



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

**TAYNARA SIMÃO MATOS**

**INVESTIGAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO CHÁ DE**  
*Plectranthus ornatus* Codd

**FORTALEZA**

**2019**

TAYNARA SIMÃO MATOS

INVESTIGAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO CHÁ 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.

Orientador (a): Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

FORTALEZA

2019

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)

---

- M382i Matos, Taynara Simão.  
Investigação dos constituintes químicos do chá de *Plectranthus ornatus* Codd / Taynara Simão Matos. –  
2019.  
164 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação  
em Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa.
1. *Plectranthus ornatus*. 2. Diterpenos. 3. Flavonoides. 4. Inibição enzimática. 5. Viabilidade celular. I.  
Título.

CDD 540

---

TAYNARA SIMÃO MATOS

INVESTIGAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO CHÁ 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: 26/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus.

À minha mãe, Lourdes.

Ao meu pai, Antonio (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, Thamyres, Thalyta, Tallys.

Ao meu sobrinho, Bryan.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sempre estar ao meu lado me guiando, dando novas possibilidades e mostrando que Nele tudo posso.

À Lourdes Francisca Simão, minha mãe, que sempre me incentivou, apoiou e foi minha fonte de paz. Ao Antonio Ferreira Matos, meu pai, que mesmo não estando mais neste plano, sinto que está comigo, sendo minha fortaleza. Aos meus irmãos Thamyres, Thalyta e Tallys, assim como ao meu sobrinho Bryan, por serem fontes de alegria e distração nos momentos de estresse.

Ao Apartamento 102, Natanael Xavier, Lucas Fonseca e Zeila Xavier, pelos filmes nos domingos, pelas conversas aleatórias, por em tão pouco tempo sermos família.

Aos meus colegas e amigos da Química-UFC, principalmente aos membros da família LAFIPLAM, pelos cafés, conversas, idas ao “RU”, saídas, cantorias e risadas. Herbert Magalhães, Luís Alves, Luana Brito, Kesya Dantas, Kaline Rodrigues, Rodrigo Ferreira, Neilyane Fernandes, Alison Batista, Fábio Ávila, Hozana Patrícia, Francisco Pinto, João Sousa, Joana Lima, Karine Oliveira, Amanda Lemos, Nayara Coriolano, Pedro Jatai, Sabrina Matias e Alejandro Silva meu muito obrigada pela convivência sempre alegre e divertida. E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer imensamente à Professora Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, por ser “minha mãe científica”, por ter me aceitado como orientanda desde a graduação, pelas lições de vida e pelo conhecimento transmitido com dedicação, atenção e descontração, contribuindo assim com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos externos a Química-UFC, Agda Facundo, Manuel Alves, Ezequiel Marinho, Renata Cardoso, Édina Schons e Jeremias Serafim pelos momentos de descontração, mesmo que à distância.

Ao Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira, coordenador do CENAUREMN e do LAFIPLAM I pelas sugestões e críticas contribuindo assim, com o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelos ensinamentos transmitidos, especialmente ao Prof. Dr. Jackson Rodrigues pelos encontros e desencontros nos corredores.

Às Profas. Maria Teresa Salles Trevisan (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica - UFC), Flávia Almeida Santos (Departamento de Farmacologia – UFC) e seus alunos pela realização dos testes farmacológicos.

Aos funcionários, Lana, Célia e Sr. Gil pelos serviços prestados.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo suporte financeiro e bolsas concedidas. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram de maneira direta, ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

“All the lights will guide the way.” – Canção  
de Alok, Zeeba e Bruno Martini



## RESUMO

*Plectranthus ornatus* Codd (Lamiaceae), popularmente conhecida como boldo-gambá ou boldinho, é uma planta medicinal utilizada na forma de chá das folhas ou parte aérea para o tratamento de problemas gastrointestinais. Apesar de sua importância na medicina popular, são poucos os trabalhos em química e farmacologia relatados sobre a espécie. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar a composição química da fração metanólica obtida a partir do decocto da parte aérea de *P. ornatus*, cultivada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará – UFC. Sucessivos fracionamentos cromatográficos, incluindo Sephadex LH-20, cartucho C18 e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), resultou no isolamento de treze constituintes químicos, entre os quais dois novos diterpenos (ácido 19- $\beta$ -D-glicopiranosil-labda-7,13-dieno-15,16-diólico e 16-desacetil-coleon L) e dois flavonoides glicosilados (3'- $\beta$ -D-glicopiranosil-5,4'-diidróxi-7-metóxi-flavona e 4'- $\beta$ -D-glicopiranosil-5,3'-diidróxi-7-metóxi-flavona). Vale ressaltar que já há relato do flavonoide 4'- $\beta$ -D-glicopiranosil-5-hidróxi-7-metóxi-flavona na literatura, entretanto os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto estão sendo apresentados pela primeira vez. Adicionalmente, foi realizado uma comparação qualitativa dos compostos isolados da fração metanólica do decocto de *P. ornatus* nas frações obtidas dos decoctos da parte aérea de espécimes de três outras espécies de *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. amboinicus* e *P. grandis*) comuns no Estado do Ceará, também cultivadas no Horto de Plantas Medicinais. O ácido rosmarínico foi o componente majoritário em todos os decoctos. Importante frisar a presença de compostos altamente hidroxilados e glicosilados. A determinação estrutural de todos os compostos foi realizada através da interpretação de espectros obtidos de métodos espectrométricos como EMAR, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura. Adicionalmente, uma proposta de rota biosintética para os diterpenos isolados do chá de *P. ornatus* foi sucedida. Além disso, os chás das espécies em estudo foram submetidos a teste de inibição enzimática da  $\alpha$ -glicosidase e de viabilidade celular com células de adenocarcinoma gástrico humana. Nenhum dos chás estudados apresentou inibição da  $\alpha$ -glicosidase. Interessantemente, todos os chás apresentaram ação proliferativa celular, podendo ser um indicativo para o uso popular medicinal. Entretanto, mais testes precisam ser realizados a fim de comprovar esse efeito profilático frente as células gástricas humanas.

**Palavras-chave:** *Plectranthus ornatus*. Diterpenos. Flavonoides. Inibição enzimática. Viabilidade celular.

## ABSTRACT

*Plectranthus ornatus* Codd (Lamiaceae), popularly known as “boldo-gambá” and “boldinho”, is a medicinal plant whose leaf or aerial part decoction is used to treat gastrointestinal problems. Despite of its importance in the popular medicinal, there are few chemical and pharmacological reports on the species. Thus, the aim of this study was to investigate the chemical composition of the MeOH soluble fraction from the decoction of the aerial part of *P. ornatus*, cultivated at the Medicinal Plants Garden Francisco José de Abreu Matos at the Universidade Federal do Ceará – UFC. Successive chromatography procedures, including Sephadex LH-20, C18 cartridge, and HPLC resulted in the isolation of thirteen chemical constituents including two new diterpene derivatives (19- $\beta$ -D-glucopyranosyl-labda-7,13-diene-15,16-dioic acid and 16-desacetyl-coleon L) and two new flavonoids (3'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5,4'-dihydroxy-7-methoxy-flavone acid and 4'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5,3'-dihydroxy-7-methoxy-flavone acid). It is noteworthy that the flavonoid 4'- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5-hydroxy-7-methoxy-flavone is already reported in the literature, however the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of this compound are being presented for the first time. Additionally, a qualitative comparison of the main isolated compounds from the methanol soluble fraction of *P. ornatus* with the MeOH fractions from the aerial part decoctions of specimens of three other *Plectranthus* species (*P. barbatus*, *P. amboinicus*, and *P. grandis*) common in Ceará State was performed. Rosmarinic acid was the main compound in all decoctions. It is worth mentioning the presence of highly hydroxylated and glycosylated compounds. The structural determination of all compounds was performed by interpretation of HRMS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, and comparison with the literature data. In addition, the biosynthetic route for the isolated diterpenes was suggested. Moreover, the decoctions of the investigated species were assayed for  $\alpha$ -glucosidase enzymatic inhibition, and cell viability on human gastric adenocarcinoma cells. None of the studied decoctions showed inhibition of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme. Interestingly, all decoctions showed cell proliferative action and may be indicative for medicinal popular use. However, further tests need to be performed to prove this prophylactic effect against human gastric cells.

**Keywords:** *Plectranthus ornatus*. Diterpenes. Flavonoids. Enzymatic inhibition. Cell viability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esqueletos representativos de diterpenos isolados do gênero <i>Plectranthus</i> . . . . .	28
Figura 2	– Fotografia digital de um espécime de <i>Plectranthus ornatus</i> Codd em estágio de floração . . . . .	32
Figura 3	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-2 . . . . .	50
Figura 4	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-4 e DPO-5 . . . . .	51
Figura 5	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-6 e DPO-7 . . . . .	51
Figura 6	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-8 e DPO-9 . . . . .	52
Figura 7	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-10 . . . . .	53
Figura 8	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-11 . . . . .	53
Figura 9	– Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-12 e DPO-13 . . . . .	54
Figura 10	– Representação estrutural da Acarbose . . . . .	56
Figura 11	– Esquema de conversão de MTT em Formazan . . . . .	57
Figura 12	– Estruturas de ressonância de hidrogênio $\beta$ à uma carbonila $\alpha,\beta$ -insaturada.. . . .	60
Figura 13	– Representação estrutural do composto DPO-1 . . . . .	60
Figura 14	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, MeOD) de DPO-1 . . . . .	62
Figura 15	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, MeOD) de DPO-1 . . . . .	62
Figura 16	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (300 MHz, MeOD) de DPO-1 . . . . .	63

Figura 17	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ APT (75 MHz, MeOD) de DPO-1 .....	63
Figura 18	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-1 .....	64
Figura 19	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-1 .....	64
Figura 20	– Proposta de interconversão intramolecular de DPO-2 .....	66
Figura 21	– Proposta de fragmentação de DPO-2 .....	67
Figura 22	– Representação estrutural do composto DPO-2 .....	67
Figura 23	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2 .....	69
Figura 24	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2 .....	69
Figura 25	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2 .....	70
Figura 26	– Espectro de massas de DPO-2 .....	70
Figura 27	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2 .....	71
Figura 28	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, MeOD) de DPO-2 .....	71
Figura 29	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-2 .....	72
Figura 30	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-2 .....	72
Figura 31	– Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ – HMBC e COSY de DPO-3 .....	73
Figura 32	– Proposta de fragmentação de DPO-3 .....	75
Figura 33	– Representação estrutural do composto DPO-3 .....	76
Figura 34	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	77
Figura 35	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	77
Figura 36	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ JMOD (75 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	78

Figura 37	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (300 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	78
Figura 38	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	79
Figura 39	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-3 .....	79
Figura 40	– Espectro de massas de DPO-3 .....	80
Figura 41	– Correlações observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ – HMBC e COSY de DPO-4 .....	81
Figura 42	– Proposta de fragmentação de DPO-4 .....	82
Figura 43	– Representação estrutural do composto DPO-4 .....	82
Figura 44	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	84
Figura 45	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	84
Figura 46	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (125 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	85
Figura 47	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	85
Figura 48	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	86
Figura 49	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-4 .....	86
Figura 50	– Espectro de massas de DPO-4 .....	87
Figura 51	– Esqueleto básico de DPO-5 e uma unidade de carboidrato .....	88
Figura 52	– Correlações de HMBC e COSY da molécula de carboidrato monomérico . .....	89
Figura 53	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-5 .....	89
Figura 54	– Proposta de fragmentação de DPO-5 .....	90
Figura 55	– Representação estrutural do composto DPO-5 .....	90
Figura 56	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5 .....	92
Figura 57	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5 .....	92

Figura 58	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5 .....	93
Figura 59	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5 .....	93
Figura 60	– Espectro de massas de DPO-5 .....	94
Figura 61	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-5 .....	95
Figura 62	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-6 .....	96
Figura 63	– Cromatograma UPLC-QToF da mistura de DPO-5 com DPO-6 .....	97
Figura 64	– Proposta de fragmentação de DPO-6 .....	97
Figura 65	– Representação estrutural do composto DPO-6 .....	98
Figura 66	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6 .....	100
Figura 67	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6 . .....	100
Figura 68	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6 .....	101
Figura 69	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6 .....	101
Figura 70	– Espectro de massas de DPO-6 .....	102
Figura 71	– Espectro de massas de DPO-5 .....	102
Figura 72	– Possíveis esqueletos básicos para DPO-7 .....	103
Figura 73	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-7 .....	104
Figura 74	– Representação estrutural do composto DPO-7 .....	104
Figura 75	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) de DPO-7 .....	106
Figura 76	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-7 .....	106
Figura 77	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-7.....	107

Figura 78	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-7 .....	107
Figura 79	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-8 .....	108
Figura 80	– Subunidades sugeridas para a estrutura de DPO-8 .....	109
Figura 81	– Representação estrutural do composto DPO-8 .....	110
Figura 82	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	111
Figura 83	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	111
Figura 84	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	112
Figura 85	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (75 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	112
Figura 86	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	113
Figura 87	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (500 x 75 MHz, MeOD) de DPO-8 .....	113
Figura 88	– Correlações observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC e COSY de DPO-9 .....	114
Figura 89	– Representação estrutural do composto DPO-9 .....	115
Figura 90	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	116
Figura 91	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	116
Figura 92	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	117
Figura 93	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (125 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	117
Figura 94	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	118
Figura 95	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-9 .....	118
Figura 96	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-10 .....	119
Figura 97	– Correlações espaciais de NOESY observadas para DPO-10 .....	120
Figura 98	– Representação estrutural do composto DPO-10 .....	120

Figura 99	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 .....	122
Figura 100	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 .....	122
Figura 101	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 .....	123
Figura 102	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 ..	123
Figura 103	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 ...	124
Figura 104	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 .....	124
Figura 105	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10 .....	125
Figura 106	– Esqueleto básico de diterpenos das subclasses espirocoleonas e roileanonas .....	126
Figura 107	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-11 .....	127
Figura 108	– Representação estrutural do composto DPO-11 .....	127
Figura 109	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	129
Figura 110	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	129
Figura 111	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	130
Figura 112	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ NOESY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 ..	130
Figura 113	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	131
Figura 114	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	131
Figura 115	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11 .....	132
Figura 116	– Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-12 .....	133
Figura 117	– Correlações espaciais de NOESY observadas para DPO-12 .....	134
Figura 118	– Representação estrutural do composto DPO-12 .....	134
Figura 119	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	136
Figura 120	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	136



Figura 121	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	137
Figura 122	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ NOESY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 ..	137
Figura 123	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135° (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	138
Figura 124	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	138
Figura 125	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12 .....	137
Figura 126	– Espectro de massas de DPO-12 .....	137
Figura 127	– Correlações de HMBC de DPO-13 .....	140
Figura 128	– Representação estrutural do composto DPO-13 .....	141
Figura 129	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 .....	143
Figura 130	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 .....	143
Figura 131	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 .....	144
Figura 132	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ NOESY (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 ..	144
Figura 133	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 .....	145
Figura 134	– Espectro de RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13 .....	145
Figura 135	– Biossíntese dos diterpenos de esqueleto abietano, labdano e clerodano .....	147
Figura 136	– Formação de enantiômeros intermediários .....	148
Figura 137	– Proposta biossintética do composto DPO-2 da classe dos labdanos .....	148
Figura 138	– Proposta biossintética dos compostos DPO-10 – 12 da classe dos abietanos isolados do chá de <i>P. ornatus</i> .....	149
Figura 139	– Proposta biossintética do composto DPO-13 da classe dos clerodanos ..	150

Figura 140	– Cromatogramas obtidos por CLAE ilustrando o ácido rosmarínico (A) com destaque para UV e decoctos de <i>P. ornatus</i> (B), <i>P. barbatus</i> (C), <i>P. amboinicus</i> (D) e <i>P. grandis</i> (E) .....	151
Figura 141	– Cromatogramas obtidos por CLAE com coluna fenil-hexil dos decoctos de <i>P. ornatus</i> (A), <i>P. amboinicus</i> (B), <i>P. barbatus</i> (C) e <i>P. grandis</i> (D) .....	152
Figura 142	– Efeitos de DPO, EEPO, DPA, DPG e DPB .....	157

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Fracionamento cromatográfico das frações metanólicas do chá das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> .....	48
Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico da fração H <sub>2</sub> O/MeOH 60% reunida com a 80% -A da fração metanólica do decocto das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> .....	49
Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico da fração H <sub>2</sub> O/MeOH 60% reunida com a 80% -B da fração metanólica do decocto das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos secundários isolados de <i>Plectranthus ornatus</i> e suas atividades farmacológicas .....	35
Tabela 2 – Dados referentes à preparação das frações metanólicas dos decoctos .....	47
Tabela 3 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 x 125 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-1 comparados com valores da literatura (400 x 100 MHz, MeOD) (KUHNT; RIMPLER e HEINRICH, 1994) .....	61
Tabela 4 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 x 75 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-2 comparados com valores da literatura (600 x 150 MHz, MeOD) (KAMDEM; SANG e HO, 2002) .....	68
Tabela 5 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 x 75 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-3 comparados com valores da literatura (400 x 100 MHz, MeOD) (YAMAMURA <i>et al.</i> , 1998) .....	76
Tabela 6 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-4 comparados com valores da literatura (600 x 150 MHz, DMSO – $d_6$ ) (BHARITKAR <i>et al.</i> , 2015) .....	83
Tabela 7 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-5 comparados com valores da literatura (500 x 125 MHz, DMSO – $d_6$ ) (TALZHANOV <i>et al.</i> , 2005) .....	91
Tabela 8 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (600 x 150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-6 comparados com valores da literatura (500 x 125 MHz, DMSO – $d_6$ ) (PATORA e KLIMEK, 2002) .....	98
Tabela 9 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ referentes ao Anel B do Luteolina e seus derivados .....	99
Tabela 10 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-7 comparados com valores da literatura (200 x 50.3 MHz, DMSO – $d_6$ ) (YOSHIZAKI <i>et al.</i> , 1987) .....	105

Tabela 11 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-8 comparados com valores da literatura (300 x 75 MHz, MeOD) (LI <i>et al.</i> , 2014) .....	110
Tabela 12 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, MeOD, $J$ em Hz) de DPO-9 comparados com valores da literatura (200 x 50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (RATHEE <i>et al.</i> , 2006) .....	115
Tabela 13 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-10 comparados com valores da literatura (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (ARIHARA; RUEDI e EUGSTER, 1975) e (300 x 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017) .....	121
Tabela 14 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-11 comparados com valores da literatura (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (ARIHARA <i>et al.</i> , 1975) .....	128
Tabela 15 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-12 comparados com valores da literatura (300 x 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (MESQUITA, 2015) .....	135
Tabela 16 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 x 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $J$ em Hz) de DPO-13 comparados com valores da literatura (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005) .....	142
Tabela 17 – Compostos isolados da fração metanólica do chá de <i>P. ornatus</i> , tempo de retenção e UV .....	152
Tabela 18 – Valores de inibição da enzima .....	156

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AGS	Adenocarcinoma Gástrico
APT	Attached Proton Test
AR	Ácido Rosmarínico
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
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQOI	Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fórmula Molecular
FMDPA	Fração Metanólica do Decocto de <i>Plectranthus amboinicus</i>
FMDPB	Fração Metanólica do Decocto de <i>Plectranthus barbatus</i>
FMDPG	Fração Metanólica do Decocto de <i>Plectranthus grandis</i>
FMDPO	Fração Metanólica do Decocto de <i>Plectranthus ornatus</i>
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 (ESI)

IV	Infravermelho
JMOD	J-Modulation
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PA	Pureza Analítica
PDA	Photodiode Array Detector
PN	Produtos Naturais
pNP	<i>para</i> -nitrofenol
pNPG	<i>para</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
PTFE	Politetrafluoretileno
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido Trifluoracético
ToF	Time of Flight
TR	Tempo de Retenção
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	Ultravioleta - Visível

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	27
2	OBJETIVOS .....	30
2.1	Objetivo geral .....	30
2.2	Objetivos específicos .....	30
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	31
3.1	Considerações sobre a família Lamiaceae .....	31
3.2	Considerações sobre o gênero <i>Plectranthus</i> .....	31
3.3	Considerações sobre a espécie <i>Plectranthus ornatus</i> .....	32
4	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	33
5	PARTE EXPERIMENTAL .....	41
5.1	Métodos cromatográficos .....	41
5.1.1	<i>Cromatografia por adsorção em gel de sílica</i> .....	41
5.1.2	<i>Cromatografia por exclusão molecular em Sephadex LH-20</i> .....	42
5.1.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i> .....	42
5.1.4	<i>Extração em fase sólida</i> .....	43
5.1.5	<i>Extração em fase aquosa</i> .....	43
5.2	Métodos espectrométricos .....	44
5.2.1	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i> .....	44
5.2.2	<i>Espectrometria de massa (EM)</i> .....	45
5.3	Determinação óptica .....	46
5.4	Análise fitoquímica das partes aéreas de espécimes do gênero <i>Plectranthus</i> .....	46
5.4.1	<i>Material vegetal</i> .....	46
5.4.2	<i>Preparação dos decoctos das partes aéreas de espécimes do gênero</i> <i>Plectranthus: P. ornatus, P. barbatus, P.amboinicus e P. grandis</i> .....	46
5.4.3	<i>Preparação das frações metanólicas dos decoctos (FMDP<sub>x</sub>)</i> .....	47
5.4.4	<i>Fracionamento da fração metanólica do decocto de P. ornatus (FMDPO) ....</i>	47
5.4.4.1	<i>Fracionamento da FMDPO- H<sub>2</sub>O/ MeOH 40%: Isolamento de DPO-1</i> .....	49
5.4.4.2	<i>Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-2</i> .....	49
5.4.4.3	<i>Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-3</i> .....	50
5.4.4.4	<i>Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-4 e DPO-5</i> .....	50
5.4.4.5	<i>Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-6 e DPO-7</i> .....	51



5.4.4.6	<i>Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-8 e DPO-9</i> .....	52
5.4.4.7	<i>Fracionamento da FMDPO- B: Isolamento de DPO-10, DPO-11, DPO-12 e DPO-13</i> .....	52
<b>5.5</b>	<b>Testes biológicos dos decoctos de <i>Plectranthus</i>: <i>P. ornatus</i>, <i>P. barbatuus</i>, <i>P. amboinicus</i> e <i>P. grandis</i></b> .....	<b>54</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Ensaio de inibição da enzima <math>\alpha</math>-glicosidase</b> .....	<b>54</b>
5.5.1.1	<i>Princípio do teste</i> .....	55
5.5.1.2	<i>Procedimento experimental</i> .....	55
<b>5.5.2</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular</b> .....	<b>56</b>
5.5.2.1	<i>Princípio do teste</i> .....	56
5.5.2.2	<i>Procedimento experimental</i> .....	57
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>6.1</b>	<b>Determinação estrutural</b> .....	<b>58</b>
6.1.1	<i>Determinação estrutural de DPO-1</i> .....	58
6.1.2	<i>Determinação estrutural de DPO-2</i> .....	65
6.1.3	<i>Determinação estrutural de DPO-3</i> .....	73
6.1.4	<i>Determinação estrutural de DPO-4</i> .....	81
6.1.5	<i>Determinação estrutural de DPO-5</i> .....	88
6.1.6	<i>Determinação estrutural de DPO-6 a partir da mistura com DPO-5</i> .....	95
6.1.7	<i>Determinação estrutural de DPO-7</i> .....	103
6.1.8	<i>Determinação estrutural de DPO-8</i> .....	108
6.1.9	<i>Determinação estrutural de DPO-9</i> .....	114
6.1.10	<i>Determinação estrutural de DPO-10</i> .....	119
6.1.11	<i>Determinação estrutural de DPO-11</i> .....	126
6.1.12	<i>Determinação estrutural de DPO-12</i> .....	133
6.1.13	<i>Determinação estrutural de DPO-13</i> .....	140
<b>6.2</b>	<b>Rota biossintética dos diterpenos isolados de <i>P. ornatus</i></b> .....	<b>146</b>
<b>6.3</b>	<b>Estudo comparativo dos decoctos de espécimes de espécies de <i>Plectranthus</i></b> .....	<b>150</b>
6.3.1	<i>Análise cromatográfica</i> .....	150
6.3.2	<i>Teste de inibição enzimática</i> .....	155
6.3.3	<i>Teste de viabilidade celular</i> .....	156
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>158</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>160</b>
--------------------------	------------

## 1 INTRODUÇÃO

Os organismos vivos, em seus processos vitais, produzem diversas substâncias as quais são classificadas em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários (material de estudo da Bioquímica) são os compostos comuns a todos os seres vivos: carboidratos, proteínas e lipídios; enquanto que os metabólitos secundários (material de estudo da Química de Produtos Naturais) são característicos de alguns organismos vivos. Os metabólitos primários participam de funções essenciais para a vida celular, já os metabólitos secundários são responsáveis por características específicas como cor, aroma, defesa contra herbívoros e doenças etc. Exemplos de metabólitos secundários seriam: alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides entre outros (BRAZ-FILHO, 2010; MATOS, 1997).

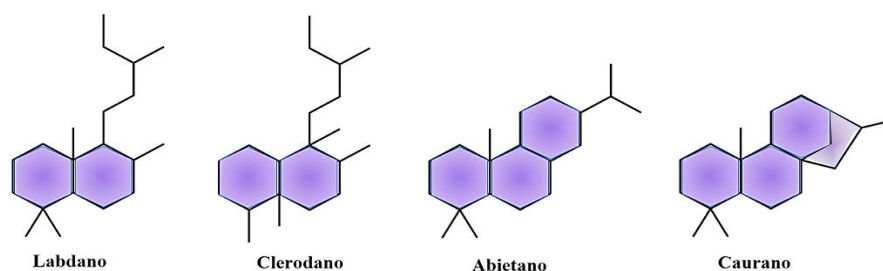
A química de Produtos Naturais (PN) tem como principal objetivo de estudo o isolamento e caracterização estrutural de metabólitos secundários a partir de organismos vivos. Assim, uma das principais aplicações está nas ciências farmacêuticas, onde se busca por novos compostos bioativos com a finalidade de se descobrir novos medicamentos (BRAZ-FILHO, 2010). A busca por novos medicamentos de origem natural tem crescido, principalmente, devido aumento da resistência de determinados microrganismos frente aos antibióticos atualmente comercializados. A relevância dos estudos de PN pode ser comprovada através das constantes revisões de Newman & Cragg (2016) que mostram que mais da metade dos medicamentos aprovados pelo FDA no período de 1981-2014 são derivados diretamente ou indiretamente de metabólitos secundários (GALVÃO RODRIGUES *et al.*, 2013; NEWMAN e CRAGG, 2016).

Além das plantas, os estudos de PN utilizam também como material de investigação esponjas marinhas, bactérias, fungos entre outros seres, mas os que utilizam plantas levam vantagem por ser um material mais acessível e barato. A grande biodiversidade brasileira abriga mais de que 45.000 espécies de plantas, além disso detém uma valiosa riqueza étnica-cultural, abrigando imenso conhecimento popular que faz uso de plantas com finalidades medicinais (DUTRA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2018). Assim, o estudo químico/biológico/farmacológico de plantas medicinais é de grande relevância pois valida a eficácia e segurança de seu uso popular.

Plantas do gênero *Plectranthus* são amplamente encontradas nas regiões tropicais do globo sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças como dor no estômago, náusea, alergia de pele, problemas respiratórios, febre, hemorragia, entre outras (LUKHOB, SIMMONDS e PATON, 2006). Os estudos fitoquímicos sobre o gênero têm relatado o

isolamento e caracterização de compostos fenólicos e de natureza terpênica, especialmente de diterpenos. Os diterpenos são moléculas formadas por vinte (20) átomos de carbono, oriundos de quatro unidades de isopreno (moléculas com 5 átomos de carbonos). Os diterpenos isolados de espécimes de *Plectranthus* (FIGURA 1), frequentemente, são aqueles de esqueletos do tipo labdano, abietano e caurano (ABDEL-MOGIB, ALBAR e BATTERJEE, 2002; LUKHOBA; SIMMONDS e PATON, 2006).

Figura 1 – Esqueletos representativos de diterpenos isolados do gênero *Plectranthus*



Fonte: elaborada pelo autor.

Em 2006, o Governo Federal Brasileiro aprovou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos que visa a melhoria da qualidade de vida da população, do uso sustentável da biodiversidade e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado das comunidades tradicionais e indígenas. Entre as diretrizes, o decreto visa implementar a Política no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2007). Em 2009, o Ministério da Saúde lançou a Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde, entre as 71 espécies vegetais listadas, encontra-se *Plectranthus barbatus* (FIGUEREDO, GURGEL e JUNIOR, 2014). Esta espécie, conhecida popularmente como malva-santa ou boldo-nacional, é usada na medicina popular no tratamento de problemas gastrointestinais, atividade esta que já foi comprovada cientificamente. O efeito positivo no tratamento de úlceras gástricas e antissecretório de ácido gástrico apresentado por *P. barbatus*, foi associada a presença do diterpeno abietano denominado de plectrinona A (SCHULTZ *et al.*, 2007).

Folhas ou partes aéreas de espécimes da espécie *P. ornatus*, popularmente conhecida como atoveran, boldinho ou boldo-gambá, são utilizadas na preparação de chás ou lambedor na medicina popular, em substituição a *P. barbatus*, para o tratamento de problemas gástricos. *P. ornatus* também é utilizada para aliviar cólicas e dores em geral, porém seu uso popular ainda não foi comprovado (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; MATOS, 2007). Investigações químicas sobre esta espécie, sugerem que os diterpenos do tipo clerodano

(FIGURA 1) são marcadores taxonômicos da mesma, visto que moléculas com esse tipo de esqueleto não foram isoladas em outras espécies do gênero *Plectranthus* (ÁVILA *et al.*, 2017).

Em levantamento (16.07.19) na plataforma de busca *SciFinder*, utilizando “*Plectranthus ornatus*” como palavra-chave, foram encontrados 21 trabalhos publicados, enquanto que utilizando o termo “*Plectranthus*”, 1855. A busca também foi realizada com a sinonímia da espécie (*Coleus comosus*) e nenhum trabalho foi encontrado. Esse fato reforça a importância de se estudar *P. ornatus* visto que, é uma planta utilizada na medicina popular, com pouco conhecimento científico associado e nenhum estudo que comprove, seu uso popular. Além do mais, até então não há relato de investigação fitoquímica do chá dessa espécie, apenas de extratos orgânicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química do chá das partes aéreas de espécimes de *Plectranthus ornatus* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar a composição química (isolar/caracterizar os metabólitos secundários) da fração metanólica obtida do chá de *P. ornatus*;
- Realizar um estudo químico comparativo qualitativo, por CLAE, das frações metanólicas dos chás liofilizados de *P. ornatus*, *P. grandis*, *P. amboinicus* e *P. barbatus*;
- Submeter à testes farmacológicos (teste de inibição enzimática e de viabilidade celular), os chás liofilizados das partes aéreas de espécimes das espécies citadas acima.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

#### 3.1 Considerações sobre a família Lamiaceae

A família Lamiaceae (Labiatae) inclui ervas, arbustos, e algumas árvores geralmente com aroma e ramos quadrangulares. É representada por cerca de 300 gêneros e 7500 espécies distribuídas ao redor do mundo (LORENZI e SOUZA, 2012). No Brasil, esta família abrange 46 gêneros e cerca de 525 espécies (MONTEIRO; PASTORE e MELO, 2018). Estudos sobre algumas espécies da família reportam a acumulação de óleo essencial devido à presença de tricomas glandulares, principalmente nas folhas, achado este que justifica o amplo emprego em preparações farmacêuticas, na perfumaria e em cosméticos (ASCENSÃO; MOTA e CASTRO, 1999). Dentre algumas das ervas aromáticas da família introduzidas no país encontram-se a lavanda (*Lavandula angustifolia*), a hortelã (*Mentha spp.*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis*), o orégano (*Origanum vulgare*) e o boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*) (LORENZI e SOUZA, 2012), espécies amplamente difundidas no Brasil e de reputado valor econômico.

#### 3.2 Considerações sobre o gênero *Plectranthus*

O gênero *Plectranthus* é um dos mais importantes da família, contendo aproximadamente 300 espécies distribuídas, principalmente, em regiões tropicais do planeta. Dentre estas, 62 espécies apresentam propriedades medicinais, alimentícias, ornamentais entre outras (BANDEIRA *et al.*, 2011). São plantas de fácil cultivo, uma vez que não exigem muita luminosidade e se adaptam às atmosferas quente e secas. Algumas espécies têm de 1 a 2 metros de altura, com pequenas flores de cor azul a roxo (RICE *et al.*, 2011). Estudos filogenéticos do gênero subdividem algumas espécies em dois grupos majoritários: Clade 1- *Coleus* e Clade 2- *Plectranthus*. As espécies da Clade 1 são maiores em número, em diversidade de uso e são geograficamente mais distribuídas pelo planeta. Exemplos de espécies da Clade 1 são *P. amboinicus* (*Coleus amboinicus*) e *P. barbatus* (*Coleus barbatus*) (LUKHOBBA, SIMMONDS e PATON, 2006).

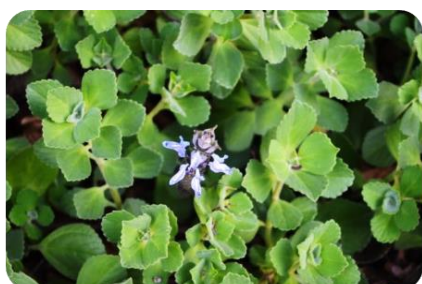
Inúmeras espécies do gênero têm aplicação na horticultura e floricultura, entretanto 85% do seu uso documentado é como medicinal. As espécies mais citadas para finalidades medicinais são *P. amboinicus* e *P. barbatus*, que representam 68% de todo o uso tradicional do gênero. Diversas propriedades farmacológicas como bactericida, antifúngica,

antitumoral e antiplasmodial, são atribuídas aos compostos isolados de plantas de *Plectranthus*, sendo mais comuns os terpenóides e compostos fenólicos. Desta forma, enfatiza-se a importância de investigar a química das espécies desse gênero, visto que muitas não têm estudos que comprovem o uso popular (LUKHOBA, SIMMONDS e PATON, 2006; RICE *et al.*, 2011).

### 3.3 Considerações sobre a espécie *Plectranthus ornatus* Codd

*P. ornatus* Codd (syn.: *Coleus comosus* Hochst. ex Guerke) é uma erva perene com folhas suculentas. A classificação taxonômica desta espécie segundo a Global Biodiversity Information Facility é apresentada na Figura 2. As vezes confundida com *P. neochilus* Schltr, *P. ornatus* apresenta flor na coloração roxa em forma de espigão, florando somente em regiões de clima serrano ([www.hear.org/org/](http://www.hear.org/org/)). Popularmente conhecida como boldinho ou boldo-gambá (devido ao odor de suas flores) na medicina popular, esta espécie é consumida na forma de chá para o tratamento de cólicas e dores em geral, podendo inclusive, ser usada em substituição à *P. barbatus* (MATOS, 2007). Testes histoquímicos das secreções das folhas da *P. ornatus* apresentaram resultado positivo para a presença de polissacarídeos, lipídeos, terpenos, flavonóides e flavonóides glicosilados, e apresentou resultado negativo para alcaloides. Estas secreções podem estar envolvidas no sistema de defesa da planta (ASCENSÃO; MOTA e CASTRO, 1999).

Figura 2 – Fotografia digital de um espécime de *Plectranthus ornatus* Codd em estágio de floração



Reino: Plantae  
 Filo: Tracheophyta  
 Classe: Magnoliopsida  
 Ordem: Lamiales  
 Família: Lamiaceae  
 Gênero: *Plectranthus*  
 Espécie: *P. ornatus* Codd

Fonte: Prof. Edilberto Rocha Silveira.



#### 4 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A relevância do gênero *Plectranthus* pode ser avaliada pelo número de trabalhos encontrados na literatura, concentrados nas grandes áreas de Química, Farmacologia, Biologia e Agronomia. O gênero é nativo da África, Ásia e Austrália, e provavelmente, chegou ao Brasil através do tráfico negreiro. Algumas espécies possuem relevante importância econômica, sendo mundialmente reconhecidas, a princípio, pelas propriedades medicinais de *P. barbatus* (RIJO *et al.*, 2011). Seus óleos essenciais, ricos em mono- e sesquiterpenos, são intensamente investigados (MOTA *et al.*, 2014). Entretanto, os principais constituintes químicos isolados de extratos orgânicos de espécimes do gênero são os diterpenoides e os compostos fenólicos. Entre os fenólicos, o ácido rosmarínico (AR) se destaca como composto majoritário tanto no extrato aquoso de *P. ornatus*, quanto de *P. zuluensis*, *P. verticillatus* “Barborton”, *P. venterii*, *P. verticillatus* “Ubombo”, *P. neochilus*, *P. madagascariensis* “Lynne”, *P. lanuginosus*, *P. grandidentatus*, *P. ernstii* e *P. barbatus* (BRITO *et al.*, 2018; MEDRADO *et al.*, 2017). Este metabólito secundário, comumente encontrado em espécies de plantas das famílias Boraginaceae e Lamiaceae, foi isolado pela primeira vez em 1958 da *Rosmarinus officinalis* (SCARPATI e ORIENTE, 1958). O AR é de grande interesse científico em virtude de suas diversas atividades biológicas e farmacológicas como anti-inflamatória, antioxidante, antiangiogênica, antimicrobiana e citotóxica frente à algumas linhas de células tumorais (KIM *et al.*, 2015; MEDRADO *et al.*, 2017).

Como já mencionado, as plantas do gênero produzem os diterpenos como principal classe de metabólitos secundários. Estes metabólitos são moléculas formadas por vinte átomos de carbono, provenientes de quatro unidades de isoprenos (moléculas com 5 átomos de carbonos). Os diterpenos isolados de *Plectranthus* pertencem às classes abietano, caurano e labdano (FIGURA 1) (ABDEL-MOGIB, ALBAR E BATTERJEE, 2002; LUKHOBA, SIMMONDS e PATON, 2006). Entretanto, foram isolados de *P. ornatus* (ÁVILA *et al.*, 2017), diterpenos do tipo clerodano, os quais podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos para a espécie, haja vista que compostos deste esqueleto não foram isolados em nenhuma outra espécie de *Plectranthus*.

Pesquisa realizada na plataforma *SciFinder* (16.07.2019) utilizando o termo *Plectranthus* apresentou 1855 resultados, muitos dos quais envolvem os chás, forma geralmente empregada na medicina popular. Esta pesquisa, quando refinada para *Plectranthus ornatus*, mostrou 21 artigos pertencentes às grandes áreas Química-Farmacologia-Biologia-Agronomia, 14 do quais foram publicados nos últimos 10 anos (2009-2019). Isso mostra um

crecente interesse do meio científico em conhecer e validar a espécie como medicinal. Vale ressaltar que, dos 21 artigos encontrados, apenas 5 são de isolamento e caracterização de metabólitos secundários, e nenhum destes está relacionado ao chá de *P. ornatus*, motivando a realização deste trabalho. Os outros 16 artigos são, em sua maioria, de testes farmacológicos com extratos orgânicos, compostos previamente isolados de espécimes da espécie ou artigos sobre a parte botânica de *P. ornatus*.

Com base nos trabalhos de fitoquímica de *P. ornatus*, constatou-se o isolamento e caracterização da mistura de  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol, 2 triterpenos, 15 diterpenos clerodanos e 8 diterpenos abietanos, corroborando com a literatura ao apontar os diterpenos como compostos majoritários do gênero (TABELA 1).

Apesar do uso medicinal popular de *P. ornatus*, verificou-se que poucos dos seus metabólitos secundários exibem atividades farmacológicas/biológicas comprovadas na literatura (TABELA 1). Entretanto, a forscolina (**21**), um diterpeno do esqueleto labdano muito usado atualmente no tratamento de inflamação associada à obesidade, exibiu uma potente ação estimulante da enzima adenilato ciclase. A ativação desta enzima promove a redução no nível de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-10) dentro das células, sendo esta atividade associada ao tratamento de asma, hipertensão, problemas cardiovasculares, entre outros (ALASBAHI e MELZIG, 2010; ASADA *et al.*, 2012). Na busca por compostos com capacidade de ativação da mesma enzima, trabalhos de síntese foram realizados, entretanto, nenhum dos derivados apresentou atividade superior à forscolina (ASADA *et al.*, 2012; BHAT *et al.*, 1983; SEAMON *et al.*, 1983).

Tabela 1 – Metabólitos secundários isolados de *Plectranthus ornatus* e suas atividades farmacológicas

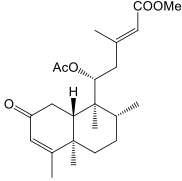
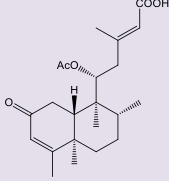
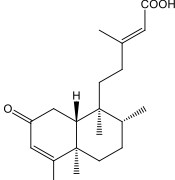
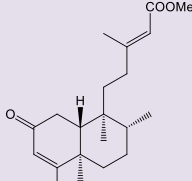
Substância – FM	Extrato de origem - Atividade
<b>Diterpenos clerodano</b>	
 <p data-bbox="268 577 450 638">Plectronatina A C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (1)</p>	<p data-bbox="517 398 979 430">- Extrato hexânico e acetona de <i>P. ornatus</i>;</p> <p data-bbox="517 456 1423 551">- Atividade: Antifúngico frente a cepas de <i>Candida</i>: <i>Candida albicans</i>, <i>C. tropicalis</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. krusei</i>, e <i>C. guilliermondii</i>, antibacteriano frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002).</p> <p data-bbox="517 577 1433 638">Obs.: Composto foi testado frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295, porém não mostrou citotoxicidade (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>
 <p data-bbox="229 853 481 972">Ácido 11-acetoxi-2-oxo-neocleroda-3,13E-dien-15-óico C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> (2)</p>	<p data-bbox="517 674 1334 705">- Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005).</p> <p data-bbox="517 732 1423 792">Obs.: Composto não foi citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>
 <p data-bbox="229 1187 488 1256">Ácido 2-oxo-kolavênico C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> (3)</p>	<p data-bbox="517 1008 1439 1189">- Extrato acetônico de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002), metanólico das folhas de <i>Detarium microcarpum</i> (LAJIDE, ESCOUBAS e MIZUTANI, 1995), metanólico da casca do caule de <i>Macaranga monandra</i> (L) Muell. et Arg (SALAH <i>et al.</i>, 2003), extrato aquoso das folhas da <i>Tectona grandis</i> (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010) e da mistura dos extratos de hexano e de acetato de etila da casca de <i>Xylopia aethiopica</i> A. Rich (DIDEROT <i>et al.</i>, 2005)</p> <p data-bbox="517 1216 1439 1435">- Atividade: Forte efeito dissuasor alimentar de cupins <i>Reticulitermes speratus</i> (LAJIDE; ESCOUBAS e MIZUTANI, 1995), antifúngico frente a <i>Phomopsis viticola</i>, <i>P. obscurans</i> e <i>Botrytis cinerea</i> (SALAH <i>et al.</i>, 2003), inibição da enzima PEP (Propyl endopeptidase) (DIDEROT <i>et al.</i>, 2005), efeito fitotóxico no bioensaio de coleóptilo de trigo elioletado, na germinação de <i>Lactuca sativa</i> (alface), no crescimento da raiz de <i>Allium cepa</i> (cebola) e do <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate) (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010).</p> <p data-bbox="517 1462 1439 1644">Obs.: Composto não apresentou significativa atividade antifúngica frente a <i>Colletotrichum acutatum</i>, <i>C. gloeosporioides</i>, <i>C. fragariae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> (SALAH <i>et al.</i>, 2003), não inibiu a enzima Thrombina (DIDEROT <i>et al.</i>, 2005) e não apresentou fitotoxicidade na germinação ou crescimento e nem no broto da <i>Lepidium sativum</i> L. (agrião), do <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate) e de <i>Allium cepa</i> (cebola) (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010).</p>
 <p data-bbox="229 1859 481 1980">Éster metílico do ácido 2-oxo-kolavênico C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> (4)</p>	<p data-bbox="517 1680 1439 1774">- Extrato acetônico de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002), EtOH/H<sub>2</sub>O (9:1) da casca da <i>Amoora ouangliensis</i> (YANG; WU e LIU, 2010) e etanólico das folhas e galhos da <i>Dysoxylum gotadhora</i> (JIANG <i>et al.</i>, 2015).</p> <p data-bbox="517 1800 1353 1861">- Atividade: Anti-inflamatória frente à produção de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo (JIANG <i>et al.</i>, 2015).</p> <p data-bbox="517 1888 1439 1980">Obs.: Composto não apresentou citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais AGZY 83-a, SMMC-7721 (YANG; WU e LIU, 2010) e nem à frente de células macrófagos RAW 264,7 (JIANG <i>et al.</i>, 2015).</p>

Tabela 1 – Continuação

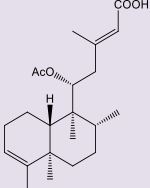
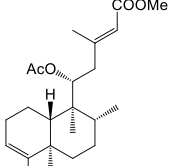
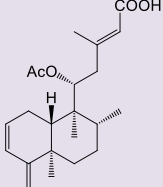
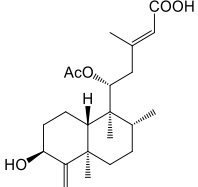
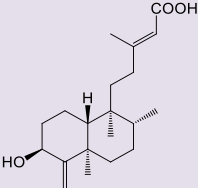
Substância – FM	Extrato de origem - Atividade
 <p>Ácido 11-acetoxineocleroda-3,13E-dien-15-óico C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> (5)</p>	- Extrato hexânico das partes aéreas da <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005).
 <p>Ornatina A C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> (6)</p>	- Extrato hexânico da parte aérea da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).  Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).
 <p>Ornatina E C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (7)</p>	- Extrato hexânico da parte aérea da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).  Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).
 <p>Ácido 11-acetoxi-3β-hidroxicleroda-4(18),13E-dien-15-óico C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (8)</p>	- Extrato hexânico das partes aéreas da <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005).  Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).
 <p>Ácido <i>ent</i>-3α-hidroxicleroda-4(18),13E-dien-15-óico C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> (9)</p>	- Extrato hexânico das partes aéreas da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).  Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i> , 2017).

Tabela 1 – Continuação

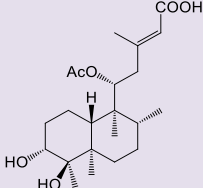
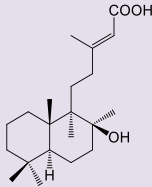
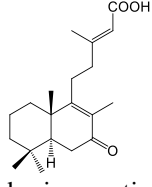
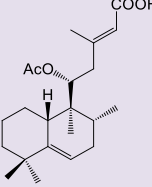
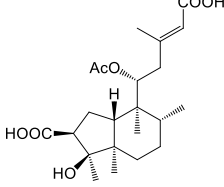
Substância – FM	Extrato de origem - Atividade
 <p data-bbox="280 524 432 584">Ornatina C C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> (10)</p>	<p data-bbox="517 331 1225 360">- Extrato hexânico da parte aérea <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p> <p data-bbox="517 389 1437 450">Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>
<b>Diterpenos labdano</b>	
 <p data-bbox="236 837 477 920">Ácido labd-13-en- 8β- hidroxi-15-óico C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub> (11)</p>	<p data-bbox="517 645 1257 674">- Extrato hexânico da parte aérea da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p> <p data-bbox="517 703 1437 763">Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>
 <p data-bbox="236 1137 477 1200">Ácido rinocerotinóico C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> (12)</p>	<p data-bbox="517 958 1385 1048">- Extrato acetônico de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2007), aquoso das folhas de <i>Tectona grandis</i> (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010) e da <i>Elytropappus rhinocerotis</i> (TRAN, WONG e CHAI, 2017).</p> <p data-bbox="517 1077 1426 1200">- Atividade: Composto apresentou inibição no bioensaio de coleóptilo de trigo elioletado, fitotoxicidade em relação a germinação da <i>Lactuca sativa</i> (alface) (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010) e anti-inflamatória em edemas induzidos por carragenina em ratos (TRAN, WONG e CHAI, 2017).</p> <p data-bbox="517 1229 1422 1413">Obs.: Composto não apresentou atividade bactericida frente as cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H<sub>37</sub>Rv e MDR (RIJO <i>et al.</i>, 2010), nem fitotoxicidade na germinação ou crescimento, broto ou raiz da <i>Lepidium sativum</i> L. (agrião), <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate) e da <i>Allium cepa</i> (cebola), nem na raiz nem no broto da <i>Lactuca sativa</i> (alface) (MACÍAS <i>et al.</i>, 2010), assim como também não apresentou atividade antiartrítica (TRAN; WONG; CHAI e 2017).</p>
 <p data-bbox="236 1644 477 1760">Ácido 11R*- acetoxihalima-5,13E- dien-15-óico C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> (13)</p>	<p data-bbox="517 1451 1155 1480">- Extrato acetônico de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2007).</p> <p data-bbox="517 1509 1390 1570">- Atividade: Bactericida frente a <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. flavescens</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Mycobacterium smegmatis</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2011).</p> <p data-bbox="517 1599 1422 1659">Obs.: Composto não apresentou citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais HL-60, U937, Molt-3, MCF-7 e SK-MEL-1 (BURMISTROVA <i>et al.</i>, 2013).</p>
 <p data-bbox="280 1991 432 2040">Ornatina B C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> (14)</p>	<p data-bbox="517 1798 1257 1827">- Extrato hexânico da parte aérea da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p> <p data-bbox="517 1856 1437 1917">Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>

Tabela 1 – Continuação

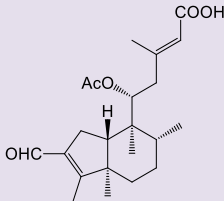
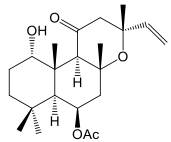
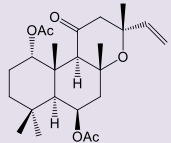
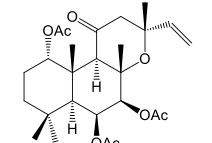
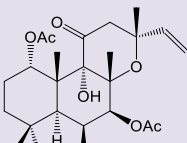
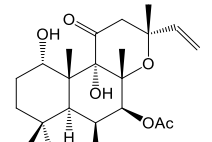
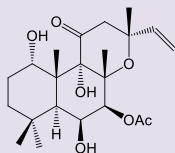
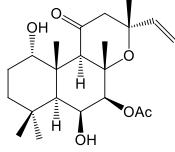
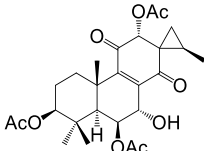
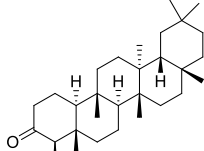
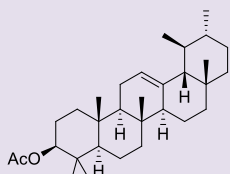
Substância – FM	Extrato de origem - Atividade
 <p data-bbox="296 533 418 591"><b>Ornatina D</b> C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> (15)</p>	<p data-bbox="517 327 1257 356">- Extrato hexânico da parte aérea da <i>P. ornatus</i> (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p> <p data-bbox="517 389 1422 450">Obs.: Composto não apresentou citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (ÁVILA <i>et al.</i>, 2017).</p>
 <p data-bbox="272 763 443 819"><b>Plectornatina B</b> C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (16)</p>	<p data-bbox="517 622 1185 651">- Extrato com acetona de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002).</p> <p data-bbox="517 685 1326 714">- Atividade: Bactericida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002).</p>
 <p data-bbox="272 994 443 1050"><b>Plectornatina C</b> C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> (17)</p>	<p data-bbox="517 853 1437 913">- Extrato hexânico das partes aéreas (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005), acetona de toda a <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002) e metanólico da raiz da <i>P. barbatus</i> (ASADA <i>et al.</i>, 2012).</p> <p data-bbox="517 947 1422 1039">- Atividade: Antifúngica frente a cepas de <i>Candida</i>: <i>Candida albicans</i>, <i>C. tropicalis</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. krusei</i>, e <i>C. guilliermondii</i>, bactericida frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2002).</p> <p data-bbox="517 1072 1437 1128">Obs.: Composto não apresentou efeito no teste de força contrátil do tecido ventricular do miocárdio de camundongos (ASADA <i>et al.</i>, 2012).</p>
 <p data-bbox="252 1308 464 1424"><b>1α,6β,7β-triacetoxi-8,13R*-epoxi-14-labden-11-ona</b> C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub> (18)</p>	<p data-bbox="517 1160 1398 1220">- Extrato hexânico das partes aéreas (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005) e acetona de toda <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2005).</p> <p data-bbox="517 1254 1374 1283">- Atividade: Não há relato de testes farmacológicos/biológicos com o composto.</p>
 <p data-bbox="272 1630 443 1727"><b>1,6-di-O-acetilforscolina</b> C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>9</sub> (19)</p>	<p data-bbox="517 1462 1398 1523">- Extrato hexânico das partes aéreas (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005) e acetona de toda <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2005).</p> <p data-bbox="517 1556 1353 1615">Obs.: Composto não apresentou efeito ativador do adenilato ciclase do córtex cerebral de ratos (SEAMON <i>et al.</i>, 1983).</p>
 <p data-bbox="252 1928 464 1986"><b>6-O-acetilforscolina</b> C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub> (20)</p>	<p data-bbox="517 1771 1134 1800">- Extrato acetônico de toda <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2005).</p> <p data-bbox="517 1834 1362 1895">- Atividade: Composto apresentou diminuição na pressão arterial comparável a forscolina (BHAT <i>et al.</i>, 1983).</p>

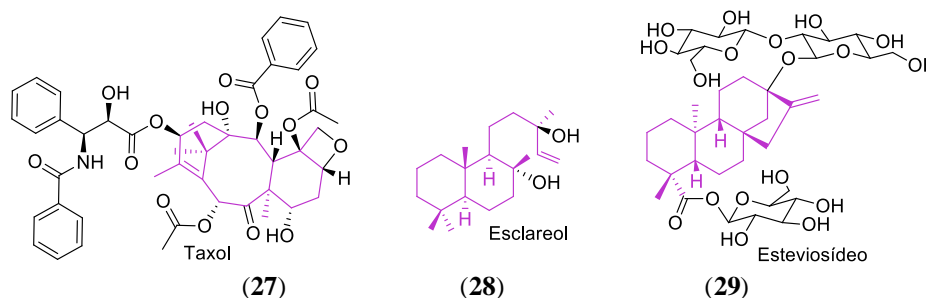
Tabela 1 – Continuação

Substância – FM	Extrato de origem - Atividade
 <p>Forscolina C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> (21)</p>	<p>- Extrato acetônico de toda <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>- Atividade: Ativador do adenilato ciclase cardíaco, atividade hipotensora devido à vasodilatação periférica, antiespasmódica ligada a capacidade de relaxar a musculatura lisa, ativador do adenilato ciclase do córtex cerebral de ratos (SEAMON <i>et al.</i>, 1983), diminui a pressão sanguínea (BHAT <i>et al.</i>, 1983), anti-inflamatório, potente estimulador da produção de cAMP intracelular, inibe proteínas de transporte de membrana de mamíferos e bactérias, aumenta a força de contração do miocárdio de ratos roedores e apresenta efeito positivo dose-dependente na força contrátil do tecido ventricular do miocárdio de camundongos (ASADA <i>et al.</i>, 2012).</p>
 <p>9-Deoxiforscolina C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> (22)</p>	<p>- Extrato acetona de toda <i>P. ornatus</i> (RIJO <i>et al.</i>, 2005) e metanólico das raízes de <i>P. barbatus</i> (ASADA <i>et al.</i>, 2012).</p> <p>Obs.: Não apresentou efeito ativador do adenilato ciclase do córtex cerebral de ratos (SEAMON <i>et al.</i>, 1983) nem no teste de força contrátil do tecido ventricular do miocárdio de camundongos (ASADA <i>et al.</i>, 2012).</p>
<b>Diterpeno abietano</b>	
 <p>Coleon R C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub> (23)</p>	<p>- Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> (Ávila <i>et al.</i>, 2017).</p> <p>Obs.: Composto não citotóxico frente às linhagens de células tumorais HCT-116, HL-60, OVCAR-8 e SF-295 (Ávila <i>et al.</i>, 2017).</p>
<b>Triterpenos</b>	
 <p>Friedelina C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O (24)</p>	<p>- Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005) e das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ALVES <i>et al.</i>, 2018).</p> <p>- Atividade: Anti-inflamatória e propriedade gastroprotetora (ALVES <i>et al.</i>, 2018).</p>
 <p>3β-Acetil-α-amirina C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub> (25)</p>	<p>- Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005).</p>
<p>Mistura de β-sitosterol e estigmasterol (26)</p>	<p>- Extrato hexânico das partes aéreas de <i>P. ornatus</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2005).</p>

Fonte: elaborada pelo autor.

Nas plantas, a maioria dos diterpenos participam do crescimento e desenvolvimento, sendo sua produção e acúmulo associados as condições de estresse ambiental. Uma das principais funções dos diterpenos é como agente natural de defesa contra

herbívoros (MAZID; KHAN e MOHAMMAD, 2011). Na indústria, alguns deles e derivados têm grande aplicação nas áreas farmacêutica, cosméticos e alimentícia (ZERBE e BOHLMANN, 2015). Como exemplo, têm-se o taxol (**27**) (farmacêutica), isolado das cascas da *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae), o qual é indicado como agente anticâncer contra diversos cânceres, mas principalmente no tratamento de câncer de ovário e de mama (KHAZIR *et al.*, 2014). Na indústria de fragrância, o esclareol (**28**), isolado de *Salvia sclarea* (Lamiaceae), *Cistus creticus* (Cistaceae), *Nicotiana glutinosa* (Solanaceae), e *Cleome spinosa* (Brassicaceae), é amplamente utilizado na síntese de Ambrox® (produto sintético que substitui o âmbar cinza) e na fixação dos odores (CANIARD *et al.*, 2012), enquanto na área alimentícia têm-se o esteviosídeo (**29**), um adoçante natural não calórico encontrado na *Stevia rebaudiana* (Bertoni) (PHILIPPE *et al.*, 2014).



Com base no exposto, *P. ornatus* é um produtor em potencial de compostos bioativos justificando seu uso medicinal popular. Assim, o estudo do chá não só contribui para o conhecimento etnofarmacológico da espécie como também para pesquisas em diversas áreas de conhecimento, visto que é uma espécie é rica em diterpenos, uma classe de metabólitos que apresenta crescente interesse industrial (ZERBE e BOHLMANN, 2015).



## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Métodos cromatográficos

Através dos métodos cromatográficos é possível analisar e separar uma determinada mistura em seus componentes. Desta forma, a partir das diferentes propriedades das substâncias a serem separadas, como a polaridade, escolhe-se qual tipo de cromatografia será aplicada.

Um sistema cromatográfico é composto, basicamente, por 3 partes (MATOS, 1997):

1. Mistura a ser analisada: material que contém os compostos a serem separados;
2. Fase fixa ou fase estacionária: meio constituído ou suportado por um sólido poroso, cuja função é reter os solutos;
3. Fase móvel ou eluente: solvente que flui constantemente pela fase fixa deslocando os solutos.

Devido a diferença de propriedades dos compostos e competição pelos mesmos entre a fase fixa e fase móvel, os componentes da mistura apresentarão diferentes velocidades de migração possibilitando sua separação. Matos completa (1997, p. 79):

Em princípio, qualquer propriedade que permita o estabelecimento de equilíbrio de concentração dos componentes da mistura nas duas fases, em grau distinto para cada um deles, pode ser utilizada como propriedade cromatográfica separativa, isto é, em função dela os vários componentes da mistura migrarão com velocidades diferentes através da fase fixa do sistema.

#### 5.1.1 Cromatografia por adsorção em gel de sílica

Na cromatografia por adsorção, utiliza-se a diferença de polaridade dos compostos de um material para separá-los. No processo, os componentes da mistura ficam adsorvidos na superfície da fase fixa devido à interação entre o suporte e as substâncias pertencentes à mistura, e desta forma, quanto mais forte for essa interação, mais lento será o deslocamento desse composto através da fase estacionária (SIMÕES *et al.*, 2003, p. 240).

A fase estacionária utilizada para esse tipo de cromatografia foi gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec  $\varnothing$  230-400  $\mu\text{m}$ . A escolha do comprimento e diâmetro da coluna baseou-se

na quantidade e perfil cromatográfico do material. Os eluentes acetato de etila e metanol, de qualidade PA da marca Synth, foram utilizados puros ou em proporções binárias.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de alumínio pré-revestidas com gel de sílica (20 x 20 cm) da marca Silicycle UltraPure Silica Gels (Modelo TLA-R10011B-323). As placas foram reveladas através de aspersão com solução alcoólica ácida de vanilina seguido por aquecimento por exposição ao ar quente pelo uso de soprador térmico DWT (Modelo HLP15-500).

- **Solução alcoólica ácida de vanilina**

Revelador utilizado para terpenos, com o qual, após aquecimento, os compostos revelam-se na forma de *spots* em diferentes cores. Para 200 mL de solução, solubiliza-se 5 g de vanilina (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) em 100 mL de álcool etílico. Em seguida, acrescenta-se à solução de vanilina, 100 mL de solução 0,75 M de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>).

### **5.1.2 Cromatografia por exclusão molecular em Sephadex LH-20**

A cromatografia por exclusão utiliza-se da dimensão molecular como base de separação. Também conhecida como peneira molecular, a separação se dá pela diferença de tamanho molecular dos compostos onde as moléculas maiores por não conseguirem entrar nos poros da fase estacionária, são deslocadas pela fase móvel. Consequentemente, as moléculas menores tendem a sair por último durante o processo de eluição do solvente (SIMÕES *et al.*, 2003, p. 240).

Para este tipo de cromatografia utilizou-se como fase estacionária gel de dextrana, Sephadex LH-20, da marca Pharmacia Fine Chemicals e metanol de qualidade PA da marca Synth como fase móvel.

### **5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) também se baseia na interação do soluto com a fase estacionária e a fase móvel, porém se diferencia na sua fase fixa que é formada de partículas extremamente finas (3 a 10 µm), homogêneas e densamente compactadas, o que oferece resistência para o fluxo do solvente. Desta forma requer alta pressão e fluxo contínuo, para que a fase móvel flua a uma velocidade razoável. Separações onde o solvente é apolar e a fase fixa polar são

denominadas separações em fase normal. Entretanto, se a fase fixa for apolar e a fase móvel polar ela é denominada separação cromatográfica em fase reversa (SIMÕES *et al.*, 2003, p. 241).

O material foi analisado em dois cromatógrafos distintos: um SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A) e sistema de bombas ternário e o outro Waters, modelo Waters-1525, equipado com detector PDA Waters-2996 e sistema de bomba binária de alta pressão. Utilizou-se colunas de fase reversa constituídas de gel de sílica substituída por cadeias orgânicas alifáticas de dezoito carbonos (C18) da marca Phenomenex® (analítica: 2,5 x 250 mm, 5 µm; semi-preparativa: 4,6 x 250 mm, 5 µm) mantida em forno termostático a 35 °C.

Os solventes utilizados foram H<sub>2</sub>O-Milli-Q (levemente acidificada com ácido trifluoracético – TFA a 0,1%) e metanol grau HPLC, adequadamente filtrado em membrana de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas em metanol e filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoretileno) com poros de 0,45 µm (Whatman).

#### ***5.1.4 Extração em fase sólida***

Mais conhecida como SPE (*Solid Phase Extraction*), a Extração em Fase Sólida (EFS) é uma técnica muito difundida para a preparação de amostras, com o objetivo de extrair e/ou concentrar analitos em amostras complexas, permitindo que analitos de baixa concentração sejam detectados em técnicas como CLAE (JARDIM, 2010).

Foram utilizados cartuchos de fase reversa (C18) de 1g da marca Strata da Phenomenex. Neste fracionamento a fase móvel empregada foi água Milli-Q e metanol PA da marca Synth. O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente (fase estacionária) com metanol, seguida de acondicionamento em água Milli-Q, utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

#### ***5.1.5 Extração em fase aquosa***

A utilização de plantas na medicina popular ocorre de várias formas dependendo do tratamento e de que parte da planta (folha, casca, fruto) está sendo usada. Os chás, por exemplo, podem ser preparados por infusão ou decocção. Segundo Matos (2007), uma das maneiras de preparar chá (p. 38):

Por decocção ou cozimento: colocar a planta na água fria e levar à fervura. O tempo de fervura pode variar de 10 a 20 minutos, dependendo da consistência da parte da planta. Após o cozimento, deixar em repouso de 10 a 15 minutos e coar em seguida. Este método é indicado quando se utilizam partes duras como cascas, raízes e sementes.

No caso do trabalho, realizou-se decocção da parte aérea (caule e folhas) dos espécimes em estudo, visto que é a forma de preparo dos chás de espécimes de *Plectranthus spp.* no conhecimento popular.

## 5.2 Métodos espectrométricos

### 5.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se na absorção de radiação eletromagnética, na região de radiofrequência, por determinados núcleos de uma molécula. Onde, (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010):

Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (p. 123).

A frequência, ou deslocamento químico, que cada núcleo apresenta é característico do ambiente químico que ele se encontra na molécula. Os núcleos analisados foram  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Alguns dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DRX-500 e DPX-300 operando na frequência do prótio a 500 e 300 MHz e na frequência do carbono a 125 e 75 MHz, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Outros espectros foram obtidos em espectrômetro Agilent DD2 operando na frequência do hidrogênio a 600 MHz e na frequência do carbono a 150 MHz, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Para obtenção dos espectros, as amostras foram dissolvidas em solventes deuterados: metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ou piridina ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram expressos em partes por milhão (ppm):  $\delta_{\text{H}}$  3,31 (metanol),  $\delta_{\text{H}}$  8,74; 7,58; 7,22 (piridina) e  $\delta_{\text{H}}$  4,80 (água). Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os picos referentes aos solventes foram  $\delta_{\text{C}}$  49,15 (metanol) e  $\delta_{\text{C}}$  150,35; 135,91; 123,87 (piridina).

As multiplicidades dos sinais de prótios no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplete de duplete), t (triplete) e m (multiplete).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulo de  $135^\circ$  foi utilizada para a determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos. Em comparação do espectro do mesmo com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB, foi possível distinguir os carbonos, sendo descritos segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

### 5.2.2 Espectrometria de massa (EM)

A espectrometria de massa fornece dados que permitem determinar a fórmula molecular dos compostos, contribuindo na elucidação estrutural através dos padrões de fragmentação inerente às diferentes funções orgânicas. O espectro de massa é um gráfico que apresenta picos que representam a relação massa/carga ( $m/z$ ). A intensidade dos picos depende da capacidade de ionização da molécula, onde quanto mais estável o íon formado mais intenso será o pico. O espectro é obtido quando a molécula na fase gasosa e ionizada, passa por um analisador e chega ao detector gerando o espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010, p. 1).

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Waters, modelo Acquity UPLC, acoplado a um sistema Quadrupolo/ Tempo de Voo (QtoF) pertencente ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm,  $1,7\ \mu\text{m}$ ) equipado uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) operando tanto no modo positivo quanto no negativo.

### 5.3 Determinação da rotação óptica

A interação de um composto orgânico com a luz plano-polarizada é chamada atividade óptica. A rotação óptica é medida por um polarímetro. Quando a luz plano-polarizada passa através de uma amostra com um ou mais centros estereogênicos, o plano de polarização da luz incidente sofre desvio de um certo ângulo que pode ser no sentido horário [dextrorrotatório (+)] ou anti-horário [levorrotatório (-)].

A rotação óptica específica dos compostos isolados foi obtida em polarímetro digital Jasco modelo P-2000 pertencente a Central Analítica do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II da UFC (LAFIPLAM-UFC). O equipamento opera com lâmpada de tungstênio, em comprimento de onda de 589 nm, temperatura variando de 20 a 23°C e cubeta com 2,5 mm de diâmetro por 10 mm de caminho óptico. As amostras foram analisadas na concentração 1mg/mL em solvente com grau de pureza HPLC, e as medições feitas em triplicata.

### 5.4 Análise fitoquímica das partes aéreas de espécimes do gênero *Plectranthus*

#### 5.4.1 Material vegetal

Os materiais botânicos foram coletados no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, campus do Pici, no período de maio-setembro de 2017 entre 13h:30-14h:30. Esse horário foi escolhido de forma aleatória. As exsiccatas, números 56806 (*P. ornatus*), 54737 (*P. barbatus*), 54739 (*P. amboinicus*) e 54738 (*P. grandis*) encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra da UFC.

#### 5.4.2 Preparação dos decoctos das partes aéreas de quatro espécimes representativas do gênero *Plectranthus*: *P. ornatus*, *P. barbatus*, *P. amboinicus* e *P. grandis*

As partes aéreas de vários espécimes representativas de cada espécie em estudo foi lavada em água corrente (2x), colocado em béckers (2000 mL) e acrescentado água destilada (30 g/ 100 mL). Em seguida, o material foi aquecido, em chapa aquecedora (Marca: Fisatom, Modelo: 752A), e permanecido por 15 min a 90 °C. Esperou-se esfriar e após esse intervalo de tempo, o decocto foi filtrado em funil comum com algodão e liofilizado

[liofilizador da marca: Christ, Modelo: Alpha 1-2/ LD plus], fornecendo os materiais da Tabela 2.

#### 5.4.3 Preparação das frações metanólicas dos decoctos (FMDPx)

Ao liofilizado de *P. ornatus* (38,16 g), foi adicionado 180 mL de MeOH, agitado e deixado em repouso por 5 min (6 extrações com 180 mL). Após esse tempo, as frações metanólicas foram combinados e evaporados à pressão reduzida.

Seguindo o mesmo procedimento, foram preparados os chás das partes aéreas de espécimes representativas das outras espécies cultivadas no Horto de Plantas Medicinais DQOI-UFC. Vale ressaltar que, ao contrário de *P. ornatus* onde todo o material foi extraído, das demais espécies foi utilizado apenas 1 g de material para extração com MeOH. Ao material foi adicionado 10 mL de MeOH e realizado o mesmo procedimento que o da *P. ornatus*. Os dados da preparação das frações metanólicas dos chás estão compilados na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados referentes à preparação das frações metanólicas dos decoctos

Espécie de <i>Plectranthus</i> Estudada	Material coletado (kg)	Decocto gerado (g)	Material fracionado (g)	Fração metanólica (g)	Rendim. %	Código
<i>P. ornatus</i>	2,250	38,16	38,16	13,43	35%	FMDPO
<i>P. grandis</i>	0,950	22,97	1,03	0,65	65%	FMDPG
<i>P. amboinicus</i>	1,050	18,93	1,06	0,29	29%	FMDPA
<i>P. barbatus</i>	0,625	13,28	1,00	0,55	55%	FMDPB

Fonte: Dados da pesquisa.

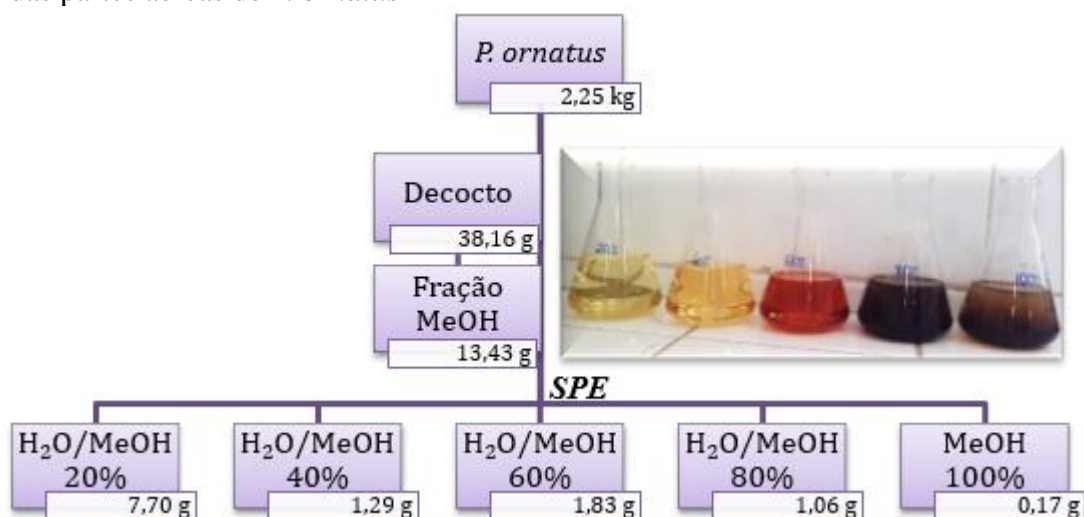
#### 5.4.4 Fracionamento da fração metanólica do decocto de *P. ornatus* (FMDPO)

Foi utilizado da fração metanólica de *P. ornatus*, FMDPO (13,43 g), quatro porções de 1,20 g, e solubilizado em 2 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O na proporção de 1:1 e, em seguida, submetido à extração em fase sólida em cartucho de fase reversa. O solvente foi removido do material coletado sob pressão reduzida, e os dados do fracionamento estão compilados no Fluxograma 1 mostrando as massas de material trabalhado, da fração metanólica do chá às frações obtidas.

Todas as frações do extrato metanólico foram analisadas por CLAE nas seguintes condições: coluna analítica C18, gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/MeOH 10-100% em 30 min + MeOH 100% em 10 min, temperatura do forno à 35 °C, fluxo de 1,0 mL/min e volume de

injeção de 25  $\mu$ L. A partir dos perfis cromatográficos observados, foram escolhidas as frações que seriam dadas continuidade no fracionamento cromatográfico. Apesar da fração H<sub>2</sub>O/ MeOH 20% possuir maior quantidade de material, seu cromatograma não apresentou picos que foram observados no cromatograma da fração metanólica do chá. A fração H<sub>2</sub>O/ MeOH 40% apresentou em seu cromatograma um pico majoritário. Já as frações H<sub>2</sub>O/ MeOH 60% e 80% foram reunidas, duas alíquotas (FMDPO A: 0,62 g e FMDPO B: 1,91 g) foram retiradas e fracionadas resultando no isolamento de 13 compostos, como mostra o Fluxograma 2 e o Fluxograma 3. Os 9 primeiros compostos foram isolados da alíquota A, porém foi observado que nenhum destes compostos apresentava os tempos de retenção dos picos representativos no cromatograma do chá. Na busca por esses últimos compostos, utilizou-se a alíquota B com outra metodologia de fracionamento, iniciando com sílica gel.

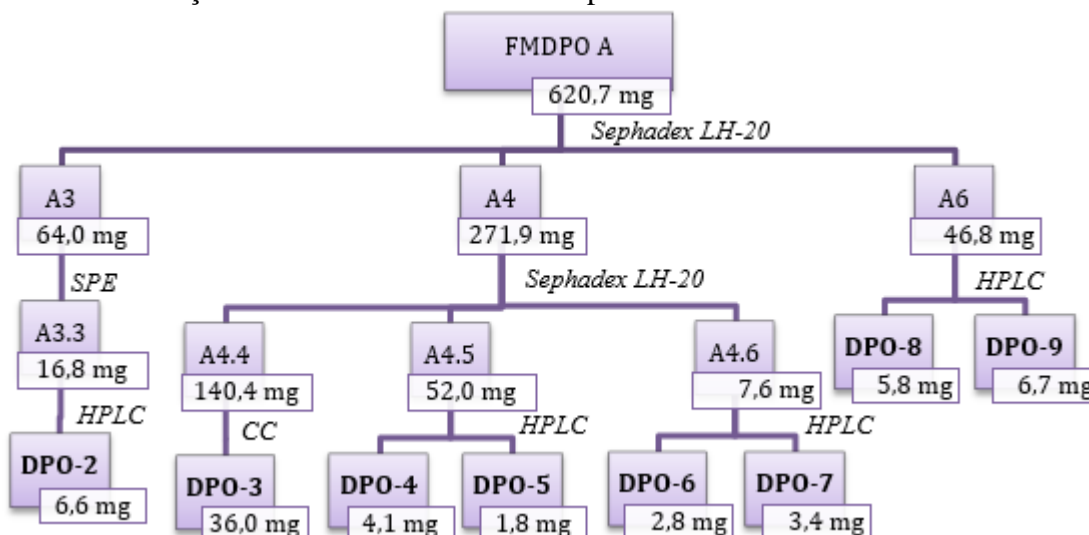
Fluxograma 1 – Fracionamento cromatográfico das frações metanólicas do chá das partes aéreas de *P. ornatus*



Fonte: Dados da pesquisa.



Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com a 80% - A da fração metanólica do decocto das partes aéreas de *P. ornatus*



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 5.4.4.1 Fracionamento da FMDPO- H<sub>2</sub>O/ MeOH 40%: Isolamento de DPO-1

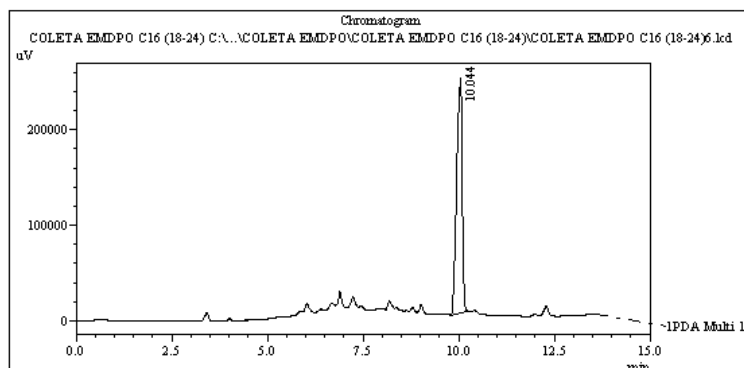
Uma alíquota da fração FMDPO - H<sub>2</sub>O/ MeOH 40% (0,37 g) foi submetida à fracionamento por exclusão molecular (Sephadex LH-20/ altura - 29 cm/ largura - 2,7 cm) utilizando MeOH como fase móvel. Após análise por CCD, utilizando a mistura DCM/MeOH 20% e o revelador vanilina, foram obtidas 4 frações: C1 (87,4 mg), C2 (55,1 mg), C3 (114,4 mg) e C4 (16,6 mg). A fração C3 apresentou-se como um sólido amorfo alaranjado sendo codificado como DPO-1, cuja determinação estrutural encontra-se no item 6.1.1.

#### 5.4.4.2 Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-2

FMDPO H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% - A (620,7 mg) foi submetida à fracionamento por exclusão molecular (Sephadex LH-20/ altura - 39 cm/ largura - 3,7 cm) utilizando MeOH como fase móvel, resultando em 7 frações: A1 (21,4 mg), A2 (89,9 mg), A3 (64,0 mg), A4 (271,9 mg), A5 (101,2 mg), A6 (46,8 mg) e A7 (16,0 mg), após monitoramento por CCD. A fração A3 (64,0 mg) foi submetida à fracionamento em SPE com H<sub>2</sub>O/MeOH iniciando com 100% H<sub>2</sub>O e aumentando a porcentagem de MeOH (20%, 40%, 60%, 80% e 100%) resultando em 4 subfrações: A3.1 (3,4 mg), A3.2 (20,4 mg), A3.3 (16,8 mg) e A3.4 (11,2 mg). A fração A3.3 (16,8 mg) foi purificada no HPLC (FIGURA 3) resultando numa resina marrom,

sendo codificada como DPO-2 (6,6 mg), cuja determinação estrutural encontra-se no item 6.1.2.

Figura 3 – Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-2



#### 5.4.4.3 Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-3

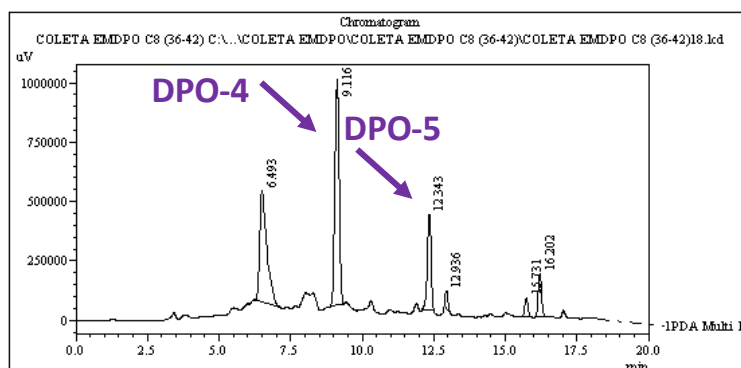
A fração A4 (271,9 mg) foi submetida à fracionamento em Sephadex LH-20 (altura - 43 cm/ largura - 2,7 cm) utilizando MeOH como fase móvel. A análise através de CCD, e reunião das frações semelhantes, resultou em 7 subfrações: A4.1 (8,6 mg), A4.2 (21,4 mg), A4.3 (15,3 mg), A4.4 (140,4 mg), A4.5 (52,0 mg), A4.6 (7,6 mg) e A4.7 (1,5 mg). A subfração A4.4 (140,4 mg) foi submetida à fracionamento sobre 4,9 g de gel de sílica e eluída com acetato de etila e metanol puros ou misturados (100%/ 5%/ 10%/ 20%/ 30%/ 50%/ 100%) em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 55 frações. As frações 23-25 apresentaram um sólido amorfo, que após lavagem com acetona, foi codificado como DPO-3 (36,0 mg), cuja determinação estrutural encontra-se no item 6.1.3.

#### 5.4.4.4 Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-4 e DPO-5

A fração A4.5 (52,0 mg) foi analisada por CLAE coluna semipreparativa de fase reversa empregado em gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/ MeOH (50-100%) por 25 minutos, com fluxo 4,0 mL/min e volume de injeção 100 µL (FIGURA 4). A análise foi realizada sob faixa de comprimentos de onda de 210-400 nm e resultou no isolamento de duas substâncias que deram origem aos picos observados nos tempos de retenção: T<sub>R</sub>= 9,12 min e T<sub>R</sub>= 12,34 min). Os outros picos em destaque também foram coletados, porém não foi possível realizar a caracterização estrutural ou pela quantidade de material ou por se apresentarem na forma de

mistura complexa. As duas substâncias mencionadas anteriormente foram codificadas, respectivamente, como DPO-4 (4,1 mg) e DPO-5 (1,8 mg). As determinações estruturais dos compostos DPO-4 e DPO-5 encontram-se nos itens 6.1.4 e 6.1.5, respectivamente.

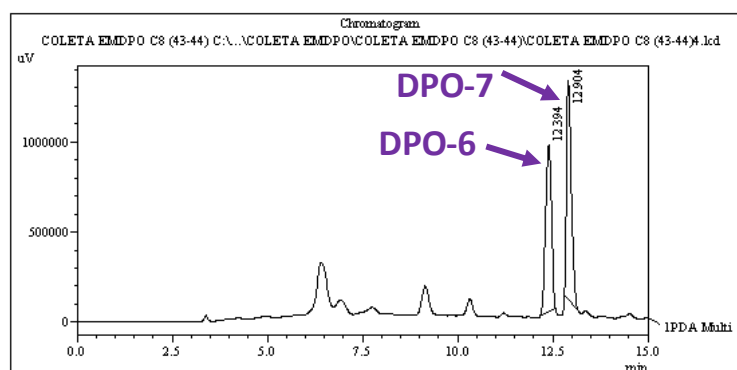
Figura 4 – Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-4 e DPO-5



#### 5.4.4.5 Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-6 e DPO-7

A fração A4.6 (7,6 mg) foi analisada por CLAE coluna semipreparativa de fase reversa empregado em gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/ MeOH (50-100%) por 25 minutos, com fluxo 4,0 mL/min e volume de injeção 100  $\mu$ L (FIGURA 5). A análise foi realizada sob faixa de comprimentos de onda de 210-400 nm e resultou no isolamento de duas substâncias que deram origem aos picos observados nos tempos de retenção:  $T_R$  = 12,39 min e  $T_R$  = 12,90 min). As mesmas foram codificadas, respectivamente, como DPO-6 (2,6 mg) e DPO-7 (3,4 mg). As determinações estruturais dos compostos DPO-6 e DPO-7 encontram-se nos itens 6.1.6 e 6.1.7, respectivamente.

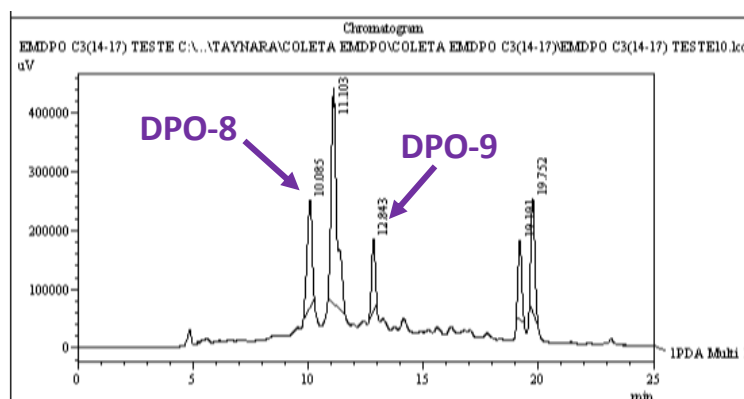
Figura 5 – Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-6 e DPO-7



#### 5.4.4.6 Fracionamento da FMDPO- A: Isolamento de DPO-8 e DPO-9

A fração A6 (46,8 mg) analisada por CLAE coluna semipreparativa de fase reversa empregado em gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/ MeOH (50-100%) por 25 minutos, com fluxo 4,0 mL/min e volume de injeção 100 µL (FIGURA 6). A análise foi realizada sob faixa de comprimentos de onda de 210-400 nm e resultou no isolamento de duas substâncias que deram origem aos picos observados nos tempos de retenção: T<sub>R</sub>= 10,08 min e T<sub>R</sub>= 12,84 min). As mesmas foram codificadas, respectivamente, como DPO-8 (5,8 mg) e DPO-9 (6,7 mg). As determinações estruturais dos compostos DPO-8 e DPO-9 encontram-se nos itens 6.1.8 e 6.1.9, respectivamente.

Figura 6 – Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-8 e DPO-9



#### 5.4.4.7 Fracionamento da FMDPO- B: Isolamento de DPO-10, DPO-11, DPO-12 e DPO-13

Os compostos isolados até então (DPO-1 a DPO-9) foram analisados por CLAE [Coluna analítica C-18, gradiente: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/MeOH, 10-100% em 30 min + 10 min em 100% MeOH, Fluxo 1,0 mL/ min, Injeção 25 µL] e comparados com o cromatograma em mesmo método da fração metanólica do chá de *P. ornatus*. Foi verificado que, os compostos majoritários, depois de DPO-1, não haviam sido isolados, então optou-se por trabalhar com outra alíquota do material, só que começando o fracionamento com sílica gel. Portanto, a fração H<sub>2</sub>O/ MeOH 60% reunida com a 80% - B (1,91 g) foi submetida à fracionamento em sílica gel (4,9 g) utilizando diclorometano e metanol misturados como fase móvel em ordem crescente de polaridade (10%, 15%, 20%, 30%, 40% e 50%). A análise através de CCD, e reunião das frações semelhantes, resultou em 12 subfrações: B1 (53,6 mg), B2 (93,0 mg), B3 (112,3 mg), B4 (169,7 mg), B5 (95,7 mg), B6 (245,8 mg), B7 (86,6 mg), B8 (91,8 mg), B9

(117,5 mg), B10 (115,2 mg), B11 (151,0 mg) e B12 (180,4 mg). Estes dados estão melhor apresentados no Fluxograma 3.

As subfrações B1 (FIGURA 7), B2 (FIGURA 8) e B3 (FIGURA 9) foram analisadas por CLAE coluna semipreparativa de fenil-hexil empregado em método isocrático H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/ MeOH (72,5 %) por 25 minutos, com fluxo 4,0 mL/min e volume de injeção 100 µL. As análises foram realizadas sob faixa de comprimentos de onda de 210-400 nm e resultou no isolamento de quatro substâncias que deram origem aos picos observados nos tempos de retenção:  $T_R = 13,59$  min,  $T_R = 6,20$  min,  $T_R = 9,92$  min e  $T_R = 12,15$  min. As mesmas foram codificadas, respectivamente, como DPO-10 (9,8 mg), DPO-11 (10,2 mg), DPO-12 (9,2 mg) e DPO-13 (4,8 mg). As determinações estruturais dos compostos DPO-10, DPO-11, DPO-12 e DPO-13 encontram-se nos itens 6.1.10, 6.1.11, 6.1.12 e 6.1.13, respectivamente.

Figura 7 – Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-10

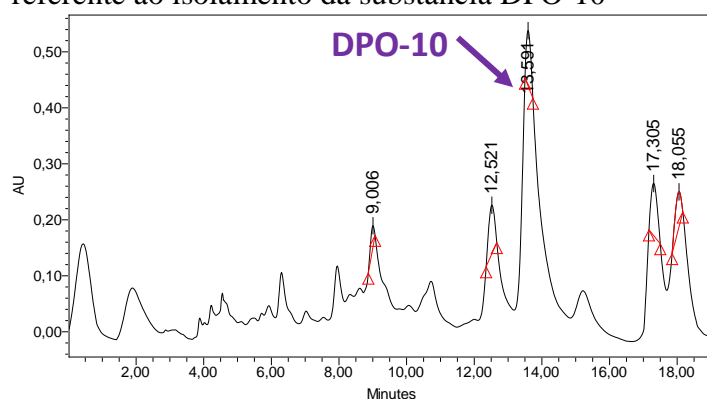


Figura 8 - Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento da substância DPO-11

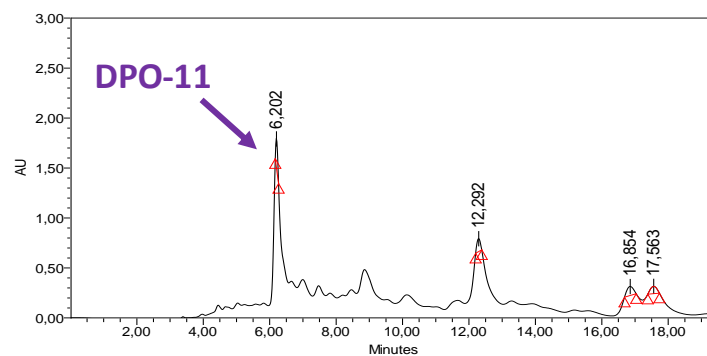
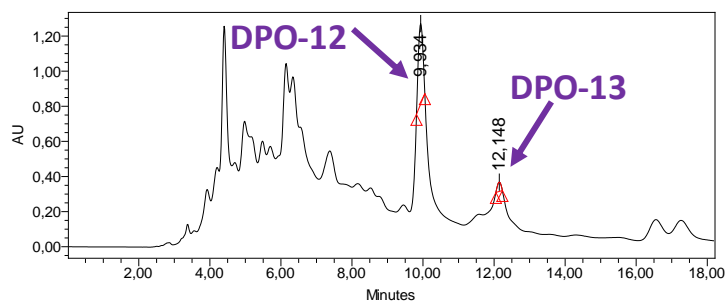
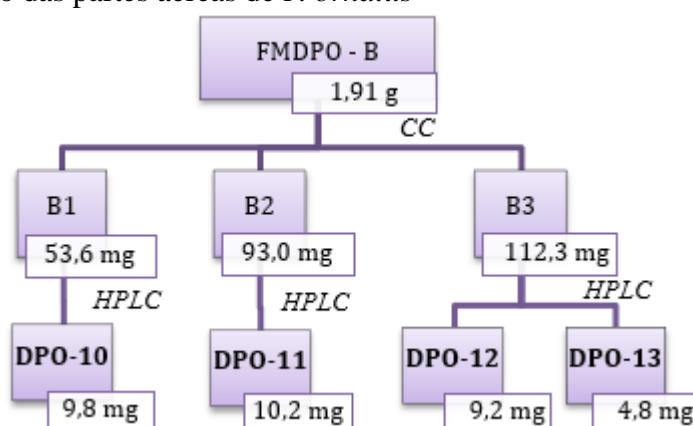


Figura 9 - Cromatograma HPLC-UV (210-400 nm) referente ao isolamento das substâncias DPO-12 e DPO-13



Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com a 80% - B da fração metanólica do decocto das partes aéreas de *P. ornatus*



Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.5 Testes biológicos dos decoctos de *Plectranthus*: *P. ornatus*, *P. barbatus*, *P. amboinicus* e *P. grandis*

O primeiro teste realizado, inibição da  $\alpha$ -glicosidase, foi escolhido em função da composição dos decoctos dos espécimes em estudo, visto que se trata de um material rico em compostos glicosilados e o fármaco utilizado, a acarbose (FIGURA 10), é um produto natural glicosilado. Já o segundo teste realizado, viabilidade celular, foi direcionado para células de origem gástrica afim de correlacionar os chás estudados com o uso popular.

### 5.5.1 Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase

O ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, com os decoctos dos espécimes das espécies de *Plectranthus* estudadas, foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e

Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob supervisão da professora Maria Teresa Salles Trevisan.

#### 5.5.1.1 Princípio do teste

A análise colorimétrica verifica a conversão de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) em *p*-nitrofenol (*p*NP) a partir da enzima  $\alpha$ -glicosidase. A conversão de *p*NPG em *p*NP, na presença da enzima  $\alpha$ -glicosidase, gera uma solução amarela. Quando há inibição da enzima pela presença de alguma substância na solução, a intensidade da cor da solução diminui. E essa variação de intensidade é medida em um espectrofotômetro.

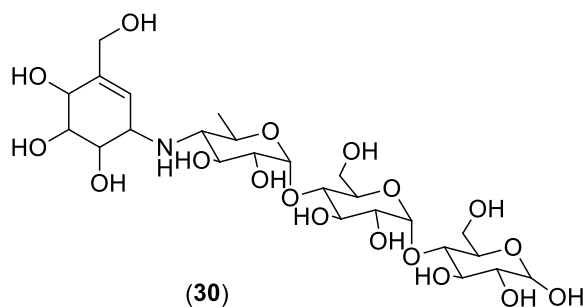
No organismo, a enzima  $\alpha$ -glicosidase participa da conversão de carboidratos em monossacarídeo (moléculas menores que os carboidratos), o que aumenta a concentração de glicose no sangue. Logo, a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase indicaria uma diminuição da concentração de glicose no sangue (SHINDE *et al.*, 2008). Desta forma, o material testado com essa atividade poderia vir a ser um agente redutor de glicemia.

#### 5.5.1.2 Procedimento experimental

Em eppendorfs de 1,5 mL, 20  $\mu$ L da amostra foi pré-incubada em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) com 10  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -glicosidase durante 5 minutos a 25° C. A reação foi iniciada pela adição de 40  $\mu$ L da solução *p*-NPG. A reação foi incubada a 37° C, durante 30 minutos, em um agitador (Thermomixer comfort da Eppendorf, Alemanha). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 10%. Por último, 100  $\mu$ L de cada amostra foi transferido para microplacas de 96 poços e a absorbância lida a 405 nm em leitora de Elisa ThermoPlate (Leitor de microplacas - TP-READER Thermo Plate).

Foram utilizadas amostras contendo o extrato vegetal e *p*-NPG, com e sem enzima, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do *p*-NPG. Para branco, foi usado o tampão fosfato com a enzima. Como controle positivo foi utilizado a acarbose (Glucobay®) 100 mg /mL. A acarbose (**30**) é um fármaco utilizado como redutor de glicemia. As demais soluções foram preparadas de modo que a concentração final foi de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 10 - Representação estrutural da Acarbose



### 5.5.2 Ensaio de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular, com os decoctos dos espécimes de *Plectranthus* estudadas, foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob supervisão da professora Flávia Almeida Santos.

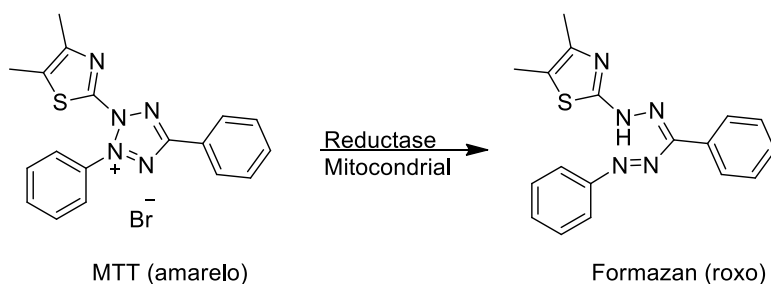
#### 5.5.2.1 Princípio do teste

Ensaio de viabilidade celular são frequentemente realizados colocando o material direta ou indiretamente em contato com células isoladas, permitindo a avaliação da citotoxicidade por diferentes parâmetros, com alterações na integridade da membrana celular, inibição enzimática e alterações na atividade metabólica da célula, baseados na absorção óptica e análise da diminuição da função celular através de produtos enzimáticos que determinam atividades vitais. A avaliação da toxicidade dos decoctos de *Plectranthus* foi realizada com o intuito de avaliar a segurança das preparações.

O teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio) é um método colorimétrico utilizado para determinar a viabilidade celular, realizado pela análise da atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O MTT (sal de coloração amarela e hidrossolúvel), quando em contato com células viáveis, é reduzido pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que compõe a cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal de cor púrpura (Formazan). A análise colorimétrica verifica a conversão do MTT em formazan (FIGURA 11), a partir de enzimas mitocondriais presentes somente em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). Deste modo, o teste permite definir a citotoxicidade do material em questão, mas não o mecanismo de ação.



Figura 11 – Esquema de conversão de MTT em Formazan



#### 5.5.2.2 Procedimento experimental

Células AGS – ATCC CRL1739 (adenocarcinoma gástrico humano) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM (Gibco Invitrogen, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade relativa.

Células AGS foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> células/poço e incubadas a 37 °C por 24 h. As células foram pré-tratadas com diferentes concentrações dos extratos em estudo (3-800 mg/mL), DMSO 1% (controle – veículo) ou Triton X-100 (0,2% - controle positivo) por 24 h e depois adicionou-se MTT (1 mg/mL) a cada poço. Após 4 h, o meio foi removido e adicionou-se DMSO (100 µL). A absorbância foi detectada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, USA). A inibição do crescimento celular foi calculada como descrito:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}).$$

Os compostos foram diluídos em 1% de DMSO. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir das curvas concentração-resposta e três experimentos independentes foram realizadas em triplicata. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP). As diferenças nos valores médios entre os grupos foram analisadas por uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey utilizando o programa *GraphPad Prism* (GraphPad Prism versão 5.01 para Windows, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Determinação estrutural

A interpretação das informações fornecidas pela espectroscopia de RMN (uni e bidimensional) e espectrometria de massa (EM), ferramentas usadas para a elucidação estrutural de substâncias orgânicas, são essenciais para a química de PN. A elucidação das estruturas de todos os compostos isolados neste trabalho se deu pelo uso destas técnicas, cujas informações obtidas serão descritas a seguir. O estudo do chá da parte aérea de *P. ornatus* resultou no isolamento de treze compostos: três compostos fenólicos (DPO-1, DPO-8 e DPO-9), um diterpeno labdano glicosilado (DPO-2), um dissacarídeo (DPO-3), quatro flavonoides glicosilados (DPO-4, DPO-5, DPO-6 e DPO-7), três diterpenos abietanos (DPO-10, DPO-11 e DPO-12) e um diterpeno clerodano (DPO-13).

#### 6.1.1 Determinação estrutural de DPO-1

Após o fracionamento cromatográfico da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 40% em Sephadex LH-20 (item 5.4.4.1) obteve-se um sólido alaranjado codificado como DPO-1 (114,4 mg).

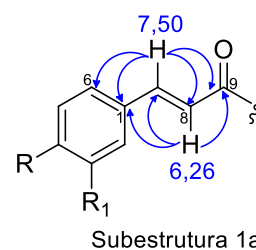
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 14) apresentou sinais de hidrogênios na região de aromáticos característicos de dois sistemas aromáticos de spin ABX um em  $\delta_H$  7,02 (d,  $J= 1,9$  Hz, H-2), 6,76 (d,  $J= 8,2$  Hz, H-5) e 6,91 (dd,  $J=1,9; 8,2$  Hz, H-6) e o outro sistema em  $\delta_H$  6,77 (sl, H-2'), 6,68 (d,  $J= 8,1$  Hz, H-5') e 6,63 (dd,  $J= 1,9; 8,0$  Hz, H-6'). Constante de acoplamento na faixa 6-10 Hz em um sistema aromático sugere posição *orto* dos hidrogênios (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010). Logo, se supõe que hidrogênios com esta mesma constante de acoplamento estejam nesta disposição na molécula. Os deslocamentos químicos em  $\delta_H$  7,50 (d, H-7) e em  $\delta_H$  6,26 (d, H-8) apresentam constante de acoplamento de  $J= 15,9$  Hz, o que sugere que eles façam parte de uma dupla ligação em posição *trans*. Além disso, foram observados os sinais em  $\delta_H$  5,09 (1H, dd,  $J= 3,4; 9,5$  Hz, H-8'), correspondente à um hidrogênio oximetínico, e dois sinais em  $\delta_H$  2,94 (1H, dd,  $J= 9,7; 14,3$  Hz, H-7' $\beta$ ) e  $\delta_H$  3,10 (1H, dd,  $J= 3,5; 14,3$  Hz, H-7' $\alpha$ ) correspondentes à hidrogênios diastereotópicos. Estes sinais mostraram correlação entre si no espectro COSY (FIGURA 16) mostrando contiguidades desses hidrogênios.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 15) apresentou linhas espectrais correspondente a 18 átomos de carbono cujo padrão de hidrogenação foi determinado pelo

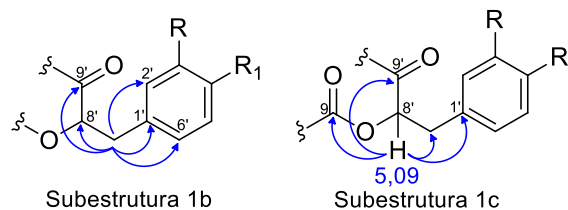
espectro de carbono-13 APT (FIGURA 17), sendo possível definir a existência de um carbono metilênico, nove carbonos metínicos (1  $sp^3$  e 8  $sp^2$ ) e oito carbonos não hidrogenados. Os carbonos não hidrogenados em  $\delta_C$  177,7 (C-9') e 169,3 (C-9) são característicos de carbonila, sendo o mais protegido inferido à um ester enquanto o outro foi associado à um ácido carboxílico.

O espectro de RMN 2D  $^1H,^{13}C$  – HSQC (FIGURA 18) foi importante para diferenciar os hidrogênios dos sistemas ABX, sendo assim possível atribuir cada hidrogênio a seu respectivo carbono, conforme mostrado na Tabela 3.

A completa elucidação da estrutura DPO-1 foi realizada com às correlações a longa distância observadas no espectro de RMN 2D  $^1H,^{13}C$  – HMBC (FIGURA 19). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  7,50 apresentou correlações com o carbono de dupla ligação C-8 ( $\delta_C$  115,7) e com os carbonos aromáticos C-1 ( $\delta_C$  128,1) e C-6 ( $\delta_C$  122,9), justificando um sistema aromático  $\alpha,\beta$ -conjugado com a carbonila de éster. O outro hidrogênio olefínico ( $\delta_H$  6,26) também apresentou correlação com C-1 ( $\delta_C$  128,1), C-9 ( $\delta_C$  169,3) e com C-7 ( $\delta_C$  146,8), confirmando a Subestrutura 1a.

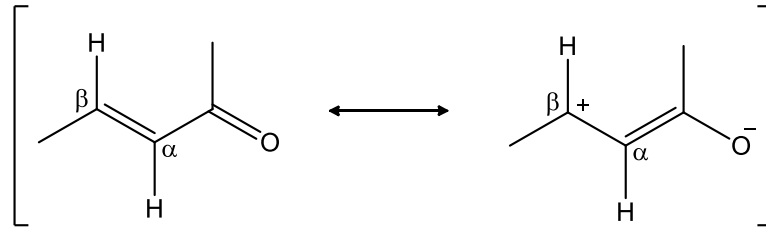


Através das correlações à longa distância observadas para os hidrogênios benzílicos diasterotópicos (2H-7') com os carbonos C-8' ( $\delta_C$  77,8), C-2' ( $\delta_C$  117,6), C-6' ( $\delta_C$  121,8), C-1' ( $\delta_C$  131,3) e com a carbonila em  $\delta_C$  177,7, foi possível sugerir a Subestrutura 1b. A união das subestruturas 1a e 1b foi realizada através das correlações do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  5,09 com a carbonila do éster em  $\delta_C$  169,3 (Subestrutura 1c).



Através dos dados acima discutidos chegou-se a estrutura planar de DPO-1 (FIGURA 13). Comparando os dados com os de Kuhnt *et al.* (1994), chegou-se ao composto conhecido como ácido rosmarínico. Entretanto, vale ressaltar que na referência houve inversão de valores de deslocamento químicos de H-7 e H-8 no artigo apresentado. De fato, quando comparado a dados em outros solventes, como DMSO e acetona, os valores de deslocamento de hidrogênio apresentado neste trabalho estão de acordo com a literatura (ELMASTAS *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 1998). Esta constatação pode ser justificada por analogia ao conceito de que “hidrogênios na posição  $\beta$  à uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada estão desblindados por ressonância” (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010, FIGURA 12). Assim, o H-7 apresentará maior deslocamento químico que o H-8.

Figura 12 – Estruturas de ressonância de hidrogênio  $\beta$  à uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada



O ácido rosmarínico (DPO-1 – FIGURA 13) é amplamente encontrado em espécies de plantas da família das Lamiaceae. Além de estar presente nos extratos orgânicos de outras espécies de *Plectranthus*, no chá ele aparece como composto majoritário em várias espécies do gênero em questão (BRITO *et al.*, 2018). O ácido rosmarínico é de amplo interesse pois apresenta diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica e bactericida (KIM *et al.*, 2015).

Figura 13 – Representação estrutural do composto DPO-1

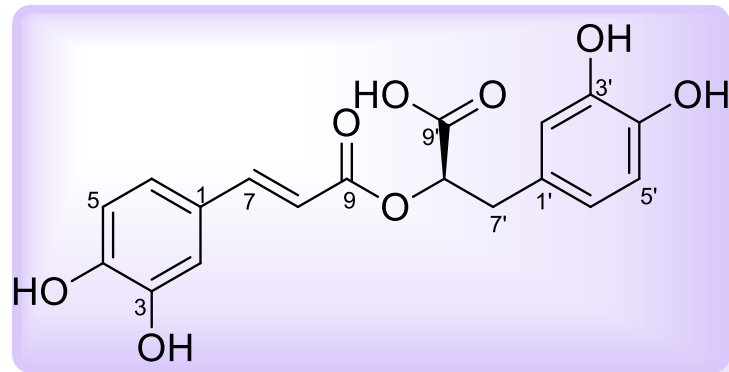


Tabela 3 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300 x 125 MHz, MeOD,  $J$  em Hz) de DPO-1 comparados com valores da literatura (400 x 100 MHz, MeOD) (KUHNT; RIMPLER e HEINRICH, 1994)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
1	128,1	127,9	-	H-7	H-5 H-8	-
2	115,3	115,6	7,02 (1H, d, $J= 1,9$ )		H-7 H-6	7,03 (1H, d, $J= 2,3$ )
3	149,4	149,4	-	H-2	H-5	-
4	146,8	146,7	-	H-5	H-2 H-6	-
5	116,6	116,5	6,76 (1H, d, $J= 8,2$ )			6,76 (1H, d, $J= 8,3$ )
6	122,9	122,9	6,91 (1H, dd, $J=1,9; 8,2$ )		H-2 H-7	6,92 (1H, dd, $J= 2,3; 8,3$ )
7	146,8	146,7	7,50 (1H, d, $J=15,9$ )		H-2 H-6	6,25 (1H, d, $J= 15,8$ )
8	115,7	115,6	6,26 (1H, d, $J= 15,9$ )	H-7		7,50 (1H, d, $J=15,8$ )
9	169,3	169,1	-	H-8	H-7 H-8'	-
1'	131,3	131,1	-	H-7'	H-8'	-
2'	117,6	117,5	6,77 (1H, sl)		H-7' H-6'	6,77 (1H, d, $J= 2,3$ )
3'	146,0	145,9	-	H-2'	H-5'	-
4'	144,8	144,8	-	H-5'	H-2' H-6'	-
5'	116,3	116,2	6,68 (1H, d, $J= 8,1$ )			6,67 (1H, d, $J= 8,3$ )
6'	121,8	121,8	6,63 (1H, dd, $J= 1,9; 8,0$ )		H-2' H-7'	6,62 (1H, dd, $J= 2,3; 8,3$ )
7'	38,9	38,8	3,10 (1H, dd, $J= 3,5; 14,3$ ) 2,94 (1H, dd, $J= 9,7; 14,3$ )	H-8'	H-2' H-6'	$\alpha$ 3,10 (1H, dd, $J= 3; 14,3$ ) $\beta$ 2,93 (1H, dd, $J= 9,8; 14,3$ )
8'	77,8	77,6	5,09 (1H, dd, $J= 3,4; 9,5$ )	H-7'		5,09 (1H, dd, $J= 3,0; 9,8$ )
9'	177,7	177,9	-	H-8'	H-7'	-

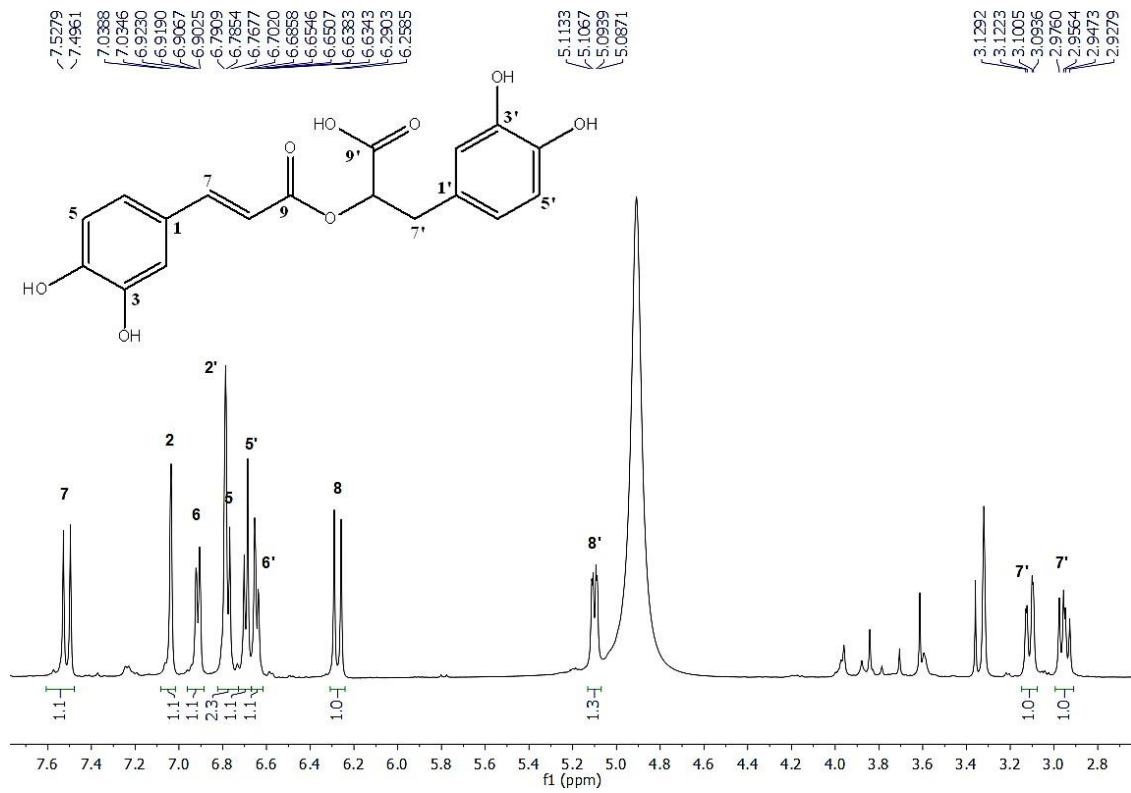
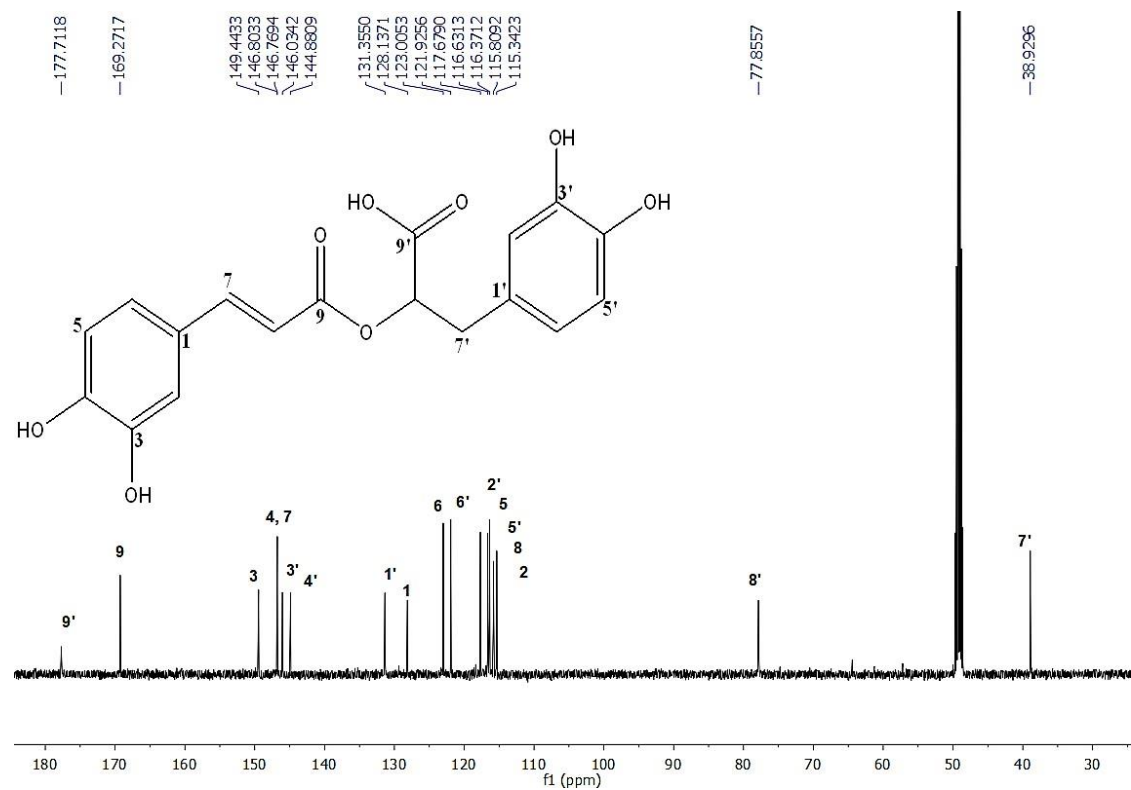
Figura 14 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) de DPO-1Figura 15 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) de DPO-1

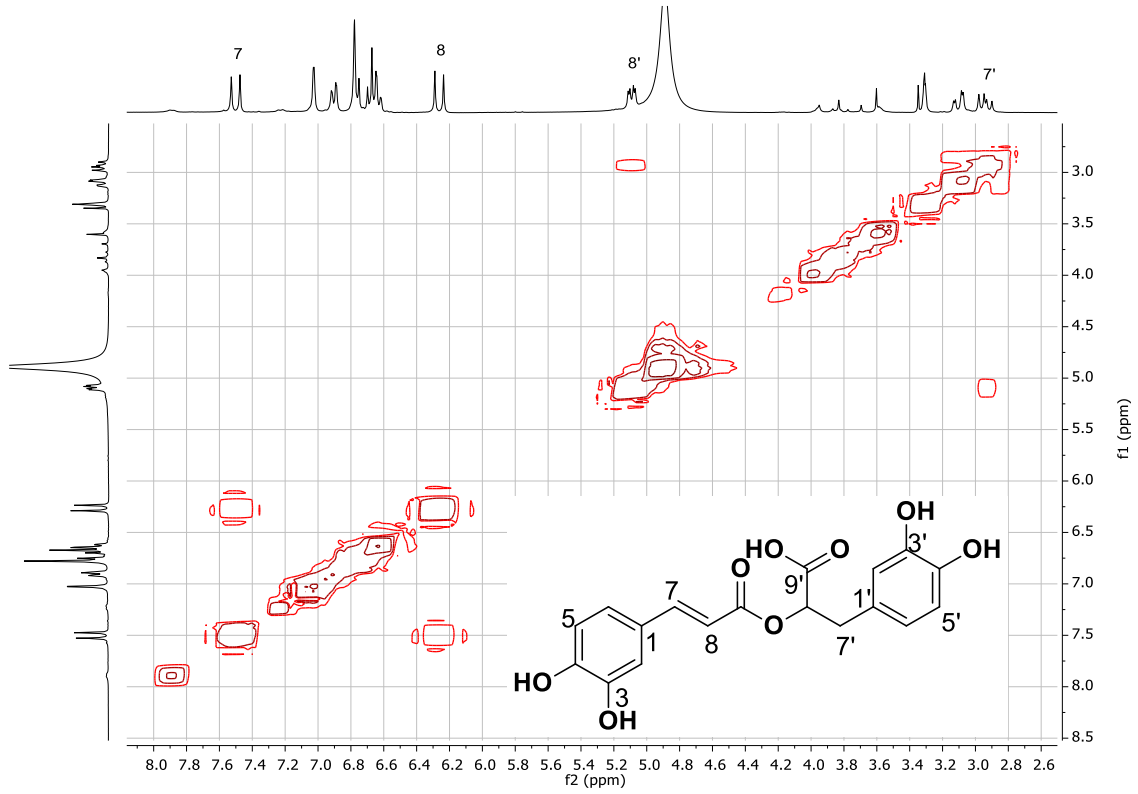
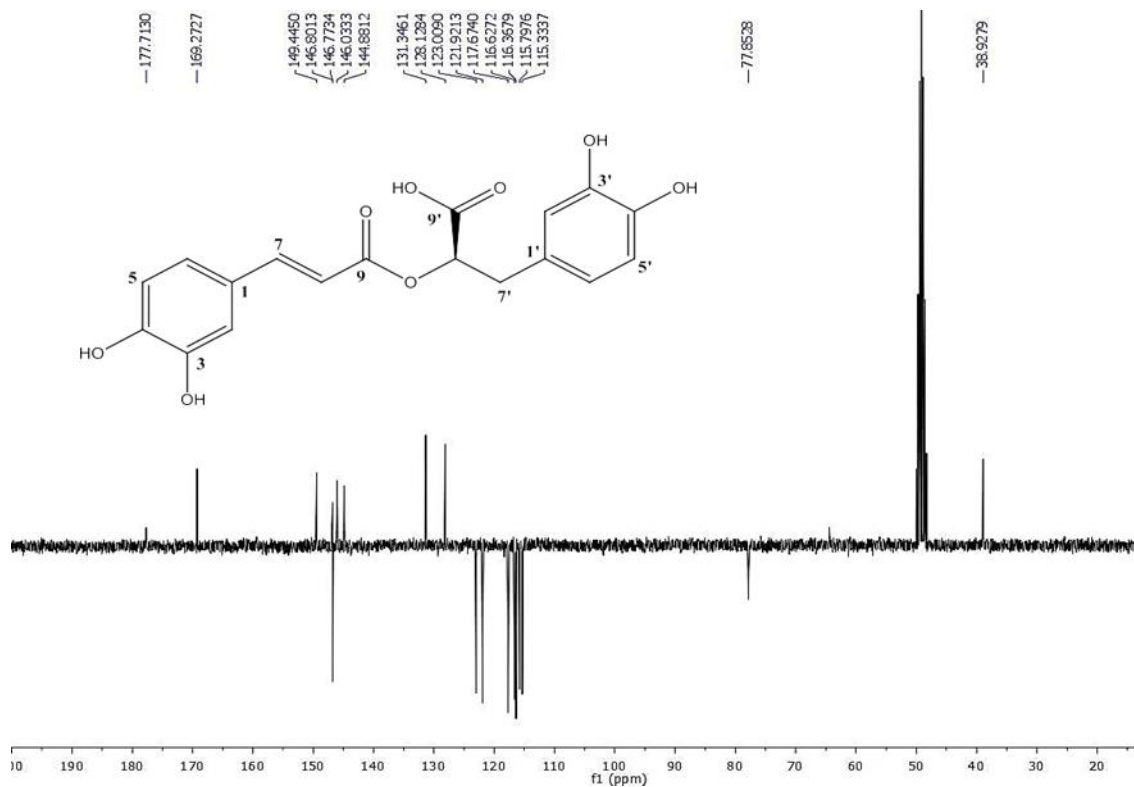
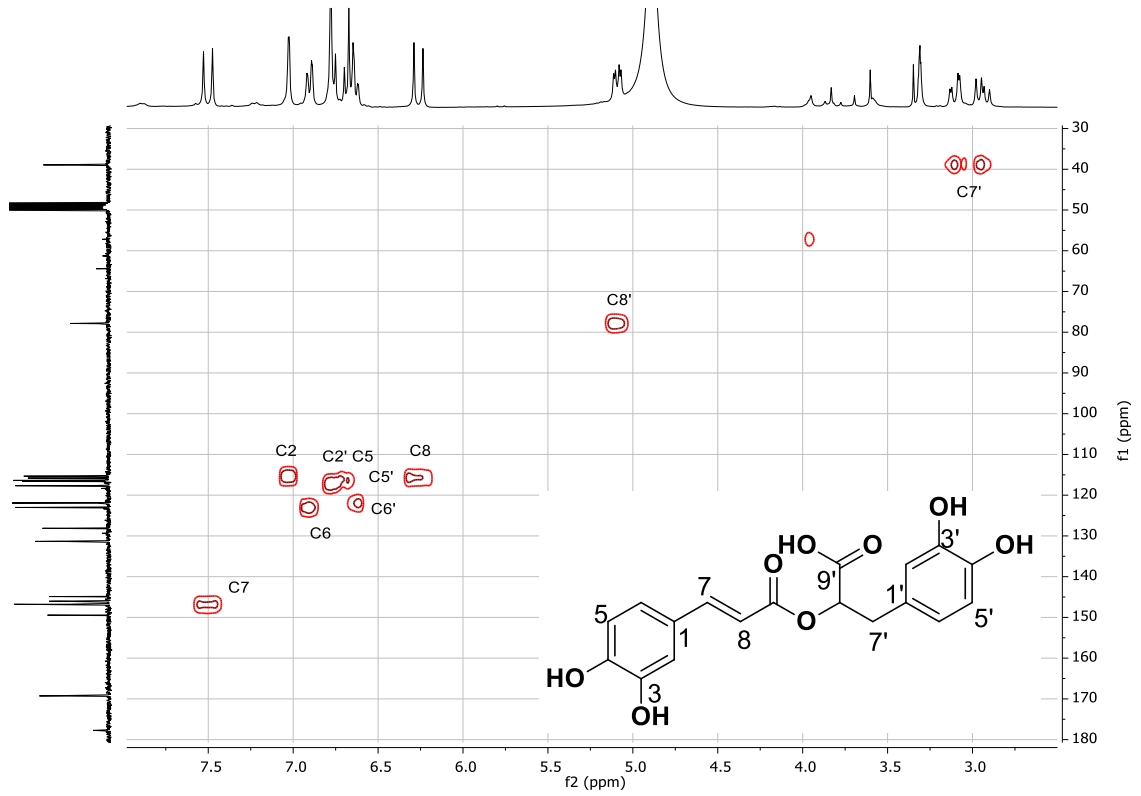
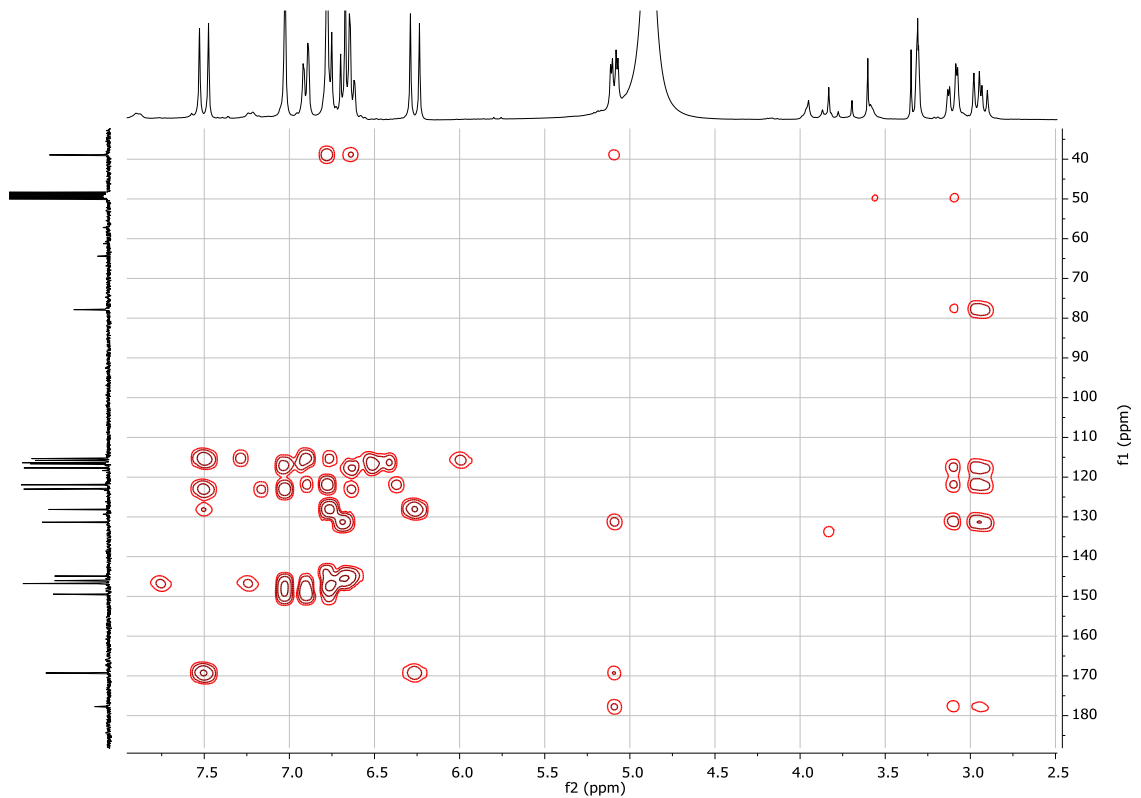
Figura 16 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (300 MHz, MeOD) de DPO-1Figura 17 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  APT (75 MHz, MeOD) de DPO-1

Figura 18 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-1Figura 19 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-1



### 6.1.2 Determinação estrutural de DPO-2

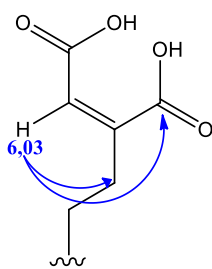
O composto designado DPO-2 (6,6 mg), uma resina marrom com rotação  $[\alpha]_D^{21} - 47,67^\circ$  ( $c$  0.11; MeOH), foi obtido da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% (FLUXOGRAMA 2) após fracionamento em Sephadex LH-20 e SPE (item 5.4.4.2).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 23) apresentou um sinal na região de olefina em  $\delta_H$  5,27 (m, H-7), indicando uma dupla ligação trissubstituída. Um conjunto de sinais na faixa de  $\delta_H$  4,76-3,95 foi compatível com uma unidade de glicose. Além disso, revelou sinais para uma série de hidrogênios metilênicos, incluindo dois pares de hidrogênios diastereotópicos ligados à carbono oxigenado em  $\delta_H$  3,10; 3,90 (d, 2H-19) e em  $\delta_H$  4,40; 4,57 (dd, 2H-6'). Adicionalmente, apresentou sinais para três grupos metilas em  $\delta_H$  0,72 (Me-20),  $\delta_H$  0,82 (Me-18) e  $\delta_H$  1,73 (Me-17). Dentre os sinais na região de alifáticos, foi verificado que os sinais em  $\delta_H$  1,11 e em  $\delta_H$  2,90 são característicos de impureza de solvente, referente a trietilamina (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010).

Através do espectro <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HSQC (FIGURA 24), verificou-se sinais para dezenove átomos de carbono classificados como metínicos (8), metilênicos (8) e metílicos (3) (TABELA 4). Enquanto que, quatro carbonos não hidrogenados foram deduzidos pelas correlações observadas no espectro de HMBC (FIGURA 25).

O espectro de massa de alta resolução de DPO-2 (FIGURA 26) apresentou, no modo positivo, um pico referente à molécula de aduto  $[M + Na]^+$  em  $m/z$  535,2512, e aquele referente à molécula protonada  $[M + H]^+$  em  $m/z$  513,2700 (FIGURA 21), compatíveis com a fórmula molecular C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub> a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio igual a sete.

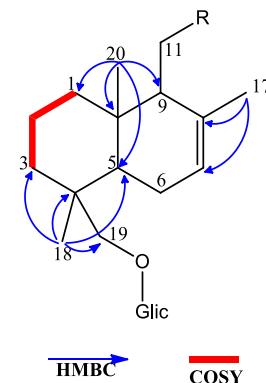
Para nossa surpresa, esta fórmula não foi compatível com o número de carbonos apresentados pelos espectros de HSQC e HMBC. Desta forma, foram obtidos espectros em metanol. No espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 28), foi observado dois sinais na região de



olefina em  $\delta_H$  5,44 (H-7) e em  $\delta_H$  6,03 (H-14), indicando duas duplas trissubstituídas ao invés de uma como observado no espectro realizado em piridina. No espectro HSQC (FIGURA 29), o sinal em  $\delta_H$  6,03 mostrou correlação com um sinal em  $\delta_C$  123,85 e no espectro HMBC (FIGURA 30), esse mesmo sinal, mostrou correlação com os carbonos em  $\delta_C$  38,86 e 171,77. Entretanto, não foi possível atribuir valores para C-13 e C-15.

Curiosamente, tanto o sinal em  $\delta_H$  6,03 como os sinais de carbono em  $\delta_C$  123, 85 e  $\delta_C$  171,77 não apareceram no espectro com piridina.

Uma análise dos deslocamentos químicos dos RMN de  $^{13}\text{C}$ , levou-nos a sugerir para DPO-2, um diterpeno glicosilado, com o esqueleto de um labdano, comum no gênero *Plectranthus* (LUKHOBÁ; SIMMONDS e PATON, 2006). O esqueleto básico e a posição da molécula de glicose foram confirmados pelas correlações de HMBC (FIGURA 25). Onde, Me-20 apresentou correlação com C-1, C-5, C-9 e C-10, Me-18 com C-3, C-4, C-5 e C-19. Além das correlações observadas no espectro de COSY (FIGURA 27). A dupla ligação foi posicionada pelas correlações apresentadas pela Me-17, assim também como foi atribuído o valor do deslocamento de C-8.



Verificou-se na literatura o isolamento do composto majoritário denominado como neoandrografolida, de uma planta medicinal, *Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae), que é da mesma ordem (Lamiales) que a *P. ornatus*. Desse composto, foi realizado reação de oxidação, onde obteve-se, como produto, o composto com parte da estrutura como apresentado na Figura 14, Subestrutura 2. Onde, a partir da proposta do mecanismo de reação, explicar-se-ia a ausência dos sinais pela interconversão intramolecular (FIGURA 20). E desta forma, justifica a dificuldade em se observar os valores de deslocamento químico desta parte da estrutura, pois se trata de uma região instável da estrutura. O produto da reação é similar à estrutura de DPO-2 e solúvel em água, já neoandrografolida é hidrofóbico (KAMDEM; SANG e HO, 2002). O produto da reação foi utilizado para comparação dos dados de RMN. A diferença entre ele e o composto isolado de *P. ornatus* está na posição da dupla em C-8, visto que em DPO-2 a dupla é endocíclica. O padrão de fragmentação (FIGURA 21) foi crucial para a confirmação da estrutura. E desta forma, a estrutura de DPO-2 (FIGURA 22) está sendo relatada pela primeira vez na literatura sendo nomeado como ácido 19- $\beta$ -D-glicopiranosil-labd-7,13-dieno-15,16-dióico.

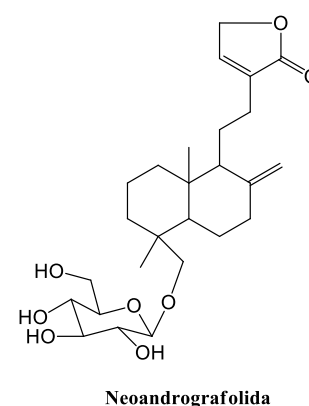
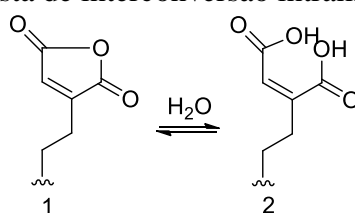


Figura 20 – Proposta de interconversão intramolecular de DPO-2



Fonte: Adaptado de KAMDEM *et al.*, 2002

Compostos terpênicos do tipo labdano possuem diversas atividades biológicas como citotóxica, anti-inflamatória e bactericida (DEMETZOS e DIMAS, 2001). O labdano mais representativo isolado da *P. ornatus* é a forskolina (RIJO; SIMÕES e RODRÍGUEZ, 2005), pois é ativador da adenilato ciclase que está envolvida em uma variedade de propriedades farmacológicas como efeitos no trato gastrointestinal e cardiovasculares (ALASBAHI e MELZIG, 2010).

Figura 21 – Proposta de fragmentação de DPO-2

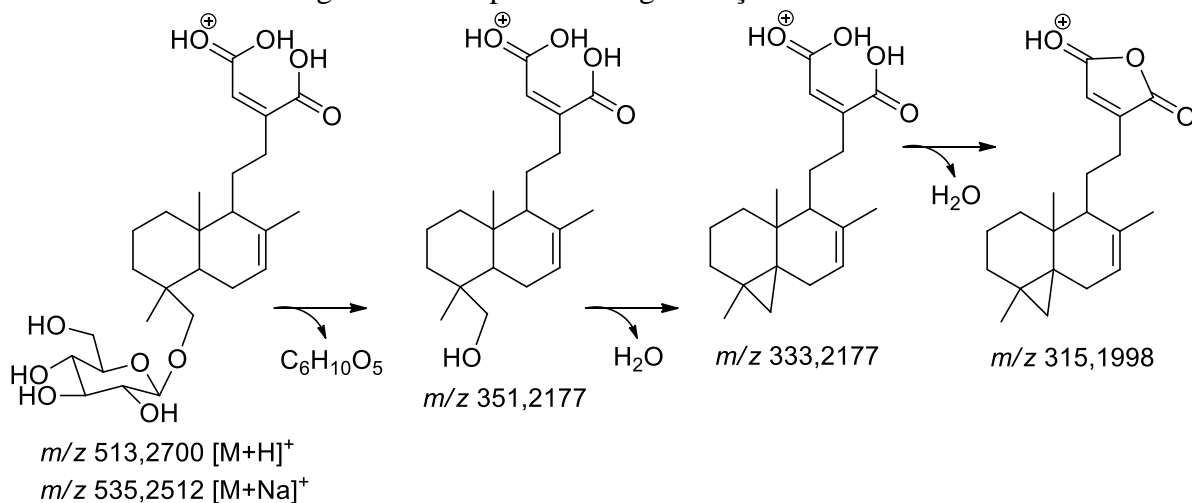


Figura 22 – Representação estrutural do composto DPO-2

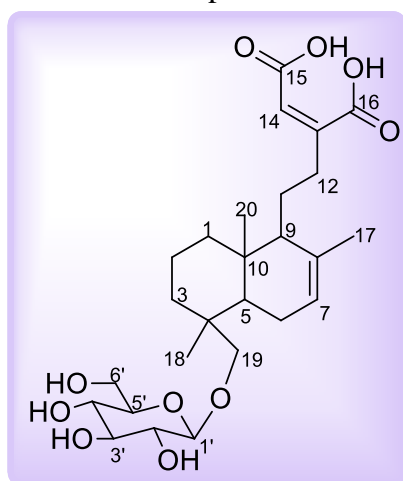


Tabela 4 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-2 comparados com valores da literatura (600 x 150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (KAMDEM; SANG e HO, 2002)

#	$\delta_{\text{C}}$ Piridina	$\delta_{\text{C MeOH}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H Piridina}}$	$\delta_{\text{H MeOH}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
1	38,35	39,87	41,0	0,84 (m) 1,78 (m)	1,06 1,90		H-20	-
2	18,35	19,21	21,3	1,34 (m) 1,45 (m)	-			-
3	36,04	38,34	36,6	1,80 (m) 1,37 (m)	-			-
4	37,25	37,79	42,0	-				-
5	43,34	44,62	58,3	1,72 (m)	1,68		H-18 H-20	-
6	23,61	24,69	27,0	1,76 (m) 2,01 (m)	-	H-5		-
7	122,25	123,85	38,4	5,27 (m)	5,44		H-17	-
8	134,87	135,94	155,3	-		H-17		-
9	54,32	55,57	58,9	1,54 (m)	1,69		H-20	-
10	36,49	37,18	40,6	-	-	H-20		-
11	27,16	27,44	24,6	1,55 (m) 1,81 (m)	-			-
12	38,85	38,86	40,8	2,43 (m) 2,85 (m)	2,31 2,68		H-14	-
13	-	-	122,1	-	-			-
14	-	123,85	152,7	-	6,03			5,56 (1H, s)
15	-	-	177,4	-	-			-
16	-	171,77	181,7	-	-		H-14	-
17	22,11	22,55	108,7	1,73 (3H, s)	1,75			4,85 (1H, sl, 17a) 4,63 (1H, sl, 17b)
18	17,81	18,29	29,7	0,82 (3H, s)	0,93			1,06 (3H, s)
19	78,87	80,02	76,4	3,10 (1H, d, $J=9,7$ ) 3,90 (1H, d, $J=9,7$ )	2,99 3,70			4,13 (1H, d, $J=9,6$ , 19a)
20	14,03	14,47	17,6	0,72 (3H, s)	0,85			0,74 (3H, s)
1'	105,57	105,24	106,3	4,76 (1H, d, $J=7,8$ )	4,22			4,20 (1H, d, $J=7,8$ )
2'	75,03	75,32	76,1	4,00 (m)	-			-
3'	78,30	78,37	78,6	3,95 (m)	-			-
4'	71,47	71,73	72,5	4,21 (m)	-			-
5'	78,30	78,01	78,6	4,22 (m)	-			-
6'	62,62	63,05	63,5	4,40 (1H, dd, $J=5,3; 11,4$ ) 4,57 (1H, dd, $J=2,2; 11,4$ )	3,72			-

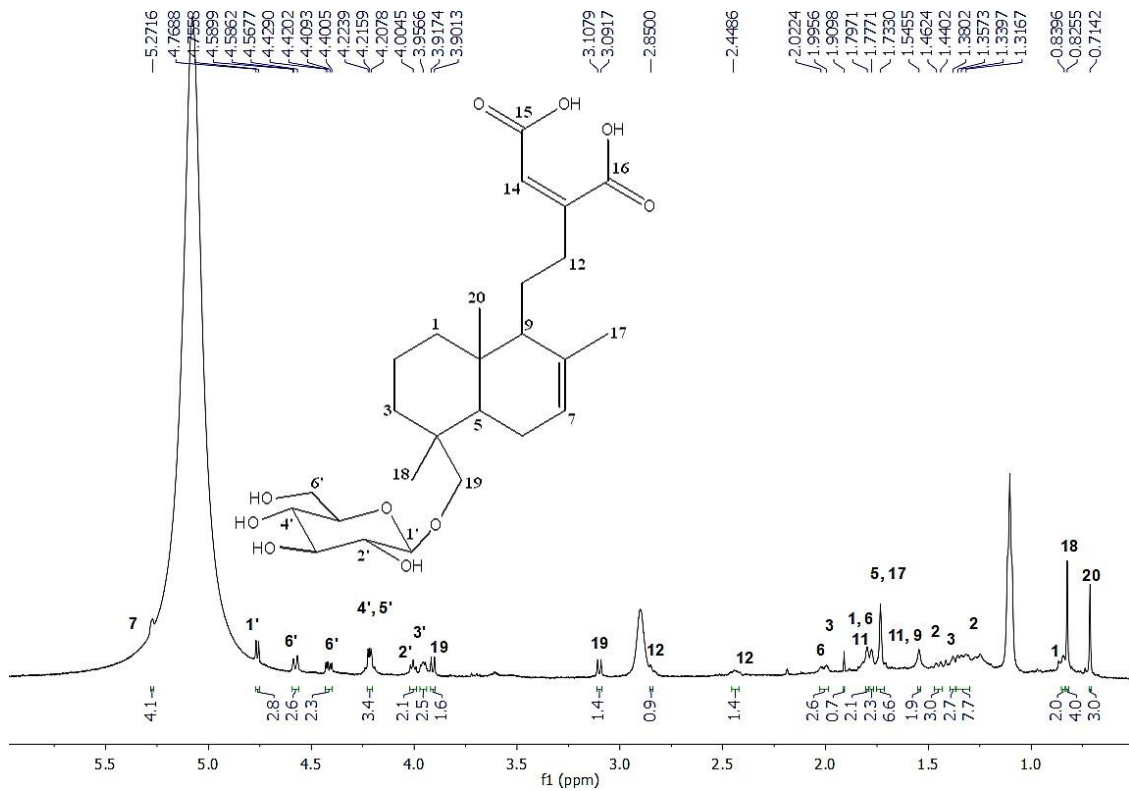
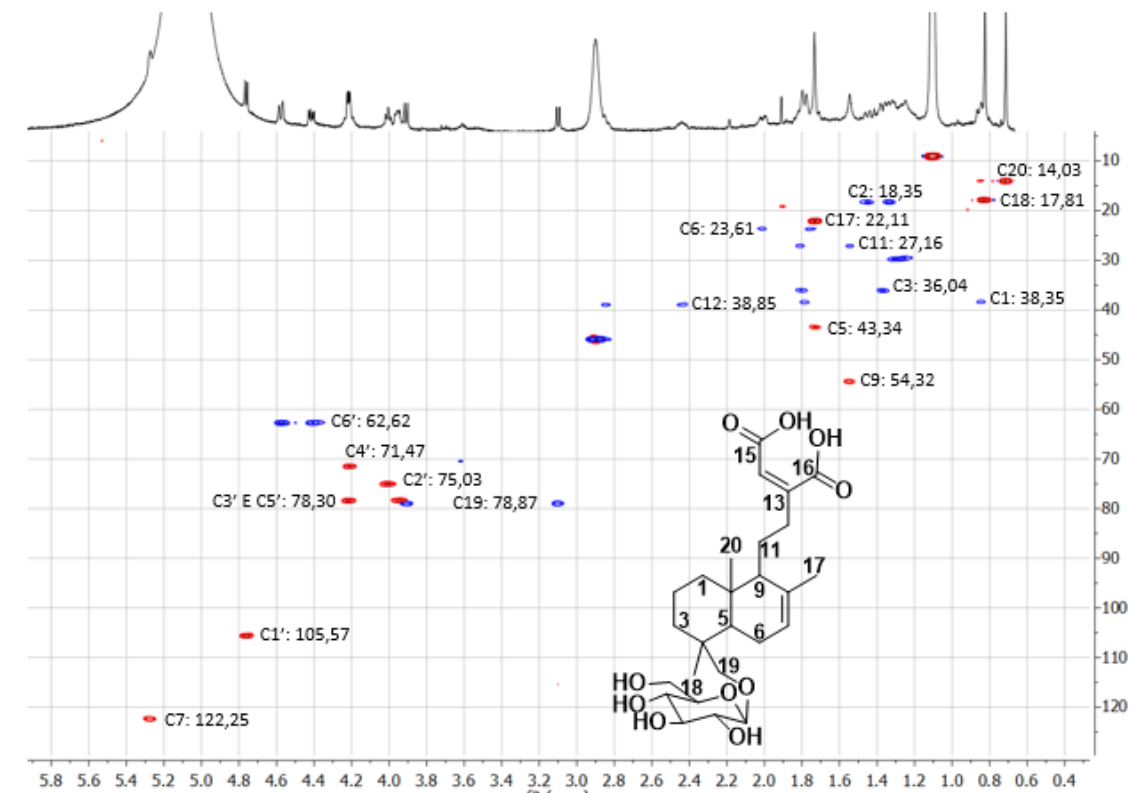
Figura 23- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2Figura 24 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2

Figura 25 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2

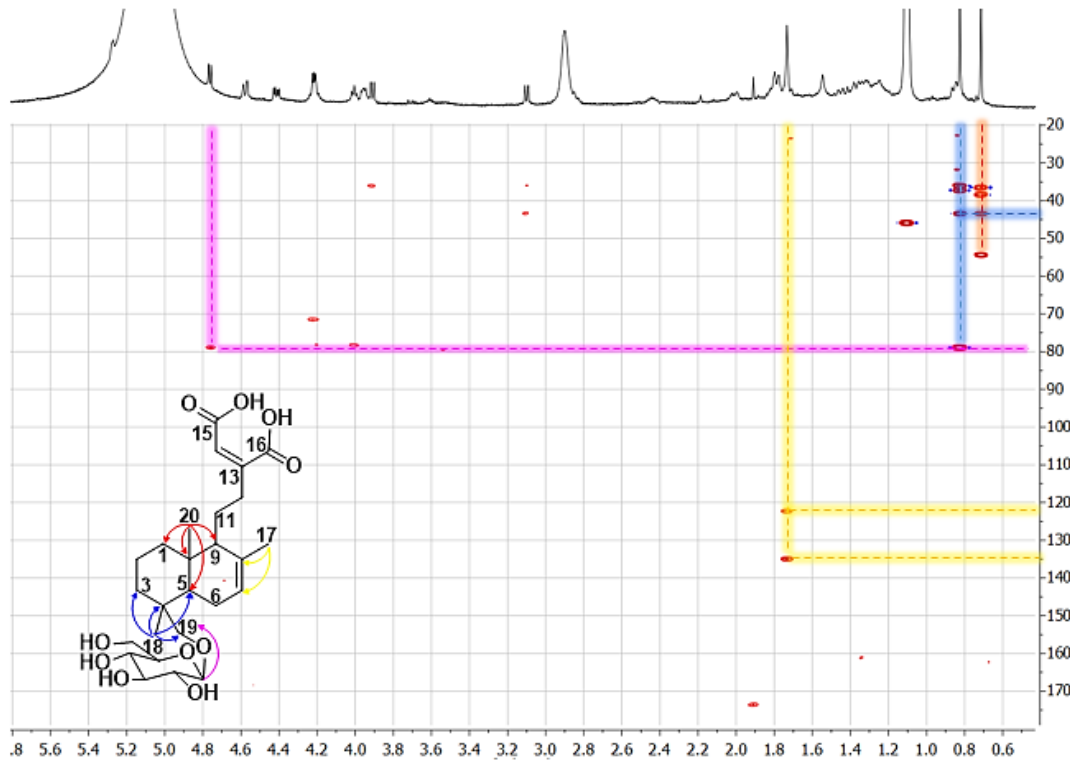


Figura 26 - Espectro de massas de DPO-2

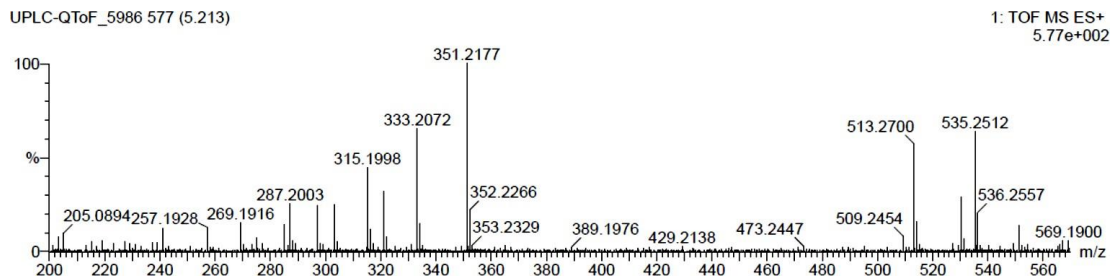


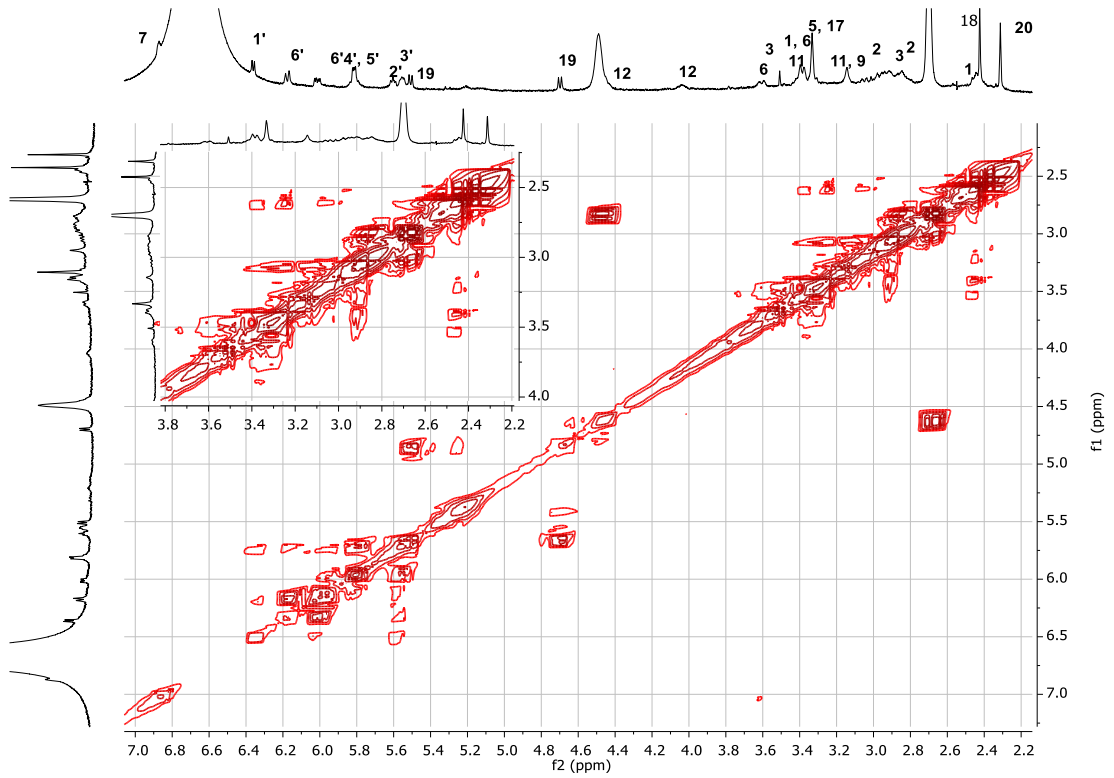
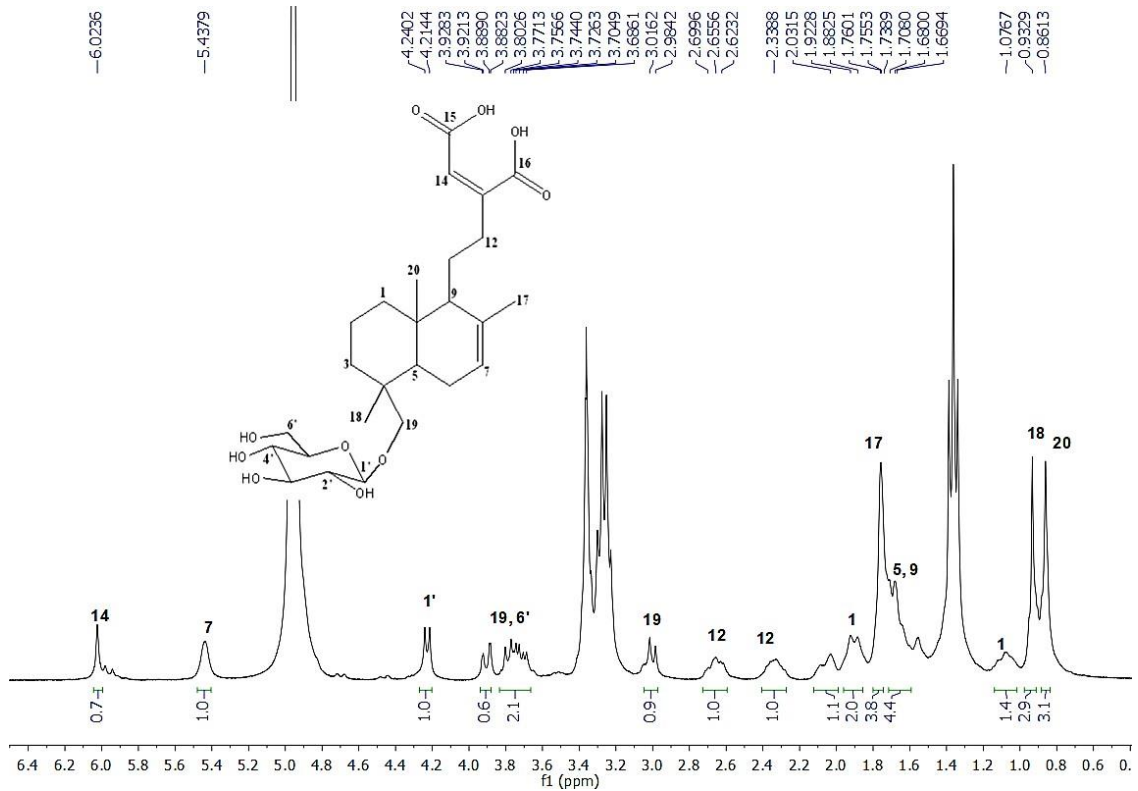
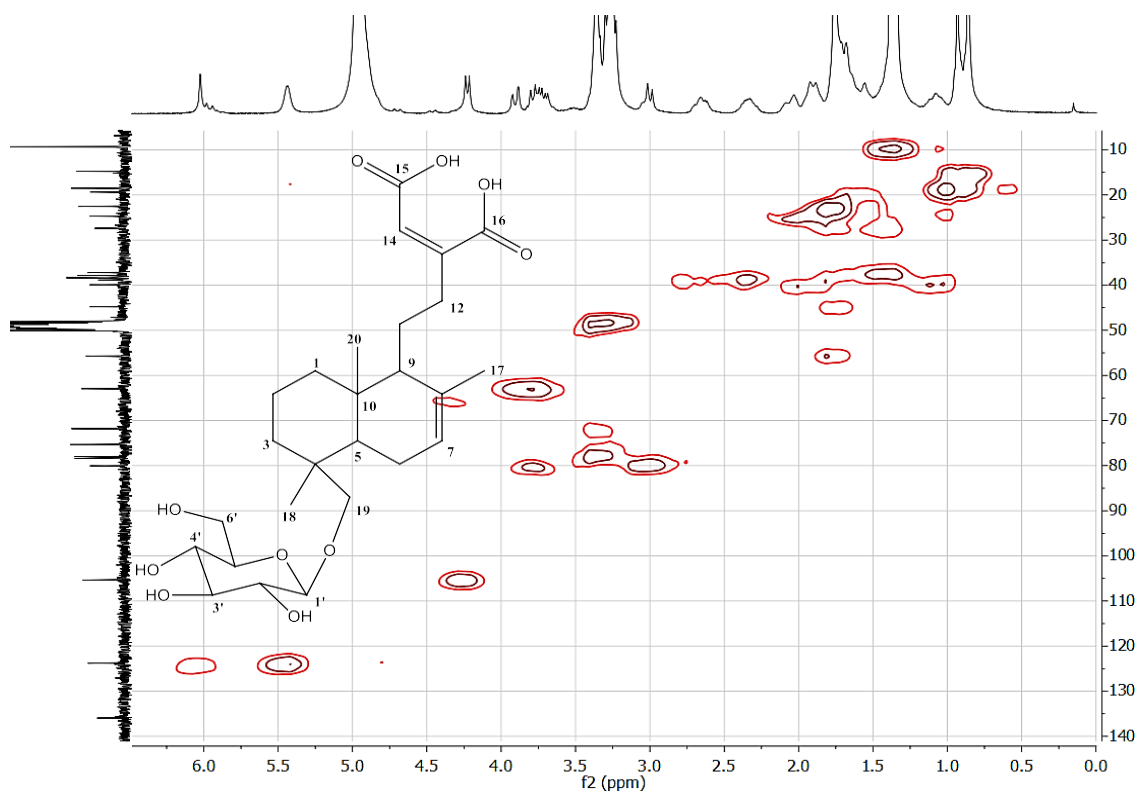
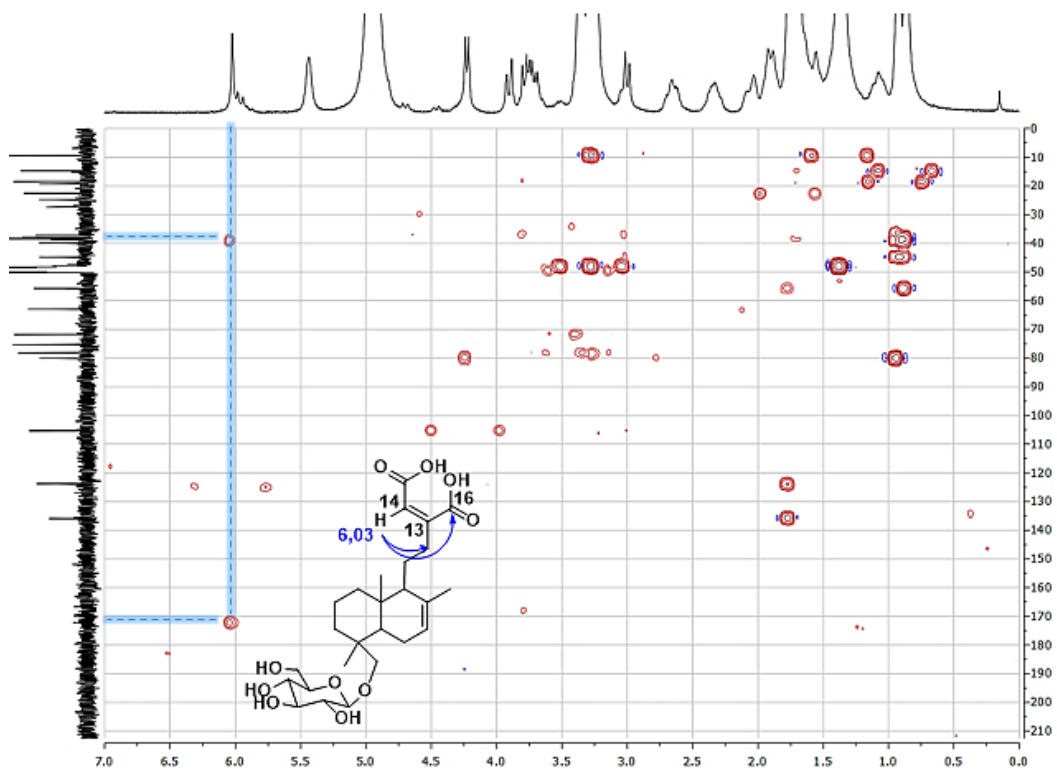
Figura 27- Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-2Figura 28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) de DPO-2

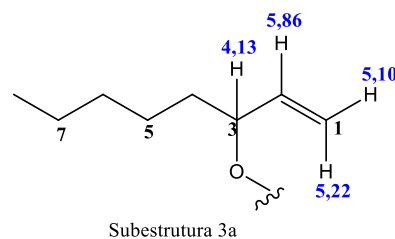
Figura 29 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-2Figura 30- Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-2



### 6.1.3 Determinação estrutural de DPO-3

O composto denominado DPO-3 (36,0 mg) foi isolado após sucessivos fracionamentos a partir da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% do extrato metanólico do decocto da *P. ornatus* (item 5.4.4.3, FLUXOGRAMA 2). DPO-3 se trata de um sólido amorfo branco.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 34) apresentou sinais na região de olefinas em  $\delta_H$  5,86 (1H, ddd,  $J= 6,7; 10,4; 17,3$  Hz, H-2), 5,22 (1H, ddd,  $J= 1,4; 2,6; 17,3$  Hz, H-1b) e em 5,10 (1H, ddd,  $J= 1,4; 2,6; 10,4$  Hz, H-1a) compatíveis com uma unidade vinílica. Adicionalmente, uma série de sinais para hidrogênios metínicos oxigenados ( $\delta_H$  3,13 - 4,34) foram observados. Sinais correspondentes a dois pares de hidrogênios oximetilênicos em  $\delta_H$  4,34 (1H, d,  $J= 6,1$  Hz, H-1'') e 4,31 (1H, d,  $J= 6,4$  Hz, H-1'), ambos correlacionados com os carbonos  $\delta_C$  105,4 e 103,4, respectivamente, no espectro HSQC (FIGURA 38). Estas informações foram sugestivas da presença dos açúcares glicose e xilose (COXON e JOHNSON, 1971; UTILLE e VOTTERO, 1980). Ainda, foram observados sinais em  $\delta_H$  4,13 (1H, dd,  $J= 6,7; 12,9$  Hz, H-3), na faixa de hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  1,74 – 1,25, e um sinal característico de metila em  $\delta_H$  0,89 (3H, t,  $J= 6,7$  Hz). Pela análise das constantes de acoplamento, pode-se sugerir a subestrutura 3a, onde  $J= 17$  Hz, observado para  $\delta_H$  5,86 e 5,22, é característico de hidrogênios em posição *trans*;  $J= 10$  Hz, para  $\delta_H$  5,86 e 5,10, é característico de hidrogênios em posição *cis*;  $J= 1,4$  Hz, visto para  $\delta_H$  5,22 e 5,10, é observado em hidrogênios em posição *geminal* de uma dupla ligação, e  $J= 6,7$  Hz apresentados em  $\delta_H$  5,86 e 4,13, é característico de hidrogênio olefínico *vicinal* à um CH (SILVERSTEIN; WEBSTER e KIEMLE, 2010).



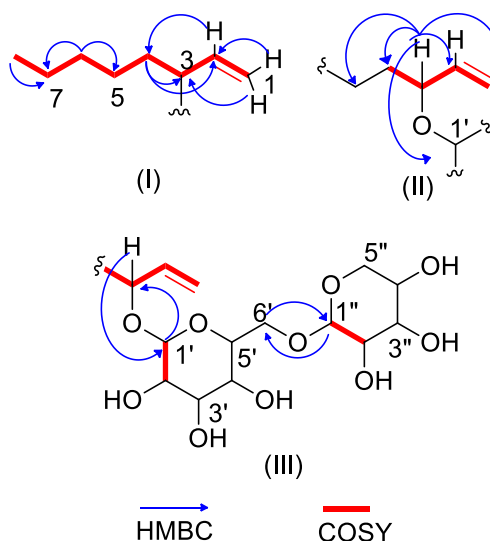
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C - BB (FIGURA 35) revelou 19 linhas espectrais, que juntamente com o espectro de RMN de <sup>13</sup>C - JMOD (FIGURA 36) foi possível definir o padrão de hidrogenação dos carbonos como sendo um carbono metílico [ $\delta_C$  14,5 (C-8)], sete carbonos metilênicos, dentre eles um metiledênico (C-1) [ $\delta_C$  23,7 (C-7), 25,7 (C-5), 33,1 (C-4), 35,8 (C-6), 66,9 (C-5''), 69,5 (C-6') e 116,3 (C-1)], oito carbonos oximetínicos [ $\delta_C$  71,3 (C-4'), 71,5 (C-4''), 74,9 (C-2''), 75,3 (C-2'), 77,1 (C-3''), 77,7 (C-5'), 78,1 (C-3') e 82,8 (C-3)], dois carbonos dioximetínicos [ $\delta_C$  103,4 (C-1') e 105,4 (C-1'')] e um carbono metínico [ $\delta_C$  140,9 (C-2)]. Vale ressaltar que os deslocamentos químicos em  $\delta_C$  116,35 e 140,99 são característicos de carbonos de dupla ligação. Já aqueles entre  $\delta_C$  105,4 e 71,3 são características de carbonos oxigenados, visto que a eletronegatividade do oxigênio diminui a

densidade eletrônica ao redor do carbono, gerando assim uma desproteção do mesmo frente ao campo magnético aplicado sendo observado um maior deslocamento químico.

Através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  – HSQC (FIGURA 38), foi possível correlacionar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono. Assim, também foi possível correlacionar os sinais de hidrogênios que estavam sobrepostos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e assim distinguir seus deslocamentos, conforme mostrado na Tabela 5.

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  – COSY (FIGURA 37) apresentou acoplamento do hidrogênio oximetínico em  $\delta_{\text{H}}$  4,13 com os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,53 e 1,67, e com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,86 do grupo vinila, confirmando assim a Subestrutura 3a (FIGURA 31).

Figura 31 – Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  - HMBC e COSY de DPO-3

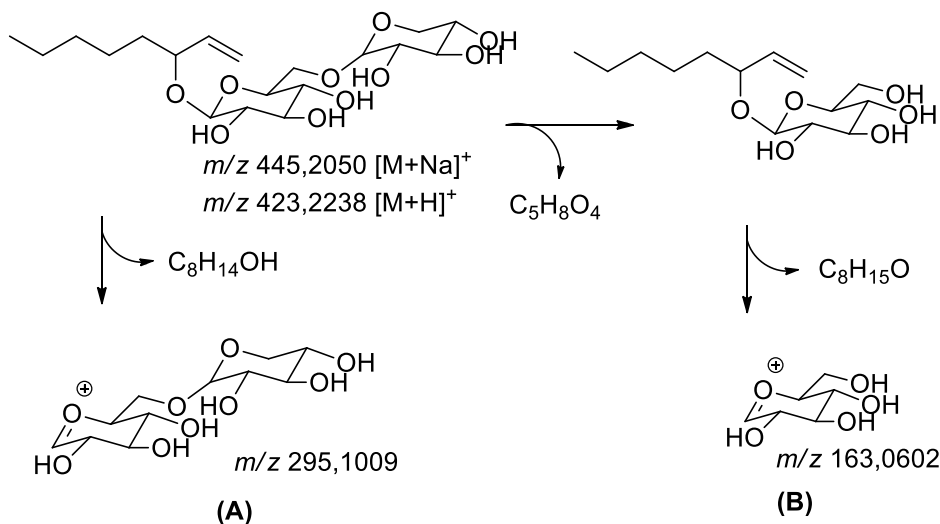


Através das correlações a longa distância, no espectro HMBC (FIGURA 39), apresentadas pelos sinais dos hidrogênios 3H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  0,89), 2H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  1,31), 2H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  1,67 e 1,53), H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  5,86) e 2H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5,22 e 5,10) foi possível confirmar a subestrutura 3a (FIGURA 31, Subestrutura I). De maneira semelhante, as correlações entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,13 (H-3) com o sinal de carbono anomérico em  $\delta_{\text{C}}$  103,4 (C-1') e vinila em 140,9 (C-2) e 116,3 (C-3) revelaram a conectividade entre esses grupos (FIGURA 31, Subestrutura II), sendo possível assim posicionar a molécula de glicose. Com as correlações entre os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,34 (H-1'') e  $\delta_{\text{C}}$  69,6 (C-6') foi possível inferir que a unidade de xilose estava ligada ao carbono oximetilênico da glicose (FIGURA 31, Subestrutura III).

A fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$  foi determinada através do espectro de massas de alta resolução (FIGURA 40) pelos picos em  $m/z$  445,2050  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  e  $m/z$  423,2238  $[\text{M} +$

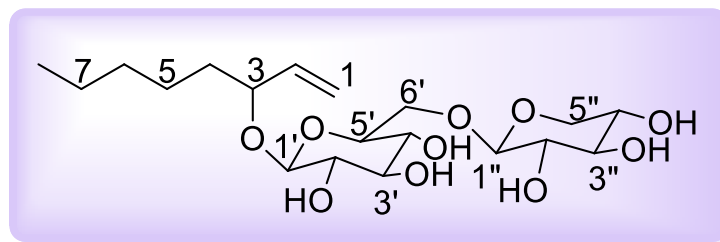
$H]^+$ , representando assim, 3 deficiências de hidrogênio. Neste mesmo espectro, foram observados picos em  $m/z$  295,1009 e  $m/z$  163,0602 correspondentes a detecção das unidades de carboidratos (**A** e **B**), conforme Figura 32.

Figura 32 – Proposta de fragmentação de DPO-3



Os dados mencionados foram compatíveis com o composto representado pela Figura 33, um composto previamente isolado da espécie *Mentha spicata*, também pertencente à família das Lamiaceae, denominado como *3-O-[\beta-D-Xylopyranosyl-(1-6)-\beta-D-glucopyranosyl] (3R)-1-octen-3-ol* (YAMAMURA *et al.*, 1998). Porém os valores de deslocamentos químicos de C-1 e C-2 foram apresentados invertidos no artigo. Este fato pode ser comprovado tanto pela análise no HSQC, tanto pela característica dos carbonos em questão sendo um  $=CH_2$  e o outro  $=CH$ . Assim, espera-se que C-2 (CH) possua maior deslocamento químico que C-1 ( $CH_2$ ). Além da presença do oxigênio, que protege carbonos em posição  $\gamma$  por efeito de compressão estérica e do efeito de desproteção da posição  $\beta$ , onde carbonos com mais substituintes na posição  $\beta$  são mais desprotegidos (SHOULDERS e WELCH, 1987). Outros dados que aparentam estar trocados no artigo são os deslocamentos dos C-4 e C-6. Esse fato também pode ser explicado pelo efeito de desproteção de carbonos na posição  $\beta$ , onde C-4 tem três substituintes em posição  $\beta$  sendo um oxigênio, enquanto que C-6 só apresenta dois substituintes em posição  $\beta$ .

Figura 33 – Representação estrutural do composto DPO-3

Tabela 5 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-3 comparados com valores da literatura (400 x 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (YAMAMURA *et al.*, 1998)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
<b>1</b>	116,3	140,9	5,10 (1H, ddd, $J = 1,4; 2,6; 10,4$ ) 5,22 (1H, ddd, $J = 1,4; 2,6; 17,3$ )	5,10 (ddd, $J = 1,2; 1,7; 17,3$ ) 5,21 (ddd, $J = 1,2; 1,7; 10,5$ )
<b>2</b>	140,9	116,2	5,86 (1H, ddd, $J = 6,7; 10,4; 17,3$ )	5,86 (ddd, $J = 6,8; 10,5; 17,3$ )
<b>3</b>	82,8	82,7	4,13 (1H, dd, $J = 6,7; 12,9$ )	4,13 (dd, $J = 6,8; 12,8$ )
<b>4</b>	35,8	33,0	1,53 (m) 1,67 (m)	1,31 (m) 1,52 (m)
<b>5</b>	25,7	25,7	1,41 (m)	1,66 (m)
<b>6</b>	33,1	35,7	1,31 (m)	1,66 (m)
<b>7</b>	23,7	23,6	1,34 (m)	1,66 (m)
<b>8</b>	14,5	14,4	0,89 (3H, t, $J = 6,7$ )	0,89 (t, $J = 6,8$ )
<b>Glic</b>	103,4	103,3	4,31 (1H, d, $J = 6,4$ )	4,33 (d, $J = 7,3$ )
<b>2'</b>	75,3	75,3	3,22-3,13 (m)	-
<b>3'</b>	78,1	78,1	3,37-3,26 (m)	-
<b>4'</b>	71,2	71,2	3,48 (m)	-
<b>5'</b>	77,6	77,6	3,37-3,26 (m)	-
<b>6'</b>	69,5	69,5	4,01 (1H, dd, $J = 1,7; 11,6$ ) 3,72 (1H, dd, $J = 4,7; 11,6$ )	-
<b>Xil</b>	105,4	105,3	4,34 (1H, d, $J = 6,1$ )	4,31 (d, $J = 7,8$ )
<b>2''</b>	74,9	74,9	3,18 (m)	-
<b>3''</b>	77,0	77,0	3,37-3,26 (m)	-
<b>4''</b>	71,5	71,5	3,34 (m)	-
<b>5''</b>	66,9	66,8	3,83 (1H, dd, $J = 5,3; 11,4$ ) 3,15 (m)	-

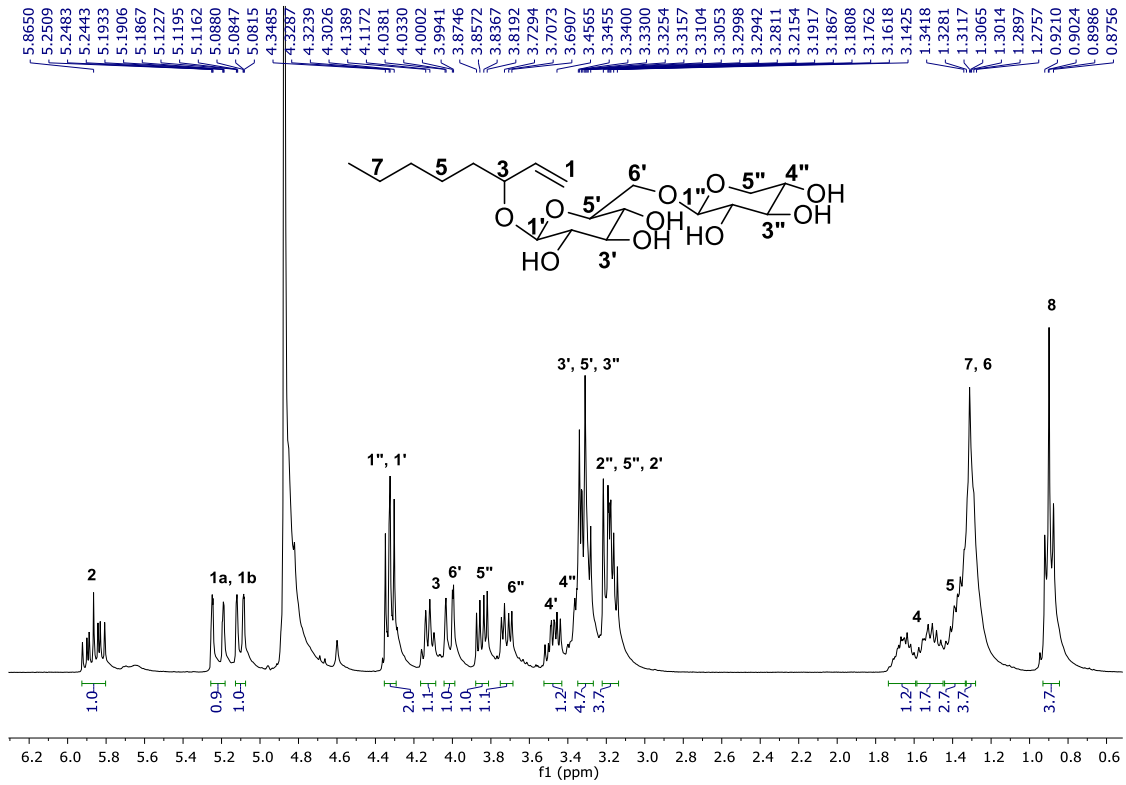
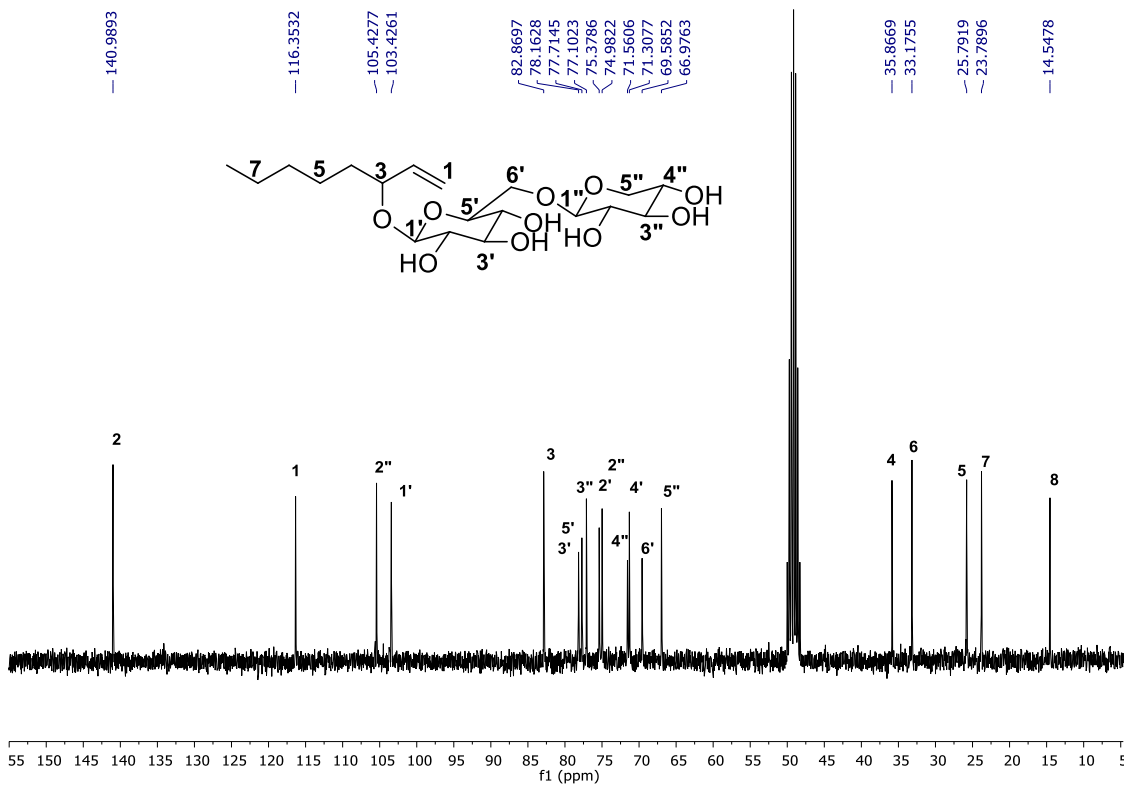
Figura 34 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) de DPO-3Figura 35 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) de DPO-3

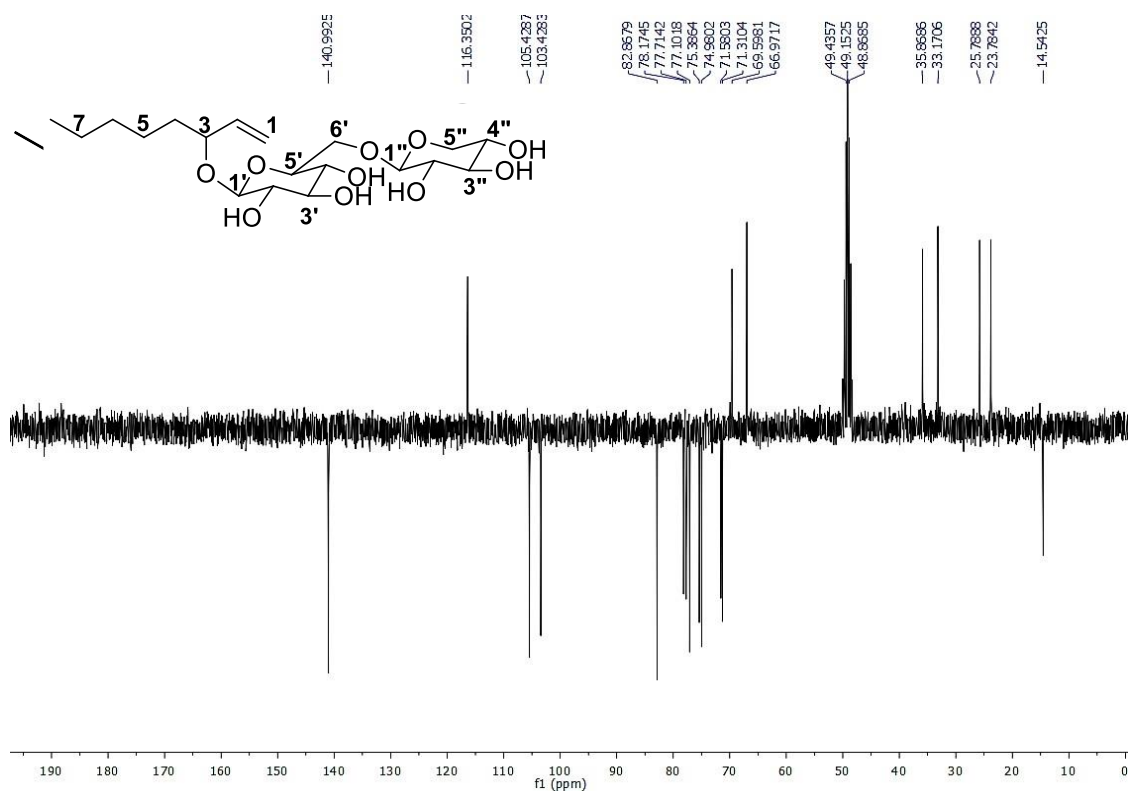
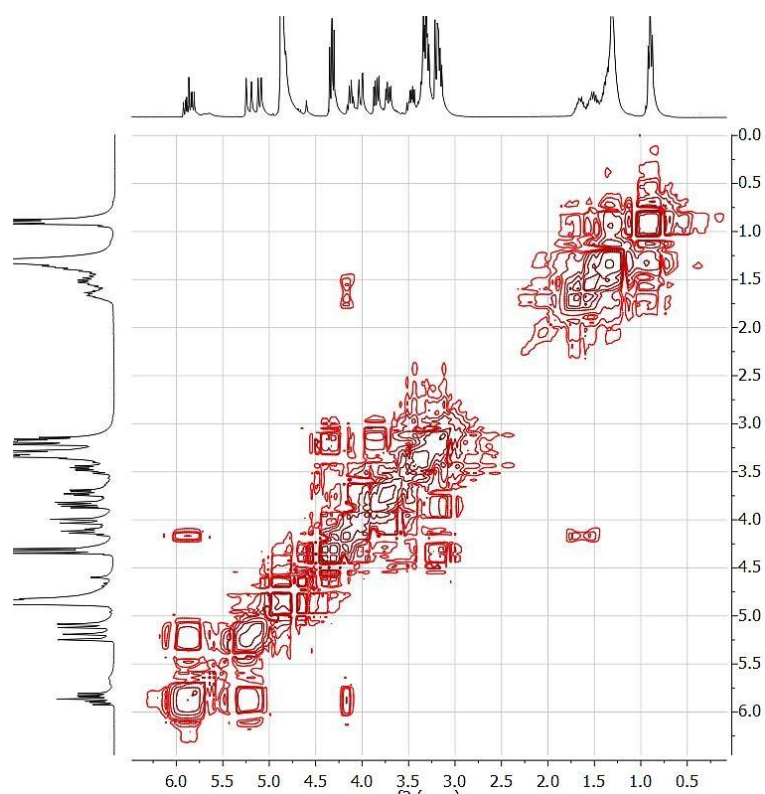
Figura 36 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  JMOD (75 MHz, MeOD) de DPO-3Figura 37 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (300 MHz, MeOD) de DPO-3

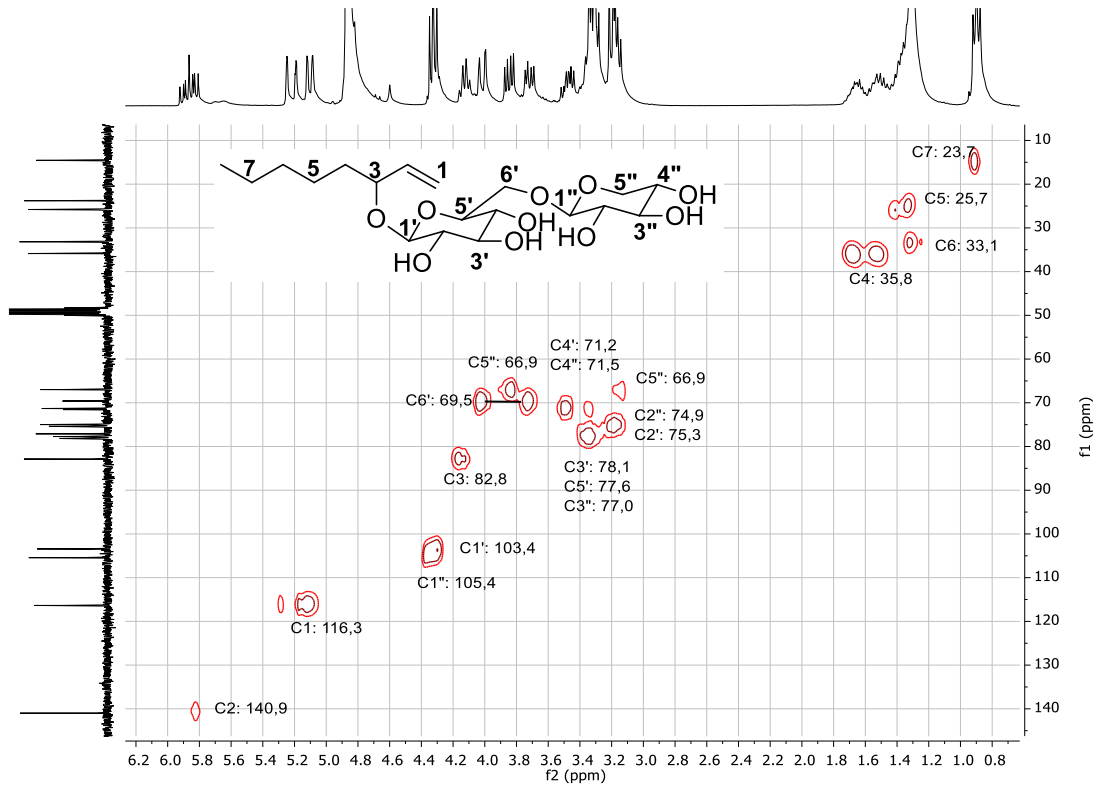
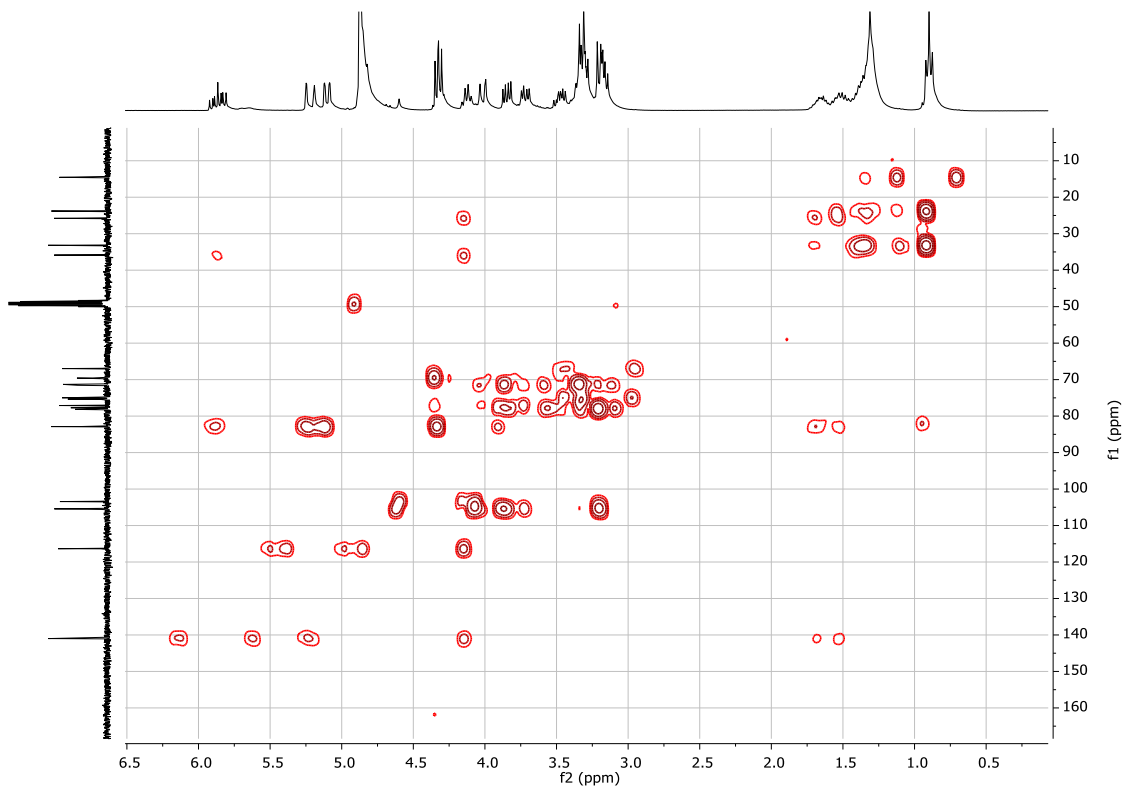
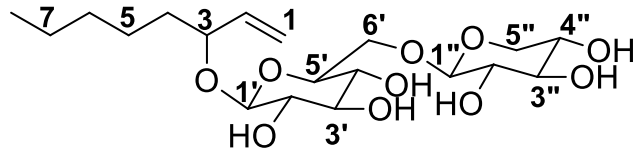
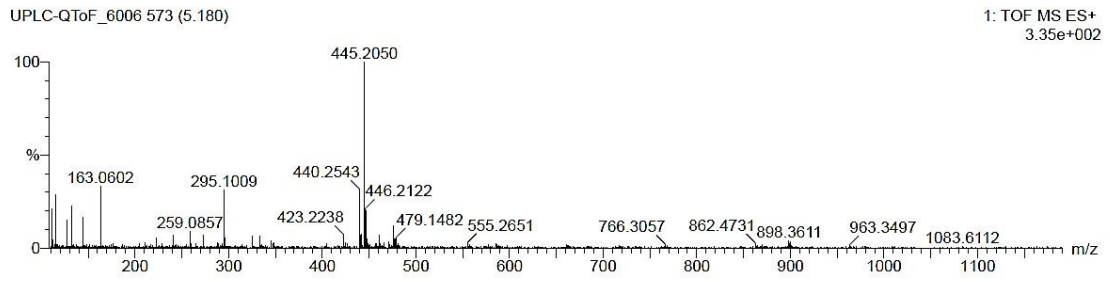
Figura 38 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-3Figura 39 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-3

Figura 40 - Espectro de massas de DPO-3





### 6.1.4 Determinação estrutural de DPO-4

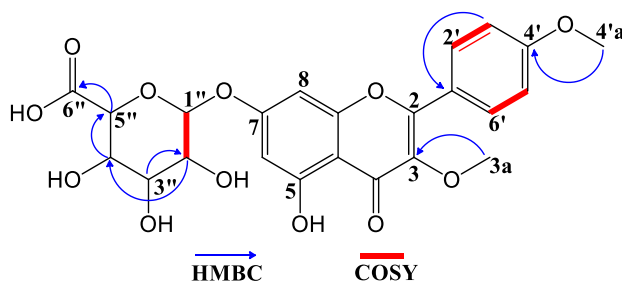
Cromatografias em Sephadex LH-20 e CLAE (item 5.4.4.4) da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% (FLUXOGRAMA 2) permitiram o isolamento de uma resina amarelada denominada DPO-4 (4,1 mg).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 44) mostrou dupletos em  $\delta_H$  7,87 (2H,  $J= 7,6$  Hz) e 7,18 (2H,  $J= 7,6$  Hz) referentes a um anel benzênico *para*-dissubstituído, que foi confirmado pelo espectro COSY (FIGURA 47). Sinais em  $\delta_H$  6,71 (1H, sl) e 6,62 (1H, sl) foram atribuídos a hidrogênios de anel aromático *meta*-posicionados. Também foi observado um hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5,16 (1H, s), que apresentou correlação no espectro de COSY com o  $\delta_H$  3,57, e no espectro de HSQC (FIGURA 48) com carbono em  $\delta_C$  101,6. Assim como uma sequência de hidrogênios oximetínicos característicos de carboidrato monomérico na faixa de  $\delta_H$  3,57-4,09 e duas metoxilas em  $\delta_H$  3,93 e 3,82 (3H, s) também foram observadas.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (FIGURA 45) apresentou 19 linhas espectrais, sendo duas linhas para dois carbonos, totalizando 21 carbonos. Com o auxílio do espectro de <sup>13</sup>C - DEPT 135° (FIGURA 46), os carbonos foram identificados como sendo dois carbonos CH<sub>3</sub> e onze carbonos CH. Com a análise do espectro de HSQC, foi possível atribuir cada hidrogênio a seu respectivo carbono (TABELA 6). Da subtração dos espectros de RMN <sup>13</sup>C e DEPT 135°, resultaram nove sinais relacionados a carbonos não hidrogenados.

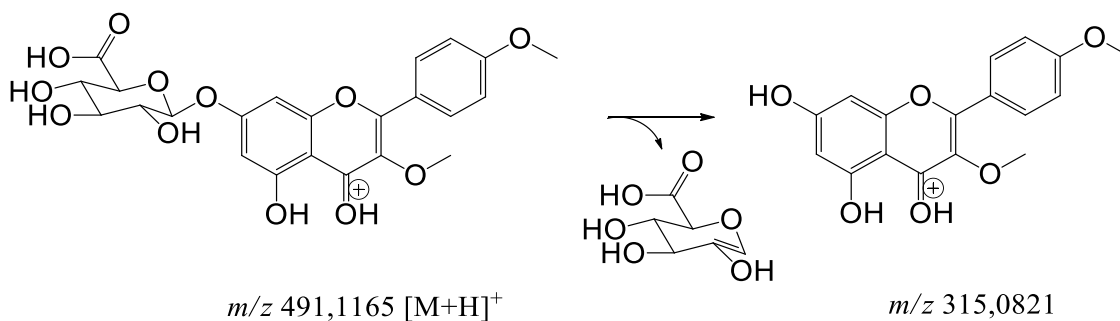
Na análise do HMBC (FIGURA 49), foi possível verificar uma correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  4,09 (H-5'') com um carbono em  $\delta_C$  172,2 (FIGURA 41). Este deslocamento aponta a existência de uma carbonila que não foi evidenciada pelo espectro de RMN <sup>13</sup>C, sugerindo assim, uma carboxila na molécula de glicose.

Figura 41 – Correlações observadas no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C - HMBC e COSY de DPO-4



O espectro de massa de alta resolução (FIGURA 50) apresentou um pico em  $m/z$  315,0821 referente à aglicona e outro em  $m/z$  491,1165  $[M + H]^+$  referente à molécula protonada, sugerindo assim, 13 deficiências de hidrogênio compatível a fórmula molecular  $C_{23}H_{22}O_{12}$  (FIGURA 42).

Figura 42 – Proposta de fragmentação de DPO-4



Após análise dos espectros e busca na literatura, foi possível identificar o composto DPO-4 (FIGURA 43) como sendo 7- $\beta$ -D-glicuropiranosil-5-hidróxi-3,4'-dimetóxi-flavona, um composto anteriormente isolado de outra planta medicinal também pertencente à família das Lamiaceae, a *Clerodendrum phlomidis*. Este é o segundo relato de isolamento e caracterização deste composto que, em 2015, foi nomeado de ácido 3,4,5-tri-hidroxi-6-[5-hidroxi-3-metoxi-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-7-iloxi]-tetra-hidro-pirano-2-carboxílico (BHARITKAR *et al.*, 2015).

Figura 43 – Representação estrutural do composto DPO-4

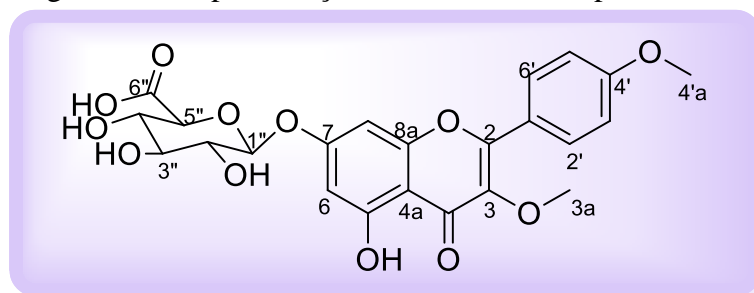


Tabela 6 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-4 comparados com valores da literatura (600 x 150 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ ) (BHARITKAR *et al.*, 2015)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
2	165,7	163,5	-			-
3	133,8	132,2	-		H-3a	-
3a	61,3	59,9	3,82 (3H, s)			3,74
4	184,2	182,0	-			-
5	161,8	152,2	-			-
6	92,3	93,7	6,71 (1H, sl)			7,05
7	165,7	155,7	-			-
8	104,8	103,0	6,62 (1H, sl)			6,92
8a	154,8	151,8	-			-
4a	106,8	105,6	-			-
1'	126,4	122,4	-		H-3'/5'	-
2', 6'	129,4	128,0	7,87 (2H, d, $J=7,6$ )			8,03
3', 5'	118,1	114,3	7,18 (2H, d, $J=7,6$ )			7,11
4'	160,7	162,1	-		H-4'a	-
4'a	57,2	55,2	3,93 (3H, sl)			3,84
1''	101,6	99,1	5,16 (1H, s)			5,29
2''	77,4	75,6	3,57 (m)	H-3''		3,35
3''	73,0	70,9	3,66 (m)			3,35
4''	74,6	72,5	3,57 (m)		H-2''	3,35
5''	76,6	75,0	4,09 (1H, d, $J=9,6$ )	H-4''		4,01
6''	172,2	169,9	-	H-5''		-

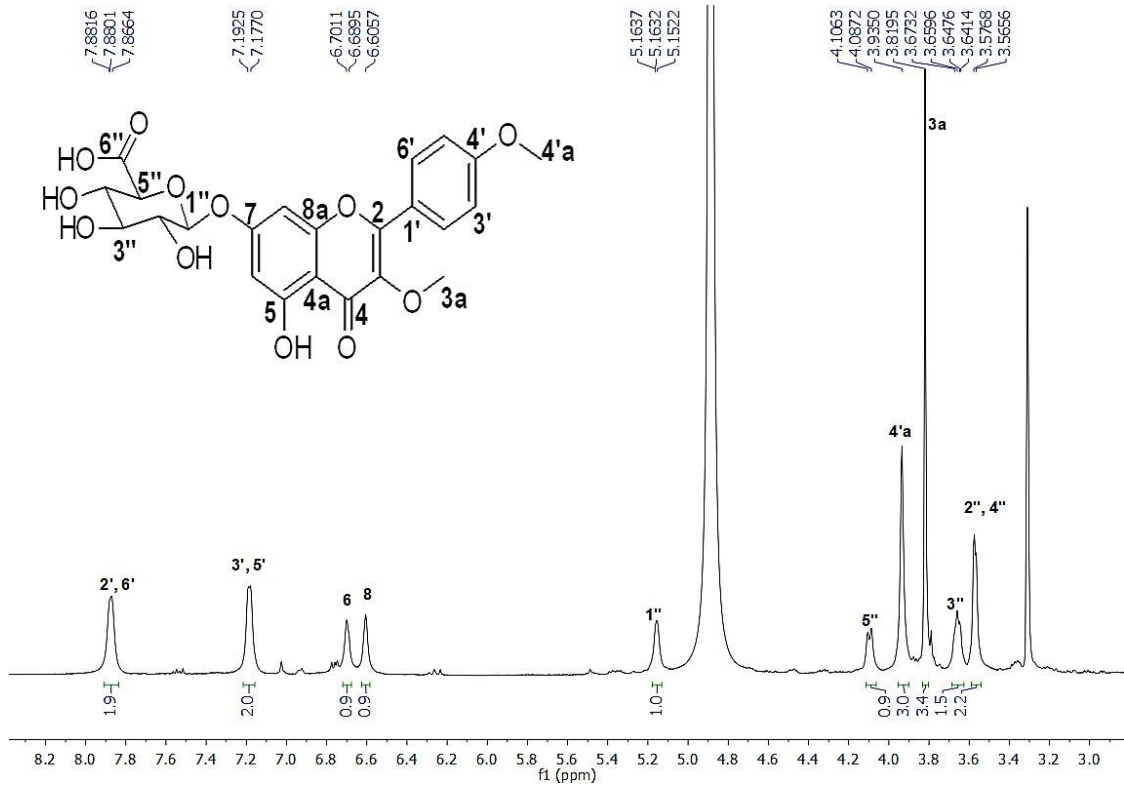
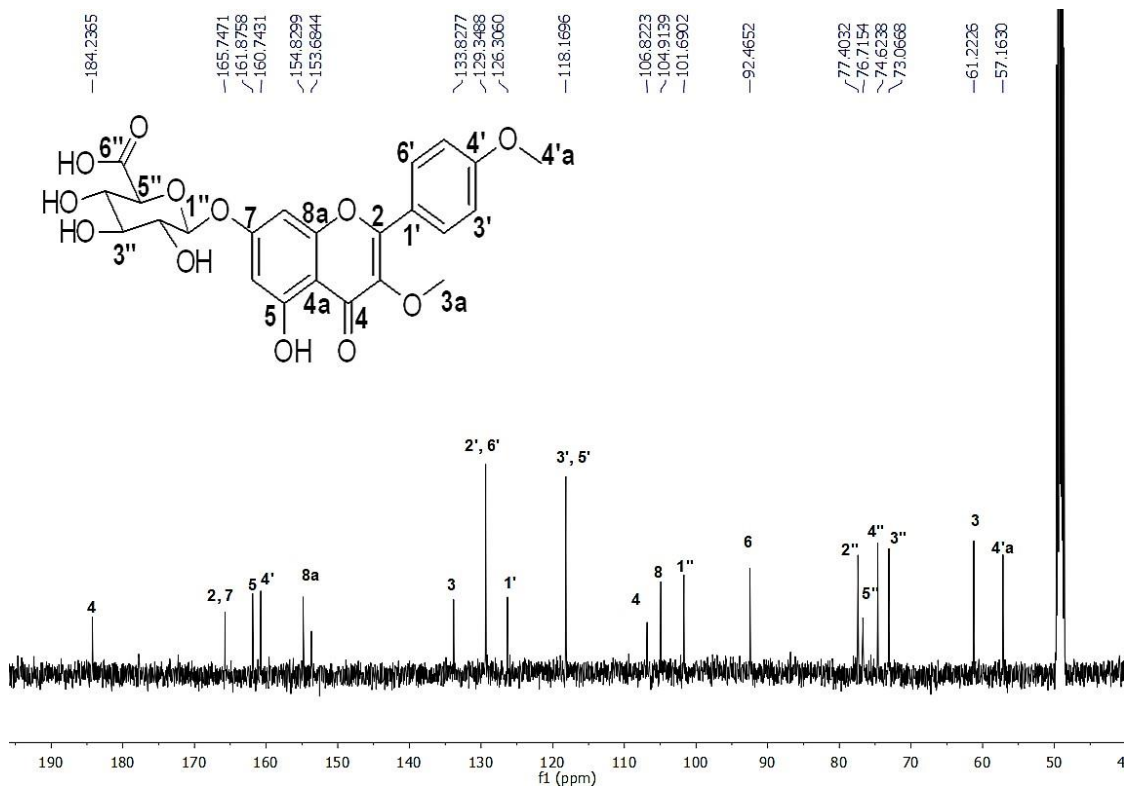
Figura 44 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de DPO-4Figura 45 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, MeOD) de DPO-4

Figura 46 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (125 MHz, MeOD) de DPO-4

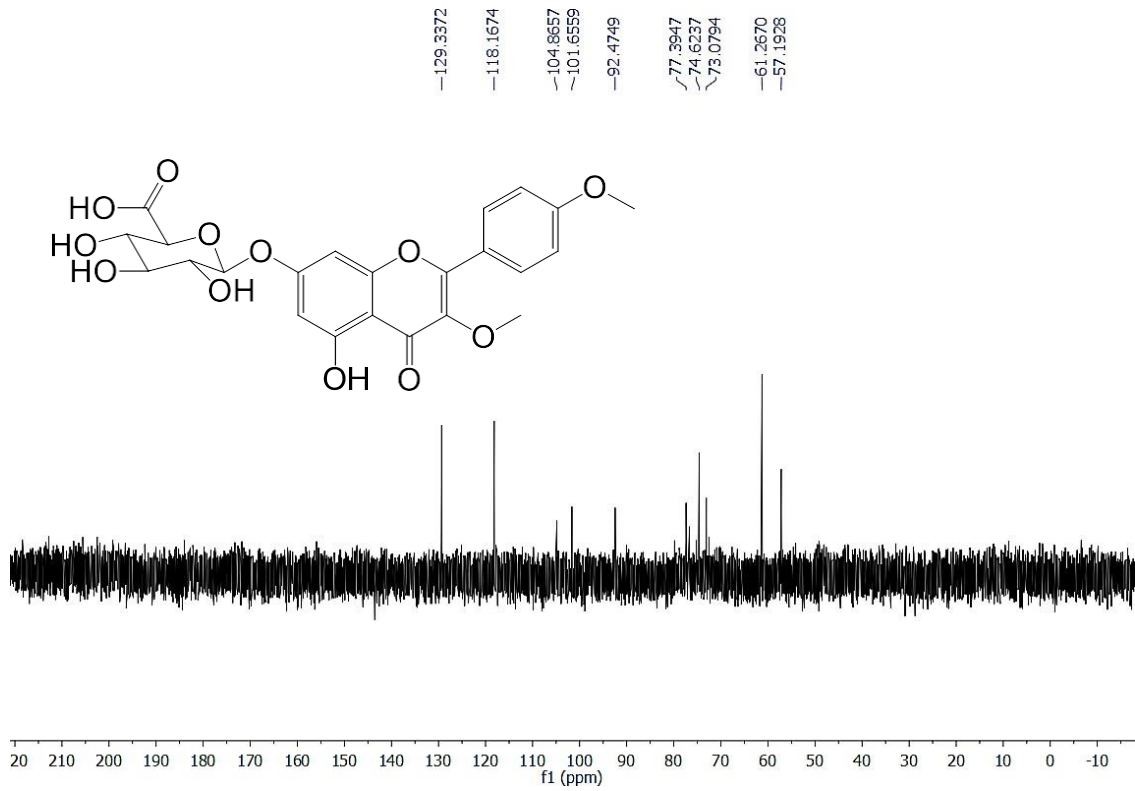


Figura 47 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-4

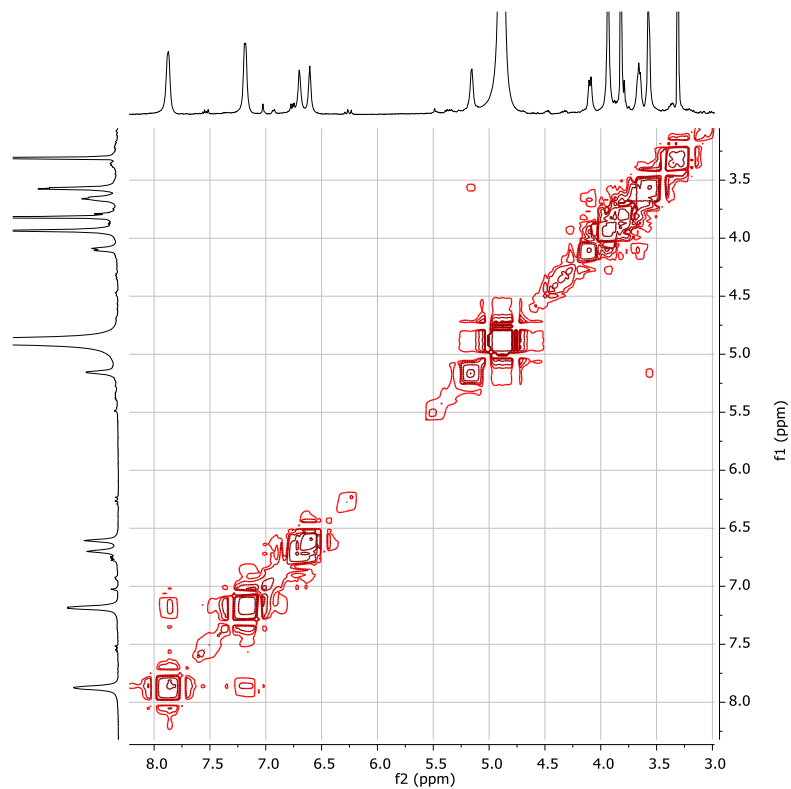


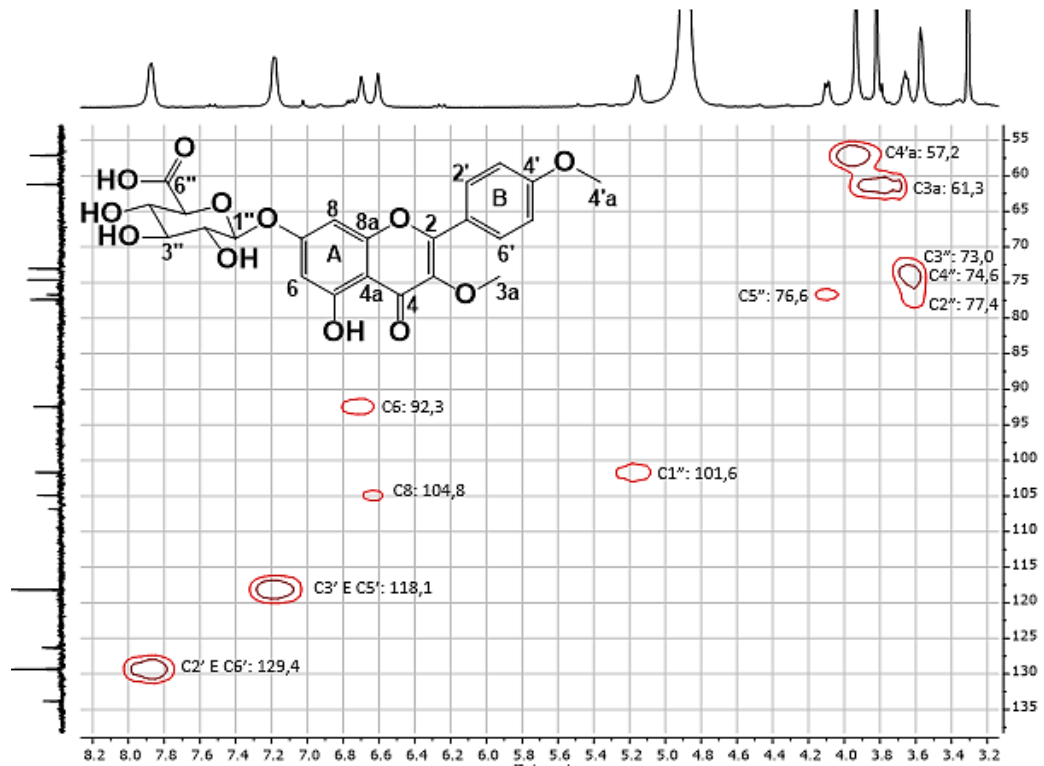
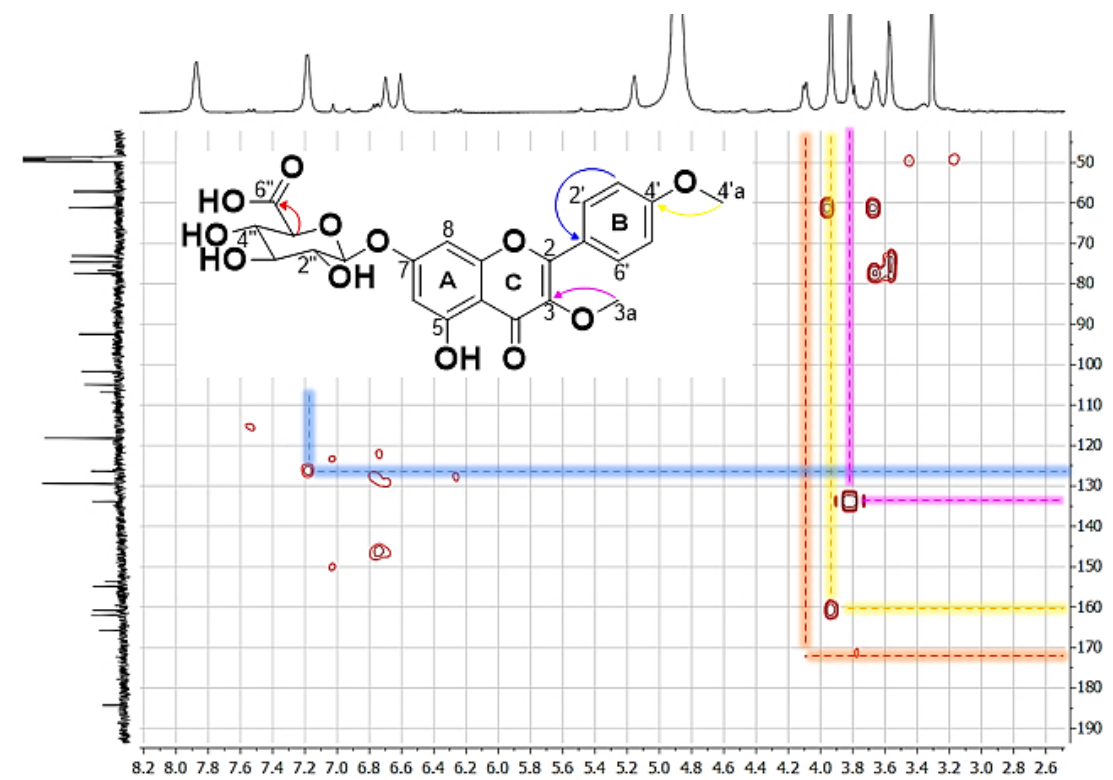
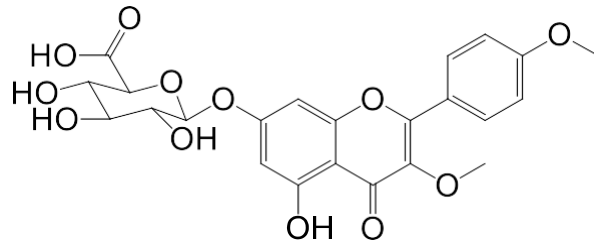
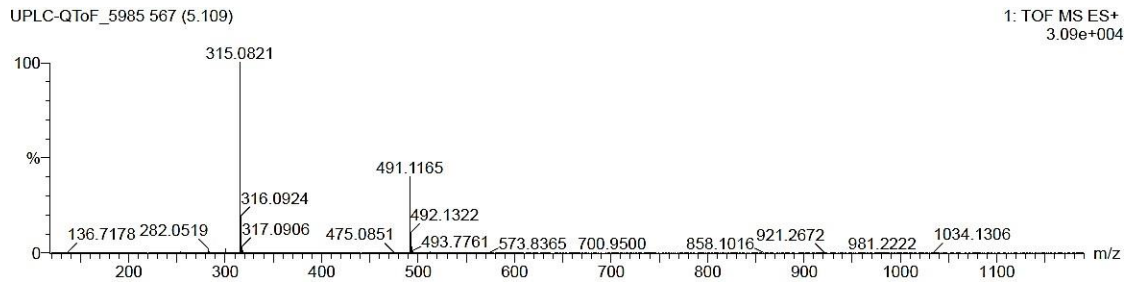
Figura 48 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-4Figura 49 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-4

Figura 50 - Espectro de massas de DPO-4

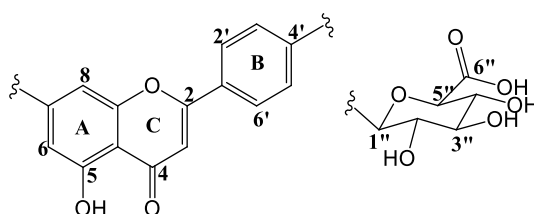


### 6.1.5 Determinação estrutural de DPO-5

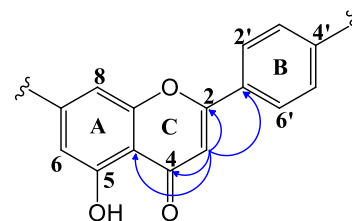
O composto denominado DPO-5 (2,4 mg), uma resina marrom com rotação  $[\alpha]_D^{21}$  -139,23° (*c* 0.10; MeOH), foi isolado da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com 80% (FLUXOGRAMA 2) do chá após fracionamento em Sephadex LH-20 e CLAE (item 5.4.4.4).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 56) de DPO-5 se mostrou semelhante ao composto DPO-4. O mesmo também apresentou dois dupletos em  $\delta_H$  7,84 (2H, *J*= 8,9 Hz) e 7,44 (2H, *J*= 8,7 Hz) referentes a um anel benzênico *para*-dissubstituído, que foi confirmado pelas constantes de acoplamento e pelo espectro COSY (FIGURA 57). Também foram observados dupletos em  $\delta_H$  6,60 e 6,70 (*J*= 2,2 Hz) atribuídos a hidrogênios *meta*-posicionados e um hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5,90 (1H, d, *J*= 6,6 Hz). Assim como uma sequência de hidrogênios oximetínicos na faixa de  $\delta_H$  4,47-4,88, que apresentaram COSY entre si, característicos de um carboidrato monomérico. Diferentemente do espectro de RMN <sup>1</sup>H de DPO-4, no espectro de DPO-5 apareceu um hidrogênio olefínico em  $\delta_H$  6,87 (s), apenas uma metoxila em  $\delta_H$  3,77 (s), e como feito em solvente diferente, apareceu o sinal da hidroxila em  $\delta_H$  13,52 (sl). Logo, podemos sugerir que o composto DPO-5 faz parte da mesma classe de compostos que DPO-4, flavonoide glicosilado com o mesmo sistema de substituição do anel A e do anel B uma molécula de carboidrato monomérico (FIGURA 51).

Figura 51 – Esqueleto básico de DPO-5 e uma unidade de carboidrato



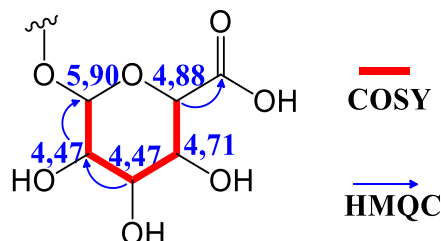
Através da análise do espectro de HSQC (FIGURA 58), foi possível atribuir cada hidrogênio ao seu respectivo carbono. Onde o hidrogênio em  $\delta_H$  6,87 (s) foi confirmado em C-3 também pelas correlações a longa distância do espectro HMBC (FIGURA 59). Estas observações ratificam um flavonoide como esqueleto básico. A molécula de carboidrato monomérico foi confirmada através da análise dos espectros de COSY e HMBC (FIGURA 52). Neste último espectro, onde





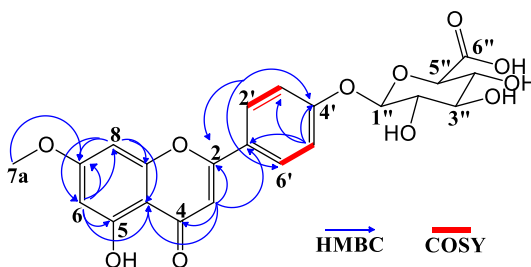
verifica-se correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a duas ou mais ligações, foi possível confirmar a presença de uma carboxila na unidade de carboidrato.

Figura 52 – Correlações de HMBC e COSY da molécula de carboidrato monomérico



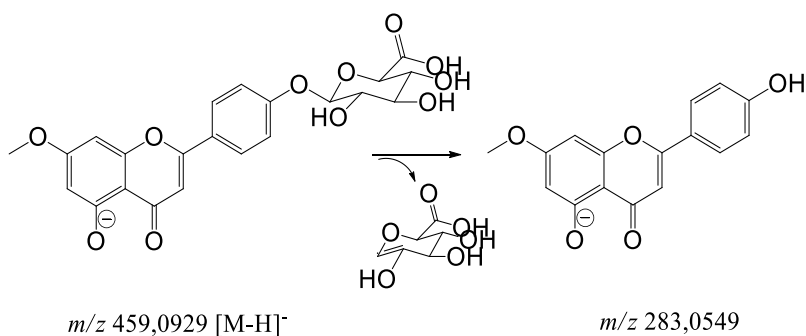
Com auxílio do espectro de HMBC (FIGURA 59), foi possível atribuir os deslocamentos aos carbonos não hidrogenados (TABELA 7). Outra informação muito importante que pôde ser obtida através da análise do mesmo, foi a posição da metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,77) em C-7 através das correlações dos hidrogênios H-7a, H-6 e H-8 com C-7. Desta forma, a molécula de carboidrato oxidada foi locada em C-4' do esqueleto básico (FIGURA 53).

Figura 53 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-5



A estrutura de DPO-5 foi confirmada através análise do espectro de massas de alta resolução (FIGURA 60) que apresentou um pico em  $m/z$  283,0549 referente à aglicona e em  $m/z$  459,0929  $[\text{M} - \text{H}]^-$  à molécula desprotonada (FIGURA 54), compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ , apresentando assim 13 deficiências de hidrogênio e confirmando a estrutura apresentada pela Figura 53.

Figura 54 – Proposta de fragmentação de DPO-5



A aglicona foi confirmada através de comparação com dados da literatura (TALZHANOV *et al.*, 2005). Não há dados de ressonância do composto DPO-5 na literatura. Entretanto, o mesmo foi proposto por análise de dados de UV da glicuronidação de flavonoides (SINGH *et al.*, 2010) onde o UV apresentado no detector do HPLC manteve o padrão da literatura (267; 326 nm; Lit.: 267,7; 324,6 nm). Assim, esta é a primeira vez que dados de ressonância magnética e rotação estão sendo apresentados para o composto nomeado como ácido 4'-β-D-glicuropiranosil-5-hidróxi-7-metóxi-flavona (FIGURA 55).

Figura 55 – Representação estrutural do composto DPO-5

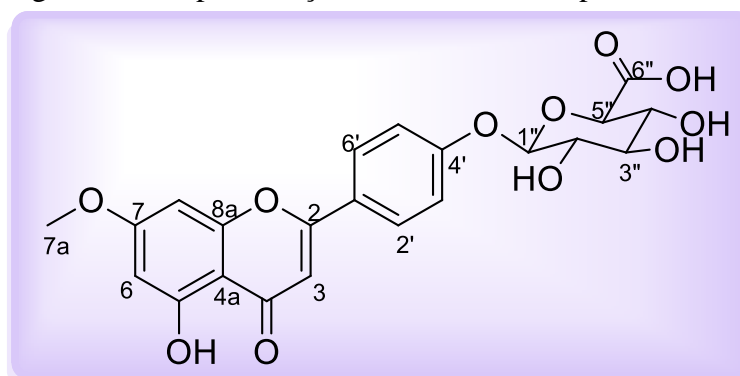
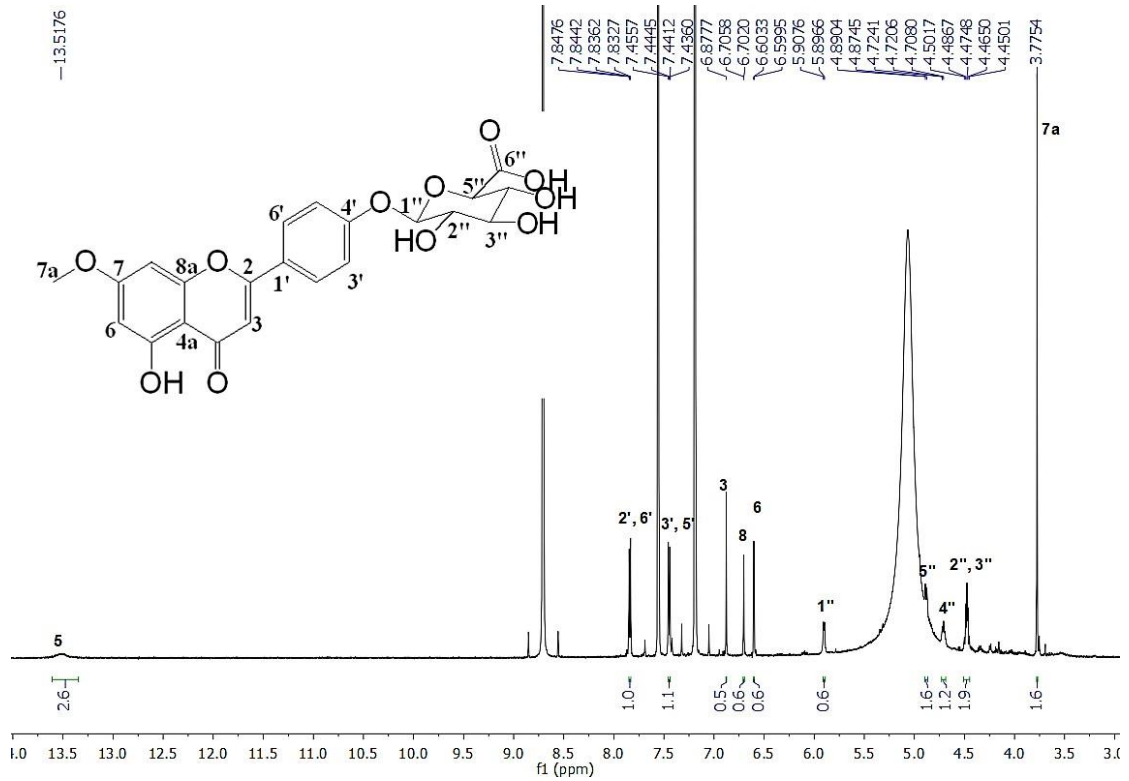


Tabela 7 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-5 comparados com valores da literatura (500 x 125 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ ) (TALZHANOV *et al.*, 2005)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
2	163,75	163,95	-	H-3	H-2'/6'	-
3	104,76	102,89	6,87 (1H, s)			6,80 (1H, s)
4	182,57	181,73	-	H-3		-
4a	105,65	104,54	-		H-6 H-8 H-3	-
5	162,48	157,09	13,52 (1H, sl)	H-6		12,93 (1H, sl)
6	98,44	97,78	6,60 (1H, d, $J=2,2$ )		H-8	6,36 (1H, d, $J=2,2$ )
7	165,83	165,0	-	H-6 H-8	H-7a	-
7a	55,92	55,86	3,77 (3H, s)			3,87 (3H, s)
8	92,62	92,52	6,70 (1H, d, $J=2,2$ )		H-6	6,74 (1H, d, $J=2,2$ )
8a	157,71	161,08	-	H-8		-
1'	124,74	120,95	-		H-3 H-3'/5'	-
2', 6'	128,35	128,35	7,84 (2H, d, $J=8,8$ )		H-6'/2'	7,94 (2H, d, $J=8,8$ )
3', 5'	117,03	115,83	7,44 (2H, d, $J=8,8$ )		H-5'/3'	6,94 (2H, d, $J=8,8$ )
4'	160,96	161,15	-	H-3'/5'	H-2'/6'	10,27 (1H, sl)
1''	101,55	-	5,90 (1H, d, $J=6,6$ )	H-2''		-
2''	77,75	-	4,47 (m)	H-3''		-
3''	74,53	-	4,47 (m)	H-2''		-
4''	73,04	-	4,71 (m)			-
5''	77,50	-	4,88 (1H, d, $J=9,5$ )			-
6''	172,23	-	-	H-5''		-

Figura 56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) DPO-5

\*Assinalados os sinais para DPO-6

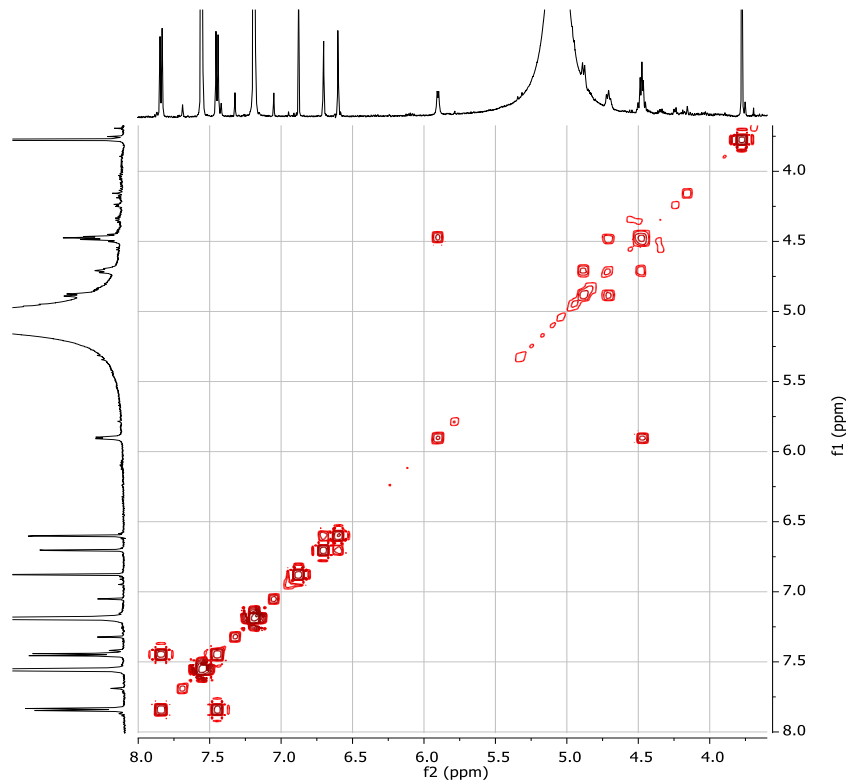
Figura 57 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5

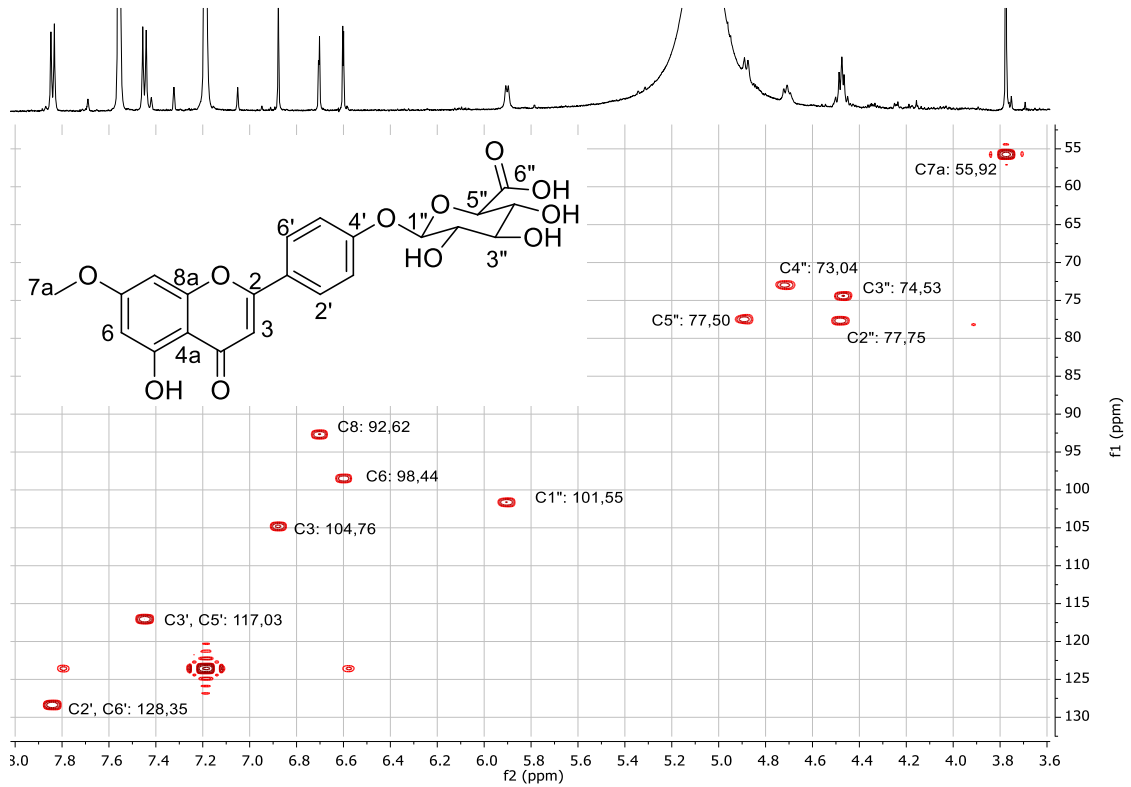
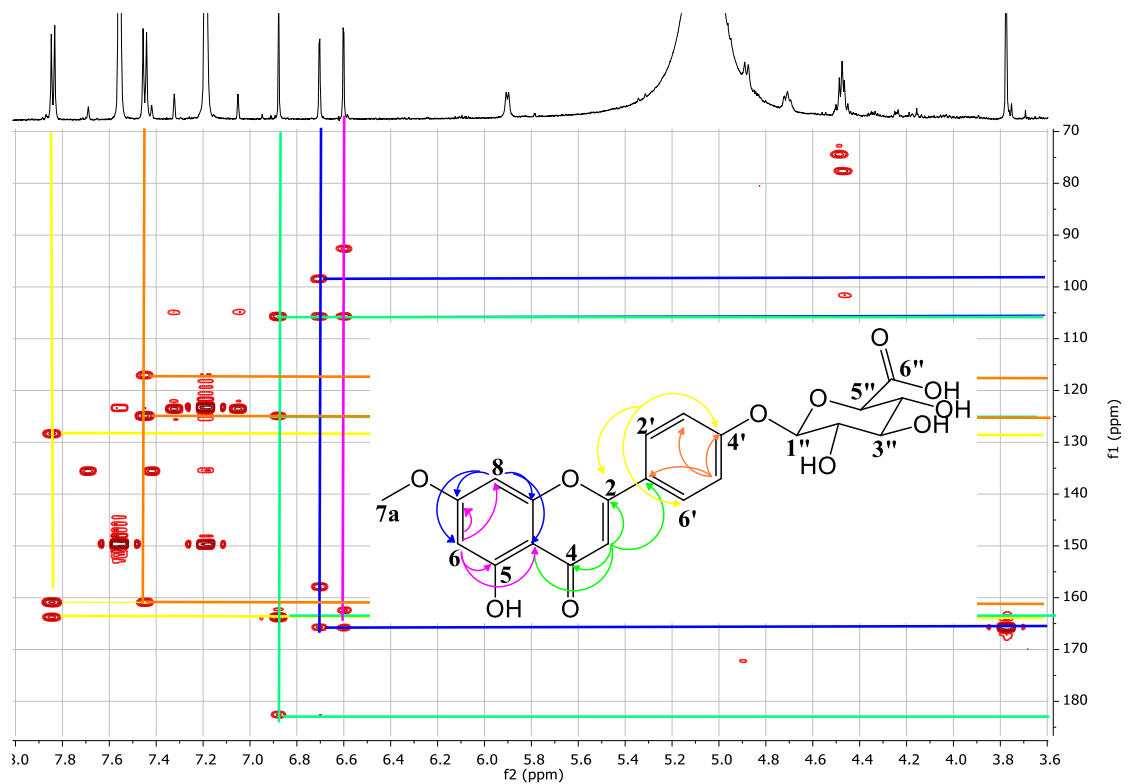
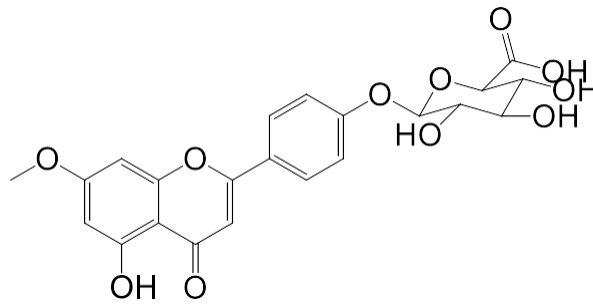
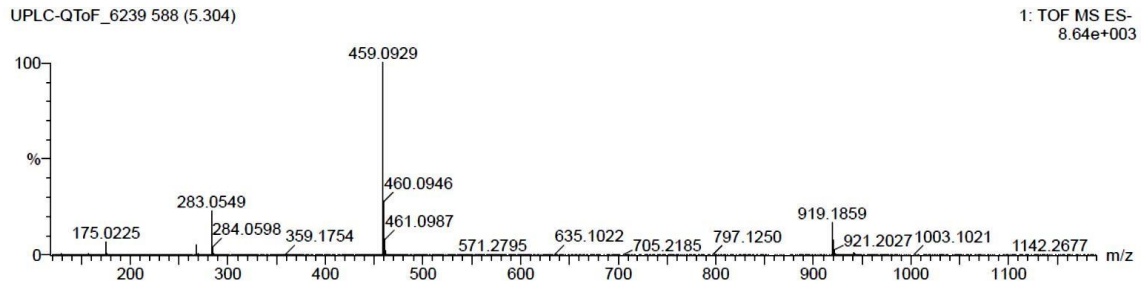
Figura 58 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5Figura 59 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-5

Figura 60 - Espectro de massas de DPO-5

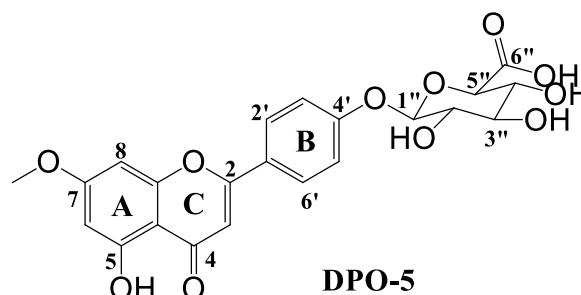


### 6.1.6 Determinação estrutural de DPO-6 a partir da mistura com DPO-5

Uma resina marrom codificada como DPO-6 foi obtida da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com 80 % (FLUXOGRAMA 2).

Pelo tempo de retenção no cromatograma (FIGURA 5, item 5.4.4.5) e perfil do ultravioleta, esperava-se que o material fosse o composto codificado como DPO-5. Entretanto, ao obter-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA

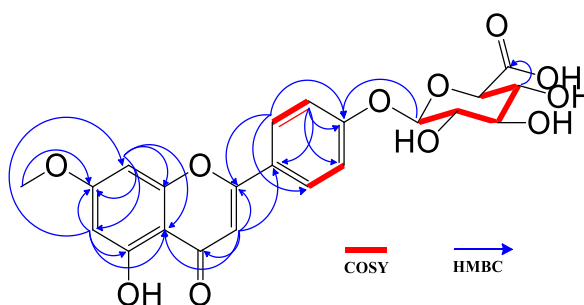
66) da resina para confirmação, foi verificado que DPO-6 apresentou mais sinais do que os apresentados no espectro de RMN <sup>1</sup>H obtido de DPO-5. A diferença encontrava-se principalmente na faixa de hidrogênios  $\delta_H$  6,00- 9,00 ppm. Além disso,



foram observados dois sinais de hidrogênios anoméricos ( $\delta_H$  5,86 e 5,91), sugerindo duas unidades de açúcar, e sinais de hidrogênios característicos de metoxila ( $\delta_H$  3,75 e 3,77).

Com o espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HSQC (FIGURA 68) foi possível atribuir cada hidrogênio a seu respectivo carbono (TABELA 8). Através das correlações observadas no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HMBC (FIGURA 69) e RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H – COSY (FIGURA 67), foi possível confirmar a presença de DPO-5, principalmente pelas correlações dos dois dupletos em  $\delta_H$  7,84 e 7,45 do anel B *para*-substituído (FIGURA 61). Assim também, como foi possível sugerir a presença de outro composto através dos sinais que não foram compatíveis com DPO-5, onde a diferença entre os compostos estaria no anel B do flavonoide.

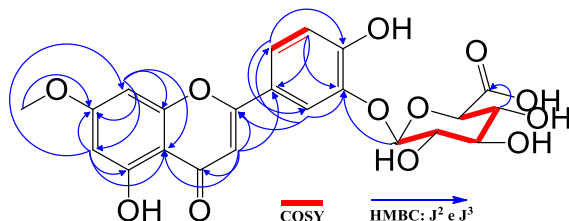
Figura 61 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-5



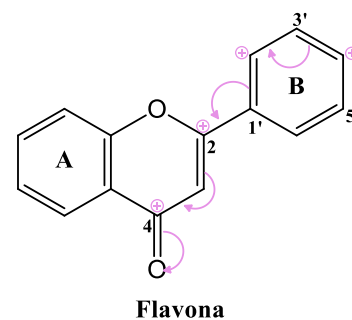
Os hidrogênios  $\delta_H$  7,69 e 7,44 apresentaram correlação no espectro de COSY compatível com a posição *orto* no anel B. Entretanto, o sinal em  $\delta_H$  7,87 apenas apresentou correlações no espectro de HMBC com C-6' e C-3'. Tanto H-2', H-5' e H-1'' apresentaram

correlação C-3', o que sugere a posição da unidade de açúcar (FIGURA 62). O hidrogênio em  $\delta_H$  7,44 apresentou correlações com C-2' e C-4', assim, somando todas as informações podemos sugerir um anel trissubstituído.

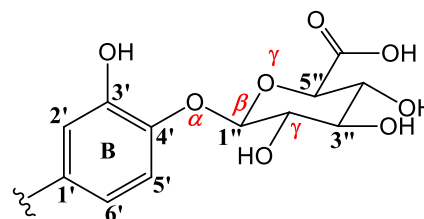
Figura 62 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-6



Devido a ressonância apresentada na estrutura base de uma flavona, que desprotege as posições de 2', 4' e 6' do anel B, espera-se que C-4' apresente maior valor de deslocamento químico do átomo de carbono que C-3'. Fato confirmado através da análise dos dados apresentados na Tabela 9. Os deslocamentos químicos de carbono foram utilizados para discussão pois os mesmos são observados numa faixa muito maior (0 a 220 ppm) que os valores de hidrogênio (0 a 12 ppm), e com isso carbonos não equivalentes possuem deslocamentos distintos, que raramente se sobrepõem e sofrem efeito de solvente relativamente insignificante (UEJI; SUGIURA e TAKAO, 1980). Desta forma, apesar dos valores de hidrogênio de H-5' e H-6' não seguirem o padrão esperado (H-5' mais protegido que H-6'), as posições dos mesmos foram atribuídas com base nas correlações de HMBC e deslocamento químico dos átomos de carbono C-5' e C-6'.



Outra informação que foi observada através da análise da Tabela 9, é que, em flavonoides glicosilados, a hidroxila na posição 4' desprotege mais o carbono do que a unidade de açúcar na mesma posição, ou seja, gera maiores valores de deslocamento químico. Isso se deve ao fato que a unidade de açúcar protege o carbono ao qual ele está ligado pelo efeito  $\gamma$  protetor, além de outros fenômenos de efeito protetor menos significativo como hiperconjugação e anisotropia. (SHOULDERS e WELCH, 1987).





Ambos compostos da mistura apresentaram H-3 e metoxila em C-7 com as mesmas correlações a 2 ou mais ligações. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apresentados na Tabela 8 referem-se apenas ao segundo composto da mistura o qual será identificado como DPO-6.

A mistura foi confirmada pelo espectro de massa de alta resolução. No cromatograma da mistura obtido no UPLC-QToF (FIGURA 63) foi possível verificar sinais de intensidades semelhantes [5,204 (A) e 5,312 (B) min] e posteriormente, identificar a massa de cada composto. Para DPO-5 foi observado pico em  $m/z$  283,0578 referente à aglicona e em  $m/z$  459,0922  $[\text{M}-\text{H}]^-$  à molécula desprotonada (FIGURA 71). Contudo, para DPO-6 foi observado o pico em  $m/z$  299,0532 referente à aglicona e pico em  $m/z$  475,0877  $[\text{M}-\text{H}]^-$  à molécula desprotonada (FIGURA 70), compatível com 13 deficiências de hidrogênio sugerindo a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$  (FIGURA 64).

Figura 63 – Cromatograma UPLC-QToF da mistura de DPO-5 com DPO-6

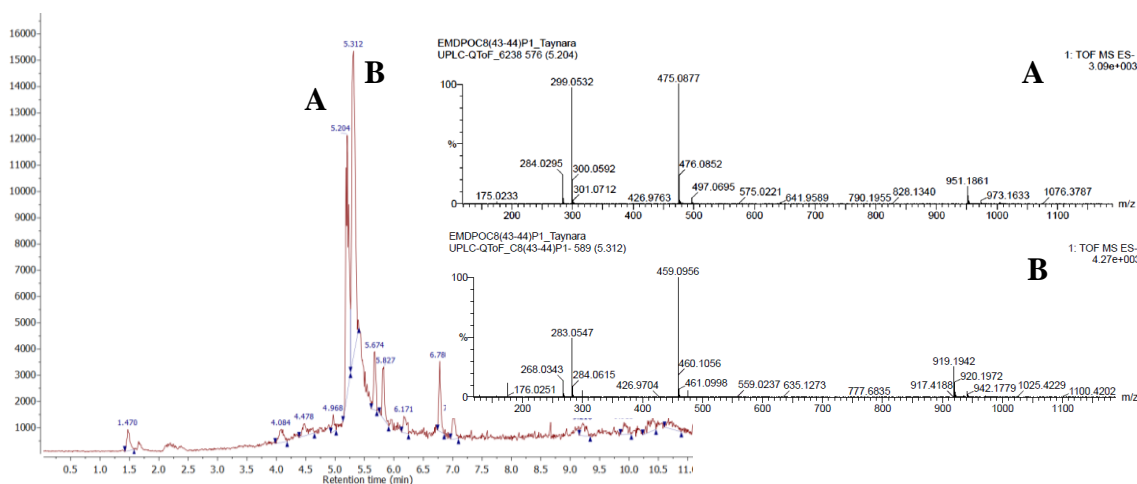
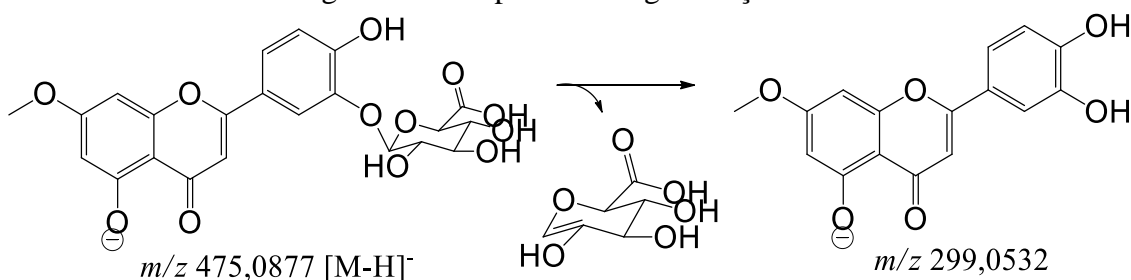


Figura 64 – Proposta de fragmentação de DPO-6



DPO-6, 3'- $\beta$ -D-glicuropiranosil-5,4'-dihidróxi-7-metóxi-flavona (FIGURA 65), está sendo relatado pela primeira vez na literatura. Entretanto, foi verificado que há relatos de um flavonoide glicosilado similar, o luteolino 3'- $O$ - $\beta$ -D-glicuronopiranosídeo. Os dados de

RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  serão comparados com este composto, que já foi isolado de espécies da família das Lamiaceae (LU e FOO, 2000; OKAMURA *et al.*, 1994; PATORA e KLIMEK, 2002).

Figura 65 – Representação estrutural do composto DPO-6

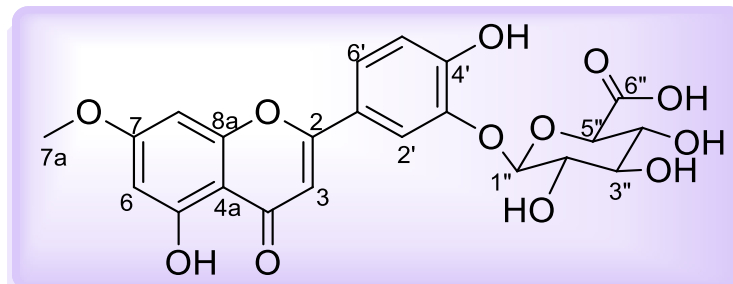


Tabela 8 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-6 comparados com valores da literatura (500 x 125 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ ) (PATORA e KLIMEK, 2002)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ Lit.	$\delta_{\text{H}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H}}$ Lit.
2	164,04	163,32	-	H-3	H-2'	-
3	105,08	103,29	6,95 (s)			6,73 (s)
4	182,64	181,83	-	H-3		
4a	105,67	103,75	-		H-3 H-6 H-8	
5	162,34	161,43	13,52 (s)	H-6		
6	98,49	98,88	6,58 (d, $J=2,1$ )		H-8	6,20 (d, $J=2,0$ )
7	165,68	164,22	-	H-6 H-8	H-7a	
7a	55,73	-	3,75 (s)			
8	92,52	94,12	6,60 (m)		H-6	6,49 (d, $J=2,1$ )
8a	157,81	157,35	-	H-8		
1'	126,57	121,93	-		H-3 H-5'	
2'	115,33	113,78	7,87 (sl)		H-6'	7,68 (d, $J=2,0$ )
3'	149,46	145,15	-	H-2'	H-5' H-1''	
4'	160,81	150,76	-		H-6'	
5'	118,09	116,64	7,69 (m)			6,98 (d, $J=8,5$ )
6'	118,56	121,60	7,44 (m)		H-2'	7,64 (dd, $J=2,0; 8,6$ )
1''	103,23	100,62	5,86 (d, $J=7,8$ )			5,21 (d, $J=7,0$ )
2''	74,32	71,38	4,31 (m)			3,38- 3,47
3''	77,62	72,97	4,44 (m)			3,38- 3,47
4''	72,95	75,42	4,62 (m)			3,38- 3,47
5''	77,55	75,42	4,89 (d, $J=9,8$ )			4,05 (d, $J=9,5$ )
6''	172,13	170,18	-	H-5''		

Tabela 9 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  referentes ao Anel B do Luteolina e seus derivados

Composto/ Código/ Solvente/ Referência	# 2'	# 3'	# 4'	# 5'	# 6'
Luteolin (31) DMSO (OKAMURA <i>et al.</i> , 1994)	112,9 7,40	145,2	149,1	115,7 6,90	118,8 7,41
Luteolin 3'-O-glucoside (32) CD <sub>3</sub> OD (MOITEIRO <i>et al.</i> , 2008)	115,9 7,91	146,0	151,6	117,0 7,01	122,2 7,63
Luteolin-3'-O-β-glucopyranoside (32) DMSO (AKDEMIR <i>et al.</i> , 2003)	114,8 7,79	145,9	150,9	116,8 6,98	122,1 7,64
Luteolin-4'-O-β-glucopyranoside (33) CD <sub>3</sub> OD (KRENN <i>et al.</i> , 2003)	114,9 7,45	148,6	149,9	117,9 7,32	119,8 7,46
Luteolin 3'-O-α-D-glucopyranoside (32) DMSO (BERTRAND <i>et al.</i> , 2006)	7,74			6,97	7,56
Luteolin 4'-O-α-D-glucopyranoside (33) DMSO (BERTRAND <i>et al.</i> , 2006)	114,0 7,50	147,9	148,7	117,2 7,35	119,0 7,52
Luteolin 3'-O-β-D-glucuronide (34) DMSO (OKAMURA <i>et al.</i> , 1994)	115,2 7,74	145,5	151,7	116,6 6,91	120,5 7,60
Luteolin 3'-O-glucuronide (34) DMSO (LU e FOO, 2000)	116,3 7,82	146,2	152,3	117,1 6,93	122,53 7,60
Luteolin 3'-O-β-D-glucuronopyranoside (34) DMSO (PATORA e KLIMEK, 2002)	113,7 7,68	145,1	150,7	116,6 6,98	121,6 7,64
Luteolin-3'-O-β-glucopyranoside (32) DMSO (YOSHIZAKI <i>et al.</i> , 1987)	7,80			6,98	7,67
Luteolin 4'-O-β-D-glucopyranoside (33) DMSO (YOSHIZAKI <i>et al.</i> , 1987)	116,21 7,49	147,12	148,68	118,60 7,24	124,90 7,53

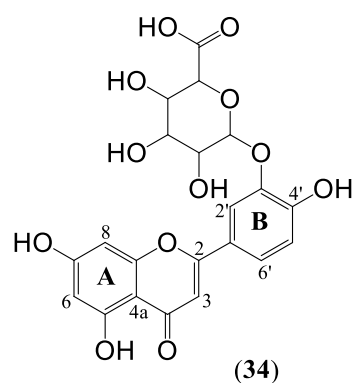
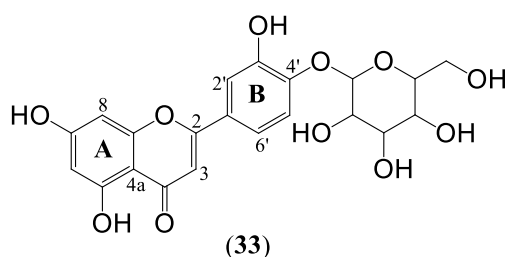
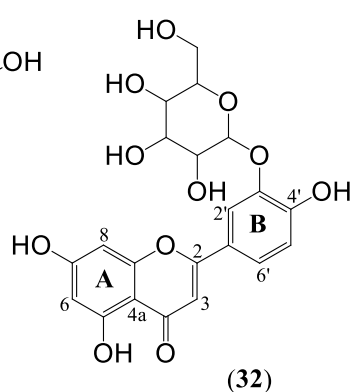
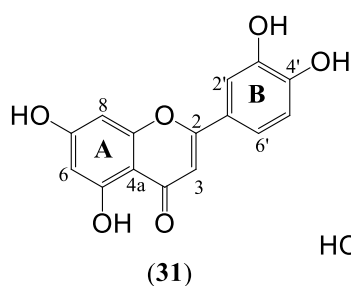


Figura 66 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6

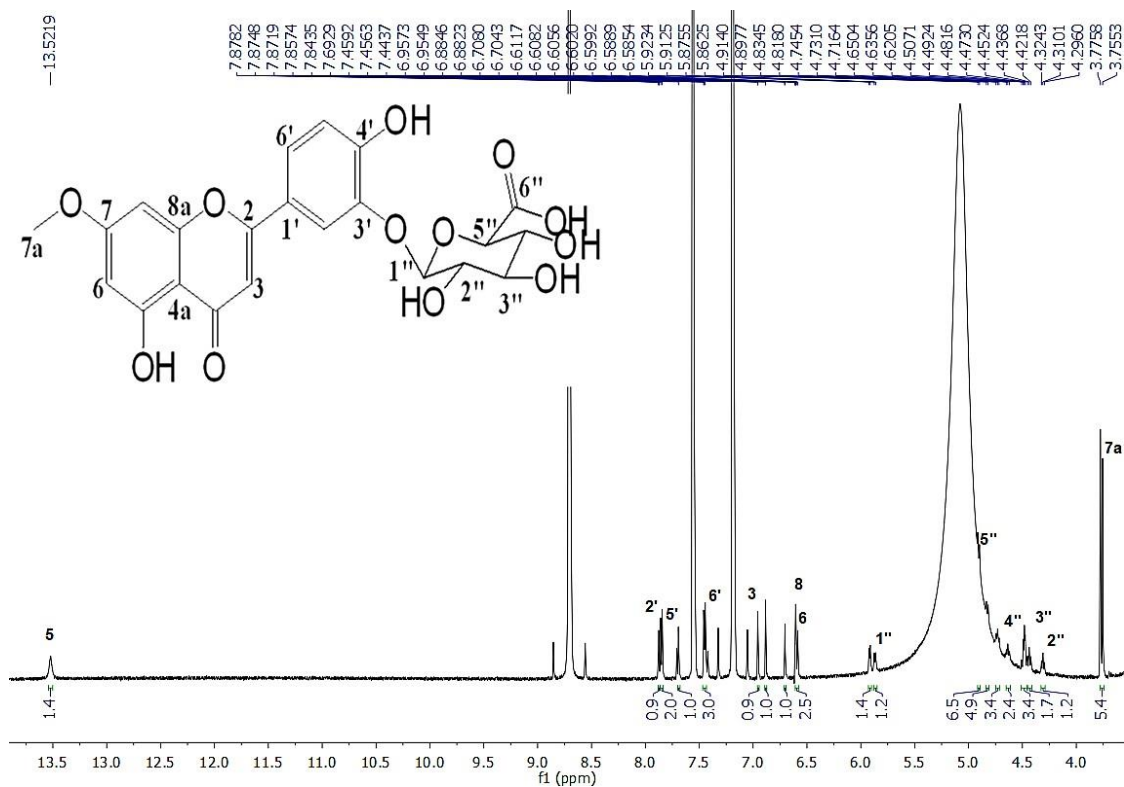


Figura 67 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6

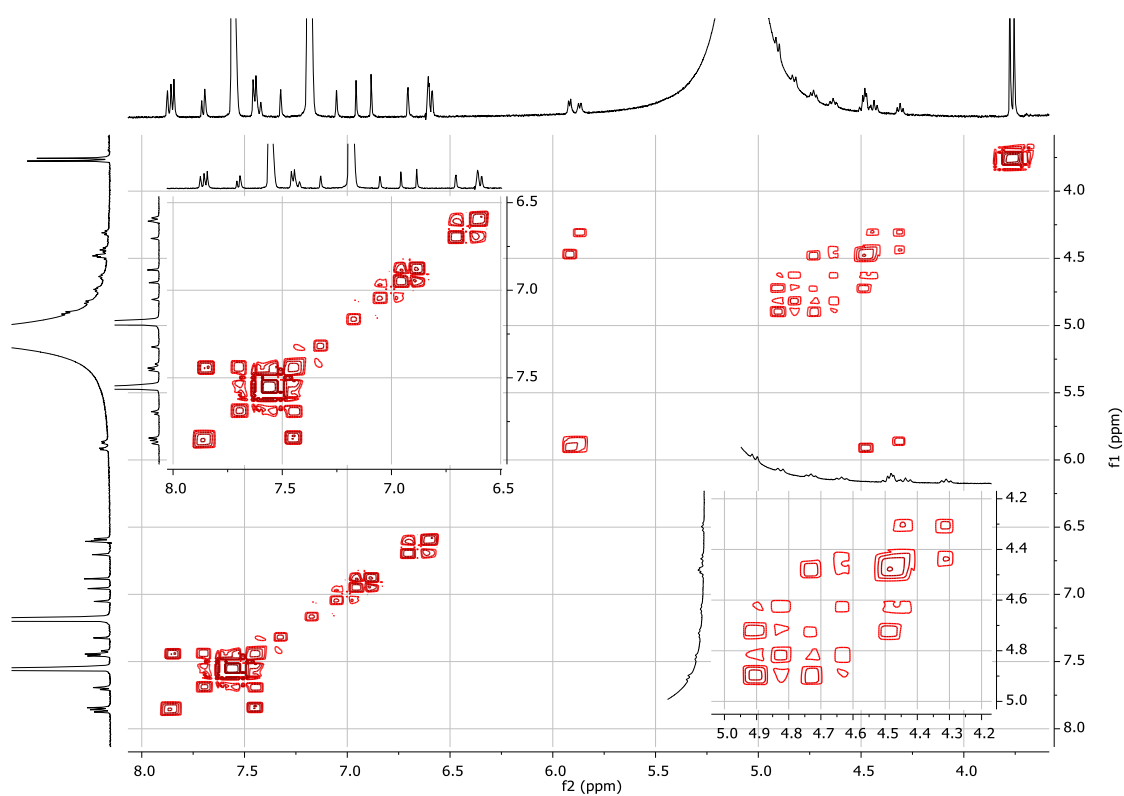


Figura 68 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6

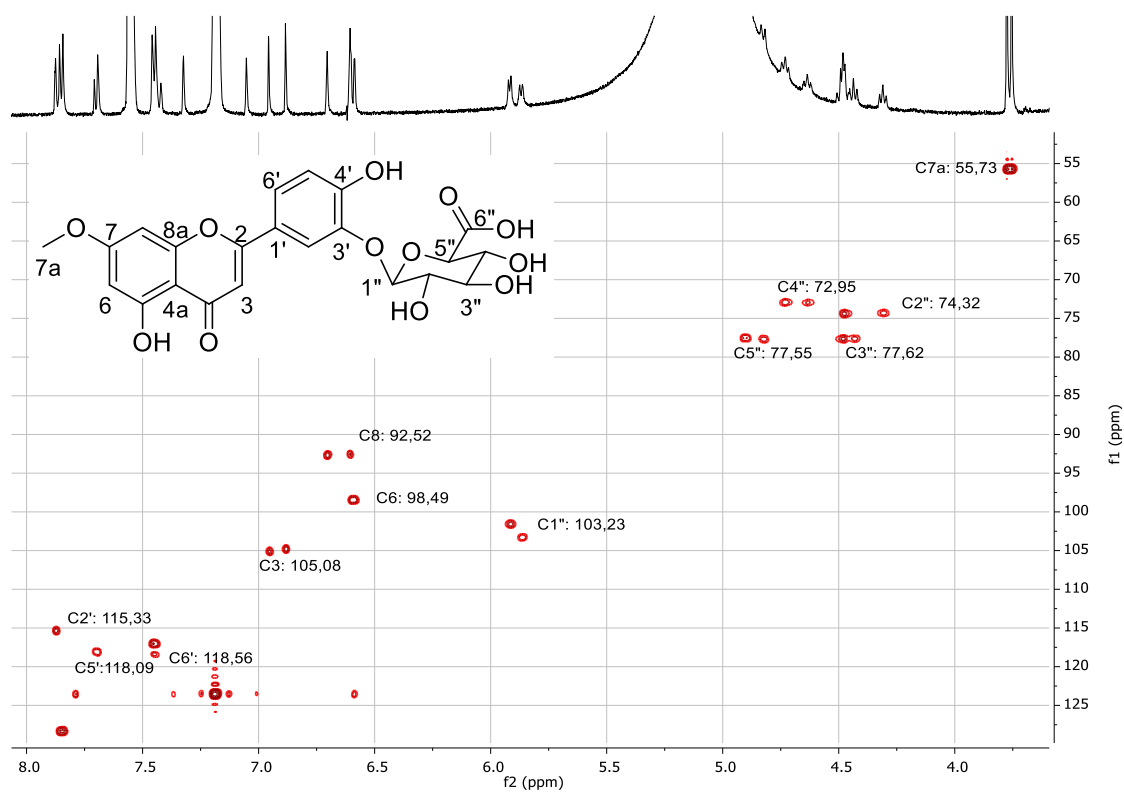


Figura 69 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (600 x 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da mistura DPO-5 e DPO-6

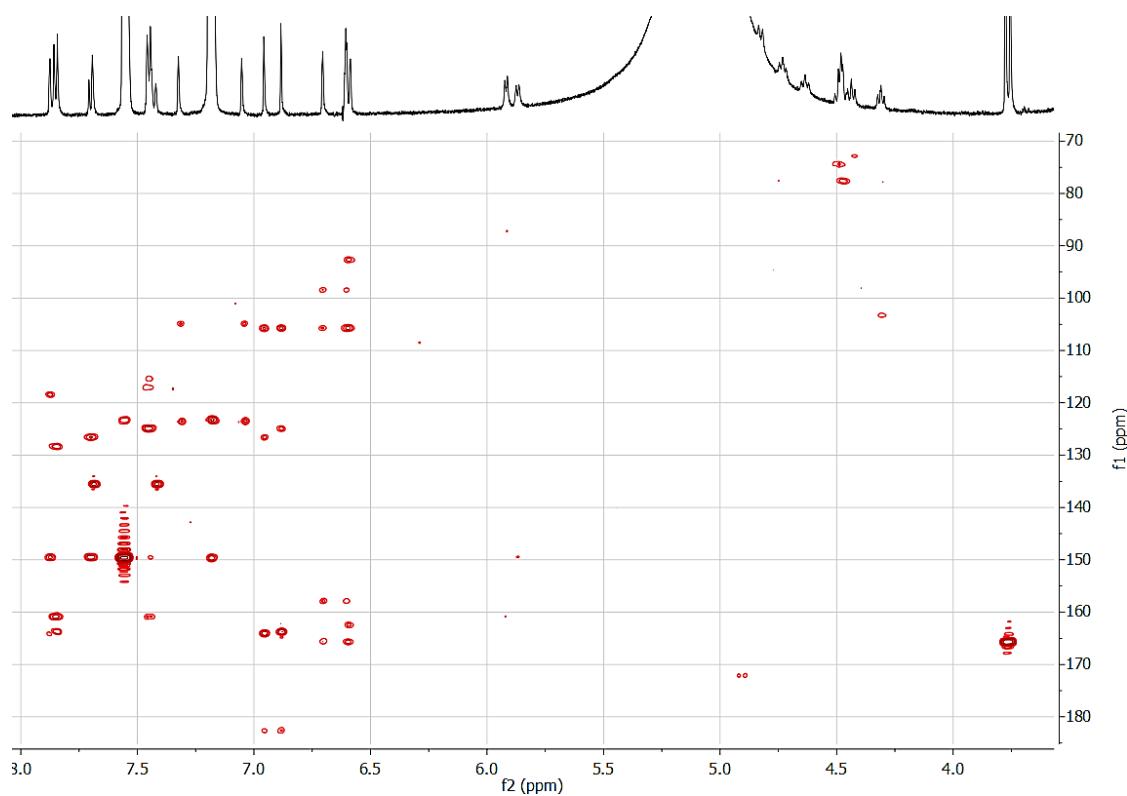


Figura 70 - Espectro de massas de DPO-6

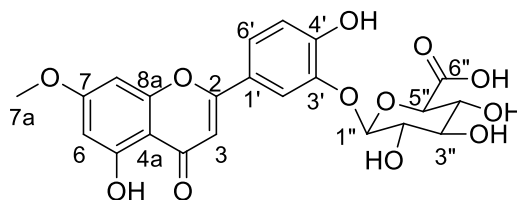
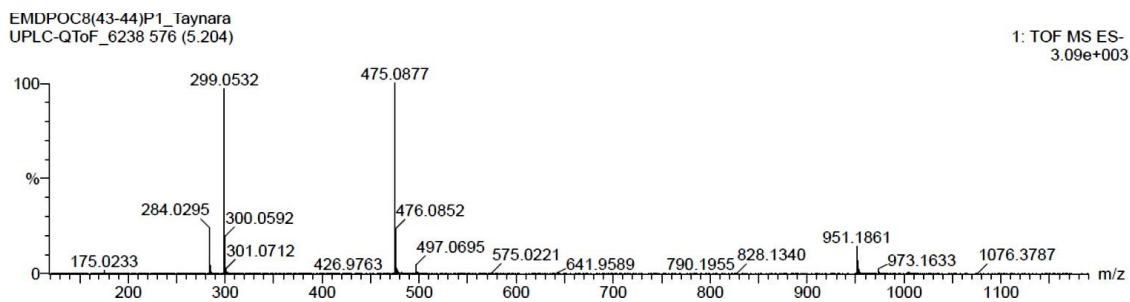
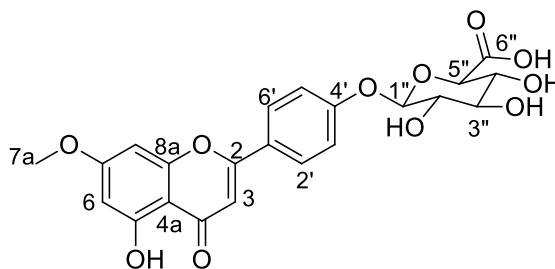
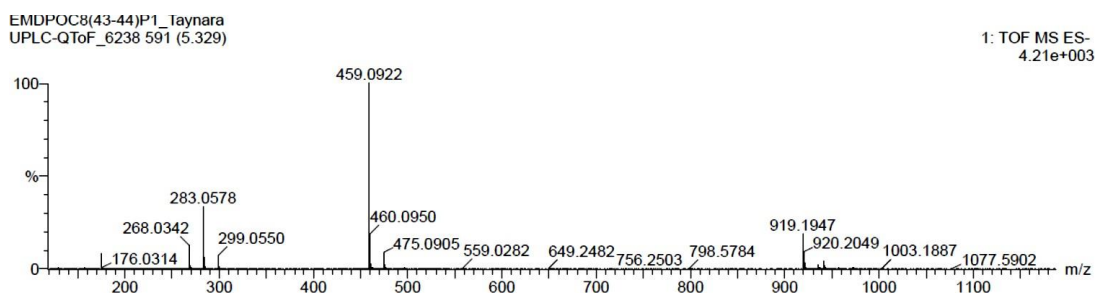


Figura 71 - Espectro de massas de DPO-5

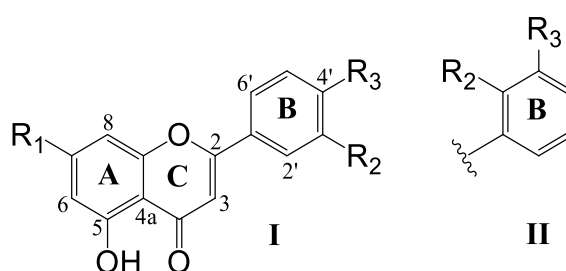


### 6.1.7 Determinação estrutural de DPO-7

O composto codificado como DPO-7 (3,4 mg) foi isolado por CLAE como uma resina marrom da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% +80% (FLUXOGRAMA 2) do chá seguido de fracionamento em Sephadex LH-20 (item 5.4.4.5).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 75) de DPO-7 se apresentou semelhante aos dos compostos DPO-4 e DPO-5, sugerindo que o composto pertence a mesma classe: flavonoide glicosilado. Também foi verificado a existência de sinais referentes à trietilamina e a uma metoxila. Na região de deslocamento químico de  $\delta_H$  6,00- 8,00 ppm, há 5 sinais referentes à 6 prótons, logo podemos sugerir as seguintes subestruturas de acordo com os possíveis locais de substituição no esqueleto básico (FIGURA 72), onde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> podem ser substituídos por uma metoxila, uma hidroxila ou por uma unidade de açúcar. Dentre os possíveis padrões de substituição, a representada pela subestrutura II não é compatível porque o espectro não apresenta um tripleto que seria o próton 5'. A subestrutura I também pode ser confirmada pelo espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H – COSY (FIGURA 76) que apresenta o acoplamento entre dois sinais de hidrogênios, que pela constante de acoplamento, confirma a posição *orto* desses dois hidrogênios [ $\delta_H$  7,60 (sl) e 6,99 (d, *J*= 7,8 Hz)].

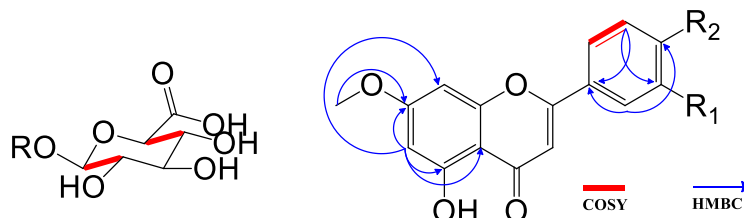
Figura 72 – Possíveis esqueletos básicos para DPO-7



Os dados de <sup>13</sup>C foram obtidos pela análise dos espectros bidimensionais <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C de HSQC (FIGURA 77) e HMBC (FIGURA 78), e assim a Tabela 10 foi elaborada. Como o hidrogênio em  $\delta_H$  6,99 (H-5') apresenta correlação no espectro de COSY com  $\delta_H$  7,60 (H-6'), ambos fazem parte do anel B, visto que não há hidrogênios vicinais nem no anel A e nem no anel C (FIGURA 73). No espectro de HMBC, o hidrogênio em  $\delta_H$  6,99 (H-5') apresenta correlação com  $\delta_C$  124,45 (C-1') e  $\delta_C$  147,77 (C-3'), assim como o singleto em  $\delta_H$  7,88 também apresenta correlação com  $\delta_C$  124,37, logo o próton em  $\delta_H$  7,88 é o H-2'. Como a metoxila e H-8 correlacionam com  $\delta_C$  168,34, logo a metoxila está no anel A. Por último, falta

alocar a molécula de açúcar no esqueleto básico do flavonoide, podendo ser em C-3' ou C-4'. DPO-6 e DPO-7 foram obtidos da mesma análise por CLAE de uma mesma subfração, e apesar de seus espectros de ressonância serem obtidos em solventes diferentes, C-4' de DPO-7 apresenta-se mais protegido que C-4' de DPO-6, o que sugere a posição da unidade de açúcar em C-4'.

Figura 73 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-7



Deste modo, DPO-7, 4'- $\beta$ -D-glicuropiranosil-5,3'-dihidróxi-7-metóxi-flavona (FIGURA 74), está sendo relatado pela primeira vez na literatura. Entretanto, foi verificado que há relatos de um flavonoide glicosilado similar, a luteolina 4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, isolado das folhas de *Trichosanthes kirilowii* (Cucurbitaceae), uma espécie característica do Japão (YOSHIZAKI *et al.*, 1987). Os dados de ressonância do mesmo foram utilizados como referência para a elaboração da Tabela 10.

Figura 74 – Representação estrutural do composto DPO-7

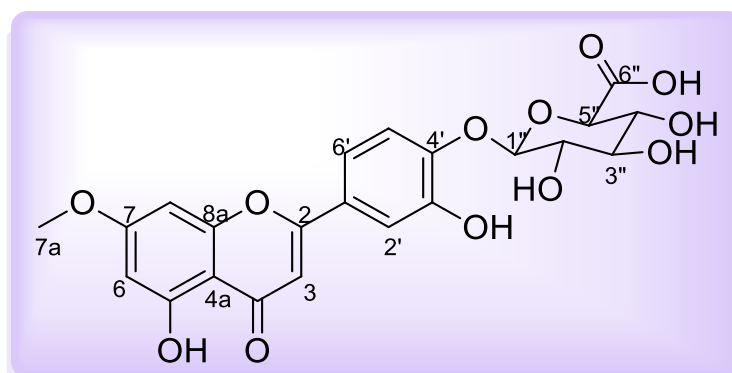




Tabela 10 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-7 comparados com valores da literatura (200 x 50.3 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ ) (YOSHIZAKI *et al.*, 1987)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C Lit.}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit.}}$
2	-	164,45	-			
3	104,70	104,10	6,64 (s)			6,83 (s)
4	-	181,93	-			
4a	106,89	103,91	-		H-6	
5	163,80	161,62	-	H-6		
6	99,75	99,02	6,30 (s)			6,20 (d, $J= 2,0$ )
7	167,66	163,37	-	H-6	H-7a	
7a	56,50	-	3,90 (s)			
8	93,53	94,09	6,67 (sl)		H-6	6,50 (d, $J= 2,0$ )
8a	-	157,52	-			
1'	124,45	124,90	-	H-2'	H-5'	
2'	117,13	116,21	7,88 (s)			7,49 (d, $J= 1,9$ )
3'	147,77	147,12	-		H-5'	
4'	153,88	148,68	-		H-2'	
5'	118,11	118,60	6,99 (d, $J= 7,8$ )			7,24 (d, $J= 8,8$ )
6'	124,16	124,90	7,60 (sl)			7,53 (dd, $J= 1,9; 8,8$ )
1''	103,23	101,37	4,99 (sl)			
2''	74,12	73,29	3,59 (m)			
3''	73,10	75,93	3,69 (m)			
4''	76,88	69,87	3,59 (m)			
5''	76,88	75,42	4,09 (m)			
6''	-	60,79	-			

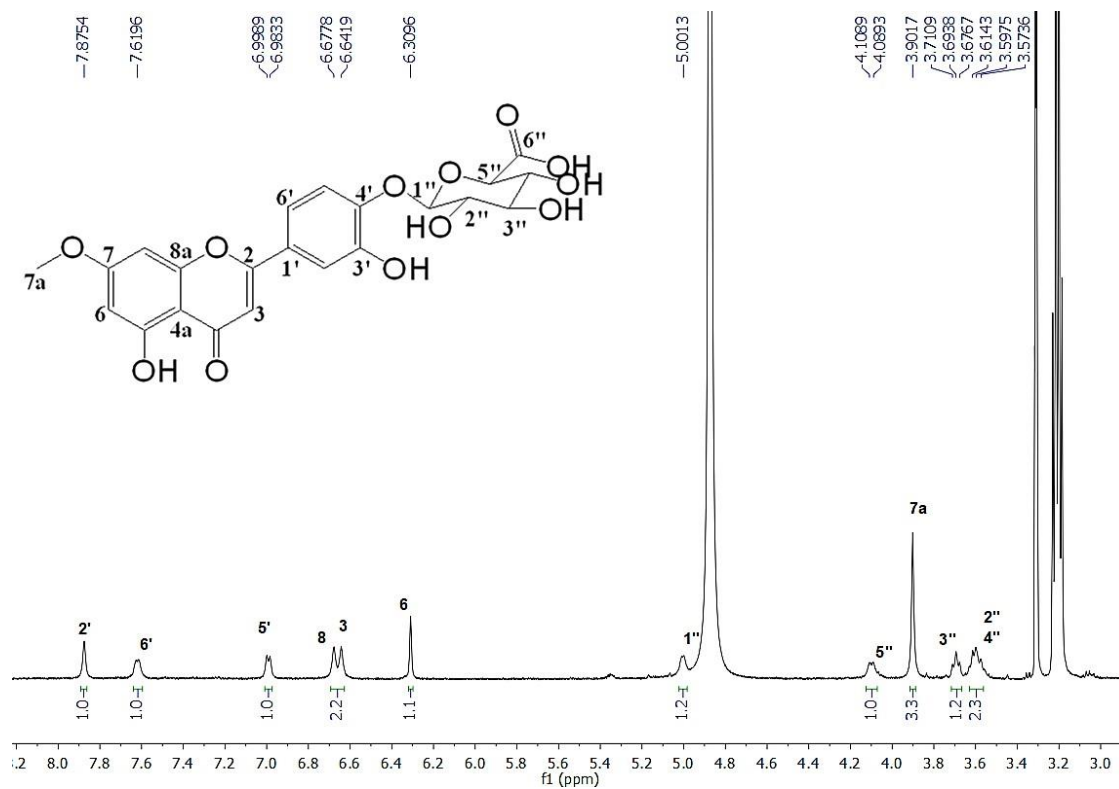
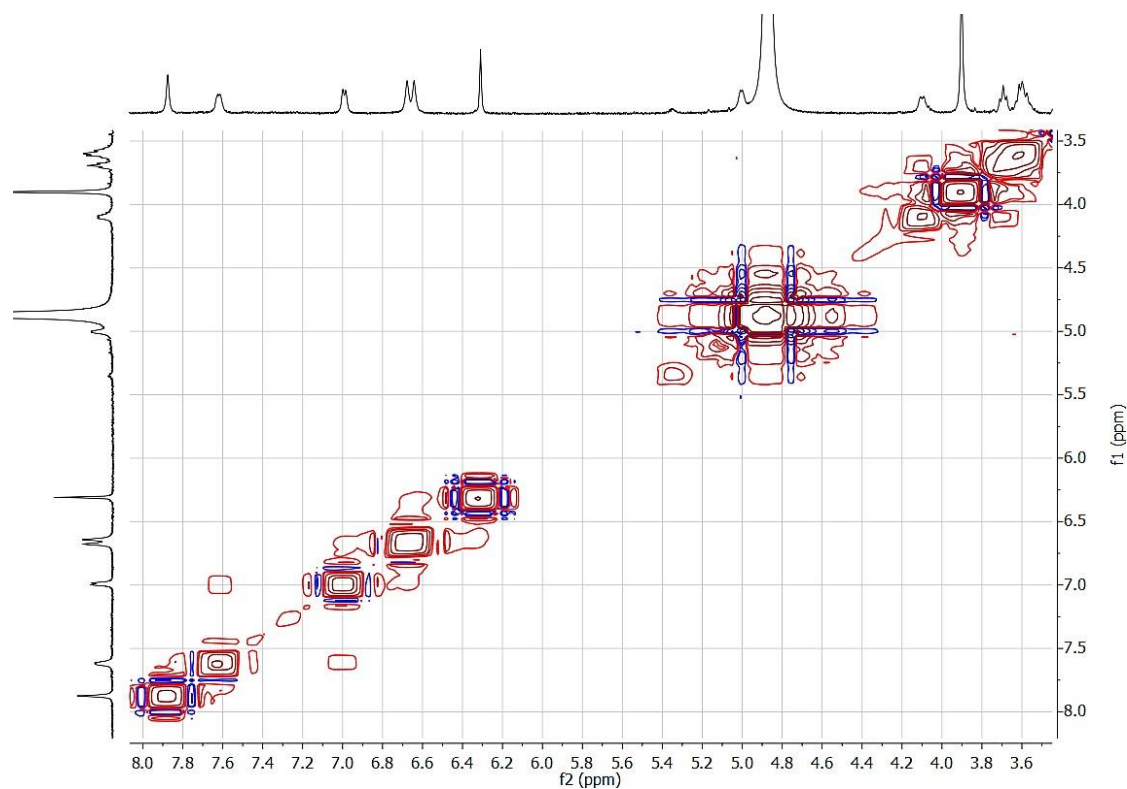
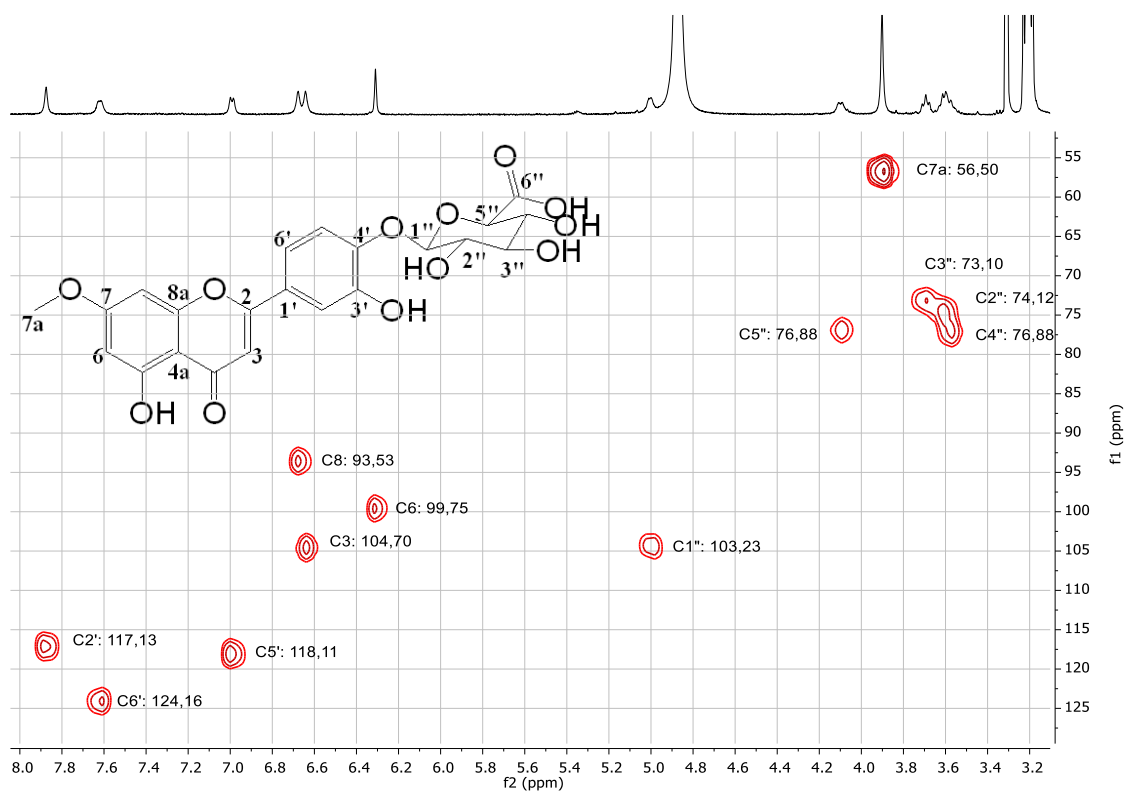
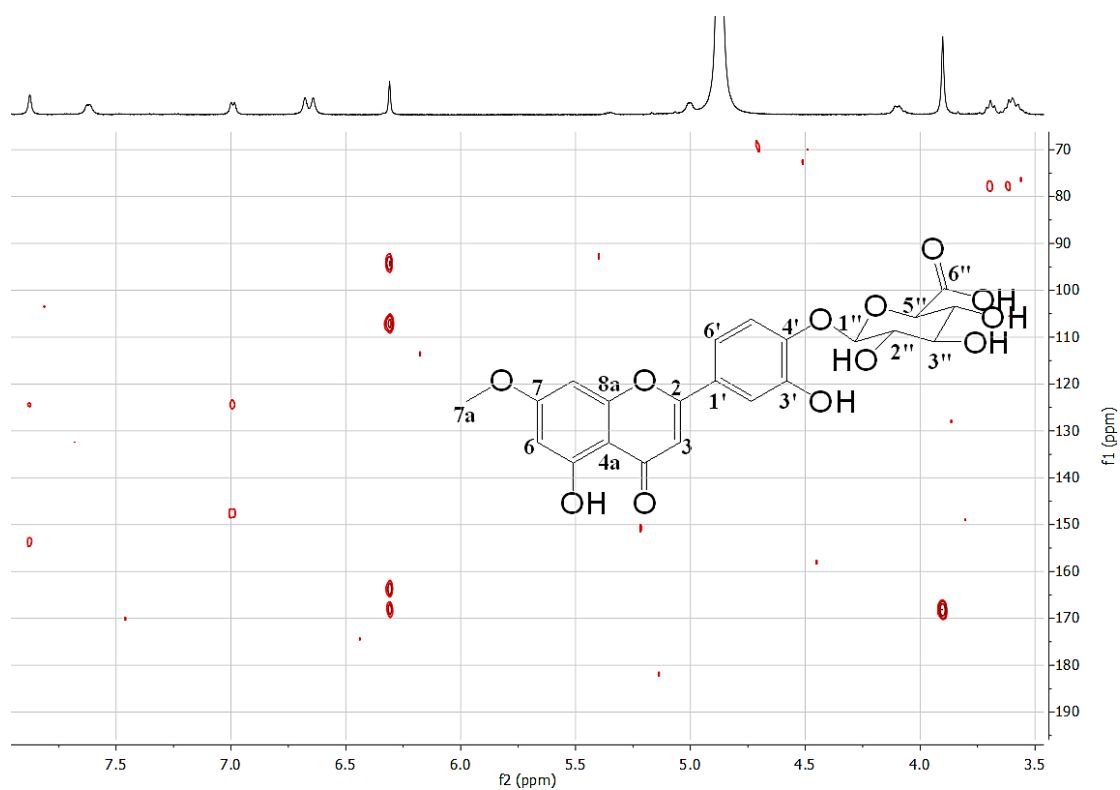
Figura 75 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de DPO-7Figura 76 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-7

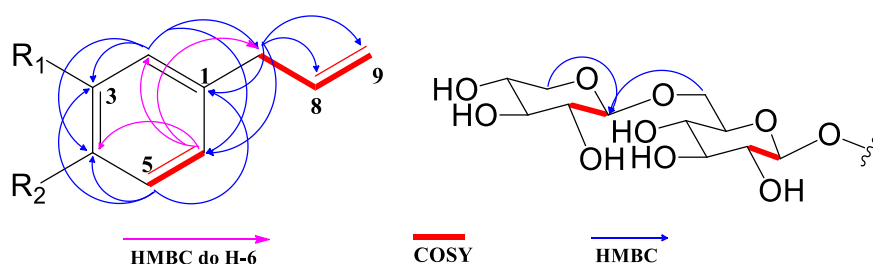
Figura 77 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-7Figura 78 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-7

### 6.1.8 Determinação estrutural de DPO-8

O composto codificado como DPO-8 (5,8 mg), uma resina amarela, foi purificado por CLAE a partir da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% (item 5.4.4.6).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 82) de DPO-8 apresentou três sinais de hidrogênios na faixa de  $\delta_H$  6,00 - 9,00 ppm, característicos de um sistema de spin ABX:  $\delta_H$  6,68 (1H, d,  $J=2,2$  Hz, H-2), 7,13 (1H, d,  $J=8,2$  Hz, H-5) e 6,63 (1H, dd,  $J=8,2; 2,2$  Hz, H-6), cujas constantes de acoplamentos permitiram sugerir um anel benzênico trissubstituído. Também foram observados sinais na região de olefinas em  $\delta_H$  5,92 (1H, ddt,  $J=6,7; 10,1; 16,7$  Hz, H-8) e 5,03 (2H, m, H-9), as quais mostram correlação entre si no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H – COSY (FIGURA 84); uma série de sinais para hidrogênios metínicos oxigenados, assim como dois sinais típicos de hidrogênios oximetilênicos em  $\delta_H$  4,70 (1H, d,  $J=7,2$  Hz, H-1') e 4,33 (1H, d,  $J=7,3$  Hz, H-1''), ambos correlacionados com carbonos anoméricos em  $\delta_C$  104,7 e 105,5, respectivamente, no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (FIGURA 86), sugerindo assim, a presença de duas unidades de açúcares. No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C – HMBC (FIGURA 87) foi verificada correlação entre sinais das unidades de açúcares (FIGURA 79), sugerindo assim que se tratava do mesmo dissacarídeo presente em DPO-3 (FIGURA 33).

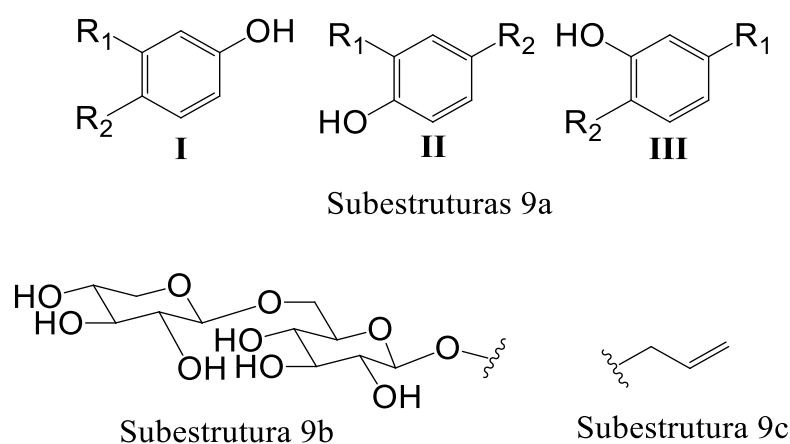
Figura 79 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-8



O espectro de RMN <sup>13</sup>C (FIGURA 83) apresentou 20 linhas espectrais cujo padrão de hidrogenação foi definido por análise do espectro de DEPT 135° (FIGURA 85) e por comparação destes averiguou-se a quantidade de carbonos não hidrogenados. Assim, os carbonos foram definidos como quatro carbonos metilênicos (2  $sp^3$  oxigenados, 1  $sp^3$  alílico e 1  $sp^2$  terminal), treze carbonos metínicos (9  $sp^3$  oxigenados, 3  $sp^2$  aromáticos e 1  $sp^2$  olefínico) e três carbonos benzênicos não hidrogenados, dos quais 2 são oxigenados.

A análise destes dados permitiu sugerir 3 subunidades (FIGURA 80), da qual 3 posições de substituição são possíveis (Subestruturas 9a: I, II e III). Entretanto, a subunidade 9a-I foi descartada com base nos deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados oxigenados em  $\delta_C$  148,2 e 145,2, haja vista que os mesmos se encontram mais protegidos em relação a carbonos benzênicos que não se encontram nessa situação de vizinhança.

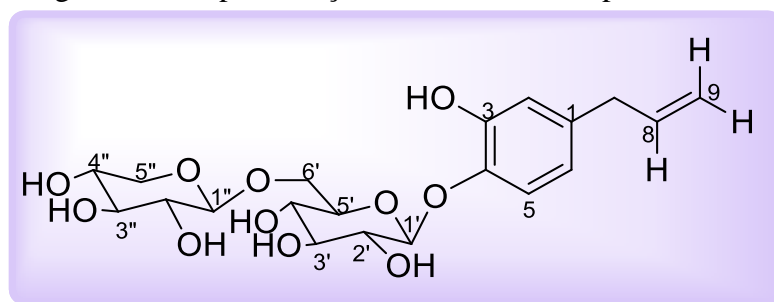
Figura 80 – Subunidades sugeridas para a estrutura de DPO-8



Através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  – HSQC (FIGURA 86), foi possível correlacionar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono (TABELA 11). Sinais que estavam sobrepostos como os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos H-7 ( $\delta_H$  3,26/  $\delta_C$  40,7) e do sinal pertencente a unidade de açúcar ( $\delta_H$  3,22/  $\delta_C$  75,1) foram discriminados.

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  – HMBC (FIGURA 87) foi fundamental para definir a Subestrutura 9a-III (FIGURA 80) em função das correlações apresentadas pelo H-6 com C-7 ( $\delta_C$  40,7) e C-4 (145,2) (FIGURA 79). Vale ressaltar que o deslocamento químico do carbono ao qual está ligado a unidade de açúcar é mais protegido do qual está ligado o -OH em função dos efeitos  $\gamma$  protetor (SHOULDERS e WELCH, 1987). Com a compilação dos dados, chegou-se ao alilbenzeno glicosilado conhecido como *forsythenside L* (FIGURA 81). Um composto previamente isolado da *Forsythia suspensa* (Oleaceae), uma erva medicinal da China (LI *et al.*, 2014).

Figura 81 – Representação estrutural do composto DPO-8

Tabela 11 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-8 comparados com valores da literatura (300 x 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (LI *et al.*, 2014)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ Lit.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$ Lit.
1	137,4	137,3	-	-
2	117,5	117,3	6,68 (1H, d, $J= 2,2$ )	6,68 (1H, d, $J= 2,1$ )
3	148,2	148,2	-	-
4	145,2	145,0	-	-
5	119,4	119,2	7,13 (1H, d, $J= 8,2$ )	7,13 (1H, d, $J= 8,2$ )
6	121,3	121,2	6,63 (1H, dd, $J= 8,2; 2,2$ )	6,63 (1H, dd, $J= 2,1; 8,2$ )
7	40,7	40,6	3,26 (m)	3,24 (m)
8	139,2	139,0	5,92 (1H, ddt, $J= 6,7; 6,9; 10,1; 16,7$ )	5,93 (1H, ddt, $J= 6,7; 10,1; 16,9$ )
9	115,9	115,7	5,03 (m)	5,03 (m)
1'	104,7	104,5	4,70 (1H, d, $J= 7,2$ )	4,70 (1H, d, $J= 7,5$ )
2'	74,9	74,8	3,46 (m)	3,45 (m)
3'	77,7	77,6	3,31 (m)	3,27 (m)
4'	71,5	71,4	3,41 (m)	3,40 (m)
5'	77,6	77,3	3,59 (m)	3,57 (m)
6'	69,9	69,8	4,12 (1H, dd, $J= 2,3; 11,5$ ) 3,78 (m)	4,12 (1H, dd, $J= 2,0; 11,5$ ) 3,76 (m)
1''	105,5	105,4	4,33 (1H, d, $J= 7,3$ )	4,33 (1H, d, $J= 7,3$ )
2''	75,1	75,0	3,22 (m)	3,20 (m)
3''	77,5	77,4	3,46 (m)	3,43 (m)
4''	71,3	71,2	3,46 (m)	3,47 (m)
5''	66,9	66,9	3,85 (m) 3,16 (m)	3,84 (m) 3,16 (m)

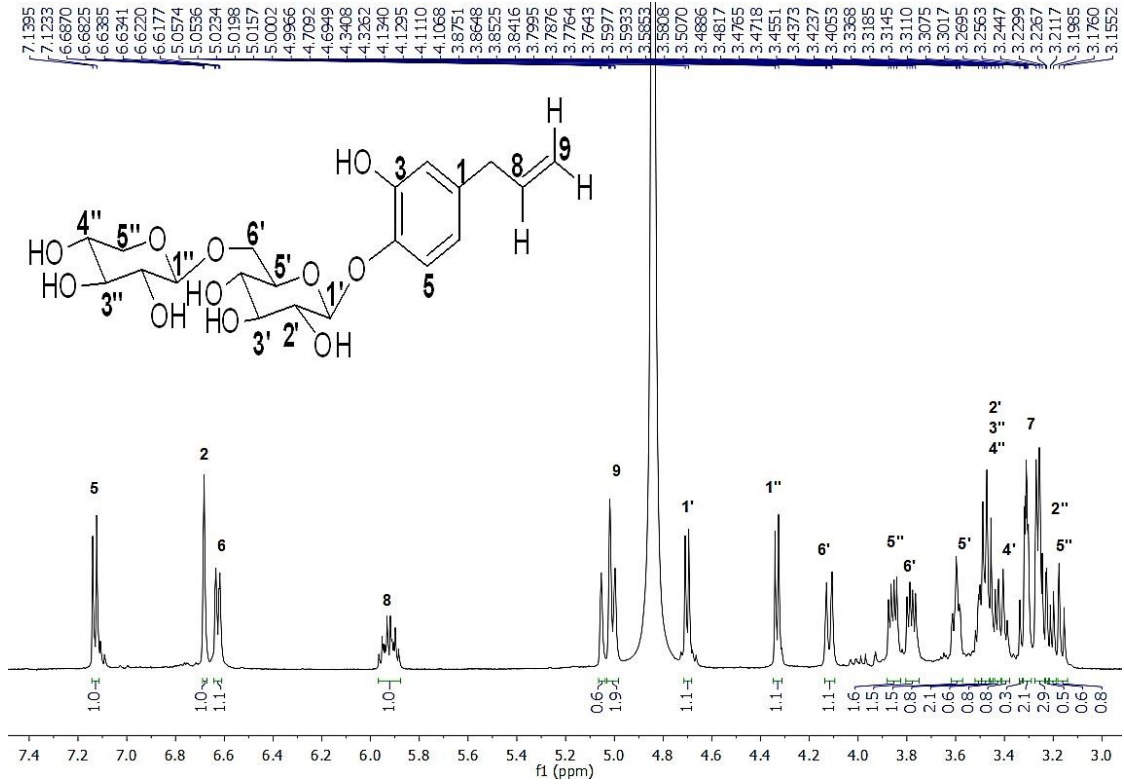
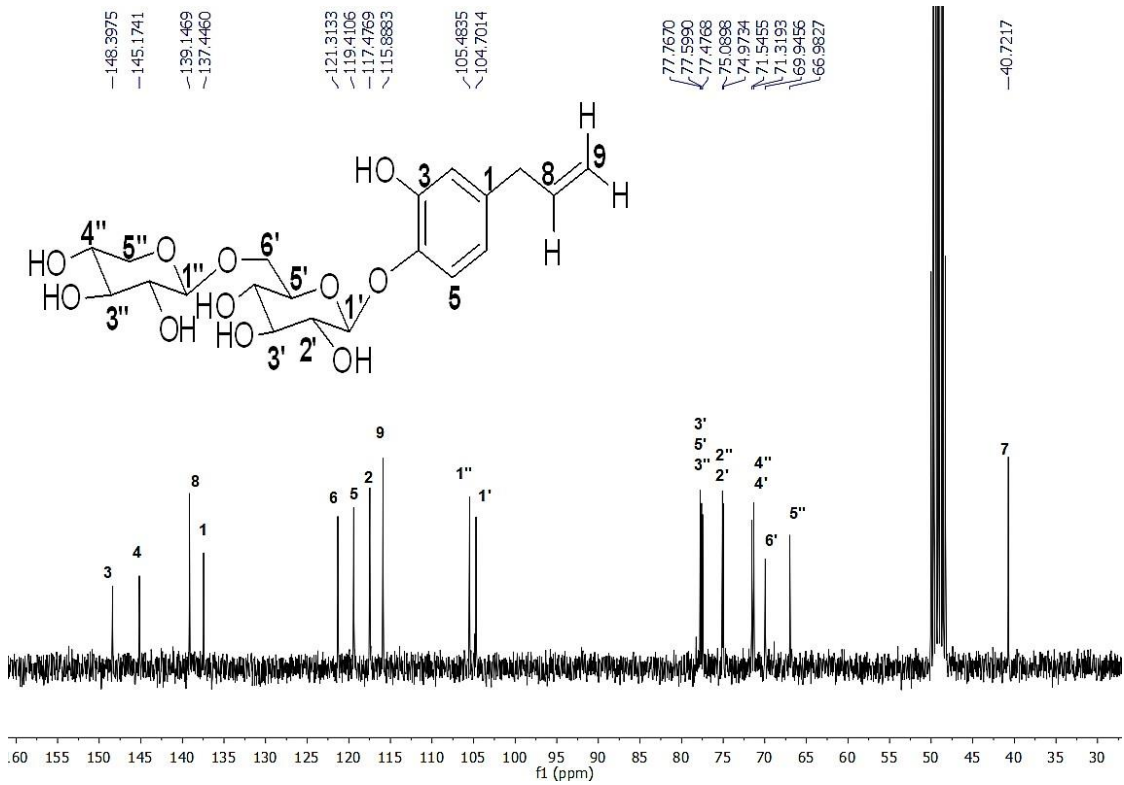
Figura 82 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de DPO-8Figura 83 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) de DPO-8

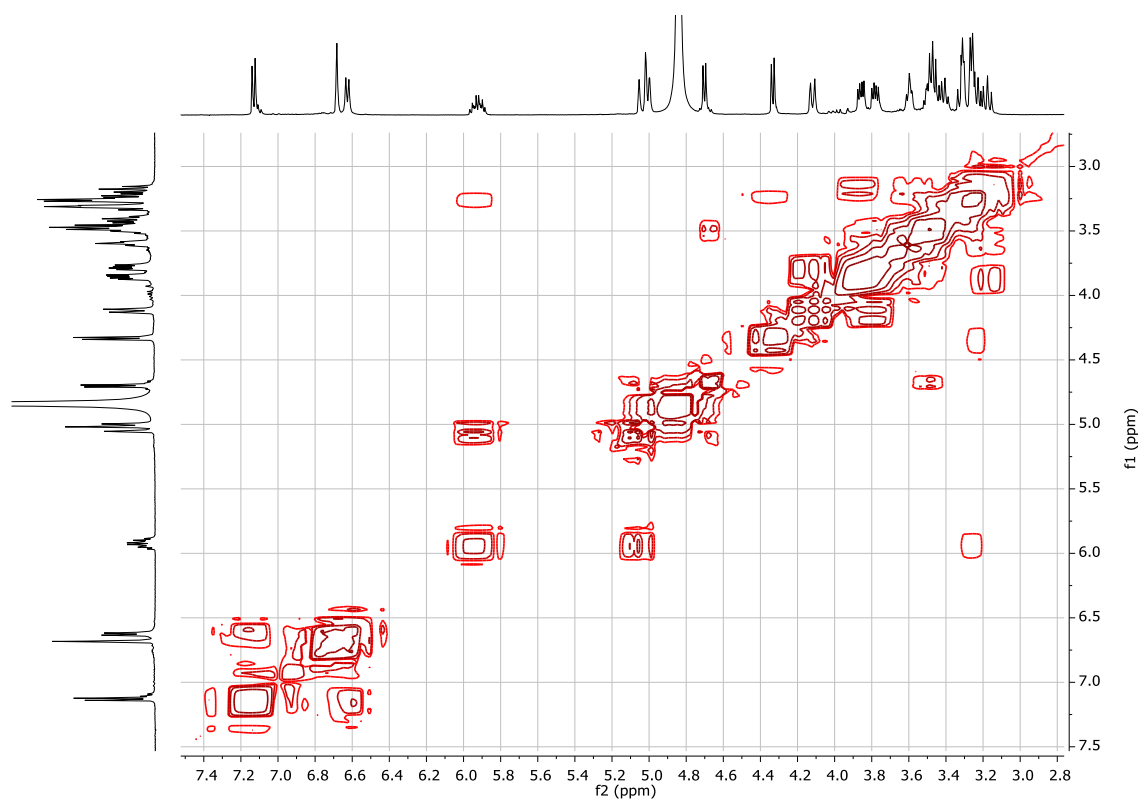
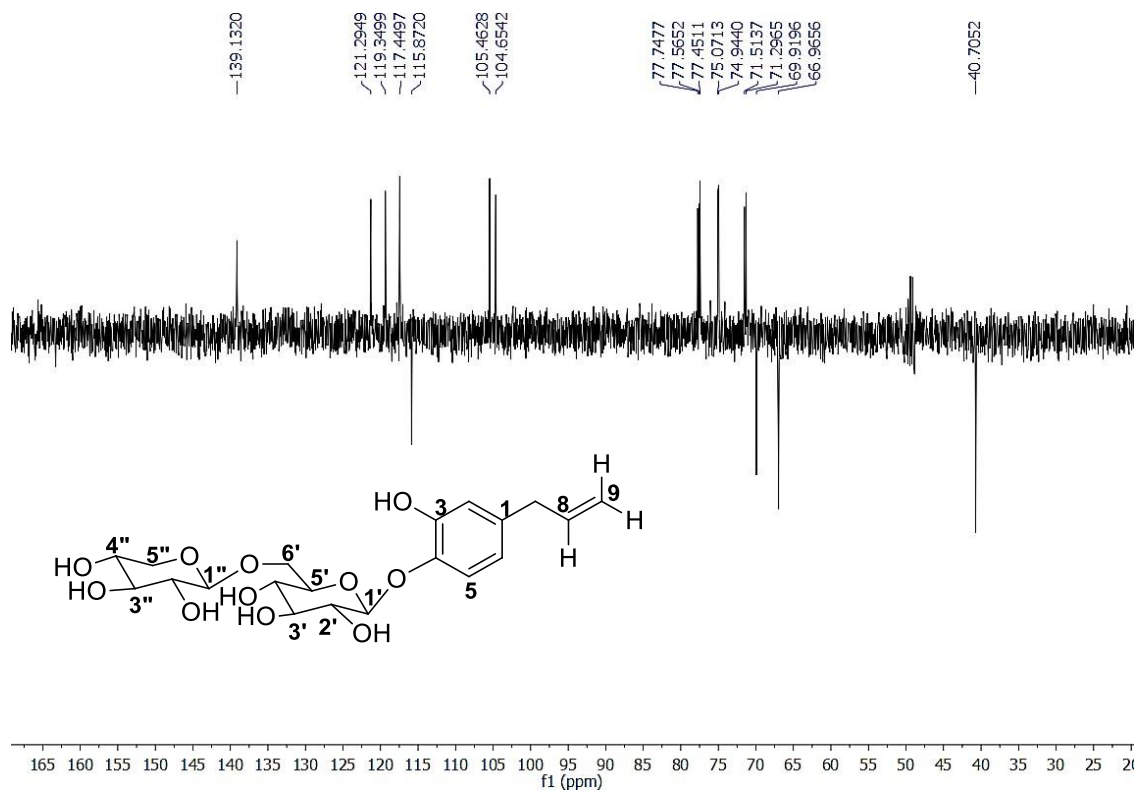
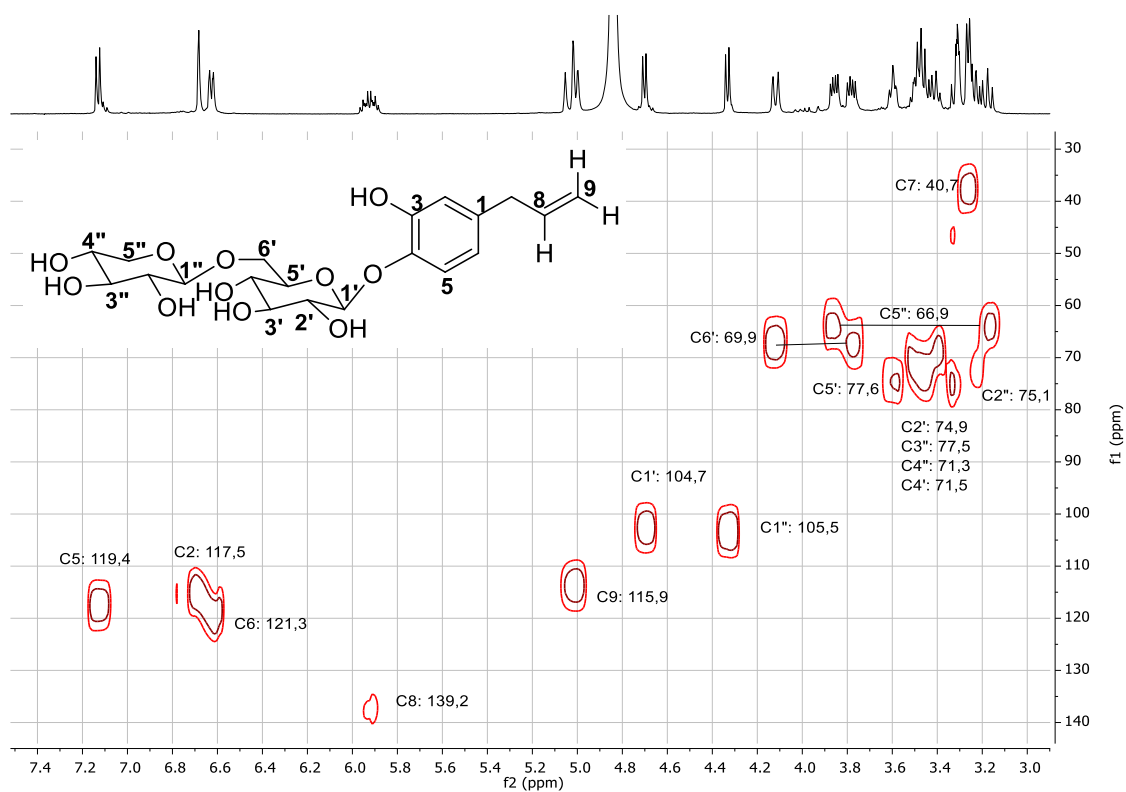
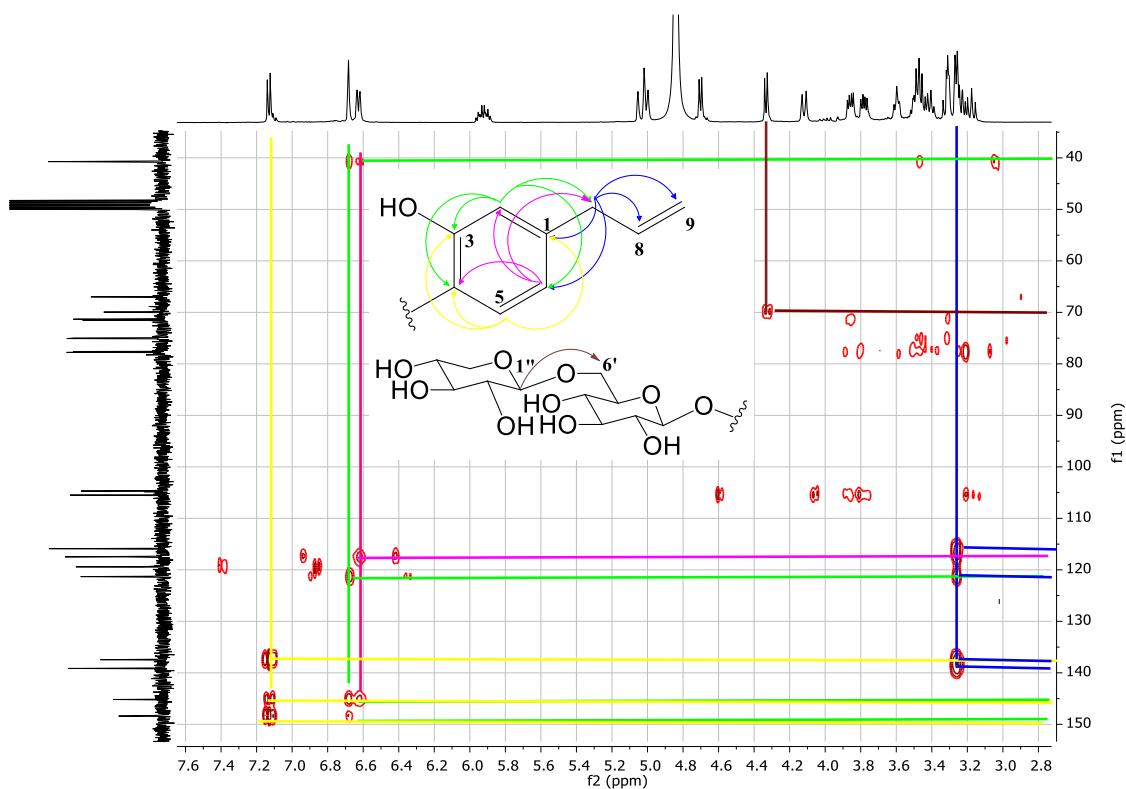
Figura 84 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-8Figura 85 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (75 MHz, MeOD) de DPO-8



Figura 86 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-8Figura 87 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz, MeOD) de DPO-8

### 6.1.9 Determinação estrutural de DPO-9

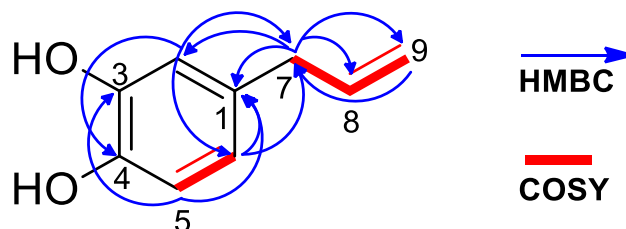
DPO-9, uma resina marrom, foi isolado da mesma fração, e pelo mesmo método que se obteve DPO-8 a partir da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% (item 5.4.4.6).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 90) de DPO-9 se apresentou similar ao DPO-8 com exceção dos sinais característicos das unidades de açúcares, assim como, a ausência dos sinais de hidrogênios característicos de carbonos anoméricos. No mesmo é possível observar os três sinais de hidrogênios na região de anel aromático ( $\delta_H$  6,60- 6,67 ppm), sinais da região de olefinas ( $\delta_H$  4,97- 5,91 ppm) e um sinal característico de hidrogênios metilênicos, confirmado pelo de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HSQC (FIGUURA 94).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C - BB (FIGURA 91) revelou 6 linhas espectrais, que juntamente com o espectro de RMN de <sup>13</sup>C – DEPT 135° (FIGURA 93) possibilitou a definição do padrão de hidrogenação dos carbonos como sendo dois carbonos metilênicos [ $\delta_C$  40,8 (C-7) e 115,4 (C-9)] e quatro carbonos metínicos [ $\delta_C$  116,4 (C-5), 116,8 (C-2), 121,0 (C-6) e 139,7 (C-8)].

Através da análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H – COSY (FIGURA 92) foi possível verificar a posição vicinal dos hidrogênios em  $\delta_H$  3,21 (2H, d,  $J= 6,7$  Hz, H-7) e 5,91 (1H, ddt,  $J= 6,8; 10,2; 16,9$  Hz, H-8), e deste último com  $\delta_H$  4,97 (1H, m,  $J= 10,2$  Hz, H-9a) e 5,01 (1H, m,  $J=1,9; 2,9; 17,3$  Hz, H-9b), confirmando a porção alílica presente em DPO-8 (FIGURA 81). Os hidrogênios em  $\delta_H$  6,48 (1H, dd,  $J= 2,5; 9,6$  Hz, H-6) e 6,67 (1H, d,  $J= 9,6$  Hz, H-5) também apresentaram correlação (FIGURA 88). E desta forma, com base nos dados apresentados e correlacionando com DPO-8, o anel aromático trissubstituído e uma cadeia lateral com hidrogênios metilênicos e de olefina são sugeridos.

Figura 88 – Correlações observadas no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C - HMBC e COSY de DPO-9



Com base nos espectros de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HSQC (FIGURA 94) e HMBC (FIGURA 95), foi possível atribuir cada hidrogênio a seu respectivo carbono (TABELA 12),

como também, identificar os carbonos não hidrogenados [ $\delta_C$  139,5 (C-1), 144,37 (C-3) e 145,89 (C-4)]. Portanto, DPO-9 (FIGURA 89), nomeado como 3,4-dihidroxiálilbenzeno, é a aglicona de DPO-8. Este fenol já é reportado na literatura como produto de síntese (POUYSGU *et al.*, 2010; SHIMONI *et al.*, 2003) e como metabólito secundário de uma planta medicinal da Índia, a *Piper betel* (Piperaceae) (RATHEE *et al.*, 2006).

Figura 89 – Representação estrutural do composto DPO-9

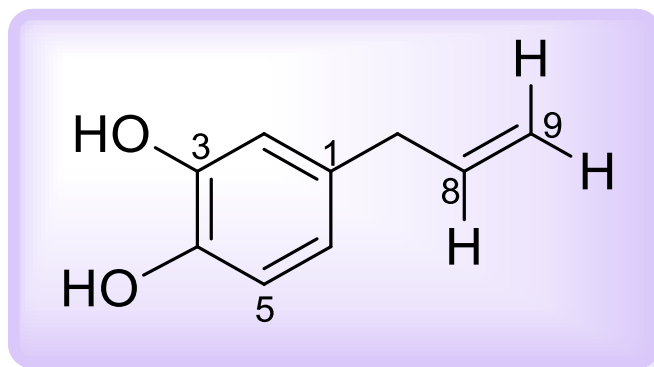


Tabela 12 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-9 comparados com valores da literatura (200 x 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (RATHEE *et al.*, 2006)

#	$\delta_C$	$\delta_C$ Lit.	$\delta_H$	$^2J$	$^3J$	$\delta_H$ Lit.
1	133,09	131,2	-	H-6 H-7	H-5	-
2	116,84	118,2	6,60 (1H, d, $J=2,5$ )		H-6 H-7	6,59-6,79 (m)
3	146,85	145,1	-		H-5	5,36 (2H, sl)
4	144,56	139,7	-		H-2 H-6	5,36 (2H, sl)
5	116,47	CH	6,67 (1H, d, $J=9,6$ )	H-6		6,59-6,79 (m)
6	121,02	122,4	6,48 (1H, dd, $J=2,5$ ; 9,6)		H-2 H-7	6,59-6,79 (m)
7	40,83	38,2	3,21 (2H, d, $J=6,7$ )	H-8	H-2 H-6 H-9	3,28 (2H, d, $J=6,5$ )
8	139,74	132,5	5,91 (1H, ddt, $J=6,8$ ; 10,2; 16,9)	H-7		5,80-6,01 (m)
9	115,36	114,6	4,97 (m, $J=10,2$ ) 5,01 (m, $J=1,9$ ; 2,9; 17,3)		H-7	4,99-5,08 (m)

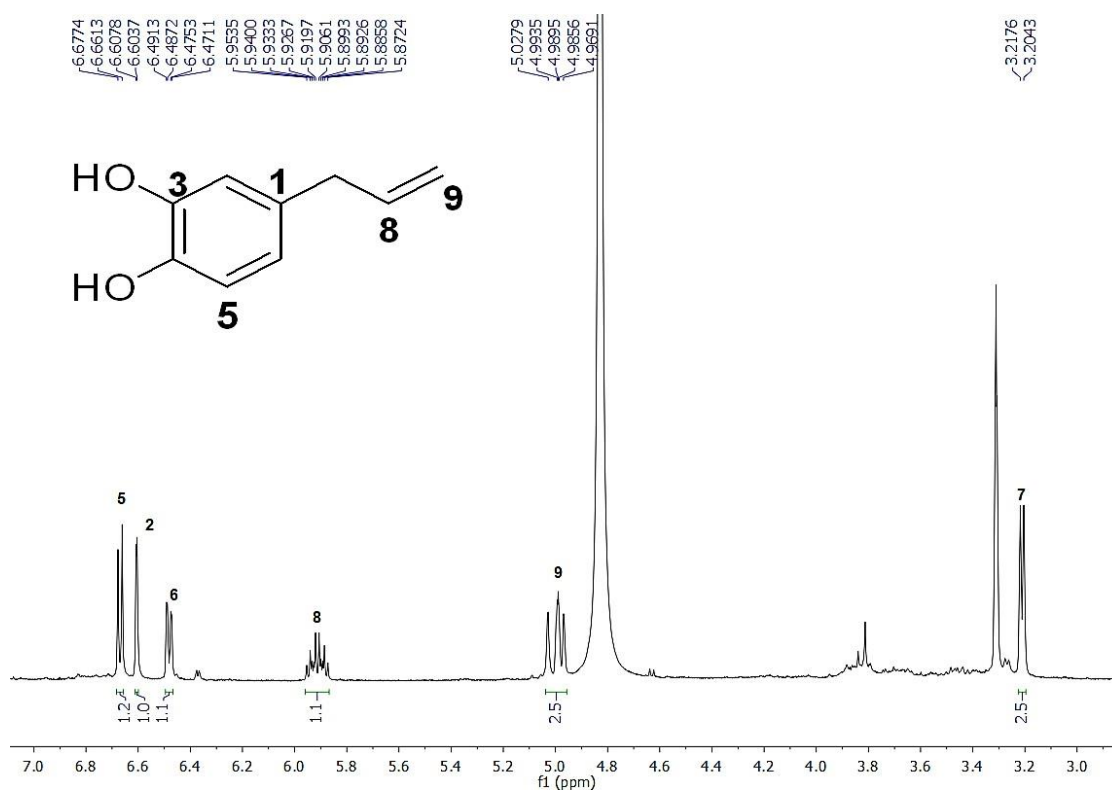
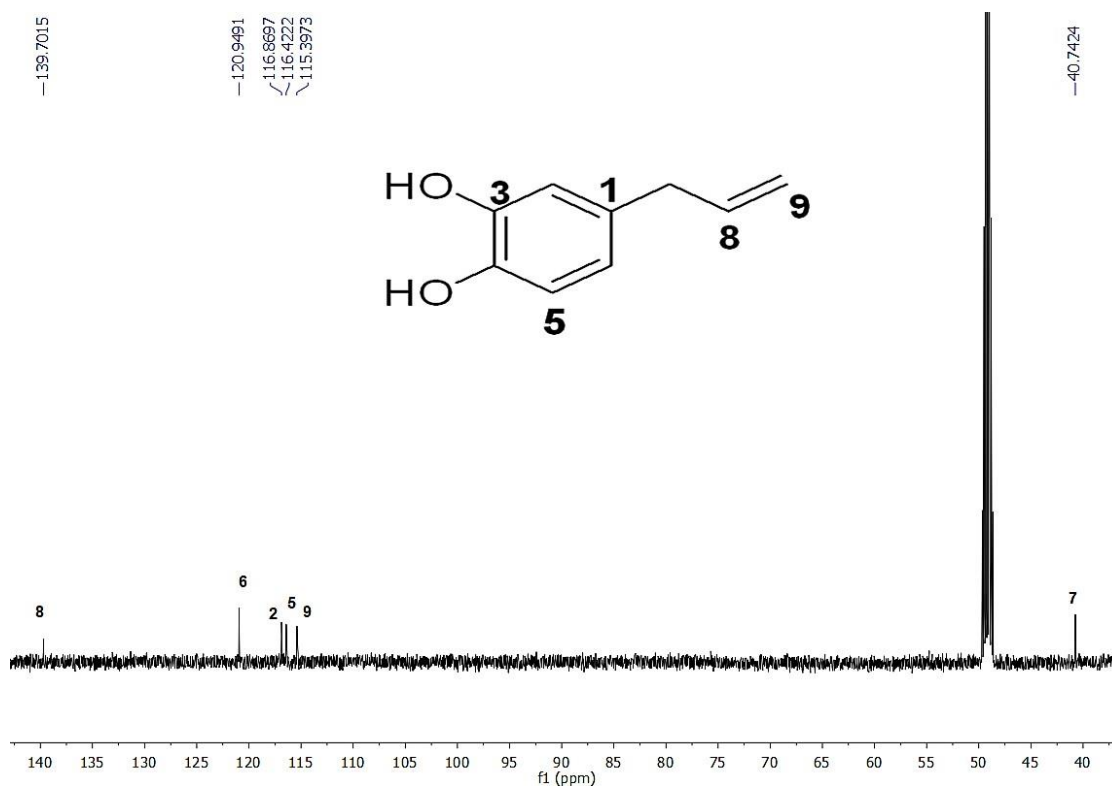
Figura 90 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de DPO-9Figura 91 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, MeOD) de DPO-9

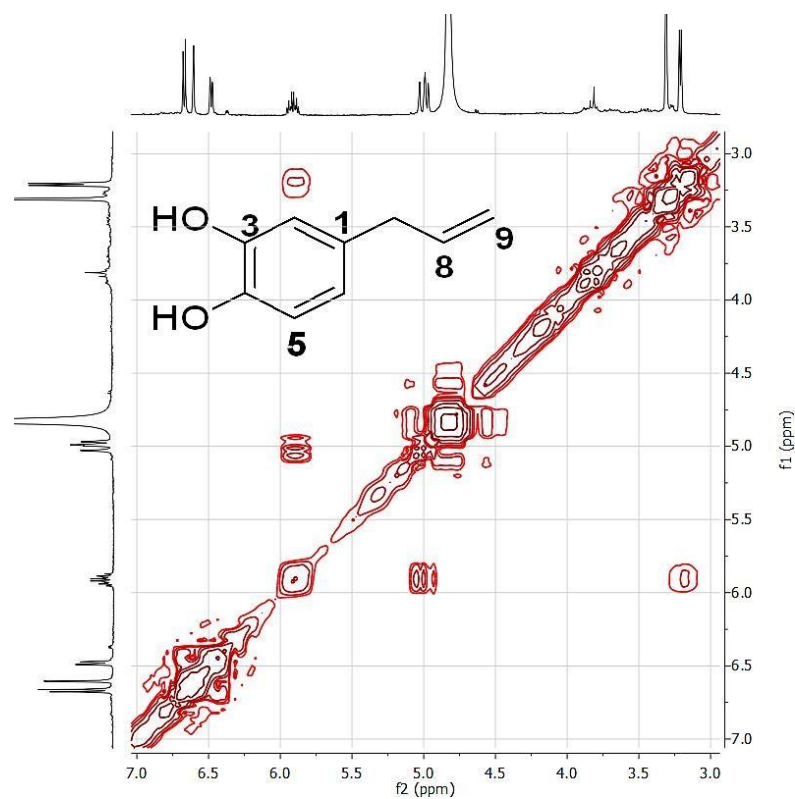
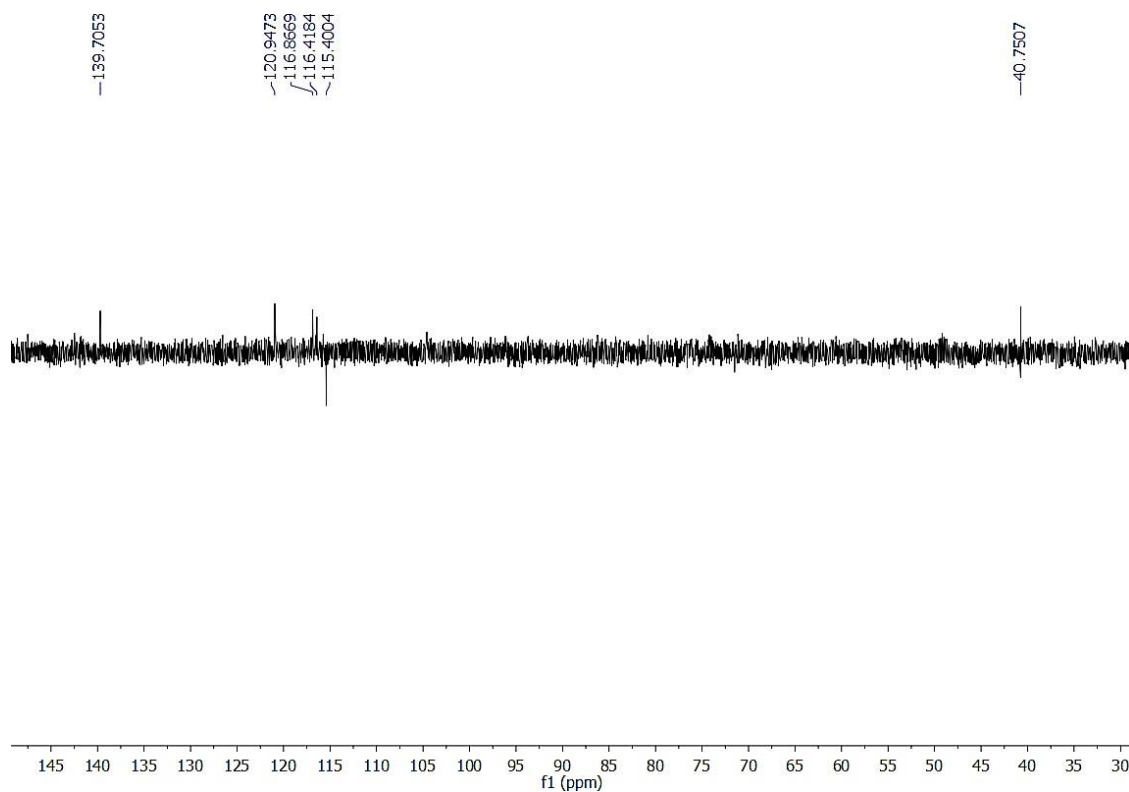
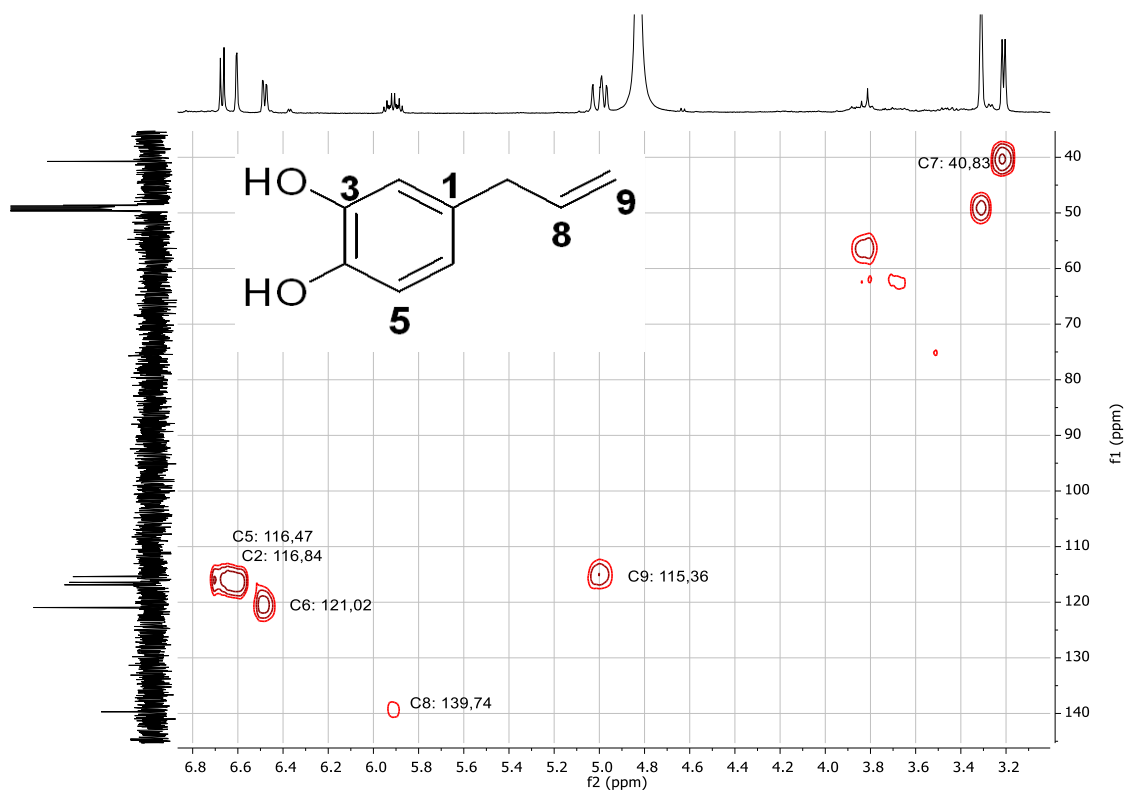
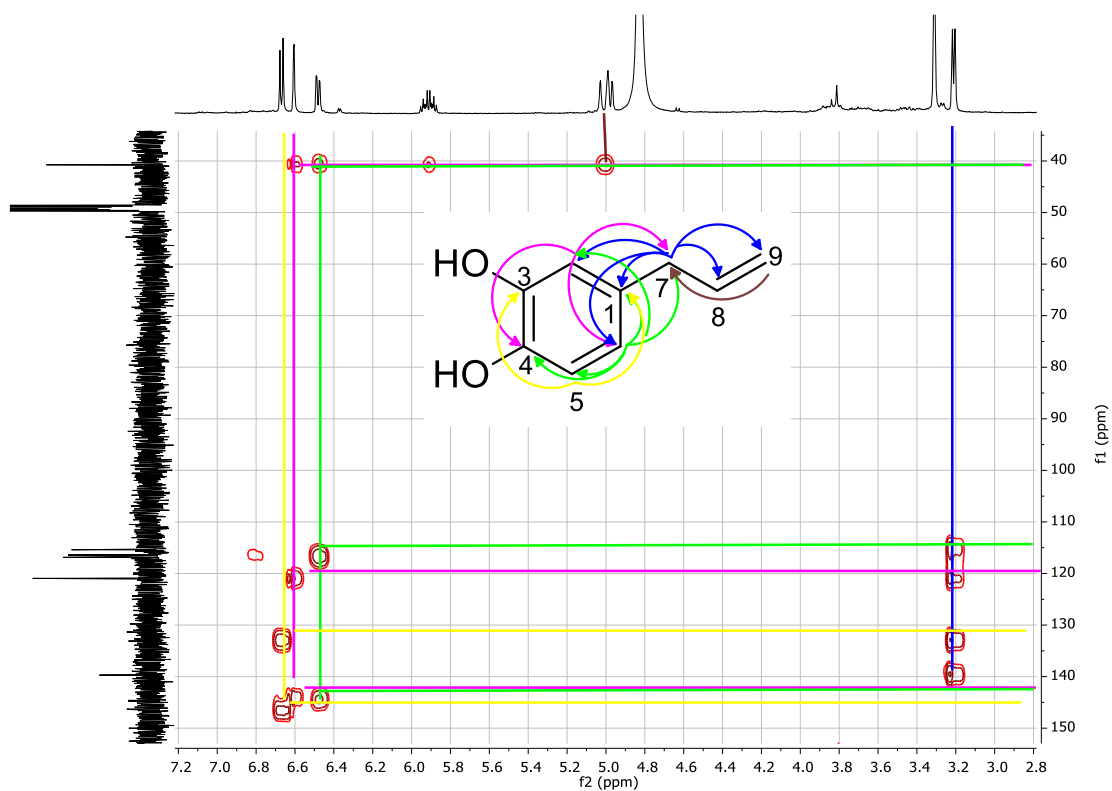
Figura 92 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (500 MHz, MeOD) de DPO-9Figura 93 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (125 MHz, MeOD) de DPO-9

Figura 94 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-9Figura 95 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (500 x 125 MHz, MeOD) de DPO-9

### 6.1.10 Determinação estrutural de DPO-10

Uma alíquota da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com a 80% foi submetida a fracionamento em sílica e cromatografia líquida de alta eficiência (FLUXOGRAMA 3), culminando no isolamento de uma resina marrom codificado como DPO-10 (9,8 mg).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 99) apresentou quatro sinais referentes a hidrogênios oximetínicos:  $\delta_H$  6,02 (t,  $J = 3,4$  Hz, H-6); 5,32 (s, H-12); 5,28 (d,  $J = 1,9$  Hz, H-7); 4,93 (dd,  $J = 7,3; 2,2$  Hz, H-3). Foram observados três simpletos intensos característicos de metilas de grupos acetoxila em  $\delta_H$  2,05 (3H-12''), 2,01 (3H-6'') e 1,98 (3H-3''). Além disso, revelou três simpletos de metilas em  $\delta_H$  1,99 (3H-20), 1,24 (3H-19) e 1,15 (3H-18), e um metila duplete em  $\delta_H$  1,02 (3H-17). Metilas (3H-20, 3H-19 e 3H-18) essas que mostraram correlação no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC (FIGURA 105) com C-3, C-4 e C-5, sugerindo assim, se tratar de um diterpeno do tipo abietano, comum no gênero e na espécie (ABDEL-MOGIB; ALBAR e BATTERJEE, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005; RIJO *et al.*, 2002). Com auxílio do espectro de COSY (FIGURA 101), foi verificado quais hidrogênios são vicinais. Foi verificada a correlação do hidrogênio de carbono oximetínico ( $\delta_H$  4,93) com hidrogênios do carbono metilênico C-2, assim também como do hidrogênio em  $\delta_H$  6,02 com 5,28 (FIGURA 96), confirmando assim os dois primeiros anéis do esqueleto abietano.

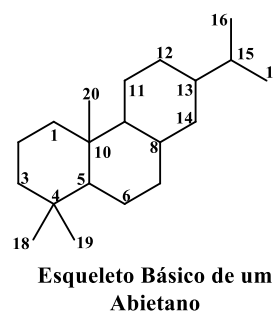
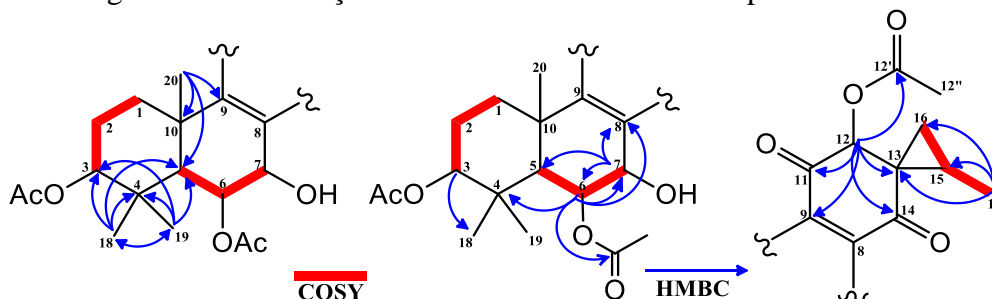
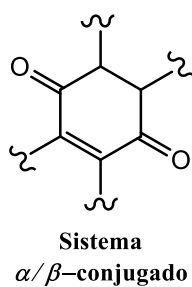


Figura 96 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-10



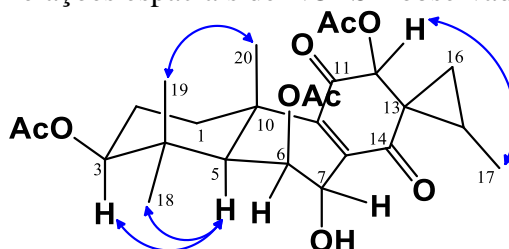
Com o uso dos espectros bidimensionais <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HSQC (FIGURA 104) e HMBC (FIGURA 105) foi elaborado a Tabela 13. As posições dos ésteres metílicos foram sugeridas com as correlações de HMBC (FIGURA 96), assim também como um anel espirociclopropânico foi posicionado em C-13 principalmente pelas correlações da metila duplete (C-17) com C-13, C-15 e C-16.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 100) apresentou 26 linhas espectrais, que em comparação com o DEPT  $135^\circ$  (FIGURA 103) foi possível definir o padrão de hidrogenação de cada carbono como sendo: 7 metílicos, 3 metilênicos, 6 metínicos e 10 carbonos não hidrogenados. Destes últimos, 5 são característicos de carbonila, sendo 2 ( $\delta_{\text{C}}$  195,9 e 195,8) associadas a cetonas em um sistema  $\alpha/\beta$ -conjugado e 3 ( $\delta_{\text{C}}$  170,8; 170,6 e 170,6) compatíveis com ésteres metílicos. Esse sistema é comum nos diterpenos abietanos do gênero (ABDEL-MOGIB; ALBAR e BATTERJEE, 2002). Também foram observadas 4 linhas espectrais associadas a carbonos oximetínicos.

A estereoquímica relativa de DPO-10 foi deduzida através da análise do espectro de correlação espacial  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (FIGURA 102). Entretanto, H-12 e H-17 mostraram correlação entre si, mas não foi possível atribuir suas orientações em relação a estrutura como um todo (FIGURA 97).

Figura 97 – Correlações espaciais de NOESY observadas para DPO-10



A partir dos dados compilados, foi possível sugerir a estrutura de DPO-10 (FIGURA 98) como sendo a coleona R. Um diterpeno abietano, pertencente à subclasse espirocoleona, previamente isolado de outra espécie de *Plectranthus* e da *P. ornatus* (ARIHARA; RUEDI e EUGSTER, 1975; ÁVILA *et al.*, 2017).

Figura 98 – Representação estrutural do composto DPO-10

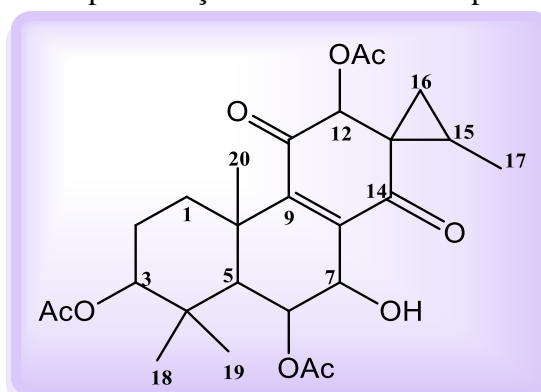




Tabela 13 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-10 comparados com valores da literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (ARIHARA; RUEDI e EUGSTER, 1975) e (300 x 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (ÁVILA *et al.*, 2017)

#	$\delta_{\text{C}}$ Piridina	$\delta_{\text{C Lit.}}$ 2017	$\delta_{\text{H Piridina}}$	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H Lit. 1975}}$	$\delta_{\text{H Lit. 2017}}$
1	35,8	35,3	1,64 (m) 2,36 (m)			-	1,12 (m) 2,07 (m)
2	24,7	23,9	1,94 (m)			-	1,80 (m)
3	80,0	79,6	4,93 (1H, dd, $J=7,3; 2,2$ )		H-18 H-19	4,72 (m)	4,56 (s)
4	38,9	38,5	-	H-5 H-18 H-19	H-6	-	-
5	46,9	47,1	2,43 (1H, s)		H-7 H-18 H-19 H-20	1,93 (m)	1,67 (s)
6	72,2	70,9	6,02 (1H, t, $J=3,4$ )	H-7		5,43 (dd)	5,49 (s)
7	64,2	65,1	5,28 (1H, d, $J=1,9$ )	H-6		4,49 (d)	4,51 (s)
8	143,2	140,8	-	H-7	H-6	-	-
9	154,3	155,1	-		H-12 H-20	-	-
10	39,4	38,3	-	H-5 H-20		-	-
11	195,8	194,4	-	H-12		-	-
12	79,1	78,3	5,32 (1H, s)			4,88 (s)	4,88 (s)
13	35,1	34,9	-	H-12	H-17	-	-
14	195,9	196,2	-		H-12	-	-
15	22,1	21,4	2,16 (m)	H-17		2,20 (s)	2,17 (dd)
16	26,3	26,8	1,21 (1H, dd, $J=9,0; 4,0$ ) 1,07 (m)		H-17	1,36 (dd) 1,10 (m)	1,34 (d) 1,31 (d)
17	13,1	13,0	1,02 (3H, d, $J=6,5$ )			1,15 (d)	1,12 (d)
18	28,7	18,3	1,15 (3H, s)		H-3 H-19	1,02 (s)	1,06 (s)
19	18,8	28,0	1,24 (3H, s)		H-5 H-18	1,13 (s)	1,08 (s)
20	21,4	22,0	1,99 (3H, s)			1,71 (s)	1,71 (s)
3'	170,6	170,1	-			-	-
6'	170,8	170,9	-		H-6	-	-
12'	170,6	169,9	-		H-12	-	-
3''	20,8	21,5	1,98 (3H, s)			2,02 (s)	2,15 (s)
6''	20,1	20,9	2,01 (3H, s)			2,05 (s)	2,20 (s)
12''	20,9	21,5	2,05 (3H, s)			2,09 (s)	2,17 (s)

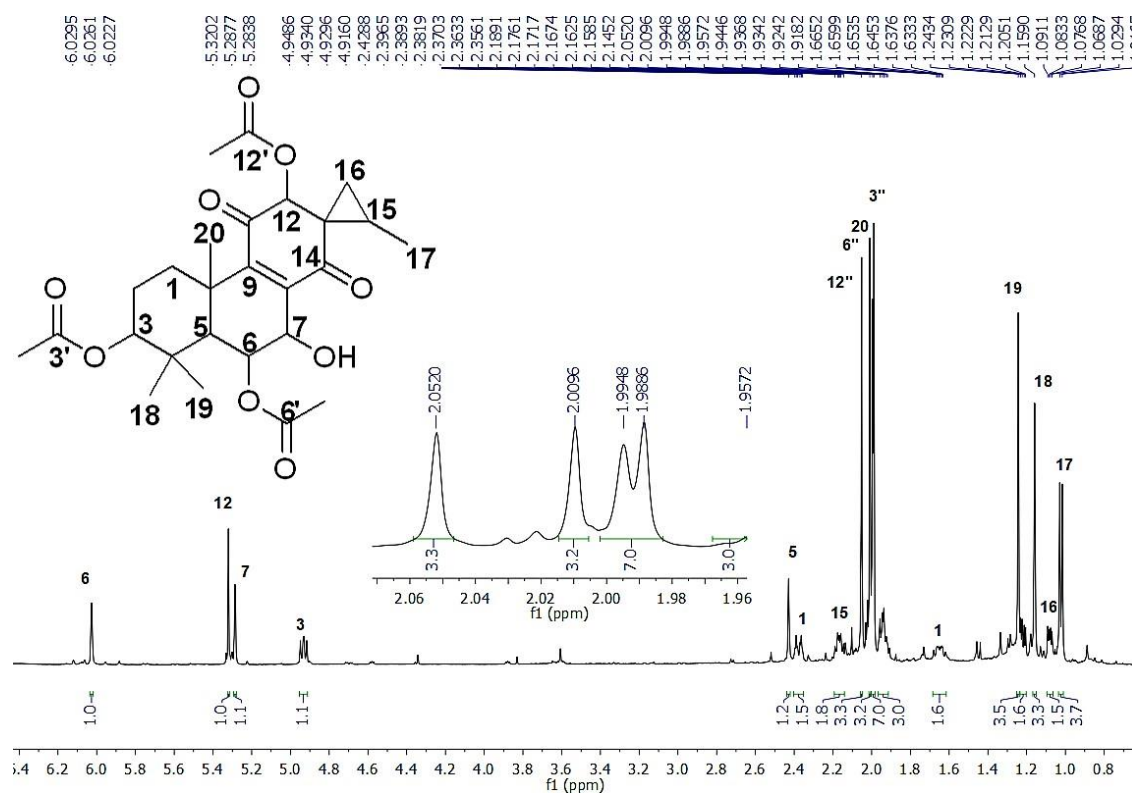
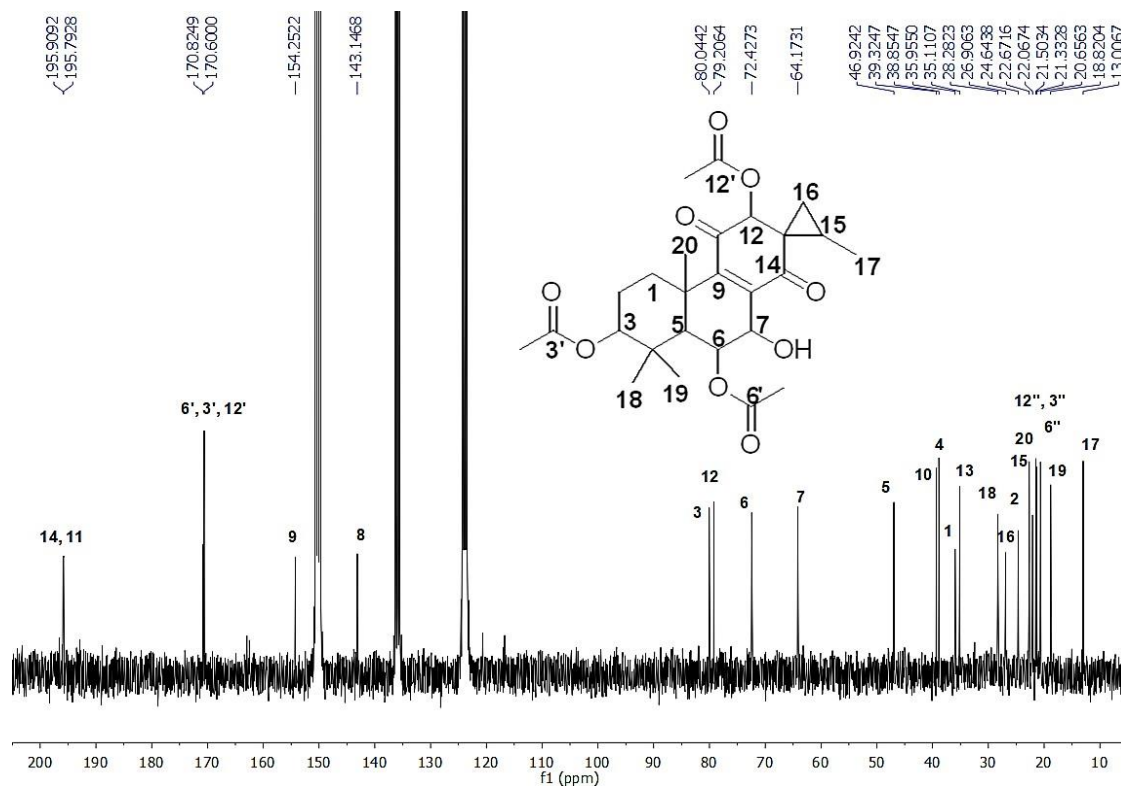
Figura 99 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10Figura 100 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10

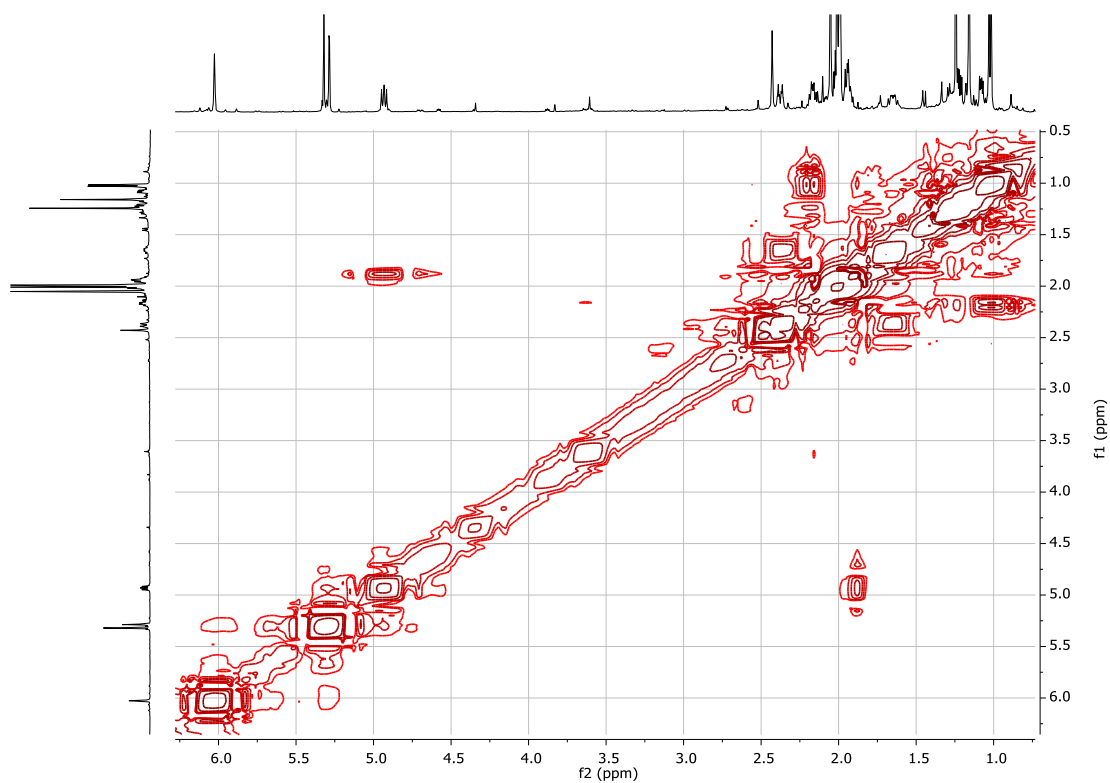
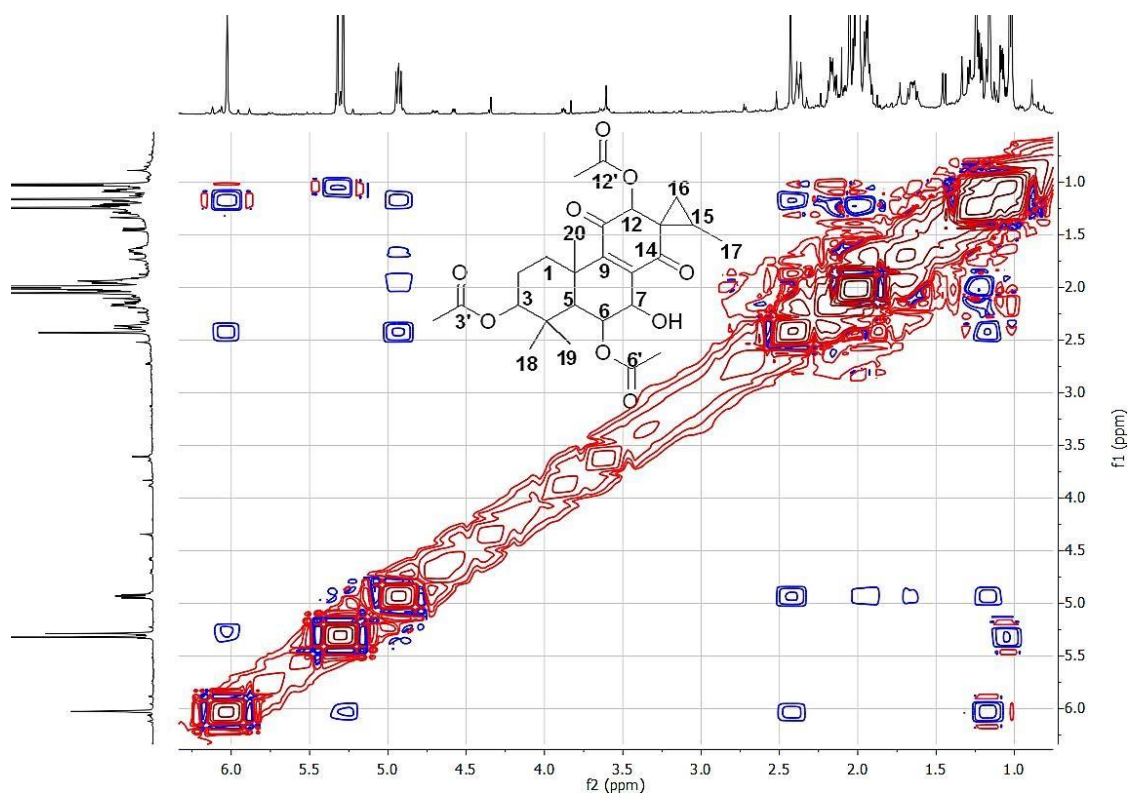
Figura 101 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10Figura 102 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10

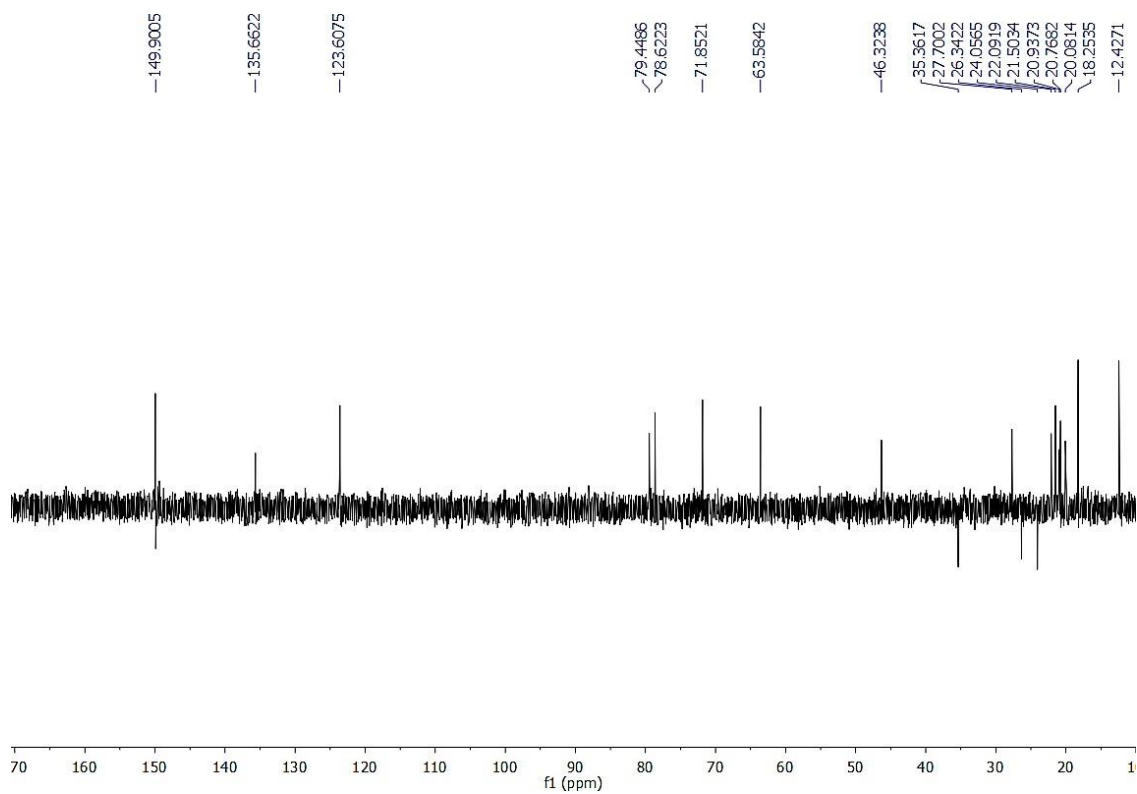
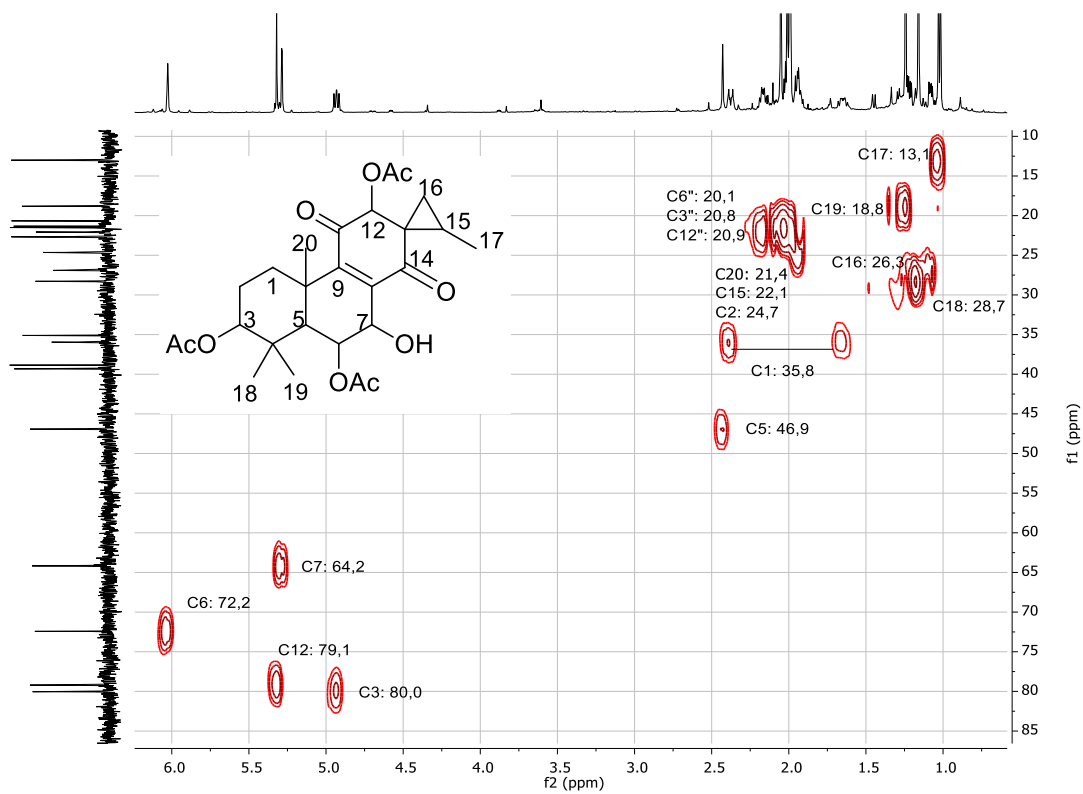
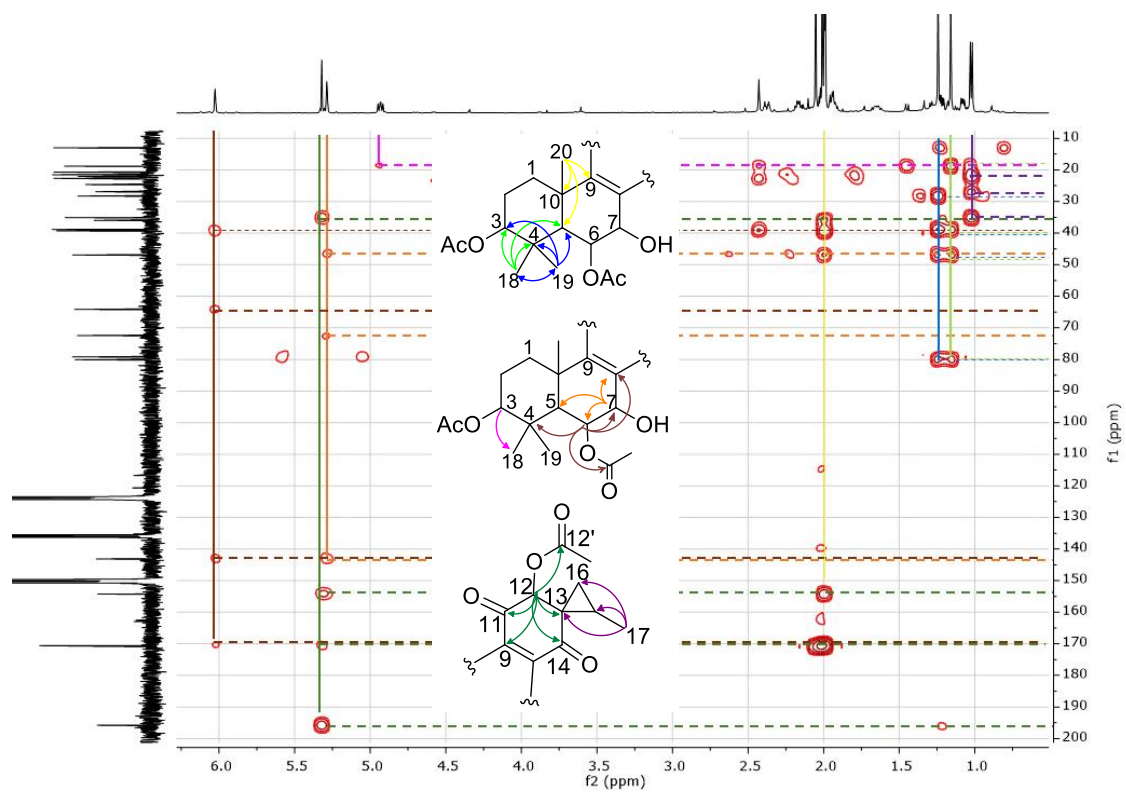
Figura 103 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10Figura 104 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (500 x 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10

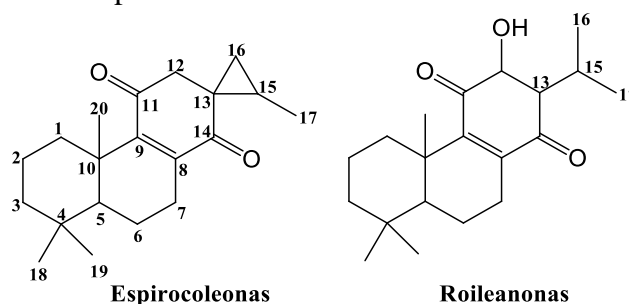
Figura 105 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (500 x 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-10

### 6.1.11 Determinação estrutural de DPO-11

Da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% reunida com a 80%, após fracionamento em sílica de gel C-18 e purificação em CLAE, foi isolado uma resina marrom codificada como DPO-11 (9,5 mg) (FLUXOGRAMA 3).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 109) apresentou perfil semelhante à de um composto diterpênico abietano, onde é verificado a presença de 4 hidrogênios característicos de carbonos oximetínicos [ $\delta_H$  6,13 (sl, H-6); 5,34 (m, H-12); 5,30 (m, H-7) e 3,60 (m, H-3)], além das 4 metilas sendo uma duplete [ $\delta_H$  2,02 (s, 3H-20); 1,47 (s, 3H-18); 1,34 (s, 3H-19) e 1,03 (d,  $J= 6,4$  Hz, 3H-17)]. Também foram observadas 2 metilas características de ésteres metílicos [ $\delta_H$  2,01 (s, 3H-6'') e 2,11 (s, 3H-12'')]. Diterpenos isolados do gênero *Plectranthus* com a metila-17 duplete geralmente são da subclasse das espirocoleonas ou da roileanonas (FIGURA 106) com substituinte no carbono-16 (ABDEL-MOGIB; ALBAR e BATTERJEE, 2002).

Figura 106 – Esqueleto básico de diterpenos das subclasses espirocoleonas e roileanonas

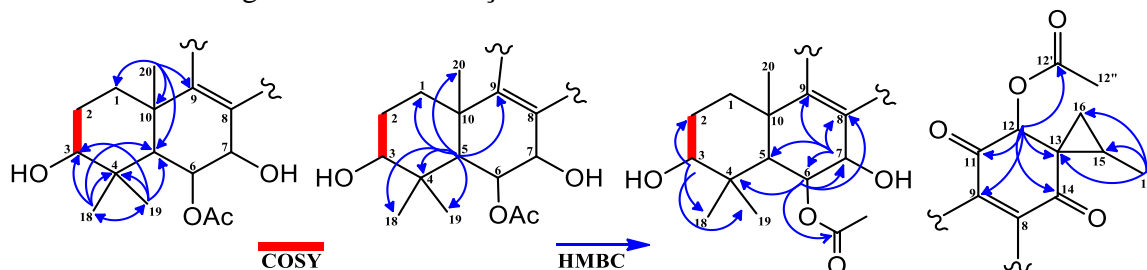


Através da análise do espectro de RMN <sup>13</sup>C – BB (FIGURA 110) combinado com o DEPT 135° (FIGURA 113), foi verificado a presença de: 6 carbonos metílicos, 3 metilênicos, 5 metínicos e 9 carbonos não hidrogenados. Dois dos carbonos não hidrogenados ( $\delta_C$  195,9 e 196,0) apresentam deslocamento de carbonila pertencentes a um sistema  $\alpha/\beta$ -conjugado, o que confirma uma das subclasses de diterpenos anteriormente mencionadas.

Através das correlações (FIGURA 107) observadas nos espectros de RMN 2D: <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H – COSY (FIGURA 111), <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C – HSQC (FIGURA 114), <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C – HMBC (FIGURA 115) foi possível elaborar a Tabela 14. A partir das correlações no espectro HMBC de H-6 e H-12 foi possível sugerir a posição dos grupos-acetil. E das correlações encontradas no mesmo espectro referentes a metila-17, foi possível sugerir que DPO-11 se trata de um

diterpeno espirocoleonano. A estereoquímica relativa do composto não pôde ser confirmada visto que o espectro de  $^1\text{H}-^1\text{H}$  – NOESY (FIGURA 112) não apresentou correlações cruciais, além de H-6 com H-18 e de H-12 com H-17.

Figura 107 – Correlações de HMBC e COSY de DPO-11



Os dados de RMN compilados, permitiram elucidar DPO-11 (FIGURA 108) como sendo  $3\beta$ -hidroxi-3-deoxobarbatusina, um composto já isolado do gênero (ZELNIK *et al.*, 1977) e da espécie (ALBUQUERQUE, 2004).

Figura 108 – Representação estrutural do composto DPO-11

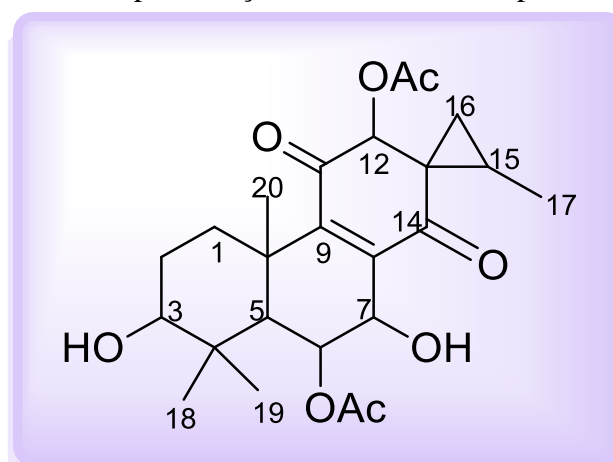


Tabela 14 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-11 comparados com valores da literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (ARIHARA *et al.*, 1975)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ Lit.	$\delta_{\text{H}}$ Piridina	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H}}$ Lit.
	<i>Piridina</i>					
1	36,6	35,7	1,61 (m) 2,41 (m)		H-5 H-20	1,06 (dd, $J= 11,5; 3,4$ ) 2,02 (m)
2	28,6	27,6	2,13 (m)	H-3		1,24 (dd, $J= 16,5; 3,5$ ) 1,78 (dd, $J= 16,5; 3,5$ )
3	77,9	78,5	3,60 (m)		H-18 H-19	3,29 (dd, $J= 16,5; 7,8$ )
4	40,3	39,4	-	H-5 H-18 H-19	H-6	-
5	47,3	47,2	2,33 (1H, sl)		H-7 H-18 H-19 H-20	1,57 (sl)
6	72,8	71,4	6,13 (1H, sl);	H-7		5,49 (sl)
7	64,3	65,3	5,30 (m);	H-6		4,52 (sl)
8	143,4	140,9	-	H-7	H-6	-
9	154,8	155,7	-		H-5 H-7 H-12 H-20	-
10	39,5	38,8	-	H-20		-
11	195,9	194,6	-	H-12		-
12	79,4	78,5	5,34 (m)			5,30 (s)
13	35,1	35,1	-	H-12	H-17	-
14	196,0	196,2	-		H-12	-
15	22,0	21,8	1,75 (m)	H-17		2,16 (m)
16	26,9	27,0	1,08 (m) 1,25 (m)		H-17	1,05 (dd, $J=15,2; 2,8$ ) 1,34 (dd, $J=15,2; 2,8$ )
17	13,1	13,3	1,03 (3H, d, $J= 6,4$ )			1,14 (d, $J= 7,1$ )
18	28,8	28,2	1,47 (3H, s)		H-3 H-5 H-19	1,17 (s)
19	18,3	17,4	1,34 (3H, s)		H-3 H-5 H-18	0,99 (s)
20	22,7	22,2	2,02 (3H, s)		H-5	1,68 (s)
6'	170,5	170,6	-	H-6''	H-6	-
12'	170,5	170,2	-	H-12''	H-12	-
6''	21,6	21,0	2,01 (3H, s)			2,03 (s)
12''	20,8	21,8	2,11 (3H, s)			2,05 (s)



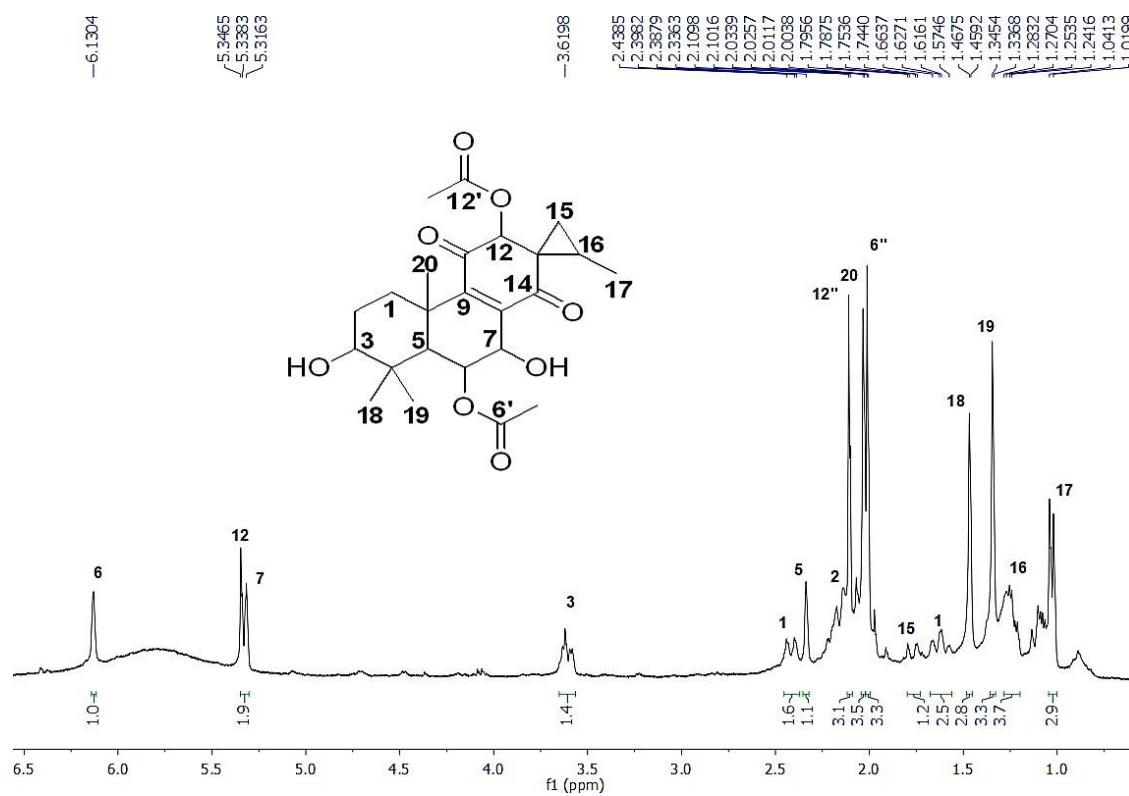
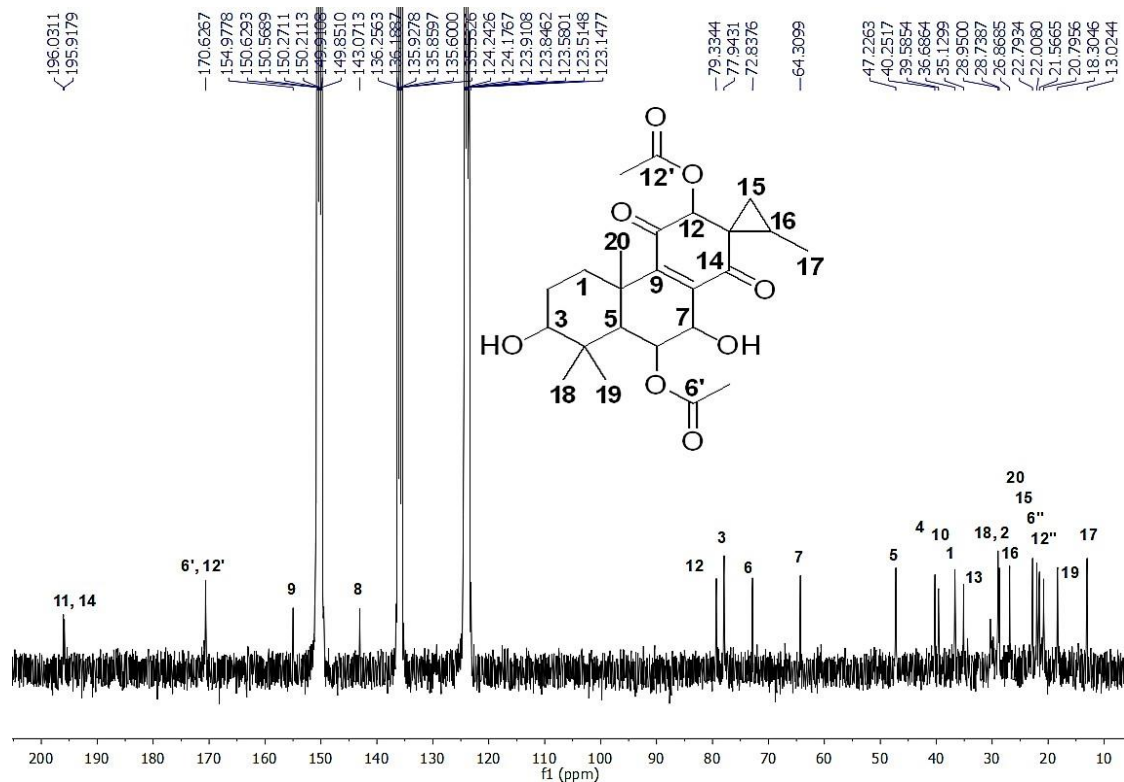
Figura 109 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11Figura 110 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11

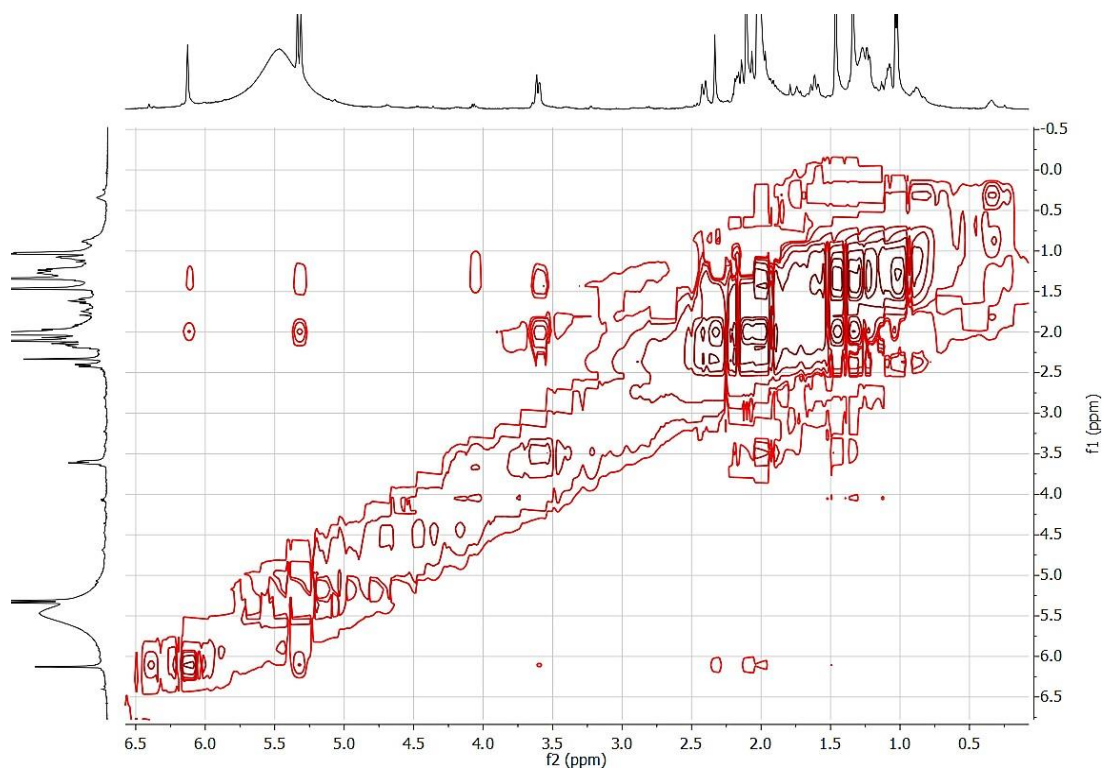
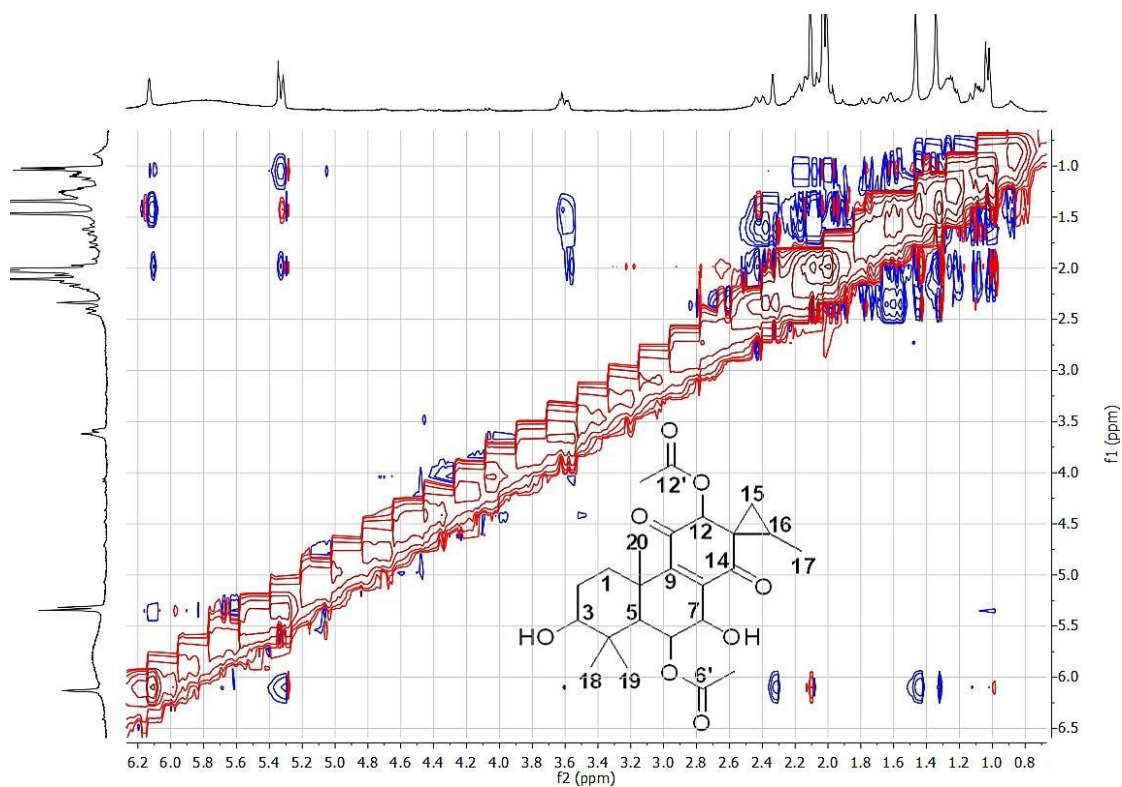
Figura 111 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11Figura 112 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11

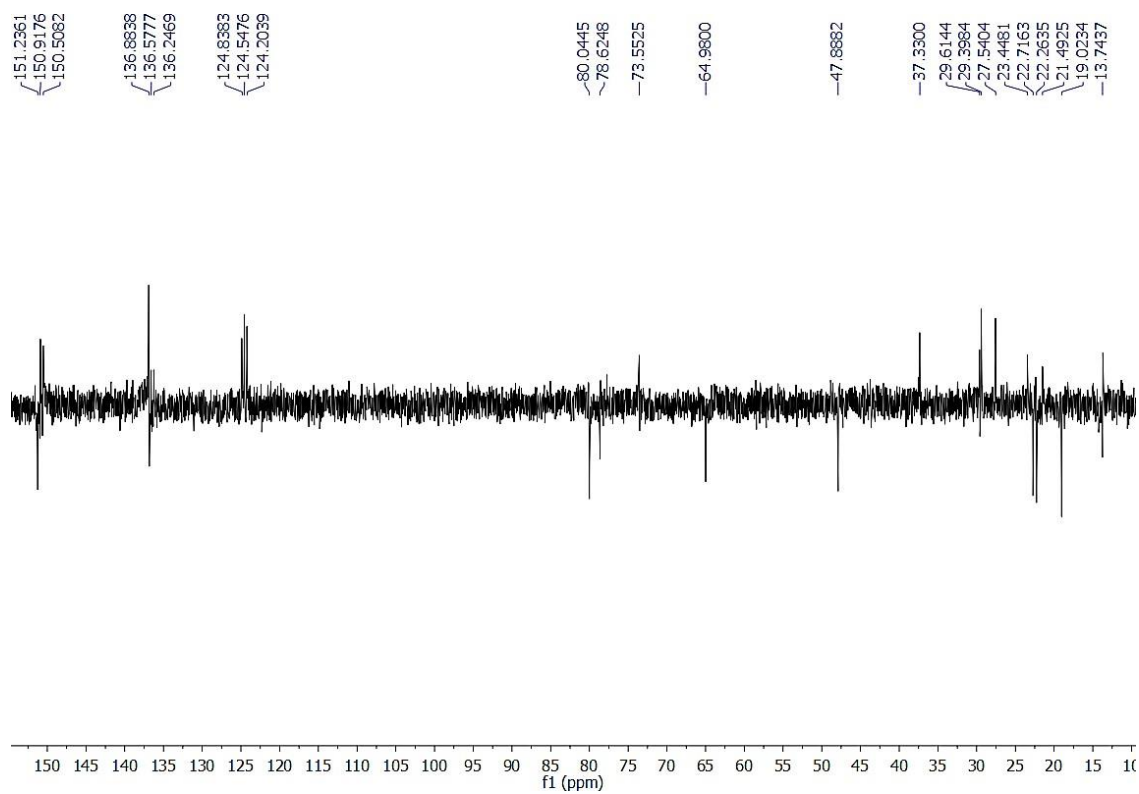
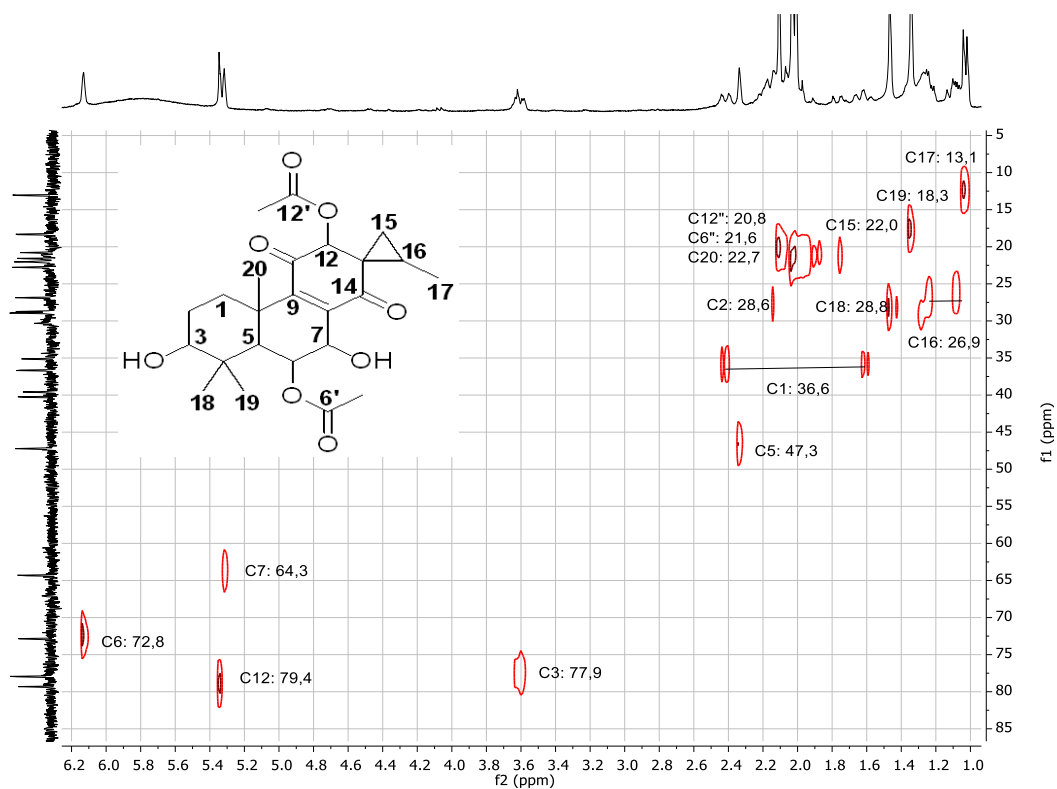
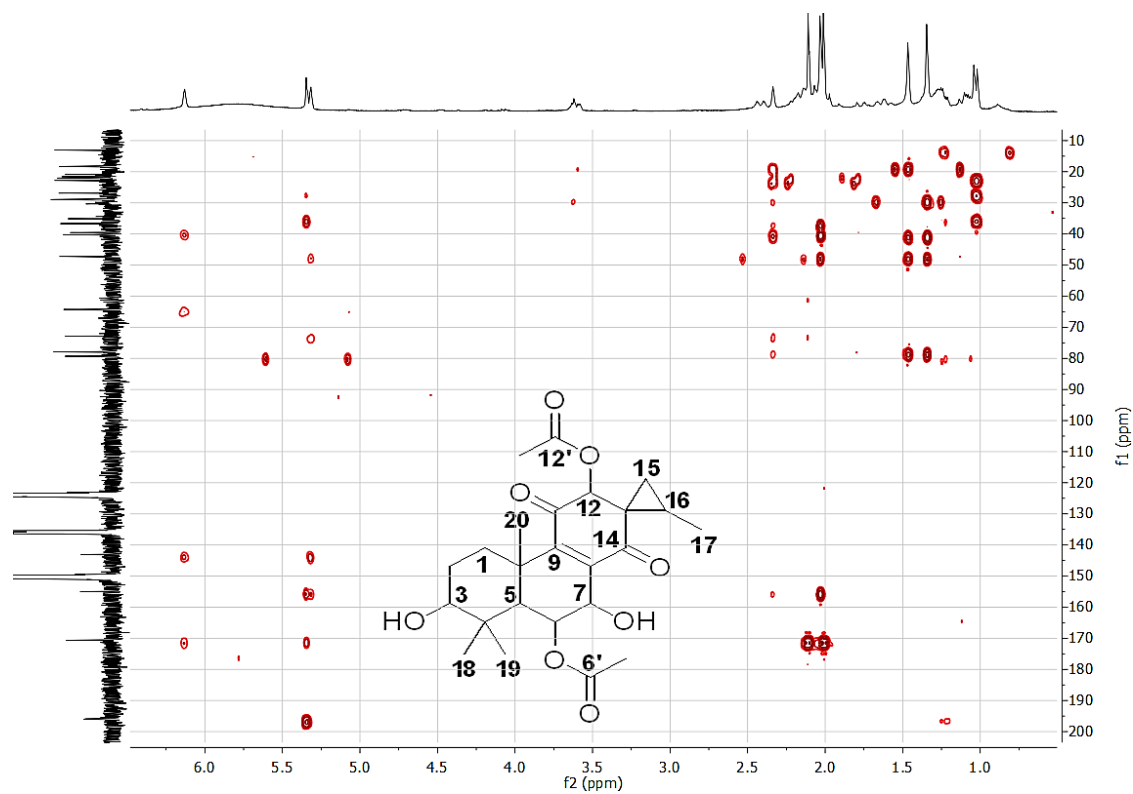
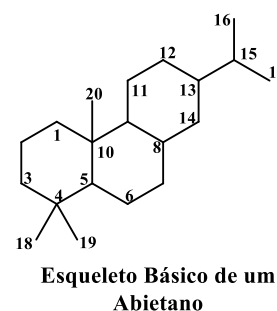
Figura 113 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11Figura 114 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11

Figura 115 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-11

### 6.1.12 Determinação estrutural de DPO-12

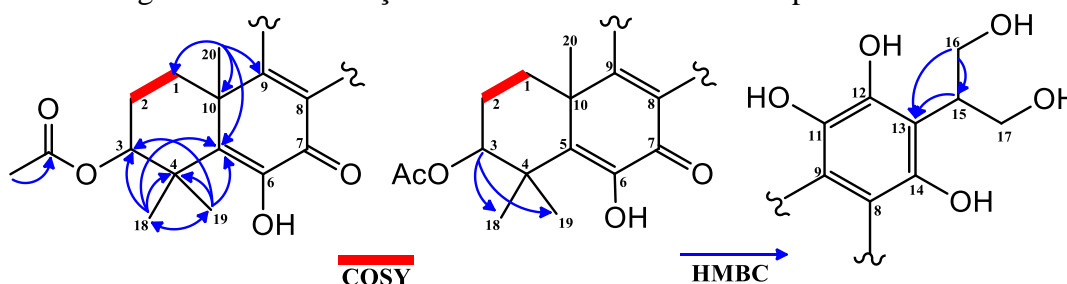
Uma alíquota da fração H<sub>2</sub>O/MeOH 60% + 80% foi submetida a fracionamento em sílica e cromatografia líquida de alta eficiência, culminando no isolamento de uma resina marrom codificada como DPO-12 (9,2 mg).

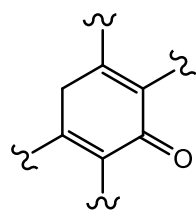
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 119) se mostrou muito semelhante aos dos diterpenos abietanos já relatados na espécie. Foi observado um sinal referente a um hidrogênio característico de hidroxila quelada em  $\delta_H$  14,14 (1H-6”), cinco sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados:  $\delta_H$  5,15 (m, 1H-3); 4,67 (m, 2H-16/17); 4,53 (m, 2H-16/17), um simpleto intenso característico de metila de grupo acetoxila em  $\delta_H$  2,15 (3H-3”) e três simpletos de metilas em  $\delta_H$  2,10 (3H-20), 1,84 (3H-19) e 1,69 (3H-18). Além disso, sinais em 4,56 (m, 1H-15); 3,71 (m, 1H-1) e 2,22 (m, 1H-1) foram observados. As metilas mostraram correlação no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC (FIGURA 125) com C-3, C-4 e C-5, confirmando assim, o esqueleto de um diterpeno do tipo abietano, comum no gênero e na espécie (ABDEL-MOGIB; ALBAR e BATTERJEE, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005; RIJO *et al.*, 2002). Com auxílio do espectro de COSY (FIGURA 121), foi verificado correlação dos hidrogênios presentes em C-1 e C-2 (FIGURA 116).



Com o uso dos espectros bidimensionais <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC (FIGURA 124) e HMBC (FIGURA 125) foi elaborada a Tabela 15. A posição da acetoxila foi sugerida com as correlações de HMBC (FIGURA 116), assim também como o grupo substituinte em C-13 principalmente pelas correlações dos hidrogênios metilênicos (C-16/17) com C-13 e C-15. Foi sugerido que C-16 e C-17 se tratavam de dois CH<sub>2</sub> com mesmo valor de carbono e hidrogênio, visto que ambos se encontram no mesmo ambiente químico e pelo fato da integração estar para 2 hidrogênios no mesmo deslocamento.

Figura 116 – Correlações de HMBC e COSY do composto DPO-12



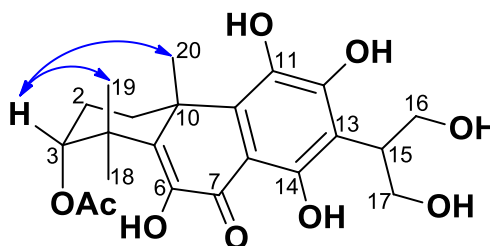


Sistema  
 $\alpha/\beta$ -conjugado

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 120) apresentou 20 linhas espectrais, que em comparação com o DEPT  $135^\circ$  (FIGURA 123) foi possível definir o padrão de hidrogenação de cada carbono como sendo: 4 metílicos, 3 metilênicos, 2 metínicos e 11 carbonos não hidrogenados. Destes últimos, 1 ( $\delta_{\text{C}}$  183,9) é característico de carbonila associada a cetonas em um sistema  $\alpha/\beta$ -conjugado e 1 ( $\delta_{\text{C}}$  170,8) compatíveis com éster metílico.

A estereoquímica relativa de DPO-12 foi deduzida através da análise do espectro de correlação espacial  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (FIGURA 122). E, diferentemente de DPO-10 e DPO-11, a substituição em C-3 foi sugerida está para trás da molécula (FIGURA 117).

Figura 117 – Correlações espaciais de NOESY observadas para DPO-12



O espectro de massa de alta resolução apresentou pico em  $m/z$  435,1648  $[\text{M}-\text{H}]^-$  correspondente a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_9$ , compatível com 9 deficiências de hidrogênio (FIGURA 126). Com a compilação dados, foi possível sugerir a estrutura de DPO-12 (FIGURA 118) como sendo de um novo diterpeno abietano nomeado como 16-desacetil-Coleon L, onde Coleon L já foi isolado *P. ornatus* (MESQUITA, 2015). Os dados de ressonância de  $^1\text{H}$  dos mesmos foram comparados na Tabela 15.

Figura 118 – Representação estrutural do composto DPO-12

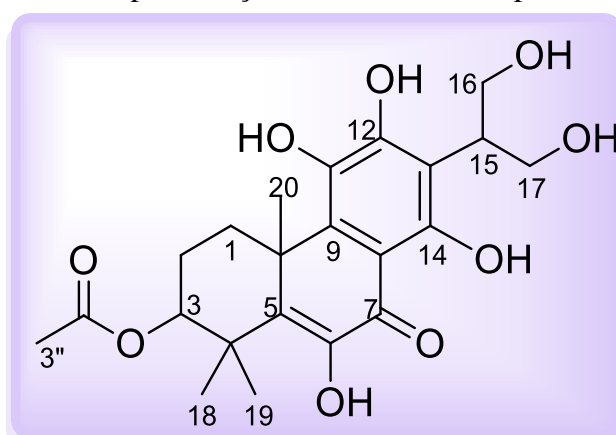


Tabela 15 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 x 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-12 comparados com valores da literatura (300 x 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (MESQUITA, 2015).

#	$\delta_{\text{C}}$ Piridina	$\delta_{\text{C}}$ Lit.	$\delta_{\text{H}}$ Piridina	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H}}$ Lit.
1	30,8	29,7	2,19 (m) 3,67 (m)		H-20	1,90 (m) 3,14 (m)
2	24,7	24,1	1,94 (m)			1,93 (m)
3	78,9	78,5	5,12 (1H, m)		H-18 H-19	4,77 (m)
4	41,2	40,8	-	H-18 H-19		-
5	141,6	141,4	-		H-18 H-19 H-20	-
6	144,8	142,8	-			-
7	183,9	182,6	-			-
8	124,5	109,9	-			-
9	137,6	135,7	-		H-20	-
10	42,2	41,6	-	H-20		-
11	137,6	135,9	-			-
12	154,8	155,6	-			-
13	114,1	150,9	-	H-15	H-16/17	-
14	157,2	141,4	-			-
15	41,3	36,7	4,50 (1H, m)	H-16/17		4,01 (m)
16	61,5	62,0	4,47 (2H, m) 4,62 (2H, m)		H-17	3,99 (m)
17	61,5	61,6	4,47 (2H, m) 4,62 (2H, m)		H-16	3,99 (m) 4,78 (m)
18	28,5	28,0	1,79 (3H, s)		H-3 H-19	1,41 (s)
19	22,9	22,5	1,65 (3H, s)		H-3 H-18	1,52 (s)
20	29,8	29,0	2,06 (3H, s)			1,72 (d, $J=1,74$ )
3'	170,9	170,9	-		H-3''	-
3''	21,4	21,1	2,10 (3H, s)			2,13 (s)
17'	-	173,7	-			-
17''	-	21,5	-			2,16 (d, $J=2,19$ )
OH-6	-	-	-			7,17 (sl)
OH-14	-	-	-			13,04 (s)

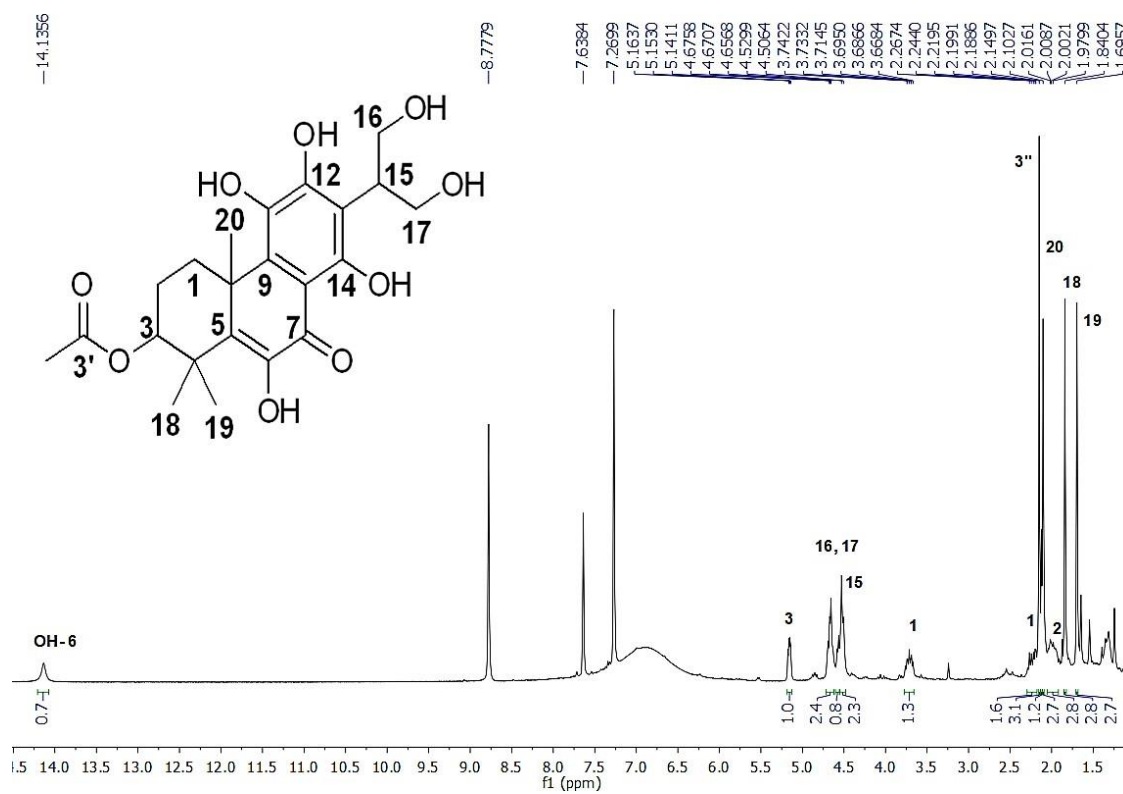
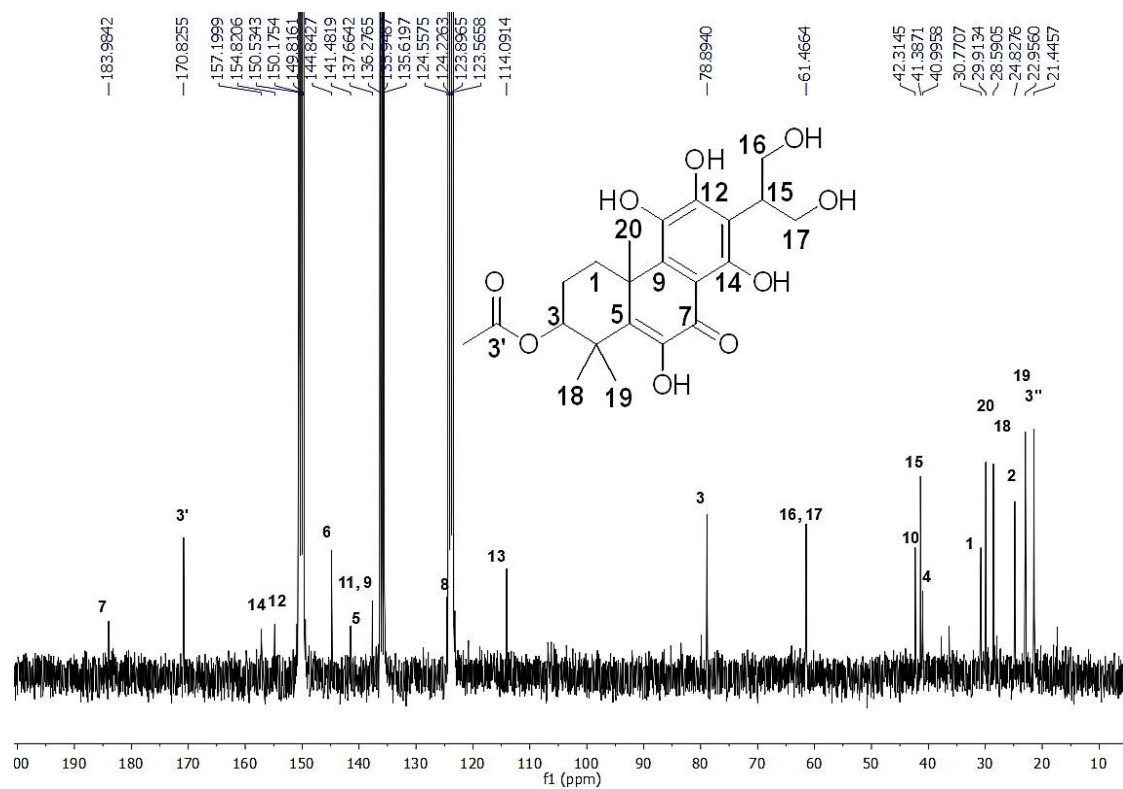
Figura 119 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12Figura 120 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12



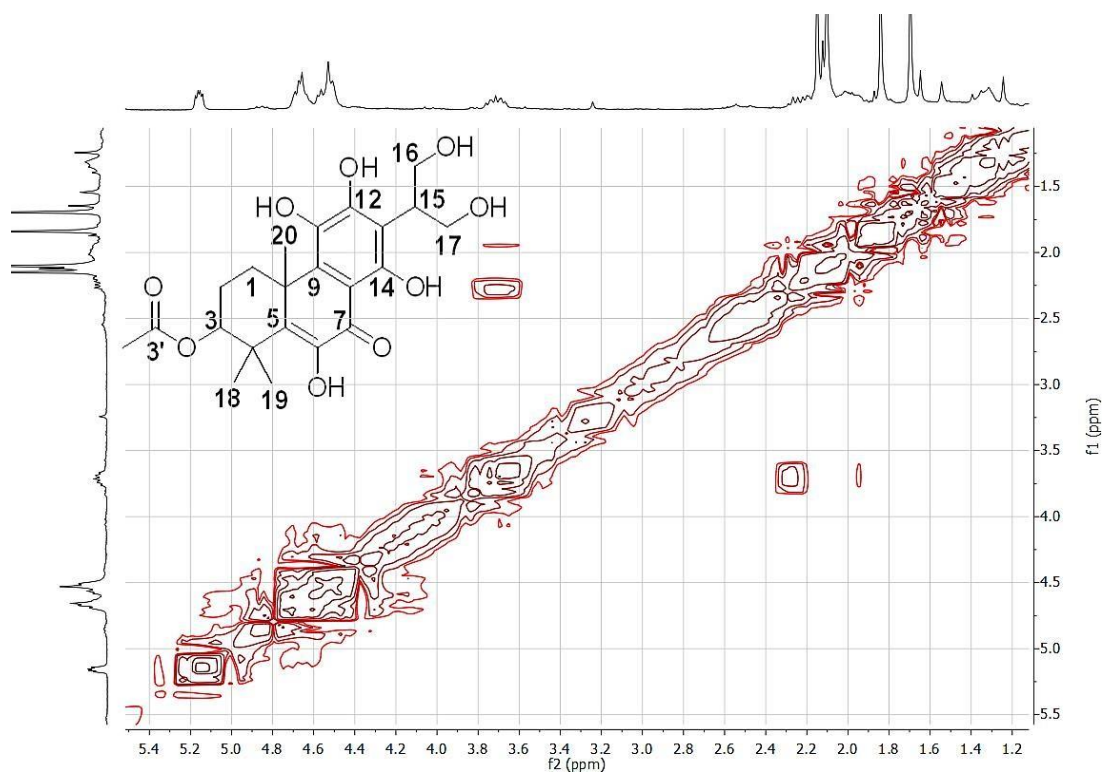
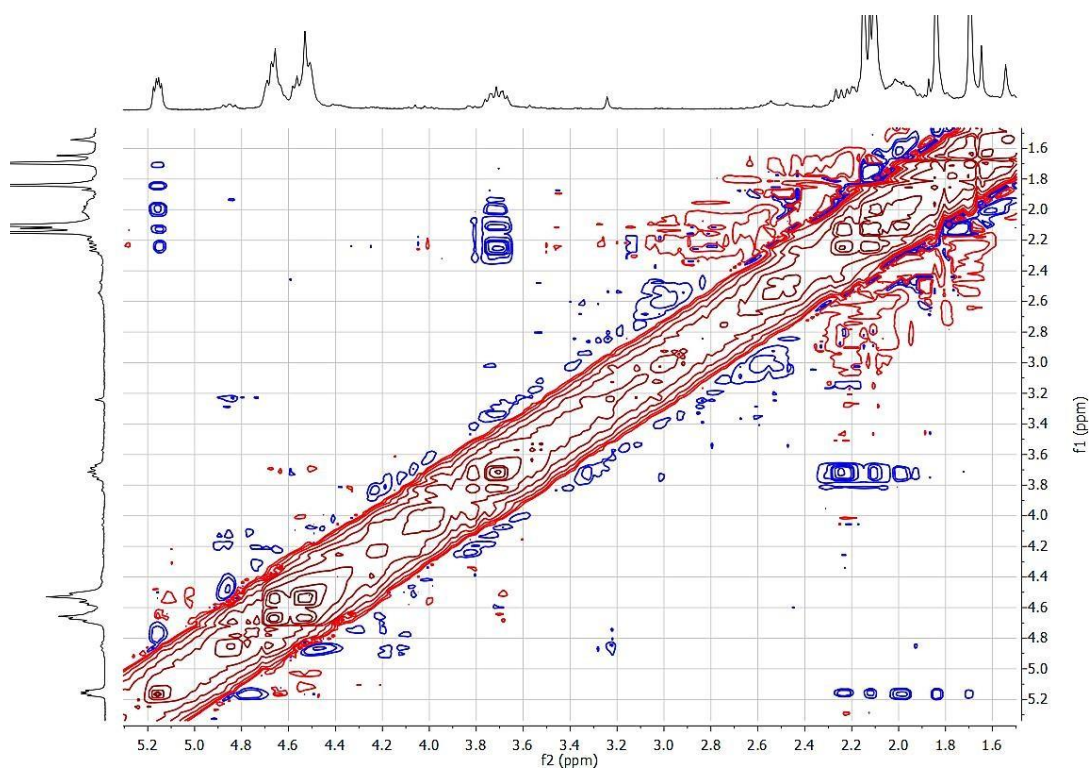
Figura 121 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12Figura 122 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12

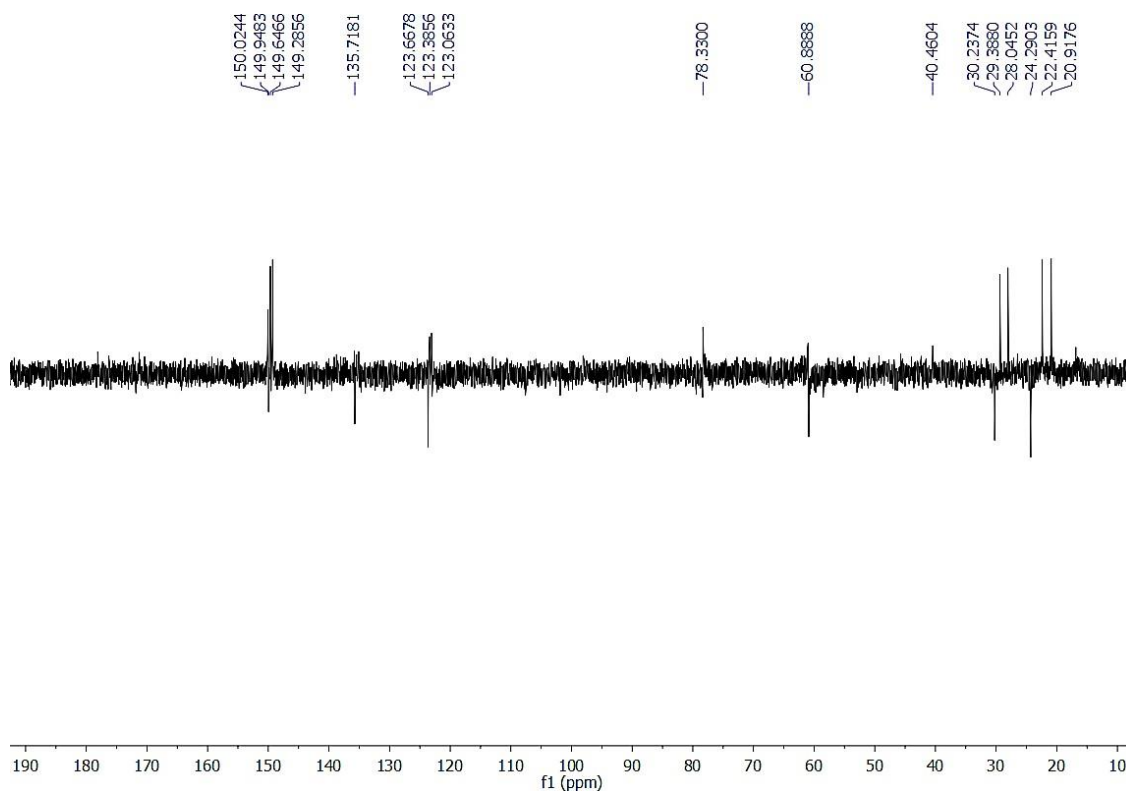
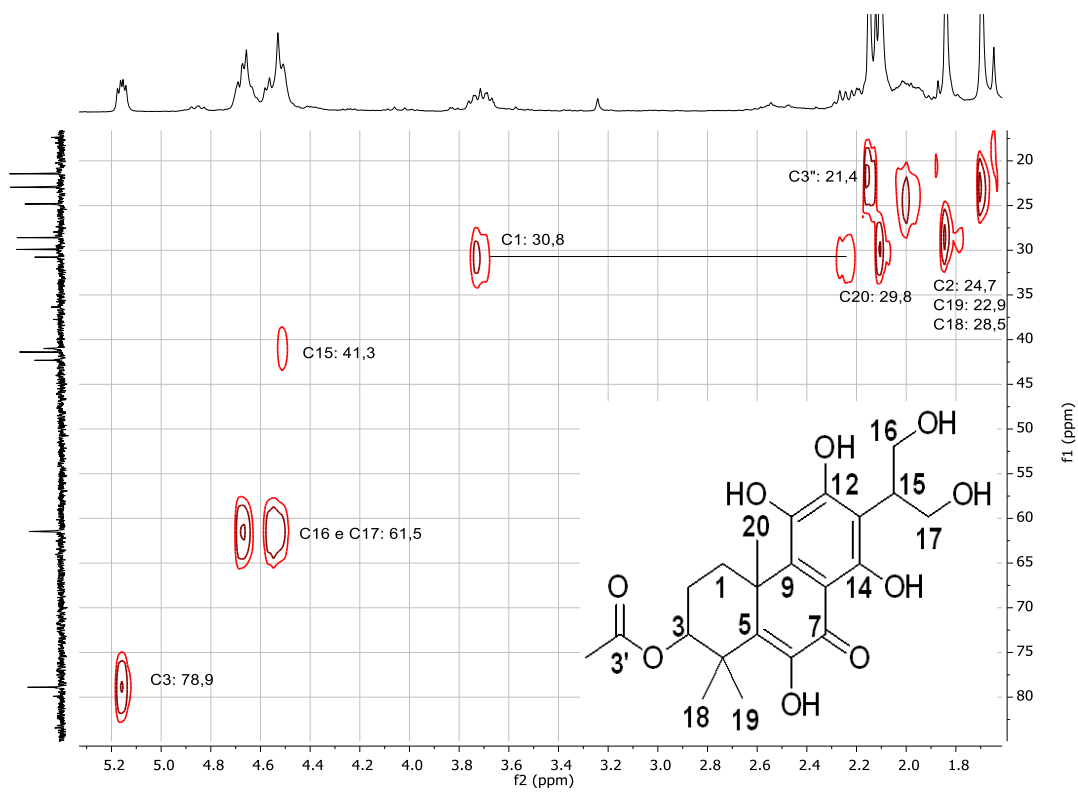
Figura 123 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12Figura 124 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12

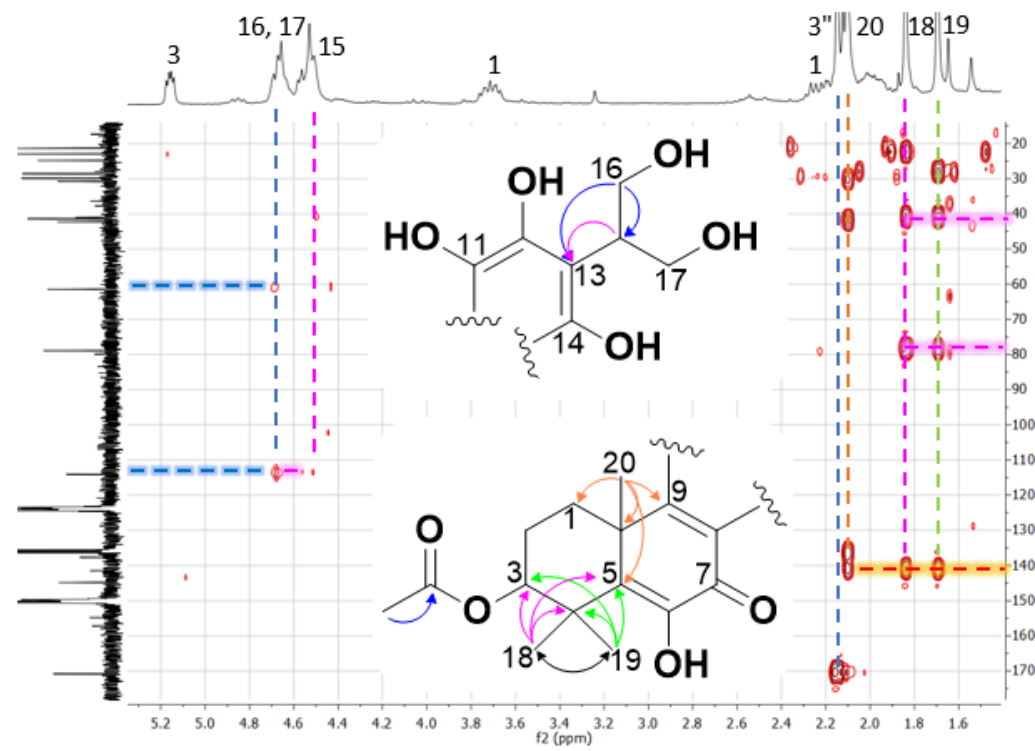
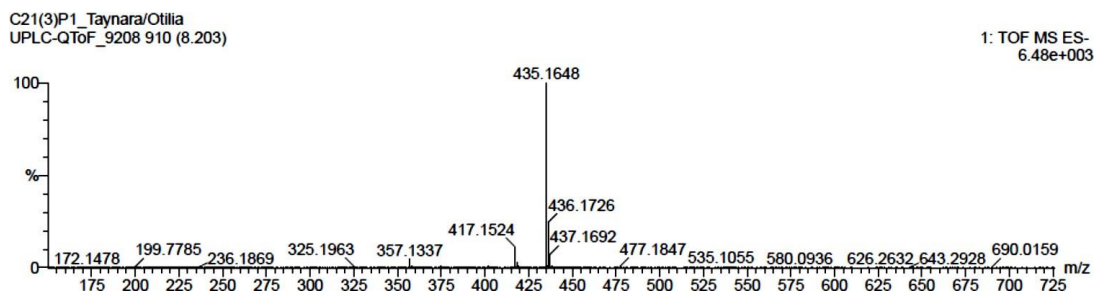
Figura 125 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-12

Figura 126 - Espectro de massas de DPO-12



### 6.1.13 Determinação estrutural de DPO-13

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 129) de DPO-13, uma resina marrom (4,8 mg), se apresentou semelhante aos compostos diterpênicos composto por hidrogênios metílicos, metinênicos e oximetínicos. Foram observados sinais característicos de hidrogênios oximetínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,15 (s, H-14), 5,86 (s, H-3) e 5,62 (d,  $J= 10,6$  Hz, H-11) e sinais de hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,46 (s, H-16), 1,74 (s, H-18), 1,05 (d,  $J= 6,6$  Hz, H-17), 1,03 (s, H-19) e 0,88 (s, H-20), sendo um deles típicos de grupo acetoxila { $\delta_{\text{H}}$  2,02 (s, H-11'')}

A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 130), foi observado a presença de uma linha espectral associada à um carbono de uma cetona  $\alpha/\beta$ -insaturada ( $\delta_{\text{C}}$  198,5), linhas características de carbonilas de ésteres metílicos ( $\delta_{\text{C}}$  170,9 e 169,1) e de duplas ligações ( $\delta_{\text{C}}$  155,3, 126,0 e 121,1). No total, foram observadas 22 linhas espectrais.

Com o auxílio dos espectros de RMN 2D  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  – HSQC (FIGURA 133) e de HMBC (FIGURA 134), foi possível elaborar a Tabela 16. E, a partir das correlações apresentadas pelas metilas no espectro de HMBC (FIGURA 127), foi verificado que não se tratava de um composto com esqueleto de diterpeno abietano. As correlações apresentadas pela metila-17 com carbonos vistos pela metila-20 (C-8 e C-9), assim como carbonos vistos pela metila-19 (C-7), sugeriram se tratar de um diterpeno do tipo clerodano. Os espectros de COSY (FIGURA 131) e NOESY (FIGURA 132) para este composto foram obtidos, entretanto os mesmos não contribuíram para a determinação estrutural de DPO-13.

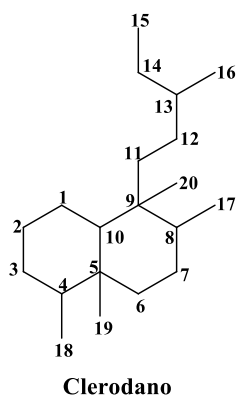
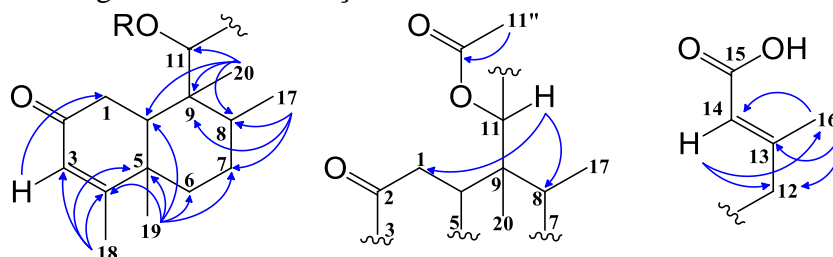


Figura 127 – Correlações de HMBC de DPO-13



A compilação dos dados permitiu a elucidação da estrutura como sendo um diterpeno clerodano conhecido como ácido 11*R*-acetoxi-2-oxo-neocleroda-3,13*E*-dien-15-óico (FIGURA 128). Este composto já foi isolado da espécie (ÁVILA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Figura 128 – Representação estrutural do composto DPO-13

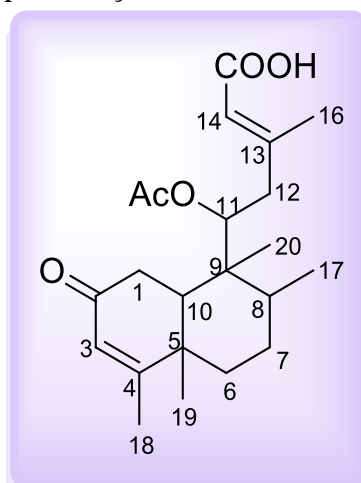


Tabela 16 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $J$  em Hz) de DPO-13 comparados com valores da literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2005)

#	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ Lit.	$\delta_{\text{H}}$ Piridina	$^2J$	$^3J$	$\delta_{\text{H}}$ Lit.
1	36,8	35,9	2,86 (m)		H-3	$\beta$ 2,60 (dd, $J= 17,5; 3,6$ ) $\alpha$ 2,50 (dd, $J= 17,5; 13,5$ )
2	198,5	199,2	-	H-1		-
3	126,1	125,5	5,86 (1H, s)		H-18	5,75 (br s)
4	171,9	172,2	-	H-18	H-19	-
5	40,7	40,1	-	H-6 H-19	H-3 H-18	-
6	35,9	35,5	1,65 (m)	H-19		$\beta$ 1,38 (ddd, $J= 13,0; 12,1; 4,1$ ) $\alpha$ 1,33 (m)
7	28,1	27,6	1,36 (m) 1,79 (m)	H-6	H-17	1,51 (m)
8	36,5	36,2	2,66 (m)	H-17	H-20	1,54 (m)
9	43,9	43,4	-	H-20	H-17	-
10	46,6	46,0	2,08 (m)		H-20	1,98 (dd, $J= 13,5; 3,6$ )
11	75,5	74,4	5,61 (1H, d, $J= 10,6$ )		H-20	5,29 (dd, $J= 9,9; 2,6$ )
12	42,1	42,0	2,52 (m) 2,39 (m)		H-14 H-16	$\beta$ 2,37 (dd, $J= 13,2; 2,6$ ) $\alpha$ 2,30 (dd, $J= 13,2; 9,9$ )
13	155,2	158,6	-	H-12 H-16	H-17	-
14	121,1	118,3	6,15 (1H, s)		H-12 H-16	5,66 (br s)
15	169,1	170,4	-			-
16	18,9	19,0	2,46 (3H, s)		H-14	2,14 (d, $J= 1,3$ )
17	18,7	17,6	1,04 (3H, d, $J= 6,7$ )	H-8		1,01 (d, $J= 5,7$ )
18	19,1	19,1	1,74 (3H, s)		H-3	1,90 (d, $J= 1,1$ )
19	18,3	18,7	1,02 (3H, s)			1,16 (s)
20	12,5	12,2	0,88 (3H, s)			0,87 (s)
11'	170,9	170,7	-	H-11''		-
11''	20,9	20,7	2,02 (3H, s)			2,01 (s)

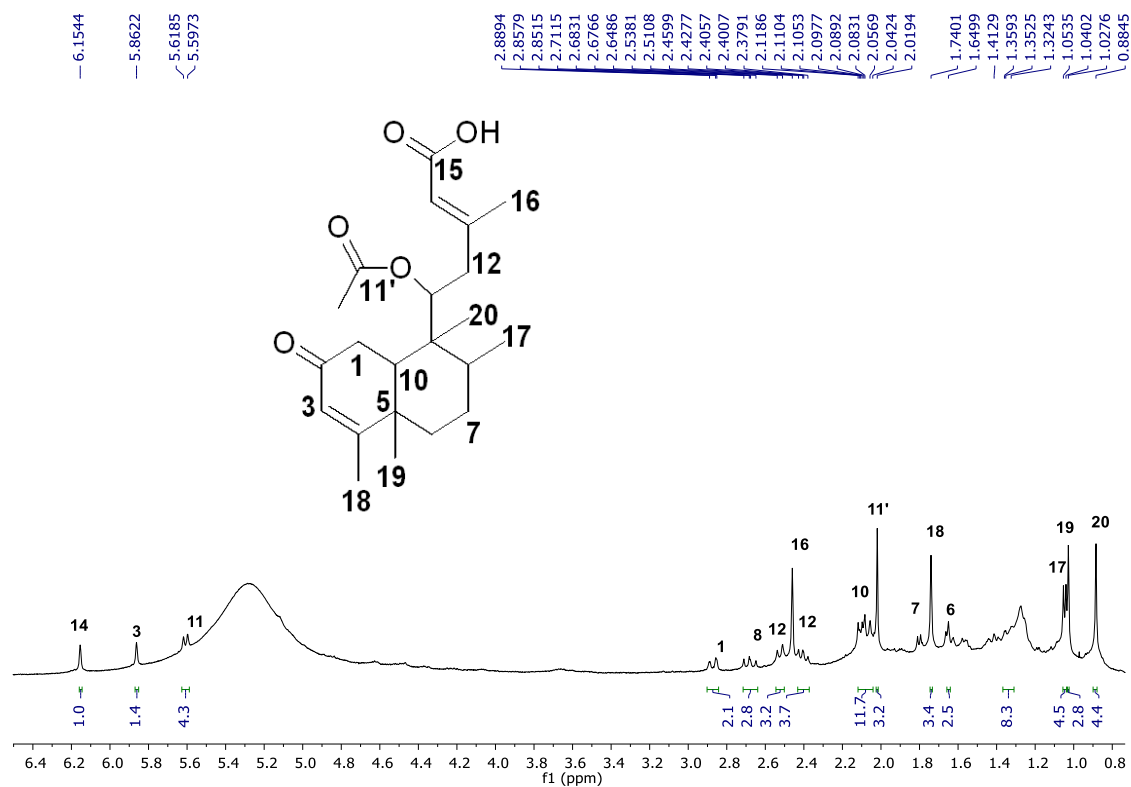
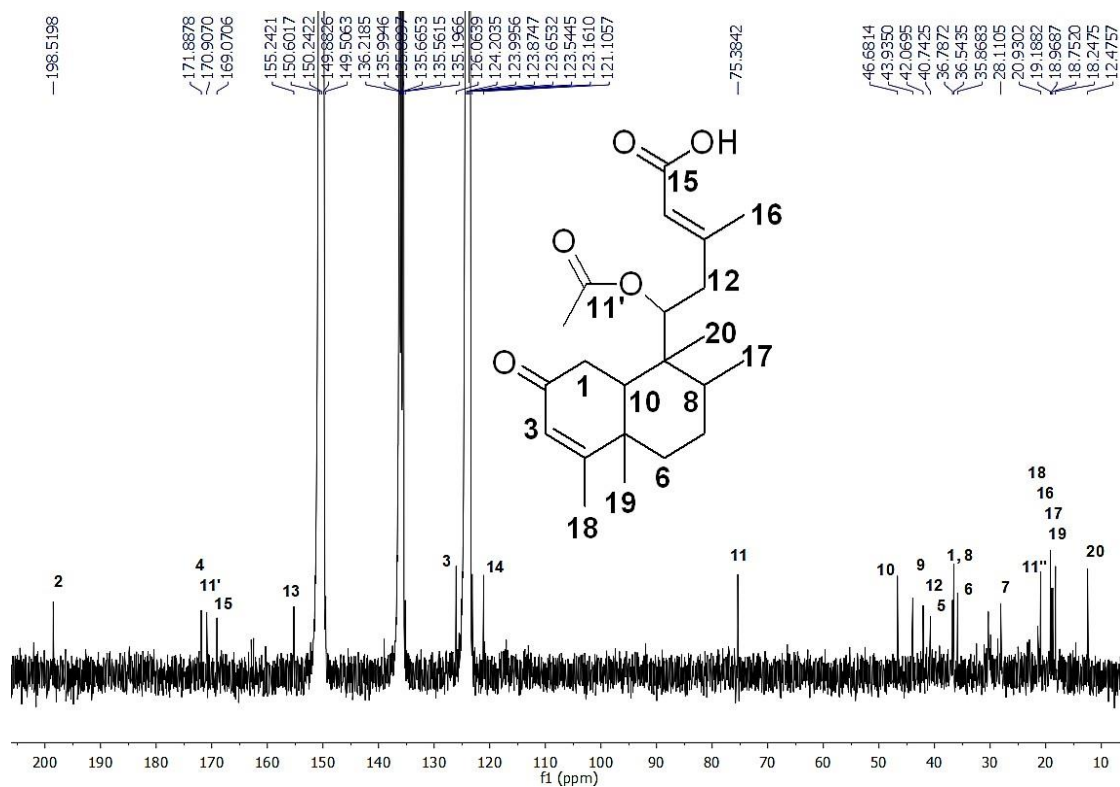
Figura 129 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13Figura 130 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13

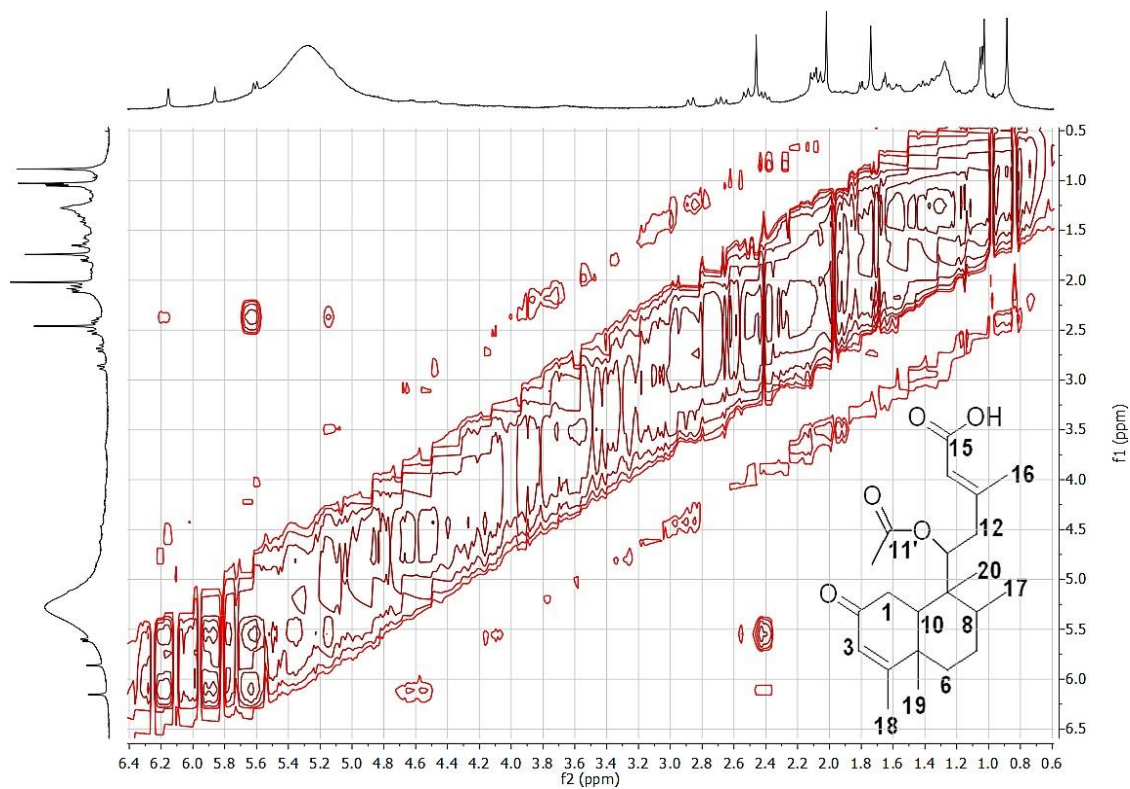
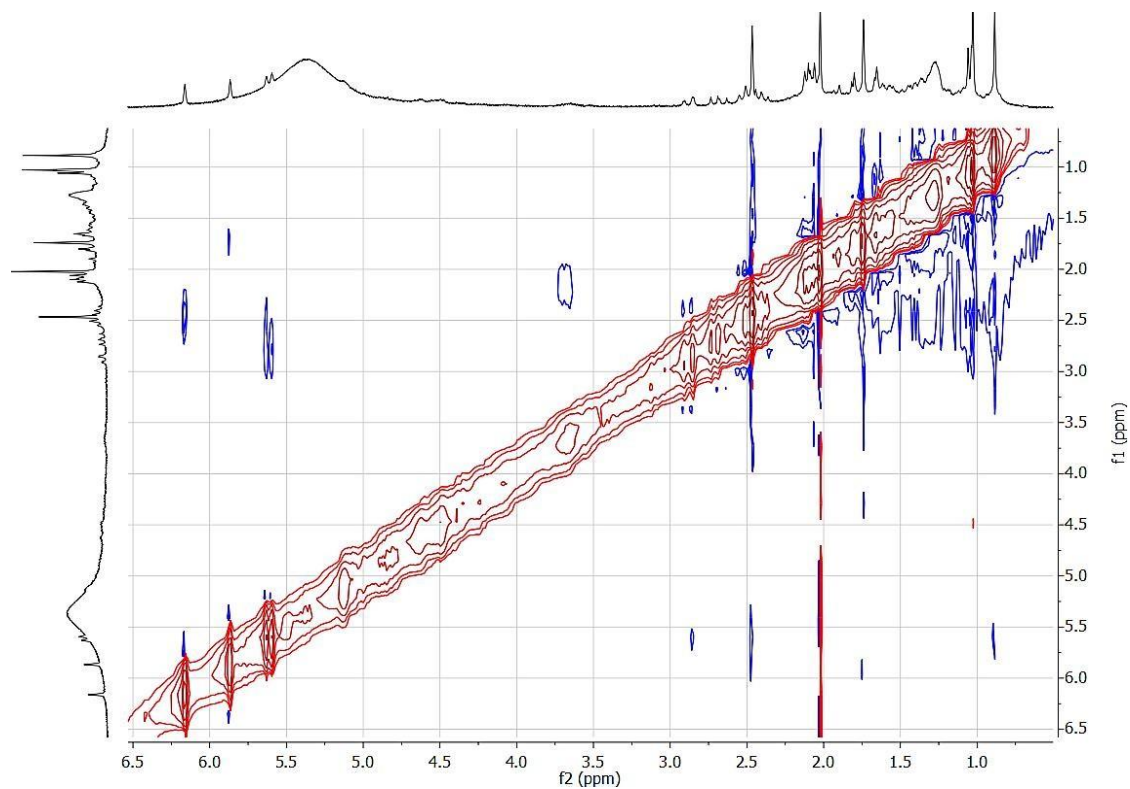
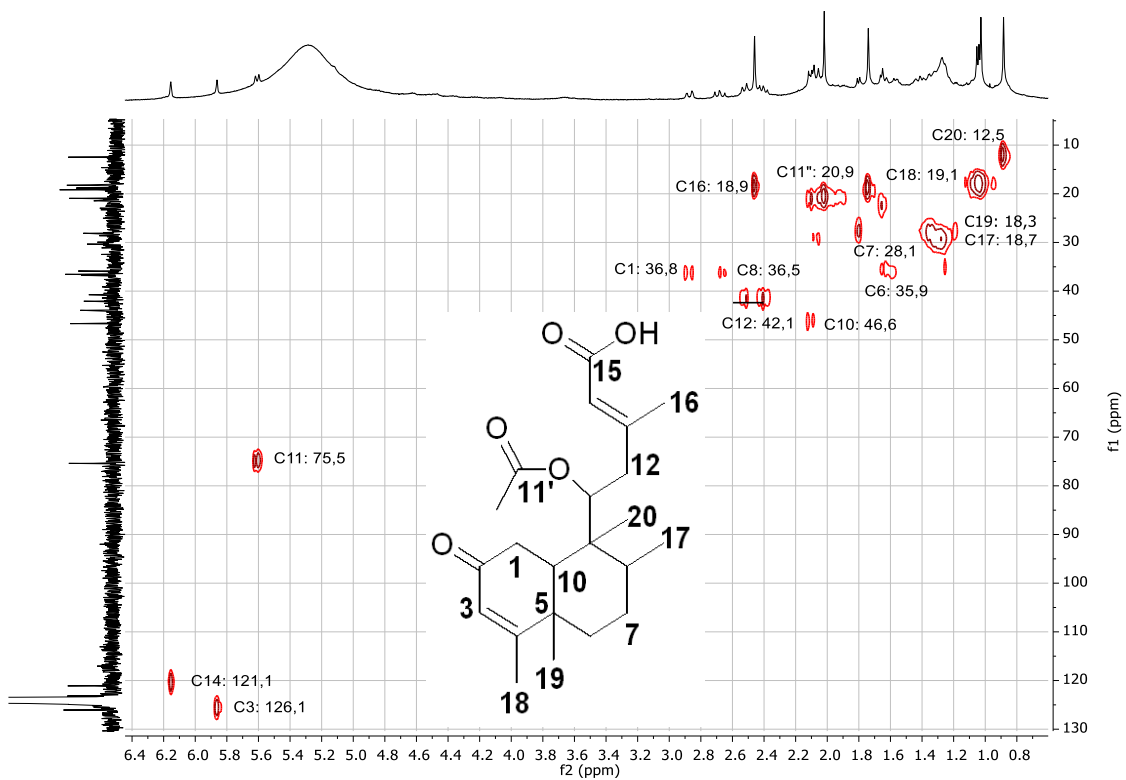
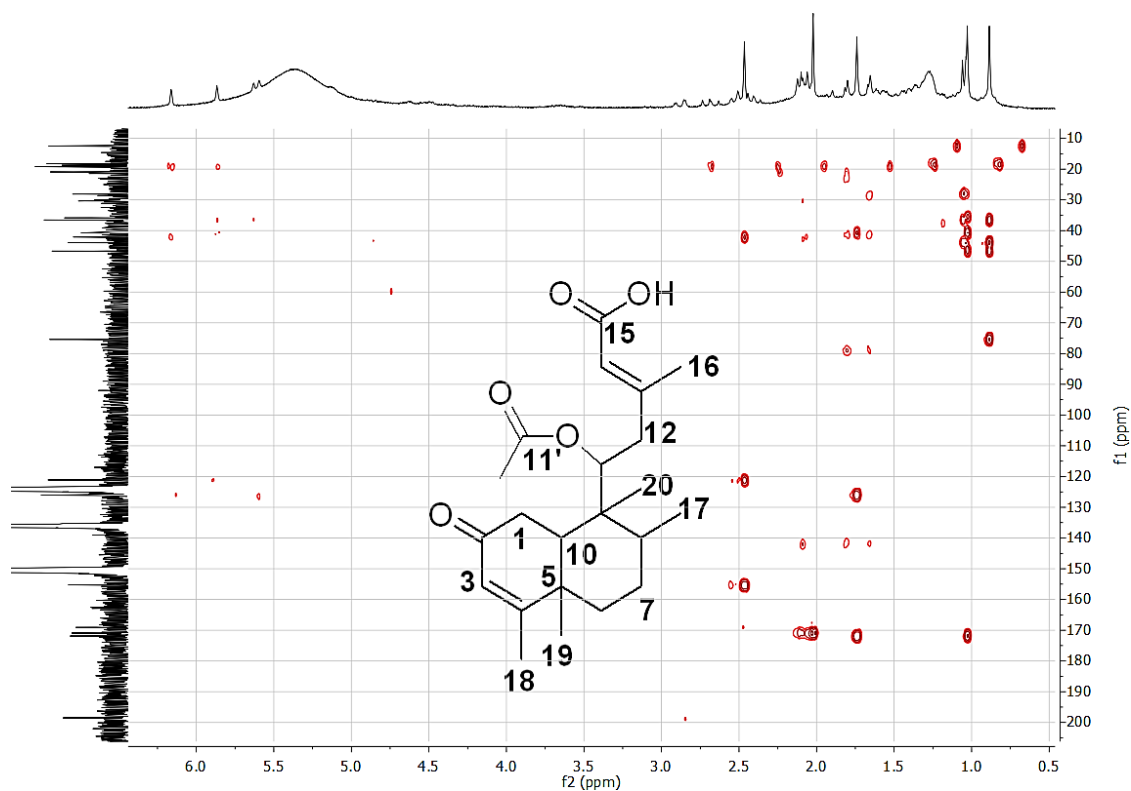
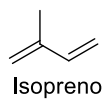
Figura 131 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13Figura 132 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13



Figura 133 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13Figura 134 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (300 x 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de DPO-13

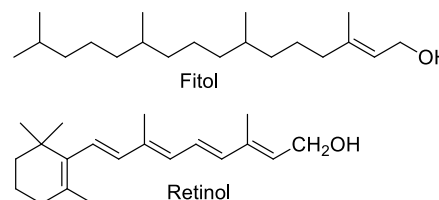
## 6.2 Rota biossintética dos diterpenos isolados de *P. ornatus*

O nome terpeno é oriundo da turpentina (*lat.* Balsamum terebinthinae), uma resina aromática produzida pela árvore terebinto (*Pistacia terebinthus*). Os terpenos constituem uma das maiores e mais variadas classes estruturais de compostos orgânicos. O grupo é formado por uma combinação de isoprenos, sendo assim classificados em:

	<b>Hemiterpenos (C<sub>5</sub>)</b>	<b>Sesterpenos (C<sub>25</sub>)</b>
	<b>Monoterpenos (C<sub>10</sub>)</b>	<b>Triterpenos (C<sub>30</sub>)</b>
	<b>Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>)</b>	<b>Tetraterpenos (C<sub>40</sub>)</b>
	<b>Diterpenos (C<sub>20</sub>)</b>	<b>Politerpenos ((C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>)</b>

Fonte: Adaptado de Torssell, 1983.

Os diterpenos podem ser encontrados nas formas cíclicas e acíclicas. Diterpenos acíclicos e monocíclicos não são facilmente encontrados na natureza. Como exemplo de diterpenos acíclicos têm-se o fitol, enquanto entre os diterpenos monocíclicos o retinol (vitamina A) é o principal representante (ZERBE e BOHLMANN, 2015). Por outro lado, os diterpenos bicíclicos e tricíclicos são abundantes na natureza.

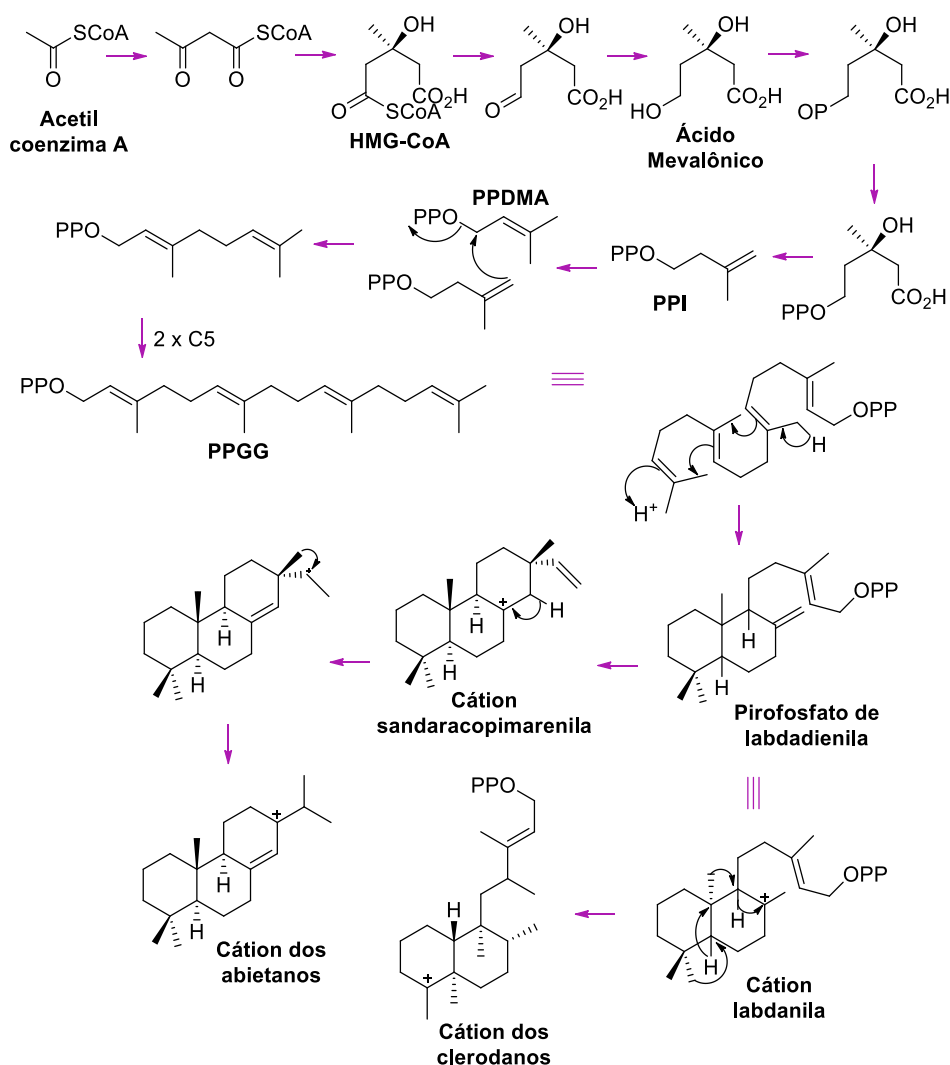


A rota biossintética dos diterpenos em geral se inicia com a condensação do acetil-CoA e acetoacetil-CoA para formar o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (**HMG-CoA**), o qual origina o ácido mevalônico. Este, após reação de desidratação e descarboxilação, forma o difosfato de dimetil-alilo (**PPDMA**) o qual condensa-se com 3 unidades de difosfato de isopentenilo (**PPI**) levando a formação de difosfato de geranylgeranila (**PPGG**) (DEWICK, 2002). Em seguida, uma série de reações de ciclização e de rearranjo leva a formação do pirofosfato de labdadienila, o qual dá origem aos cátions abietanos, clerodanos e labdanos, tipos esqueletais de diterpenos isolados de *P. ornatus* (FIGURA 135).

Vale ressaltar, que, na formação dos diterpenos bicíclicos labdanos, o controle estereoelétrico e fechamento concertado do anel gera os enantiômeros intermediários **I-1** e **I-2** (FIGURA 136) os quais levam a formação de uma grande variedade de compostos diterpênicos (DEWICK, 2009; GEISSMAN e CROUT, 1969). No gênero *Plectranthus* há relato de diterpenos oriundos das duas configurações, sendo a configuração *trans* do átomo de

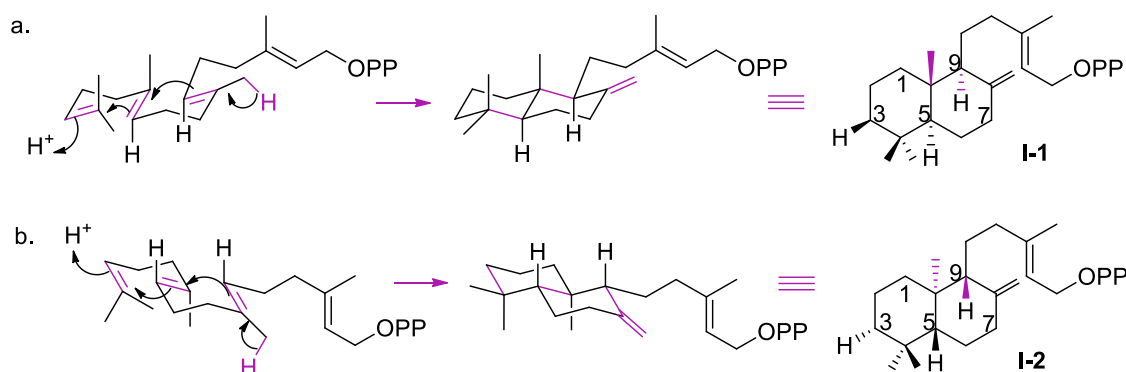
hidrogênio em C-9 e da metila em C-10 (FIGURA 136 – I-1) a mais comum, e até então, a única configuração que origina os diterpenos labdanos de *P. ornatus*. como mostrado na Tabela 1 (ABDEL-MOGIB; ALBAR e BATTERJEE, 2002; GASPAR-MARQUES; SIMÕES e RODRÍGUEZ, 2003, 2004).

Figura 135 – Biossíntese dos diterpenos de esqueleto abietano, labdano e clerodano



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

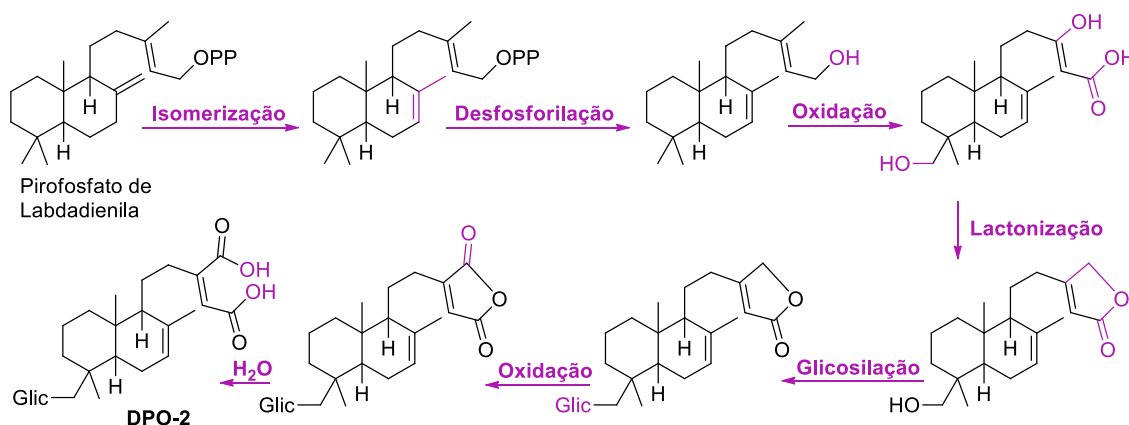
Figura 136 – Formação dos enantiômeros intermediários



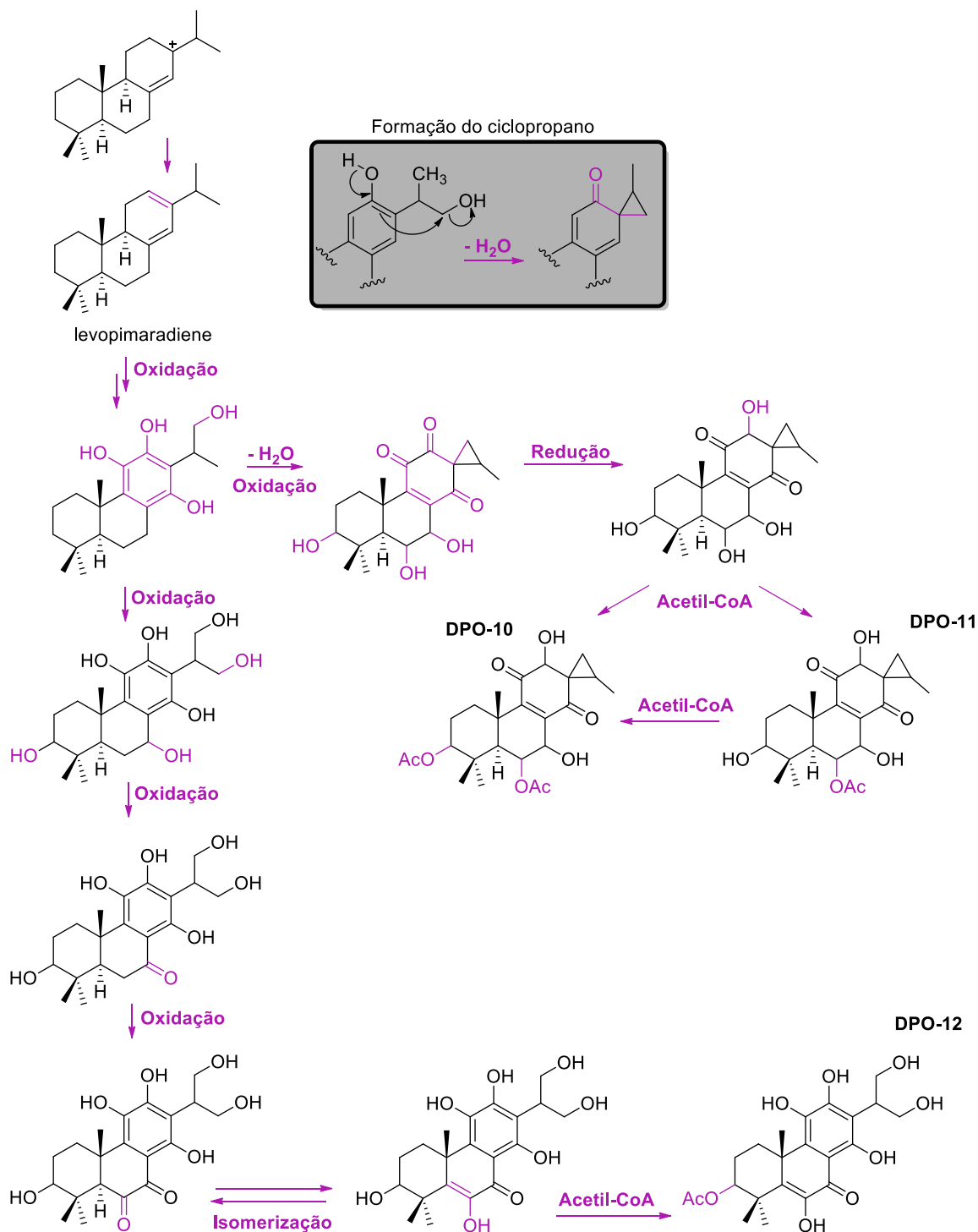
Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

Neste trabalho, foi investigado a composição química do chá da parte aérea de *P. ornatus* tendo culminado no isolamento de diterpenos abietanos, labdanos e clerodanos. Partindo dos seus correspondentes cátions, foi proposto as rotas biossintéticas para o diterpeno labdano DPO-2 (FIGURA 137), para os diterpenos abietanos DPO-10-12 (FIGURA 138), bem como para o diterpeno clerodano DPO-13 (FIGURA 139). Conforme pode ser observado nas propostas biossintéticas, reações clássicas de redução, oxidação, acilação, lactonização e glicosilação foram sugeridas para a formação dos compostos obtidos de *P. ornatus*.

Figura 137 – Proposta biossintética do composto DPO-2 da classe dos labdanos

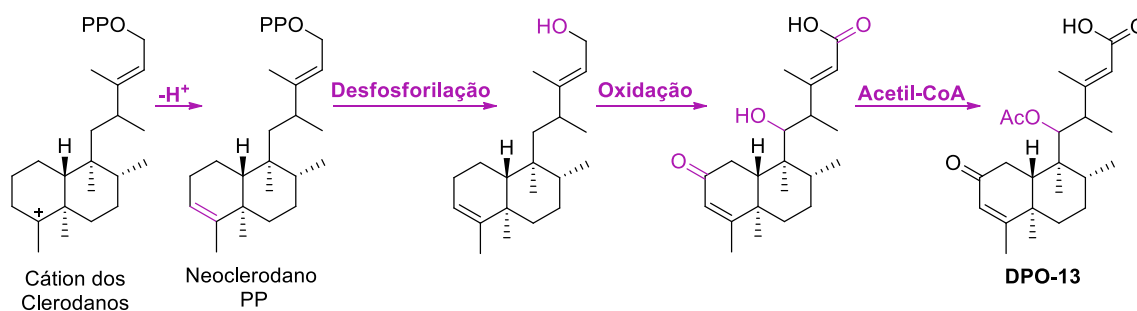


Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 138 – Proposta biossintética dos compostos DPO-10 – 12 da classe dos abietanos isolados do chá de *P. ornatus*

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 139 – Proposta biossintética do composto DPO-13 da classe dos clerodanos



Fonte: elaborada pelo autor.

### 6.3 Estudo comparativo dos decoctos de espécimes de espécies de *Plectranthus*

Conforme descrito no item 5.4.2, foram obtidos os chás das partes aéreas de espécimes de quatro espécies de *Plectranthus*: *P. ornatus*, *P. barbatus*, *P. amboinicus* e *P. grandis*. Todas cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará. A ideia foi estudar a composição química de *P. ornatus* e a partir dos resultados, comparar com os estes chás.

#### 6.3.1 Análise cromatográfica

Após fracionamento da fração metanólica do decocto da *P. ornatus* (item 5.4.4), foi verificado que o composto majoritário do extrato era o ácido rosmarínico (item 6.1.1), um composto fenólico de grande interesse farmacológico por apresentar diversas atividades como: anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antiviral (KIM *et al.*, 2015).

De forma semelhante ao procedimento realizado com decocto de *P. ornatus*, o decocto dos espécimes das outras espécies de *Plectranthus* foi extraído com MeOH e posteriormente, analisado por CLAE [Coluna analítica C-18, gradiente: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/MeOH, 10-100% em 30 min + 10 min em 100% MeOH, Fluxo 1,0 mL/ min, Injeção 25 µL]. A comparação foi realizada através da análise do tempo de retenção e do perfil no ultravioleta do ácido rosmarínico. Conforme pode ser observado a partir dos cromatogramas (FIGURA 140), este metabólito secundário foi majoritário nos extratos de todas as espécies. Esse mesmo resultado também foi verificado por Brito e colaboradores (2018) utilizando *P. barbatus* além de 8 outras espécies de *Plectranthus*. O ácido rosmarínico é um metabólito secundário comumente encontrado não só gênero *Plectranthus* como também na família Lamiaceae (ZORIĆ *et al.*, 2016).

A análise dos extratos metanólicos dos chás das quatro espécies em estudo, empregando o método mencionado acima, porém, utilizando coluna fenil-hexil apresentou uma melhor resolução (FIGURA 141), e com isso foi escolhido, também, para análise dos compostos isolados do chá de *P. ornatus*. Deste modo, com exceção do composto DPO-7, os compostos isolados foram analisados por CLAE [coluna analítica fenil-hexil, gradiente: H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/MeOH, 10-100% em 30 min + 10 min em 100% MeOH, Fluxo 1,0 mL/min, Injeção 25 µL], permitindo elaborar a Tabela 17, a qual mostra os compostos isolados *P. ornatus*, o tempo de retenção de cada composto no método anteriormente detalhado e seus respectivos UVs. Essas informações foram utilizadas para tentar rastrear os compostos nas frações metanólicas dos chás dos espécimes das espécies em estudo.

Vale ressaltar, que devido ao alto teor e absorção do ácido rosmarínico, aliado a complexidade química da fração metanólica do chá de *P. ornatus*, não foi possível identificar pelo tempo de retenção e dados de ultravioleta os demais compostos isolados nem na fração metanólica do chá de *P. ornatus* nem das outras espécies.

Figura 140 – Cromatogramas obtidos por CLAE ilustrando o ácido rosmarínico (A) com destaque para UV e decoctos de *P. ornatus* (B), *P. barbatus* (C), *P. amboinicus* (D) e *P. grandis* (E)

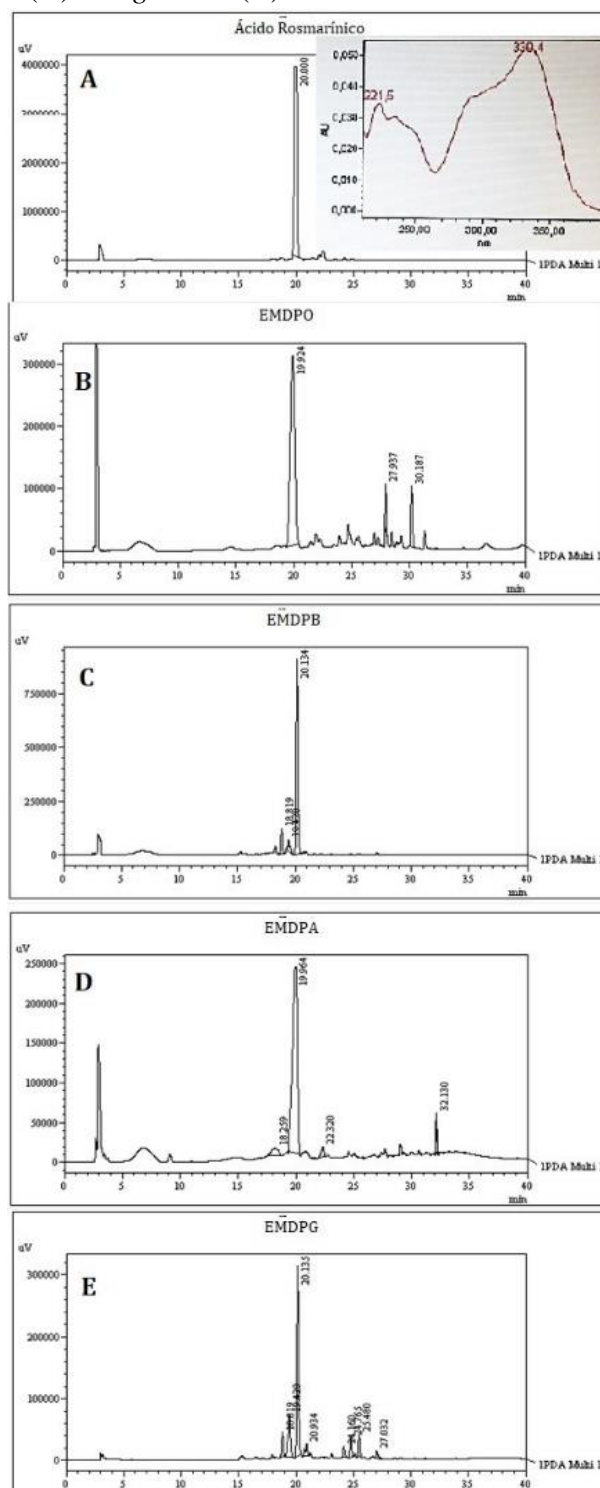


Figura 141 – Cromatogramas obtidos por CLAE com coluna fenil-hexil dos decoctos de *P. ornatus* (A), *P. amboinicus* (B), *P. barbatus* (C) e *P. grandis* (D)

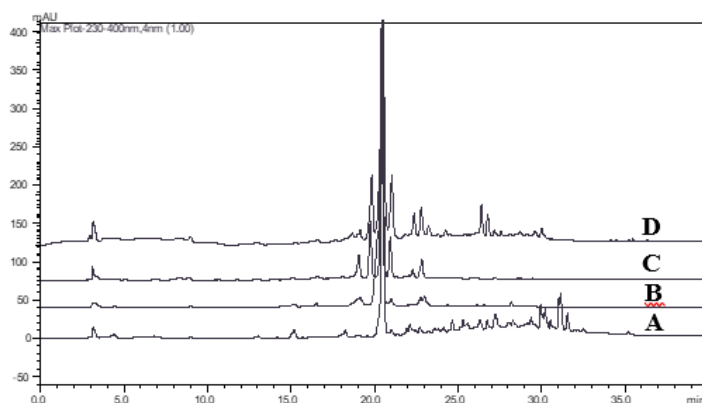


Tabela 17 – Compostos isolados da fração metanólica do chá de *P. ornatus*, tempo de retenção e UV

Composto (Tempo de retenção em minutos)	UV PDA
<p><b>DPO1 (20,48)</b></p>	
<p><b>DPO2 (25,49)</b></p>	
<p><b>DPO3 (10,98)</b></p>	



Tabela 17 – Continuação

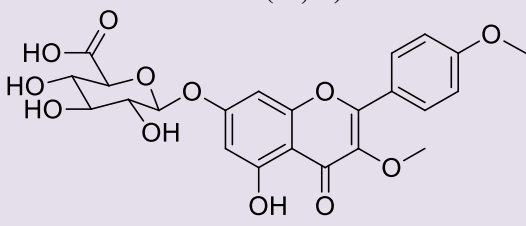
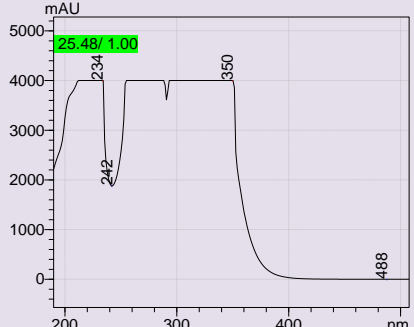
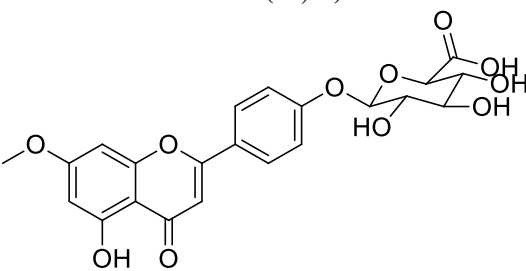
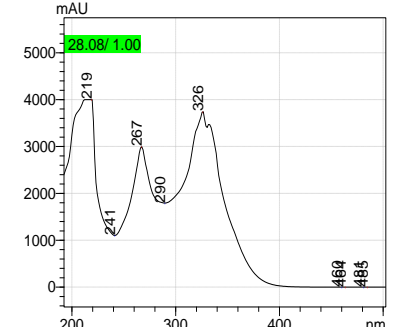
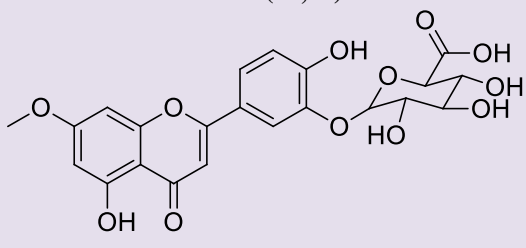
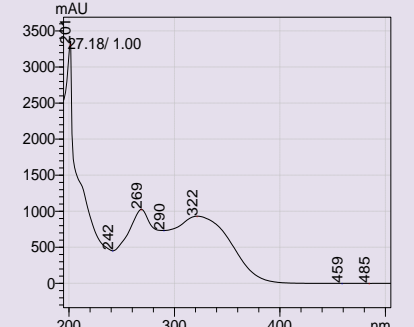
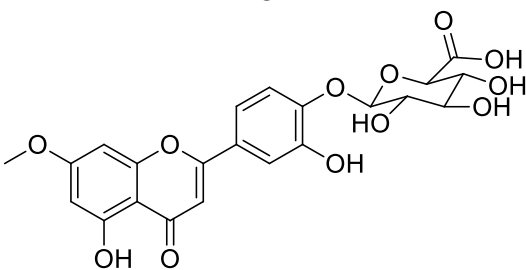
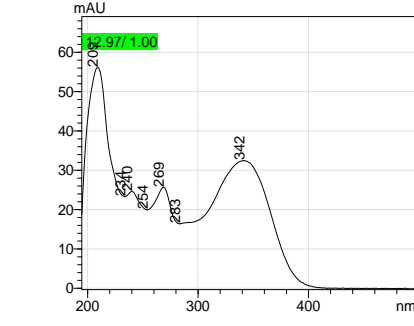
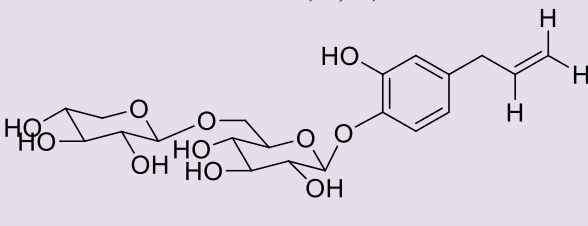
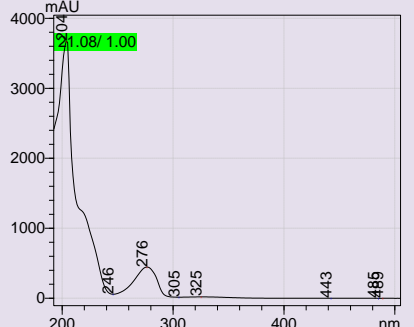
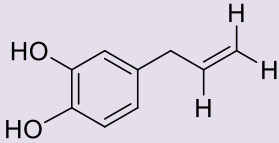
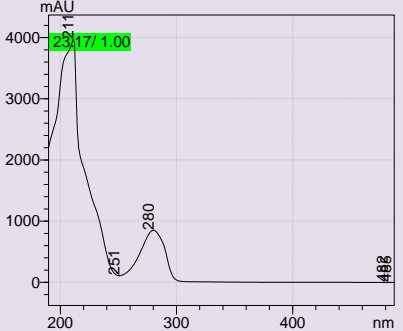
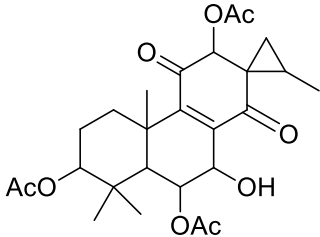
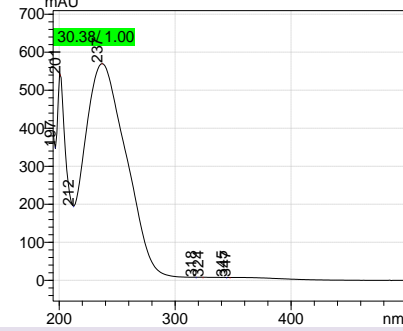
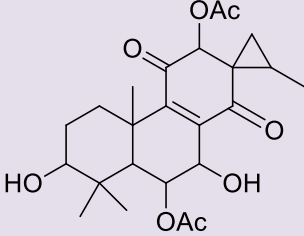
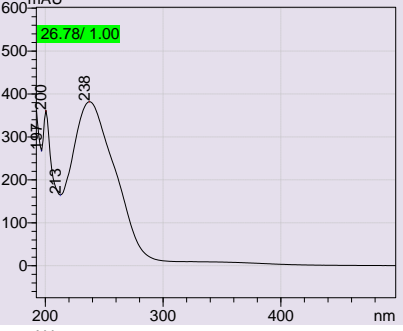
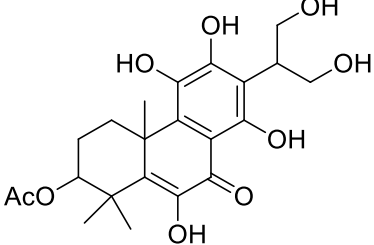
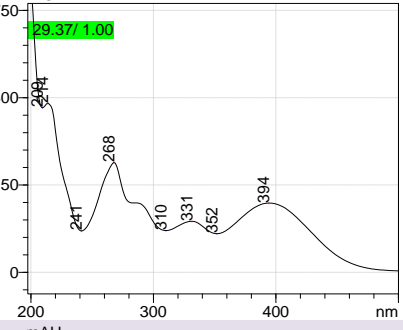
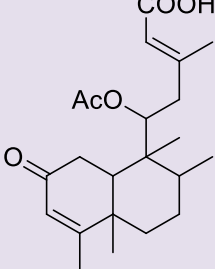
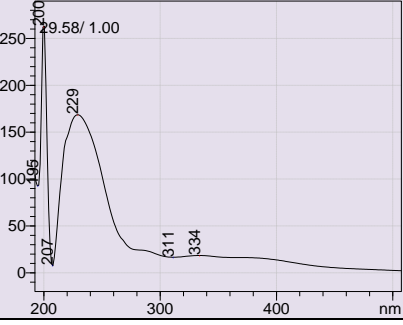
Composto (Tempo de retenção em minutos)	UV PDA
<p><b>DPO4 (25,48)</b></p> 	
<p><b>DPO5 (28,08)</b></p> 	
<p><b>DPO6 (27,18)</b></p> 	
<p><b>DPO7 -</b></p> 	
<p><b>DPO8 (21,08)</b></p> 	

Tabela 17 – Continuação

Composto (Tempo de retenção em minutos)	UV PDA
<p data-bbox="485 297 639 327"><b>DPO9 (23,17)</b></p> 	
<p data-bbox="485 638 639 667"><b>DPO10 (30,38)</b></p> 	
<p data-bbox="485 978 639 1008"><b>DPO11 (26,78)</b></p> 	
<p data-bbox="485 1319 639 1348"><b>DPO12 (29,37)</b></p> 	
<p data-bbox="485 1659 639 1688"><b>DPO13 (29,58)</b></p> 	

Dentre os compostos minoritários isolados do chá de *P. ornatus*, há relatos apenas de DPO-10 (coleona R) e DPO-11 ( $3\beta$ -hidroxi-3-deoxobarbatusina) a partir de outras espécies de *Plectranthus*. DPO-10 foi isolado do extrato hexânico de *P. ornatus* (ÁVILA *et al.*, 2017) e do extrato obtido com éter etílico de *P. caninus* (ARIHARA; RUEDI e EUGSTER, 1975), enquanto DPO-11 foi isolado do extrato em acetona de *P. barbatus* (ZELNIK *et al.*, 1977), bem como do extrato hexânico de *P. grandis* (ARAÚJO *et al.*, 2010). Adicionalmente, DPO-11 foi quantificado nas espécies em estudo sendo encontrado em maior quantidade em *P. grandis* e menor quantidade em *P. ornatus* (SILVA *et al.*, 2017).

### 6.3.2 Teste de inibição enzimática

Diabetes é uma doença caracterizada, basicamente, por hiperglicemia crônica ocasionando no paciente diversas complicações como catarata e problemas renais. É projetado que, em 2030, cerca de 366 milhões de pessoas de várias idades no mundo tenham esta doença (HA *et al.*, 2012). Assim, diversos estudos são realizados na busca de diminuir a glicose do sangue de diabéticos.

Sotnikova e colaboradores (2013) verificaram que a diabetes induzida por administração de estreptozocina em ratos desencadeia hiperglicemia, redução do peso corporal, aumento do consumo de água e produção diária de urina. Assim como induz a diminuição da frequência cardíaca, mas não afeta a pressão arterial. A administração oral do ácido rosmarínico (AR) não afetou nenhum desses sintomas com exceção do consumo diário de água. Além disso, a diabetes desencadeia processos inflamatórios através de estresse oxidativo no endotélio da aorta. O uso do AR amenizou a disfunção vascular na aorta dos ratos, efeito que foi atribuído às atividades antioxidante e anti-inflamatória do mesmo (SOTNIKOVA *et al.*, 2013).

Entretanto, o AR não apresentou efeito inibitório frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase, mas mostrou efeito inibitório ( $IC_{50} = 11,2 \mu M$ ) frente à aldose redutase, outra enzima relacionada à diabetes crônica, onde o composto usado como controle positivo (quercetina) forneceu  $IC_{50} = 1,9 \mu M$  (HA *et al.*, 2012). Baseado na atividade inibitória do ácido rosmarínico frente à aldose redutase, Kang e colaboradores (2016) sintetizaram derivados deste composto para verificar a relação estrutura-atividade. Foi observado que compostos glicosilados amenizaram a inibição da enzima. Assim também como a dupla ligação da cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada nos derivados do AR é importante para a inibição da aldose redutase (KANG *et al.*, 2016). Desta forma, este resultado pode ser um indicativo que espécies de *Plectranthus*,

por apresentarem o AR como componente majoritário, possam apresentar atividade antidiabética frente à aldose redutase.

Contudo, apesar do AR não apresentar efeito inibitório frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase, questionou-se se a presença de diversos compostos glicosilados nos chás de *Plectranthus* não afetaria no resultado. Mas, como pode ser observado na Tabela 18, nenhum dos chás das espécies de *Plectranthus* se mostrou antidiabético frente à enzima  $\alpha$ -glicosidase, corroborando com a literatura.

Tabela 18 – Valores de inibição da enzima

<b>Amostras</b>	<b>% Inibição</b>
<b>Chá da <i>P. ornatus</i></b>	Não houve inibição
<b>Chá da <i>P. grandis</i></b>	Não houve inibição
<b>Chá da <i>P. amboinicus</i></b>	Não houve inibição
<b>Chá da <i>P. barbatus</i></b>	Não houve inibição
<b>Acarbose*</b>	92,70

\*Controle positivo. Fonte: Dados da pesquisa.

### 6.3.3 Teste de viabilidade celular

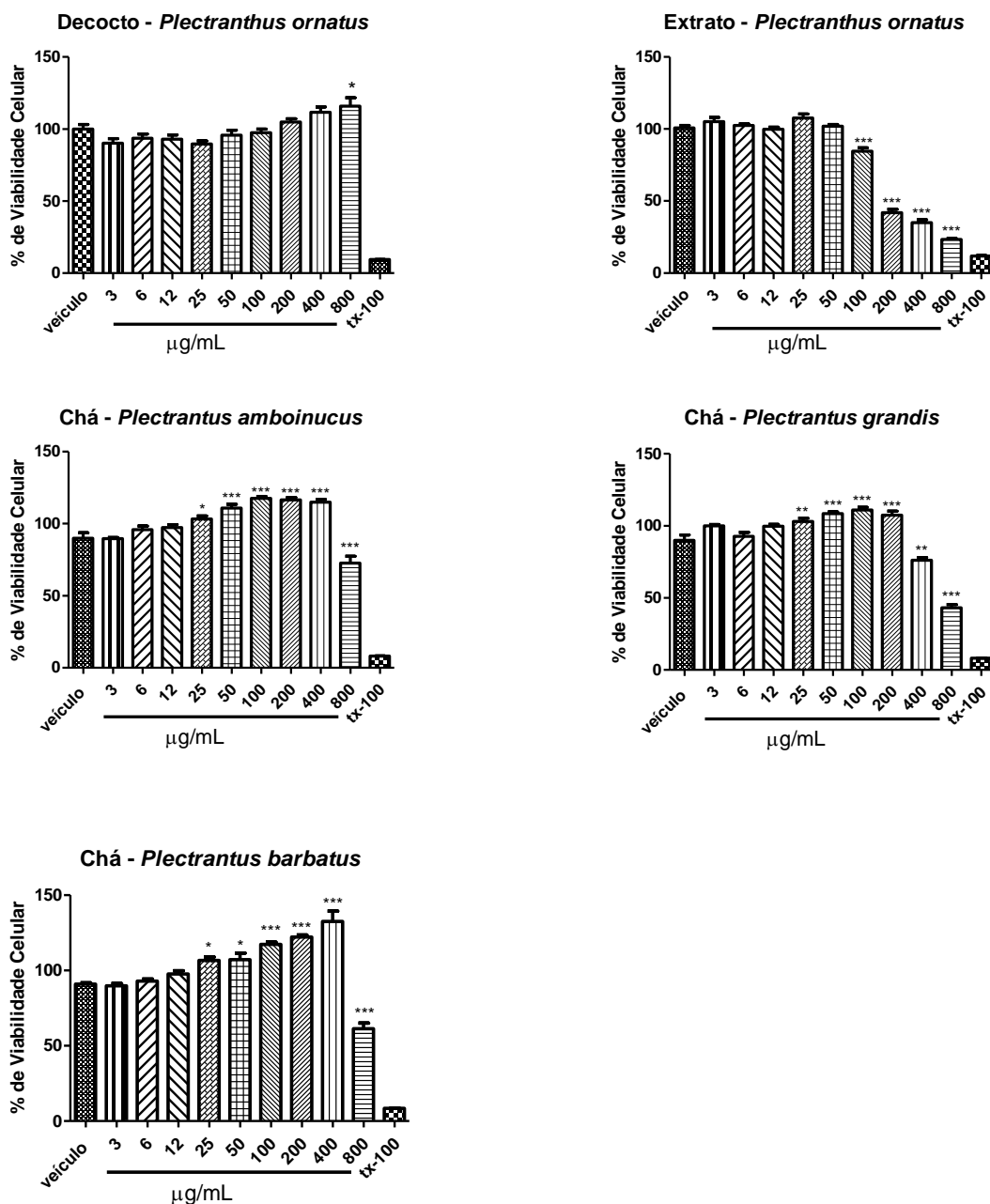
A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983) utilizando células de adenocarcinoma gástrico (AGS) com a finalidade de estabelecer as doses não citotóxicas que serão utilizadas em experimentos de cicatrização *in vitro* com células AGS. O direcionamento do estudo para células de origem gástrica se deve pela necessidade de estabelecer uma correlação com o uso popular da planta.

O decocto de *P. ornatus* (DPO) não apresentou citotoxicidade nas concentrações utilizadas (FIGURA 142), diferentemente do observado no extrato etanólico da mesma planta (EEPO, IC<sub>50</sub> 138  $\mu$ g/mL), podendo-se sugerir que a presença dos compostos mais polares como constituintes glicosilados têm papel importante no tratamento de problemas gastrointestinais. Os decoctos de *P. amboinicus* (DPA), *P. grandis* (DPG) e *P. barbatus* (DPB) apresentaram toxicidade nas concentrações mais altas, sendo de 800  $\mu$ g/mL para DPA e DPB, assim como a partir de 400  $\mu$ g/mL para DPG.

Apesar do ensaio de MTT ser utilizado para determinar a viabilidade celular, uma ação proliferativa foi observada no decocto de *P. ornatus* na concentração de 800  $\mu$ g/mL, na faixa de concentração de 25 – 400  $\mu$ g/mL nos decoctos de *P. amboinicus* e de *P. barbatus*, e na faixa de concentração de 25 – 200  $\mu$ g/mL para o decocto de *P. grandis* em relação ao grupo

veículo, o que não é normal em outros extratos. Deste modo, testes com inibidores da proliferação celular precisam ser realizados para comprovar o potencial proliferatório dos chás frente a essa linhagem celular.

Figura 142 – Efeitos de DPO, EEPO, DPA, DPG e DPB



Valores representam as médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs veículo. Tx-100 (triton x -100, padrão citotóxico). Fonte: Dados da pesquisa.

## 7 CONCLUSÃO

A investigação química da fração solúvel em metanol, obtida do decocto de *Plectranthus ornatus*, resultou no isolamento e caracterização de treze metabólitos secundários, sendo o ácido rosmarínico o constituinte majoritário. Entre os compostos isolados, dois diterpenos (DPO-2 e DPO-12) e dois flavonoides (DPO-6 e DPO-7) ainda não haviam sido relatados na literatura. Ressalte-se, que sete dos compostos isolados, entre diterpenos e fenólicos possuem em sua estrutura, uma ou duas unidades glicosídicas (xilose e glicose), algumas das quais oxidadas.

Através de análise qualitativa comparativa dos cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações metanólicas dos chás de *P. ornatus*, *P. amboinicus*, *P. barbatus* e *P. grandis*, foi verificado que o ácido rosmarínico era o composto majoritário em todos os chás. Vale ressaltar, que em estudos prévios, envolvendo outras espécies de *Plectranthus*, este composto também foi o componente majoritário. Além disso, compostos como flavonoides glicosilados e diterpenos também já haviam sido identificados nos chás de outras espécies do gênero.

Infelizmente, a tentativa de detectar os compostos isolados guiados pelo tempo de retenção e dados de UV nos extratos brutos das quatro espécies investigadas, foi infrutífera. Talvez pela quantidade significativa de ácido rosmarínico e sua alta absorção nas faixas de UV investigadas.

Verificou-se que para as análises dos chás de *Plectranthus*, a coluna fenil-hexil se apresentou mais eficiente que a coluna C18. Fato plausível visto que coluna fenil-hexil aprimora interações Pi-Pi com aromáticos, tendo sua seletividade para compostos aromáticos e moderadamente polares.

Das espécies em estudo, a fração metanólica do decocto de *P. grandis* apresentou maior rendimento, enquanto, *P. amboinicus* apresentou menor rendimento.

Nenhum dos chás apresentou inibição enzimática da  $\alpha$ -glicosidase, resultado que pode ser explicado pelo fato do composto majoritário dos chás, o ácido rosmarínico, não apresentar essa propriedade.

A viabilidade celular dos chás (decoctos), verificada através do teste de MTT frente a células de adenocarcinoma gástrico humano, mostrou em altas concentrações, ação proliferativa, o que pode ser um indicativo para o uso popular. Entretanto, o extrato etanólico da parte aérea de *P. ornatus*, quando em altas concentrações, apresenta efeito tóxico, sugerindo que a presença de compostos polares, capazes de serem extraídos com a água, se façam necessários para as propriedades terapêuticas gástricas. Diferentemente do chá de *P.*

*ornatus*, os chás de *P. amboinicus*, *P. grandis* e *P. barbatus* apresentaram ação proliferativa em uma faixa de concentração, em concentrações muito altas ambos apresentam efeito tóxico. Entretanto, mais testes precisam ser realizados a fim de comprovar esse efeito proliferativo celular.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H. A.; BATTERJEE, S. M. Chemistry of the Genus *Plectranthus*. **Molecules**, v. 7, p. 271–301, 2002.
- AKDEMIR, Z. S. *et al.* Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 71–75, 2003.
- ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 2. **Planta Medica**, v. 76, p. 753–765, 2010.
- ALBUQUERQUE, R. L. DE. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas medicinais do gênero Plectranthus: *Plectranthus amboinicus* Lour (Spreng); *Plectranthus barbatus* Andr.; *Plectranthus grandis* Cramer (Willense) e *Plectranthus ornatus* Codd.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2004.
- ALBUQUERQUE, R. L. DE *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. November, p. 24–26, 2007.
- ALVES, T. B. *et al.* Friedelin in *Maytenus ilicifolia* Is Produced by Friedelin Synthase Isoforms. **Molecules**, v. 23, n. 700, p. 1–12, 2018.
- ARAÚJO, P. DE *et al.* Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxybarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 725–730, 2010.
- ARIHARA, S.; RUEDI, P.; EUGSTER, C. H. Neue spiro-Cyclopropyl-cyclohexendion-Diterpene: Coleone M, N, P, Q, R sowie Barbatusin aus *Plectranthus caninus* ROTH und Coleon O aus *Coleus somaliensis* S. Moore. **Helvetica Chimica Acta**, v. 58, n. 42, p. 343–356, 1975.
- ASADA, Y. *et al.* Labdane-type diterpenoids from hairy root cultures of *Coleus forskohlii*, possible intermediates in the biosynthesis of forskolin. **Phytochemistry**, v. 79, p. 141–146, 2012.
- ASCENSÃO, L. .; MOTA, L. .; CASTRO, M. D. M. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology , Distribution and Histochemistry. **Annals of Botany**, v. 84, p. 437–447, 1999.
- ÁVILA, F. N. *et al.* Miscellaneous diterpenes from the aerial parts of *Plectranthus ornatus* Codd. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1014–1022, 2017.
- BANDEIRA, J. M. *et al.* Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p.157-164, 2011.
- BERTRAND, A. *et al.* Leuconostoc mesenteroides glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. **Carbohydrate Research**, v.



341, p. 855–863, 2006.

BHARITKAR, Y. P. *et al.* New flavonoid glycosides and other chemical constituents from *Clerodendrum phlomidis* leaves: Isolation and characterisation. **Natural Product Research**, v. 29, n. 19, p. 1850–1856, 2015.

BHAT, S. V. *et al.* The Antihypertensive and Positive Inotropic Diterpene Forskolin: Effects of Structural Modifications on Its Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 486–492, 1983.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. p. 60, 2007.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BRITO, E. *et al.* Bioactivities of decoctions from *Plectranthus* species related to their traditional use on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, n. December 2017, p. 147–154, 2018.

BURMISTROVA, O. *et al.* Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1413–1423, 2013.

CANIARD, A. *et al.* Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 119, p. 1–13, 2012.

COXON, B.; JOHNSON, L. F. The N.M.R. Spectroscopy of derivatives of 6-amino-6-deoxy-D-Glucose-6-<sup>15</sup>N\*. **Carbohydrate Research**, v. 20, p. 105–122, 1971.

DEMETZOS, C.; DIMAS, K. S. Labdane - Type Diterpenes: Chemistry and Biological Activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, p. 235–292, 2001.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5 – C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 181–222, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A biosynthetic Approach**. 3. ed. Nottinghamm, UK: John Wiley & Sons LTD, 2009.

DIDEROT, N. T. *et al.* Prolyl endopeptidase and thrombin inhibitory diterpenoids from the bark of *Xylopiya aethiopica*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1763–1766, 2005.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ELMASTAS, M. *et al.* Antioxidant activity of an anatolian herbal tea — *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 374–384, 2018.

FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção , perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

GALVÃO RODRIGUES, F. F. *et al.* Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; RODRÍGUEZ, B. Labdane and Kaurane Diterpenoids from *Plectranthus fruticosus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 491–496, 2003.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; RODRÍGUEZ, B. Further Labdane and Kaurane Diterpenoids and Other Constituents from *Plectranthus fruticosus*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 614–621, 2004.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. ix ed. San Francisco: Freeman, Cooper, 1969.

HA, T. J. *et al.* Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against  $\alpha$ -glucosidase and aldose reductase. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1397–1403, 2012.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JIANG, K. *et al.* Anti-inflammatory Terpenoids from the Leaves and Twigs of *Dysoxylum gotadhora*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1037–1044, 2015.

KAMDEM, R. E.; SANG, S.; HO, C.-T. Mechanism of the Superoxide Scavenging Activity of Neoandrographolide – A Natural Product from *Andrographis paniculata* Nees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4662–4665, 2002.

KANG, J. *et al.* Fitoterapia Isolation, modification, and aldose reductase inhibitory activity of rosmarinic acid derivatives from the roots of *Salvia grandifolia*. **Fitoterapia**, v. 112, p. 197–204, 2016.

KHAZIR, J. *et al.* Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 173–181, 2014.

KIM, G.-D. *et al.* Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2083–2092, 2015.

KRENN, L. *et al.* Flavonoids from *Achillea nobilis* L. **Zeitschrift fur Naturforschung**, n. January, p. 11–16, 2003.

KUHNT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 485–489, 1994.

LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Termite antifeedant activity in *Detarium*

- microcarpum*\*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1101–1104, 1995.
- LI, C. *et al.* Quinoid glycosides from *Forsythia suspensa*. **Phytochemistry**, v. 104, p. 105–113, 2014.
- LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2012.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 263–267, 2000.
- LUKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 1–24, 2006.
- MACÍAS, F. A. *et al.* Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 4, p. 396–404, 2010.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Medicianis - Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3ª ed. Fortaleza: UFC, 2007.
- MAZID, M.; KHAN, T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232–249, 2011.
- MEDRADO, H. H. *et al.* Rosmarinic and cinnamic acid derivatives of in vitro tissue culture of *Plectranthus ornatus*: Overproduction and correlation with antioxidant activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 505–511, 2017.
- MESQUITA, L. S. F. **Prospecção química do extrato etanólico das folhas de *Plectranthus ornatus* Codd**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.
- MOITEIRO, C. *et al.* HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola* L. from Portugal. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3683–3687, 2008.
- MONTEIRO, F. K. S.; PASTORE, J. F. B.; MELO, J. I. M. The Flora of Paraíba State, Brazil: subfamilies Ajugoideae and Viticoideae (Lamiaceae). **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3: e20170472, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOTA, L. *et al.* Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, p. 719–732, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.

- OKAMURA, N. *et al.* Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* Leaves. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1463–1466, 1994.
- OLIVEIRA, P. M. *et al.* Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 588–591, 2005.
- PATORA, J.; KLIMEK, B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 59, n. 2, p. 139–143, 2002.
- PHILIPPE, R. N. *et al.* Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 155–161, 2014.
- POUYSÉGU, L. *et al.* Hypervalent iodine-mediated oxygenative phenol dearomatization reactions. **Tetrahedron**, v. 66, p. 5908–5917, 2010.
- RATHEE, J. S. *et al.* Antioxidant Activity of *Piper betel* Leaf Extract and Its Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9046–9054, 2006.
- RIBEIRO, V. P. *et al.* Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018.
- RICE, L. J. *et al.* *Plectranthus*: A plant for the future? **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 4, p. 947–959, 2011.
- RIJO, P. *et al.* Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1387–1390, 2002.
- RIJO, P. *et al.* Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 4, p. 215–221, 2007.
- RIJO, P. *et al.* Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*: Royleanone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* Strains. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 922–932, 2010.
- RIJO, P. *et al.* Antimicrobial Properties of *Plectranthus ornatus* Extracts, 11-acetoxyhalima-5, 13-dien-15-oic Acid Metabolite and its Derivatives. **The Natural Products Journal**, v. 1, n. April 2016, p. 57–64, 2011.
- RIJO, P.; SIMÕES, M. F.; RODRÍGUEZ, B. Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 595–598, 2005.
- SALAH, M. A. *et al.* Antifungal Clerodane Diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. et Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7607–7610, 2003.
- SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. **Ricerca Scientifica**, v. 28, p. 2329–2333, 1958.

- SCHULTZ, C. *et al.* Inhibition of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 1–7, 2007.
- SEAMON, K. B. *et al.* Structure-Activity Relationships for Activation of Adenylate Cyclase by the Diterpene Forskolol and Its Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 436–439, 1983.
- SHIMONI, E. *et al.* Biotransformations of propenylbenzenes by an *Arthrobacter* sp. and its t-anethole blocked mutants. **Journal of Biotechnology**, v. 105, p. 61–70, 2003.
- SHINDE, J. *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto – Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 1278–1281, 2008.
- SHOULDERS, B.; WELCH, S. C. A Very Brief, Rapid, Simple, and Unified Method for Estimating Carbon-13 NMR Chemical Shifts. **Journal of Chemical Education**, v. 64, n. 11, p. 915–918, 1987.
- SILVA, M. G. D. V. *et al.* Quantification of barbatusin and 3 beta-hydroxy-3-deoxybarbatusin in *Plectranthus* species by HPLC-DAD. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, p. 1–5, 2017.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. rev. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.
- SINGH, R. *et al.* Identification of the Position of Mono-*O*-glucuronide of Flavones and Flavonols by Analyzing Shift in Online UV Spectrum ( $\lambda$  max) Generated from an Online Diode Array Detector. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9384–9395, 2010.
- SOTNIKOVA, R. *et al.* Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced. **Journal of Pharmacy And Pharmacology Research**, v. 65, p. 713–723, 2013.
- TALZHANOV, N. A. *et al.* Components of *Artemisia pontica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 2, p. 178–181, 2005.
- TORSSELL, K. B. G. **Natural product chemistry: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. Chichester: Wiley - Interscience, 1983.
- TRAN, Q. T. N.; WONG, W. S. F.; CHAI, C. L. L. Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 124, p. 43–63, 2017.
- UEJI, S.; SUGIURA, M.; TAKAO, N. Aromatic Solvent-Induced Shifts (ASIS) in Carbon-13 NMR Spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 475–478, 1980.
- UTILLE, J.-P.; VOTTERO, P. J. A. Effets de substituants sur les déplacements chimiques en

r.m.n -  $^{13}\text{C}$  pour la série du D-xylose\*. **Carbohydrate Research**, v. 85, p. 289–297, 1980.

WANG, M. *et al.* Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4869–4873, 1998.

YAMAMURA, S. *et al.* Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 131–136, 1998.

YANG, S. M.; WU, D. G.; LIU, X. K. Anticancer activity of diterpenoids from *Amoora ouangliensis* and *Amoora stellato-squamosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 65, n. 1–2, p. 39–42, 2010.

YOSHIZAKI, M. *et al.* A Chemotaxonomic study of flavonoids in the leaves of six *Trichosanthes* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2557–2558, 1987.

ZELNIK, R. *et al.* Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoids from *Coleus barbatus* Benth. **Tetrahedron**, v. 33, n. 12, p. 1457–1467, 1977.

ZERBE, P.; BOHLMANN, J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, p. 1–10, 2015.

ZORIĆ, Z. *et al.* Stability of rosmarinic acid in aqueous extracts from different Lamiaceae species after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 97–102, 2016.