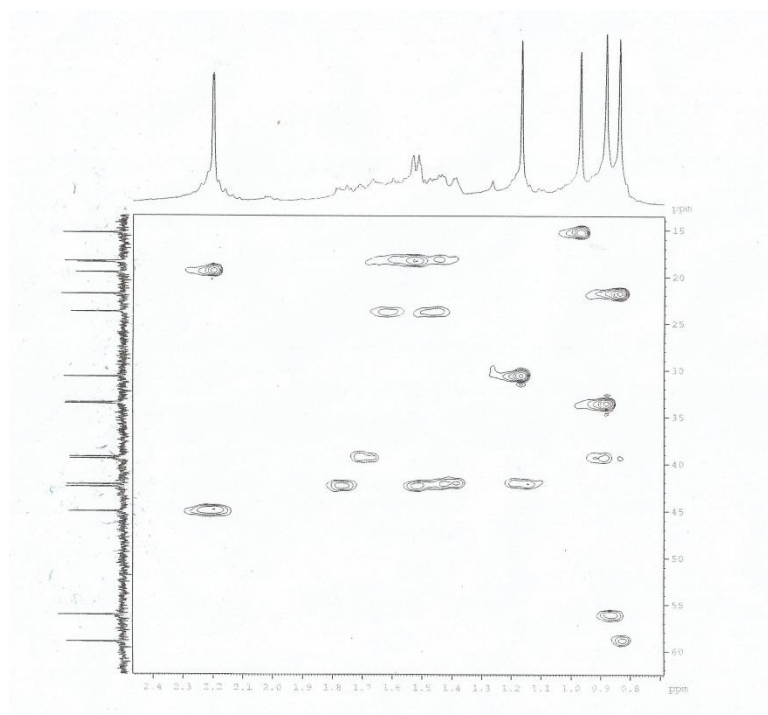
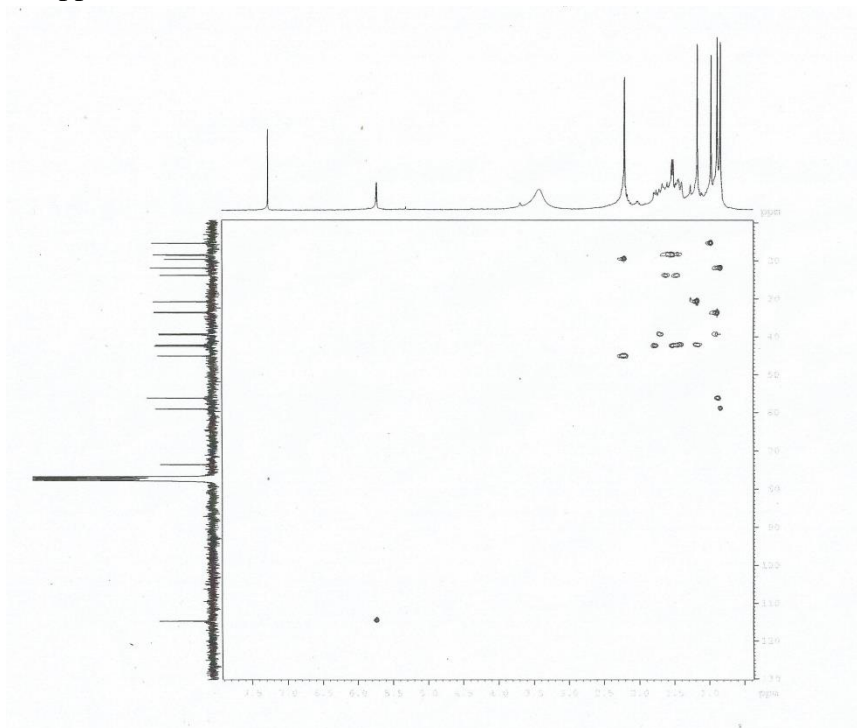
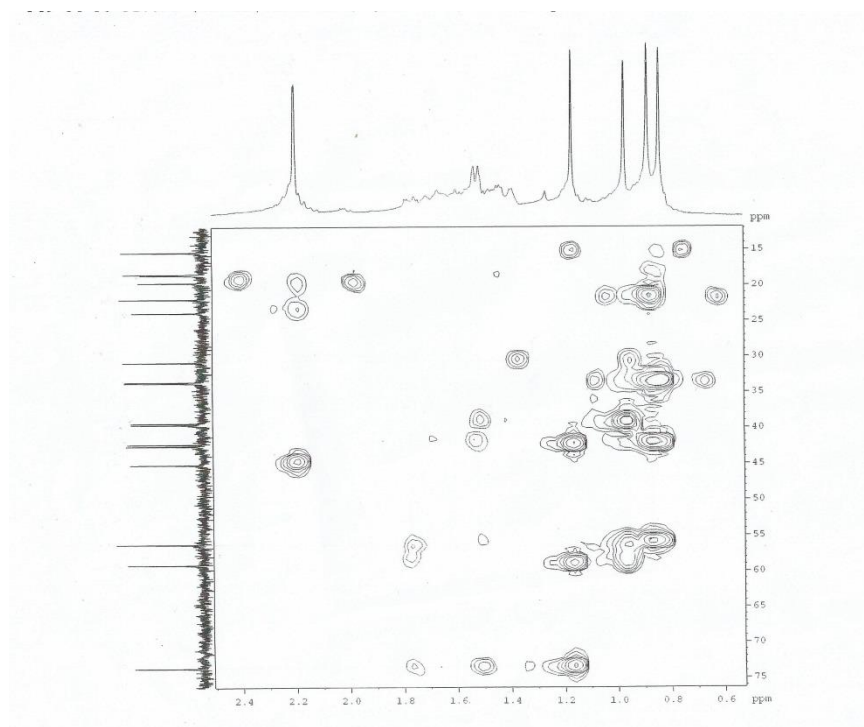
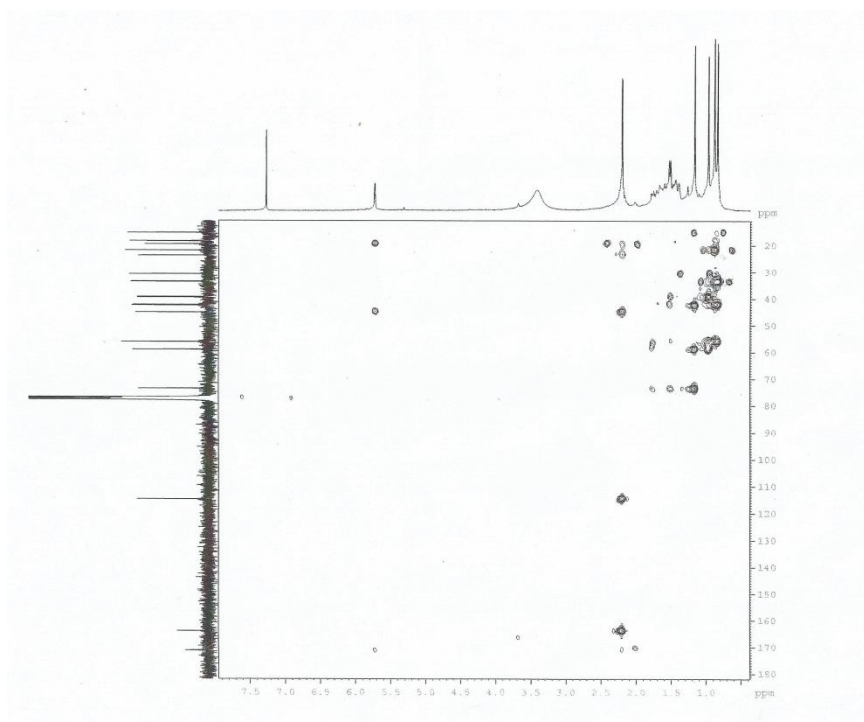


Figura 96. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-06 e expansão da faixa 0,6 a 2,5 ppm.



4.7 Determinação estrutural de PO-07

O fracionamento por CLAE da fr. A-VIII. 8.5.5 (pág. 146), utilizando H₂O/MeOH 3:7 como sistema de eluentes, resultou no isolamento de 24,0 mg de um óleo incolor, $[\alpha]_D^{20} = 56,7^\circ$, (c 0,1, CH₂Cl₂), UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 236,4 nm (Fig. 103, pág. 98), intitulado como **PO-07**.

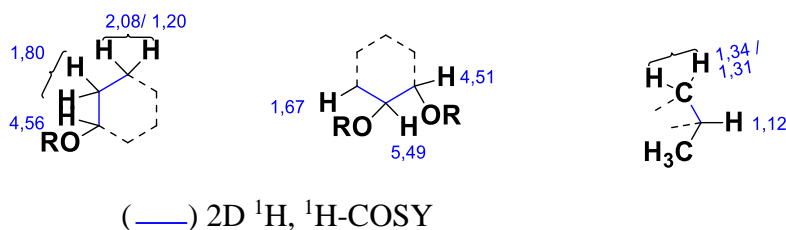
A fórmula molecular C₂₆H₃₄O₉, com IDH igual a dez, foi definida por EMAR-ESI pela análise do pico referente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 513,2082 (massa calcd. 513,2095; erro -2,53 ppm), Fig. 102, pág. 98.

O espectro de IV (Fig. 104, pág. 98) apresentou uma banda de deformação axial em 3466 cm⁻¹ referente a grupo hidroxila, bem como uma banda larga e intensa em 1729 cm⁻¹, possivelmente formada pela sobreposição de absorções de grupos funcionais carbonilados (Yu e Wu 2007).

A análise do espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃] (Fig. 105, pág. 99), revelou um padrão de distribuição dos hidrogênios diferente dos compostos anteriores, apresentando duas diferenças importantes: 1) quatro simpletos característicos de hidrogênios oximetícos em δ_H 5,49 (H-6); 4,88 (H-12); 4,56 (H-3) e 4,51 (H-7), 2) três simpletos intensos em δ_H 2,20 (H-6); 2,17 (H-12) e 2,15 (H-3) típicos de hidrogênios metílicos de grupos acetoxila, justificando três dos dez graus de instauração.

A análise do espectro 2D ¹H, ¹H-COSY (Fig.108, pág. 101), exibiu acoplamentos entre os hidrogênios em δ_H 1,80 (2H-2) com os hidrogênios diastereotópicos em δ_H 2,07 (1-Ha); 1,12 (1-Hb) e com 4,56 (1H-3). Em adição, se verificou acoplamentos vicinais entre os prótons oximetínicos δ_H 4,51 (H-7) com δ_H 5,49 (H-6) e 1,67 (H-5). Por fim, a correlação vicinal entre o hidrogênio em δ_H 2,17 (H-15) com os hidrogênios diastereotópicos em δ_H 1,36 (16-Ha; dd; $J=4,05$) e 1,31 (16-Hb; m; $J=4,14$) (Fig. 97, pág. 93). Estes dados sugerem um anel tensionado de três membros, observados em diterpenos do tipo Cicloabietano (Ratsami et al., 2010).

Figura 97. Principais acoplamentos observados no espectro 2D ¹H, ¹H-COSY para PO-07.



O espectro de RMN ^{13}C CPD [75 MHz, CDCl_3] (Fig.106, pág. 100), exibiu 26 faixas espectrais, indicando um diterpeno tri-acetilado. A análise dos sinais do espectro de RMN ^{13}C -BB com o DEPT 135° (Fig.107, pág. 100), juntamente com espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ - HSQC (Fig. 109, pág. 101), possibilitou correlacionar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono, que diferentemente dos demais, revelou um baixo número de carbonos metilênicos e metínicos não-hidrogenados na molécula.

A análise do espectro de RMN ^{13}C de PO-07 mostrou cinco linhas espectrais associados a carbonos de carbonilas, dos quais δ_{C} 196,2 e 194,4 são compatíveis com cetonas em um sistema α/β -conjugado, além disso, mostrou três carbonilas para ésteres metílicos em δ_{C} 170,9; 170,1; 169,9, justificando a banda larga na região típica de carbonilas no espectro de IV. Observou-se também os sinais em δ_{C} 79,6 (C-3), 78,3 (C-12), 70,9 (C-6) e 65,1 (C-7) associados aos carbonos oximetínicos.

A análise do espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ – HMBC (Fig. 110, pág. 102), em conjunto com os dados obtido do espectro de RMN 2D $^1\text{H},^1\text{H}$ – COSY, confirmaram a proposta de um sistema policíclico característico de diterpenos abietanos, através das correlações observadas entre os sinais de δ_{H} 1,67 (H-5) com δ_{C} 38,5 (C-4), 38,3 (C-10) e 155,1 (C-9), a correlação dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,71 (Me-20) com δ_{C} 35,3 (C-1), 47,1 (C-5) e 155,1 (C-9) justificando a presença dos anéis A e B. Adicionalmente, foi verificado as correlações dos próton oximetínicos em δ_{H} 4,51 (H-7) e 4,88 (H-12) com os carbonos de cetonas conjugadas em δ_{C} 194,4 e 196,2 (C-11 e C-14), bem como com os carbonos em 155,1 (C-9) e 140,8 C-8 confirmando a presença de um sistema α - β insaturado envolvendo duas cetonas no anel C. Por fim, a presença do anel espirociclopropânico foi estabelecida através das correlações do duplete em δ_{H} 1,12 (Me-17; $J=6,4$) com os carbonos em δ_{C} 34,9 (C-13); 21,4 (C-15); 26,8 (C-16). A exata localização dos demais grupos funcionais na molécula foi confirmada como representada na figura 99 (pág. 95).

Diante dos dados observados e discutidos, conclui-se que PO-07 se trata de um diterpeno tetracíclico com um anel espirociclopropânico, de esqueleto abietano rearranjado do tipo cicloabietano (Figura 101, pág. 96), que atende os dez graus de insaturação previstos pela fórmula molecular. Diterpenos deste tipo são bastante comuns no gênero *Plectranthus* (Arihara et al., 1975a; 1977b)

Figura 98. Representação estrutural do esqueleto básico de um diterpeno da classe Abietano.

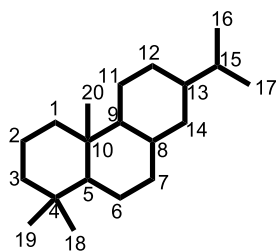
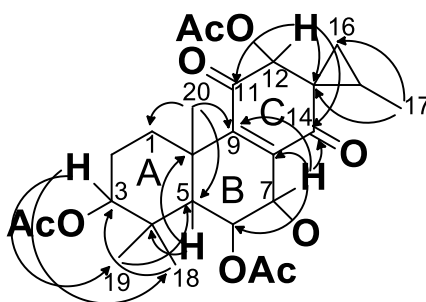


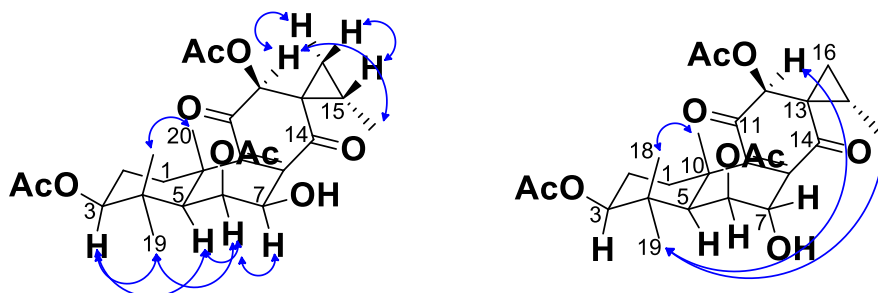
Figura 99. Representação estrutural dos principais acoplamentos observados para PO-07 nos espectros COSY e HMBC



RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (—) RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (↷)

A estereoquímica relativa de PO-07 foi definida através das correlações observadas no espectro 2D RMN ^1H , ^1H -NOESY [300 MHz, CDCl_3] (Fig. 111, pág. 103), entre os hidrogênios em δ_{H} 4,56 (1H-3); 1,67 (1H-5) e 1,08 (Me-19), assim como a metila em δ_{H} 1,08 (Me-19) com 5,49 (H-6); 1,06 (Me-18) e 4,88 (H-12) sugerindo uma β -orientação para esses grupos. Um espectro NOESY adicional [300 MHz] agora em DMSO-d_6 (Fig. 112, pág. 103) foi realizado numa tentativa de evitar a sobreposição dos sinais de H-3 com H-7, e assim verificar o acoplamento entre H-6 e H-7. Estas interações sugeriram uma orientação equatorial para os grupos AcO-3 e HO-7. Por fim, a correlação da δ_{H} 1,02 (Me-18) e 1,71 (Me-20) confirmaram a fusão *trans* para os anéis A e B, como já era esperado.

Figura 100. Correlações espaciais ^1H , ^1H -NOESY observados para PO-07



(↷) Correlações ^1H , ^1H - NOESY

Pesquisas realizadas na literatura revelaram a presença de uma molécula similar, nomeada Coleon R (Arihara et al., 1975a; 1977b; Devriese et al., 1988) isolado de *P. caninus*, onde os dados de RMN ^1H encontram-se sintetizados na Tabela 13 (pág. 66). Como pode ser observado não houve mudanças significativas nos deslocamentos químicos, embora os experimentos tenham sido realizados em solventes diferentes. Com isso pode-se verificar que a estereoquímica relativa de PO-07 é a mesma que o Coleon R já registrado em trabalhos anteriores (Fig. 101).

Figura 101. Representação estrutural proposta para PO-07

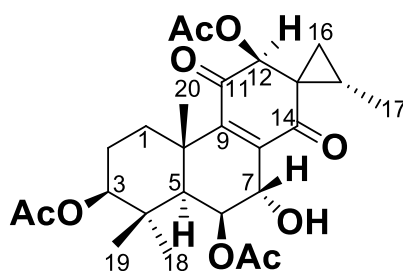


Tabela 13. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-07 com dados da literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit.	^1H	^1H Lit. (Acetona)	HMBC	
					$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	35,3		2,07; m** 1,12; m*		-	-
2	23,9		1,80; m		-	-
3	79,6		4,56; s	4,72; m	-	H-18/19
4	38,5		-	-	H- 3/5/18/19	H-6
5	47,1		1,67; s	1,93; m	-	H- 7/18/19/20
6	70,9		5,49; s	5,43; dd	H-7	-
7	65,1		4,51; s	5,49; d	H-6	-
8	140,8		-	-	H-7	H-6
9	155,1		-	-	-	H-5/7/12/20
10	38,3		-	-	H-5/20	H-6
11	194,4		-	-	H-12	-
12	78,3		4,88; s	4,88; s	-	H-16
13	34,9		-	-	H-12/16	H-17
14	196,2		-	-	-	H-7/12/16
15	21,4		2,17; dd ($J=15,51; 8,55$)	2,20; s	H-17	-
16	26,8		1,34; d ($J=4,05$) 1,31; d ($J=4,14$)	1,36; dd 1,10; m	-	H-12/17
17	13,0		1,12; d ($J=6,4$)	1,15; d	-	-
18	18,3		1,06; s	1,02; s	H-19	H-3/5
19	28,0		1,08; s	1,13; s	H-18	H-3
20	22,0		1,71; s	1,71; s	-	-
3-ACo	170,1		-	-	H-3	-
6-ACo	170,9		-	-	H-6	-
12-ACo	169,9		-	-	H-12	-
3- COOCH ₃	21,5		2,15; s	2,02; s	-	-
6- COOCH ₃	20,9		2,20; s	2,05; s	-	-
12- COOCH ₃	21,5		2,17; s	2,09; s	-	-

*Dados obtidos de Devriese et al., 1988.

Figura 102. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-07 no modo positivo.

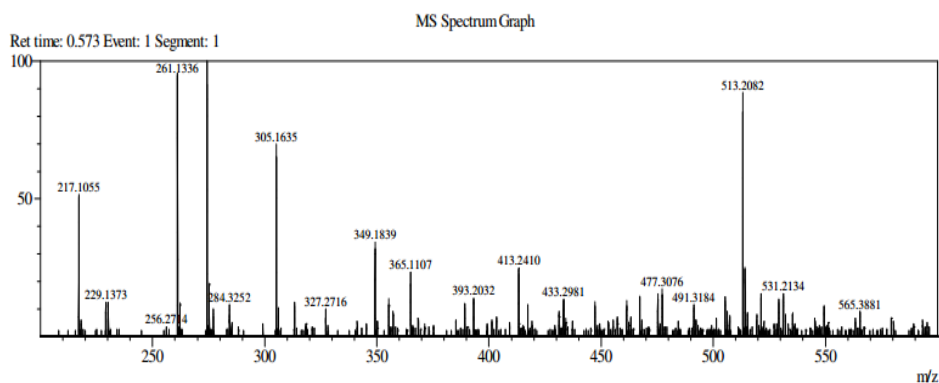


Figura 103. Espectro de absorção na região do UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) de PO-07.

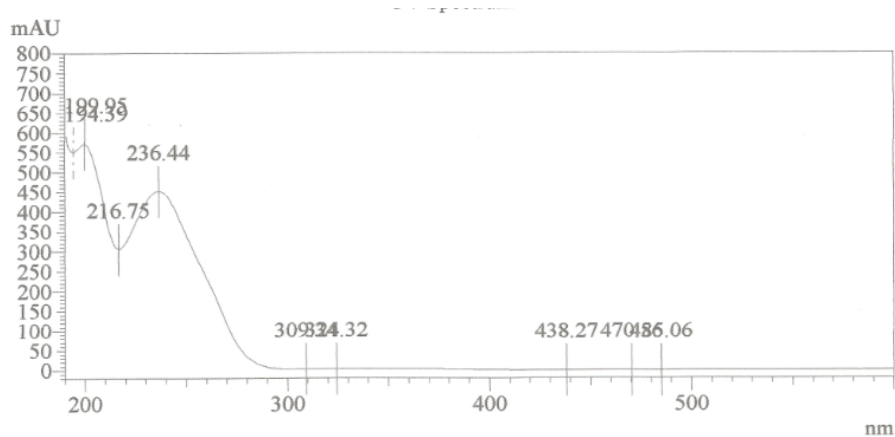


Figura 104. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-07.

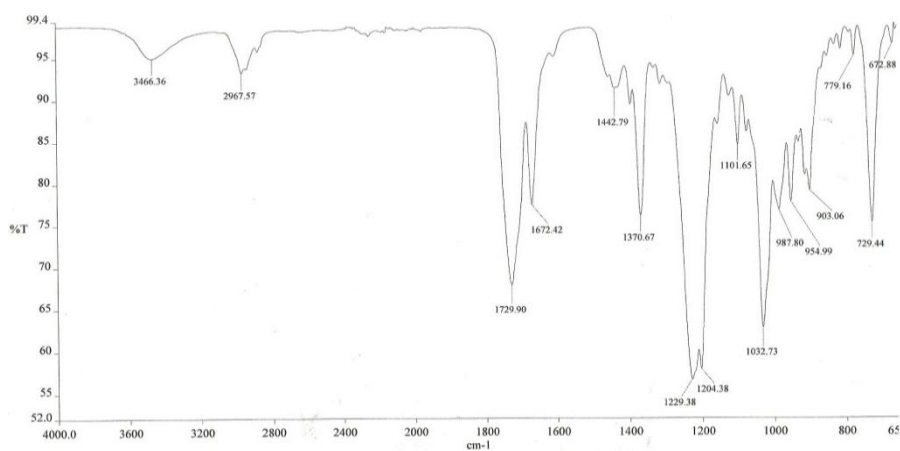


Figura 105. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-07 e expansão na faixa de 0,5 a 2,5 ppm.

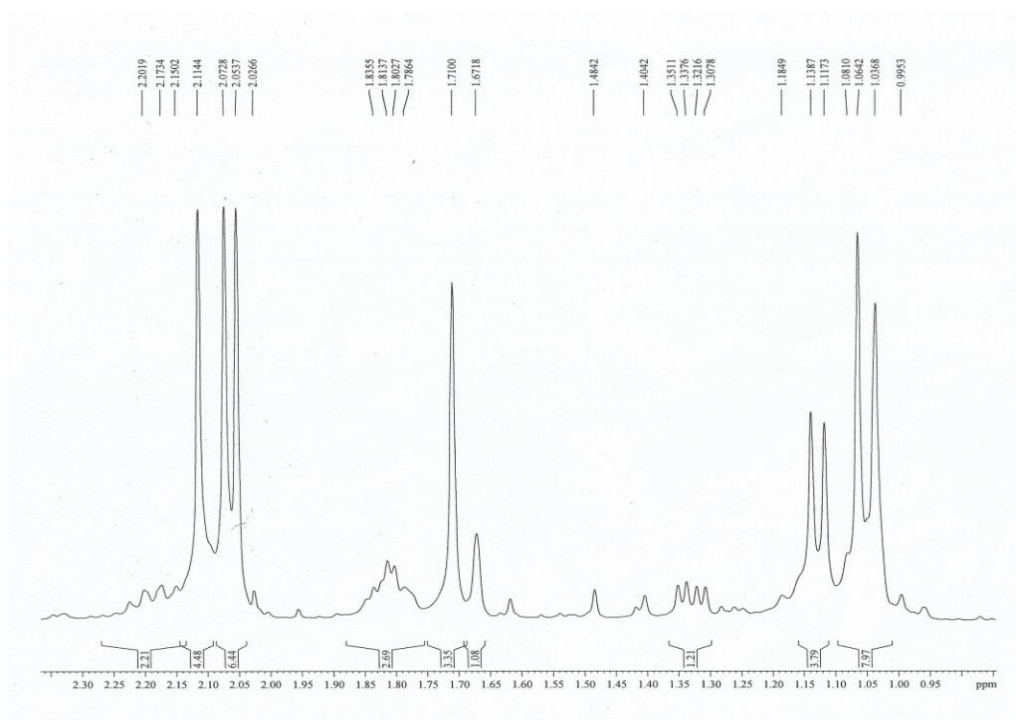
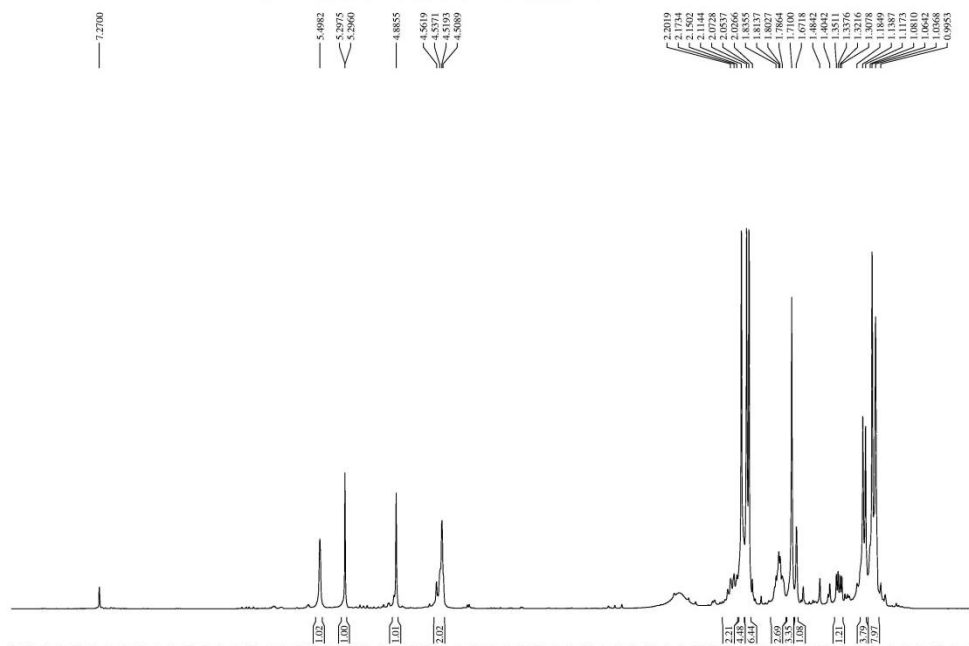


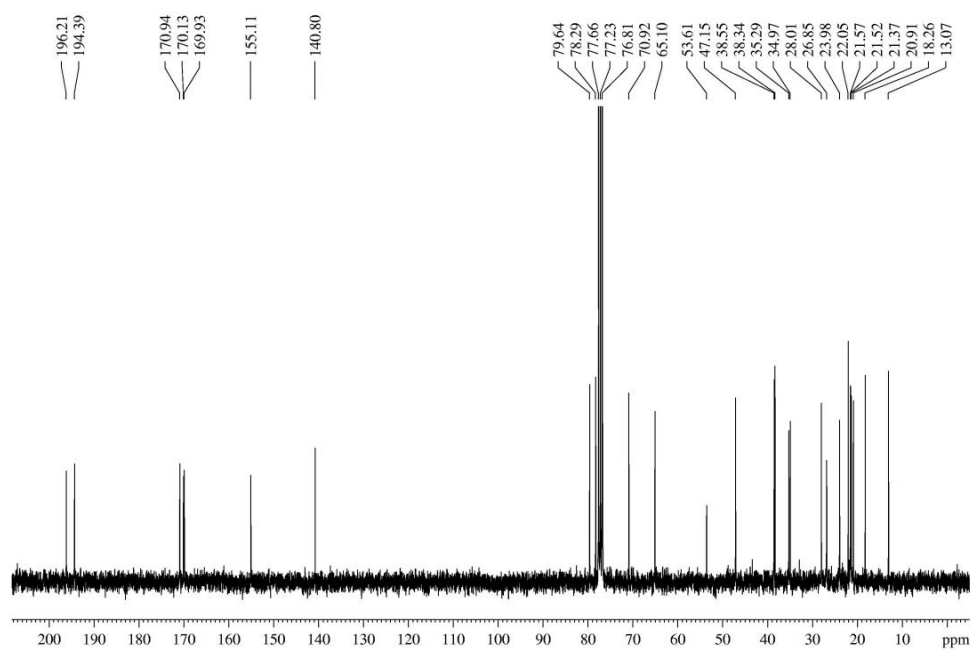
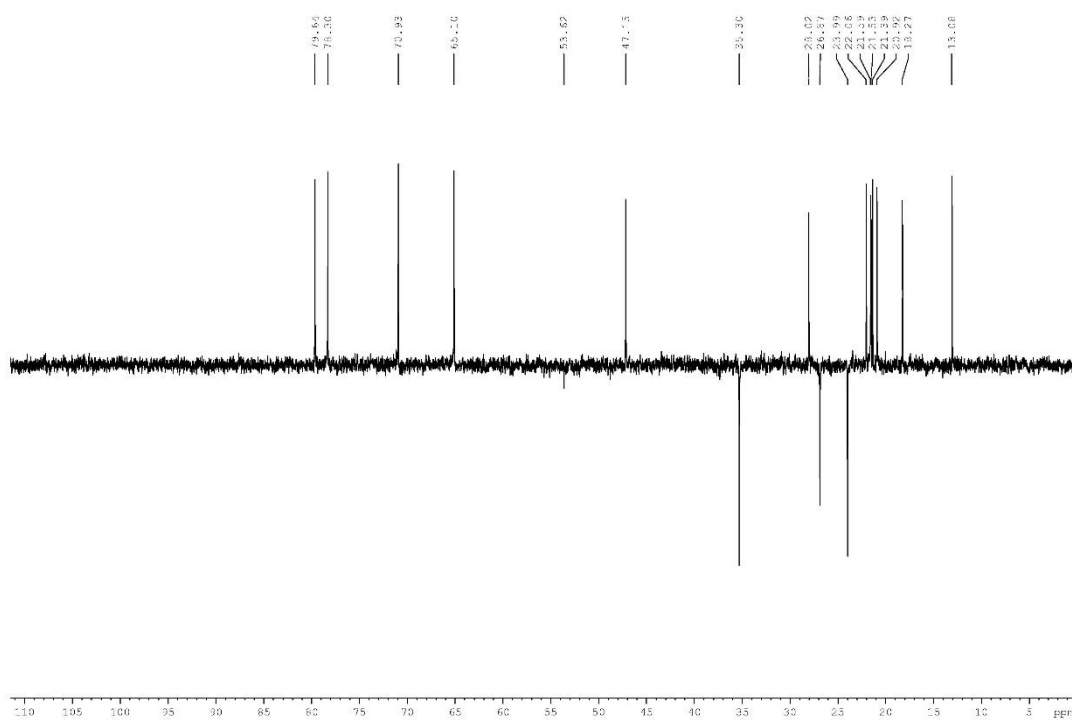
Figura 106. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de PO-07.**Figura 107.** Espectro de RMN DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de PO-07.

Figura 108. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-07.

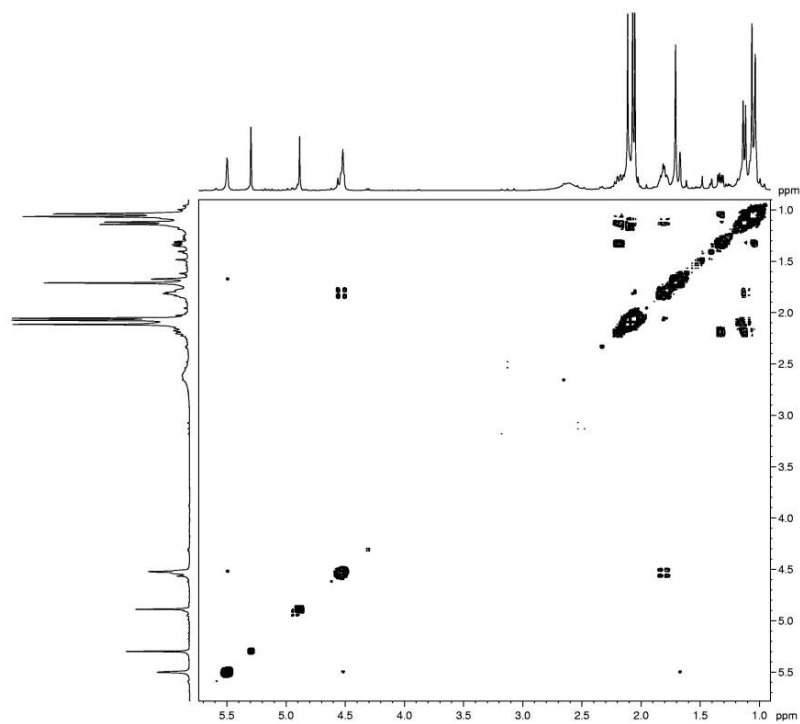


Figura 109. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-07.

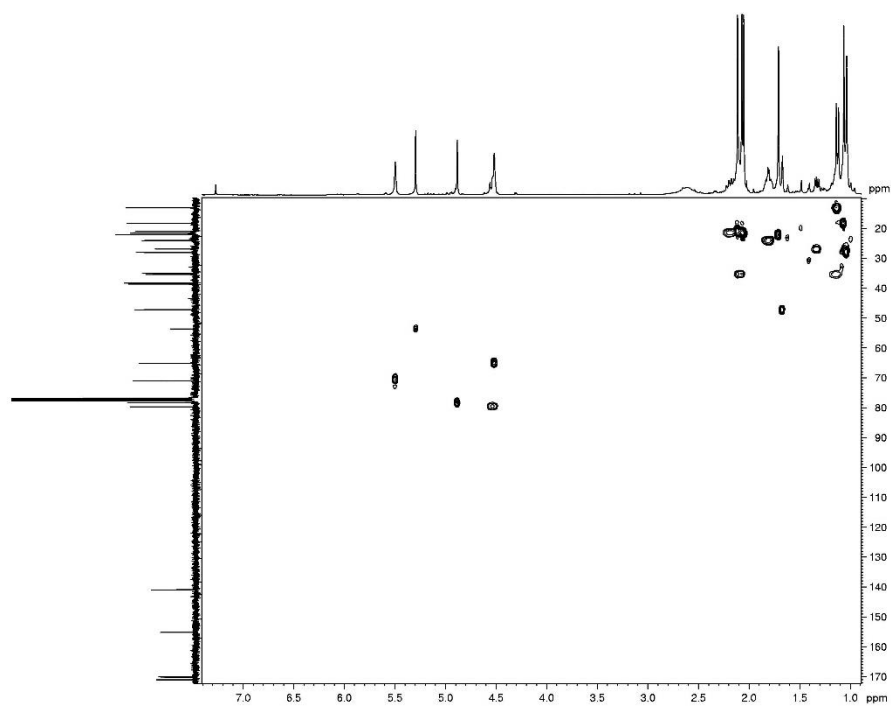


Figura 110. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-07 e expansão na faixa de 0,8 a 2,3 ppm.

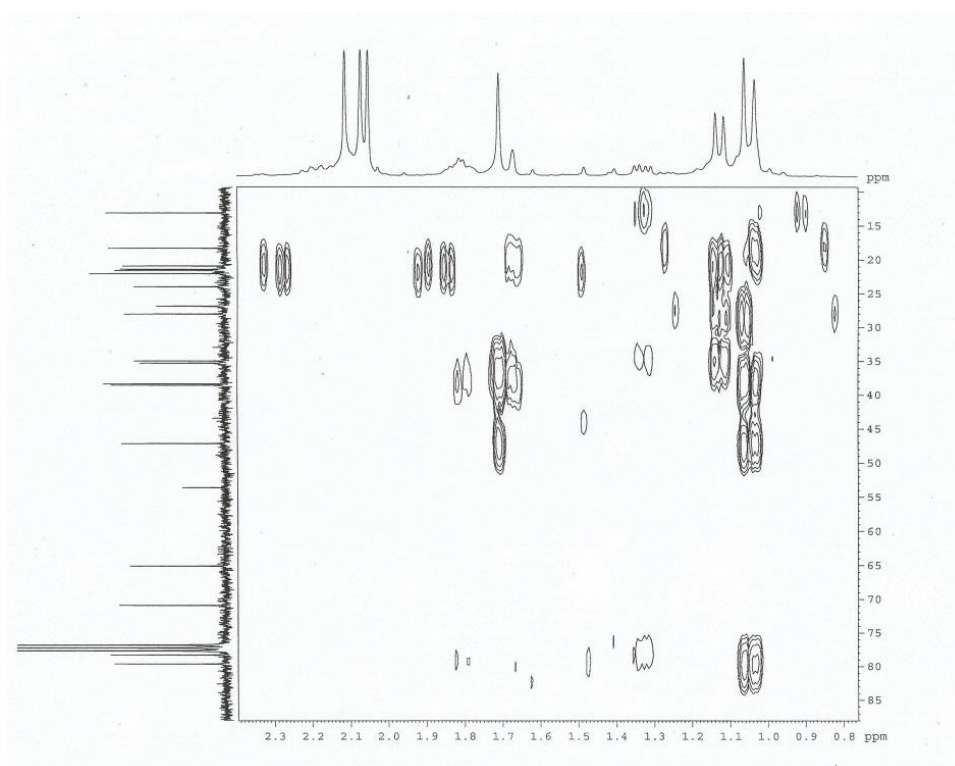
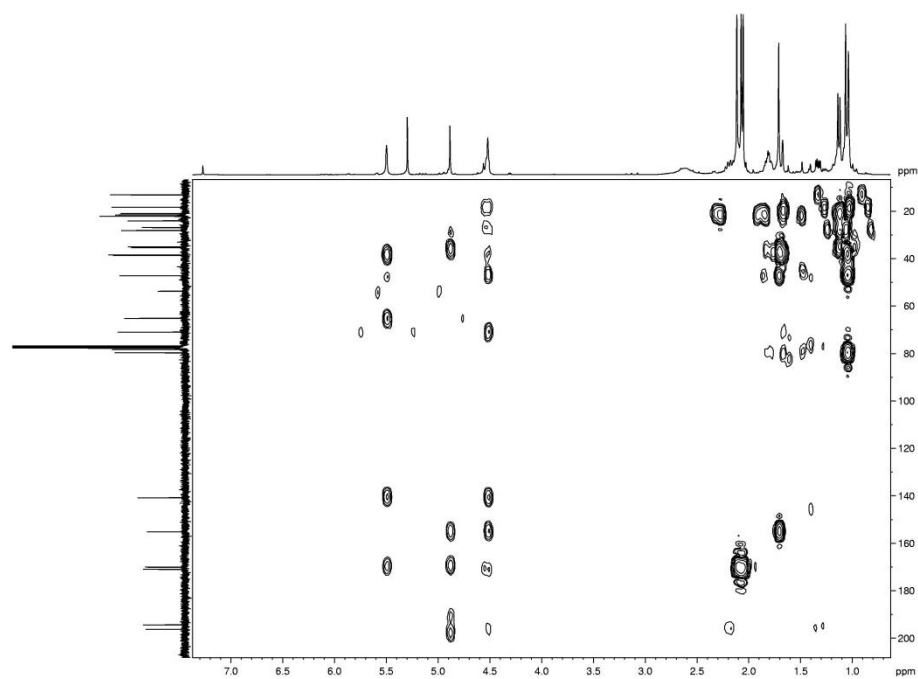


Figura 111. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-07 em CDCl_3 .

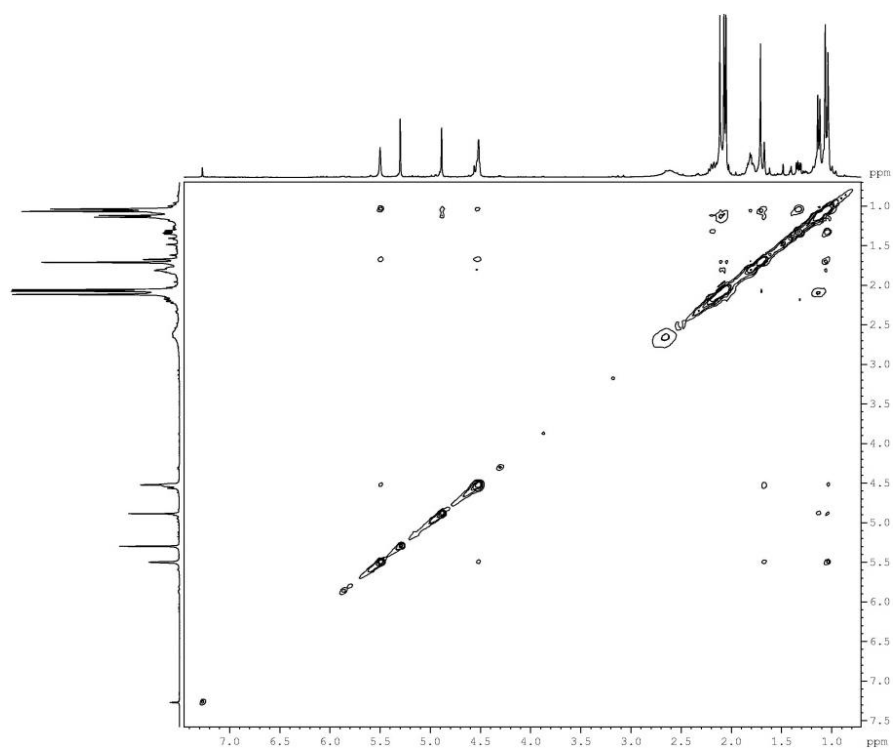
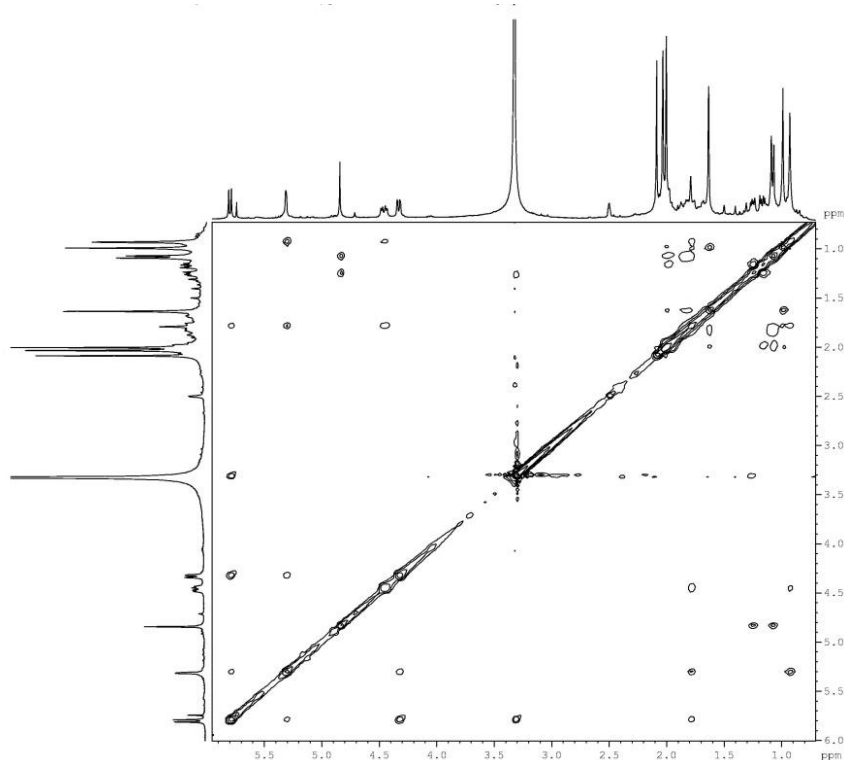


Figura 112. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-07 em DMSO.



4.8 Determinação estrutural de PO-08

A fração A-VIII.8 (pag. 146), oriundo da fr. EHPO, foi submetida à cromatografia em CLAE, obtendo-se 4,5 mg de um óleo incolor com $[\alpha]_D^{20} = 5,9^\circ$, (c 0,1, CH₂Cl₂), UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 220,3 nm (Fig. 117, pág. 108) que recebeu o código de **PO-08**.

O espectro de EMAR-ESI apresentou um pico em m/z 343,2243 correspondente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$, através do qual obteve-se a fórmula molecular C₂₀H₃₂O₃, (massa calcd. 343,2244; erro -0,29 ppm), a qual apresenta IDH igual a cinco (Fig. 116, pág. 108).

A análise do espectro de IV (Fig. 118, pág. 108) mostrou bandas intensas características de deformações axiais em 1689 e 1638 cm⁻¹ indicando a presença de duplas ligações conjugadas.

O espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃] (Fig. 119, pág. 109), apresentou três singletos em δ_H 5,67 (1H-14); 4,93 (18-Ha) e 4,74 (18-Hb) para hidrogênios ligados a carbonos sp² e um duplete de duplete em δ_H 4,31 ($J=11,9; 5,6$) de hidrogênio ligado a carbono oxigenado. A comparação do espectro de PO-08 com os compostos descritos nas seções anteriores, mostrou forte semelhança com PO-05, exceto pela ausência dos grupos metoxila e acetoxila, além da redução do número de hidrogênios metílicos. Diante dessas observações, podemos propor que PO-08 trata-se de mais um diterpeno, de provável esqueleto clerodano, comum na espécie *P. ornatus*.

O espectro de RMN ¹³C CPD [75 MHz, CDCl₃] (Fig. 120, pág. 110), de PO-08 apresentou 18 linhas espectrais. A comparação dos espectros de RMN ¹³C de PO-05 com os PO-08 mostrou como principal diferença a ausência dos sinais correspondentes as carbonilas de cetona e de éster, bem como a presença do sinal em δ_C 99,6 para um carbono metilênico de uma dupla ligação exocíclica. A análise do espectro de RMN ¹³C, juntamente com o espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C – HSQC (Fig. 123, pág. 111), permitiu correlacionar os respectivos átomos de carbono ao seu sinal de hidrogênio, com ênfase na correlação dos sinais em δ_H 4,93 (18-Ha); 4,74 (18-Hb) e δ_C 99,6 confirmando a presença de um alceno exocíclico.

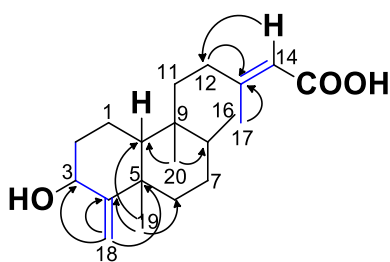
No espectro de correlação homonuclear ¹H, ¹H-(Fig. 122, pág. 111) foram observados os acoplamentos alílicos e vinílicos do hidrogênio oximetínico em δ_H 4,31 (H-3) com o alceno terminal δ_H 4,92 (18-Ha); 4,74 (18-Hb) e com os hidrogênios diastereotópicos em δ_H 2,19(2-Ha); 1,80 (2-Hb).

No espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C – HMBC (Fig. 124, pág. 112) observaram-se os acoplamentos em δ_H 1,05 (Me-19) com o sinal de carbono em aproximadamente 162,4 ppm (C-4), e de δ_H 2,16 (Me-16); 2,01 (12-Ha) e 1,90 (12-Hb) com δ_C 164,0 (C-13). Dessa forma,

confirmou-se o número de carbonos proposto no espectro de massas (EMAR) ratificando a proposta de PO-08 como sendo um diterpeno de estrutura semelhante à maioria dos demais diterpenos isolados neste trabalho. Em adição, as demais correlações observadas para PO-08 encontram-se na figura 113.

Diante dos dados de RMN e experimentos bidimensionais apresentados até agora, pode-se deduzir que PO-05 trata-se de um diterpeno de esqueleto clerodano análogo aos demais descritos nas seções anteriores.

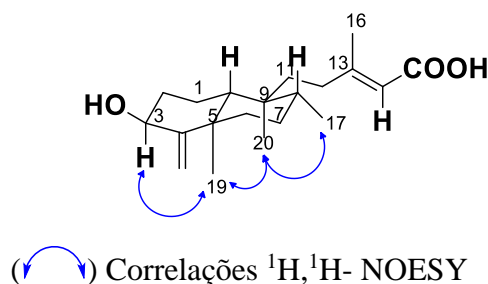
Figura 113. Principais acoplamentos observados em ^1H , ^1H -COSY e ^1H , ^{13}C – HMBC para a estrutura proposta de PO-08.



(—) RMN 2D ^1H , ^1H -COSY; (↷) ^1H , ^{13}C -HMBC

O espectro de correlação espacial ^1H , ^1H -NOESY (Fig. 125, pág. 113) permitiu atribuir a estereoquímica relativa de PO-08, através dos acoplamentos entre os hidrogênios das metilas δ_{H} 0,83 (Me-17) e 0,75 (Me-20); 0,75 (Me-20) e 1,05 (Me-19) e 1,05 (Me-19) com 4,31 (H-3), atribuindo-se uma orientação *beta* (β -OH) para a hidroxila em C-3 (Fig. 114, pág. 105). Devido à superposição de inúmeros sinais, não se pode confirmar a fusão *trans* para o sistema decalina, contudo, levando em consideração os demais diterpenos isolados no gênero *Plectranthus*, bem como a comparação de seus deslocamentos químicos, propõe-se a estrutura mostrada na figura 114, pág. 105 para PO-08.

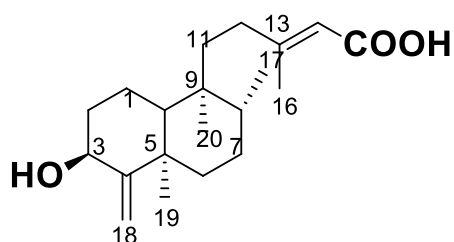
Figura 114. Representação estrutural de PO-08 com suas principais correlações ^1H , ^1H -NOESY



Diante das informações obtidas dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e NOESY pode-se identificar PO-05 como sendo o diterpeno de esqueleto clerodano conhecido como ácido 3β -hidroxi-neocleroda-4(18),13*E*-dien-15-óico.

A literatura mostra que o composto em questão já foi isolado na espécie *Cyathocalix zeilanica* por (Wijethne et al., 1995). A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , embora analisados em solventes diferentes, mostraram-se muito semelhantes. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C encontram-se resumidos na Tabela 14, página 107.

Figura 115. Representação estrutural de PO-08



Pesquisas realizadas na literatura não mostraram nenhuma atividade biológica comprovada ou associada a esta molécula

Tabela 14. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H em (Hz) e ^{13}C (CDCl_3) de PO-08, comparados com os dados da literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit.* (piridina)	^1H	^1H Lit.* (piridina)	HMBC	
					$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	20,7	21,0	1,60; m	1,56; m 1,63; m	-	-
2	37,6	38,3	2,19; d ($J=5,13$) -	1,58; m 2,40; m	-	-
3	69,8	68,9	4,31; dd ($J=11,9$; 5,6)	4,58; m	H-18	H-18
4	162,4	163,7	-	-	-	H-19
5	40,4	40,4	-	-	H-19	H-18
6	37,8	38,0	1,62; m	1,66; m	-	H-19
7	27,4	27,6	1,51-1,47; m	1,42; m 1,47; m	-	H-17
8	36,8	36,8	1,54-1,51; m	1,41; m	H-17	H-20
9	39,6	39,5	-	-	H-11	H-17/20
10	48,6	48,8	1,18; m	1,22; dd ($J=11,2$)	H-11	H-19/20
11	36,4	36,7	1,42; d ($J=5,34$)	1,36; td, ($J=13$; 4,5; 1,47)	H-12	H-20
12	34,9	34,5	2,01; m 1,19; m	1,86; td ($J=13,5$; 1,97; 4,5)	-	H-14/16;
13	164,0	159,5	-	-	H-12	H-16
14	114,5	117,4	5,71; s	6,09; q ($J=1,2$)	-	H-12/16
15	162,4	169,2	-	-	-	-
16	19,6	19,0	2,16; s	2,36; s	-	H-14/12
17	16,0	16,0	0,83; d ($J=6,4$)	0,77; d ($J=6,5$)	-	-
18	99,6	100,1	4,92; s 4,74; s	5,63; t ($J=1,8$) 4,95; t ($J=1,5$)	-	-
19	21,5	21,6	1,05; s	1,06; s	-	-
20	18,2	18,2	0,75; s	0,70; s	-	H-11

* Dados obtidos de WIJETHNE, *et al*; 1994.

Figura 116. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-08 no modo positivo e negativo.

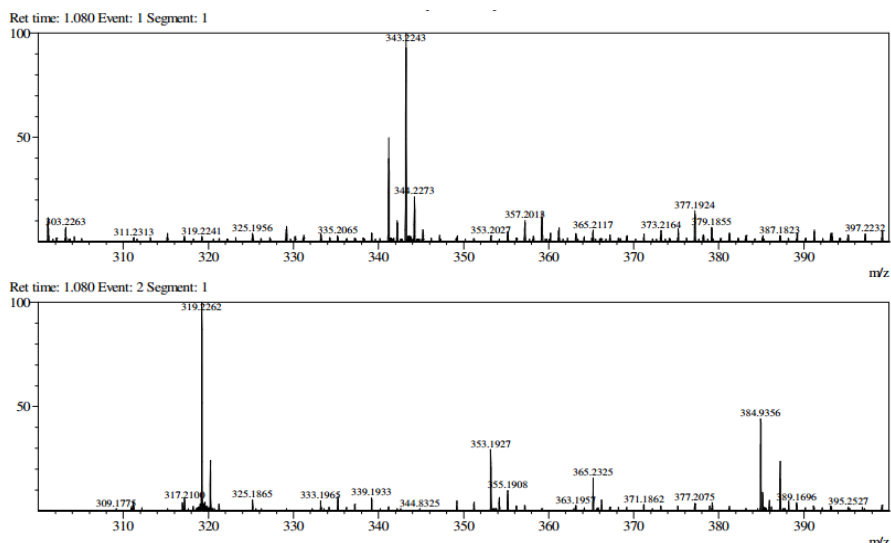


Figura 117. Espectro de absorção na região do UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) de PO-08.

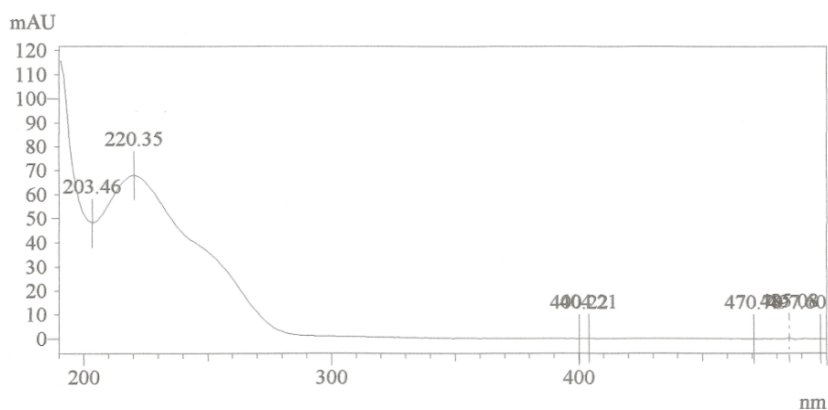


Figura 118. Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-08.

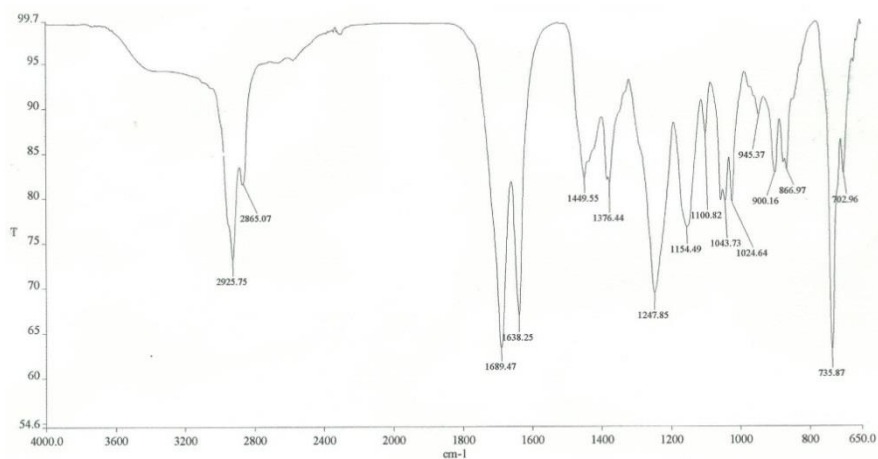


Figura 119. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de PO-08 e expansão na faixa de 0,5 a 2,5 ppm.

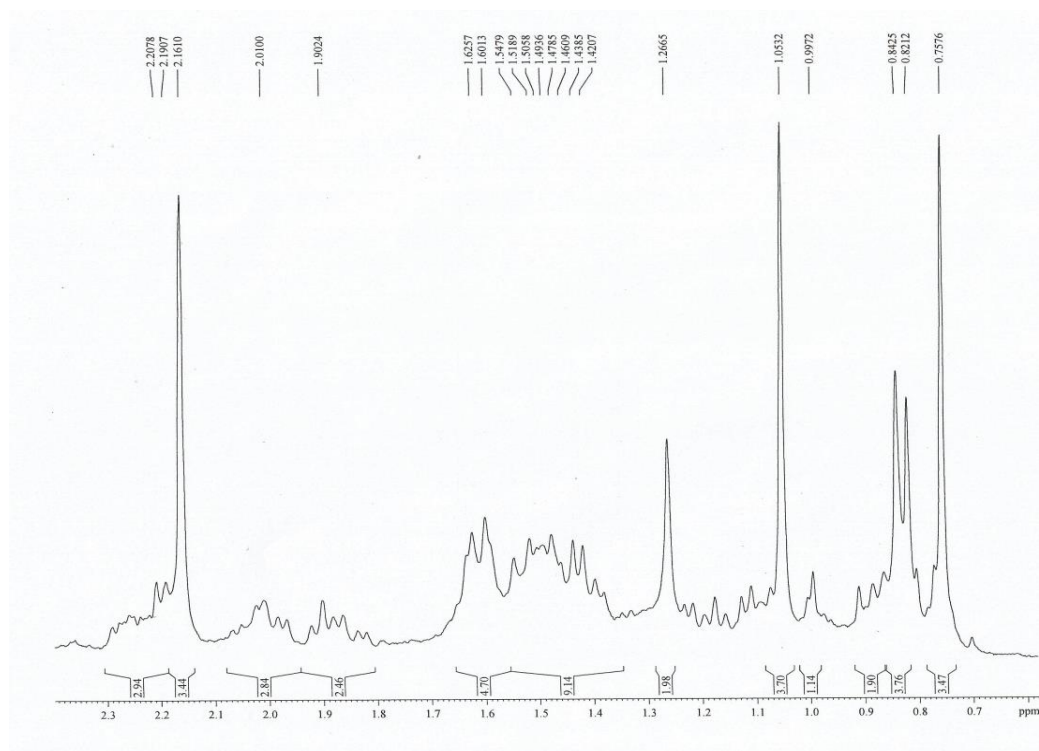
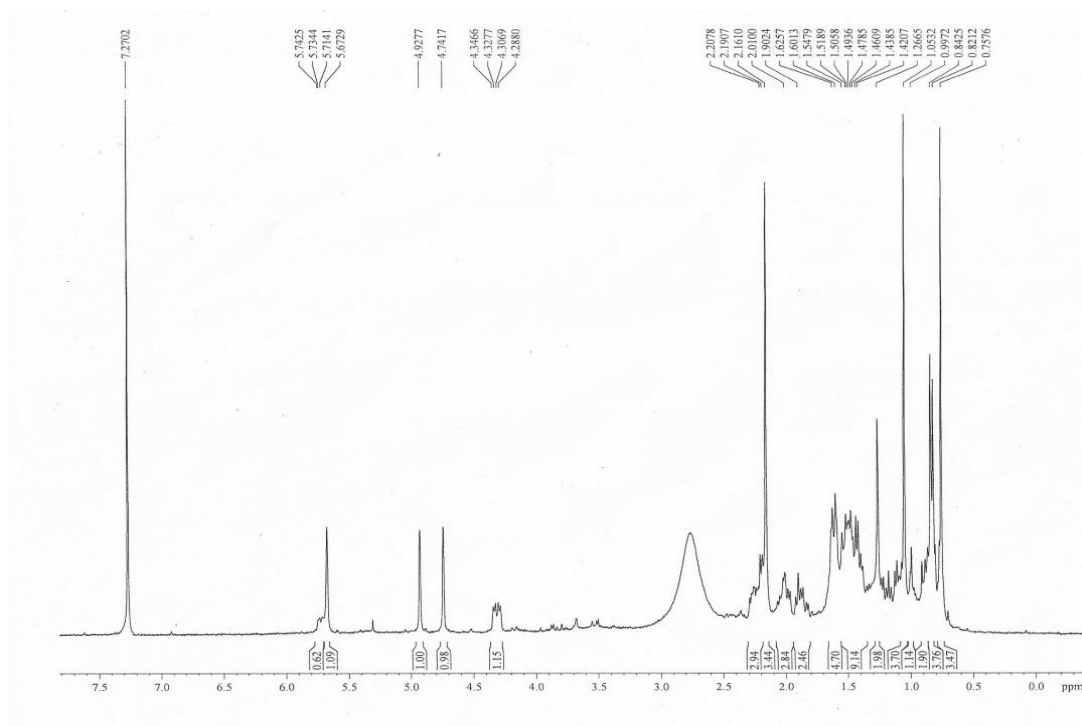


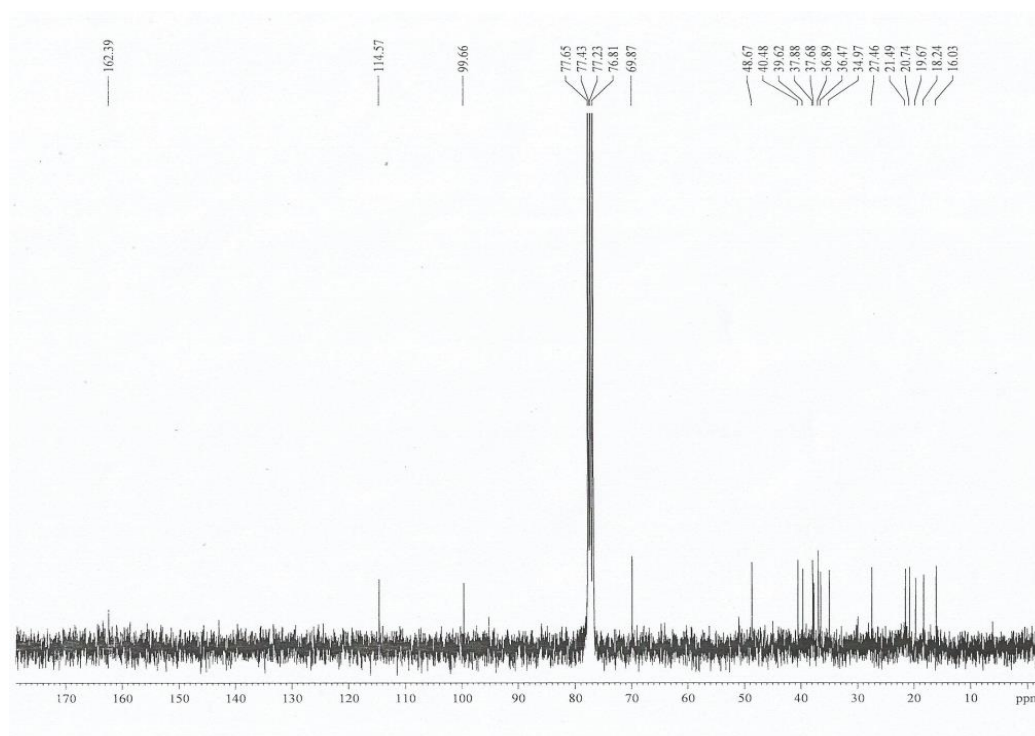
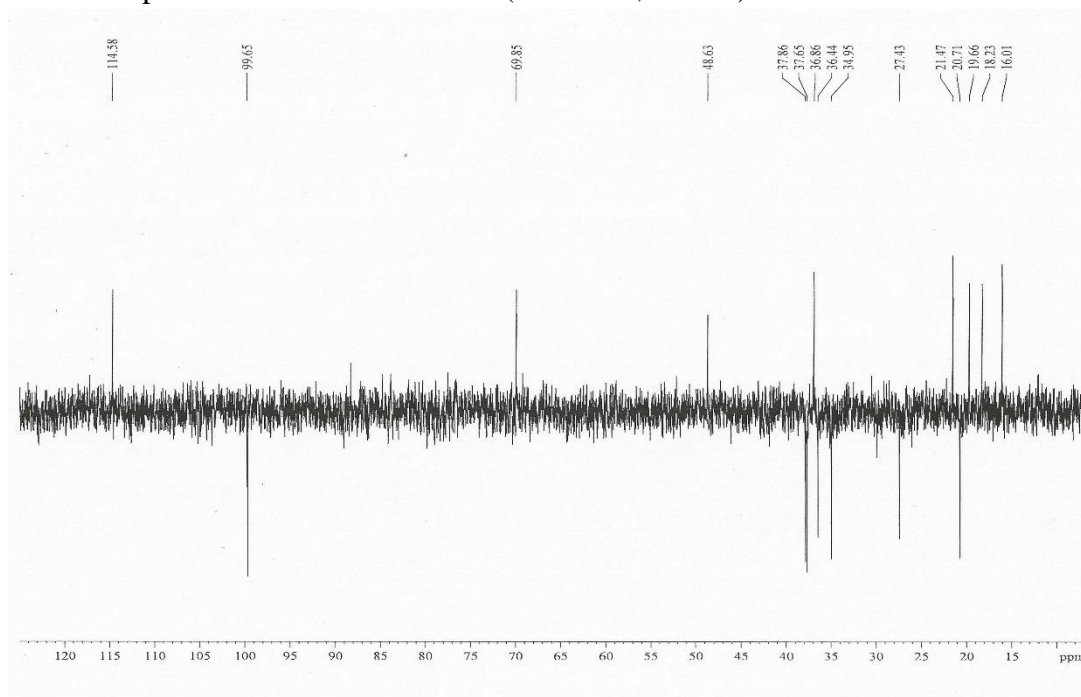
Figura 120. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de PO-08.**Figura 121.** Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-08.

Figura 122. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-08.

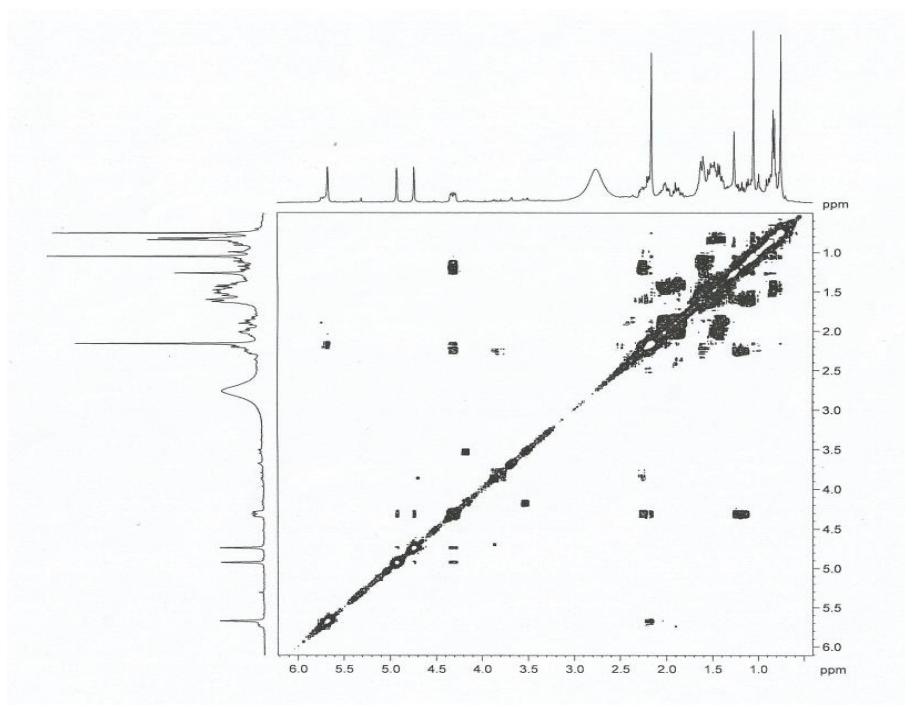


Figura 123. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-08.

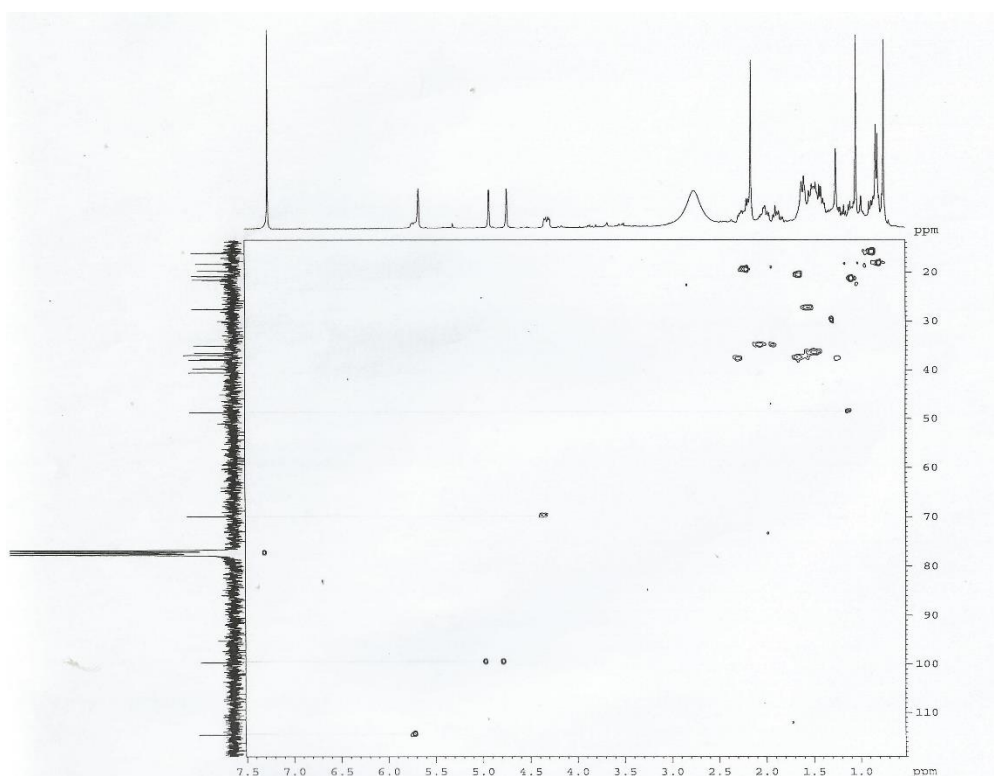


Figura 124. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-08 e expansão na faixa de 1,0 a 7,5 ppm.

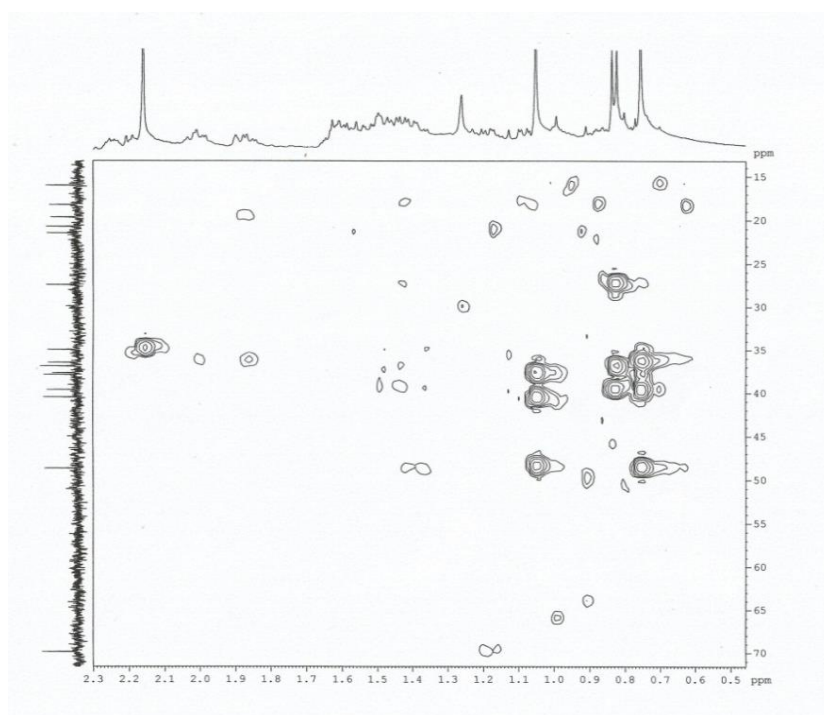
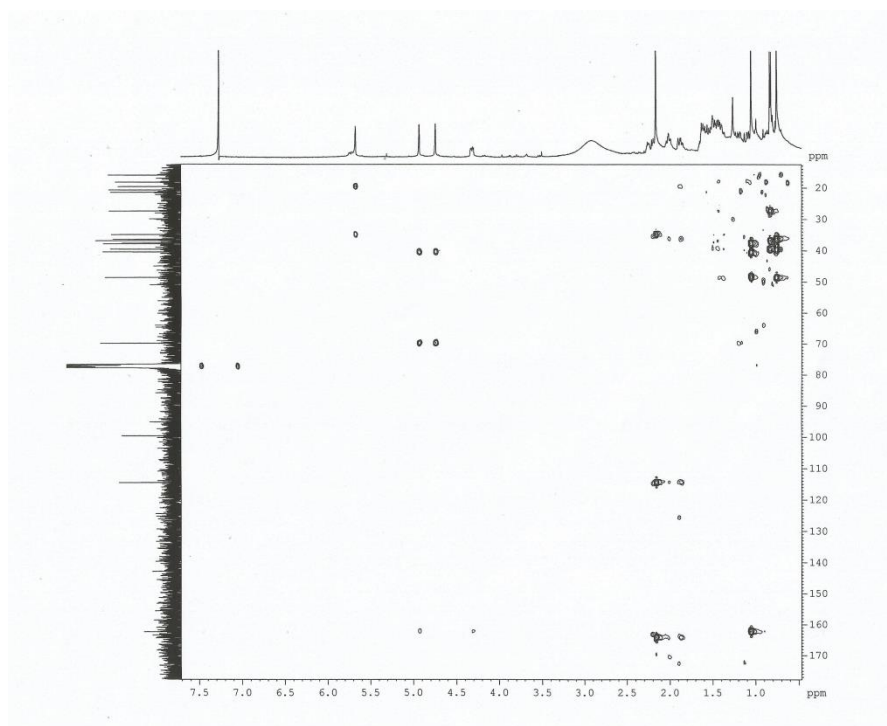
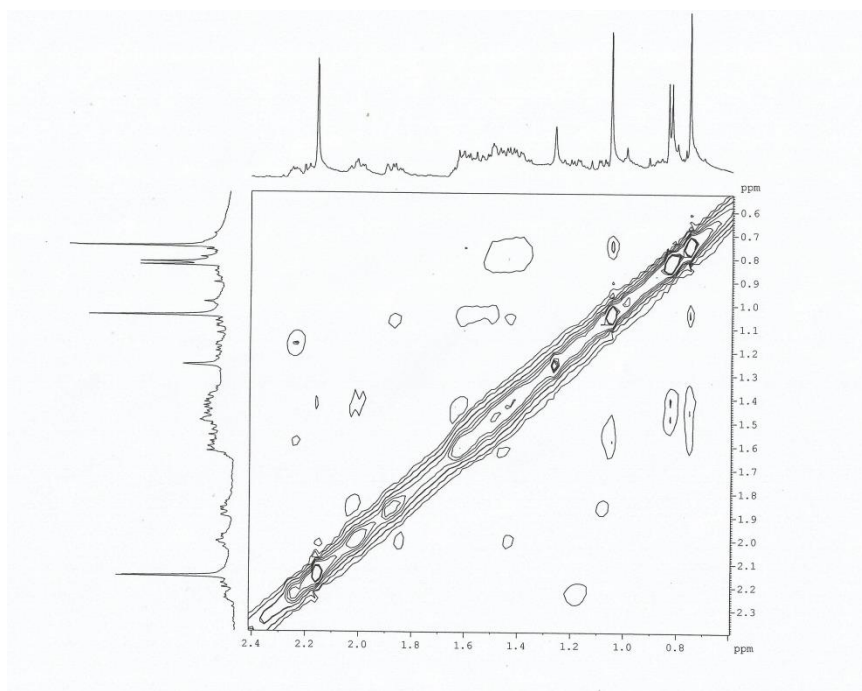
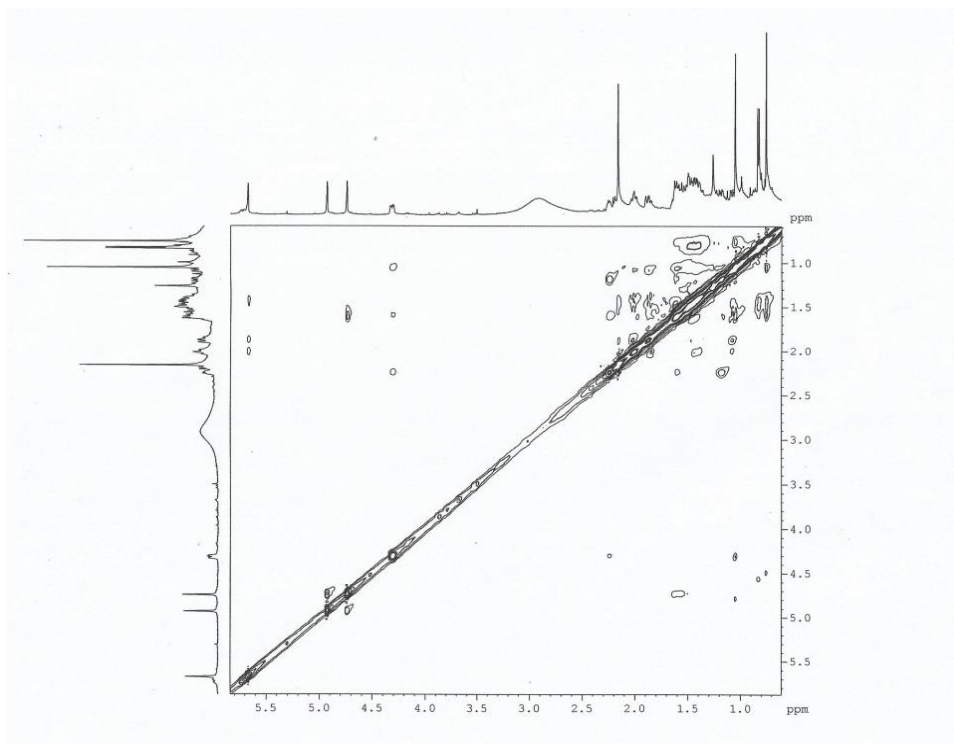


Figura 125. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-08 e expansão na faixa de 0,8 a 2,5 ppm.



4.9 Determinação estrutural de PO-09

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fr. A-X, resultou na obtenção da fr. A-X.2.2 (pág. 147), a qual foi submetida a CLAE, utilizando H₂O/CH₃OH 3:7, levando ao isolamento de 24,2 mg de uma resina de cor cinza e $[\alpha]_D^{22} = -11,76$, (c 0,1, CH₂Cl₂), UV (MeOH) λ_{\max} (pda) 221,9 nm (Fig. 128, pág. 117), nomeado **PO-09**.

O espectro de EMAR-ESI apresentou um pico em m/z 399,2145 (massa calcd. 399,2142, erro 0,75 ppm) associado ao aduto de sódio $[M+Na]^+$, resultando na fórmula molecular C₂₂H₃₂O₅, a qual mostra grau de instauração igual a sete (Fig. 127, pág. 117).

O espectro de IV apresentou bandas de deformação axial em 1711 e 1640 cm⁻¹ característica de carbonilas e de ligação C=C, respectivamente (Fig. 129, pág. 117).

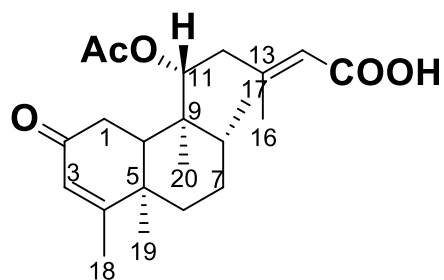
Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] (Fig. 130, pág. 118) foram comparados com os demais compostos, onde se observou semelhança com PO-05, exceto pela ausência da metoxila em δ_H 3,67. Podemos assim supor que PO-09 trata-se de um diterpeno de esqueleto clerodano semelhante à Plectronatina A, com a ausência do grupo metoxila ligado ao carbono C-15.

A análise do espectro de correlações homonuclear ¹H, ¹H-COSY (Fig.133, pág. 120) foi condizente com a proposta de que PO-09 se tratava de um diterpeno análogo a PO-05, haja vista que apresentou deslocamentos químicos semelhantes.

O espectro de RMN ¹³C CPD [500 MHz, CDCl₃] (Fig. 131, pág. 119) apresentou 22 linhas espectrais. A comparação dos espectros de PO-09 com PO-05 confirmou o que já havia sido observado no espectro de RMN ¹H. A mudança no deslocamento químico do carbono C-15 de δ_C 166,8 para δ_C 170,8 comprova a substituição da metoxila de éster por um grupo ácido carboxílico α/β -insaturado, corroborando com o que foi observado no espectro de RMN ¹H. Essa conjugação explica a redução do valor normalmente observada para ácidos carboxílicos em cerca de 20 ppm (Silverstein et al., 2007).

Dessa forma pode-se assumir que o composto PO-09 se trata do diterpeno clerodano nomeado de maneira análoga a PO-01/05 como ácido 11*R*-acetoxi-2-oxo-neocleroda-3,13*E*-dien-15-óico (Fig. 126, pág. 115).

Figura 126. Representação estrutural para PO-09



Pesquisas realizadas na literatura mostram que o composto em questão se trata de um diterpeno já isolado na espécie *P. ornatus* (Oliveira et al., 2005) e não apresenta nenhum estudo relativos a ensaios de atividades biológicas.

Tabela 15. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H em (Hz) e ^{13}C (CDCl_3) de PO-09, comparados com dados da literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit. (CDCl_3)*	^1H	^1H Lit. (CDCl_3)*
1	36,0	35,9	2,62; dl ($J=15,45$) 2,52; t ($J=17,5$)	2,60; dd ($J=3,6; 17,5$) 2,50; dd ($J=13,5; 17,5$)
2	199,7	199,2	-	-
3	125,6	125,5	5,76; s	5,75; s
4	172,9	172,2	-	-
5	40,3	40,1	-	-
6	35,5	35,5	1,83; d ($J=12,75$) 1,36; m	1,38; ddd ($J=4,1; 12,1; 13,0$) 1,33; m
7	27,6	27,6	1,49; d ($J=11,00$)	1,51; m
8	36,4	36,2	1,54; d ($J=9,1$)	1,55; m
9	43,5	43,4	-	-
10	46,1	46,0	1,96 (m)	1,98; dd ($J=3,6; 13,5$)
11	74,5	74,0	5,28; d ($J=9,45$)	5,29; dd ($J=2,6; 9,9$)
12	42,1	42,0	2,37-2,29; m	2,37; dd ($J=2,6; 13,2$) 2,30; dd ($J=9,9; 13,2$)
13	158,9	158,6	-	-
14	118,4	118,3	5,65; s	5,66; s
15	170,8	170,4	-	-
16	19,1	19,0	2,13; s	2,14; d ($J=1,3$)
17	17,7	17,6	1,00; d ($J=4,65$)	1,01; d ($J=5,7$)
18	19,3	19,1	1,90; s	1,90; d ($J=1,1$)
19	18,8	18,7	1,16; s	1,16; s
20	12,3	12,2	0,87; s	0,87; s
$^{11}\text{CO}_2\text{CH}_3$	170,7	170,7	-	-
$^{11}\text{CO}_2\text{CH}_3$	20,9	20,7	2,00; s	2,01; s

* Dados obtidos de Oliveira et al., 2005.

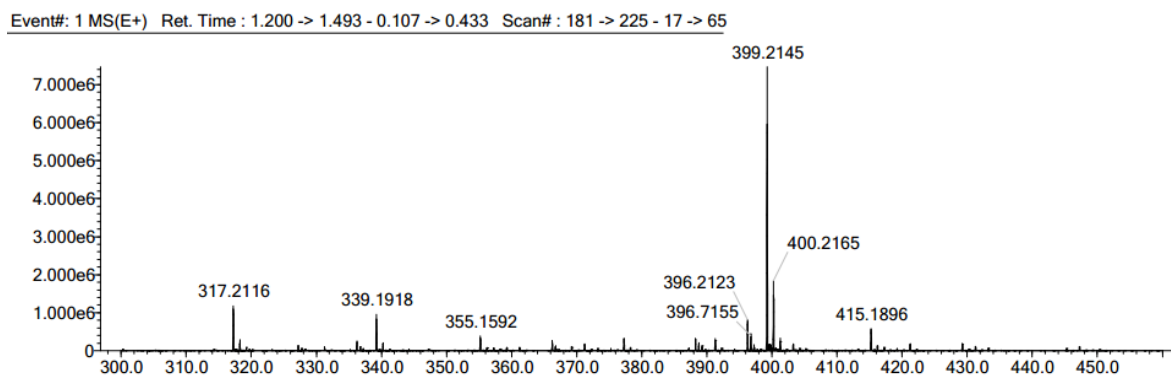
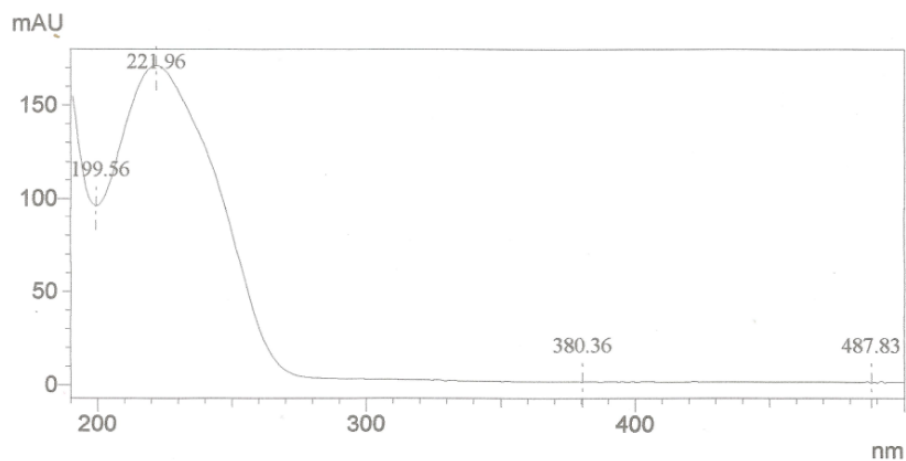
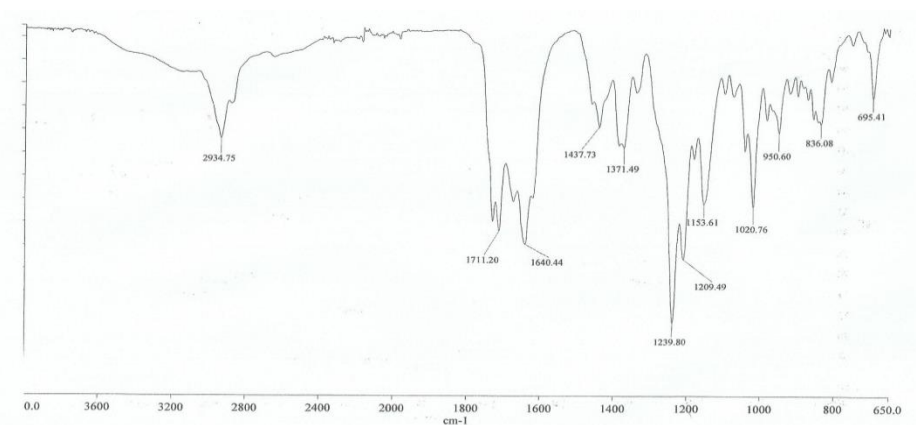
Figura 127. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-09 no modo positivo.**Figura 128.** Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-09.**Figura 129.** Espectro de absorção na região do infravermelho de PO-09.

Figura 130. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PO-09 e expansão na faixa de 0,5 a 3,0 ppm.

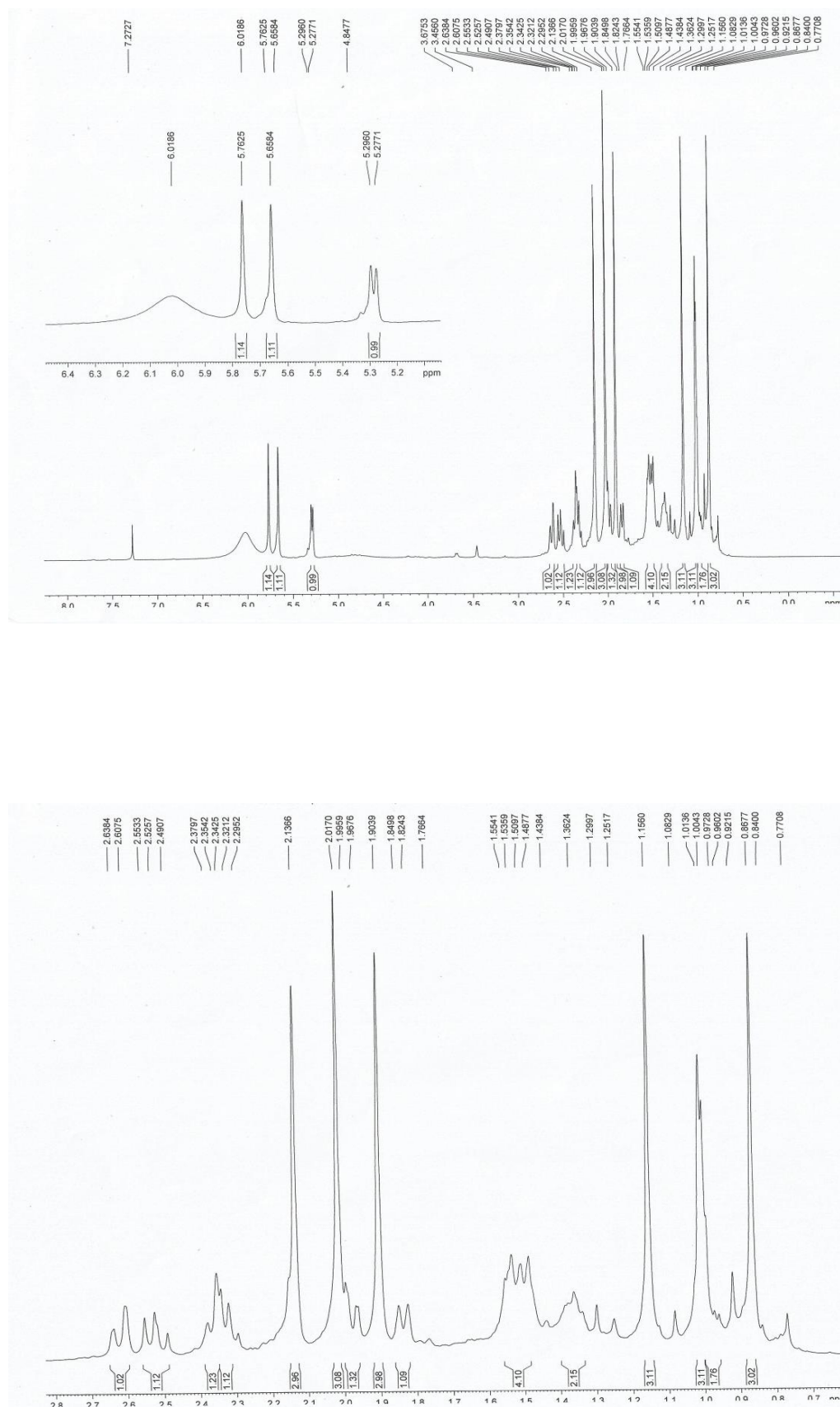


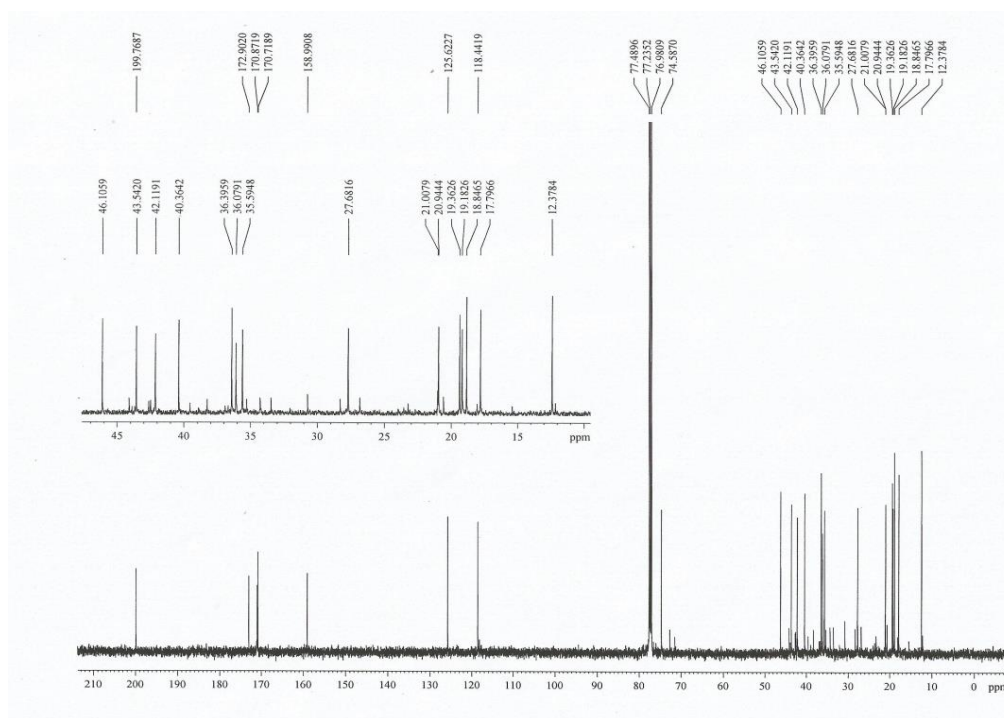
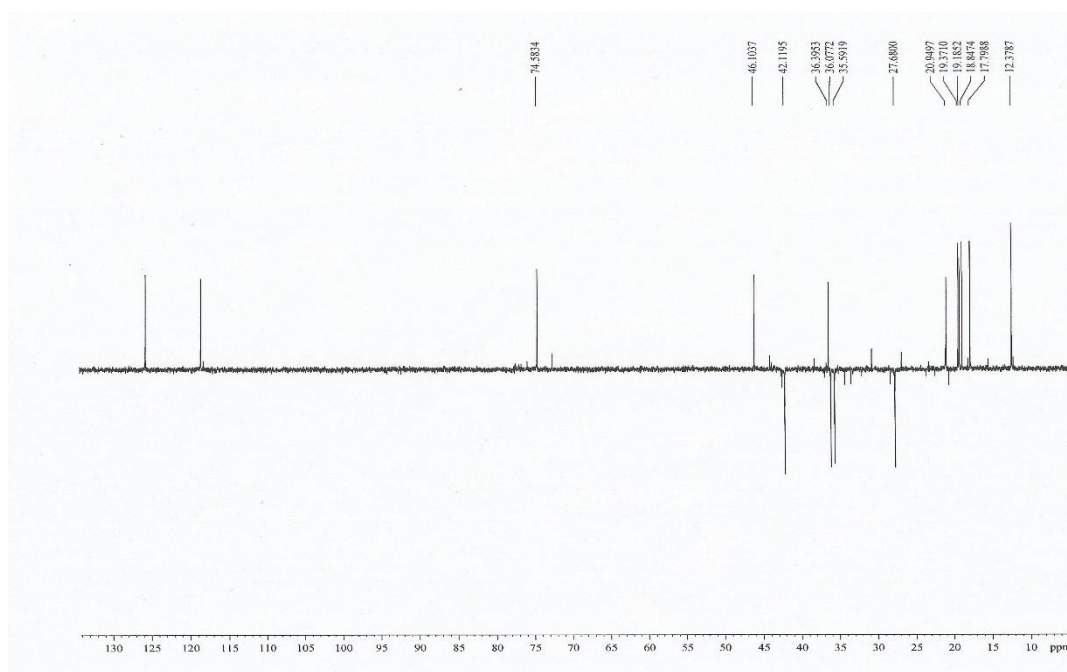
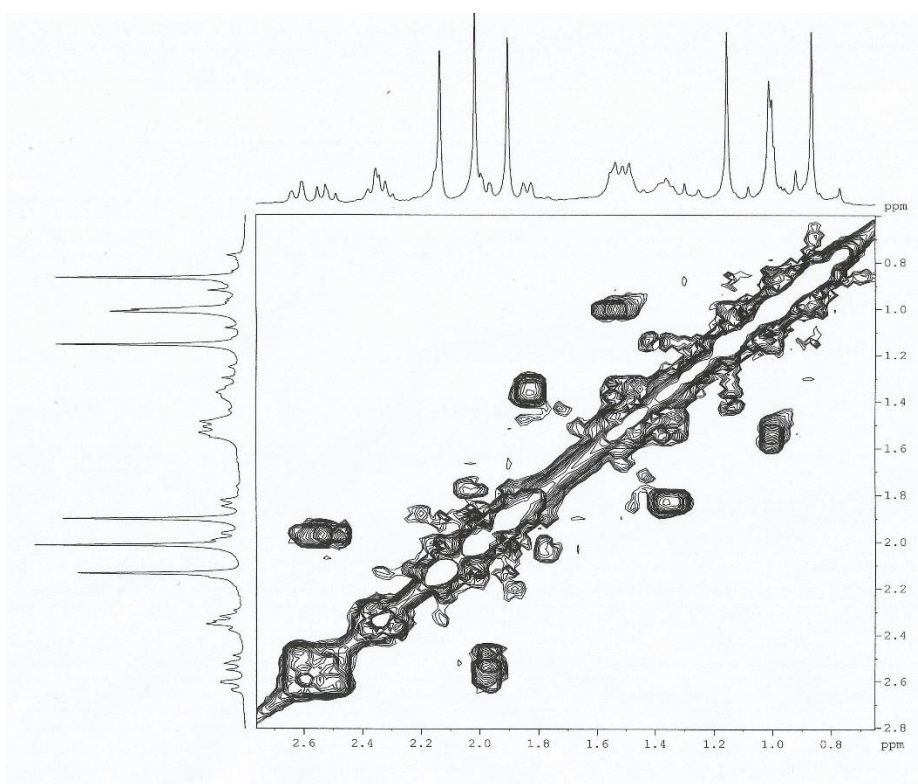
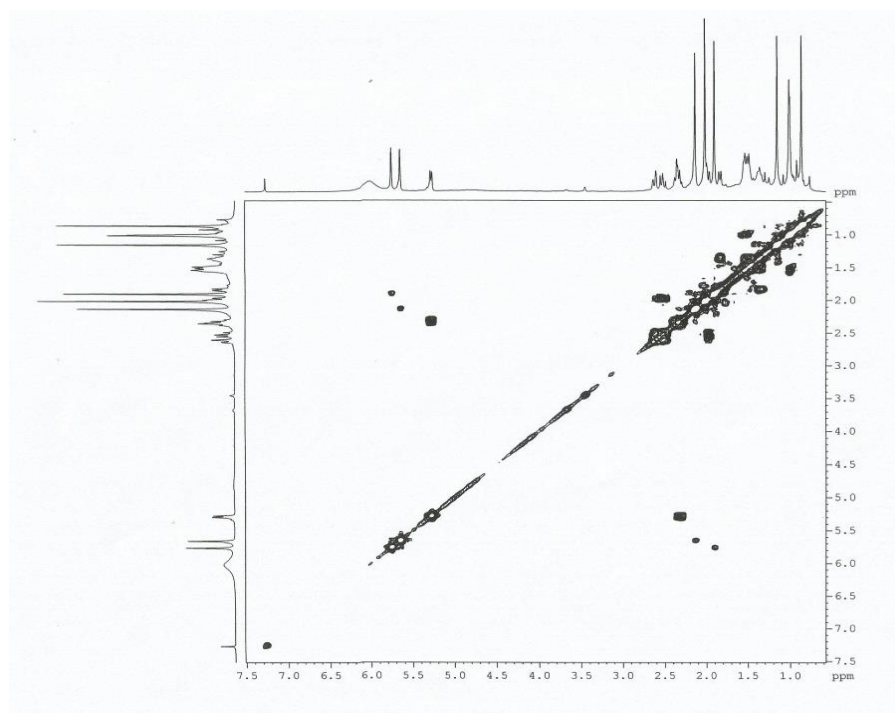
Figura 131. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PO-09.**Figura 132.** Espectro de RMN DEPT 135° (300 MHz, CDCl_3) de PO-09.

Figura 133. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY de PO-09 e expansão na faixa de 0,8 a 2,5 ppm.



4.10 Determinação estrutural de PO-10

Inúmeros fracionamentos cromatográficos da fr. A-X, resultou no isolamento da subfração A-X.2.2 (pág. 147) que foi cromatografada em CLAE, levando ao isolamento de 17,0 mg de uma resina alaranjada, $[\alpha]_D^{22} = -6,13$, (c 0,1, CH_2Cl_2), UV (MeOH) λ_{max} (pda) 217,9 nm (Fig. 136, pág. 124), nomeado **PO-10**.

O espectro EMAR-ESI apresentou um pico referente ao aduto de sódio em m/z 401,2305 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$ (massa calcd. 401,2298; erro 1,74 ppm) cujo grau de instauração corresponde a seis (Fig. 135, pág. 124).

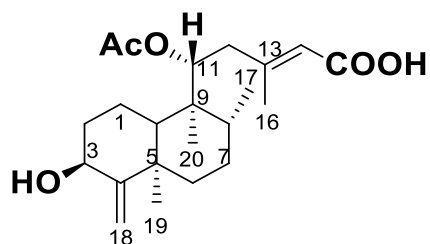
O espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 137, pág. 124), apresentou cinco sinais de intensidade média em torno de 6,0-3,0 ppm, sendo eles, três simples em δ_{H} 5,65 (H-14); 4,94 (18-Ha) e 4,74 (18-Hb); um duplete em δ_{H} 5,35 ($J = 10,3$) e um multiplete em torno de δ_{H} 4,31 (H-3), ambos característicos de hidrogênios de carbono oximetínico. Adicionalmente verificou-se a presença dos demais sinais pertencentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

A comparação dos espectros de RMN ^1H de PO-10 com os compostos descritos neste trabalho apresentou um padrão similar de distribuição dos deslocamentos químicos, principalmente com PO-08, nos permitindo propor uma estrutura semelhante para esta molécula.

Como esperado, o espectro de RMN ^{13}C CPD [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 138, pág. 125) apresentou 22 linhas espectrais, mostrando ser um diterpeno clerodano acetilado. Ao se comparar os espectros de RMN ^{13}C de PO-10 com os de PO-08, confirmou-se a semelhança entre os compostos, entretanto, pela presença dos sinais adicionais em δ_{C} 170,9 e 20,8 devido à presença do grupo acetoxila no carbono C-11, gerando uma diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos da vizinhança, justificada pelo efeito *Y-gauche*, como já foi discutido para PO-01.

Diante do exposto, PO-10 trata-se de um diterpeno de esqueleto clerodano análogo ao ácido 3β -hidroxi-neocleroda-4(18),13E-dien-15-óico (PO-08) e nomeado Ácido 11(R) Acetoxi- 3β -hidroxi-neocleroda-4(18),13E-dien-15-óico (Fig. 134, pág. 122).

Figura 134. Representação estrutural proposta para PO-10



Pesquisas realizadas na literatura mostraram que o composto descrito nesta seção foi anteriormente isolado por Oliveira e colaboradores (2005) também na espécie *P. ornatus*. Os valores referentes aos deslocamentos químicos de PO-10, juntamente com os dados da literatura encontram-se sumariados na Tabela 16, página 123.

Tabela 16. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-10, comparados com os dados da literatura.

C	^{13}C	^{13}C Lit.* CDCl_3	^1H	^1H Lit.* CDCl_3
1	21,6	21,04	1,60; m	1,93; m 1,71; m
2	37,6	37,6	2,19; d ($J=5,13$) -	2,27; m 1,31; m
3	69,5	69,4	4,31; dd ($J=11,9; 5,6$)	4,33; dd ($J=5,6; 11,7$)
4	161,7	161,6	-	-
5	40,6	40,5	-	-
6	37,5	37,4	1,62; m	1,58; m
7	28,0	27,9	1,51-1,47; m	1,50; m 1,52; m
8	36,6	36,5	1,54-1,51; m	1,41; m
9	43,9	43,9	-	-
10	49,3	49,2	1,18; m	1,13; dd ($J=1,8; 12,2$)
11	75,7	75,5	5,35; d ($J=10,3$)	5.35 dd (1.7, 10.5)
12	42,1	42,0	2,01; m 1,19; m	1,86; td ($J=13,5; 1,97; 4,5$)
13	159,5	159,3	-	-
14	118,0	117,9	5,65; s	6,09 (q, $J=1,2$)
15	170,8	170,6	-	-
16	21,0	19,0	2,16; s	2,36; s
17	19,1	17,8	0,83; d ($J=6,4$)	0,77; d ($J=6,5$)
18	100,1	99,9	4,92; s 4,74; s	5,63; t ($J=1,8$) 4,95; t ($J=1,5$)
19	21,5	21,4	1,05; s	1,06; s
20	12,1	11,9	0,75; s	0,70; s
11-AcO	170,9	170,7		
COOCH₃		20,8		

Figura 135. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-10.

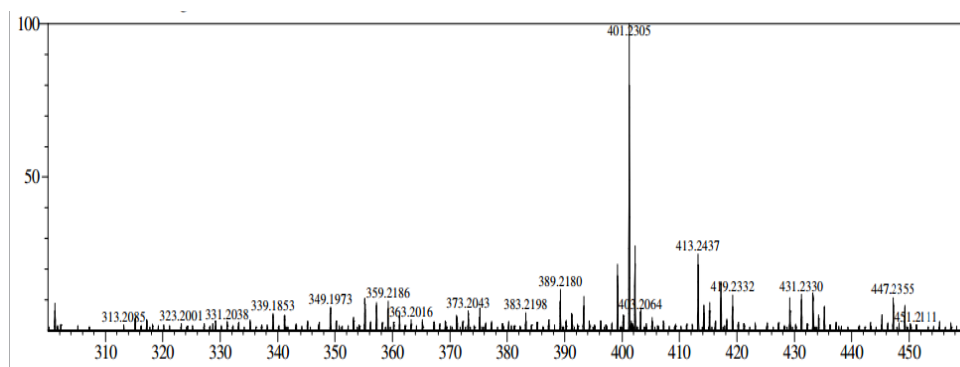


Figura 136. Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm) para PO-10.

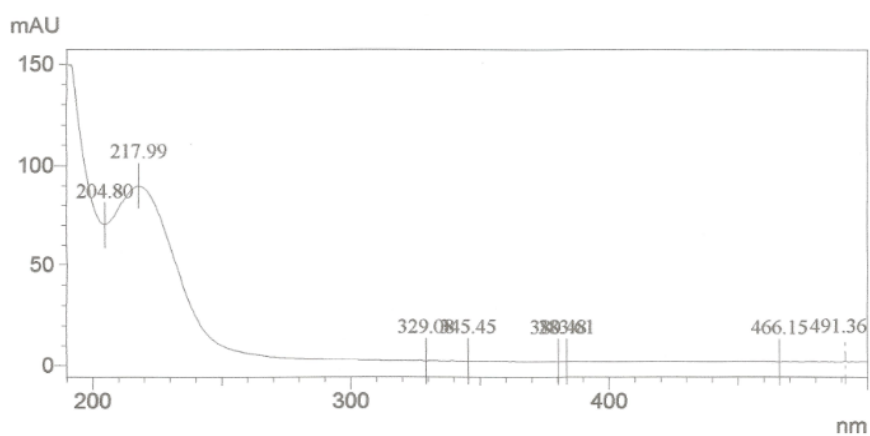


Figura 137. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PO-010.

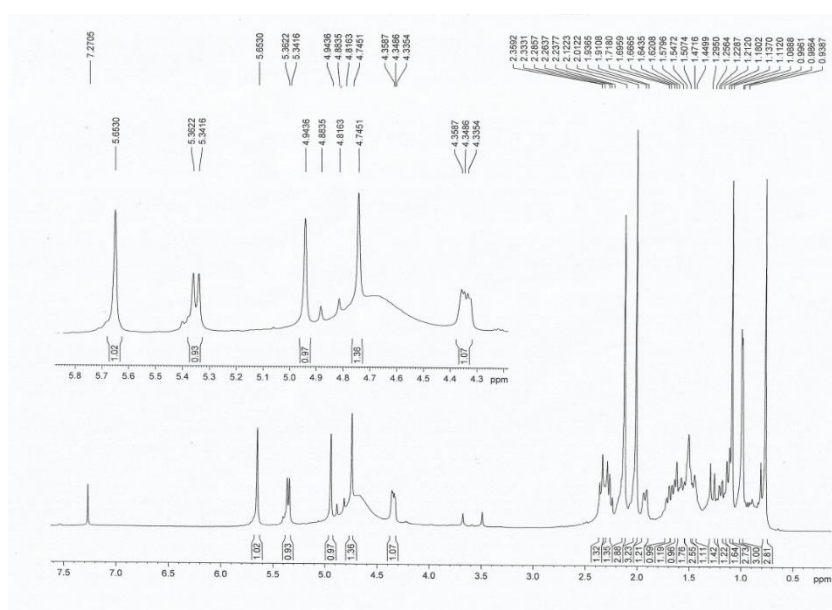
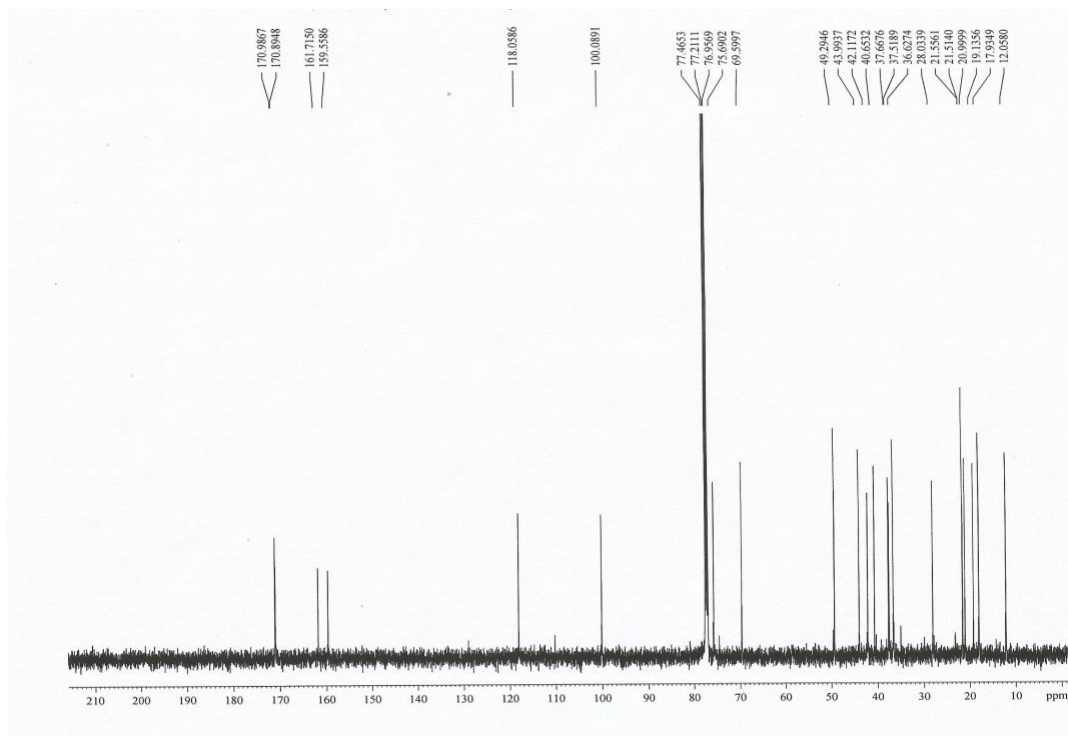
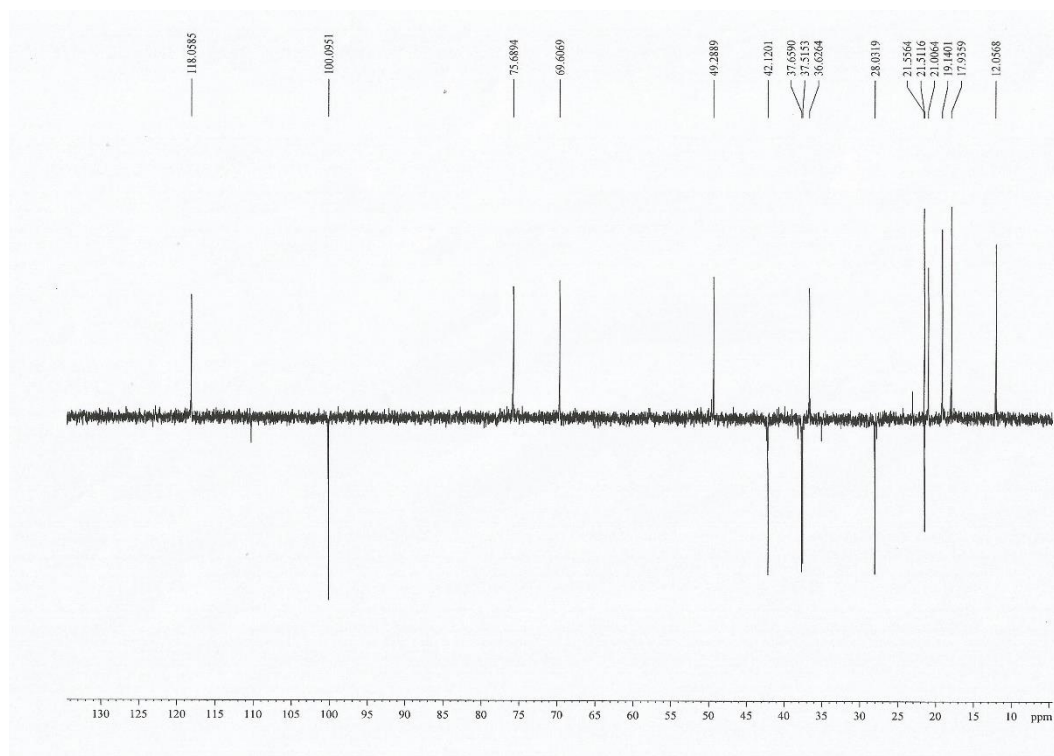


Figura 138. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PO-10.**Figura 139.** Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, CDCl_3) de PO-10.

4.11 Elucidação estrutural de PO-11

O fracionamento cromatográfico da fração A-X.2.2 (pág. 147), por CLAE, levou ao isolamento de 16,4 mg de um óleo esverdeado com $[\alpha]_D^{21} = 43,23^\circ$, (c 0,1, CH_2Cl_2), UV λ_{max} (pda) 218,4 nm (Fig. 143, pág. 129) que recebeu o código de **PO-11**.

A análise do espectro EMAR mostrou um pico em m/z 399,2495 pertencente ao aduto de potássio $[\text{M}+\text{K}]^+$ condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$, com grau de insaturação igual a sete (Fig. 142, pág. 129).

A análise preliminar do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de PO-11 (Fig. 144, pág. 130) apresentou seis sinais de hidrogênios na região de 6,00-4,00 ppm, além de uma série de sinais na região hidrogênios ligados a carbono insaturados (2,00-0,5 ppm). A comparação dos espectros de PO-11 com os demais compostos apresentou como principais diferenças, os sinais de um duplete δ_{H} 6,05 (H-3, $J = 9,55$ Hz) e um multiplete δ_{H} 5,80 (H-2). Os demais sinais observados sugerem que a molécula em análise deve ser análoga a PO-10.

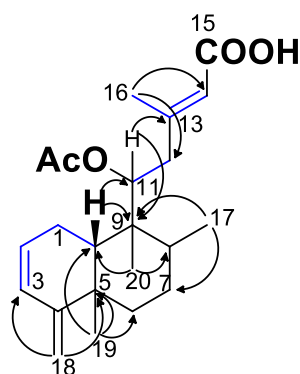
A análise do espectro de RMN ^{13}C CPD [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 145, pág. 130), apresentou também 22 linhas espectrais, corroborando com a proposta de PO-11. A subtração dos sinais dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 146, pág. 131) revelou o padrão de hidrogenação do composto, confirmando a presença de um carbono metilênico exocíclico δ_{C} 107,1 (C-18). Observou-se também a presença de três sinais em δ_{C} 129,1; 128,1 e 117,9 pertencentes a carbonos metínicos insaturados. A análise do espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HSQC (Fig. 148, pág. 132) permitiu a correta correlação de cada sinal de carbono ao seu respectivo sinal de hidrogênio.

A análise do espectro 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig. 147, pág. 131) permitiu observar os acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em δ_{H} 6,05 (H-3) e 5,80 (H-2), H-2 com 2,40 (2H-1) e de 2H-1 com δ_{H} 1,49 (1H-10), mostrados na Figura 140, pág. 127

As informações obtidas até agora foram comprovadas através das correlações observadas entre os hidrogênios das metilas δ_{H} 2,11 (Me-16) com δ_{C} 41,9 (C-12), 117,9 (C-14), δ_{H} 1,05 (Me-19) com δ_{C} 38,1 (C-5), 37,1 (C-6), 44,5 (C-10) e δ_{H} 0,83 (Me-20) com os carbonos em δ_{C} 44,5 (C-10), 36,9 (C-8) obtidas no espectro de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Fig. 149, pág. 132). Adicionalmente, confirmaram-se as correlações entre os hidrogênios ligados ao carbono sp^2 exocíclico δ_{H} 4,80 (18-Ha) e 4,66 (18-Hb) com os carbonos δ_{C} 129,0 (C-3), 38,1 (C-5) mostrando que o anel B da decalina e a cadeia lateral iniciada em C-9 encontram-se intactos neste composto (Fig. 140, pag. 127).

Diante das informações apresentadas nos espectros de RMN uni e bidimensionais, conclui-se que PO-11 trata-se de um diterpeno de esqueleto clerodano similar a PO-10, apenas pela substituição da hidroxila no carbono C-3 de PO-10 por um sistema de insaturação entre os carbonos C-2/C-3 e C-4/C-18.

Figura 140. Principais acoplamentos e correlações observados para a estrutura proposta para PO-11.



A análise do espectro 2D RMN ^1H , ^1H -NOESY [500 MHz, CDCl_3] (Fig. 150, pág. 133), não foi suficiente para concluir a estereoquímica relativa de PO-11, devido a sobreposição dos sinais, como os de H-8 e H-10. Contudo se pode verificar o arranjo *cis* para os hidrogênios das metilas Me-17, Me-19 e Me-20, como previamente verificado em todos os compostos descritos neste trabalho, e corroborando com os dados obtidos na literatura acerca dos constituintes químicos obtidos nas plantas do gênero *Plectranthus* (Abdel-mogbi et al., 2002). Dessa forma propomos que PO-11 tenha uma estereoquímica similar ao observado para os demais compostos, sendo nomeado como Ácido 11(R^*)-acetoxineocleroda-2, 4(18), 13*E*-trien-15-oico e apresentado pela primeira vez na literatura (Fig. 141, pág. 129).

Figura 141. Representação da estrutura de PO-11

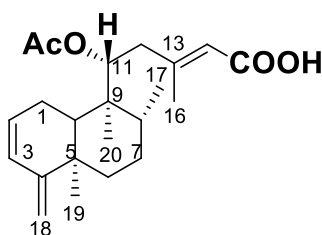


Tabela 17. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de PO-11.

C	^{13}C	^1H	HMBC	
			$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	24,8	2,40; m	-	-
2	128,1	5,80; m	-	-
3	129,1	6,05; d ($J=9,55$)	-	H-18a
4	156,8	-	-	H-19
5	38,1	-	-	H-18a; H-18b
6	37,1	1,88; m	-	-
		1,49; m		
7	27,9	1,43; m	H-17	-
8	36,9	1,64; t ($J=6,95$)	H-17	H-20
9	43,6	-	H-20	H-20
10	44,5	1,49; m	-	H-19; H-20
11	75,4	5,33; d ($J=10,3$)	-	H-20
12	41,9	2,58; m	-	H-16; H-14
		2,18; m		
13	159,6	-	H-16	-
14	117,9	5,66; s	-	H-16
15	171,0	-	H-14	
16	19,2	2,11; s	-	H-14
17	18,1	1,01; d ($J=5,6$)	-	-
18	107,1	4,80; s	-	-
		4,66; s		
19	22,2	1,05; s	-	-
20	12,4	0,83; s	-	-
11-OAc	170,8	-	15-Me	H-11
	21,0	2,01; s	-	-

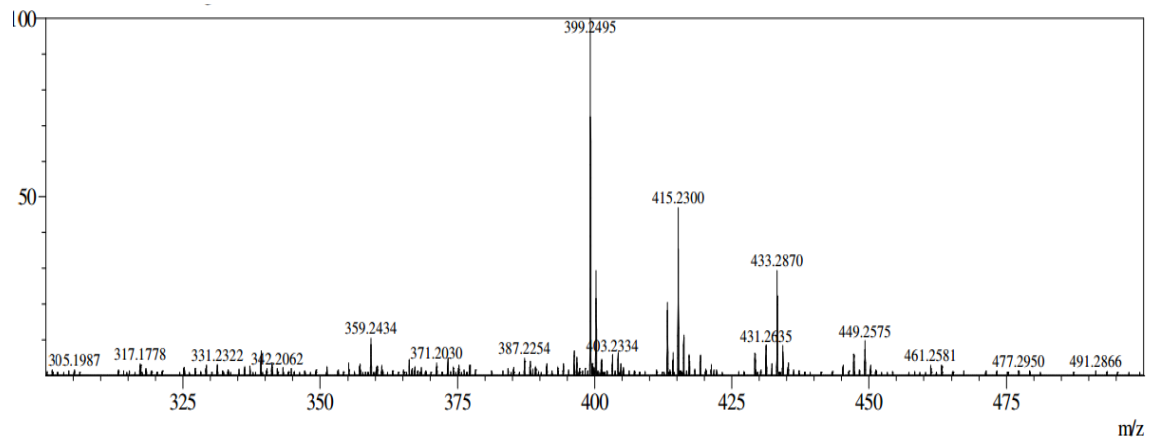
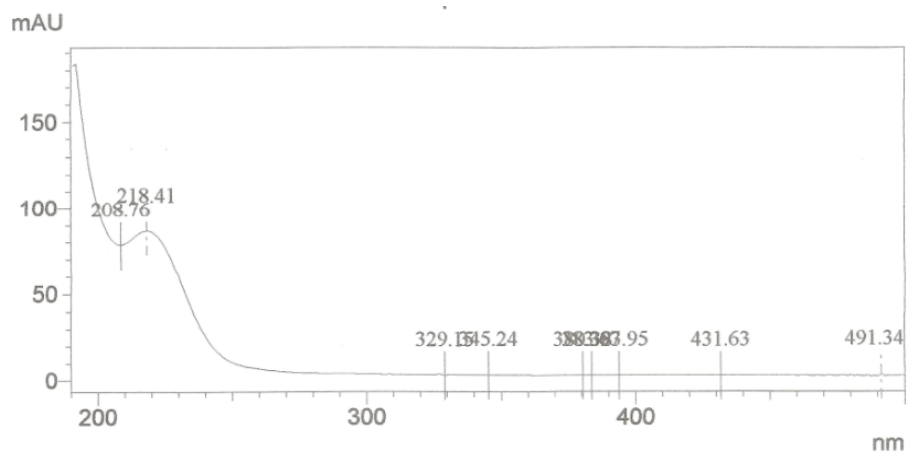
Figura 142. Espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI) de PO-11.**Figura 143.** Espectro de Ultravioleta UV (λ_{\max} (pda-190-500 nm)) para PO-11.

Figura 144. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PO-011.

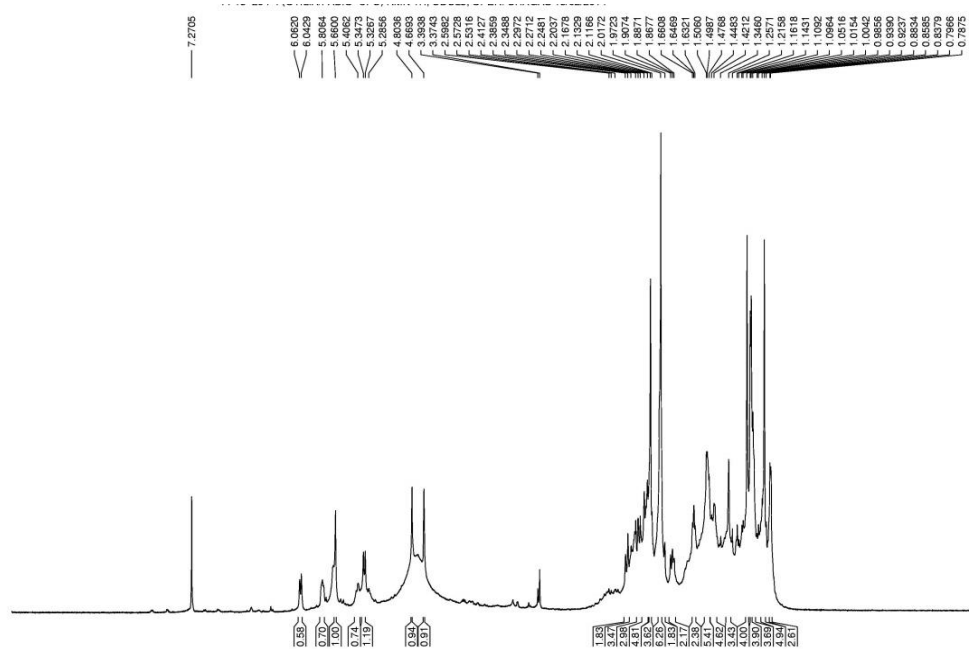


Figura 145. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PO-011.

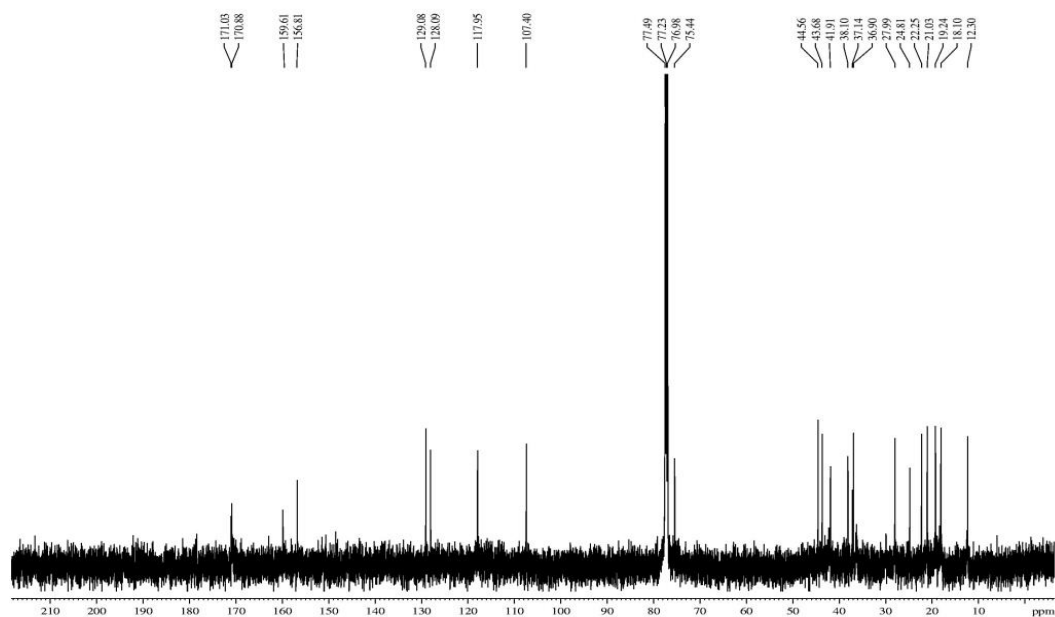


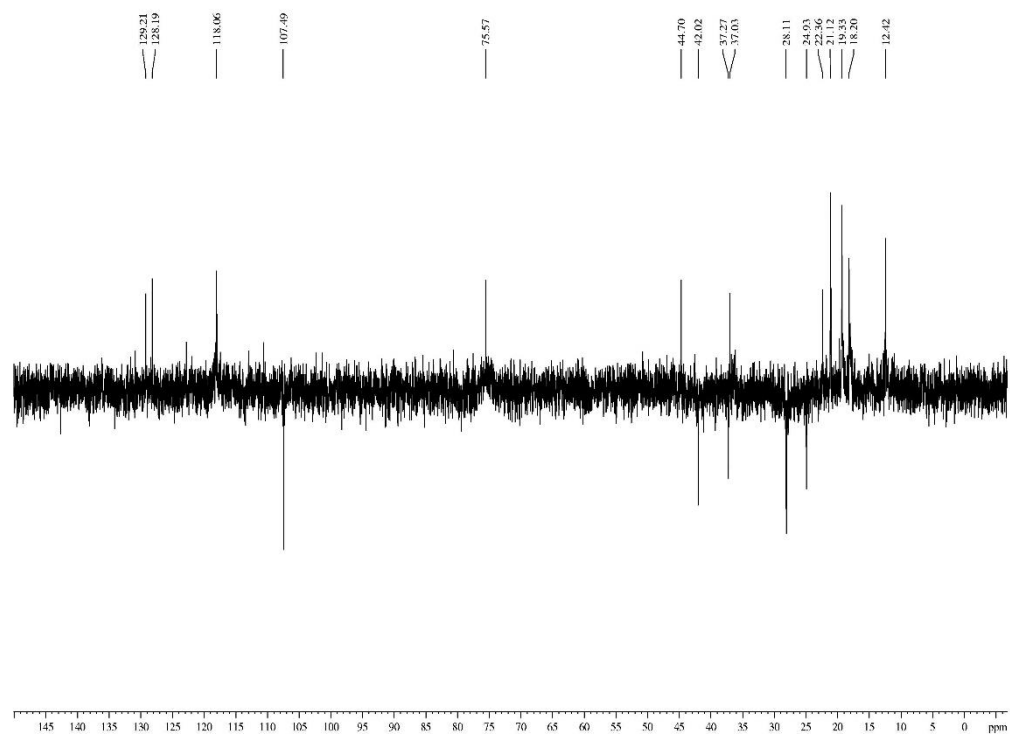
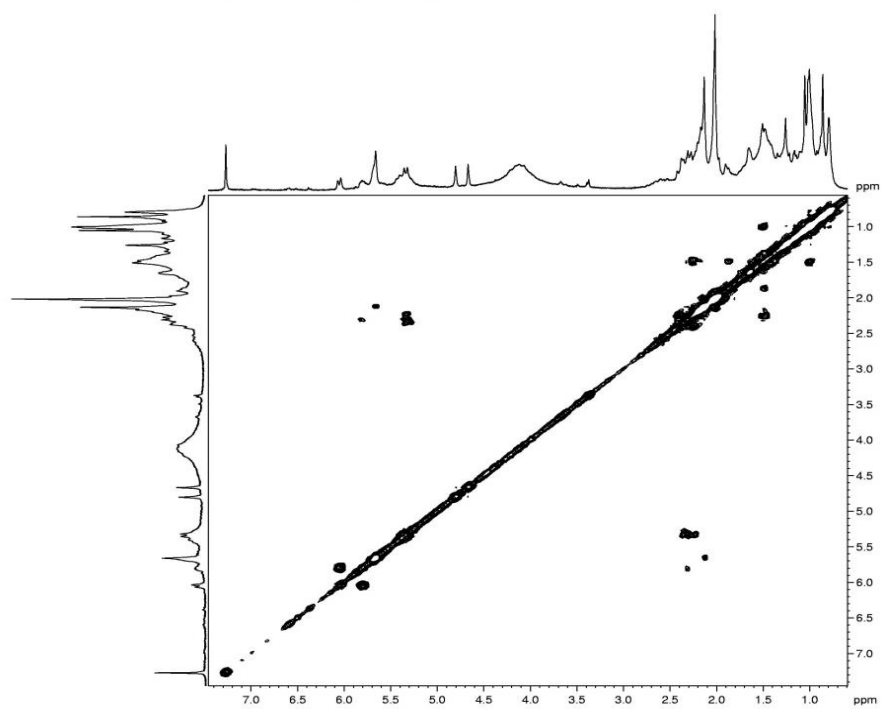
Figura 146. Espectro de RMN DEPT 135° (500 MHz, CDCl₃) de PO-11.**Figura 147.** Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H, ¹H-COSY de PO-11.

Figura 148. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de PO-11.

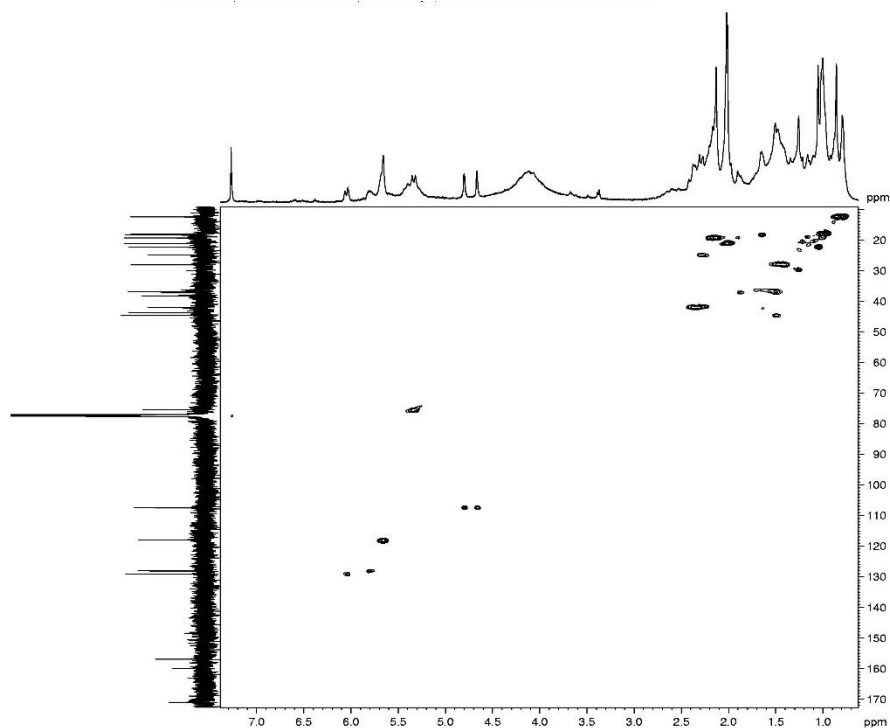


Figura 149. Espectro de correlação heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de PO-11.

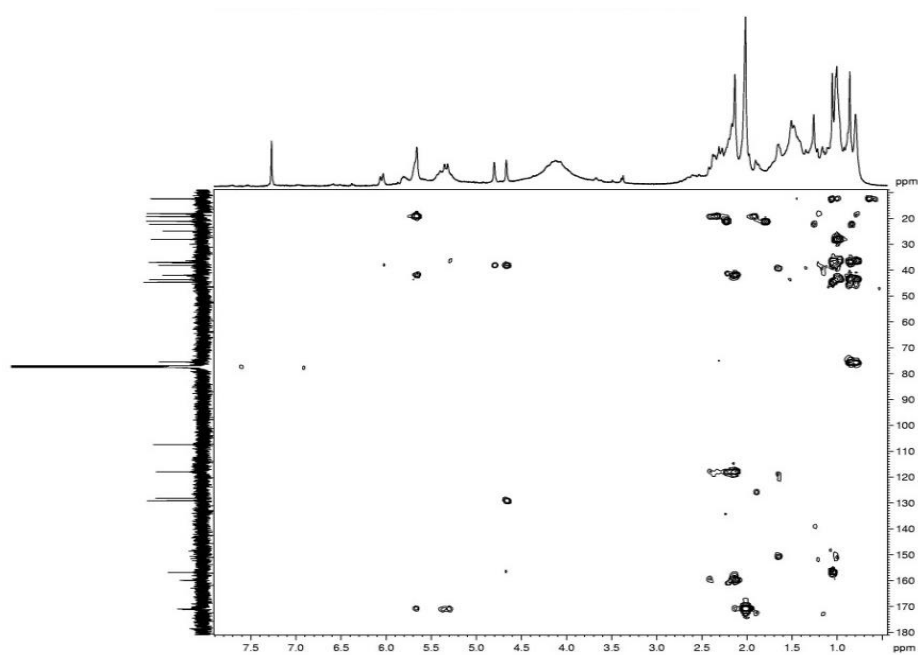
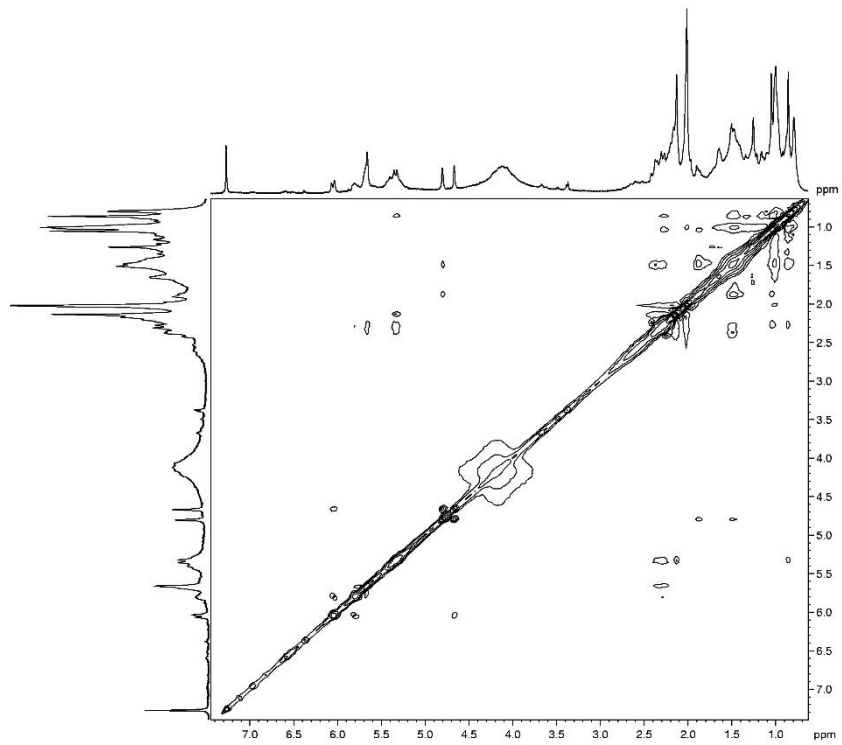


Figura 150. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de PO-11.



5 PARTES EXPERIMENTAIS

5.1 Métodos Cromatográficos

5.1.1 *Cromatografia de Adsorção*

Nas cromatografias de adsorção foi empregada gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec (\emptyset mm 0,063-0,200, cromatografia gravitacional e \emptyset mm 0,040-0,063, cromatografia *flash*). As colunas sob média pressão (cromatografia *flash*) foram realizadas empregando-se uma bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos Ltda. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (\emptyset 0,002-0,025 mm) sobre alumínio da Silicycle com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm. Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puro ou combinado em proporções crescentes de polaridade. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta no comprimento de onda (254 nm) emitido por lâmpada modelo CN-15LM da Vilber Lourmat, e/ou por aspensão com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$), seguido de aquecimento por exposição ao ar quente de soprador serigráfico Steinel HL 500.

5.1.2 *Cromatografias de Exclusão*

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão (peneira molecular) foram efetuados em gel formado pelo derivado hidroxipropil da dextrana (Sephadex LH-20) da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol como fase móvel.

5.1.3 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de dióxido (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram efetuadas em coluna semi-preparativa Phenomenex® (4,6 x 250 mm, 5 μ m), mantidas em forno termostático a 35°C. As amostras foram eluídas com água (levemente acidificada com ácido trifluoracético-TFA a 0,1 %) e Metanol.

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH -Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas em membranas de PTFE (Politetrafluoretileno) com poros de 0,45 µm. µm (Whatman).

5.2 Métodos Físicos

5.2.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamentos de micro determinação digital, MARCONI, modelo MA 381/CE composto por uma placa aquecedora N480D pertencente ao Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais - LAFIPLAM/UFC. As verificações foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min.

5.2.2 Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 em temperatura de 25 °C e concentração de 1mg/1mL de solvente.

5.3 Métodos Espectroscópicos

5.3.1 *Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)*

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Spectrum 100 – FT-IR Spectrometer da Perkin Elmer, modelo Universal ATR *Sampling Accessory*.

5.3.2 *Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)*

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro SHIMADZU, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com uma fonte de ionização por *eletrorspray*, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC), sendo os *scans* adquiridos no modo positivo e negativo.

5.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC E NOESY), foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos avante DRX-500 e DPX-300 equipados com sonda de 5 mm, instalados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará. O equipamento citado opera na frequência de 500 MHz para núcleos de hidrogênio e 125 MHz para núcleos de carbono-13 e os espectros foram obtidos a temperatura de 300K.

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol (MeOD).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencentes às moléculas residuais não deuterado, dos solventes utilizados na análise.

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

6 ESTUDO DO MATERIAL BOTÂNICO DE *Plectranthus ornatus* CODD

O material botânico de *P. ornatus* foi coletado no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceara, campus do Pici em maio de 2013. A exsicata identificada pelo Professor Dr. Raymond M. Harley já se encontrava depositada no Herbário Prisco de Menezes, também na UFC, sob o número 31929.

6.1 Isolamento dos constituintes não voláteis de *P. ornatus*

Foram coletados 20 Kg de material botânico das partes aéreas de *P. ornatus*. Este material foi seco a temperatura ambiente por 20 dias e triturado, gerando 1,5 Kg de material seco. Em seguida foram feitas sucessivas extrações a frio com hexano, seguidas de etanol para gerar os seus respectivos extratos brutos como mostrado na Tabela abaixo.

Tabela 18. Dados referentes à obtenção dos extratos de *P. ornatus*

	Sigla	Massa (g)	Rendimento (%)
Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i>	EHPO (A)	42,8	2,81
Extrato etanólico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i>	EEPO (E)	35,2	2,31

6.1.1 Fracionamentos cromatográficos de EHPO

Uma alíquota do extrato hexânico das partes aéreas de *P. ornatus* (30,0 g) foi misturada a 50,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetido a um fracionamento cromatográfico em coluna de 1,0 L em gradiente de polaridade, utilizando hexano puro, seguido da mistura binária de hexano/AcOEt (7:3; 5:5; 3:7) e AcOEt puro, resultando em 30 frações de 100 mL cada. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), pode-se obter 10 grupos de frações codificadas de A-I até A-X.

Tabela 19. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHPO.

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-2	1,0	A-I	15-18	20,6	A-VI
3	0,6	A-II	19	0,5	A-VII
4-5	3,5	A-III	20-22	2,2	A-VIII
6-8	0,4	A-IV	23-26	0,7	A-IX
9-14	0,5	A-V	27-30	0,8	A-X

6.1.2 Isolamento do constituinte químico PO-01

A fração A-VI (20,6 g) foi misturada a 60,0 g de gel de sílica, pulverizada e submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna gravitacional, sendo acondicionado sobre 130,0 g de gel CC. Utilizou-se 50,0 mL da mistura de hexano/AcOEt em gradiente de polaridade de 10% (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5) e finalizando com AcOEt puro. Desse fracionamento obteve-se 29 frações que após analisadas por CCD, resultaram em 09 grupos de subfrações.

Tabela 20. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
3	1,4	A-VI.1	17-18	0,7	A-VI.6
14-11	4,3	A-VI.2	19-23	2,7	A-VI.7
12	4,7	A-VI.3	24	0,1	A-VI.8
13	2,8	A-VI.4	25-29	0,8	A-VI.9
14-16	1,8	A-VI.5			

A fração A-VI.4 (2,8 g) foi submetida a uma coluna gravitacional com gel de sílica como adsorvente, onde foi misturada a 7,0 g de sílica e acondicionada em coluna de 250 mL sobre 26,1 g de sílica, utilizando a mistura binária de 200 mL de hexano/AcOEt (98:2; 96:4; 94:6; 92:8; 90:10) %, seguido de 100 mL da mistura equimolar desses eluentes, de onde obteve-se 130 frações de 10 mL cada. Após análise por CCD, reuniram-se estas frações em 08 grupos diferentes.

Tabela 21. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.4

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
34-43	0,006	-	62-73	0,4	-
44-45	0,002	-	74-83	0,1	-
46-51	0,2	A-VI.4.3	84-99	0,5	-
52-61	0,3	-	100-130	0,9	-

A fração A-VI.4.3 (0,2 g) foi misturada a 751,0 mg de gel de sílica, pulverizada e submetida a um fracionamento cromatográfico e eluída com mistura binária constante de hexano/AcOEt 2% de onde se obteve 66 frações de 5 mL cada. A comparação das frações com mesmo R_f permitiu reuni-las em 04 grupos distintos. A fração 19-27 apresentou-se como um óleo viscoso alaranjado de pureza satisfatória e foi codificada como **PO-01**. Sua determinação estrutural encontra-se na seção 4.1 (pag. 35).

Tabela 22. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.4.3

Frações	Peso (mg)	Código	Frações	Peso (g)	Código
15-18	50,7	-	28-41	70,1	-
19-27	50,0	PO-01	42-66	20,4	-

6.1.3 Isolamento dos constituintes químicos PO-02; PO-03 e PO-04.

A subfração A-VI.7 (2,7g; pág.138) foi submetida a um fracionamento cromatográfico tipo *Flash*, sendo misturada a 6,8 g de sílica gel e acondicionada sobre 120,0 g de sílica CC. Utilizou-se a mistura binária de Hexano/AcOEt 20%, obtendo-se 21 subfrações de 50,0 mL cada, seguido por duas subfrações de 100 mL de AcOEt e MeOH puro. A Análise dessas frações, por CCD, nos permitiu reuni-las em 06 grupos distintos.

Tabela 23. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
3-6	0,1	A-VI.7.1	18-22	0,02	A-VI.7.4
7	0,05	A-VI.7.2	23-28	0,02	A-VI.7.5
8-17	2,1	A-VI.7.3	29	0,1	A-VI.7.6

A subfração A-VI.7.3 (2,1g) foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico citado anteriormente, resultando em 104 subfrações de 10,0 mL cada. A comparação por CCD dessas amostras nos permitiu organiza-las em 07 novos grupos de subfrações.

Tabela 24. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7.3

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-14	0,02	A-VI.7.5.1	35-53	0,6	A-VI.7.5.4
15-21	0,03	A-VI.7.5.2	54-91	0,1	A-VI.7.5.5
22-34	1,0	A-VI.7.5.3	92-104	0,06	A-VI.7.5.6

A subfração A-VI.7.5.3 (1,0 g) foi dissolvida em 3,0 mL de MeOH, cromatografada em gel de Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluente. Esse procedimento cromatográfico resultou em 26 frações de 5,0 mL cada, sendo reunidas em 04 grupos de subfrações, após a comparação de seus R_fs por CCD.

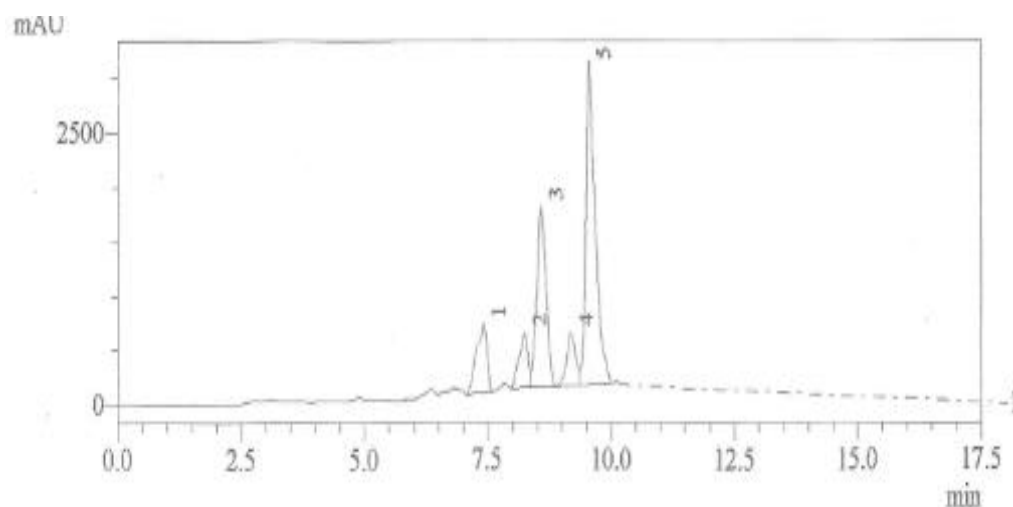
Tabela 25. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VI.7.5.3

Frações	Peso (mg)	Código	Frações	Peso (mg)	Código
1-11	40,4	-	14-22	256,6	A-VI.7.5.3-2
12-13	84,0	-	23-26	100,0	-

A fração A-VI.7.5.3 (256,6 mg) foi cromatografada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna semi-preparativa C-18 de fase reversa (Gemini-

Phenomenex) 250 x 10 mm (5 μ m). Eluída em gradiente de H₂O (TFA 0,1 %)/MeOH de 70-100% em um tempo de corrida de 15 minutos com acréscimo de 10 min em MeOH puro. O fluxo utilizado foi de 4,72 mL/min e volume de injeção de 200 μ L. Os picos coletados foram denominados **PO-02** (Pico 1; Rt: 7,41); **PO-03** (Pico 2; Rt: 8,24) e **PO-04** (Pico 4; Rt: 8,57). A elucidação estrutural desses compostos encontra-se disponíveis nas seções 4.2 (pág. 48), 4.3 (pág. 58) e 4.4 (pág. 68).

Figura 151. Cromatograma de isolamento de **PO-02**, **PO-03** e **PO-04**



6.1.4 Isolamento dos constituintes químicos *PO-05* e *PO-06*

A fração A-VIII (2,2 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna gravitacional, sendo misturada a 9,0 g de gel de sílica e acondicionada sobre 50,0 g de sílica em coluna de 50 mL e eluída em 100,0 mL de hexano puro, seguido da mistura binária de hexano/AcOEt (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5) e AcOEt puro, obtendo-se 43 frações de aproximadamente 50 mL cada. Após a análise por CCD, reuniram-se os grupos de frações semelhantes, resultando em 09 grupos de subfrações.

Tabela 26. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-7	0,009	-	21-24	0,4	A-VIII.6
8-9	0,03	-	25-32	0,3	-
10-15	0,04	-	33-39	0,5	A-VIII.8
16-17	0,04	-	40-43	0,2	-
18-20	0,2	-			

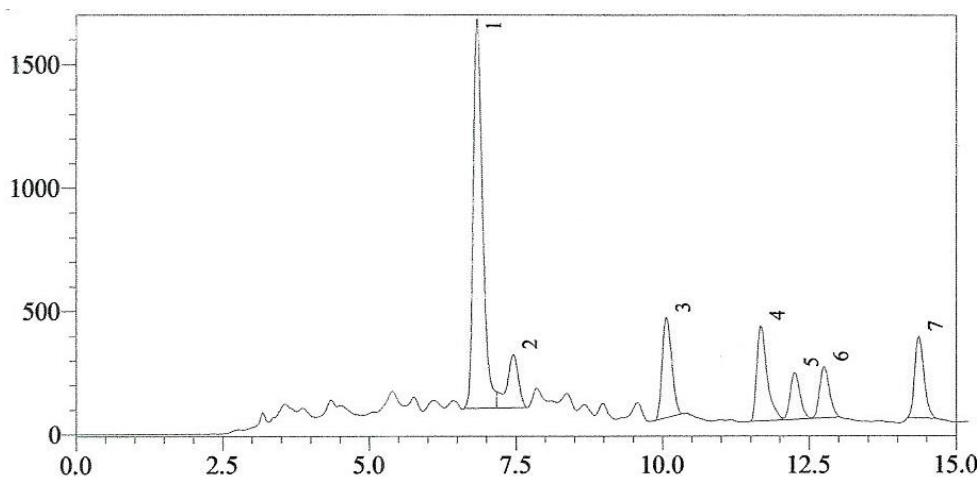
A fração A-VIII.6 (0,4 g) foi misturada à 1,1 g de gel de sílica, pulverizada em gel de porcelana e submetida a um fracionamento cromatográfico sobre 15,9 g de sílica em coluna de 100 mL, utilizando como eluentes a mistura binária de Hexano/AcOEt (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5) e AcOEt puro em gradiente de polaridade, obtendo 91 frações de 10 mL cada. As frações resultantes foram reunidas de acordo com a semelhança de seus Rfs, gerando os grupos de frações mostrados na tabela abaixo.

Tabela 27. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.6

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-10	0,002	-	42-54	0,2	A-VIII.6.5
11-19	0,001	-	55-63	0,1	-
20-30	0,001	-	64-91	0,05	-
31-41	0,04	-			-

A fração A-VIII.6.5 (0,2 g) foi submetido a cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE), em coluna semi-preparativa C-18 de fase reversa (Gemini-Phenomenex) 250 x 10 mm (5 μ m) e eluída em gradiente de H₂O (TFA 0,1 %)/MeOH de 80-100% em um tempo de corrida de 20 minutos, com fluxo de 4,72 mL/min e volume de injeção de 200 μ L. Os picos coletados foram denominados **PO-05** e **PO-06**, correspondentes aos tempos de retenção do pico 1 (R_T: 6,8 min) e pico 4 (R_T: 11,6 min) respectivamente (Figura 152, pág. 141). Estes compostos foram identificados como diterpenos e suas determinações estruturais encontram-se disponíveis nas seções 4.5 (pág. 77) e 4.6 (pág. 84).

Figura 152. Cromatograma de isolamento de **PO-05** e **PO-06**



6.1.5 Isolamento dos constituintes químicos PO-07 e PO-08

A fração A-VIII.8 (0,5 g; pág. 138), foi misturada a 1,7 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana, seguido de um fracionamento cromatográfico sobre 22,6 g de sílica em coluna de 250 mL e eluída com a mistura binária dos solventes hexano/AcOEt (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5) em gradiente de polaridade. Este fracionamento gerou 120 frações de 10 mL cada, que após análise por CCD, resultou nos grupos descritos na tabela abaixo.

Tabela 28. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.8.

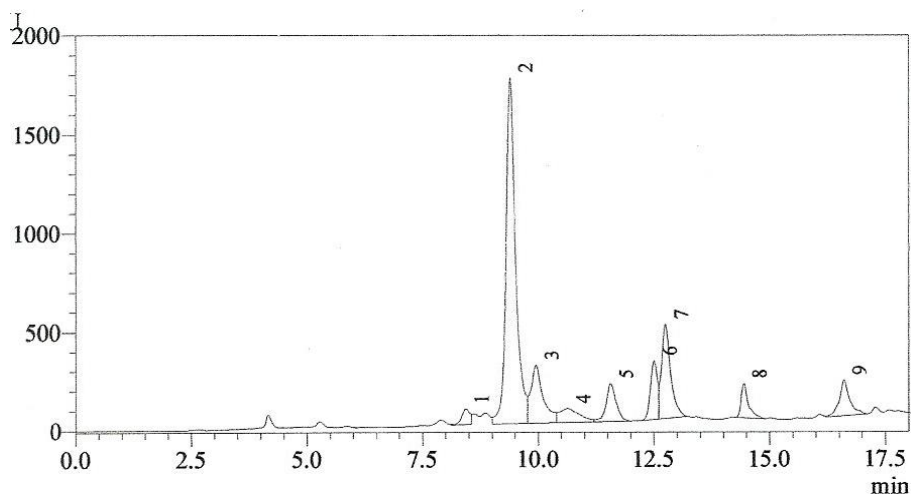
Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-29	0,003	-	46-50	0,005	
30-35	0,002	-	51-104	0,3	A-VIII.8.5
36-45	0,004	-	105-120	0,07	-

A fração A-VIII.8.5 (0,3 g) foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico descrito anteriormente, gerando 121 frações de 10 mL cada. A análise por CCD permitiu reunir estas frações em 05 grupos de subfrações.

Tabela 29. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-VIII.8.5

Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
1-30	0,005	-	64-81	0,1	
31-45	0,003	-	82-120	0,16	A-VIII.8.5.5
46-63	0,08	-			

A fração A-VIII.8.5.5 (0,16 g) foi analisada por cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE), em coluna semi-preparativa C-18 de fase reversa (Gemini-Phenomenex) 250 x 10 mm (5µm) e eluída em gradiente de H₂O (TFA 0,1 %)/MeOH de 65-100% em um tempo de corrida de 20 minutos, com fluxo de 4,72 mL/min e volume de injeção de 200 µL. Os picos coletados foram o pico 2 (R_t=9,4 min) e pico 5 (R_t=14,4 min) e analisados em CCD, sendo codificados como **PO-07** e **PO-08**. Estes compostos foram caracterizados como diterpenos e suas determinações estruturais encontram-se presentes nas seções 4.7 (pág. 94) e 4.8 (pág. 105).

Figura 153. Cromatograma de isolamento de **PO-07 e PO-08**

6.1.6 Isolamento do constituinte químico PO-09, PO-10 e PO-11

A fração A-X (0,8 g) foi solubilizada em 3,0 mL de MeOH e acondicionado em coluna de vidro de 3 cm de diâmetro contendo Sephadex LH-20 e eluída em MeOH. Foram coletadas 57 frações de aproximadamente 5,0 mL, reunidas através de comparação por CCD de seus Rfs, onde se obteve três grupos de frações.

Tabela 30. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração A-X

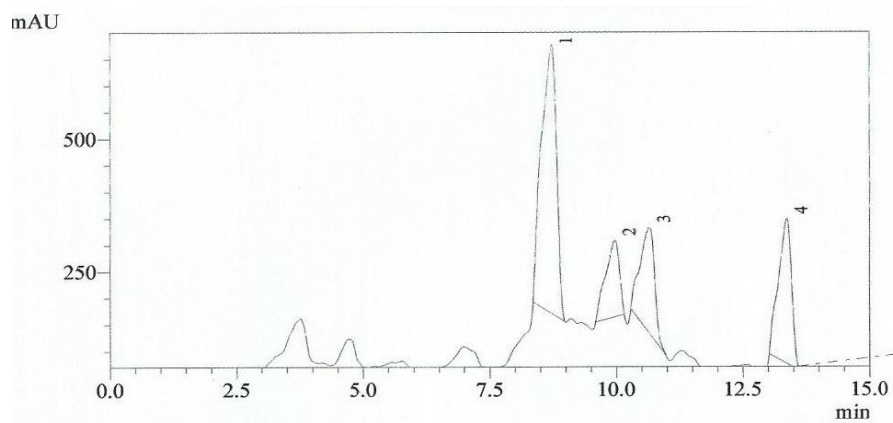
Frações	Peso (g)	Código	Frações	Peso (g)	Código
2-32	0,2	-	48-57	0,01	-
33-47	0,35	A-X.2			

A fração A-X.2 (0,35 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH-20 sob as mesmas condições descritas anteriormente, obtendo-se 20 frações de 5,0 mL cada. Por comparação em CCD, obtiveram-se 2 grupos de subfrações; A-X.2.1 (0,06 g) e A-X.2.2 (0,27 g).

A fração A-X.2.2 (0,27 g) foi analisada por cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE), em coluna semi-preparativa C-18 de fase reversa (Gemini-Phenomenex) 250 x 10 mm (5 μ m) e eluída em gradiente de H₂O (TFA 0,1 %)/MeOH de 70-90% em um tempo de corrida de 15 minutos, com fluxo de 4,72 mL/min e volume de injeção de 200 μ L. Os picos coletados tiveram os seguintes tempos de retenção: Pico 1 (Rt=8,1 min); Pico 2 (Rt=9,0 min); Pico 3 (Rt=9,5 min) e Pico 4 (Rt=11,5 min) (Fig. 154, pág. 144). Estes compostos foram caracterizados

por RMN ^1H , ^{13}C , IV e EMAR como sendo diterpenos e codificados como **PO-09**, **PO-02**, **PO-10** e **PO-11**. A determinação estrutural desses compostos encontra-se disponível nas seções 4.9 (pág. 117), 4.10 (pág. 124) e 4.11 (pág. 130).

Figura 154. Cromatograma de isolamento das moléculas **PO-09**, **PO-02**, **PO-10** e **PO-11**.



6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

A citotoxicidade dos compostos PO-1 a PO-11, foram avaliados através do método do MTT (MOSMANN, 1983) utilizando as seguintes linhagens: HCT-116, OVCAR-8, HL-60 e SF-295.

O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) - 2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor azul. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

As células foram plaqueadas numa densidade variando de $1,5 \times 10^4$ a $4,0 \times 10^4$ células/mL em placas de 96 poços. Os compostos foram incubados juntamente com as células durante 72 horas, em concentrações variando de 0,08 a 10 μ M, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95 % de umidade.

Após 69 h de incubação o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 200 μ L da solução de MTT (2 mg/ml, em meio RPMI 1640) em cada poço e novamente incubada por mais 3 horas até completar o período de 72 h de incubação. Após esse período o sobrenadante foi novamente descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan e este foi então ressuspensionado em 200 μ L de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal de MTT reduzido, as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570nm.

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

A análise dos resultados para a citotoxicidade dos compostos intitulados de PO-01 até PO-11 foi avaliada através do método MTT, contudo nenhum dos compostos apresentou atividade frente às linhagens de células cancerígenas utilizadas neste experimento.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho intitulado CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE *Plectranthus ornatus* Codd, uma planta muito utilizada na medicina popular, pertencente ao projeto farmácia viva e tendo seu uso autorizado pela Agência de vigilância sanitária (ANVISA) para o alívio de doenças no trato digestivo. Por isso, a compreensão da composição química e farmacológica dessa espécie torna-se extremamente importante, justificando o interesse por esta pesquisa.

Neste trabalho foi realizada a prospecção química do extrato hexânico das partes aéreas de *P. ornatus*, culminando no isolamento de onze (11) constituintes químicos, dos quais seis (06) são relatados pela primeira vez na literatura: 11*R*-acetoxineocleroda-3,13*E*-dien-15-oato de metila, ácido 11*R*-acetoxi-3,4-dihidroxineocleroda-13*E*-en-15-óico, ácido 11*R*-acetoxisolidagonal, ácido 11*S*-acetoxi-solidago-3,15-dióico, *pseudo*-coleon R e ácido 11*R*-acetoxineocleroda-2,4(18), 13*E*-trien-15-óico e caracterizados como diterpenos pertencente às classes: clerodano, labdano e abietano. Entre estes compostos destacam-se PO-03 e PO-04, dois diterpenos pertencente à classe dos clerodanos que apresentam um rearranjo no anel A de seis membros para cinco. Através de pesquisas realizadas em vários bancos de dados disponíveis, constatou-se que este tipo de estrutura ainda não havia sido obtido em plantas do gênero *Plectranthus* e muito menos na família *Lamiaceae*, revelando o grande potencial de *P. ornatus* como uma planta produtora de metabólitos secundários com estruturas diversificadas e com atividades farmacológicas ainda não relatadas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H. A.; BATTERJEE, S. M. Chemistry of the genus *Plectranthus*. **Molecules**, v. 7, p. 271-301, 2002.

ALBUQUERQUE, R. L. **CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO GÊNERO PLECTRANTHUS: *P. amboinicus*; *P. barbatus*; *P. grandis* e *P. ornatus***. Fortaleza, 2004. Dissertação (Doutorado em Química). Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2004.

ALBUQUERQUE, R. L.; KENTOPFF, M. R.; MACHADO, M. I. L.; SILVA, M. G.; MATOS, F. J. A.; MORAES, S.; BRAZ-FILHO, R. Abietane diterpenoids isolated from *Plectranthus Barbatus* Andrews. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1882-1886, 2007.

ARIHARA, S.; RUEDI, P.; EUGSTER, C. H. New spirocyclopropyl cyclohexenedione diterpene type compounds. Coleons M, N, P, Q, and R and barbatusin from *Plectranthus caninus* and coleon O from *Coleus somaliensis*. **Helv. Chim. Acta**, v. 58, p. 343-56, 1975.

_____. Diterpenoid leaf-gland pigments: coleons S and T from *Plectranthus caninus* Roth (*Labiatae*), a new diosphenoltrans-A/B-6,7-diketone pair of the abietane series. **Helv. Chim. Acta**, v. 60, p. 1443-1447, 1977.

BOHLMANN, F.; SINGH, P.; SINGH, R. K.; JOSHI, K. C.; JAKUPOVIC, C. A. diterpene with a new carbon skeleton from *Solidago altissima*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, 1114-1115, 1985.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; DA SILVA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, Chemical modifications and structural analysis- A review. **Carbohydr. Polym.** v. 77, p. 167-180, 2009.

CHEN, Y. S.; YU, H. M.; SHIE, J. J.; et al. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. **Bioorg. Med. Chem.** v, 22, p. 1766-1772, 2014.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quím. Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

DEVRIESE, E. G.; BUFFEL, K.; GEUNS, J. M. C. Stimulation of adventitious root formation on mung bean cuttings by colenon O. **Phytochemistry**, v. 27, p. 793-294, 1988.

DEWICK, M. P. **Medicinal Natural Products – A biosynthetic Approach**. 2 ed. Nottingham, UK: John Wiley & Sons LTD, 2002.

_____. **Medicinal Natural Products – A biosynthetic Approach**. 3 ed. Nottingham, UK: John Wiley & Sons LTD, 2009.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; RODRIGUEZ, B. A Trihoabietane diterpenoids from *Plectranthus grandidentatus* and unusual addition to Acetone to the ortho-quinone sistem of Criptotanshinone. **J. Nat Prod.** v. 68, n.9, p. 1408-1411, 2005.

_____. Labdane and kaurane diterpenoids from *Plectranthus fruticosus*. **J. Nat. Prod.** v. 66, p. 491-496, 2003.

_____. Further Labdane and Kaurane diterpenoids and other constituents from *Plectranthus fruticosus*. **J. Nat. Prod.** v. 67, p. 614-621, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ESTIMATIVAS PARA 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2014.

KEBEDE, W.; BISLAT, D.; ASRES, K. Free radical scavenging activity-guided isolation of a diterpenoid from *Plectrathus punuctatus*. **Nat. Prod. Commum.** v. 6, p. 1229-1232, 2011.

KIDO, H.; LI, S. Terpenoid from *Coleus barbatus* extract as antibacterial agent effective against Gram-positive bacteria and disinfecting method.

KIURU, P.; D'AURIA, M. V.; MULLER, C. D.; TAMMELA, P.; VOURELA, H.; YLI-KAUHALUOMA. Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. **Planta Med.** v. 8, p. 1234-1246, 2014.

LOPES, L.; M; BOLZANI, V.; S. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. **Phytochemistry**, v. 27, n.7, p. 2265-2268, 1988.

MACIAS, F.; A.; LACRET, R.; VARELA, R.; M.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J.; M.; G. Isolations and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **J. Chem. Ecol.** v. 36, p. 396-404, 2010.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais - Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil** - 2 ed. Fortaleza: Ed. da UFC, 2000.

MAURO, C.; SILVA, C. P.; MISSIMA, J.; OHNUKI, T.; RINALDI, R. B.; FROTA, M. Comparative anatomical study of the vegetative organs of boldo miúdo, *Plectanthus ornatus* Codd. And malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.- Lamiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 18, p. 608-613, 2008.

OLIVEIRA, P.M; FERREIRA, A. A; SILVEIRA, D.; et al. Diterpenoids from the Aerial Parts of *Plectranthus ornatus*. **J. Nat. Prod.** v. 68, p. 588-591, 2005.

PACHECO, A. G.; OLIVEIRA, P. M.; ALCANTARA, A. F. C.; et al. ^{13}C NRM Data of Diterpenes isolated from *Aristolchia* Species. **Molecules**, v. 14, p. 1245-1262, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, R. C. A; SANTOS, O.G. **Plantas Condimentares: Cultivo e Utilização**. Documentos Embrapa Agroindústria Tropical, v. 161, p. 58-70, 2013.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RATSAMI, L.; SOMDEJ, K.; KWANJAI, K. Bioactive diterpenes from aerial parts of *Anisochilus harmandii*. **Planta Med.** v. n. 76, p. 726-728, 2010.

RICE, L. J.; BRITS, G. J.; STADEN, J. V. *Plectranthus*: A plant for the future? **S. Afr. J. Bot.** v. 77, p. 947-959, 2011.

RIJO, P.; GASPAR-MARQUES, C.; SIMOES, M. F.; et al. Neoclerodane and Labdane Diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. **J. Nat. Prod.** v. 65, p. 1387-1390, 2002.

_____. Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. **Magn. Reson. Chem.** v. 43, p. 595-598, 2005.

_____. Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 35, p. 215-221, 2007.

_____. Antimicrobial Properties of *Plectranthus ornatus* Extracts, 11-acetoxy- halima-5,13-dien-15-oic Acid Metabolite and its Derivatives. **The Nat. Prod. J.** v. 1, p. 57-64, 2011.

ROYAL BOTANIC GARDEN – KEW. Disponível em: < www.kew.org/science-conservation/research-data/.../lamiaceae >. Acesso em: 10 de Novembro de 2014.

SCHULZ, K. F.; GRIMES, D.A. **An overview of clinical research: the lay of the land**. *Lancet*, v. 359, p. 57-6, 2002.

SHAN, Y.; XU, L.; LU, Y.; WANG, X.; ZHENG, Q.; KONG, L.; NIWA, M. Two minor diterpenes glycosides and an eusdeman sesquiterpene from *Coleus forskohlii*. **Chen. Phram. Bull.** v. 55, p. 376-381, 2007.

_____. Diterpenenes from *Coleus forskohlii* (WILLD) BRIQQ (Labiatae). **Chen. Phram. Bull.** v. 56, p. 52-56, 2008.

SHEN, Y. H.; XU, Y. L. Two new diterpenoids from *Coleus forskohlii*. **J. Asian Nat. Prod.** v. 7, n. 6. p. 811-815, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Organizadores) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SIMOES, M. F.; RIJO, P.; DUARTE, A.; BARBOSA, D.; MATIAS, D.; RODRIGUEZ, B. Two new diterpenoids from *Plectranthus* species. **Phytochem. Lett.** v. 3, n. 4, p. 221-225, 2010.

STAVRI, M.; PATON, A.; SKELTON, B. W.; GIBBON, S. Antibacterial diterpenes from *Plectranthus ernstii*. **J. Nat. Prod.** v. 72, n. 9, p. 1191-1194, 2009.

SYAMASUNDAR, K. V. VINODH, G.; SIRINIVAS, K. V. N. S.; SRINIVASULU, B. A new abietane diterpenoids from *Plectranthus bishopianus* Benth. **Helv. Chim. Acta**, v. 95, n.4, p. 643-646, 2012.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, V. S: Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WIJETHNE, E. M. K.; SILVA, L. B.; TEZUKA, Y.; et al. Clerodane Diterpenoids from *Ciathocalix Zeylanica*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 443-445, 1995.

XU, L. L.; KONG, L. Y. Isolation and identification of labdane diterpenoids from roots of *Coleus forskohlii*. **Zhongguo Tianran Yaowu**. v. 2, n. 6, p. 344-347, 2004.

Yu, J.; Wu, P. Crystallization process of poly(ϵ -caprolactone)–poly (ethylene oxide)–poly(ϵ -caprolactone) investigated by infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **Polymer**. v. 48, p. 3477–3485, 2007.