

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E  
MUCURI- UFVJM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ABRAÃO JOSÉ SILVA VIANA**

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DE *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae)**

**DIAMANTINA - MG**

**2011**

**ABRAÃO JOSÉ SILVA VIANA**

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE**  
*Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**DIAMANTINA – MINAS GERAIS**

**2011**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Viviane Pedrosa CRB6 2641

V614e  
2011

Viana, Abraão José Silva  
Estudo Químico e de Atividade Biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae)/Abraão José Silva Viana. – Diamantina: UFVJM, 2011.  
104p.

Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química)-Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Machado Oliveira

1. Atividade anticolinesterásica 2. Extrato hexânico 3. Estudo fitoquímico 4. Boldo 5. Boldo-gambá II. Título

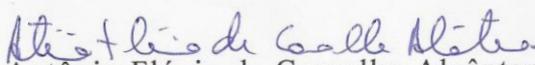
**CDD 541.3**

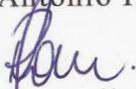
**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Plectranthus  
neochilus* Schltr**

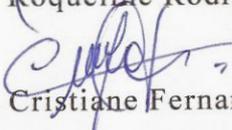
**Abraão José Silva Viana**

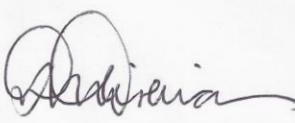
Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química, nível  
de Mestrado, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 16 / 09 / 2011

  
Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara – UFMG

  
Prof.ª Roqueline Rodrigues Silva de Miranda – UFMG

  
Prof.ª Cristiane Fernanda Fuzer Grael – UFVJM

  
Prof.ª Patrícia Machado Oliveira – UFVJM  
Presidente

DIAMANTINA  
2011

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob a orientação da Professora Dra. Patrícia Machado de Oliveira (UFVJM) e co-orientado pelo Professor Dr. Antônio Flávio Carvalho Alcântara (UFMG).

*Dedicatória*

Dedico este trabalho a minha mãe Zélia, meu pai José Geraldo, meus irmãos Danuza, Daniele, Davi, Daniel, minha avó Maria Rocha e minha namorada Rita.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo caminho percorrido até aqui, pela saúde que me proporcionou.

Agradeço à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pela oportunidade oferecida e pelo ambiente de trabalho proporcionado a realização das atividades.

Agradeço à minha orientadora Patrícia Machado de Oliveira pelo apoio, ensinamento, conquistas, dedicação e toda disponibilidade oferecida. Os ensinamentos servirão de aprendizado em toda minha vida, não só no mundo acadêmico, mas também no dia-a-dia, obrigado por tudo.

Agradeço à Professora Roqueline Rodrigues Silva de Miranda, minha “segunda orientadora”, onde teve uma participação enorme no desenvolvimento do meu trabalho, passando ensinamentos de uma excelente professora e pesquisadora, além de uma excepcional pessoa.

Agradeço ao Professor Antônio Flávio Carvalho Alcântara “Tininha”, pela co-orientação deste trabalho.

Ao professor Carlos Victor Mendonça Filho pela colaboração na identificação da espécie que trabalhamos.

Aos professores Cristiane Graef e Paulo Fidêncio, pelo ensinamento através das disciplinas ministradas durante o mestrado, além de Patrícia e Roqueline.

À técnica Vany Ferraz (UFMG), pelo imenso apoio a realização dos cromatogramas, que foram valiosos ao meu trabalho.

À professora Jacqueline Aparecida Takahashi (UFMG) pela colaboração na realização dos testes biológicos.

À professora Nísia Vilela (UFVJM) pela colaboração no empréstimo de equipamentos para realização de alguns testes de atividade antioxidante.

À técnica Tatiana de Andrade Campos do laboratório de orgânica, que foi fundamental no apoio dedicado durante o mestrado.

Aos estagiários Raphael, Maíra, Dalila, Cecília, Fabiana, Maria Cecília, Alysso e meus colegas de mestrado Vinícius e Clináscia pela ajuda incondicional na realização dos trabalhos desenvolvidos, que não foram poucos.

Aos colegas e professores do prédio de Química (UFVJM).

Aos professores do LIPEMVALE que contribuíram de uma forma ou de outra disponibilizando horário para minha pesquisa, no último semestre.

Aos alunos de doutorado da UFMG Geone, Thiago e Isabela pela ajuda em algumas análises espectrométricas.

Ao técnico Ricardo Assis do departamento de química da UFMG pela ajuda incondicional e muito valiosa na elaboração dos espectros de RMN.

Aos amigos da Universidade que deram força e incentivaram nessa caminhada, agradeço a todos, com certeza a ajuda de vocês foi excepcional.

Aos meus amigos e vizinhos que sempre estão presentes em minha vida, vocês são demais.

À minha mãe e meu pai pela incessante busca em querer meu bem, sempre ajudando e estando presente em todas as ocasiões. Com certeza a fé e as orações por eles realizadas foram de extrema grandeza.

Agradeço aos meus irmãos e companheiros Danuza, Daniele, Daniel, Davi, minha avó Maria Rocha e minha namorada Rita pela força depositada em mim, vocês são muito importantes em minhas conquistas.

**OBRIGADO A TODOS DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO!**

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>LISTA DE NOTAÇÕES.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>PLECTRANTHUS NEOCHILUS</i> SCHLTR.....	2
OBJETIVOS.....	4
<b>CAPITULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
1.1 Informações etnobotânicas das espécies pertencentes ao gênero <i>Plectranthus</i> .....	6
1.2 Fitoquímica.....	7
1.2.1 Diterpenóides.....	7
1.2.2 Compostos isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .....	12
1.2.3 Outros compostos encontrados no gênero <i>Plectranthus</i> .....	17
1.3 Atividades biológicas do gênero <i>Plectranthus</i> .....	18
1.3.1 Atividade antioxidante.....	18
1.3.2 Propriedades antimicrobianas.....	19
1.3.3 Atividade anti-inflamatória.....	21
1.3.4 Atividade tóxica.....	21
1.3.5 Antídoto para veneno de escorpião.....	22
1.3.6 Controle de insetos.....	22
1.3.7 Atividades sobre o sistema digestivo.....	23
1.3.8 Outras atividades biológicas.....	24
<b>CAPITULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
2.1 Metodologia.....	25
2.1.1 Planta.....	25
2.1.2 Métodos cromatográficos.....	25
2.1.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	25

2.1.2.2 Cromatografia em coluna (CC).....	25
2.1.2.2.1 Sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh).....	25
2.1.2.2.2 Exclusão em gel utilizando Sephadex LH-20.....	26
2.1.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	26
2.1.2.3.1 Condições de análise.....	26
2.1.3 Reagentes para revelações cromatográficas.....	26
2.1.3.1 Irradiação com luz ultravioleta.....	26
2.1.3.2 Vapores de iodo.....	27
2.1.3.3 Vanilina.....	27
2.1.4 Testes químicos.....	27
2.1.4.1 Teste Liebermam-Burchard.....	27
2.1.5 Ponto de fusão.....	27
2.1.6 Métodos espectrométricos.....	27
2.1.6.1 Infravermelho.....	27
2.1.6.2 RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C.....	27
2.1.6.3 Espectrometria de Massas.....	28
2.2 Preparação dos extratos de <i>P. neochilus</i> Schltr.....	28
2.2.1 Preparação dos extratos das folhas e caules.....	28
2.2.2 Preparação dos extratos das flores.....	29
2.2.3 Elaboração do extrato hexânico de <i>P. neochilus</i> Schltr. (HPN).....	29
2.2.3.1 Fracionamento de R4.....	30
2.2.3.2 Fracionamento da reunião R18.....	31
2.2.3.3 Fracionamento de reunião R29.....	32
2.2.3.4 Fracionamento da reunião R20.....	34
2.2.3.5 Fracionamento da subreunião R19.....	35
2.2.3.6 Fracionamento da subreunião R62.....	36
2.2.3.7 Fracionamento da subreunião R67.....	37
2.2.3.8 Fracionamento em CCS de R76.....	38
2.2.4 Elaboração do extrato em acetato de etila de <i>P. neochilus</i> Schltr. (APN).....	39
2.2.4.1 Fracionamento de R10 proveniente do extrato APN.....	41
2.2.4.2 Fracionamento da subreunião 17.....	42
2.2.5 Obtenção de extratos polares das partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr.....	43
2.2.5.1 Extração ácida (EAA) de <i>P. neochilus</i> .....	43

2.2.5.2 Extração básica (EAB) de <i>P. neochilus</i> .....	43
2.2.5.3 Fracionamento do extrato F4A.....	45
2.2.5.4 Fracionamento de R2 proveniente do extrato F4A.....	46
<b>CAPITULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
3.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.....	47
3.1.1 PN1: $\alpha$ -amirina esterificada.....	47
3.1.2 PN2: Friedelan-3-ona ou friedelina.....	53
3.1.3 PN3: Mistura de sitosterol e estigmasterol.....	63
3.1.4 PN4: 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina).....	64
3.2 Extratos polares de <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.....	72
3.2.1 Avaliação por CLAE da fração rica em Sapogeninas (F1).....	72
3.2.2 Avaliação por CLAE da fração rica em Alcalóides (F2).....	73
3.2.3 Avaliação por CLAE da fração rica em Antocianinas (F3).....	74
3.2.4 Avaliação por CLAE da fração rica em flavonóides (F4).....	76
3.2.4.1 Fracionamento de F4A e análise por CLAE das frações obtidas.....	77
3.2.4.2 Nova tentativa de fracionamento de F4A e análise por CLAE das frações obtidas.....	79
<b>CAPITULO 4 – TESTES BIOLÓGICOS</b> .....	81
4.1 Teste de atividade antioxidante .....	81
4.1.1 Introdução.....	81
4.1.2 Metodologia.....	82
4.1.2.1 Determinação de fenólicos totais.....	82
4.1.2.2 Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH.....	83
4.1.2.3 Determinação do poder redutor (PR).....	83
4.1.3 Resultados e Discussão.....	83
4.1.3.1 Conteúdo de fenólicos totais.....	83
4.1.3.2 Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH e poder reductor (PR).....	85
4.2 Teste de inibição da acetilcolinesterase.....	88
4.2.1 Introdução.....	88

4.2.2 Metodologia.....	89
4.2.2.1 Método de Ellman.....	89
4.2.3 Resultados e Discussão.....	89
<b>CAPÍTULO 5 - DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....</b>	<b>92</b>
5.1 PN1: $\alpha$ -amirina esterificada.....	92
5.2 PN2: Friedelan-3-ona ou Friedelina.....	93
5.3 PN3: Mistura de sitosterol e estigmasterol.....	94
5.4 PN4: 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina).....	95
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE NOTAÇÕES

---

$\delta$  – Deslocamento químico

$\bar{\nu}$  – Número de onda

$\lambda$  – Comprimento de onda

AChE – Acetilcolinestarese

ACTI - Iodeto de acetiltiocolina

CCDS – Cromatografia em camada delgada de sílica

CCPS – Cromatografia em camada preparativa de sílica

CCS – Cromatografia em coluna de sílica gel

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

d – Duplete

dd – duplete duplo

ddd – Duplo duplete duplo

DEPT 135 – *Distortionless enhancement by polarization transfer* – ângulo 135°

DMAPP – Dimetilalila pirofosfato

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

ESI – Ionização por *Spray* de elétrons

EM – Espectro de massas

IPP – Isopentenila pirofosfato

$J$  – Constante de acoplamento escalar

m – Multiplete

MEP – Metileritritol fosfato

MVA - Mevalonato

q – Quarteto

R<sub>f</sub> – Fator de retenção

s – Simpleto

t – Tripleto

US - Ultrassônico

<b>LISTA DE TABELAS</b>	Pág.
<b>TABELA 2.1</b> Fracionamento do extrato hexânico das folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr. (HPN)	29
<b>TABELA 2.2</b> Reunião das frações obtidas por CCDS do extrato de HPN	30
<b>TABELA 2.3</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R4	30
<b>TABELA 2.4</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R4	31
<b>TABELA 2.5</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R18	32
<b>TABELA 2.6</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R18	32
<b>TABELA 2.7</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R29	33
<b>TABELA 2.8</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R29	33
<b>TABELA 2.9</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R20	34
<b>TABELA 2.10</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R20	34
<b>TABELA 2.11</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R19	35
<b>TABELA 2.12</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R19	35
<b>TABELA 2.13</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R62	36
<b>TABELA 2.14</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R62	37
<b>TABELA 2.15</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R67	37
<b>TABELA 2.16</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R67	38
<b>TABELA 2.17</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica extrato APN	40
<b>TABELA 2.18</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de APN	40
<b>TABELA 2.19</b> Frações obtidas da cromatografia em coluna de sílica de R10	41

---

<b>TABELA 2.20</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R10	41
<b>TABELA 2.21</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em Sephadex LH-20 de F4A	46
<b>TABELA 2.22</b> Reunião das frações provenientes do fracionamento em Sephadex LH-20 de R2	46
<b>TABELA 3.1</b> Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN1 com dados da literatura	52
<b>TABELA 3.2</b> Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ de PN2 com dados da literatura	58
<b>TABELA 3.3</b> Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ de PN3 com dados da literatura	63
<b>TABELA 3.4</b> Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN4 com dados da literatura	71
<b>TABELA 4.1</b> Rendimento dos extratos e conteúdos de fenólicos totais em extratos de <i>P. neochilus</i> Schltr.	84
<b>TABELA 4.2</b> DPPH e poder redutor (PR) dos extratos da parte aérea e flores de <i>P. neochilus</i> Schltr.	86
<b>TABELA 4.3</b> Extratos utilizados e Rf's dos pontos de inibição no teste de atividade com a enzima acetilcolinesterase	90

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1</b> Partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – aspecto do crescimento.	2
<b>FIGURA 2</b> Folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr. cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto das folhas	3
<b>FIGURA 3</b> Tricomas encontrados em <i>P. neochilus</i> Schltr.: 1- tricoma capitado com pedúnculo longo, 2 - tricoma capitado com pedúnculo curto, 3 - tricoma peltado, 4 - tricoma não-glandular, 5 - tricomas na inflorescência, 6 - tricomas no limbo foliar. <i>Fonte:</i> (1, 2, 3, 4).	3
<b>FIGURA 4</b> Partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto da inflorescência.	4
<b>FIGURA 1.1</b> Esquema de biossíntese das unidades isoprênicas IPP e DMAPP provenientes da via do mevalonato.	8
<b>FIGURA 1.2</b> Esquema de biossíntese das unidades isoprênicas IPP e DMAPP provenientes do metileritritol fosfato (MEP), oriundo de unidades de piruvato e gliceraldeído-3P.	9
<b>FIGURA 1.3</b> Esquema de formação das classes de terpenos via condensação de unidades de cinco carbonos (unidades isoprênicas).	10
<b>FIGURA 1.4</b> Esquema de biossíntese dos principais esqueletos diterpênicos encontrados no gênero <i>Plectranthus</i> .	11
<b>FIGURA 1.5</b> Diterpenóides, tipo roileanonas isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .	13
<b>FIGURA 1.6</b> Diterpenóides, tipo acil-hidroquinonas isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .	14
<b>FIGURA 1.7</b> Diterpenóides, tipo espirocoleonas e quinonametídeos isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .	14
<b>FIGURA 1.8</b> Diterpenóides, tipo abietano 6,20-epoxiabietanóides e abietanóides diméricos isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .	15
<b>FIGURA 1.9</b> Diterpenóides, tipo abietanos primaranos isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> .	16
<b>FIGURA 1.10</b> Outros compostos isolados de espécies <i>Plectranthus</i> .	16
<b>FIGURA 1.11</b> Triterpenos, flavonas e ácidos graxos isolados de espécies <i>Plectranthus</i> .	17

---

<b>FIGURA 2.1</b> Esquema ilustrativo do processo de preparação dos extratos das folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr..	28
<b>FIGURA 2.2</b> Esquema de investigação fitoquímica do extrato hexânico obtido das folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr..	39
<b>FIGURA 2.3</b> Esquema do estudo fitoquímico conduzido com o extrato em acetato de etila das folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr..	42
<b>FIGURA 2.4</b> Esquema de partição dos extratos das folhas e caules e das flores de <i>P. neochilus</i> Schltr. para obtenção de frações ricas nas classe de compostos polares saponinas, alcalóides, antocianinas, açúcares, ácidos e flavonóides.	45
<b>FIGURA 3.1</b> Espectro de absorção na região do IV de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) (NaCl).	47
<b>FIGURA 3.2</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	48
<b>FIGURA 3.3</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	49
<b>FIGURA 3.4</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	49
<b>FIGURA 3.5</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).	50
<b>FIGURA 3.6</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).	50
<b>FIGURA 3.7</b> Subespectro DEPT-135 de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).	51
<b>FIGURA 3.8</b> Espectro de absorção na região do IV de PN2 (Friedelina) (KBr).	53
<b>FIGURA 3.9</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PN2 (Friedelan-3-ona ou friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	54
<b>FIGURA 3.10</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PN2 (Friedelan-3-ona ou friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	55
<b>FIGURA 3.11</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN2 (Friedelan-3-ona ou friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	56
<b>FIGURA 3.12</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PN2 (Friedelan-3-ona ou friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	56
<b>FIGURA 3.13</b> Subespectro DEPT-135 de PN2 (Friedelan-3-ona ou friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).	59

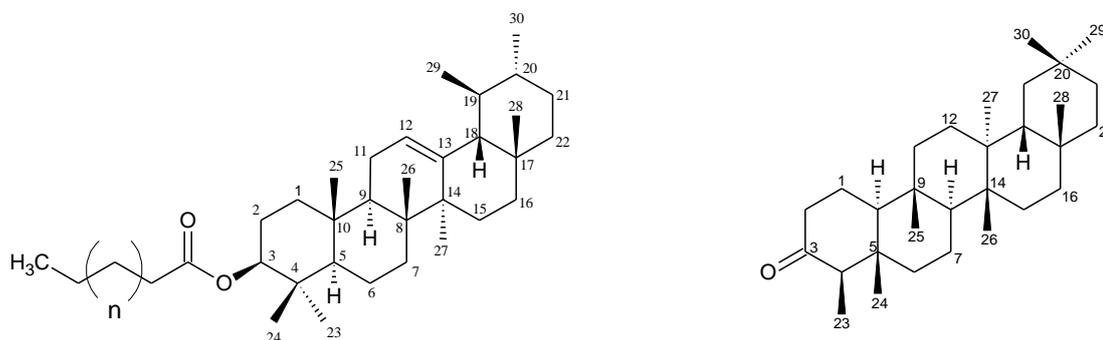
- FIGURA 3.14** Espectro de absorção na região do IV de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) (KBr). 60
- FIGURA 3.15** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz). 61
- FIGURA 3.16** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz). 61
- FIGURA 3.17** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz). 62
- FIGURA 3.18** Subespectro DEPT-135 de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz). 62
- FIGURA 3.19** Cromatograma obtido por CLAE do composto PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona). 64
- FIGURA 3.20** Espectro de ESI do composto PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona). 65
- FIGURA 3.21** Espectro de absorção na região do IV de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) (KBr). 66
- FIGURA 3.22** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 67
- FIGURA 3.23** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 67
- FIGURA 3.24** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 68
- FIGURA 3.25** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 69
- FIGURA 3.26** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 69
- FIGURA 3.27** Subespectro DEPT de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 70
- FIGURA 3.28** Expansão do subespectro DEPT de PN4 (4',5-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ ; 200 MHz). 70
- FIGURA 3.29** Cromatograma obtido por CLAE para fração F1A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. 72
- FIGURA 3.30** Cromatograma obtido por CLAE para fração F1F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. 73

- FIGURA 3.31** Cromatograma obtido por CLAE para fração F2A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. 73
- FIGURA 3.32** Cromatograma obtido por CLAE para fração F2F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. 74
- FIGURA 3.33** Cromatograma obtido por CLAE para fração F3A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. 75
- FIGURA 3.34** Cromatograma obtido por CLAE para fração F3F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. 75
- FIGURA 3.35** Cromatograma obtido por CLAE para fração F4A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. 76
- FIGURA 3.36** Cromatograma obtido por CLAE para fração F4F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. 77
- FIGURA 3.37** Cromatograma obtido por CLAE para R1 proveniente da fração F4A. 78
- FIGURA 3.38** Cromatograma obtido por CLAE para R3 proveniente da fração F4A. 78
- FIGURA 3.39** Cromatograma obtido por CLAE para a subreunião R5 proveniente do fracionamento de R2. 79
- FIGURA 3.40** Cromatograma obtido por CLAE de R5 e comparação com os flavonóides rodanina, rutina, quercetina, naringenina e camferol respectivamente. 80
- FIGURA 3.41** Espectro de massas ESI (modo negativo) da subreunião R5, proveniente de R2. 80
- FIGURA 4.1** Curva de regressão linear do ácido gálico nas concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. 84
- FIGURA 4.2** Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos da parte aérea de *P. neochilus* Schltr.. 87
- FIGURA 4.3** Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos das flores de *P. neochilus* Schltr. 87
- FIGURA 4.4** Poder redutor dos extratos de *P. neochilus* Schltr. 88
- FIGURA 4.5** Placas de CCD mostrando as manchas de inibição da enzima acetilcolinesterase. 91

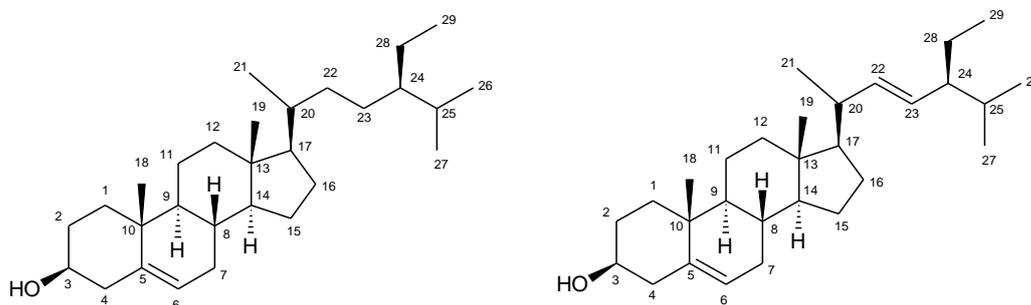
## RESUMO

O trabalho apresentado nesta dissertação descreve o estudo fitoquímico e de atividade biológica das folhas e caules e flores de *Plectranthus neochilus* Schltr., espécie pertencente à família Lamiaceae. A planta é uma erva aromática conhecida popularmente no Brasil como “boldo” ou “boldo-gambá”, e assim como as espécies *P. barbatus* Andrews (“boldo-brasileiro”) e *P. ornatus* Codd. (“boldinho”), tem o chá de suas folhas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia, em substituição a *Peumus boldus* Molina (“boldo-do-chile”).

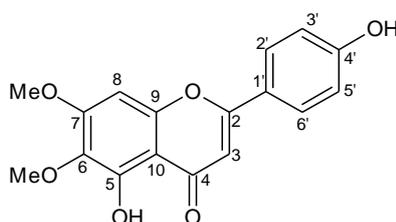
O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* forneceu dois triterpenos:  $\alpha$ -amirina (PN1) e friedelina (PN2). PN1 foi isolada como um éster de ácido graxo ligado na posição C-3. Deste extrato foi obtida também a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol (PN3). O estudo fitoquímico conduzido com o extrato em acetato de etila das folhas e caules forneceu a flavona metoxilada nas posições C-6 e C-7, a cirsimartina (PN4).

PN1:  $\alpha$ -amirina esterificada

PN2: Friedelina



PN3: Mistura sitosterol e estigmasterol



PN4: 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimartina)

Todos os compostos obtidos foram descritos pela primeira vez na espécie. A elucidação estrutural dos compostos isolados, baseou-se na análise espectroscópica de RMN 1D, CLAE, ESI e por comparação com dados encontrados na literatura.

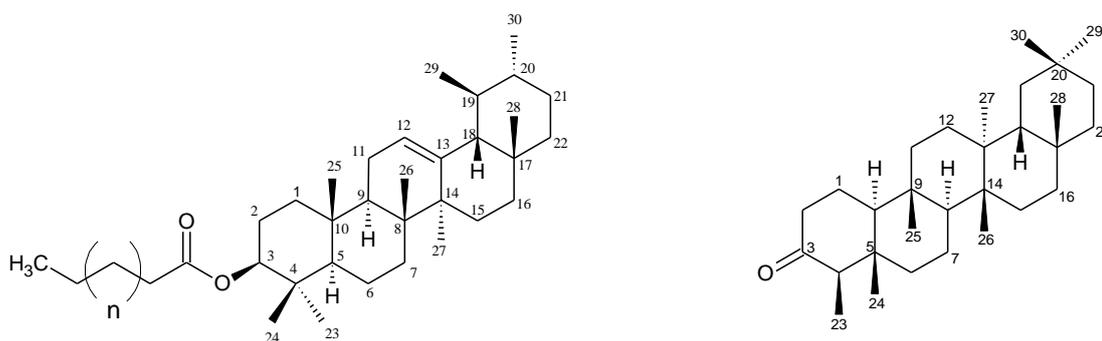
O extrato metanólico das folhas e caules de *P. neochilus* mostrou significativa atividade antioxidante quando avaliado pelo método de DPPH, seguido pelo extrato em acetato de etila e hexânico. Foi avaliado também o extrato metanólico das flores da espécie, que apresentou atividade inferior aquele observado para o extrato metanólico das folhas e caule, sendo estas atividades confirmadas pelo conteúdo fenólico dos extratos.

A atividade anticolinesterásica dos extratos das folhas e caules e das flores de *P. neochilus* foi avaliada, sendo observada a inibição da enzima acetilcolinesterase para todos os extratos pesquisados.

## ABSTRACT

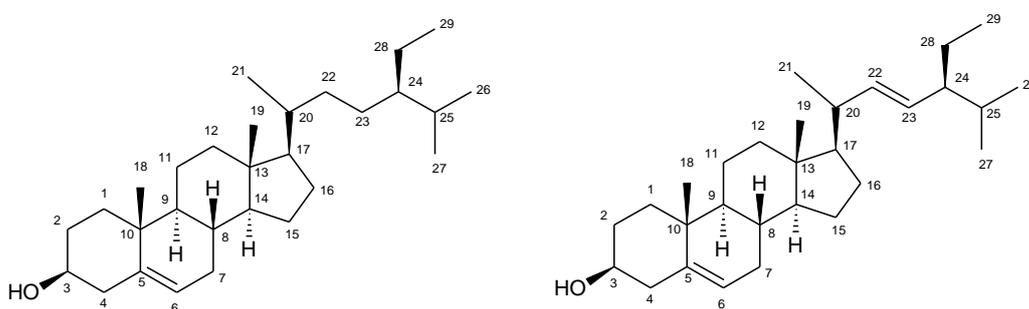
The present work describes the phytochemical and pharmacological investigation on extracts of the leaves and stems and flowers of the species *Plectranthus neochilus* Schltr. belonged to the family Lamiaceae. The plant is aromatic herb popularly known in Brazil as “boldo” or “boldo-gambá”, and as the species *P. barbatus* Andrews (“boldo-brasileiro”) e *P. ornatus* Codd. (“boldinho”), according to ethnopharmacological survey, is often used in the treatment of hepatic insufficiency and dyspepsia, replacing the *Peumus boldus* Molina (“boldo-do-chile”).

The phytochemical investigation of the hexanic extract of the *P. neochilus* leaves and stems yielded two triterpenes:  $\alpha$ -amyrin (PN1) e friedelin (PN2). The compound  $\alpha$ -amirin was isolated as a fatty acid ester in position C-3. In this extract was also obtained the mixture of the steroids sitosterol and stigmasterol (PN3). The phytochemical study conducted with the ethyl acetate extract of the leaves and stems gave the methoxy flavone at positions C-6 and C-7, the cirsimartin (PN4).

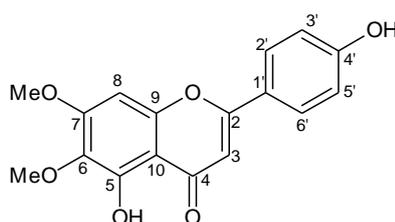


PN1:  $\alpha$ -amyrin fatty ester

PN2: Friedelin



PN3: Mixture sitosterol and stigmasterol



PN4: 5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (cirsimartin)

All compounds obtained were first described in the species. Structural elucidation of isolated compounds was based on spectroscopic analysis of 1D NMR, HPLC, ESY and by comparison with data found in literature.

The methanol extract of leaves and stems of *P. neochilus* showed significant antioxidant activity when evaluated by the DPPH method, followed by the extract in ethyl acetate and hexane. We also evaluate the methanol extract of flowers of the species that showed activity lower than that observed for the methanolic extract from leaves and stems, and these activities confirmed for the content of phenolic extracts.

The anticholinesterase activity of extracts of leaves and stems and flowers of *P. neochilus* was evaluated and found to inhibit the enzyme acetylcholinesterase to all extracts studied.

## INTRODUÇÃO

---

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Em algumas regiões, os medicamentos tradicionais feitos de plantas são muitas vezes a única fonte disponível e acessível para o tratamento de várias doenças (KAVITHA *et al.*, 2010).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez em 1890 por H. Joachin e encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II. Porém, pertence à época da XVIII dinastia egípcia que reinou entre 1550 a.C. e 1295 a.C. (PINTO *et al.*, 2002). Muitas sociedades tradicionais ou autóctones possuem uma vasta farmacopéia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais ocupados por estas populações ou cultivados em ambientes alterados antropicamente (AMOROZO, 2002).

O gênero *Plectranthus*, pertencente à família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae), representa uma valiosa reunião de plantas com atividades biológicas, utilizadas comumente na medicina tradicional para diversos fins. Os usos populares dessas espécies incluem tratamentos de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatite, alergias e picadas de inseto e de escorpião e como agente anti-séptico. As plantas do gênero são também uma importante fonte de novos compostos bioativos e potenciais medicamentos. Várias espécies de *Plectranthus* são cultivadas também como tubérculos comestíveis, condimentos e plantas ornamentais. As plantas são ainda importantes fontes de óleos essenciais (ASCENSÃO *et al.*, 1999), utilizados amplamente em preparações farmacêuticas, em perfumaria e cosméticos (ASCENSÃO *et al.*, 1998). Atualmente, cerca de 62 espécies do gênero *Plectranthus* são utilizadas em todo o mundo para fins medicinais ou ornamentais, juntamente com uma rica diversidade de usos etnobotânicos (WALDIA *et al.*, 2011). Os principais aspectos etnobotânicos, farmacológicos e químicos do gênero são abordados no Capítulo 1 desta dissertação (pág. 7).

Dentre as espécies medicinais quimicamente inéditas do gênero, tem-se *Plectranthus neochilus* Schltr. (descrição botânica pág. 3), que é uma erva aromática usada na medicina popular para tratamento de insuficiência hepática e dispepsia (DUARTE *et al.*, 2007). As suas folhas frescas apresentam um odor distinto e são usadas como infusão ou extrato aquoso para

fins de cura em seu uso popular (LORENZI *et al.*, 2002). No Brasil a planta é conhecida popularmente como “boldo” ou “boldo-gambá” e, assim como as espécies *P. barbatus* Andrews (“boldo-brasileiro”) e *P. ornatus* Codd. (“boldinho”), tem o chá de suas folhas utilizadas em substituição ao *Peumus boldus* Molina (“boldo-do-chile”).

### **DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *PLECTRANTHUS NEOCHILUS* SCHLTR.**

*P. neochilus* é uma planta perene ou, por vezes, anual, prostrada e ereta, geralmente muito ramificada e densa, erva suculenta medindo de 0,12-0,5 m de altura, galhos moderados a densamente viloso; raízes tuberosas (CODD, 1985) (FIGURA 1).

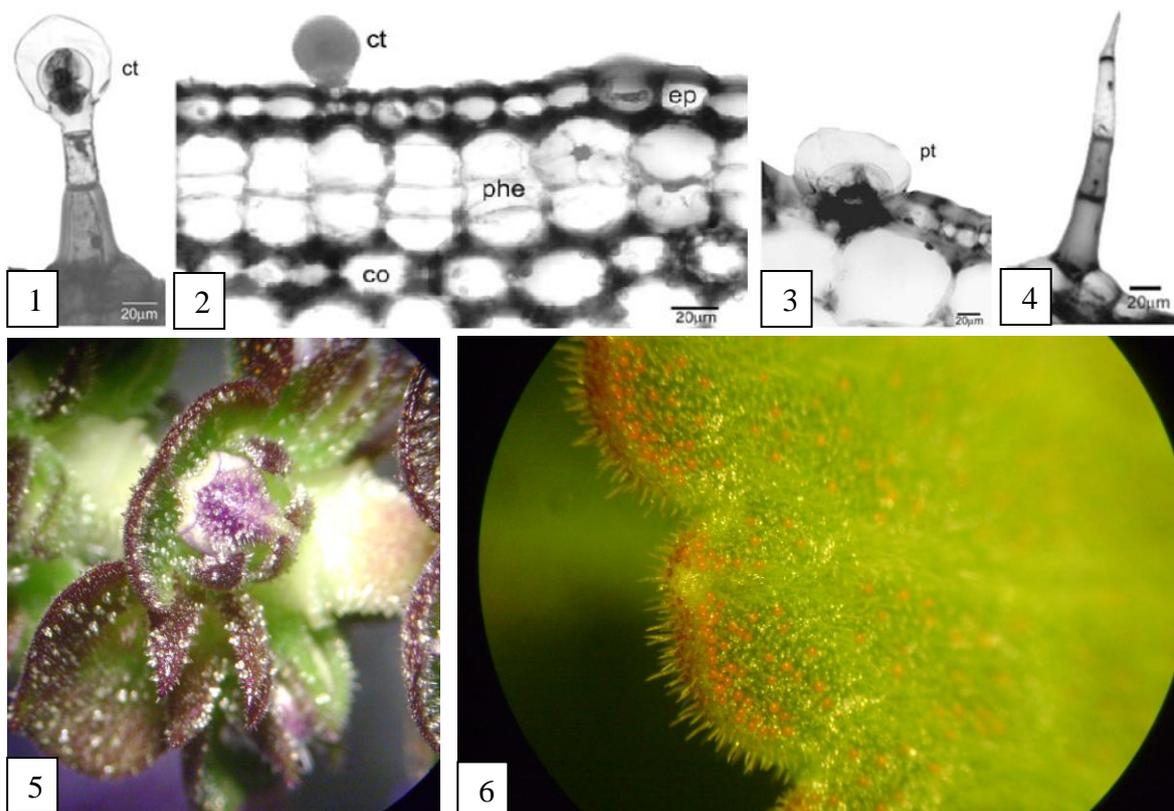


**FIGURA 1** Partes aéreas de *P. neochilus* Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – aspecto do crescimento.

As folhas pecioladas apresentam lâminas suculentas, geralmente viscosa, tendendo a dobrar ao longo da nervura central, obovadas a elíptico ovais, 20-50 x 15-35 mm, pubescente, com glândulas laranja sob a superfície, ápice obtuso, base cuneada a atenuada, margem com alguns dentes; pecíolo 5-15 mm de comprimento (CODD, 1985) (FIGURA 2, pág. 3). Em *P. neochilus* são encontrados alguns tipos de tricomas (FIGURA 3, pág. 3), sendo estes tecidos do ponto de vista funcional, produtores de óleos essenciais que são responsáveis pela proteção contra herbívoros e patógenos, bem como na atração de polinizadores em partes florais (DUARTE *et al.*, 2007).



**FIGURA 2** Folhas e caules de *P. neochilus* Schltr. cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto das folhas.



**FIGURA 3** Tricomas encontrados em *P. neochilus* Schltr.: 1- tricoma capitado com pedúnculo longo, 2 - tricoma capitado com pedúnculo curto, 3 - tricoma peltado, 4 - tricoma não-glandular, 5 - tricomas na inflorescência, 6 - tricomas no limbo foliar. *Fonte:* (1, 2, 3, 4) DUARTE *et al.*, 2007.

Inflorescência terminal tipo racemo 70-150 mm de comprimento, brácteas formando ângulo 25° apical coma, esverdeada com ponta roxa, decídua precoce; flores em 3 sesséis, formando verticilos de seis flores, verticilos densos acima, flexíveis e 5-15 mm a parte

inferior; pedicelos ereto. Cálice 6 mm de comprimento em frutos, similar a *P. tetensis*. Corola malva roxa, 12-20 mm de comprimento; tubo ligeiramente geniculado sobre o meio e expandido para a garganta; lábio superior branco azulado, 2 mm de comprimento; lábio inferior em forma de barco, 8-11 mm de comprimento. Estames 8-11 mm de comprimento, unidos na base de 2-3 mm (CODD, 1985) (FIGURA 4).



**FIGURA 4** Partes aéreas de *P. neochilus* Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto da inflorescência.

## OBJETIVOS

A presente dissertação descreve o estudo fitoquímico da espécie vegetal *P. neochilus*, quimicamente inédita, utilizada tradicionalmente para fins medicinais e amplamente difundida

---

no Brasil, assim como a avaliação da atividade biológica dos extratos da planta. Para tal, os objetivos de investigação propostos foram o estudo fitoquímico via fitoquímica clássica, realizar a elucidação estrutural das substâncias isoladas, utilizando as técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e fragmentação por CG-EM e avaliar as atividades antioxidante e anticolinesterase dos extratos das folhas e caules e das flores de *P. neochilus*.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA**

---

*Plectranthus* L'Hér., pertencente à família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae), é um grande gênero contendo aproximadamente 350 espécies de ervas e arbustos perenes nativas de regiões tropicais da África, Ásia e Austrália (CODD, 1985). Taxonomicamente, as espécies *Coleus* Lour. são relacionadas a *Plectranthus* e classificadas geralmente como *Plectranthus* ou *Solenostemon* Thonn., ocasionando, muitas vezes, dificuldades em torno da distinção dessas espécies (ABDEL-MOGIB *et al.*, 2002). O nome *Plectranthus* vem das palavras grega *plektron* (esporão) e *anthos* (flor), sendo seu significado devido as flores apresentarem um esporão em sua base (WALDIA *et al.*, 2011).

Várias espécies *Plectranthus* são cultivadas como tubérculos comestíveis, condimentos, fragrâncias para xampus, plantas ornamentais ou como fontes de óleos essenciais (ASCENSÃO *et al.*, 1999), que são utilizados amplamente em preparações farmacêuticas, em perfumaria e cosméticos (ASCENSÃO *et al.*, 1998). Alguns extratos são utilizados também como componentes de preparações cosméticas patenteadas como anti-sinais (OKAMOTO *et al.*, 2005), e produtos para a estimulação do crescimento capilar (KANEDA *et al.*, 2005). O gênero *Plectranthus* é também uma importante fonte de novos compostos bioativos e potenciais medicamentos.

Estudos taxonômicos, farmacológicos e fitoquímicos sobre o gênero *Plectranthus* têm sido conduzidos desde 1963. Uma coletânea das informações químicas sobre esse gênero (com dados até 1999) pode ser encontrada nos trabalhos desenvolvidos por Abdel-Mogib e colaboradores (2002) e, posterior a esta data, até 2005, por Oliveira (2006).

### **1.1 Informações etnobotânicas das espécies pertencentes ao gênero *Plectranthus***

Para as espécies *P. barbatus* e *P. amboinicus* são descritos os mais diversos usos populares. A estas duas espécies são atribuídos 68% de todos os usos tradicionais descritos para o gênero, em uma gama de doenças (LUKHOBÁ *et al.*, 2006). As diversas utilizações das espécies de *Plectranthus* na medicina tradicional incluem tratamentos de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatite, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente anti-séptico (ASCENSÃO *et al.*, 1998 e 1999). Desordens do sistema digestivo são tratadas usando 21 espécies de *Plectranthus*, dentre elas: *P. barbatus*, *P. amboinicus*, *P. laxiflorus*, *P. esculentus* e *P. vettiveroides*. As espécies *P. barbatus* e *P. amboinicus* são empregadas ainda

no tratamento de infecções bucais, carminativas, purgativas e anti-helmínticas (LUKHOBBA *et al.*, 2006).

A espécie *P. barbatus* é uma das espécies mais importantes deste gênero, sendo identificado por vários sinônimos, tais como *P. forskohlii* Briq., *P. forskolli* Willd., *P. kilimandschari* (Gurke) H. L., *P. grandis* (Cramer) R. H. Willemse, *Coleus forskohlii* Briq., *Coleus kilimandschari* Gurke ex Engl., *Coleus coerulescens* Gurke, *Coleus comosus* A. Rich. e *Coleus barbatus* (Andr.) Benth. (ALASBAHI *et al.*, 2010). Em *P. barbatus* são descritos vários metabólitos secundários com propriedades biológicas comprovadas (ALBURQUEQUE *et al.*, 2007).

A espécie *P. amboinicus* Lour., muito utilizada no norte do Brasil é conhecida como “malvarisco” ou “hortelã-grande” e indicada para afecções odontológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Na medicina caseira, é utilizada para dores de garganta, tosse, bronquite e para o alívio de inflamações ovarianas e uterinas (MATOS *et al.*, 1988).

Tradicionalmente, outras espécies são utilizadas também para tratar dor de garganta e resfriados, o que pode estar relacionado às altas concentrações de óleo essencial presentes nestas plantas (MWANGI *et al.*, 2006).

## 1.2 Fitoquímica

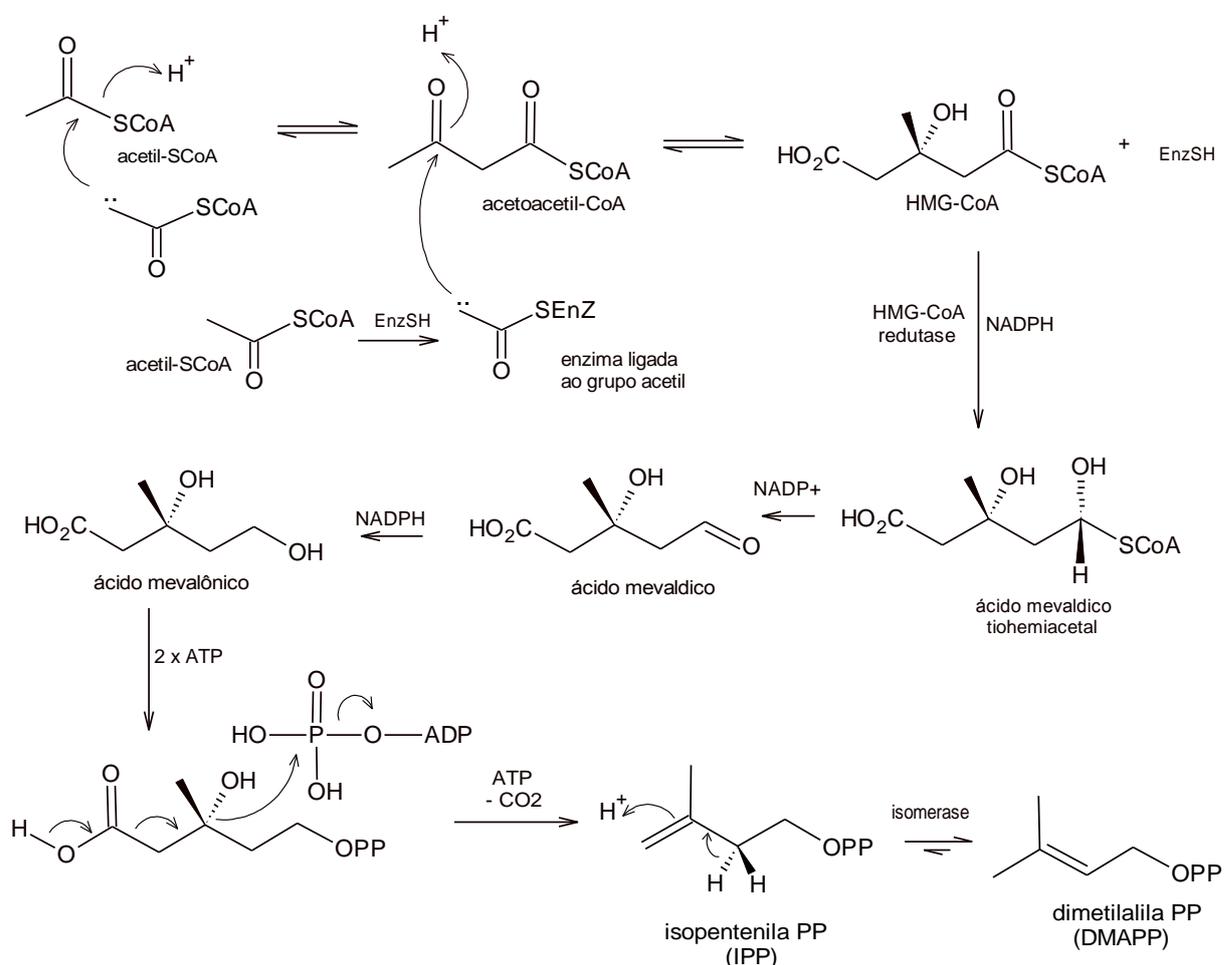
Estudos químicos das espécies de *Plectranthus* são descritos desde a década de 60. Até o momento, foram identificados mais de 200 compostos isolados das espécies do gênero, sendo os diterpenóides os principais metabólitos secundários presentes.

### 1.2.1 Diterpenóides

Os diterpenos formam uma classe de metabólitos secundários que apresentam uma grande variedade estrutural. Estas substâncias são encontradas em angiospermas, principalmente nas famílias Asteraceae e Lamiaceae, sendo esta última a que se encontra o gênero *Plectranthus* (WALDIA *et al.*, 2011).

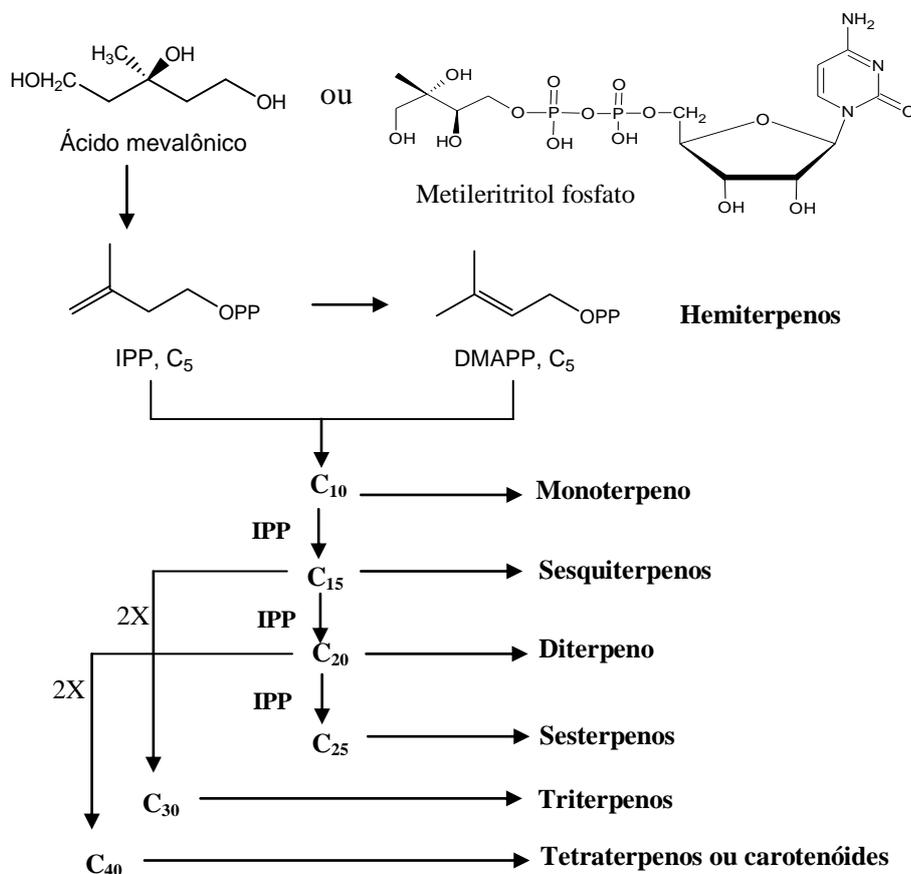
Os diterpenos, assim como os demais terpenos, eram considerados tradicionalmente como derivados do 2-metil-butadieno (C<sub>5</sub>: isopreno). Entretanto, estudos de biossíntese demonstram que um dos precursores dos terpenos é o ácido mevalônico (MVA), proveniente da condensação aldólica de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA) (FIGURA 1.1, pág. 8). Recentemente, através de estudos biossintéticos mais detalhados, descobriu-se que, em

certos organismos como as plantas, alguns terpenos são, na verdade, provenientes do metileritritol fosfato (MEP), oriundo de unidades de piruvato e gliceraldeído-3P (FIGURA 1.2, pág. 9). Os mamíferos possuem apenas a via do MVA, enquanto que plantas biossintetizam terpenos através do MVA e do MEP. Em todo caso, MEP e/ou MVA irão originar duas importantes unidades C5 que são os precursores imediatos dos terpenos: isopentenila pirofosfato (IPP) e dimetilalila pirofosfato (DMAPP) (DEWICK, 2002). Os intermediários IPP e DMAPP ligam-se através do modelo "cabeça-cauda" para formar unidades maiores. Em qualquer caso, a divisão das estruturas químicas dos terpenos em unidades de isopreno (C5) é muito útil e se utiliza com bastante frequência por ser bastante didática (FIGURA 1.3, pág. 10).



**FIGURA 1.1** Esquema de biossíntese das unidades isoprênicas IPP e DMAPP provenientes da via do mevalonato.

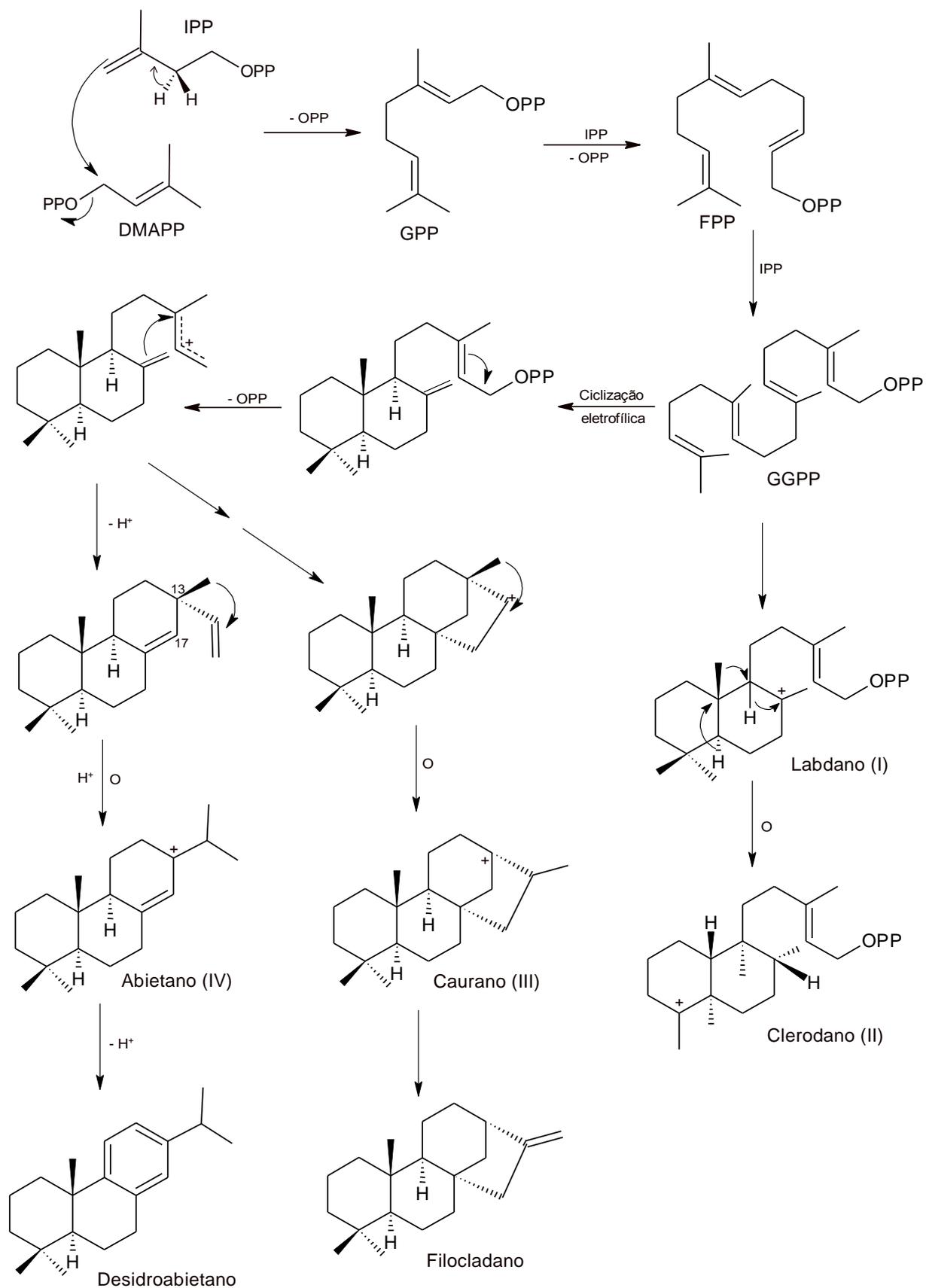




**FIGURA 1.3** Esquema de formação das classes de terpenos via condensação de unidades de cinco carbonos (unidades isoprênicas).

A condensação de Claisen de unidades C<sub>5</sub> de DMAPP e IPP, via a enzima prenil transferase, forma o intermediário pirofosfato de geranila (GPP, C<sub>10</sub>), que ao condensar com outra unidade de IPP, fornece o pirofosfato de farnesila (FPP, C<sub>15</sub>). Por último, a condensação de FPP com outra unidade de IPP, leva a formação do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP, C<sub>20</sub>), precursor dos diterpenos. Ciclizações de GGPP via formação de diferentes carbocátions e rearranjos Wagner-Meerwein conduzem as variações estruturais dos diterpenos isolados (DEWICK, 2002) (FIGURA 1.4, pág. 11).

Alguns dos esqueletos diterpênicos, encontrados frequentemente em espécies de *Plectranthus*, são o labdano (I), clerodano (II), caurano (III) e abietano (IV), conforme mostrados na FIGURA 1.4, pág. 11.



**FIGURA 1.4** Esquema de biossíntese dos principais esqueletos diterpênicos encontrados no gênero *Plectranthus*.

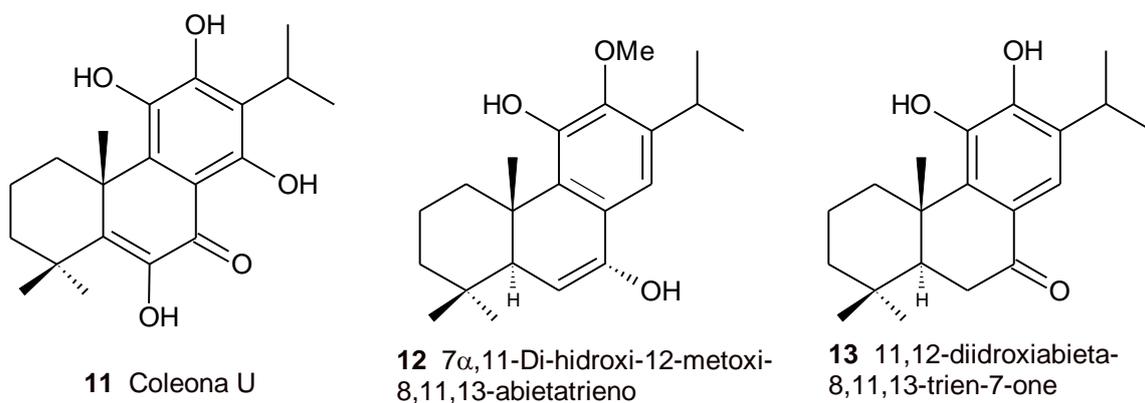
### 1.2.2 Compostos isolados das espécies de *Plectranthus*

Diterpenóides são compostos predominantes em *Plectranthus*, com aproximadamente 170 identificados nas espécies do gênero. A maioria dos compostos identificados é do tipo abietanóides altamente modificados, podendo ser sub-classificados, de acordo com a variação estrutural apresentada, como roileanonas (**1 a 10**) (FIGURA 1.5, pág. 13), acil-hidroquinonas (**11 a 13**) (FIGURA 1.6, pág. 14), espirocoleonas (**14**) e quinonametídeos (**15 a 17**) (FIGURA 1.7, pág. 14), 6,20-epoxiabietanóides (**18**) (TIBOR *et al.*, 2004), abietanóides diméricos (**19 a 22**) (FIGURA 1.8, pág. 15) e abietanóides primaranos (**23 e 24**, FIGURA 1.9, pág. 16) (STAVRI *et al.*, 2009). Vale ressaltar que vários dos abietanóides isolados do gênero *Plectranthus* e *Coleus* são substâncias de interesse farmacológico (GASPAR-MARQUES *et al.*, 2005).

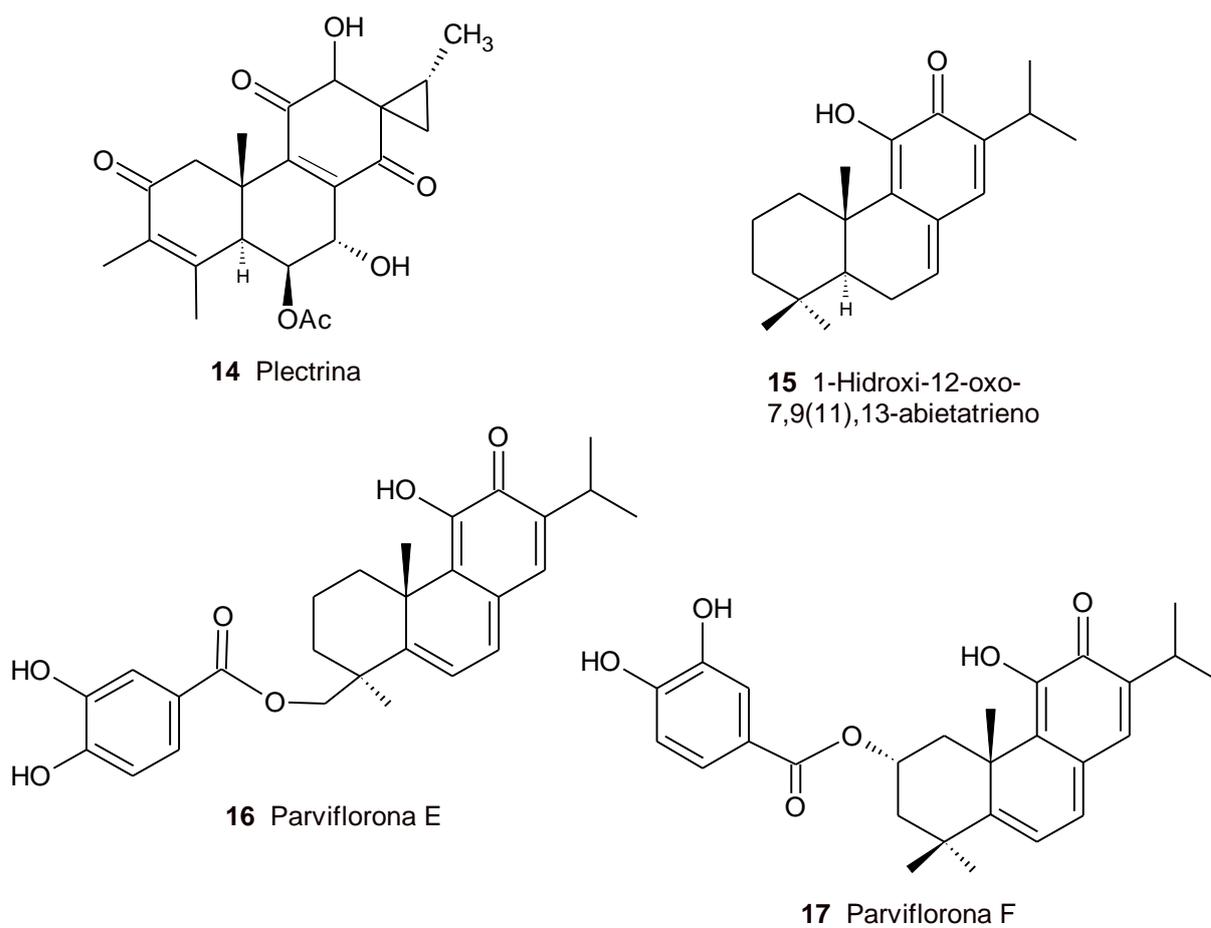
Os diterpenóides labdanos são também uma importante classe de substâncias bioativas presentes no gênero *Plectranthus*, descritos em algumas espécies como *P. barbatus*, *P. fruticosus* e *P. ornatus* (LUCHOBA *et al.*, 2006). Para a espécie *P. barbatus*, são descritos 68 diterpenóides. Destes, 25 são pertencentes à classe dos abietanos e 43 a dos labdanos (ALASBAHI *et al.*, 2010), sendo a China e a Índia os países responsáveis pelo isolamento da maioria destes compostos. A forskolina (**25**, FIGURA 1.10, pág. 16) é um exemplo de diterpenóide labdano, encontrado em *P. barbatus*. Forskolina tem demonstrado que é capaz de relaxar o músculo liso das vias aéreas em cobaias *in vitro* e *in vivo*, bem como de bronquíolos de ovinos (CHANG *et al.*, 1984; YOUSIF *et al.*, 2000). Em uma clínica, o estudo com crianças e adultos, que tomaram cápsulas de forskolina por via oral a 10 mg por dia, foram mais eficaz do que cromoglicato de sódio (duas inalações a cada 8 h, três vezes por dia) em prevenção a ataques de asma em pacientes com asma persistente leve ou asma persistente moderada (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006). O fato de que a forskolina ativa diretamente a adenil ciclase e, portanto, aumenta os níveis de AMPc é considerado como o mecanismo de ação que justifica os diversos efeitos farmacológicos da forskolina e o uso de *P. barbatus* para o tratamento de distúrbios digestivos, pois o aumento de AMPc estimula a secreção gástrica (LUCHOBA *et al.*, 2006).

Outros diterpenos isolados no gênero *Plectranthus* incluem filocladanos tetracíclicos (ou 13- $\beta$ -cauranos) e derivados caurânicos, como a camebacaurina (**26**, FIGURA 1.10, pág. 16). Diterpenóides caurânicos foram identificados em um grande número de plantas medicinais e são utilizados no tratamento de inflamações e câncer (LEE *et al.*, 2002).

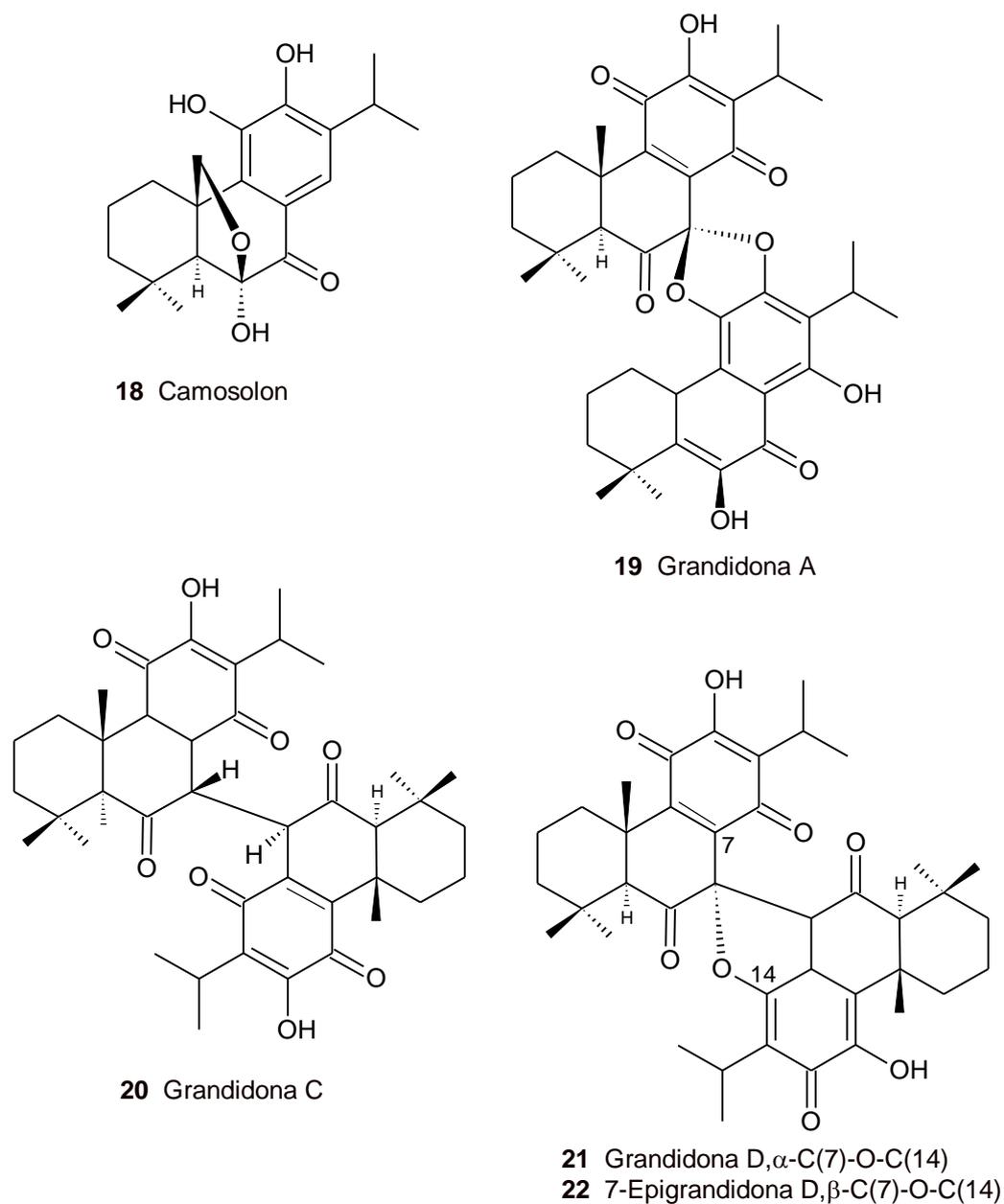




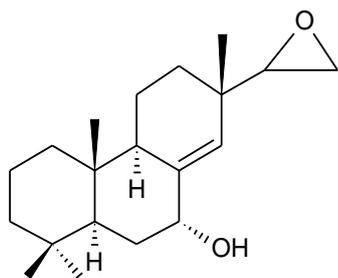
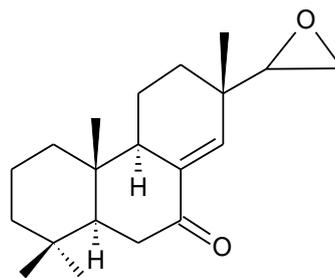
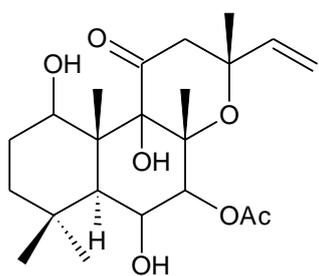
**FIGURA 1.6** Diterpenóides tipo acil-hidroquinonas isolados das espécies de *Plectranthus*.



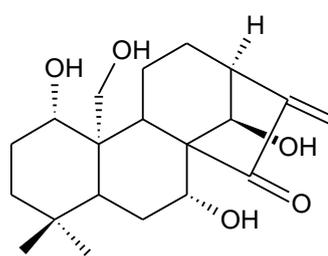
**FIGURA 1.7** Diterpenóides tipo espirocoleonas e quinonametóides isolados das espécies de *Plectranthus*.



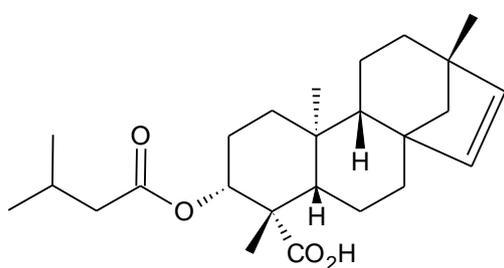
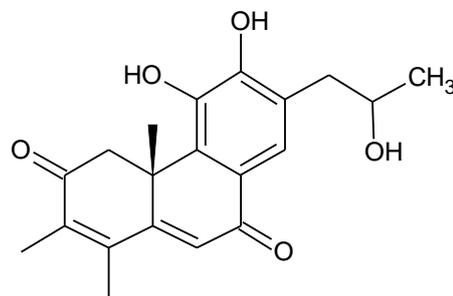
**FIGURA 1.8** Diterpenóides tipo abietano 6,20-epoxiabietanóides e abietanóides diméricos isolados das espécies de *Plectranthus*.

23 *rel*-15(Z),16-Epoxi-7 $\alpha$ -hidroxipimar-8,14-ene24 *rel*-15(Z),16-Epoxi-7-oxopimar-8,14-ene**FIGURA 1.9** Diterpenóides tipo abietanos primaranos isolados das espécies de *Plectranthus*.

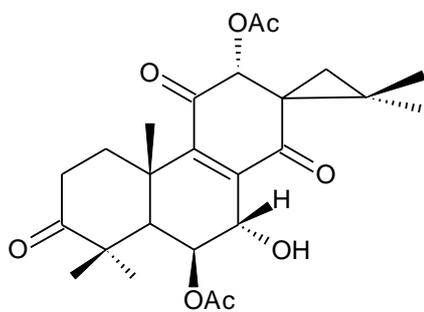
25 Forskolina



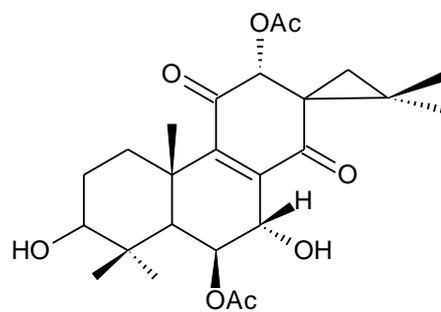
26 Camebacaurina

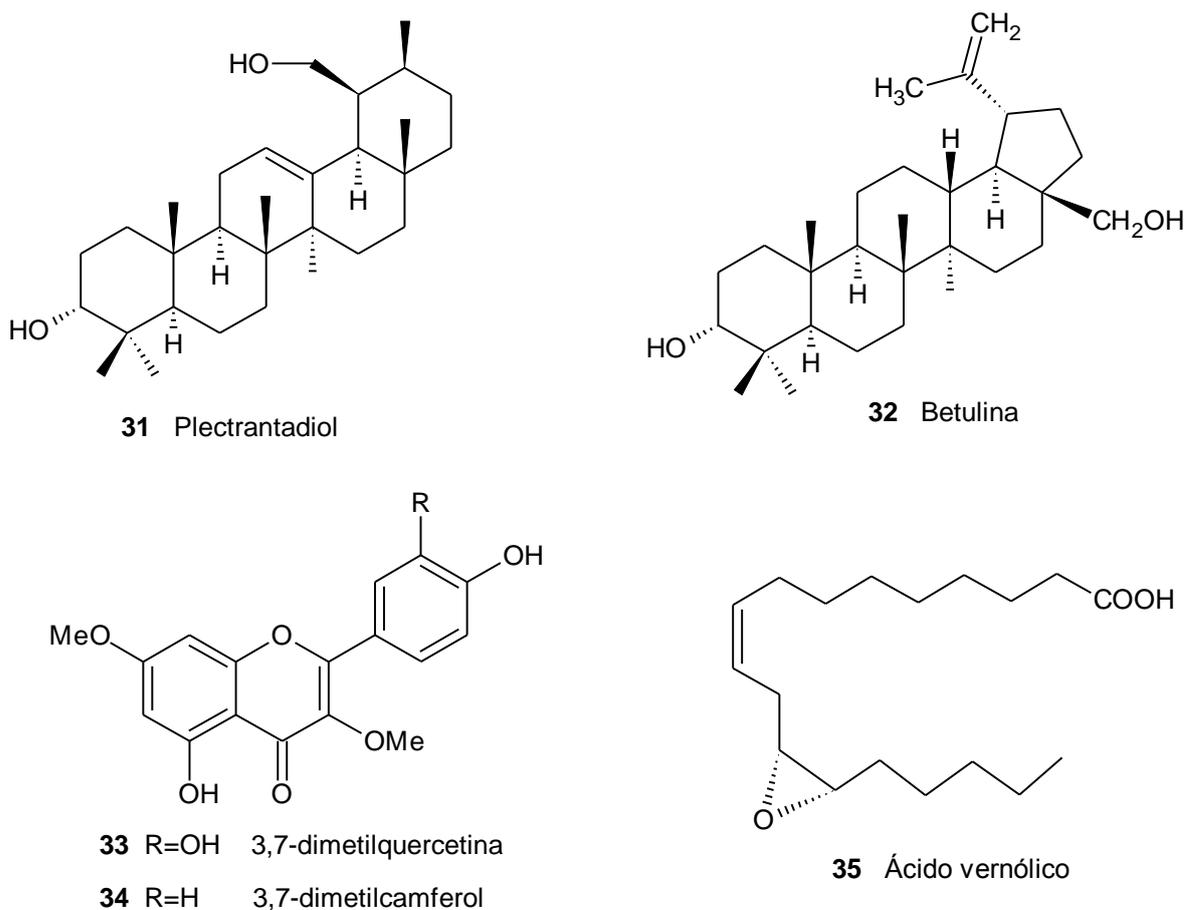
27 Ácido ent-3 $\beta$ -(3-metil-2butenoil)oxi-15-beieren-19-oico

28 Plectrinona A



29 Barbatusina

30 3 $\beta$ -hidroxi-3-deoxibarbatusina**FIGURA 1.10** Outros compostos isolados de espécies *Plectranthus*.



**FIGURA 1.11** Triterpenos, flavonas e ácidos graxos isolados de espécies *Plectranthus*.

### 1.2.3 Outros compostos encontrados no gênero *Plectranthus*

O estudo realizado por WALDIA e colaboradores (2011) mostram o isolamento de triterpenos tipo esqualeno (acíclicos), ambreina (tricíclicos), lanosterol (tetracíclico) e amirinas (pentacíclicos) (**31** e **32**), flavonas (**33** e **34**) e ácidos graxos (**35**) em diferentes espécies de *Plectranthus* (FIGURA 1.11).

Foram encontrados triterpenos em *P. caninus*, *P. rugosus* e *P. straitus*. As flavonas 3,7-dimetilquercetina e 3,7-dimetilcamferol (**33** e **34**, FIGURA 1.11, pág. 17) foram encontradas em partes aéreas de *P. caninus* (WALDIA *et al.*, 2011).

### 1.3 Atividades biológicas do gênero *Plectranthus*

A família Lamiaceae compreende espécies citadas como potenciais fontes de compostos antifúngicos, antibacterianos e inseticidas (RASIKARI *et al.*, 2005; MATU *et al.*, 2003). Entretanto, poucos estudos descrevem o fracionamento monitorado por atividades biológicas para o isolamento de compostos associados a usos específicos etnobotânicos das espécies de *Plectranthus* (LUKHOBÁ *et al.*, 2006).

A seguir são discutidas as principais atividades farmacológicas descritas para as plantas do gênero.

#### 1.3.1 Atividade antioxidante

Estudos com atividade antioxidante têm sido relevantes, pois radicais livres estão relacionados diretamente com o surgimento de diversas doenças. Radicais são produzidos em processos de oxidação, na maioria dos organismos vivos, durante a produção de energia necessária aos processos biológicos (KYUNG-A *et al.*, 2011). O aumento do consumo de compostos fenólicos tem sido correlacionado com um risco reduzido de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (BONOLI *et al.*, 2004).

A espécie *P. barbatus* mostrou uma inibição máxima de 71,7% de retirada de radical, a 5 mg/mL, em comparação com o padrão vitamina C que, na mesma concentração, apresentou inibição de 95%, no teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (TIWARI *et al.*, 2010). O extrato aquoso de *Isodon japonica* (*Rabdosia japonica*) apresentou 19,4% de inibição na concentração 10 ppm, sendo registrada para a vitamina C, 53,7% de inibição, utilizando-se o mesmo teste (KYUNG-A *et al.*, 2011). O extrato metanólico de *Rabdosia serra* na concentração de 30 µg/mL apresentou 45% de inibição (LIN *et al.*, 2011), utilizando-se o método DPPH.

Em estudo comparativo envolvendo as espécies *P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* e *P. verticillatus*, *P. barbatus* apresentou o maior poder antioxidante, 10,4% do extrato aquoso sobre a forma de infusão e 45,8 % por decocção, ambos pelo método DPPH (FALÉ *et al.*, 2009). O extrato bruto de *Rabdosia japônica* a 8 µ/mL apresentou por volta de 4% de inibição de DPPH transcorridos 15 minutos de incubação (MASUOKA *et al.*, 2006).

O cultivo de *P. forskholii* utilizando-se fungicidas triazóis com o objetivo de melhorar a produtividade, resultou em aumento do conteúdo de fenólicos totais, o que sugere melhorar ainda mais o poder antioxidante da planta (LAKSHMANAN *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Propriedades antimicrobianas

As espécies de *Plectranthus* são utilizadas extensivamente no tratamento de infecções, inflamações e febre na medicina tradicional. Alguns artigos avaliando a atividade antimicrobiana dessas plantas datam da década de 60 (VARINA *et al.*, 1963; VICHKANOVA *et al.*, 1966).

Estudos conduzidos por ORABI e colaboradores (2003) mostraram a atividade do extrato de *P. cylindraceus* frente a bactérias Gram-positivas. O fracionamento desse extrato monitorado por ensaios de atividade antimicrobiana culminou no isolamento do timol (2-isopropil-5-metilfenol), produto responsável pelo efeito apresentado pelo extrato da planta. Esse composto é considerado responsável pelo uso culinário da planta fresca, especialmente na região sul da Arábia e como desinfetante e aromatizante (ORABI *et al.*, 2003).

Os abietanóides **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7** e **9** (FIGURA 1.5, pág. 13), encontrados nas espécies de *Plectranthus*, foram avaliados como agentes antimicrobianos, sendo verificada atividade apenas para as roileanonas. O composto **1** mostrou forte atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* (RIJO *et al.*, 2010). O composto **3** mostrou ser o mais potente frente a *Mycobacterium tuberculosis* dentre os diterpenos roileanonas **1**, **2** e **10** (Figura 1.5, pág. 13).

O diterpeno **11** (FIGURA 1.5, pág. 13) isolado de *P. gradidentatus* revelou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e potente atividade contra *S. aureus*. Enquanto o composto **2** (FIGURA 1.5, pág. 13), isolado de *P. hereroensis*, mostrou atividade somente contra *S. aureus*. Os dois compostos descritos foram isolados dos extratos acetônicos das raízes de *P. gradidentatus* e *P. hereroensis* (GASPAR-MARQUES *et al.*, 2006). O fracionamento monitorado do extrato das raízes de *P. hereroensis* utilizando a bioautografia, como método de detecção, conduziu ao diterpeno **8** (FIGURA 1.5, pág. 13), com moderada atividade antimicrobiana apenas frente a *S. aureus* (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995; BATISTA *et al.*, 1996). O diterpenóide **9** (FIGURA 1.5, pág. 13) mostrou atividade antiviral frente à *Herpes simplex* tipo II (HSV2). A formação de placas HSV2 foi inibida em 60% na concentração de 0,2 µg/mL (máxima concentração não-citotóxica) do composto (BATISTA *et al.*, 1995).

O diterpeno abietano primarano **23** (FIGURA 1.9, pág. 16), isolado de *P. ernstii*, apresentou valores de CIM  $\geq 32$  µg/mL frente a *S. aureus* e *Mycobacterium* spp. (STAVRI *et al.*, 2009).

O fracionamento guiado por ensaios biológicos do extrato das partes aéreas de *P. elegans* levou à obtenção de dois novos abietanóides bioativos (12, FIGURA 1.6, pág. 14) e (15, Figura 1.7, pág. 14). Ambos inibem a germinação de esporos do fungo *Cladosporium cucumerinum*. Esses diterpenos inibem também o crescimento de bactérias Gram-positivas. O extrato alcoólico das partes aéreas de *P. glaucocalyx* apresenta alta toxicidade frente a protozoários, bactérias Gram-positivas e ácido-resistentes. A plectrina (14, FIGURA 1.7, pág. 14), isolado dessa espécie, foi efetivo frente a *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (VICHKANOVA *et al.*, 1966).

O extrato bruto e os compostos isolados de *P. crassus*, as nepetoidinas A e B apresentaram atividade antifúngica frente a *Aspergillus niger*. Nepetoidina B mostrou também atividade antifúngica frente à espécie *Cladosporium herbarum* (GRAYNER *et al.*, 2003). Os diterpenóides isolados de *P. ornatus*, mostraram moderada atividade antifúngica, com valores de CIM de 62,5 µg/mL, frente a *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. guillhermondii*. Sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas revelam valores de CIM  $\geq$  125 µg/mL (RIJO *et al.*, 2010). Vários compostos isolados de *P. fruticosus* foram testados como agentes antimicrobianos frente a três cepas de bactérias e uma levedura (GASPAR-MARQUES *et al.*, 2003 e 2004).

O extrato metanólico na concentração 500 mg/mL de *P. amboinicus* e *P. barbatus* matou 100% das prosmatigotas de *Leishmania chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil (TEMPONE *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo foi testada atividade antifúngica do extrato metanólico de *P. neochilus* contra leveduras de *Candida krusei*, mostrando que a concentração 500 mg/mL matou 100% das leveduras. Os extratos metanólico e acetônico das folhas de *P. amboinicus* mostrou atividade antibacteriana contra os organismos *Klebsiella aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (MANJAMALAI *et al.*, 2010).

Os extratos brutos acetônicos das espécies *P. madagascariensis* e de *P. forsteri* mostraram-se ativos frente à bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas syringae*) (WELLSON *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais obtidos das folhas de *P. glandulosus* Hook. (ZOLLO *et al.*, 1998) e *P. japoanicus* K. (MATHPAL *et al.*, 2002) apresentaram significativa atividade antifúngica. O óleo essencial de *P. amboinicus* na concentração de 500 mg/mL apresentou completa inibição do crescimento fúngico de *Aspergillus ochraceus* (MURTHY *et al.*, 2009). Forte atividade bactericida foi descrita para os óleos essenciais de *P. madagascariensis*

(ASCENSÃO *et al.*, 1998), *P. incanus* (VARINA *et al.*, 1963) e *P. amboinicus* (TIMOR *et al.*, 1991).

O óleo essencial de *P. cylindraceus* foi avaliado frente aos agentes patogênicos *Klebsiela pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, mostrando valores apreciáveis para a CIM (MARWAH *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Atividade anti-inflamatória

Os extratos brutos de *P. barbatus* mostraram atividade anti-inflamatória a 500 µg/mL, no ensaio de inibição da ciclooxygenase (COX-1) (MATU *et al.*, 2003). Formulações contendo o extrato de *P. barbatus* e outros extratos de plantas foram descritas como inibidoras da ativação do fator nuclear de transcrição NF-κB (nuclear-kappa B), responsável pelo aumento da expressão de genes inflamatórios. Por conseguinte, são utilizadas para o tratamento de distúrbios inflamatórios, como anti-sinais e no tratamento de doenças relacionadas (OKAMOTO *et al.*, 2005).

Alquilcatecóis obtidos de *P. sylvestris* mostraram efeito inibitório dose-dependente sobre lipooxygenase em ensaio espectrofotométrico direto. Esses compostos mostraram-se significativamente mais potentes que as drogas analgésicas anti-inflamatórias indometacina e o ácido nordiidroguaiarético. Também, foi observada a tendência do aumento do poder inibitório com o aumento da cadeia carbônica (JUCH, 1997).

### 1.3.4 Atividade tóxica

A toxicidade do extrato aquoso de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. pelo bioensaio com larvas de *Artemia salina* resultou em CL<sub>50</sub> igual a 53,29 µg/mL, não sendo considerado tóxico (PARRA *et al.*, 2001). Estudos de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para investigar a presença de substâncias genotóxicas em *P. amboinicus*. Os resultados obtidos sugerem a ausência de atividade no ensaio de detecção de segregação somática usando cepas de *Aspergillus nidulans* D-30 (RUIZ *et al.*, 1996).

A triagem de 25 espécies de *Plectranthus* para avaliação de toxicidade de contato ao ácaro polífago *Tetranychus urticae* e citotoxicidade frente a células de insetos-pragas *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) resultou em grande número de espécies com atividade. A toxicidade por contato de moderada a alta, frente a *T. urticae* foi observada para 14 espécies na concentração

de 1,0% (m/v), sendo que os extratos de *P. habrophyllus* e *P. sp.* ‘Hann Tableland’, depois da aplicação tópica, ocasionaram 100% de mortalidade dos insetos. A 10 µg/mL, todos os extratos testados mostraram-se tóxicos para as células de *S. frugiperda*, mas apresentaram efeito mínimo sobre as linhagens de *D. melanogaster*. Contudo, os autores não puderam estabelecer uma relação direta entre a alta toxicidade e o efeito acaricida observado (RASIKARI *et al.*, 2005).

### 1.3.5 Antídoto para veneno de escorpião

O extrato aquoso de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. usado como antídoto para picadas de animais ou insetos em velhas receitas de preparações tailandesas foi avaliado quanto à atividade frente à lise de células fibroblásticas, depois do tratamento com veneno do escorpião *Heterometrus laoticus*. Eficiência em torno de 40 % (teste/controle) foi obtida no tratamento das células pré-incubadas com o extrato da planta, indicando sua tendência de atuação como antídoto para veneno de escorpião (UAWONGGUL *et al.*, 2006).

### 1.3.6 Controle de insetos

Dentre os meios para controle de insetos, os extratos das espécies de *Plectranthus* e seus compostos isolados destacam-se como agentes que apenas afastam os insetos, atuando como repelentes e inibidores da alimentação (antialimentar). O diterpenóide beierano ácido ent-3β-(3-metil-2-butenoil)oxi-15-beieren-19-óico (**27**, FIGURA 1.10, pág. 16) isolado do extrato acetônico das folhas de *P. saccatus* Benth, mostrou atividade contra o inseto *Spodoptera littoralis* (WELLSOW *et al.*, 2006).

O extrato metanólico bruto de *P. barbatus* exibe a atividade inibidora de alimentação do percevejo *Schizaphis graminum* e da lagarta rosada *Pectinophora gossypiella*. O fracionamento guiado por atividade antialimentar do extrato dessa espécie conduziu ao isolamento do diterpenóide plectrina (**14**, FIGURA 1.7, pág. 14), que exibiu também atividade antialimentar frente a *S. graminum* e *P. gossypiella*, com 50% de inibição alimentar nas doses de 50 ppm e de 100 ppm, respectivamente (KUBO *et al.*, 1984).

O gênero *Plectranthus* é conhecido por ser rico em óleos voláteis contendo numerosos sesqui- e monoterpenos (ABDEL-MOGIB *et al.*, 2002), como: terpinoleno, fenchona, óxido de piperitenona, α-pineno, eremofileno, mirceno e humuleno. Esses compostos mostram efeitos tóxicos frente a inúmeros artrópodes via numerosos modos de ação (RASIKARI *et al.*,

2005). Os óleos essenciais de *P. longipes* Baker e *P. marruboides* foram avaliados quanto à repelência frente a *Anopheles gambiae sensu stricto* em humanos e mostraram ser mais eficientes ( $RC_{50} = 1,93 \times 10^{-5}$  e  $8,9 \times 10^{-5}$  mg/cm<sup>2</sup>, respectivamente), do que *N,N*-dietil-3-toluamida (DEET) ( $RC_{50} = 33 \times 10^{-4}$  mg/cm<sup>2</sup>), um repelente comum utilizado para mosquitos (ODALO *et al.*, 2005; OMOLO *et al.*, 2005). Recentes estudos mostram que o óleo essencial de *P. marruboides* possui também forte ação fumigante frente a *A. gambiae* (OMOLO *et al.*, 2005). O óleo essencial de *P. grandulosus*, bem como a fenchona, um dos compostos majoritários em teste de toxicidade com os insetos *Sitophilus zeamais* Motschulsky e *Prostephanus truncatus* (Horn), apresentou alta mortalidade das populações (NUKENINE *et al.*, 2010).

### 1.3.7 Atividades sobre o sistema digestivo

CÂMARA e colaboradores (2003) mostraram que o óleo essencial de *P. barbatus* possui atividade relaxante intestinal e antiespasmódica em concentrações que variam de 1 a 300 µg/mL. A principal substância responsável pela ação relaxante e espasmolítica parece ser o  $\alpha$ -pineno, composto que apresenta essas atividades em pequenas concentrações. Tais resultados podem ser relacionados à utilização das infusões das folhas da espécie *P. barbatus* na medicina popular brasileira, para o alívio sintomático da dor abdominal aguda associada a perturbações gástricas. O extrato aquoso dessa planta apresentou também atividade antiespasmódica, além das atividades hipotensiva e hipoglicêmica (CÂMARA *et al.*, 1998).

O diterpenóide forskolina (**25**, FIGURA 1.10, pág. 16), isolado de *P. barbatus*, ativa diretamente a adenil-ciclase e, desta forma, a modulação do mensageiro AMPc, o que pode estimular a produção das secreções gástricas e explicar a utilização da espécie no tratamento de desordens digestivas, assim como a diversidade de usos tradicionais (LUKHOBÁ *et al.*, 2006). Os labdanos isolados de *P. ornatus* possuem esqueleto carbônico similar ao da forskolina, com um sistema 8,13-epóxi-labd-14-en-11-ona, o que pode justificar a utilização popular de *P. ornatus* em substituição à espécie *P. barbatus* no tratamento de desordens digestivas (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

O efeito do diterpeno abietano plectrinona A (**28**, FIGURA 1.10, pág. 16) isolado de *P. barbatus*, na H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gástrica provocou a inibição da secreção ácida basal, estimulou ambos os secretagogos com as frações purificadas indicando a inibição da bomba de prótons, ou seja, mostrou atividade anti-secretora de ácido gástrico (SCHULTZ *et al.*, 2007).

O diterpeno horminona (**1**, FIGURA 1.5, pág. 15), isolado das raízes de *P. hereroensis*, pode causar lesões no fígado, uma resposta adversa que justifica avaliações posteriores dos extratos da planta no tratamento de desordens digestivas (LUKHOBBA *et al.*, 2006).

Utilizando camundongos com lesão gástrica induzida por etanol foi testado o efeito gastropotetor dos diterpenos quinonóides barbatusina e 3- $\beta$ -hidroxi-3-deoxibarbatusina (**29** e **30** respectivamente, FIGURA 1.10, pág. 16), previamente isolados de *P. grandis*. Foi observado que a administração oral de barbatusina (5 e 10 mg/kg) obteve 32 e 76% de inibição para as respectivas doses, e 3- $\beta$ -hidroxi-3-deoxibarbatusina (2.5, 5 e 10 mg/kg) de 53, 58 e 96% respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2009).

### 1.3.8 Outras atividades biológicas

Os diterpenos abietanos 7 $\alpha$ -acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone, Coleona U (**3** e **11**, FIGURAS 1.5 e 1.6 respectivamente, págs. 13 e 14) e Grandidona A (**19**, FIGURA 1.8, pág. 15) isolados de *P. grandidentatus* inibiram a proliferação de linfócitos humanos em dose-dependente, sendo que o composto **3** (FIGURA 1.5, pág. 13) foi apenas 10 vezes menos potente que a ciclosporina A, utilizada como imunossupressor (CERQUEIRA *et al.*, 2004).

A atividade nematicida do óleo essencial de *P. cylindraceus* a 25 mg/mL, foi tão eficaz como o pesticida carbofuran contra nematóides juvenis de *Meloidogyne javanica* (ONIFADE *et al.*, 2008). O óleo essencial de *P. glandulosus* reduziu consideravelmente o crescimento micelial, de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, de maneira dose dependente (AOUDOU *et al.*, 2010).

## **CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL**

---

### **2.1 METODOLOGIA**

#### **2.1.1 Planta**

*P. neochilus* foi cultivada no Campus JK da UFVJM, Diamantina/MG, sendo seu plantio através de propagação vegetativa utilizando os galhos da planta, provenientes de outra região. Não foi feito nenhum tratamento químico ou qualquer tipo de adubação. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Prof. Dr. Carlos Victor de Mendonça Filho do Departamento de Ciências Biológicas da FCBS/UFVJM, sendo depositada uma exsicata do material no Herbário DIA da UFVJM, sob o registro número 1720. Folhas e caules da espécie foram coletados em agosto de 2009. Realizou-se também na mesma época a coleta das flores (inflorescência), separadamente, durante plena floração da espécie. As características do local de cultivo, como temperatura, umidade, pluviosidade e outros parâmetros climatológicos da região, favoreceram a floração durante todo o período de estiagem que compreende os meses de abril a novembro, cessando a floração apenas no período chuvoso (dezembro a março). Durante as chuvas ocorreu intenso crescimento vegetativo.

#### **2.1.2 Métodos cromatográficos**

##### **2.1.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Foram preparadas com placas de vidro com sílica gel 60G (MACHEREY-NAGEL) em camadas de 0,25 mm e 0,50-0,75 mm de espessura, para cromatografia analítica (CCDS) e preparativa (CCPS) previamente ativadas a 100 °C.

##### **2.1.2.2 Cromatografia em coluna (CC)**

Foram utilizadas colunas de vidro de diversos diâmetros e tamanhos, eluídas sob pressão atmosférica. A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi, em geral, de 1:30. As fases estacionárias foram:

###### **2.1.2.2.1 Sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh)**

Empacotada em colunas de vidro em diversos diâmetros e tamanhos, utilizando vários solventes como eluentes e em diferentes gradientes de polaridade. Os volumes coletados variaram de 50 a 500 mL.

#### **2.1.2.2 Exclusão em gel utilizando Sephadex LH-20**

Sephadex LH-20 foi suspenso no solvente utilizado como fase móvel e empacotado em buretas de 50 e 100 mL. A coluna foi mantida em repouso por 24 h até seu completo empacotamento. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente do eluente e aplicada no topo da coluna, sendo coletadas frações de aproximadamente 10 mL.

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

As análises por CLAE foram realizadas em um equipamento da marca SHIMADZU Série 20A, consistindo por 2 bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A e software de aquisição de dados LCsolution (Departamento de Química – ICEX – UFMG). As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado, filtradas em microfiltro Millipore illex – HV 0,45 mm e depois centrifugadas. Volumes de 20 µL foram injetados no equipamento. As condições de análise em CLAE foram de acordo com as encontradas em HARBONE (1984) e com algumas modificações, como descritas posteriormente.

##### **2.1.2.3.1 Condições de análise:**

- **CLAE 1:** Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocrático A/B (70:30) em 35 min.

- **CLAE 2:** Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocrático A/B (10:90) em 30 min.

- **CLAE 3:** Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol e B: Água contendo ácido acético 0,5%, gradiente de 0% A a 100% A em 30 min.

- **CLAE 4:** Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol B: tampão fosfato pH 2,7 contendo 30,8 mg/L de octanosulfonato de sódio. Eluição no modo isocrático A/B (10:90). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min.

#### **2.1.3 Reagentes para revelações cromatográficas (MATOS, 1998; GALOTTA, 2005)**

### **2.1.3.1 Irradiação com luz ultravioleta ( $\lambda$ 254 e 365 nm)**

A cromatoplaça foi colocada em uma câmara fechada em aparelho Biotech BT 107 sob irradiação com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

### **2.1.3.2 Vapores de iodo**

A cromatoplaça foi colocada em uma câmara fechada em contato com vapores de iodo (revelador geral).

### **2.1.3.3 Vanilina**

Solução A: 1,0 g de vanilina, solubilizada em 100,0 mL de etanol.

Solução B: 3,0 mL de ácido perclórico, solubilizado em 100,0 mL de água.

As soluções A e B foram misturadas na proporção 1:1 e borrifadas nas cromatoplaças, estas foram levadas a estufa por 10-15 minutos a 120 °C.

## **2.1.4 Testes químicos**

### **2.1.4.1 Teste Liebermam-Burchard**

Uma alíquota da amostra foi dissolvida em 1 mL de  $\text{CHCl}_3$ , sendo adicionados 1 mL de anidrido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico (3 ou 4 gotas) até que se processe a reação. O aparecimento de coloração, que vai de verde ao azul, indica a presença de substâncias com núcleo esteroidal, enquanto que coloração do pardo ao vermelho indica a presença de triterpenos pentacíclicos (MATOS, 1988).

### **2.1.5 Ponto de fusão**

As temperaturas de fusão foram determinadas no fusiômetro TECNOPON, PFM-II no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química - FACET/UFVJM.

## **2.1.6 Métodos espectrométricos**

### **2.1.6.1 Infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com o uso de pastilhas de KBr ou NaCl, em equipamentos SHIMADZU/IR-408 e Perkin-Elmer 283B do Departamento de Química –ICEX/UFMG.

### **2.1.6.2 RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectros DEPT-135 foram obtidos em espectrômetros Bruker modelos DX-200 (200MHz) e DRX-400 (400 MHz) linha AVANCE do Departamento de Química – ICEx/UFMG. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  e as constantes de acoplamento dadas em Hz. Como padrão de referência interna utilizou-se o tetrametilsilano. Os solventes utilizados foram clorofórmio e piridina deuterados ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

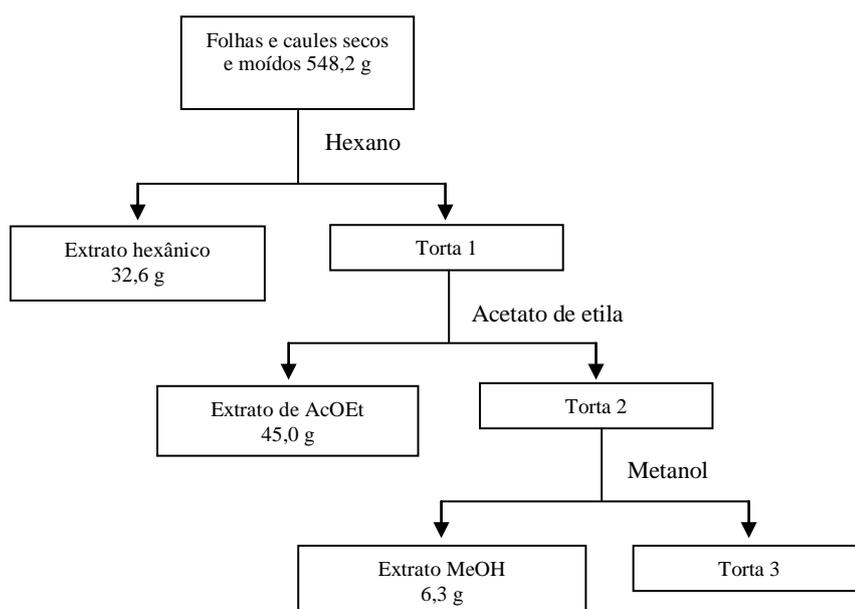
### 2.1.6.3 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Q-ToF MicroTM (Micromass, Manchester, UK) do Departamento de Química – ICEx/UFMG. As amostras foram dissolvidas em 0,2 mol/L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  em metanol (modo negativo) e injetados diretamente no equipamento.

## 2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *P. neochilus* Schltr.

### 2.2.1 Preparação dos extratos das folhas e caules

Folhas e caules de *P. neochilus* foram secas em estufa de circulação de ar a temperatura de  $65\text{ }^\circ\text{C}$  até manter peso constante e, posteriormente moídas em moinhos de facas. O material moído foi submetido a extrações exaustivas por maceração, sucessivamente com *n*-hexano, acetato de etila e metanol. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotatório, foram obtidos os respectivos extratos (FIGURA 2.1).



**FIGURA 2.1** Esquema ilustrativo da preparação dos extratos das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.

### 2.2.2 Preparação dos extratos das flores

As flores de *P. neochilus* foram secas, pulverizadas (460,0 g) e acondicionadas em um cartucho feito com papel de filtro. O cartucho contendo as flores foi submetido à extração em aparelho *soxhlet*, utilizando-se metanol como solvente em uma relação material vegetal:solvente 10:1, sob temperatura de 60 °C. Foram feitas 25 extrações, em função da capacidade do extrator utilizado, sendo o tempo de cada extração de 120 minutos. Após a evaporação do solvente foram obtidos 109,9 g de extrato metanólico.

Dentre os extratos preparados apenas os hexânico e de AcOEt obtidos das folhas e caules de *P. neochilus* foram submetidos a procedimentos cromatográficos posteriores, como descrito a seguir.

### 2.2.3 Elaboração do extrato hexânico de *P. neochilus* Schltr. (HPN)

Parte do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* (30,0 g) foi submetida a filtração em sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram utilizados como solvente hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Desse procedimento foram obtidas 190 frações coletadas em volumes de 500 mL e rotaevaporadas (TABELA 2.1).

**TABELA 2.1** Fracionamento do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr. (HPN)

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano	1-21
<i>n</i> -hexano: AcOEt (1:1)	22-60
<i>n</i> -hexano: AcOEt (2:8)	61-71
AcOEt	72-94
AcOEt: MeOH (1:1)	95-139
MeOH	140-190

Por análise dos perfis cromatográficos em CCDS, utilizando-se iodo como revelador as frações obtidas foram reunidas em 13 grupos (TABELA 2.2).

**TABELA 2.2** Reunião das frações obtidas por CCDS do extrato de HPN

Reunião	Fração	Massa (g)
R1	1-11	0,4
R2	12-17	0,2
R3	18-22	0,3
R4	23-26	18,1
R5	27-41	1,3
R6	42-49	0,5
R7	50-53	0,3
R8	54-62	0,6
R9	63-73	1,1
R10	74-116	1,2
R11	117-154	1,0
R12	143-164	0,9
R13	165-190	0,9

Das reuniões obtidas em HPN, apenas R4 foi submetida a outros procedimentos cromatográficos, as demais reuniões não foram trabalhadas.

### 2.2.3.1 Fracionamento de R4

O material deste grupo (18,1 g) apresentou-se como um óleo viscoso escuro, complexo, sendo fracionado em coluna de sílica utilizando como eluente hexano, AcOEt e MeOH em gradientes crescentes de polaridade. A coluna para fracionamento utilizada tinha 4,5 cm de diâmetro e 65 cm de sílica seca (380,0 g). Foram obtidas 184 frações coletadas em volumes de 500 mL e rotaevaporadas (TABELA 2.3).

**TABELA 2.3** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R4

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano	1-77
<i>n</i> -hexano: AcOEt (1:1)	78-123
<i>n</i> -hexano: AcOEt (4:6)	124-134
<i>n</i> -hexano: AcOEt (2:8)	135-143

*continuação*

AcOEt	144-153
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (1:1)	154-169
CH <sub>3</sub> OH	170-184
<i>conclusão</i>	

Com a análise dos perfis cromatográficos em CCDS utilizando-se iodo e vanilina como revelador, as frações foram agrupadas em 12 reuniões, descritas na TABELA 2.4.

**TABELA 2.4** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R4

Reunião	Fração	Massa (g)
R14	1-5	0,02
R15	6-7	0,01
R16	8-12	0,01
R17	13-27	0,01
R18	28-77	1,10
R19	78-103	12,70
R20	104-116	0,19
R21	117-121	0,02
R22	122-134	0,31
R23	135-142	0,11
R24	143-153	0,01
R25	154-184	0,50

O material relativo às reuniões R17 e de R21 a R25 não foram trabalhados por se tratarem de misturas complexas e/ou em pequenas quantidades. As reuniões R18, R19 e R20 foram recromatografadas em CCS, como descritos a seguir.

### 2.2.3.2 Fracionamento da reunião R18

O material relativo à reunião R18 apresentou-se como um sólido branco que quando submetido ao teste de Liebermam-Burchard apresentou coloração rósea a marrom, indicativa da natureza triterpênica da amostra. R18 (1,1 g) foi fracionada em coluna de sílica utilizando-se como eluente *n*-hexano e AcOEt em gradiente crescente de polaridade, sendo obtidas 140 frações de 150 mL e rotaevaporadas (TABELA 2.5).

**TABELA 2.5** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R18

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano:AcOEt (9,5:0,5)	1-110
<i>n</i> -hexano: AcOEt (1:1)	111-125
AcOEt	126-140

As frações obtidas foram agrupadas em sete novas reuniões após análise por CCDS comparativa (TABELA 2.6).

**TABELA 2.6** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R18

Reunião	Fração	Massa (mg)
R26	1-5	5,0
R27	6-7	101,1
R28	8-11	358,9
R29	12-32	98,9
R30	33-69	16,0
R31	70-102	13,0
R32	103-115	29,5

As reuniões R26, R28, R30, R31 e R32 não foram trabalhadas. Apenas as reuniões R27 e R29 foram submetidas a estudos posteriores.

O material referente à reunião R27 apresentou-se como um sólido branco, denominado de PN1 (101,1 mg). Através de métodos espectrométricos PN1 foi identificado como o triterpeno  $\alpha$ -amirina esterificada.

### 2.2.3.3 Fracionamento de reunião R29

O material proveniente da reunião R29 (98,9 mg) foi submetido a uma recromatografia em coluna de sílica (1,3 cm de diâmetro e 8,43 g de sílica). Como eluente foram utilizados hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH em gradiente crescente de eluição. Foram coletadas 87 frações (TABELA 2.7).

**TABELA 2.7** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R29

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (8:2)	1-23
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (6:4)	24-36
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (3:7)	37-50
CHCl <sub>3</sub>	51-60
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt (1:1)	61-71
AcOEt	72-77
CH <sub>3</sub> OH	78-87

As frações obtidas foram agrupadas em nove reuniões após análise por CCDS comparativa (TABELA 2.8).

**TABELA 2.8** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R29

Reunião	Fração	Massa (mg)
R33	1-23	41,6
R34	24-36	15,0
R35	37-45	15,4
R36	46-50	8,0
R37	51-55	5,0
R38	56-60	2,0
R39	61-64	3,4
R40	65-78	5,0
R41	79-87	2,0

A reunião R33 apresentou-se como um sólido branco de massa 41,6 mg, através de métodos espectroscópicos apresentou sinais característicos de ácido graxo, porém não foi elucidado estruturalmente. As demais reuniões não foram trabalhadas por se tratarem de misturas complexas e apresentarem-se em pequenas quantidades.

### 2.2.3.4 Fracionamento da reunião R20

O material da reunião R20 (194,5 mg) foi submetido a uma recromatografia em coluna de sílica. Como eluente foram utilizados hexano, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH em gradiente crescente de eluição. Desta coluna foram obtidas 68 frações (TABELA 2.9).

**TABELA 2.9** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R20

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano: AcOEt (1:1)	1-19
<i>n</i> -hexano: AcOEt (4:6)	20-31
<i>n</i> -hexano: AcOEt (3:7)	32-38
AcOEt	39-46
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (9:1)	47-53
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (6:4)	54-60
CH <sub>3</sub> OH	61-68

Através da análise de CCDS comparativa, as frações obtidas foram agrupadas em nove subreuniões, de acordo com o seu perfil cromatográfico (TABELA 2.10).

**TABELA 2.10** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R20

Reunião	Fração	Massa (mg)
R42	1-10	50,0
R43	11-16	10,0
R44	17-31	12,0
R45	32-39	10,0
R46	40-47	10,0
R47	48-53	15,0
R48	54-60	18,0
R49	61-68	15,0

Nenhuma das subreuniões desta CCS foi submetida a trabalho posterior por apresentarem-se como misturas complexas e em pequenas quantidades.

### 2.2.3.5 Fracionamento da subreunião R19

A subreunião R19 (12,7 g) foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica, utilizando-se os solventes *n*-hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH puros ou em misturas em gradientes crescente de polaridade. Foram obtidas 329 frações (FIGURA 2.11).

**TABELA 2.11** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R19

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano	1-44
<i>n</i> -hexano: CHCl <sub>3</sub> (9:1)	45-66
<i>n</i> -hexano: CHCl <sub>3</sub> (7:3)	65-106
<i>n</i> -hexano: CHCl <sub>3</sub> (1:1)	107-116
<i>n</i> -hexano: CHCl <sub>3</sub> (3:7)	117-176
CHCl <sub>3</sub>	177-215
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (8:2)	216-239
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (1:1)	240-250
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (2:8)	251-263
AcOEt	264-274
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (7:3)	275-287
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (1:1)	288-304
CH <sub>3</sub> OH	305-329

As frações descritas, após análise por CCDS comparativa, foram agrupadas em 16 subreuniões, de acordo com o perfil cromatográfico apresentado (TABELA 2.12).

**TABELA 2.12** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R19

Reunião	Fração	<i>continuação</i>
		Massa (g)
R50	1-12	0,015
R51	13-29	0,020
R52	30-49	0,010
R53	50-63	0,005
R54	64-69	0,209
R55	70-84	0,347

R56	85-96	0,020
R57	97-107	0,050
R58	108-117	0,010
R59	118-122	0,756
R60	123-139	0,100
R61	140-155	0,096
R62	156-160	1,038
R63	161-234	3,000
R64	235-287	1,000
R65	288-329	1,200

*conclusão*

O material identificado como R57 (33,5 mg) foi lavado exaustivamente com éter etílico, fornecendo um sólido branco cristalino, denominado PN2, que foi identificado por métodos espectroscópicos de análise como friedelan-3-ona (friedelina).

O material identificado como R61 foi lavado duas vezes com éter etílico até apresentar-se como um sólido branco cristalino, denominado de PN3 (96,8 mg). Por análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  PN3 foi identificado como uma mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol.

A subreunião R62 foi submetida procedimentos cromatográficos posteriores. As demais subreuniões deste grupo, não foram estudadas, pois se tratavam de misturas complexas e em pequenas quantidades.

### 2.2.3.6 Fracionamento da subreunião R62

O material de R62 (1,04 g) foi submetido a recromatografia em coluna de sílica. Após análise por CCD optou-se pela eluição da coluna utilizando-se inicialmente a mistura  $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$  (8:2), seguida de outras misturas em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 126 frações em frascos de vidro com capacidade de 10 mL (FIGURA 2.13).

**TABELA 2.13** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R62

Eluente	<i>continuação</i> Fração
$\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (8:2)	1-50
$\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (7:3)	51-81

CHCl <sub>3</sub> :AcOEt (1:1)	82-98
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt (3:7)	99-104
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (1:1)	105-118
CH <sub>3</sub> OH	119-126

*conclusão*

As frações obtidas foram agrupadas em nove subreuniões, de acordo com o perfil cromatográfico apresentado em CCDS comparativa (TABELA 2.14).

**TABELA 2.14** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R62

Reunião	Fração	Massa (mg)
R66	1-3	15,2
R67	4-5	400,0
R68	6-7	49,5
R69	8-14	104,4
R70	15-64	32,7
R71	65-76	17,6
R72	77-104	30,2
R73	105-107	50,9
R74	108-126	26,9

Somente a subreunião R67 foi trabalhada, e seu estudo é mostrado em seguida. As demais subreuniões não foram submetidas a procedimentos posteriores por se tratarem de misturas complexas e em pequenas quantidades.

### 2.2.3.7 Fracionamento da subreunião R67

A subreunião R67 (400,0 mg) foi submetida a recromatografia em coluna de sílica utilizando-se como solventes CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e CH<sub>3</sub>OH puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Após avaliação da subreunião por CCD optou-se por iniciar a eluição com a mistura CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (7:3). Foram coletadas 46 frações (TABELA 2.15, pág. 37).

**TABELA 2.15** Frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica de R67

<i>continuação</i>	
Eluente	Fração
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (7:3)	1-19

CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (3:7)	20-29
AcOEt: CH <sub>3</sub> OH (7:3)	30-39
CH <sub>3</sub> OH	40-46

*conclusão*

Pelo perfil cromatográfico apresentado em CCDS comparativa, as frações obtidas foram agrupadas em seis subreuniões (TABELA 2.16).

**TABELA 2.16** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R67

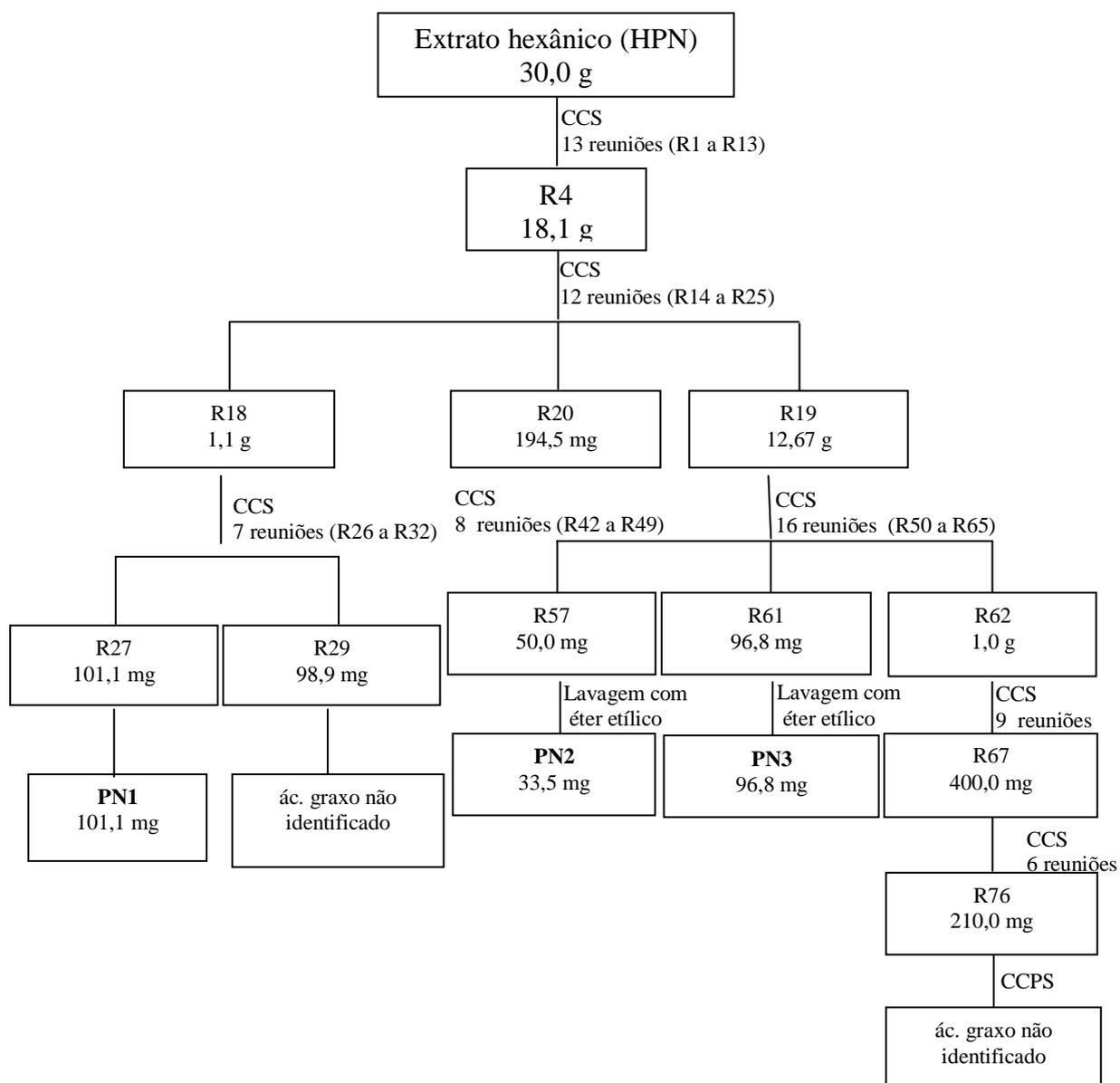
Reunião	Fração	Massa (mg)
R75	1-3	10,0
R76	4-14	210,0
R78	15-19	6,3
R79	20-29	6,5
R80	30-37	8,0
R81	38-46	16,2

Das frações reunidas, apenas R76 foi submetida a procedimentos posteriores. As demais não foram trabalhadas por apresentarem-se como misturas complexas ou por se tratarem de reuniões com pequena massa.

### 2.2.3.8 Fracionamento em CCS de R76

O material denominado R76 (210,0 mg) apresentou-se como um óleo viscoso que, por CCD apresentou duas manchas de Rf's bastante distintos. R76 foi submetida então a cromatografia em camada preparativa de sílica para UV 254 nm (CCPS), utilizando-se a mistura de solvente CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (7:3) como eluente. A mancha de maior Rf foi separada e analisada por métodos espectroscópicos, apresentando sinais característicos de ácido graxo, porém não foi elucidado estruturalmente.

A FIGURA 2.2 (pág. 39) sumariza os trabalhos realizados com o extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus*.



**FIGURA 2.2** Esquema de investigação fitoquímica do extrato hexânico obtido das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.

#### 2.2.4 Elaboração do extrato em acetato de etila de *P. neochilus* Schltr. (APN)

O extrato em acetato de etila (42,0 g) das folhas e caules de *P. neochilus* foi submetido CCS. Foram coletadas 127 frações em volumes de 500 mL e rotaevaporadas, utilizando-se diferentes solventes, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, como mostrado na TABELA 2.17, pág. 40).

**TABELA 2.17** Frações obtidas após CCS do extrato APN

Eluente	Fração
<i>n</i> -hexano	1-14
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (9:1)	15-20
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (6:4)	21-27
<i>n</i> -hexano:CHCl <sub>3</sub> (4:6)	28-32
CHCl <sub>3</sub>	33-38
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt (9:1)	39-47
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (7:3)	48-60
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (1:1)	61-67
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt (2:8)	68-78
AcOEt	79-85
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (7:3)	86-94
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (1:1)	95-103
AcOEt:CH <sub>3</sub> OH (3:7)	104-109
CH <sub>3</sub> OH	110-127

Pelo perfil cromatográfico em CCDS comparativa, as frações obtidas foram agrupadas em 15 reuniões (TABELA 2.18).

**TABELA 2.18** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de APN

Reunião	Fração	<i>continuação</i>
		Massa (g)
R1	1-4	0,280
R2	5-7	0,030
R3	8-9	0,004
R4	10-17	0,211
R5	18-19	0,051
R6	20-24	0,200
R7	25-32	0,120
R8	33-38	1,200
R9	39-42	2,20
R10	43-47	1,50
R11	48-67	11,00
R12	68-85	0,600

R13	86-94	700,0
R14	95-109	500,0
R15	110-127	410,0

*conclusão*

O material relativo à reunião R7, após lavagem e recristalização com éter etílico, forneceu um sólido branco cristalino (105,0 mg). Análise por espectroscopia de RMN indicou tratar-se de quantidades adicionais da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol (PN3).

Dentre as demais reuniões obtidas, apenas R10 foi submetida a procedimentos cromatográficos. O estudo fitoquímico das outras reuniões encontra-se em andamento.

#### 2.2.4.1 Fracionamento de R10 proveniente do extrato APN

R10 (1,5 g) foi submetida a lavagem e recristalização utilizando-se éter etílico. O material resultante (800,0 mg) foi fracionado em coluna de sílica. Foram utilizados como eleutes  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 94 frações coletadas em volumes de 50 mL (TABELA 2.19).

**TABELA 2.19** Frações obtidas após CCS de R10

Eluente	Fração
$\text{CHCl}_3$ : AcOEt (7:3)	1-51
$\text{CHCl}_3$ : AcOEt (6:4)	52-56
AcOEt	57-75
AcOEt: MeOH (3:7)	76-85
MeOH	86-94

Pelo perfil cromatográfico em CCDS comparativa, as frações obtidas foram agrupadas em oito subreuniões de acordo com a TABELA 2.20.

**TABELA 2.20** Reunião das frações provenientes do fracionamento em CCS de R10

<i>continuação</i>		
Reunião	Fração	Massa (mg)
R16	1-15	80,0
R17	16-20	40,0
R18	21-29	70,0
R19	30-39	100,0

R20	40-46	90,0
R21	47-49	85,0
R22	50-56	30,0
R23	57-94	150,0

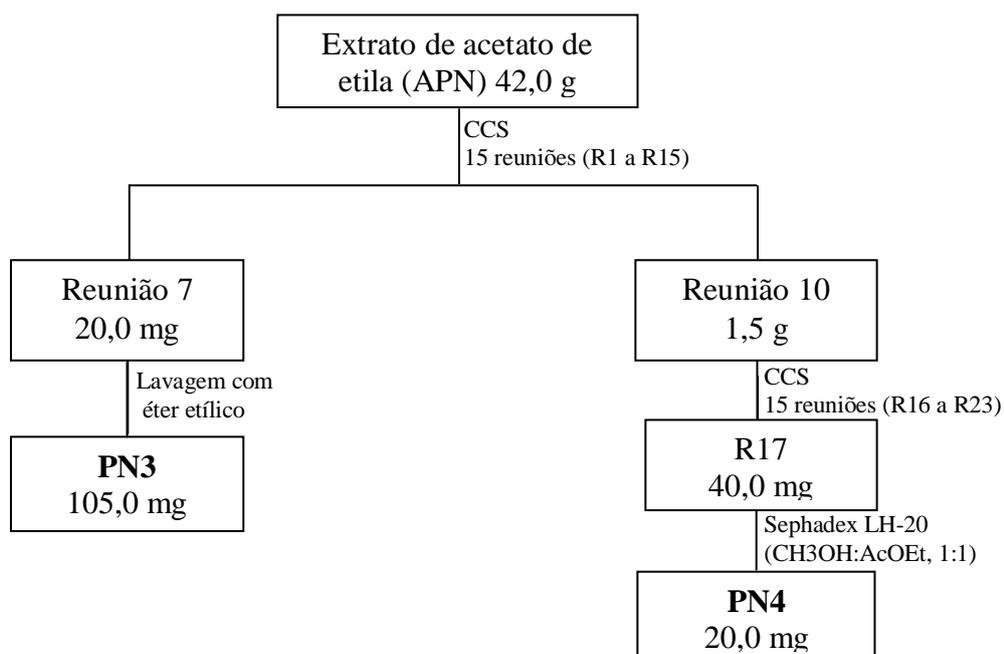
*conclusão*

Dentre as frações obtidas apenas R17 foi submetida a trabalhos posteriores. As demais reuniões apresentaram-se como misturas complexas e/ou em pequenas quantidades.

#### 2.2.4.2 Fracionamento da subreunião 17

R17 apresentou-se como um sólido avermelhado cristalino (40,0 mg). O material foi submetido a duas filtrações sucessivas em coluna de Sephadex LH-20, utilizando-se mistura MeOH:AcOEt (1:1) como solvente. Foram coletadas 20 frações de 10 mL em cada coluna. Após a segunda coluna, nas frações de 7 a 11, foi obtido um sólido cristalino marron claro (20,0 mg) denominado PN4 que, por análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de RMN de  $^{13}\text{C}$ , CLAE e massas, foi identificado como 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina).

A FIGURA 2.3 sumariza o estudo fitoquímico realizado com o extrato em acetato de etila das folhas e caules de *P. neochilus*.



**FIGURA 2.3** Esquema do estudo fitoquímico do extrato em acetato de etila das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.

### **2.2.5 Obtenção de extratos polares das partes aéreas de *P. neochilus* Schltr.**

As folhas e caules e as flores de *P. neochilus* secas e moídas foram submetidas separadamente a extrações ácidas e básicas, segundo metodologia de MATOS (1988) e HAMPP (1996).

#### **2.2.5.1 Extração ácida (EAA) de *P. neochilus***

Folhas e caules (200,0 g) e flores (200,0 g) da planta, separadamente, após secagem e moagem, foram colocadas em um béquer, seguindo-se da adição de 1000 mL de HCl (1 mol/L) e da extração em banho ultrassônico (US) por 60 minutos a temperatura de 40 °C. O extrato foi filtrado em algodão e em papel de filtro utilizando vácuo. À torta resultante adicionou-se 200 mL de HCl (1 mol/L) seguida por uma nova extração em US por 30 minutos. Após nova filtragem, os extratos foram reunidos e chamados de camada aquosa ácida (CAA). A TORTA 1 resultante foi submetida a extração básica. A CAA foi fracionada por partição, ou seja, extração por solvente. Em um funil de separação foram colocados CAA juntamente com 300 mL de AcOEt, após agitação vigorosa e repouso, foram obtidas duas camadas: camada orgânica 1 (CO1) e camada aquosa ácida 1 (CAA1). As camadas foram separadas e uma segunda partição foi realizada em CAA1, utilizando-se 200 mL de AcOEt. A camada orgânica obtida agrupada a CO1 que foi lavada duas vezes com 50 mL de HCl 1 M, sendo estas camadas aquosas agrupadas a CAA1. A CO1 foi seca em rotavapor a 40 °C e redissolvida em 10 mL de água, resultando na fração 1 (F1). A CAA1 foi basificada com 70 mL de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 1 M em funil de separação, juntamente com 300 mL de AcOEt. Após agitação vigorosa e repouso, obtiveram uma camada orgânica (CO2) e uma camada aquosa básica (CAB). A CO2 foi retirada e a CAB sofreu uma nova partição com 200 mL de AcOEt, sendo a camada orgânica obtida agrupada a CO2, que foi lavada duas vezes com 50 mL de HCl 1 mol/L, sendo estas camadas aquosas desprezadas. A CO2 foi seca em rotavapor a 40 °C e redissolvida em 10 mL de água, produzindo a fração 2 (F2). A CAB foi neutralizada com 70 mL de HCl 1 mol/mL e concentrada em rotavapor a 60 °C, resultando na fração 3 (F3) (FIGURA 2.4, pág. 45).

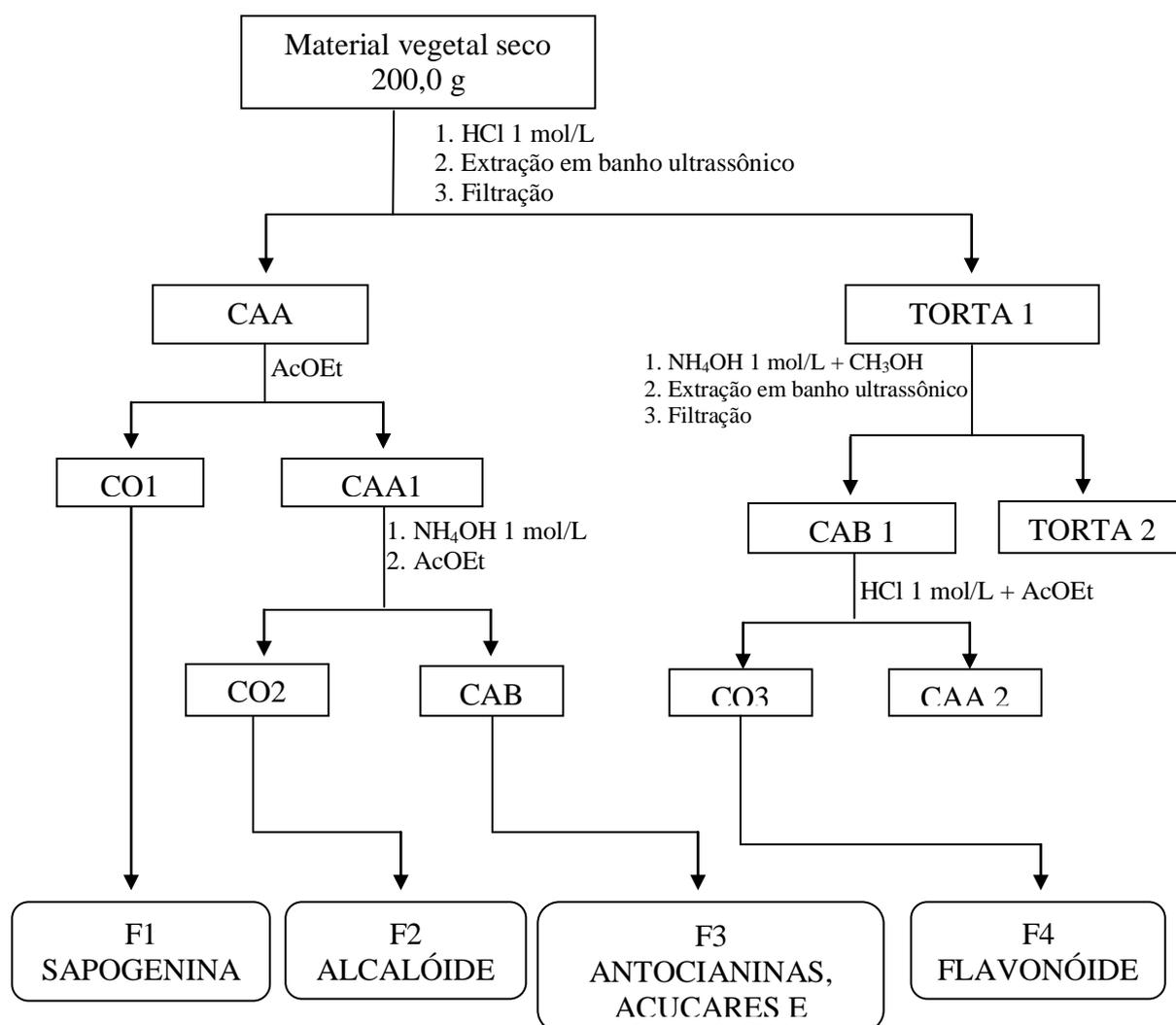
#### **2.2.5.2 Extração básica (EAB) de *P. neochilus***

À TORTA 1 resultante da extração aquosa ácida foram adicionados 500 mL de NH<sub>4</sub>OH 1 mol/L juntamente com 200 mL de metanol. A extração foi feita em banho US por 60 minutos a 40 °C. O extrato foi filtrado em algodão e em papel filtro utilizando vácuo. A

torta resultante sofreu uma nova extração com 300 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 mol/L e 100 mL de metanol em banho US por 30 min. Após nova filtração, os filtrados foram reunidos e denominados de camada aquosa básica 1 (CAB1). A CAB1 foi acidificada com 70 mL de HCl 1 mol/L e particionada com 300 mL de AcOEt em funil de separação. Após agitação vigorosa e repouso, foram obtidas a camada orgânica 3 (CO3) e a camada aquosa ácida 2 (CAA2). CO3 foi retirada e uma segunda partição foi feita com CAA2 em 200 mL de AcOEt. A camada orgânica obtida foi agrupada a CO3 que foi lavada duas vezes com 50 mL de HCl 1 mol/L, sendo estas camadas desprezadas. CO3 foi seca em rotavapor a 40 °C e redissolvida em 10 mL de água, resultando na fração 4 (F4). A CAA2 foi descartada (FIGURA 2.4, pág. 45).

Dos procedimentos realizados foram obtidos quatro frações para as folhas e caules (F1A, F2A, F3A e F4A) e quatro para a extração feita para as flores (F1F, F2F, F3F e F4F), que podem ser ricas em saponinas, alcalóides, antocianinas e flavonóides, respectivamente (MATOS, 1988; HAMPP, 1996). As frações preparadas foram submetidas à avaliação por CLAE utilizando-se as condições descritas por HARBONE (1984) com modificações (pág. 26).

A fração F4A foi submetida a procedimentos cromatográficos, por apresentar picos isolados que incentivaram seu fracionamento na tentativa de isolamento.



**FIGURA 2.4** Esquema de partição dos extratos das folhas e caules e das flores de *P. neochilus* Schltr. para obtenção de frações que podem ser ricas nas classe de compostos polares saponinas, alcalóides, antocianinas, açúcares, ácidos e flavonóides.

### 2.2.5.3 Fracionamento do extrato F4A

A fração 4 das folhas e caules (F4A) (350,0 mg) apresentou na análise por CLAE picos separados e intensos, em 12,5 e 19,0 minutos, característicos de compostos puros. A fração foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 com o objetivo de isolamento dos picos observados. Foram coletadas desta coluna 70 frações em volume de 10 mL, utilizando-se MeOH como eluente. Desse procedimento foram obtidos três grupos de frações reunidas por CCDS comparativa (TABELA 2.21, pág. 46).

**TABELA 2.21** Reunião das frações provenientes do fracionamento em Sephadex LH-20 de F4A

Reunião	Fração	Massa (mg)
R1	1-10	50,0
R2	11-30	90,0
R3	31-70	40,0

Dentre as reuniões descritas apenas a R2 foi submetida a procedimentos posteriores por apresentar melhor perfil cromatográfico em CCDS. As reuniões R1 e R3 foram avaliadas por CLAE.

#### 2.2.5.4 Fracionamento de R2 proveniente do extrato F4A

Na tentativa de purificação, foi feita uma nova coluna de Sephadex LH-20 com a R2 (90,0 mg). Desta coluna foram obtidas 29 frações coletadas em volumes de 10 mL, reunidas em três subreuniões (TABELA 2.22).

**TABELA 2.22** Reunião das frações provenientes do fracionamento em Sephadex LH-20 de R2

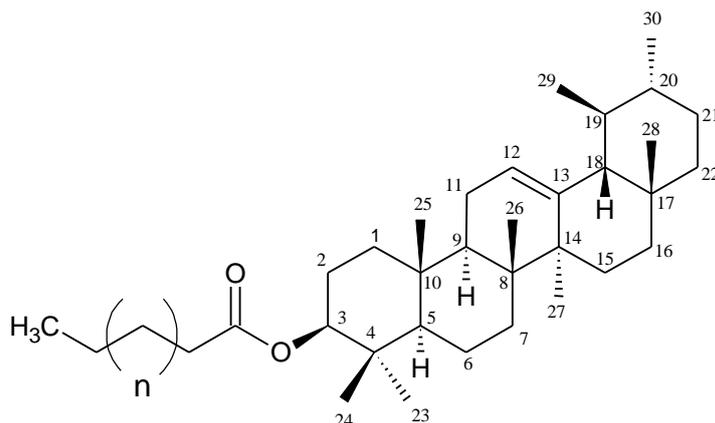
Reunião	Fração	Massa (mg)
R4	1-6	10,0
R5	7-9	5,0
R6	10-29	40,0

A subreunião R5 (5,0 mg) apresentou-se com uma coloração vermelha intensa. A amostra quando avaliada por CLAE, cuja pureza foi sugerida por CCDS, apresentou absorção característica de um flavonóide. R5 foi analisada por RMN de 200 MHz, mas, entretanto, a quantidade da amostra não foi suficiente para obtenção do espectro. R5 foi analisada também por espectroscopia de massas (ESI), o que permitiu obter a massa da substância. Desta forma, a determinação estrutural de R5 será conduzida quando for obtido o espectro de RMN da amostra.

## CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Plectranthus neochilus* Schltr.

#### 3.1.1 PN1: $\alpha$ -amirina esterificada



A substância **PN1** foi isolada do extrato hexânico das folhas e caules, apresentando-se como um sólido branco e, quando submetida ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou coloração rósea, resultado positivo para triterpenos.

O espectro de IV (FIGURA 3.1) mostra bandas em 1465 e 1373  $\text{cm}^{-1}$ , características de deformação angular de C-H, em 2948 e 2880  $\text{cm}^{-1}$ , bandas características de estiramento de C-H e uma banda em 1731  $\text{cm}^{-1}$ , referente a deformação axial de C=O de ésteres alifáticos (MIRANDA *et al*, 2007).

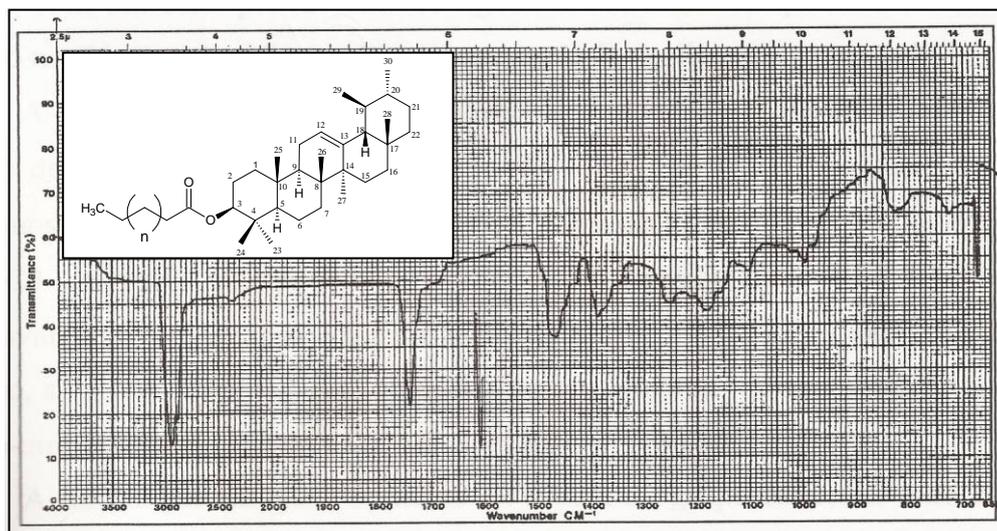
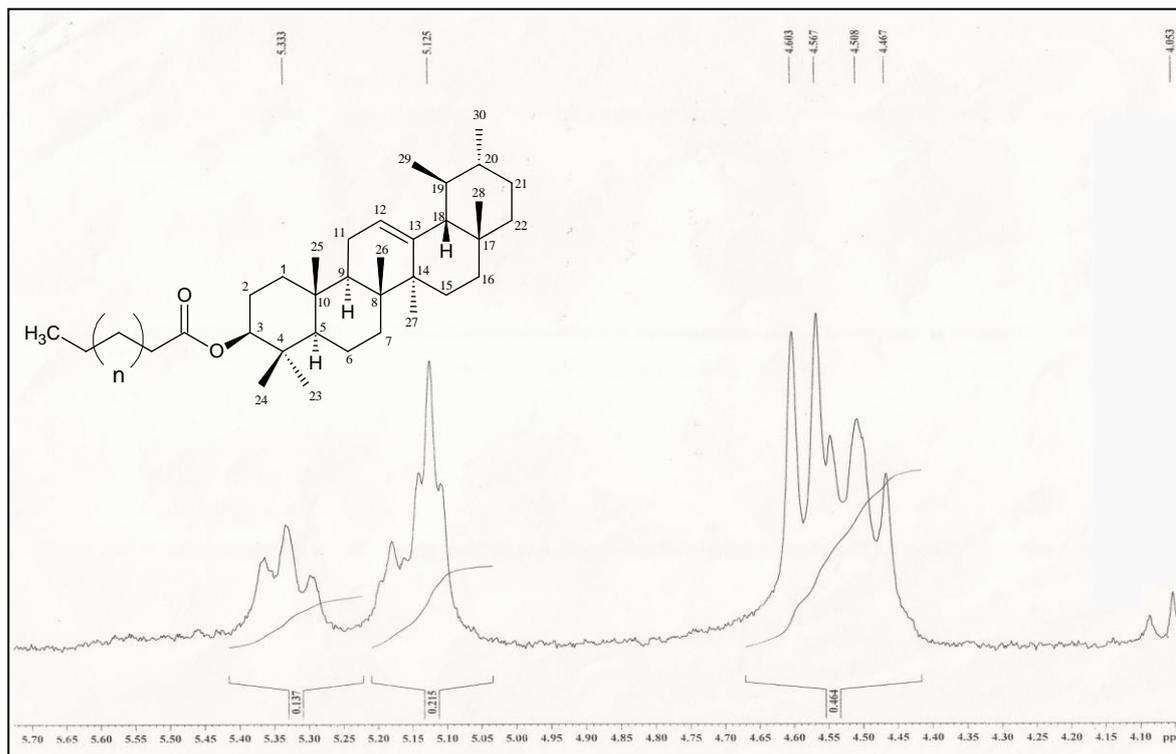
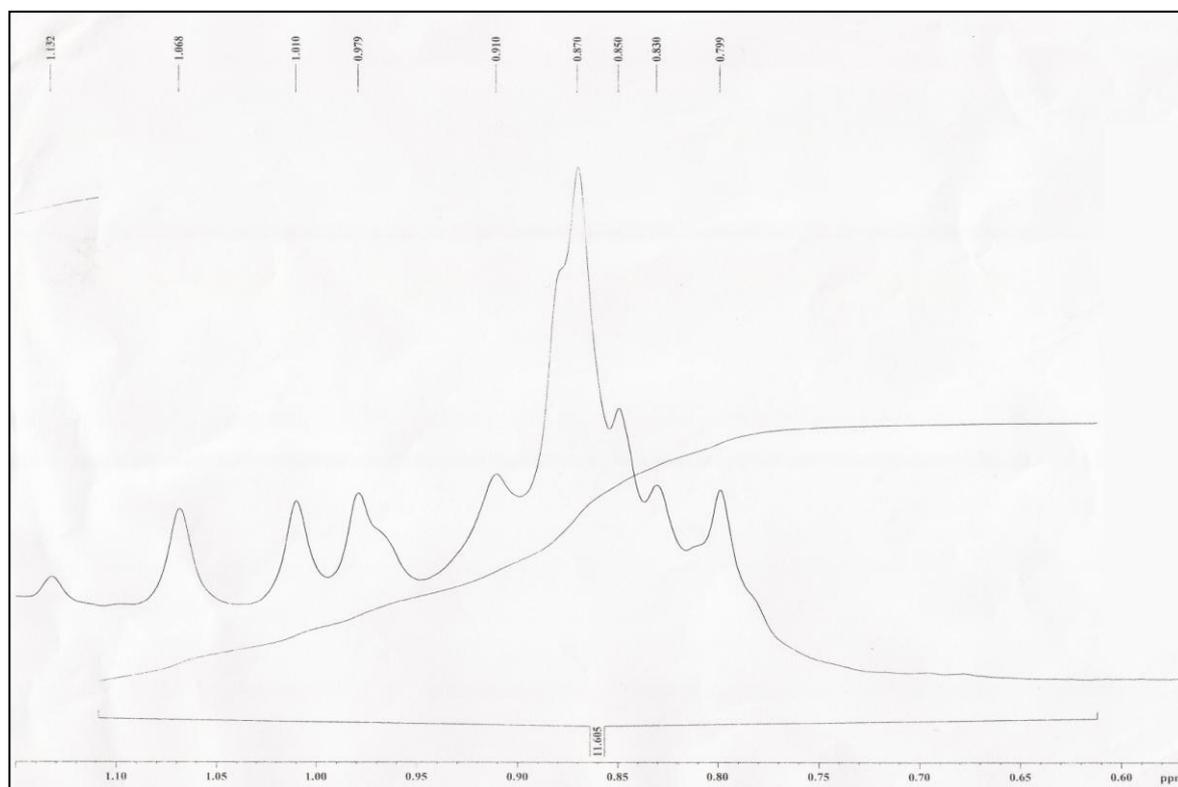


FIGURA 3.1 Espectro de absorção na região do IV de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) (NaCl).





**FIGURA 3.3** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).



**FIGURA 3.4** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).

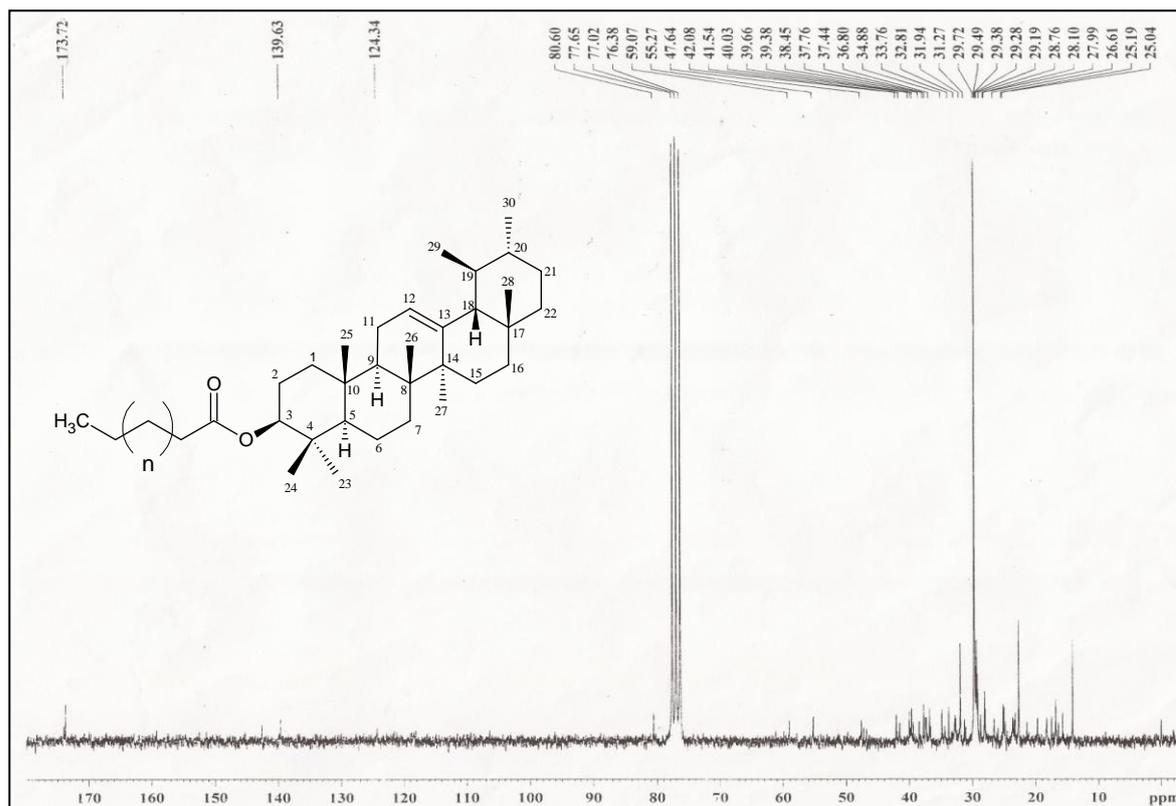


FIGURA 3.5 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).

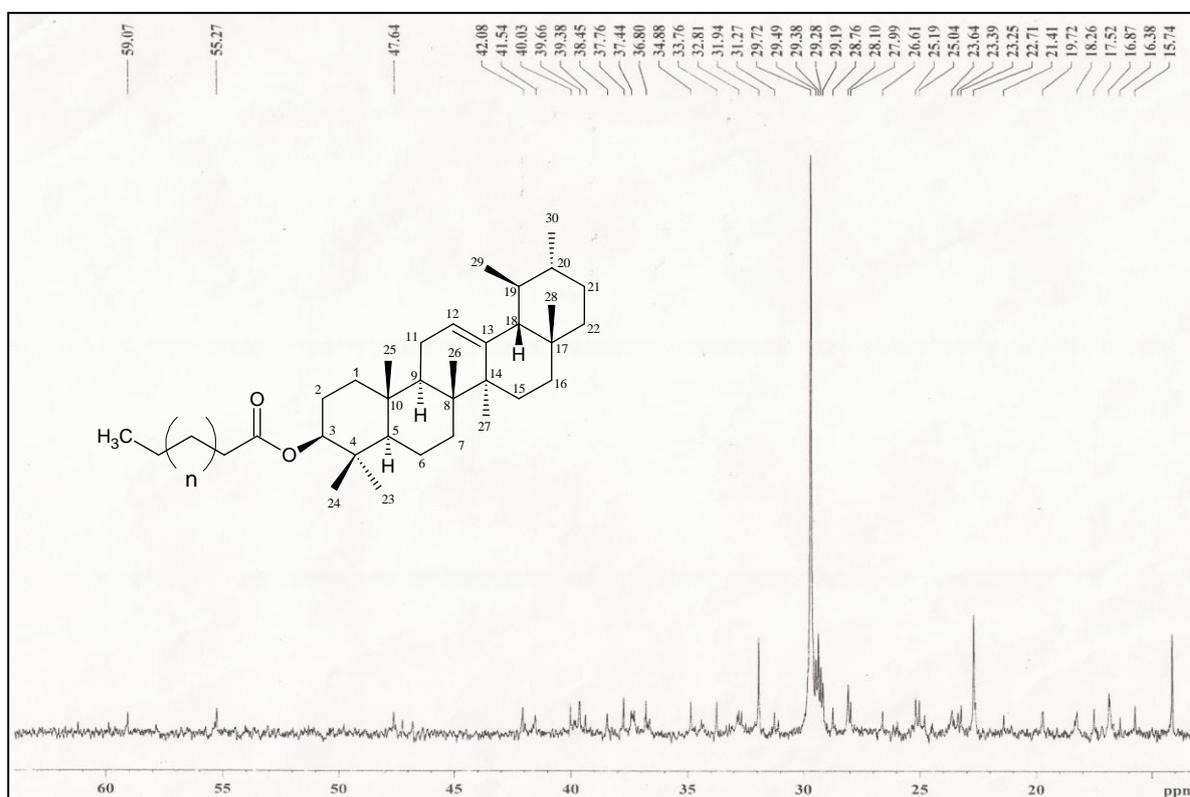


FIGURA 3.6 Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).

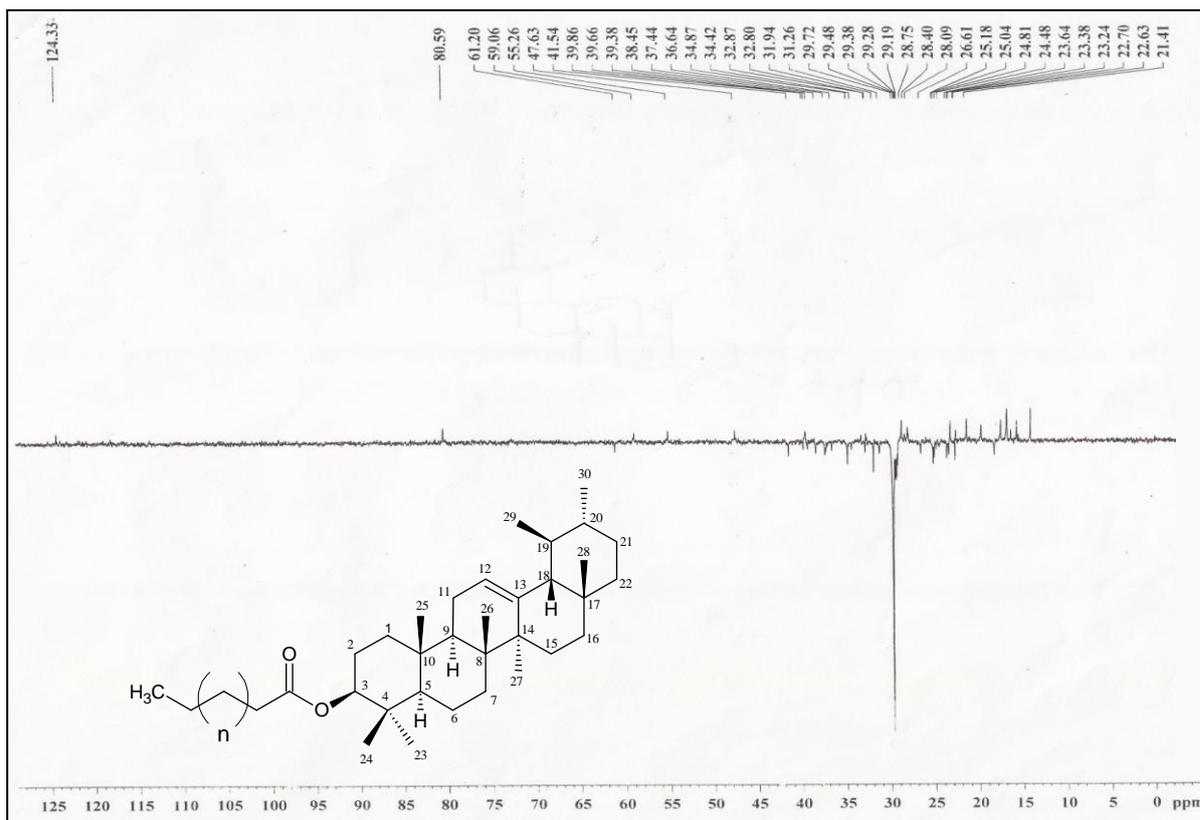
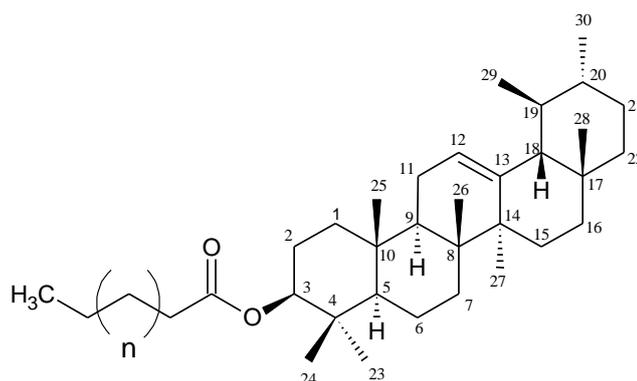


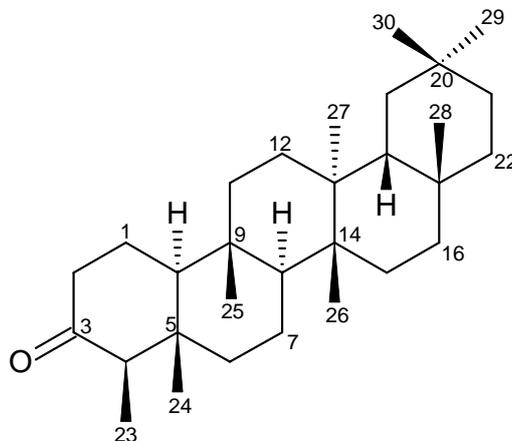
FIGURA 3.7 Subespectro DEPT-135 de PN1 ( $\alpha$ -amirina esterificada) (CDCl<sub>3</sub>; 50 MHz).

**TABELA 3.1** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PN1** com dados da literatura (MIRANDA *et al.*, 2007)

N	$\alpha$ -amirina	PN1
1	38,5	38,5
2	23,7	23,6
3	80,6	80,6
4	37,8	37,8
5	55,3	55,3
6	18,3	18,3
7	32,9	32,8
8	40,1	40,0
9	47,7	47,6
10	36,8	36,8
11	23,4	23,4
12	124,4	124,3
13	139,7	139,6
14	42,1	42,1
15	26,6	26,6
16	28,1	28,4
17	33,8	33,8
18	59,1	59,1
19	39,6	39,4
20	39,7	39,7
21	31,3	31,3
22	41,6	41,5
23	28,1	28,1
24	16,8	16,9
25	15,7	15,7
26	16,9	16,9
27	23,3	23,2
28	28,8	28,8
29	17,5	17,5
30	21,4	21,4

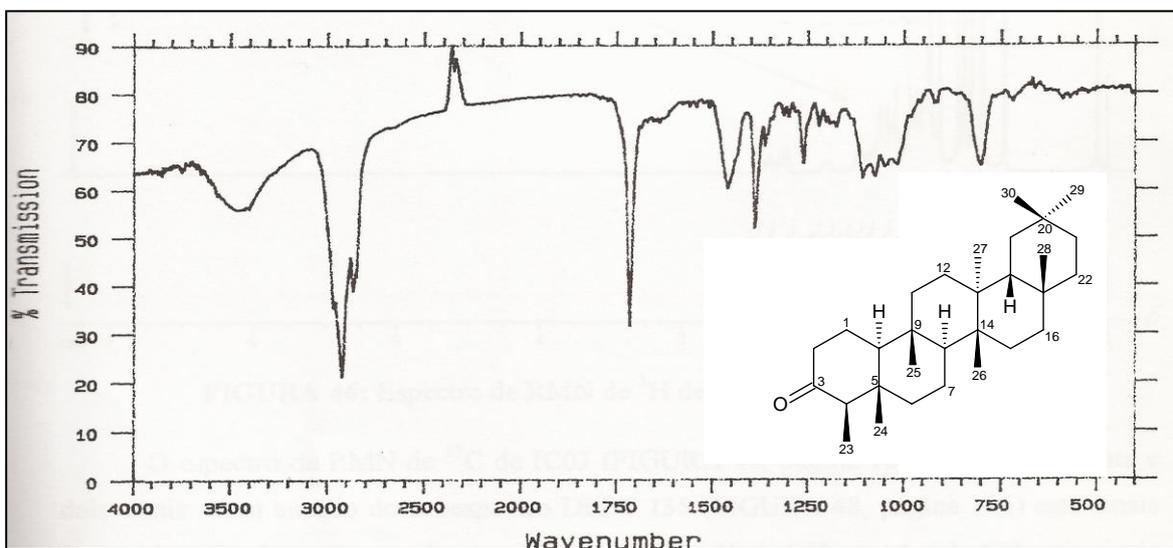


### 3.1.2 PN2: Friedelan-3-ona ou friedelina



**PN2** apresentou-se como um sólido branco e, quando submetida ao teste Liebermann-Burchard apresentou coloração rósea, resultado positivo para triterpenos pentacíclicos.

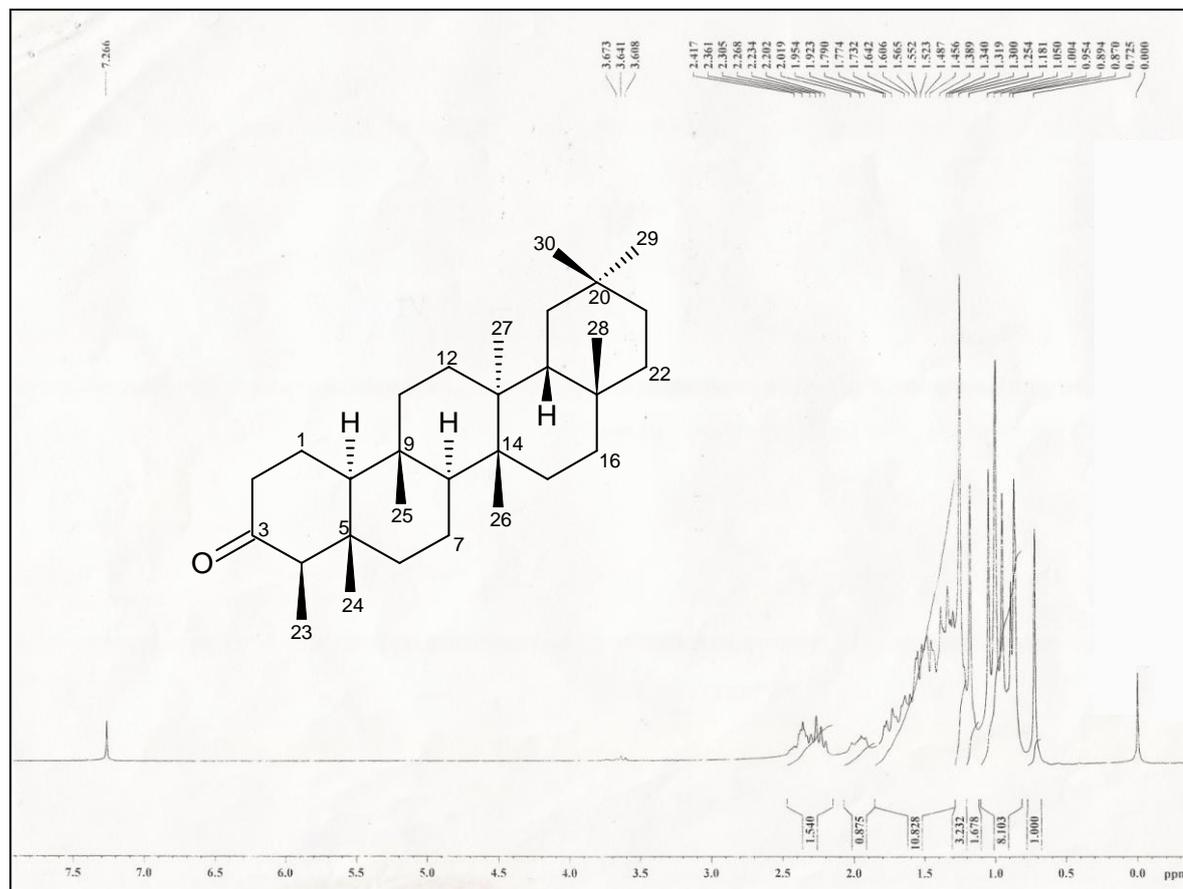
O espectro no infravermelho de **PN2** (FIGURA 3.8) apresenta bandas de absorção em 2980, 2910 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  (v C-H alifático e/ou alicíclica), 1720  $\text{cm}^{-1}$  (v C=O de cetona) e 1460, 1390  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H alifático e/ou alicíclica) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).



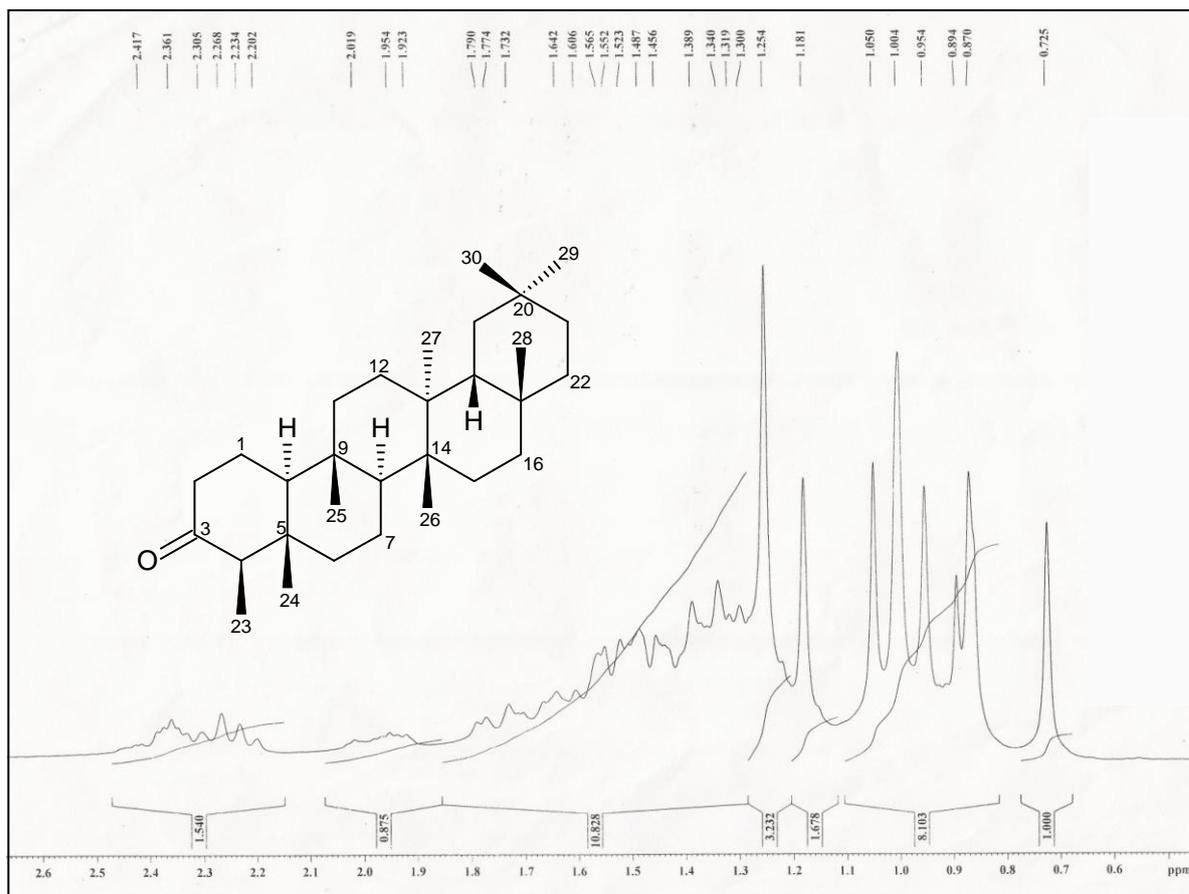
**FIGURA 3.8** Espectro de absorção na região do IV de **PN2** (friedelina) (KBr).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **PN2** e sua expansão (FIGURA 3.9 e 3.10 respectivamente, págs. 54 e 55) observa-se a presença de simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,73; 0,87; 0,95; 1,00; 1,01; 1,05 e 1,18, que foram atribuídos a sete grupos metila ligados a átomos de carbono não hidrogenados. Observou-se também outros sinais, um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,87 ( $J = 6,5$  Hz),

um multiplete em  $\delta_H$  1,97, um quarteto em  $\delta_H$  2,23 ( $J = 6,5$  Hz), um multiplete em  $\delta_H$  2,30 e um duplo duplete em  $\delta_H$  2,40 ( $J = 13,8; 5,1; 1,9$  Hz), semelhantes aos relatados para a friedelina, correspondendo respectivamente, ao grupo metila 23, H1-axial, H4-axial, H2-equatorial e H2-axial, deste constituinte (MAHATO *et al.*, 1994).



**FIGURA 3.9** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN2 (friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).



**FIGURA 3.10** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN2 (friedelina) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **PN2** e sua expansão (FIGURA 3.11 e 3.12 respectivamente, pág. 56) mostram a presença de 32 sinais. Através do subespectro DEPT-135 (FIGURA 3.13, pág. 57) estes sinais foram identificados como nove metílicos ( $\text{CH}_3$ ), doze metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), quatro metínicos ( $\text{CH}$ ), seis sinais de átomos de carbono não hidrogenados e um sinal de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  213,3. Dois destes sinais ( $\delta_{\text{C}}$  14,1 e 30,0) foram atribuídos a contaminantes presentes na amostra.

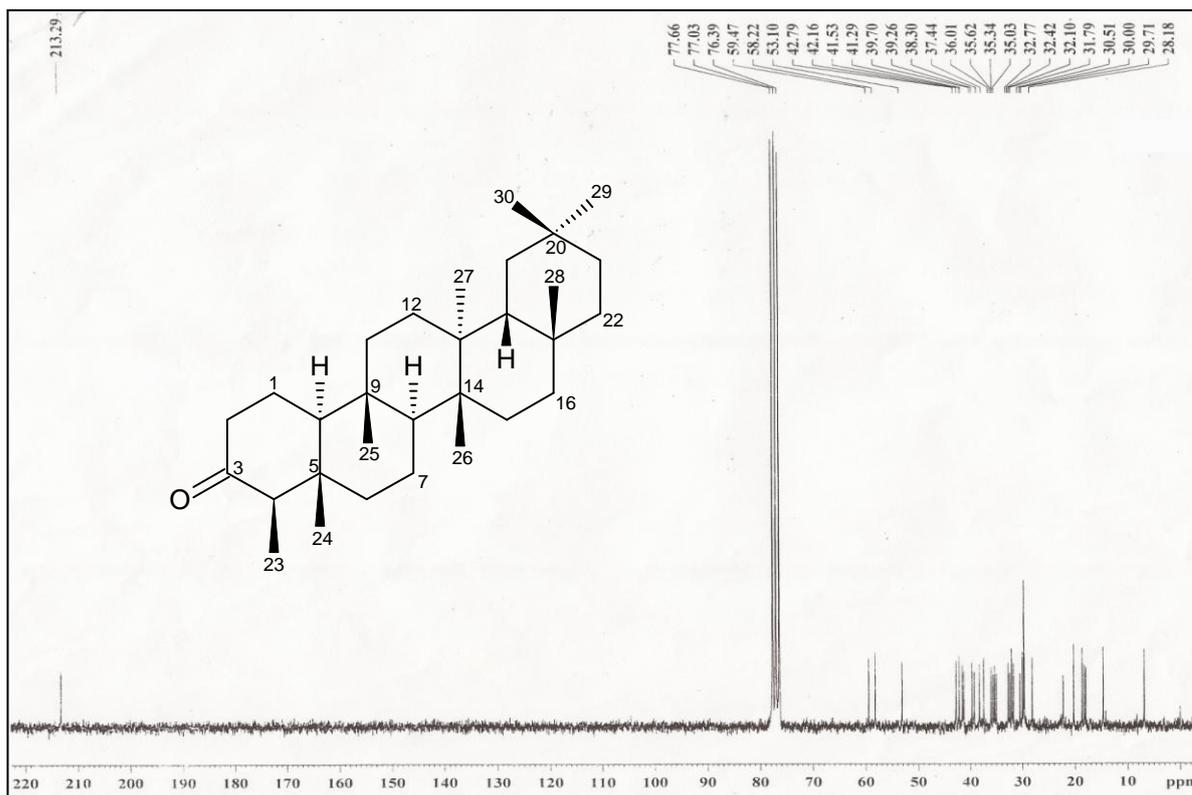


FIGURA 3.11 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de PN2 (friedelina) (CDCl<sub>3</sub>; 50 MHz).

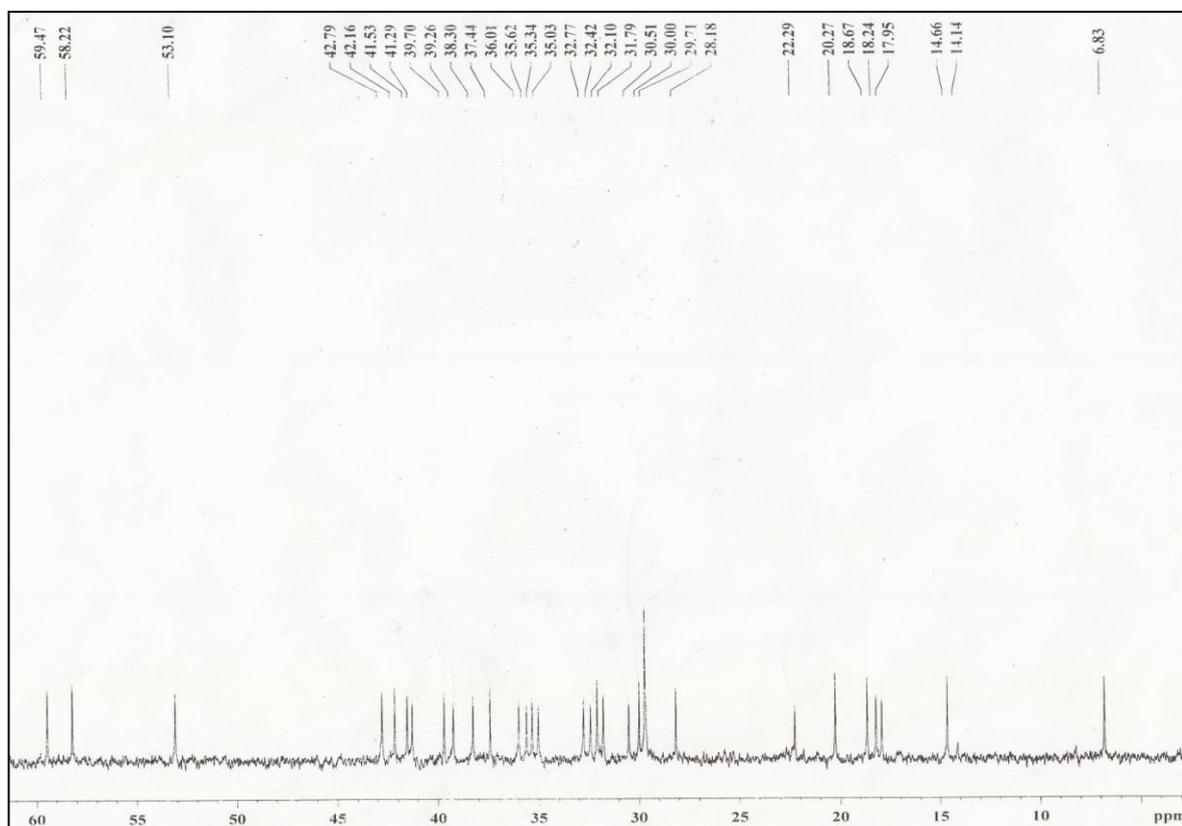
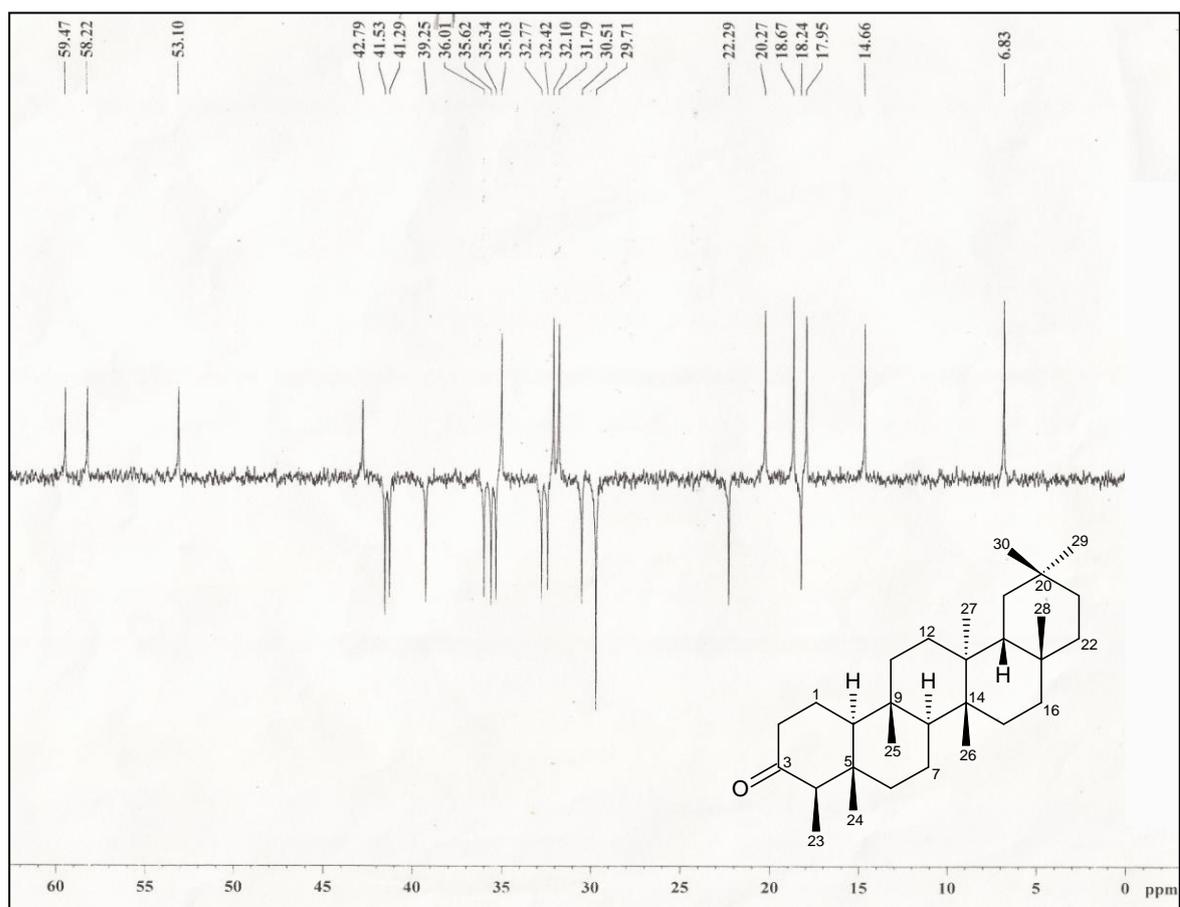


FIGURA 3.12 Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de PN2 (friedelina) (CDCl<sub>3</sub>; 50 MHz).

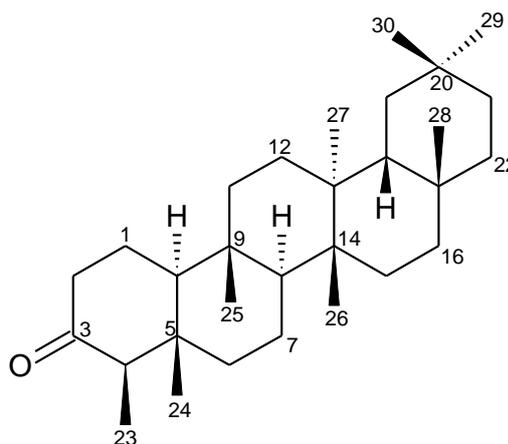


**FIGURA 3.13** Subespectro DEPT-135 de PN2 (friedelina) (CDCl<sub>3</sub>; 50 MHz).

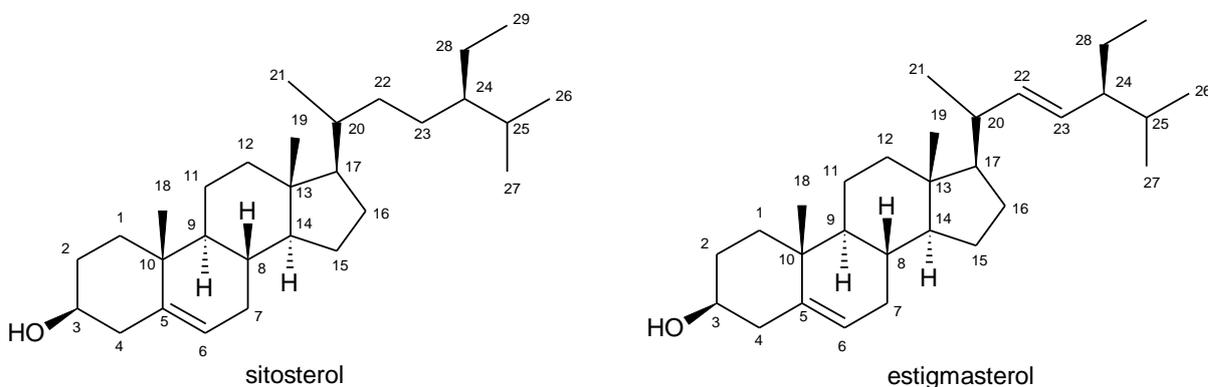
Os sinais encontrados para **PN2** em relação ao espectro de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H quando comparados com dados da literatura (MAHATO *et al.*, 1994) (TABELA 3.2, pág. 58), confirmaram a identidade desta estrutura, se tratando da Friedelan-3-ona ou conhecida como friedelina, um triterpeno pentacíclico.

**TABELA 3.2** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de **PN2** com dados da literatura (MAHATO *et al.*, 1994)

N	Friedelina ( $\delta_{\text{C}}$ )	PN2 ( $\delta_{\text{C}}$ )
1	22,3	22,3
2	41,5	41,5
3	213,2	213,3
4	58,2	58,2
5	42,1	42,2
6	41,3	41,3
7	18,2	18,2
8	53,1	53,1
9	37,4	37,4
10	59,4	59,5
11	35,6	35,6
12	30,5	30,5
13	39,7	39,7
14	38,3	38,3
15	32,4	32,8
16	36,0	36,0
17	30,0	29,7
18	42,8	42,8
19	35,3	35,3
20	28,1	28,2
21	32,7	32,4
22	39,2	39,3
23	6,8	6,8
24	14,6	14,7
25	17,6	17,9
26	20,2	20,3
27	18,6	18,7
28	32,1	32,1
29	35,0	35,0
30	31,8	31,8



### 3.1.3 PN3: Mistura de sitosterol e estigmasterol



**PN3** foi isolado do extrato hexânico e do extrato em acetato de etila. Em ambos os extratos, a mistura foi obtida com a eluição utilizando-se os solventes hexano:CHCl<sub>3</sub> (3:7).

**PN3** apresentou-se como um sólido de coloração branca e, quando submetido ao teste de Liebermam-Burchard, apresentou coloração verde, indicativa da natureza esteroidal da amostra.

No espectro de infravermelho de **PN3** (FIGURA 3.14, pág. 60) observou-se bandas de absorção em 3410 cm<sup>-1</sup> (estiramento de ligação O-H), 2940 e 2890 cm<sup>-1</sup> (estiramento de ligação C-H alifática e/ou alicíclica), 1470 e 1380 cm<sup>-1</sup> (deformação angular C-H alifática e/ou alicíclica), 960 cm<sup>-1</sup> (deformação angular dupla trans-substituída) e em 800 cm<sup>-1</sup> (deformação angular de ligação dupla tri-substituída) (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

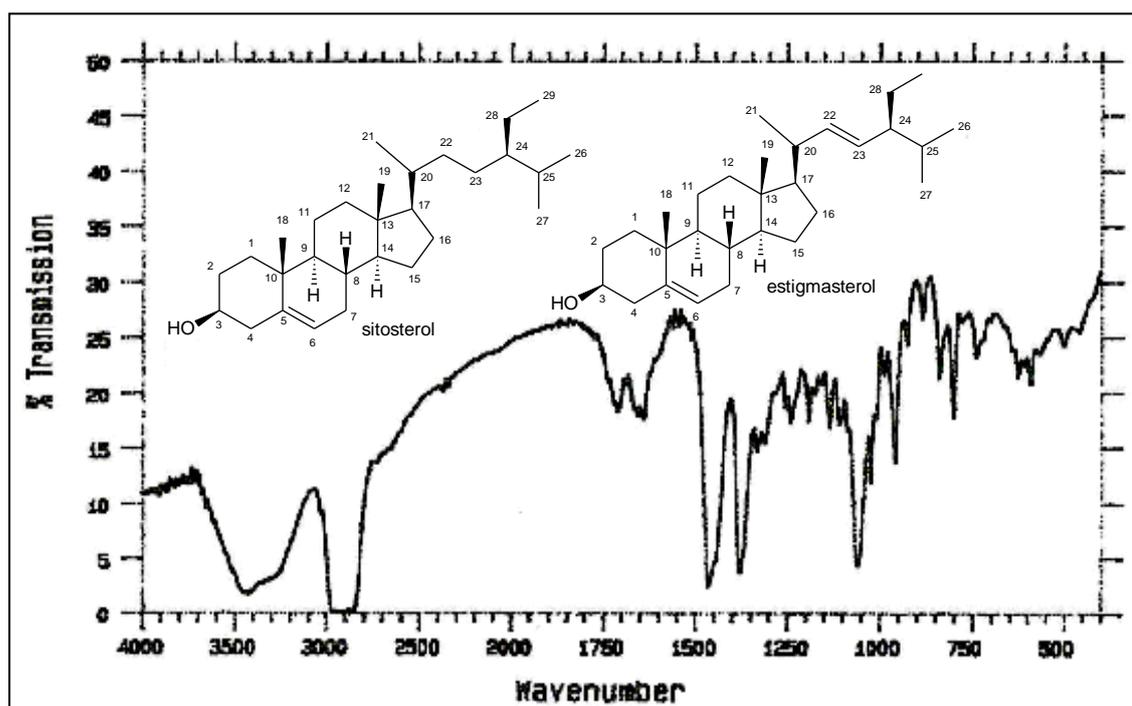


FIGURA 3.14 Espectro de absorção na região do IV de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) (KBr).

O sinal em  $\delta_H$  5,35 observado no espectro de RMN de  $^1H$  (FIGURA 3.15, pág. 61) foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 do átomo de carbono C6 e o sinal em  $\delta_H$  3,52 foi atribuído aos átomos de hidrogênio H-3 do carbono hidroxilado ( $CH-OH$ ). Um duplo duplete em  $\delta_H$  5,16 ( $J_{22-23} = 5,0$  Hz e  $J_{22-20} = 4,4$  Hz) foi atribuído ao H-22 do estigmasterol e um duplo duplete em  $\delta_H$  5,03 ( $J_{23-22} = 4,4$  Hz e  $J_{23-24} = 4,4$  Hz) atribuído ao H-23 do estigmasterol. Sinais entre  $\delta_H$  0,6 e  $\delta_H$  2,3 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos metila, metilênicos e metínicos de ambos os compostos.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  e de sua expansão (FIGURA 3.16 e 3.17 respectivamente, pág. 61 e 62), os sinais em  $\delta_C$  140,8 e  $\delta_C$  121,7 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínicos C-5 e C-6 das duas estruturas e os sinais em  $\delta_C$  138,3 e  $\delta_C$  129,3 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínicos C-22 e C-23 do estigmasterol. O sinal em  $\delta_C$  71,8 foi atribuído ao átomo de carbono carbinólico C-3 ( $CH-OH$ ). Os valores encontrados para os carbono olefínico. Desta forma sugerem a presença da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol em **PN3**. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (FIGURA 3.18, pág. 62) foi possível confirmar a presença do átomo de carbono não hidrogenado C-5.

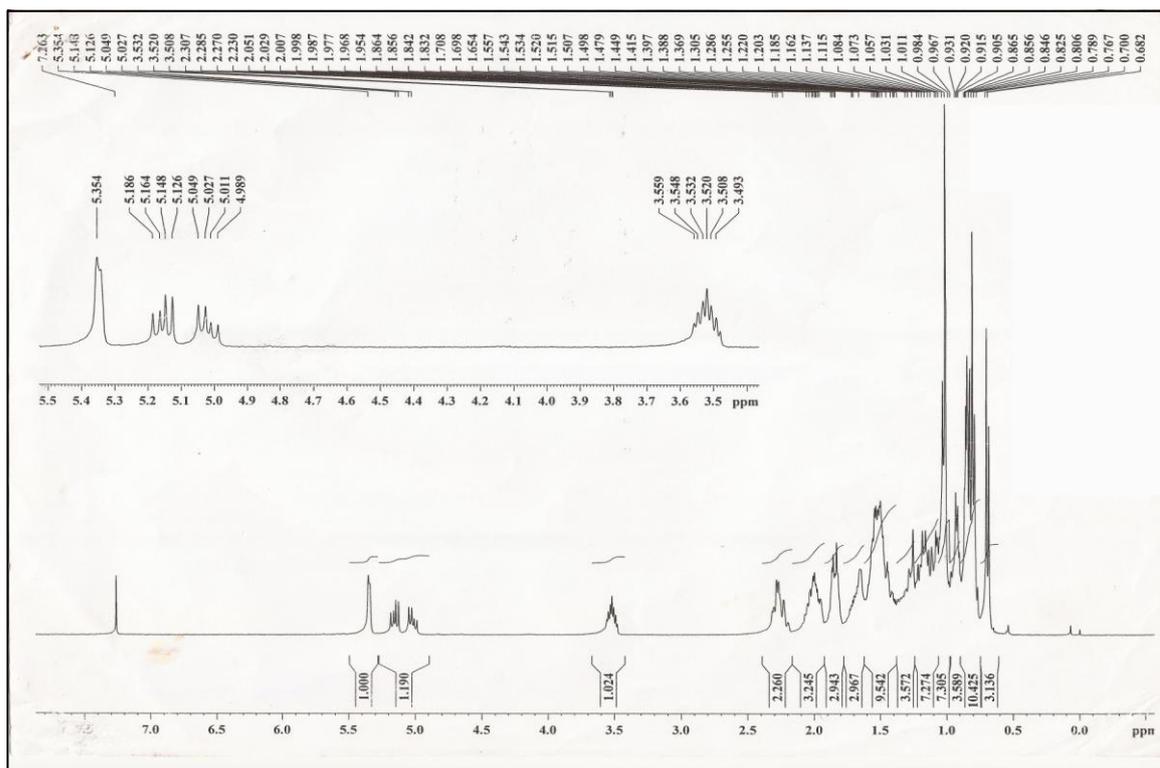


FIGURA 3.15 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz).

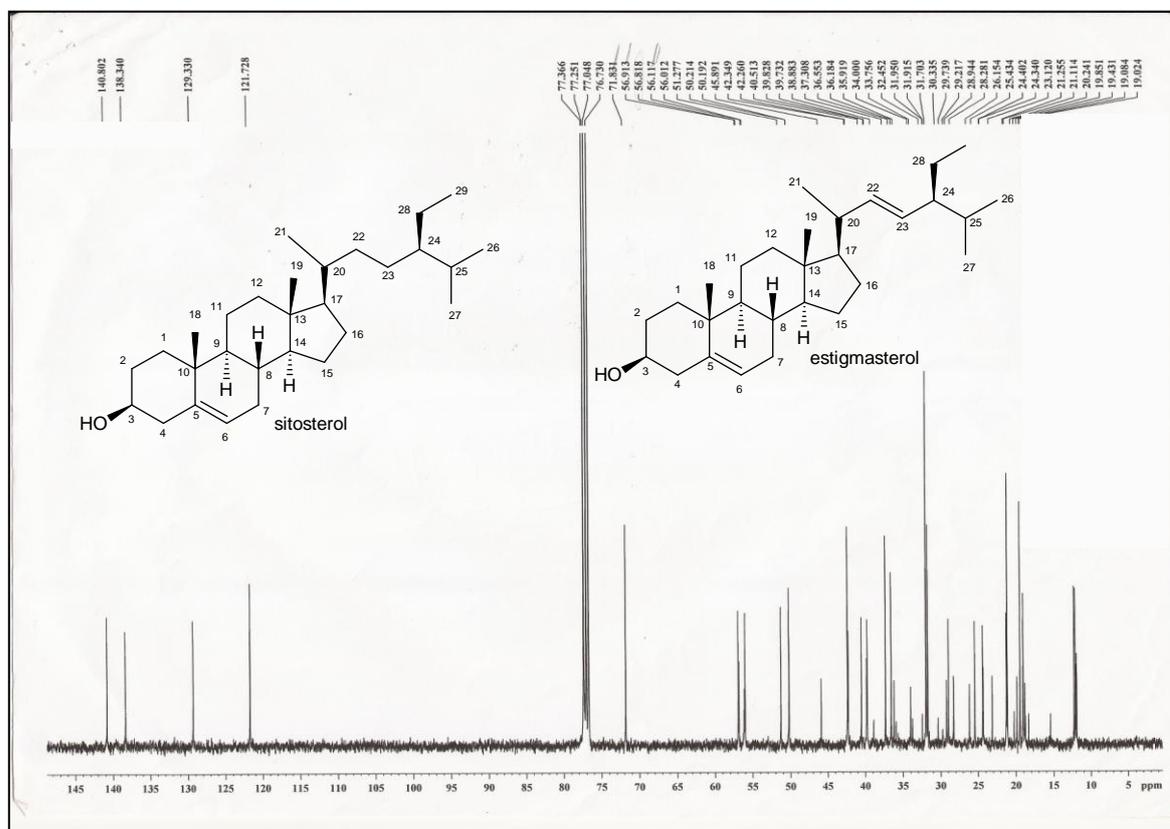


FIGURA 3.16 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).

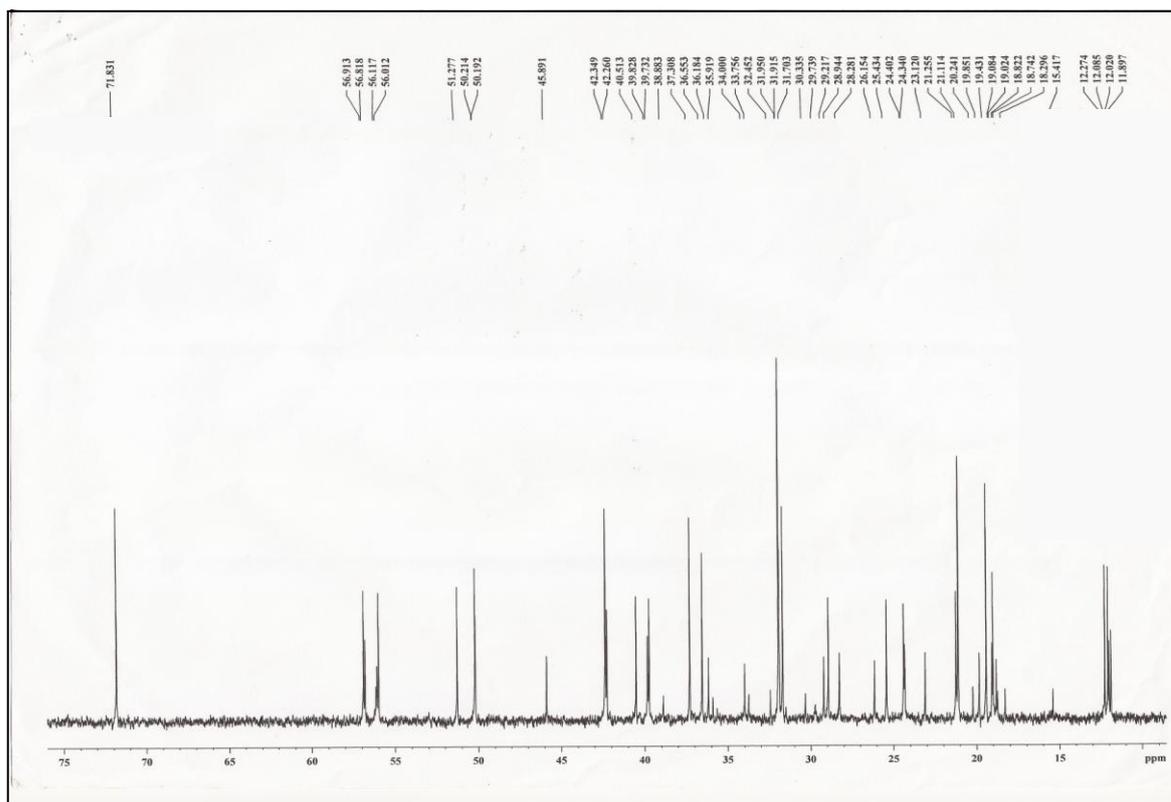


FIGURA 3.17 Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).

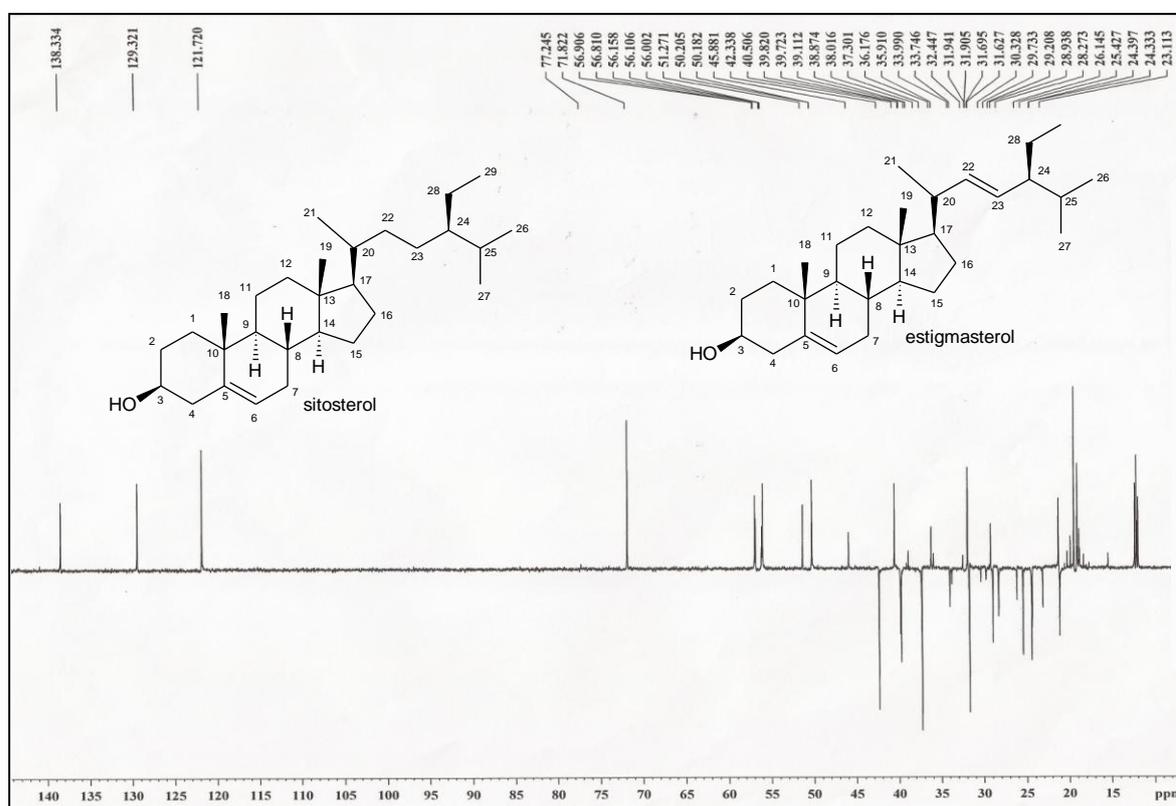
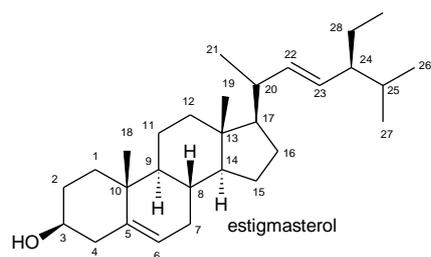
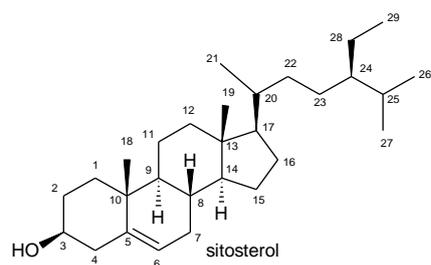


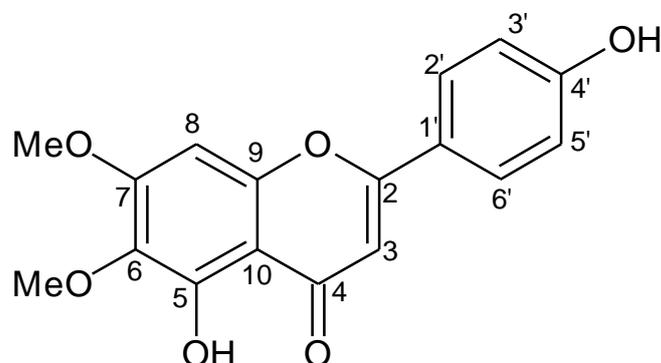
FIGURA 3.18 Subespectro DEPT-135 de PN3 (Mistura de sitosterol e estigmasterol) ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz).

**TABELA 3.3** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PN3** com dados da literatura (GALOTTA, 2005)

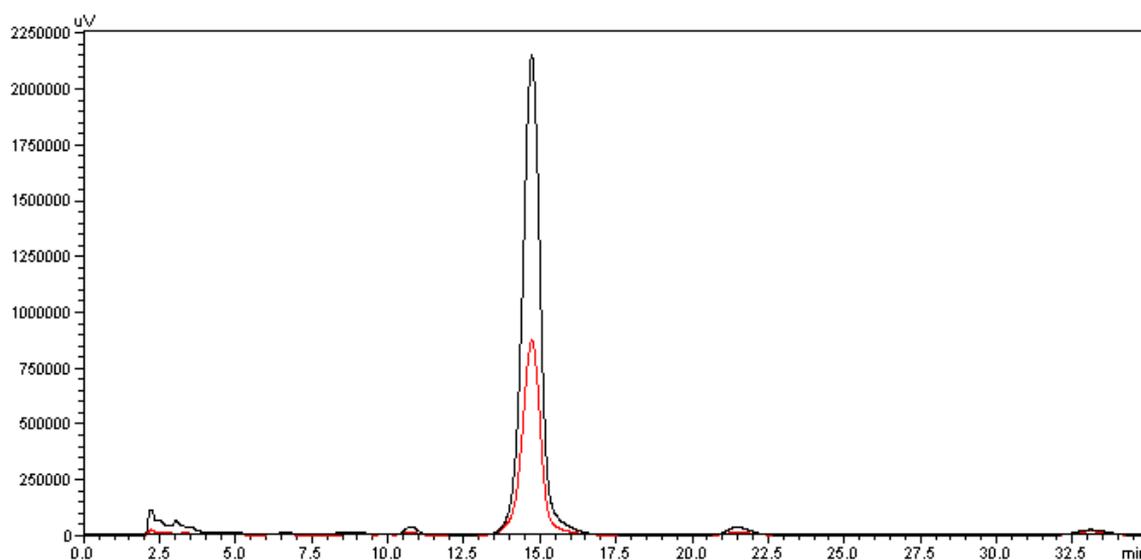
N	sitosterol	PN3	Estigmasterol	PN3
C	( $\delta_{\text{C}}$ )	( $\delta_{\text{C}}$ )	( $\delta_{\text{C}}$ )	( $\delta_{\text{C}}$ )
1	37,3	37,3	37,3	37,3
2	31,6	31,7	31,6	31,7
3	71,8	71,8	71,8	71,8
4	42,3	42,3	42,3	42,3
5	140,8	140,8	140,8	140,8
6	121,7	121,7	121,7	121,7
7	31,9	31,9	31,9	31,9
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,2	50,1	50,2
10	36,5	36,5	36,5	36,5
11	21,1	21,1	21,1	21,1
12	39,8	39,8	39,7	39,7
13	42,3	42,3	42,3	42,3
14	56,8	56,8	56,8	56,9
15	24,3	24,3	24,4	24,4
16	28,3	28,3	28,3	28,3
17	56,0	56,1	55,9	56,0
18	11,9	11,9	11,9	12,0
19	19,4	19,4	19,4	19,4
20	36,1	36,2	40,5	40,5
21	19,0	19,0	21,2	21,2
22	33,9	34,0	138,3	138,3
23	26,0	26,1	129,3	129,3
24	45,8	45,5	51,2	51,3
25	29,0	28,9	31,9	31,9
26	19,8	19,8	19,0	19,1
27	19,0	18,8	19,0	18,7
28	23,1	23,1	25,4	25,4
29	12,0	12,1	12,3	12,3



### 3.1.4 PN4: 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina)

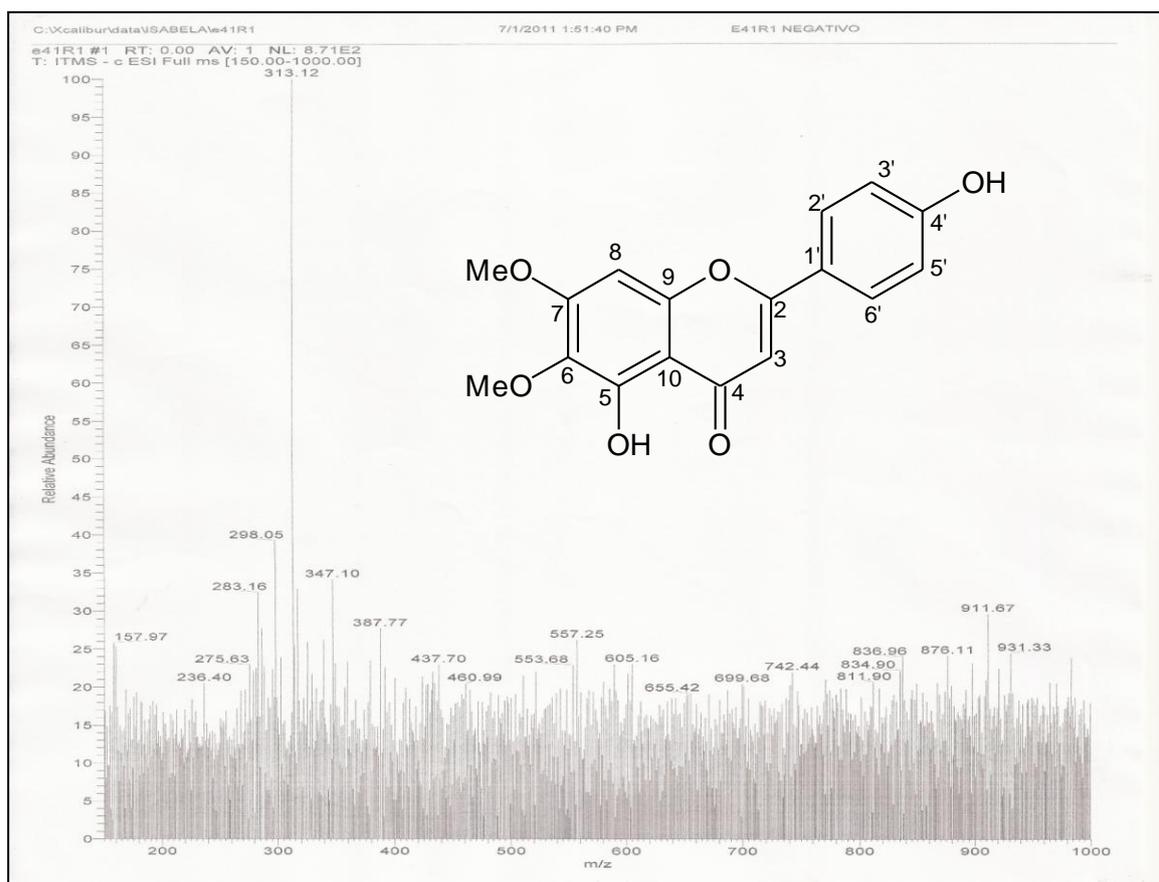


PN4 foi analisado por CLAE em condições para flavonóides e, apresentou absorção de energia nos  $\lambda$  280 e 370 nm (FIGURA 3.19), característico de flavonóides (HARBONE, 1984).



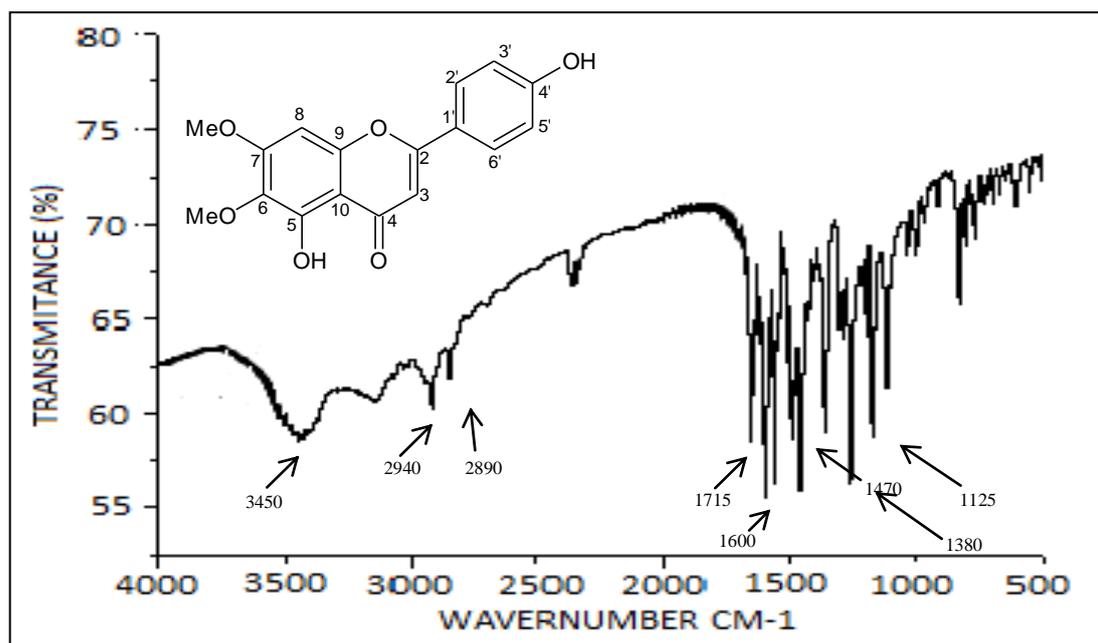
**FIGURA 3.19** Cromatograma obtido por CLAE do composto PN4 (5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona). Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto) e Ch2 a 370 nm (vermelho). Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 $\mu$ m (NST); fluxo de 0,700 mL/min; volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5; Isocratico A/B (60:40) em 35 min.

Através da espectrometria de massas com ionização por eletrospray (modo negativo), foi possível obter a massa molecular do composto (FIGURA 3.20, pág. 65), correspondendo a 314 g/mol, pois como foi realizada a análise no modo negativo, houve uma desprotonação da molécula, onde no espectro apresentou-se 313 g/mol.



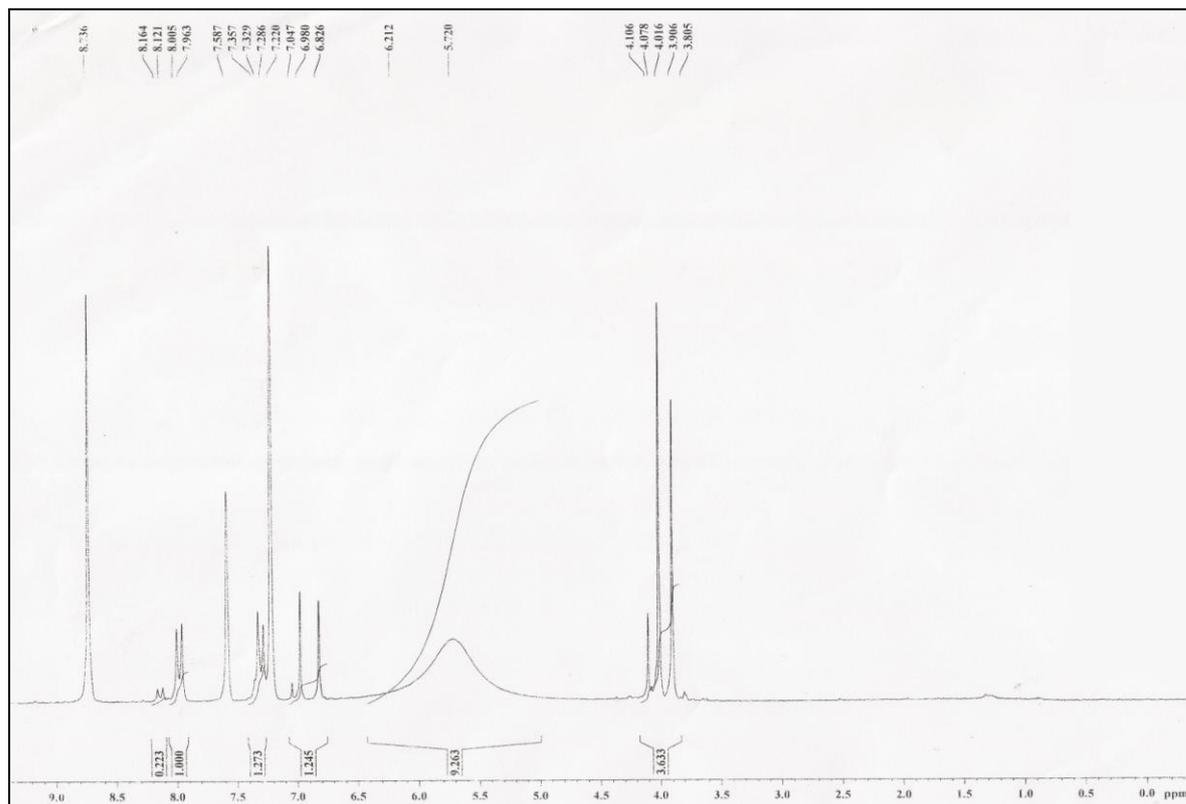
**FIGURA 3.20** Espectro de ESI do composto PN4 (5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona).

O espectro no infravermelho (FIGURA 3.21, pág. 66) mostra bandas de absorção em  $3450\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação O-H),  $2940$  e  $2890\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação C-H alifática e/ou alicíclica),  $1470$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$  (deformações de ligação C-H alifática e/ou alicíclica),  $1600$  e  $1470\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação C=C de aromáticos),  $1715\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação C=O),  $1125\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação C-O-C) (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

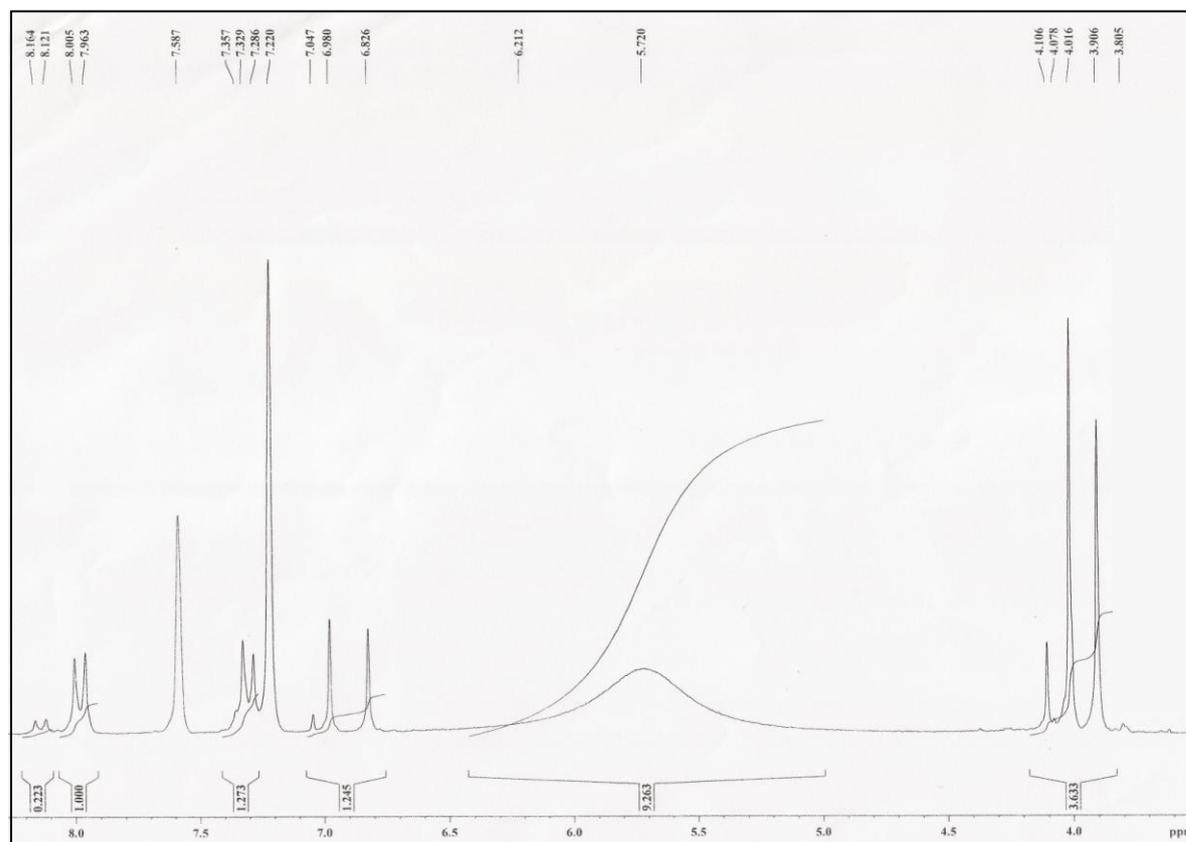


**FIGURA 3.21** Espectro de absorção na região do IV de PN4 (5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona) (KBr).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e sua expansão (FIGURA 3.22 e 3.23 respectivamente, pág. 67) mostram os dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 e 6,98, que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-3 e H-8. Os simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,91 e 4,02 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos metila ligados as posições 6 e 7 do anel A da flavona. Um duplete registrado em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 ( $J= 10$  Hz) foi atribuído a H-3' e H-5' e o registrado em  $\delta_{\text{H}}$  7,98 ( $J= 10$  Hz) atribuído à H-2' e H-6'. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,22 e 7,59 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio residuais da piridina. Até o momento não foram obtidos os mapas de contornos de **PN4** que possibilitaria atribuir de maneira inequívoca os sinais dos átomos de hidrogênio das metoxilas em C-6 e C-7.

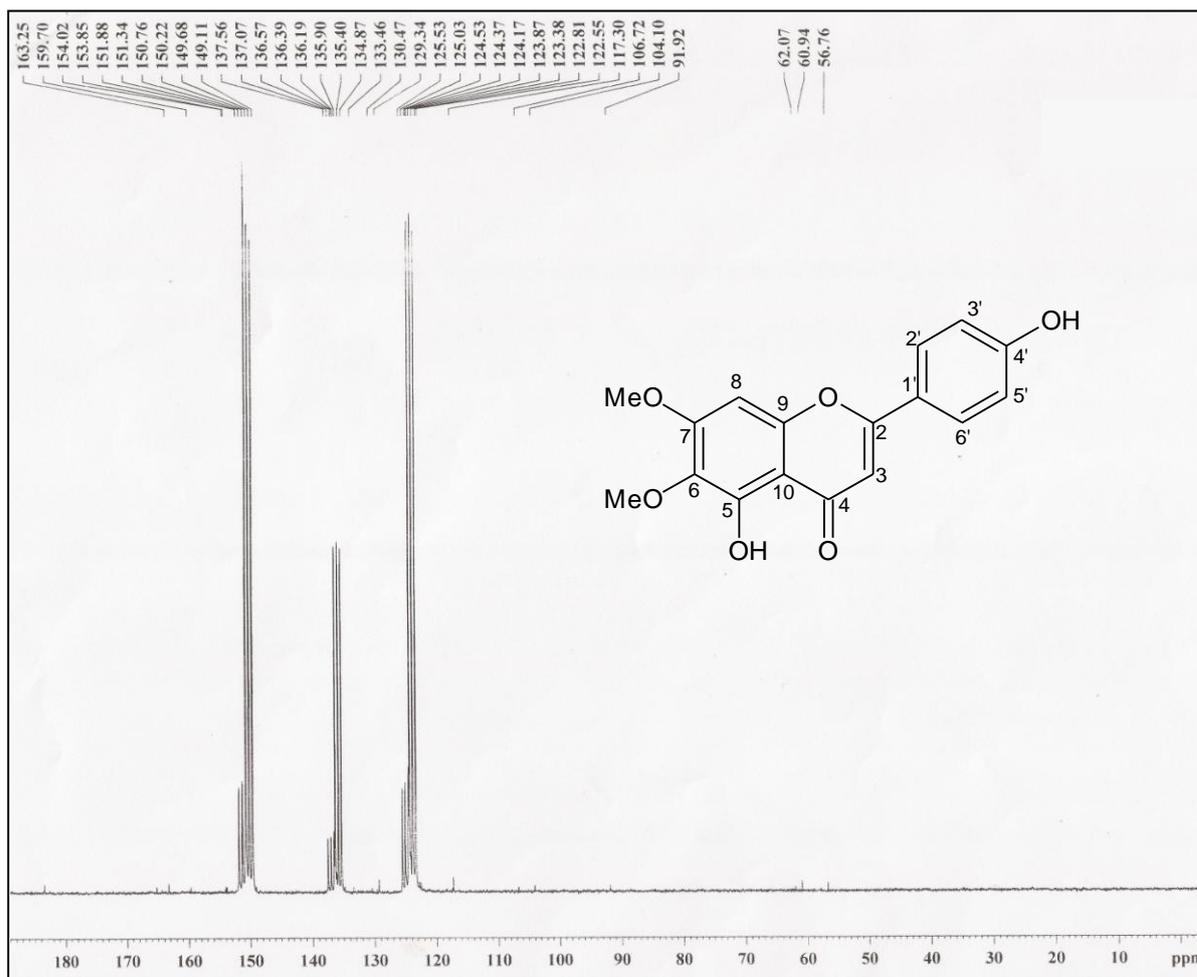


**FIGURA 3.22** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN4 (5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; 200 MHz).

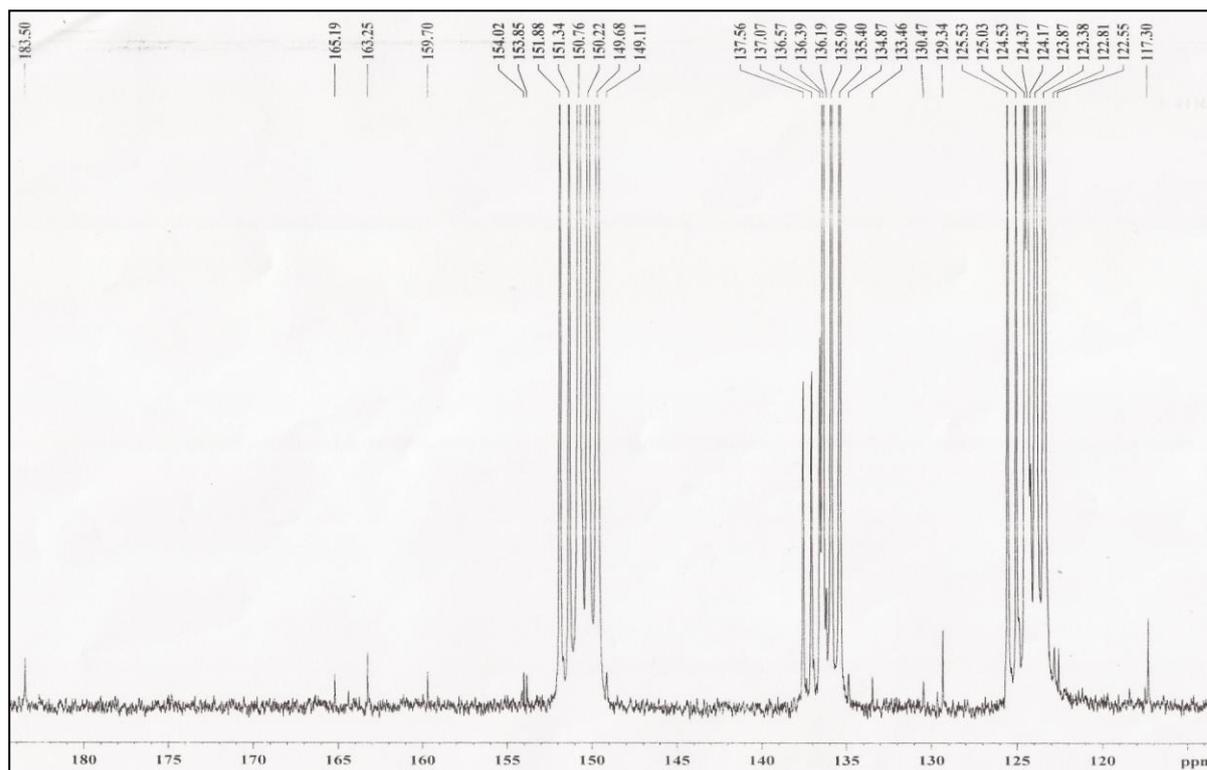


**FIGURA 3.23** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN4 (5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; 200 MHz).

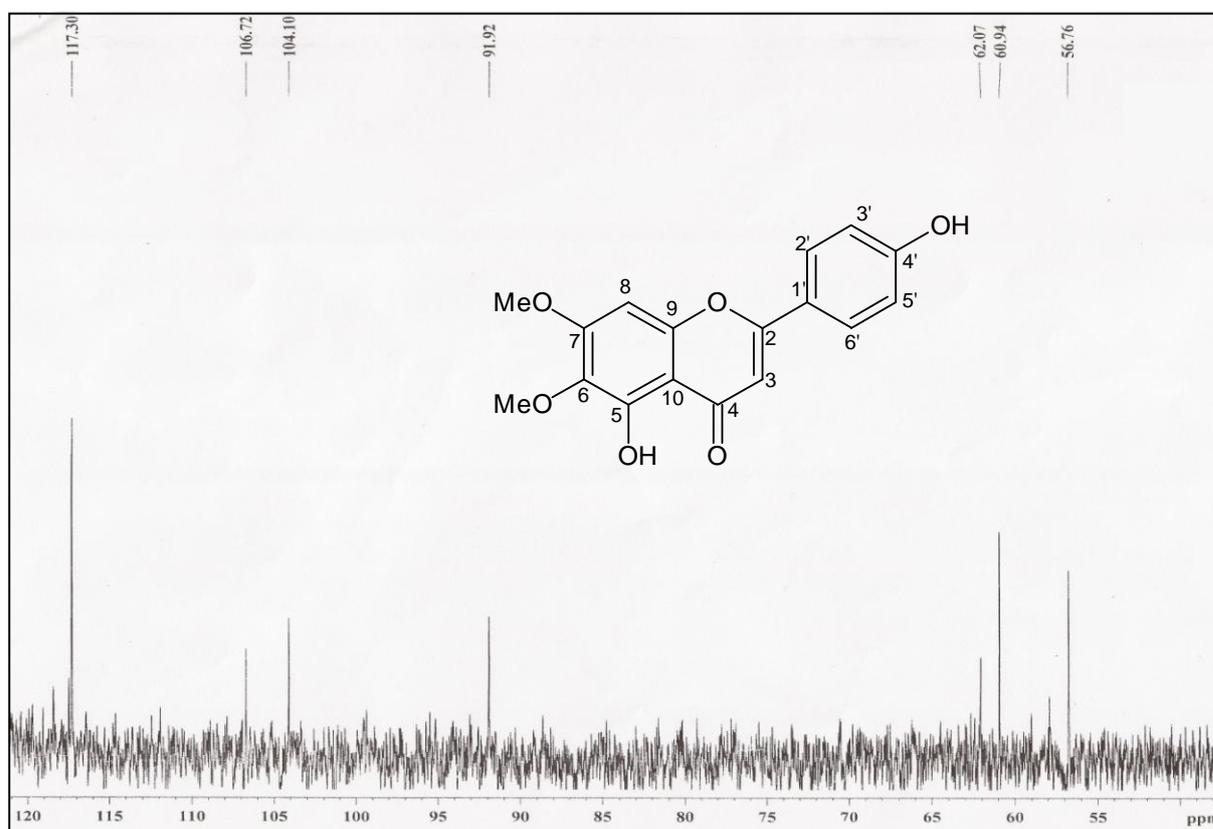
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.24) e suas expansões (FIGURA 3.25 e 3.26, pág. 69) mostra o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  183,5 atribuído ao átomo de carbono C-4 da carbonila (C=O) do anel aromático C. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  133,5 e 159,7 foram atribuídos aos átomos de carbono C-6 e C-7, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  56,8 e 60,9 foram atribuídos aos átomos de carbono metílicos das metoxilas nas posições C-6 e C-7, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  154,0 e 163,2 foram atribuídos aos átomos de carbono hidroxilados C-5 e C-4' (C-OH) e  $\delta_{\text{C}}$  129,3 e 117,3 atribuídos aos átomos de carbono metínicos (C-2' e C-6') e (C3' e C-5') respectivamente, que apresentam o mesmo ambiente químico e, conseqüentemente, sobreposição desses sinais. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  104,1 e 91,9 foram atribuídos aos demais átomos de carbono metínicos C-3 e C-8. Com o auxílio do subspectro DEPT-135 (FIGURAS 3.27 e 3.28, pág. 70) foi possível confirmar a presença dos átomos de carbono metínicos, metílicos e não hidrogenados. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  124,2; 136,2 e 150,6 foram atribuídos ao solvente.



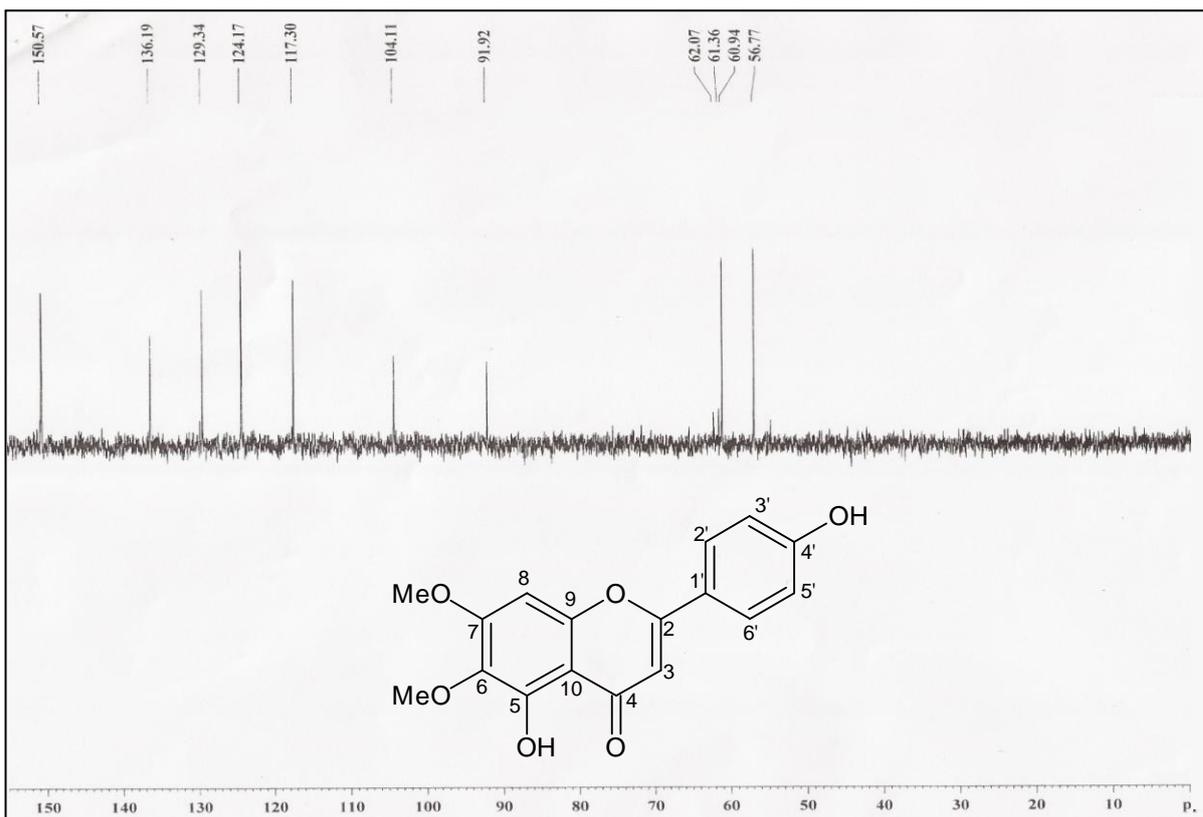
**FIGURA 3.24** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; 50 MHz).



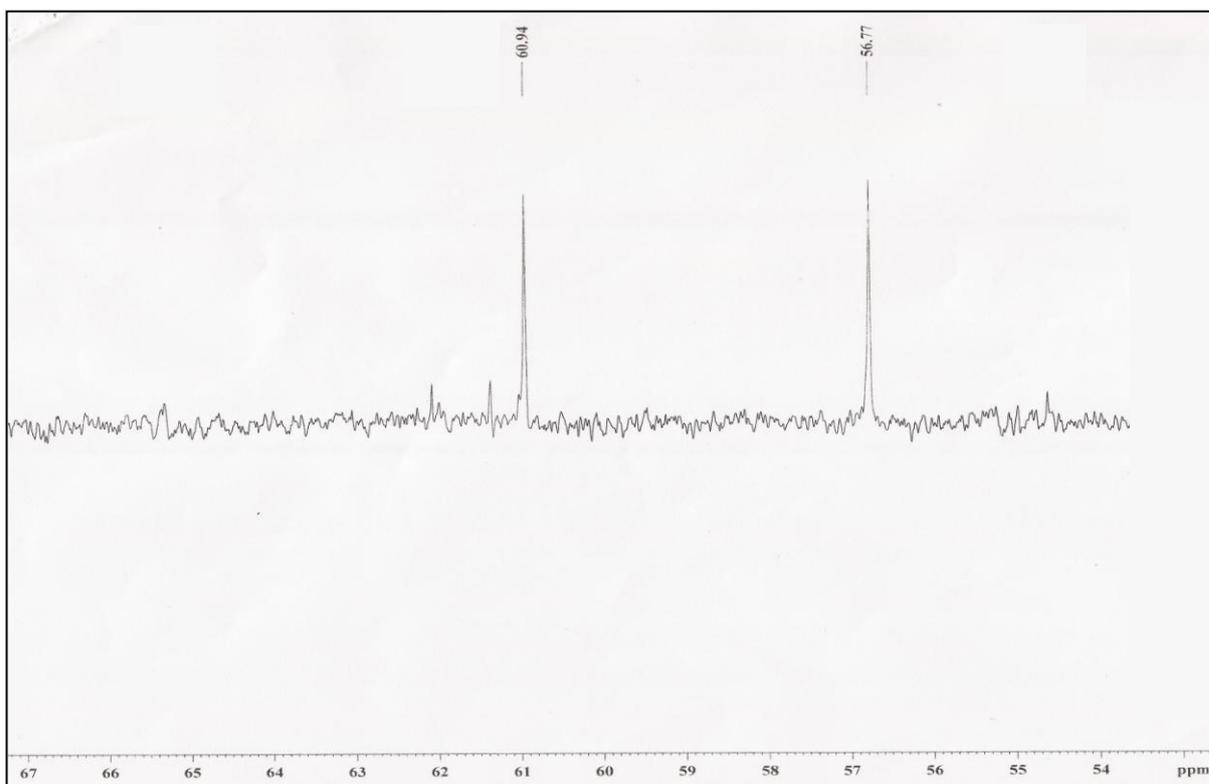
**FIGURA 3.25** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (5,4'-diidroxiflavona) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; 50 MHz).



**FIGURA 3.26** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PN4 (5,4'-diidroxiflavona) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; 50 MHz).



**FIGURA 3.27** Subespectro DEPT de PN4 (5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N; 50 MHz).

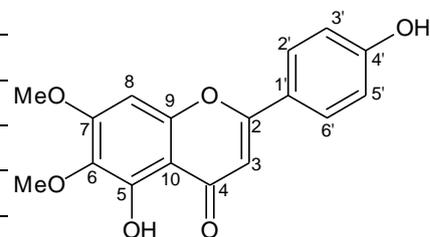


**FIGURA 3.28** Expansão do subespectro DEPT de PN4 (5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N; 50 MHz).

A TABELA 3.4 compara os dados de RMN de PN4 com dados da literatura e confirma a estrutura como a flavona 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona, conhecida também como cirsimaritina.

**TABELA 3.4** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 50 MHz) e de  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{ND}_5$ , 200 MHz) de PN4 com dados da literatura (NYILIGIRA *et al.*, 2008)

Posição	Cirsimaritina ( $\delta_{\text{C}}$ )	PN4 ( $\delta_{\text{C}}$ )	PN4 ( $\delta_{\text{H}}$ )
2	164,5	165,2	
3	103,1	104,1	6,83 s
4	182,6	183,5	
5	153,1	154,0	
6	132,3	133,5	
7	159,0	159,7	
8	92,1	91,9	6,98 s
9	152,5	153,8	
10	105,5	106,7	
1'	121,5	122,5	
2'	129,0	129,3	7,98 d ( $J_{\text{H}2'/\text{H}3'} = 10 \text{ Hz}$ )
3'	116,5	117,3	7,31 d ( $J_{\text{H}3'/\text{H}2'} = 10 \text{ Hz}$ )
4'	161,8	163,2	
5'	116,5	117,3	7,31 d ( $J_{\text{H}5'/\text{H}6'} = 10 \text{ Hz}$ )
6'	129,0	129,3	7,98 d ( $J_{\text{H}6'/\text{H}5'} = 10 \text{ Hz}$ )
OCH <sub>3</sub>	60,6	60,9	4,02 s*
OCH <sub>3</sub>	57,0	56,8	3,91 s*



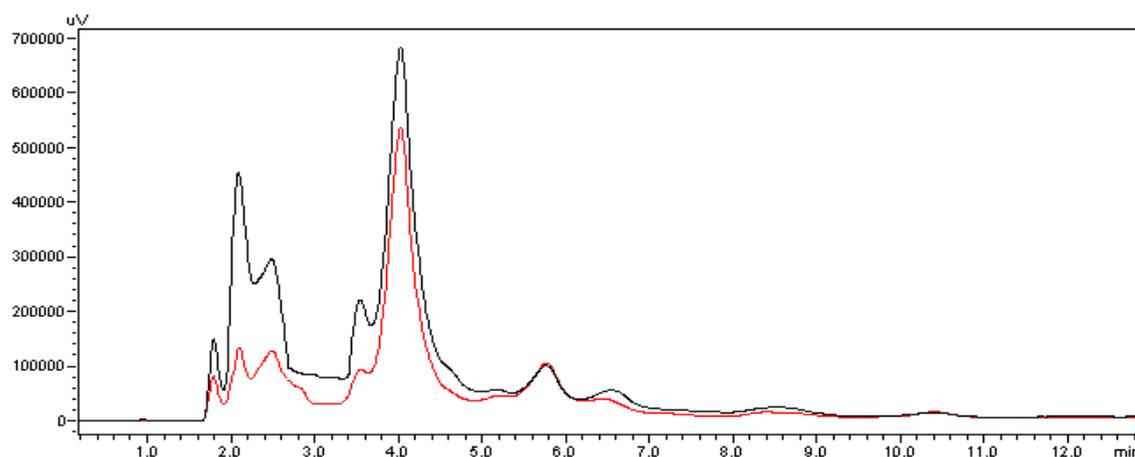
\* Estes sinais podem estar trocados.

### 3.2 EXTRATOS POLARES DE *Plectranthus neochilus* Schltr.

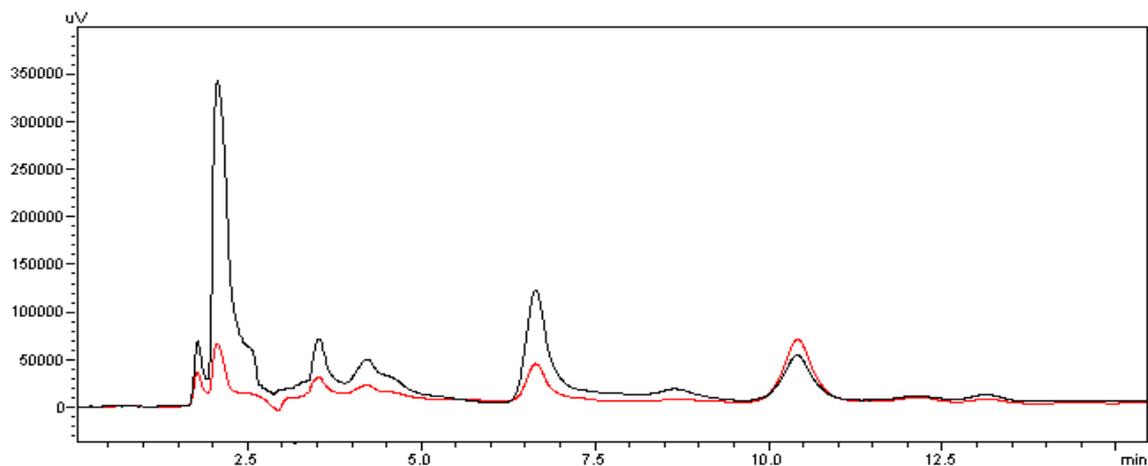
Os extratos das folhas e caules e das flores foram particionados de acordo com metodologia de MATOS (1988) e HAMPP (1996) fornecendo frações que podem ser ricas nas classes químicas: sapogeninas (F1), alcalóides (F2), antocianinas (F3) e flavonóides (F4). Na denominação das frações foram acrescentadas as letras A e F, respectivamente para aquelas obtidas das folhas e caules e das flores da planta. Estas frações foram analisadas por CLAE de acordo com as condições encontradas em HARBONE (1984) e com algumas modificações, sendo os cromatogramas obtidos mostrados a seguir.

#### 3.2.1 Avaliação por CLAE das frações ricas em Sapogeninas

Os perfis para sapogenina dos extratos das folhas e caules (F1A) (FIGURA 3.29) e das flores (F1F) (FIGURA 3.30, pág. 73) foram bastante diferentes, sendo que o pico por volta de 2 minutos de retenção, no comprimento de onda de 220 nm, apresentou-se intenso nas duas frações. A F1A teve ainda um pico bem intenso por volta de 4 minutos, sugerindo ser o composto majoritário nesta fração.



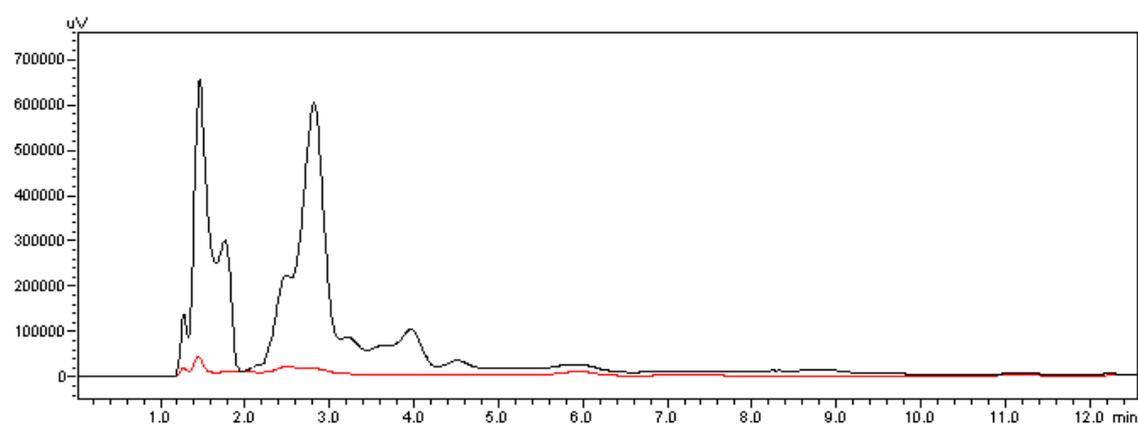
**FIGURA 3.29** Cromatograma obtido por CLAE para fração F1A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 220 nm (preto), Ch2 a 250 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocratico A/B (10:90) em 30 min.



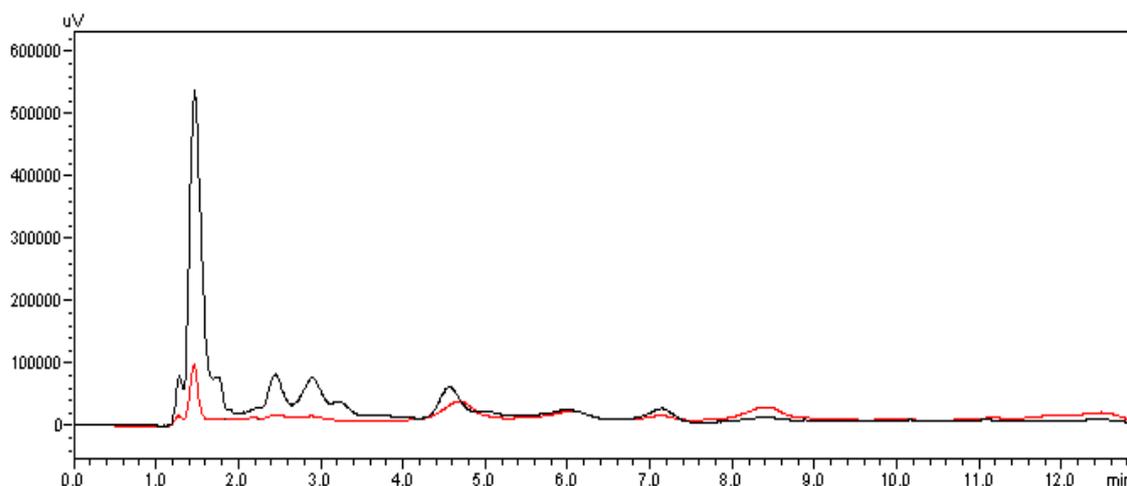
**FIGURA 3.30** Cromatograma obtido por CLAE para fração F1F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 220 nm (preto), Ch2 a 250 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocrático A/B (10:90) em 30 min.

### 3.2.2 Avaliação por CLAE das frações ricas em Alcalóides

Os perfis dos cromatogramas para estas frações demonstraram que os extratos não apresentam abundância nesta classe de compostos, sugerindo ainda que o extrato das flores (F2F) (FIGURA 3.31) é mais pobre em alcalóides do que o extrato das folhas e caules (F2A) (FIGURA 3.32, pág. 74), sendo este apresentando picos mais intensos entre o tempo de retenção de 2,2 a 3 minutos.



**FIGURA 3.31** Cromatograma obtido por CLAE para fração F2A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV, Ch1 a 280 nm (preto) e Ch2 a 254 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, consistindo de 2 bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A e software de aquisição de dados LCsolution. Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol, B: tampão fosfato pH 2,7 contendo 30,8 mg/L de octanosulfonato de sódio. Eluição no modo isocrático A/B (10:90). Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min. Volume de injeção: 20 µL.

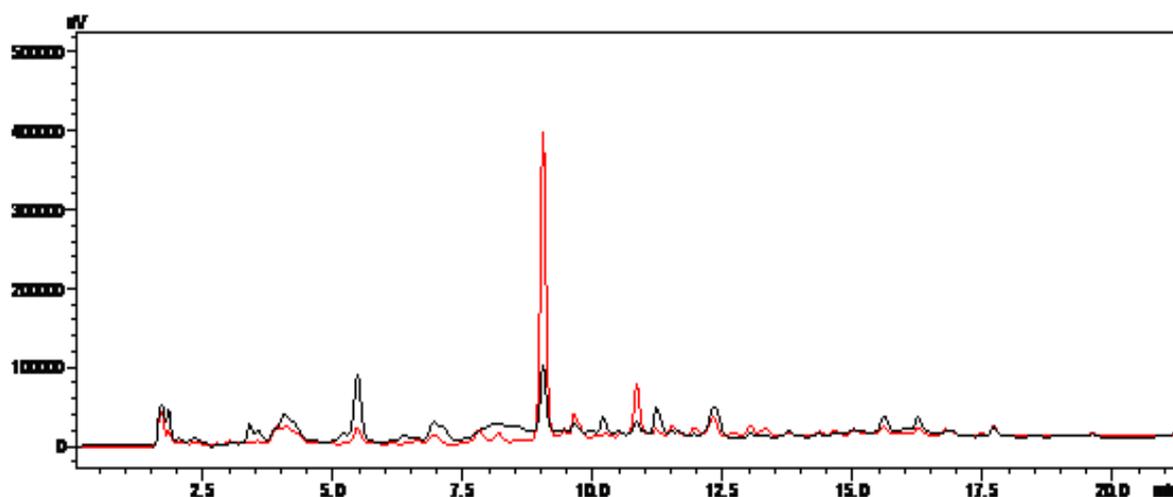


**FIGURA 3.32** Cromatograma obtido por CLAE para fração F2F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV, Ch1 a 280 nm (preto) e Ch2 a 254 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, consistindo de 2 bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A e software de aquisição de dados LCsolution. Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol, B: tampão fosfato pH 2,7 contendo 30,8 mg/L de octanosulfonato de sódio. Eluição no modo isocrático A/B (10:90). Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min. Volume de injeção: 20 µL.

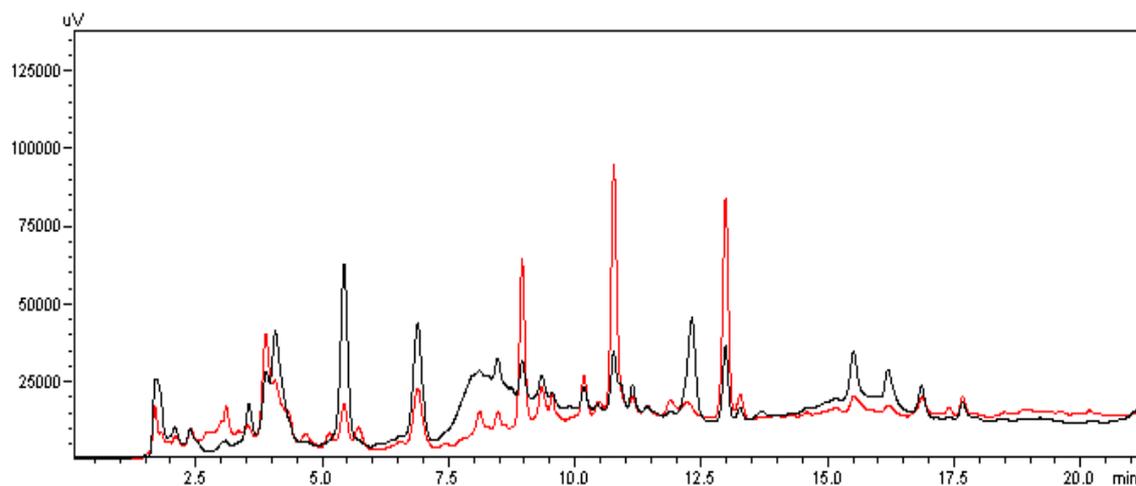
### 3.2.3 Avaliação por CLAE das frações ricas em Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, pertencentes à família dos flavonóides, podendo ser encontradas em flores, frutos, folhas, caules e sementes, tendo como funções: a atração de polinizadores, a dispersão de sementes, a proteção contra danos provocados pela luz UV e contra o ataque de patógenos (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Quando são analisados os perfis dos cromatogramas nas condições para antocianinas (HARBONE, 1984), observamos que o cromatograma do extrato das flores (F3F) (FIGURA 3.34, pág. 75) apresenta maior número de picos do que o cromatograma da fração proveniente do extrato das folhas e caules (F3A) (FIGURA 3.33, pág. 75). F3A apresenta apenas um pico intenso em torno de 9 minutos. O maior número de picos observados para F3F pode estar correlacionado ao papel das flores na atração de polinizadores devido à intensa coloração violeta apresentada.



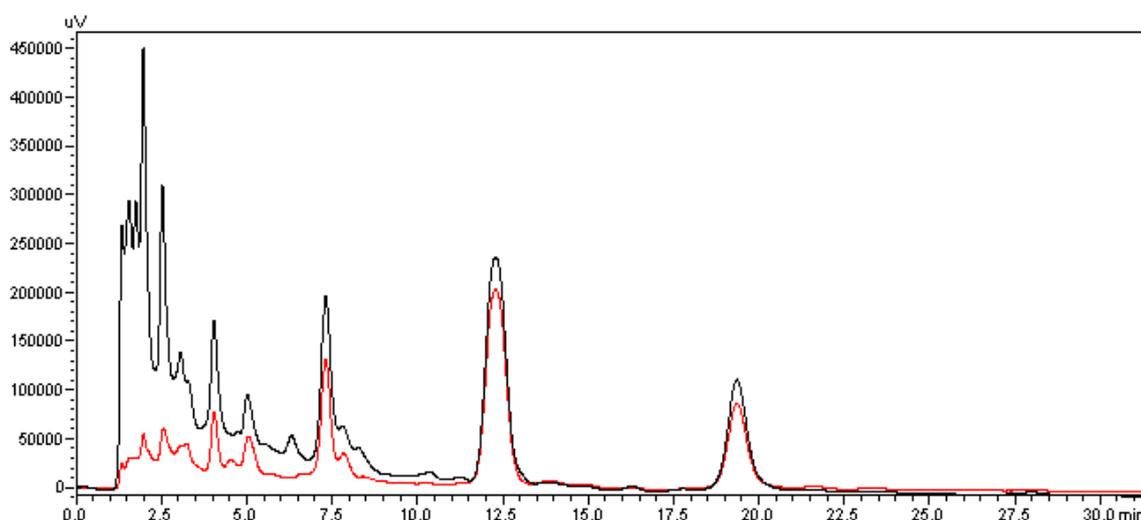
**FIGURA 3.33** Cromatograma obtido por CLAE para fração F3A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis , Ch1 a 450 nm (preto) e Ch2 a 372 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, consistindo de 2 bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A e software de aquisição de dados LCsolution. Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol e B: Água contendo ácido acético 0.5% , gradiente de 0% A a 100% A em 30 min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L.



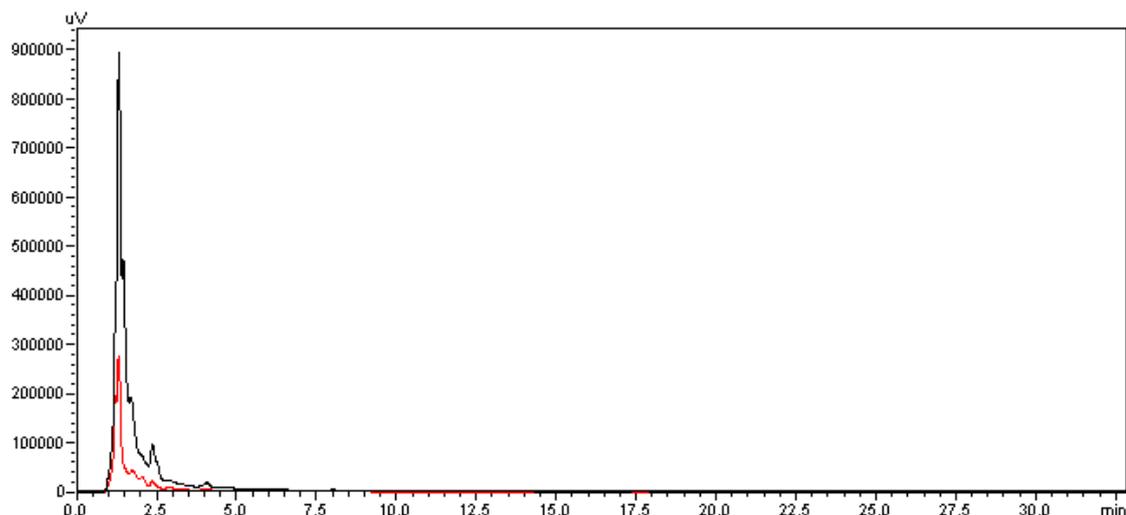
**FIGURA 3.34** Cromatograma obtido por CLAE para fração F3F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis , Ch1 a 450 nm (preto) e Ch2 a 372 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, consistindo de 2 bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A e software de aquisição de dados LCsolution. Coluna: ODS Hypersil 250 x 4,6 mm (SUPELCO). Fase móvel: A: Metanol e B: Água contendo ácido acético 0.5%, gradiente de 0% A a 100% A em 30 min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L.

### 3.2.4 Avaliação por CLAE das frações ricas em flavonóides

As frações obtidas do extrato das folhas e caules (F4A) e das flores (F4F) de *P. neochilus* foram avaliadas por CLAE. Nas condições utilizadas (pág. 26), o perfil para flavonóides iniciou-se com picos no tempo de retenção de 0 a 22 minutos para F4A (FIGURA 3.35), e de 0 a 5 minutos para F4F (FIGURA 3.36, pág. 77). Foram observados picos isolados em 12,5 e 19,5 minutos, para F4A, característicos de compostos puros e em alta concentração. Tal observação pode estar relacionada à maior atividade antioxidante observada pelo método do DPPH, para o extrato das folhas e caules comparada a aquela registrada para o extrato obtido das flores (CAPÍTULO 4, pág. 91).



**FIGURA 3.35** Cromatograma obtido por CLAE para fração F4A, proveniente do extrato das folhas e caules de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto), Ch2 a 370 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5  $\mu$ m (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético, pH 2,5. Isocratico A/B (70:30) em 35 min.

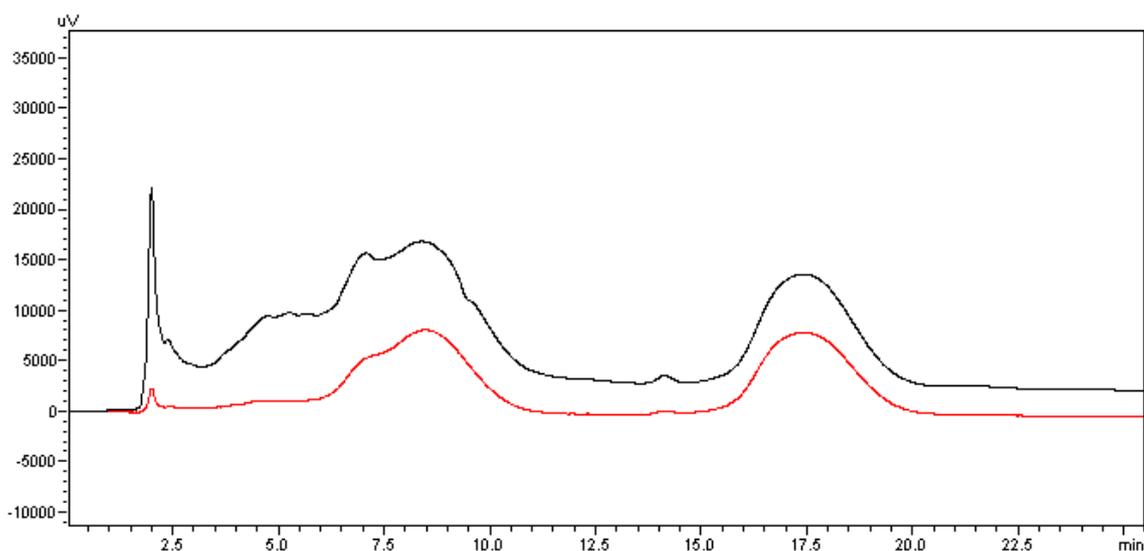


**FIGURA 3.36** Cromatograma obtido por CLAE para fração F4F, proveniente do extrato das flores de *P. neochilus* Schltr.. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto), Ch2 a 370 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético, pH 2,5. Isocrático A/B (70:30) em 35 min.

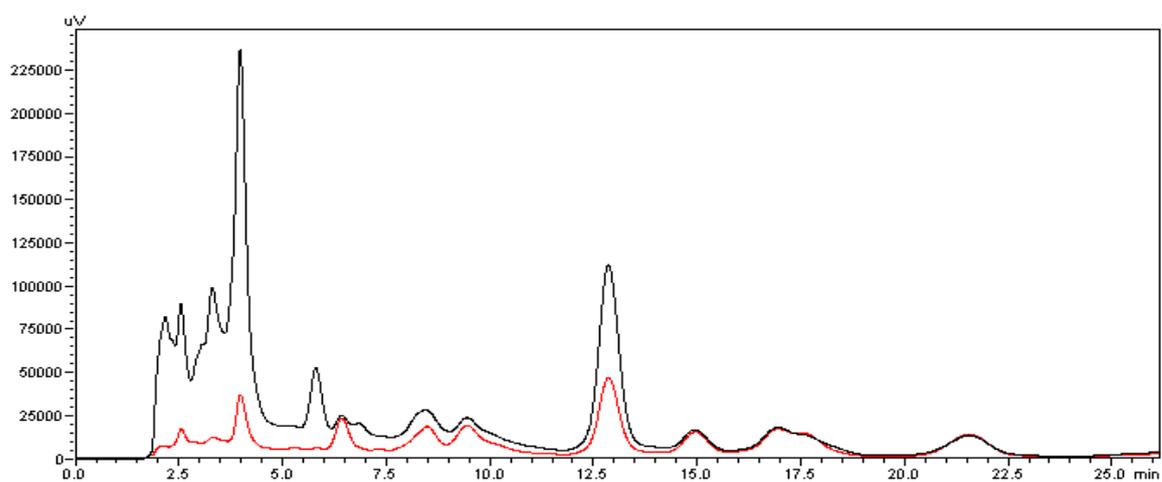
#### 3.2.4.1 Fracionamento de F4A e análise por CLAE das frações obtidas

F4A foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (pág. 45) no intuito de isolar os compostos responsáveis pelos picos observados nos tempos de retenção de 12,5 minutos e de 20,0 minutos. As reuniões obtidas desse procedimento, R1 e R3, foram avaliadas por CLAE, e os cromatogramas são apresentados nas FIGURAS 3.37 e 3.38 (pág. 78), respectivamente. No entanto, não foi possível identificar nenhum composto a partir dos padrões disponíveis.

A fração R2 foi submetida, novamente a cromatografia em Sephadex LH-20, e os resultados são discutidos na pág. 79.



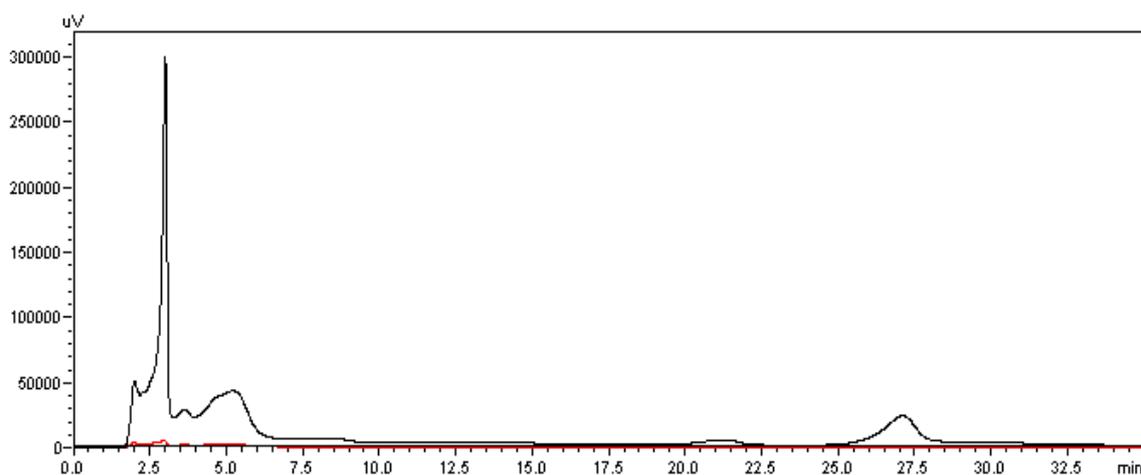
**FIGURA 3.37** Cromatograma obtido por CLAE para R1 proveniente da fração F4A. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto), Ch2 a 370 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5  $\mu$ m (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético, pH 2,5. Isocratico A/B (60:40) em 35 min.



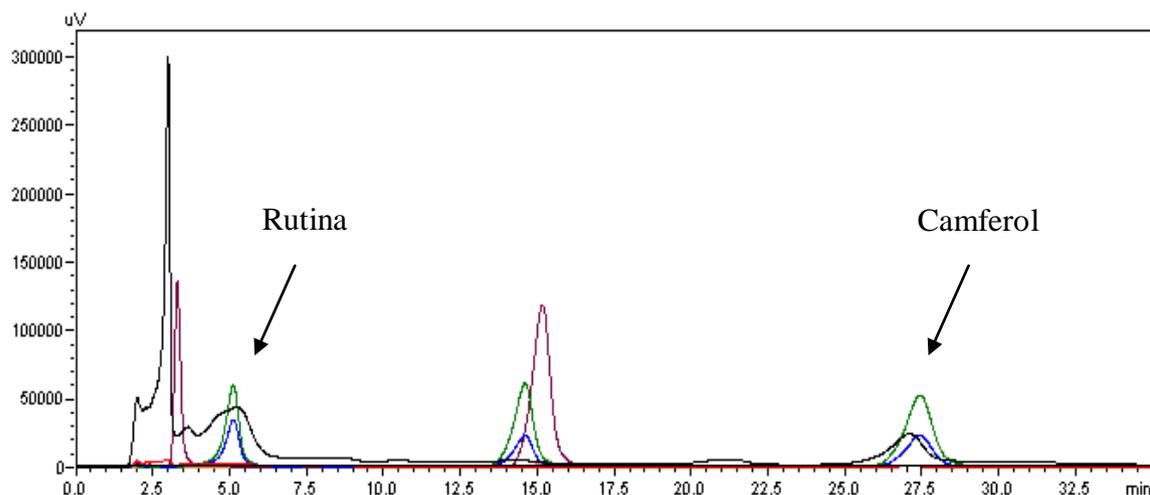
**FIGURA 3.38** Cromatograma obtido por CLAE para R3 proveniente da fração F4A. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto), Ch2 a 370 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5  $\mu$ m (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético, pH 2,5. Isocratico A/B (60:40) em 35 min.

### 3.2.4.2 Nova tentativa de fracionamento de F4A e análise por CLAE das frações obtidas

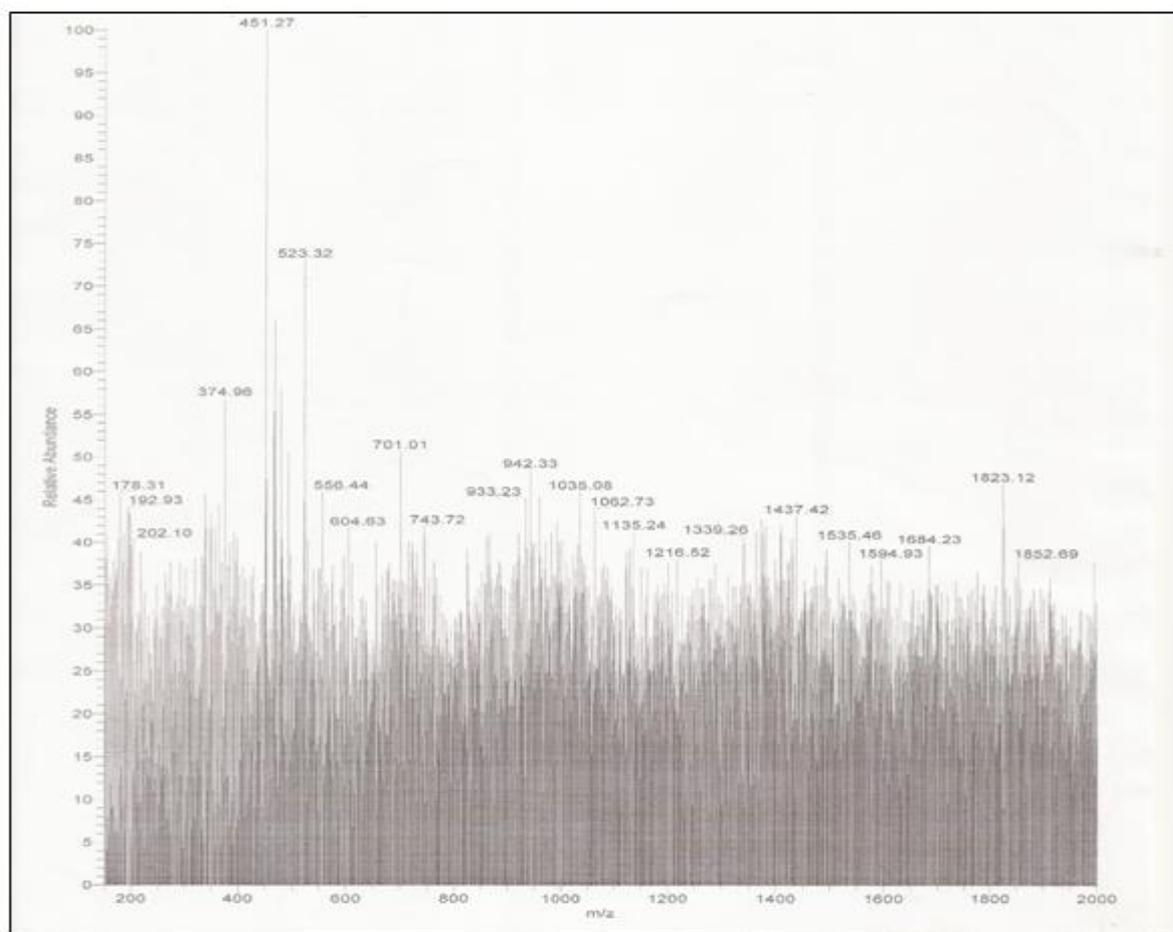
Uma nova coluna de Sephadex LH-20 foi feita com a reunião R2 de F4A, sendo obtidas dessa coluna três subreuniões. A subreunião das frações 7 a 9 apresentou uma coloração vermelha e pureza cromatográfica por CCDS. Desta forma, foi submetida à análises por RMN, ESI e CLAE. O cromatograma obtido por CLAE (fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O/50:50) desta subreunião é mostrado na FIGURA 3.39, assim como sua comparação com alguns flavonóides padrões (FIGURA 3.40, pág. 80). A análise realizada sugere a presença dos flavonóides rutina (TR= 5 minutos) e camferol (TR= 27,3 minutos) na amostra. O ESI (FIGURA 3.41, pág. 80) no modo negativo mostra que o composto em maior concentração apresenta uma massa de 452 g/mol. Devido à quantidade de amostra ser pequena (5,0 mg), não foi suficiente para obtenção do espectro em RMN a 200 MHz, portanto não foi possível a elucidação estrutural. Novas tentativas de isolamento serão feitas no intuito de isolar uma quantidade maior.



**FIGURA 3.39** Cromatograma obtido por CLAE para a subreunião R5 proveniente do fracionamento de R2. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto), Ch2 a 370 nm (vermelho). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5 µm (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocratico A/B (50:50) em 35 min.



**FIGURA 3.40** Cromatograma obtido por CLAE de R5 e comparação com os flavonóides rodanina, rutina, quercetina, naringenina e camferol respectivamente. Condições de análise: Detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm (preto, azul, vinho), Ch2 a 370 nm (vermelho, verde, laranjado). Cromatógrafo SHIMADZU Série 20A, Coluna: NST C18 – 250 mm x 3,0 mm x 5  $\mu$ m (NST), Fluxo: 0,70 mL/min. Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fase móvel: A: Metanol e B: H<sub>2</sub>O com 1% de ácido acético pH 2,5. Isocratico A/B (50:50) em 35 min.



**FIGURA 3.41** Espectro de massas ESI (modo negativo) da subreunião R5, proveniente de R2.

## **CAPÍTULO 4 – TESTES BIOLÓGICOS**

---

*Plectranthus neochilus* é uma erva aromática denominada boldo ou "boldo-gambá" e empregada no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia na medicina popular (DUARTE *et al.*, 2007). Suas folhas frescas têm um odor distinto e são utilizados em infusão ou como extrato aquoso para fins de cura (LORENZI *et al.*, 2002). Até o presente momento nenhum estudo descrevendo propriedades biológicas da espécie foi discutido.

A investigação apresentada a seguir avalia as propriedades antioxidantes e de atividade anticolinesterásica dos extratos das flores e das folhas e caules de *P. neochilus*, tendo por objetivo contribuir para a validação da utilização da planta na medicina tradicional.

### **4.1 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

#### **4.1.1 INTRODUÇÃO**

A produção excessiva de radicais, tais como os radicais ânions superóxido, hidroxila, oxigênio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm sido associada com a carcinogênese, doenças cardíacas, câncer e muitos outros problemas de saúde relacionados com o avanço da idade (KYUNG-A *et al.*, 2011). Assim, compostos antioxidantes exógenos agem com uma função auxiliar neste processo de defesa. Neste contexto, novos antioxidantes naturais, principalmente os isolados de plantas medicinais, adquirem uma grande importância, sendo nos últimos anos as pesquisas farmacológicas destes compostos de grande interesse (SILVA *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Plectranthus* estão distribuídas ao redor do mundo e as folhas têm sido usadas na medicina tradicional para diversos fins (LUKHOBBA *et al.*, 2006). Alguns compostos fenólicos têm sido isolados de espécies *Plectranthus* e esses apresentaram eficientes atividades de retirada de radicais hidroxila, além de inibir o desenvolvimento de câncer de cólon, estômago e oral (MASUOKA *et al.*, 2006)

Neste trabalho, o potencial antioxidante dos extratos das folhas e caules e flores de *P. neochilus* foi avaliado através do método DPPH, poder redutor e fenólicos totais.

#### 4.1.2 METODOLOGIA

Os testes foram realizados nos laboratórios do Departamento de Química/FACET e da Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFVJM.

##### 4.1.2.1 Determinação de fenólicos totais

Os extratos avaliados foram analisados de acordo com metodologia descrita por SINGH e colaboradores (2002). Os extratos obtidos das folhas e caules em acetato de etila e metanol foram dissolvidos em metanol e o extrato hexânico foi solubilizado em clorofórmio. A concentração das amostras testadas foi de 300 ppm (As amostras foram preparadas solubilizando 3 mg de extrato em 10 mL de solvente).

Alíquotas de 0,6 mL das amostras previamente preparadas foram misturadas a 0,3 mL de reagente de Folin Ciocalteu, diluídas 10 vezes e 2,4 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%.

Esta mistura foi deixada em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e as absorbâncias foram medidas a 765 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando ácido gálico como padrão de acordo com metodologia de BONOLI e colaboradores (2004), sendo os resultados encontrados expressos em equivalentes de ácido gálico, usando a equação linear:

$$A = 0,0016C + 0,059, R^2 = 0,9808$$

Onde A = absorvância e C = concentração de ácido gálico (AG) em ppm. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

Para determinar a quantidade de AG na solução, utilizou-se a equação a seguir:

$$\text{mg AG em 10 mL} = (10 \times \text{ppm AG}) / 1000$$

Posteriormente, para encontrar o valor em mg/g de fenólicos totais no extrato, utilizou-se a equação dada a seguir, sendo que a massa de extrato utilizada no ensaio foi de 3,0 mg:

$$\text{mg/g de fenólicos no extrato} = (1000 \times \text{mg AG em 10 mL}) / 3$$

#### 4.1.2.2 Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH

Seguindo a metodologia descrita por SINGH e colaboradores (2002) e BLOIS (1958), alíquotas de 100 µL de amostra dos extratos das folhas e caules e flores a 200, 300 e 400 ppm em etanol foram colocadas em tubos de ensaio. Como padrão utilizou-se 100 µL de solução alcoólica de ácido gálico a 100 ppm. Solução metanólica de DPPH 0,1 mM (5 mL) foi adicionada aos tubos que, em seguida, foram agitados vigorosamente. Os tubos foram deixados em repouso a 27 °C por 20 minutos. Um tubo controle contendo a mistura acima, sem o extrato, foi usado como branco e o metanol usado como corretor da linha de base. As absorvâncias foram medidas a 517 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e a atividade de retirada de radical (ARR) expressa como a porcentagem de inibição e calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ ARR} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. Amostra})/\text{Abs. Controle}] \times 100$$

Onde **Abs.** = absorvância.

#### 4.1.2.3 Determinação do poder redutor (PR)

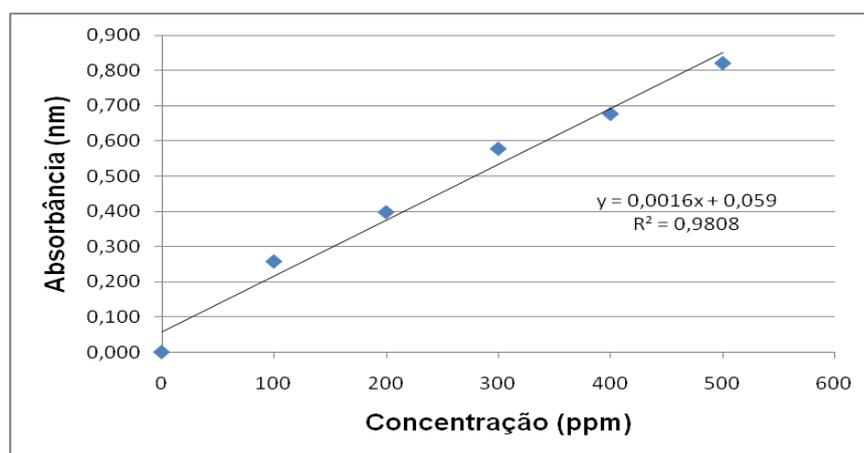
Alíquotas de 1 mL das amostras dos extratos a 50, 100, 200 e 300 ppm e 1 mL de solução de ácido gálico a 100 ppm, ambos em etanol, foram preparadas como descrito anteriormente e analisadas de acordo com metodologia descrita por YILDIRIN *et al.* (2001). Acrescentaram-se às alíquotas, 1,0 mL de tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 6,6) e 1,5 mL de  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1%). Em seguida, as amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. Após este período, adicionou-se 1,5 mL de ácido tricloroacético (10%) e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 8 min. Retiraram-se 2,0 mL da camada superior, que foram acrescidos de 2,0 mL de água destilada e 0,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  aquoso (0,1 %). A absorvância foi medida a 700 nm (YILDIRIN *et al.*, 2001). O aumento do poder redutor foi avaliado com o aumento da absorvância.

### 4.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1.3.1 Conteúdo de fenólicos totais

Os resultados de conteúdo de fenólicos totais foram obtidos através de regressão linear com a curva de ácido gálico segundo metodologia de BONOLI e colaboradores (2004) (FIGURA 4.1, pág. 84). Os resultados são apresentados na TABELA 4.1, pág. 84.

Para a avaliação da atividade antioxidante, quatro extratos foram investigados, sendo três das folhas e caules, extrato hexânico (EHA), em acetato de etila (EAA) e extrato metanólico (EMA) e o extrato metanólico das flores (EMF). Os resultados mostraram que os extratos mais polares possuem maiores porcentagens de fenólicos totais, sendo o EMA o que apresentou maior concentração (466,7 mg/g) seguido pelo extrato EAA (235,4 mg/g) e o extrato EMF (181,9 mg/g). O extrato hexânico mostrou a menor concentração de compostos fenólicos (35,4 mg/g). A presença de compostos fenólicos nesse extrato pode estar relacionada ao arraste desses compostos durante a extração com hexano.



**FIGURA 4.1** Curva de regressão linear do ácido gálico nas concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm.

**TABELA 4.1** Conteúdo de fenólicos totais em extratos de *P. neochilus* Schltr.

Extrato	Absorbância Média (nm)	Fenólicos totais (mg/g)
EHA	0,076	35,4
EAA	0,172	235,4
EMA	0,283	466,7
EMF	0,146	181,9

#### 4.1.3.2 Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH e poder redutor (PR)

O teste de DPPH é utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias puras. O DPPH é um radical capaz de reduzir em presença de compostos doadores de elétrons. A evidência da reação se dá quando a cor violeta da solução metanólica de DPPH desaparece, passando, portanto, a incolor, quando este reage com substâncias que doam radicais (WU, 2006). O teste do poder redutor auxilia nos resultados da atividade antioxidante. Desta forma, foram realizados os testes de poder redutor com os extratos EHA, EAA, EMA e EMF nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 ppm e os teste com o DPPH nas concentrações 200, 300 e 400 ppm para os extratos EHA, EAA e EMA e 100, 200, 300, 400, e 500 ppm para EMF.

Os valores encontrados nos testes de DPPH e poder redutor (PR) dos extratos das folhas e caules e flores de *P. neochilus* são apresentados na TABELA 4.2, pág. 86.

De acordo com os resultados obtidos, o extrato EHA apresentou a menor atividade antioxidante dentre os extratos das folhas e caules. Existem alguns testes que permitem avaliar a atividade antioxidante de amostras menos polares (MURCIA, 2004), mas que não foram realizados neste trabalho.

Pode-se observar que, na avaliação antioxidante das folhas e caules, os extratos EAA e EMA foram os que apresentaram maior atividade, sendo que o extrato EMA nas concentrações avaliadas apresentaram as melhores capacidades de retirada de radical (TABELA 4.2, pág. 86 e FIGURA 4.2, pág. 87). O padrão utilizado nestes testes foi o ácido gálico (a 100 ppm), que mostrou 67% de retirada de radical. O resultado mais interessante foi aquele apresentado pelo extrato EMA, que apresentou 11% de retirada de radical para as concentrações de 400 e 300 ppm, mostrando diferença significativa entre as demais concentrações dos diferentes extratos. O valor obtido é considerável, pois se trata da avaliação de um extrato bruto. Os maiores valores apresentados pelo extrato EMA (11%) comparados ao observado por EMF (4%) podem estar associado à maior concentração de flavonóides, mostrado pelo perfil cromatográfico em CLAE quando comparado as frações das folhas e caules e das flores (TABELA 4.2, pág. 86).

O poder redutor (PR) dos extratos das folhas e caules testados foi dependente da concentração (TABELA 4.2, pág. 86 e FIGURA 4.4, pág. 88), mostrando uma variação entre as concentrações. Os resultados de retirada de radical (DPPH) e poder redutor (PR) para os extratos das folhas e caules ficaram vinculados, com um nítido salto do extrato metanólico da parte aérea a partir da concentração 100 ppm, observado nos resultados de PR. Nota-se que os melhores resultados do teste DPPH e PR foram observados para o extrato metanólico das folhas e caules (EMA).

Na avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico das flores (EMF) (TABELA 4.2, pág. 86 e FIGURA 4.3, pág. 87) a retirada de radical foi próxima ao resultado obtido para EHA, porém quanto ao poder redutor (TABELA 4.2, pág. 86 e FIGURA 4.4, pág. 88), esse apresentou valores inferiores somente ao extrato EMA, nas diferentes concentrações avaliadas; e bem próximo a do EAA, mostrando que estes resultados não foram vinculados em relação proporcional aos extratos da parte aérea.

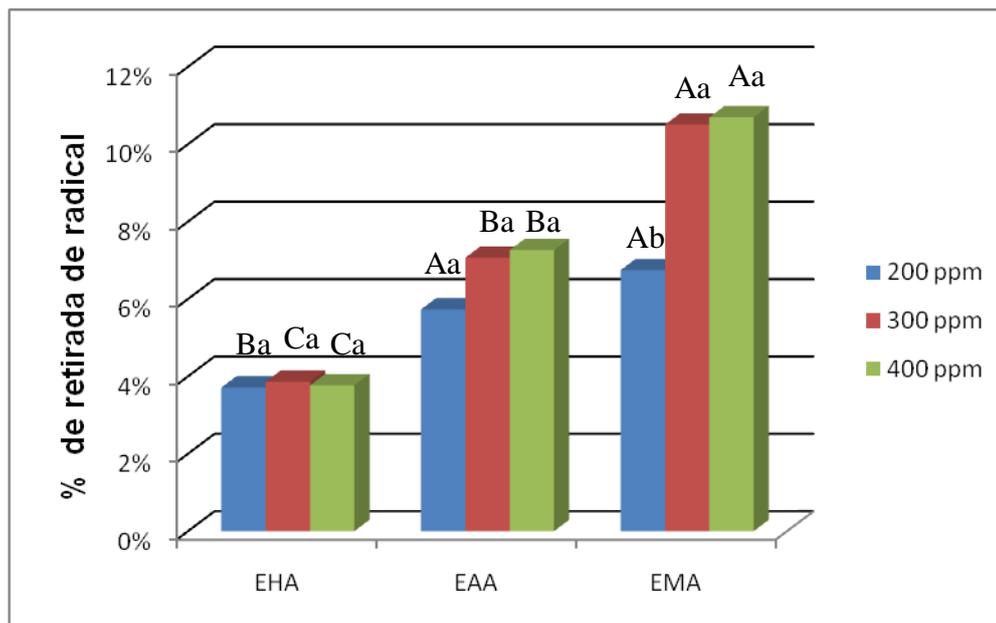
Levando em consideração os resultados de fenólicos totais, DPPH e PR, pode-se concluir que o método de extração com o metanol se mostrou mais eficiente no que diz respeito à otimização da atividade antioxidante, devido à extração de compostos mais polares, que possivelmente são responsáveis pela maior atividade de retirada de radical, pela neutralização do radical livre do DPPH. A maior atividade pode ser relacionada a maior concentração de compostos fenólicos determinada.

**TABELA 4.2** DPPH e poder redutor (PR) dos extratos da parte aérea e flores de *P. neochilus Schltr.*

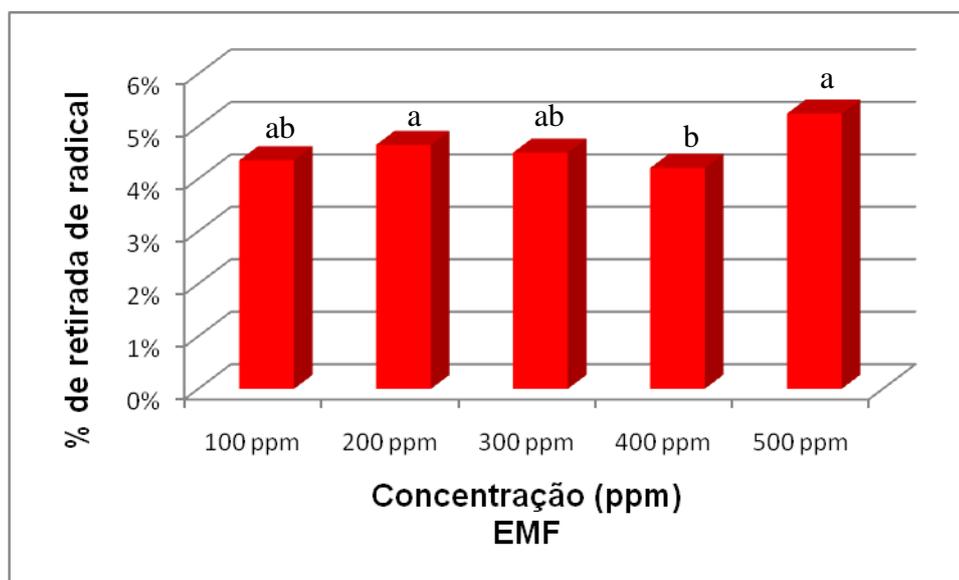
Extrato	Concentração (ppm)	Absorbância média (nm)	DPPH (%)	Poder redutor
EHA	50	NR	NR	0,085
	100	NR	NR	0,094
	200	1,096	4%	0,137
	300	1,094	4%	0,176
	400	1,095	4%	NR
EAA	50	NR	NR	0,101
	100	NR	NR	0,140
	200	1,073	6%	0,218
	300	1,057	7%	0,314
	400	1,055	7%	NR
EMA	50	NR	NR	0,125
	100	NR	NR	0,257
	200	1,061	7%	0,495
	300	1,018	11%	0,737
	400	1,016	11%	NR
EMF	50	NR	NR	0,120
	100	1,076	4%	0,159
	200	1,071	5%	0,246
	300	1,075	5%	0,329
	400	1,082	4%	NR
	500	1,066	5%	NR

NR= Não registrado.

EHA: extrato hexânico das folhas e caules; EAA: extrato de acetato de etila das folhas e caules; EMA: extrato metanólico das folhas e caules; EMF: extrato metanólico das flores.



**FIGURA 4.2** Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos da parte aérea de *P. neochilus* Schltr. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem entre si em relação a cada concentração e médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação às concentrações do extrato pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 4.3** Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos das flores de *P. neochilus* Schltr. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

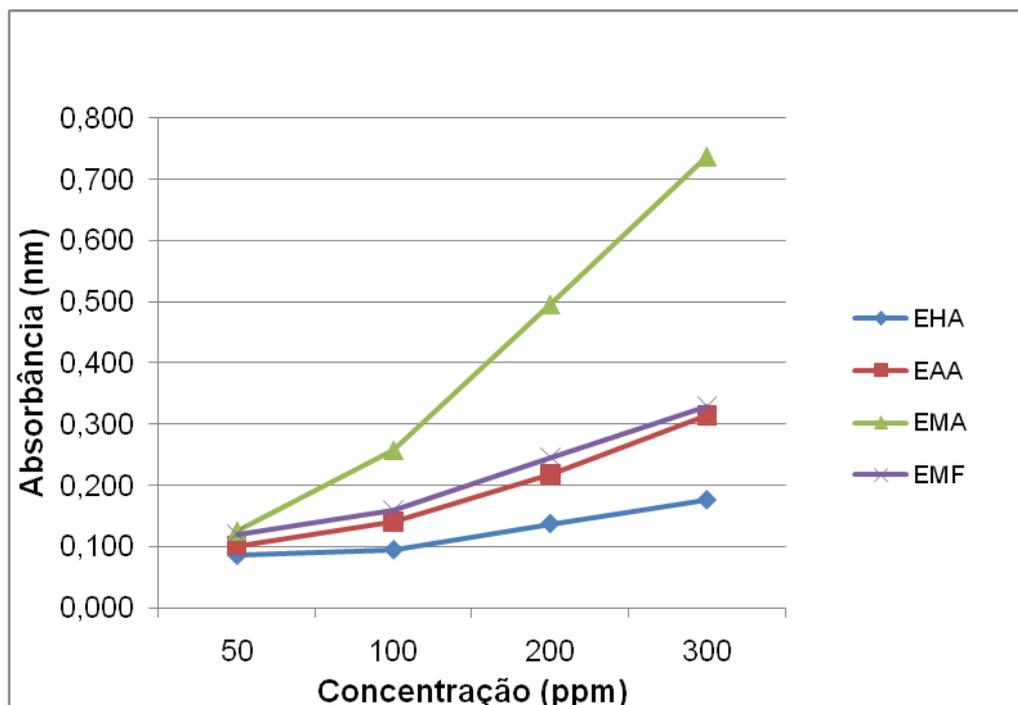


FIGURA 4.4 Poder redutor dos extratos de *P. neochilus* Schltr.

## 4.2 TESTE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

### 4.2.1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência entre os idosos. Cerca de 10% da população mundial com idade acima de 65 anos é atingida pela doença (RACCHI *et al.*, 2004). A causa está relacionada à redução de neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina. É a enzima acetilcolinesterase (AChE) que catalisa a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor encontrado na fenda sináptica e a inibição desta enzima poderia dar alguma explicação para a ação do chá de ervas sobre o sistema nervoso. Atualmente, a inibição da AChE é usada no tratamento da doença de Alzheimer. Portanto, a terapia de maior sucesso para a doença, no momento, consiste em aumentar os níveis de acetilcolina através da inibição da atividade da acetilcolinesterase (FALÉ *et al.*, 2009; DI GIOVANNI *et al.*, 2008).

Com este teste, objetiva-se encontrar novas substâncias e extratos de plantas com atividade de inibição da AChE, bem como buscar correlação de outras atividades biológicas correlacionadas a esta atividade.

## 4.2.2 METODOLOGIA

O teste de inibição da acetilcolinesterase foi realizado com os extratos brutos das flores e das folhas e caules de *P. neochilus* no Departamento de Química da UFMG, sob a orientação da Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi.

### 4.2.2.1 Método de Ellman

Para realização do teste de inibição da acetilcolinesterase foi utilizada a metodologia descrita por ELLMAN (1961), modificada por RHEE e colaboradores (2001). Este teste consiste na utilização de placas de CCD, onde os poços foram preenchidos com os extratos testados (01, 02, 03, 04). As placas com os extratos foram eluídas em dois gradientes diferentes com os solventes hexano e AcOEt (4:1 e 2:3, respectivamente). Após eluição, as placas foram secas e borrifadas sobre elas uma mistura de iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) com o reagente de Ellman (0,15 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) em 0,1 M de tampão fosfato pH 7,4). Após completa secagem da placa, uma solução de enzima AChE foi borrifada e alguns minutos se passaram até o desenvolvimento de manchas brancas sob um fundo amarelo, indicando a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (RHEE *et al.*, 2001).

## 4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

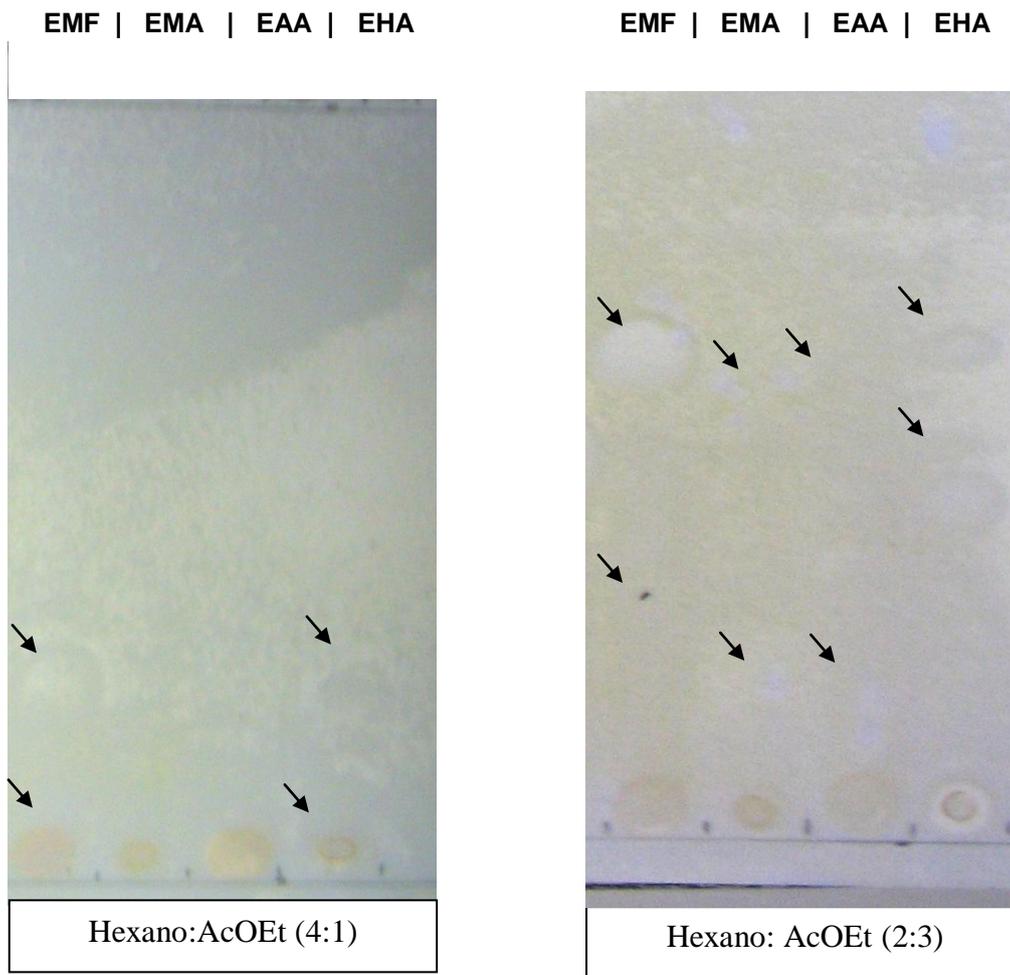
Os resultados para a atividade da inibição da acetilcolinesterase (TABELA 4.3, pág. 90) mostraram que, ao eluir a placa de CCD com a mistura de solvente hexano:AcOEt (2:3), o maior número de manchas do que ao eluir com a mistura hexano:AcOEt (4:1). Na placa de CCD, onde se utilizou a mistura de solvente hexano:AcOEt (4:1) como eluente (FIGURA 4.5, pág. 91), observa-se que o extrato metanólico das flores (EMF) apresenta atividade de inibição contra a enzima acetilcolinesterase nos Rf's 0,067 e 0,28, enquanto que o extrato hexânico das folhas e caules (EHA) nos Rf's 0,12 e 0,27. Na placa de CCD, onde se utilizou a mistura de solvente hexano:AcOEt (2:3) para eluição (FIGURA 4.5, pág. 91), o extrato EMF apresentou inibição da enzima acetilcolinesterase nos Rf's 0,26 e 0,62, o extrato metanólico das folhas e caules (EMA) nos Rf's 0,15; 0,23 e 0,60, o extrato em acetato de etila das folhas e caules (EAA) nos Rf's 0,15 e 0,61, enquanto o EHA nos Rf's 0,45 e 0,63. Os resultados obtidos são satisfatórios e promissores, sugerindo uma boa metodologia para um

fracionamento biomonitorado a ser desenvolvido posteriormente na tentativa de isolamento de substâncias com possíveis atividades anticolinesterásica.

**TABELA 4.3** Extratos utilizados e Rf's dos pontos de inibição no teste de atividade com a enzima acetilcolinesterase

Amostras (50 µg)	Hexano:AcOEt (4:1)	Hexano:AcOEt (2:3)
	Rf's	Rf's
EMF	0,07 e 0,28	0,26 e 0,62
EMA	---	0,15; 0,23 e 0,60
EAA	---	0,15 e 0,61
EHA	0,12 e 0,27	0,45 e 0,63

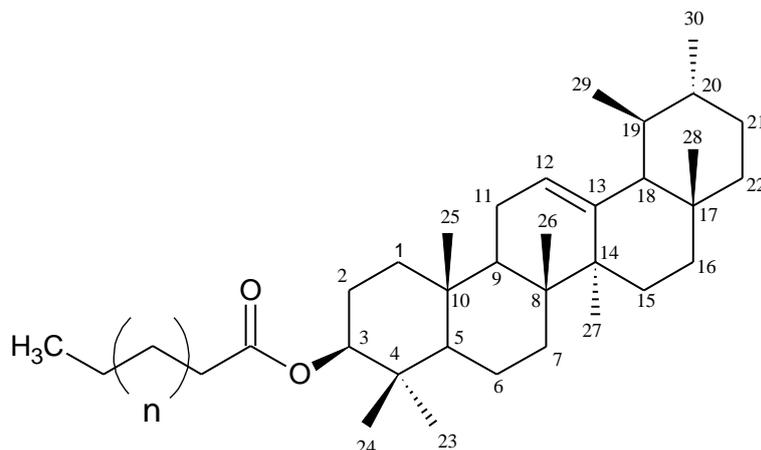
EMF: extrato metanólico das flores; EMA: extrato metanólico das folhas e caules; EAA: extrato de acetato de etila das folhas e caules e EHA: extrato hexânico das folhas e caules.



**FIGURA 4.5** Placas de CCD mostrando as manchas de inibição da enzima acetilcolinesterase promovida pelos extratos EMF, EMA, EAA e EHA.

## CAPÍTULO 5 - DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

### 5.1 PN1: $\alpha$ -amirina esterificada



Aspecto: sólido branco cristalino, solúvel em clorofórmio.

Reação de Liebermann-Burchard: cor marron-avermelhada.

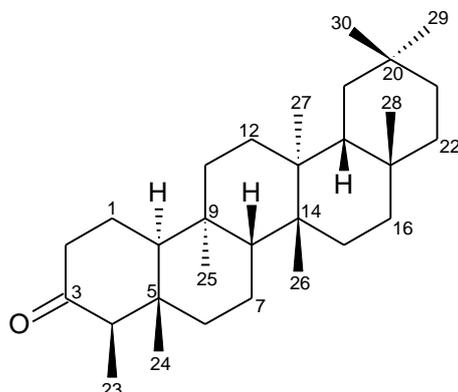
#### Dados espectroscópicos

IV (NaCl): 1465 e 1373  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H), 2948 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H) e 1731  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O).

**RMN  $^1\text{H}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 0,80; 0,87; 0,98; 1,01 e 1,07 (s, 6  $\text{CH}_3$ ), 0,83 e 0,91(s, C29 e C30), 4,51 (H-C-O do C3), 2,29 (t,  $J = 7,4$  e  $7,6$  Hz) e 1,25 (cadeia lateral ligada ao grupo éster).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 38,5 (C1); 23,6 (C2); 80,6 (C3); 37,8 (C4); 55,3 (C5); 18,3 (C6); 32,8 (C7); 40,1 (C8); 47,6 (C9); 36,8 (C10); 23,4 (C11); 124,3 (C12); 139,6 (C13); 42,1 (C14); 26,6 (C15); 28,4 (C16); 33,8 (C17); 59,1 (C18); 39,4 (C19); 39,7 (C20); 31,3 (C21); 41,5 (C22); 28,1 (C23); 16,9 (C24); 15,7 (C25); 16,9 (C26); 23,2 (C27); 28,8 (C28); 17,5 (C29); 21,4 (C30).

## 5.2 PN2: Friedelan-3-ona ou Friedelina



Aspecto: sólido branco em forma de agulhas, solúvel em clorofórmio.

Ponto de Fusão: 258-262 °C.

Reação Lieberman-Burchard: coloração marron-avermelhada.

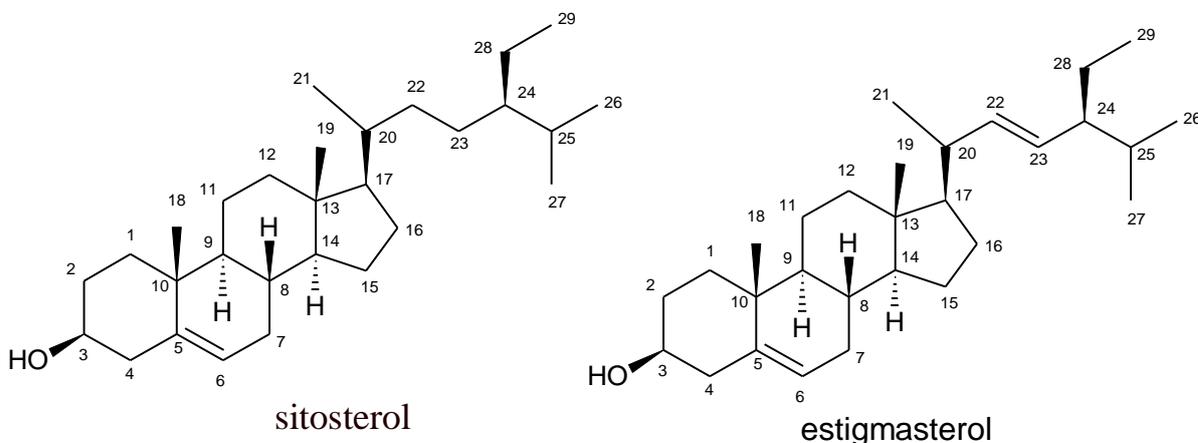
### Dados espectroscópicos

IV (KBr): 1460 e 1390  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H), 2980, 2910 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H) e 1720  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O).

**RMN  $^1\text{H}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 0,73; 0,87; 0,95; 1,00; 1,01; 1,05; 1,18 (s, 7  $\text{CH}_3$ ), 0,87 (d, C23,  $J = 6,50$  Hz), 1,97 (m, H1), 2,23 (q, H4,  $J = 6,50$  Hz), 2,30 (m, H2), 2,40 (dd, H2,  $J = 13,80$ ; 5,10; 1,90 Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 22,3 (C1); 41,5 (C2); 213,3 (C3); 58,2 (C4); 42,2 (C5); 41,3 (C6); 18,2 (C7); 53,1 (C8); 37,4 (C9); 59,5 (C10); 35,6 (C11); 30,5 (C12); 39,7 (C13); 38,3 (C14); 32,8 (C15); 36,0 (C16); 29,7 (C17); 42,8 (C18); 35,3 (C19); 28,2 (C20); 32,4 (C21); 39,3 (C22); 6,8 (C23); 14,7 (C24); 17,9 (C25); 20,3 (C26); 18,7 (C27); 32,1 (C28); 31,8 (C29); 35,0 (C30).

### 5.3 PN3: Mistura de sitosterol e estigmasterol



Aspecto: sólido branco cristalino, solúvel em clorofórmio.

Ponto de Fusão: 157-160 °C.

Reação Lieberman-Burchard: coloração verde.

#### Dados espectroscópicos

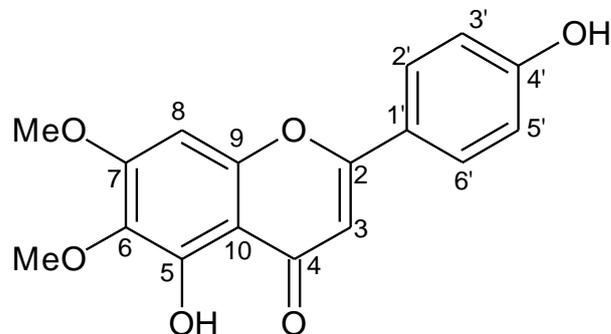
IV (KBr): 1470 e 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H), 2940 e 2890  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H), 3410  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H), 960 ( $\delta$  C=C) e 800  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C=C).

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 5,35 (d, H6), 3,52 (H3,  $\text{CH-OH}$ ), 5,16 (dd, H22,  $J_{22-23}=5,0$  Hz e  $J_{22-20}=4,4$  Hz), 5,03 (dd, H23,  $J_{23-22}=4,4$  Hz e  $J_{23-24}=4,4$  Hz), 0,6 - 2,3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm):

sitosterol: 37,3 (C1); 31,7 (C2); 71,8 (C3); 42,3 (C4); 140,8 (C5); 121,7 (C6); 31,9 (C7); 31,9 (C8); 50,2 (C9); 36,5 (C10); 21,1 (C11); 39,8 (C12); 42,3 (C13); 56,8 (C14); 24,3 (C15); 28,3 (C16); 56,1 (C17); 11,9 (C18); 19,4 (C19); 36,2 (C20); 19,0 (C21); 34,0 (C22); 26,1 (C23); 45,5 (C24); 28,9 (C25); 19,8 (C26); 18,8 (C27); 23,1 (C28); 12,1 (C29).

Estigmasterol: 37,3 (C1); 31,7 (C2); 71,8 (C3); 42,3 (C4); 140,8 (C5); 121,7 (C6); 31,9 (C7); 31,9 (C8); 50,2 (C9); 36,5 (C10); 21,1 (C11); 39,7 (C12); 42,3 (C13); 56,9 (C14); 24,4 (C15); 28,3 (C16); 56,0 (C17); 12,0 (C18); 19,4 (C19); 40,5 (C20); 21,2 (C21); 138,3 (C22); 129,3 (C23); 51,3 (C24); 31,9 (C25); 19,1 (C26); 18,7 (C27); 25,4 (C28); 12,3 (C29).

**5.4 PN4: 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina)**

Aspecto: sólido marrom claro, solúvel em piridina e metanol.

**Dados espectroscópicos**

**IV** (KBr): 1470 e 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H), 2940 e 2890  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H), 3450  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H), 1715 ( $\nu$  C=O), 1125  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-O-C).

**RMN  $^1\text{H}$**  (400MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ (ppm): 3,91; 4,02; 6,83; 6,98; (s, H-7, H-6, H-3, H-8), 7,31 (d, H-3'5',  $J_{(3',5')}= 10$  Hz), 7,98 (d, H-2'6',  $J_{(2',6')}= 10$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (400MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ (ppm): 183,5 (C4); 165,2 (C2); 163,2 (C4'); 159,7 (C7); 154,0 (C5); 153,8 (C9); 133,5 (C6); 129,3 (C6'); 129,3 (C2'); 122,5 (C1'); 117,3 (C5'); 117,3 (C3'); 106,7 (C10); 104,1 (C3); 91,9 (C8); 60,9 (OMe); 56,8 (OMe).

## CONCLUSÃO

---

O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* forneceu dois triterpenos, a friedelina e  $\alpha$ -amirina esterificada na posição C-3. Deste extrato foi obtida também a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. A investigação química foi realizada ainda com o extrato em acetato de etila das folhas e caules da planta, este trabalho conduziu ao isolamento da flavona metoxilada nas posições C-6 e C-7, conhecida como cirsimaritina, isolada previamente em *P. ecklonii* e *P. fruticosus*, e a obtenção de quantidades adicionais da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Entretanto, outros trabalhos devem ser conduzidos a fim de purificar frações obtidas até o momento.

Flavonóides têm ocorrência restrita no gênero *Plectranthus*, sendo descrito o isolamento principalmente de flavonas, flavonóis e flavanonas. Diterpenos são os metabólitos secundários de maior ocorrência nas espécies. Entretanto, não foi possível isolar nenhum composto pertencente a esta classe.

Os extratos das folhas e caules e das flores de *P. neochilus* mostraram moderado poder de retirada de radical DPPH em ensaio de avaliação da atividade antioxidante, sendo o extrato metanólico das folhas e caules, o que mostrou o maior poder de retirada de radical, confirmado pelo conteúdo de fenólicos totais dos extratos.

A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase mostra que os extratos apresentam substâncias ativas contra esta enzima, sendo necessários estudos posteriores de biomonitoramento para isolamento das substâncias responsáveis pela inibição da enzima acetilcolinesterase, estudo este de grande importância, já que várias doenças como o mal de Alzheimer, são tratadas com este inibidor enzimático.

O estudo realizado nesta dissertação contribuirá para novas perspectivas de avanços em se tratando de desenvolvimento de fitoterápicos e validação da espécie em alguns usos populares, isto representa uma retribuição dada à sociedade pelos investimentos na pesquisa realizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H. A.; BATTERJEE, S. M. Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, vol. 7, n. 2, p. 271-301, Feb. 2002.
- ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology – part1. *Planta Med.*, Vol. 76, n. 7, p. 653-661, May. 2010.
- ALBUQUERQUE, R. L.; KENTOPFF, M. R.; MACHADO, M. I. L.; SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A. Abietane diterpenoids isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. *Quim. Nova*, vol.30, n.8, p. 1882-1886, Out. 2007.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e Diversidade de Plantas Mediciniais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. *Act Bot. Bras.*, vol. 16, n. 2, p. 189-203, Dez. 2002.
- AOUDOU, Y.; LEOPOLD, T. N.; MICHEL, J. O. P.; XAVIER, E. F.; MOSES, M. C. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, vol.1, n. 1, p. 001-008, Feb. 2010.
- ASCENSÃO, L.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHRIPEMA, J.; DEANS, S. G.; SCHEFFER, J. J. C. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. *J. Plant Sciences*, vol. 159, n. 1, p. 31-38, Jan. 1998.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Ann. Bot.*, vol. 84, n. 4, p. 437-447, Jun. 1999.
- BATISTA, O.; SIMÕES M. F.; DUARTE, A.; VALDEIRA, M. L.; DE LA TORRE, M. F.; RODRÍGUEZ, B. An antimicrobial abietane from root of *Plectranthus hereroensis*. *Phytochemistry*, vol. 38, n. 1, p. 167-169, Jan. 1995.
- BATISTA, O.; SIMÕES, M. F.; NASCIMENTO, J.; RIBEIRO, S.; DUARTE, A.; RODRÍGUEZ, B.; DE LA TORRE, M. F. A rearranged abietane diterpenoid from *Plectranthus hereroensis*. *Phytochemistry*, vol. 41, n. 2, p. 571-573, Feb. 1996.
- BLOIS, M. S. K. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 4617, p. 1199-1120, 1958.
- BONOLI, M.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1057, n. 1-2, p. 1-12, Nov. 2004.
- CÂMARA, C. C. *et al.* Avaliação do mecanismo de ação do extrato hidroalcoólico de *Plectranthus barbatus* na pressão arterial de ratos normotensos. *In: Reunião Anual da*

*Federação das Sociedades de Biologia Experimental*, XIII, 1998, São Paulo. Anais: 315. São Paulo: Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 1998.

CÂMARA, C. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; MACÊDO-FILHO, C. L., ALMEIDA, F. B. S.; FONTELES, M. C. Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. *Plant. Med.*, vol. 69, n. 12, p. 1080-1085, Dec. 2003.

CERQUEIRA, F.; CORDEIRO-DA-SILVA, GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, F.; PINTO, M. M. M.; NASCIMENTO, M. S. J. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 12, n. 1, p. 217–223, Jan. 2004.

CHANG, J.; HAND, J. M.; SCHWALM, S.; DERVINIS, A.; LEWIS, A. J. Bronchodilating activity of forskolin in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, vol. 101, n. 3-4, p.271-274, Jun. 1984.

CODD, L. E. Lamiaceae. In: LEISTNER O.A. (ed.). *Flora of Southern Africa*. Pretoria: Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply, 1985. Vol. 28, part 4, p. 137-151.

DEWICK, P. M., 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd: England, 507 p.

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 33, n. 2, p. 109–119, Feb. 2008.

DUARTE, M. R.; LOPES, J.F. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, n. 4, p. 549-556, Dez. 2007.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, p. 88-95, Jul. 1961.

FALÉ, P. L.; BORGES, C.; MADEIRA, P. J. A.; ASCENSÃO, L.; ARAÚJO, M. E. M.; FLORÊNCIO, M. H.; SERRALHEIRO, M. L. M. Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”). *Food Chemistry*, vol. 114, n. 3, p. 798–805, Jun. 2009.

GALOTTA, A. L. Q. *Estudo químico e farmacológico da espécie Euterpe precatória* (Martius) Arecaceae. 341 f. 2005. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química, UFMG, 2005.

GASPAR-MARQUES, C.; RIJO, P.; SIMÕES, M. F.; DUARTE, M. A.; B. RODRIGUEZ, B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine*, vol. 13, n. 4, p. 267-271, Mar. 2006.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, F. M.; RODRÍGUEZ, B. A trihomooabietane diterpenoid from *Plectranthus grandidentatus* and an unusual addition of acetone to the ortho-quinone system of cryptotanshinone. *J. Nat. Prod.*, vol. 68, n. 9, p. 1408-1411, Sep. 2005.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; DUARTE, A.; RODRÍGUEZ, B. Labdane and kaurane diterpenoids from *Plectranthus fruticosus*. *J. Nat. Prod.*, vol. 66, n. 4, p. 491-496, Apr. 2003.

GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, M. F.; RODRÍGUEZ, B. Further labdane and kaurane diterpenoids and other constituents from *Plectranthus fruticosus*. *J. Nat. Prod.*, vol. 67, n. 4, p. 614-621, Apr. 2004.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ R, TRUJILLO X, TRUJILLO-HERNÁNDEZ B, VÁSQUEZ C, HUERTA M, ELIZALDE A. Forskolin versus sodium cromoglycate for prevention of asthma attacks: a single-blinded clinical trial. *J Int Med Res*, vol. 34, n. 2, p. 200–207, Apr. 2006.

GRAYER, R. J.; ECKERT, M. R.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; MARIN, P. D.; KOKUBUN, T.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*, vol. 64, n. 2, p. 519-528, Sep. 2003.

HAMPP, A. J. The Extraction of Caffeine from Tea: A Modification of the Procedure of Murray and Hansen. *Chem. Education*, vol. 73, n. 12, p. 1103-1246, Dec. 1996.

HARBONE, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2. ed. London: Chapman and hall, 288p. 1984.

JUCH, M.; RÜEDI, P. Isolation, structure, and biological activities of long-chain catechols of *Plectranthus sylvestris* (Labiatae). *Helv. Chim. Acta*, vol. 80, n. 2, p. 436-448, Mar. 1997.

KANEDA, K.; SERIZAWA, S.; MARUYASU, S.; HASEGAWA, M.; MOTONO, M. Hair growth stimulating compositions containing (benzylamino) purines and Labiatae extracts. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. JP 2005035903 A2, p. 18, Feb. 2005.

KAVITHA, C.; RAJAMANI, K.; VALDIVEL, E. *Coleus forskohlii*: a comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol 4, n. 4, p. 278-285, Feb. 2010.

KUBO, I. T.; MATSUMOTO, M.T.; ASAKAWA, Y. Structure of plectrin, an aphid antifeedant diterpene from *Plectranthus barbatus*. *Chem. Lett.*, vol. 9, p. 1513-1516, 1984.

KYUNG-A, H.; YU-JIN, H.; DONG-SIK, P.; JAEHYUN, K.; AE-SON O. In vitro investigation of antioxidant and anti-apoptotic activities of Korean wild edible vegetable extracts and their correlation with apoptotic gene expression in HepG2 cells. *Food Chemistry*, vol. 125, n. 2, p. 483-487, Jul. 2011.

LAKSHMANAN, G. M. A.; JALEEL, C. A.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Changes in antioxidant potential and sink-organ dry matter with pigment accumulation induced by hexaconazole in *Plectranthus forskohlii* Briq. *C R Biol.*, vol. 330, n. 11, p. 814–820, Sep. 2007.

- LEE, J. H.; KOO, T. H.; HWANG, B. Y.; LEE, J. J. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF- $\kappa$ B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF- $\kappa$ B target genes. *The J. Biolog. Chem.* Vol.277, n. 21, p. 18411-18420, Mar. 2002 .
- LIN, L.; CUI, C.; WEN, L.; YANG, B.; LUO, W.; ZHAO, M. Assessment of in vitro antioxidant capacity of stem and leaf extracts of *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA and identification of the major compound. *Food Chemistry*, vol. 126, n. 1, p. 54–59, May. 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas*. Nova Odessa: Plantarum. 2002.
- LUCKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 103, n. 1, p. 1-24, Jan. 2006.
- MAHATO, S. B.; JUNDI, A. P. <sup>13</sup>C-NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. *Phytochemistry*, vol. 37, n. 6, p.1517-1575, Dec. 1994.
- MANJAMALAI, A.; SINGH, R. S.; GURUVAYOORAPPAN, C.; GRACE, V. M. B. Analysis of phytochemical constituents and anti-microbial activity of some medicinal plants in Tamil Nadu, India. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, vol. 5, n. 2, p. 120-128, Jul. 2010.
- MARWAH, R. G.; FATOPE, M. O.; DEADMAN, M. L.; OCHEI, J. E.; AL-SAIDI, S. H. Antimicrobial activity and the major components of the herb oil of *Plectranthus cylindricus*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, p. 1220-1226, Sep. 2007.
- MASUOKA, N.; ISOBE, T.; KUBO, I. Antioxidants from *Rabdosia japonica*. *Phytother. Res.*, vol. 20, p. 206–213, Nov. 2006.
- MATHPAL, D.; MATHPAL, R.; SHAH, G. C.; GUPTA, R. C. Essential oil constituents and antifungal activity of *Plectranthus japonicus*. *Asian J. Chem.*, vol. 14, n. 2, p. 1044-1046, Apr. 2002.
- MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. Características distintas de duas espécies de *Coleus* usadas em medicina popular. *X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. São Paulo, 1988.
- MATOS, F. J. A.; *Introdução a Fitoquímica Experimental*, Editora UFC, Fortaleza, p.126, 1988.
- MATU, E. N.; VAN STADEN, J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purpose in Knya. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 87, n. 1, p. 35-41, Jul. 2003.
- MIRANDA, R. R. S.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Triterpene Esters Isolated from Leaves of *Maytenus salicifolia* Reissek. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 90, n. 4, p. 652-658, Apr. 2007.

- MURCIA, M. A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMENEZ, A. M.; MARTINEZ-TOME, M. Antioxidant evaluation in dessert Spices compared with common food additives: Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n. 7, p. 1872-1881, Mar. 2004.
- MURTHY, P. S.; RAMALAKSHMIA, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*, vol. 114, n. 3, p. 1014-1018, Jun. 2009.
- MWANGI, J. W.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Composition of essential oil of *Plectranthus tenuiflorus* (Vatke) Agnew. *Flav. Frag. J.*, vol. 8, n. 1, p. 51-52, Jun. 2006.
- NUKENINE, E. N.; ADLER, C.; REICHMUTH, C. H. Bioactivity of fenchone and *Plectranthus glandulosus* oil against *Prostephanus truncatus* and two strains of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology*, vol. 134, n. 2, p. 132-141, Mar. 2010.
- NYILIGIRA, E.; VILJOEN, A. M.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN ZYL, R. L.; VAN VUURENA, S. F.; STEENKAMP, P. A. Phytochemistry and in vitro pharmacological activities of South African *Vitex* (Verbenaceae) species. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, n. 3, p. 680-685, Oct. 2008.
- ODALO, J. O.; OMOLO, M. O.; MALEBO, J. A.; NJERU, P. M.; NDIEGE, I. O.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some plants from Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta Tropica*, vol. 95, n. 3, p. 210-218, Sep. 2005.
- OKAMOTO, H.; TANANKA, K.; HASEGAWA, J. *Chrysanthemum* and other plant extracts as NF- $\kappa$ B activation inhibitors for treatment of inflammatory diseases and skin aging and related diseases. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 2005194246 A2, Ago. 2005.
- OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. bras. Farmacogn.*, vol. 17, n. 3, p. 466-476, Jul. 2007.
- OLIVEIRA, P. M.; SOUZA, J. N. C.; LAGE, G. L. C.; ALVES, R. B.; Silveira, d.; RASLAN, D. S. Ethnobotany, Pharmacology and Phytochemistry of *Plectranthus* (Lamiaceae). *Salasar*, vol. 17, cap. 18, Jul. 2006.
- OMOLO, M. O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I. O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Fumigant toxicity of the essential oils of some African plants against *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Phytomedicine*, vol. 12, n. 3, p. 241-246, Mar. 2005.
- ONIFADE, A. K.; FATOPE, M. O.; DEADMAN, M. L.; AL-KINDY, S. M. Z. Nematicidal activity of *Haplophyllum tuberculatum* and *Plectranthus cylindraceus* oils against *Meloidogyne javanica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 36, n. 9, p. 679-683, Sep. 2008.
- ORABI, K. Y.; MOSSA, J. S.; MUHAMMED, I.; ALLOUSH, M. H.; GALAL, A. M.; EL-FERALY, F. S.; MCPHAIL, A. T. New eudesmane sesquiterpenes from *Plectranthus cylindraceus*. *J. Nat. Prod.*, vol. 63, n. 12, p. 1665-1668, Dec. 2003.

- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINAS, I. G.; BUELA, I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, vol. 8, n. 5, p. 395-400, Sep. 2001.
- PINTO, A. C.; SILVA, O. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, vol. 25, n. 1, p. 45-61, Mai. 2002.
- RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.*, vol. 50, n. 4, p. 441-451. Oct. 2004.
- RASIKARI, H. L.; LEACH, D. N.; WATERMAN, P. G.; SPOONER-HART, R. N.; BASTA, A. H.; BANBURY, L. K.; FORSTER, P. I. Acaricidal and cytotoxic activities of extracts from selected genera of Australian lamiaceae. *J. Economic Entomology*, vol. 98, n. 4, p. 1259-1266, Aug. 2005.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A*, vol. 915, n. 1-2, p. 217-223, Apr. 2001.
- RIJO, P.; SIMÕES, M. F.; FRANCISCO, A. P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. R. H.; VAISBERG, A. J.; RODRIGUEZ, B. AND CRISTINA MOITEIRO. Antimycobacterial Metabolites from *Plectranthus*: Royleanone Derivatives against Mycobacterium tuberculosis Strains. *Chem Biodivers.*, vol. 7, n. 4, p. 922-932, Apr. 2010.
- RODRIGUES, P. A.; MORAISB, S. M.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. R. A.; ANDRADE, G. M.; SILVA, M. G. V.; ALBUQUERQUE, R. L.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 127, n. 3, p. 725-730, Dec. 2009.
- RODRÍGUEZ, B.; DE LA TORE, M. C.; SIMÕES, M. F.; BATISTA, O.; NASCIMENTO, J.; DUARTE, A.; MAYER, R. Revision of the structure of na aristolane sesquiterpene aldehyde isolated from the root of *Plectranthus hereroensis* and *Aristolochia debilis*. *Phytochemistry*, vol. 38, n. 4, p. 905-907, Mar. 1995.
- RUIZ, A. R.; DE LA TORRE, R. A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J. Ethnopharmacol.*, vo. 52, n. 3, p. 123-127, Jul. 1996.
- SCHULTZ, C.; BOSSOLANI, M. P.; TORRES, L. M. B.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, <sup>a</sup> J.; SOUCCAR, C. Inhibition of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, n. 1, p. 1-7, Apr. 2007.

- SILVA, G. D. F.; SILVA, S. R. S.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; VIEIRA FILHO, S. A.; OLIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, n. 2B, p. 530-536, Abr./Jun. 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER G. H.; MORRIL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 5ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 387p, 1994.
- SINGH, R. P.; CHIDAMBARA, K. N. M.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n. 1, p. 81-86, Nov. 2002.
- STAVRI, M.; PATON, A.; SKELTON, B. W.; GIBBONS, S. Antibacterial Diterpenes from *Plectranthus ernstii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 72, n. 6, p. 1191-1194, May. 2009.
- TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F. O.; CALIXTO, I. A. R. L.; LORENZI, HARRI; MELHEM, M. S. C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 103, n. 5, p. 443-449, Aug. 2008.
- TIBOR, H.; LINDEN, A.; YOSHIZAKI, F.; EUGSTER, H. C.; RÜEDI, P. Abietanes and a novel 20-norabietanoid from *Plectranthus cyaneus* (Lamiaceae). *Helv. Chim. Acta*, vol. 87, n. 9, p. 2346-2353, Sep. 2004.
- TIMOR, C. E.; MANZINI, A. F.; GONZALEZ, M. L. Physicochemical assessment of the essential oil from the leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. Growing in Cuba. *Rev. Cubana de Farmacia*, vol. 25, n. 1, p. 63-68, Jun. 1991.
- TIWARI, N.; CHAUDHARY, A.; MISHRA, A. Phytochemistry Screening and Antioxidant Activities of Some Indian Medicinal Plants Used for Malarial Therapy. *Der Pharmacia Lettre*, vol. 2, n. 5, p. 335-340, Feb. 2010.
- UAWONGGUL, N., CHAVEERACH, A.; THAMMASIRIRAK, S.; ARKARAVICHIE, T.; CHUACHAN, C.; DADUANG, S. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 103, n. 2, p. 201-207, Jan. 2006.
- VARINA, K. C.; SHARMA, R. K. Antimicrobial activity of essential oil of *plectranthus incanus*. *Indian J. Pharmacy*, vol. 25, n. 6, p. 189-190, Apr. 1963.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. *Plantas medicinais: cura segura?*. *Química Nova*, vol. 28, n. 3, p. 519-528, Jun. 2005.
- VICHKANOVA, S. A.; RUBINCHIK, M. Antimicrobial properties of a plectrin diterpene from *Plectranthus glaucocalyx*. *Parmakologiya i Toksikologiya*, vol. 29, n. 5, p. 605-609, Mar. 1966.
- WALDIA, S.; JOSHI B. C.; PATHAK U.; JOSHI M. C. The Genus *Plectranthus* in India and Its Chemistry. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 8, n. 2, p. 244-252, Feb. 2011.

WELLSOW, J.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C.; KOKUBIN, T.; LELLI, R.; KITE, G. C.; SIMMONTS, M. S. J. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. *Phytochemistry*, vol. 67, n. 16, p. 1818-1825, Aug. 2006.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, vol. 126, n. 2, p. 485-493, jun. 2001.

WU, C.; CHEN, F.; WANG, X.; KIM, H. J.; HE, G.; ZITLIN, V. H.; HUANG, G. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem.*, vol. 96, n. 2, p. 220-227, Apr. 2006.

YILDIRIN, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n. 8, p. 4083-4089, Aug. 2001.

YOUSIF, M. H. M.; THULESIUS, O. A pharmacological study of bronchodilator properties of NKH477, forskolin, and  $\beta$ -agonists on guinea pig and ovine isolated bronchioles. *Drug Dev Res*, vol. 51, n. 3, p. 169-176, Jan. 2000.

ZOLLO, A. P. H.; BIYITI, L.; TCHOUMBOUGNANG, F.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BOUCHET, P. H. Aromatics Plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flav. Frag. J.*, vol. 13, n. 2, p. 107-114, Dec. 1998.