

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

# CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE Hyptis carvalhoi Harley

KARISIA SOUSA BARROS DE LIMA

FORTALEZA –CE

2010

#### KARISIA SOUSA BARROS DE LIMA

# CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE Hyptis carvalhoi Harley

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial, para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira

FORTALEZA –CE 2010

#### KARISIA SOUSA BARROS DE LIMA

# CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE Hyptis carvalhoi Harley

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, Área de Concentração Química Orgânica.

Karísia Sousa Barros de Lima Karísia Sousa Barros de Lima

#### DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 16/07/2010

**EXAMINADORES:** 

Fullwork. Jo Weine Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Jair Mafezoli

Universidade Federal do Ceará - UFC

-que

Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Á Deus e a minha família

#### AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que ele tem proporcionado em minha vida.

Aos meus Pais, Miguel Romelio Barros de Lima e Maria Nomésia Sousa de Lima e minha tia-mãe, Rosa Lopes de Souza, pela dedicação, pelo apoio, pela atenção, pelo carinho e principalmente pelos ensinamentos sempre coerentes e indispensáveis a minha vida.

Ao meu noivo e futuro marido, Welton de Souza Silva, pelo seu companheirismo, carinho, atenção e pelo seu auxílio em todos os momentos de confecção deste trabalho.

Aos meus irmãos, Fabricio Sousa Barros de Lima e Michel Sousa Barros de Lima, que mesmo distantes puderam contribuir com a motivação e o apoio.

Ao meu orientador, Prof. Edilberto Rocha Silveira, pela acolhida, dedicação, amizade, atenção e conhecimento transmitido para o desenvolvimento deste trabalho e principalmente, por todas as críticas e sugestões que foram essenciais para o meu crescimento e aprimoramento desta dissertação.

À minha co-orientadora, Profa. Mary Anne Souza Lima, pelo grande incentivo, colaboração, orientação e também por toda dedicação e amizade.

À botânica Profa. Maria Lenise Silva Guedes, do Instituto de Biologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal da Bahia, pela identificação botânica da espécie estudada.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os meus colegas de bancada do LAFIPLAM I e II, pelo apoio constante e convivência sempre alegre e divertida.

Aos meus amigos de sempre, Thiciana da Silva Souza, Vanessa Araújo de Queiroz, Mariano George, Luciana Medeiros Bertini, Leonardo Alcântara e Ayla Márcia, por tudo que vocês representam na minha vida, pelos incentivos e momentos de descontração.

À minha mais nova amiga e companheira de mestrado Patrícia Coelho do Nascimento, por todos os momentos que passamos juntas, apoiando e incentivando uma a outra.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massa e Infravermelho, pela contribuição e comprometimento com a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento, principalmente a Raimunda, a Lana, ao Sr. Paulo, a Célia e o Orlando pelos serviços prestados.

Ao CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP, PRONEX, pelo apoio financeiro. A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

#### **RESUMO**

Este trabalho relata o estudo fitoquímico dos constituintes voláteis das folhas e inflorescências de *Hyptis carvalhoi* Harley (Lamiaceae), como também dos constituintes químicos não-voláteis da parte aérea. Os constituintes voláteis foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG/EM, permitindo a identificação de nove constituintes químicos, dos quais os componentes majoritários foram identificados como sendo o globulol (47,45%) e o  $\beta$ -cariofileno (18,75%). A análise fitoquímica do extrato etanólico da parte aérea resultou no isolamento de seis metabólitos secundários, todos pertencentes à classe dos diterpenos abietanos: rosmanol,  $7\alpha$ -etoxirosmanol,  $7\alpha$ metoxirosmanol,  $7\beta$ -metoxirosmanol, galdosol e epiisorosmanol. Os constituintes nãovoláteis isolados foram submetidos a testes de citotoxicidade *in vitro*, em que nenhum dos diterpenos apresentou atividade significativa, frente as linhagens de células estudadas. A determinação estrutural dos constituintes não-voláteis foi realizada através de métodos espectrométricos EM, IV e RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, inclusive técnicas uni e bidimensionais (HMBC, HSQC, <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY e NOESY) e comparação com dados da literatura.

Palavras-chaves: diterpenos abietanos, Lamiaceae, Hyptis carvahoi

#### ABSTRACT

This work reports the phytochemical study of the volatile constituents from leaves and flowers of *Hyptis carvalhoi* Harley (Lamiaceae), as well of the non-volatile constituents from shoot. The volatile constituents were obtained by hidrodistillation while GC/MS was used for identification. Nine constituents were obtained, which globulol (47,45%) and  $\beta$ -caryophyllene (18,75%) were the major components. The phytochemical analysis of the ethanol extract from shoot, resulted to the isolation and characterization of the six secondary metabolites belonging to the class of the abietane diterpenes: rosmanol,  $7\alpha$ -ethoxyrosmanol,  $7\alpha$ -methoxyrosmanol,  $7\beta$ -methoxyrosmanol, epiisorosmanol and galdosol. The non-volatile constituents isolated were subjected to *in vitro* cytotoxicity assays, which diterpenes no showing significant activity. The structure determination of all non-volatile constituents was performed by mean of spectroscopic such as MS, IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, including uni and bidimensional pulse sequences (NOESY, COSY, HSQC and HMBC) and comparison with the data described in the literature.

#### LISTA DE FIGURAS

1	Prancha revelando as características botânicas da família Lamiaceae	3
2	Fotos de Hyptis carvalhoi Harley	6
3	Cromatograma do óleo essencial das folhas e inflorescências de H. carvalhoi	40
4	Espectro de massa do p-cimeno	41
5	Espectro de massa do limoneno	41
6	Espectro de massa do $\gamma$ -terpineno	41
7	Espectro de massa do linalol	41
8	Espectro de massa do $\beta$ -cariofileno	42
9	Espectro de massa do $\alpha$ -humuleno	42
10	Espectro de massa do biciclogermacreno	42
11	Espectro de massa do óxido de cariofileno	42
12	Espectro de massa do globulol	43
13	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no RMN COSY de HC-P4	45
14	Possíveis estruturas para HC-P4	46
15	Sub-estruturas mostrando correlações observadas no RMN HMBC para HC-P4	46
16	Espectro de absorção na região do infravermelho de HC-P4	49
17	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	49
18	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	50
19	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4 - expansão	50
20	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	51
21	Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	51
22	Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	52
23	Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	52
24	Espectro de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4	53
25	Espectro de massa de baixa resolução de HC-P4	53
26	Espectro de massa de alta resolução de HC-P4	54
27	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P1	56
28	Sub-estruturas I, II e III de HC-P1, mostrando as correlações de acordo com o espectro de	
	HMBC	57
29	Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P1	60
30	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	60
31	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	61

32	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	61
33	Espectro de Massa de Baixa Resolução de HC-P1	62
34	Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	62
35	Espectro de HSQC – expansão (5030 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	63
36	Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	63
37	Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	64
38	Espectro de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1	64
39	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P2	66
40	Sub-estruturas de HC-P2, mostrando as correlações de acordo com o espectro de RMN	
	HMBC	67
41	Sub-estruturas de HC-P2, mostrando a correlação de acordo com o espectro de RMN	
	NOESY	67
42	Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P2	70
43	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	70
44	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	71
45	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	71
46	Espectro de Massa de Baixa Resolução de HC-P2	72
47	Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	72
48	Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	73
49	Espectro de 2D, <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, COSY de HC-P2	73
50	Espectro de 2D, <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, NOESY de HC-P2	74
51	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P5	76
52	Sub-estruturas de HC-P5, mostrando as correlações de acordo com o espectro de HMBC	77
53 54	Sub-estruturas de HC-P5, mostrando as correlações de NOESY Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P5	78 80
55	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	80
56	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	81
57	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT 135° (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	81
58	Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	82
59	Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	82
60	Espectro de 1H, 1H, COSY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	83
61	Espectro de 1H, 1H, NOESY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5	83
62	Espectro de massa de baixa resolução de HC-P5	84

63	Espectro de massa de alta resolução de HC-P5	84
64	Acoplamento a longa distância (HMBC) de HC-P3	86
65	Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P3	89
66	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P3	89
67	Espectro de RMN <sup>1</sup> H - expansão (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P3	90
68	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P3	90
69	Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )de HC-P3	91
70	Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )de HC-P3	91
71	Espectro de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, COSY de HC-P3	92
72	Espectro de massa de alta resolução de HC-P3	92
73	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P6	94
74	Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no HMBC de HC-P6	95
75	Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P6	97
76	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	97
77	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	98
78	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	98
79	Espectro de HSQC (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	99
80	Espectro de HMBC (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	99
81	Espectro de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6	100
82	Espectro de massa de baixa resolução de HC-P6	100
83	Espectro de massa de baixa resolução - expansão de HC-P6	101
84	Cromatograma de HC-P1, HC-P2 e HC-P3	113
85	Cromatograma de HC-P4 e HC85-P5	116
86	MTT é reduzido a formazan por enzimas mitocondriais	119

## LISTA DE QUADROS

1	Formação do pirofosfato de geranilgeranila	7
2	Biogênese de diterpenos abietanos tricíclicos	10

#### LISTA DE FLUXOGRAMA

1	Método de extração do óleo essencial das folhas e inflorescências de H. carvalhoi	
	Harley	108
2	Obtenção dos extratos hexânicos e etanólicos da parte aérea de Hyptis carvalhoi	
	Harley	109
3	Fracionamento de HCFIE-HC-(6-18)	114
4	Fracionamento de HCFIE-HC-(25-27)	117

#### LISTA DE TABELAS

1	Metabólitos secundários não-voláteis isolados de espécies do gênero Hyptis publicados na	
	literatura de 1900 a 2009	13
2	Constituintes do óleo essencial das folhas e inflorescências de Hyptis carvalhoi Harley	40
3	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de HC-P4 por padrão de	
	hidrogenação	45
4	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P4, comparados com os valores	
	da literatura (AMARO-LUIS, 1997) de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (400/100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para o	
	diterpeno abietano rosmanol	48
5	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de HC-P1 por padrão de	
	hidrogenação	56
6	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P1, comparados com os valores da	
	literatura (ARISAWA, 1987; GONZÁLEZ, 1989) para o diterpeno abietano 7a-	
	etoxirosmanol	59
7	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de HC-P2 por padrão de	
	hidrogenação	66
8	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2, comparados com os valores da	
	literatura de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do diterpeno 7-metoxirosmanol	
	(TAKENAKA, 1997)	69
9	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CDC <sub>13</sub> , 500 MHz) de HC-P5 por padrão de	
	hidrogenação	76
10	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P5, comparados com os valores de	
	RMN ${}^{1}$ H e ${}^{13}$ C (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P2	79
11	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de HC-P3 por padrão de	
	hidrogenação	86
12	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de HC-P3, comparados com os valores da	
	literatura de RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do diterpeno galdosol	88
13	Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de HC-P6 por padrão de	
	hidrogenação	94
14	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de HC-P6, comparados com os valores	
	da literatura de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para o diterpeno abietano epiisorosmanol	96

15	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens	
	tumorais HCT-8 (cólon-humano), MDAMB-435 (mama-humano) e SF-295 (glioblastoma	
	– humana) testadas na dose única de 5 $\mu$ g/mL. Valores são média <u>+</u> DPM	102
16	Valores da $IC_{50}$ em $\mu g/mL$ das substâncias avaliadas pelo método do MTT nas linhagens	
	de HL-60, SF-295, MDAMB-435 e HCT-8 com incubação de 72hs. Maior concentração	
	testada: 5 μg/mL	103
17	Dados da extração do óleo essencial de H. carvalhoi Harley	108
18	Coluna cromatográfica de HCFIE-HC	111
19	Coluna cromatográfica de HCFIE-HC-(6-18)	112
20	- Coluna cromatográfica de HCFIE-HC-(6-18)-(14-35)	112
21	Coluna cromatográfica de HCFIE-HC-(25-27)	115

# LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

a	Δlfa
ß	Beta
P CCD	Cromatografia em camada delgada
0.02	Cromatografia gasosa aconlada a
CG/EM	
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
CPD	Composite pulse decoupling
ПЕРТ	Distortionless enhancement by
CCD CG/EM CLAE COSY CPD DEPT EM FM HCFIE HCFIE HMBC HSQC IDH IV OEFIHC	polarization transfer
EM	Espectrometria de massa
FM	Fórmula molecular
	Extrato etanólico das folhas e
HCFIE	inflorescências de Hyptis carvalhoi
	Extrato hexânico das folhas e
НСГІН	inflorescências de Hyptis carvalhoi
НСГІН НМВС	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
IV	Infravermelho
OFFILIC	Óleo essencial das folhas e inflorescêcnias
OEFIHC	de Hyptis carvalhoi
DI (1) 13 C	Ressonância magnética nuclear de
RMN <sup>10</sup> C	carbono -13
RMN <sup>13</sup> C carbon RMN <sup>1</sup> H Ressonância mag	Ressonância magnética nuclear de
KMN H	hidrogênio

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS
2.1	Considerações botânicas sobre a família Lamiaceae
2.2	Considerações gerais sobre o gênero Hyptis Jacquin
3	CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS SOBRE DITERPENOS
3.1	Considerações sobre diterpenos abietanos
4	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO
4.1	Levantamento bibliográfico sobre constituintes não-voláteis de espécies do gênero
	Hyptis
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1	Identificação dos constituintes químicos voláteis de Hyptis carvalhoi Harley
5.2	Determinação estrutural dos constituintes fixos de Hyptis carvalhoi Harley
5.2.1	Determinação estrutural do rosmanol (HC-P4)
5.2.2	Determinação estrutural do 7α-etoxirosmanol (HC-P1)
5.2.3	Determinação estrutural do 7α-metoxirosmanol (HC-P2)
5.2.4	Determinação estrutural do $7\beta$ -metoxirosmanol (HC-P5)
5.2.5	Determinação estrutural do galdosol (HC-P3)
5.2.6	Determinação estrutural d epiisorosmanol (HC-P6)
5.3	Avaliação do potencial citotóxico
5.3.1	Ensaio das amostras isoladas de H. carvalhoi Harley
5.3.2	Cálculo da IC <sub>50</sub> da amostra HC-P1
6	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS
6.1	Métodos cromatográficos
6.1.1	Cromatografia de adsorção
6.1.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
6.2	Métodos espectroscópicos e espectrométricos
6.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)
6.2.2	Espectrometria de massa (EM)
6.2.3	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup> C)
6.3	Outras determinações

6.3.1	Ponto de fusão	1
6.3.2	Rotação óptica	1
6.4	Material vegetal	1
6.4.1	Hyptis carvalhoi Harley	1
6.5	Estudo dos constituintes voláteis de Hyptis carvalhoi Harley	1
6.5.1	Obtenção do óleo essencial	1
6.6	Isolamento dos constituintes não-voláteis de Hyptis carvalhoi Harley	1
6.6.1	Obtenção dos extratos hexânico (HCFIH) e etanólico (HCFIE) da parte aérea de <i>H</i> . <i>carvalhoi</i> Harley	1
6.6.2	Tratamento e fracionamento cromatográfico do extrato etanólico (HCFIE)	1
6.6.3	Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC	1
6.6.4	Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC-(6-18)	1
6.6.4.1	CLAE de HCFIE-HC-(6-18)-(14-35)-(25-52) – Isolamento de HC-P1, HC-P2 e HC-P3	1
6.6.5	Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC-(25-27)	1
6.6.5.1	CLAE de HCFIE-HC-(25-27)-(21-36) – Isolamento de HC-P4 e HC-P5	1
6.6.6	Recristalização de HCFIE-HC-(19-24) e (28-36)	1
6.7	Atividade de citotoxicidade in vitro	1
6.7.1	Material biológico	1
6.7.2	Método da avaliação do potencial citotóxico das substâncias isoladas de Hyptis	
	carvalhoi Harley	1
6.7.3	Análise estatística	1
7	CONCLUSÃO	1
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	1



#### Introdução

#### 1. INTRODUÇAO

Lamiaceae é uma vasta família com cerca de 300 gêneros e 7500 espécies, de distribuição cosmopolita, mas centrada, principalmente, na região mediterrânea, onde constitui parte integrante da vegetação (SOUZA e LORENZI, 2008). Muitas espécies de diferentes gêneros da família Lamiaceae são importantes para extração de óleos essenciais (*Mentha, Lavandula, Marrubium, Nepeta, Ocimum, Origanum, Rosmarinus, Salvia, Satureja, Thymus, Hyptis* etc.), tanto para uso cosmético, como condimentar, aromático e/ou medicinal. Há também o uso caseiro de várias espécies, tanto para chás, condimentos e uso medicinal com as mais diversas propriedades (FALCÃO e MENEZES, 2003). Além disso, as espécies desta família são relativamente bem estudadas do ponto de vista químico, onde os compostos terpenoídicos aparecem como componentes principais, destacando-se os diterpenos, principalmente com esqueletos do tipo labdânico (1) e abietânico (2) (ALVARENGA *et al.,* 2001).



O gênero *Hyptis* é composto por aproximadamente 580 espécies e muitas destas possuem grande importância econômica e etnofarmacológica, pois são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que conferem aos alimentos (MENEZES, 1994) e utilizadas para diversos fins medicinais, não só no Brasil (BARBOSA e RAMOS, 1992), mas também no México (KUHNT, RIMPLER e HEINRICH, 1994; NOVELO *et al*, 1993; PEREDA-MIRANDA e DELGADO, 1990; PEREDA-MIRANDA e GASCON-FIGUEROA, 1988), Índia (MISRA *et al*, 1981; MUKHERJEE, K., MUKHERJEE, R. e GHOSH, 1984), China (LEE *et al*, 1988), Tailândia (ALMTORP, HAZELL e TORSSELL, 1991) Caribe (PORTER *et al*, 1995), Panamá (GUPTA *et al*, 1996), Norte da Nigéria e em outras localidades da África (AYCARD *et al*, 1993).

Dentre as espécies do gênero com propriedades medicinais destacam-se *H. suaveolens*, com propriedades antisépticas comprovadas; *H. capitata*, usada contra resfriados, febre e asma; *H. verticillata* com propriedades anti-infecciosas, antihelmíntica e expectorante; *H.* 

2

*pectinata* com propriedades antibacteriana e anti-micótica; *H. mutabilis* usada contra desordens gastrointestinais e malária e *H. albida* com propriedades anti-sépticas (FALCÃO e MENEZES, 2003). Além de serem utilizadas na medicina tradicional, as plantas do gênero também apresentam inúmeras atividades biológicas comprovadas como, antifúngica (De OLIVEIRA *et al*, 2004); antiulcerogênica (BARBOSA e RAMOS, 1992); antibacteriana (SOUZA *et al*, 2003); antidepressiva (BUENO *et al*, 2006) e ainda atividade larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti* (COSTA *et al.*, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com o conhecimento químico do gênero *Hyptis*, através do estudo químico inédito de *Hyptis carvalhoi* Harley, em que possibilitou o isolamento e caracterização estrutural de seis diterpenos abietanos da parte aérea e a análise dos constituintes voláteis presentes nas folhas e inflorescências da espécie estudada.

O capítulo 2 apresenta algumas considerações botânicas sobre a Família Lamiaceae e o gênero *Hyptis*.

A quantidade de diterpenos do tipo abietano encontrados em *H. carvalhoi* Harley motivou a conhecer melhor este tipo de esqueleto, analisando algumas considerações biogenéticas, capítulo 3.

No capítulo 4 encontra-se um levantamento bibliográfico de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Hyptis*.

A determinação estrutural dos constituintes químicos fixos e a identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial de *H. carvalhoi* Harley encontram-se descritos no capítulo 5.

No capítulo 6 aborda-se o procedimento experimental, no qual estão descritos os dados de coleta do material, técnicas utilizadas, especificações de equipamentos e procedimentos para obtenção do óleo essencial e dos componentes fixos.

Este trabalho encerra-se com uma conclusão no capítulo 7 e no capítulo 8 as referências bibliográficas.

A produção deste trabalho e apresentação final da redação foi baseada segundo as normas para apresentação de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará, realizadas em de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (MELO, 2007).



#### 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

#### 2.1 Considerações botânicas sobre a família Lamiaceae

Lamiaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil ocorrem 28 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008). De acordo com Souza e Lorenzi (2008), a família Lamiaceae é constituída por:

"Ervas ou arbustos, menos freqüentemente árvores, comumente aromáticos, com ramos geralmente quadrangulares. Folhas opostas ou menos freqüentemente verticiladas ou alternas (*Amasonia*), simples, raramente compostas (*Vitex*), sem estípulas, geralmente serreadas. Inflorescências geralmente cimosas, freqüentemente congestas; flores freqüentemente vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas; cálice pentâmero, gamossépalo, prefloração geralmente imbricada, em geral persistente na frutificação; corola pentâmera, gamopétala, geralmente bilabiada, prefloração imbricada; estames 2 ou 4, neste caso didínamos, epipétalos, anteras rimosas; ovário súpero, bicarpelar, bilocular ou tetralocular pelo desenvolvimento de um falso septo, geralmente profundamente 4-lobado e, neste caso, estilete geralmente ginobásico; óvulos 2 por carpelo. Fruto geralmente baga ou esquizocarpo." (Figura 1, abaixo)



Figura 1 – Prancha revelando as características botânicas da família Lamiaceae.

Dentre os gêneros cultivados no Brasil estão incluídas muitas ervas aromáticas, como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis*), o poejo (*Mentha officinalis*), a alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o orégano (*Origanum vulgare*), o boldobrasileiro (*Plectranthus barbatus*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o tomilho (*Thymus vulgaris*) e a hortelã (*Mentha* spp.). Nos cerrados e campos rupestres brasileiros são freqüentes espécies de *Eriope* e *Hyptis* (SOUZA e LORENZI, 2008).

A acumulação de óleos essenciais em algumas espécies da família Lamiaceae está associada com a presença de estruturas secretoras altamente especializadas, conhecidas como tricomas glandulares, presentes principalmente nas folhas e cálices (CAVALCANTI, 1997).

#### 2.2 Considerações gerais sobre o gênero Hyptis Jacquin

O gênero *Hyptis* é composto por cerca de 580 espécies exclusivamente neotropicais, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. Algumas espécies invasoras são bem estabelecidas na Ásia, África e norte da Austrália. O centro da diversidade do gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (BORDIGNON, 1990).

Conforme Epling (1949 apud Falcão, 2003), o gênero Hyptis apresenta:

"variabilidade na forma vegetativa e no hábito, no entanto, sua estrutura floral é extraordinariamente uniforme. A corola tem apresentado muito pouca modificação durante o decurso da evolução. O cálice é completamente uniforme, salvo o que diz respeito à forma e à distância relativa dos seus dentes, mas se diversifica nos frutos. Quase toda essa diversificação ocorre em função do desenvolvimento do tubo, que normalmente se alarga na parte inferior e resulta em formas modificadas; os dentes conservam quase a mesma forma, e a distância entre eles não varia, apenas aumenta de tamanho."





**(A)** 





**(C)** 

**(B)** 

**Figura 2** – Fotos de *Hyptis carvalhoi* Harley; (A) detalhe da planta em seu habitat natural; (B) detalhe para as folhas e inflorescências; (C) destaque para as inflorescências. Fotos: Prof. Edilberto Rocha Silve



#### **3 CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS SOBRE DITERPENOS**

#### 3.1 Considerações sobre diterpenos abietanos

Os diterpenos constituem um grande grupo de compostos e estes são formados pela condensação do pirofosfato de farnesila (FPP) a molécula do pirofosfato de isopentenila (IPP), dando origem ao pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) (Quadro 1, abaixo) (DEWICK, 2002). Muitos diterpenos conhecidos são compostos cíclicos, cuja biossíntese é feita a partir do precursor pirofosfato de geranilgeranila, um diterpeno de cadeia aberta, por reações de ciclização via íons carbônio. Eles são encontrados em plantas superiores, fungos, insetos e organismos marinhos (GEISSMAN, 1969).



QUADRO 1 - Formação do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) (DEWICK, 2002)

### Considerações Biogenéticas

As ciclizações mais comuns do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) (3) são iniciadas pelo ataque eletrofílico à ligação dupla terminal, acompanhado por controles estereoeletrônicos e um fechamento concertado do anel (GEISSMAN, 1969). A estereoquímica do produto é controlada pelo dobramento do substrato na superfície da enzima, formando o pirofosfato de copalila (4) ou o pirofosfato de labdadienila (5), dependendo da forma de dobramento da molécula de GGPP (DEWICK, 2002).



De acordo com Dewick, 2002, a partir do copalila PP formam-se os *ent*-kauranos (6), uma série de diterpenos denominada enantiomérica, mas a estereoquímica mais comum é a encontrada para o labdadienila PP (5).



A estereoquímica típica do pirofosfato de labdadienila, que é um intermediário na biossíntese de diterpenos tri e tetracíclicos, pode ser vista na estrutura do ácido abiético (11) (Quadro 2, p. 10), o componente majoritário da resina de pinheiros. Inicialmente o sistema tricíclico é formado pela perda do difosfato, levando a formação do carbocátion no terceiro

# Considerações Biogenéticas

anel do sistema. O cátion perde um próton para formar o sandaracopimaradieno (9) (Quadro 2, p. 10), um diterpeno com esqueleto pimarano (7).

Os diterpenos com esqueleto abietano (8) são formados a partir dos pimaranos pela migração do grupo metila localizado em C-13 para C-15, modificando a cadeia lateral e perde um próton para formar o abietadieno (10) (Quadro 2, p. 10). Os carbonos metílicos podem ser oxidados e a oxidação do anel C leva a um grande número de diterpenos abietanos aromáticos (TORSSEL, 1983).



Este grande grupo de diterpenos é dividido em seções que incluem ainda os *abeo-*abietanos (**I**, **II e III**), *seco-*abietanos (**IV**) e abietanos dímeros.



# Considerações Biogenéticas



QUADRO 2 - Biogênese de diterpenos abietanos tricíclicos (DEWICK, 2002).



# LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

11

#### 4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

## 4.1 Levantamento bibliográfico sobre constituintes não-voláteis de espécies do gênero Hyptis

O interesse fitoquímico, biológico e farmacológico das espécies ocorreu em 1952 quando a *Hyptis suaveolens*, precursora nos estudos do gênero, teve a composição química do óleo essencial estudada, pois este era utilizado para o tratamento de diversas infecções, (NAYAK e GUHA, 1952). A partir de então, o interesse das espécies do gênero foi relatado devido sua utilização na medicina tradicional, observando diversas propriedades medicinais e também como condimentos, conferindo aroma aos alimentos (*Hyptis oblongifolia* e *Hyptis pectinata*) (PEREDA-MIRANDA e DELGADO, 1990; PEREDA-MIRANDA et al., 1993), repelentes de insetos (*Hyptis spicigera*) (AYCARD *et al.*, 1993; PEREDA-MIRANDA e DELGADO, 1990), fungicida (*Hyptis ovalifolia*) (SOUZA *et al.*, 2003) e bactericida (*Hyptis martiusii*) (COUTINHO *et al.*, 2008).

As plantas do gênero *Hyptis*, do ponto de vista químico, apresentam uma grande variedade de classes de micromoléculas e descritas como: triterpenos e flavonóides (PEREDA-MIRANDA e DELGADO, 1990), diterpenos com esqueleto do tipo labdano (OHSAKI *et al.*, 2005) e alguns com o esqueleto do tipo abietano (ARAÚJO, LIMA e SILVEIRA, 2004; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2008; CHUKWUJEKWUA *et al*, 2005; URONES *et al.* 1998), lignanas e derivados  $\alpha$ -pirânicos (DENG *et al.* 2009; PEREDA-MIRANDA *et al.* 1993) e ainda, da classe dos alcalóides, apenas a (R)-Hidroxipirrolidina-2-ona foi isolada de *H. verticillata* (KUHNT, RIMPLER e HEINRICH, 1994).

O estudo de diterpenos abietanos no gênero *Salvia* (Lamiaceae) mostrou que modificações químicas nos substituintes do anel C, quando este se encontra oxidado, resultam na mudança da atividade bactericida da substância. Por exemplo, uma substância metoxilada em C-12 (12) é mais ativa que uma hidroxilada (13), que por sua vez é mais ativa que uma carbonilada (14), frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (HARLEY, 1992).



#### Levantamento Bibliográfico

Levantamento bibliográfico realizado no *SciFinder* tornou possível o relato de nomes e estruturas de constituintes químicos não-voláteis isolados de espécies do gênero *Hyptis* (Tabela 1, p. 13). A semente de *H. suaveolens* é utilizada como condimento na culinária regional, por isso foi à única que teve a composição da mucilagem da casca da semente estudada, tendo sido identificados como principais constituintes os seguintes glicídeos: Lfucose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e ácido 4-*O*-metil-D-glicurônico (GOWDA, 1984). Além dos açúcares, os aminoácidos também foram pesquisados, chegandose a presença de treonina, valina, arginina, serina, metionina, alanina, glutamina, leucina e isoleucina nas folhas e caules; fenilalanina, glicina, triptofano, lisina e prolina nos frutos (TIWARI, RAJWAR e RAWAT, 1979), no entanto, não foram encontrados fenilalanina nem treonina nas sementes (RAO e NIGAM, 1971).

Na Tabela 1, da pág. 13 encontram-se relatados constituintes fixos, como triterpenos pentacíclicos, lactonas  $\alpha$ -pirânicas, lignanas, ácidos graxos, diterpenos tricíclicos e um sesquiterpeno, isolados de 20 espécies do gênero *Hyptis*. Observando assim a contribuição quimiotaxonômica das espécies deste gênero e verificando que os diterpenos não são constituintes majoritários destas espécies, pois encontram-se limitados.

#### Levantamento Bibliográfico

**TABELA 1** – Metabólitos secundários não-voláteis isolados de espécies do gênero *Hyptis* publicados na literatura de 1900 a 2009.



Levantamento Bibliográfico



Levantamento Bibliográfico






















(CHUKWUJEKWU et al., 2005)

 $\cap$ 

Η̈́

Η

**TRITERPENOS** 



















































#### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 Identificação dos constituintes químicos voláteis de Hyptis carvalhoi Harley

O estudo dos constituintes químicos voláteis de *Hyptis carvalhoi* Harley foi realizado com o óleo essencial obtido de 540 g de folhas e inflorescências coletadas, em fevereiro de 2009, na Chapada Diamantina-BA.

A extração dos constituintes do óleo essencial das folhas e inflorescências de *H. carvalhoi* Harley foi realizada através de hidrodestilação em aparelho doseador de óleo essencial tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb, seguindo o procedimento descrito no Item 6.5.1, da página 107. Obteve-se 1,23 g de óleo essencial, nomeado como HCFI-OE, tendo um rendimento de 0,23%.

A análise por CG/EM de HCFI-OE forneceu o cromatograma mostrado na Figura 3, p. 40. O cromatograma de HCFI-OE mostrou 10 picos, dos quais nove foram identificados como sendo: *p*-cimeno (1,92%), limoneno (6,22%),  $\gamma$  -terpineno (2,26%), linalool (1,16%),  $\beta$ -cariofileno (18,75%),  $\alpha$ -humuleno (7,54%), biciclogermacreno (5,06%), óxido de cariofileno (7,62%) e globulol (47,45%). Um total de 97,98% da composição do óleo foi determinado, sendo 12% de monoterpenos e 88% de sesquiterpenos e tendo como componentes majoritários o globulol e o  $\beta$ -cariofileno, seguido do óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e biciclogermacreno.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada através da determinação dos índices de Kovats simulados (ALENCAR, et al., 1990), pesquisa em espectroteca e comparação com dados da literatura (ADAMS, 1989). A correção dos índices de Kovats foi efetuada através de regressão linear utilizando cinco picos obtidos no cromatograma de HCFI-OE, com tempos de retenção iguais a 11,167; 11,392; 12,467; 13,967; 35,50, relacionados ao *p*-cimeno, limoneno, *y*-terpineno, linalool e globulol, rescpectivamente. A equação da reta da regressão obtida no procedimento foi Y= 22,927x + 717,77 e o fator de correção foi  $R^2$ = 0,9998.

A Tabela 2, p. 40 mostra os componentes voláteis de HCFI-OE, o IK e a percentagem de cada um dos componentes identificados.

Através de levantamento bibliográfico realizado no *ScienceFinder*, com publicações de 1950 - 2009, verificou-se que o estudo fitoquímico e/ou farmacológico da espécie *H*. *carvalhoi* Harley não foi relatado na literatura.



Figura 3 - Cromatograma do óleo essencial das folhas e inflorescências de Hyptis carvalhoi Harley

Componentes	*IK	(%)				
Monoterpenos:						
<i>p</i> -cimeno (162)	1028	1,92				
limoneno (163)	1033	6,22				
y-terpineno (164)	1058	2,26				
linalool (165)	1092	1,16				
Sesquiterpenos:						
β-cariofileno ( <b>166</b> )	1359	18,75				
$\alpha$ -humuleno (167)	1383	7,54				
biciclogermacreno (168)	1414	5,06				
óxido de cariofileno (169)	1476	7,62				
globulol ( <b>170</b> )	1586	47,45				
TOTAL		97,98				

Tabela 2 - Constituintes do óleo essencial das folhas e inflorescências de Hyptis carvalhoi Harley (HCFI-OE)

\*IK - Índice de Kovats corrigido



**Figura 6** – Espectro de massa do  $\gamma$ -terpineno (**164**) (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, MM = 136)



Figura 7 – Espectro de massa do linalol (165) ( $C_{10}H_{18}O$ , MM = 154)









Figura 9 – Espectro de massa do  $\alpha$ -humuleno (167) (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, MM = 204)



Figura 10 – Espectro de massa do biciclogermacreno (168) ( $C_{15}H_{24}$ , MM = 204)



Figura 11 – Espectro de massa do óxido de cariofileno (169) ( $C_{15}H_{24}O$ , MM = 220)



Figura 12 – Espectro de massa do globulol (170) ( $C_{15}H_{26}O$ , MM = 222)

### 5.2 Determinação estrutural dos constituintes fixos de Hyptis carvalhoi Harley

### 5.2.1 – Determinação estrutural do rosmanol (HC-P4)

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração hidroalcoólica (HCFIE-H), obtida a partir do extrato etanólico da parte aérea de *H. carvalhoi* (item. 6.6.5.1, p. 116), levou a obtenção de um sólido amarelado, com ponto de fusão 221,6 – 223,6 °C e  $[a]_D^{20} = -32^\circ$  (c = 0,06, CH<sub>3</sub>OH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (Fig. 16, p. 49) exibiu absorções características referentes às deformações axiais da ligação O-H de hidroxilas em  $3441 \text{ cm}^{-1}$  e  $3481 \text{ cm}^{-1}$ . Além dessas absorções, observaram-se bandas de deformação axial de ligação C=O em 1753 cm<sup>-1</sup> e uma absorção intensa provavelmente de deformação axial de ligação C-O em 1304 cm<sup>-1</sup>. Mostrou ainda absorções de deformação axial de ligação C-H de alifático entre 2960 a 2868 cm<sup>-1</sup> e bandas esqueletais em 1622, 1570 e 1454 e cm<sup>-1</sup> referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático.

O espectro de massa obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 25, p. 53), apresentou o pico do íon molecular em m/z 346 Daltons, confirmado pelo espectro de massa de alta resolução (Fig. 26, p. 54), que forneceu o pico correspondente a molécula protonada m/z 347,1854 (massa calculada m/z 347,1858). O espectro mostrou ainda picos correspondentes aos adutos com sódio [M + Na]<sup>+</sup>, em m/z 369,1674 Daltons e com potássio [M + K]<sup>+</sup>, em m/z 385,1380 Daltons.

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN <sup>1</sup>H) [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD] (Fig. 17, p. 49), mostrou um sinal referente a um único hidrogênio ligado ao anel aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,84 (s, 1H, H-14), revelando a natureza pentassubstituída do anel. Apresentou sinais em  $\delta_{\rm H}$  1,20 (d, 3H, J = 6,9, H-16) e  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 3H, J = 6,9, H-17) referentes a hidrogênios de carbonos metílicos, e em  $\delta_{\rm H}$  3,22 (sept,1H, J = 7,0, H-15) relacionado a um hidrogênio de carbono metínico, sugerindo a presença de um grupo isopropila ligado diretamente ao anel aromático, pois devido ao efeito anisotrópico do anel, estes hidrogênios encontram-se mais desprotegidos. O espectro exibiu ainda sinais em  $\delta_{\rm H}$  4,52 (d, 1H, J = 3,5 H-6) e 4,59 (d, 1H, J = 3,5 H-7) relativos a hidrogênios carbinólicos e outros sinais de hidrogênios de carbonos metilênicos e metínicos característicos de anel ciclohexano.

O espectro RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CD<sub>3</sub>OD] (Figs. 18 e 19, p. 50), revelou sinais correspondentes a 20 átomos de carbono. A comparação dos espectros de RMN <sup>13</sup>C CPD e DEPT 135° (Fig. 20, p. 51) permitiu determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, onde foi possível visualizar oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal mais desprotegido

45

em  $\delta_{\rm C}$  181,2 (C-20), referente a um carbono carbonílico e os sinais em  $\delta_{\rm C}$  143,6 (C-12) e 145,5 (C-11) na região de carbonos oxigenados aromáticos; quatro carbonos metínicos, sendo dois oximetínicos em  $\delta_{\rm C}$  80,1 (C-6) e 69,4 (C-7); três carbonos metilênicos; quatro carbonos metílicos e ainda um carbono aromático hidrogenado em  $\delta_{\rm C}$  120,7 (C-14) (Tabela 3, abaixo).

С	СН	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
181,2 (C=O)	120,7	39,6	32,0	
143,6 (-OH)	80,1 (-O-)	28,9	23,3	
145,5 (-OH)	69,4 (-OH)	20,4	23,1	
137,7	51,9		22,6	
129,7	28,1			
125,2				
48,5				
32,5				
C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C5H6O2	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	$C_4H_{12}$	FM C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 3 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de HC-P4 por padrão de hidrogenação

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 21, p. 51) possibilitou a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono como observado na Tabela 4, p. 48.

A análise do espectro RMN bidimensional de correlação homonuclear (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY) de HC-P4 (Fig. 24, p. 53), evidenciou as correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  3,31 (H-1b); 1,96 (H-1a); 1,45 (H-2b); 1,62 (H-2a); 1,45 (H-3b); 1,31 (H-3a), típicos de acoplamentos de CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- em anéis ciclohexânicos. A presença do grupo isopropila foi evidenciada pela correlação entre o hidrogênio de carbono metínico em  $\delta_{\rm H}$  3,22 (sept, 1H, J = 7,0, H-15) com os hidrogênios de carbonos metílicos em  $\delta_{\rm H}$  1,20 (d, 3H, J = 6,9, H-16) e  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 3H, J = 6,9, H-17) (Fig. 13, abaixo).



Figura 13 - Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no RMN COSY de HC-P4.

Os dados espectroscópicos descritos na Tabela 3, p. 45, juntamente com o íon molecular obtido no espectro de massa alta resolução em m/z = 346,1854 Daltons, permitiram

propor a fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_5$ . Desta forma, foi possível atribuir para HC-P4 um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito, justificados pela presença de quatro insaturações do anel benzênico, uma carbonila em  $\delta_C$  181,2, e as três insaturações remanescentes sugeriram a presença de três anéis.

A conjunção dos dados obtidos levou a sugestão de um diterpeno de esqueleto tipo abietano para HC-P4, devido à presença da isopropila ligada a anel aromático pentassubstituído e também por comparação com dados da literatura, tornando possível avaliar as seguintes possibilidades (Figura 14, abaixo):



Figura 14 – Possíveis estruturas para HC-P4.

Para determinar a estrutura final do diterpeno isolado, analisou-se o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a mais de uma ligação, com detecção no canal do hidrogênio (HMBC) (Figs. 22 e 23, p. 52) onde ficaram evidenciados os acoplamentos à distância ( ${}^{2}J_{C-H}$  e  ${}^{3}J_{C-H}$ ) entre hidrogênios e carbonos (Tabela 4, p. 48). A verificação de um anel lactônico foi confirmada pelas correlações do hidrogênio em  $\delta_{H}$  4,52 (H-6) com os carbonos em  $\delta_{C}$  181,2 (C-20), 48,5 (C-10), 69,4 (C-7) e 129,7 (C-8) e do em  $\delta_{H}$  2,26 (H-5) com os carbonos em  $\delta_{C}$  181,2 (C-20), 125,2 (C-9) e 69,4 (C-7). Por outro lado, a disposição *orto* das hidroxilas no anel aromático foi confirmada pelos acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_{H}$  6,84 (H-14) com os carbonos em  $\delta_{C}$  69,4 (C-7), 125,2 (C-9), 145,5 (C-12) e 28,1 (C-15) (Fig. 15, abaixo).



Figura 15 - Sub-estruturas mostrando correlações observadas no RMN HMBC para HC-P4

47

A comparação dos dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de HC-P4 com os registrados na literatura (Tabela 4, p. 48) para diterpenos abietanos (NAKATANI e INATANI, 1984; ARISAWA, 1987; GONZÁLEZ, 1989; AMARO-LUIS, 1997) permitiu identificar HC-P4 como sendo o diterpeno abietano natural  $7\alpha$ ,11,12-trihidroxi-6,10-(epoximetano)abietan-8,11,13-trien-20-one (rosmanol). Este diterpeno foi isolado pela primeira em vez de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (NAKATANI e INATANI, 1984) e também no gênero *Hyptis*, da espécie *Hyptis dilatata* (URONES, 1998).

HC-P4				Literatura		
	HSQC		HMBC		(AMARO-LUIS, 1997)	
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$^{2}J_{\text{CH}}$	$^{3}J_{\rm CH}$	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$
1a 1b	28,9	1,96 (m, 1H) 3,31 (m, 1H)			28,6	3,30 (dl, <i>J</i> = 10,5 Hz, 1H)
2a 2b	20,4	1,62 (m, 1H) 1,45 (m, 1H)	1,96		20,2	-
3a 3b	39,6	1,31 (m, 1H) 1,45 (m, 1H)		1,03; 0,91	39,4	-
4	32,5	-	2,26; 1,03; 0,91	4,52	32,3	-
5	51,9	2,26 (s, 1H)		4,59; 1,03; 0,91	51,6	2,26 (s, 1H)
6a	80,1	4,52 (d, J = 3,5 Hz, 1H)	4,59		79,2	4,50 (d, J = 3,3 Hz, 1H)
7	69,4	4,59 (d, <i>J</i> = 3,5 Hz, 1H)	4,52	6,84; 2,26	69,2	4,57 (d, <i>J</i> = 3,3 Hz, 1H)
8	129,7	-	4,59	4,52	129,2	-
9	125,2	-		6,84; 4,59; 2,26; 1,96	124,9	-
10	48,5	-	2,26; 1,96	4,52	48,4	-
11	143,6	-			145,0	-
12	145,5	-		6,84	143,2	-
13	137,7	-		1,20; 1,22	137,5	-
14	120,7	6,84 (s, 1H)		4,59	120,5	6,83 (s, 1H)
15	28,1	3,22 (sept, $J = 7,0$ Hz, 1H)	1,20; 122	6,84	27,9	3,28 (sept, 1H)
16	23,1	1,20 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)	1,22		23,0	1,16 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)
17	23,3	1,22 (d, J = 6,9 Hz, 3H)	1,20		22,4	1,18 d (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)
18	32,0	0,91(s, 3H)		2,26; 1,03; 0,91	31,9	0,89 (s, 3H)
19	22,6	1,03 (s, 3H)		2, <del>26; 1,31;</del> 1,03	22,5	1,01 (s, 3H)
20	181,2	-		2,26; 4,52	180,0	-

**Tabela 4** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4, comparados com os valores da literatura (AMARO-LUIS, 1997) de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (400/100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) para o diterpeno abietano rosmanol.



HC-P4



Figura 16 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P4



Figura 17 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4



Figura 18 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4



Figura 19 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4 - expansão
Figura 21 – Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4





**Figura 20** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4



Figura 22 – Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4



Figura 23 – Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4

52



Figura 24 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P4



Figura 25 - Espectro de massa de baixa resolução de HC-P4



Figura 26 – Espectro de massa de alta resolução de HC-P4

#### 5.2.2 – Determinação estrutural do 7*a*-etoxirosmanol (HC-P1)

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração hidroalcoólica (HCFIE-H), obtida a partir do extrato etanólico das folhas e inflorescências de *H. carvalhoi* possibilitou o isolamento de HC-P1, (item 6.6.4.1, p. 113), na forma de um sólido amarelado, com ponto de fusão na faixa de 175,1 - 177,1 °C e  $[a]_D^{20} = -23^\circ$  (c = 0,06, CHCl<sub>3</sub>).

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de HC-P1 (Fig. 29, p. 60) exibiu bandas semelhantes às de HC-P4, através de absorções em 1741 cm<sup>-1</sup> e em 1088 cm<sup>-1</sup>, as quais são provavelmente de deformações axiais de ligação C=O característica de éster e de ligação C-O, provavelmente de lactona, respectivamente. Ainda mostrou absorções de deformação axial de ligação O-H de hidroxilas em 3473 e 3301 cm<sup>-1</sup>, de ligação de C-H alifático em 2958 a 2874 cm<sup>-1</sup>, além de bandas esqueletais de anel aromático em 1618, 1570, 1485 e 1443 cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 31, p. 61), revelou sinais correspondentes a 22 átomos de carbono, que comparado com o espectro de carbono de HC-P4, apresentou 2 carbonos a mais. A comparação dos espectros de RMN <sup>13</sup>C CPD e DEPT 135° (Fig. 32, p. 61) possibilitou determinar o padrão de hidrogenação referente a oito átomos de carbonos não hidrogenados, sendo um do carbono carbonílico em  $\delta_C$  179,1 (C-20) e dois oxigenados na região de aromáticos em  $\delta_C$  141,7 (C-12) e 142,4 (C-11). Além destes foram ainda observados quatro carbonos metínicos, sendo dois oximetínicos em  $\delta_C$  75,8 (C-7) e um carbono aromático hidrogenado em  $\delta_C$  120,6 (C-14), sugerindo a presença de um anel aromático pentassubstituído. A principal diferença observada para HC-P1 em relação a HC-P4 foi à presença de um carbono oximetilênico adicional em  $\delta_C$  66,2 (C-21) e um carbono metílico, totalizando quatro átomos de metilênicos e cinco carbonos metílicos (Tab. 5, p. 56).

O espectro de massa de baixa resolução de HC-P1 (Fig. 33, p. 62), revelou o pico do íon molecular com razão massa/carga (m/z) em 374 Daltons e desta forma, foi possível propor a fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, com grau de insaturação igual a oito (Tabela 5, p. 56).

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HSQC (Fig. 34, p. 62 e Fig. 35, p. 63) permitiu correlacionar, todos os sinais de hidrogênios ao seus respectivos sinais de carbonos inequivocamente, como observado na Tabela 6, p. 59.

С	СН	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
179,1 (C=O)	120,6	66,2 (H <sub>2</sub> C-O-)	31,3	
142,4 (-OH)	75,8	38,0	22,3	
141,7 (-OH)	75,3 (HC-O-)	27,3	22,2	
134,8	50,9	19,0	22,0	
126,7	27,2		15,8	
124,4				
47,0				
31,4				
C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	C5H15	FM C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 5 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de HC-P1 por padrão de hidrogenação

O espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 30, p. 60) também revelou similaridade aos dados observados para HC-P1, através do sinal do hidrogênio ligado a anel aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (1H, s, H-14), dos sinais característicos do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 6H, J = 7,5 Hz, H-16 e H-17) e  $\delta_{\rm H}$  3,07 (sept, 1H, J = 7,5 Hz, H-15), além dos sinais em 4,36 (1H, d, J = 2,5Hz, H-6) e 4,66 (1H, d, J = 2,5Hz, H-7) relativos a hidrogênios sp<sup>3</sup> carbinólicos. A diferença observada no espectro RMN <sup>1</sup>H de HC-P1 em relação a HC-P4, foi à presença de sinais adicionais em  $\delta_{\rm H}$  3,86 (q, 2H, J = 7,5 Hz, H-21) e em  $\delta_{\rm H}$  1,33 (t, 3H, J = 7,0 Hz, H-22), referentes a hidrogênios de um grupamento etoxi, corroborado pelos dados observados no espectro de RMN <sup>13</sup>C.

A análise do espectro de RMN (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY) de HC-P1 (Figura 38, p. 64), forneceu as correlações entre os sinais em  $\delta_{\rm H}$  3,86 (q, 2H, J = 7,5 Hz, H-21) e em  $\delta_{\rm H}$  1,33 (t, 3H, J = 7,0 Hz, H-22), evidenciando a presença do grupo etoxi, além das correlações dos sinais do grupo isoproprila em  $\delta_{\rm H}$  3,07 (sept, 1H, J = 7,5 Hz, H-15) com os metilas em  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 6H, J = 7,5 Hz, H-16 e H-17) e do sub-sistema –CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>- referente a anel ciclohexano, através das correlações dos sinais em  $\delta_{\rm H}$  3,17 (H-1b); 1,99 (H-1a); 1,55 (H-2b); 1,66 (H-2a); 1,45 (H-3b); 1,22 (H-3a), subseqüente (Fig. 27, abaixo).



Figura 27 – Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P1.

A fórmula molecular  $C_{22}H_{30}O_5$  para HC-P1 proposta anteriormente, foi confirmada através dos dados de RMN explicitados na Tabela 5, p. 56. De acordo com o IDH igual a oito pôde-se sugerir o mesmo esqueleto proposto para HC-P4, onde quatro insaturações foram relacionadas ao anel benzênico, uma carbonila e três anéis.

No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HMBC (Fig. 36, p. 63 e Fig. 37, p. 64), observou-se os acoplamentos à longa distância ( ${}^{2}J_{CH}$  e  ${}^{3}J_{CH}$ ) entre os hidrogênios e carbonos (Tabela 6, p. 59). Neste espectro observou-se o mesmo arranjo *orto* relacionado às hidroxilas do anel aromático em comparação com HC-P4, que foi confirmado pelo acoplamento do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (H-14) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  75,8 (C-7), além dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  4,36 (H-7) e em  $\delta_{\rm H}$  3,07 (H-15) com o carbono aromático em  $\delta_{\rm C}$  120,6 (C-14). (Figura 28. II, abaixo). Através das correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  1,99 (H-1 $\alpha$ ), 2,29 (H-5) e 4,66 (H-6) com o sinal do carbono em  $\delta_{\rm C}$  179,1 (C-20), confirmou-se a presença do mesmo anel lactônico que em HC-P4, além das correlações dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  2,29 (H-5) e 4,36 (H-7) com o sinal do carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  75,3 (C-6) (Figura 28. I, abaixo). As correlações do sinal de hidrogênio do anel aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (H-14) com o sinal do carbono de motifico em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (H-14) com o sinal do carbono de motifico em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (H-14) com o sinal do carbono de motifico em  $\delta_{\rm C}$  75,3 (C-6) (Figura 28. I, abaixo). As correlações do sinal de hidrogênio do anel aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,79 (H-14) com o sinal do carbono metínico do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  3,07 (H-15) com os carbonos em  $\delta_{\rm C}$  142,6 (C-12),  $\delta_{\rm C}$  134,8 (C-13) e  $\delta_{\rm C}$  120,6 (C-14), confirmaram a posição do grupo isopropila em C-13 (Figura 28. III, abaixo).

A posição relativa do grupo etoxila em C-7 foi determinada através da correlação do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,36 (H-7) com o carbono metilênico em  $\delta_{\rm C}$  66,2 (C-21) (Figura 28. II, abaixo).



Figura 28 – Sub-estruturas I, II e III de HC-P1, mostrando as correlações de acordo com o espectro de HMBC.

A análise detalhada de todos os dados discutidos, bem como a comparação com os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C registrados para HC-P4 e os obtidos na literatura para diterpenos abietanos (ARISAWA, 1987; GONZÁLEZ, 1989) (Tabela 6, p. 59) possibilitou identificar HC-P1 como o diterpeno 7 $\alpha$ -etoxirosmanol, isolado anteriormente de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), porém inédito no gênero *Hyptis*.

**Tabela 6** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1, comparados com os valores da literatura (ARISAWA, 1987; GONZÁLEZ, 1989) para o diterpeno abietano  $7\alpha$ -etoxirosmanol.

HC-P1					Literatura			
HSQC		НМВС		Arisawa, 1987 (acetona d <sub>6</sub> )		González, 1989 (CDCl <sub>3</sub> )		
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{\rm H}$ (mult., J Hz, H)	$^{2}J_{\text{CH}}$	$^{3}J_{\rm CH}$	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$\delta_{ m H}$	
1a 1b	27,3	1,99 (dt, <i>J</i> = 5; 14; 1H); 3,17 (td, <i>J</i> = 13,5; 1H)			28,3	3,30; 1,96	-	
2a 2b	19,0	1,66 (m, 1H); 1,55 (m, 1H)	1,99		19,8		-	
3a 3b	38,0	1,22 (m, 1H); 1,45 (m, 1H)		1,99	38,9		-	
4	31,4	-	2,29	4,66	32,0		-	
5	50,9	2,29 (s, 1H)	4,66	4,36	51,5	2,22	2,28	
6	75,3	4,36 (d, <i>J</i> = 2,5; 1H)	4,36; 2,29		75,4	4,35	4,36 (d, $J = 3,2$ Hz)	
7	75,8	4,66 (d, <i>J</i> = 2,5; 1H)	4,66	6,79	76,8	4,75	4,66 (d, $J = 3,2$ Hz)	
8	126,7	-	4,36	4,66	128,4		-	
9	124,4	-		6,79; 4,36; 2,29; 1,99	124,1		-	
10	47,0	-	2,29; 1,99	4,66	47,6		-	
11	142,4	-			144,6		-	
12	141,7	-		6,79; 3,07	142,6		-	
13	134,8	-	3,07		136,3		-	
14	120,6	6,79 (s, 1H)		4,36; 3,07	120,6	6,84	6,79	
15	27,2	3,07  (sept,  J = 7,5Hz,1H)		6,79	27,4	3,27	3,11 (d, <i>J</i> = 7,0Hz)	
16	22,2	1,22 (d, J = 7,5Hz, 3H)	3,07		22,9	1,17	1,22 (d, $J = 7,0$ Hz)	
17	22,3	1,22 (d, J = 7,5Hz, 3H)	3,07		23,1	1,20	1,22 (d, $J = 7,0$ Hz)	
18	31,3	1,09 (s, 3H)		2,29	31,8	1,02	1,01	
19	22,0	0,99 (s, 3H)		2,29	22,3	0,91	0,92	
20	179,1	-		4,66; 2,29; 1,99	178,4		-	
21	66,2	3,86 (q, J = 7,5Hz, 2H)		4,36	66,4		3,84	
22	15,8	1,33 (t, $J = 7,0Hz,3H$ )	3,86		16,2		1,33	







Figura 29 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P1



Figura 30 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



**Figura 31** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 32 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 33 - Espectro de Massa de Baixa Resolução de HC-P1



Figura 34 – Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 35 – Espectro de HSQC – expansão (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 36 – Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 37 – Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1



Figura 38 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P1

#### 5.2.3 Determinação estrutural do 7*a*-metoxirosmanol (HC-P2)

HC-P2 foi obtido (item 6.6.4.1, p. 113), na forma de um sólido alaranjado, com ponto de fusão na faixa de 181,3 – 182,3 °C e  $[a]_D^{20}$  = -11° (c = 0,066, CHCl<sub>3</sub>).

No espectro de absorção na região do IV (Fig. 42, p. 70) observou-se em HC-P2 as mesmas absorções para HC-P1 e HC-P4, através das bandas em 3473 e 3286 cm<sup>-1</sup> referentes a deformação axial de ligação O-H. Os estiramentos axiais de ligações C-H de carbono sp<sup>3</sup>, foram representadas pelas absorções características em 2864, 2937 e 2962 cm<sup>-1</sup> e as absorções em 1780 e 1062 cm<sup>-1</sup>, foram relacionadas as deformações axiais de ligação C=O e de ligação C-O de lactona, respectivamente. Por último pôde-se destacar as bandas esqueletais de estiramentos axial da ligação C=C características de anel aromático em 1622, 1570 e 1460 cm<sup>-1</sup>.

Os dados observados nos espectros de RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de HC-P2 (Fig. 44, p. 71) mostraram-se bastante similares aos observados para HC-P1. A única diferença observada foi o desaparecimento dos sinais relativos ao grupo etoxi de HC-P1, que foram substituídos por um carbono metílico oxigenado em  $\delta_C$  58,2 (C-21). A comparação dos espectros de RMN <sup>13</sup>C CPD e DEPT 135° (Fig. 45, p. 71) revelou o mesmo sinal de carbono aromático hidrogenado em  $\delta_C$  120,7 (C-14), os quatro carbonos metínicos, com dois oximetínicos em  $\delta_C$  74,8 (C-6) e  $\delta_C$  77,6 (C-7), cinco carbonos metílicos, sendo que para HC-P2 um destes é oximetílico em  $\delta_C$  58,2 (C-21). Os demais sinais foram referentes aos oito carbonos não hidrogenados, sendo um carbono carbonílico em  $\delta_C$  179,0 (C-20) e cinco sinais entre  $\delta_C$  124,3 (C-9) e 142,3 (C-11) correspondentes aos carbonos do anel benzílico, os quais dois oxigenados ( $\delta_C$  142,0 (C-12) e 142,3 (C-11)), além de dois sinais referentes a carbonos quaternários em  $\delta_C$  47,2 (C-10) e 31,4 (C-4) e três carbonos metilênicos em  $\delta_C$  19,1 (C-2), 27,4 (C-1) e 38,1 (C-3) (Tabela 7, p. 66).

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HSQC (Fig. 47, p. 72) tornou possível a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, como observado na Tabela 8 da página 69.

Na comparação do espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 43, p. 70) de HC-P2 com o de HC-P1 confirmou-se a ausência dos sinais correspondentes aos hidrogênios do grupo etoxi em HC-P1 e observou-se a presença de um singleto adicional em  $\delta_{\rm H}$  3,66 (s, 3H, H-21), sugerindo a presença de uma metoxila. Neste espectro observou-se ainda a presença de sinais semelhantes a HC-P1 em  $\delta_{\rm H}$  6,78 (s, 1H, H-14), relacionado ao hidrogênio aromático, além dos sinais característicos do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  1,19 (d, 6H, J = 7,0 Hz, H-16-17) e  $\delta_{\rm H}$  3,06 (sept, 1H, J = 6,5 Hz, H-15), dos dois sinais dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,26 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H-7) e em 4,71 (1H, d, J = 2,5 Hz, H-6) e dos sinais relacionados a hidrogênios oxigenados em  $\delta_{\rm H}$  6,21 (s, OH) e em  $\delta_{\rm H}$  5,87 (s, OH).

No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY (Fig. 49, p. 73) foram evidenciadas as mesmas correlações entre os sinais do grupo isopropil em  $\delta_{\rm H}$  3,06 (H-15) e em  $\delta_{\rm H}$  1,19 (H-16-17), além das correlações dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,71 (H-6) com os em  $\delta_{\rm H}$  4,26 (H-7), e do subsistema do anel ciclohexânico (Fig. 39, abaixo).



Figura 39 – Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P2.

С	СН	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
179,0 (C=O)	120,7	38,1	58,2	
142,3 (-OH)	77,6 (-OR-)	27,4	31,6	
142,0 (-OH)	74,8 (-O-)	19,1	22,5	
135,0	50,9		22,2	
126,6	27,2		22,1	
124,3				
47,2				
31,4				
C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	C5H15	FM C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 7 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de HC-P2 por padrão de hidrogenação

Como observado na Tabela 7 acima, os dados espectroscópicos e o pico do íon molecular com razão massa/carga (m/z) em 360 Daltons (Fig. 46, p. 72) revelaram para HC-P2 a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, com IDH igual a oito, justificado pelas quatro insaturações do anel benzênico, uma insaturação referente à carbonila e outras três equivalentes a três anéis.

A análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HMBC (Fig. 48, p. 73), mostrou os acoplamentos à distância ( ${}^{2}J_{CH}$  e  ${}^{3}J_{CH}$ ) entre os hidrogênios e os carbonos (Tabela 8, p. 69). A posição relativa do grupo metoxila em C-7 foi determinada através dos acoplamentos entre o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,26 (H-7) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  58,2 (C-21), além dos acoplamentos entre o hidrogênio de carbono aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,78 (H-14) e o carbono em  $\delta_{\rm C}$  77,6 (C-7), e do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  3,66 (H-21) com o carbono 7 (Fig. 40. I, p. 67).

A confirmação da posição do anel lactônico foi observada através dos acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,71 (H-6) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  179,0 (C-20), do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  2,36 (H-5) com o carbono carbonílico em  $\delta_{\rm C}$  179,0 (C-20), além do acoplamento do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,26 (H-7) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  74,8 (C-6), respectivamente (Fig. 40. II, abaixo).

A localização das hidroxilas fenólicas e do grupo isopropila, foi determinada, observando os acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  6,78 (H-14) com os carbonos em  $\delta_{\rm C}$  77,6 (C-7) e 27,2 (C-15), do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,26 (H-7) com o carbono aromático em  $\delta_{\rm C}$  120,7 (C-14), dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  1,19 (6H, H-16; H-17) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  27,2 (C-15), respectivamente (Fig. 40. III, abaixo).



Figura 40 – Sub-estruturas de HC-P2, mostrando as correlações de acordo com o espectro de RMN HMBC.

No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY (Fig. 50, p. 74) corroborou-se a estereoquímica da metoxila na posição  $\alpha$ , devido as correlações dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  3,66 (H-21) e  $\delta_{\rm H}$  2,36 (H-5) com o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,71 (H-6), observando que estes também estão na posição  $\alpha$  e ainda dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  1,09 (H-18) e  $\delta_{\rm H}$  0,99 (H-19) também com o hidrogênio 6 (Fig. 41, abaixo). A estereoquímica dos hidrogênios metilênicos do anel ciclo hexano foram confirmadas pelas correlações observadas no NOESY e por comparação com dados da literatura (Tabela 8, p. 69).



Figura 41 – Sub-estrutura de HC-P2, mostrando a correlação de acordo com o espectro de RMN NOESY.

A comparação dos dados de HC-P1, HC-P4 e HC-P2 mostrou uma semelhança estrutural entre estes compostos, diferindo apenas no substituinte em C-7. Desta forma, HC-P2 foi caracterizado como sendo o diterpeno 7-metoxirosmanol, através de comparação com os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 8, p. 69) registrados na literatura (TAKENAKA, 1997). Este composto foi isolado anteriormente de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), no gênero *Hyptis* da espécie *Hyptis dilatata* (URONES, 1998).

HC-P2				Literatura		
		HSQC	HMBC		TAKENAKA, 1997	
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$^{2}J_{\text{CH}}$	$^{3}J_{\rm CH}$	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$
1α	27 /	1,98 (m, 1H)			28.6	1,96 m
-1 <i>β</i>	27,4	3,17 (m, 1H);			20,0	3,05 m
$2\alpha$	191	1,66 (m, 1H);	1 98		20.1	1,62
2β	17,1	1,54 (m, 1H)	1,70		20,1	1,49
3α	38.1	1,19 (m, 1H)		1.09: 0.99	39.3	1,24
<u></u>	50,1	1,46 (m, 1H);		1,07, 0,77		1,49
4	31,4	-	2,36; 0,99;	4,71	32,4	-
			1,09, 1,40	4 26.		
5	50,9	2,36 (s, 1H)		1,09; 0,99	52,3	2,18 (s, 1H)
6	74,8	4,71 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz)	4,26		76,0	4,70 (d, 1H, <i>J</i> = 3,3 Hz)
7	77,6	4,26 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz)	4,71	6,78; 3,66; 2,36	78,9	4,25 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz)
8	126,6	-	4,26	4,71	127,6	-
9	124,3	-		6,78; 2,36; 1,98	125,0	-
10	47,2	-	2,36; 1,98	4,71	48,4	-
11	142,3	-			145,3	-
12	142,0	-		6,78	143,7	-
13	135,0	-		1,19	137,3	-
14	120,7	6,78 (s, 1H)		4,26	120,8	6,77 (s, 1H)
15	27,2	3,06 (sept, 1H, $J = 6,5$ Hz)	1,19	6,78	27,9	3,17 (m, 1H)
16	22,2	1,19 (d, 3H, J = 7,0 Hz)			23,0	1,18 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz)
17	22,5	1,19 (d, 3H, <i>J</i> = 7,0 Hz)			23,2	1,21 (d, $J = 6,6$ Hz)
18	31,6	1,09 (s, 3H)			32,1	0,91 (s, 3H)
19	22,1	0,99 (s, 3H)		1,19; 2,36; 1,09	22,4	0,93 (s, 3H)
20	179,0			2,36; 4,71	180,9	
21	58,2	3,66 (s, 3H)		4,26	58,6	3,65 (s, 3H)

**Tabela 8** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2, comparados com os valores da literatura de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do diterpeno  $7\alpha$ -metoxirosmanol (TAKENAKA, 1997).



HC-P2





Figura 42 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P2



Figura 43 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 44 – Espectro de RMN  $^{13}$ C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 45 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 46 – Espectro de Massa de Baixa Resolução de HC-P2



Figura 47 – Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 48 – Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 49 – Espectro de 2D, <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2



Figura 50 – Espectro de 2D, <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P2

#### 5.2.4 Determinação estrutural do 7β-metoxirosmanol (HC-P5)

A substância isolada, HC-P5, foi obtida seguindo o mesmo procedimento experimental realizado para a obtenção de HC-P4 (item 6.6.5.1, p. 116). HC-P5 é uma substância resinosa de coloração amarelada com rotação específica de  $[a]_D^{20} = +18^\circ$  (c = 0,07g, CHCl<sub>3</sub>).

O espectro de absorção na região do IV de HC-P5 (Fig. 54, p. 80) mostrou absorções semelhantes ao de HC-P2, através das bandas em 3483 e 3257 cm<sup>-1</sup>, referentes à deformação axial de ligação O-H. As absorções características em 2958, 2928 e 2872 cm<sup>-1</sup> relacionadas aos estiramentos axiais de ligações C-H de carbono sp<sup>3</sup> e as absorções em 1736 e 1016 cm<sup>-1</sup>, foram relacionadas às deformações axiais de ligação C=O de carbonila de éster e da ligação C-O. E finalmente pôde-se destacar as bandas esqueletais de estiramentos axial da ligação C=C características de anel aromático em 1624, 1570, 1456 e 1441 cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de HC-P2 (Fig. 56, p. 81) mostrouse bastante similar ao observado para HC-P2. A comparação dos espectros de RMN <sup>13</sup>C CPD e DEPT 135° de HC-P5 (Fig. 57, p. 81) com os de HC-P2 revelou o sinal de carbono aromático hidrogenado em  $\delta_{\rm C}$  118,9 (C-14) e os quatro carbonos metínicos, com dois oximetínicos em  $\delta_{\rm C}$  74,7 (C-6) e  $\delta_{\rm C}$  78,2 (C-7). Mostrou ainda, um sinal de carbono em  $\delta_{\rm C}$ 55,5 (C-5) mais desprotegido que em HC-P2, cinco carbonos metílicos, observando a mesma presença do carbono oximetílico para HC-P2 em  $\delta_{\rm C}$  56,0 (C-21). Os demais sinais foram referentes a oito carbonos não hidrogenados, sendo um carbono carbonílico em  $\delta_{\rm C}$  178,4 (C-20) e cinco sinais entre  $\delta_{\rm C}$  123,7 (C-9) e 142,1 (C-11) correspondentes aos carbonos do anel benzínico, os quais dois oxigenados ( $\delta_{\rm C}$  142,0 (C-12) e 142,1 (C-11)). Além dos sinais explicitados, revelou dois sinais referentes a carbonos quaternários em  $\delta_{\rm C}$  47,9 (C-10) e 31,8 (C-4) e três carbonos metilênicos em  $\delta_{\rm C}$  18,9 (C-2), 27,3 (C-1) e 38,0 (C-3) (Tabela 9, p. 6).

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HSQC (Fig. 58, p. 82) tornou possível a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, como observado na Tabela 10 da página 83.

Comparando o espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 55, p. 80) de HC-P5 com o de HC-P2 confirmou-se a semelhança entre eles, em que observou-se diferenças nos deslocamentos químicos de três hidrogênios. Uma das diferenças observadas foi o sinal do hidrogênio metínico em  $\delta_{\rm H}$  1,95 (s, 1H, H-5), revelando-se mais protegido do que o mesmo hidrogênio 5 ( $\delta_{\rm H}$  2,36) em HC-P2 (Tabela 10, p. 79). As outras duas diferenças foram os sinais dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (1H, d, J = 2,5, H-7) e em 4,94 (1H, d, J = 2,5, H-6), menos protegidos que os hidrogênios 6 ( $\delta_{\rm H}$  4,71) e 7 ( $\delta_{\rm H}$  4,26) em HC-P2 (Tabela 10, p. 79). Os demais sinais foram semelhantes, observando a presença de um singleto em  $\delta_{\rm H}$  3,60 (s, 3H, H-21), sugerindo a presença de uma metoxila e o sinal em  $\delta_{\rm H}$  6,83 (s, 1H, H-14) relacionado ao hidrogênio ligado a anel aromático. Ainda revelou sinais característicos do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  1,17 (d, 3H, J = 6,8, H-16),  $\delta_{\rm H}$  1,08 (d, 3H, J = 6,8, H-17) e  $\delta_{\rm H}$  3,03 (sept, 1H, J = 6,8, H-15).

No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY (Fig. 60, p. 83) foram evidenciadas as correlações de HC-P5 semelhantes as de HC-P2. Foram evidenciadas as correlações entre o sinal do grupo isopropil em  $\delta_{\rm H}$  3,03 (H-15) com os sinais em  $\delta_{\rm H}$  1,17 (d, 3H, H-16) e  $\delta_{\rm H}$  1,08 (d, 3H, H-17). Além destas, foram evidenciadas as correlações dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,94 (H-6) com os em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (H-7) e as correlações entre os hidrogênios do subsistema do anel ciclohexânico (Fig. 51, abaixo).



Figura 51 - Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P5 .

С	СН	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
178,4 (C=O)	118,9	38,0	56,0	
142,1 (-OH)	78,2 (-OR-)	27,3	31,7	
142,0 (-OH)	74,7 (-O-)	18,9	22,6	
135,1	55,5		22,1	
126,7	27,2		22,0	
123,7				
47,9				
31,8				
C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	C5H15	FM C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 9 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de HC-P5 por padrão de hidrogenação

Como observado na Tabela 9 acima, os dados espectroscópicos e o espectro de massa de baixa resolução (Fig. 62, p. 84), apresentando o pico do íon molecular com razão massa/carga (m/z) em 360 Daltons, confirmado pelo espectro de alta resolução (Fig. 63, p. 84), que forneceu picos correspondentes a molécula formando adutos com sódio [M + Na]<sup>+</sup>, em m/z 383,1822 Daltons e com potássio [M + K]<sup>+</sup> em m/z 399,1526 Daltons, revelaram para HC-P5 a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, com IDH igual a oito, justificado pelas quatro insaturações do anel benzênico, uma insaturação referente à carbonila e outras três equivalentes a dois ciclohexanos e outro ciclo, formado pelo fechamento lactônico.

A análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HMBC (Fig. 59, p. 82), mostrou os acoplamentos à distância ( ${}^{2}J_{CH}$  e  ${}^{3}J_{CH}$ ) entre os hidrogênios e os carbonos (Tabela 10, p. 79). A posição relativa do grupo metoxila em C-7 foi determinada através dos acoplamentos entre o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (H-7) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  56,0 (C-21), além dos acoplamentos entre o hidrogênio de carbono aromático em  $\delta_{\rm H}$  6,83 (H-14) e o carbono em  $\delta_{\rm C}$  78,2 (C-7), e do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  3,60 (H-21) com o carbono 7 (Fig. 52. I, abaixo).

A confirmação da posição do anel lactônico foi observada através dos acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,94 (H-6) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  178,4 (C-20), do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  1,95 (H-5) com o carbono carbonílico em  $\delta_{\rm C}$  178,4 (C-20), além do acoplamento do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (H-7) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  74,7 (C-6), respectivamente (Fig. 52. II, abaixo).

A localização das hidroxilas fenólicas e do grupo isopropila, foi determinada, observando os acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  6,83 (H-14) com os carbonos em  $\delta_{\rm C}$  78,2 (C-7) e 27,2 (C-15), do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (H-7) com o carbono aromático em  $\delta_{\rm C}$  118,9 (C-14), dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  1,08 (3H, H-16) e  $\delta_{\rm H}$  1,17 (3H, H-17) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  27,2 (C-15), respectivamente (Fig. 52. III, abaixo).



Figura 52 – Sub-estruturas de HC-P5, mostrando as correlações de acordo com o espectro de HMBC.

A comparação dos dados de HC-P5 com os de HC-P2 mostrou uma semelhança estrutural entre estes compostos, diferindo apenas nos deslocamentos de carbono e hidrogênio no carbono 5 e nos hidrogênios 5, 6 e 7. Desta forma foi construído o modelo tridimensional da molécula e verificou-se que a mudança na estereoquímica da metoxila em C-7, afetaria os deslocamentos de carbono e hidrogênio em C-5. Essas observações foram corroboradas pelo espectro de NOESY.

No espectro 2D, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H, NOESY (Fig. 61, p. 83) de HC-P5 foi evidenciada a correlação entre o sinal de hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  1,95 (H-5) com o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,44 (H-7), analisando que estes tem a mesma estereoquímica  $\alpha$ , corroborando a estereoquímica da metoxila em C-7 como sendo  $\beta$  (Fig. 53, abaixo) diferindo do espectro 2D, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H, NOESY de HC-P2, do qual não evidencia esta correlação, pois os hidrogênios possuem configurações diferentes, uma vez que a metoxila encontra-se na posição  $\alpha$ . A estereoquímica dos hidrogênios ligados ao anel ciclohexano foram confirmadas pelo espectro de NOESY, observando as correlações entre os hidrogênios axiais e equatoriais.



Figura 53 – Subestrutura de HC-P5, mostrando as correlações de acordo com o espectro de NOESY.

Concluiu-se assim que HC-P5 tratava-se de um epímero de HC-P2, sendo caracterizado como o diterpeno  $7\beta$ -metoxirosmanol ou epimetilrosmanol que através de comparação com os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de HC-P2 e os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C registrados de acordo com AHMED, 2006 (Tabela 10, p. 79). Este composto foi isolado anteriormente de *Salvia dorrii* L. (Lamiaceae), e no gênero *Hyptis* na espécie *Hyptis dilatata* houve relato do composto acetilado, pois as frações antes de serem submetidas à cromatografia foram acetiladas (URONES, 1998). Então concluiu-se que o composto  $7\beta$ -metoxirosmanol não é inédito no gênero.

# Resultados e Discussão

НС-Р5						HC-P2		
	HSQC		HMBC			HSQC		
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$^{2}J_{\rm CH}$	$^{3}J_{\rm CH}$	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{ m H}$		
1α 1β	27,3	1,95 (m, 1H) 3,21 (m, 1H)			27,1	1,91 (m, 1H) 3,18 (dl, <i>J</i> =14 1H)		
2α 2β	18,9	1,64 (m, 1H) 1,55 (m, 1H)	1,95		18,9	1,61 (m, 1H) 1,51 (m, 1H)		
3α 3β	38,0	1,17 (m, 1H) 1,45 (m, 1H)		1,00;0,96	37,9	1,42 (m, 1H) 1,18 (m, 1H)		
4	31,8	-	1,95	4,94	31,6			
5	55,5	1,95 (s, 1H)	4,94		55,4	1,90 (s, 1H)		
6	74,7	4,94 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz)	4,44		74,7	4,92 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz)		
7	78,2	4,44 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz)	4,94	6,83; 3,60;1,95	78,2	4,40 (d, 1H, <i>J</i> = 3,0 Hz)		
8	126,7	-	4,44	4,94	123,5	-		
9	123,7	-		6,83; 4,44;1,95	126,5	-		
10	47,9	-	1,95	4,94	47,9	-		
11	142,1	-			142,5	-		
12	142,0	-		6,83	142,1	-		
13	135,1	-		1,17;1,08	135,5	-		
14	118,9	6,83 (s, 1H)		4,44	118,9	6,77 (s, 1H)		
15	27,2	3,03 (m, 1H)		6,83	27,2	3,00 (sept, <i>J</i> = 7,0 Hz 1H)		
16	22,1	1,08 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)			22,1	1,01 (d, $J = 7,0$ Hz)		
17	22,6	1,17 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)			22,7	1,12 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz)		
18	31,7	1,00 (s, 3H)			21,9	0,92 (s, 3H)		
19	22,0	0,96 (s, 3H)		1,95	31,8	0,97 (s, 3H)		
20	178,4			4,94; 1,95	178,9	_		
21	56,0	3,60 (s, 3H)			56,0	3,57 (s, 3H)		

**Tabela 10** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5, comparados com os valores da literatura de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do diterpeno abietano  $7\beta$ -metoxirosmanol.





Figura 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P5



Figura 55 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5



h M p 

Figura 56 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5



Figura 57 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5



Figura 58 – Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5



Figura 59 – Espectro de HMBC (500 e 125 MHz,  $CDCl_3$ ) de HC-P5



7.0

6.5

7.5

5.5 5.0 4.5 4.0

Figura 60 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5



Figura 61 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P5

pp

I

3.0 2.5 2.0

83



Figura 62 – Espectro de massa de baixa resolução de HC-P5



Figura 63 – Espectro de massa de alta resolução de HC-P5

#### 5.2.5 Determinação estrutural do galdosol (HC-P3)

HC-P3 foi obtido com um aspecto resinoso, seguindo o mesmo procedimento experimental para HC-P1 e HC-P2 (item 6.6.4.1, p. 113). A substância isolada (HC-P3) apresentou  $[a]_D^{20} = +21^\circ$  (c = 0,166g, CHCl<sub>3</sub>).

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 65, p. 89) exibiu bandas semelhantes aos diterpenos discutidos anteriormente, mas foi o único que apresentou uma banda larga em  $3437 \text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de ligação O-H de hidroxila, absorções em 1780 cm<sup>-1</sup> e em 1697 cm<sup>-1</sup> relacionado as deformação axial de ligação C=O de éster cíclico e de cetona conjugada, respectivamente, além das absorções características de deformações axiais de ligação C=C de anel aromático em 1603, 1560 e 1522 cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 68, p. 90) de HC-P3, exibiu 19 linhas espectrais, observando um sinal mais intenso em  $\delta_{\rm C}$  22,2, sugerindo a presença de dois átomos de carbono para este sinal. Os dados observados mostraram-se similares aos observados para os compostos anteriores (HC-P1, HC-P2, HC-P4 e HC-P5). A diferença mais significativa observada foi o desaparecimento do sinal relativo ao carbono sp<sup>3</sup> oxigenado em C-7 e o aparecimento de um carbono carbonílico adicional na molécula. A análise comparativa com o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 69, p. 91) revelou a presença de três carbonos metínicos, sendo um em  $\delta_{\rm C}$  81,4 (C-6) oximetínico, três carbonos metilênicos, quatro carbonos metílicos, quatro carbonos não hidrogenados sp<sup>2</sup>, dois carbonos carbonílicos [ $\delta_{\rm C}$  189,9 (C-7) e 177,7 (C-20)] e dois carbonos sp<sup>3</sup> quaternários [ $\delta_{\rm C}$  32,7 (C-4) e 49,8 (C-10)] (Tabela 11, p. 86).

Semelhante aos compostos anteriormente explicitados, o espectro de RMN <sup>1</sup>H de HC-P3 [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 66, p. 99 e Fig. 67, p. 90), exibiu sinais relacionados ao esqueleto abietano, através do hidrogênio aromático em  $\delta_{\rm H}$  7,66 (1H, s, H-14), sendo este mais desprotegido talvez devido a influência de um grupo desprotetor próximo, como uma carbonila. Mostrou ainda os hidrogênios do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  1,24 (6H, d, J = 5,0, H-16-17) e  $\delta_{\rm H}$  3,11 (1H, m, H-15), porém, para este composto foi observado apenas um sinal de hidrogênio oximetínico em  $\delta_{\rm H}$  4,73 (1H, d, H-6), diferindo dos demais compostos, em que observou-se dois hidrogênios oximetínicos.

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 72, p. 92) de HC-P3, forneceu picos correspondentes a molécula protonada em 345,1696 m/z Daltons, formando adutos com sódio  $[M+Na]^+$  em 367,1515 m/z Daltons e com potássio  $[M+K]^+$  em 383,1792 m/z Daltons,

condizente com a fórmula molecular  $C_{20}H_{24}O_5$  determinada, juntamente com os dados de RMN da Tabela 11, abaixo. Desta forma foi possível atribuir para HC-P3 um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove, justificados pelas quatro insaturações do anel benzênico, três anéis e a presença de duas carbonilas, diferindo dos outros compostos em que era observada apenas uma.

С	СН	$CH_2$	CH <sub>3</sub>	Total
189,9 (C=O)	120,8	38,0	31,8	
177,7 (C=O)	81,4 (HC-O-)	27,6	22,5	
141,4 (-OH)	60,6	19,0	22,2	
149,0 (-OH)	27,5		22,2	
134,9				
128,6				
122,4				
49,8				
32,7				
C <sub>8</sub> HO <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O	$C_3H_6$	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub>	FM C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 11 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de HC-P3 por padrão de hidrogenação.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY de HC-P3 (Figura 71, p. 92), evidenciou as mesmas correlações relacionadas ao esqueleto abietano e observadas para os compostos descritos anteriormente.

Com base no espectro RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HMBC (Fig. 70, p. 91), observou-se as correlações do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  3,11 (H-15) com o carbono oxigenado em  $\delta_{\rm C}$  149,0 (C-11) e com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  120,8 (C-14) e do hidrogênio aromático em  $\delta_{\rm H}$  7,66 (H-14) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  141,4 (C-12), verificando assim a disposição *orto* das hidroxilas no anel aromático (Fig. 64. I, abaixo).



Figura 64 - Acoplamento a longa distância (HMBC) de HC-P3

A posição do anel lactônico pôde ser determinada em função da correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  4,73 (H-6), e 2,46 (H-5) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  177,7 (C-20) (Fig. 64. II, acima). A posição da carbonila de cetona em C-7 foi determinada através das correlações dos
hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  7,66 (H-14) e 2,46 (H-5) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  189,9 (C-7) (Fig. 64. III, p. 86).

A interpretação dos dados espectroscópicos obtidos para HC-P3 (Tabela 12, p. 88), bem como a análise comparativa com dados da literatura (MARRERO, 2002), permitiram concluir que HC-P3 trata-se do diterpeno abietano denominado galdosol, isolado anteriormente de espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae), porém inédito no gênero *Hyptis*.

		HSQC		HMBC		MARRERO, 2002
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$^{2}J_{\text{ CH}}$	$^{3}J_{\rm CH}$	${}^{4}J_{\mathrm{W}}$	$\delta_{ m H}$
1α 1β	27,6	2,07 (m, 1H); 3,26 (m, 1H)				-
2α 2β	19,0	1,73 (m, 1H); 1,64 (m, 1H)	2,07			-
3α 3β	38,0	1,24 (m, 1H); 1,50 (m, 1H)		1,04; 0,98		-
4	32,7	-	1,04; 0,98; 2,45	4,73		-
5	60,6	2,46 (s, 1H)	4,73			2,46 (s, 1H)
6	81,4	4,73 (s, 1H)	2,45			4,72 (s, 1H)
7	189,9	-	4,73	7,66; 2,45		-
8	122,4	-		4,73		_
9	128,6	-		7,66; 2,45; 2,07		-
10	49,8	-	2,07; 2,45	4,73		-
11	149,0	-		3,11		-
12	141,4	-			7,66	
13	134,9	-	3,11	1,24		
14	120,8	7,66 (s, 1H)		3,11		7,69 (s, 1H)
15	27,5	3,11 (m, 1H, <i>J</i> = 7,0 Hz)	1,24	7,66		3,20 (hept, $J = 7,0$ Hz, 1H)
16	22,5	1,24 (d, 3H, <i>J</i> = 6,8 Hz)	3,11	1,24		1,18 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)
17	22,2	1,24 (d, 3H, <i>J</i> = 6,8 Hz)	3,11	1,24		1,29 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)
18	31,8	1,04 (s, 3H)		0,98; 2,45		1,12 (s, 3H)
19	22,2	0,98 (s, 3H)		1,04; 2,45		0,98 (s, 3H)
20	177,7	-		2,07; 2,45; 4,73		-

**Tabela 12** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3, comparados com os valores da literatura de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do diterpeno galdosol (MARRERO, 2002).







Figura 65 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P3



Figura 66 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3



Figura 67 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H - expansão (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3



Figura 68 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3



Figura 69 – Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3



Figura 70 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3





Figura 71 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de HC-P3



Figura 72 – Espectro de massa de alta resolução de HC-P3

#### 5.2.6 Determinação estrutural do epiisorosmanol (HC-P6)

As frações (19-24) e (28-36), originárias do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da parte aérea de *H. carvalhoi* Harley, foram solubilizadas em clorofórmio e reunidas, após comparação por cromatografia em camada delgada (CCD). Nas frações reunidas observou-se um precipitado, que após filtração e posterior lavagem com clorofórmio, resultou em um sólido branco denominado HC-P6 (item 6.6.6 na pág. 118), que apresentou ponto de fusão 187,2 – 189,1 °C e rotação específica de  $[a]_D^{20} = -3^\circ$  (c = 0,066, CHCl<sub>3</sub>).

No espectro de absorção na região do IV (Fig. 75, p. 97) observaram-se absorções em 3539 e 3381 cm<sup>-1</sup> referentes à deformação axial de ligação O-H. Os estiramentos axiais de ligações C-H de carbono sp<sup>3</sup> foram representadas pelas absorções características entre 2962 e 2876 cm<sup>-1</sup>. Além desses a absorção em 1718 cm<sup>-1</sup>, foi relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila e a absorção em 1014 cm<sup>-1</sup> pode ser deformação axial da ligação C-O. Por último pôde-se destacar a banda de estiramento axial da ligação C=C característica de anel aromático em 1456 cm<sup>-1</sup>.

Os dados observados no espectro de RMN <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de HC-P6 (Fig. 77, p. 98) e a comparação com espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° de HC-P6 (Fig. 78, p. 98) revelou o sinal de carbono aromático hidrogenado em  $\delta_{\rm C}$  116,4 (C-14), quatro carbonos metínicos, sendo dois oximetínicos em  $\delta_{\rm C}$  69,3 (C-6) e  $\delta_{\rm C}$  81,8 (C-7) e quatro carbonos metílicos. Os demais sinais foram referentes a oito carbonos não hidrogenados, sendo um carbono carbonílico em  $\delta_{\rm C}$  178,3 (C-20) e cinco sinais entre  $\delta_{\rm C}$  123,0 (C-9) e 144,9 (C-11) correspondentes aos carbonos do anel aromático, sendo dois oxigenados [ $\delta_{\rm C}$  144,6 (C-12) e 144,9 (C-11)]. Ainda mostrou dois sinais referentes a carbonos quaternários em  $\delta_{\rm C}$  49,5 (C-10) e 35,3 (C-4) e três carbonos metilênicos em  $\delta_{\rm C}$  20,0 (C-2), 30,2 (C-1) e 42,3 (C-3) (Tabela 13, p. 94).

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HSQC (Fig. 79, p. 99) tornou possível a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, como observado na Tabela 14 da pág. 96.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de HC-P6 (Fig. 76, p. 97) mostrou um singleto mais desprotegido em  $\delta_{\rm H}$  6,77 (s, 1H, H-14) ), relacionado a hidrogênio ligado a anel aromático. Os demais sinais foram referentes a sinais característicos do grupo isopropila em  $\delta_{\rm H}$  1,20 (d, 6H, J = 4,8, H-17),  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 6H, J = 4,8, H-16) e em  $\delta_{\rm H}$  3,25 (sept,1H, J = 5,0, H-15) e dos dois sinais de hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,30 (1H, d, J = 4,0, H-6) e em 5,13 (1H, d, J = 4,0, H-7).

No espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY (Fig. 81, p. 100) foram evidenciadas as mesmas correlações entre o sinal do hidrogênio do carbono metínico do grupo isopropil em  $\delta_{\rm H}$ 3,25 (sept, J = 5,0 Hz, H-15) e os sinais dos hidrogênios de carbonos metílicos em  $\delta_{\rm H}$  1,20 (d, 6H, J = 4,8, H-17) e  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, 6H, J = 4,8, H-16) e ainda as correlações dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\rm H}$  4,30 (1H, d, J = 4,0, H-6) com os em 5,13 (1H, d, J = 4,0, H-7). Ainda observou as correlações do hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  4,30 (1H, d, J = 4,0, H-6) com o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  1,38 (1H, d, J = 5,0, H-5). Além dessas correlações foram evidenciadas as correlações entre os hidrogênios de carbonos metilênicos do subsistema do anel ciclohexano (Fig. 73, abaixo).



Figura 73 – Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no COSY de HC-P6.

С	СН	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
178,3 (C=O)	116,4	42,3	32,7	
144,9 (-OH)	81,8 (-OR-)	30,2	21,6	
144,6 (-OH)	69,3 (-OH)	20,0	23,4	
136,2	56,7		23,2	
129,6	28,1			
123,0				
49,5				
35,3				
$C_8H_2O_3$	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub>	FM C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>

Tabela 13 – Deslocamentos químicos RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de HC-P6 por padrão de hidrogenação

Os dados espectroscópicos observados na Tabela 14 acima e o pico do íon molecular com razão massa/carga (m/z) em 346 Daltons (Figs. 82, p. 100 e 83, p. 101) revelaram para HC-P6 a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, com IDH igual a oito, justificado pelas quatro insaturações do anel benzênico, uma insaturação referente à carbonila e outras três equivalentes a três anéis.

A análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C – HMBC (Fig. 80, p. 99), mostrou os acoplamentos à distância (<sup>2</sup>*J*CH e <sup>3</sup>*J*CH) entre os hidrogênios e os carbonos (Tabela 14, p. 96). Os acoplamentos entre o hidrogênio do carbono metínico em  $\delta_{\rm H}$  5,13 (d, *J* = 4,0 Hz, H-7), o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  1,38 (d, *J* = 5,0 Hz H-5) e o hidrogênio do carbono metilênico em  $\delta_{\rm H}$  2,57 (td, *J* = 15; 5,0 Hz, H-1 $\beta$ ), todos com carbono carbonílico em  $\delta_{\rm C}$  178,3 (C-20), confirmou

a posição do anel lactônico em C-7, observando um fechamento diferente dos compostos isolados anteriormente, em que o carbono carbonílico não acoplava com o carbono 7, mas com o carbono 6 (Fig. 74. I, abaixo). O fechamento da lactona em C-7 causa uma diferença nas multiplicidades e nos deslocamentos dos hidrogênios 5 ( $\delta_{\rm H}$  1,38, d) e 6 ( $\delta_{\rm H}$  4,30, dd), este último observa-se como um tripleto largo no espectro.

Através do espectro de RMN HMBC observaram-se ainda as correlações entre o hidrogênio em  $\delta_{\rm H}$  6,77 (H-14) com os carbonos em  $\delta_{\rm C}$  81,8 (C-7) e 28,1 (C-15), confirmando a posição *orto* das hidroxilas ligadas ao anel aromático. Verificou-se que a posição das hidroxilas é a mesma dos compostos anteriormente explicitados. A posição do grupo isopropila foi a mesma dos compostos anteriores, determinada pelos acoplamentos entre os hidrogênios em  $\delta_{\rm H}$  1,20 (d, J = 4,8 Hz, H-17) e em  $\delta_{\rm H}$  1,22 (d, J = 4,8 Hz, H-16) com o carbono em  $\delta_{\rm C}$  28,1 (C-15), respectivamente (Fig. 74. II, abaixo).



Figura 74 - Sub-estruturas mostrando as correlações observadas no HMBC de HC-P6.

A interpretação dos dados espectroscópicos obtidos para HC-P3 (Tabela 14, p. 96), bem como a análise comparativa com dados da literatura (PULKALSKAS, 2005), permitiram concluir que HC-P6 trata-se do diterpeno abietano denominado epiisorosmanol, isolado anteriormente de espécies do gênero *Salvia, Rosmarinus* (Lamiaceae), porém inédito no gênero *Hyptis*.

I

**Tabela 14** – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6, comparados com os valores da literatura (PULKALSKAS, 2005) de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) para o diterpeno abietano epiisorosmanol.

		HC-P6			PULKALSKAS, 2005
		HSQC	HM	IBC	Epiisorosmanol
С	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$	$^{2}J_{\text{CH}}$	$^{3}J_{\text{CH}}$	
1α 1β	30,2	2,57 (td, <i>J</i> = 15; 5,0 Hz, 1H) 2,78 (dl, <i>J</i> = 15,0 Hz, 1H)			2,78 (d, <i>J</i> = 14; 4,0 Hz, 1H) 2,57 (ddd, <i>J</i> = 4,5; 13,3 Hz, 1H)
2α 2β	20,0	1,86 (m, 1H) 1,60 (m, 1H)	2,57		1,87 (m, 1H) 1,59 (m, 1H)
3α 3β	42,3	1,31 (m, 1H) 1,49 (m, 1H)		1,02; 0,90	1,50 (d, <i>J</i> = 12,3 Hz, 1H) 1,31 (m, 1H)
4	35,3	-	1,38; 1,02; 0,90	4,30	-
5	56,7	1,38 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz 1H)		5,13; 1,02; 0,90	1,38 (d, <i>J</i> = 4,2 Hz, 1H)
6	69,3	4,30 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H)	5,13; 1,38		$6\beta$ 4,30 (dd, $J = 4,3$ ; 4,2 Hz, 1H)
7	81,8	5,13 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1H)	4,30	6,77	$7\alpha$ 5,13 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H)
8	129,6	-		5,13	-
9	123,0	-	5,13	6,77	-
10	49,5	-	2,57; 1,38		-
11	144,9	-			-
12	144,6	-		6,77; 3,25	-
13	136,2	-	3,25	1,20; 1,22	-
14	116,4	6,77 (s, 1H)		5,13; 3,25	6,77 (s, 1H)
15	28,1	3,25  (sept,  J = 5,0  Hz, 1H)	1,20; 1,22	6,77	3,28 (m, 1H)
16	23,2	1,22 (d, <i>J</i> = 4,8 Hz, 3H)	3,25	1,20	1,21 (d, <i>J</i> = 6,7 Hz, 3H)
17	23,4	1,20 (d, J = 4,8 Hz, 3H)	3,25	1,22	1,20 (d, J = 6,8 Hz, 3H)
18	32,7	1,02 (s, 3H)		1,38; 0,90	1,02 (s, 3H)
19	21,6	0,90 (s, 3H)		1,38; 1,02	0,90 (s, 3H)
20	178,3	-		5,13; 2,57; 1,38	-





Figura 75 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de HC-P6



Figura 76 – Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6



Figura 77 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6



Figura 78 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° (125MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6



Figura 79 – Espectro de HSQC (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6



Figura 80 – Espectro de HMBC (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6





Figura 81 – Espectro de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H, COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de HC-P6



Figura 82 – Espectro de massa de baixa resolução de HC-P6



Figura 83 – Espectro de massa de baixa resolução - expansão de HC-P6

#### 5.3 Avaliação do potencial citotóxico

#### 5.3.1 Ensaio das amostras isoladas de H. carvalhoi Harley

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela 15, abaixo, com seus respectivos percentuais de inibição. A substância destacada foi escolhida para avaliação subseqüente por apresentar valor de inibição  $\geq 75\%$  em pelo menos uma linhagem tumoral testada, valor esse considerado como ponto mínimo de atividade para o ensaio de novas substâncias com potencial antitumoral.

**Tabela 15** – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais HCT-8 (cólon-humano), MDAMB-435 (mama-humano) e SF-295 (glioblastoma – humana) testadas na dose única de  $5\mu$ g/mL. Valores são média <u>+</u> DPM.

Amostra		HCT-8		MDAMB-435		SF-295	
N°	Identificação	CI% (média)	SD	CI% (média)	SD	CI% (média)	SD
1	HC-P1	97,65%	0,44%	38,05%	1,25%	0,00%	0,00%
2	HC-P2	76,49%	2,75%	16,03%	5,34%	0,00%	0,00
3	HC-P4	54,47%	3,47%	40,38%	3,86%	25,14%	7,65%
4	HC-P5	29,78%	29,78%	17,08%	0,23%	6,21%	5,39%
5	HC-P6	9,33%	9,33%	20,45%	3,41%	0,00%	0,00

CI% - concentração inibitória

Pelos dados apresentados na Tabela 15 acima, a substância HC-P1, que trata-se do diterpeno  $7\alpha$ -etoxirosmanol, apresentou-se mais ativo frente as células tumorais de cólonhumano e foi submetido a teste para cálculo de sua CI<sub>50</sub>. Analisando a tabela observa-se que HC-P2 também mostrou-se mais ativo, porém seu desvio padrão foi maior que para HC-P1.

#### 5.3.2 Cálculo da IC<sub>50</sub> da amostra HC-P1

Com os resultados apresentados na Tabela 16, abaixo, verifica-se que HC-P1 apresentou uma boa atividade citotóxica, pois de acordo com o protocolo do National Cancer Institute (NCI), valores de  $CI_{50} \leq 4 \mu g/mL$ , devem ser considerados significativos para substâncias puras.

**Tabela 16** – Valores da  $CI_{50}$  em µg/mL das substâncias avaliadas pelo método do MTT nas linhagens de HL-60, SF-295, MDAMB-435 e HCT-8 com incubação de 72hs. Maior concentração testada: 5 µg/mL

Amostras	HL-60	SF-295	MDAMB-435	HCT-8
HC-P1	>5	>5	>5	>5



# PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Procedimentos Experimentais

#### 6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 6.1 - Métodos cromatográficos

#### 6.1.1 - Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção em coluna foram empregadas, como fase estacionária, gel de sílica 70-30 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da marca Merck para cromatografia sob média pressão (cromatografia flash). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se gel de sílica 60 F 254 da Merck em placas de vidro e cromatoplacas Merck de gel de sílica 60 F $_{254}$  sobre alumínio.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Todos os solventes eram de qualidade P.A., destilados ou com grau CLAE.

As revelações das substâncias nas cromatoplacas analíticas foram realizadas pela pulverização com solução de vanilina ( $C_8H_8O_3$ ) e ácido perclórico ( $CClO_4$ ) em etanol P.A., seguido de aquecimento em chapa aquecedora a 100°C, até o aparecimento de coloração.

#### 6.1.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os fracionamentos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados em equipamento constituído de uma bomba ternária Shimadzu LC-20AT e um detector Shimadzu SPD-M20A, utilizando coluna Phenomenex (10 x 150 mm, 5µm).

Os solventes empregados como fase móvel foram hexano, clorofórmio e acetato de etila com grau de pureza CLAE, que foram filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45µm (Phenomenex), seguido de desgaseificação por sonicação à vácuo durante 5 minutos. As amostras foram dissolvidas com os solventes utilizados nas fases móveis empregadas em cada análise, e filtradas num sistema manual através de membranas de teflon com poros de 0,45µm (Waters).

#### 6.2 - Métodos espectroscópicos e espectrométricos

#### 6.2.1 - Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Espectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Utilizaram-se pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) para análise das amostras.

#### 6.2.2 - Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa dos óleos essenciais extraídos de *H. carvalhoi* Harley foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, em espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50, através de impacto eletrônico a 70eV (CG/EM).

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos no modo positivo usando um espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) – SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por electrospray pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC).

# 6.2.3 - Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C)

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Brucker, modelo Avance DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na freqüência do hidrogênio a 500 MHz, e na freqüência do carbono a 125 MHz, respectivamente.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio ( $\delta$  7,27) e metanol ( $\delta$  3,31). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio ( $\delta$  77,0) e metanol ( $\delta$  49,0) (PAVIA, LAPMAN e KRIZ, 2001).

## Procedimentos Experimentais

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (dupleto), t (tripleto), e m (multipleto).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135°, CH e CH<sub>3</sub> com amplitudes em oposição aos CH<sub>2</sub> foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN <sup>13</sup>C, descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH<sub>2</sub> (carbono metilênico) e CH<sub>3</sub> (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro CPD.

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HSQC e HMBC), realizados em aparelho Brucker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A.

#### 6.3 - Outras determinações

#### 6.3.1 - Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados no equipamento de microdeterminação Mettler Toledo, localizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 2º C/min e não foram corrigidos.

#### 6.3.2 - Rotação óptica

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sendo as medidas realizadas a 589 nm (20 °C).

#### 6.4 - Material vegetal

#### 6.4.1 - Hyptis carvalhoi Harley

As folhas e inflorescências de *Hyptis carvalhoi* Harley foram coletadas no município de Mucujê, na Chapada Diamantina-BA pelo prof. Edilberto Rocha Silveira da Universidade Federal do Ceará, e identificada pela botânica Profa. Maria Lenise Silva Guedes do Instituto de Biologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal da Bahia. A exsicata referente à coleta encontra-se depositada no Herbário Alexandre Leal Costa, no Departamento de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o registro de número 78091.

#### 6.5 - Estudo dos constituintes voláteis de Hyptis carvalhoi Harley

A extração dos constituintes do óleo essencial das folhas e inflorescências de *H. carvalhoi* Harley foi realizada utilizando o método da hidrodestilação e o óleo foi coletado em um aparelho doseador de óleo essencial tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb.

A análise dos constituintes do óleo essencial foi realizada através do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) descrito no item 5.1, p. 39

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada através da determinação dos índices de Kovats simulados (ALENCAR et al., 1990), pesquisa em espectroteca e comparação com dados da literatura (ADAMS, 1989). Os resultados encontram-se na pág. 40, Tabela 2.

#### 6.5.1 - Obtenção do óleo essencial (Fluxograma 1, p. 108)

As folhas e inflorescências frescas de *H. carvalhoi* Harley, pesando 0,540 Kg, foram colocadas em balão de vidro de 5 L, juntamente com 2,5 L de água destilada e extraídas pelo método de hidrodestilação. Após a extração com o vapor d'água, que durou aproximadamente 3 horas, a mistura (água+óleo) contida no doseador foi separada utilizando-se um funil de separação. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O óleo obtido (1,23 g) com rendimento de 0,23%, foi enviado para análise dos constituintes por cromatografia gásosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Os dados referentes à coleta e extração dos óleos essenciais estão resumidos na Tabela 17, p. 108.

Procedimentos Experimentais

DATA DA COLETA	PARTE DA PLANTA	PESO (g)	PESO DO ÓLEO (g)	TEOR (%)	SIGLA
27.02.2009	Folhas e inflorescências	540	1,23	0,23	HCFI-OE

Tabela 17 – Dados da extração do óleo essencial de H. carvalhoi Harley



Fluxograma 1 – Método de extração do óleo essencial das folhas e inflorescências de H. carvalhoi Harley

#### 6.6 – Isolamento dos constituintes não-voláteis de Hyptis carvalhoi Harley

# 6.6.1 Obtenção dos extratos hexânico (HCFIH) e etanólico (HCFIE) da parte aérea de *H. carvalhoi* Harley (Fluxograma 2, abaixo)

1,54 Kg de folhas, inflorescências e caules (parte aérea) de *H. carvalhoi* Harley, secos e moídos foram submetidos à maceração em 6L de hexano por 72 horas. A extração foi realizada em triplicata e a solução foi rotoevaporada sob pressão reduzida. O extrato hexânico, de coloração esverdeada, foi obtido e denominado HCFIH (68,5 g, rendimento = 4,45%). O mesmo procedimento foi realizado utilizando etanol para obtenção do extrato etanólico na forma de um sólido verde, denominado HCFIE (170,0 g, rendimento = 11,04%).



Fluxograma 2 – Obtenção dos extratos hexânico e etanólico da parte aérea de Hyptis carvalhoi Harley

#### 6.6.2 - Tratamento e fracionamento cromatográfico do extrato etanólico (HCFIE)

Uma alíquota (70,0 g) do extrato etanólico foi solubilizada em uma mistura de  $CH_3OH$ :  $H_2O$  (1:1 v/v), para a precipitação da clorofila. A mistura foi filtrada e a soluçãomãe foi evaporada em rotaevaporador, obtendo-se 13,0 g do extrato hidroalcoólico (HCFIE-H). Uma alíquota de 10,0 g de HCFIE-H foi submetida a sucessivas cromatografias flash, totalizando seis colunas. Em todas as colunas utilizou-se como fase estacionária gel de sílica flash, e como fase móvel os solventes: hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Após este procedimento as frações semelhantes das seis colunas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas, obtendo-se 4 frações finais de cada coluna. As frações semelhantes das colunas foram reunida, das quais a fração HCFIE-HC (1,65 g) foi objeto de estudo, devido uma análise prévia desta por RMN <sup>1</sup>H, em que observou-se uma possível presença de diterpenos, identificados por sinais característicos.

#### 6.6.3 - Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC

A fração HCFIE-HC (1,65 g) foi adsorvida em 1,8 g de gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 66,4 g de gel de sílica em coluna de 3,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH nas proporções indicadas na Tabela 19, abaixo. As frações semelhantes foram reunidas após comparação por CCD, para obtenção de 12 frações resultantes.

FRAÇÕES	ELUENTE	PESO (g)
HCFIE-HC-(1-5)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,015
HCFIE-HC-(6-18)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 3%	0,320
HCFIE-HC -(19-24)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 3%	0,068
HCFIE-HC-(25 - 27)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 3%	0,351
HCFIE-HC -(28-36)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 5%	0,421
HCFIE-HC-(37-38)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 5%	0,025
HCFIE-HC-(39-42)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 5%	0,085
HCFIE-HC-(43-46)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 5%	0,036
HCFIE-HC-(47-60)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 7%	0,032
HCFIE-HC -(61-65)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 15%	0,005
HCFIE-HC-(66-67)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 50%	0,008
HCFIE-HC -(68-70)	100% CH <sub>3</sub> OH	0,026
TOTAL		1,39
RENDIMENTO		84,24%

Tabela 18 – Coluna cromatográfica de HCFIE-HC

#### 6.6.4 - Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC-(6-18) (Fluxograma 3, p. 114)

A fração HCFIE-HC-(6-18) (320,0 mg) foi recromatografada em coluna flash ( $\Phi$ = 2,5 cm) sobre gel de sílica (36,5 g) e eluída com CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH de acordo com as proporções mostradas na Tabela 19, abaixo. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações semelhantes foram reunidas, levando a obtenção de 5 frações resultantes.

FRAÇÕES	ELUENTE	PESO (g)
HCIFIE-HC-(6-18)-(1-6)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,011
HCIFIE-HC-(6-18)-(7-13)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,039
HCIFIE-HC-(6-18)-(14-35)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,211
HCIFIE-HC-(6-18)-(36-62)	CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH 50%	0,049
HCIFIE-HC-(6-18)-(63-65)	100% CH <sub>3</sub> OH	0,008
TOTAL		0,318
RENDIMENTO		99,37%

Tabela 19 – Coluna cromatográfica de HCFIE-HC- (6-18)

A fração HCIFIE-HC-(6-18)-(14-35) (211 mg), foi recromatografada em gel de sílica (14,0 g), utilizando coluna de 2 cm de diâmetro e eluída com Hexano/CHCl<sub>3</sub> (1:9 v/v) de forma isocrática. As frações semelhantes foram reunidas, e após análise em CCD obteve-se 6 frações resultantes, de acordo com a Tabela 20, abaixo.

Tabela 20 – Coluna cromatográfica de HCFIE-HC- (6-18)-(14-35)

FRAÇÕES	ELUENTE	PESO (g)
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(1)	Hexano/CHCl <sub>3</sub> 90%	0,004
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(2-14)	Hexano/CHCl <sub>3</sub> 90%	0,017
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(15-18)	Hexano/CHCl <sub>3</sub> 90%	0,014
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(19-24)	Hexano/CHCl <sub>3</sub> 90%	0,041
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(25-52)	Hexano/CHCl <sub>3</sub> 90%	0,114
HCFIE-HC-(6-18)-(14-5)-(53-70)	100% CH <sub>3</sub> OH	0,016
TOTAL		0,206
RENDIMENTO		97,63%

# 6.6.4.1 - CLAE de HCFIE-HC-(6-18)-(14-35)-(25-52) – Isolamento de HC-P1, HC-P2 e HC-P3

A fração HCFIE-HC-(6-18)-(14-35)-(25-52) (114 mg) submetida a CLAE, provido de coluna de fase normal e utilizando a fase móvel hexano/AcOEt (75:25, v/v) em um fluxo de 3mL/min. Selecionou-se a detecção do UV para uma faixa de 280 – 400 nm e obteve-se um cromatograma (Fig. 84, abaixo) que exibiu 3 picos majoritários cujos tempos de retenção foram 5,91 min (pico 1), 6,49 min (pico 2) e 7,93 min (pico 3). O pico 1 rendeu 14,0 mg de um sólido amarelado com ponto de fusão 175,1 - 177,1 °C, designado HC-P1. O pico 2 levou ao isolamento de 32,0 mg de um sólido alaranjado com ponto de fusão 181,3 - 182,3°C, designado HC-P2, e o pico 3 rendeu 11,0 mg de uma substância com aspecto resinoso, designada HC-P3, respectivamente (Fluxograma 3, p. 114).



Figura 84 - Cromatograma de HC-P1, HC-P2 e HC-P3



Fluxograma 3 – Fracionamento de HCFIE-HC-(6-18)

# 6.6.5 - Fracionamento cromatográfico de HCFIE-HC-(25-27) (Fluxograma 4, p. 117)

A fração HCFIE-HC-(25-27) (351,0 mg) foi adsorvida em 1,23 g de gel de sílica, pulverizada e acondicionada sobre 28,0 g de gel de sílica em coluna flash com 2,5 cm de diâmetro, utilizando CHCl<sub>3</sub> como fase móvel. As frações obtidas foram comparadas por CCD, e reunidas de acordo com seus Rfs, resultando em 8 frações (Tabela 21, abaixo).

FRAÇÕES	ELUENTE	PESO (g)
HCFIE-HC-(25-27)-(1)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,006
HCFIE-HC-(25-27)-(2-14)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,015
HCFIE-HC-(25-27)-(15-20)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,021
HCFIE-HC-(25-27)-(21-36)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,187
HCFIE-HC-(25-27)-(37-49)	100% CHCl <sub>3</sub>	0,046
HCFIE-HC-(25-27)-(50-57)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 50%	0,029
HCFIE-HC-(25-27)-(58-61)	CHCl <sub>3</sub> / CH <sub>3</sub> OH 50%	0,011
HCFIE-HC-(25-27)-(62)	100% CH <sub>3</sub> OH	0,002
TOTAL		0,317
RENDIMENTO		90,31%

Tabela 21 – Coluna cromatográfica de HCFIE-HC- (25-27)

#### 6.6.5.1 -CLAE de HCFIE-HC-(25-27)-(21-36) - Isolamento de HC-P4 e HC-P5

Uma alíquota de HCFIE-HC-(25-27)-(21-36) (119,6 mg) foi parcialmente solubilizada em uma mistura de hexano/AcOEt (60:40, v/v), e com esse procedimento obteve-se um precipitado branco. Separou-se o precipitado (53,4 mg) da solução-mãe e esta foi filtrada em um sistema manual com filtros de 0,45  $\mu$ m. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram injetadas em aparelho CLAE, provido de coluna de fase normal. A fase móvel utilizada foi hexano/AcOEt (60:40, v/v) em um fluxo de 3mL/min, e uma corrida de 10 minutos. Selecionou-se a detecção do UV para uma faixa de 280 – 400 nm e após injeção obteve-se um cromatograma (Fig. 85, abaixo) que exibiu 2 picos majoritários cujo os tempos de retenção foram 4,66 min (pico 1) e 5,27 min (pico 2). O pico 1 rendeu 15,0 mg de um sólido amarelado com ponto de fusão 221,6 - 223,6 °C, designado HC-P4 e o pico 2 levou ao isolamento de 7,0 mg de uma substância com aspecto resinoso designada HC-P5 (Fluxograma 4, p. 117).



Figura 85 – Cromatograma de HC-P4 e HC-P5



Fluxograma 4 – Fracionamento de HCFIE-HC-(25-27)

#### 6.6.6 - Recristalização de HCFIE-HC-(19-24) e (28-36)

As frações HCFIE-HC-(19-24) (68,0 mg) e a HCFIE-HC-(28-36) (421,0 mg) foram reunidas, após análise por cromatografia em camada delgada (CCD). Depois adicionou-se clorofórmio e a mistura foi aquecida visando a dissolução do material para posterior recristalização. No entanto, notou-se que somente parte do material havia sido dissolvido, formando uma solução com um precipitado em suspensão. O precipitado foi separado da solução sobrenadante por filtração e em seguida lavado com clorofórmio, fornecendo um sólido branco denominado HC-P6 (34,0 mg) e possui ponto de fusão na faixa de 187,2 - 189,1 °C. A amostra foi enviada para análise em RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sendo caracterizada como o diterpeno epiisorosmanol.

#### 6.7 Atividade de citotoxicidade in vitro

Os testes de citotoxicidade foram realizados pelo aluno Felipe Augusto Rocha Rodrigues do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo como responsável o Prof. Manoel Odorico de Moraes, a Profa. Letícia Veras Lotufo e a Profa. Cláudia do Ó Pessoa.

#### 6.7.1 Material biológico

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (Mama - humano), HCT-8 (Cólon – humano) e SF-295 (Glioblastoma – humana), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $CO_2$ .

# 6.7.2 Método da avaliação do potencial citotóxico das substâncias isoladas de *Hyptis* carvalhoi Harley

A análise da citotoxicidade pelo método do MTT foi utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et a*l., 1996).



Figura 89 – MTT é reduzido a formazan por enzimas mitocondriais

### Procedimentos Experimentais

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x  $10^6$  cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,3 x  $10^6$  para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Para o cálculo da IC<sub>50</sub> das substâncias ativas estas, previamente solubilizadas em DMSO, foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,048-25 µg/mL) e adicionadas em placa de 95 poços (100 µL / poço). Após um período de incubação de 72h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm /15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e adicionado-se ao mesmo 150 µL de solução de MTT 10% em RPMI, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por 3h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm / 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspendido em 150 µL de DMSO e agitado por 10 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro da placa a um comprimento de onda de 550 nm.

#### 6.7.3 Análise estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular. O cálculo das IC<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear, usando o programa *GraphPad Prism*.


Conclusão

### 7. CONCLUSÃO

A prospecção química do extrato etanólico das partes aéreas de H. carvalhoi Harley, empregando métodos cromatográficos, inclusive cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), resultou no isolamento e caracterização de constituintes não-voláteis pertencentes à química dos diterpenos abietanos, 7α,11,12-trihidroxi-6,10classe como: (epoximetano)abietan-8,11,13-trien-20-ona (rosmanol) (HC-P4), 7α-etoxi-11,12-trihidroxi-6,10-(epoximetano)abietan-8,11,13-trien-20-ona (7α-etoxirosmanol) (HC-P1), 7α-metoxi-11,12-trihidroxi-6,10-(epoximetano)abietan-8,11,13-trien-20-ona (7α-metoxirosmanol) (HC-P2). 7β-metoxi-11,12-trihidroxi-6,10-(epoximetano)abietan-8,11,13-trien-20-ona (7βmetoxirosmanol) (HC-P5), galdosol (HC-P3) e epiisorosmanol (HC-P6). Dentre as substâncias isoladas, os diterpenos rosmanol,  $7\alpha$ -metoxirosmanol e  $7\beta$ -metoxirosmanol, já possuem relatos para o gênero Hyptis, enquanto que os diterpenos  $7\alpha$ -etoxirosmanol, galdosol e epiisorosmanol possuem caráter inédito no gênero.

Além do isolamento e caracterização dos constituintes não-voláteis, foram também identificados 10 constituintes voláteis das folhas e inflorescências desta espécie [*p*-cimeno (1,92%), limoneno (6,22%),  $\gamma$ -terpineno (2,26%), linalool (1,16%),  $\beta$ -cariofileno (18,75%),  $\alpha$ -humuleno (7,54%), biciclogermacreno (5,06%), óxido de cariofileno (7,62%), globulol (47,45%)]. Dentre os constituintes identificados destaca-se o globulol que apresentou-se como constituinte majoritário.

As substâncias isoladas foram submetidas a testes de citotoxicidade *in vitro* frente às células tumorais MDA-MB435 (mama – humano), HCT-8 (cólon – humano) e SF-295 (Glioblastoma – humana). Dentre os compostos testados, HC-P1 apresentou elevado potencial citotóxico no ensaio para a linhagem de células HCT-8.

O levantamento bibliográfico dos constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Hyptis*, utilizando como fonte de consulta os sites científicos "Scifinder", "Science@Direct" e "Scielo", revelou que os diterpenos abietanos são marcadores quimiotaxonômicos, mostrando, com esses dados, que *H. carvalhoi* é uma fonte promissora desta classe de compostos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem vislumbrar a continuidade do estudo fitoquímico desta espécie, bem como a extensão a outras do mesmo gênero, visto que possui diversas classes de substâncias, algumas com estruturas diversificadas e atividade biológica comprovada.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy. San Diego: Academic Press Inc., 1989.

AHMED, A. A.; MOHAMED, A. E. H.; KARCHESY, J.; ARAKAWA, Y. Salvidorol, a norabietane diterpene with a rare carbon skeleton and two abietane diterpene derivatives from *Salvia dorii*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 424-428, 2006.

ALEMANY, A.; MARQUEZ, C.; PASCUAL, C.; VALVERDE, S.; MARTINEZ-RIPOLL, M.; FAYOS, J.; PERALES, A. New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 3583-3586, 1979.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. et al. Kovats Indices Simulation Essencial Oils Analysis. **Química Nova**, v. 13 (4), p. 282, 1990.

ALMTORP, G. T.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. **Phytochemistry**, v. 30 (8), p.2753-2756, 1991.

ALVARENGA, S. A. V., GASTMANS, J. P., RODRIGUES, G. V., MORENO, P. R. H., EMERENCIANO, V. P. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies – diterpenes in Lamiaceae. **Phytochemistry**, v. 56, p. 583-595, 2001.

AMARO-LUIS, J. M. Abietane diterpenoids from *Salvia rubescens* ssp. *Truxillensis*. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 72, p. 233-238, 1997.

ARAÚJO, E. C. C., UCHOA, D. E. A., SILVEIRA, E. R. Structure Determination of New Abietane Diterpenes from *Hyptis Martiusii* by NMR Analysis **Annals of Magnetic Resonance**, v. 2 (3), p. 119-121, 2003

ARAUJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Abietane diterpenes from *Hyptis platanifolia*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16 (6B), p. 1336-1341, 2005.

ARAÚJO, E. C. C., LIMA, M. A. S. E SILVEIRA, E. R. Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 42, p. 1049-1052, 2004.

ARISAWA, M.; HAYASHI, T.; OHMURA, K.; NAGAYAMA, K.; SHIMIZU, M.; MORITA, N. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay: Studies on "Romero", Part 2. Journal of Natural Products, v. 50 (6), p. 1164-1166, 1987.

ASPINALL, G. O.; CAPEK, P.; CARPENTER, R. C.; GOWDA, D. C.; SZAFRANEK, J. A novel L-fuco-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan from *Hyptis suaveolens*. Carbohydrate Research, v. 214 (1), p. 107-113, 1991.

AYCARD, J. P.; KINI, F.; KAM, B.; GAYDOU, E. M.; FAURE, R. Isolation and identification of spicigera lactone: complete proton and carbon-13 assignments using twodimensional NMR experiments. **Journal of Natural Products**, v. 56 (7), p.1171-1173, 1993.

BARBOSA, P. P. P.; RAMOS, C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 114-115, 1992.

BARKER, C.; DUNN, H. C.; HILDITCH, T. P. African drying oils. V. Some Nigerian and Sudanese drying oils. Journal Society Chemical Indian, v. 69, p. 71-75. 1950.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BIGGS, D. A. C.; PORTER, R. B. R.; REYNOLDS, W. F.; WILLIAMS, L. A. D. A new hyptadienic acid derivative from *Hyptis verticillata* (Jacq.) with insecticidal activity. **Natural Product Communications**, v. 3 (11), p. 1759-1762, 2008.

BOALINO, D. M.; CONNOLLY, J. D.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. F.  $\alpha$ -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64 (7), p. 1303-1307, 2003.

BORDIGNON, S. A. L. O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 1990.

BUENO, A. X., MOREIRA, A. T. S., SILVA, F. T., ESTEVAM, C. S., MARCHIORO, M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 317-323, 2006.

CAVALCANTI, E. S. B. Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste *Mentha villosa* Backer e *Bursera leptophleos* e síntese de derivados do eugenol. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará – Fortaleza-Ce, 1997.

CHUKWUJEKWU, J. C.; SMITH, P.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND, D. A.; VAN STADEN, J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. Journal of Ethnopharmacology, v. 102 (2), p. 295-297, 2005.

COSTA, J. G. M., RODRIGUES, F. F. G., ANGÉLICO, E. C., SILVA, M. R., MOTA, M. L., SANTOS, N. K. A., CARDOSO, A. L. H., LEMOS, T. L. G.. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15 (4), p. 304-309, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CAVALCANTI, B. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MORAES, M. O.; ARAUJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 388-392, 2008.

COUTINHO, H. D. M., COSTA, J. G. M., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P., LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.

De OLIVEIRA, C. M. A., SILVA, M. DO R. R., KATOA, L., DA SILVA, C. C., FERREIRA, H. D., SOUZA, L. K. H. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). Journal Brazilian Chemical Society, v. 15 (5), p. 756-759, 2004.

De VIVAR, A. R.; VIDALES, P.; PEREZ, A. L. An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. **Phytochemistry**, v. 30 (7), p. 2417-2418, 1991.

DELGADO, G.; PEREDA-MIRANDA, R.; VIVAR, A. R. Structure and stereochemistry of 4-deacetoxy-10-epi-olguine, a new δ-lactone from *Hyptis oblongifolia* Bentham (Labiatae). **Heterocycles**, v. 23 (8), p. 1869-1872, 1985.

DELLE, F. M.; MARLETTI, F.; MARINI-BETTOLO, G.; DE MELLO, J. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Diterpenoids of *Hyptis fructicosa* (Labiatae). II. Hyptol. Gazzetta Chimica Italiana, v. 107 (5-6), p. 319-321, 1977.

DENG, Y. E.; BALUNAS, M. J.; KIM, J.; LANTVIT, D. D.; CHIN, Y.; CHAI, H.; SUGIARSO, S.; KARDONO, L. B. S.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; SWANSON, S. M.; CARCACHE, E. J. DE B.; KINGHORN, A. D. Bioactive 5,6-dihydro-r-pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. Journal Natural Products, v. 72, p. 1165-1169, 2009.

DEWICK, P. M., Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach. 2 ed. John Wiley & Sons Ltda., 2002.

FALCÃO, D. Q. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de Hyptis do Estado do Rio Grande do Sul, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2003.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84 (3), p. 69-74, 2003.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GONZALEZ-CHIMEO, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. Journal of Natural **Products**, v. 62 (1), p. 45-50, 1999.

GEISSMAN, A. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism, 1969.

GERMAN, V. F. A. H. Isolation and characterization of cytotoxic principles from *Hyptis verticillata* Jacq. Journal of pharmaceutical Sciences, v. 60 (4), p. 649- 650, 1971.

GONZÁLEZ, A. G.; ANDRÉS, L. S.; HERRERA, J. R.; LUIS, J. G.; RAVELO, A. G. Abietane diterpenes with antibiotic activity from the flowers of *Salvia canariensis*. Reaction of galdosol with diazomethane. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 208-210, 1989.

GOWDA, D. C. Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis* suaveolens. **Phytochemistry**, v. 23 (2), p. 337-338, 1984.

GRASSI, P.; REYES, T. S. U.; SOSA, S.; TUBARO, A.; HOFER, O.; ZITTERL-EGLSEER, K. Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. **Journal of Biosciences**, v. 61(3/4), p. 165-170, 2006.

GRINDLEY, D. N. The component fatty acids of various Sudan vegetable oils. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 1, p. 152-155, 1950.

GUPTA, M. P.; MONGE, A.; KARIKAS, G. A.; LOPEZ DE CERAIN, A.; SOLIS, P. N.; DE LEON, E.; TRUJILLO, M.; SUAREZ, O.; WILSON, F. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. Int. J. **Pharmacognosia**, v. 34 (1), p. 19-27. 1996.

HARLEY, R. M.; REYNOLDS T. Advanced in Labiatae, Ed. Royal Botanic Gardens Kew, 1992

ISOBE, T.; DOE, M.; MORIMOTO, Y.; NAGATA, K.; OHSAKI, A. The anti-Helicobacter pylori flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29 (5), p. 1039-1041, 2006.

KASHIWADA, Y.; WANG, H.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.; YEH, E.; LEE, K. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 61 (9), p. 1090-1095, 1998.

KINGSTON, D. G. I.; RAO, M. M.; ZUCKER, W. V. Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. Journal Natural Products, v. 42 (5), p. 496-499, 1979.

KOBAYASHI, K. Components of the leaves of *Hyptis capitata*. ScienceFinder, v. 72, p. 1-3, 1952.

KUHNT, M.; PROEBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further costituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, v. 61 (3), p. 227-232. 1995.

KUHNT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry**, v. 36 (2), p. 485-489, 1994.

LEE, K.H.; LIN, Y.M.; WU, T.S.; ZHANG, DE C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I.H.; CHANG, J.J.; WU, R.Y.; YANG, T.H. Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica**, v. 54 (4), p. 308-311, 1988.

LIN, Y.L.; LEE, H.P.; HUANG, R.L.; OU, J.C.; KUO, Y.H. Studies on the constituents of *Hyptis rhomboides*. ScienceFinder., 1993

MANCHAND, P. S.; WHITE, J. D.; FAYOS, J.; CLARDY, J. Chemical constituents of tropical plants. V. Structures of suaveolic acid and suaveolol. Journal of Organic Chemistry, v. 39 (15), p. 2306-2308, 1974.

MARLETTI, F.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; DE ARAUJO, M. C. M.; CAVALCANTI, M. DA S. B.; LEONCIO D'ALBUQUERQUE, I.; LIMA, O. G. Diterpenoid quinones of *Hyptis fructicosa* (Labiatae). **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 106 (1-2), p. 119-26, 1976.

MARRERO, J. G.; ANDRE'S, L. S.; LUIS, J. G. Semisynthesis of rosmanol and its derivatives. Easy access to abietatriene diterpenes isolated from the genus *Salvia* with biological activities. **Journal Natural Products**, v. 65, p. 986-989, 2002.

MELO, A. C., MOURA, E., ANSELMO, G., MESQUITA, M., AQUINO, M., COSTA, R. Normas para apresentaçãode trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará, 2007.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae.** Tese de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 94, 1994.

MESSANA, I.; FERRARI, F.; SOUZA, M. A. DE M.; GACS-BAITZ, E. (-)-Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. **Phytochemistry**, v. 29 (1), p. 329-332, 1990.

MIRALLES, J. Study of new vegetable oil sources. Oleagineux, v. 38 (12), p. 665-667. 1983.

MIRALLES, J.; PARES, Y. Fatty acid composition of some oils from Senegalese seeds. **Revue Francaise des Corps Gras**, 27 (8-9), 393-396. 1980.

MISRA, T. N.; SINGH, R. S.; OJHA, T. N.; UPADHYAY, J. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. Journal of Natural Products, v. 44 (6), p. 735-738, 1981.

MISRA, T. N.; SINGH, R. S.; UPADHYAY, J. A natural triterpene acid from *Hyptis* suaveolens. **Phytochemistry**, v. 22(11), p. 2557-2558, 1983a.

MISRA, T. N.; SINGH, R. S.; UPADHYAY, J. Triterpenoids from *Hyptis suaveolens* roots. **Phytochemistry**, v. 22(2), p. 603-605, 1983b.

MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; GACS-BAITZ, E.; COELHO, J. S. DE B.; DE ALBUQUERQUE, I. L.; CHIAPPETA, A. DE A.; DE MELLO, J. F. Umbrosone, an orthoquinone from *Hyptis umbrosa*. **Phytochemistry**, v. 29 (12), p. 3971-3972, 1990.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotocicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983

MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GHOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis* suaveolens: a pentacyclic triterpene. Journal of Natural Products, v. 47 (2), p. 377-378, 1984.

NAYAK, U. G.; GUHA, P. C. Essential oil from *Hyptis suaveolens*. Journal of the Indian Chemical Society, 29, 183-186, 1952.

NAKATANI, N.; INATANI, R. Two antioxidative diterpenes from *Rosemary (Rosrnarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. **Agricultural Biological Chemical**, v. 48 (8), p. 2081-2085, 1984.

NOVELO, M.; CRUZ, J. G.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; CHAI, H.; MAR, W.; PEZZUTO, J. M. Chemical studies on Mexican Hyptis species. VI. Biologically active natural products from Mexican medicinal plants. II. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. Journal of Natural Products, v. 56(10), p. 1728-1736, 1993.

OHSAKI, A., KISHIMOTO, Y., ISOBE, T. e FUKUYAMA, Y. New Labdane Diterpenoids from *Hyptis fasciculata*, Chemical Pharmaceutical Bulletin, v. 53 (12), p. 1577-1579, 2005.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. Introduction to Spectroscopy. 3 ed. Thomson Learning. United States of America, 2001.

PEREDA-MIRANDA, R.; DELGADO, G. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. **Journal Natural Products**, v. 53, p. 182-185, 1990.

PEREDA-MIRANDA, R.; FRAGOSO-SERRANO, M.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. **Tetrahedron**, v. 57 (1), p. 47-53, 2001.

PEREDA-MIRANDA, R.; GARCIA, M.; DELGADO, G. Chemical studies on Mexican Hyptis species. Part 3. Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis* oblongifolia. **Phytochemistry**, v. 29 (9), p. 2971-2974, 1990.

PEREDA-MIRANDA, R.; GASCON-FIGUEROA, M. Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. Journal of Natural Products, v. 51 (5), p. 996-998, 1988.

PEREDA-MIRANDA, R.; HERNANDEZ, L.; VILLAVICENCIO, M. J.; NOVELO, M.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-pyrones from *Hyptis pectinata*. Journal Natural **Products**, v. 56, p.583-587, 1993.

PORTER, R. B. R.; BIGGS, D. A. C.; REYNOLDS, W. F. Abietane diterpenoids from Hyptis *verticillata*. **Natural Product Communications**, v. 4 (1), p. 15-18, 2009.

PORTER, R. B. R.; REESE, P. B.; WILLIAMS, L. A. D.; WILLIAMS, D. J. Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4,10(15)-dien-3-one. **Phytochemistry**, v. 40, p. 735, 1995.

PUKALSKAS, A.; van BEEK, T. A.; WAARD, P. Development of triple hyphenated HPLCradical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. **Journal of Chrmatography A**, v. 1074, p. 81-88, 2005.

RAO, B. G. V. N.; NIGAM, S. S. Chemical examination of the fixed oil from the seeds of *Hyptis suaveolens*. Indian Oil Soap Journal, v. 37 (12), p. 295-300. 1972.

RAO, B. V. G. N.; NIGAM, S. S. Amino acid composition of proteins of the seeds of the *Hyptis suaveolens* and *Benincasa hispida*. Indian Journal Applied Chemistry, v. 34 (2), p. 67-70, 1971.

RAO, K. V. R.; RAO, L. J. M.; RAO, N. S. P. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis* suaveolens. **Phytochemistry**, v. 29 (4), p. 1326-1329, 1990.

SALUJA, A. K.; SANTANI, D. D. Chemical studies of *Hyptis suaveolens* Poit. Indian Drugs, v. 21 (10), p. 423-424, 1984.

SOUZA, C. V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 2 ed. São Paulo. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA, L. K. H. OLIVEIRA, C. M. A., FERRI, P. H., OLIVEIRA JÚNIOR, J. G., SOUZA JÚNIOR, A. H., FERNANDES, O. F. L., SILVA, M. R. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 98 (7), p. 963-5, 2003.

TAKENAKA, M.; WATANABE, T.; SUGAHARA, K.; HARADA, Y.; YOSHIDA, S.; SUGAWARA, F. New antimicrobial substance against *Streptomyces scabies* from *Rosemary* (*Rosmarinus officinalis* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** v. 61 (9), p. 1440-1444, 1997.

TANOWITZ, B.D.; JUNAK, S.A.; SMITH, D.M. Terpenoids of *Hyptis emoryi*. Journal Natural Products, v. 47 (4), p. 739-40. 1984.

TIWARI, V. K.; RAJWAR, G. S.; RAWAT, G. S. Protein and amino acid contents of *Hyptis* suaveolens Poit. Journal Science Research Plants Medical, v. 1 (1), p. 48-51, 1979.

TORSSEL, K. B. G. Natural Product Chermistry – a Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secundary Metabolism, 1983.

UPADHYAY, J.; SINGH, R. S.; MISRA, T. N. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens* Poit. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 44 (2), p. 19-20, 1982.

URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L. R. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**, v. 48 (6), p. 1035-1038, 1998.

YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.; YEH, E.; LEE, K. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 61 (9), p. 1090-1095, 1998.

YAMAGISHI, T.; ZHANG, DE C.; CHANG, J. J.; MCPHAIL, D. R.; MCPHAIL, A. T.; LEE, K. H. Antitumor agents. Part 94. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and B. **Phytochemistry**, v. 27 (10), p. 3213-3216, 1988.

ZIEGLER, H. L.; JENSEN, T. H.; CHRISTENSEN, J.; STAERK, D.; HAGERSTRAND, H.; SITTIE, A. A.; OLSEN, C. E.; STAALSO, T.; EKPE, P.; JAROSZEWSKI, J. W. Possible artefacts in the in vitro determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayers: apparent antiplasmodial activity of dehydroabietinol, a constituent of *Hyptis suaveolens*. **Planta Medica**, v. 68 (6), p. 547-549, 2002.