

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa De Pós-Graduação Em Química

Mariana das Graças Augusta César

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E FLORES DE *PLECTRANTHUS NEOCHILUS*
SCHLTR.**

Diamantina

2021

MARIANA DAS GRAÇAS AUGUSTA CÉSAR

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E FLORES DE *PLECTRANTHUS NEOCHILUS*
SCHLTR.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Roqueline Rodrigues Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Patrícia Machado Oliveira

Diamantina

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

M333 César, Mariana das Graças Augusta
2021 ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E FLORES DE *Plectranthus neochilus*
Schltr. [manuscrito] / Mariana das Graças Augusta César. --
Diamantina, 2021.
109 p. : il.

Orientador: Prof. Roqueline Rodrigues Silva.
Coorientador: Prof. Patrícia Machado Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal
dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação
em Química, Diamantina, 2021.

1. *Plectranthus neochilus*. 2. diterpeno. 3. citotóxica. 4.
antioxidante. I. Silva, Roqueline Rodrigues . II. Oliveira,
Patrícia Machado . III. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886
Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho

Mariana das Graças Augusta César

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E FLORES DE *PLECTRANTHUS NEOCHILUS*
SCHLTR.**

Dissertação apresentada ao MESTRADO EM QUÍMICA, nível de mestrado como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Roqueline Rodrigues Silva

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Patrícia Machado Oliveira

Data de aprovação: 01/03/2021


Prof.Dr.^a ROQUELINE RODRIGUES SILVA - UFVJM


Prof.Dr.^a PATRÍCIA MACHADO DE OLIVEIRA - UFVJM


Prof.Dr. VICTOR HUGO DE OLIVEIRA MUNHOZ - UFVJM


Prof.Dr.^a CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL - UFVJM

Diamantina

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
Nicolau e Socorro, meus irmãos
Maiara e Matheus, meu namorado
Daniel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo caminho percorrido até aqui, pela saúde que me proporcionou. Ao meu pai e meus avós por serem minha proteção.

Agradeço à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), em especial o Departamento de Química, pela oportunidade oferecida e pelo ambiente de trabalho proporcionado a realização das atividades. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à professora Roqueline Rodrigues pelos ensinamentos, apoio, e toda disponibilidade oferecida.

Agradeço à Professora Patrícia Machado de Oliveira, minha “segunda orientadora”, onde teve uma participação enorme no desenvolvimento do meu trabalho, passando ensinamentos de uma excelente professora e pesquisadora. Professora e amiga, por toda orientação, pelo carinho, ensinamentos, prontidão em me auxiliar e principalmente pela paciência com minhas dificuldades.

Aos Laboratório de Ressonância Magnética da Universidade Federal de Goiás e Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear e Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (Faculdade de Farmácia) da Univesidade Federal de Minas Gerais, pelo imenso apoio a realização dos experimentos, que foram valiosos ao meu trabalho.

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

Ao Abrãao e Cecilia pela amizade, dedicação, colaboração e disponibilidade em todas as fases deste trabalho. Aos alunos de Iniciação Científica Alexandre e Joyce pela colaboração na parte experimental deste trabalho, pela dedicação e amizade. Agradeço aos amigos do curso de Pós-graduação, pela amizade e troca de experiências. Aos amigos que a graduação me presentou, Joyce, Ana Clara, Paulo e Itamara que deram força e incentivaram nessa caminhada. Aos meus amigos que sempre estão presentes em minha vida, obrigada por tudo.

À minha mãe pela incessante busca em querer meu bem, pelas orações, por ser minha fortaleza, meu maior exemplo, sempre ajudando e estando presente em todas as ocasiões. Agradeço aos meus irmãos Maiara e Matheus, ao Tião e meu namorado Daniel pela força depositada em mim, vocês são muito importantes e essenciais em minhas conquistas. Agradeço a minha família por todo carinho, preocupação e cuidado que sempre tiveram comigo.

RESUMO

Plectranthus neochilus Schltr, espécie pertencente à família Lamiaceae, é uma erva aromática conhecida popularmente no Brasil como “boldo” ou “boldo-gambá”, e assim como a espécie *P. barbatus* (boldo-brasileiro), tem o chá de suas folhas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia. O presente estudo descreve o estudo fitoquímico, a avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de flores e folhas de *P. neochilus*, coletadas em Diamantina, Minas Gerais. O extrato hidroalcoólico das flores, o extrato hidroalcoólico das folhas, ambos obtidos por maceração, e os extratos obtidos por partição das flores e folhas da planta foram submetidos à prospecção fitoquímica preliminar utilizando-se testes cromogênicos e de precipitação, sendo possível detectar a presença de taninos, flavonóides, triterpenos e esteróides, saponinas e cumarinas. A composição química do gênero *Plectranthus* é vasta e complexa, sendo os diterpenos os compostos de maior interesse nos estudos fitoquímicos desse gênero. Assim, buscou-se o isolamento destes metabólitos utilizando-se extrato toluênico das folhas de *P. neochilus* procedimentos cromatográficos previamente descritos para o isolamento de diterpenos. A partir do extrato das folhas da planta, foi possível isolar um novo diterpeno abietanóide e do tipo espirocoleona, caracterizado por IV, UV e RMN de ^1H e de ^{13}C . Os extratos das folhas e flores foram avaliados quanto à atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais K562, RKO-AS45-1, MDA-MB231, THP1 e Wi-26VA4, linhagem de células não tumorais, utilizando etoposídeo como composto citotóxico padrão. O extrato das flores apresentou citotoxicidade, quando comparado à quimioterapia não seletiva. Observou-se ainda que a citotoxicidade de todos os extratos é menor que a do padrão, o etoposídeo, em relação à linha celular não tumoral. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando-se métodos eletroquímicos, sendo sugerida a presença de compostos com propriedades antioxidantes na planta.

Palavras-chave: *Plectranthus neochilus*, diterpeno, citotóxica, antioxidante.

ABSTRACT

Plectranthus neochilus Schltr, a species belonging to the Lamiaceae family, is an aromatic herb popularly known in Brazil as “boldo” or “boldo-possá”, and like a species *P. barbatus* (boldo-brasileiro) it has tea from its leaves used in traditional medicine in the treatment of liver failure and dyspepsia. The present study addresses the phytochemical study, an evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of flowers and leaves of *P. neochilus*, collected in Diamantina, Minas Gerais. The hydroalcoholic extract of the flowers and the hydroalcoholic extract of the leaves of the plant, both obtained by maceration, were discovered by preliminary phytochemical exploration using chromogenic and occurrence tests, being possible to detect the presence of tannins, flavonoids, triterpenes and steroids, saponins and coumarins. The chemical composition of the genus *Plectranthus* is vast and complex, with diterpenes being the compounds of greatest interest in phytochemical studies of this genus. Thus, we sought to isolate these metabolites using chromatographic procedures previously incorporated for the isolation of diterpenes. From the extract of the leaves of the plant, it was possible to isolate a new abietanoid diterpene and the spirocoleone type, identified by IR, UV and ¹H and ¹³C NMR. Leaf and flower extracts were taken for cytotoxic activity against tumor cell lines K562, RKO-AS45-1, MDA-MB231, THP1 and Wi-26VA4, non-tumor cell line, using etoposide as the standard cytotoxic compound. The flower extract shows cytotoxicity when compared to non-selective chemotherapy. It was also observed that the cytotoxicity of all extracts is less than that of the standard, the etoposide, in relation to the non-tumor cell line. The antioxidant activity of the extracts was evaluated using electrochemical methods, and the presence of compounds with antioxidant properties in the plant was suggested.

Keywords: *Plectranthus neochilus*, diterpene, cytotoxic, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Classes de diterpenos identificados nas plantas do gênero <i>Plectranthus</i> | 12 |
| Figura 1.1 - Esquema de formação das classes de terpenos via condensação de unidades de cinco carbonos | 18 |
| Figura 1.2 - Esquema de biossíntese das unidades isoprênicas IPP e DMAPP provenientes da via do mevalonato (MEV) | 19 |
| Figura 1.3 Esquema de biossíntese das unidades C ₅ IPP e DMAPP via do metileritritol fosfato (MEP) | 20 |
| Figura 1.4 - Esquema de biossíntese dos principais esqueletos diterpênicos isolados nas plantas do gênero <i>Plectranthus</i> | 22 |
| Figura 1.5 - Via de biossíntese do diterpeno lábdano forscolina a partir do GGPP. | 23 |
| Figura 1.6 - Diterpenóides tipo roileanonas isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 24 |
| Figura 1.7 - Diterpenóides tipo acil-hidroquinonas isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 24 |
| Figura 1.8 - Diterpenóides tipo espirocoleonas e quinonametídeos isolados das espécies do gênero <i>Plectranthu</i> | 25 |
| Figura 1.9 - Diterpenóides tipo 6,20-epoxiabietanóides e abietanóides diméricos isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 25 |
| Figura 1.10 -Diterpenóides tipo abietanos primaranos isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 25 |
| Figura 1.11 - Diterpenóides isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 26 |
| Figura 1.12 - Outros compostos isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 27 |
| Figura 1.13 - Outros compostos isolados das espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 27 |
| Figura 1.14 - Diterpenóide 29 e 30 , isolado do extrato de diclorometano das partes aéreas de <i>Plectranthus Scutellarioides</i> | 30 |
| Figura 1.15 Diterpenóide Coleon O (31), isolado extratos de diclorometano das partes aéreas de <i>P. scutellarioides</i> | 31 |
| Figuras 1.16 - Componentes eugenol (32), α -pineno (33) e β -cariofileno (34) identificados no óleo essencial de <i>P. barbatus</i> | 31 |
| Figura 1.17 - Partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM (Diamantina – MG) – evidenciando o aspecto do crescimento das folhas. | 33 |
| Figura 1.18 - Folhas e caules de <i>P. neochilus</i> Schltr. cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto das folhas | 33 |
| Figura 1.19 - 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 | 34 |
| Figura 1.20 Partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto da inflorescência | 34 |
| Figura 1.21 - Constituintes identificados nos óleos essenciais de amostras de <i>P. neochilus</i> , coletadas em diferentes locais | 37 |
| Figura 1.22 - Compostos identificados nos dos extratos de <i>Plectranthus neochilus</i> | 39 |
| Figura 2.1 - Sequência metodológica para a obtenção de frações polares a partir das folhas e flores de <i>P. neochilus</i> | 47 |
| Figura 3.1 - Cromatograma da mistura dos padrões de flavonóides e ácido fenólico (280 nm; tempo de retenção (min) catequina (13,7), ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3), rutina (28,2), quercetina (34,6) | 58 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 3.2 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas obtidos de <i>Plectranthus neochilus</i> . (280 nm; tempo de retenção (min) ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3)) | 59 |
| Figura 3.3 - Cromatograma da fase flavonoídica das folhas obtidos de <i>Plectranthus neochilus</i> . (280 nm; tempo de retenção (min) catequina (13,7), ácido cafeico (16,7), (+)-epicatequina (18,3) e quercetina (34,6). | 60 |
| Figura 3.4 - Cromatograma do extrato das flores obtidos de <i>Plectranthus neochilus</i> . (280 nm; tempo de retenção (min) quercetina (34,6) | 60 |
| Figura 3.5 - Cromatograma da fase flavonoídica das flores obtidos de <i>P. neochilus</i> . (280 nm; tempo de retenção (min) ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3), quercetina (34,6). | 61 |
| Figura 3.6 - Flavonóides e compostos fenólicos identificados por CLAE nos extratos das flores e folhas de <i>P. neochilus</i> . | 62 |
| Figura 3.7 - Cromatograma de PN1 isolado de <i>P. neochilus</i> (tempo de retenção: 33,10 minutos em 250 nm) | 63 |
| Figura 3.8 - Espectro de absorção na região do IV da substância PN1 isolada do extrato toluênico das folhas e de <i>Plectranthus neochilus</i> | 63 |
| Figura 3.9 - Espectros de absorção no UV-Vis (200-800 nm) da substância PN1 isolada de <i>P. neochilus</i> | 64 |
| Figura 3.10 – Espectro de RMN de ¹ H de PN1 (500 MHz, MeOD). | 65 |
| Figura 3.11 - Secção expandida do espectro de RMN de ¹ H de PN1 na região de δ_H 0 - 1,50 ppm (500 MHz, MeOD) | 65 |
| Figura 3.12 - Secção expandida do espectro de RMN de ¹ H de PN1 na região de δ_H 1,50-1,85 ppm (500 MHz, MeOD) | 66 |
| Figura 3.13 - Secção expandida do espectro de RMN de ¹ H de PN1 na região de δ_H 1,85-2,50 ppm(500 MHz, MeOD) | 66 |
| Figura 3.14 - Secção expandida do espectro de RMN de ¹ H de PN1 na região de δ_H 2,50-3,80 ppm(500 MHz, MeOD) | 67 |
| Figura 3.15 - Secção expandida do espectro de RMN de ¹ H de PN1 na região de δ_H 3,80-6,00 ppm(500 MHz, MeOD) | 67 |
| Figura 3.16 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY, para o composto PN1. | 70 |
| Figura 3.17 - Diterpenóides do tipo abietano espirocoleonas previamente identificados em espécies do gênero <i>Plectranthus</i> | 71 |
| Figura 3.18 - Secção expandida do mapa de contorno HSQC de PN1 na região de δ_C 10 a 35 ppm (500 MHz, MeOD). | 72 |
| Figura 3.19 - Secção expandida do mapa de contorno HSQC de PN1 na região de δ_C 35 a 59 ppm (500 MHz, MeOD). | 72 |
| Figura 3.20 - Secção expandida do mapa de contorno HSQC de PN1 na região de δ_C 60 a 78 pm (500 MHz, MeOD) | 73 |
| Figura 3.21 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 190-200 ppm (500 MHz, MeOD) | 73 |
| Figura 3.22 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 163-178 ppm (500 MHz, MeOD) | 74 |
| Figura 3.23 Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 136-160 ppm (500 MHz, MeOD) | 74 |
| Figura 3.24 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 60-76 ppm (500 MHz, MeOD) | 75 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 3.25 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 60-76 ppm (500 MHz, MeOD) | 75 |
| Figura 3.26 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 26-52 ppm (500 MHz, MeOD) | 76 |
| Figura 3.27 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 26-52 (500 MHz, MeOD) | 76 |
| Figura 3.28 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de PN1 na região de δ_C 12-29 (500 MHz, MeOD) | 77 |
| Figura 3.29 - Mapa de contorno COSY de PN1 (500 MHz, MeOD) | 77 |
| Figura 3.30 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de PN1 na região de δ_H 3,0-5,8 (500 MHz, MeOD) | 78 |
| Figura 3.31 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de PN1 na região de δ_H 2,0-4,4 (500 MHz, MeOD) | 78 |
| Figura 3.32 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de PN1 na região de δ_H 0,0-4,4 (500 MHz, MeOD) | 79 |
| Figura 3.33 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}^1$) e de pulso diferencial ($v=30 \text{ mV/s}$) do extrato bruto das folhas de <i>P. neochilus</i> (EF) em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 83 |
| Figura 3.34 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}$) do padrão canferol e em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 83 |
| Figura 3.35 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}$) e de pulso diferencial ($v = 20 \text{ mV/s}$) da fase flavonoídica das folhas de <i>P. neochilus</i> em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 84 |
| Figura 3.36 - Voltamogramas cíclicos ($v=20 \text{ mV/s}$) e de pulso diferencial ($v = 20 \text{ mV/s}$) do extrato bruto das flores de <i>P. neochilus</i> em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 85 |
| Figura 3.37 - Voltamogramas cíclicos ($v=20 \text{ mV/s}$) e de pulso diferencial ($v = 20 \text{ mV/s}$) da fase flavonoídica das flores de <i>P. neochilus</i> em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 86 |
| Figura 3.38 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}$) e de pulso diferencial ($v = 20 \text{ mV/s}$) do ácido ascórbico em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 Fracionamento cromatográfico de P01, proveniente da extração das folhas de <i>P. neochilus</i> . | 51 |
| Tabela 2.2 Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do precipitado amarelo, proveniente da extração das folhas de <i>P. neochilus</i> . | 51 |
| Tabela 2.3 Fracionamento cromatográfico de R8. | 52 |
| Tabela 2.4 Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico de R8. | 52 |
| Tabela 3.1 Deslocamento químicos de RMN de ^{13}C de d ^1H de PN1 e dados de RMN dos compostos espiroscutelone C (ITO <i>et al.</i> ,2018) e espirocoleone (RUEDI <i>et al.</i> ,1983). | 79 |
| Tabela 3.2 Atividade citotóxica das fases extrato de flores (EF1) e fase flavonóide (EFF) das folhas de <i>P. neochilus</i> e etoposídeo (controle) para linhagens celulares. | 81 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1.1 - Principais atividades biológicas descritas para o gênero <i>Plectranthus</i> | 28 |
| Quadro 1.2 - Locais de coleta e obtenção de óleos voláteis de <i>P. neochilus</i> e constituintes majoritários | 35 |
| Quadro 3.1 - Componentes fitoquímicos dos extratos das folhas e flores de <i>P. neochilus</i> identificados na triagem preliminar dos extratos | 55 |

LISTA DE NOTAÇÕES

δ – Deslocamento químico

ν – Número de onda

λ – Comprimento de onda

CCDS – Cromatografia em camada delgada de sílica

CCS – Cromatografia em coluna de sílica gel

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

d – Duplete

dd – duplete duplo

ddd – Duplo duplete duplo

DMAPP – Dimetilalila pirofosfato

EM – Espectro de massas

HeLa – linhas celulares de câncer cervical

HepG2 - linhas celulares de carcinoma hepatocelular hepático

HCT116 – linhas celulares de câncer de cólon

HT-29 - linhas celulares de câncer de cólon humano

IPP – Isopentenila pirofosfato

J – Constante de acoplamento escalar

m – Multiplete

MEP – Metileritritol fosfato

MVA - Mevalonato

MCF-7 – linhas celulares de câncer de mama

MDA-MB-231 – linhas celulares de câncer de mama

NCI-H460 - linhas celulares de carcinoma de pulmão

q – Quarteto

Rf – Fator de retenção

s – Simpleto

t – Tripleto

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 11 |
| OBJETIVOS | 14 |
| CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 1.1. Informações etnobotânicas das espécies pertencentes ao gênero <i>Plectranthus</i> | 15 |
| 1.2. Fitoquímica | 16 |
| 1.2.1. Diterpenos | 16 |
| 1.2.2. Compostos isolados das espécies de <i>Plectranthus</i> | 23 |
| 1.2.3. Outros compostos encontrados no gênero <i>Plectranthus</i> | 26 |
| 1.3. Atividades biológicas do gênero <i>Plectranthus</i> | 28 |
| 1.4. <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr. | 32 |
| 1.4.1. Descrição botânica de <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr. | 32 |
| 1.4.2. Constituintes químicos previamente descritos em <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr. | 35 |
| 1.4.2.1. Composição do Óleo essencial | 35 |
| 1.4.2.2. Composição de extratos <i>P. neochilus</i> | 37 |
| 1.4.3. Atividades biológicas demonstradas em estudos de <i>P. neochilus</i> | 40 |
| 1.4.3.1. Atividade citotóxica | 40 |
| 1.4.3.2. Atividade antioxidante | 40 |
| 1.4.3.3. Atividade antimicrobiana | 41 |
| 1.4.3.4. Toxicidade | 42 |
| 1.4.3.5. Outras atividades | 42 |
| 1.5. Importância da pesquisa de Produtos Naturais para desenvolvimento de antitumorais | 42 |
| 1.6. Atividade antioxidante | 43 |
| CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA | 44 |
| 2.1. Material vegetal | 44 |
| 2.1.2. Métodos cromatográficos | 44 |
| 2.1.2.1. Cromatografia em coluna (CC) | 44 |
| 2.1.2.1.1. Sílica Flash Agela Technologies® (40-60 µm) | 44 |
| 2.1.2.1.2. Sílica Flash Agela Technologies® (40-60 µm) impregnada com nitrato de prata (AgNO ₃) | 44 |
| 2.1.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 45 |
| 2.1.2.3.1. Condições de análise | 45 |
| 2.1.3. Reagentes para revelações cromatográficas (MATOS, 1998) | 45 |
| 2.1.3.1. Irradiação com luz ultravioleta (λ 254 e 365 nm) | 45 |
| 2.1.3.2. Vapores de iodo | 45 |

| | |
|---|----|
| 2.1.3.3 Vanilina | 45 |
| 2.1.4. Métodos espectrométricos | 46 |
| 2.1.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV) | 46 |
| 2.1.4.2. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C | 46 |
| 2.1.4.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis) | 46 |
| 2.2. Estudo Fitoquímico | 46 |
| 2.2.1. Obtenção de extratos polares por partição | 46 |
| 2.2.2. Obtenção dos extratos polares por maceração | 48 |
| 2.3. Prospecção fitoquímica | 48 |
| 2.3.1. Teste para Triterpenos e/ou estereoides | 48 |
| 2.3.2. Teste para Flavonoides | 48 |
| 2.3.2.1. Reação com hidróxido de amônio | 48 |
| 2.3.2.2. Reação de Cianidina | 48 |
| 2.3.3. Teste para Taninos | 49 |
| 2.3.3.1. Reação com Cloreto Férrico | 49 |
| 2.3.3.2. Reação com gelatina | 49 |
| 2.3.4. Teste para Alcaloides | 49 |
| 2.3.4.1. Reativo de Mayer | 49 |
| 2.3.4.2. Reativo de Dragendorff | 49 |
| 2.3.5. Teste para Saponinas | 49 |
| 2.3.6. Teste para Cumarinas | 50 |
| 2.4. Extração e isolamento de diterpenos | 50 |
| 2.4.1. Fracionamento de R8 | 51 |
| 2.5. Extração do óleo essencial | 52 |
| 2.6. Atividade biológica | 53 |
| 2.6.1. Atividade citotóxica | 53 |
| 2.7.1. Atividade antioxidante por voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) | 53 |
| CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 3.1 Estudo químico | 55 |
| 3.1.1. Prospecção fitoquímica | 55 |
| 3.1.2. Identificação de compostos flavonoídicos nos extratos de folhas e flores de <i>Plectranthus neochilus</i> por CLAE | 58 |
| 3.1.2. Determinação estrutural do diterpeno isolado de <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr. | 62 |
| 3.1.2.1. PN1 | 62 |
| 3.2. Atividades biológicas | 80 |

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| 3.2.1. | <i>Atividade citotóxica</i> | 80 |
| 3.2.2. | <i>Atividade antioxidante por voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD)</i> | 82 |
| CAPÍTULO 4 - | CONCLUSÕES | 88 |
| REFERÊNCIAS | BIBLIOGRÁFICAS | 90 |

INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações (BERLINCK et al., 2017).

De acordo com Ministério do Meio Ambiente (MMA), até meados de 2016, globalmente os fitoterápicos representaram aproximadamente 25% do mercado dos medicamentos, o que implicou uma movimentação financeira, para moléculas derivadas de produtos naturais, situada entre US\$ 500 e 800 bilhões anuais (BRASIL, 2016). O Brasil, em decorrência de ser um dos países mega-biodiversos, apresenta número superior a 55 mil espécies descritas (22% do total mundial), ocupando assim uma posição privilegiada na ciência de produtos naturais, agregando um grande corpo de pesquisadores nessa área da química (BERLINCK et al., 2017).

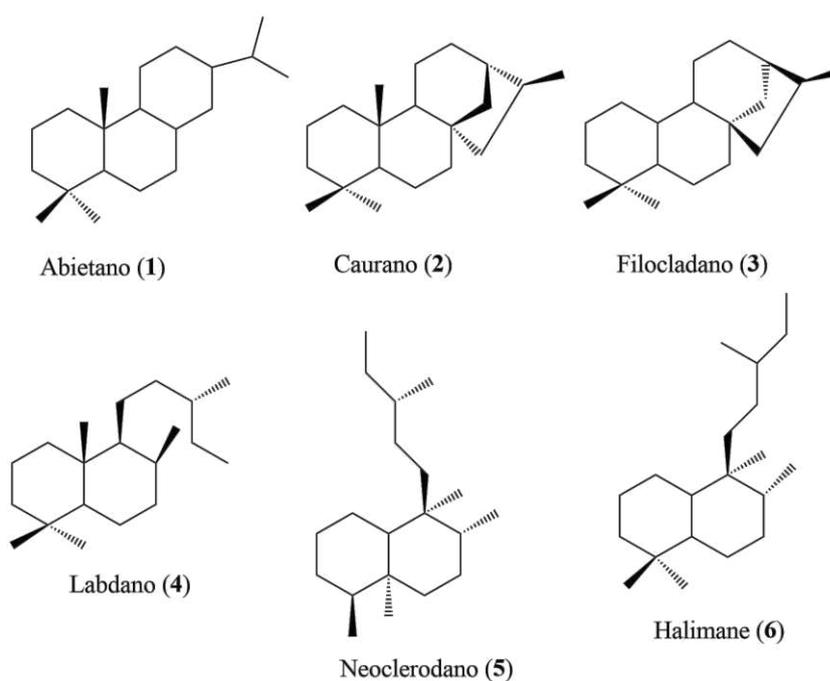
Dentre as várias espécies de importância medicinal e comercial, neste trabalho, destaca-se as plantas do gênero *Plectranthus*, pertencente à família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae). O gênero compreende arbustos, herbáceas, espécies ornamentais, comestíveis, com propriedades medicinais, de interesse econômico. O potencial medicinal do gênero é indiscutível, considerando que tais propriedades representam mais de 85% dos usos etnobotânicos relatados, segundo Luckhoba e colaboradores (2006). Essas espécies têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diferentes distúrbios digestivos, infecções gerais, febre, dor, condições músculoesqueléticas, no tratamento de problemas respiratórios e de pele, repelentes de insetos e de escorpião sendo plantadas aos arredores das casas e como agentes antisépticos (ABDEL-MOGIB et al., 2002; LUCKHOBA et al., 2006). Algumas espécies de *Plectranthus* também foram descritas por seu potencial citotóxico e antioxidante (AMINA et al., 2017; GARCIA et al., 2018a; LUCKHOBA et al., 2006; MOTHANA et al., 2019; MUNIYANDI, 2017; NTUNGWE et al., 2017).

O gênero abriga os chamados falsos boldos, são eles *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus grandis*, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus neochilus* e *Plectranthus ornatus*, todos cultivados no Brasil. Porém, o verdadeiro boldo, *Peumus boldus* (Monimiaceae), é uma árvore originária do Chile e que não é cultivado no Brasil. Além

dos citados, a *Vernonia condensata*, da família Asteraceae, é outra espécie também conhecida e utilizada no país como boldo (LORENZI e MATOS, 2002, 2008).

Estudos comprovam o inegável valor do gênero *Plectranthus* como fonte de compostos bioativos e potenciais medicamentos (LUCKHOBA et al., 2006). As propriedades farmacológicas apresentadas pelas plantas do gênero *Plectranthus* têm sido frequentemente atribuídas aos óleos essenciais, cujos principais constituintes são mono e sesquiterpenos e à presença de diterpenos bioativos oxigenados, pertencentes prioritariamente às classes abietano (1), caurano (2), filocladano (3), labdano (4), neoclerodano (5) e halimane (6) (ABDEL-MOGIB et al., 2002) (FIG. 1).

Figura 1 - Classes de diterpenos identificados nas plantas do gênero *Plectranthus*



Dentre as espécies medicinais do gênero, têm-se o *Plectranthus neochilus* Schltr., conhecida popularmente como “boldo-gambá” atribuído por ser uma planta muito aromática, cujas folhas frescas são tomadas como infusão ou extrato aquoso, utilizados no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia, problemas de digestão, infecções de pele e de doenças respiratórias (LORENZI & MATOS, 2002; DUARTE et al., 2007). Alguns estudos foram previamente descritos, caracterizando a composição química do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *P. neochilus*, coletadas em diferentes locais de crescimento. As composições químicas desses óleos essenciais se mostraram substancialmente diferentes (MOTA et al., 2014; CAIXETA et al., 2011; MOSTAFA et al., 2019), entretanto, como perfil geral, hidrocarbonetos monoterpênicos foram os

constituintes voláteis mais prevalentes, em adição a sesquiterpenos, como o β -cariofileno e sua forma oxidada, óxido de cariofileno, que também estavam presentes em altos rendimentos (LAWAL et al., 2010). Ensaios de atividade biológica demonstraram o potencial antimicrobiano, esquistossomicida, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante e citotóxico dos óleos essenciais de *P. neochilus* (MATIAS et al., 2019; LAWAL et al., 2010; CAIXETA et al., 2011). Trabalhos decorendo o estudo fitoquímico de extratos das partes aéreas da planta são escassos, sendo descritos até o momento, o isolamento dos triterpenos friedelina, α e β -amirina, α -amirinafoi isolada como um éster de ácido graxo ligado na posição C-3, os esteroides sitosterol e estigmasterol, o flavonóide cirsimaritina (VIANA, 2011, MATIAS, 2019). A análise dos extratos de *P. neochilus* por CLAE permitiram identificar os ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico e cumárico e rosmarínico (MATIAS, 2019; ANDRADE et al., 2018; RAMBORGER et al., 2017). As atividades citotóxica, antioxidante, antimicrobiana e digestiva são descritas para os extratos de diferentes polaridades, obtidos das partes aéreas da espécie (ARCANJO et al., 2012; BORGES et al., 2016; RIJO et al., 2014; RAMBORGER et al., 2017; CREVELIN et al., 2015; RÊGO et al., 2018; BRITO et al. 2018).

Considerando o potencial medicinal do gênero *Plectranthus*, e desta forma, buscando contribuir para o conhecimento da composição química de mais uma espécie ainda pouco estudada, este trabalho teve por objetivo a caracterização fitoquímica do extrato das folhas e flores de *P. neochilus* e a avaliação do potencial antioxidante e citotóxico frente a linhagens tumorais desses extratos. . .

OBJETIVOS

A presente dissertação descreve o estudo fitoquímico da espécie vegetal *P. neochilus*, utilizada tradicionalmente para fins medicinais e amplamente difundida no Brasil, assim como a avaliação do potencial biológico dos extratos dessa planta. Para tal, os objetivos de investigação propostos foram:

- Realizar prospecção fitoquímica dos extratos das flores e das folhas por meio de testes cromogênicos e de precipitação;
- Identificar flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos da planta;
- Obter e análise do óleo essencial das flores de *P. neochilus*;
- Fracionar cromatográfico de extratos, com vistas ao isolamento de diterpenos;
- Utilização de técnicas espectrométricas e espectroscópicas de análise para a identificação estrutural dos compostos isolados;
- Avaliação do potencial citotóxico dos extratos das folhas e flores frente a linhagens de células tumorais e células não tumorais;
- Avaliação do potencial antioxidante dos extratos das folhas e flores pelo método eletroquímico.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Plectranthus L'Hér, pertencente à família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae), é um grande gênero constituído por cerca de 350 espécies de ervas e arbustos perenes nativos de regiões tropicais da África, Ásia e Austrália. (COOD, 1985). Taxonomicamente, as espécies *Coleus* Lour. são relacionadas a *Plectranthus*, entretanto, o gênero possui questões taxonômicas ainda em discussão. A inserção do gênero *Coleus* é um ponto discutido por autores desde 1962, pois inicialmente acreditava-se que ambos apresentavam características morfológicas distintas. Com estudos posteriores, as espécies de *Coleus* foram aceitas e agregadas à *Plectranthus*, embora ainda haja certa dificuldade para distingui-las (GALBIATE, 2019; ABDEL-MOGIB et al., 2002). O nome *Plectranthus* vem das palavras gregas *plektron* (esporão) e *anthos* (flor), evidenciando uma característica das flores das espécies deste gênero que apresentam um esporão em suas bases (MÉNDEZ e RIFÁ, 2016).

Várias espécies de *Plectranthus* são cultivadas como tubérculos comestíveis, condimentos, fragrâncias para xampus, plantas ornamentais. Esse é um gênero rico em óleos essenciais (maior que 0,5% do peso seco da planta) (ABDEL-MOGIB et al., 2002), que são amplamente utilizados em preparações farmacêuticas, em perfumaria e cosméticos (ASCENSÃO et al., 1998). O gênero *Plectranthus* constitui em 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 de informações químicas sobre esse gênero pode ser encontrada nos trabalhos desenvolvidos por Abdel-Mogib e colaboradores (2002), e posterior a essa data, por Oliveira (2007) e Garcia (2018a).

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

Cerca de 85% das espécies pertencentes ao gênero são utilizadas na medicina popular no tratamento de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatites, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente anti-séptico (ASCENSÃO et al., 1998 e 1999; RICE et al., 2011; COSTA, 2006; LUCKHOBA et al., 2006).

Desordens do sistema digestivo são tratadas utilizando-se 21 espécies de *Plectranthus*, dentre elas: *P. barbatus*, *P.amboinicus*, *P. laxiflorus*, *P. esculentus* e *P. vetiveroides*. As espécies ainda são usadas para distúrbios respiratórios, doenças de pele, atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (COSTA, 2006; LUCKHOBA et al., 2006). As espécies de *P. barbatus* e *P. amboinicus* são empregadas ainda no tratamento de infecções bucais, apresentando efeitos contra as bactérias causadoras de cárie dentária (SANTOS VERÍSSIMO et al., 2014; LUCKHOBA et al., 2006).

Para as espécies *P. barbatus* e *P. amboinicus* são descritos os mais diversos usos populares que correspondem a aproximadamente 68% de todos os usos tradicionais descritos para o gênero (LUCKHOBA et al., 2006). *P. barbatus* é umas das espécies mais importantes desse gênero, amplamente utilizada no Brasil, é identificada por vários sinônimos, tais como *P. forskohlii* Briq., *P. forskohlii* Willd., *P. kilimandschari* (Gurke) H. L., *P. grandis* (Cramer) R. H. Willemse, *Coleus forskohlii* Briq., *Coleus kilimandschari* Gurke ex Engl., *Coleus coeruleus* Gurke, *Coleus comosus* A. Rich. e *Coleus barbatus* (Andr.) Benth. (ALASBAHI & MELZIG, 2010). 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 tradicional é usada no tratamento de cefaléia, anorexia, cólera, cólica, tosse crônica, cálculos renais e vesiculares e apresenta atividade anti-helmíntica (KUMAR et al., 2020).

1.2. Fitoquímica

Estudos químicos envolvendo as espécies de *Plectranthus* são descritos desde a década de 60. A composição química do gênero *Plectranthus* é vasta e complexa e dos compostos identificados, os diterpenóides são os principais metabólitos secundários presentes.

1.2.1. Diterpenos

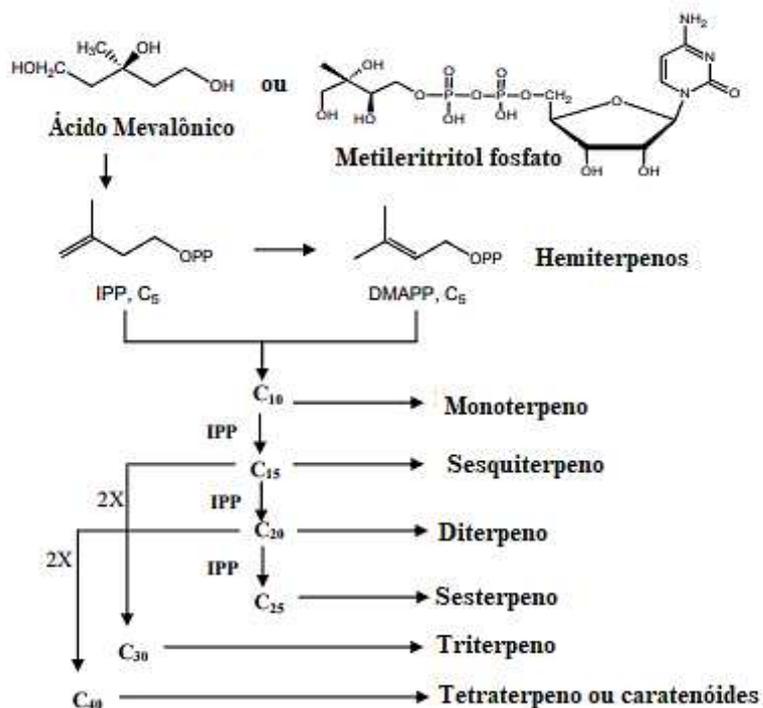
Os diterpenos constituem a segunda maior classe de terpenos, com mais de 2.200 compostos identificados, pertencentes a 130 diferentes tipos de esqueleto. O interesse no isolamento destes compostos é crescente devido à sua vasta gama de atividades biológicas, função ecológica, uso como molde para síntese e função taxonômica (LADEIRAS et al., 2016). São os compostos de maior interesse nos estudos fitoquímicos

desse gênero, com um significativo número de compostos já identificados (ABDELMOGIB et al., 2002; HANSON, 2009; GASPAR-MARQUES et al., 2005; LUCKHOBA et al., 2006).

Os diferentes esqueletos terpênicos são derivados de reações de condensação entre unidades de cinco carbonos, unidades isoprênicas. Estruturas típicas contendo esqueletos de carbonos representados por $(C_5)_n$ são classificadas como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (FIG. 1.1, p. 18). O isopreno foi caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais e foi sugerido como o bloco de construção fundamental para os terpenóides (isoprenóides). Entretanto, o isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação desses compostos, e as unidades de isopreno bioquimicamente ativas foram identificadas como difosfato (pirofosfato) de dimetilalila (DMAPP) e pirofosfato de isopentenila (IPP).

As unidades bioquímicas DMAPP e IPP (C_5) podem ser derivadas de duas vias, envolvendo dois intermediários distintos: ácido mevalônico (MVA) ou 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (metileritritol fosfato - MEP) (FIG. 1.1, p. 18). Nas plantas, as duas vias parecem ser compartimentadas, sendo as enzimas da via do mevanolato localizadas no citosol, enquanto as enzimas da via do fosfato de desoxixilulose encontradas nos cloroplastos. Conseqüentemente, sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides (produtos citosólicos) são formados pela via do mevanolato, enquanto que a maioria dos outros terpenóides são formados nos cloroplastos, e são derivados da fosfato de desoxixilulose, com algumas exceções. Também há exemplos em que as duas vias podem fornecer porções diferentes de uma molécula ou onde há troca de intermediários comuns de estágio avançado entre as duas vias, resultando em uma contribuição de unidades de isopreno de cada (DEWICK, 2008). Entretanto, resultados contraditórios, apresentados por Wanke e colaboradores (2001), sugerem que essas duas vias estão operando em diferentes condições fisiológicas da célula e são dependentes do estado de desenvolvimento dos plastídeos.

Figura 1.1 - Esquema de formação das classes de terpenos via condensação de unidades de cinco carbonos

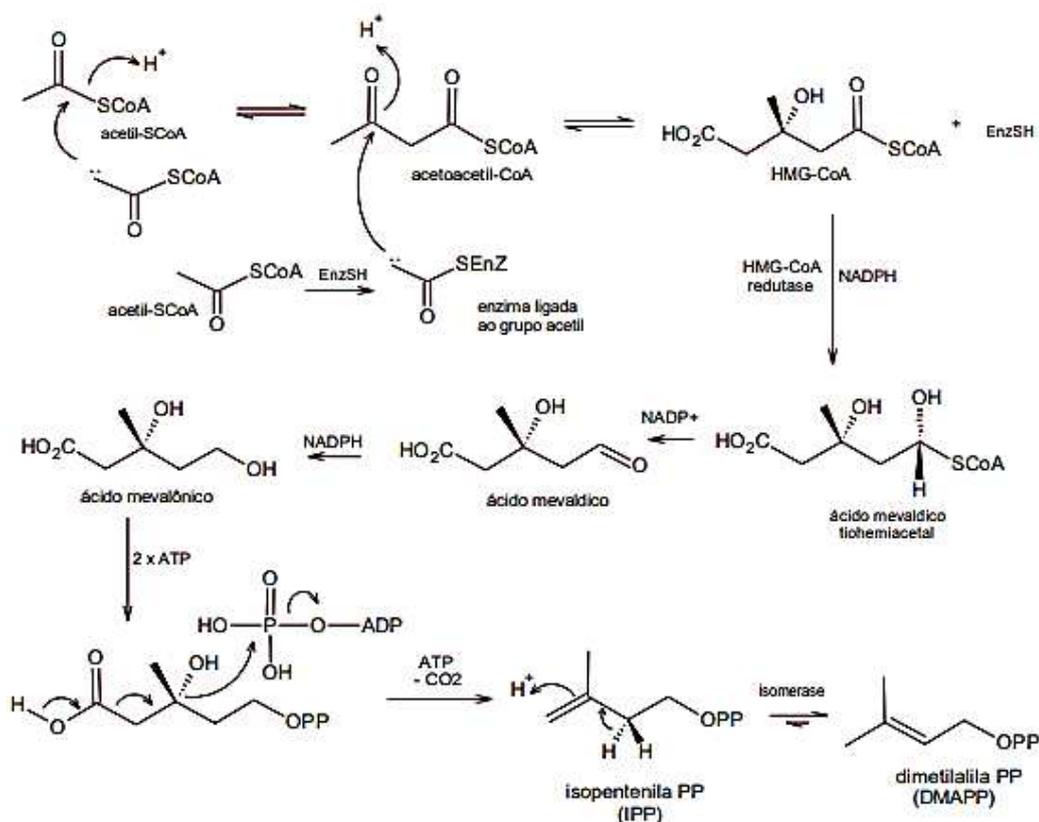


Fonte:

DEWICK, 2008, p.188.

Para a síntese do intermediário MVA, três moléculas de acetil-coenzima A são utilizadas, ocorrendo inicialmente a combinação entre duas em uma condensação de Claisen, fornecendo o acetoacetil-CoA. A terceira é incorporada via uma adição aldólica estereoespecífica, fornecendo a cadeia ramificada do éster 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A conversão do HMG-CoA em (3*R*)-MVA envolve reduções em duas etapas, que convertem um grupamento tioéster em um álcool primário. O composto de seis carbonos, MVA, é transformado fosforilados de cinco carbonos, em uma série de reações, que se iniciam pela fosforilação do álcool primário. Duas diferentes enzimas ATP-dependentes são envolvidas, resultando no ácido mevalônico difosfato, que por descarboxilação-desidratação conduzem a unidade C₅, IPP. A isomerização de IPP, a outra unidade isoprênica, DMAPP, é catalisada por uma enzima isomerase, que incorpora um próton, gerado a partir da água, na posição C-4 e estereoespecificamente, remove o próton pró-*R* de C₂ (DEWICK, 2008) (FIG. 1.2, p. 19).

Figura 1.2 - Esquema de biossíntese das unidades isoprênicas IPP e DMAPP provenientes da via do mevalonato (MEV)

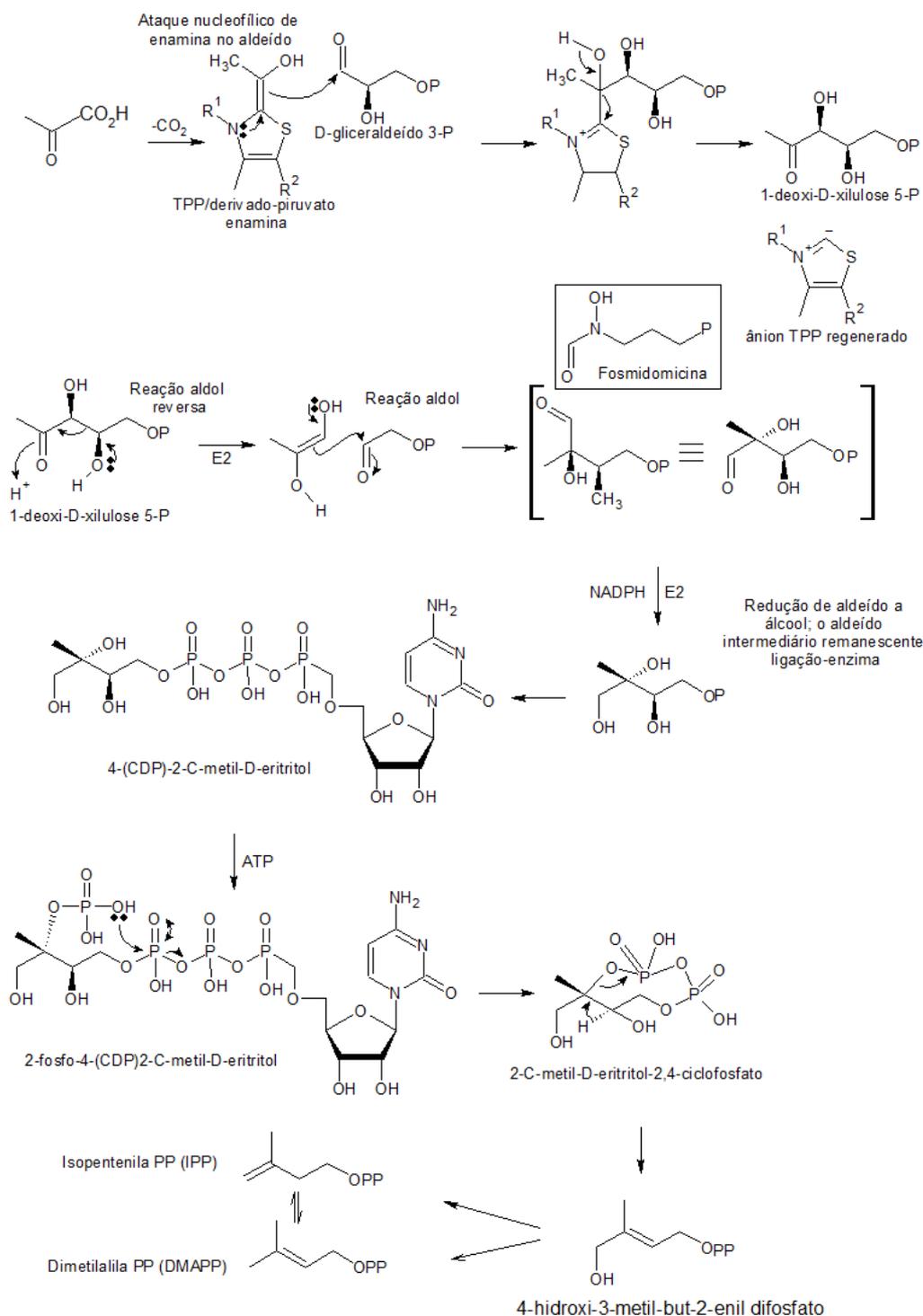


Fonte: DEWICK, 2008, p. 190

Os intermediários da via glicolítica, ácido pirúvico e gliceraldeído 3-fosfato são os precursores do metileritritol fosfato (MEP) (FIG. 1.3, p. 20). A descarboxilação de piruvato mediada por difosfato de tiamina produz um equivalente de acetaldeído ligado na forma de enamina (TPP). Este reage como um nucleófilo em reação de adição com o gliceraldeído 3-fosfato. A saída do grupo TPP gera a 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (fosfato de desoxixilulose) que é convertido em MEP por processos de rearranjos, que parece envolver uma sequência reversa aldol-aldol, juntamente com uma redução. Uma única enzima catalisa estes rearranjos esqueléticos e reações de redução sem qualquer liberação de intermediário. Assim, o produto contém o sistema de cadeia ramificada equivalente à unidade de isopreno. A reação do MEP com trifosfato de citidina (CTP) produz um derivado difosfato de citidina (CDP) que é então fosforilado via ATP. O 2-fosfato resultante é então convertido em um fosfoanidrido cíclico com perda de fosfato de citidina. As etapas subsequentes que levam ao IPP e DMAPP são a parte menos compreendida da via. A metodologia do gene mostrou que duas enzimas estão envolvidas, a primeira produzindo 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato e o segundo convertendo-o

predominantemente em IPP, mas também em DMAPP, ambas as etapas são redutoras. A formação do IPP e DMAPP envolve um sistema alílico, com prótons fornecidos pela água (DEWICK, 2008) (FIG.1.3).

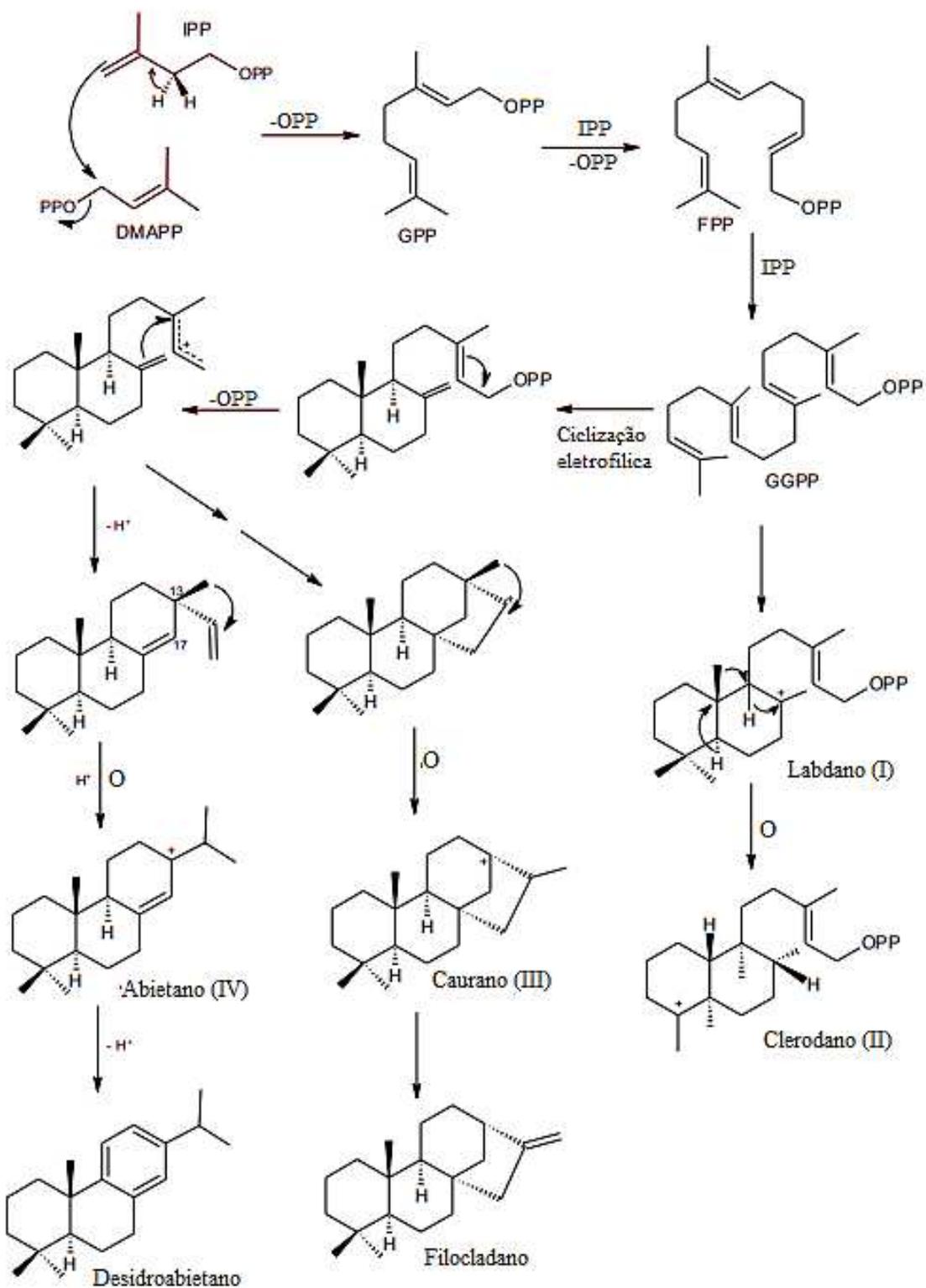
Figura 1.3 Esquema de biossíntese das unidades C₅ IPP e DMAPP via do metileritritol fosfato (MEP)



A condensação de Claisen das unidades C₅, IPP e DMAPP, via a enzima prenil transferase, fornece intermediário pirofosfato de geranila (GPP, C₁₀), que ao condensar com outra unidade de IPP, leva ao pirofosfato de farnesila (FPP, C₁₅). Por fim, a condensação de FPP com outra unidade de IPP, fornece o pirofosfato de geranylgeranila (GGPP, C₂₀), precursor dos diterpenos. Reações de ciclização de GGPP envolvendo diferentes carbocátions e rearranjos Wagner-Meerwein conduzem as variações estruturais dos diterpenos isolados, como demonstrado na Figura 1.4, página 22 (DEWICK, 2008). Além disso, os sistemas de enzimas individuais presentes em um determinado organismo irão então controlar o dobramento da molécula dos substratos e, assim, definir a estereoquímica do produto final (RIJO et al., 2010). Alguns dos esqueletos diterpênicos, encontrados frequentemente em espécies de *Plectranthus*, são o labdano (I), clerodano (II), caurano (III) e abietano (IV), conforme mostrado na Figura 1.4 (p. 22).

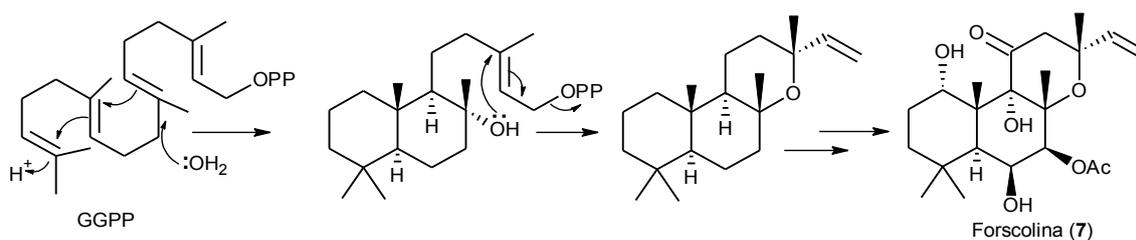
Dentre os representantes dessa classe de metabolitos secundários, destaca-se o diterpeno labdano forscolina (7, FIG. 1.5, p. 23), que em sua biossíntese ocorre a formação de um terceiro anel heterocíclico. O esqueleto básico da forscolina pode ser visto como o resultante da ciclização do cátion promovida pela água, seguida da substituição nucleofílica S_N2 no difosfato alílico (ou substituição nucleofílica no cátion alílico gerado pela perda do grupo pirofosfato). Uma série de modificações oxidativas subsequentes conduz então à forscolina (uma ferramenta farmacológica valiosa como um potente estimulador da atividade da adenil ciclase, com efeitos cardiovasculares e broncoespasmodílicos expressivos) (DEWICK, 2008).

Figura 1.4 - Esquema de biossíntese dos principais esqueletos diterpênicos isolados nas plantas do gênero *Plectranthus*



Fonte: Dewik, 2008, p. 229 e 230. Adaptado.

Figura 1.5 - Via de biossíntese do diterpeno lábdano forscolina a partir do GGPP.



Fonte: Dewik, 2008, p.233. Adaptado.

1.2.2. Compostos isolados das espécies de *Plectranthus*

Dentre os diterpenóides identificados em *Plectranthus*, a maioria é do tipo abietanóide altamente modificados, podendo ser sub-classificados, de acordo com a variação estrutural apresentada, como roileanonas (**8**, FIG. 1.6, p. 24) (GASPAR-MARQUES et al., 2006) (**9**, FIG. 1.6, p. 24) (GARCIA et al., 2018b), acil-hidroquinonas (**10**, FIG. 1.7, p. 24) (MATIAS et al., 2019), espirocoleonas (**11**) (FIG. 1.8, p. 25) (ITO et al., 2018) e quinonametóides (**12**, FIG. 1.8, p. 25) (SIMÕES et al., 2010), 6,20-epoxiabietanóides (**13** FIG. 1.9, p. 25) (TIBOR et al., 2004), abietanóides diméricos (**14**, FIG. 1.9, p. 25) (RODRIGUEZ et al, 1995) e abietanóides primaranos (**15 e 16**, FIG. 1.10, p. 25) (STAVRI et al., 2009). Ressaltando que vários dos abietanóides isolados do gênero *Plectranthus* e *Coleus* são compostos de interesse farmacológico.

Os diterpenóides do tipo labdano são uma importante classe de substâncias bioativas presentes no gênero *Plectranthus*, descritos em espécies como *P. barbatus*, *P. fruticosus* e *P. ornatus* (LUCKHOBA et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2006a).

A espécie *P. barbatus*, uma das mais relevantes do gênero, é tradicionalmente utilizada para diversas patologias e com várias propriedades farmacológicas comprovadas. (ALASBAHI & MELZIG, 2010). Para essa planta, são descritos aproximadamente 68 diterpenóides, e destes, 25 são pertencentes à classe dos abietanos e 43 a dos labdanos (ALASBAHI & MELZIG, 2010). Dentre os diterpenóides do tipo labdano previamente descritos em *P. barbatus*, tem-se a forscolina (**7**), (FIG. 1.5), composto relacionado a muitos dos diversos usos medicinais dessa espécie vegetal (RIJO et al., 2010). Este diterpeno é usado em várias preparações farmacêuticas patenteadas e como medicamento de venda livre, com os nomes *Coleus Forskohlii*, *Forskohlii* e

Forskolin indicado para o tratamento de pressão alta, tratamento de glaucoma, desordens respiratórias, suplemento para perda de peso e prevenir o bloqueio dos vasos sanguíneos (ALASBAHI & MELZIG, 2010; KUMAR et al, 2020).

Outros diterpenos isolados do gênero *Plectranthus* incluem filocladanos tetracíclicos e derivados caurânicos, como a camebaucarina (17, FIG. 1.11, p.. 26). Diterpenóides caurânicos foram identificados em um grande número de plantas medicinais e são utilizados no tratamento de inflamações e câncer (LEE et al., 2002). Além destes, diterpenos clerodanos como a ornatina E (18, FIG. 1.11, p.. 26), também foram encontrados em espécies de *Plectranthus* em estudos realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2006b), RIJO e colaboradores (2011) e ÁVILA e colaboradores (2017).

Figura 1.6 - Diterpenóides tipo roileanonas isolados das espécies do gênero *Plectranthus*

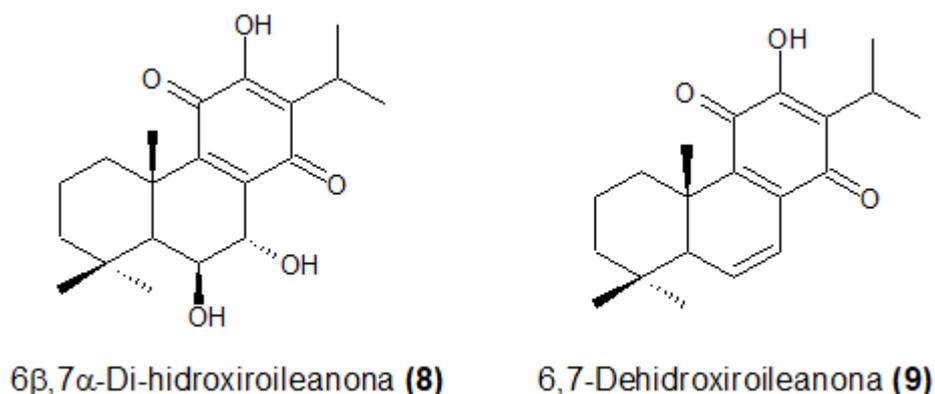


Figura 1.7 - Diterpenóides tipo acil-hidroquinonas isolados das espécies do gênero *Plectranthus*

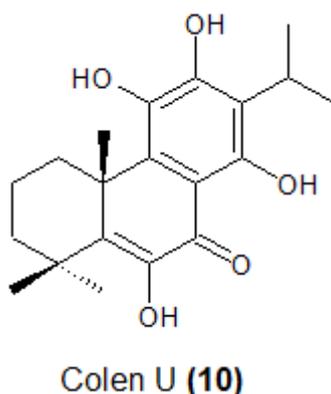
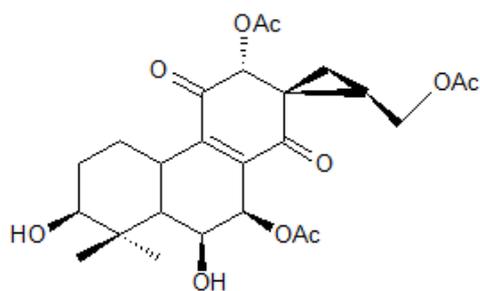
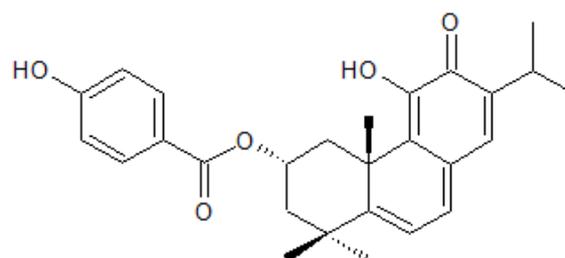


Figura 1.8 - Diterpenóides tipo espirocoleonas e quinonametídeos isolados das espécies do gênero *Plectranthus*

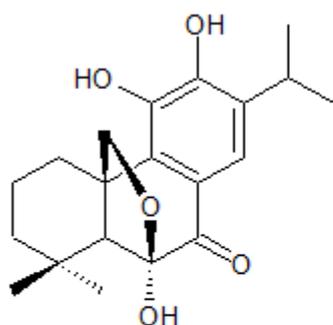


Espirocutelone C (11)

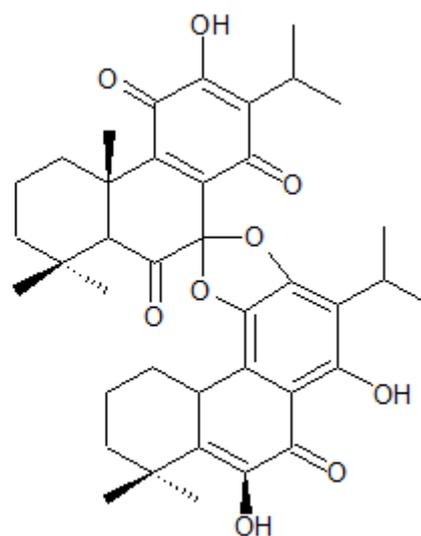


Parviflorona D (12)

Figura 1.9 - Diterpenóides tipo 6,20-epoxiabietanóides e abietanóides diméricos isolados das espécies do gênero *Plectranthus*

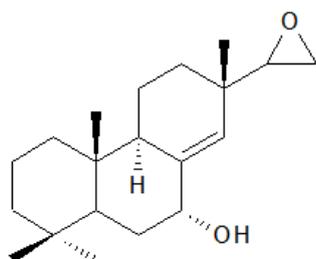


Comosolon (13)

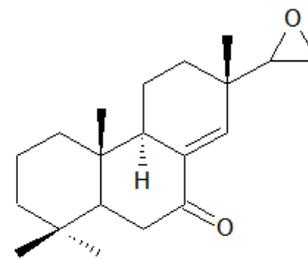


Grandidona A (14)

Figura 1.10 -Diterpenóides tipo abietanos primaranos isolados das espécies do gênero *Plectranthus*

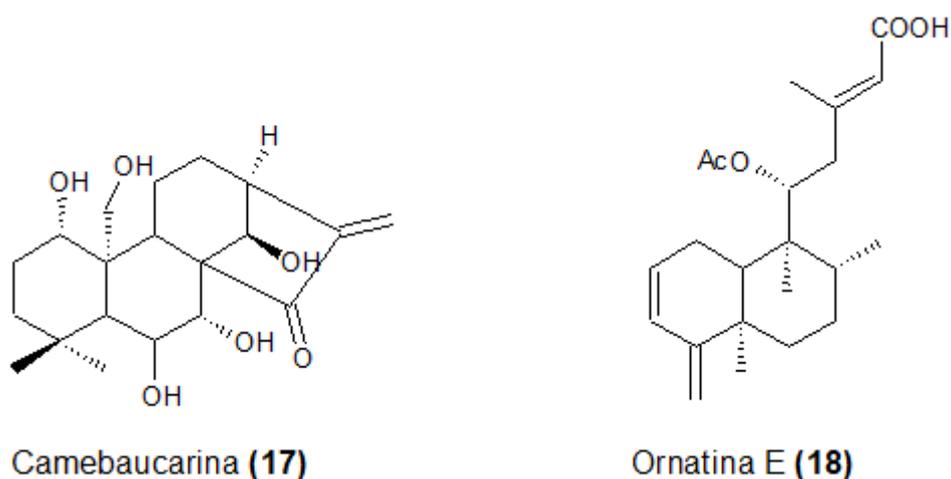


rel-15(z),16-epoxi-7 α -hidroxipimar-8,14-ene (15)



rel-15(z),16-epoxi-7-oxopimar-8,14-ene (16)

Figura 1.11 - Diterpenóides isolados das espécies do gênero *Plectranthus*



1.2.3 Outros compostos encontrados no gênero *Plectranthus*

O estudo realizado por Waldia e colaboradores (2011) descreve o isolamento de triterpenos tipo amirinas (pentacíclicos) (**19 e 20**), flavonas (**21 e 22**) e ácidos graxos (**23**) em diferentes espécies de *Plectranthus* (FIG. 1.12, p. 27).

Estudos conduzidos por Kubínová e colaboradores (2019) descrevem o isolamento das flavonas apigenina 7-*O*-(3''-*O*-acetil- β -D-glucosídeo, apigenina 5-*O*-(3''-*O*-acetil)-D-glucosídeo e luteolina 5-*O*- β -D-glucosídeo (**24-25 e 27**) em partes aéreas *P. scutellarioides*. Foram isolados também ácidos fenólicos como ácido cafeico e o ácido rosmarínico (**26 e 28**, FIG. 1.13, p.. 27).

Figura 1.12 - Outros compostos isolados das espécies do gênero *Plectranthus*.

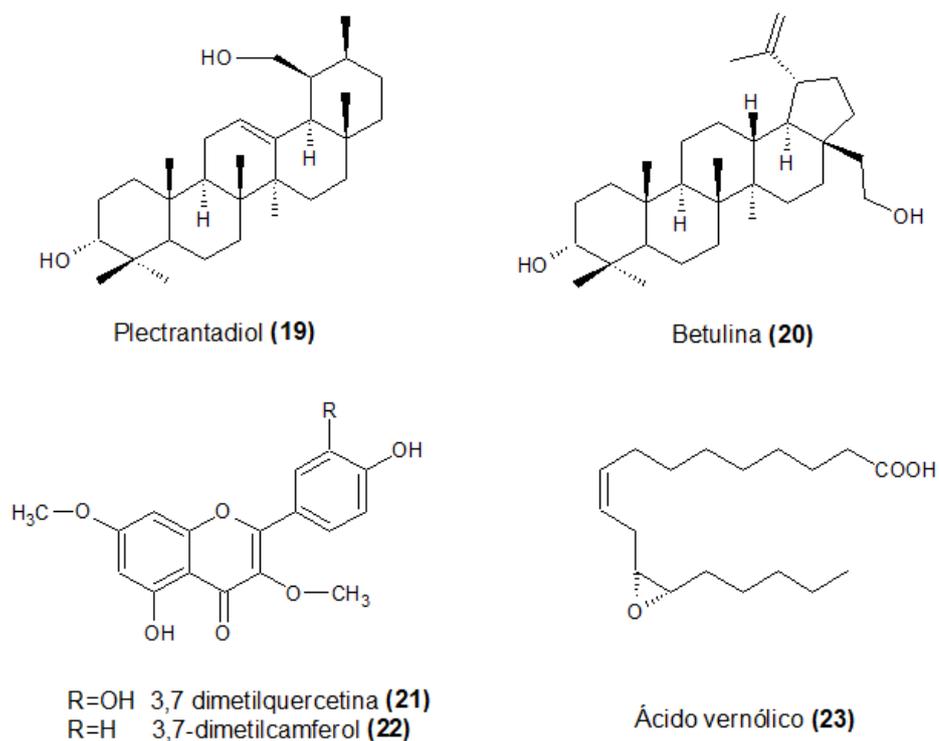
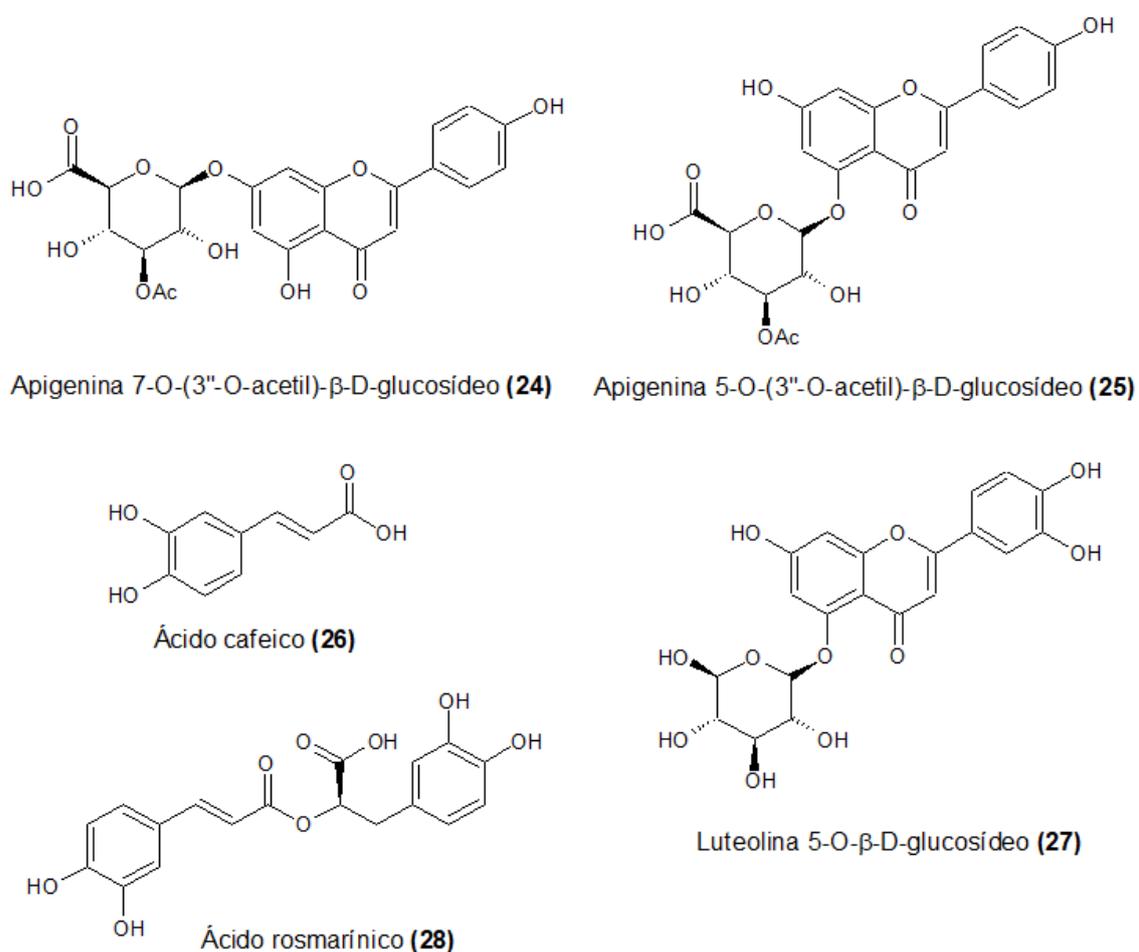


Figura 1.13 - Outros compostos isolados das espécies do gênero *Plectranthus*.



1.3. Atividades biológicas do gênero *Plectranthus*

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

A seguir são apresentadas as principais atividades biológicas descritas para os extratos das plantas do gênero (Quadro 1.1).

Quadro 1.1 - Principais atividades biológicas descritas para o gênero *Plectranthus*

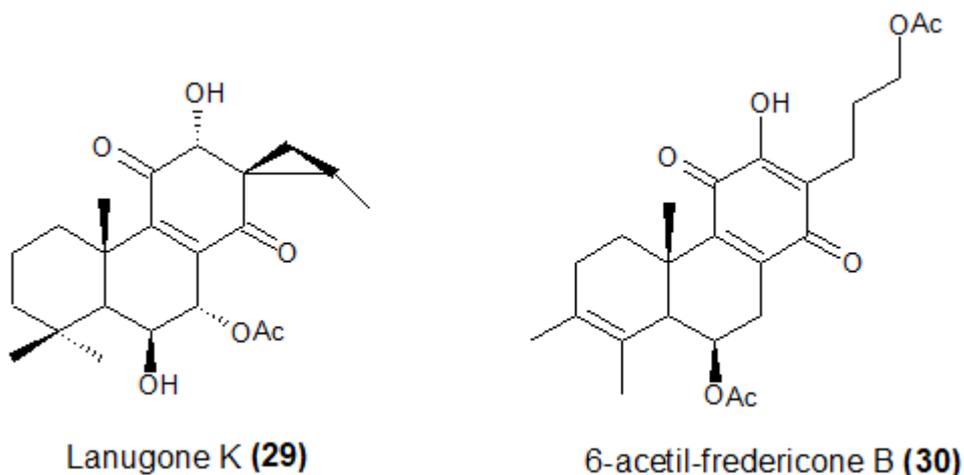
| Atividade observada | Espécie | Extrato | Parte da planta utilizada | Referência Bibliográfica |
|---|---|--|---------------------------|--------------------------|
| Antimicrobiana | <i>P. amboinicus</i> | MeOH | Folhas | SWAMY et al., 2017 |
| | <i>P. madagascarensis</i> | Acetônico | Partes áreas | RIJO et al., 2012 |
| | <i>P. madagascariensis</i> <i>P. neochilus</i> | Acetônico | Partes áreas | PEREIRA et al., 2015 |
| | <i>P. neochilus</i> , <i>P. madagascarensis</i> <i>P. barbatus</i> e <i>P. verticillatus</i> | Acetônico | Partes áreas | RIJO et al., 2012 |
| | Antioxidante | <i>P. ecklonii</i> <i>P. grandidentatus</i> <i>P. ecklonii</i> | MeOH AcOEt | Partes áreas |
| <i>P. strigosus</i> <i>P. madagascariensis</i> | | Acetônico | Partes áreas | GARCIA et al., 2018b |
| <i>P. barbatus</i> | | EtOH | Partes áreas | MOTHANA et al., 2019 |

| | | | | |
|--|--|-----------|-----------------|---------------------------|
| Citotóxica (MDA-MB-231) | <i>P. madagascariensis</i> | Acetônico | Partes áreas | MATIAS et al., 2019 |
| (HCT116), (MCF-7) e (NCI-H460) | <i>P. strigosus</i> <i>P. madagascariensis</i> | Acetônico | Partes áreas | GARCIA et al., 2018b |
| (HeLa), (HepG2) e (HT-29) | <i>P. barbatus</i> | EtOH | Partes áreas | MOTHANA et al., 2019 |
| Larvicida (controle do vetor da dengue) | <i>P. amboinicus</i> | MeOH | Partes áreas | MURUGAN et al., 2013 |
| Antídoto para veneno de escorpião | <i>P. amboinicus</i> | Aquoso | Partes áreas | UAWONGGUL et al., 2006 |
| Anti-colagenase | <i>P. madagascariensis</i> <i>P. grandidentatus</i> <i>P. ecklonii</i> | MeOH | Partes áreas | ANDRADE et al., 2020 |
| Anti- inflamatória | <i>P. barbatus</i> | MeOH | Partes áreas | MATU et al., 2003 |

Kapewangolo e colaboradores (2013) identificaram o mecanismo anti-inflamatório, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, desempenhado pelos extratos de *P. barbatus*. Os extratos, 50 e 25 mg/mL, reduziram a produção de todas as citocinas testadas (IL-2, IL-6, IL-10, TNF e IL-17A). Os níveis de IL-17A juntamente com os de outras citocinas, são elevadas durante as diferentes fases da infecção pelo HIV. Assim, diminuir a produção dessas citocinas, especialmente IL-17A, pode contribuir para a lenta ou a não progressão da infecção pelo HIV. Formulações contendo o extrato de *P. barbatus* e outros extratos de plantas foram descritos como inibidores da ativação do fator nuclear de transcrição NF- κ B (nuclear-kappa B), responsável pelo aumento da expressão de genes inflamatórios. Em consequência, são utilizadas para o tratamento de distúrbios inflamatórios, para uso cosmético e no tratamento de doenças relacionadas (OKAMOTO *et al.*, 2005).

Diterpenóides lanugone K (**29**) e 6-acetil-fredericone B (**30**) (FIG. 1.14) obtidos a partir do extrato de diclorometano das partes aéreas de *P. scutellarioides* apresentaram efeitos inibitórios contra NF- κ B (nuclear-kappa B) (CRETTON et al., 2018).

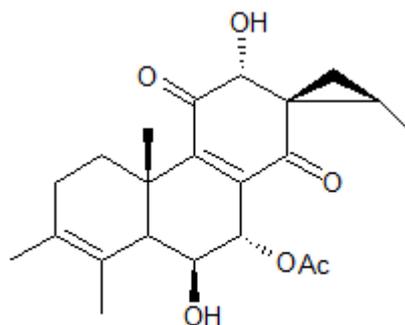
Figura 1.14 - Diterpenóide **29** e **30**, isolado do extrato de diclorometano das partes aéreas de *Plectranthus Scutellarioides*



O diterpeno **10** (FIG. 1.7, p. 24), isolado de *P. grandidentatus*, revelou atividade contra *Pseudomas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e potente atividade contra *Spectrococcus aureus*. Enquanto que o composto **8** (FIG. 1.6, p. 24) isolado de *Plectranthus hereroensis*, mostrou atividade somente contra *S. aureus*. Os dois compostos foram isolados dos extratos acetônicos das raízes das espécies (GASPAR-MARQUES et al., 2006).

O diterpenóide Coleon O (**31**, FIG. 1.15) obtido a partir do extrato de diclorometano das partes aéreas de *P. scutellarioides* exibiu uma atividade significativa contra células de mieloma múltiplo (MM-CSCs) e células plasmáticas tumorais (RPMI 8226) com IC_{50} de 9,2 e 8,4 μ M, respectivamente. Comparado ao controle positivo, Bortezomib, que apresenta IC_{50} de 0,008 e 0,003 μ M, respectivamente, para as mesmas linhagens de células tumorais (CRETTON et al., 2018). Uma coletânea de informações sobre os diterpenos que apresentam atividade citotóxica, pertencentes ao gênero *Plectranthus* com dados até 2018 pode ser encontrada nos trabalhos desenvolvidos por Garcia e colaboradores (2018a).

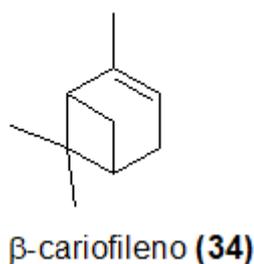
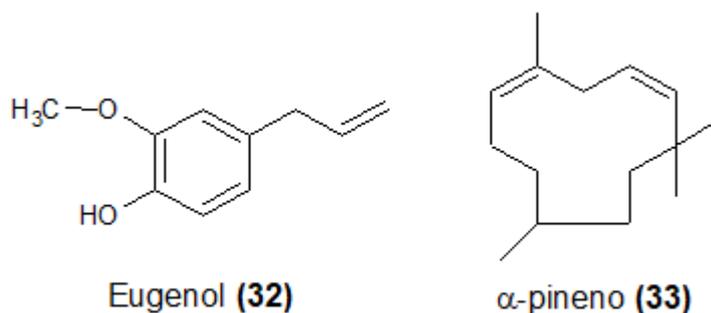
Figura 1.15 Diterpenóide Coleon O (**31**), isolado extratos de diclorometano das partes aéreas de *P. scutellarioides*



Coleon O (31)

O óleo essencial de *P. barbatus* e seus principais componentes (eugenol **32**, α -pineno **33** e β -cariofileno **34**) (FIG. 1.16) foram avaliados contra larvas de terceiro estágio do vetor da malária *Anopheles subpictus*, o vetor da dengue *Aedes albopictus*, o vetor da encefalite japonesa *Culex tritaeniorhynchus*. Um efeito tóxico significativo do óleo essencial foi observado em todas as larvas. Com relação aos constituintes principais, parecem ser mais eficazes contra a *Anopheles subpictus*, seguido por *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* (GODINDARAJAN *et al.*, 2016).

Figuras 1.16 - Componentes eugenol (**32**), α -pineno (**33**) e β -cariofileno (**34**) identificados no óleo essencial de *P. barbatus*



Os óleos essenciais de *Plectranthus cylindraceus*, *P. asirensis* e *P. barbatus*, em estudo comparativo, demonstraram o maior potencial antioxidante (72%) pelo teste de

branqueamento de β -caroteno e pelo método de eliminação de radical DPPH (75%) para a espécie de *P. cylindraceus*, ambos a uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MOTHANA et al., 2018).

Os óleos essenciais de *P. cylindraceus*, *P. asirensis* e *P. barbatus*, em estudo comparativo, foram avaliados frente a microorganismos, sendo a maior atividade demonstrada, com valores de MIC variando entre 0,14 e 0,55 mg/mL, para *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* para os óleos de *P. cylindraceus* e *P. barbatus* (MONTHANA et al., 2018).

1.4. *Plectranthus neochilus* Schltr.

P. neochilus Schltr. conhecido popularmente como “boldo-gambá”, é uma planta muito aromática e utilizada para tratamento de insuficiência hepática e dispepsia (LORENZI & MATOS, 2002), que também auxilia no tratamento de problemas de digestão, infecções da pele e doenças respiratórias (LORENZI & MATOS, 2002; DUARTE et al., 2007; YORK et al., 2011). As suas folhas frescas são tomadas como infusão ou extrato aquoso para fins de cura (LORENZI & MATOS, 2002). Devido à reestruturação taxonômica do gênero, *P. neochilus* apresenta sinônimos, são eles: *Coleus neochilus* e *Coleus schinzii*, que ainda são utilizados (MOTA et al., 2014).

1.4.1. Descrição botânica de *Plectranthus neochilus* Schltr.

P. neochilus Schltr. é uma planta perene, às vezes anual, prostrada e ereta, geralmente muito ramificada e densa, erva suculenta medindo de 0,12-0,5 de altura, com ramos de moderados à densos; raízes tuberosas (COOD, 1985) (FIG. 1.17 pag 33).

Figura 1.17 - Partes aéreas de *P. neochilus* Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM (Diamantina – MG) – evidenciando o aspecto do crescimento das folhas.



Fonte: Autor.

A propagação vegetativa da espécie por estaquia possibilita a produção de mudas em menos tempo, com maior uniformidade e padronização. A planta pode ser plantada em qualquer época do ano (COOD, 1985; COELHO et al., 2014).

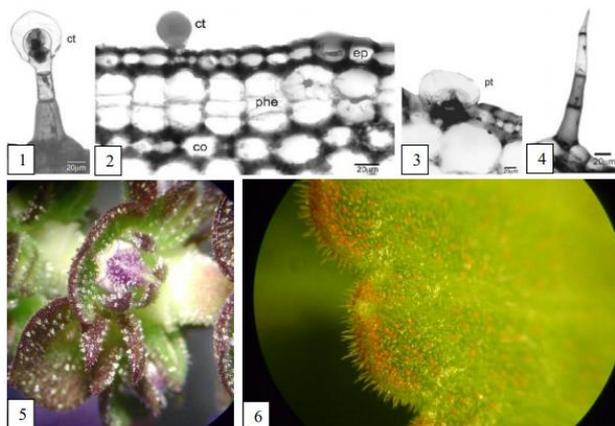
As folhas pecioladas apresentam lâminas suculentas, geralmente viscosas. Tendem a dobrar ao longo da veia central, tendo forma de ovo, mas com o ápice mais largo que a base (20-50 x 15-35 mm), pubescente, com glândulas laranjas abaixo da superfície, ápice obtuso, estreito, base aguda e margem com alguns dentes; pecíolo mede de 5 a 15 mm de comprimento (COOD, 1985; DUARTE et al., 2007; COELHO et al., 2014) (FIG. 1.18). Em *P. neochilus* são encontrados alguns tipos de tricomas (FIG. 1.19), 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 1.18 - Folhas e caules de *P. neochilus* Schltr. cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto das folhas



Fonte: Autor.

Figura 1.19 - 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; (5 e 6) VIANA, 2011.

A planta apresenta inflorescência terminal racemosa (70-150 mm) de coloração violeta, brácteas formando ângulo de 25° apical coma, esverdeada com ponta roxa, decídua precoce. Floresce em 3 sessões, formando verticilos de seis flores, verticilos densos acima, flexíveis e 5 -15 mm a parte inferior; pedicelos eretos. Cálice de 6 mm de comprimento em frutos, tubo ligeiramente geniculado no meio e expandido para a garganta. Corola malva roxa, 12-20 mm de comprimento; 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 (COOD,1985) (FIG. 1.20, p. 33).

Figura 1.20 Partes aéreas de *P. neochilus* Schltr., cultivadas no Campus JK da UFVJM – Aspecto da inflorescência



Fonte: Autor.

1.4.2. Constituintes químicos previamente descritos em *Plectranthus neochilus* Schltr.

1.4.2.1. Composição do Óleo essencial

Segundo Correa e colaboradores (2006), os compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas medicinais conferem-lhes seu valor. O forte aroma apresentado por *P. neochilus* faz com que a composição dos seus óleos voláteis desperte o interesse de pesquisadores de diferentes países, como Brasil, África e Portugal. Essas pesquisas mostraram diferenças nos constituintes e concentrações destes compostos de acordo com o local de estudo. Entretanto, como perfil geral, hidrocarbonetos monoterpênicos foram os constituintes voláteis mais prevalentes, em adição aos sesquiterpenos, como o β -cariofileno e sua forma oxidada, óxido de cariofileno, que também estavam presentes em altos rendimentos. O Quadro 1.2 resume a prevalência dos compostos de acordo com a localização.

Quadro 1.2 - Locais de coleta e obtenção de óleos voláteis de *P. neochilus* e constituintes majoritários

| Local | Compostos principais | Referência |
|---------------|---|---|
| África do Sul | Predominância de monoterpênicos, citronelol (35), linalol (36) e isomentona (37 , FIG. 1.21, p. 37) | LAWAL et al., 2010 |
| Brasil | Predominância de sesquiterpenos, com α -cariofileno (38) e/ou β -cariofileno (34 , FIG. 1.16, p. 37), <i>trans</i> cariofileno (39), óxido de cariofileno (40) e germacreno D (41 , FIG. 1.21, p. 37) | AGUIAR et al., 2018; BALDIN et al., 2012; BANDEIRA et al., 2011; CAIXETA et al. 2011; CREVLIN et al., 2015; GALBIATTI, 2019. |
| Portugal | Predominância de monoterpênicos, com α -tujeno (42), e β -pineno (43 , FIG. 1.21, p. 37), α -pineno (33 , FIG. 1.16, p.31) | MOTA et al, 2014 |

De acordo com Correa e colaboradores (2006), a produção de metabólitos secundários pelas plantas é influenciada por fatores ambientais (altitude, herbívoros,

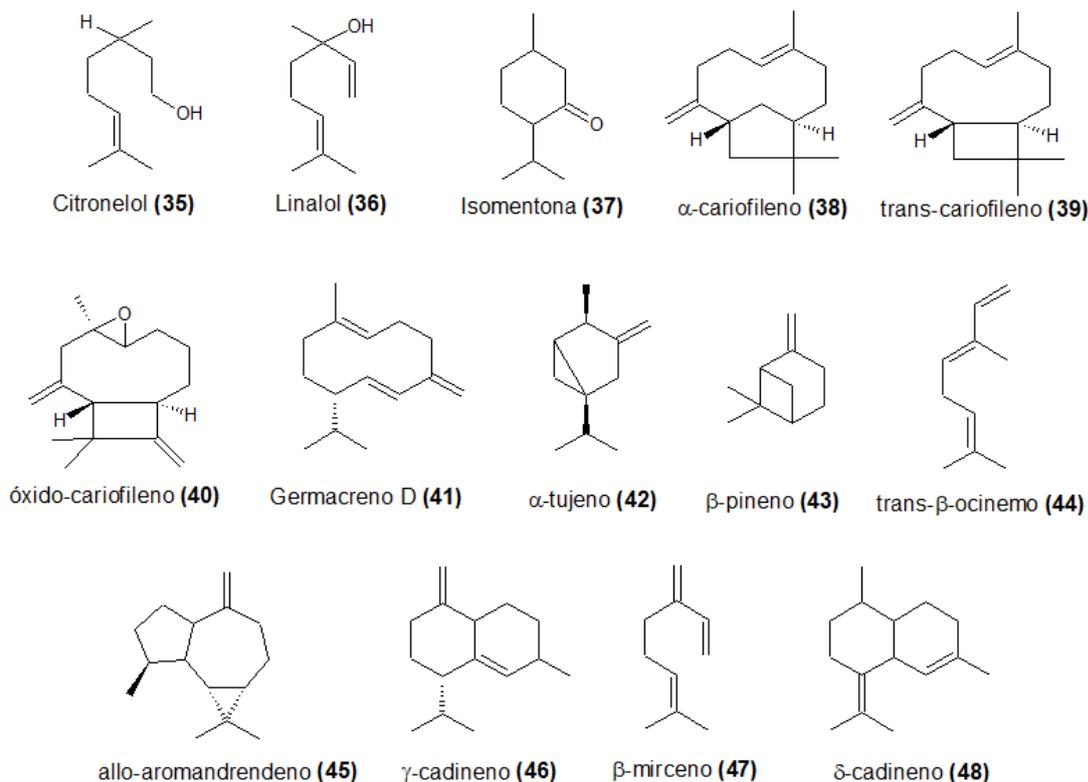
parasitas, latitude, temperatura, umidade relativa do ar, duração do dia, solo, disponibilidade de água e nutrientes) e técnicas (época, forma de plantio, técnicas de coleta e processo extrativo empregado), assim as diferenças apresentadas na composição e/ou concentração dos compostos majoritários são consideradas aceitas.

El-sakhawy (2018) identificou a predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos nos óleos essenciais tanto das folhas quanto das flores. Entretanto, alloverdendreno (**45**, FIG. 1.21, p. 37) e aromandendreno predominavam nos óleos voláteis das partes aéreas enquanto que, nas das flores predominaram γ -cadineno (**46**, FIG. 1.21, p. 37) e aromadendreno seguido por β -mirceno (**47**, FIG. 1.21, p. 37).

Os estudos realizados por Baldin e colaboradores (2013), Crevelin e colaboradores (2015) e Fanela e colaboradores (2016) realizados na cidade de Franca, São Paulo, apresentaram composição próxima a de Bocardi (2008), que realizou as coletas na cidade de Curitiba, Paraná. Observou-se que as coletas realizadas na mesma localidade apresentam, em sua maioria, os mesmos voláteis como Germacreno D (**40**, FIG. 1.21, p. 37), α -tujeno (**42**, FIG. 1.21, p. 37), β -pineno (**43**), α -pineno (**33**), *trans*- β -ocimeno (**44**, FIG. 1.21, p. 37), *trans*-cariofileno (**39**, FIG. 1.21).

A produção da biomassa, teor e qualidade do óleo essencial para diferentes espécies vegetais, submetidas à aplicação de diferentes fontes de fertilizantes orgânicos em ambiente protegido da luz, foi observada por Rosal e colaboradores (2011). O teor de óleo essencial em plantas cultivadas com esterco proveniente do frango foi 11,4 vezes maior do que o observado para as plantas não fertilizadas e 1,8 e 4,6 vezes superior ao teor presente nas plantas adubadas com esterco bovino e/ou orgânico, respectivamente. Nesses óleos foram identificados 27 compostos, contendo majoritariamente, δ -cadineno (**48**, FIG. 1.21), β -cariofileno (**39**) e óxido de cariofileno (**41**).

Figura 1.21 - Constituintes identificados nos óleos essenciais de amostras de *P. neochilus*, coletadas em diferentes locais



1.4.2.2. Composição de extratos *P. neochilus*

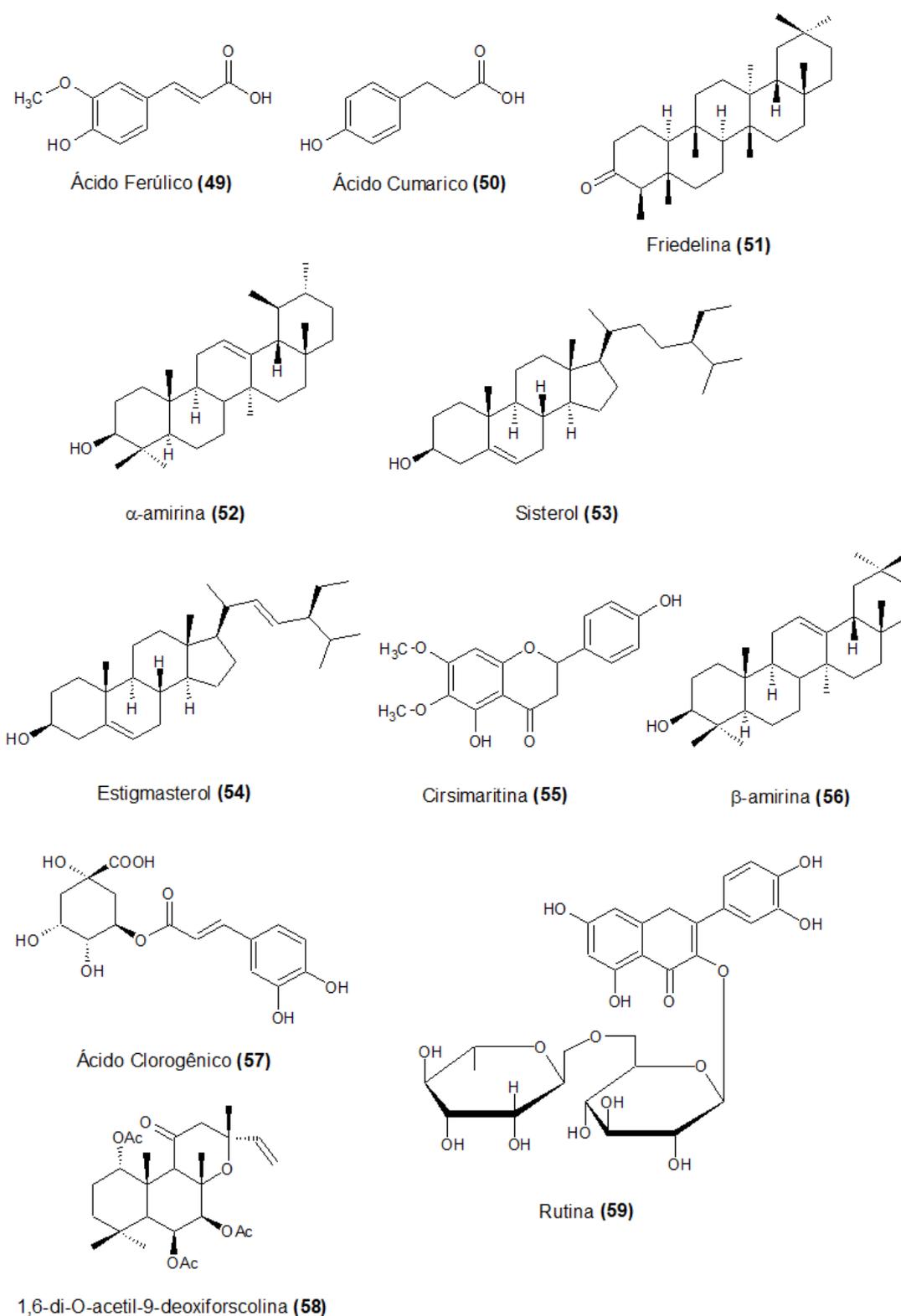
No que se refere à análise dos compostos presente nos extratos, obtidos com com solventes orgânicos, de diferentes tipos de “boldos” existem inúmeros trabalhos na literatura, porém, poucos abordando estudos fitoquímicos da espécie *P. neochilus*.

No estudo de Ramborger e coautores (2017), foi possível identificar os ácido cafeico (26, FIG. 1.13, p. 27), ferúlico (49, FIG. 1.22, p. 39) e cumárico (50, FIGURA 1.22, p. 39) no extrato aquoso, BRITO e colaboradores (2018) identificaram o ácido rosmarínico (28, FIG. 1.13, p. 27). Nos estudos conduzidos por Viana (2011) foram isolados os triterpenos friedelina (51, FIG. 1.22, pág 39), éster de ácido graxo α -amirina (52, FIG. 1.22, pág 39), os esteroides sisterol (53, FIG. 1.22) e estigmasterol (54, FIG. 1.22) e o diterpeno análogo à forskolina (7), o 1,6-di-*O*-acetil-9-deoxiforskolina (58). O flavonóide cirsimaritina (55, FIG. 1.22) foi isolado a partir do extrato etanólico da planta. Em estudo com diferentes espécies do gênero *Plectranthus*, Andrade e coautores (2018),

isolaram os triterpenóides α -amirina (**52**) e β -amirina (**56**, FIG. 1.22) das partes aéreas *P. neochilus*.

Matias e colaboradores (2019) analisaram extratos preparados pela combinação de métodos de extração com solventes de polaridades diferentes. O extrato acetônico de *P. neochilus* apresentou atividade antibacteriana. Nos extratos ricos em polifenóis, por foram identificados por CLAE-DAD o ácido cafeico (**26**), o ácido clorogênico (**57**, FIG. 1.22), o ácido rosmarínico (**28**) e nos extratos aquosos (infusão e decocção) e extração assistida usando acetona ou metanol, estava presente o flavonóide rutina (**59**).

Figura 1.22 - Compostos identificados nos dos extratos de *Plectranthus neochilus*



1.4.3. Atividades biológicas demonstradas em estudos de *P. neochilus*

1.4.3.1. Atividade citotóxica

O extrato etanólico de *P. neochilus*, no estudo realizado por Arcanjo e colaboradores (2012), mostraram-se promissores para novos ensaios de atividade antitumoral, pelo teste de letalidade para o crustáceo *Artemia salina*. O bioensaio de letalidade da artemia promove uma correlação com a atividade citotóxica e pode ser usado para monitorar atividade de produtos bioativos naturais. Posteriormente, extrato hexânico das folhas apresentaram atividade citotóxica contra células de câncer de língua (SCC-25) com valor de IC₅₀ de 17,2%, comparando com cisplatina (quimioterápico padrão, 36,6%) e utilizando-se o método de MTT (BORGES et al., 2016).

Posteriormente, a citotoxicidade de extratos obtidos por diferentes técnicas de extração e solventes de *P. neochilus* foi avaliada em células de câncer de mama (MDA-MB-31). O extrato obtido por re-extração em acetona, previamente extraído por fluido supercrítico, apresentou um maior efeito citotóxico, com redução da viabilidade celular de 11,4% (MATIAS et al., 2019).

1.4.3.2. Atividade antioxidante

Estudo realizado com o extrato aquoso das folhas de *P. neochilus* obteve bons resultados quanto à atividade antioxidante (14,7%) (RIJO et al., 2014). Viana (2011) observou uma menor atividade antioxidante pelo método DPPH, nos extratos metanólicos (11%), acetato de etila (7%) e hexano (4%) das folhas e caules. O extrato metanólico das flores apresentou atividade antioxidante inferior (5%) em relação às folhas e caules. Posteriormente, estudos com extrato em metanol e aquoso de *P. neochilus* utilizando-se o método de DPPH demonstraram atividade antioxidante relevante com valor de RSA (atividade de eliminação de radical) de 64,9% e 68,9, respectivamente, comparando com ácido ascórbico (93,4%) (MATIAS et al., 2019). Nesse estudo, foi observada também, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) de extratos de folhas, caules e flores da planta, devido à inibição da enzima AChE para todos os extratos testados (MATIAS et al., 2019).

No estudo de Ramborger e coautores (2017), quando colocado em contato com o herbicida 2,4-D (no solo e na água), a capacidade antioxidante total das folhas no extrato

aquoso desta espécie foi diminuída em ambos os ambientes, indicando a toxicidade do composto para a planta.

Em relação ao seu óleo essencial de folhas e caules na fase de floração, Rosal e colaboradores (2011) analisaram o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para verificar a capacidade de prevenção da oxidação lipídica. Os resultados demonstraram que o óleo volátil obteve 60% de inibição na concentração de 1 mg/mL, significando uma razoável ação antioxidante.

1.4.3.3. Atividade antimicrobiana

A relevância dos estudos com a extração do seu óleo essencial vai além da análise dos constituintes, uma vez que muitos estudos identificaram diferentes atividades biológicas a ele atribuídas. Nesse sentido, o óleo essencial obtido das folhas de *P. neochilus* apresentou uma atividade promissora frente bactérias causadoras de cáries, sendo a atividade frente a *Enterococcus faecalis* (MIC=250 µg/mL) e *Streptococcus salivarius* (MIC = 250 µg/mL) moderada, atividade significativa contra *Streptococcus sobrinus* (MIC = 62,5 µg/mL), *Streptococcus sanguinis*(MIC=62,5 µg/mL), *Streptococcus mitis* (MIC = 31,25 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (MIC =31,3 µg/mL) e atividade interessante contra *Streptococcus mutans* (MIC = 3,9 µg/mL) (CREVELIN et al., 2015).

Estudos realizados por Aguiar e coautores (2018) demonstram que o óleo volátil dessa espécie apresenta atividade antifúngica com CIM de 125 µg/mL frente a *R. stolonifera*. Outra atividade atribuída ao óleo essencial é a propriedade esquistossomicidas *in vitro*, em que a concentração de 100 µg/mL matou 100% dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (CAIXETA et al., 2011), e causou redução na postura de ovos de fêmeas e inibidor de oviposição de *Bemisia tabaci*, mosca-branca tipo B em tomates (BALDIN et al., 2013; FANELA et al., 2016).

O estudo realizado por Tempone e coautores (2008) mostrou que o extrato metanólico é capaz de matar 100% da levedura *C. krusei*, a uma concentração de 20,5 µg/mL. No trabalho de Antinarelli e colaboradores (2015), o extrato metanólico de folhas da espécie apresentou atividade leshimanicida promissora, exibindo valores de IC₅₀ 20 µg/mL na espécie *L. chagasi*.

Os extratos de *P. neochilus* obtidos por maceração ou extração por ultrassom foram avaliados *in vitro* contra cinco micro-organismos Gram-positivos (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidemidise*, *Mycobacterium smegmatis*). Apresentaram atividade contra a maioria dos micro-organismos Gram-positivos, quando comparados com o controle positivo Vancomicina (MATIAS et al., 2019).

1.4.3.4. Toxicidade

O extrato hidroalcoólico de *P. neochilus* foi avaliado quanto a toxicidade aguda e toxicidade dérmica e uma formulação em Gel produzida a partir dos extratos de *P. neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* (FGBF). Foram utilizados camundongos e após a administração aguda dos extratos não houve mortalidade nem sinais de intoxicação. A aplicação tópica na pele lesionada não induziu irritação local, porém, foram observadas alterações significativas no perfil hematológico e bioquímico nos tratados com a associação de FGBF (*P. neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* - FGBF) quando comparados ao controle negativo (Carbopol), mas dentro do padrão de normalidade. O extrato hidroalcoólico de *P. neochilus* quando administrado via gavagem causou toxicidade aguda relativamente baixa (RÊGO et al., 2018).

1.4.3.5. Outras atividades

O extrato metanólico de *P. neochilus* apresentou significativa atividade anti-coleagenase (76,4%) em comparação ao controle positivo EGCG (93,1%, galato de epigallocatequina). Os resultados obtidos foram relacionados à presença de triterpenos pentacíclicos, tais como α -amirina (52) e β -amirina (56), isolados dos extratos da planta, como relatado nos estudos de Andrade e coautores (2018) (ANDRADE et al., 2020).

1.5. Importância da pesquisa de Produtos Naturais para desenvolvimento de antitumorais

O câncer (neoplasia maligna) é uma doença genética maligna, cuja células possuem um acúmulo progressivo de mutações de seu genoma, resultando na proliferação desordenada. É a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. Sua incidência é fortemente afetada pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, hábitos alimentares, sedentarismo, fatores ambientais

como incidência de raios ultravioletas e como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. Para o Brasil, estima-se para cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (BRAY et al., 2018). Adicionalmente, em 2017, as doenças tumorais neoplásicas foram apontadas como a terceira causa de mortes mais frequentes no Brasil juntamente com doenças cardiovasculares e causas externas (GBD-BRASIL, 2017; MACHADO; MELO-JUNIOR, 2009).

A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas teve sua origem nos produtos naturais. Diante desse cenário, estima-se que o estudo de produtos naturais tem sido uma estratégia bem sucedida na quimioterapia nos últimos anos. Dentre estes se destacam etoposídeo (Topophos®), vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), o paclitaxel (Taxol®) e topotecano (Hycamtin®). Além disso, vários outros estão a ser testados quanto à atividade antitumoral.

1.6. Atividade antioxidante

Estudos com atividade antioxidante são relevantes e consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, que inibem a formação de radicais livres, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo (SINGH et al., 2018). Essas formações dos radicais livres estão relacionadas diretamente com o surgimento de diversas doenças como isquemia cerebral e cardíaca, doenças de Parkinson, distúrbios gastrointestinais, envelhecimento, câncer, dentre outros (ABDEL-MOGIB et al., 2002; LUCKHOBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012).

A determinação da atividade antioxidante por voltametria cíclica é uma interessante forma de avaliação desta ação, pois apresenta resultados rápidos, simples e sensíveis, além de requerer quantidade reduzida de amostra, levando em consideração o baixo rendimento dos extratos obtidos das plantas (SOCHOR et al., 2013).

CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA

2.1. Material vegetal

A planta cultivada no Campus JK da UFVJM, Diamantina/MG, em área de cerrado e campo rupestre, a altitude de 865 m e nas coordenadas 18°12'09.2''S 43°43'33.5''W, foi coletada em 21 de maio de 2019. A exsicata da espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Carlos Victor de Mendonça Filho do Departamento de Ciências Biológicas da FCBS/UFVJM e depositada no Herbário DIA da UFVJM, sob o número 1720.

2.1.2. Métodos cromatográficos

2.1.2.1. Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro de diversos diâmetros e tamanhos, eluídas sob pressão. A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi baseada nos estudos de STILL e colaboradores (1978). As fases estacionárias foram:

2.1.2.1.1. Sílica Flash Agela Technologies® (40-60 µm)

Empacotadas em colunas de vidro em diversos diâmetros e tamanhos, utilizando-se vários solventes como eluentes e diferentes gradientes de polaridade. Os volumes coletados foram de 5 mL.

2.1.2.1.2. Sílica Flash Agela Technologies® (40-60 µm) impregnada com nitrato de prata (AgNO₃)

Nitrato de prata (AgNO₃) foi solubilizado em pequena quantidade de água e a solução obtida foi adicionada à sílica (5% m/m de AgNO₃), para o aumento seletivo do poder de resolução da sílica em misturas com estruturas muito semelhantes. Após o acréscimo de um pouco mais de água para facilitar a suspensão, a mistura foi transferida para um balão, coberto com papel alumínio e a água foi então retirada por destilação à pressão reduzida. O material foi transferido para uma cápsula de porcelana, coberto com papel alumínio e mantido na estufa por 6 horas a 100 °C, para completar a secagem. Em

seguida, o material foi empacotado em coluna de vidro, coberta com papel alumínio para evitar contato com a luz, até total sedimentação.

2.1.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas foram obtidos em Cromatógrafo Agilent Technologies® 1260 Infinity Quaternary LC VL, do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Foi utilizada coluna HPLC Discovery C₁₈, tamanho das partículas 5 µm, 25 cm x 4,6 mm, mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída por solvente A (solução aquosa ácido fórmico 0,1% v/v) e solvente B (metanol). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 nm a 400 nm e o volume de injeção de 10µL.

2.1.2.3.1 Condições de análise

- CLAE 1: O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% v/v B (0 min), 5% v/v B (65 min), 5% v/v B (70 min), 95% v/v B (75 min), 95% v/v B (85 min). As amostras dos extratos serão analisadas por comparação de padrões internos de flavonóides.

- CLAE 2: O fluxo foi de 1 mL/min. Eluição no modo isocrático A/B (10:90 v/v) em 40 min.

2.1.3 Reagentes para revelações cromatográficas (MATOS, 1998)

2.1.3.1 Irradiação com luz ultravioleta (λ 254 e 365 nm)

As cromatoplasmas foram colocadas 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

As cromatoplasmas foram colocadas 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 1:1v/v e borrifadas nas cromatoplacas, que foram levadas à estufa por 10-15 minutos a 120 °C.

2.1.4. Métodos espectrométricos

2.1.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de Infravermelho foram obtidos em um Espectrômetro Agilent® Cary 630 FTIR ATR ZnSe, do Departamento de Engenharia de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Foram realizadas varreduras na faixa de 4000-650 cm^{-1} .

2.1.4.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram realizados em um espectrômetro Bruker® AVANCE III 500, no Laboratório de Ressonância Magnética da Universidade Federal de Goiás (UFG), operando a 500,13 MHz para o núcleo de ^1H e a 125,75 MHz para o núcleo de ^{13}C .

2.1.4.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis)

Os espectros no UV/Vis foram obtidos em um Espectrofotômetro UV-Vis-Thermo Scientific® modelo Genesys 105 do Departamento de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

2.2. Estudo Fitoquímico

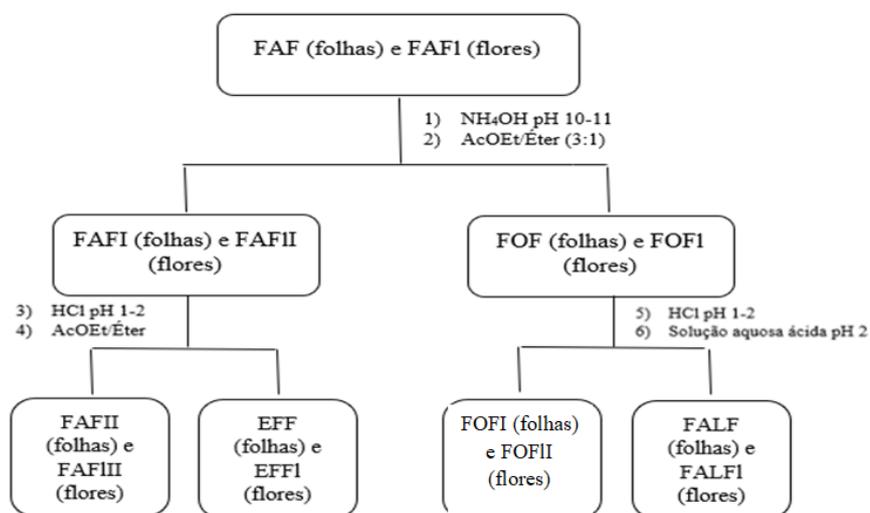
2.2.1. Obtenção de extratos polares por partição

Folhas e flores de *P. neochilus* foram coletadas e secas em estufa a 40 °C, ao abrigo da luz. Posteriormente, foram trituradas em um moinho de facas, obtendo-se a massa de 95,5 g. O material obtido foi submetido, separadamente, à decocção em 1,0 L de água por 2 h a temperatura de 60 °C e posterior filtração. O extrato obtido foi tratado com hidróxido de amônio concentrado até se atingir pH 10-11, controlado através de fitas indicadoras de pH, obtendo-se a fase aquosa das folhas (FAF) e fase aquosa das flores (FAF1) da planta. As fases FAF e FAF1 foram colocadas em um funil de separação, adicionando-se em seguida uma solução de acetato de etila/éter etílico (3:1 v/v). Após a

extração, foram obtidas quatro fases: fase aquosa (FAFI) e fase orgânica (FOF) das folhas e fase aquosa (FAFII) e fase orgânica (FOFI) das flores (FIG. 2.1).

As fases aquosas (FAFI e FAFII) foram acidificadas com ácido clorídrico concentrado, até o pH 1-2 e submetidas a extração com solução de acetato de etila/éter etílico (3:1), resultando na fase aquosa (FAFII e FAFIII) (rica em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares) que foi descartada, e na fase orgânica, denominada fase flavonoídica (EFF e EFFI) (rica em compostos fenólicos). As fases orgânicas (FOF e FOFI) foram acidificadas com HCl PA até se atingir pH 1-2, em seguida foram submetidas a extração com solução aquosa ácida a pH 2. Assim, obteve-se a fase aquosa denominada fase alcaloídica (FALF e FALFI), e a fase orgânica (FOFI e FOFII) (FIG. 2.1). As fases flavonoídicas foram submetidas à análise por CLAE (condição 1, p. 42) e as fases alcaloídicas foram submetidas aos testes de detecção preliminar de alcalóides (p. 46)

Figura 2.1 - Sequência metodológica para a obtenção de frações polares a partir das folhas e flores de *P. neochilus*



Legenda: FAF: fase aquosa das folhas; FAFI: fase aquosa das flores; FAFII: fase aquosa das folhas após a extração; FAFIII: fase aquosa das flores após a extração; FOF: fase orgânica das folhas; FOFI: fase orgânica das flores; FOFII: fase orgânica das flores após a extração; FOFIII: fase orgânica das flores após a extração; EFF: fase flavonoídica das folhas; EFFI: fase flavonoídica das flores; EFFII: fase flavonoídica das folhas após a extração; EFFIII: fase flavonoídica das flores após a extração; FALF: fase alcaloídica das folhas; FALFI: fase alcaloídica das flores; FALFII: fase alcaloídica das folhas após a extração; FALFIII: fase alcaloídica das flores após a extração; FOFI: fase orgânica das folhas; FOFII: fase orgânica das flores.

2.2.2. Obtenção dos extratos polares por maceração

Para a obtenção dos extratos, as folhas e flores foram coletadas e secas em estufa a 40 °C ao abrigo da luz. Posteriormente, o material foi triturado em um moinho de facas, obtendo-se a massa de 76,0 g e submetido à extração em solução de etanol e água (9:1 v/v) durante sete dias por maceração. Após esse período, os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 50 °C, obtendo-se os extratos hidroalcoólicos das folhas (EHF) e das flores (EHF1), respectivamente, 15,6 e 10,8 g.

2.3. Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos de partição e maceração, para detecção da presença de saponinas, taninos (hidrolisáveis e condensados), flavonoides, esteroides, triterpenos, cumarinas, flavonas, xantonas, chalconas, auronas e alcaloides foi realizada conforme descrito por MATOS (1997). A análise foi baseada na observação visual de uma mudança de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.3.1. Teste para Triterpenos e/ou estereoides

Em um tubo de ensaio, uma alíquota do extrato foi diluída em clorofórmio, seguida da adição de 2,0 mL de anidrido acético e de duas gotas de ácido sulfúrico (reagente de Liebermann Burchard) e agitou-se o sistema suavemente. O aparecimento da cor rosa, azul ou verde é indicativa da presença de triterpenos e/ou de estereóides.

2.3.2. Teste para Flavonoides

2.3.2.1. Reação com hidróxido de amônio

Uma alíquota do extrato foi dissolvida em 2,0 mL de água. Ao recipiente foi adicionada solução de hidróxido de amônia até atingir pH 11. O aparecimento de coloração amarela é indicativo da presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Coloração vermelha púrpura é indicativa da presença de chalconas e auronas. A coloração vermelha alaranjada, por sua vez, indica a presença de flavonóis na amostra.

2.3.2.2. Reação de Cianidina

Uma alíquota de 2 mL de extrato foi aquecida em banho-maria e em uma cápsula de porcelana, com 0,2 mL de clorofórmio para eliminação da clorofila (45°C). O resíduo da cápsula foi solubilizado em 1 mL de solução etanol/água (7:3 v/v) e transferido a um

tubo de ensaio. Foram adicionados 200,0 mg de magnésio metálico, seguido da adição de 1 mL de HCl concentrado, que foi vertido cuidadosamente pelas paredes do tubo. O aparecimento da coloração róseo-avermelhada é indicativa da presença de flavonoides na amostra.

2.3.3. Teste para Taninos

2.3.3.1. Reação com Cloreto Férrico

Uma alíquota do extrato foi diluída em 2,0 mL de água, posteriormente acrescentaram-se 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% m/v. A reação positiva para taninos condensados tem como resultado o aparecimento de coloração azul, ao passo que para taninos hidrolisáveis há o desenvolvimento da cor verde.

2.3.3.2. Reação com gelatina

Em uma alíquota do extrato (2 mL) foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico e solução de gelatina incolor comercial a 2,5% v/v em água destilada, gota a gota. A formação de precipitado caracteriza a presença de taninos na amostra.

2.3.4. Teste para Alcaloides

2.3.4.1. Reativo de Mayer

Uma alíquota do extrato foi dissolvida em 2,0 mL de água destilada e, posteriormente adicionaram-se três gotas de reativo de Mayer (cloro-iodo mercurato de potássio). A formação de precipitado branco é indicativo da presença de alcaloides na amostra.

2.3.4.2. Reativo de Dragendorff

Uma alíquota do extrato foi dissolvida em 2,0 mL de água destilada e, posteriormente adicionaram-se três gotas de reativo de Dragendorff (carbonato de bismuto-iodeto de potássio). A formação do precipitado floculoso indica a presença de alcaloides na amostra.

2.3.5. Teste para Saponinas

Uma alíquota dos extratos foi diluída em um tubo de ensaio em 2 mL de água destilada e agitou-se o sistema vigorosamente por três minutos e deixando-o em repouso

por trinta minutos. A reação positiva é indicada pelo aparecimento de espuma persistente após o repouso.

2.3.6. Teste para Cumarinas

Os extratos foram solubilizados nos solventes apropriados, posteriormente, aplicados nos *spots* correspondentes. Como fase estacionária utilizou-se sílica gel 60G (0,045 mm, Merck[®]) granulometria de aproximadamente 0,25 mm; e como eluente utilizou-se uma mistura de acetato de etila-ácido acético glacial-ácido fórmico-água destilada, nas proporções (100, 11, 11 e 26% v/v), respectivamente. A placa cromatográfica foi revelada sob luz UV (360 nm). O aparecimento de coloração amarela sugere a presença de cumarinas.

2.4. Extração e isolamento de diterpenos

Para a obtenção dos extratos, as folhas coletadas foram secas em estufa a 40°C ao abrigo da luz até que fosse obtido uma massa constante. Posteriormente, as folhas foram trituradas em um moinho de facas. O material (8,0 g) foi extraído com tolueno (3 vezes 500 mL) a 60 °C durante 2 h, em sistema fechado e com agitação contínua. O extrato em tolueno foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida a 60° C. Em seguida, adicionou-se ao extrato, lentamente e sob agitação contínua, hexano para remoção das impurezas, obtendo-se um precipitado sólido marrom (5,7 g). O precipitado foi fracionado em coluna de carvão ativado, eluída com metanol e acetonitrila:metanol (50:50 v/v), clorofórmio e cloroformio/metanol (95:5 v/v). As frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, por cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS), foram agrupados e concentrados sob vácuo a 40°C. A fração eluída em metanol, forneceu um sólido (0,5 g), que foi agitado com hexano para remoção de impurezas solúveis, em seguida o solvente foi removido por filtração. O resíduo seco foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio, e em seguida adicionou-se 100 mL de hexano, sob agitação contínua, para remover a maior parte da matéria corante. Após esse procedimento obteve-se um precipitado amarelo pálido, denominado P01 (0,3 g) (SALEEM, 2006). Esse procedimento foi realizado três vezes.

O sólido P01 foi fracionado em coluna de sílica/AgNO₃ (2,5 cm de diâmetro e 15 cm de sílica seca impregnada com 1,5 g de AgNO₃), utilizando-se como eluentes os

solventes acetatos de etila, hexano e metanol em gradientes crescentes de polaridade (TAB. 2.1). Desse procedimento foram obtidos 35 frações coletadas em volume de 5 mL cada, reunidas em seis grupos após análise em CCDS utilizando-se iodo e vanilina como revelador (TAB. 2.2).

Tabela 2.1 - Fracionamento cromatográfico de P01, proveniente da extração em coluna de sílica/AgNO₃ das folhas de *P. neochilu*

| Eluente | Fração |
|------------------------------------|--------|
| Acetato de etila/Hexano (1:1 v/v) | 1-24 |
| Acetato de etila | 25-30 |
| Acetato de etila/Metanol (1:1 v/v) | 31-33 |
| Metanol | 34-35 |

Tabela 2.2 Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico do precipitado amarelo, proveniente da extração das folhas de *P. neochilus*

| Reunião | Grupo de frações | Massa (mg) |
|---------|------------------|------------|
| R1 | 1-9 | 0,5 |
| R2 | 10 | 1,9 |
| R3 | 11-12 | 2,4 |
| R4 | 13-18 | 8,4 |
| R5 | 19-22 | 5,4 |
| R6 | 23-28 | 5,6 |
| R7 | 28-35 | 5,6 |

Das reuniões obtidas, foi realizada um novo agrupamento (R8) entre R4-R5 e estas foram submetidas a outros procedimentos cromatográficos, as demais reuniões não foram trabalhadas devido à complexidade do perfil cromatográfico apresentada e por se apresentarem em pequenas quantidades.

2.4.1. Fracionamento de R8

O material desse grupo (13,8 mg) apresentou-se como sólido amarelo, sendo fracionado em coluna de sílica (1 cm de diâmetro e 15 cm de altura de sílica), utilizando-se como eluente acetato de etila e hexano, em gradientes crescentes de polaridade (TAB.

2.3). Foram obtidos 32 frações de 6 mL cada, reunidas em seis grupos, após análise em CCDS utilizando-se iodo e vanilina como revelador (TAB. 2.4).

Tabela 2.3 - Fracionamento cromatográfico de R8 em coluna de sílica.

| Eluente | Fração |
|-------------------------------|--------|
| Acetato de etila/Hexano (1:1) | 1-24 |
| Acetato de etila/Hexano (7:3) | 25-32 |

Tabela 2.4 - Reunião das frações obtidas do fracionamento cromatográfico de R8

| Reunião | Grupo de frações | Massa (mg) |
|---------|------------------|------------|
| R9 | 1-8 | 1,9 |
| R10 | 9-10 | 3,1 |
| R11 | 11-13 | 1,9 |
| R12 | 14-20 | 5,1 |
| R13 | 21-24 | 2,5 |
| R14 | 25-32 | 5,3 |

As R9, R11, R13 e R14 não foram trabalhadas por se tratarem de misturas complexas e/ou em pequenas quantidades. As reuniões R10 e R12 foram submetidas a estudos posteriores.

O material referente às reuniões R10 e R12 apresentaram-se como sólido amarelos, denominado de PN1 (3,0 mg) e PN2 (5,1 mg), respectivamente. Esses foram submetidos à análises espectrométricas de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C . PN2 se tratava de uma mistura e a estrutura dos componentes da mistura não foi elucidada.

2.5. Extração do óleo essencial

Flores frescas de *P. neochilus* (17,5 g) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger utilizando-se 1,0 L de água destilada, por 2 horas a 60 °C. Após extração e secagem, o óleo essencial obtido foi acondicionado em frasco de vidro fechado envolto em papel alumínio, e armazenados em freezer. Os experimentos não foram realizados.

2.6. Atividade biológica

2.6.1. Atividade citotóxica

A análise de citotoxicidade de extratos de flores e folhas foi realizada em cooperação com o Departamento de Química, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear e Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (Faculdade de Farmácia) da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi realizado o teste de brometo colorimétrico de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). A atividade citotóxica foi realizada frente a células de leucemia monocítica aguda [ATCCTIB-202 (THP-1)], célula de eritroleucemia humana [ATCC CCL-243 (K-562)], célula de carcinoma do cólon [ATCC CRL-2579 (RKO-AS45- 1)], células de câncer de mama humano [ATCC HTB-26 (MDA-MB-231)] e linhagem de células não tumorais [ATCC CCL-95.1 (Wi-26VA4)]. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2 x 105 células por poço) e incubadas por 24 h em atmosfera de solução umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 h, os poços foram lavados com meio de cultura (RPMI-1640 + soro fetal bovino inativado a 20% + 2 mmol / L L-glutamina) e incubados por 48 horas com amostras em concentrações de 0,10 a 100 µg/mL.

Após 48 h, as placas foram tratadas com MTT (5 mg/mL) e utilizando o leitor de microplacas Spectramax M5e, medições colorimétricas a 550 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicado. A atividade citotóxica foi definida como uma redução percentual na absorbância versus culturas de controle não tratadas e os resultados expressos pelos valores de IC₅₀ (concentração do medicamento que reduziu a viabilidade em 50%). Os valores de IC₅₀ foram calculados no Software OriginPro 8.0.

2.7. Ensaio químico

2.7.1. Atividade antioxidante por voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD)

Os extratos de *P. neochilus* foram investigados quanto ao potencial antioxidante utilizando-se os métodos eletroquímicos voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). Os voltamogramas foram obtidos para soluções preparadas com 0,01 g do extrato seco previamente diluído em 2 mL de etanol e posteriormente em 10 mL de tampão fosfato pH = 7 (0,1 mol/L). A concentração final do extrato na solução foi de 0,83 g/L. Tanto para a voltametria cíclica quanto para a voltametria de pulso diferencial foi

utilizado o tradicional sistema de três eletrodos. O eletrodo de referência utilizado um Ag/AgCl (KCl 3 M) de junção simples e um eletrodo de carbono vítreo e de platina foram empregados como eletrodo de trabalho e auxiliar, respectivamente. É importante destacar que o eletrodo de trabalho foi previamente polido e limpo com água destilada e etanol. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura numa janela de potencial de -0,2 até 1,0 V enquanto os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em uma janela de 0,15 a 50 V com uma amplitude de pulso de 50 mV. Para fins de comparação, voltamogramas cíclicos de típicos compostos antioxidantes, ácido ascorbico e Quercetina foram obtidos sob condições semelhantes.

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo químico

3.1.1. Prospecção fitoquímica

Substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas fazem parte de um grupo extenso de compostos que desempenham a função de defesa e adaptação frente às agressões externas. Denominadas metabólitos secundários, essas substâncias estão divididas em diversas classes na natureza, de acordo com sua rota de síntese na planta e com semelhanças estruturais (SIMÕES et al., 2007). A análise fitoquímica preliminar dos metabólitos secundários permite avaliar qualitativamente a composição dos extratos estudados. Na Quadro 3.1, são apresentados os constituintes fitoquímicos detectados nos extratos de folhas e flores de *P. neochilus*. O resultado observado para uma classe de metabólitos foi classificada como positivo forte, positivo moderado e não detectado de acordo com a coloração ou precipitado apresentado.

Quadro 3.1 - Componentes fitoquímicos dos extratos das folhas e flores de *P. neochilus* identificados na triagem preliminar dos extratos

| Extrato | EFF | EF | EFFI | EFI |
|--|-----|----|------|-----|
| Triterpenos e/ou Esteróides | + | ++ | - | ++ |
| Taninos – Reação com Cloreto Férrico | ++ | ++ | - | - |
| Taninos -Reação com gelatina | + | + | + | + |
| Flavonóides-Reação Hidróxido de Amônio | + | - | - | - |
| Flavonóides – Reação de Cianidina | ++ | + | ++ | + |
| Alcalóides | - | ++ | - | + |
| Saponinas | ++ | ++ | - | ++ |
| Cumarinas | + | + | + | + |

Fase flavonoídica folhas (EFF); extrato hidroalcoólico das folhas (EF); fase flavonoídica flores (EFFI); extrato hidroalcoólico das flores (EFI). ++ = forte presença; + = presença moderada; - = não detectado.

Triterpenos e compostos esteróidais foram detectados em todos os extratos, exceto na fase EFFI. Os resultados foram considerados positivos devido ao desenvolvimento de uma coloração verde após a reação de Lieberman-Burchard. Triterpenos, um diterpeno, e dois esteróides foram previamente descritos como constituintes presentes nos extratos

obtidos a partir das partes aéreas de *P. neochilus* (p. 35) (ANDRADE et al., 2018, TORRES, 2014, VIANA, 2011). Estudos sugerem que os terpenóides sejam os principais compostos relacionados às atividades antioxidantes e antimicrobianas demonstradas por extratos obtidos das espécies do gênero *Plectranthus* (RIJO et al., 2012).

Os taninos são compostos polifenólicos de alto massa molecular, que formam complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas. Esses podem estar concentrados no caule, casca e/ou folhas e seu papel principal nas plantas é a proteção contra a decomposição, predação e incêndios. Existem três classes principais de taninos que incluem hidrolisáveis ou pirogalóis (galotaninos e elagitaninos), taninos condensados e complexos. Todos os extratos avaliados apresentaram resultado positivo para o teste indicativo da presença de taninos, devido à formação de precipitado. E nos testes realizados com cloreto férrico observou-se o desenvolvimento da coloração verde, indicativa da presença de taninos condensados de forma mais intensa no extrato das folhas (EF) e fase flavonoídica das folhas (EFF). Tradicionalmente *P. barbatus* Andrews é utilizada em comunidades locais do Quênia como cerca viva, para estabelecer demarcações de terras, devido a sua resistência ao fogo. Essa resistência é uma característica predominante em plantas com alto teor de taninos. A triagem fitoquímica dos extratos de *P. barbatus* revelou que as folhas continham alto teor de taninos do tipo hidrolisável (OBIERO, 2017). A presença de taninos também foi sugerida em triagem preliminar para as espécies *P. amboinicus* (Lour) Spreng e *P. stocksii* Hook, e a presença correlacionada com a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos destas plantas (MUNIYANDI et al., 2017; BHATT et al., 2013).

A presença de flavonóides foi observada em todos os extratos e mais fortemente nas fases flavonoídicas das folhas e flores, evidenciando o isolamento dos mesmos de acordo com a metodologia proposta. O resultado foi confirmado com a reação de Cianidina. Diversas atividades biológicas, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer, estão associadas aos flavonóides (VERDI et al., 2005). Existem relativamente poucos relatos sobre a ocorrência de flavonóides nos extratos de *Plectranthus*. Segundo MATIAS e colaboradores (2019), apenas 17 flavonóides haviam sido encontrados no gênero até 2015, especialmente em *P. amboinicus* (11 flavonóides de extratos obtidos da planta inteira). A flavona cirsimarina (**55**) e o flavonol rutina (**59**) foram previamente descritas como constituintes dos extratos etanólico e aquoso, respectivamente (MATIAS et al., 2016, VIANA, 2011). Os compostos fenólicos ou

polifenóis, representados principalmente por taninos e flavonóides, são um dos principais eixos de pesquisa, pois são considerados potentes antioxidantes, agentes anti-inflamatórios, antibacterianos, antivirais e anti-câncer (BENARIBA et al., 2013)

Na identificação de alcalóides nos extratos das folhas e flores observou-se a formação do precipitado branco para o reativo de Mayer e o resultado foi confirmado com o reativo de Dragendorff (precipitado floculoso). Na identificação de alcalóides na fase alcoólica das folhas e flores observou-se a formação do precipitado branco para o reativo Mayer e o resultado foi confirmado com o reativo de Dragendorff (precipitado floculoso). A presença de alcaloides nos extratos metanólico e hidrometanólico das folhas de *P. neochilus* foi sugerida em triagem fitoquímica (HAMADOU et al., 2020). A presença de alcaloides foi sugerida em estudos preliminares para algumas espécies de *Plectranthus*, no entanto, na literatura não existem relatos de alcaloides previamente isolados no gênero, para verificação dos resultados é necessário empregar métodos analíticos (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ou Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) para eliminar os falsos positivos. Devido à sua variabilidade estrutural, os alcalóides podem atuar como repelentes, anti-hipertensivos, antitumorais, hipnoanalgésicos, estimulantes do sistema nervoso central, antivirais, tratamento da doença de Alzheimer, simpatomimético e diurético (SIMÕES et al., 2007).

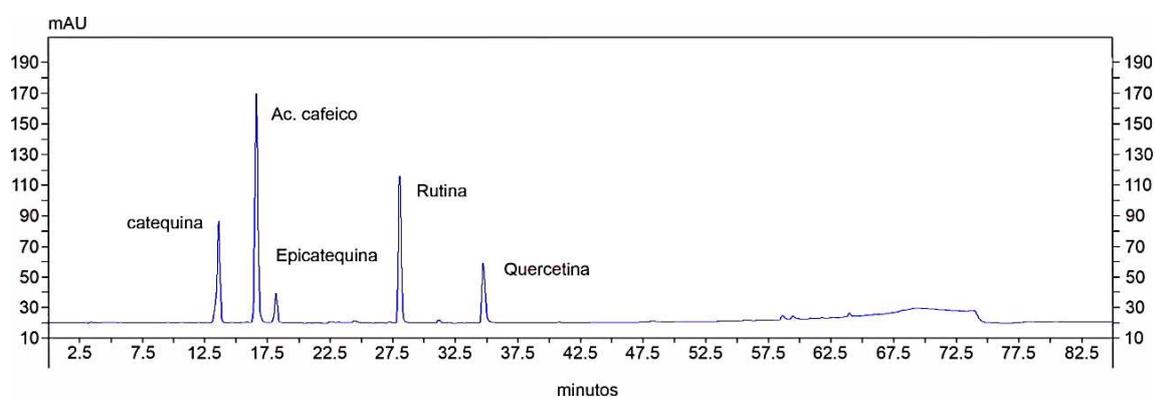
No teste realizado para saponinas, não foi detectada a presença dessa classe de metabolitos apenas na fase flavonoídica das flores. As saponinas ocorrem constitutivamente em muitas espécies de plantas como parte de seu sistema de defesa. No entanto, o conteúdo de saponina em plantas parece ser dinâmico, respondendo a muitos fatores externos, incluindo vários estímulos bióticos ligados ao ataque de herbivoria e infecção patogênica, bem como envolvidos em simbioses mutualísticas de plantas com bactérias rizobianas e fungos micorrízicos (SCHENKEL et al., 2001).

A presença de cumarinas foi sugerida nas amostras testadas. Derivados do metabolismo da fenilalanina e identificados em plantas, as cumarinas são caracterizadas por extensa quimodiversidade e atividades farmacológicas, como por exemplo, atividades imunossupressoras, relaxamento vascular, antipasmódica, antitrombótica, antioxidante, vasodilatadora e atividades relacionadas ao relaxamento muscular (SIMÕES et al., 2007).

3.1.2. Identificação de compostos flavonóidicos nos extratos de folhas e flores de *Plectranthus neochilus* por CLAE

O extrato de flor (EF1) e o extrato de folha (EF) obtidos por maceração, a fase flavonoidica da flor (EFFL) e fase flavonóide da folha (EFF) obtidos por partição foram analisados por CLAE a 190 a 400 nm. A mistura dos quatro padrões de flavonóides e um ácido fenólico na análise por CLAE (FIG. 3.1) foi utilizada para comparação dos tempos de retenção com os cromatogramas dos extratos e fases das folhas e flores de *P. neochilus*.

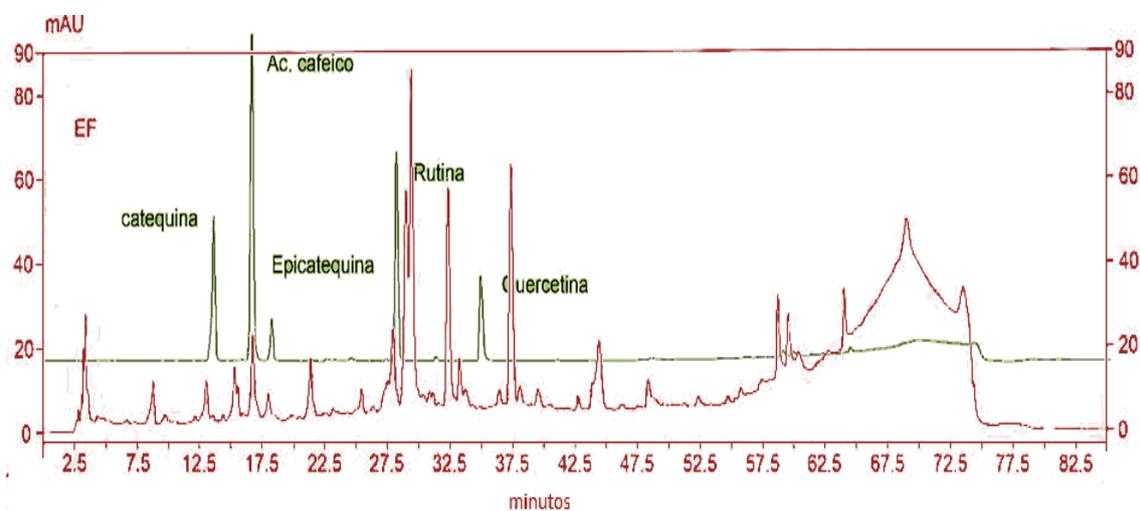
Figura 3.1 - Cromatograma da mistura dos padrões de flavonóides e ácido fenólico (280 nm; tempo de retenção (min) catequina (13,7), ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3), rutina (28,2), quercetina (34,6)



Condições: Fase móvel: solução aquosa ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% B (0 min), 5% B (65 min), 5% B (70 min), 95% B (75 min), 95% B (85 min). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400 nm e selecionado o melhor comprimento de onda, 280 nm.

O extrato das folhas (EF) na análise por CLAE é mostrado na Figura 3.2 (p. 59). Os picos no cromatograma foram atribuídos como epicatequina e o composto fenólico ácido cafeico, após comparação com CLAE da mistura dos flavonóides e ácido fenólico (FIG. 3.1).

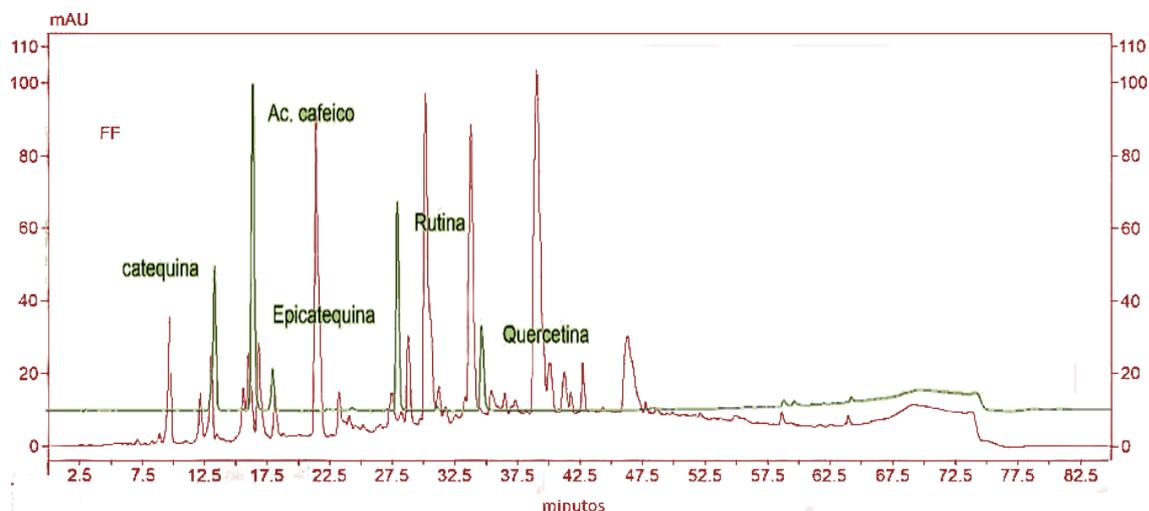
Figura 3.2 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas obtidos de *Plectranthus neochilus*. (280 nm; tempo de retenção (min) ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3).



Condições: Fase móvel: solução aquosa ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% B (0 min), 5% B (65 min), 5% B (70 min), 95% B (75 min), 95% B (85 min). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400 nm e selecionado o melhor comprimento de onda, 280 nm.

O cromatograma da fase flavonoídica das folhas (FF) de *P. neochilus* na análise por CLAE é mostrado na FIGURA 3.3, pág. 60 . Os picos no cromatograma foram atribuídos como catequina, epicatequina e quercetina e o composto fenólico ácido cafeico, após comparação com o cromatograma da mistura dos flavonóides e ácido cafeico (FIG. 3.1, p. 58). Observa-se que a extração por partição das folhas aumentou a intensidade dos picos da catequina, ácido cafeico e epicatequina em comparação com FIGURA 3.2 que corresponde ao extrato bruto, o que reflete a possível maior quantidade dos compostos fenólicos extraída.

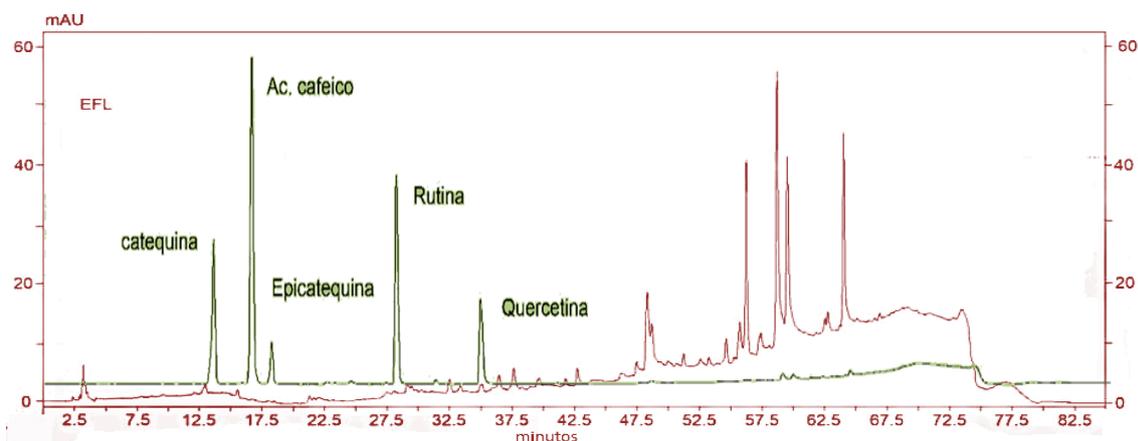
Figura 3.3 - Cromatograma da fase flavonoídica das folhas obtidos de *Plectranthus neochilus*. (280 nm; tempo de retenção (min) catequina (13,7), ácido cafeico (16,7), (+)-epicatequina (18,3) e quercetina (34,6).



Condições: Fase móvel: solução aquosa ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% B (0 min), 5% B (65 min), 5% B (70 min), 95% B (75 min), 95% B (85 min). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400nm e selecionado o melhor comprimento de onda, 280 nm.

O extrato das flores (EFL) na análise por CLAE é mostrado na Figura 3.4. Um dos picos no cromatograma foi atribuídos como quercetina, após comparação com o cromatograma da mistura dos flavonóides e ácido fenólico (FIG. 3.1).

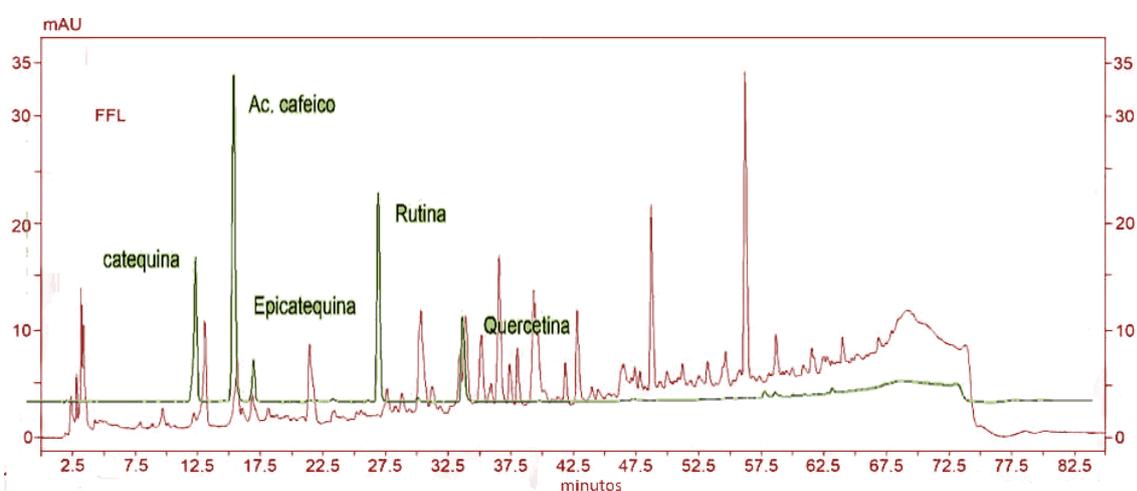
Figura 3.4 - Cromatograma do extrato das flores obtidos de *Plectranthus neochilus*. (280 nm; tempo de retenção (min) quercetina (34,6).



Condições: Fase móvel: solução aquosa ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% B (0 min), 5% B (65 min), 5% B (70 min), 95% B (75 min), 95% B (85 min). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400 nm e selecionado o melhor comprimento de onda, 280 nm.

A fase flavonoídica das flores (FFL) de *P. neochilus* na análise por CLAE é mostrado na Figura 3.5. Os picos no cromatograma foram atribuídos como epicatequina, quercetina e o composto fenólico ácido cafeico, após comparação com CLAE da mistura dos flavonóides e ácido fenólico (FIG. 3.1, p. 58). Na extração por partição das flores os picos referentes a epicatequina e o ácido cafeico foram observados, diferentemente do extrato bruto (FIG. 3.4).

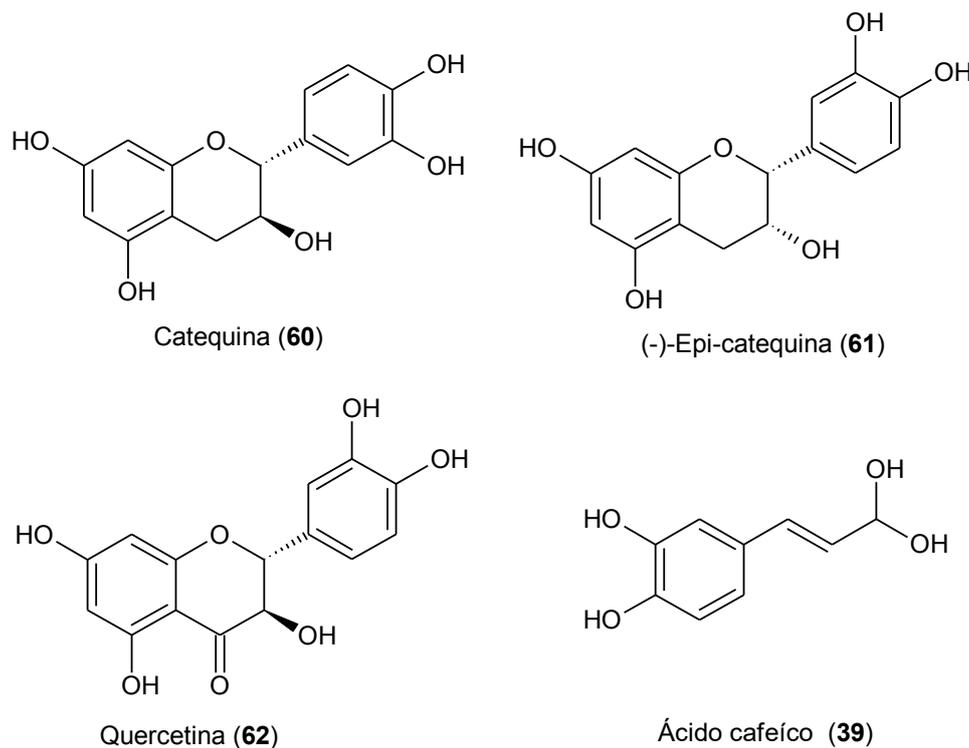
Figura 3.5 - Cromatograma da fase flavonoídica das flores obtidos de *P. neochilus*. (280 nm; tempo de retenção (min) ácido cafeico (16,7), (-)-epicatequina (18,3), quercetina (34,6).



Condições: O fluxo foi de 1 mL/min e o gradiente de eluição 95% B (0 min), 5% B (65 min), 5% B (70 min), 95% B (75 min), 95% B (85 min). Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400 nm e selecionado o melhor comprimento de onda, 280 nm.

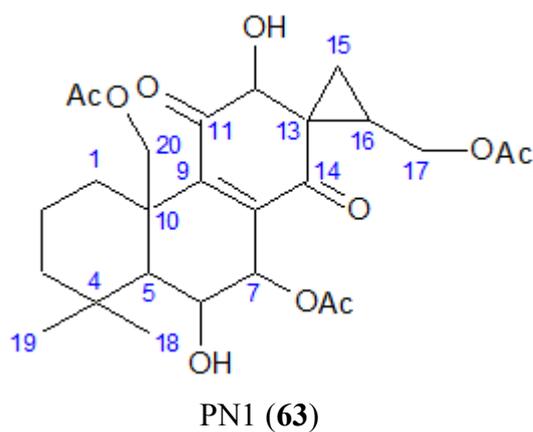
Os três compostos flavonóidicos catequina (**60**), epicatequina (**61**), quercetina (**62**) e um composto fenólico, ácido cafeico (**39**) (FIG. 3.6) foram identificados nas amostras quando comparados aos tempos de retenção padrão. MATIAS e colaboradores (2019) descrevem para os extratos de *P. neochilus* os seguintes compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico e rutina, como citado anteriormente. Catequina, epicatequina e quercetina foram identificados pela primeira vez na espécie. Segundo levantamento realizado, os estudos fitoquímicos do extrato das flores e extratos por partição são descritos pela primeira vez para *P. neochilus*.

Figura 3.6 - Flavonóides e compostos fenólicos identificados por CLAE nos extratos das flores e folhas de *P. neochilus*.



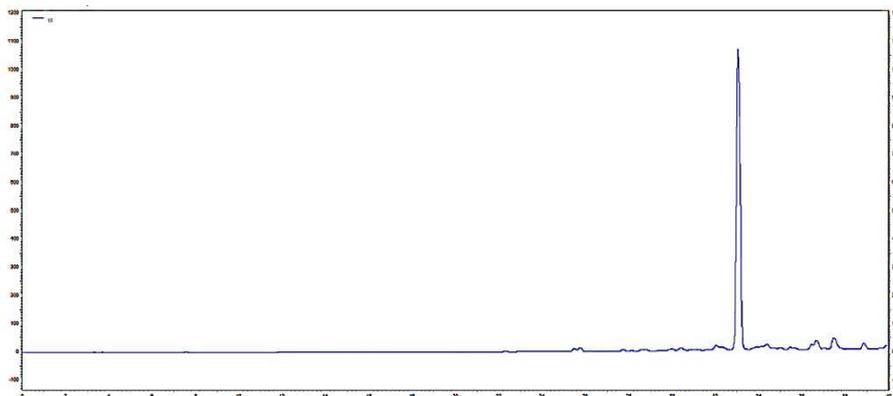
3.1.2. Determinação estrutural do diterpeno isolado de *Plectranthus neochilus* Schltr.

3.1.2.1. PN1



O composto PN1 foi isolado do extrato toluênico das folhas e caules, apresentando-se como um sólido amarelo. O alto grau de pureza cromatográfica de PN1 foi sugerido por análise em CCDS. e detectado por CLAE, sendo observado um pico separado e intenso no cromatograma (FIG. 3.7), registrado em 33,10 minutos.

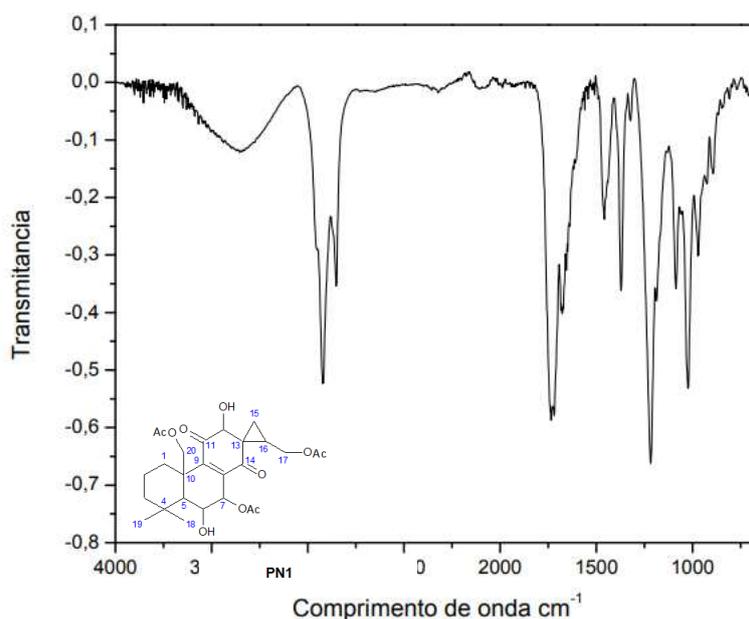
Figura 3.7 - Cromatograma de PN1 isolado de *P. neochilus* (tempo de retenção: 33,10 minutos em 250 nm)



Condições: Fase móvel: solução aquosa ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O fluxo foi de 1 mL/min. Eluição no modo isocrático A/B (10:90) em 40 min.

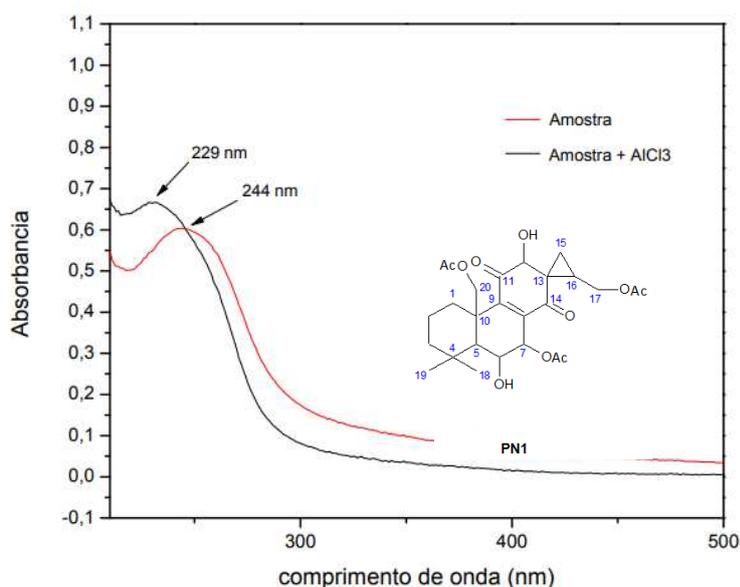
O espectro de IV (FIG. 3.8) mostra bandas de absorção em 3346 cm^{-1} , características de estiramento de O-H, banda larga e fraca, devido grupos vicinais que podem realizar ligações de hidrogênio intramolecular; em 1021 e 1220 cm^{-1} , banda característica de estiramento de C-O de ésteres; uma banda em 1730 e 1716 cm^{-1} , referente a deformação axial de C=O de ésteres alifáticos (duplete devido a ressonância de Fermi); em 1673 cm^{-1} , banda característica estiramento de C=O conjugada com ligação dupla; em 2921 cm^{-1} , banda característica de estiramento de C-H (BARBOSA, 2007).

Figura 3.8 - Espectro de absorção na região do IV da substância PN1 isolada do extrato toluênico das folhas e de *Plectranthus neochilus*.



O espectro UV-Vis de PN1 em metanol apresentou banda de absorção (λ_{\max}) em 244 nm (FIG. 3.9). O uso de cloreto de alumínio (AlCl_3) auxiliou na determinação espectrofotométrica da presença de grupos capazes de formar complexos estáveis. (LIANDA e CASTRO, 2008).

Figura 3.9- Espectros de absorção no UV-Vis (200-800 nm) da substância PN1 isolada de *P. neochilus*



A natureza terpênica de **PN1** foi evidenciada pela análise do espectro de RMN de ^1H (FIG. 3.10 a 3.15, p. 61-63), que apresenta múltiplos sinais na região entre δ_{H} 1,03-2,32 ppm, referentes à hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Foram observados cinco simpletos em δ_{H} 1,03, 1,09, 1,91, 1,96, 2,14 ppm relativos a grupos metilas sendo três desses referentes a grupos acetoxila; um sinal de hidrogênio adjacente a carbonila (δ_{H} 5,71); cinco sinais de hidrogênios metínicos (δ_{H} 1,55, 3,35, 2,07, 4,15, 4,68). No espectro observam-se três dupletos em δ_{H} 1,20 ($J = 13,11$ Hz), 2,78 ($J = 4,94$ Hz), 4,12 ($J = 11,31$ Hz), correspondentes a grupos metilênicos; dois dupletos duplo em δ_{H} 1,65 ($J = 5,36$ Hz), 4,27 ($J = 5,65$ Hz) correspondentes a dois grupos metilênicos e um tripleto em δ_{H} 3,57 ($J = 11,42$ Hz) correspondente a um grupo metilênico. O espectro apresenta sinais em δ_{H} 1,28; 2,31 e 7,89 que foram atribuídos a impurezas, pois não foram observadas correlações com outros sinais da amostra, nos experimentos de RMN 2D.

Figura 3.10 – Espectro de RMN de ^1H de PN1 (500 MHz, MeOD).

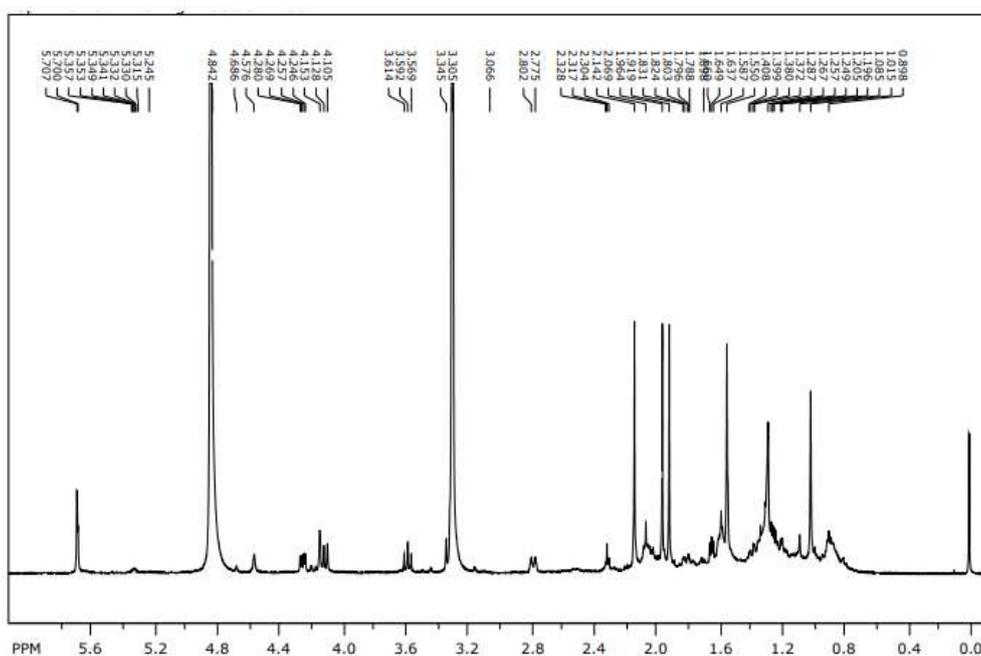


Figura 3.11 - Seção expandida do espectro de RMN de ^1H de PN1 na região de δ_{H} 0 - 1,50 ppm (500 MHz, MeOD)

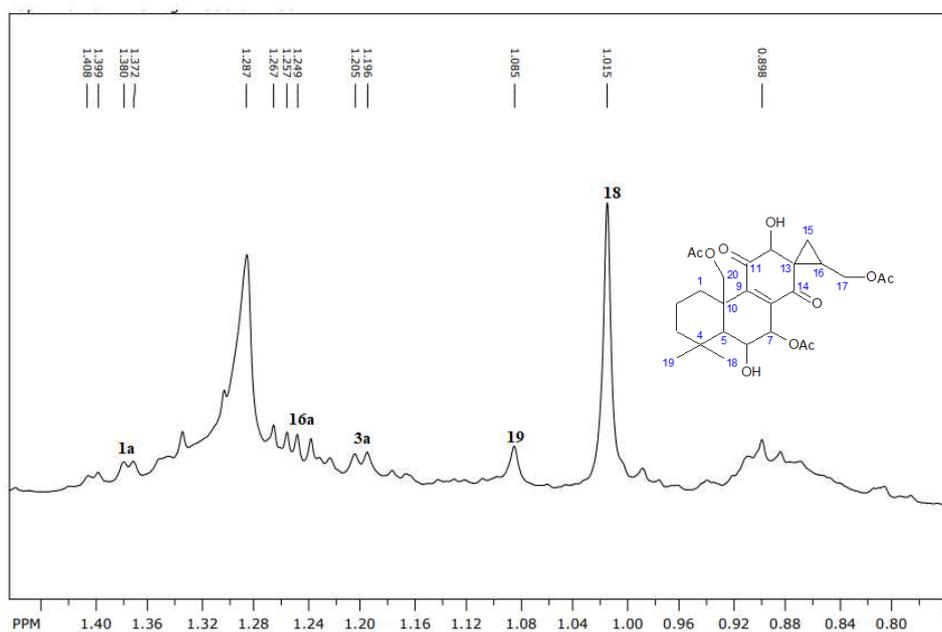


Figura 3.12 - Secção expandida do espectro de RMN de ^1H de **PN1** na região de δ_{H} 1,50-1,85 ppm (500 MHz, MeOD)

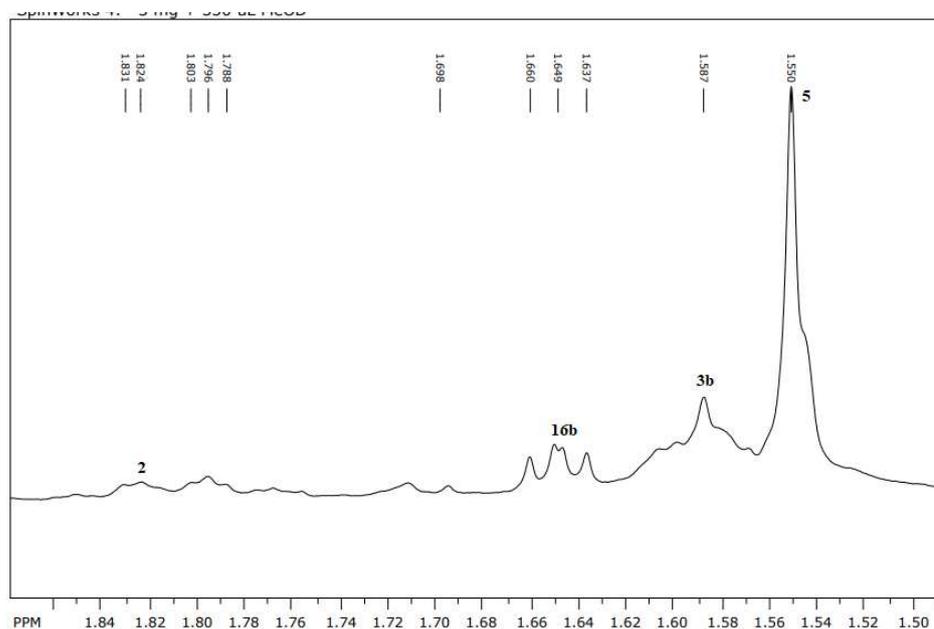


Figura 3.13 - Secção expandida do espectro de RMN de ^1H de **PN1** na região de δ_{H} 1,85-2,50 ppm (500 MHz, MeOD)

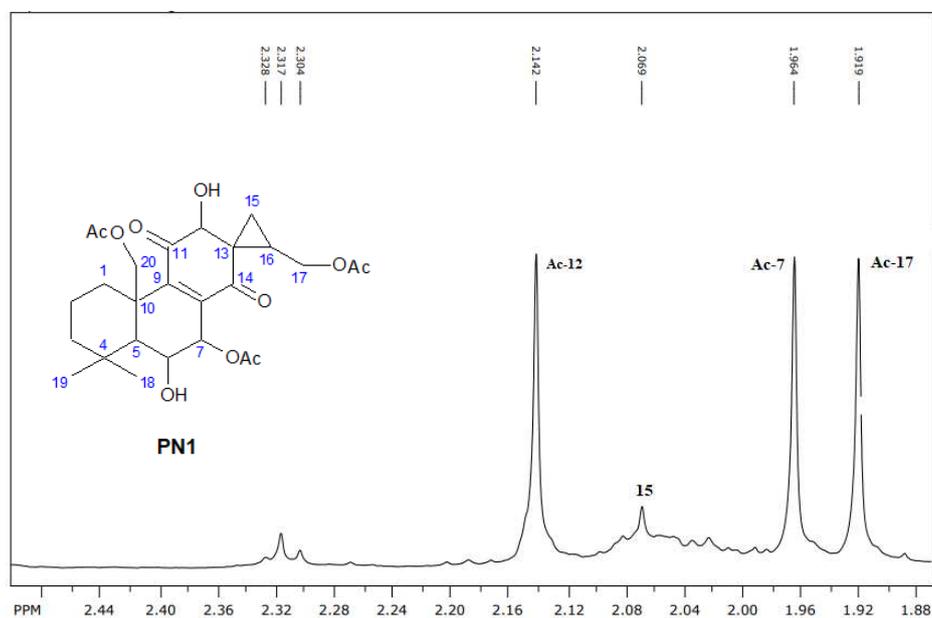


Figura 3.14 - Secção expandida do espectro de RMN de ^1H de **PN1** na região de δ_{H} 2,50-3,80 ppm(500 MHz, MeOD)

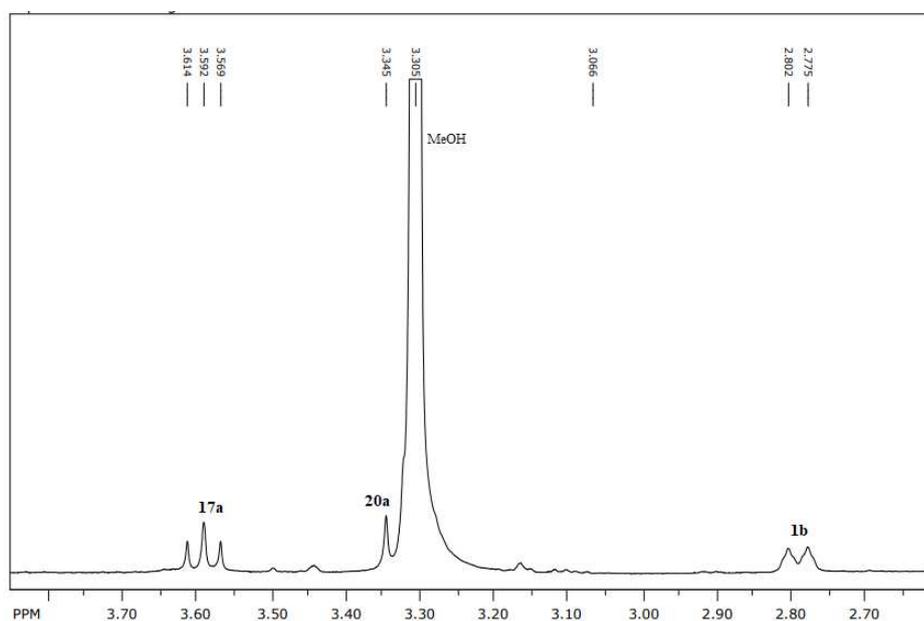
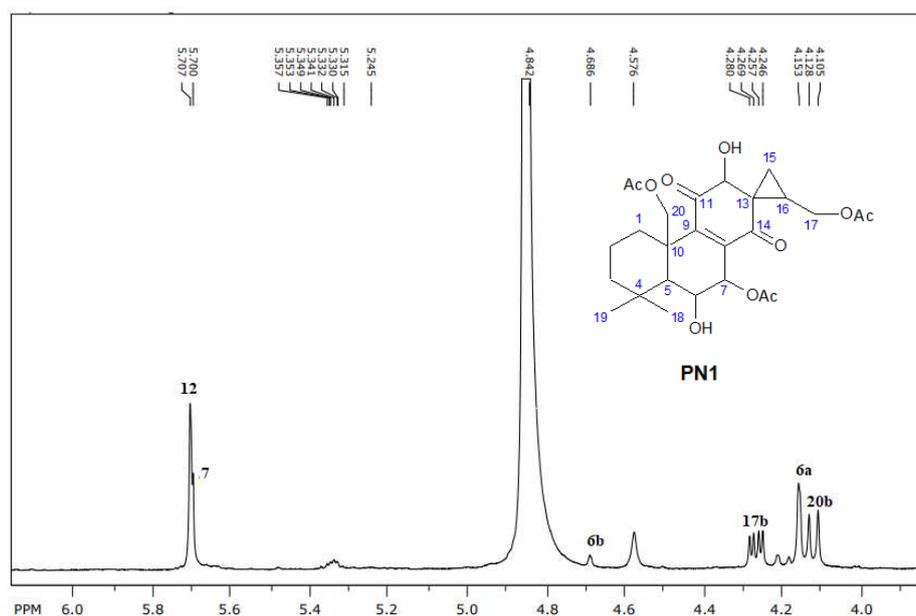


Figura 3.15 - Secção expandida do espectro de RMN de ^1H de **PN1** na região de δ_{H} 3,80-6,00 ppm(500 MHz, MeOD)



A análise dos mapas de contornos ^1H - ^{13}C HSQC (FIG.3.18-3.20, p. 72 a 73) e ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77) indicou a presença de 26 sinais de carbonos,

sendo dez não hidrogenados, seis metínicos, cinco metilênicos e cinco metílicos. Dentre esses sinais, dois foram atribuídos a grupos carbonilas de cetonas (δ_C 194,20 e 196,17), três à carbonilas de grupos acetoxilas (δ_C 169,34; 170,90 e 172,24), dois a carbonos olefínicos (δ_C 140,00 e 157,00) e três a carbonos metínicos oxigenados (δ_C 66,36; 68,40 e 75,56), sendo dois destes relativos a carbonos carbinólicos. Devido ao número de sinais de carbonos observados, foi considerada a natureza diterpênica da amostra.

Os sinais atribuídos aos carbonos C8 (δ_C 140,00), C9 (δ_C 157,00), C11 (δ_C 196,17), C12 (δ_C 75,56), C13 (δ_C 35,50), C14 (δ_C 194,20), C15 (δ_C 24,08), C-16 (δ_C 14,03) e C17 (δ_C 62,76) foram atribuídos por comparação com os dados de RMN de ^{13}C descritos na literatura (TAB. 3.1, p. 79) aliada às sinais de correlação observadas nos experimentos 2D e discutidas a seguir. Desta forma, definiu-se para **PN1** o esqueleto do tipo espirocoleona.

O sinal atribuído a C11 (δ_C 196,17), no mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), apresenta correlação 4J com um hidrogênio de δ_H 5,71, pertencente ao grupo metínico, que foi atribuído a H7. O sinal de C14 (δ_C 194,20) também apresenta correlação 3J com esse hidrogênio em δ_H 5,71, atribuído a H7 e com os sinais em δ_H 1,25 e 1,65 de grupo metilênico, atribuídos a H16 (3J) (^1H - ^{13}C HSQC, FIG. 3.18-3.20, p. 72 a 73).

O sinal em δ_C 35,5, atribuído a C13 através do mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), apresenta correlações com os hidrogênios em δ_H 1,25 e 1,46; δ_H 4,27 e 3,57, relativos a hidrogênios metilênicos e δ_H 5,71, relativos a hidrogênios metínicos, atribuídos respectivamente a H16 (2J), H17 (3J) e H12 (2J). O carbono em δ_C 75,56, atribuído à C12, apresenta correlações 3J com o hidrogênio δ_H 1,25 e 1,46, relativos aos hidrogênios metilênicos, atribuídos a H16.

O carbono δ_C 14,03, atribuído a C16 (^1H - ^{13}C HSQC, FIG. 3.18-3.20, p. 72 a 73), apresenta correlações com o hidrogênio δ_H 3,57 e 5,71 relativo a hidrogênios metilênicos e metínico, respectivamente, atribuídos a H17 (3J) e H12 (3J). No mapa de contorno ^1H - ^1H COSY (FIG. 3.29 a 3.32, p. 77 e 79) pode-se observar o acomplamento entre o sinal de H16 e o hidrogênio atribuído a H15.

O carbono δ_C 62,76, atribuído a C17, apresenta correlações 3J com os hidrogênios δ_H 1,25 e 1,46 relativos a hidrogênios metilênicos, atribuídos a H16 (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77). No mapa de contorno COSY (FIG. 3.29 a 3.32, p. 77 e 79) pode-

se observar o acomplamento entre oH17 e o carbono δ_C 24,08 de grupo metínico, atribuído a H15. Observa-se correlações entre o H17 e o sinal δ_C 172,24, atribuído a carbono carbonílico do grupo acetoxila (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77

O carbono δ_C 24,08, atribuído a C15 (^1H - ^{13}C HSQC, FIG.3.18-3.20, p. 72 a 73), apresenta correlações com os hidrôgenios δ_H 1,25 e 1,46; 3,57 e 4,27 relativos a hidrogênios metilênicos, atribuídos a H16 (2J) e H17 (2J) e também δ_H 5,71, relativo a hidrogênio metínico, atribuídos a H12 (3J) (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77).

No mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), são observadas correlações 3J entre o hidrogênio H6 (δ_H 4,15) com o carbono em δ_C 40,00 relativo a carbono não hidrogenado, atribuído a C-8 . Para o sinal de H7 (δ_C 5,70) são observadas correlações com os carbonos em δ_C 157,00 e 140,00 também relativos a carbonos não hidrogenados, atribuídos a C9 (3J) e C8 (2J), respectivamente (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77).

O carbono em δ_C 66,36, atribuído a C6 (^1H - ^{13}C HSQC, FIG.3.18-3.20, p. 72 a 73), apresenta correlações com os hidrogênios em δ_H 1,55 e 5,70, relativos a hidrogênios metínicos, atribuídos a H5 (2J) e H7 (2J), respectivamente. O correlação entre os sinais H6 e H7 pode ser observado pelo mapa de contorno ^1H - ^1H COSY (FIG. 3.29 a 3.32, p. 77 e 79). Pelo mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), foram observadas correlações entre os carbonos em δ_C 40,19 e 140 relativos a carbonos não hidrogenados e em δ_C 68,40 e 51,06 relativos a carbonos metínicos, atribuídos a C10, C8, C7 e C5, respectivamente (^1H - ^{13}C HSQC, FIG.3.18-3.20, p. 72 a 73).

No mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMBC (FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), são observadas correlações o hidrogênio H7 (δ_H 5,70) e o carbono em δ_C 170,90 relativo a carbonila de um grupo acetoxila. E são observados correlações entre o o hidrogênio H-12 e o carbono δ_C 169,34 relativo a carbono carbonílico do grupo acetoxila.

O sinal em δ_C 35,9, atribuído a C4 (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77), apresenta correlação com o hidrogênio em δ_H 1,09 relativo a hidrogênio metílico, atribuído a H-19 (^1H - ^{13}C HMBC, FIG. 3.21-3.28, p. 73 a 77).

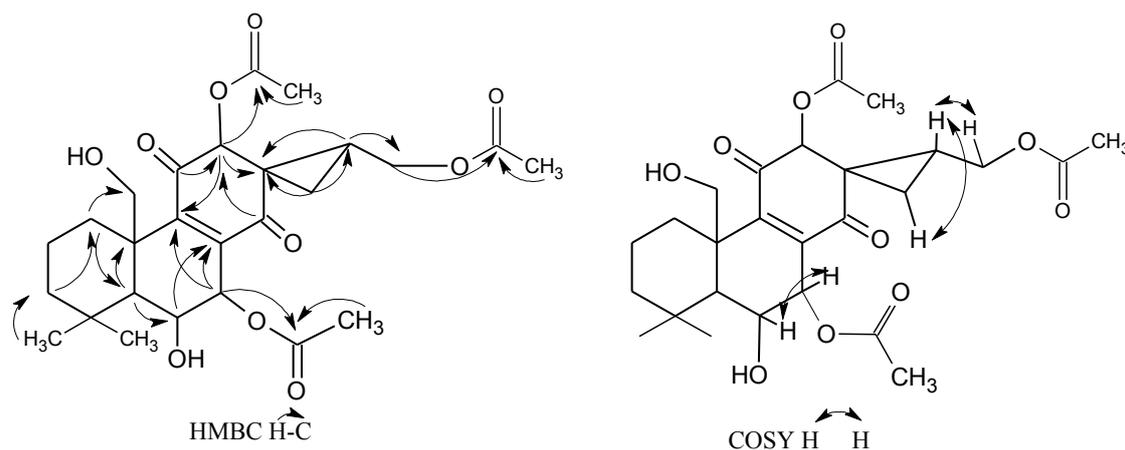
O carbono atribuído a C3 apresenta correlações 3J com o sinal hidrogênio em δ_H 2,78, de grupo metilênico, que foi atribuído a H1 . O carbono atribuído a C1 apresenta, correlação com os hidrogênios em δ_H 4,12, 3,35 e 1,55 de grupos metínicos, atribuídos a

H-20 (3J) e H5 (3J), respectivamente. O carbono, atribuído a C2 apresenta correlações com o hidrogênio em δ_H 1,20 de hidrogênios de grupo metilênico, que foram atribuídos a H3 (2J). Os carbonos metílicos, C18 e C19, apresentam correlações com o hidrogênio em δ_H 1,20 de hidrogênio de grupo metilênico, que foi atribuído a H3 (3J).

O sincarbono C20 apresenta correlações com os hidrogênios em δ_H 1,55 de hidrogênios de grupo metínico, atribuído a H-5 (3J). O C10 apresenta correlações com os hidrogênios em δ_H 4,12, 3,35, 1,55 e 4,15 de grupos metínicos, atribuídos a H20 (4J), H5 (2J) e H6 (3J), respectivamente.

A Figura 3.16 resume as principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY observadas para **PN1**.

Figura 3.16 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY, para o composto **PN1**.



Considerando as análises efetuadas, foi proposta a estrutura do diterpeno abietano, do tipo espirocoleona identificado como sendo o 7,17,20-triidroxi-6,12-diidroxi-13,16-ciclo-8-abietano-11,14-diona (**63**). Não foram realizados experimentos para a determinação da estereoquímica do composto, desta forma, as atribuições dessa natureza foram realizadas por comparação com os dados de RMN de 1H e de ^{13}C de **PN1** e os de compostos relacionados, previamente descritos. Segundo levantamento bibliográfico realizado, **PN1** trata-se de um composto inédito na literatura. No entanto, para a elucidação estrutural inequívoca, outros experimentos devem ser realizados como COSY duplo quantum e NOESY.

Abietanóides do tipo espiro foram isolados de apenas cinco espécies de *Plectranthus*, *P. scutellarioides* (extrato em $CHCl_3$, **64**) (ITO et al., 2018), *P. porcatus*

(extrato acetônico, **65**) (SIMÕES et al., 2010), *P. lanuginosus* (**65**, RUEDI et al., 1983), *P. zeylanicus* (extrato hexânico, **66**) (NAPAGODA et al., 2014), *P. barbatus* var. *grandis* (extrato em CHCl_3 , **67**), *P. barbatus* var. *grandis* (extrato hexânico, **68**) (DE ARAÚJO et al., 2010), sendo descritos até o momento, apenas os compostos **64 a 68** (FIG. 3.17).

Figura 3.17 - Diterpenóides do tipo abietano espirocoleonas previamente identificados em espécies do gênero *Plectranthus*

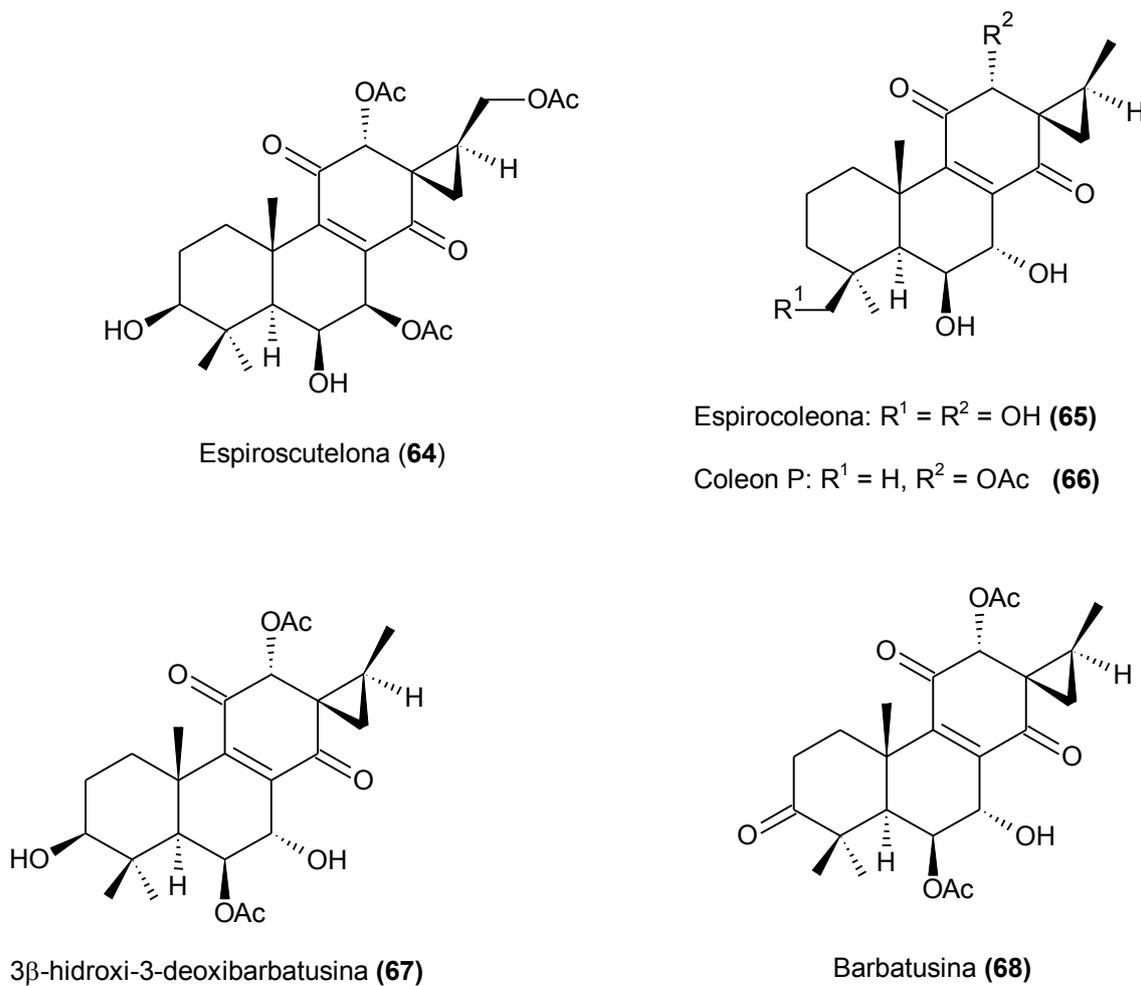


Figura 3.18- Secção expandida do mapa de contorno HSQC de **PN1** na região de δ_c 10 a 35 ppm (500 MHz, MeOD).

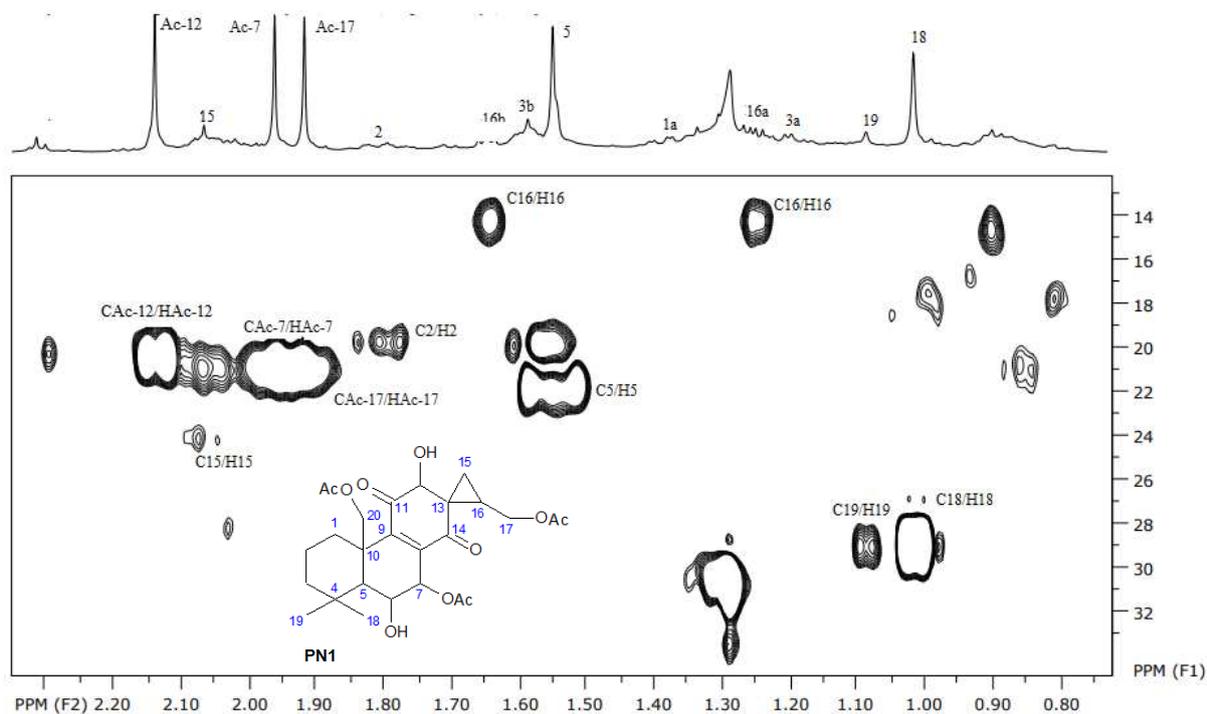


Figura 3.19 - Secção expandida do mapa de contorno HSQC de **PN1** na região de δ_c 35 a 59 ppm (500 MHz, MeOD).

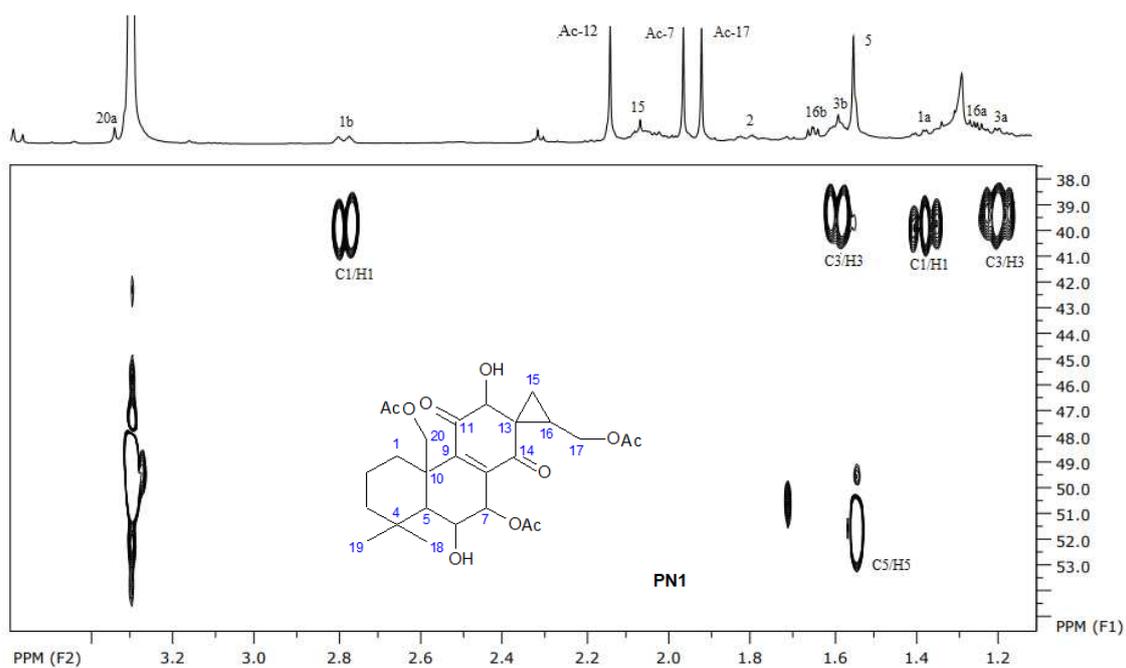


Figura 3.20 - Secção expandida do mapa de contorno HSQC de **PN1** na região de δ_C 60 a 78 pm (500 MHz, MeOD)

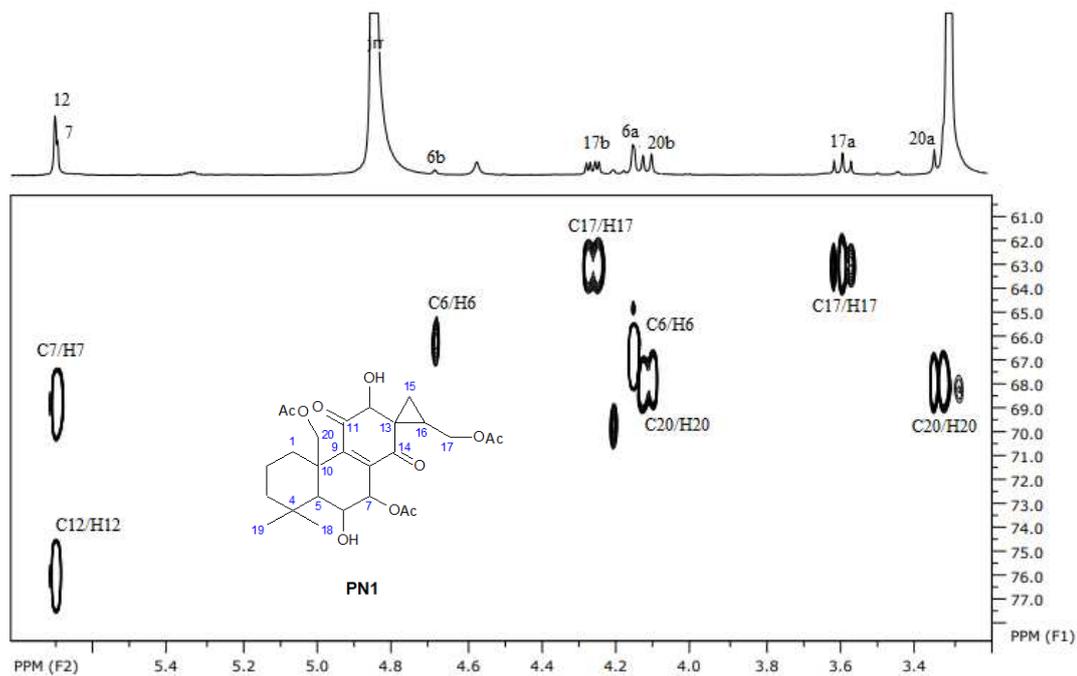


Figura 3.21 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 190-200 ppm (500 MHz, MeOD)

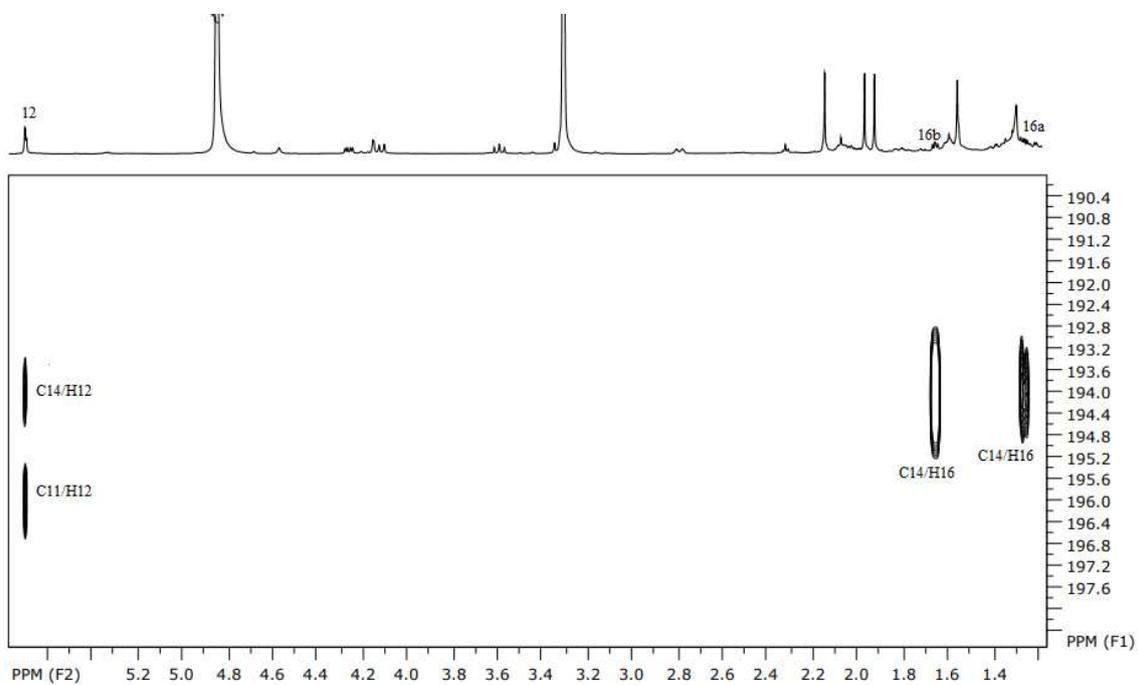


Figura 3.22 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 163-178 ppm (500 MHz, MeOD)

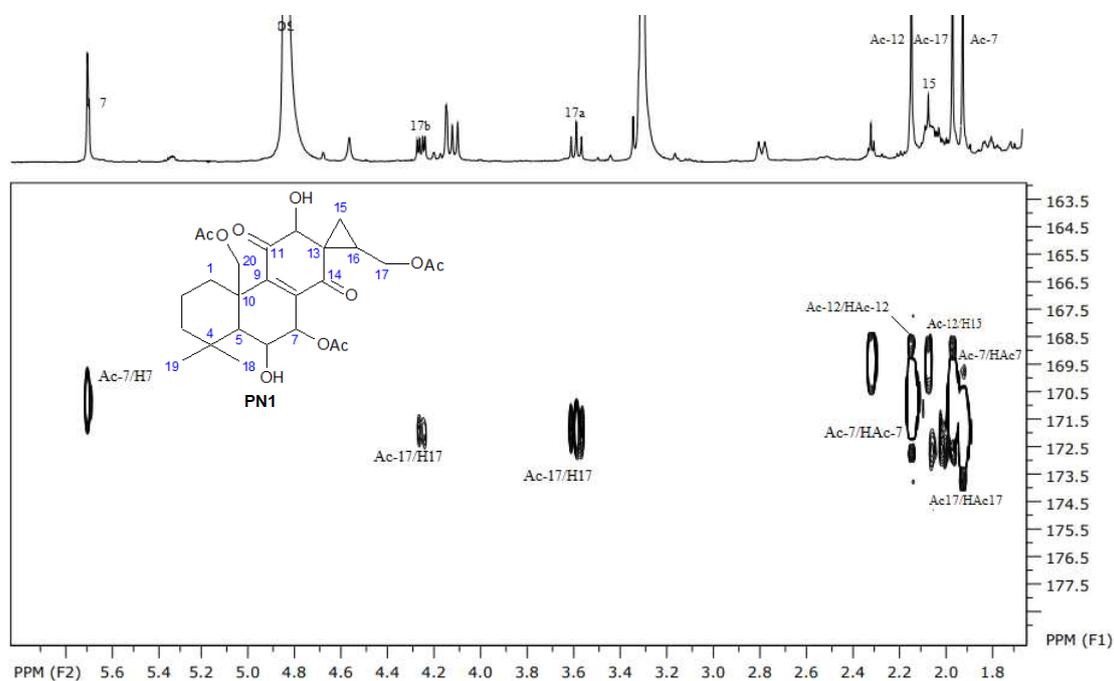


Figura 3.23 Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 136-160 ppm (500 MHz, MeOD)

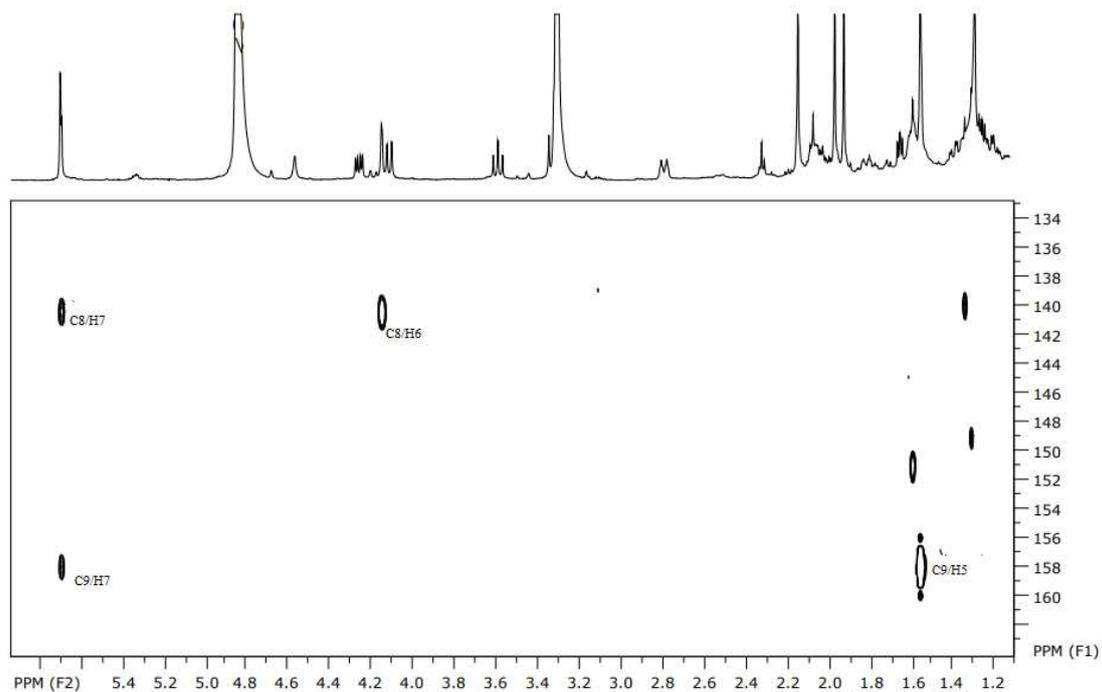


Figura 3.24 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 60-76 ppm (500 MHz, MeOD)

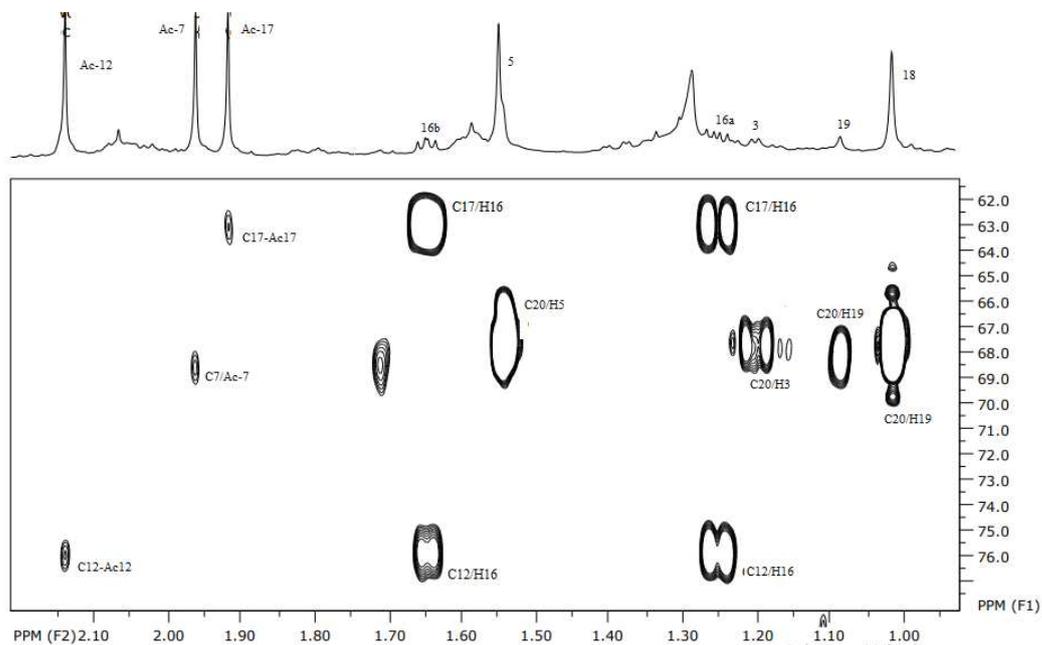


Figura 3.25 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 60-76 ppm (500 MHz, MeOD)

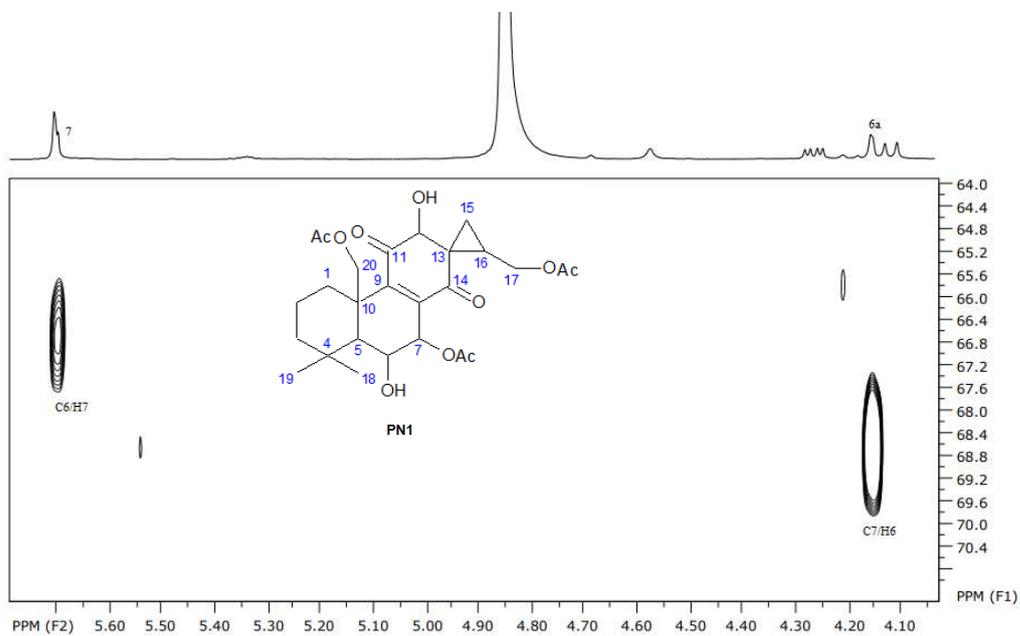


Figura 3.26 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 26-52 ppm (500 MHz, MeOD)

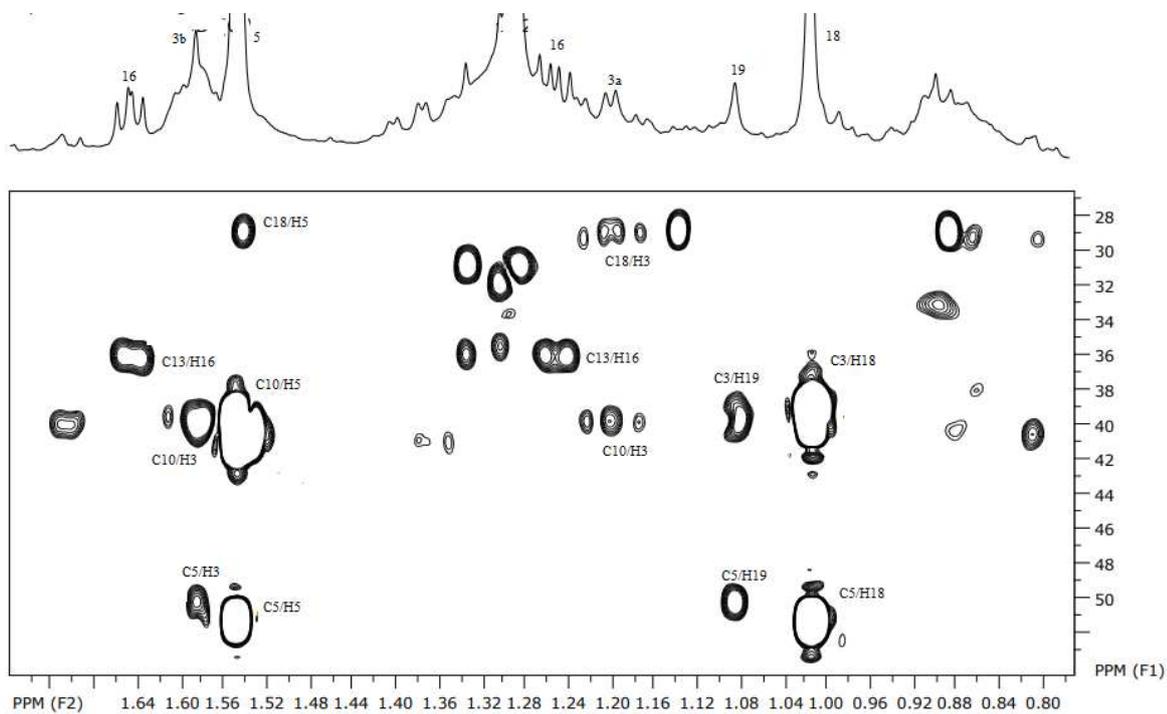


Figura 3.27 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 26-52 (500 MHz, MeOD)

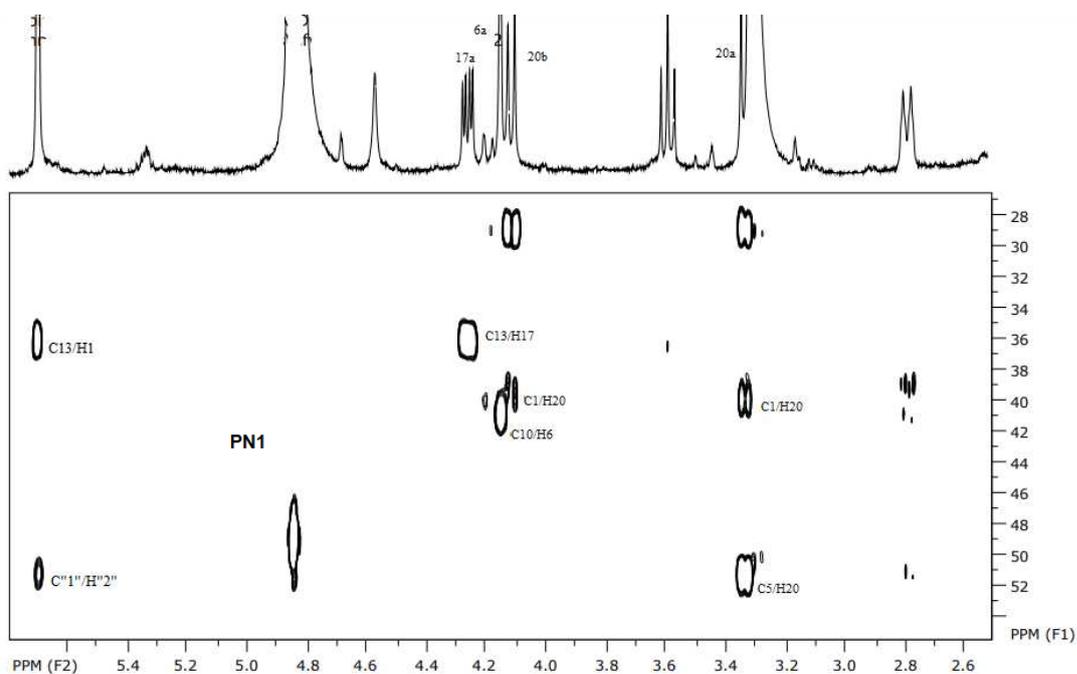


Figura 3.28 - Secção expandida do mapa de contorno HMBC de **PN1** na região de δ_C 12-29 (500 MHz, MeOD)

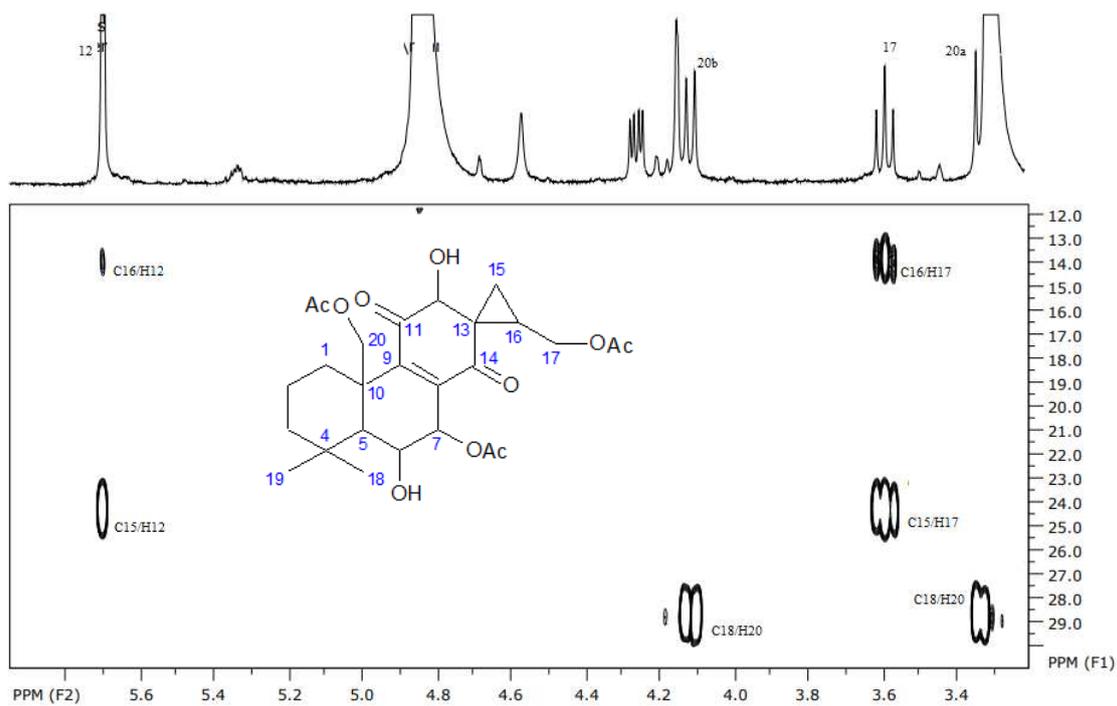


Figura 3.29 - Mapa de contorno COSY de **PN1** (500 MHz, MeOD)

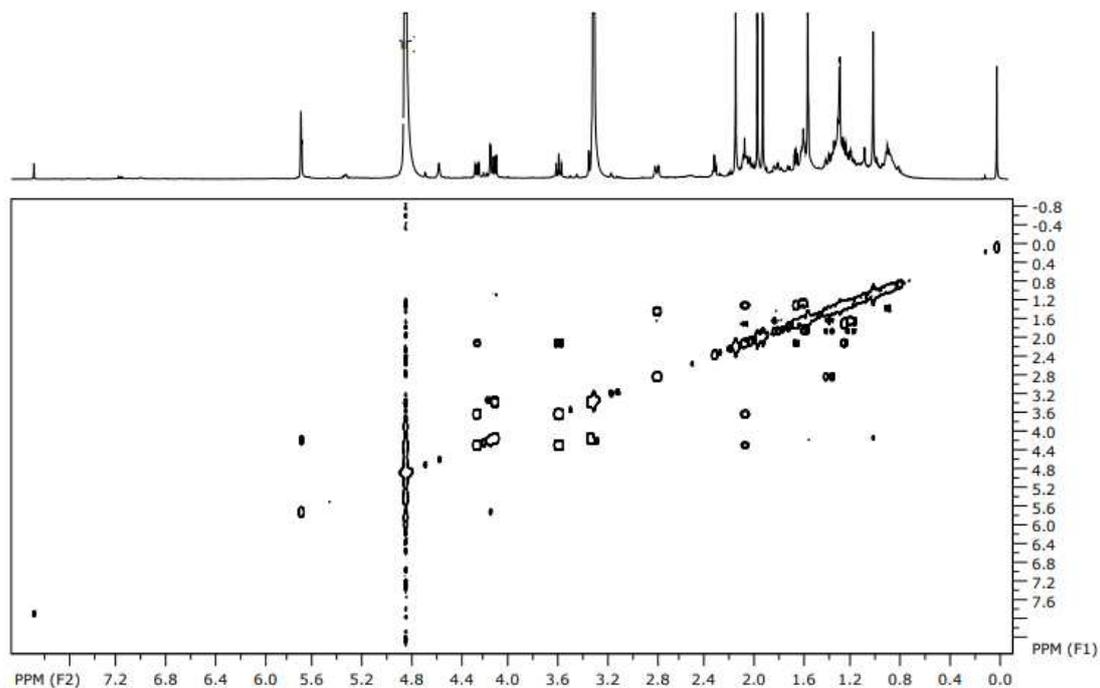


Figura 3.30 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de **PN1** na região de δ_H 3,0-5,8 (500 MHz, MeOD)

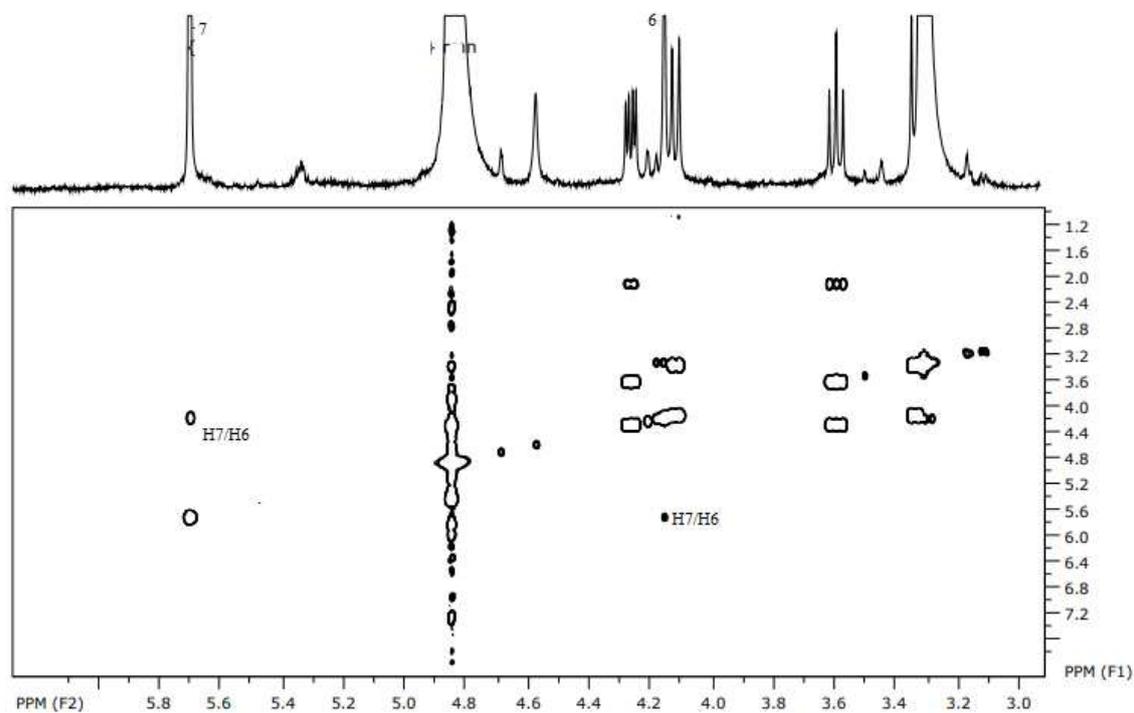


Figura 3.31 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de **PN1** na região de δ_H 2,0-4,4 (500 MHz, MeOD)

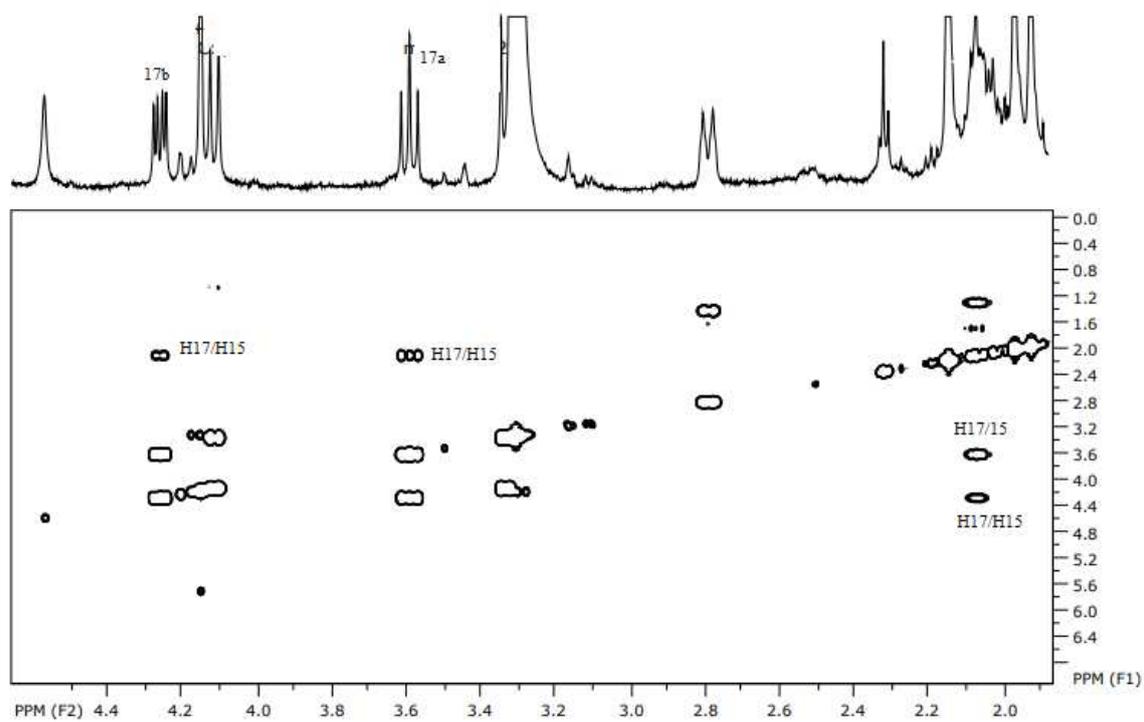


Figura 3.32 - Secção expandida do mapa de contorno COSY de **PN1** na região de δ_H 0,0-4,4 (500 MHz, MeOD)

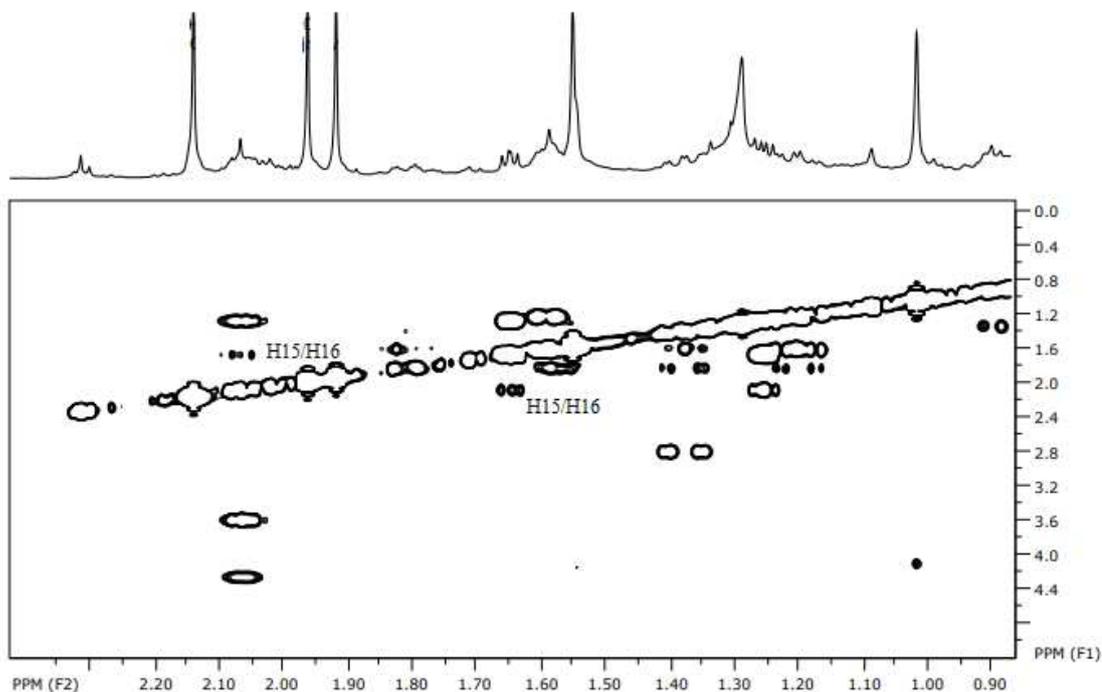
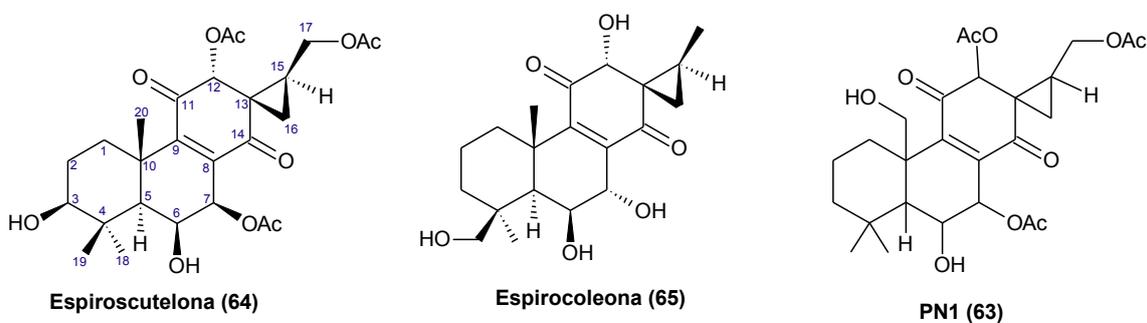


Tabela 3.1 - Deslocamento químicos de RMN de ^{13}C de d^1H de **PN1** e dados de RMN dos compostos espiroscutelona C (ITO *et al.*, 2018) e espirocoleona (RUEDI *et al.*, 1983)



| Nº | Espiroscutelona C (64) ^a (ITO <i>et al.</i> , 2018) | | Espirocoleona (65) ^b (RUEDI <i>et al.</i> , 1983) | | PN1 (63) | |
|----|--|----------------------------------|--|--|-------------------|--|
| | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H |
| 1 | 36,1 | 1,43 (m) 2,80, dt (13.8, 3.4) | 38,76 | α 1,29 td β 2,05 m** | 39,4 | α 1,38 β 2,78 d (13,11 Hz) |
| 2 | 27,7 | 1,80 (m) | 20,11 | α 1,5 ddddd β 1,79 ddddd | 19,11 | 1,83 |
| 3 | 78,1 | 3,20, dd (10.9, 5.2) | 40,27 | α 1,26 ddd β 1,55 br d | 38,86 | α 1.20 dd (4,94 Hz) β 1.57 s |
| 4 | 39,8 | — | 39,81 | — | 35,9 | - |
| 5 | 48,8 | 1,25, s | 50,33 | α 1,72 d | 51,06 | 1,55 s |
| 6 | 66,9 | 4,31 s | 70,30 | α 4,23 m* | 66,36 | 4,15 s |

| | | | | | | |
|-----------------|---------------|--|--------|------------------------|-----------------|--|
| | | | | | | 4,68 s |
| 7 | 69,1 | 5,58, d, 2.3 | 67,16 | β 4,63 dd | 68,40 | 5,70 |
| 8 | 139,1 | — | 142,49 | — | 140,00 | — |
| 9 | 157,6 | — | 156,17 | — | 157,00 | — |
| 10 | 39,2 | — | 40,08 | — | 40,19 | — |
| 11 | 194,2 | — | 200,28 | — | 196,17 | — |
| 12 | 74,4 | 5,64 (s) | 78,57 | 3,82 d | 75,56 | 5,71 |
| 13 | 34,9 | — | 37,47 | — | 35,50 | — |
| 14 | 192,5 | — | 198,00 | — | 194,20 | — |
| 15 | 23,3 | 2.07 (m) | 21,63 | 1,44 m** | 24,08 | 2,069 (s) |
| 16 | 13,4 | 1,14 (dd, 9.2, 5.2) 1,69 (dd, 6.2, 5.2) | 27,28 | A 1,08 dd B 0,92 dd | 14,03 | 1,25 m 1,65 dd (5,86 Hz) |
| 17 | 61,6 | 3,59 (m) 4,23 (dd, 12.0, 5.2) | 14,15 | 1,26 d | 62,76 | a 3,57 t (11,42 Hz) b 4,27 dd (5,65 Hz) |
| 18 | 28,3 | 1,03 (s) | 29,37 | 1,26 d | 28,83 | 1,03 s |
| 19 | 17,3 | 1,17 (s) | 68,72 | A 4,24 dd B 3,33 dd | | 1,09 s |
| 20 | 21,4 | 154 (s) | 22,73 | 1,74 s | 67,56 | 3,35 s 4,12 d (11,31 Hz) |
| Ac-7 | 169,7 20,6 | 1,97 (s) | — | — | 170,90 20,90 | 1,96 (s) |
| Ac-12 | 169,2 20,5 | — 2,16 (s) | — | — | 169,30 20,47 | — 2,14 (s) |
| Ac-17 | 170,1 20,8 | 1,90 (s) | — | — | 172,24 20,90 | 1,91 (s) |
| 6 β -OH | — | — | — | 4,99 d | — | — |
| 7 α -OH | — | — | — | 4,26 d | — | — |
| 12 α -OH | — | — | — | 5,12 br d | — | — |

Legenda: m: multipletto, dt: duplo triplete, dd: duplo duplete, s: simpleto, d: duplete, t: triplete, dddd duplo duplo duplo duplete. ^a ¹H 500 MHz; ¹³C 125 MHz. CDCl₃ ^b ¹H 200 MHz; ¹³C 20 MHz. CDCl₃

3.2. Atividades biológicas

3.2.1. Atividade citotóxica

Os extratos de *P. neochilus* foram avaliados quanto ao potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais, K562, RKO-AS45-1, MDA-MB-231, e uma linha de célula leucêmica, THP1 e uma linhagem de célula não tumoral, Wi-26VA4. No teste foi utilizando o etoposídeo como composto citotóxico padrão. A Tabela 3.2 apresenta os resultados de citotoxicidade dos extratos de flores (EF1) e folhas da planta (EFF).

Tabela 3.2 - Atividade citotóxica do extrato de flores (EFl) e da fase flavonoidica (EFF) das folhas de *Plectranthus neochilus* e do etoposídeo (controle) para linhagens celulares tumorais e não-tumoral.

| Material | IC ₅₀ (µg/mL) ± SD * | | | | |
|------------|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| | THP-1 | K562 | RKO-AS45-1 | MDA-MB-231 | Wi-26VA4 |
| EFF | 9.19 ± 1.58 | 12.50 ± 1.44 | 28.19 ± 2.75 | 32.00 ± 4.25 | 59.66 ± 3.05 |
| EFl | 32.76 ± 2.87 | 46.15 ± 3.01 | 67.88 ± 3.98 | 70.01 ± 5.08 | 78.70 ± 4.76 |
| Etoposídeo | 12.04 ± 2.32 | 9.11 ± 1.33 | 10.66 ± 2.23 | 12.00 ± 0.63 | 8.63 ± 0.13 |
| P valor | < 0,05 ^a > 0,05 ^b | < 0,05 ^c > 0,05 ^d | < 0,05 ^e | < 0,05 ^f | < 0,05 ^g |

* valores como padrão ± padrão da média; a: THP-1, etoposídeo vs EFF; b: THP-1, etoposídeo vs EFF; c: K562, etoposídeo vs todos os extratos; d: K562, etoposídeo vs todos os extratos; e: RKO-AS45-1, etoposídeo vs todos os extratos; f: Wi-26VA4, etoposídeo vs todos os extratos.

A ação citotóxica apresentada pelo extrato foliar rico em flavonóides (EFF) foi mais significativa frente a linhagem celular de eritroleucemia humana carcinogênica K-562. Quando comparada à quimioterapia não seletiva (etoposídeo), a fase flavonoidica das folhas demonstrou atividade citotóxica significativa frente as linhas celulares de leucemia monocítica aguda (THP-1). É importante notar que a citotoxicidade de todos os extratos foi menor que a do etoposídeo em relação à linha celular não tumoral.

Em estudos previamente descrito, o extrato hexânico das folhas de *P. neochilus* apresentou atividade citotóxica contra células de câncer de língua (SCC-25) com valor de IC₅₀ de 17,2%, comparando a cisplatina (quimioterápico padrão, 36,6%) pelo método de MTT (brometo de [3-4,5-dimetilazol-2il-2,5-difeniltetrazólio (BORGES et al., 2016).

Matias e colaboradores (2019) descrevem para o extrato em acetona de *P. madagascariensis* a redução da viabilidade das células MDA-MB-231 de 20,1%, resultando em uma atividade citotóxica promissora comparando com doxorrubicina (quimioterápico padrão) e utilizando-se o método de ensaio de coloração com violeta de cristal (MATIAS et al., 2019). Diferentemente, desse resultado, nesse ensaio o extrato de

P. neochilus apresentou IC₅₀ maior que o do etoposídeo para essa mesma classe de células tumorais.

Nos estudos conduzidos por Garcia e colaboradores (2018b), extratos acetônico de *P. strigosus* e *P. madagascariensis* apresentaram potencial atividade citotóxica em relação a adenocarcinoma de cólon humano (HCT116) e mama (MCF-7) e carcinoma de pulmão (NCI-H460), comparando-se com a doxorrubicina e utilizando o método ensaio de sulforodamina B (SRB). Para os extratos etanólicos de *P. barbatus* foi observada atividade citotóxica notável frente a linhas celulares de câncer cervical humano (HeLa), carcinoma hepatocelular hepático (HepG2) e câncer de cólon humano (HT-29), apresentando IC₅₀ menores e/ou próximos do controle quimioterápico dasatinibe (MOTHANA et al., 2019).

De acordo com os resultados obtidos, a planta possui substâncias potencialmente antitumorais que requer mais estudos, incluindo de toxicidade para outras linhagens de células não tumorais e *in vivo*, para verificar o potencial tóxico para a população que utiliza a planta na medicina popular.

3.2.2. Atividade antioxidante por voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD)

Compostos que apresentam propriedades captadoras de radicais livres, foram identificados nas espécies de *Plecthanthus* (KYUNG-A et al., 2011). A avaliação do potencial antioxidante de plantas medicinais ou compostos isolados é de extrema importância, considerando que os radicais livres estão relacionados diretamente com o surgimento de diversas doenças como isquemia cerebral e cardíaca, doenças de Parkinson, distúrbios gastrointestinais, envelhecimento, câncer entre outros (ABDELMOGIB et al., 2002; LUCKHOBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012). Estudos conduzidos com extrato em metanol e aquoso de *P. neochilus*, utilizando-se o método de DPPH, demonstraram atividade antioxidante relevante com valor de RSA (atividade de eliminação de radical) de 64,9% e 68,9, respectivamente, em comparação com ácido ascórbico (93,4%) (MATIAS et al., 2019).

A determinação da atividade antioxidante por voltametria cíclica é uma interessante forma de avaliação desta ação, pois apresenta resultados rápidos, simples e sensíveis, além de requerer reduzida quantidade de amostra, levando em consideração o

baixo rendimento dos extratos obtidos das plantas (SOCHOR et al., 2013). A Figura 3.33 apresenta os resultados encontrados pela VC e pela VPD, respectivamente, para o extrato bruto das folhas de *P. neochilus* (EF) em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol. No voltamograma cíclico, a densidade da corrente oxidativa começa a aumentar em potenciais próximos 240 mV apresentando pico de intensidade máxima de oxidação em torno de 290 mV. O voltamograma de pulso diferencial (VPD) segue um padrão semelhante ao do VC: uma região sem atividade eletroquímica significativa, seguida de um aumento da densidade da corrente oxidativa com máximo em torno de 290 mV. Isso indica a presença de espécies eletroativas no extrato. A capacidade da amostra de atuar como protetor oxidativo depende da existência de espécies facilmente oxidáveis (baixo potencial de oxidação) (BARROS et al., 2011; ZHENG et al., 2019). A Figura 3.34 apresenta também o resultado pelas técnicas voltamétricas do padrão canferol.

Figura 3.33 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}^1$) e de pulso diferencial ($v=30 \text{ mV/s}$) do extrato bruto das folhas de *P. neochilus* (EF) em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol

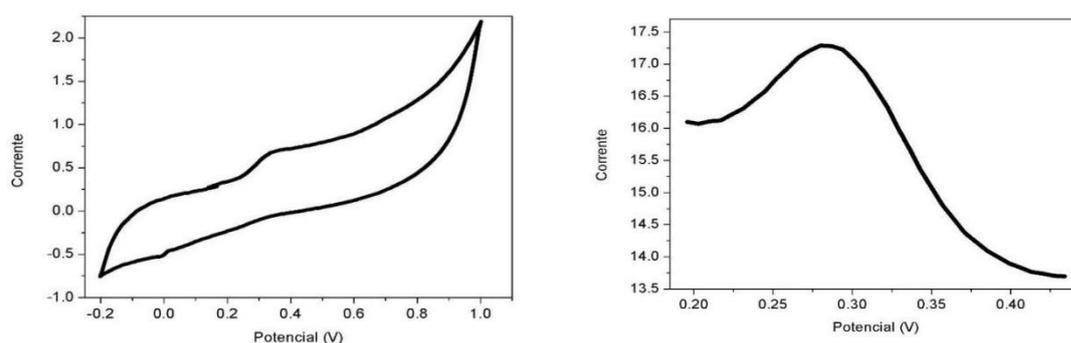
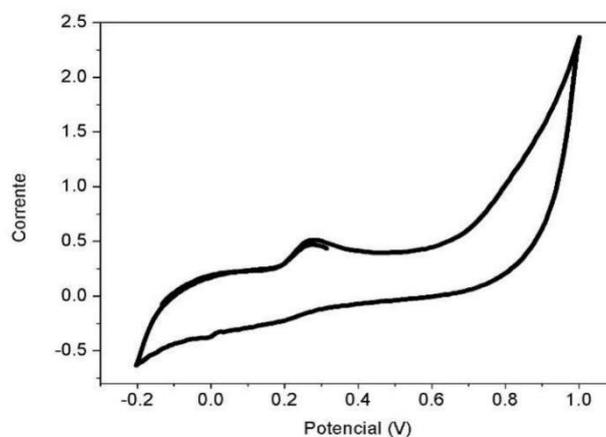


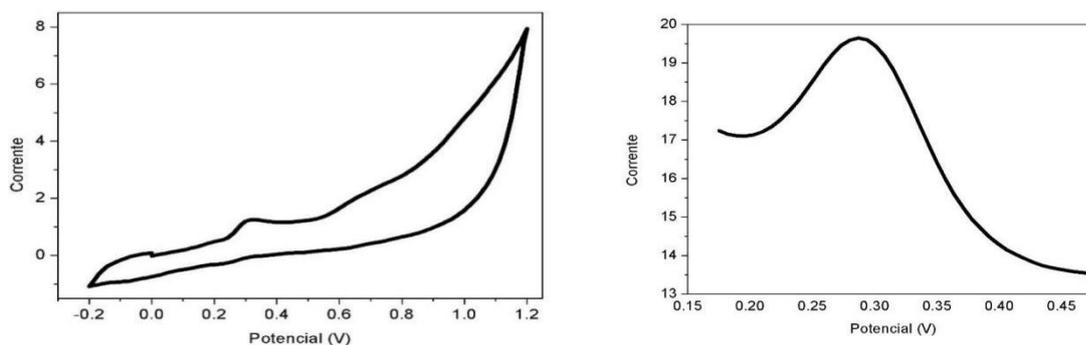
Figura 3.34- Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mV/s}$) do padrão canferol e em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol



Ao observar os voltamogramas é perceptível a semelhança eletroquímica existente entre o extrato bruto das folhas de *P. neochilus* e o padrão canferol. É observado um pico alargado no voltamograma do extrato bruto das folhas de *P. neochilus*, que pode ter sido influenciado pelos diferentes metabólitos presentes.

Na Figura 3.35 são apresentados os resultados encontrados pela VC e pela VPD, respectivamente, para a fase flavonoídica das folhas (EFF) de *P. neochilus* em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol. No voltamograma cíclico, a densidade da corrente oxidativa começa a aumentar em potenciais próximos a 210 mV apresentando pico de intensidade máxima de oxidação em torno de 290 mV. O voltamograma de pulso diferencial (VPD) segue um padrão semelhante ao do VC: região sem atividade eletroquímica significativa, seguida de um aumento da densidade da corrente oxidativa com máximo em torno de 290 mV. Isso indica a presença de espécies eletroativas no extrato (BARROS et al., 2011).

Figura 3.35- Voltamogramas cíclicos ($v = 20$ mV/s) e de pulso diferencial ($v = 20$ mV/s) da fase flavonoídica das folhas de *P. neochilus* em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol



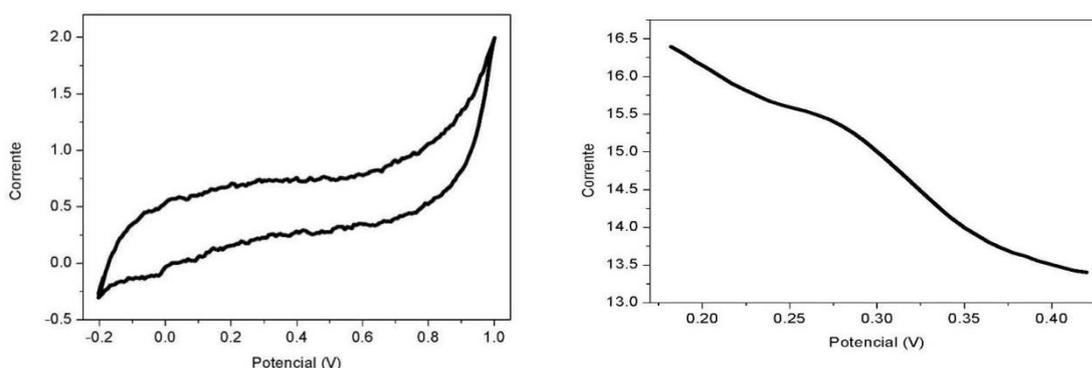
O padrão canferol (FIG. 3.34, p.83) também apresentou semelhança eletroquímica com a fase flavonoídica das folhas (EFF). É observado que não há a presença do pico alargado na fase flavonoídica das folhas, evidenciando o isolamento de compostos fenólicos de acordo com a metodologia de extração utilizada.

A Figura 3.36 apresentam os resultados encontrados pela VC e pela VPD, respectivamente, para o extrato bruto das flores de *P. neochilus* (EF1) em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol. No voltamograma cíclico, a densidade da corrente oxidativa começa a aumentar em potenciais próximos de 250 mV apresentando pico de intensidade máxima de oxidação em torno de 300 mV.

O voltamograma de pulso diferencial (VPD) segue um padrão semelhante ao do VC: região sem atividade eletroquímica significativa, seguida de um aumento da

densidade da corrente oxidativa com máximo em torno de 300 mV. Isso indica a presença de espécies eletroativas no extrato (BARROS et al., 2011). E a Figura 3.34 (p. 83) representa também o resultado pelas técnicas voltamétricas do padrão canferol.

Figura 3.36 - Voltamogramas cíclicos ($v=20$ mV/s) e de pulso diferencial ($v = 20$ mV/s) do extrato bruto das flores de *P. neochilus* em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol

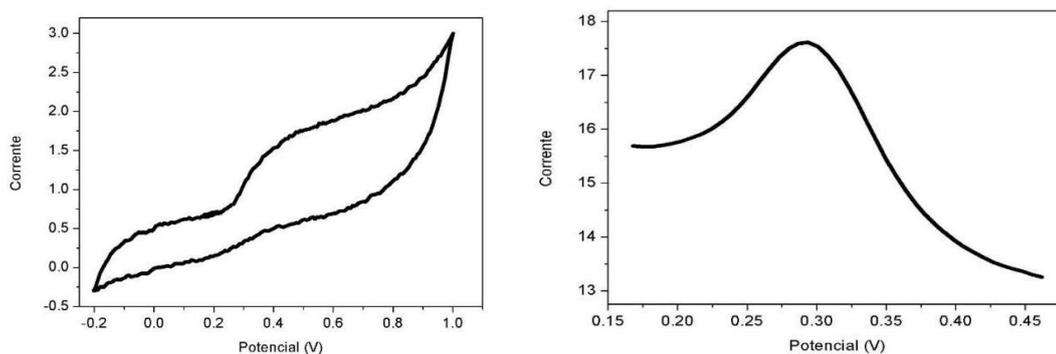


Ao observar os voltamogramas é perceptível a semelhança eletroquímica existente entre o extrato bruto das flores de *P. neochilus* e o padrão canferol. Porém, não é possível observar pico de oxidação no voltamograma cíclico, mas no de pulso diferencial há um pico alargado, que pode ter sido influenciado pelos diferentes metabólitos presentes.

Na Figura 3.37 (p. 86) são apresentados os resultados encontrados pela VC e pela VPD, respectivamente, para a fase flavonoídica das flores (EFFI) de *P. neochilus* em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol. No voltamograma cíclico, a densidade da corrente oxidativa começa a aumentar em potenciais próximos a 230 mV apresentando pico de intensidade máxima de oxidação em torno de 290 mV.

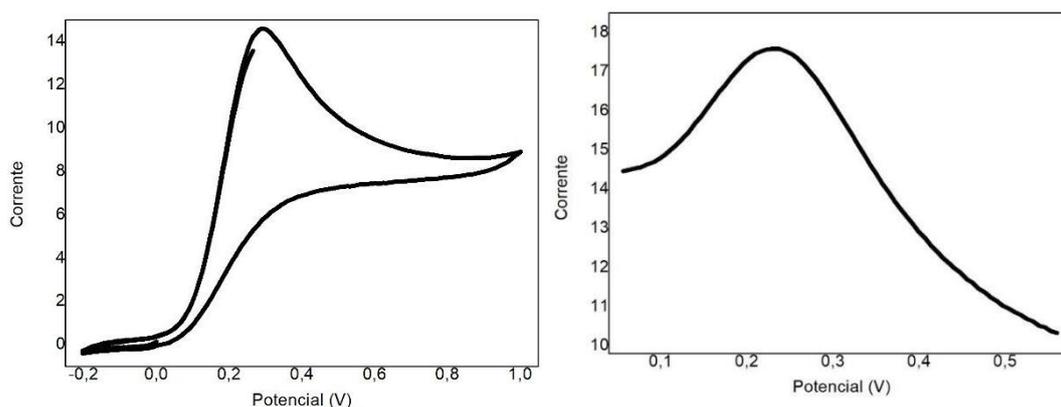
O voltamograma de pulso diferencial (VPD) segue um padrão semelhante ao do VC: região sem atividade eletroquímica significativa, seguida de um aumento da densidade da corrente oxidativa com máximo em torno de 290 mV. Isso indica a presença de espécies eletroativas no extrato (BARROS et al., 2011). O padrão canferol (FIG. 3.34, p. 83) também apresentou semelhança eletroquímica com a fase flavonoídica das flores (EFFI). É observado que a presença de um pico alargado na VC, que podem ter sido influenciado pelos diferentes metabólitos presentes.

Figura 3.37 - Voltamogramas cíclicos ($v=20$ mV/s) e de pulso diferencial ($v = 20$ mV/s) da fase flavonoídica das flores de *P. neochilus* em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol



Na Figura 3.38, é apresentado os resultados encontrados pela VC e pela VPD, respectivamente, para o ácido ascórbico 0,001 mol/L em tampão fosfato pH 7 (0,1 mol/L) e etanol, apresentando pico de oxidação de 240 mV. O ácido ascórbico é um composto com atividade antioxidante comprovada, com grande poder de neutralizar as moléculas de radicais livres (PELLEGRINI et al., 2007). Ele foi utilizado como controle positivo e verificou-se que todos as amostras analisadas possuem um pico de oxidação próximo ao do ácido ascórbico, evidenciado potencial antioxidante das amostras.

Figura 3.38 - Voltamogramas cíclicos ($v = 20$ mV/s) e de pulso diferencial ($v = 20$ mV/s) do ácido ascórbico em tampão fosfato pH 7 0,1 mol/L e etanol



Estudos anteriores conduzidos por Viana (2011), Rijo et al. (2014) e Matias et al. (2019) indicaram potencial antioxidante das folhas e caules de *Plectranthus Neochilus* pelo método DPPH. Neste estudo, os extratos foi avaliados utilizando-se métodos eletroquímicos e foi possível comprovar a existência de compostos antioxidantes em

todos os extratos avaliados. Na prospecção fitoquímica foram encontrados a presença de compostos fenólicos que podem estar contribuindo para esse resultado.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES

O presente estudo teve por objetivo geral, contribuir para novas perspectivas de avanços no conhecimento de mais uma espécie vegetal, pertencente a um gênero que tem sido apontado como extremamente promissor no contexto medicinal. Nesse sentido, nesse trabalho foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- A fase rica em flavonóides, obtida das folhas de *P. neochilus*, apresentaram significativa citotoxicidade, quando comparada à quimioterapia não seletiva. Observou-se ainda, que a citotoxicidade de todos os extratos foi menor que a demonstrada pelo etoposídeo frente à linha de célula não tumoral utilizada no teste. Desta forma, o resultado obtido contribui para a confirmação do potencial de mais uma espécie do gênero como agente antitumoral, considerando os resultados previamente descritos para extratos e frações isolados de outras espécies de *Plectranthus*.
- Flavonóides têm ocorrência restrita em *Plectranthus*, no entanto, mais recentemente, vários estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de identificar esses metabolitos, considerando o expressivo desempenho dos extratos das plantas do gênero em diferentes ensaios para a avaliação da atividade antioxidante. No presente trabalho, as análises realizadas por CLAE permitiram identificar, considerando os padrões disponíveis, os flavonóides epicatequina, catequina, quercetina e o composto fenólico ácido cafeico nos extratos de *P. neochilus*. Sendo a epicatequina e catequina descritos pela primeira vez na espécie. Ainda, o gênero, como membro da subfamília Nepetoideae, é quimiotaxonomicamente caracterizado pela presença do ácido cafeico, ácido rosmarínico e os derivados do ácido cafeico, nepetoidinas A e B, o que pôde ser evidenciado, mesmo que parcialmente.
- O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado utilizando-se métodos eletroquímicos, que vêm sendo utilizados em ensaios preliminares, pois fornecem um método alternativo rápido, simples e sensível na análise de fatores bioativos. Em todos os extratos analisados foi possível comprovar a existência de compostos antioxidantes e além disso, foi possível observar que o potencial de oxidação destes é maior que o do ácido ascórbico, referência do teste.

- Diterpenos são os metabólitos secundários de maior ocorrência nas espécies de *Plectranthus*. O fracionamento cromatográfico realizado, permitiu isolar do extrato das folhas o diterpeno abietano, do tipo espirocoleona identificado como sendo o 7,12,17-triidroxi-6,20-diidroxi-13,16-ciclo-8-abietene-11,14-diona, cuja estrutura foi elucidada a partir da análise de RMN 1D e 2D. Segundo levantamento bibliográfico, esse é o primeiro relato deste diterpeno. Outros experimentos devem ser realizados a fim de confirmar a estereoquímica do composto, assim como a sua estrutura de forma inequívoca. O fracionamento foi conduzido inicialmente, na perspectiva de isolamento de derivados da forscolina, entretanto, não foi possível o isolamento de diterpenos do tipo labdano.

A literatura descreve vários trabalhos abordando a citotoxicidade dos diterpenos abietano, estudados contra várias linhas de células cancerosas. Desta forma, os resultados obtidos para os extratos de *P. neochilus*, aliados ao isolamento de um diterpeno derivado desse esqueleto, encorajam estudos adicionais visando a realização de estudos biomonitorados.

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.

AMINA, M.; ALAM, P.; PARVEZ, M. K.; AL-MUSAYEIB, N. M.; AL-HWAITY, S. A.; AL-RASHIDI, N. S.; AL-DOSARI, M. S. Isolation and validated HPTLC analysis of four cytotoxic compounds, including a new sesquiterpene from aerial parts of *Plectranthus cylindraceus*. *Nat. Prod. Res.* 8, 1-6, 2017.

AGUIAR GP, LIMA KA, SEVERIANO ME, GROppo M, AMBRÓSIO SR, CREVELIN EJ. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Plectranthus neochilus* (Lamiaceae) e *Tagetes erecta* (Asteraceae) cultivados no Brasil. *Int J Complement Alt Med.* 2018; 11, 31 - 35. 10.15406 / ijcam.2018.11.00343.

ANDRADE, J. M.; CUSTODIO, L.; ROMAGNOLI, A.; REIS, C. P.; RODRIGUES, M. J.; GARCIA, C.; PETRUCCIOLI, E.; GOLETTI, D.; FAUSTINO, C.; FIMIA, G. M.; RIJO, P. Antitubercular and anti-inflammatory properties screening of natural products from *Plectranthus* species. *Future Med Chem.* 10(14), 1677–1691. 2018.

ANDRADE, J. M.; DOMÍNGUEZ-MARTÍN, E. M.; NICOLAI, M.; FAUSTINO, C.; RODRIGUES, L. M.; RIJO, P. Screening the dermatological potential of *plectranthus* species components: antioxidant and inhibitory capacities over elastase, collagenase and tyrosinase. *Journal of Enzyme Inhibition and Med Chem*, 36:1, 257-269. 2020.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B. B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Avaliação da bioatividade frente à *lixívia* de *Artemia salina* de plantas medicinais utilizadas na medicina popular nordestina. *Braz. J. Biol.* 2012; 72, 505-509. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000300013>.

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.

ÁVILA, F. N.; PINTO, F. C. L.; SOUSA, S. T.; TORRES, M. C. M.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ROCHA, D. D.; VASCONCELOS, M. A.; CARDOSO-SÁ, N.; TEIXEIRA, E. H.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Miscellaneous diterpenes from the aerial parts of *Plectranthus ornatus* Codd. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 6, p. 1014–1022, 2017.

BALDIN, E. L.; CROTTI, A. E. M.; WAKABAYASHI, K. A. L.; SILVA, J. P. G. F.; AGUIAR, G. P.; SOUZA, E. F.; VENEZIANI, R. C. S.; GROppo, M. Óleos essenciais derivados de plantas afetando o assentamento e oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B em tomate. *J Pest Sci.* 2013; 86, 301–308. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0462-x>.

BANDEIRA, J. M.; BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. M. P.; RODRIGUES, I. C. S.; BACARIN, M. A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. *Revista Brasileira de Plantas Med.* 2011; 13, 157-164. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000200006>.

BARBOSA, L. C. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Ed. UFV, Viçosa. 2007.

BARROS, L.; CABRITA, L.; BOAS, M. V.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C.F.R. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry* 127. 2011, 1600–1608.

BENARIBA, N.; DJAZIRI, R.; HUPKENS, E.; LOUCHAMI, K.; MALAISSE, W. J.; SENER, A.. Insulinotropic action of *Citrullus colocynthis* seed extracts in rat pancreatic islets. *Mol Med Rep.* 2013.

BERLICNK, R.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do brasil do século XXI. *Quím. Nova*, vol.40, nº6 . São Paulo, Julho de 2017.

BOCARDI, J. M. B. Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* schltr. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná. 2008.

BORGES G. A.; Ferreira, J. F.; ELIAS, S. T.; GUERRA, E. N.; SILVEIRA, D.; SIMEONI, L. A. Cytotoxic effect of *Plectranthus neochilus* extracts in head and neck carcinoma cell lines. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 10(10), 15. 2016, 157-163.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2016. <http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2016/06/uso-deplantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161> acesso em 05/03/2020.

BRITO, E; GOMES, E.; FALÉ, P.L.; BORGES, C.; PACHECO, R.; TEIXEIRA, V.; MACHUQUEIRO, M.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M.L.M. Bioactivities of decoctions from *Plectranthus* species related to their traditional use on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. *Journal of Ethnopharmacology.* 28, 147-154. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.006>.

BURMISTROVA, O.; PERDOMO, J.; SIMÕES, F.; RIJO, P.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F. The abientane diterpenoid Parvifloron D from *Plectranthus ecklonii* is a potent apoptotic inducer in human leukemia cells. *Phytomedicine*, 2015.

CAIXETA, S.C.; MAGALHÃES, L.G.; DE MELO, N.I.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G.P.; AGUIAR, D.P.; MANTOVANI, A.L.L.; ALVES, J.M.; OLIVEIRA, P.F.; TAVARES, D.C. Chemical composition and in vitro schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in Southeast Brazil. *Chem. Biodivers.* ;8:2149–2157, 2011.

COELHO, M. F. B.; ARRUDA, R.; PEREIRA, E. D.; BOMFIM, A. B.; GERMANO, E. B. Propagação de *Plectranthus neochilus* . Schlechter. *Journal of Global Biosciences.* 2014; 3, 494-498, 2014.

CORREA, J.C.; SCHEFFER, M.C.; MING, L.C. Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. In, Ministério do Desenvolvimento Agrário, Brasília. 2006.

COSTA, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 2, p. 81-88, out. 2006.

CRETTON, S.; SARAUX, N.; MONTEILLIER, A.; RIGHI, D.; MARCOURT, L.; GENTA-JOUVE, G.; WOLFENDERA, J.; CUENDETA, M.; CHRISTEN, P. Anti-inflammatory and antiproliferative diterpenoids from *Plectranthus scutellarioides*. *Phytochemistry* 154,39–4. 2018.

CREVELIN, E. J.; CAIXETA, S. C.; DIAS, H. J.; GROppo, M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A.E.M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* contra bactérias cariogênicas. *Medicina Alternativa e Complementar Baseada em Evidências*. 2015, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102317>.

DE ARAUJO RODRIGUES, P. et al Gastroprotective effect of barbatusin and 3-betahydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. *J. Ethnopharmacol.* 127, 725–730 (2010).

DEWICK, P. M.. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd: England, 507 p., 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.

EL-SAKHAWY, F. S.; KASSEM, H. A.; EL-GAYED, S. H.; MOSTAFA, M. M. Headspace solid phase microextraction analysis of volatile compounds of the aerial parts and flowers of *Plectranthus neochilus* Schltr. and *Salvia farinacea* Benth. *Journal of essential oil bearing plants*. v. 21, n. 3, p. 674–686, 2018.

FANELA, T.L.; BALDIN, E.L.; PANNUTI L.E., CRUZ PL, CROTTI, A.E.; TAKEARA, R.; KATO, M.J. Atividades letais e inibitórias de óleos essenciais derivados de plantas contra *Bemisia tabaci gennadius* (Hemiptera: aleyrodidae) biótipo B em tomate. *Neotrop. Entomol.* 2016; 45, 201-210 DOI 10.1007 / s13744-015-0356-8.

GALBIATTI, M. I. Estudo da anatomia, morfologia e perfil químico do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas. 2019.

GARCIA, C.; TEODÓSIO, C.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C.; DÍAZ-LANZA, A.; REIS, C.; DUARTE, N.; RIJO, P. Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities.; 24: 4207- 4236, 2018a.

GARCIA, C.; SILVA, C. O.; MONTEIRO, C. M.; NICOLAI, M.; VIANA, A.; ANDRADE, J. M.; BARASOAIN, I.; STANKOVIC, T.; QUINTANA, J.; HERNÁNDEZ, I.; GONZÁLEZ, I.; ESTÉVEZ, F.; DÍAZ-LANZA, A. M.; REIS, C. P.; AFONSO, C. A. M.; PESIC, M.; RIJO, P. Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction. *Future medicinal chemistry* vol. 10, no. 10. 2018b.

GARCIA, C.; NTUNGWE, E.; REBELO, A.; BESSA, C.; STANKOVIC, T. DINIC, J.; DÍAZ-LANZA, A., REIS, C. P.; ROBERTO, A; PEREIRA, P.; CEBOLA, M.-J.; SARAIVA, L.; PESIC, M.; DUARTE, N.; RIJO, P. Parvifloron D from *Plectranthus strigosus*: Cytotoxicity Screening of *Plectranthus* spp. Extracts. *Biomolecules* 9, 616. 2019.

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

HANSON, J. R. Diterpenoids. *Natural Product Reports*, 24, 1332, 2009.

HAMADOU, M.; DAOUDOU, B.; MARTIN- PAUL, B.; MOHAMADOU, S.; ROGER, D. D. Inhibitory Effect of Methanolic and Methanolic-Aqueous Mixture Extract of Leaves of *Plectranthus neochilus* Schltr (Lamiaceae) and *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae) on Two Strains of Enterobacteria Producing Beta-lactamases. *Journal of Advances in Microbiology*, 20(7), 11-20. 2020.

ITO, T.; RAKAINSA, S.; NISA, K; MORITA, H. Three new abietane-type diterpenoids from the leaves of Indonesian *Plectranthus scutellarioides*. *Fitoterapia* 127 146–150. 2018.

KAPEWANGOLO P.; MEYER D. *Plectranthus barbatus*; Antioxidante e outras respostas inibitórias contra o HIV / AIDS. In: HIV / AIDS Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. EUA, 2018 páginas 149-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809853-0.00013-4>.

KUBÍNOVÁ, R.; GAZDOVÁ, M.; HANÁKOVÁ, Z.; JURKANINOVÁ, S.; DALL'ACQUA, S.; CVAČKA, J.; HUMPA, O. Novos diterpenóides glicosídeo e flavonóides de *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. Volume 120, páginas 286-290. 2019.

KUMAR, P.; SANGAM; KUMAR, N. *Plectranthus amboinicus*: A review on its pharmacological and pharmacognostical studies. A. J. Physiol Biochem Pharmacol, Vol 10. 2020.

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.

LADEIRAS, D.; MONTEIRO, C. M.; PEREIRA, F.; REIS, P.; AFONSO, C. A. M.; RIJO, P. Reactivity of diterpenoid quinones: royleanones. Curr. Pharmaceut. Des. 22, 1682–1714. 2016. doi:10.2174/1381612822666151211094521.

LAWAL, O.A.; HUTCHINGS, A.H.; OYEDEJI, O. Chemical composition of the leaf oil of *Plectranthus neochilus*Schltr. J. Essent. Oil Res. ;22:546–547, 2010.

LEE, J. H.; KOO, T. H.; HWANG, B. Y.; LEE, J. J. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kB by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kB target genes. The J. Biolog. Chem. Vol.277, n. 21, p. 18411-18420, Mar. 2002 .

LIANDA, R. L. P.; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. Química nova. vol.31 no 6, 1472-1475. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum. 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUCKHOBA, 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.

MATIAS, D.; NICOLAI, M.; FERNANDES, A. S.; SARAIVA, N.; ALMEIDA, J.; SARAIVA, L.; FAUSTINO, C.; DÍAZ-LANZA, A. M.; REIS, C.; REIS, P.; RIJO, P. Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Biomolecules* 8;9(5):179. 2019.

MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Editora UFC, Fortaleza, p.126, 1997.

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.

MITRA, M.; GANTAIT, S.; MANDAL, N. *Coleus forskohlii*: advancements and prospects of in vitro biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104:2359–2371.2020.

MÉNDEZ, S.; RIFÁ T.J. Dos especies de *Plectranthus* (Lamiaceae) de reciente introducción en Cuba. *Bouteloua* 26: 92 - 96. 2016.

MOTA, L.; FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G.; MIGUEL M. G.; FALEIRO, M. L.; ASCENSÃO L. Volatile-oils composition, and bioactivity of the essential oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* grown in Portugal. *Chem. Biodivers.* ;11:719–732, 2014.

MOTHANA, R. A.; KHALED, J. M.; EL-GAMAL, A. A.; NOMAN, O. M.; KUMAR, A.; ALAJMI, M. F.; AL-REHAILY, A. J.; AL-SAID, M. S.. Comparative evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of the crude extracts of three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal* 27.; 162–170, 2019.

MOSTAFA, M. M.; EL-SAKHAWY, F. S.; KASSEM, H. A.; EL-GAYED, H. Phytochemical and Biological Study of *Plectranthus neochilus* Schltr. and *Salvia farinacea* Benth. (Family Lamiaceae) Cultivated in Egypt. 2019. <http://erepository.cu.edu.eg/index.php/cutheses/article/view/8141>, acesso em 20 de maio de 2020.

MUNIYANDI, K.; GEORG, E; MUDILI, V; KALAGATUR, N. K.; ANTHUVAN, A. J.; KRISHNA, K.; THANGARAJ, P; NATARAJAN, G. Antioxidant and anticancer activities of *Plectranthus stocksii* Hook. f. leaf and stem extracts. *Agriculture and Natural Resources* 51.; 63e73, 2017.

MURUGAN, K.; KALIMUTHU, K.; KUMAR, P. M.; HWANG, J.-S.; NICOLETTI, M. Larval and pupal toxicity effects of *Plectranthus amboinicus*, *Bacillus sphaericus* and predatory copepods for the control of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Phytoparasitica* 41:307–316 DOI 10.1007/s12600-013-0291-3. 2013.

NAPAGODA, M. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. *J. Ethnopharmacol.* 151, 800–809. (2014).

NTUNGWE, E.; MARÇALO, J.; GARCIA, C.; REIS, C; TEODÓSIO, C.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C.; ROBERTO, A.; RIJO, P. Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Biomed Biopharm Res.* 14 (1).; 95-108, 2017.

OKAMOTO, H.; TANANKA, K.; HASEGAWA, J. Chrysanthemum and other plant extracts as NF-kB 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, Phamacology and Phytochemistry of *Plectranthus* (Lamiaceae). *Salasar*, vol. 17, cap. 18, Jul. 2006a.

OLIVEIRA, P. M. Estudo químico e farmacológico de *Plectranthus ornatus* CODD (Lamiaceae). Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais. 2006b

OLIVEIRA, P. S.; MULLER, R. C. S.; DANTAS, K. G. F.; ALVES, C. N. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona Fasciculata*, *M. Flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis Mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. Química Nova, Vol. 35, No. 9, 1728-1732, 2012.

PELLEGRINI, N. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.

PEREIRA, M.; MATIAS, D.; PEREIRA, F.; REIS, C.; SIMÕES, M. F.; RIJO, P. Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. Biomed Biopharm Res.; (12) 1: , 127-138. 2015.

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.

RAMBORGER, B.P.; GOULARTE, C.A.O.; RODRIGUES D.T.; GAYER M.C.; CARRIÇO, M.R.S.; BIANCHINI, C.M., PUNTEL, R.L.; DENARDIN, E.L.G.; ROEHRS, R. O potencial de fitorremediação de *Plectranthus neochilus* sobre o ácido 2,4-diclorofenoxiacético e o papel da capacidade antioxidante na tolerância ao herbicida. Chemosphere. 2017; 188, 231-240.

RAMBORGER, B.P.; GOMES, M. E.; DENARDIN, E.L.G.; SOARES, J. J.; ROEHRS, R. A review of anatomical, physiological, biological characteristics and uses of *Plectranthus neochilus*. Universidade Federal de Santa Maria. Cien. e Nat., Santa Maria v.42, Special Edition: 40 anos, e12. 2020.

RÊGO, M. S. A.; SILVA, V. C. L.; MAIA, C. S.; TEIXEIRA, M. N.; MARINHO, M. L.; LIMA, E. R. Avaliação da segurança do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Plectranthus neochilus* Schlechter, Lamiaceae e entrecascas de *Cnidocolus quercifolius*

Pohl, Eupharbiaceae em roedores. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, Recife, v.12, n.2 (abr-jun), p.82-92, 2018.

RICE, L.J.; BRITS, G.J.; POTGIETER, C.J.; VAN, STADEN J.. *Plectranthus* : uma planta para o futuro? *South African Journal of Botany*. 2011; 77, 947-959. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.07.001>.

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.

RIJO, P. Phytochemical study and biological activities of diterpenes and derivatives from *Plectranthus* species. PhD Thesis. University of Lisbon, Faculty of Pharmacy. 2011.

RIJO, P., BATISTA, M., MATOS, M., ROCHA, H., JESUS, S., SIMÕES, M. F. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp. Extracts. *Biomed Biopharm Res.*, 9(2): 225-235, 2012.

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.

ROSAL, L.F., PINTO, J.E.B.P., BERTOLUCCI, S.K.V., BRANT R.S., NOCULAU E.S., ALVES B.P.. Efeito de fontes de fertilizantes orgânicos na produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter. *Rev. Ceres (Impr.)*. 2011; 58, 670-678. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000500020>.

RUEDI, P.; SCHMID, J. M.; PREWO, R.; BIERI, J. H.; EUGSTER, C. H. Spirocoleone: Synthese und Charakterisierung von vier diastereomeren Spiro (methylcyclopropan)-Substrukturen; Revision der Konfiguration an C (12) und C(15) von Coleon P und Derivaten sowie von Coleon-Z-Derivaten; Röntgenstrukturanalysen von Lanugon J und weiteren Spirocoleonen. *Helvetica chimica acta* - Vol. 66, Fasc.2 - Nr. 37.1983.

SALEEM, A. M.; DHASAN, P. B.; RAFIULLAH, M. R. M. Simple and rapid method for the isolation of forskolin from *Coleus forskohlii* by charcoal column chromatography. *Journal of chromatography A*, 1101. 2006, 313-314.

SANTOS VERÍSSIMO, R. C.; LINS, T.H.; BASTOS, M. L.; SARMENTO, P. A.; ARAUJO, V. A.; ARAUJO, M. G. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Antimicrobial activity of *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae). Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC) Florianópolis, Brasil. 2014.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC. cap.27, p.597-619, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Ed. 6; Porto Alegre/Florianópolis; UFRGS/Ed. da UFSC, p. 387-415, 2007.

SIMÕES, M. F.; RIJO, P.; DUARTE, A.; BARBOSA, D.; MATIAS, D.; DELGADO, J.; CIRILO, N.; RODRÍGUEZ, B. Two new diterpenoids from *Plectranthus* species. *Volume 3, Issue 4*, 17, Pages 221-225. 2010.

SITAREK, P.; TOMA, M.; NTUNGWE, E.; KOWALCZYK, T.; SKAŁA, E.; WIECZFINSKA, J.; ŚLIWIŃSKI, T.; RIJO, P. Insight the Biological Activities of Selected Abietane Diterpenes Isolated from *Plectranthus* spp.. *Biomolecules* 2020, 10, 194.

SOCHOR, J.; DOBES J. ; KRYSTOFOVA, O.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; BABULA, P.; POHANKA, M.; JURIKOVA, T.; ZITKA, O.; ADAM, V.; KLEJDUS, B.; KIZEK, R. Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8, 8464 – 8489, 2013.

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.

STILL, W.C.; Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separation with Moderate Resolution, *Journal Organic Chemistry*, 43, 292-309, 1978.

SWAMY, M. K.; ARUMUGAM, G.; KAUR, R.; GHASEMZADEH, A.; YUSOFF, M. M.; SINNIAH, U. R. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2017, Article ID 1517683, 10 pages. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1517683>.

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.

TORRES, A. B. S. Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 2014.

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.

UAWONGGUL, N., CHAVEERACH, A.; THAMMASIRIRAK, S.; ARKARAVICHIEEN, 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.

VIANA, A. J. S. Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 2011.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova* 28: 85-94, 2005.

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.

WANKE, M., SKORUPINSKA-TUDEK, K., SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate(DOXP/MEP) pathway, *Acta Biochim. Pol.*48, 663-672. 2001.

ZHENG, Y.; WU, M.; XU, Y.; PENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Q.; DU, J.; ZHANG, H.; FU, L. Electrochemical Determination of Antioxidant Activity of Different Bee Products. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 14. 2019, 3663 – 3672.