

VICENTE CARLOS DE OLIVEIRA COSTA

**Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis*
com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostachys*
Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

João Pessoa-PB

2013

VICENTE CARLOS DE OLIVEIRA COSTA

**Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis*
com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostachys*
Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, como um dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOQUÍMICA**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

COORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa-PB

2013

C837c Costa, Vicente Carlos de Oliveira.
Contribuição ao conhecimento químico de espécies de
Hyptis com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis*
macrostrachys Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. Ex Benth. /
Vicente Carlos de Oliveira Costa.- João Pessoa, 2013.
162f. : il.
Orientador: Marcelo Sobral da Silva
Coorientador: Josean Fechine Tavares
Tese (Doutorado) – UFBPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica. 3. *Hyptis*
macrostachys. 4. *Hyptis umbrosa*. 5. Lamiaceae. 6. Hiptenol.
7. Hiptenolídio.

UFPB/BC

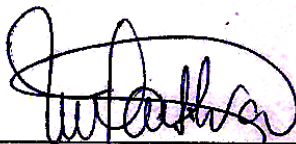
CDU: 547.9(043)

VICENTE CARLOS DE OLIVEIRA COSTA

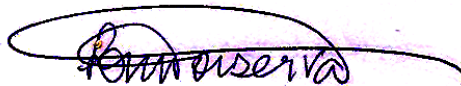
**Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis*
com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostachys*
Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.**

Aprovada em 21/11/2013

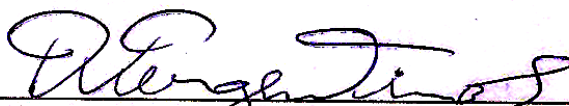
BANCA EXAMINADORA



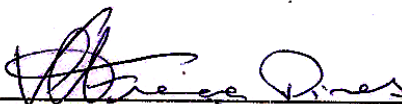
Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador



Profa. Dra. Lucia Maria Conserva
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinadora externa



Prof. Dr. Damão Pergentino de Sousa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo



Profa. Dra. Vanusia Cavalcanti França Pires
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa



Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Dedicatória

Em especial aos meus pais, Vicente Pío da Costa (in memoriam) e Eunice de Oliveira Costa, pela dignidade e exemplo de pais que sempre foram. Além de terem me ensinado a enfrentar as adversidades da vida.

Aos meus queridos filhos, Jehandeson, Suênia, Vitória e Vinicius, e ao meu neto Henrique, pela agradável convivência, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos, Wilson Petrólio de Oliveira Costa (in memoriam) e Dalva Cristina de Oliveira Costa, pela força, estímulo e incentivo que sempre me deram.

A minha esposa, Bagnólia Araújo Costa, pelo carinho, compreensão e apoio incondicional que sempre me deu, seja na vida pessoal ou profissional, por jamais ter me deixado fraquejar ou desistir dos meus ideais.

Agradecimientos

Acima de tudo agradeço a Deus pelas inúmeras vezes que me enxergou melhor do que eu sou, que sempre esteve presente, dando-me saúde e força para poder vencer mais uma etapa na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, pelo estímulo e incentivo que sempre me deu durante estes longos anos de convivência, além da dedicação, dos conselhos, dos ensinamentos, da sabedoria, da seriedade e da forma como conduziu esta orientação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, por estar sempre a disposição na hora em que foi procurado para tirar dúvidas, durante toda a elaboração deste trabalho, além dos ensinamentos teóricos no dia a dia. Obrigado pela amizade e por toda a atenção a mim dispensada.

À Profa Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela identificação das espécies em estudo.

À Profa Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante pela constante presença em todos os momentos solicitados, e por não saber dizer “não” a quem quer que seja quando procurada, independente da área de atuação. Além de seus valiosos ensinamentos, e palavras de incentivo, força e estímulo. Muito obrigado pela sua valiosa contribuição na elaboração deste trabalho.

Às Profas Dras. Maria de Fátima Vanderlei de Souza e Célia de Oliveira Chaves pelo incentivo que sempre me deram, pelos ensinamentos básicos, pela boa convivência aos longos dos anos e por estarem sempre a disposição para compartilhar os seus conhecimentos científicos.

À Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos pela amizade e ensinamentos práticos e teóricos no dia a dia, além da acessibilidade concedida a todos aqueles que lhe procuram.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pelo incentivo e atenção durante todos estes anos de convivência, além de sua valiosa contribuição científica à mim dispensada.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela obtenção do espectro de Dicroísmo Circular.

Ao Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha pela convivência e companherismo durante todos estes anos de trabalho, e por ter me dado os

primeiros ensinamentos técnicos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Ao Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior do Departamento de Biologia Molecular pelo incentivo e pela nossa parceria profissional, além é claro pela grande amizade que foi formada ao longo dos anos.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva e sua mestrande, Iara Leão Luna de Souza, pela colaboração na área da farmacologia.

Ao antigo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” estrutura onde toda a minha vida profissional e acadêmica começou. Serei sempre grato por todos os momentos bons ali vividos.

À Caroline Manguiera, secretária do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), pela atenção a mim dispensada, sempre que o procurei para obter algum esclarecimento.

À Tânia Maria Alves de Araújo, ex-secretária do PPgPNSB, pela amizade e excelente convivência ao longo dos anos, além de ser uma excelente profissional.

A Wellington de Lima Navarro pelos espectros de infravermelho e por estar sempre a disposição para ajudar quando solicitado. Além do incentivo que sempre me deu.

Aos meus velhos amigos de longas datas: Raimundo Nonato da Silva Filho, pelo incondicional apoio dentro do laboratório de fitoquímica, sempre que precisei durante todo o período de elaboração deste trabalho; José Crispim Duarte e Gilmário Moreira Lima, pelas palavras de força, incentivo e estímulo desde a inclusão na vida acadêmica.

A José Wanderley da Silva Gomes pela amizade, companheirismo e por estar disposto sempre a contribuir todas as vezes que o procurei.

A Severino Francisco Alves pela amizade formada ao longo dos anos de convivência dentro do laboratório.

A Alexandro Marinho e Sócrates Golzio pela amizade formada e pela imensa contribuição a mim prestada no laboratório de RMN nos momentos em que precisei estar ausente para a elaboração deste trabalho.

Ao meu grande amigo Marcelo Cavalcante Duarte, carinhosamente conhecido por “Manso”, hoje Prof. Dr. da Universidade Federal de Sergipe, pela

excelente convivência dentro do laboratório, nas disciplinas, nas horas de estudo e nos momentos de lazer.

A todos os meus colegas e amigos pós-graduandos dos Laboratórios de Fitoquímica e de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB, em especial, a minha turma de Doutorado 2010 pela boa convivência durante e depois das disciplinas.

A todos os voluntários, bolsistas de iniciação científica, pós-graduandos e aqueles que já passaram pelo Laboratório de Fitoquímica e Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise do PPgPNSB, pela amizade e companheirismo.

À Andreza Barbosa Silva, aluna de Iniciação Científica, pessoa fundamental na elaboração deste trabalho, além do seu excelente desempenho, dedicação, seriedade e organização que sempre teve na bancada. Sem o seu empenho, tudo seria mais difícil.

À Maria da Conceição Correia Silva, pelo pouco tempo de convivência, mas o suficiente para perceber que se trata de uma pessoa que está sempre disposta a ajudar. Você tem uma parcela na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários da limpeza, Avani, Juvanildo (“Dinho”), Chico, Manoel, Inaldo, Luiz e Adriano por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Ao pessoal da manutenção Sr. Ivan, Luciano e Ednaldo (“Bambam”) que sempre estiveram prontos para me atender sempre que solicitados.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, embora não mencionados fizeram parte da “rotina” do dia a dia, e que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

MUITO OBRIGADO!

Vicente Carlos de Oliveira Costa

*"Nada poderá me abalar,
Nada poderá me derrotar,
Pois, minha força e vitória
Tem um nome
É Jesus"*

Eliana Ribeiro

Resumo

RESUMO

A família Lamiaceae possui 295 gêneros e cerca de 7.775 espécies com distribuição cosmopolita. Estima-se que 22 gêneros e 402 espécies ocorrem no Brasil. Neste trabalho, realizou-se um estudo fitoquímico de duas espécies do gênero *Hyptis* encontradas no semiárido paraibano, *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth. As folhas e os caules das espécies em estudo foram submetidas a processos de extração, de filtração e cromatografia de seus respectivos extratos. Posteriormente, as estruturas químicas das substâncias isoladas foram identificadas e/ou determinadas por métodos espectroscópicos. Do extrato etanólico bruto (EEB) de *Hyptis macrostachys* obteve-se as fases hexânica, diclorometano e acetato de etila. No estudo da fase diclorometânica de *H. macrostachys* foram isoladas cinco substâncias através de métodos cromatográficos convencionais, sendo dois diterpenos: o beier-15-en-17-ol (eritroxilol B), codificado como Hm-1, isolado anteriormente e o ácido ent-labda(8)-17,14-dien,9,13-epóxi,12 α -hidroxi-19-oico (Hm-3), inédito na literatura (hiptenol); dois triterpenos: 3- β -acetoxi-olean-12-en-28-oico (acetato de ácido oleanólico) e o ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico), isolados anteriormente de espécies de *Hyptis* (Hm-2 e Hm-4, respectivamente); além de uma pirona 6R-[(5'S,6'S-diacetoxi)-1'Z,3'E-heptenil]-5,6-diidro-2H-pirano-2-ona (Hm-5), inédita na literatura (hiptenolídeo). Da fase acetato de etila foram isolados dois triterpenos, sendo uma mistura dos ácidos oleanólico e ursólico (Hm-6) e o ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxi-urs-12-en-28-oico (ácido tormêntico), codificado como Hm-7. O EEB de *Hyptis umbrosa* foi submetido à cromatografia de média pressão. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos perfis cromatográficos. Do EEB de *Hyptis umbrosa*, foram isolados dois diterpenos: o pomiferin D (Hu-1), relatado pela primeira vez nesta espécie, porém seus dados de RMN foram completamente reassinalados, e o salviol (Hu-2), isolado anteriormente em outras espécies da família Lamiaceae. Como várias espécies de Lamiaceae são conhecidas por apresentarem quantidade significativa de óleos essenciais, decidiu-se analisar as folhas frescas de *Hyptis macrostachys* e *Hyptis umbrosa*, onde os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de *clevenger* e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM). A constituição química dos óleos essenciais de *Hyptis macrostachys* e *Hyptis umbrosa* foi de 98,37 e 92,9%, respectivamente, de monoterpenos e sesquiterpenos. Sendo o 1,8-cineol (36,3%) o constituinte majoritário para *Hyptis macrostachys* e a fenchona (24,8%) para *Hyptis umbrosa*, compatíveis com a composição química de óleos essenciais de outras espécies de Lamiaceae. Esses resultados contribuíram com o estudo fitoquímico das espécies do semiárido paraibano, *H. macrostachys* e *H. umbrosa*, com a identificação estrutural de nove substâncias, sendo duas inéditas na literatura (hiptenol e hiptenolídeo).

Palavras-chave: *Hyptis macrostachys*; *Hyptis umbrosa*; Lamiaceae; hiptenol; hiptenolídeo.

Abstract

ABSTRACT

Lamiaceae family has 295 genera and about 7,775 species with cosmopolitan distribution. It is estimated that 22 genera and 402 species occur in Brazil. This study describes the phytochemical study of two species of the genus *Hyptis* found in semiarid Paraíba, *Hyptis macrostachys* Benth. and *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth. Leaves and stems of the species studied were subjected to extraction and subsequently processes of filtration and chromatography of their extracts. Posteriorly, chemical structures of the isolated compounds were identified and/or determined by spectroscopic methods. The crude ethanol extract (CEE) of *Hyptis macrostachys* obtained phases hexane, and dichlorometane and ethyl acetate. In study of dichlorometanic phase from *H. macrostachys* were isolated five substances by conventional chromatographic methods: two diterpenes, beier-15-en-17-ol (erytroxilol B) encoded as Hm-1, isolated as before and *ent*-labda (8)-17.14-dien,9,13-epoxy-12 α -hydroxy-19-oic acid (Hm-3) unpublished literature (hyptenol); two triterpenes, 3- β -acetoxylean-12-en-28-oic (acetate oleanolic acid) and 3 β -hydroxy-lup-20 (29)-on-28-oic acid (betulinic acid), have previously been isolated from species of *Hyptis* (Hm-2 and Hm-4, respectively), plus a pyrone 6*R*-[(5'*S*, 6'*S*-diacetoxyl)-1'*Z*, 3'*E*-heptenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one (Hm-5), unpublished literature (hyptenolide). From ethyl acetate phase two triterpens have been isolated, a mixture of ursolic and oleanolic acids (Hm-6) and 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (tormentic acid), encoded as Hm-7. The CCE from *Hyptis umbrosa* was subjected to medium pressure chromatography. The fractions were monitored by TLC and assembled according to their chromatographic profiles. In CEE of *Hyptis umbrosa*, two diterpens were isolated, pomifrim D (Hu-1) first reported in this species, but its NMR data were completely reassignment and salviol (Hu-2), previously isolated from other species of Lamiaceae family. How many species of Lamiaceae are known to have significant amount of essential oils, it was decided to analyze the fresh leaves of *Hyptis macrostachys* and *Hyptis umbrosa* was extracted by hydrodistillation in clevenger apparatus and characterized by GC-MS. The chemical constitution of the essential oils of *Hyptis macrostachys* and *Hyptis umbrosa* was 98.37 and 92.9%, respectively, of monoterpenes and sesquiterpenes. Being 1,8-cineole (36.3%) the major constituent for *Hyptis macrostachys* and fenchona (24.8%) for *Hyptis umbrosa*, consistent with the chemical composition of essential oils of other species of Lamiaceae. These results contributed to the phytochemical study of the species of the semiarid of Paraíba, *H. macrostachys* and *H. umbrosa* with the structural identification of nine substances, two of the unpublished (hyptenol and hyptenolide).

Keywords: *Hyptis macrostachys*; *Hyptis umbrosa*; Lamiaceae; hyptenol; hyptenolide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo, área representada em vermelho.....	35
Figura 2 – Substâncias isoladas de espécies da família Lamiaceae.....	36
Figura 3 – Esquema de obtenção de diterpenos.	41
Figura 4 – Estruturas de alguns diterpenos.	41
Figura 5 – Alguns tipos de esqueletos envolvidos no mecanismo de formação dos triterpenos.	42
Figura 6 – Estruturas moleculares de alguns triterpenos bioativos	44
Figura 7 – Foto de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	46
Figura 8 – Foto de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	48
Figura 9 – Estrutura química de compostos isolados de <i>Hyptis umbrosa</i>	48
Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1.....	68
Figura 11 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0-70 ppm.	68
Figura 12 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0-45 ppm.	69
Figura 13 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 50-140 ppm.	69
Figura 14 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz CDCl_3) de Hm-1.	70
Figura 15 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0,60-1,85 ppm.	70
Figura 16 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 3,3-6,0 ppm.	71
Figura 17 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2.	74

Figura 18 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 2,7-5,4 ppm.	74
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 0,6-2,1 ppm.	75
Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2.....	75
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 12-58 ppm.	76
Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 80-185 ppm.	76
Figura 23 – Espectro de massas de alta resolução de Hm-3 obtido por IES $^-$	80
Figura 24 – Espectro de IV de Hm-3 obtido em pastilhas de KBr.....	80
Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.	81
Figura 26 – Expansão de espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 6,0-4,0 ppm	81
Figura 27 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 6,0-40 ppm	82
Figura 28 – Expansão de espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 na região de 5,24-5,04 ppm	82
Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-3.....	83
Figura 30 – Expansão de espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3 de Hm-3 na região de 48 – 15 ppm	83
Figura 31 – Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,0-150 x 0,0-10 ppm.....	84
Figura 32 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 75-145 ppm x 3,9-6,3 ppm.	84
Figura 33 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 10-50 ppm x 0,5-2,7 ppm	85

Figura 34 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 12-38 ppm x 0,6-2,0 ppm.	85
Figura 35 – Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3.....	86
Figura 36 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 70-190 ppm x 0,5-2,9 ppm	86
Figura 37 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 30-150 ppm x 3,8-5,6 ppm	87
Figura 38 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 30-100 ppm x 4,7-5,3 ppm	87
Figura 39 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 50-15 ppm x 0,4-2,8 ppm	88
Figura 40 – Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.	88
Figura 41 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 4,4-6,1 ppm x 4,6-6,1,0 ppm	89
Figura 42 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-6,0 ppm x 0,5-6,0 ppm	89
Figura 43 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-2,8 ppm x 0,4-2,9 ppm	90
Figura 44 – Espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.....	90
Figura 45 – Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-6,0 ppm x 0,5-6,0 ppm	91
Figura 46 – Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-2,9 ppm x 0,2-3,0 ppm	91
Figura 47 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4.	94
Figura 48 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 0,70-1,75 ppm.	94
Figura 49 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 1,8-4,8 ppm.	95

Figura 50 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-4.....	95
Figura 51 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 14-58 ppm	96
Figura 52 – Espectro de massas de alta resolução de Hm-5 obtido por IES ⁺	100
Figura 53 – Espectro de IV de Hm-5 obtido em pastilha de KBr	100
Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5	101
Figura 55 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 0,9-2,7 ppm	101
Figura 56 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 4,9-7,1 ppm	102
Figura 57 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-5.....	102
Figura 58 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 120-172 ppm.	103
Figura 59 – Espectro de HMBC de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5	103
Figura 60 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 115-175 ppm x 2,0-7,0 ppm	104
Figura 61 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 127,0-132,5 ppm x 5,5-6,7 ppm	104
Figura 62 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 163-171 ppm x 4,9-7,0 ppm	105
Figura 63 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 10-80 ppm x 1,0-2,6 ppm	105
Figura 64 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 10-80 ppm x 1,0-7,0 ppm	106
Figura 65 – Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5.....	106
Figura 66 – Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 0,5-7,5 ppm x 0,0-7,0 ppm	107

Figura 67 – Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 4,8-7,4 ppm x 4,9-7,3 ppm	107
Figura 68 – Espectro de dicroísmo circular (DC) de Hm-5 obtido em CDCl_3	108
Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6	111
Figura 70 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 15-35 ppm	111
Figura 71 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 37-56 ppm	112
Figura 72 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 15-60 ppm	112
Figura 73 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 70-185 ppm.	113
Figura 74 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6.....	113
Figura 75 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 0,85-1,30 ppm.	114
Figura 76 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 1,45-2,35 ppm.	114
Figura 77 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 2,5-5,7 ppm	115
Figura 78 – Espectro de IV de Hm-7 obtido em pastilha de KBr	118
Figura 79 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7.	118
Figura 80 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 13-46 ppm	119
Figura 81 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 55-185 ppm	119
Figura 82 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7.....	120
Figura 83 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 0,6-2,3 ppm	120

Figura 84 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 3,0-5,4 ppm	121
Figura 85 –Espectro de massas de alta resolução de Hu-1 por IES ⁺	125
Figura 86 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1.....	125
Figura 87 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 68-16 ppm	126
Figura 88 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 150-60 ppm	126
Figura 89 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1	127
Figura 90 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 7,18-6,86 ppm.	127
Figura 91 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 4,09-3,99 ppm	128
Figura 92 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 3,00-2,56 ppm.	128
Figura 93 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 1,93-1,63 ppm	129
Figura 94 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 1,40-0,95 ppm	129
Figura 95 – Espectro de correlação de RMN ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1	130
Figura 96 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 15-70 ppm x 0,8-4,2 ppm	130
Figura 97 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 46-53 ppm x 1,1-2,7 ppm	131
Figura 98 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 122-129 ppm x 7,35-6,80 ppm.	131
Figura 99 – Espectro de correlação de RMN ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1	132

Figura 100 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 115-155 ppm x 1,0-7,5 ppm	132
Figura 101 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 20-150 ppm x 6,85-7,35 ppm	133
Figura 102 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 115-155 ppm x 1,0-7,5 ppm	133
Figura 103 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 20-65 ppm x 0,92-1,40 ppm	134
Figura 104 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 15-65 ppm x 1,5-3,1 ppm	134
Figura 105 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 144-148 ppm x 1,14-141 ppm	135
Figura 106 – Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1	135
Figura 107 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 0,5-4,5 x 0,6-4,4 ppm.....	136
Figura 108 – Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1	136
Figura 109 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 0,5-4,5 ppm x 0,4-4,4 ppm.....	137
Figura 110 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2.....	140
Figura 111 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 12-68 ppm	140
Figura 112 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 104-154 ppm	141
Figura 113 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2	141
Figura 114 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 2,52-3,16 ppm	142
Figura 115 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 0,91-1,25 ppm	142

Figura 116 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 3,90-4,16 ppm	143
Figura 117 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de <i>Hyptis macrostachys</i>	144
Figura 118 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de <i>Hyptis umbrosa</i>	147

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	58
Esquema 2 – Isolamento dos constituintes químicos da fase diclorometânica das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	60
Esquema 3 – Isolamento dos constituintes químicos da fase acetato de etila das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	61
Esquema 4 – Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de <i>Hyptis</i> utilizadas na medicina popular	38
Quadro 2 – Diterpenos isolados de <i>Hyptis</i> e atividades farmacológicas descritas	39
Quadro 3 – Óleos essenciais do gênero <i>Hyptis</i> com bioatividade relatada.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.....	60
Tabela 2 – Fracionamento cromatográfico do EEB (média pressão) de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth	63
Tabela 3 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-1 com os dados da literatura para o beier-15-en-17-ol (eritroxilol B).....	67
Tabela 4 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-2 com os dados da literatura para o ácido 3 β -acetoxi-oleano-12-en-28-oico (acetato do ácido oleanólico).....	73
Tabela 5 – Dados de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais (500 e 125 MHz em CDCl_3) de Hm-3 – ácido labda-8(17),14-dien-9,13-epoxi,12 α -hidroxi-19-óico (hiptenol)	79
Tabela 6 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 de Hm-4 com os dados da literatura para o ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico).....	93
Tabela 7 – Dados de ^1H , ^{13}C e 2D (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5, 6 <i>R</i> -[(5' <i>S</i> ,6' <i>S</i> -diacetoxi)-1' <i>Z</i> ,3' <i>E</i> -heptenil]-5,6-diidro-2H-pirano-2-ona (hiptenolídeo).....	99
Tabela 8 – Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hm-6a/Hm-6b (ácido ursólico e ácido oleanólico), verificados nos espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e comparação com os dados de RMN de ^{13}C -APT da literatura.....	110
Tabela 9 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-7 com os dados da literatura para o ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxi-urs-12-en-28-oico (ácido tormêntico) em MeOH (50 MHz)	117
Tabela 10 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz) de Hu-1 em CDCl_3	124
Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hu-2 com os dados da literatura	139
Tabela 12 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Hyptis macrostachys</i>	145
Tabela 13 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Hyptis umbrosa</i>	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	“Attached Proton Test”
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas
COSY	“Correlation Spectroscopy”
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dubleto
DC	Dicroísmo circular
<i>dd</i>	Duplo dubleto
EEB	Extrato etanólico bruto
EM-AR-IES	Espectrometria de massas de alta resolução por ionização de elétron <i>sprey</i>
EtOH	Etanol
HIV	Vírus da Imuno Deficiência Humana
Hm	<i>Hyptis macrostachys</i>
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
HM-EtOH _{PA}	Extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de <i>H. macrostachys</i>
Hu	<i>Hyptis umbrosa</i>
IR	Índice de retenção
IV	Infravermelho

<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
Mo	Modelo
NOESY	“Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy”
PFF	Pirofosfato de farnesila
PFGG	Pirofosfato de geranilgeranila
PFI	Pirofosfato de isopenil
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quadruplete
R _f s	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
sl	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
tl	Triplete largo
TTPC	Triterpenos Pentacíclicos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.1 A família Lamiaceae	34
2.2 O gênero <i>Hyptis</i>.....	37
2.2.1 Principais classes de metabólitos encontrados em <i>Hyptis</i>	37
2.3 Considerações sobre as espécies estudadas	46
2.3.1 <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	46
2.3.2 <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	47
2.4 Óleos essenciais	49
3 OBJETIVOS.....	52
3.1 Geral	53
3.2 Específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Material e Equipamentos Utilizados	55
4.2 Material Vegetal	56
4.2.1 <i>Hyptis macrostachys</i> Benth. e <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	56
4.2.2 Processamento do material vegetal de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	57
4.2.3 Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.....	57
4.2.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	57
4.2.5 Isolamento dos constituintes químicos da fase diclorometânica das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	59

4.2.6 Isolamento dos constituintes químicos da fase acetato de etila das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	61
4.2.7 Processamento do material vegetal de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	62
4.2.8 Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	62
4.2.9 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	62
4.2.10 Extração dos óleos essenciais das folhas e dos caules de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth. e <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Identificação estrutural de Hm-1.....	66
5.2 Identificação estrutural de Hm-2.....	72
5.3 Determinação estrutural de Hm-3.....	77
5.4 Identificação estrutural de Hm-4.....	92
5.5 Determinação estrutural de Hm-5.....	97
5.6 Identificação estrutural de Hm-6.....	109
5.7 Identificação estrutural de Hm-7.....	116
5.8 Identificação estrutural de Hu-1.....	122
5.9 Identificação estrutural de Hu-2.....	138
5.10 Identificação dos constituintes voláteis de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	144
5.11 Identificação dos constituintes voláteis de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	147
6 CONCLUSÕES	150
REFERÊNCIAS	152
APÊNDICES	160
Apêndice A – Artigo publicado na revista Journal of Medicinal Plants Research...	161
Apêndice B – Artigo aceito para publicação na revista Phytochemistry Letters.....	162

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A relação entre o conhecimento popular e científico, no que se refere ao uso de plantas medicinais, pode ser enquadrada dentro da visão dialética, que prevê a transformação e a evolução das ideias, sendo o conhecimento popular uma incorporação de experiências e conhecimentos transmitidos de geração em geração. Existem diferenças entre as formas pelas quais as populações produzem e expressam seus conhecimentos sobre o mundo natural e aquelas que foram desenvolvidas pela ciência moderna. A união entre esses dois pontos de vista é alcançada quando os pesquisadores buscam o conhecimento popular e, a partir destes, realizam pesquisas laboratoriais (CASTRO; FERREIRA, 2001).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Além disso, elas fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os a enfrentar desafios na construção de novas moléculas naturais (BRAZ-FILHO, 2010).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

Durante algum tempo, os investimentos elevados na preparação de produtos sintéticos contribuíram significativamente para estimular ações que tentavam reduzir o uso de organismos vivos como fontes de novos bioprodutos com atividade biológica. Nos últimos anos, no entanto, a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos na construção de cenários crescentes, estimulando, inclusive, a percepção das lideranças industriais empenhadas na fabricação de produtos sintéticos (BRAZ-FILHO, 2010).

Ao longo do tempo foram registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina

alopática a partir da segunda metade do século XX, existem dificuldades básicas na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuíram para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Apesar da necessidade de atuação nas áreas de fronteira do conhecimento, o Brasil possui uma característica territorial muito diferente dos países industrializados, marcada, principalmente, pela sua imensa biodiversidade, sendo, portanto, ainda um celeiro para a busca de substâncias novas, de interesse biológico ou não. Trabalhos científicos integrados poderão, em um tempo limite, propiciar o conhecimento real da diversidade química dos ambientes tropicais e auxiliar nos estudos futuros sobre o perfil metabólico e associações com perfil macromolecular das espécies de interesse de nossa biota (PINTO et al., 2002).

No Brasil, o uso de plantas medicinais foi disseminando principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade, cujo território possui cinco principais biomas, sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma fonte rica de produtos com potencial terapêutico. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pouco explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

No final do século passado, mais especificamente nos anos 60, ocorreu nos países desenvolvidos iniciando pela Alemanha, França e Reino Unido, e posteriormente difundindo-se para outros países da Europa e América do Norte, um interesse maior pela fitoterapia e, ao invés de usar a infuso, decocto ou tintura de drogas vegetais, passam a usar formas farmacêuticas mais elaboradas, como os comprimidos, cápsulas e geleias (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Este interesse surgiu principalmente devido a população acreditar que os fitoterápicos são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que

avaliam a eficácia e a segurança, assim como também, a garantia de qualidade na produção (CALIXTO, 2000; CARVALHO et al., 2008).

Várias plantas se destacam na flora brasileira, entre elas, as da família Lamiaceae, que tem grande importância econômica, fornecedoras de óleos essenciais e de plantas ornamentais. Além de serem utilizadas como condimentos na culinária (FALCÃO, MENEZES, 2003) e por possuírem propriedades medicinais (ZELLNER et al., 2009). Esta família também apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários, entre eles, terpenoides, flavonoides, lactonas, lignanas, ácidos graxos (DARIAS et al., 1990; PATORA; KLIMEK, 2002; HORVATH et al., 2004; ALI et al., 2007). No levantamento bibliográfico das espécies *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth. foram encontrados poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Diante do exposto, decidiu-se realizar o estudo fitoquímico de *Hyptis macrostachys* Benth. e de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth., espécies da família Lamiaceae com ocorrência no semiárido, utilizando para tanto técnicas cromatográficas e métodos físicos de análises, tais como infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS), com o objetivo posterior de disponibilizar extratos, substâncias isoladas e óleos essenciais para realização de testes biológicos, integrando, assim, os estudos farmacológicos ao estudo fitoquímico dessas espécies.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

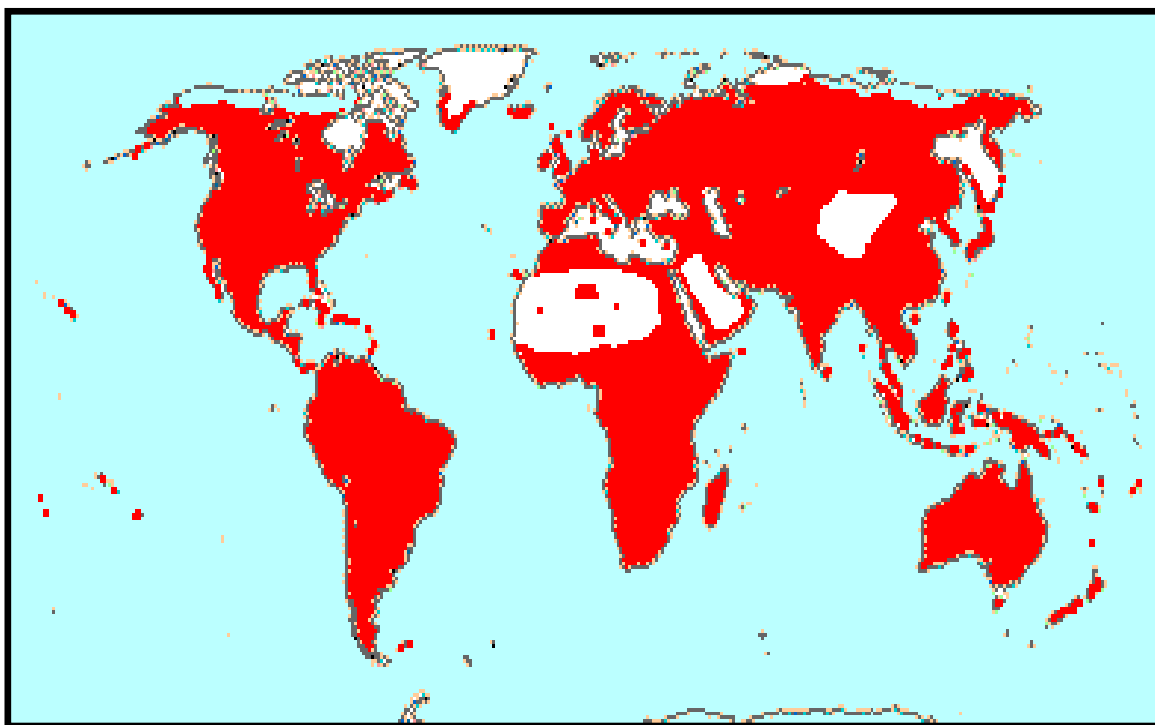
2.1 A família Lamiaceae

A família Lamiaceae possui 295 gêneros e cerca de 7.775 espécies de plantas herbáceas a arbustivas. É um grupo com distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas de clima tropical a subtropical. Estima-se que pelo menos 22 gêneros e 402 espécies ocorrem no Brasil (BASÍLIO et al., 2006). A Figura 1 (p. 35) mostra o mapa da distribuição (em vermelho) de plantas da família Lamiaceae no mundo. Esta família é relativamente bem estudada do ponto de vista químico, e o seu metabolismo especial apresenta uma variedade de classes de micromoléculas (Figura 2, p. 36), existindo representantes das vias do ácido acético, da via do ácido chiquímico e proveniente de vias mistas (FALCÃO; MENEZES, 2003).

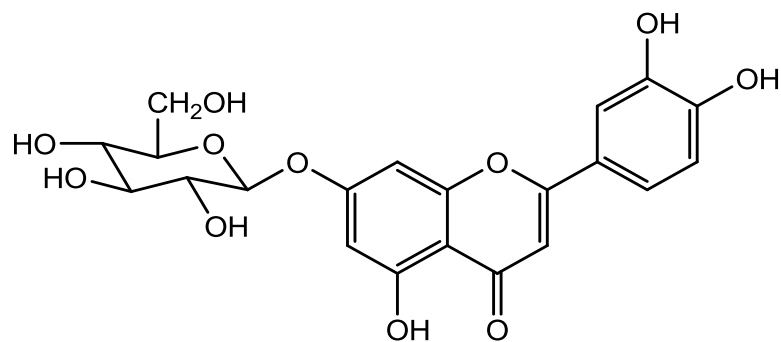
Essa família é composta por ervas, arbustos e árvores distribuídos em ambos os hemisférios e inclui um grande número de plantas medicinais de importância significativa (PEERZADA, 1997). Ela tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais (encontrados em várias espécies dos gêneros *Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja* e *Thymus*), e de plantas ornamentais. Muitas espécies são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que fornecem aos alimentos (FALCÃO; MENEZES, 2003) e algumas especiarias são uma fonte bem conhecida de antioxidantes, especialmente polifenóis (HOSSAIN et al., 2010).

Dentre as atividades biológicas relatadas para os constituintes químicos isolados de plantas da família Lamiaceae, podemos destacar: antifúngica, antiulcerogênica, antibacteriana, citotóxica, inibitória do crescimento de células leucêmicas, anti-HIV, anti-inflamatória, antinociceptiva e antitumoral (FALCÃO; MENEZES, 2003; ARRIGONI-BLANKA et al., 2008).

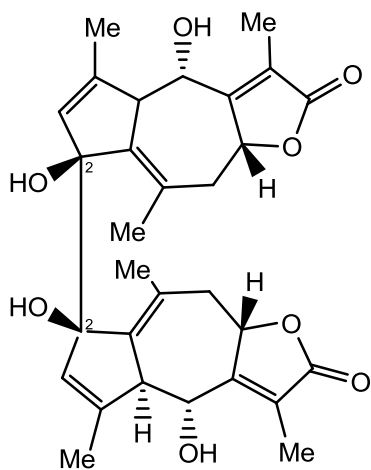
Figura 1 – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo, área representada em vermelho.



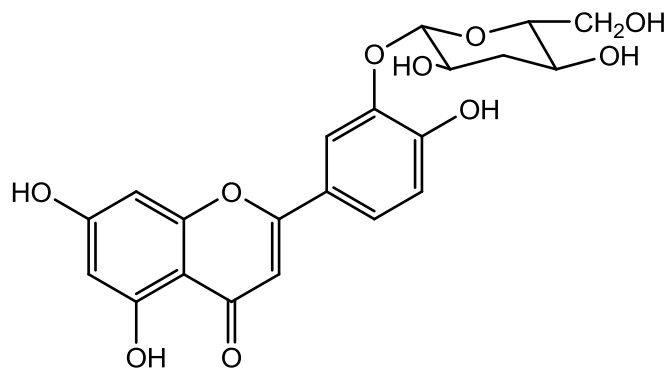
Adaptado de: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>. Acesso em: 29 de outubro de 2012.

Figura 2 – Substâncias isoladas de espécies da família Lamiaceae.

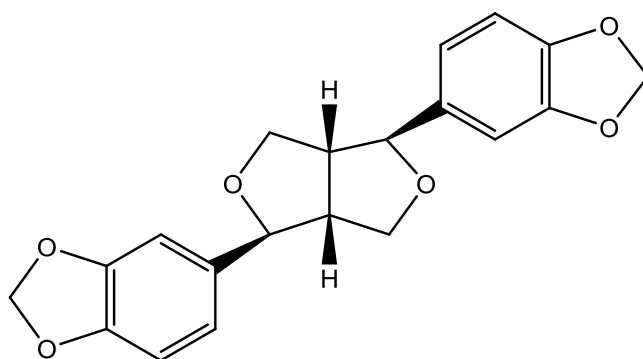
Luteolina 7-O- β -glicopiranosídeo
Folhas de *Melissa officinalis* L.
(PATORA; KLIMEK, 2002)



Bisnumidiol
Salvia nubicola
(ALI et al., 2007)



Luteolina 3'-O- β -glicopiranosídeo
Folhas de *Melissa officinalis* L.
(PATORA; KLIMEK, 2002)



(+)-Sesamina
Folhas *Salvia* ssp. e *Sideritis* ssp.
(DARIAS et al., 1990)

2.2 O gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* compreende aproximadamente 400 espécies (SANTOS et al., 2007), distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. *Hyptis* é um gênero rico em espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003). As populações são utilizadas para diversos fins medicinais como mostrado no Quadro 1 (p. 38). O grupo caracteriza-se pela presença de plantas fortemente aromáticas. No nordeste do Brasil são popularmente usadas na forma de infuso, decocto e cigarro, sendo indicadas no tratamento de várias doenças, especialmente das vias respiratórias, e são amplamente comercializadas nas feiras livres (BASÍLIO et al., 2006).

2.2.1 Principais classes de metabólitos encontrados em *Hyptis*

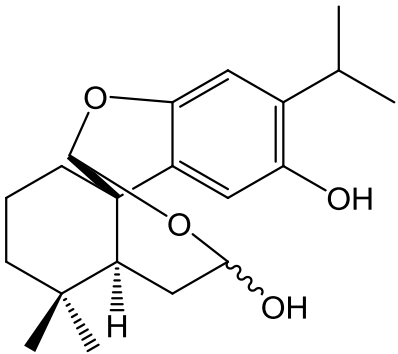
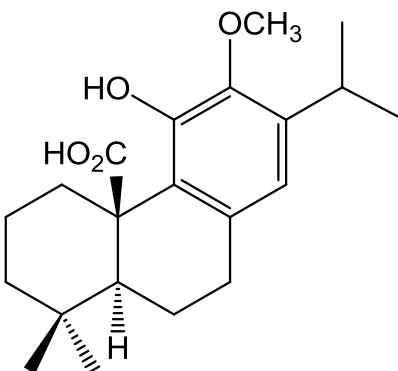
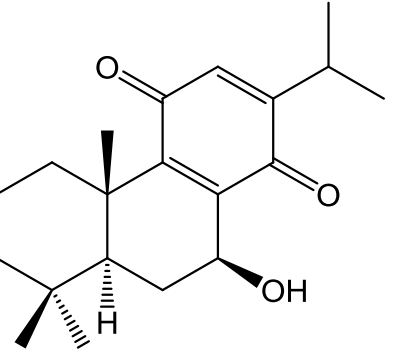
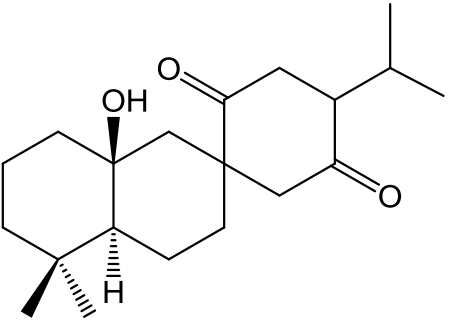
A constituição química de espécies desse gênero é bastante variada, tendo destaque os terpenoides, a exemplo dos diterpenos, os quais tem demonstrado atividade citotóxica, antimalárica, antimicrobiana, expectorante e antiviral (Quadro 2, p. 39). Estes por sua vez, são provenientes de uma unidade de pirofosfato de geranilgeranil (PFGG) obtido pela união de uma unidade de pirofosfato de farnesila (PFF) com uma unidade de pirofosfato de isopentil (PFI). O mais importante é o fitol. Este composto nada mais é do que uma forma reduzida do geranilgeraniol (Figura 3, p. 41) (NIERO; MALHEIROS, 2009).

Outros esqueletos de diterpenos podem ser formados como mostra a Figura 4 (p. 41).

Quadro 1 – Espécies de *Hyptis* e suas partes utilizadas na medicina popular.

Espécie	Parte da Planta	Uso Popular	Referência
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Raízes Flores	Propriedades estomacais Doenças respiratórias, digestão e dor de cabeça	MUKHERJEE, et al., 1984 AGRA et al., 2008
<i>Hyptis capitata</i> Jacq.	Partes aéreas	Resfriado, febre, asma e doenças fúngicas	LEE et al., 1988 ALMTORP; HAZELL; TORSSELL, 1991
<i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	Planta inteira	Dor de cabeça, desordens gastrintestinais, repelente de insetos e antisséptica	ROJAS et al., 1992
<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Não informado Flores	Antibacteriana, antimicótica e antitussígena Asma, tosse, bronquite e doenças do fígado	MALAN; BELISSIERE; PELLERIN, 1989 AGRA et al., 2008
<i>Hyptis spincigera</i> Lam.	Planta inteira	Controle de insetos	AYCARD et al., 1993
<i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Briq.	Planta inteira	Úlceras de pele infectadas e conjuntivite	BARBOSA; BARBOSA, 1992
<i>Hyptis martiusii</i> Benth.	Folhas Raízes	Doenças intestinais e estomacais Inflamação dos ovários	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Frutos e folhas	Gripe, resfriado e asma	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Doenças articulares, estomacais e expectorante	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	Folhas	Asma, tosse e bronquite	AGRA et al., 2008

Quadro 2 – Diterpenos isolados de *Hyptis* e atividades farmacológicas descritas.

Estrutura	Atividade	Referência
 7.seco-7(20),11(20)-diepoxiabieta-8,11,13-trieno	Antiviral	ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2004
 Ácido12-metoxicarnósico	Citotóxica	ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2004
 7β-hidroxi-11,14-dioxiabieta-8,12dieno	Citotóxica	CAVALCANTI et al., 2008
 Martiusano	Antitumoral	ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2004

Quadro 2 – (Continuação).

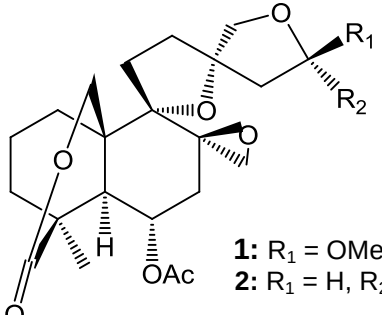
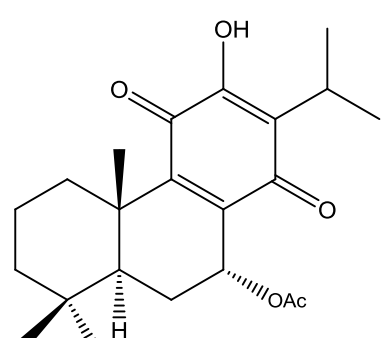
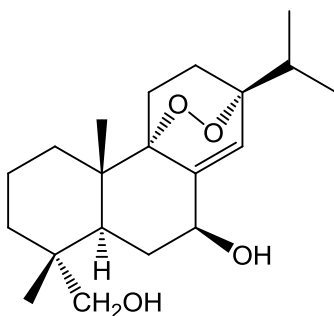
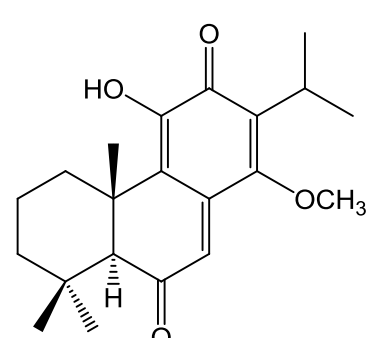
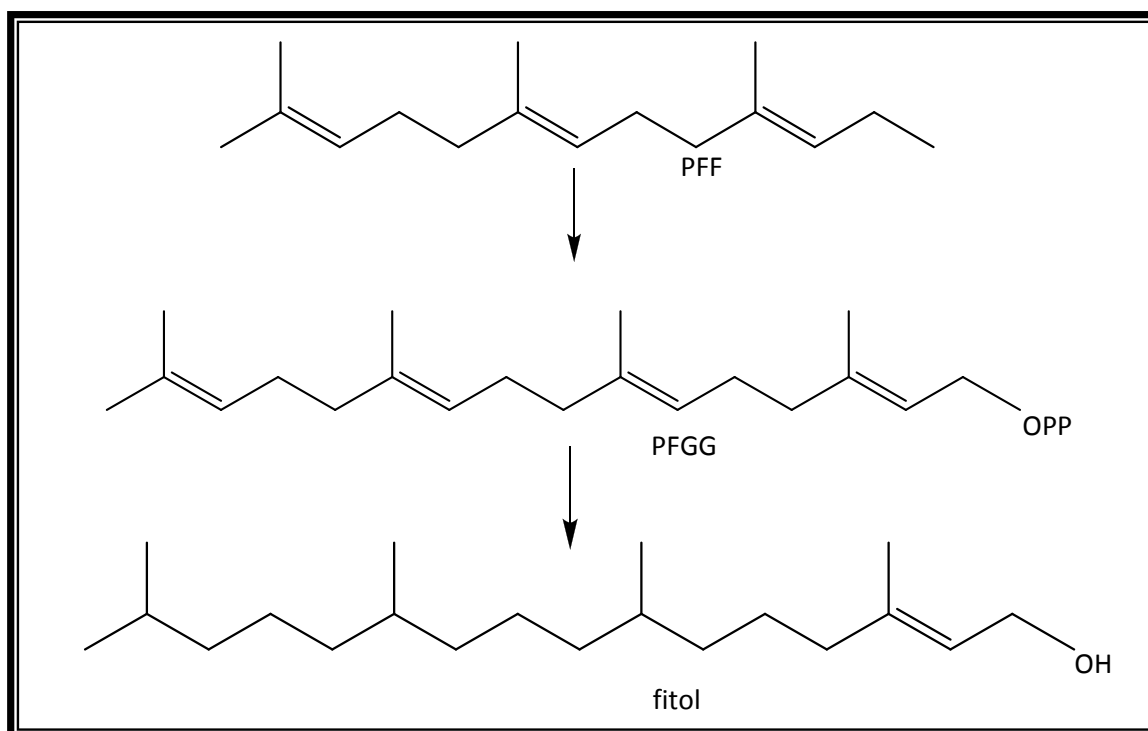
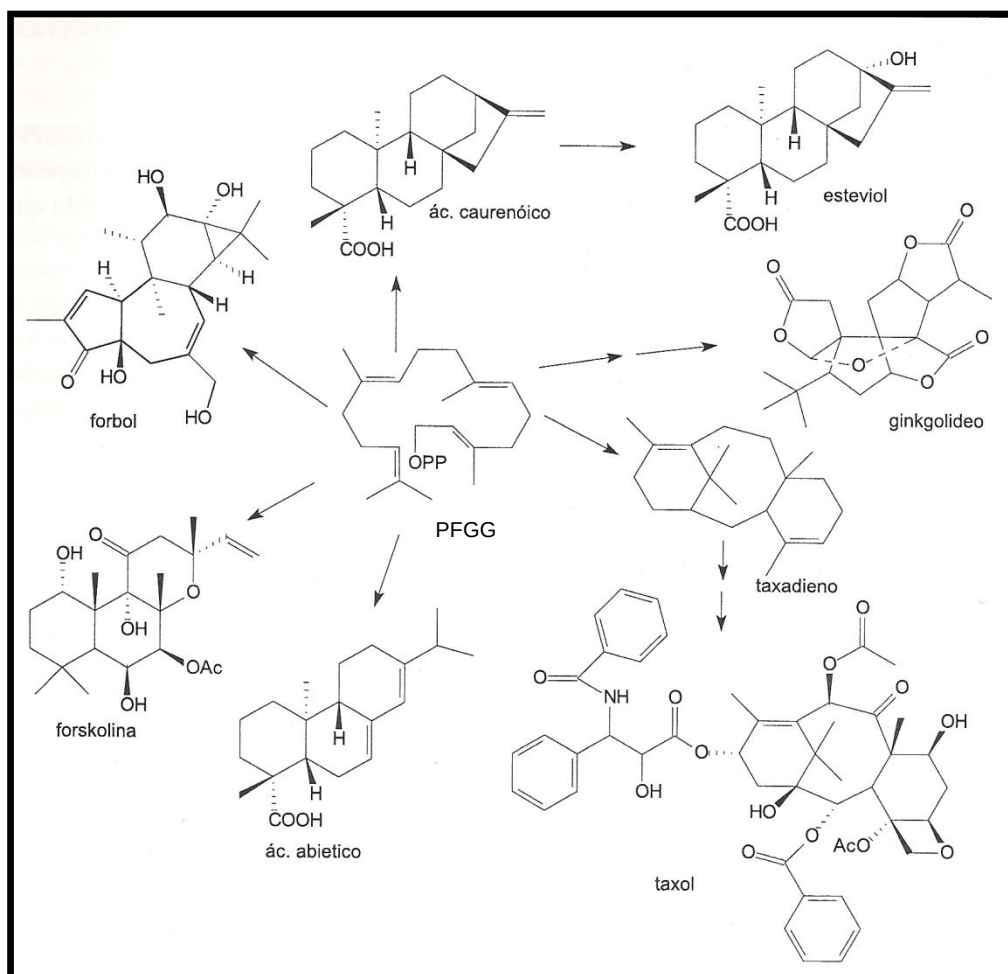
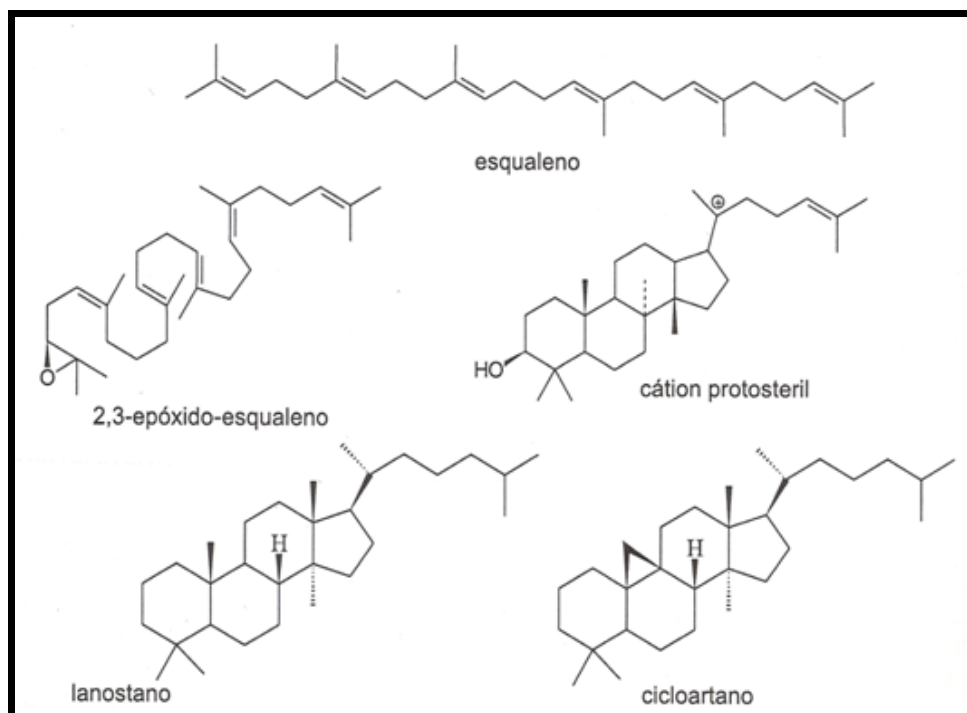
 1: R₁ = OMe, R₂ = H 2: R₁ = H, R₂ = OMe 1: 15β-metoxifaciculatum 2: 15α-metoxifaciculatum	Expectorante	OHSAKI et al., 2005
 7α-acetoxi-12hidroxi-11,14-dioxoabieta-8,13-dieno	Citotóxica	CAVALCANTI et al., 2008
 13α-epi-dioxiabieta-8(14)-en-18-ol	Antimalária	CHUKWUJEKWU et al., 2005
 14-metoxitaxodiano	Antitumoral	MONACHE et al., 1977

Figura 3 – Esquema da formação de diterpenos.**Figura 4 – Estruturas de alguns diterpenos.**

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante de terpenoides. Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2009).

Os triterpenos não são formados através do processo de acrescentar IPP à cadeia já existente, resultando numa maior cadeia (Figura 5, p. 42). Ao invés disso, duas moléculas de farnesil pirofosfato associam-se “cauda a cauda” através de um processo complexo para formar um hidrocarboneto denominado esqualeno, ou no caso dos 3- β -hidroxiterpenoides, o isômero 3-S do 2,3-epóxido-esqualeno. A conformação que todos os *trans*-2,3-epóxido-esqualeno adotam quando se inicia a ciclização, vai determinar a estereoquímica da junção do anel no triterpeno produzido. Como resultado da ciclização da conformação cadeira-barco-cadeira-barco leva a formação do cátion protosteril e a ciclização cadeira-cadeira-barco leva a formação do cátion damaril. O cátion intermediário formado pode sofrer uma série de migrações, as quais formam uma variedade de tipos de esqueletos (CONNOLLY; HILL, 2000; DEWICK, 2002).

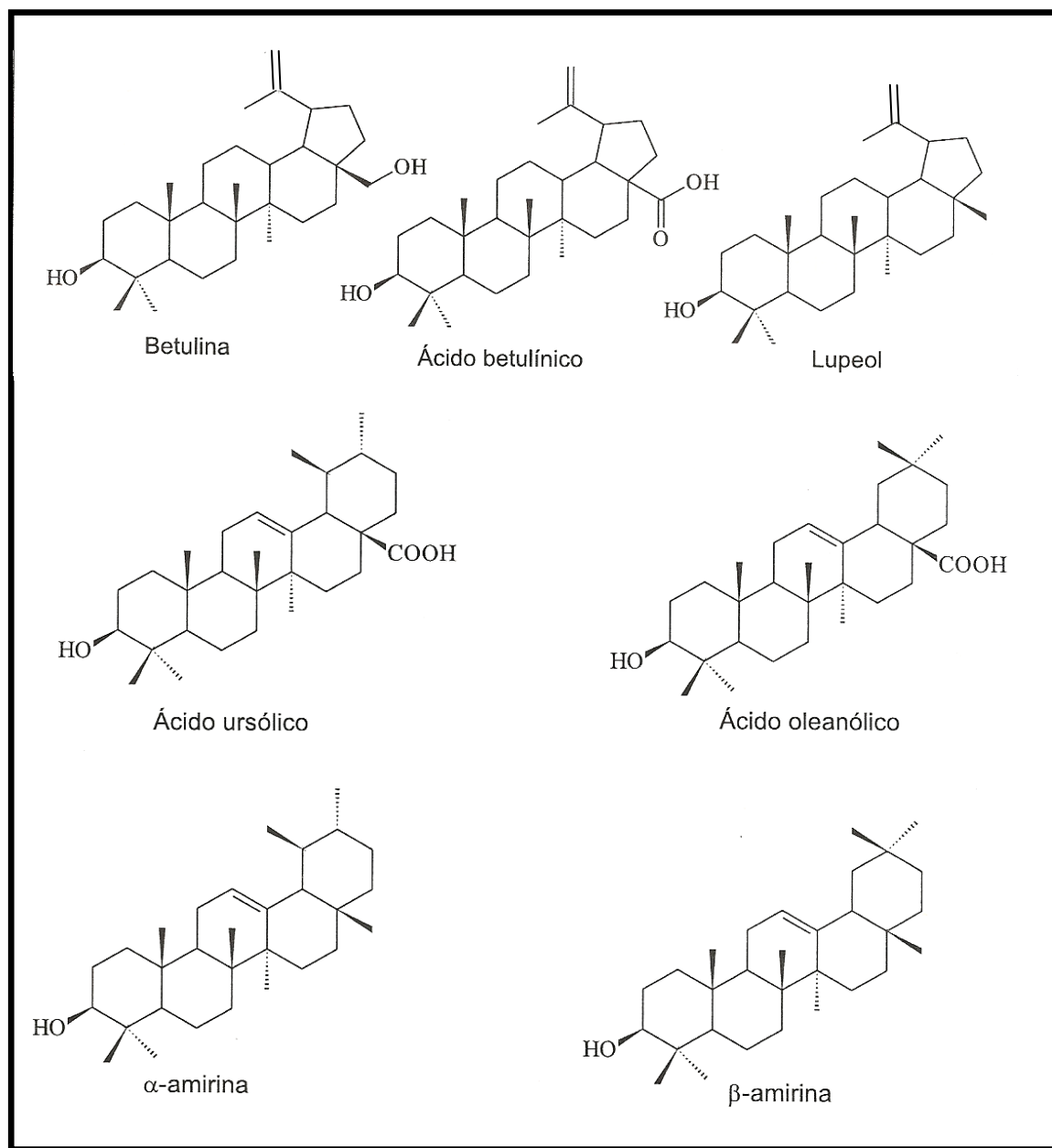
Figura 5 – Alguns tipos de esqueletos envolvidos no mecanismo de formação dos triterpenos.



Os triterpenos pentacíclicos derivam do arranjo do epóxido do esqualeno em um arranjo cadeira-cadeira-cadeira-barco seguido de uma condensação. Este tipo de componente é comum em plantas. As estruturas pentacíclicas, podem ter quatro anéis de seis membros e um de cinco, entre os quais pertencem as famílias lupano e hopano, ou cinco anéis de seis membros como as famílias oleanano, ursano, friedelano e lonastano. Pertencente à família dos lupanos a betulina, ácido betulínico e lupeol, entre outras (Figura 6, p. 44). A betulina é o triterpeno mais abundante na natureza, também é o precursor na biossíntese do ácido betulínico, o composto biologicamente mais ativo deste grupo. Estes compostos tem apresentado várias atividades biológicas, entre as quais vale destacar, a atividade anti-inflamatória. A betulina e o ácido betulínico inibem a formação de edema de pata de ratos induzidos por carragenina e serotonina, suas atividades são comparadas aos anti-inflamatórios fenilbutazona e dexametazona (PATOCKA, 2003; ALLAKURTTI et al., 2006). O lupeol apresenta maior atividade anti-inflamatória em edema induzido por carragenina (FOTIE et al., 2006).

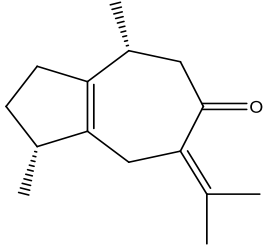
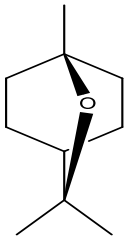
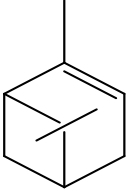
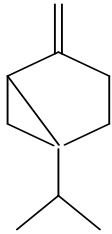
O ácido betulínico tem apresentado uma variedade de atividades biológicas, incluindo a inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), antibacteriana, antimalárica, anti-helmíntica, antimicobacteriana, antioxidante, entre outras (YOGEE SWARI, SRIRAM, 2005).

Os ácidos ursólico e oleanólico e α - e β -amirina (Figura 6, p. 44) são isômeros pertencentes às famílias ursano e oleanano, respectivamente. Devido à semelhança estrutural, quando os respectivos isômeros encontram-se em determinada espécie, são isoladas como misturas. Alguns trabalhos tem demonstrado que os ácidos ursólico e oleanólico exercem inúmeras atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as atividades anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, anti-HIV e tripanossomicida. Também apresenta atividade inibidora da acetilcolinesterase, podendo ser utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer (KASHIWADA et al., 1998; TRAORE-KEITA et al., 2000).

Figura 6 – Estruturas moleculares de alguns triterpenos bioativos.

Espécies desse gênero também apresentam uma composição muito rica em óleos essenciais os quais tem demonstrado atividades antioxidante, antimicrobiana e antinociceptiva (Quadro 3, p. 45).

Quadro 3 – Óleos essenciais do gênero *Hyptis* com bioatividade relatada.

Espécie (parte da planta)	Atividade	Composto Majoritário	Referência
<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit. (folhas)	Antimicrobiana	 Calamusenona	SANTOS et al., 2008
<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm.ex Benth. (partes aéreas)	Antinociceptiva	 1,8 cineol	LIMA; CARDOSO, 2007
<i>Hyptis crenata</i> Pohl ex Benth. (folhas)	Antioxidante	 α -pineno	NIERO; MALHEIROS, 2009
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. (folhas)	Antimicrobiana	 Sabineno	NIERO; MALHEIROS, 2009

2.3 Considerações sobre as espécies estudadas

2.3.1 *Hyptis macrostachys* Benth.

Hyptis macrostachys Benth. é uma espécie arbustiva pertencente à família Lamiaceae, encontrada no semiárido nordestino e conhecida popularmente como “alfavaca-brava” e “hortelã-do-mato” (Figura 7, p. 46). Suas folhas são utilizadas na medicina popular no tratamento da asma, da tosse e de bronquite na forma de infuso ou xarope (AGRA et al., 2008). Em pesquisas realizadas em bancos de dados mundiais, não foi encontrado nenhum relato de estudo fitoquímico para esta espécie.

Figura 7 – Foto de *Hyptis macrostachys* Benth.



Fonte: J. F. TAVARES, (2009).

Vasconcelos (2011) relatou que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* (HM-EtOH_{PA}) até as doses de 5000 mg/kg por via oral e 2000 mg/kg intraperitoneal não apresentou toxicidade aguda, entretanto, apresentou atividade antidiarreica em camundongos.

Recentemente, nossos colaboradores da farmacologia relataram que o HM-EtOH_{PA} também apresentou efeito espasmolítico não seletivo em aorta de rato, útero de rata, traqueia e íleo de cobaia (SOUZA et al., 2013); e que, diferentemente, a pirona isolada da fase diclorometânica das partes aéreas de *Hyptis macrostachys*, denominado de hiptenolídeo, apresentou efeito espasmolítico apenas em íleo de cobaia (SOUZA, 2013).

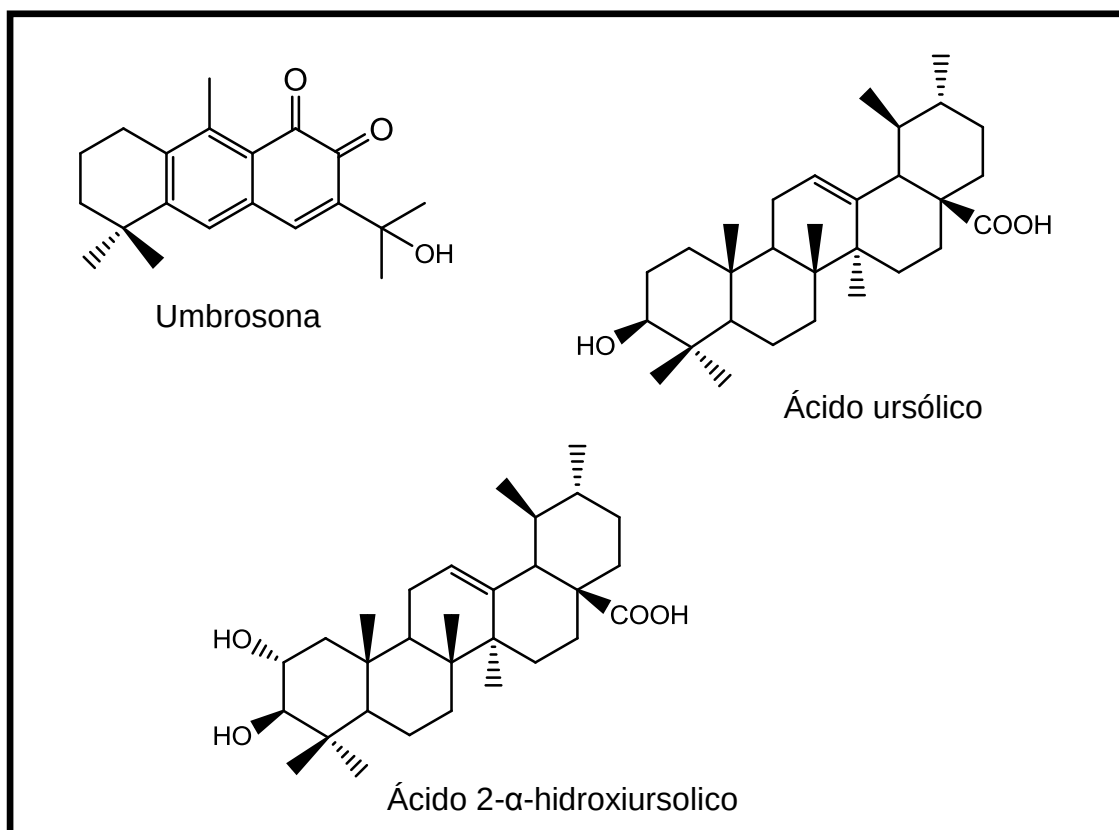
2.3.2 *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

Hyptis umbrosa também pertence à família Lamiaceae, é popularmente conhecida como “bamburral” e trata-se de uma planta subarborescente com hábito perene/anual (Figura 8, p. 48). As partes mais utilizadas desta espécie são as folhas e as flores. Sua indicação terapêutica na medicina popular é para tratamento das moléstias do estômago, para dores de cabeça, para doenças nasais e articulares, como expectorante, carminativo, tônico e sudorífero (MATOS, 1999; AGRA et al., 2008). Em pesquisas realizadas nos bancos de dados foram encontrados apenas alguns artigos relatando o isolamento de substâncias (Figura 9, p. 48), entre elas, um diterpeno do tipo orto-quinona, denominado de umbrosona (MONACHE et al., 1990); o ácido ursólico e 2 α -hidroxi-ursólico (MATIDA; ZELNIK, PANIZZA, 1986).

Monache et al. (1990) relataram que o extrato etanólico de *Hyptis umbrosa* apresentou uma significativa atividade antimicrobiana. Também foi demonstrado que o óleo essencial de suas folhas apresentou potente atividade antitumoral (ROLIM et al., 2013a) e baixa toxicidade frente aos eritrócitos murinos (CH₅₀ = 494,9 μ g/mL) e baixa toxicidade aguda em camundongos por via intraperitoneal (DL₅₀ em torno de 500 mg/kg) (ROLIM et al., 2013b).

Figura 8 – Foto de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

Fonte: J. F. TAVARES (2009).

Figura 9 – Estrutura química de compostos isolados de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos formados basicamente por dois grupos de origem biossintética distintos: o principal grupo é constituído por terpenos e o outro é constituído por componentes fenilpropanoides. Ambos os grupos são caracterizados por moléculas com baixo peso molecular. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, broto, flor, folha, caule, ramo, semente, fruto, raiz e casca, sendo armazenados em células secretoras, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Nas plantas, os óleos essenciais apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo, normalmente um composto majoritário. A grande maioria, no entanto, é constituído de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides, preponderando os últimos. Os terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (90% dos óleos) e os sesquiterpenos (MELO, 2005).

É importante salientar que há variações na composição quali e quantitativa destes produtos naturais a depender da composição química do solo (SANTOS et al., 2012); fase de crescimento e maturação da planta (TAVARES et al., 2005); sazonalidade da coleta (CERQUEIRA et al., 2009); temperatura do ar de secagem do material vegetal (RADÜNZ, 2002), dentre outras variáveis.

Os óleos essenciais, em geral, são secretados pelas glândulas capilares, ao cobrirem as folhas protegem a planta contra herbívoros e patógenos, enquanto o óleo secretado pelas glândulas capilares nas flores servem para atrair agentes polinizadores, no caso da família Lamiaceae, principalmente as abelhas (WERKER, 1993).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de duas maneiras: pela compressão de frutas cítricas ou por destilação a vapor de materiais vegetais, como folhas e sementes (MIRALLES, 1998). A maior parte dos óleos essenciais de plantas condimentares é extraída por diferentes técnicas de destilação a vapor, como destilação com vapor direto e indireto.

A composição dos óleos essenciais das plantas é determinada pela sua espécie, variedade, por condições agronômicas, período de colheita e tipo de processamento. Muito importante também são as características ambientais e ecológicas particulares da região de crescimento do vegetal. Estas fornecem características organolépticas como pungência, amargor e outras, de maneira particular e peculiar a cada planta aromática (GUILLÉN; CABO; BURILLO, 1996).

Estima-se que cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, alimentar, agronômica, sanitária, cosmética e de perfumes. Os óleos essenciais ou algum de seus componentes são muito usados em perfumarias, produtos sanitários, produtos ortodônticos, agronômicos e indústria alimentícia (HENRIQUE, SIMÕES-PIRES; APEL, 2009). Ademais, os óleos essenciais parecem apresentar propriedades medicinais para tratar uma ou outra disfunção orgânica ou doença sistêmica (SILVA et al., 2003; HAJHASHEMI; GHANNADI; SHARIF, 2003).

O papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas está relacionado com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa contra o reino animal (CARDOSO et al., 2004).

Eles são solúveis em lipídios e em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente menor do que a da água. São extraídos de diversas plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado à quente como do Mediterrâneo e dos países tropicais, onde eles representam uma parte importante da farmacopeia tradicional (BAKKALI et al., 2008).

Os produtos naturais do Brasil, especialmente os de óleos essenciais, vem sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas e já existem resultados promissores indicando o uso de produtos a base de óleos essenciais com indicação terapêutica. São exemplos de produtos recentemente lançados no mercado, o Acheflan[®] produzido com óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (“erva-baleeira”), contendo α -humuleno, com indicação anti-inflamatória de uso tópico para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais e o Rowachol[®], indicado para cálculos biliares e como colerético e colagogo, contém borneol, α -

pineno, canfeno, 1,8-cineol, mentona e mentol (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009).

Os estudos iniciais para caracterização química dos óleos essenciais começaram em meados do século XVIII, trazendo, assim, novos conhecimentos técnicos sobre o assunto e incentivando a evolução das pesquisas (MELO, 2005). Atualmente existe um grande número de plantas conhecidas para produção de óleos essenciais como, por exemplo, plantas da família Lamiaceae.

A família Lamiaceae engloba diversas plantas aromáticas, das quais é possível extrair óleo essencial muito cheiroso, que apresenta em sua composição química, complexa mistura de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos. Várias espécies do gênero *Hyptis* também apresentam uma composição muito rica em óleos essenciais os quais tem demonstrado atividades antioxidante (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009), antimicrobiana (SANTOS et al., 2008; YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009) e antinociceptiva (LIMA; CARDOSO, 2007)

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir com o conhecimento químico de plantas do semiárido do nordeste brasileiro através da extração, isolamento e identificação de constituintes químicos das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth. e de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth. da família Lamiaceae.

3.2 Específicos

- Isolar, purificar, caracterizar e identificar/determinar constituintes químicos fixos das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth. e de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.;
- Caracterizar constituintes voláteis das folhas de *Hyptis macrostachys* Benth. e de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.
- Disponibilizar os extratos e seus constituintes químicos para avaliações farmacológicas.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e Equipamentos Utilizados

As cromatografias de adsorção em colunas foram realizadas em colunas de vidro de comprimentos e diâmetros variados, utilizando como adsorvente sílica gel da Merck, 7734, com partículas 0,063-0,200 mm de diâmetros.

As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Preparativa (CCDP) foram preparadas com gel sílica 60 PF₂₅₄ artigo 7749, Merck, suspensas em água destilada (1:2) espalhadas sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quick fit” que conferia as camadas espessuras de 0,25 e 1,00 mm, respectivamente. As cromatoplas obtidas foram secas ao ar livre e, em seguida, ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.

As revelações das cromatoplas foram realizadas por exposição a luz ultravioleta, por meio do aparelho Mineralight, modelo UVGL-58 com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), e reveladas em uma câmara saturada com vapores de iodo.

Os espectros de absorção na região de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetros VARIAN e BOMEM 100MB, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr (0,5 mg da amostra/100 mg de KBr).

Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kopfle”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que variava de 0 a 350° C.

O reagente de Libermann-Buchard foi utilizado para a detecção dos terpenos, e que também serve para a detecção de esteroides.

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN SYSTEM, operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN ¹H) e 125 MHz para carbono-13 (RMN ¹³C), e VARIAN MERCURY operando a 200 MHz para hidrogênio (RMN ¹H) e 50 MHz para carbono-13 (RMN ¹³C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades da RMN ¹H foram indicadas segundo a

convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *ddd* (duplo duplo dubleto), *dddd* (duplo duplo duplo dubleto), *t* (tripleto), *tl* (tripleto largo), *q* (quadrupleto) e *m* (multipleto).

Os solventes utilizados foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puro ou em misturas binárias, seguindo gradiente crescente de polaridade, utilizando para análises solventes da Merck, Vetec, e solventes deuterados (RMN).

Um aparelho de Média Pressão (BÜCHI Pump Manager C-615/605) foi utilizado para a resolução cromatográfica do extrato etanólico bruto de *Hyptis umbrosa*.

Um cromatógrafo para CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa) da marca Shimadzu GC17-A foi utilizado para a caracterização dos óleos essenciais das espécies em estudo.

O Polarímetro (Jasco, modelo P-20000) foi utilizado para determinação de $[\alpha]_D^{20}$.

4.2 Material Vegetal

4.2.1 *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

As folhas e os caules de *Hyptis macrostachys* e de *Hyptis umbrosa* foram coletadas em agosto de 2009, no município de Maturéia-PB, semiárido paraibano. Os materiais foram identificados pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, da UFPB sob identificação AGRA et al. 6947 para *Hyptis macrostachys* e AGRA et al. 6964 para *Hyptis umbrosa*.

4.2.2 Processamento do material vegetal de *Hyptis macrostachys* Benth.

O material vegetal (3,5 kg), folhas e caules, foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foram submetidos a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 2,0 kg do pó planta.

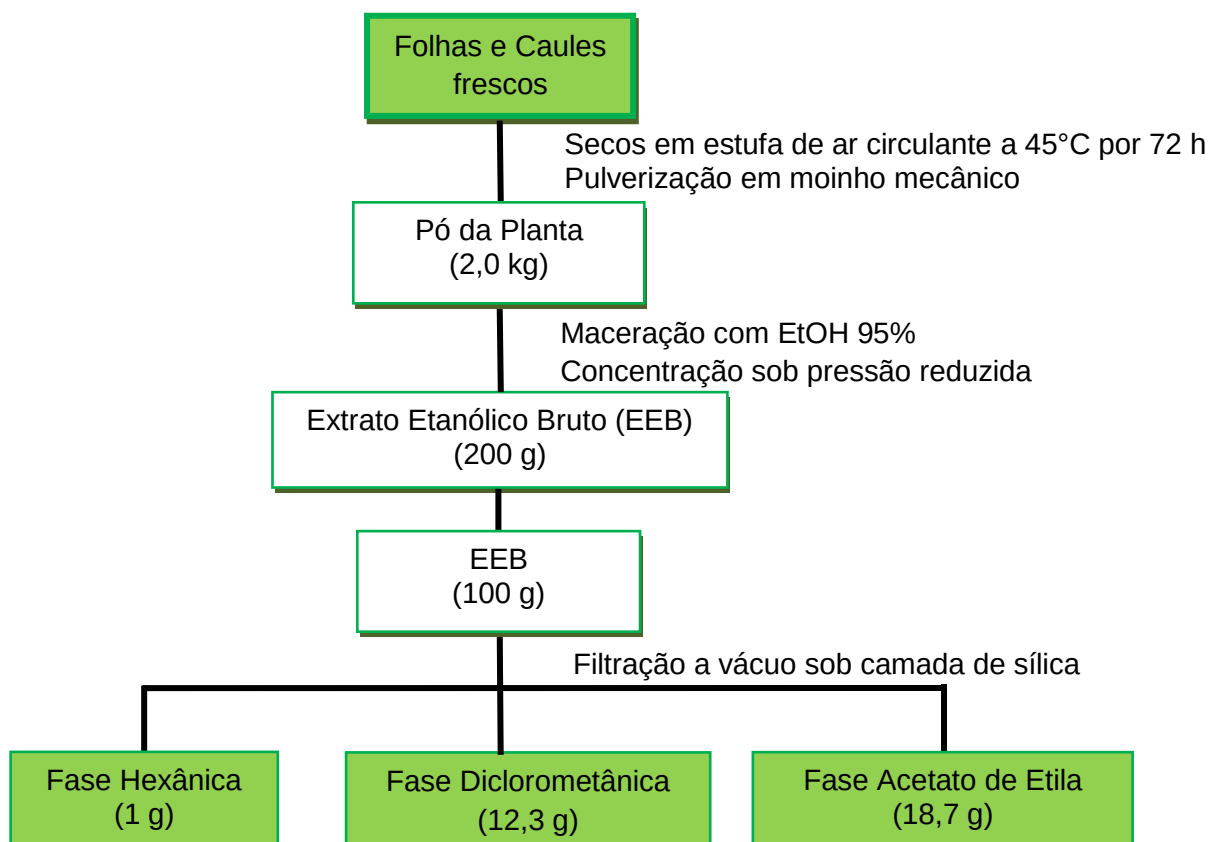
4.2.3 Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.

O material vegetal seco e pulverizado (2,0 kg) foi macerado com EtOH (95%) durante 72 horas, esse processo de maceração foi repetido por três vezes. Obtendo-se assim a solução etanólica. Após a extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura de 40 °C obtendo-se 200 g do extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1, p. 58).

4.2.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.

Parte do EEB (100 g) foi submetido à cromatografia líquida a vácuo utilizando um funil de placa porosa e sílica-gel, e como eluentes hexano, diclorometano e acetato de etila, puro ou em misturas binárias. Fornecendo as fases hexânica (1 g), diclorometano (12,3 g) e acetato de etila (18,7 g) (Esquema 1, p. 58).

Esquema 1 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.



4.2.5 Isolamento dos constituintes químicos da fase diclorometano das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.

Uma alíquota de 10 g da fase diclorometano foi submetida a uma cromatografia em coluna, obtendo-se 305 frações de 125 mL (Tabela 1 e Esquema 2, p. 60). Essas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (Rfs). As frações 5-11 foram reunidas e recromatografadas em uma coluna com sílica gel e eluída com hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 79 frações que foram analisadas por CCDA utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila 10%, e reunidas de acordo com seus Rfs, as frações 13-19 foram recristalizadas em metanol, e submetidas à RMN de ^1H e codificada como Hm-1(30 mg).

As frações 31-33 foram reunidas e submetidas a uma filtração rápida em uma pequena coluna com sílica gel, utilizando-se hexano e acetato de etila na proporção 1:1 como fase móvel, desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada, evaporada a temperatura ambiente e submetida a RMN de ^1H , e codificada como Hm-2 (10 mg).

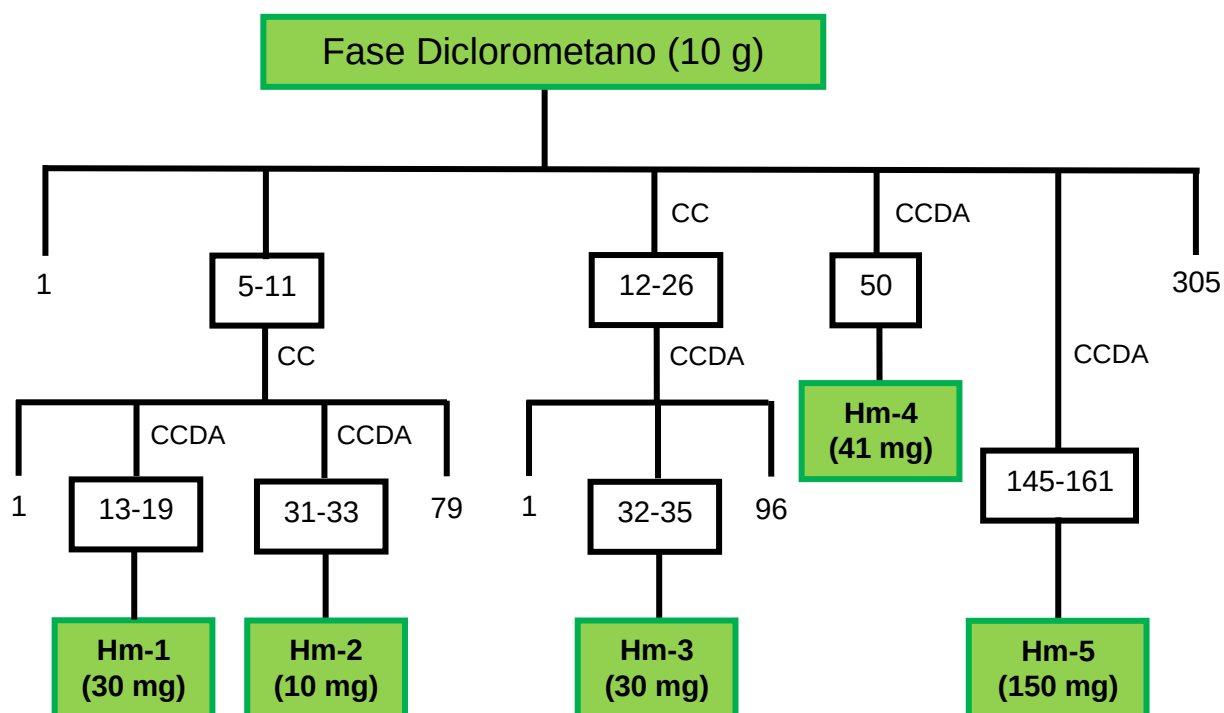
As frações 12-26 foram submetidas a uma CC, utilizando-se como fase móvel hexano e acetato de etila 95:5, obtendo-se 96 frações que foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos Rfs.

As frações 32-35 apresentaram-se como uma mancha única e após análise de RMN de ^1H foi codificada como Hm-3 (30 mg). A fração 50 foi analisada por CCDA utilizando-se como fase móvel hexano e acetato de etila nas proporções de 70:30, e apresentando uma única mancha, foi submetido a análise de RMN de ^1H e codificada como Hm-4 (41 mg).

A fração 145-161 foi analisada por CCDA utilizando-se como fase móvel hexano e acetato de etila na proporção de 1:1 e mostrando uma única mancha, que foi submetida a análise de RMN ^1H e foi codificada como Hm-5 (150 mg).

Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Hyptis macrostachys* Benth.

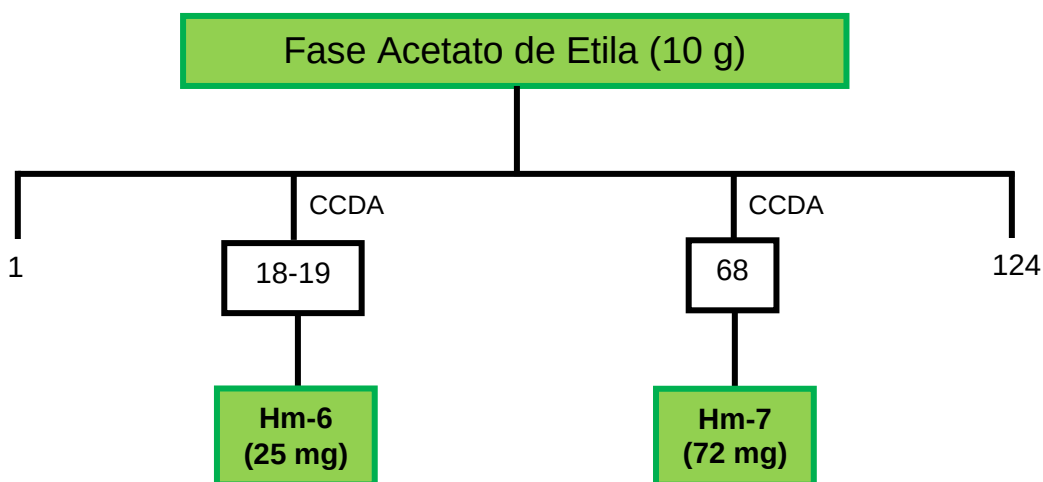
Frações	Solvente	Proporção (%)
1-12	Hexano	100
13-26	Hexano:AcOEt	95:5
27-101	Hexano:AcOEt	90:10
102-217	Hexano:AcOEt	85:15
218-245	Hexano:AcOEt	80:20
246-253	Hexano:AcOEt	75:25
254-273	Hexano:AcOEt	60:40
274-297	AcOEt	100
298-305	AcOEt:MeOH	90:10

Esquema 2 – Isolamento dos constituintes químicos da fase diclorometano das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.

4.2.6 Isolamento dos constituintes químicos da fase acetato de etila das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.

Uma alíquota de 10 g da fase acetato de etila foi submetida a uma CC, utilizando gel-sílica como adsorvente e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, puro ou em misturas binárias, em grau crescente de polaridade. Foram coletadas 124 frações de 100 mL cada. Estas frações após serem analisadas por CCDA foram reunidas de acordo com os seus respectivos Rfs. As frações reunidas 18-19 foram recristalizadas com metanol, filtradas, desidratadas com sulfato de sódio anidro e submetidas à análise de RMN ^1H , e codificada como Hm-6 (28 mg) A fração 68 foi submetida à CCDA e apresentando-se como mancha única, foi encaminhada para análise de RMN de ^1H e codificada como Hm-7 (72 mg) (Esquema 3, p. 61).

Esquema 3 – Isolamento dos constituintes químicos da fase acetato de etila das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* Benth.



4.2.7 Processamento do material vegetal de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

O material vegetal (2,0 kg), folhas e caules, foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi submetido a um processo de trituração em moinho mecânico, obtendo-se 1,0 kg do pó planta.

4.2.8 Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

O material vegetal seco e pulverizado (1,0 kg) foi macerado com EtOH (95%) durante 72 horas, esse processo de maceração foi repetido por três vezes. Obtendo-se assim a solução etanólica. Após a extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura de 40 °C obtendo-se 100 g do EEB.

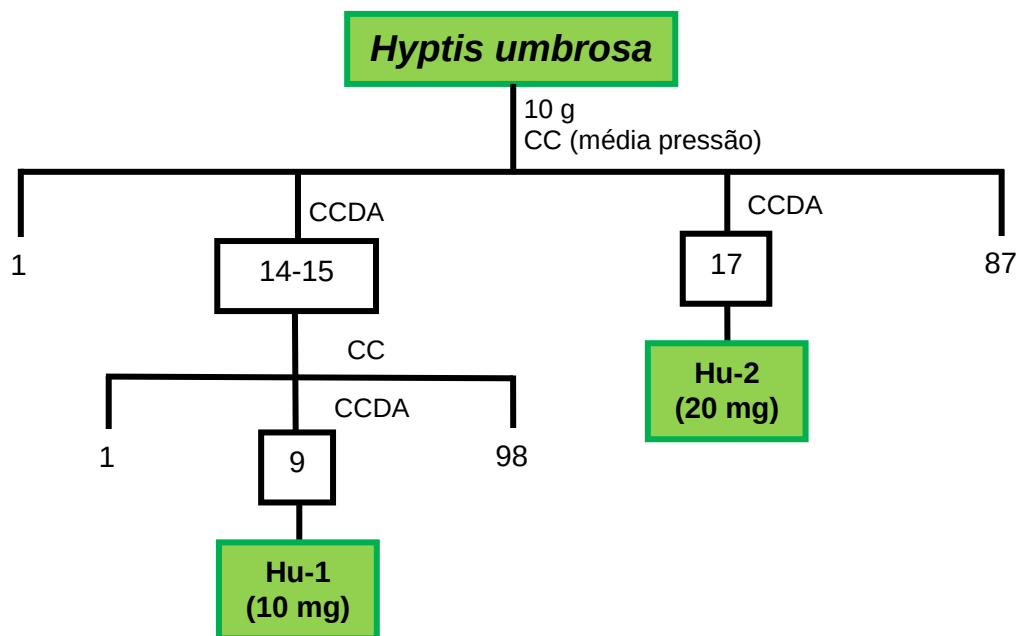
4.2.9 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e dos caules de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

Uma alíquota do EEB (10 g) foi submetida a uma cromatografia de média pressão, utilizando aparelho BUCHI Pump Manager C-615/605, utilizando sílica gel como adsorvente e como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em grau crescente de polaridade. Foram obtidas 87 frações de 20 mL cada, que após analisadas por CCDA, foram reunidas de acordo com os seus respectivos Rfs (Tabela 2, p. 63).

As frações reunidas 14-15 foram submetidas a uma CC, utilizando sílica gel como fase estacionária e, hexano e acetato de etila nas proporções de 1:1, como fase móvel, foram coletadas 98 frações, que foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos Rfs, a fração 9 apresentou-se como uma única mancha e foi submetida a análise de RMN de ^1H e codificada como Hu-1 (10 mg). A fração 17 após análise por CCDA foi submetida a análise de RMN de ^1H e codificada como Hu-2 (20 mg) (Esquema 4, p. 63).

Tabela 2 – Fracionamento cromatográfico sob média pressão do EEB de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

Frações	Solvente	Proporção (%)
1-6	Hexano	100
7-19	Hexano : AcOEt	80:20
20-30	Hexano : AcOEt	60:40
31-40	Hexano : AcOEt	20:80
41-46	Acetato	100
47-53	AcOEt : MeOH	97:3
54-59	AcOEt : MeOH	90:10
60-79	AcOEt : MeOH	70:30
80-87	AcOEt : MeOH	50:50

Esquema 4 – Isolamento dos constituintes químicos do EEB das folhas e dos caules de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

4.2.10 Extração dos óleos essenciais das folhas de *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

As folhas e os caules frescos de *Hyptis macrostachys* (1500 g) e *Hyptis umbrosa* (1000 g) foram submetidas a uma hidrodestilação durante 4 h, em um aparelho do tipo *clevenger* à temperatura de 100 °C, obtendo-se 0,12 e 0,6% do óleo essencial, respectivamente. Para análise, o óleo essencial foi diluído da seguinte forma: 2 µL de amostra em 1 mL de acetato de etila.

A análise em CG-EM foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GC17-A, usando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme). Foi utilizado Hélio como gás carreador, a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 230 °C, respectivamente.

A temperatura da coluna foi programada de 60 a 240 a 3 °C/min. A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (ADAMS, 1995). Os índices de retenção das substâncias foram obtidos pela coinjeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C9-C24), aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz, 1963.

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural de Hm-1

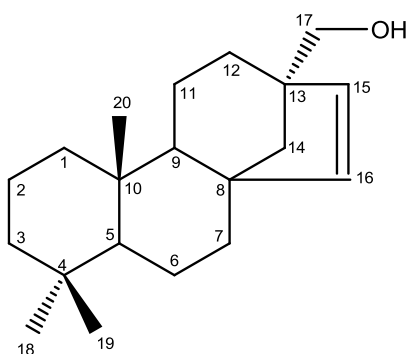
A substância codificada como Hm-1 foi isolada na forma de um pó amorfo. No espectro de RMN de ^{13}C APT (Figuras 10-13, p. 68-69) foi possível observar a presença de 20 sinais correspondentes a 20 átomos de carbono. Desses, quatro foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, quatro a carbonos metínicos, nove a carbonos metilênicos e três a carbonos metílicos. Os sinais em deslocamentos químicos de δ_{C} 55,6; 53,4; 137,4 e 131,6 quando comparados com a literatura (ABAD et al., 1994), sugeriram tratar-se de um esqueleto de diterpeno do tipo beierano, e foram atribuídos à C-5, C-9, C-15 e C-16, respectivamente. Observaram-se ainda os sinais de carbonos metílicos em δ_{C} 33,6; 21,9 e 15,0 que de acordo com a literatura foram atribuídos a CH_3 -18, CH_3 -19 e CH_3 -20. A presença do sinal em δ_{C} 68,7 inferiu uma oxigenação no C-17, os demais dados de carbonos estão na Tabela 3 (p. 67).

No espectro de RMN ^1H (Figuras 14-16, p. 70-71) foram observados os sinais em δ_{H} 5,80 (d, $J = 5,0$ Hz) e 5,55 (d, $J = 5,0$ Hz) atribuídos a H-15 e H-16 de diterpenos do tipo beierano. Observou-se ainda sinal em δ_{H} 3,51 (d, $J = 10,5$) e 3,42 (d, $J = 10,5$ Hz) corroborando aos dados de ^{13}C com uma oxigenação em C-17. Também foram observados três singletos em δ_{H} 0,84; 0,80 e 0,72 atribuídos as metilas CH_3 -18, CH_3 -19 e CH_3 -20, além de um dubleto em δ_{H} 0,98 (d, $J = 9,7$ Hz) atribuído a 2H-14, os demais sinais estão compilados na Tabela 3 (p. 67).

Assim, após comparação dos dados de RMN de Hm-1 com os descritos na literatura, pode-se concluir que Hm-1 se trata do diterpeno beierano, beier-15-en-17-ol, eritroxilol B. Esse composto já foi isolado em outras espécies de Lamiaceae, porém esse é o primeiro relato em *Hyptis macrostachys*.

Tabela 3 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-1 com os dados da literatura para o beier-15-en-17-ol (eritroxilol B).

Nº	Tipo de carbono	δ_c de Hm-1 em CDCl_3	δ_c (ABAD et al., 1994) em CDCl_3
1	CH_2	39,1	39,1
2	CH_2	18,5	18,5
3	CH_2	42,1	42,0
4	C	33,1	33,1
5	CH	55,9	55,9
6	CH_2	20,1	20,0
7	CH_2	37,1	37,1
8	C	48,8	48,6
9	CH	53,4	53,3
10	C	37,1	37,3
11	CH_2	19,5	19,5
12	CH_2	27,8	27,8
13	C	50,0	49,9
14	CH_2	55,6	55,5
15	CH	137,4	137,4
16	CH	131,6	131,6
17	CH_2	68,7	68,6
18	CH_3	33,6	33,6
19	CH_3	21,9	21,9
20	CH_3	15,0	15,0



Eritroxilol B

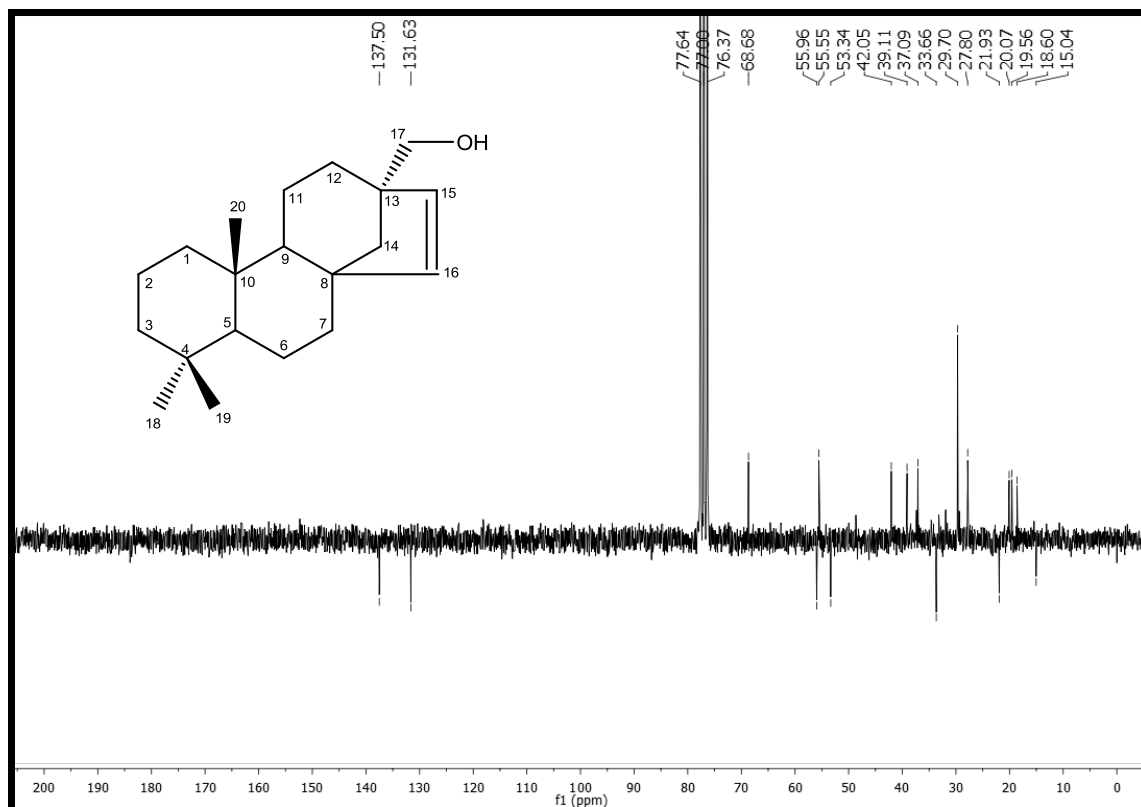
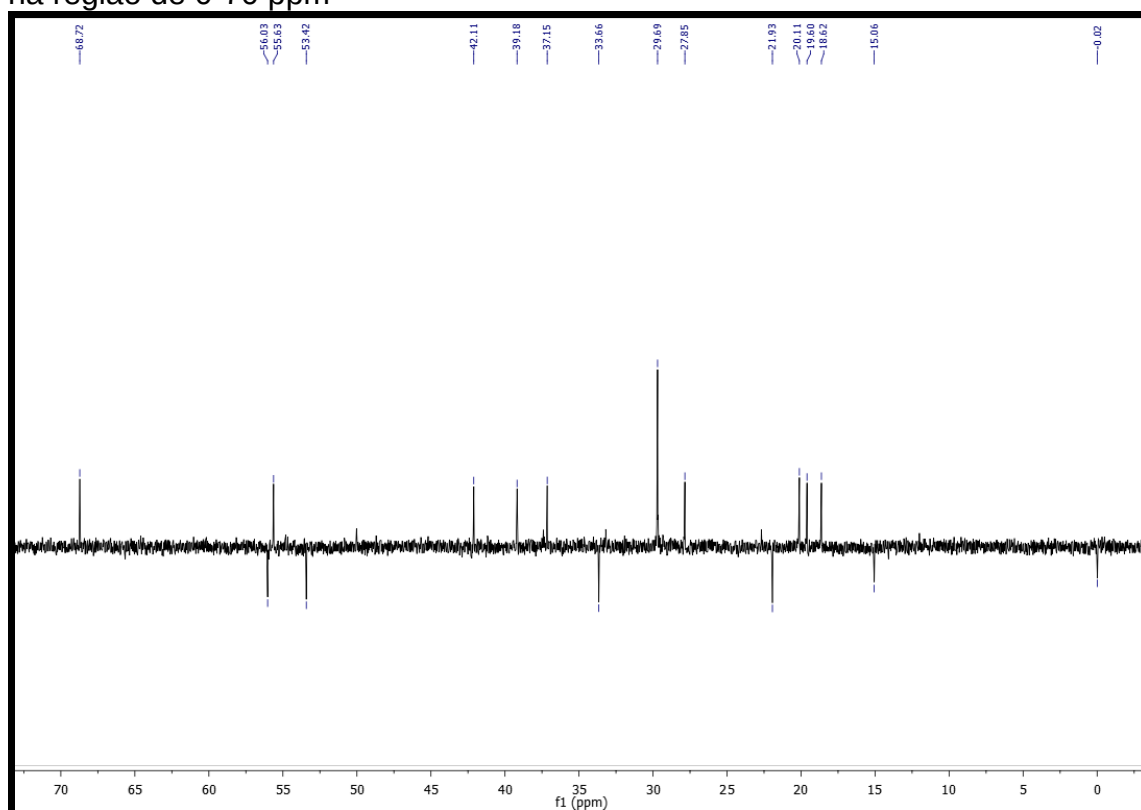
Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1.**Figura 11** – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0-70 ppm

Figura 12 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0-45 ppm.

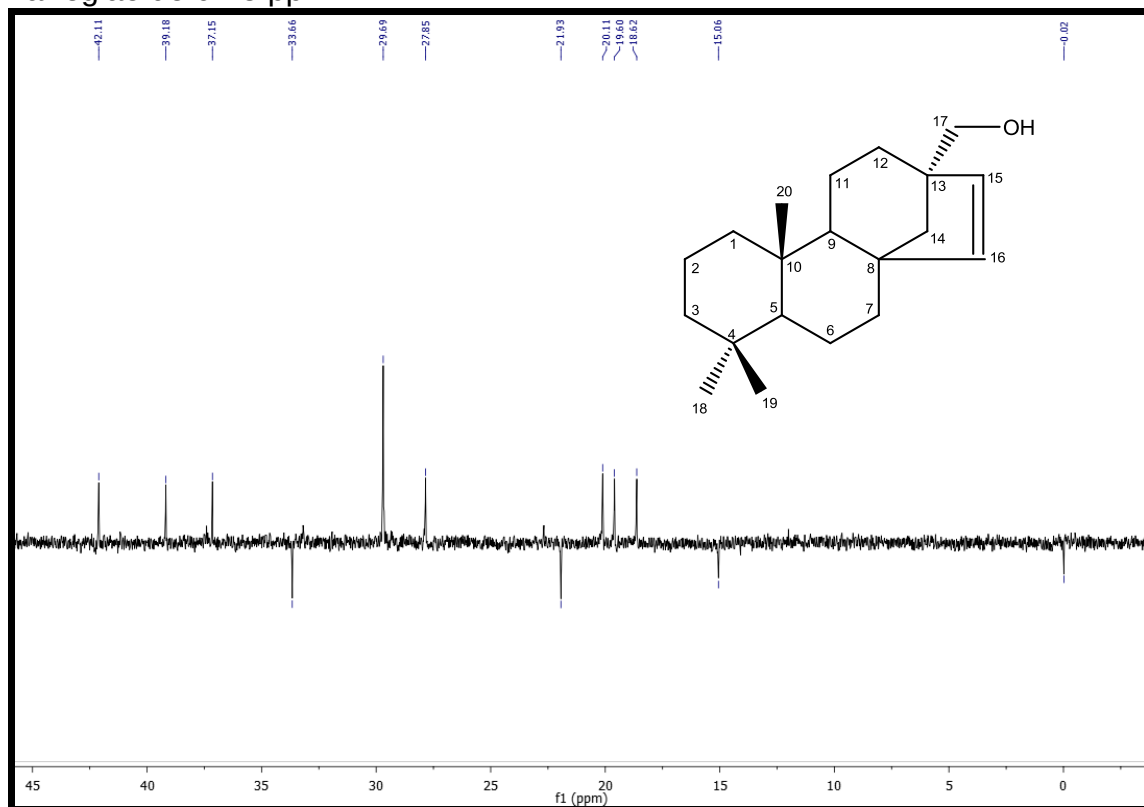


Figura 13 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 50-140 ppm.

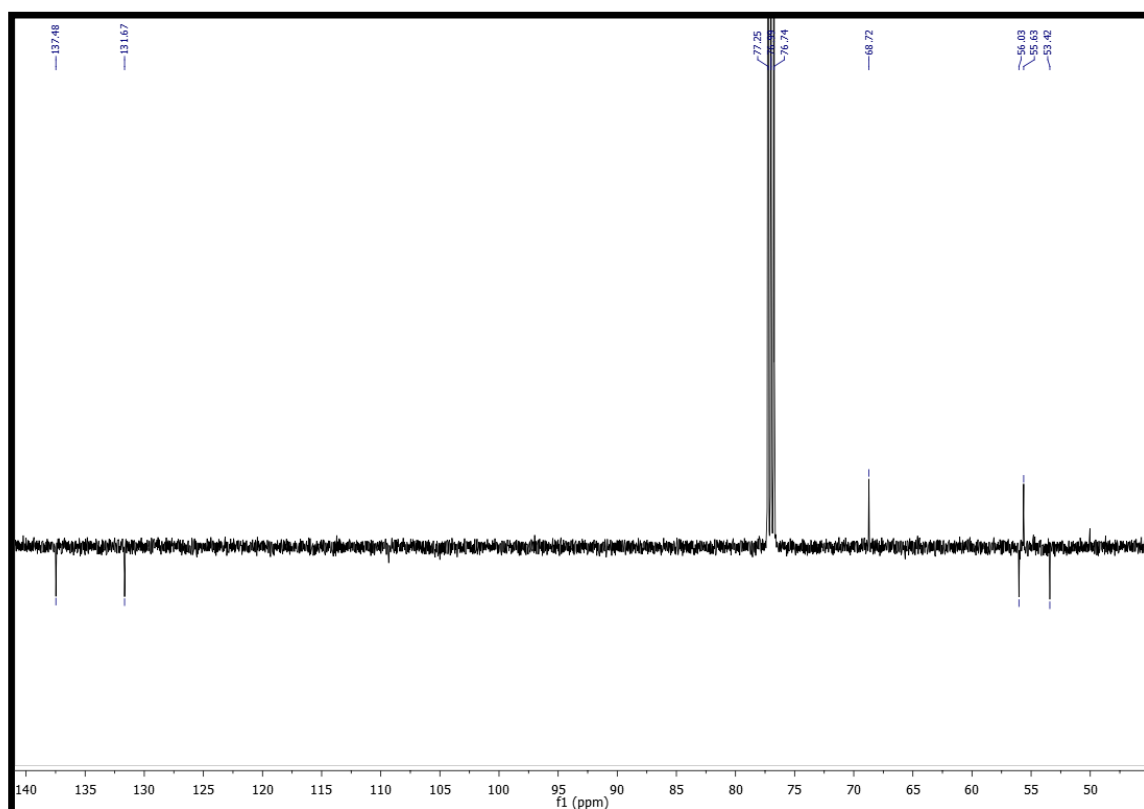


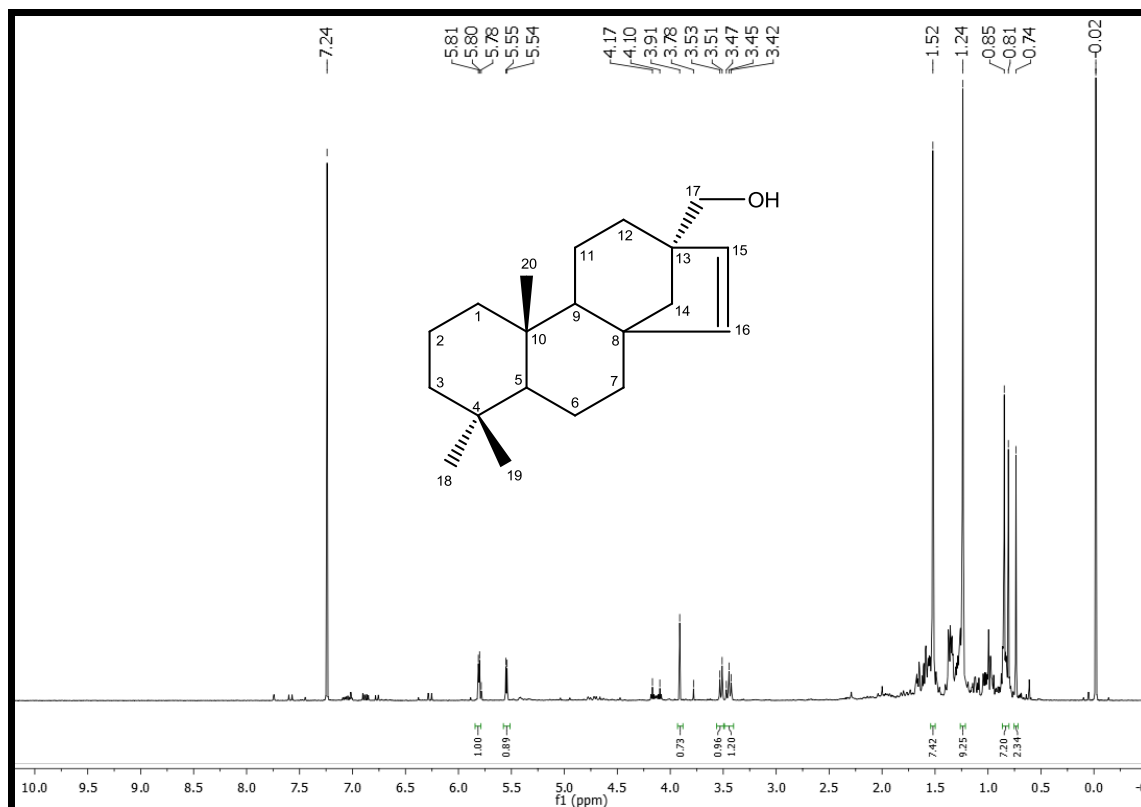
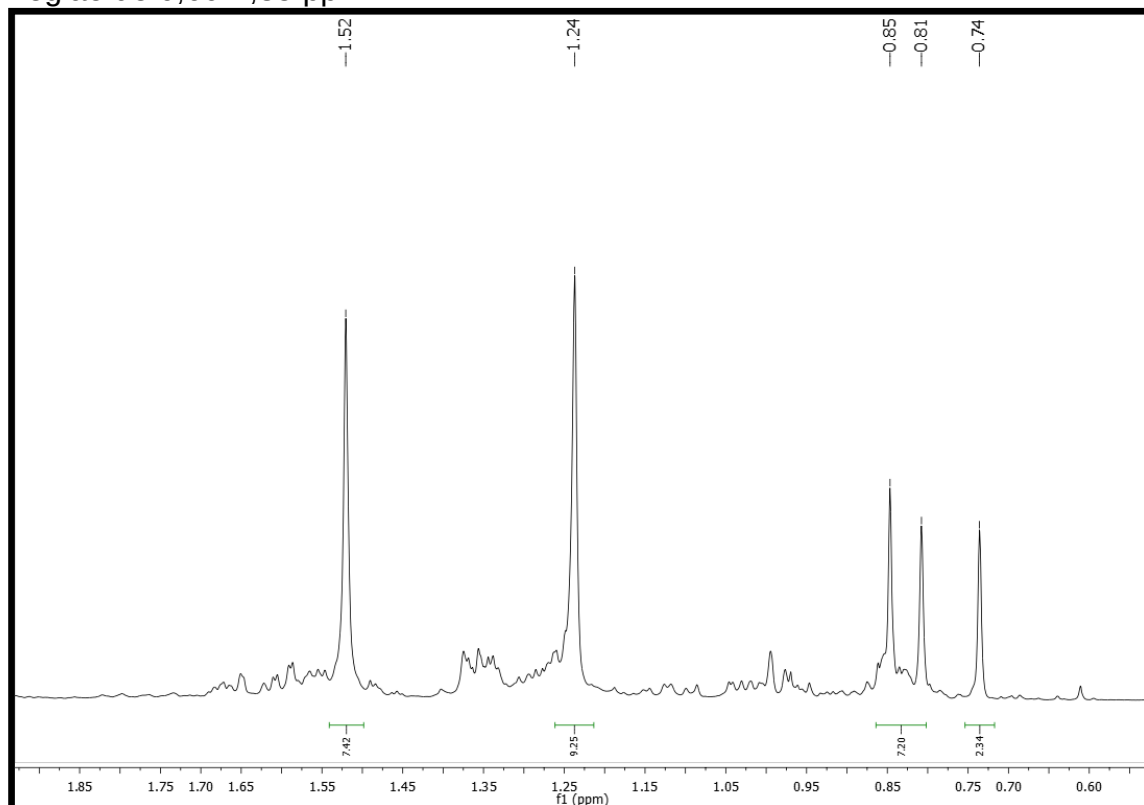
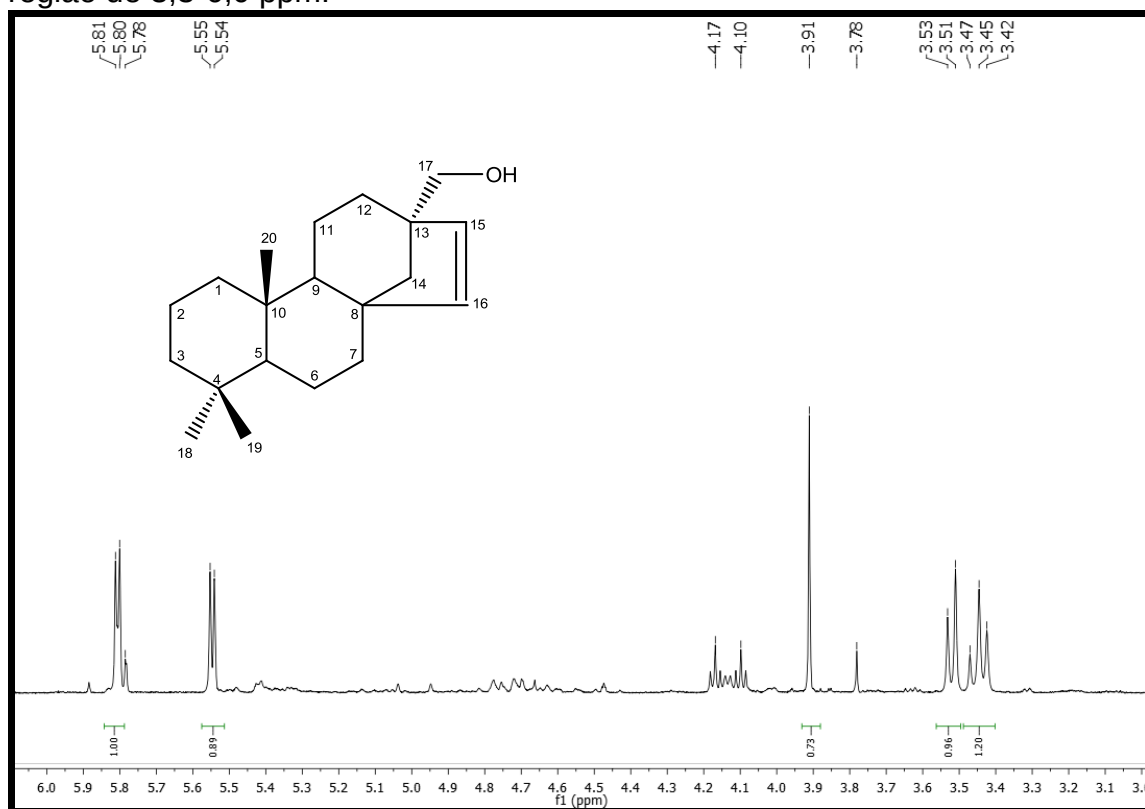
Figura 14 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-1.**Figura 15** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 0,60-1,85 ppm.

Figura 16 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-1 na região de 3,3-6,0 ppm.



5.2 Identificação estrutural de Hm-2

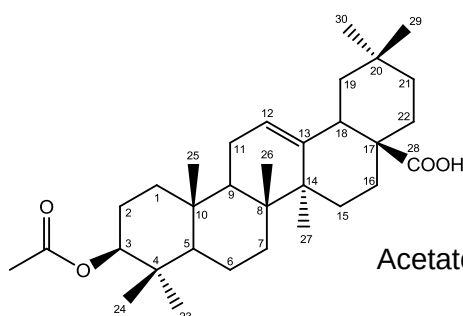
A substância codificada como Hm-2 foi obtida como um sólido amorfo. O espectro de RMN ^1H (Figuras 17-19, p. 74-75) mostrou sinais referentes a sete metilas singleto δ_{H} 0,70; 0,81; 0,82; 0,86; 0,88; 0,89; e 1,08 além de uma metila de acetato singleto em δ_{H} 2,00, compatíveis com a estrutura de um triterpeno acetilado. O sinal em δ_{H} 5,22 (sl) indicou a presença de hidrogênio olefínico. O hidrogênio metínico verificado em δ_{H} 4,47 tripleto largo ($J = 8,5 \text{ Hz}$) é indicativo de acetoxila equatorial em C-3.

O espectro RMN de ^{13}C -APT (Figuras 20-22, p. 75-76) mostrou 32 átomos de carbonos majoritários, sendo 9 carbonos não hidrogenados, 10 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 8 carbonos metílicos. Os sinais em δ_{C} 123,2 e 143,0 foram atribuídos aos carbonos C-12 e C-13, respectivamente de triterpeno do tipo oleanano. Os sinais em δ_{C} 80,9 e 171,1 são característicos de grupo acetoxi em C-3, além do sinal em δ_{C} 184,3 característico de ácido carboxílico em C-17. Os demais sinais estão compilados na Tabela 4 (p. 73).

Após comparação com dados da literatura (OGIHARA et al., 1997), pode-se concluir que Hm-2 se trata do 3- β -acetoxi-oleano-12-en-28-oico, acetato do ácido oleanólico. Esta substância tem ampla distribuição no reino vegetal, porém está sendo relatada pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 4 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-2 com os dados da literatura para o ácido 3 β -acetoxi-oleano-12-en-28-oico (acetato do ácido oleanólico).

Nº	Tipo de carbono	δ_c de Hm-2 em CDCl_3	δ_c (OGIHARA et al., 1997) em CDCl_3
1	CH_2	38,0	37,6
2	CH_2	23,5	23,5
3	CH	80,9	80,9
4	C	37,6	37,6
5	CH	55,2	55,1
6	CH_2	18,1	18,1
7	CH_2	32,4	32,4
8	CH	39,2	39,1
9	CH	47,5	47,4
10	C	36,9	36,8
11	CH_2	22,8	22,7
12	CH	122,4	122,4
13	C	143,5	143,5
14	C	41,5	41,4
15	CH_2	27,6	27,5
16	CH_2	23,3	23,3
17	C	46,5	46,4
18	CH	40,8	40,8
19	CH_2	45,8	45,7
20	C	30,6	30,6
21	CH_2	33,7	33,6
22	CH_2	32,4	32,4
23	CH_3	28,0	27,9
24	CH_3	16,6	16,6
25	CH_3	15,3	15,3
26	CH_3	17,1	16,9
27	CH_3	25,8	25,8
28	COOH	184,3	184,3
29	CH_3	33,0	33,0
30	CH_3	23,5	23,5



Acetato do ácido oleanólico

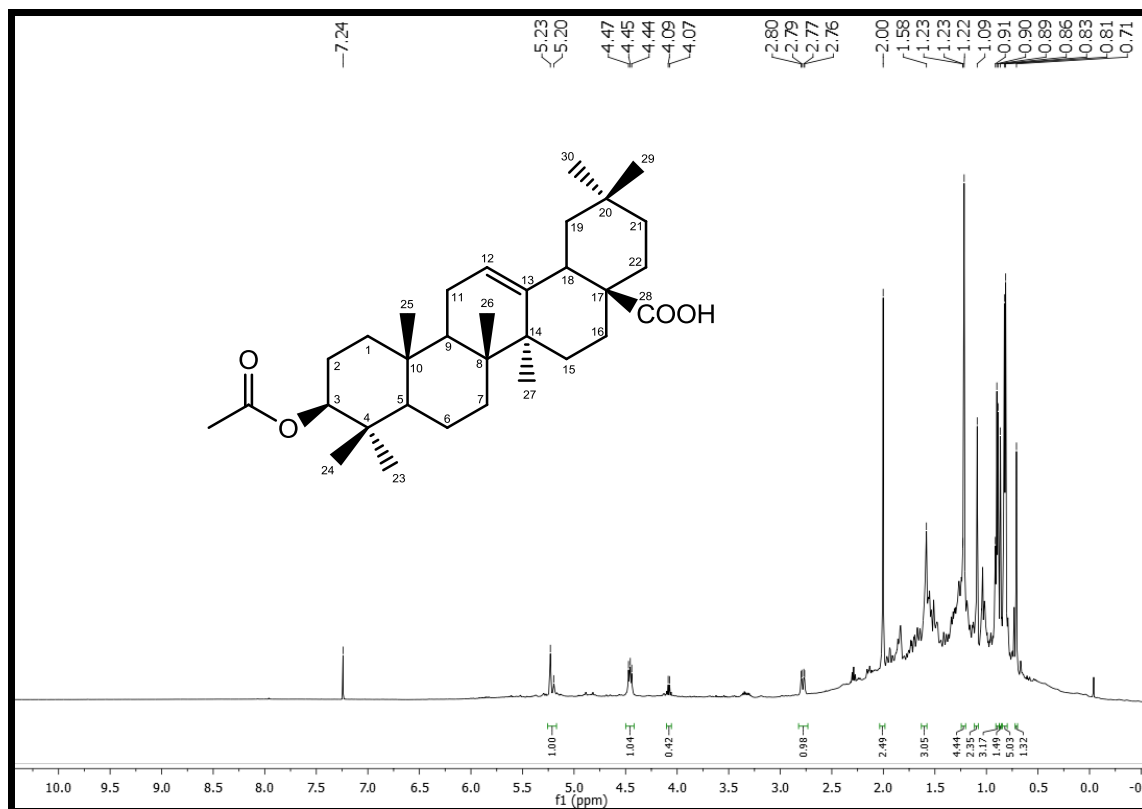
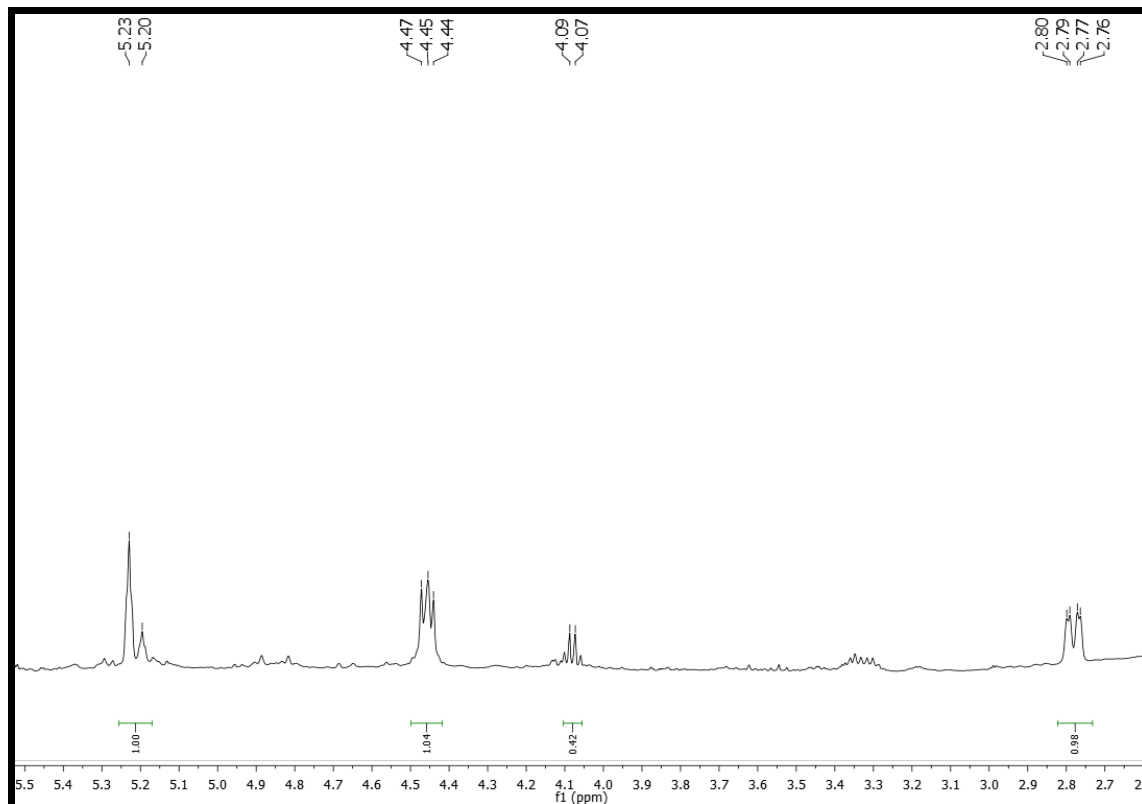
Figura 17 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2.**Figura 18** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 2,7-5,4 ppm.

Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 0,6-2,1 ppm.

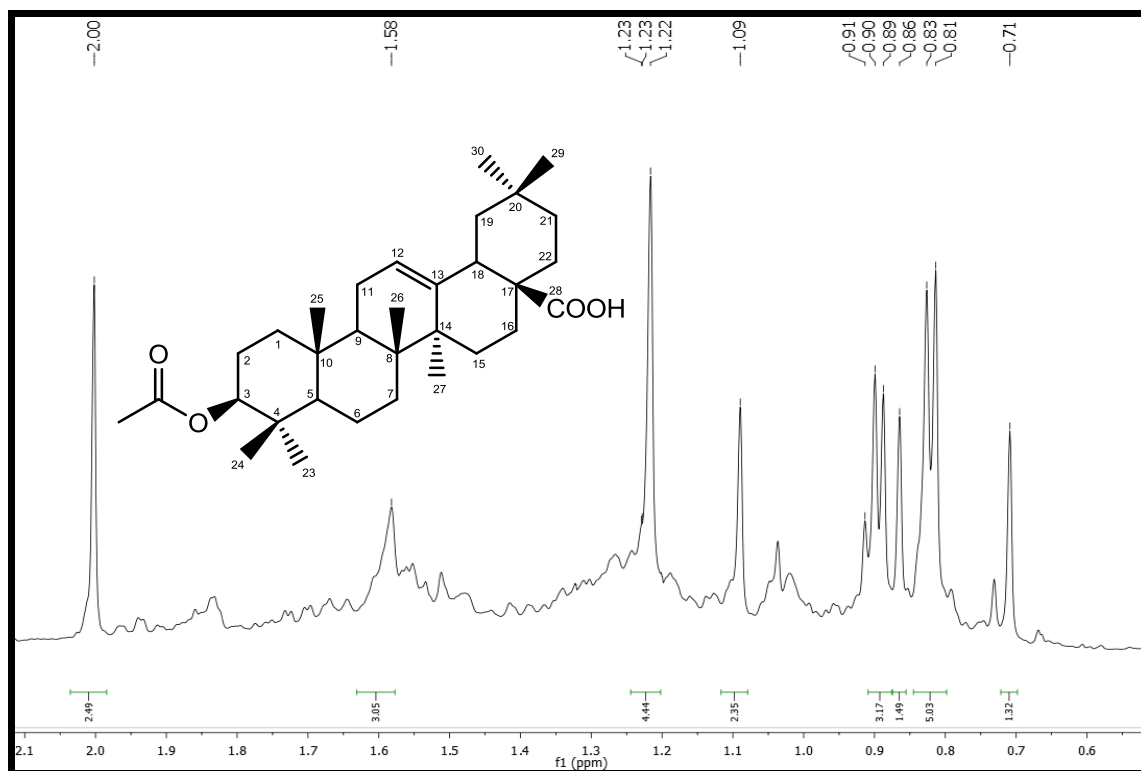


Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2.

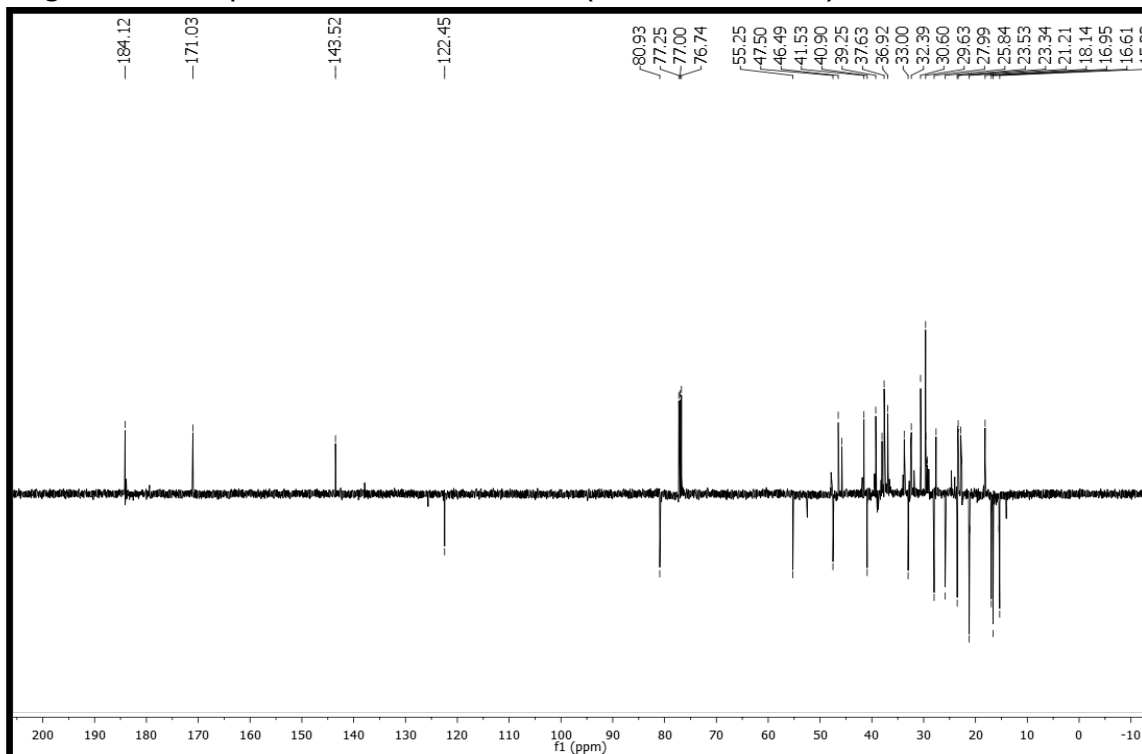


Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 12-58 ppm.

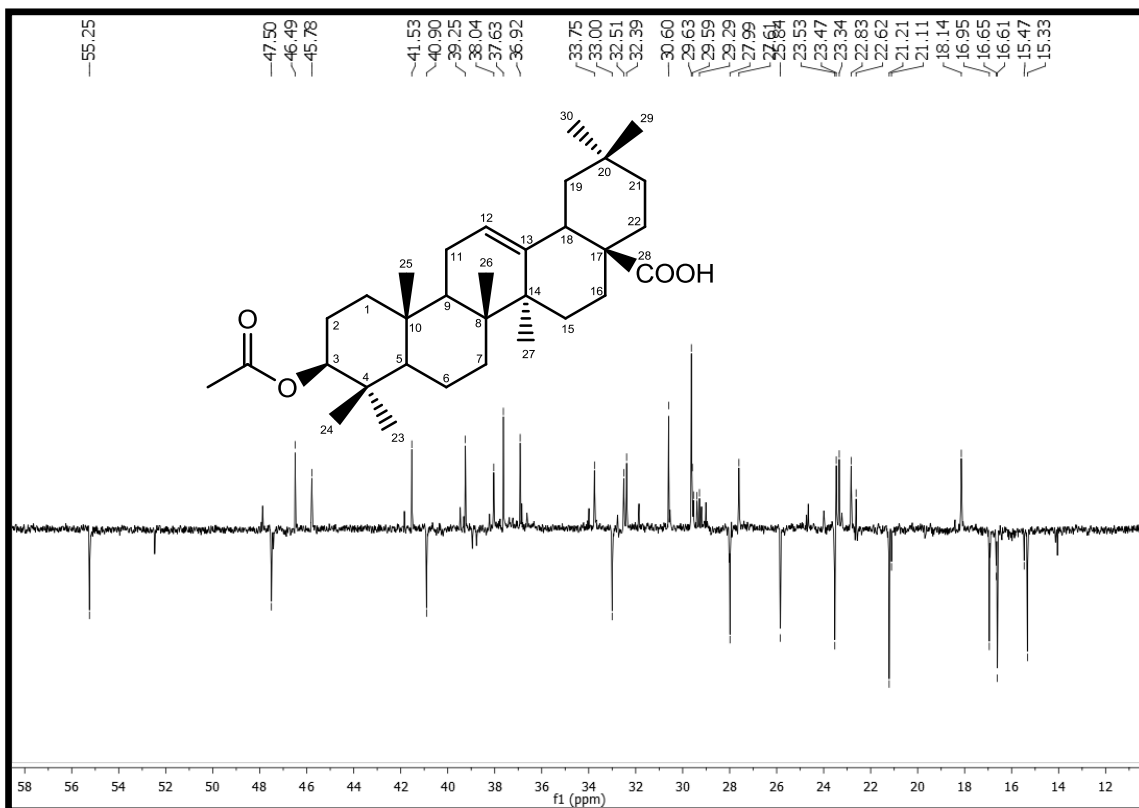
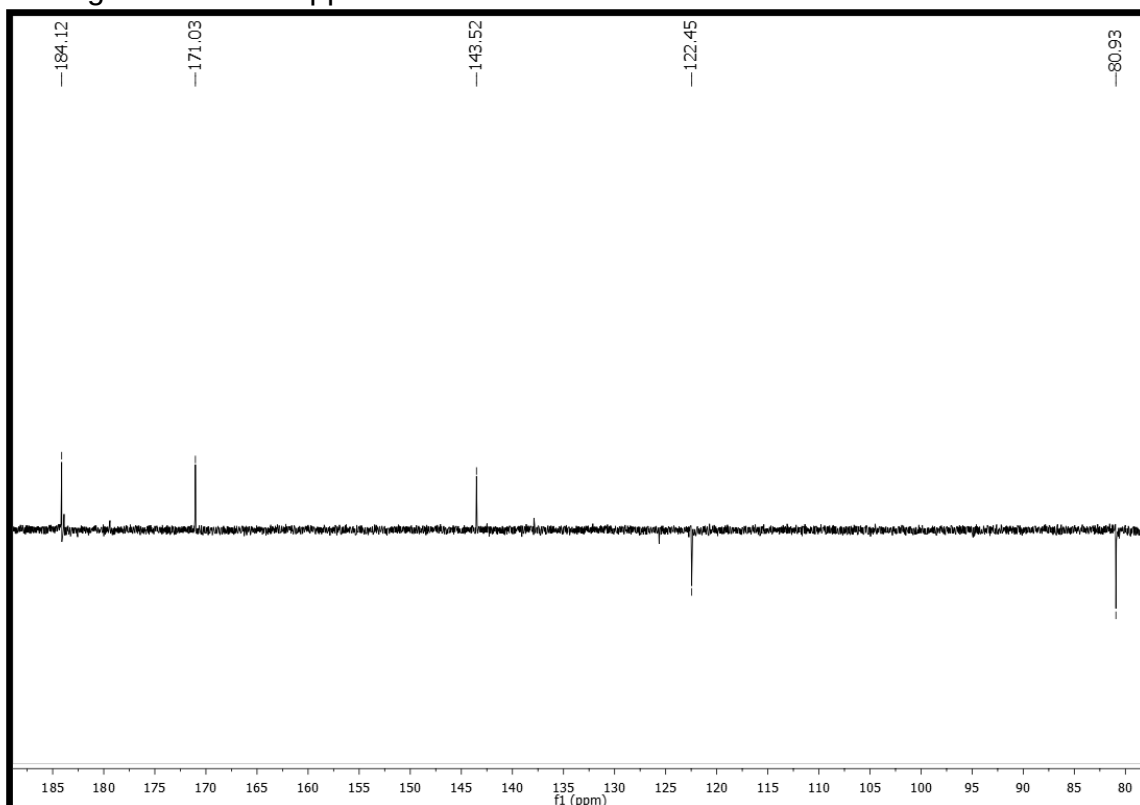


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-2 na região de 80-185 ppm.



5.3 Determinação estrutural de Hm-3

A substância Hm-3 foi isolada na forma de um pó amorfo, p.f. 67-70 °C. A rotação óptica foi obtida à temperatura ambiente em polarímetro Jasco modelo P-2000 $[\alpha]_D^{24} +54$ (c 0,001, CHCl_3). O espectro de massas obtido por EM-AR-IES (Espectrometria de massas de alta resolução por ionização de elétron spray) mostrou um pico em m/z 333.1885 $[\text{M-H}]^-$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$ (Figuras 23, p. 80).

O espectro de infravermelho (Figura 24, p. 80) mostrou absorções em 3419, 3200-2875 e 1693-1641 cm^{-1} característica de estiramento de grupo hidroxila, ácido carboxílico e de ligação dupla, respectivamente.

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 25-28, p. 81-82) foram observados sinais em δ_{H} 4,86 (sl, 1H) e 4,76 (sl, 1H) atribuídos aos dois hidrogênios H-17 da dupla exocíclica de diterpenos grindelanos 8-17. Foram observados também os sinais em δ_{H} 5,96 (1H, dd, $J = 11,0$ e $17,5$ Hz), 5,23 (1H, dd, $J = 1,0$ e $17,5$ Hz) e 5,06 (1H, dd, $J = 1,5$ e $11,0$ Hz) que foram atribuídos a H-14 e 2H-15. Observaram-se também três singletos em δ_{H} 0,66; 1,16 e 1,21 correspondentes a três grupos metila além do sinal em δ_{H} 4,05 (t, $J = 7,0$ Hz) atribuído a H-12. Os demais deslocamentos químicos estão na Tabela 5 (p. 79).

No espectro de RMN de ^{13}C -APT (Figuras 29-30, p. 83) observou-se a presença de vinte sinais, correspondentes a vinte átomos de carbono. Destes seis foram atribuídos a átomos de carbono não hidrogenados, oito a átomos de carbono metilênicos, três a átomos de carbono metínicos e três a átomos de carbono metílicos. Os sinais em δ_{C} 47,9; 88,3 e 83,9 foram atribuídos aos carbonos C-5, C-9 e C-13, respectivamente de diterpenos do tipo grindelano (RAMAN et al., 2000). Os sinais em δ_{C} 153,5 e 107,3 característicos de dupla exocíclica foram atribuídos a C-8 e C-17, respectivamente. O sinal em δ_{C} 183,4 foi compatível com ácido carboxílico em C-4 e o sinal em δ_{C} 28,7 foi atribuído a metila C-18 equatorial (MERALGEMAN; PEDROSA; GIL, 2004). O sinal em δ_{C} 19,7 foi atribuído a metila C-16 de diterpenos grindelanos com dupla ligação entre C-14 e C-15 cujos deslocamentos químicos foram δ_{C} 143,2 e 112,6, respectivamente. O deslocamento químico de C-16 está sofrendo proteção devido a um efeito gama de um grupo hidroxila inserido na posição alfa em C-12 cujo

deslocamento químico foi de δ_C 78,0. Essa proposição ainda é reforçada pelo mesmo efeito em C-9. Os demais deslocamentos estão compilados na Tabela 5 (p. 79).

O espectro HMQC (Figuras 31-34, p. 84-85) mostrou correlação do sinal em δ_H 1,94 com δ_C 47,9 confirmando a atribuição a H-5. Mostrou ainda uma correlação do sinal em δ_H 1,16 com δ_C 19,5 confirmando CH₃-16 e de δ_H 4,05 com δ_C 78,0 confirmando H-12.

No espectro HMBC (Figuras 35-39, p. 86-88) observou-se correlações do sinal em δ_H 1,16 (CH₃-16) com os carbonos em δ_C 78,0; 83,0 e 143,2 que foram atribuídos a C-12, C-13 e C-14, respectivamente. Observou-se ainda correlações do sinal em δ_H 0,66 (CH₃-20) com os carbonos em δ_C 32,4; 47,5, 88,3 e 43,2 que foram atribuídos a C-1, C-5, C-9 e C-10, respectivamente. Observou-se ainda uma correlação do sinal em δ_H 4,96 (H-17) com o carbono em δ_C 33,3 que foi atribuído a C-7 e do sinal em δ_H 2,26 (H-7) com δ_C 25,3 que foi atribuído a C-6, além do sinal em δ_H 1,21 (CH₃-18) com os carbonos em δ_C 37,8; 44,2 e 183,1 que foram atribuídos a C-3, C-4 e C-19, respectivamente. Observou-se o sinal em δ_H 2,18 (H-11) com os sinais em δ_C 153,5; 88,3; 78,0 e 83,9 confirmando H-11 e correlação desse sinal no HMQC com o carbono em δ_C 34,6 confirma C-11. As demais correlações estão compiladas na Tabela 5 (p. 79).

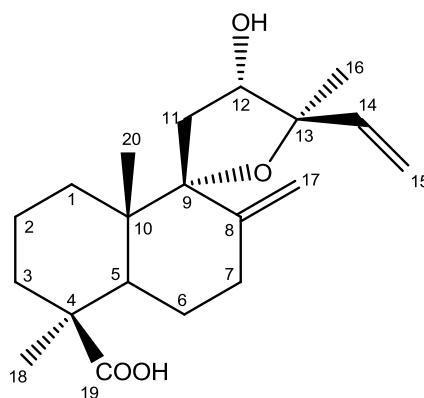
No espectro COSY (Figuras 40-43, p. 88-90) foram observadas correlações do sinal em δ_H 5,96 (H-14) com os sinais em δ_H 5,23 e 5,06 (2H-15) confirmando uma dupla ligação monossubstituída além da correlação de δ_H 1,94 (H-5) com 1,90 (H-6) confirmando H-6 e de δ_H 1,68 (H-1) com 1,82 que foi atribuído a H-2.

No espectro NOESY (Figuras 44-46, p. 90-91) foram observadas correlações dos sinais em δ_H 2,10 (H-7eq) com 4,96 (H-17) do sinal em δ_H 1,02 (H-3ax) com 1,94 (H-5) e de δ_H 0,66 (CH₃-20) com 2,18 (H-11).

Após análises desses dados pode-se concluir que a substância Hm-3 trata-se do ácido labda-8(17),14-dien-9,13-epoxi,12 α -hidroxi-19-óico, um novo produto natural, nomeado hiptenol.

Tabela 5 – Dados de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais (500 e 125 MHz em CDCl_3) de Hm-3 – ácido labda-8(17),14-dien-9,13-epoxi,12 α -hidroxi-19-óico (hiptenol).

C	δC	HMQC	HMBC	COSY
		^1H ^{13}C		
1	32,4	1,68 (ddd, $J = 4,0; 13,5; 4,0$ Hz, H-1 ax) 1,22 (m, H-1 eq)		H-1 eq
2	19,6	1,82 (m, H-2 ax), 1,51 (m, H-2 eq)	C-1	H-3, H1
3	37,8	1,02 (ddd, $J = 13,5; 4,0; 4,0$ Hz, H-3 ax), 2,10 (m, H-3 eq)		H-2, H-3
4	44,2	-		
5	47,9	1,94 (dd, $J = 13,0; 3,5$ Hz)		H-6
6	25,3	1,90 (m, H-6 ax), 1,30 (m, H-6 eq)	C-8	
7	33,3	2,26 (ddd, $J = 5,5; 6,0; 13,0$ Hz, H-7 ax), 2,10 (m, H-7 eq)	C-6, C-8	H-7, H-6
8	153,5	-		
9	88,3	-		
10	43,2	-		
11	34,6	2,18 (d, $J = 5,0$ Hz)	C-8, C-9, C-10 C-12, C-13	H-12
12	78,0	4,05 (t, $J = 7,0$ Hz)	C-9, C-14, C-16	H-11
13	83,9	-		
14	143,2	5,96 (dd, $J = 11,0; 17,5$ Hz)	C-13	H-15a H-15b
15	112,6	5,23 (dd, $J = 1,0, 17,5$ Hz, Ha), 5,06 (dd, $J = 1,5; 11,0$ Hz, Hb)	C-13, C-14	H-14
16	19,6	1,16 (s)	C-12, C-13, C-14	
17	107,3	4,86 (sl), 4,76 (sl)	C-7, C-8, C-9	
18	28,7	1,21 (s)	C-3, C-4, C-5, C-19	
19	183,1	-		
20	15,3	0,66 (s)	C-1, C-5, C-9, C-10	



Hiptenol

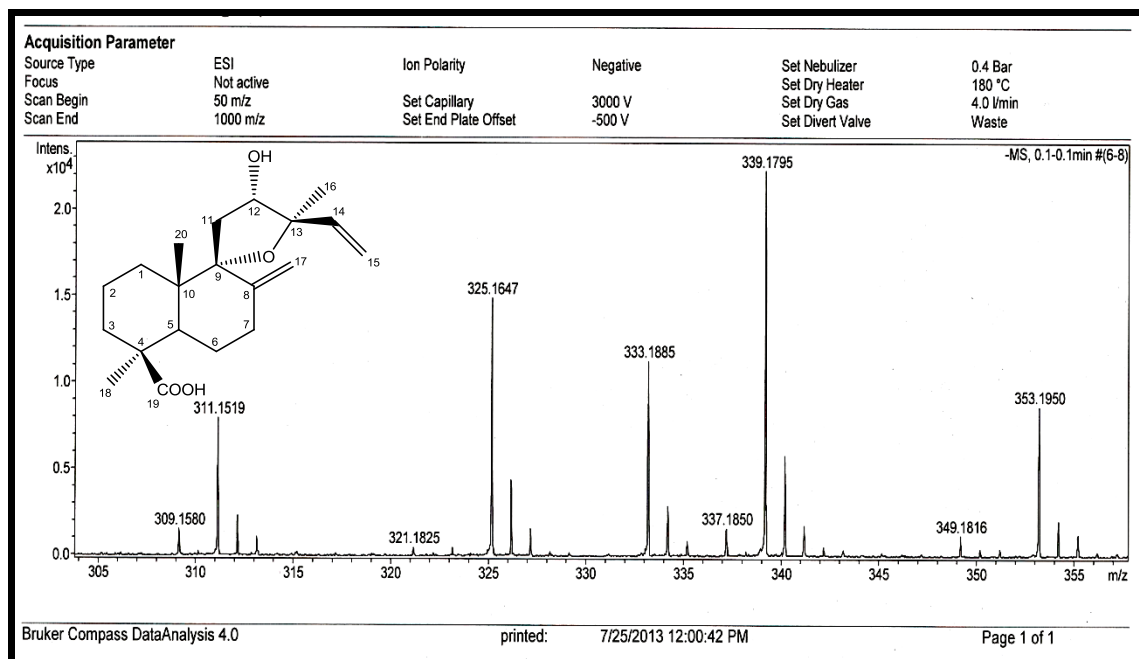
Figura 23 – Espectro de massas de alta resolução de Hm-3 obtido por IES⁻.

Figura 24 – Espectro de IV de Hm-3 obtido em pastilhas de KBr.

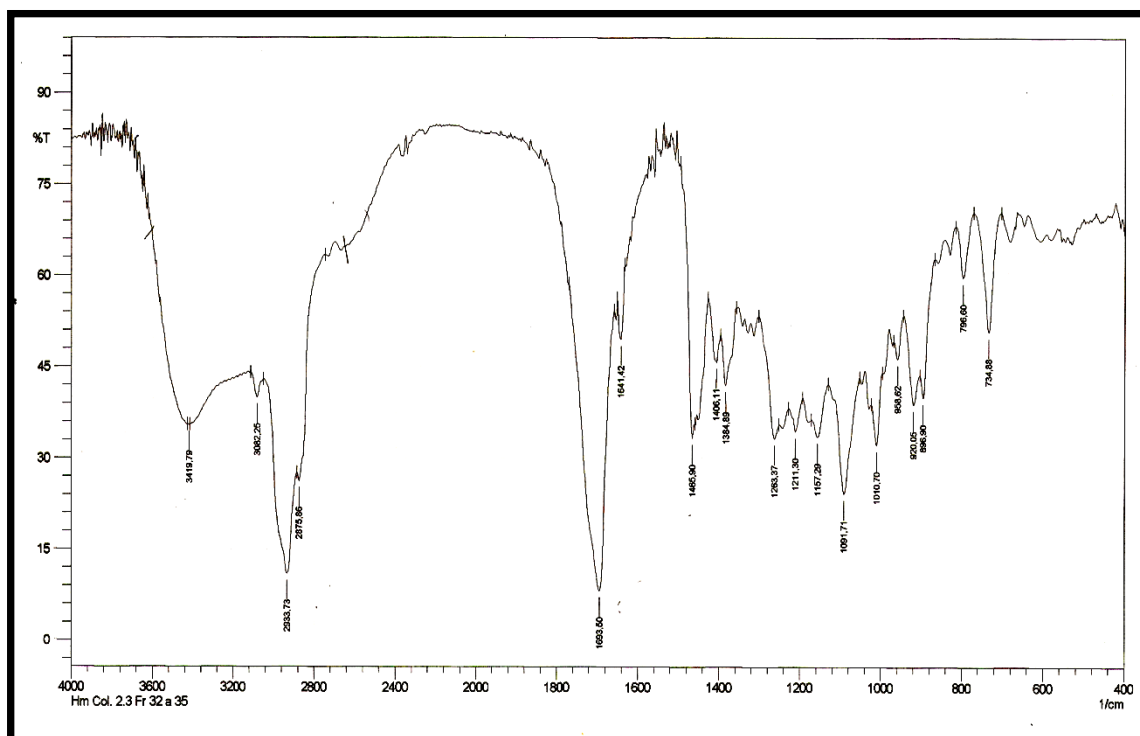


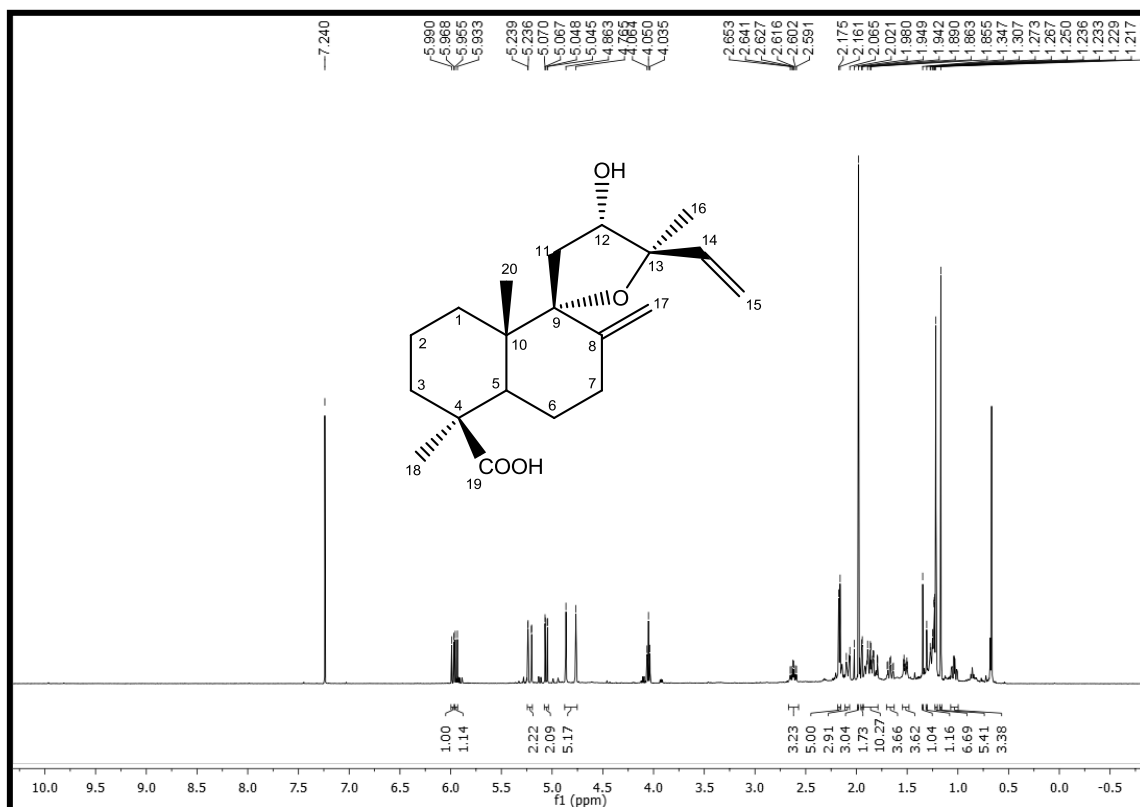
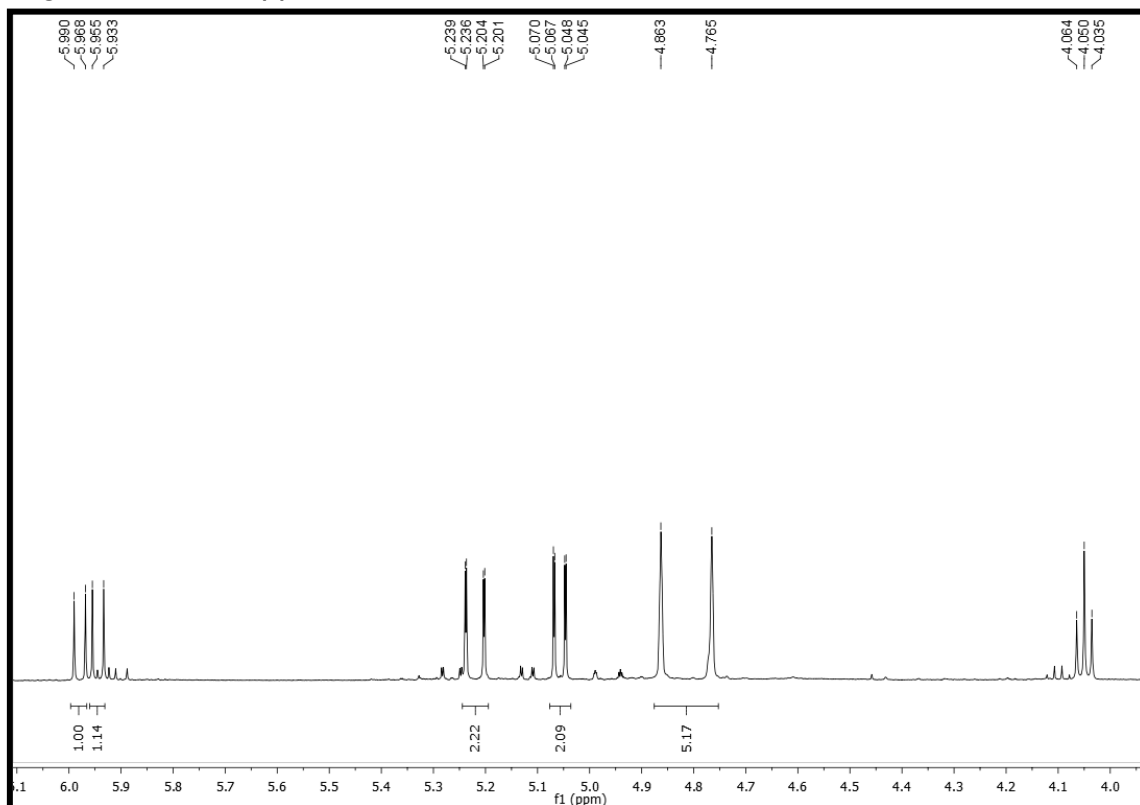
Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.**Figura 26** – Expansão de espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 6,0-4,0 ppm.

Figura 27 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 1,0-2,7 ppm.

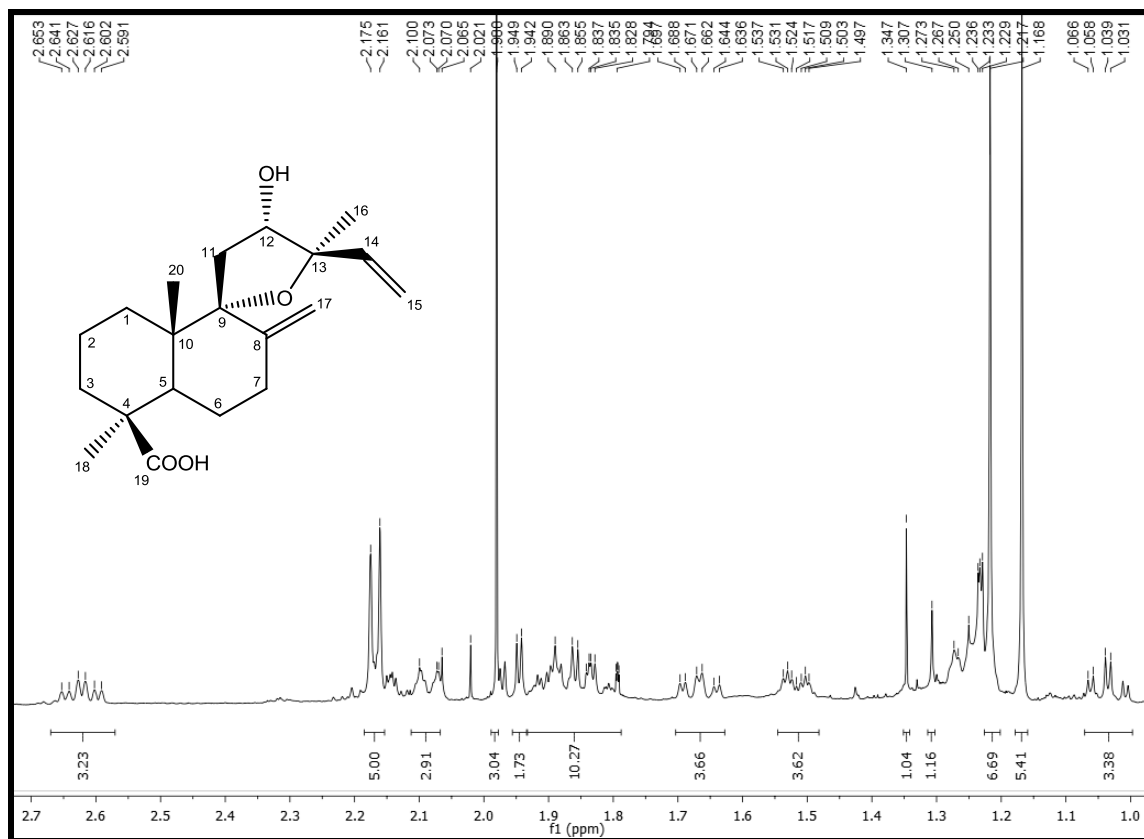


Figura 28 – Expansão de espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 5,24-5,04 ppm.

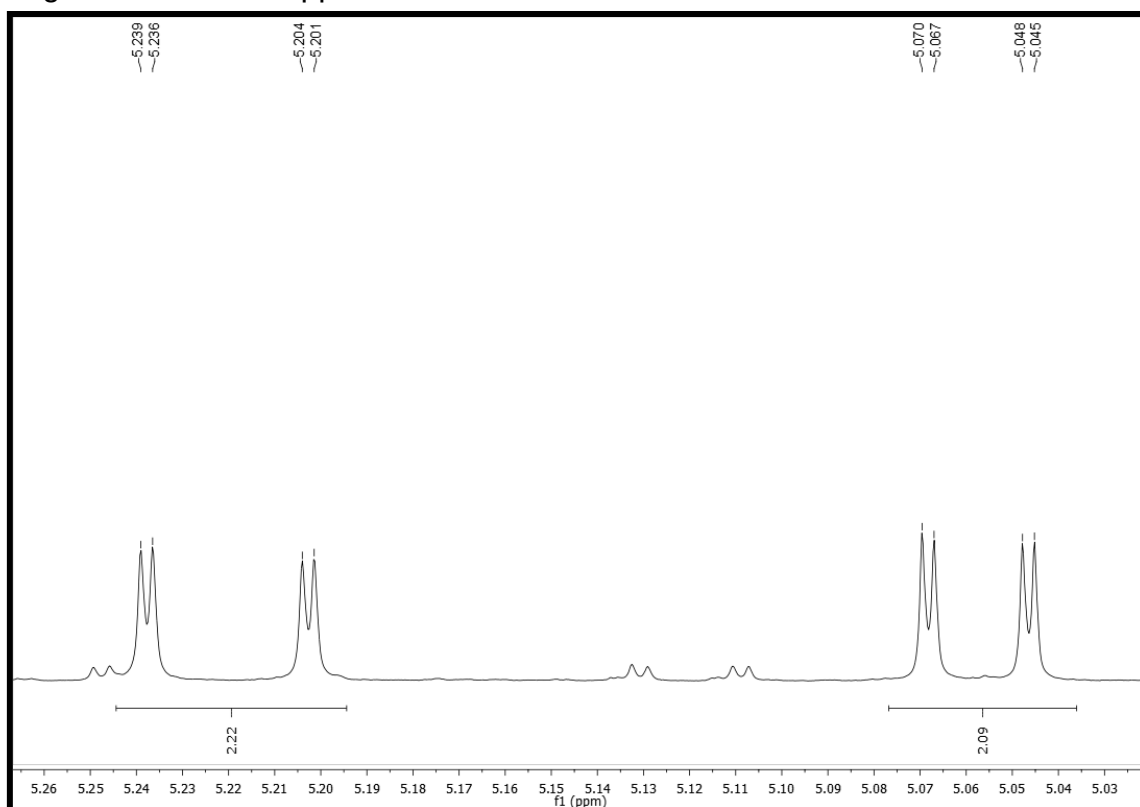
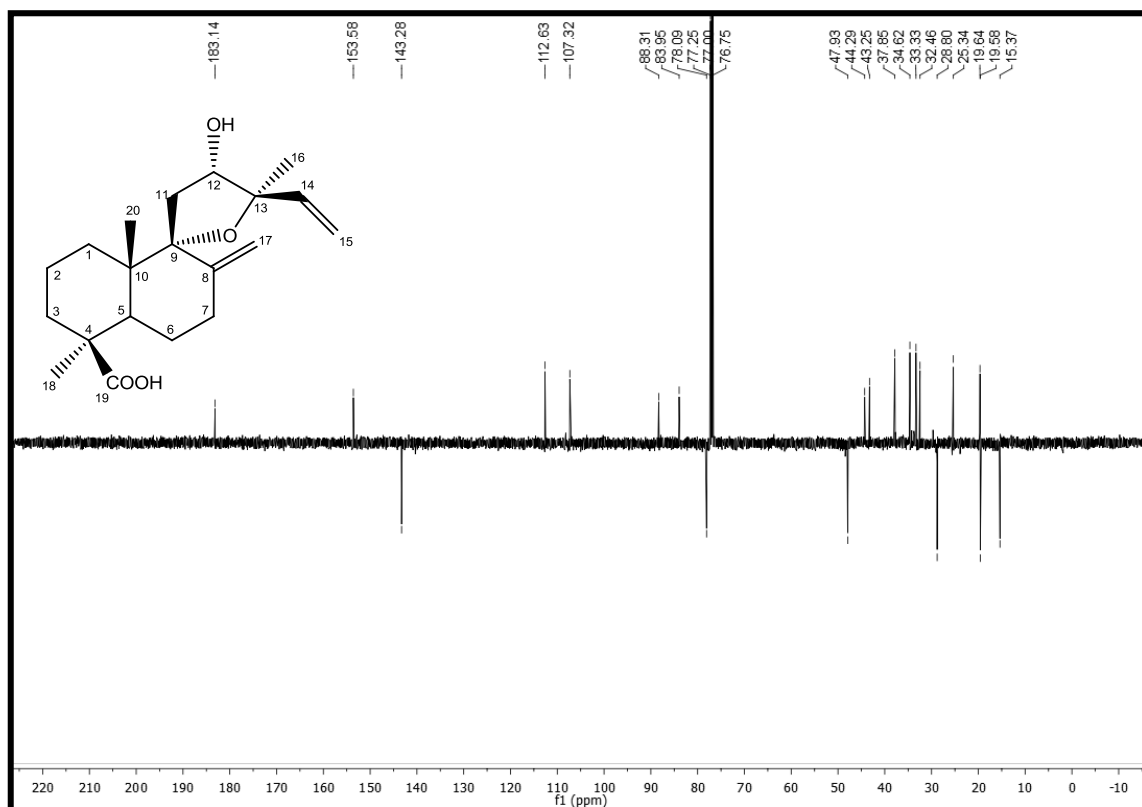
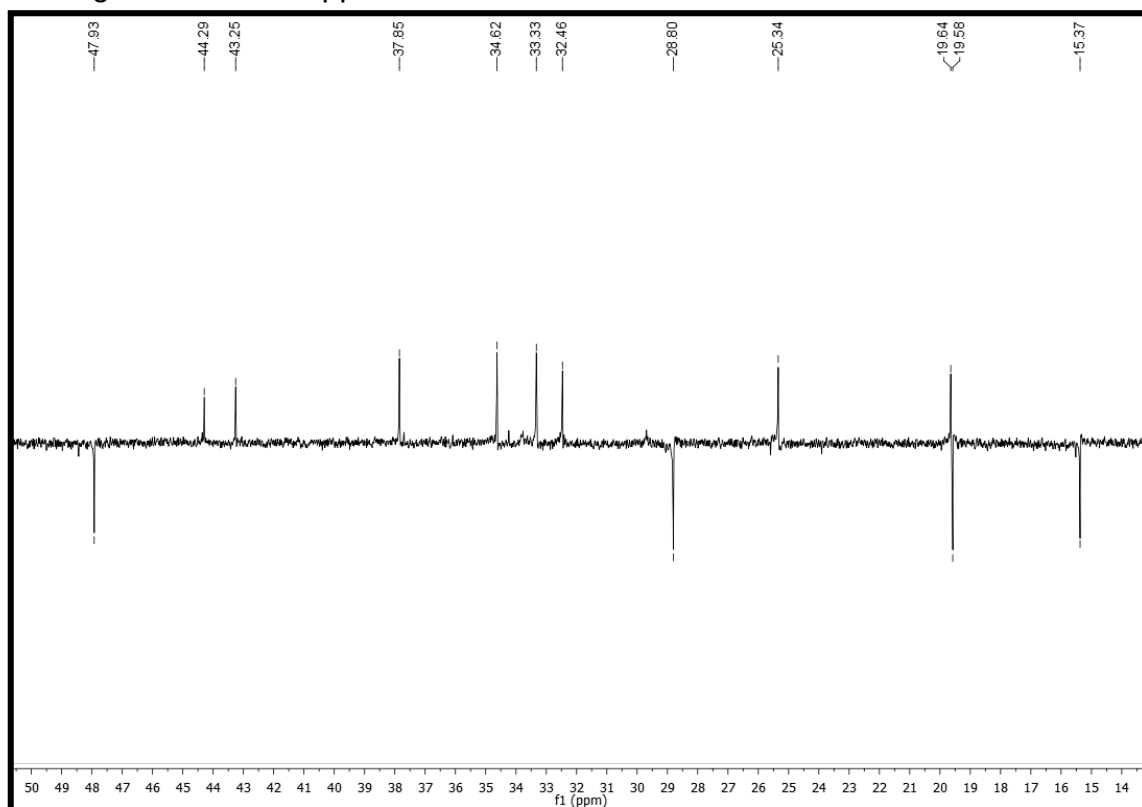


Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-3.**Figura 30** – Expansão de espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 48 – 15 ppm.

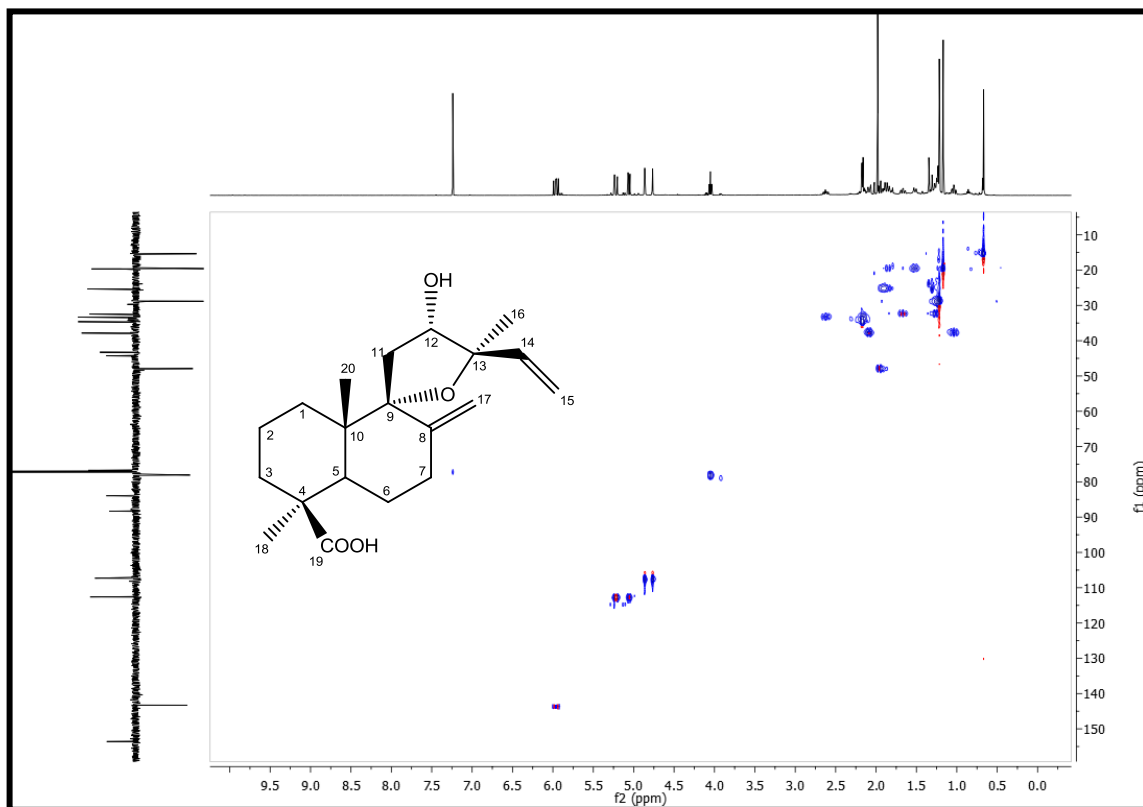


Figura 32 – Expansão do espectro de correlação de ^1H x ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 75-145 ppm x 3,9-6,3 ppm.

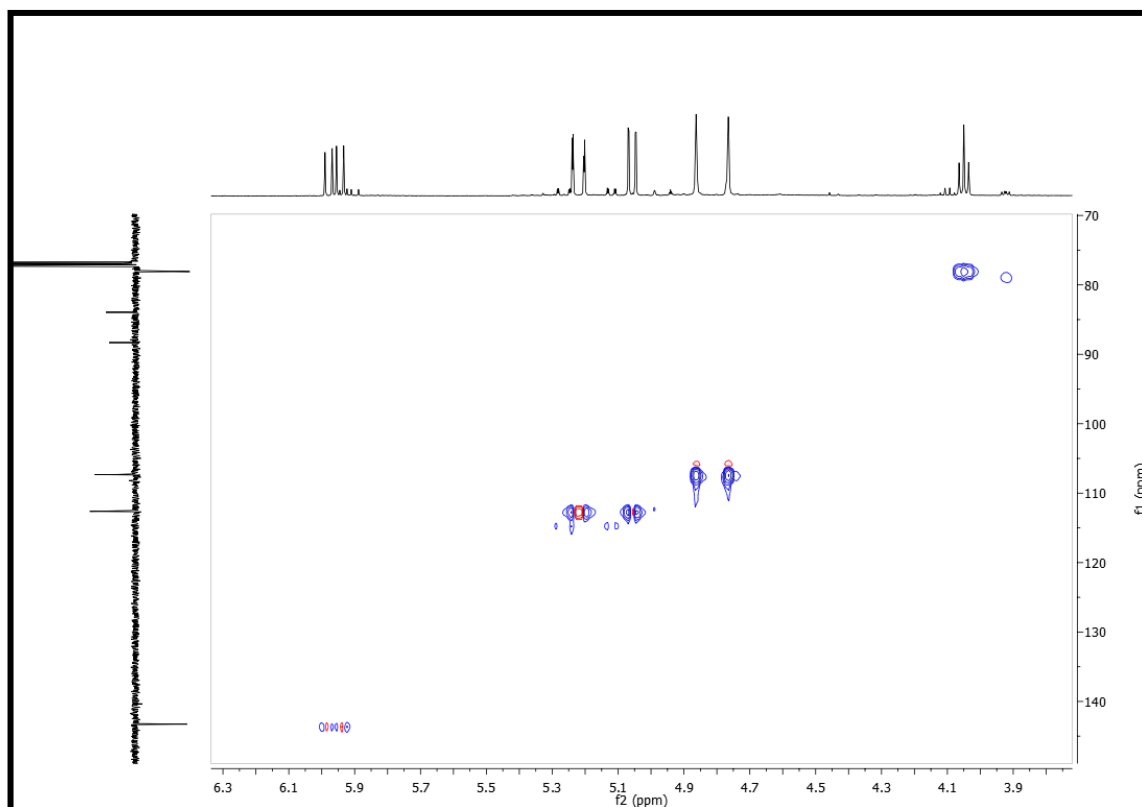


Figura 33 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 10-50 ppm x 0,5-2,7 ppm.

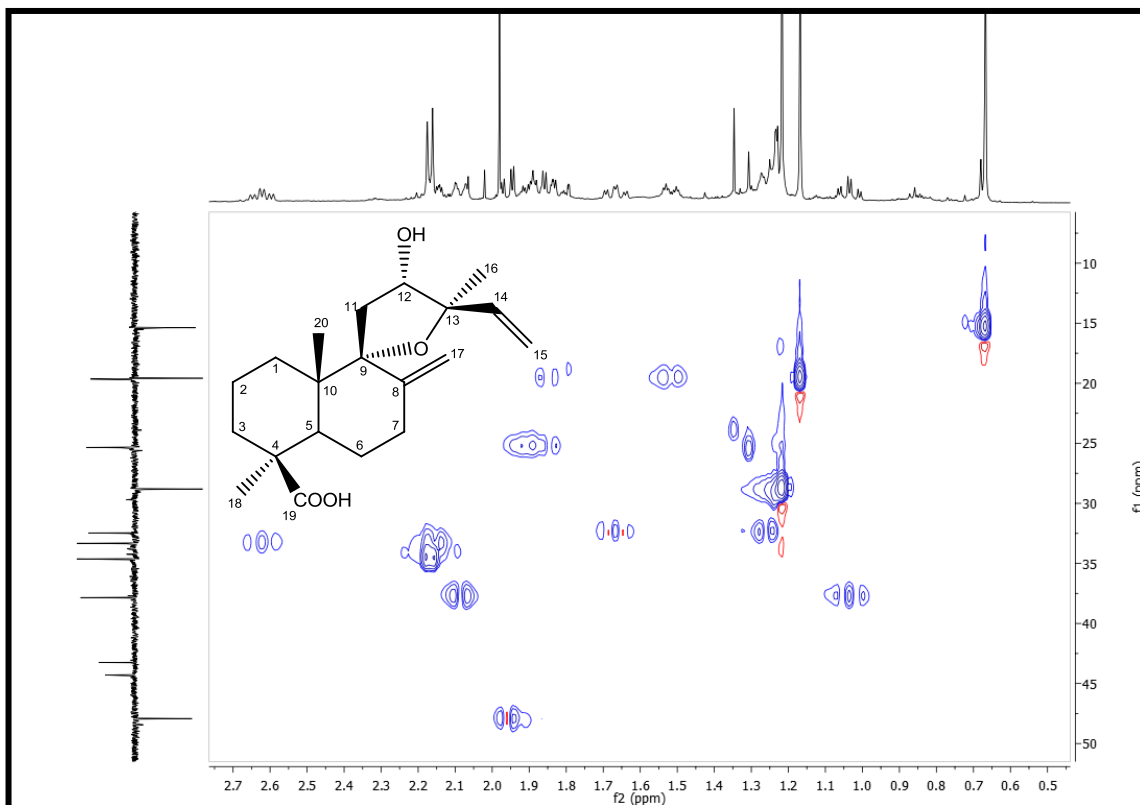


Figura 34 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 12-38 ppm x 0,6-2,0 ppm.

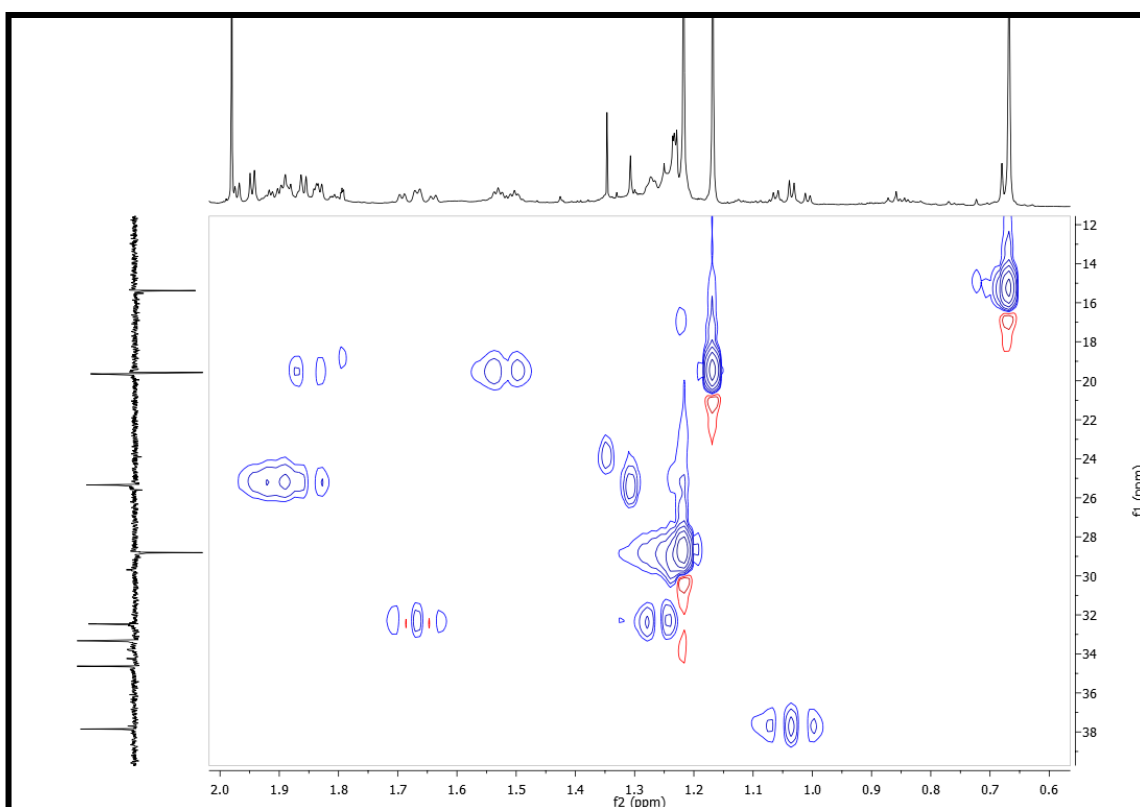


Figura 35 – Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3.

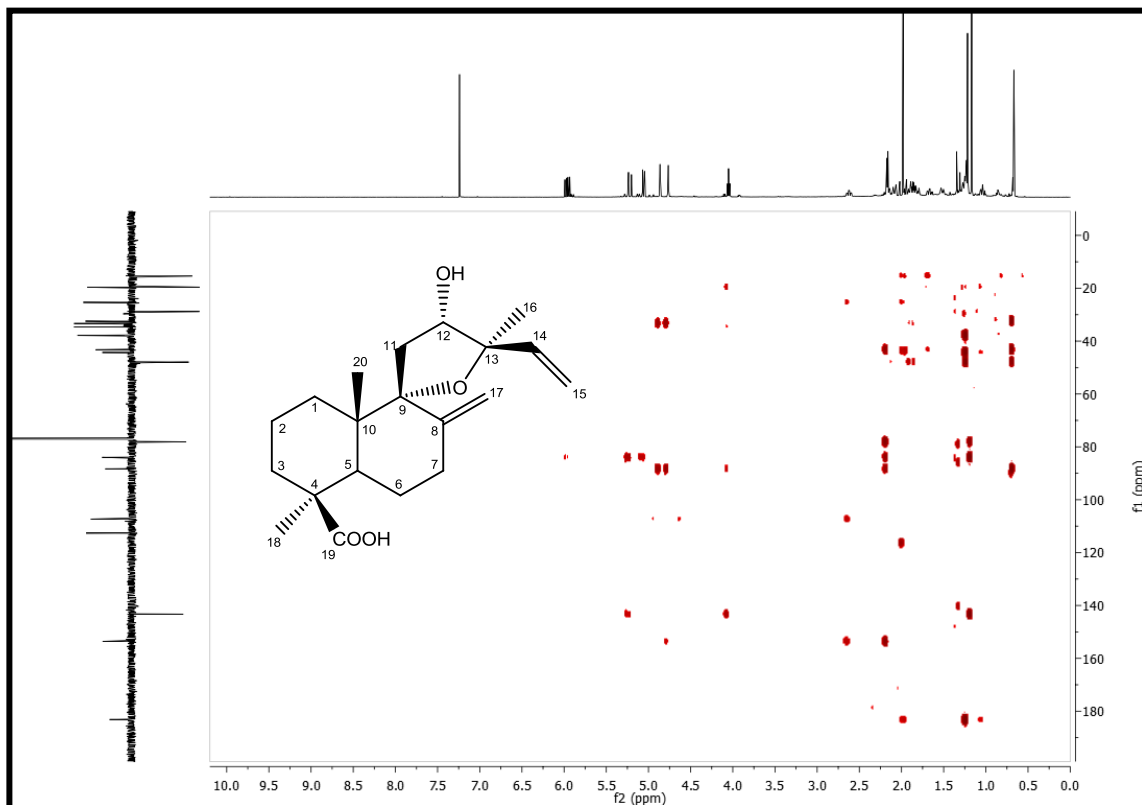


Figura 36 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 70-190 ppm e 0,5-2,9 ppm.

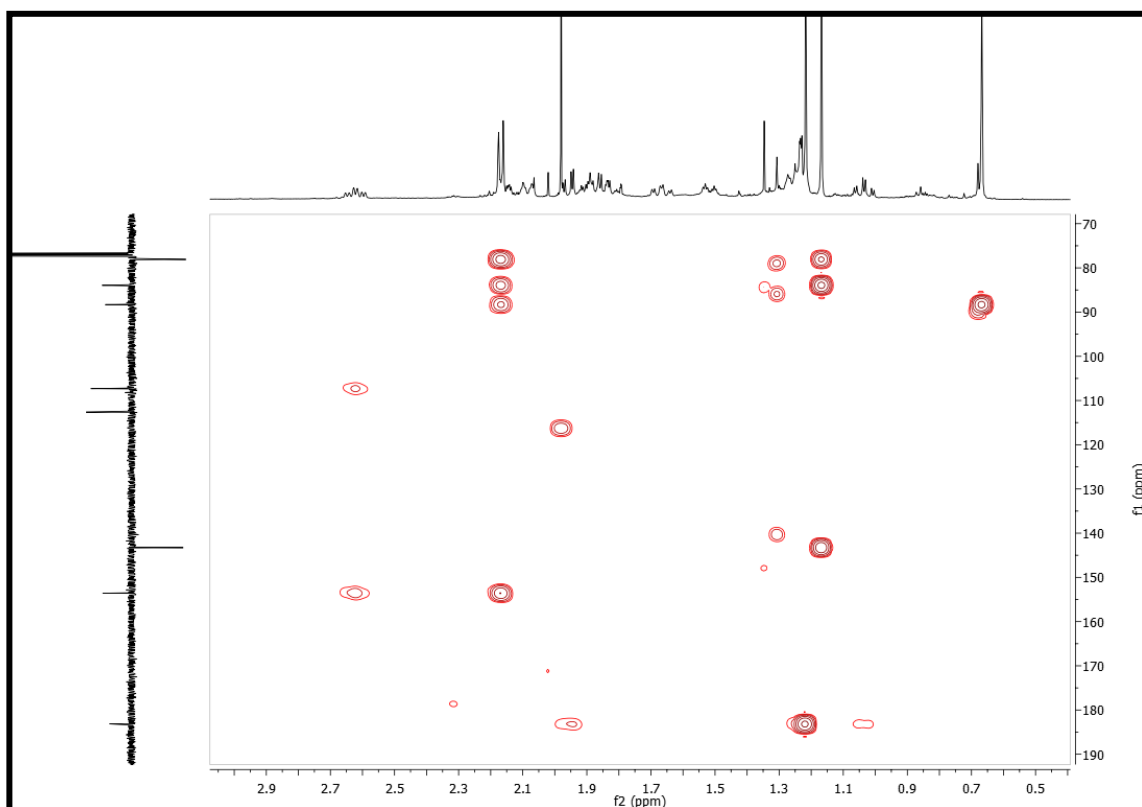


Figura 37 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 30-150 ppm x 3,8-5,6 ppm.

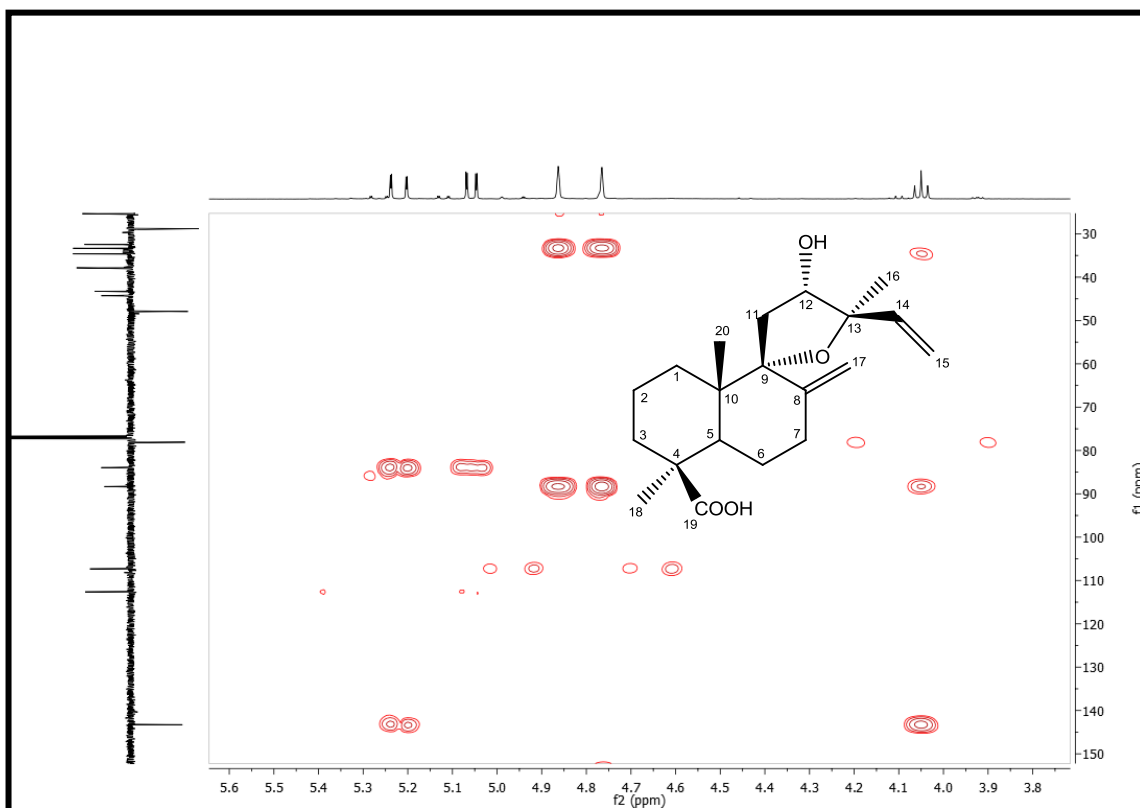


Figura 38 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 30-100 ppm x 4,7-5,3 ppm.

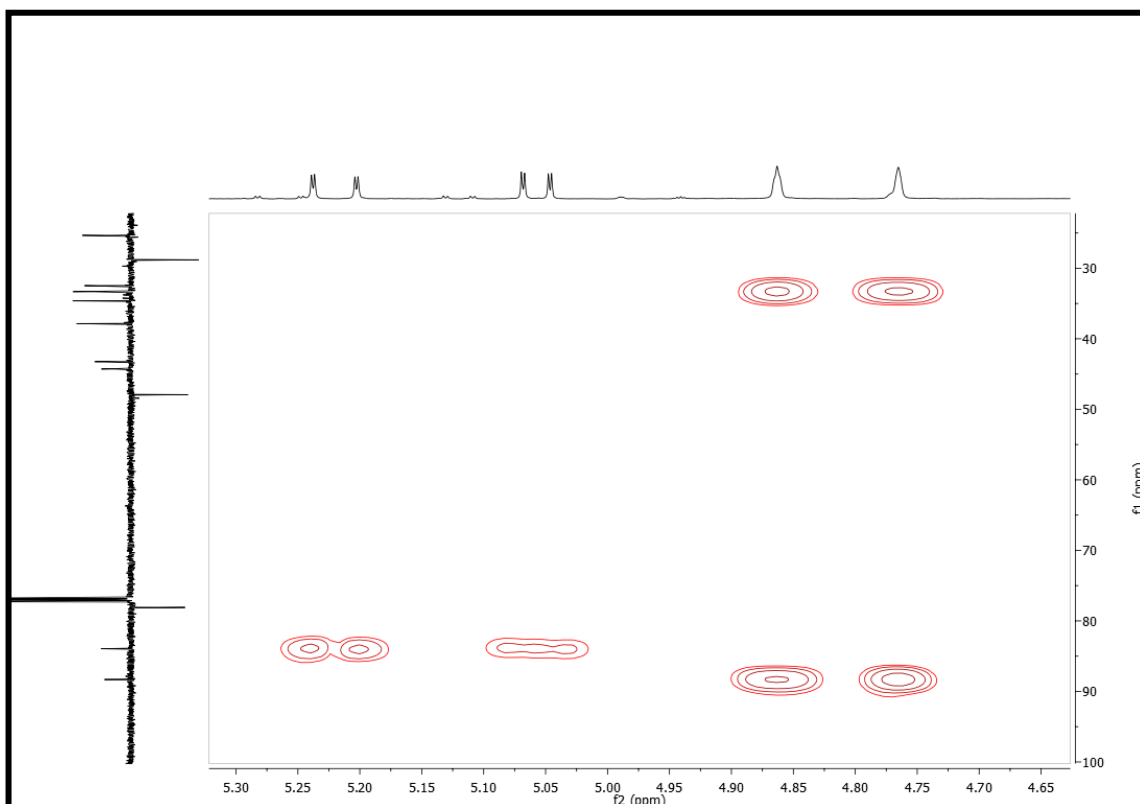


Figura 39 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 50-15 ppm x 0,4-2,8 ppm.

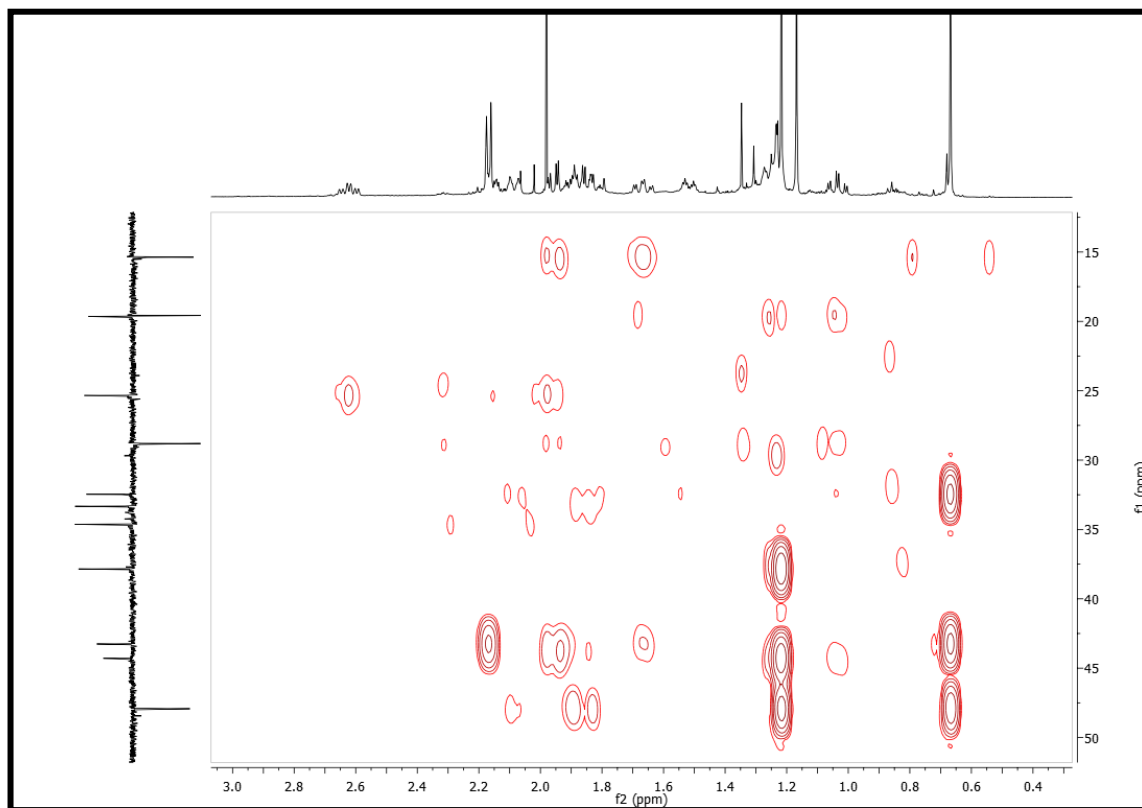


Figura 40 – Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.

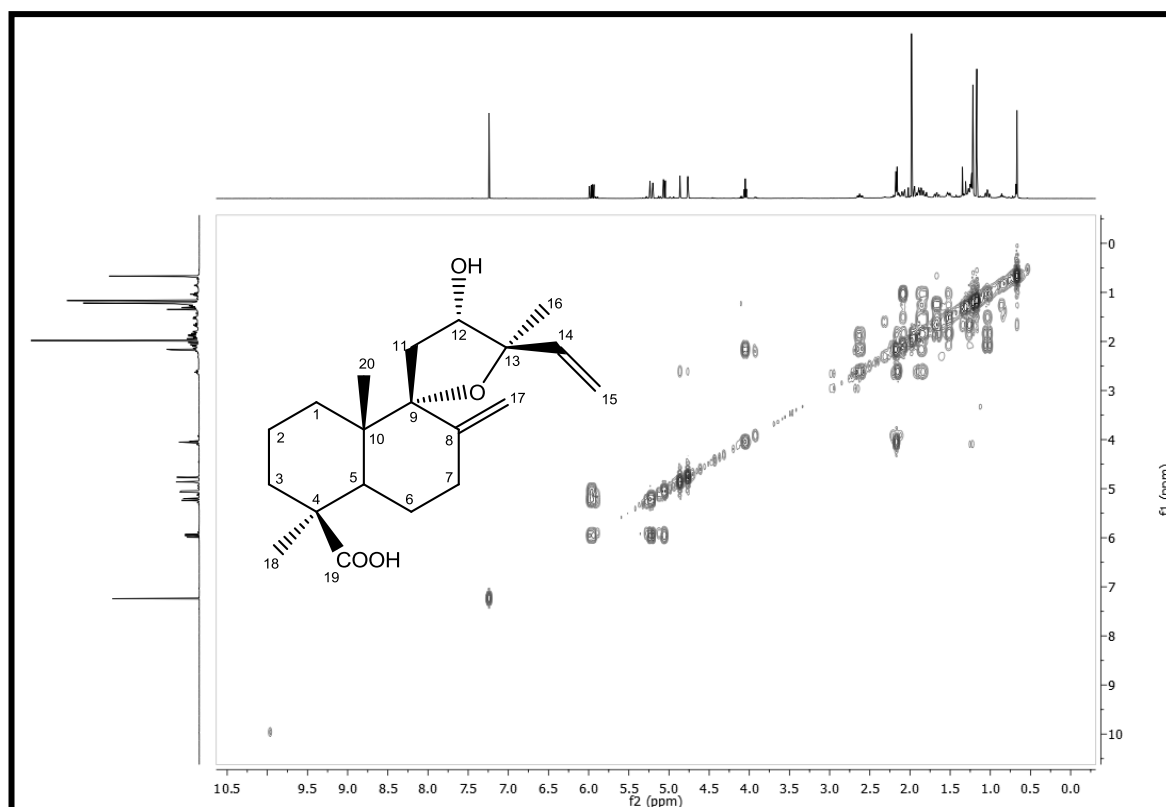


Figura 41 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 4,4-6,1ppm x 4,6-6,1,0 ppm.

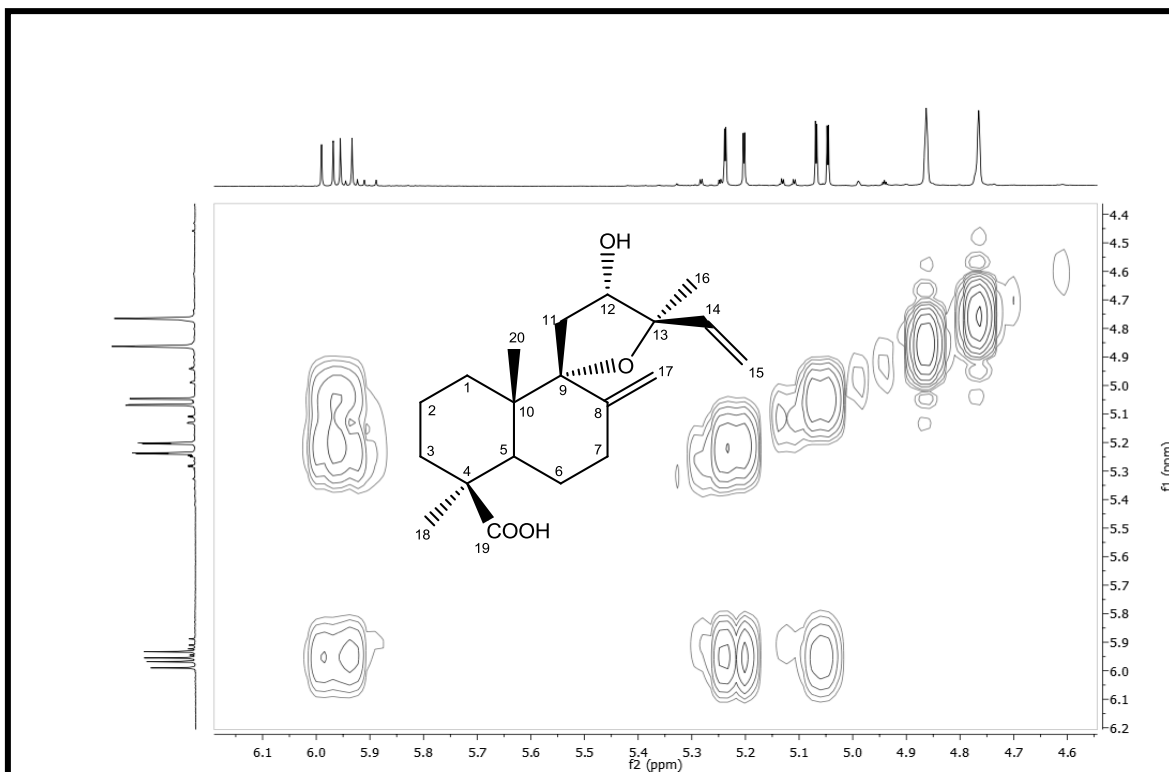


Figura 42 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-6,0ppm x 0,5-6,0 ppm.

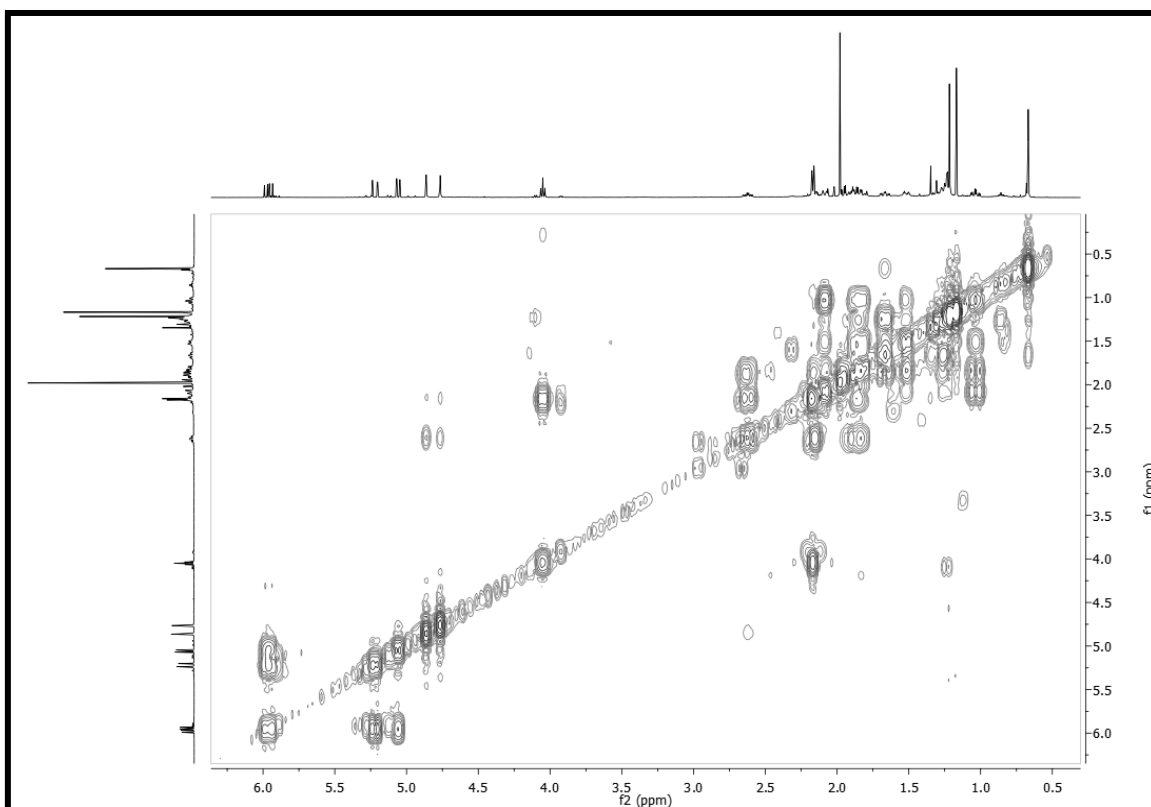


Figura 43 – Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-2,8 ppm x 0,4-2,9 ppm.

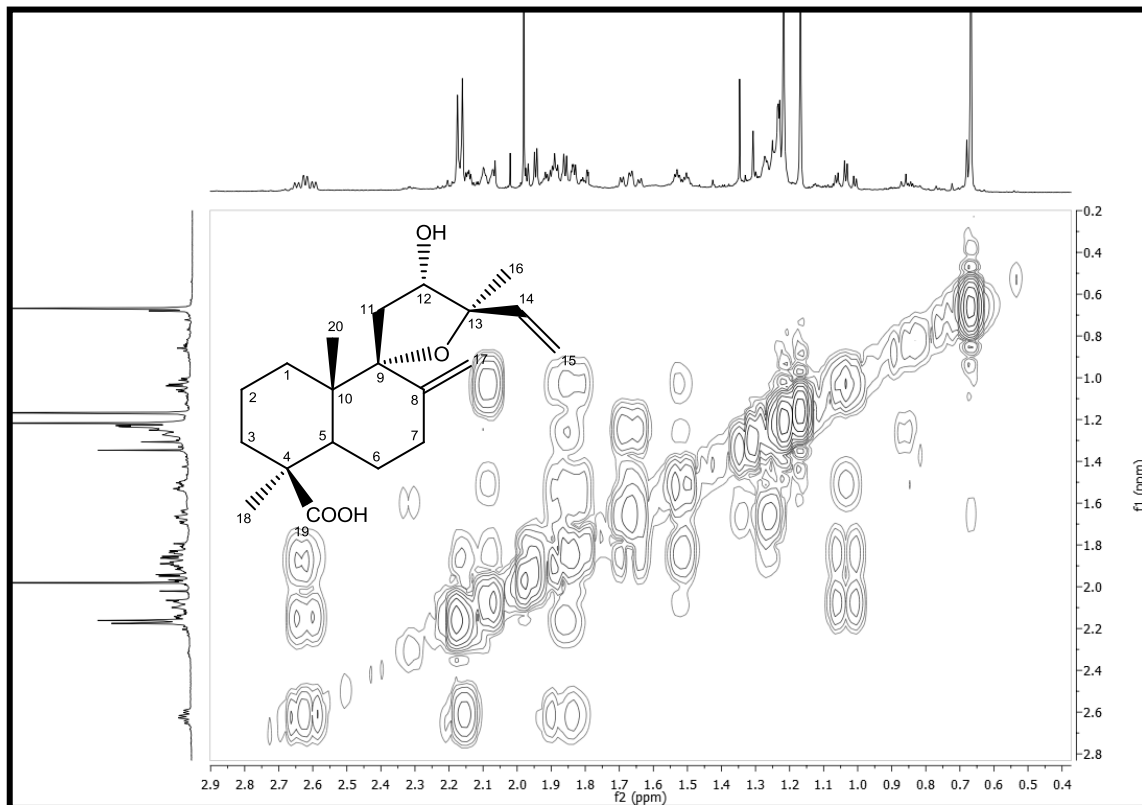


Figura 44 – Espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3.

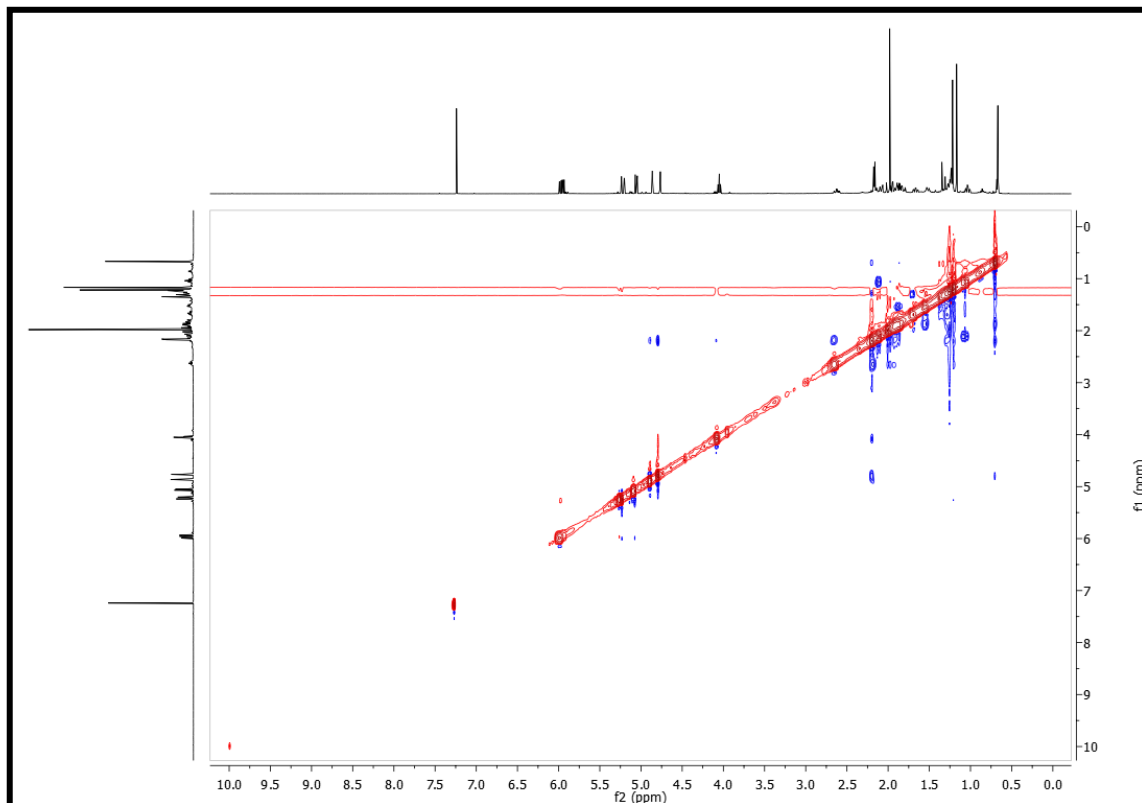


Figura 45 – Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-6,0 ppm x 0,5-6,0 ppm.

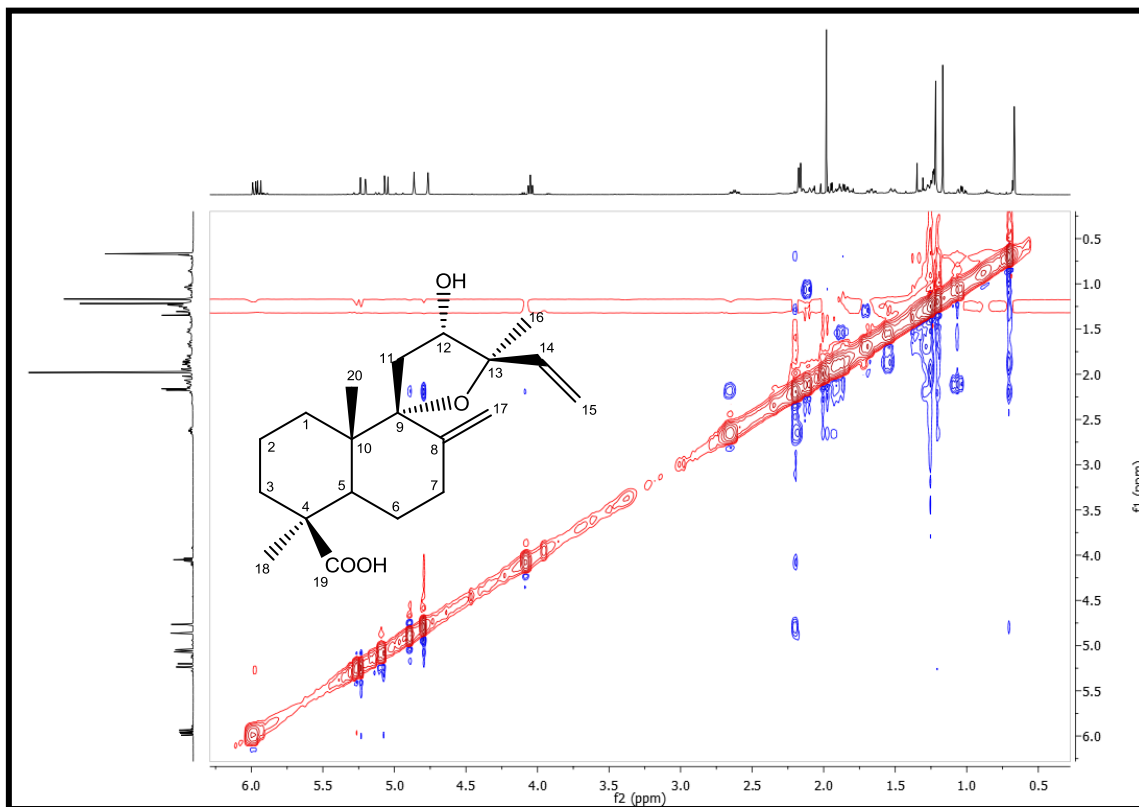
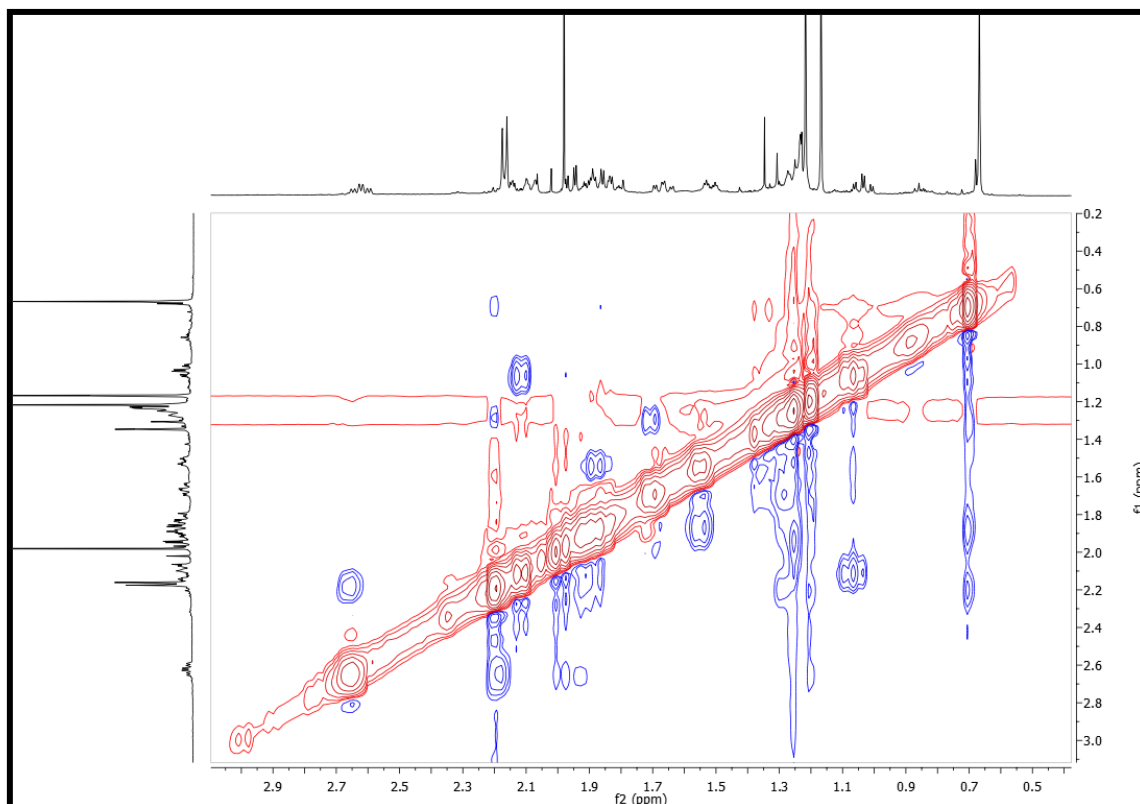


Figura 46 – Expansão do espectro de NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-3 na região de 0,5-2,9 ppm x 0,2-3,0 ppm.



5.4 Identificação estrutural de Hm-4

A substância codificada como Hm-4 foi isolada em forma de cristais. O espectro de RMN ^1H (Figuras 47-49, p. 94-95) apresentou sinais em δ_{H} 4,76 (s) δ_{H} 4,62 (s, H-29), um sinal de hidrogênio carbinólico em δ_{H} 3,2 (*dd*, $J = 5,4$ Hz e 11,5 Hz, H-3), um sinal de hidrogênio metínico em δ_{H} 3,02 (*ddd*, $J = 4,5$; 10,9 e 12,5, H-18) e seis sinais de hidrogênios metílicos na região de δ_{H} 0,83 a 1,65. Sendo esse último atribuído à metila sobre dupla ligação.

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (Figuras 50-51, p. 95-96) mostrou trinta átomos de carbonos majoritários, sendo sete carbonos não hidrogenados, seis carbonos metínicos, onze carbonos metilênicos e seis carbonos metílicos, apresentou sinais em δ 181,1 atribuído a carbonila de ácido (C-28), em δ_{C} 79,0 do carbono carbinólico (C-3), em δ_{C} 109,6 do carbono metilênico (C-29) e em δ_{C} 150,3 do carbono vinílico (C-20). Os demais sinais estão compilados na Tabela 6 (p. 93).

Após comparação com dados da literatura (SHARMA; ROY; GUPTA, 2010), pode-se concluir que Hm-4 trata-se ácido do 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico, ácido betulínico. Esta substância tem ampla distribuição no reino vegetal, porém está sendo relatada pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 6 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 de Hm-4 com os dados da literatura para o ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico).

Nº	Tipo de carbono	δ_c de Hm-4 em CDCl_3	δ_c (SHARMA; ROY; GUPTA, 2010) em CDCl_3
1	CH_2	38,7	39,0
2	CH_2	27,4	27,6
3	CH	79,0	78,2
4	C	38,3	39,1
5	CH	55,3	55,5
6	CH_2	18,3	18,4
7	CH_2	34,3	34,5
8	C	40,7	40,8
9	CH	50,5	50,7
10	C	37,2	37,3
11	CH_2	20,8	21,0
12	CH_2	25,5	25,7
13	CH	38,4	38,1
14	C	42,4	42,5
15	CH_2	30,5	30,2
16	CH_2	32,1	32,9
17	C	46,9	47,1
18	CH	49,3	48,1
19	CH	49,2	49,2
20	C	150,3	150,1
21	CH_2	29,7	30,6
22	CH_2	37,0	37,0
23	CH_3	28,0	27,9
24	CH_3	15,3	15,5
25	CH_3	16,0	16,4
26	CH_3	16,1	16,7
27	CH_3	14,7	15,0
28	C	180,1	181,3
29	CH_2	109,6	108,9
30	CH_3	19,3	19,6

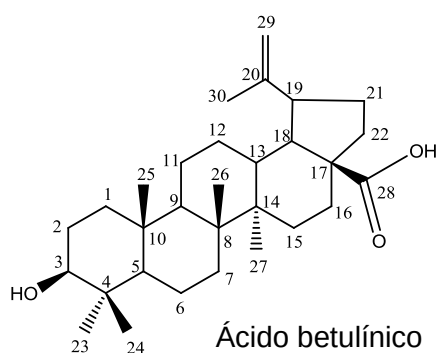


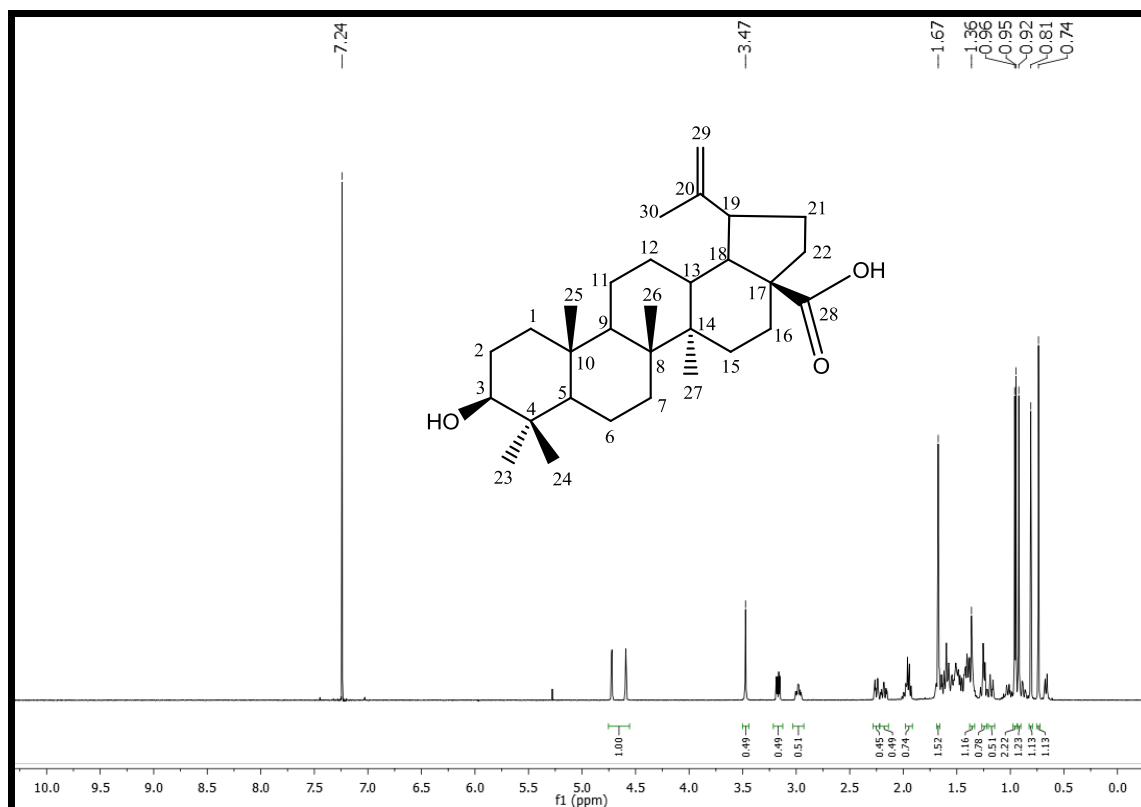
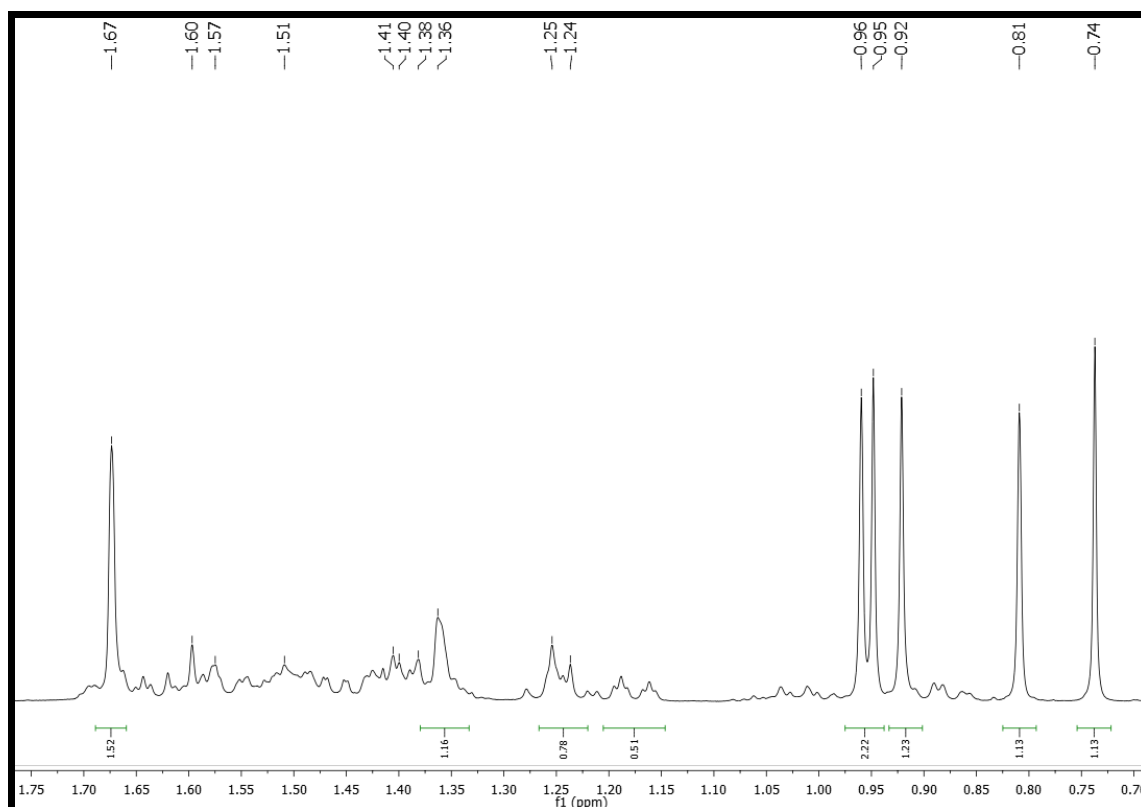
Figura 47 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4.**Figura 48** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 0,70-1,75 ppm.

Figura 49 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 1,8-4,8 ppm.

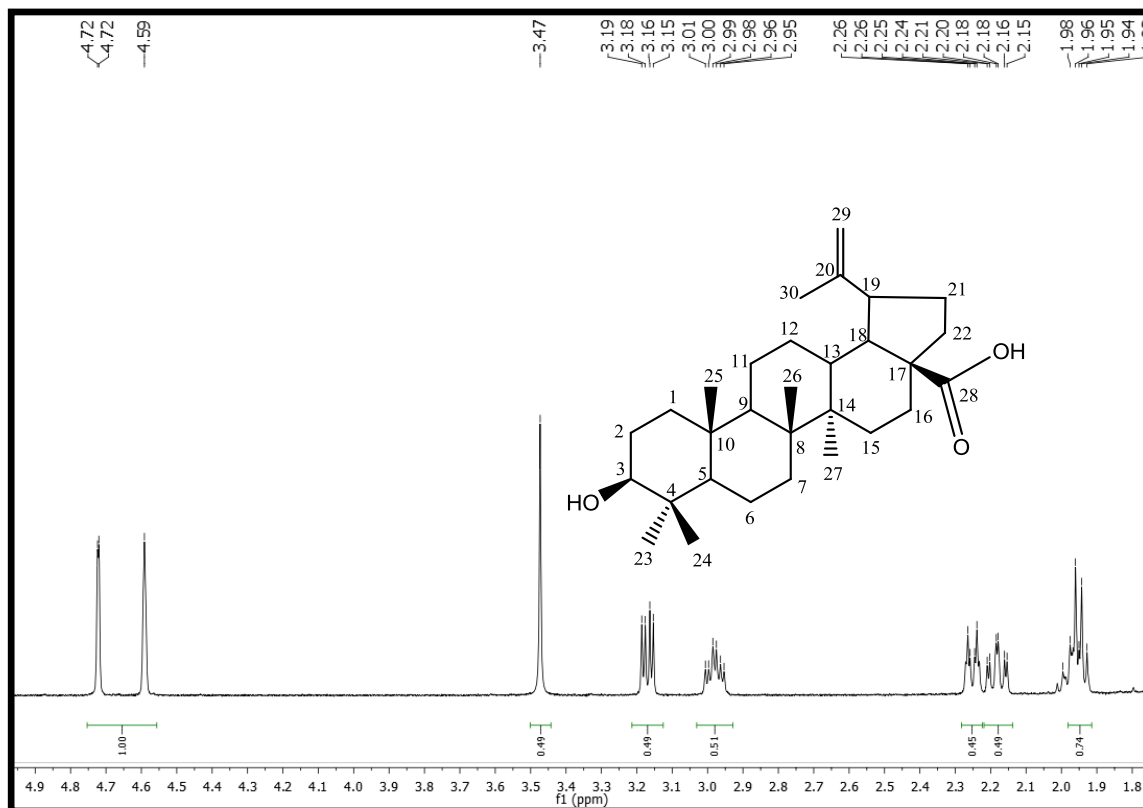


Figura 50 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-4.

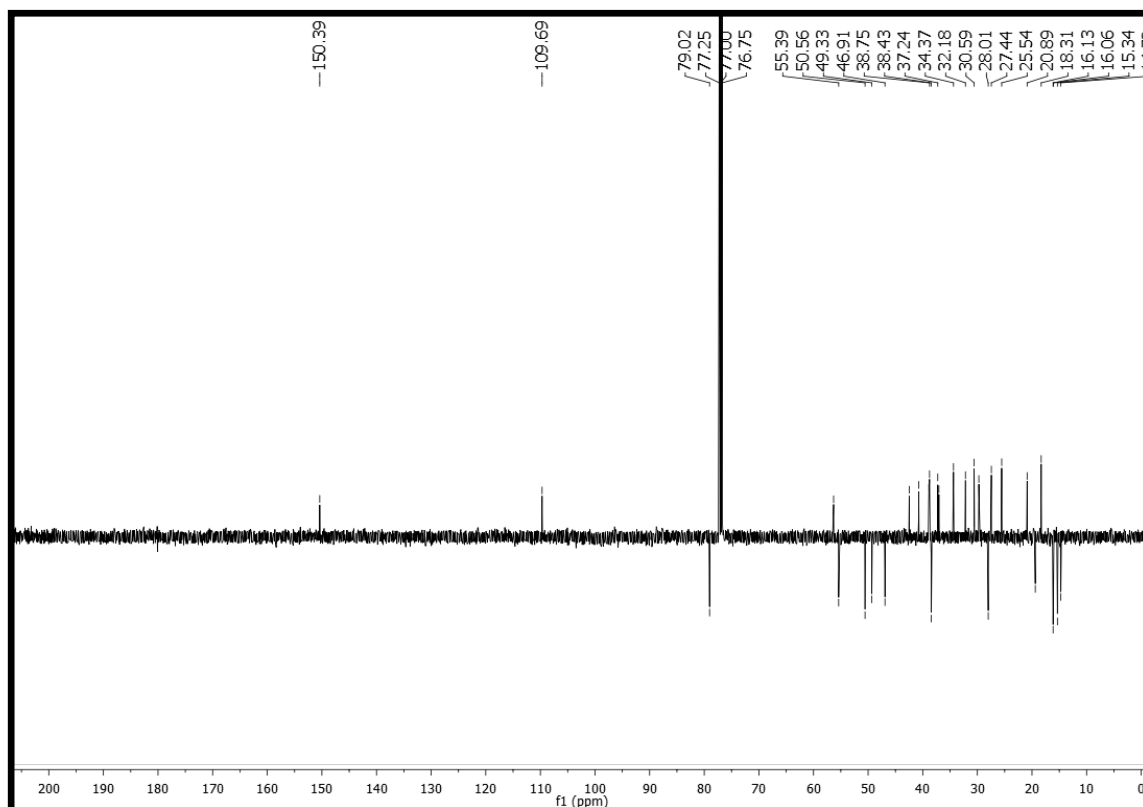
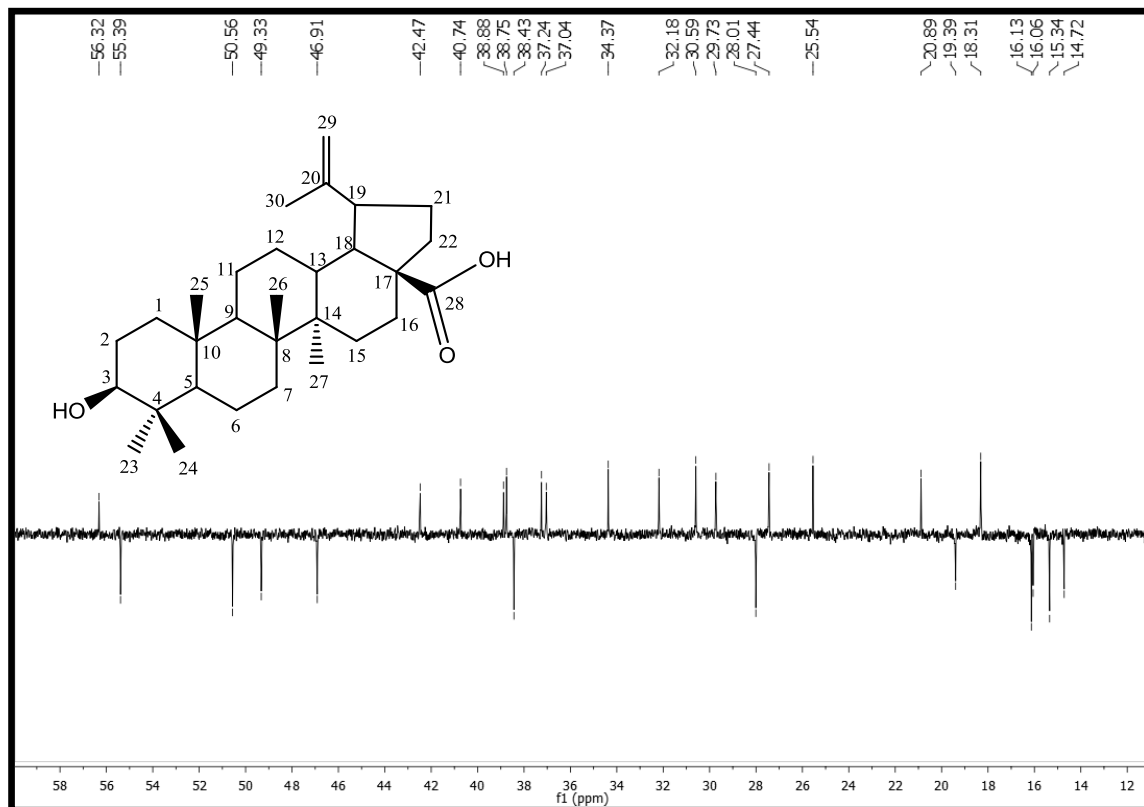


Figura 51 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-4 na região de 14-58 ppm.



5.5 Determinação estrutural de Hm-5

A substância Hm-5 foi isolada na forma de um óleo marrom. A rotação óptica foi obtida à temperatura ambiente em polarímetro Jasco modelo P-2000 [α]_D + 45 (c. 0,001 em CHCl₃).

O espectro de massas (Figuras 52, p. 100) obtido por EM-AR-IES mostrou um pico em m/z 331.1167 [M+Na]⁺ compatível com uma fórmula molecular C₁₆H₂₀O₆.

O espectro de IV (Figura 53, p. 100) mostrou absorções em 1739 e 1635 cm⁻¹ devido à presença de uma δ -lactona α,β -insaturada.

No espectro de RMN ¹H (Figuras 54-56, p. 101-102) foi possível observar duas metilas de grupo acetoxi com deslocamento químico em δ_H 2,06 (s, 3H) e 2,04 (s, 3H), bem como um sinal em δ_H 1,17 (d, 3H, J = 6,5 Hz) que foi atribuída a grupo metil secundário terminal. Observou-se ainda, os sinais em δ_H 6,02 (dd, 1H, J = 2,0, 8,5 Hz) e δ_H 6,87 (ddd, 1H, J = 3,0, 5,0, 9,0 Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios olefinícos H-3 e H-4, respectivamente, de esqueleto de dihidropironas, além dos sinais em δ_H 5,59 (dd, 1H, J = 8,5; 11,0 Hz) e δ_H 6,13 (tl, 1H, J = 11,0 Hz) atribuídos a H-1' e H-2', respectivamente. A constante de acoplamento J = 11,0 estabeleceu a geometria *Z* para essa dupla ligação. Observou-se também sinais em δ_H 6,47 (dd, 1H, J = 11,0; 15,0) e 5,73 (dd, 1H, J = 7,0; 15,0) que foram atribuídos a H-3' e H-4', respectivamente. A constante de acoplamento J = 15,0 Hz estabeleceu a configuração *E* para essa dupla ligação. Foram observados ainda três hidrogênios oximetínicos em δ_H 5,32 (dddd, J = 1,0; 5,0; 9,5; 10,0 Hz), δ_H 5,40 (ddd, 1H, J = 1,0; 3,5; 7,5 Hz) e δ_H 5,04 (qd, 1H, J = 3,5; 6,5). Os demais sinais estão compilados na Tabela 7 (p. 99).

No espectro de RMN ¹³C-APT (Figuras 57-58, p. 102-103) observou-se a presença de 16 sinais sendo 4 correspondentes a dois grupos acetoxil estabelecendo um esqueleto carbônico C-12 característico de C-12- δ -lactona com ocorrência em espécies de *Hyptis* (PEREDA-MIRANDA; GARCIA; DELGADO, 1990). O sinal em δ_C 163,6 (C-2) foi indicativo de carbonila de unidade δ -lactona conjugada com carbonos olefinícos em δ_C 121,6 (C-3) e 144,5 (C-4) (Tabela 7, p. 99).

No espectro HMBC (Figuras 59-64, p. 103-106) observou-se correlações do sinal em δ_H 6,87 (H-4) com os carbonos em δ_C 163,6; 29,7 e 73,7 que foram

atribuídos a C-2, C-5 e C-6 do anel α -pirona, respectivamente. Observaram-se também correlações dos sinais em δ_H 5,59 com o carbono em δ_C 29,7 (C-5) confirmando o sinal em δ_H 5,59 para H-1' e δ 6,13 com os carbonos em δ_C 130,3 (C-4') e 73,7 (C-6) confirmando o sinal em δ_H 6,13 para H-2' e inferindo a união do grupo heptenil em C-6 do anel α -pirona.

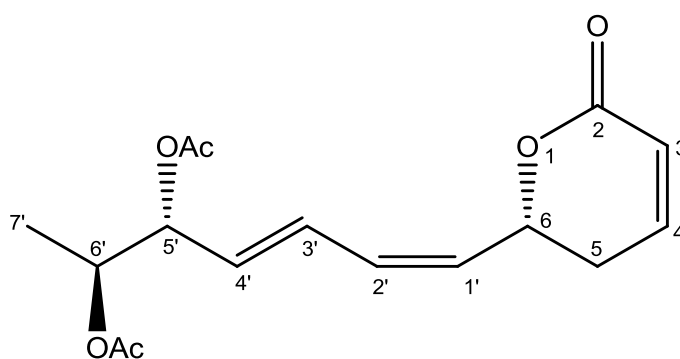
No espectro de COSY (Figuras 65-67, p. 106-107) foram observados correlações do sinal em δ_H 1,17 (H-7') com δ_H 5,04 que foi atribuído a H-6'. Observou-se ainda correlações do sinal em δ_H δ 5,73 (H-4') com δ_H δ 5,40 que foi atribuído a H-5'.

No HMBC as correlações do sinal em δ_H 5,40 (H-5') e δ_H 5,04 (H-6') com os carbonos em δ_C 169,9 e 170,3 permitiram assinalar as carbonilas dos grupos acetoxi em C-5' e C-6', respectivamente. Correlações dos sinais em δ_H 2,06 e 2,04 com as carbonilas em δ_C 169,9 e 170,3 permitiram atribuir as metilas dos grupos acetoxi em C-5' e C-6', respectivamente, as demais correlações estão na Tabela 7 (p. 99).

As estereoquímicas dos centros quirais C-5' e C-6' foram determinadas por comparações com dados da literatura (PEREDA-MIRANDA; SERRANO; ROJAS, 2001). O sinal positivo na curva de dicroísmo circular (DC) ($\Delta\epsilon_{256} = + 2,8$) (Figura 68, p. 108) evidencia a configuração R para o centro estereogênico C-6 do núcleo pirona. Após análise dos dados, pode-se concluir que Hm-5 tratava-se do 6*R*-[(5'*S*,6'*S*-diacetoxi)-1'*Z*,3'*E*-heptenil]-5,6-diidro-2H-pirano-2-ona, um novo produto natural, nomeado hiptenolídeo. Este composto apresentou atividade espasmolítica frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ($Cl_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M) ou por histamina ($Cl_{50} = 0,9 \pm 0,05 \times 10^{-4}$ M) em íleo isolado de cobaia (SOUZA, 2013).

Tabela 7 – Dados de ^1H , ^{13}C e 2D (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5, 6*R*-[(5'*S*,6'*S*-diacetoxi)-1'*Z*,3'*E*-heptenil]-5,6-diidro-2*H*-pirano-2-ona (hiptenolídeo).

C	δ_{C}	HMQC	HMBC	COSY
		^1H ^{13}C		
2	163,6	-		
3	121,6	6,03 (dd, $J = 1,0, 2,0, 9,5$ Hz)	C-2, C-5	H-4
4	144,5	6,87 (ddd, $J = 3,0, 5,0, 9,5$ Hz)	C-2 C-6, C-5	H-5, H-5
5	29,7	2,38(m); 2,41(m)	C-3, C-4, C-6	H-4, H-6
6	73,7	5,32 (dddd, $J = 1,0, 5,0, 9,0, 10,0$ Hz)	C-1', C-2', C-4	H-1'
1'	128,5	5,59 (dd, $J = 9,0, 11,0$ Hz)	C-3', C-5	H-2'
2'	131,1	6,13 (br t, $J = 11,0$ Hz)	C-3', C-4', C6	H-3'
3'	128,1	6,47 (dd, $J = 11,5, 15,0$ Hz)	C-1', C-2', C-4'	H-4'
4'	130,3	5,73 (dd, $J = 7,0, 15,0$ Hz)	C-2'	H3'
5'	74,5	5,40 (ddd, $J = 1,0, 4,0, 7,0$ Hz)	5'- <u>COCH</u> ₃ , C-3', C-4', C-7'	H-4'
6'	70,4	5,04 (qd, $J = 4,0, 6,5$ Hz)	6'- <u>COCH</u> ₃	H-5'
7'	14,9	1,17 (d, $J = 6,5$ Hz)	C-5', C-6'	H-6'
5' <u>COCH</u> ₃	169,9			
5' <u>COCH</u> ₃	20,9	2,06 (s)		
6' <u>COCH</u> ₃	170,3	-		
6' <u>COCH</u> ₃	21,0	2,00 (s)		



Hiptenolídeo

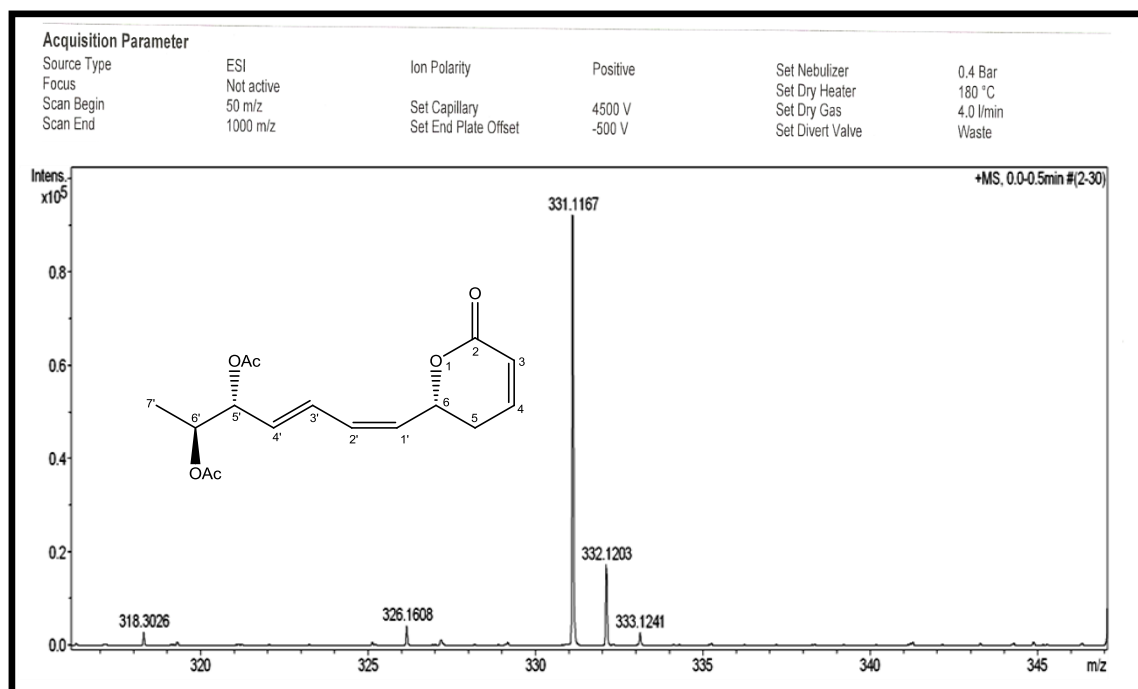
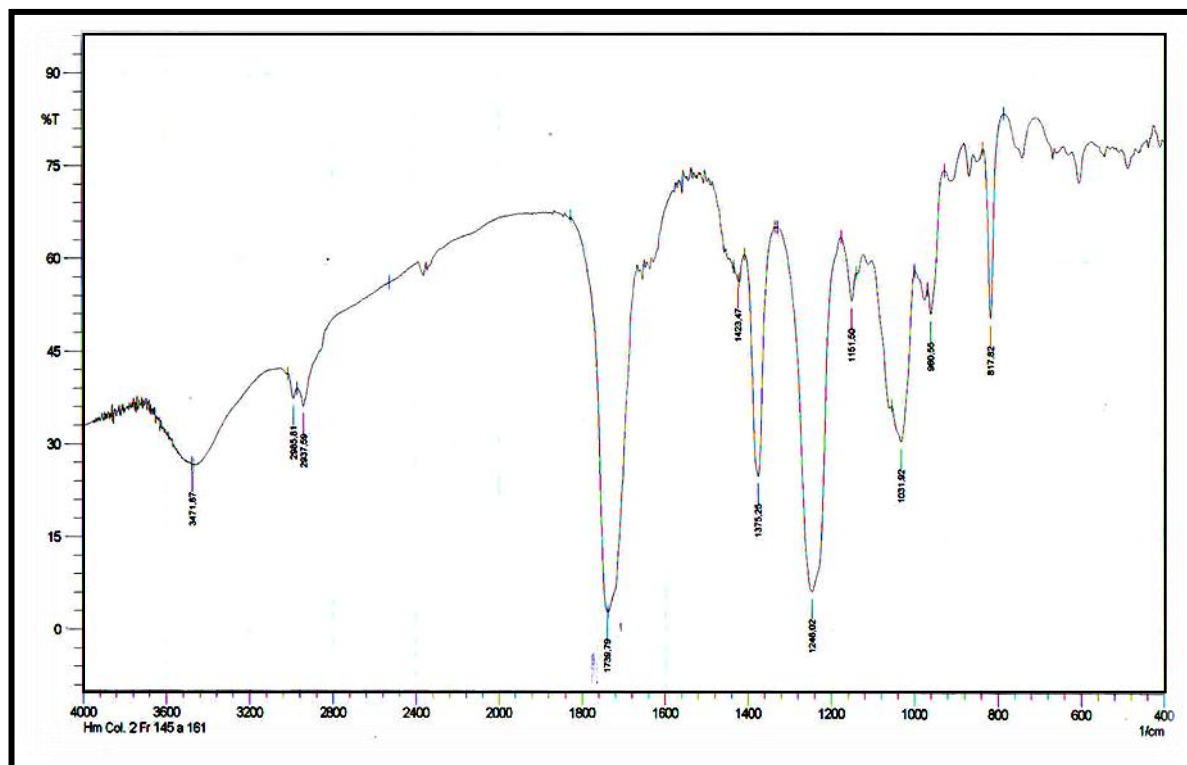
Figura 52 – Espectro de massas de alta resolução de Hm-5 obtido por IES⁺.**Figura 53** – Espectro de IV de Hm-5 obtido em pastilha de KBr.

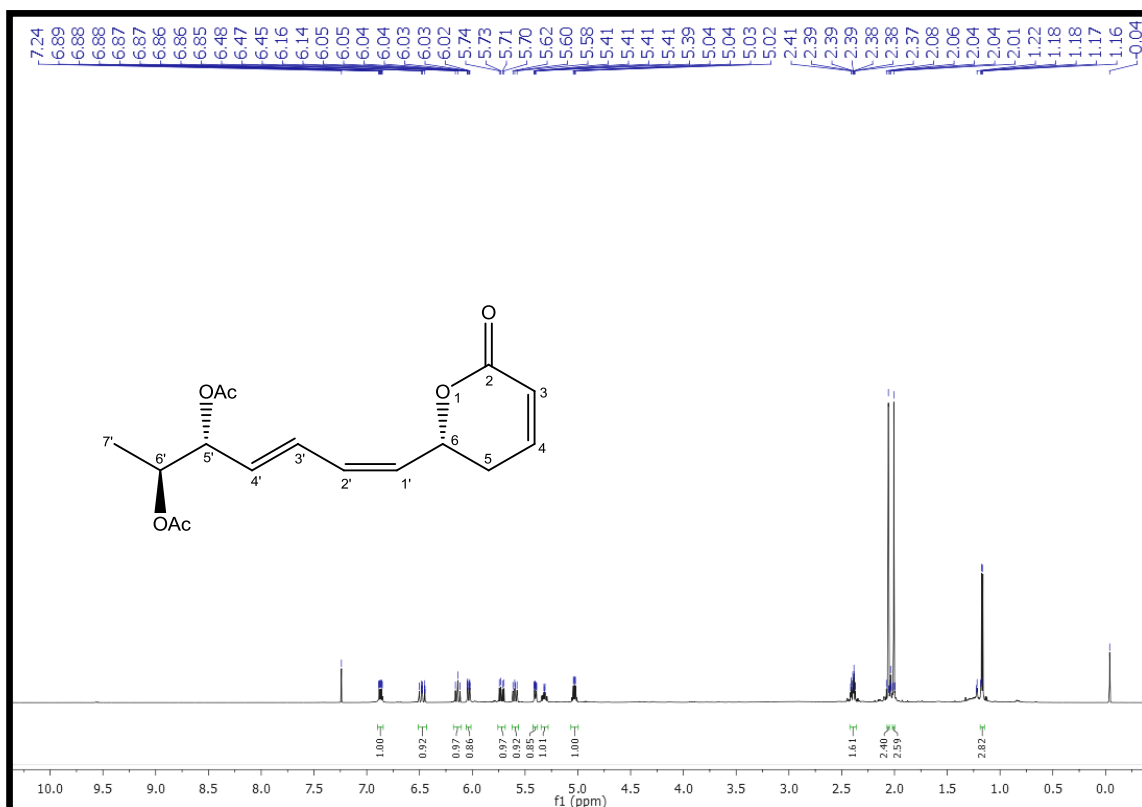
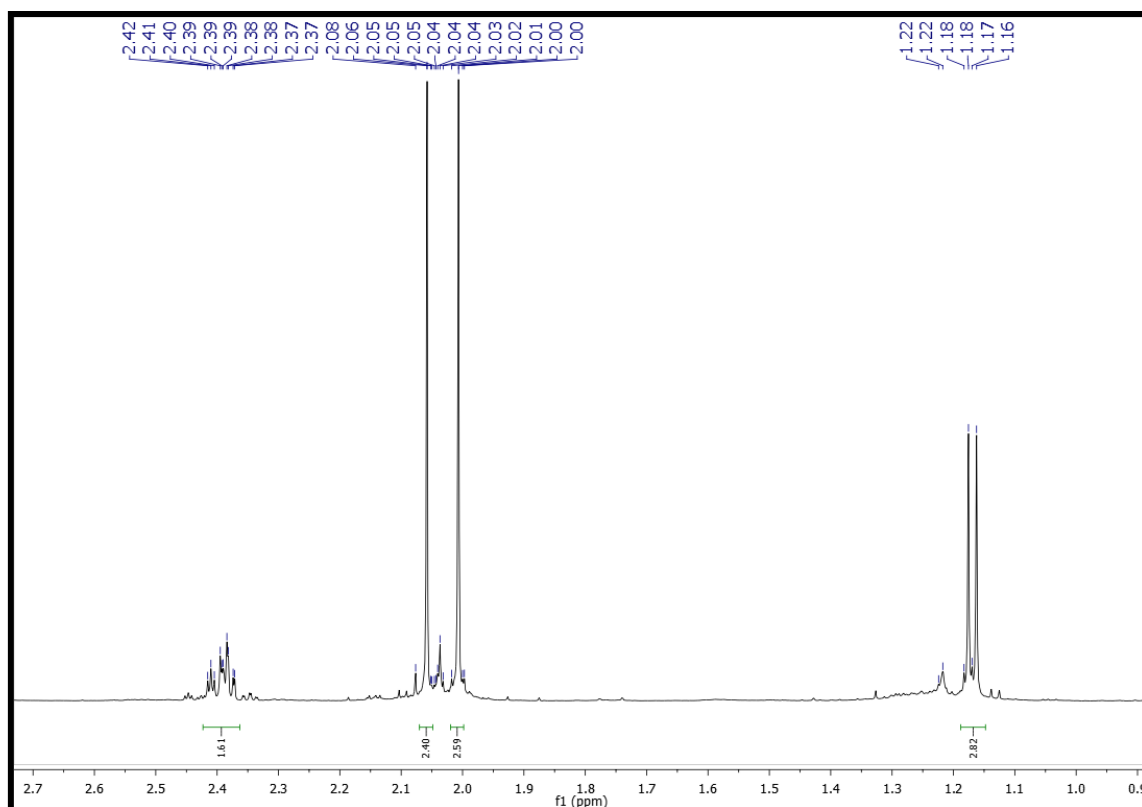
Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5.**Figura 55** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 0,9-2,7 ppm.

Figura 56 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 4,9-7,1 ppm.

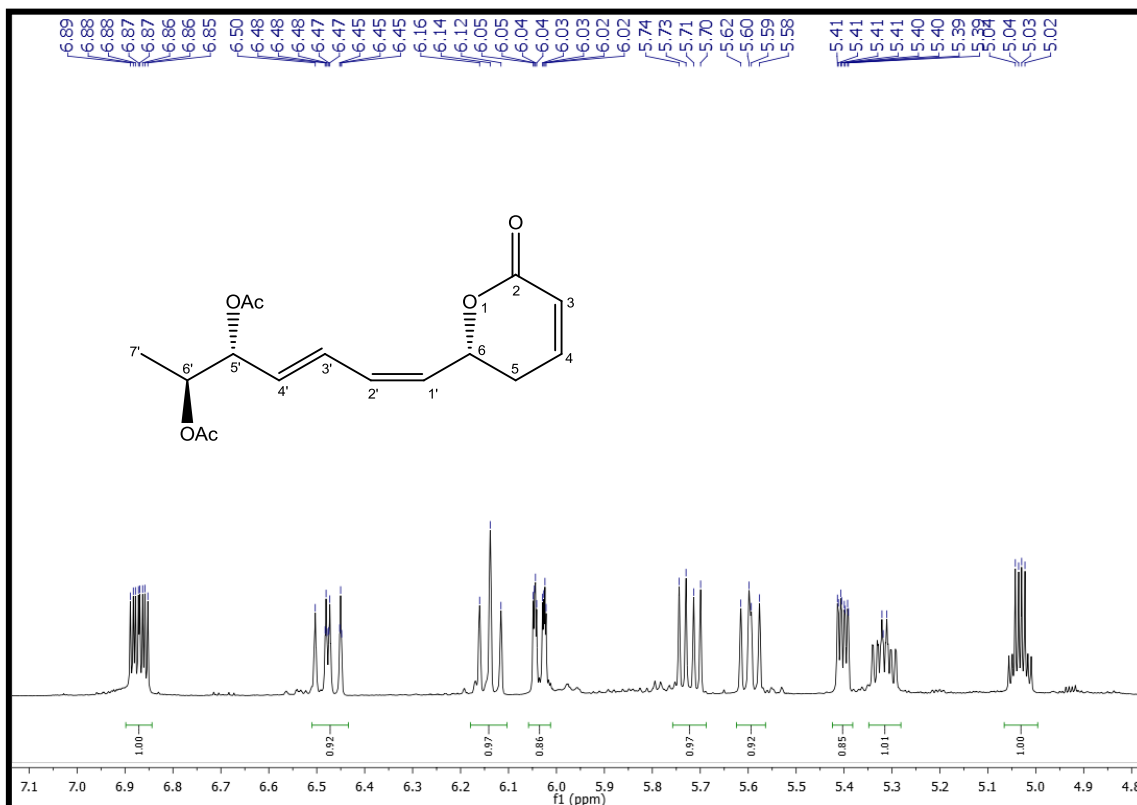


Figura 57 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-5.

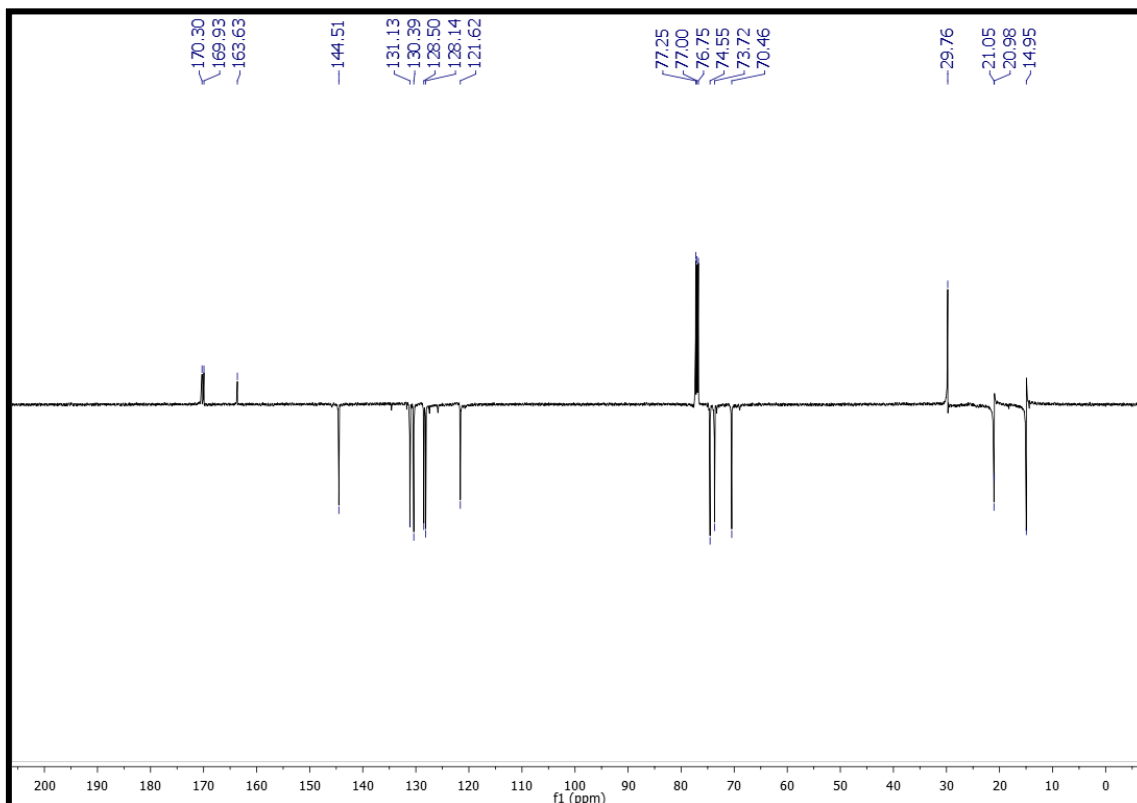


Figura 58 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 120-172 ppm.

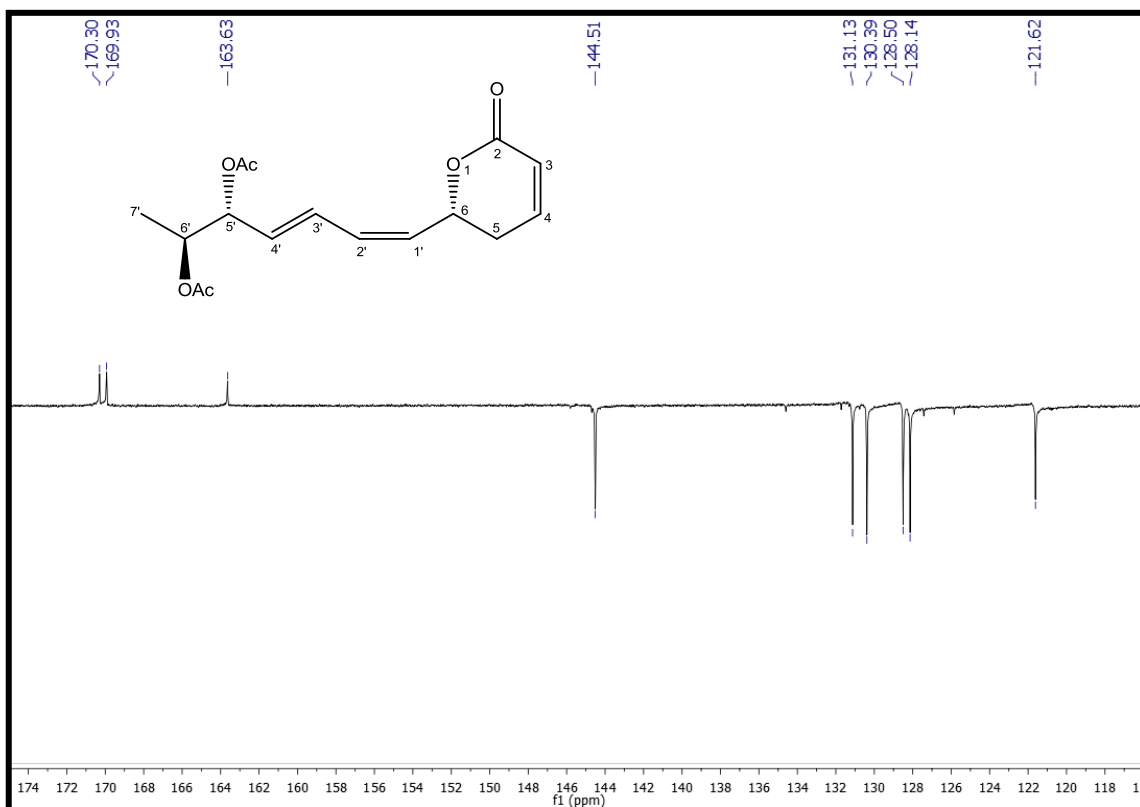


Figura 59 – Espectro de HMBC de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5.

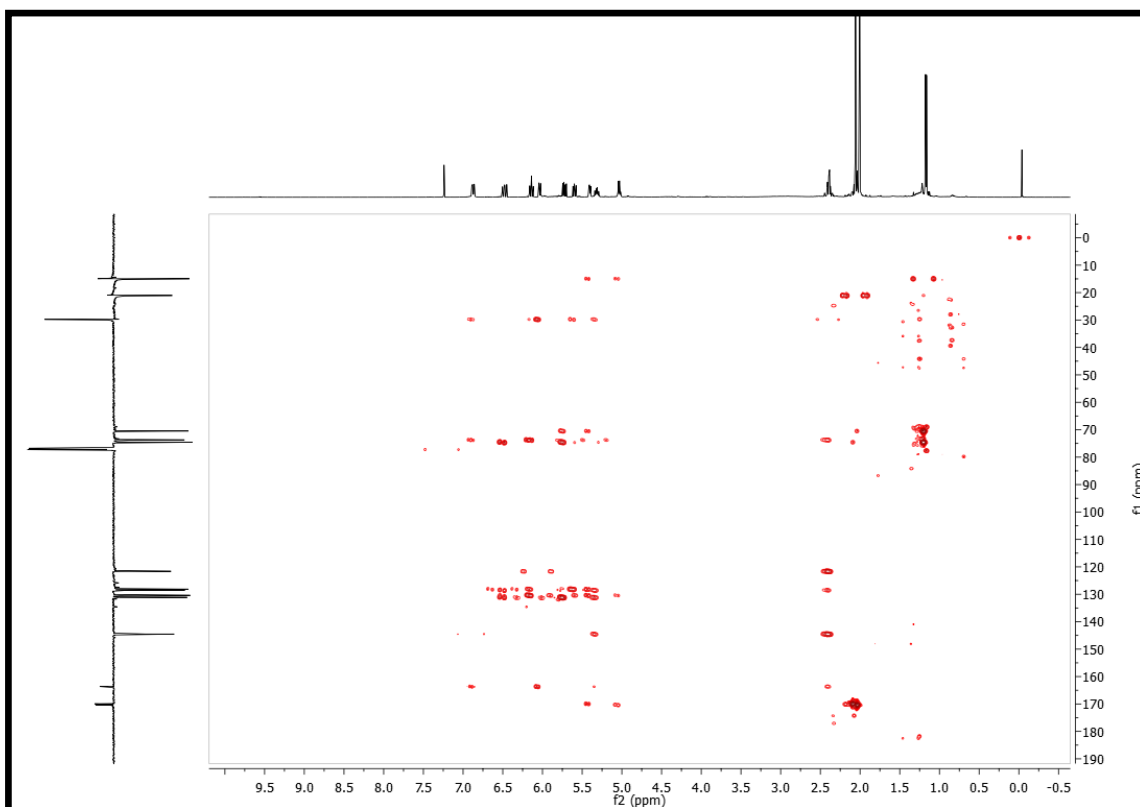


Figura 60 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 115-175 ppm x 2,0-7,0 ppm.

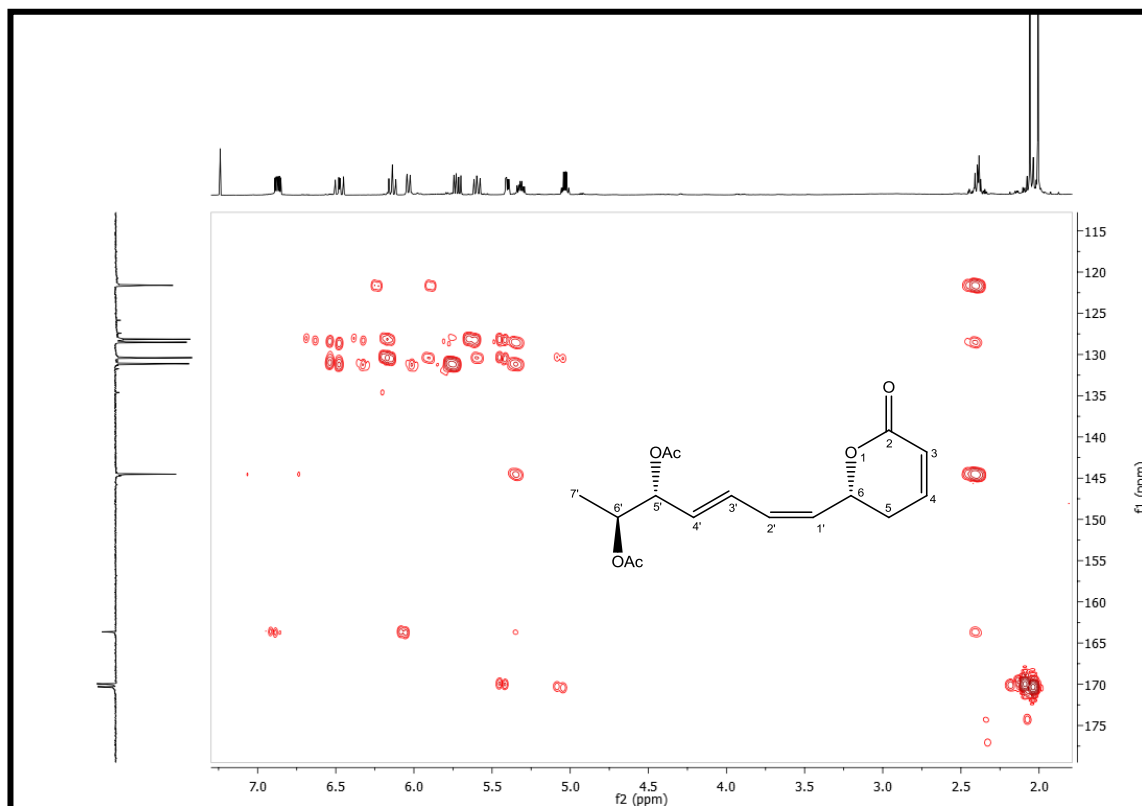


Figura 61 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 127,0-132,5 ppm x 5,5-6,7 ppm.

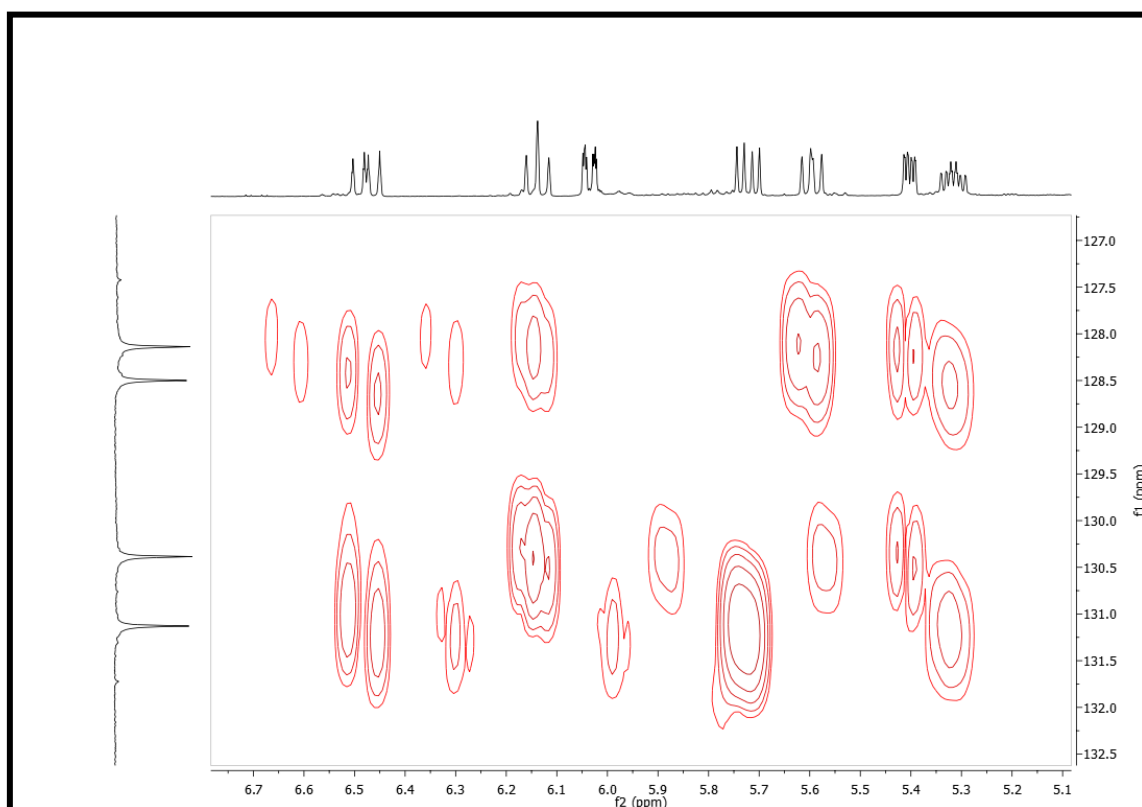


Figura 62 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 163-171 ppm x 4,9-7,0 ppm.

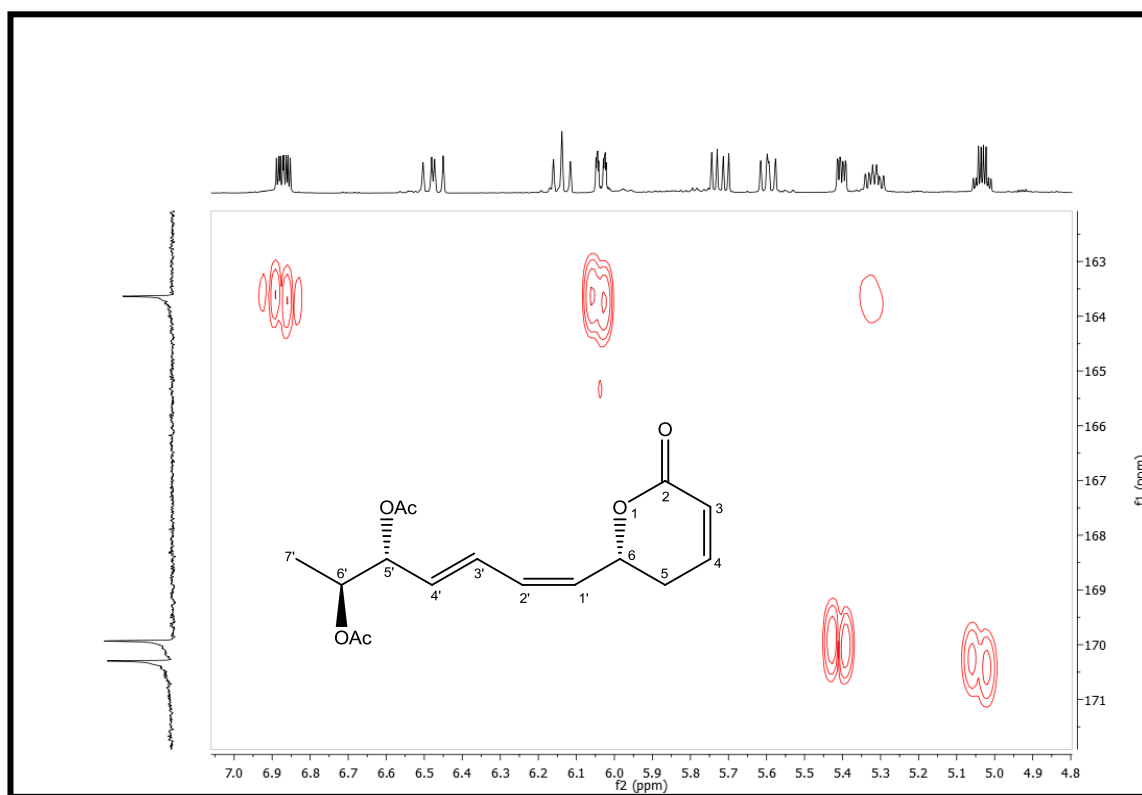


Figura 63 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 10-80 ppm x 1,0-2,6 ppm.

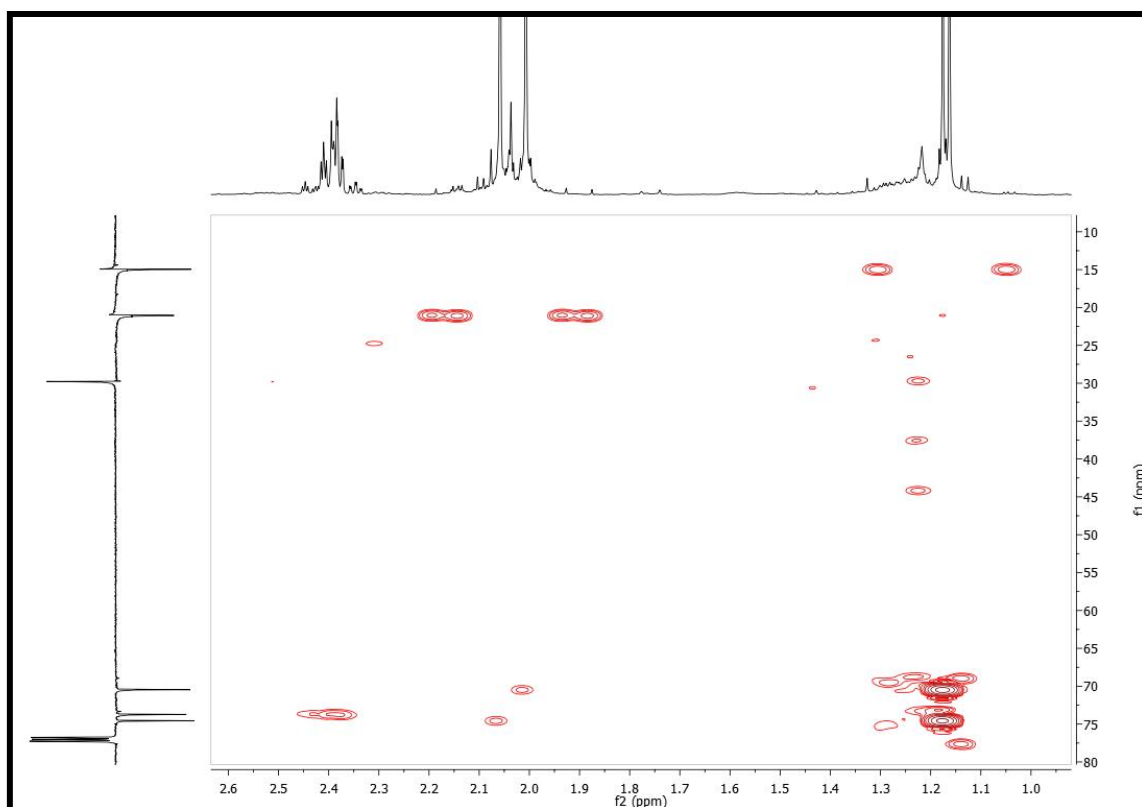


Figura 64 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 10-80 ppm x 1,0-7,0 ppm.

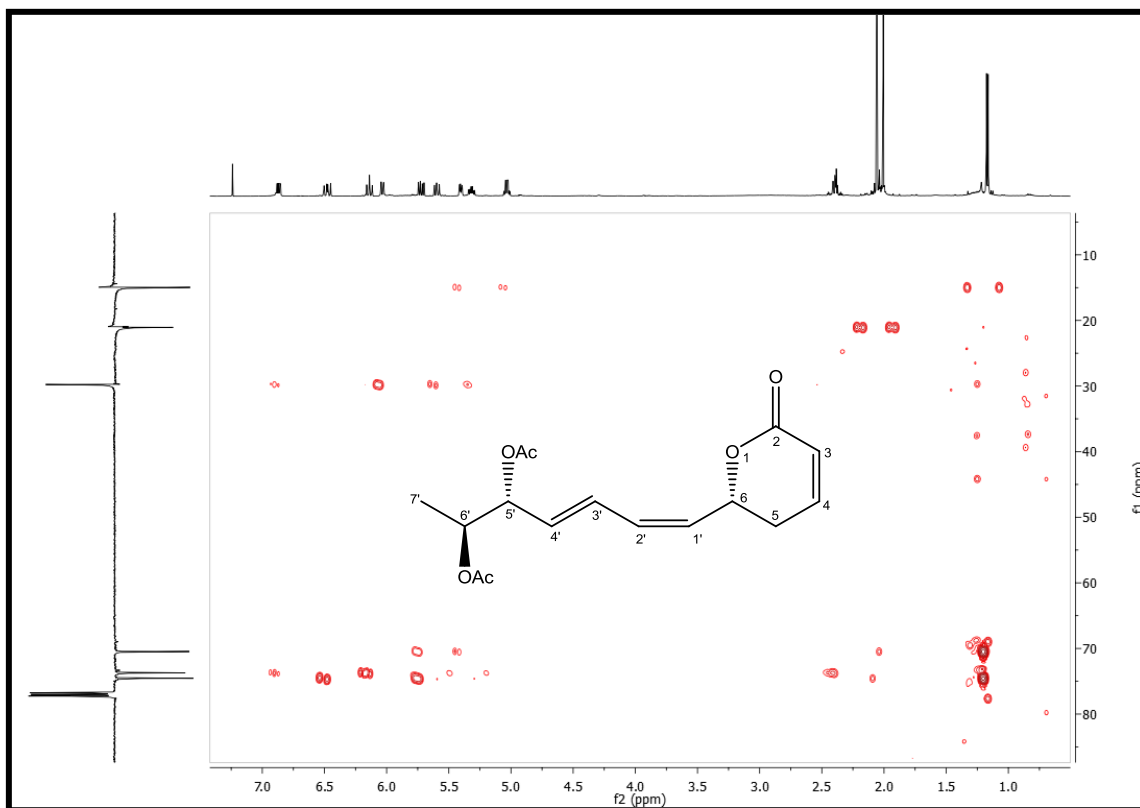


Figura 65 – Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5.

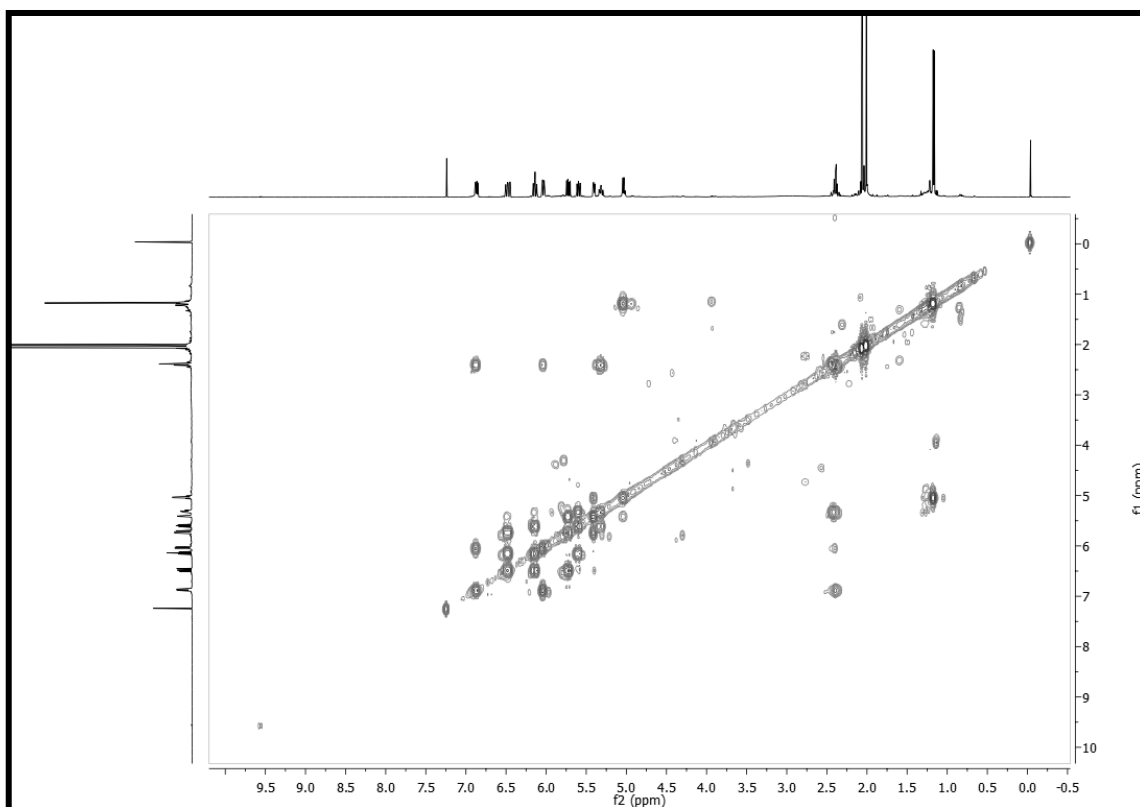


Figura 66 – Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 0,5-7,5 ppm x 0,0-7,0 ppm.

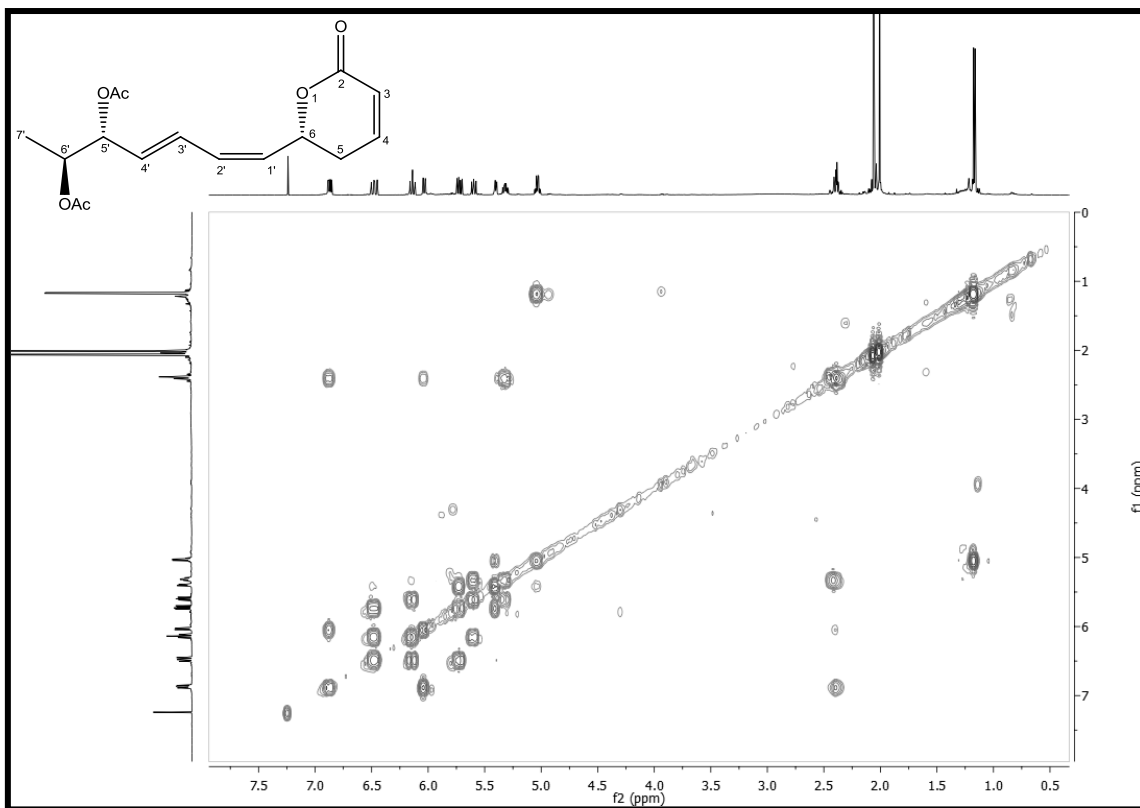


Figura 67 – Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hm-5 na região de 4,8-7,4 ppm x 4,9-7,3 ppm.

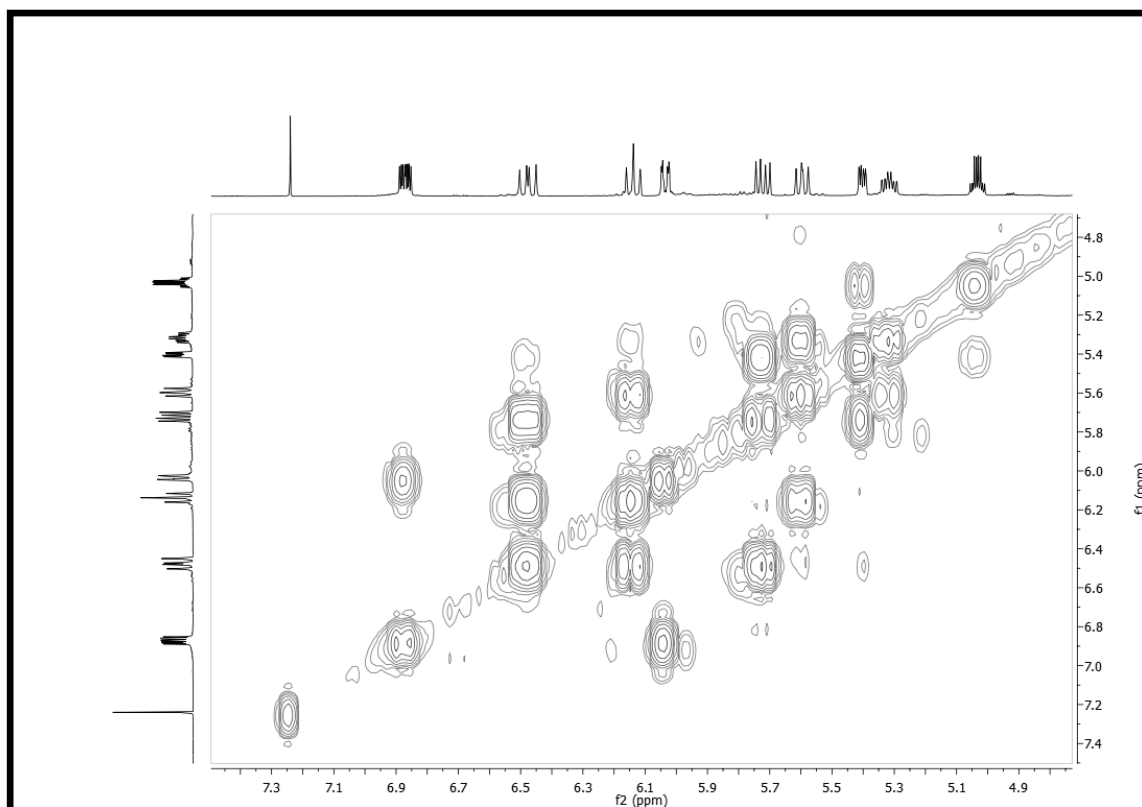
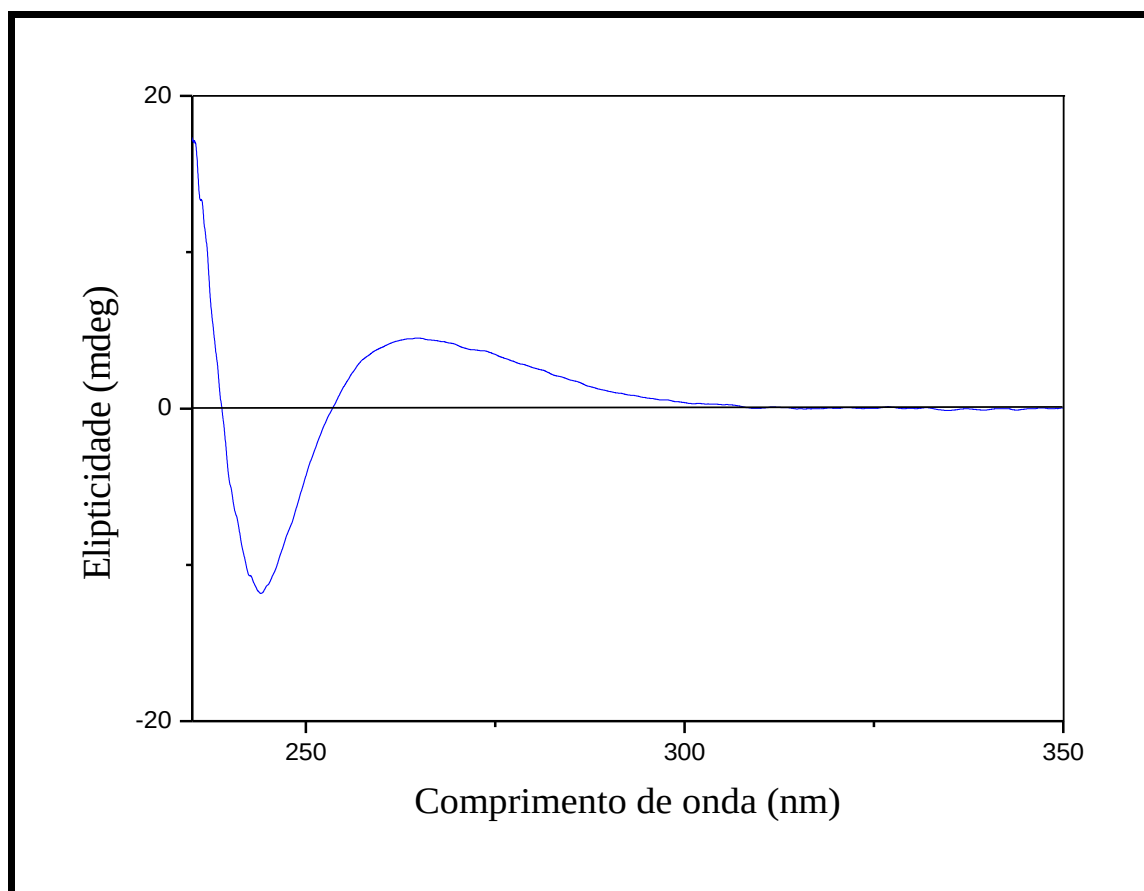


Figura 68 – Espectro de dicroísmo circular (DC) de Hm-5 obtido em CDCl_3 .

5.6 Identificação estrutural de Hm-6

A fração codificada como Hm-6 foi isolada na forma de um sólido branco.

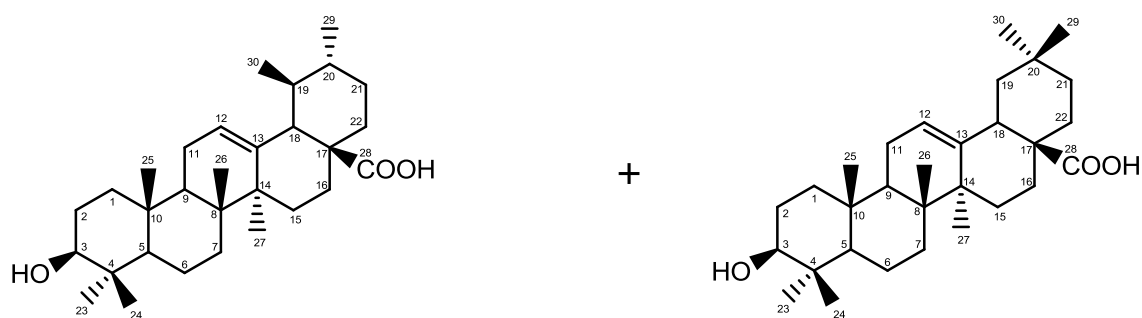
O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 69-73, p. 111-113) apresentou 53 sinais, sendo a maioria registrada entre δ_{C} 15,5 e 78,1, e atribuídos a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos. O perfil apresentado nesse espectro sugeriu tratar-se de uma mistura de substâncias de natureza triterpênica. Para confirmação dessa hipótese foram realizadas comparações com dados da literatura (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003). Para os deslocamentos químicos e dos carbonos C-12, C-13, C-18, C-19 e C-20 que são sinais norteadores para esse tipo de substância. Assim no espectro de RMN ^{13}C APT foram observados os sinais em δ_{C} 125,6; 139,2; 53,5; 39,4 e 38,9 atribuídos a C-12, C-13, C-18, C-19 e C-20, respectivamente, de triterpenos da série ursano. Observou-se ainda os sinais em δ_{C} 122,5; 144,8; 42,0; 46,5 e 30,9 atribuídos a C-12, C-13, C-18, C-19 e C-20, respectivamente, de triterpenos da série oleanano.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 74-77, p. 113-115) observou-se um tripleto largo em δ_{H} 5,47 (H-12) atribuído a hidrogênio olefínico de triterpenos oleananos e ursanos. Observou-se ainda um sinal em δ_{H} 3,44 (dd, $J = 6,0; 11,5$ Hz) atribuído ao hidrogênio H-3 de triterpeno oleanano e ursano. A área do sinal em δ_{H} 3,44 foi de 2,01 e o sinal em δ_{H} em 3,31 foi de 0,83, logo a porcentagem na mistura foi estabelecida como 70,7% de ácido ursólico e 29,3% de ácido oleanólico.

A compilação dos dados de RMN ^{13}C -APT de Hm-6 com os dados da literatura estão mostrados na Tabela 8 (p. 110). Esses triterpenos são comuns em espécies de Lamiaceae e no reino vegetal, porém estão sendo relatados pela primeira vez em *Hyptis macrostachys*.

Tabela 8 – Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hm-6a/Hm-6b (ácido ursólico e ácido oleanólico), verificados nos espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e comparação com os dados de RMN de ^{13}C -APT da literatura (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003).

	Ácido Ursólico	Ácido Oleanólico	Hm-6a/Hm-6b
C	δ_c	δ_c	δ_c
1	38,8	38,5	38,9; 38,9
2	27,3	27,4	28,1; 27,3
3	78,8	78,7	78,1; 78,1
4	38,8	38,7	39,0; 39,0
5	55,4	55,2	55,8; 55,8
6	18,4	18,3	18,8; 18,8
7	33,0	32,6	33,2; 33,3
8	39,6	39,3	39,3; 39,7
9	47,5	47,6	46,7; 46,5
10	37,0	37,0	37,3; 37,4
11	23,3	23,1	23,8; 23,7
12	125,5	122,1	122,5; 125,6
13	138,0	143,4	143,4; 139,2
14	42,0	41,6	42,0; 42,2
15	28,2	27,7	28,3; 28,1
16	24,3	23,4	23,9; 24,9
17	48,1	46,6	48,0; 48,1
18	52,8	41,3	53,5; 53,5
19	39,1	45,8	46,5; 46,7
20	38,8	30,6	30,9; 31,1
21	30,7	33,8	33,3; 33,6
22	36,7	32,3	37,4; 37,4
23	28,2	28,1	28,3; 28,7
24	15,5	15,6	15,5; 15,6
25	15,7	15,3	15,7; 15,5
26	16,9	16,8	15,5; 15,6
27	23,6	26,0	16,5; 16,5
28	180,0	181,0	179,8; 180,1
29	16,9	33,1	17,4 33,2
30	21,2	23,6	23,7 23,6



Ácido ursólico e ácido oleanólico

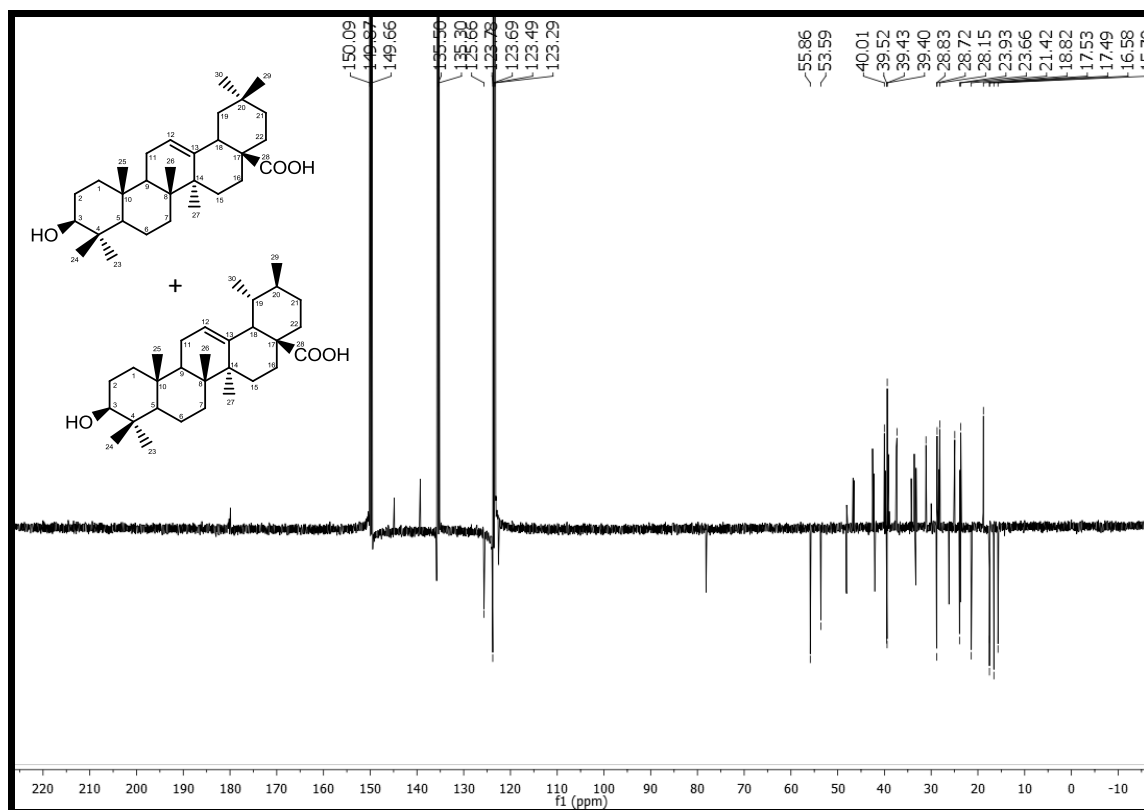
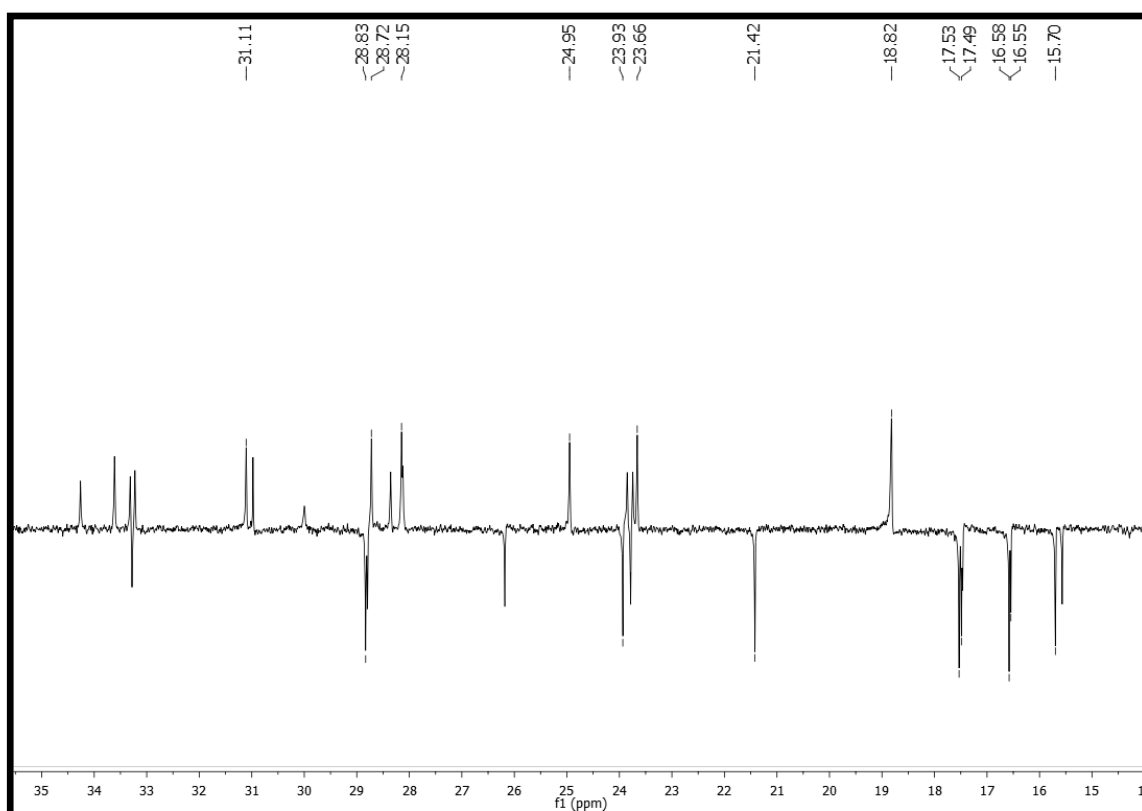
Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6.**Figura 70** – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 15-35 ppm.

Figura 71 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 37-56 ppm.

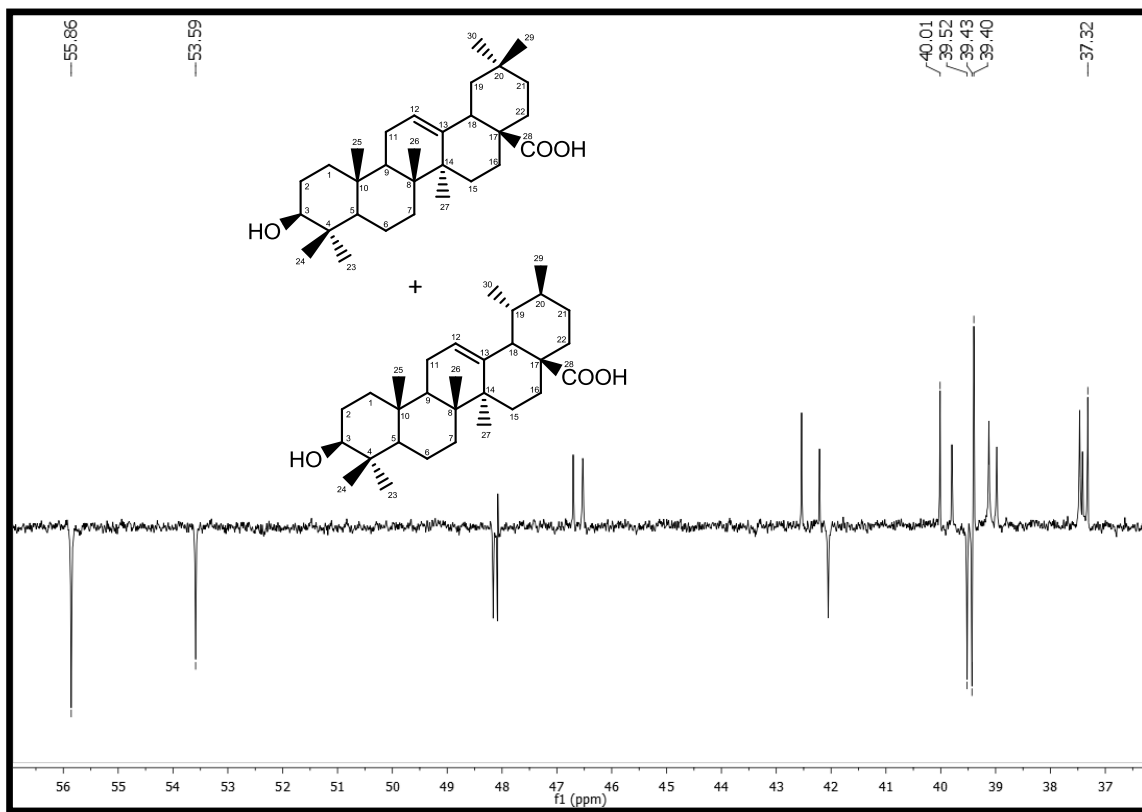


Figura 72 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 15-60 ppm.

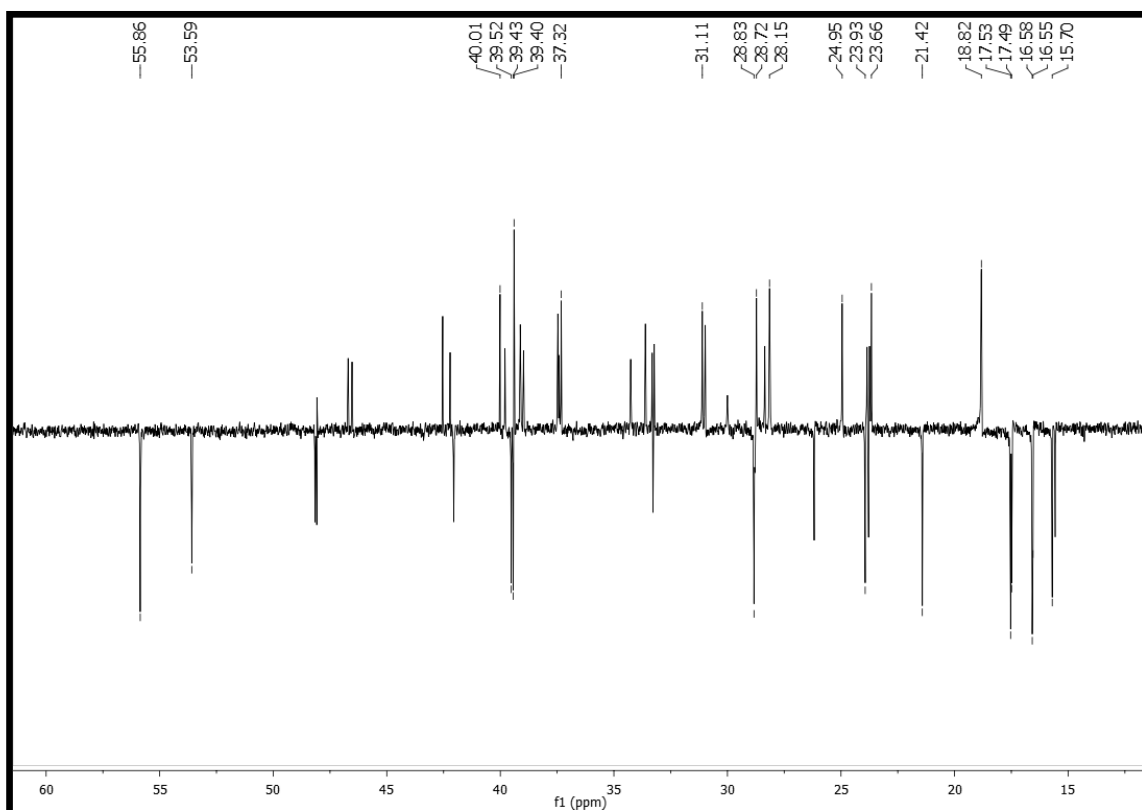


Figura 73 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 70-185 ppm.

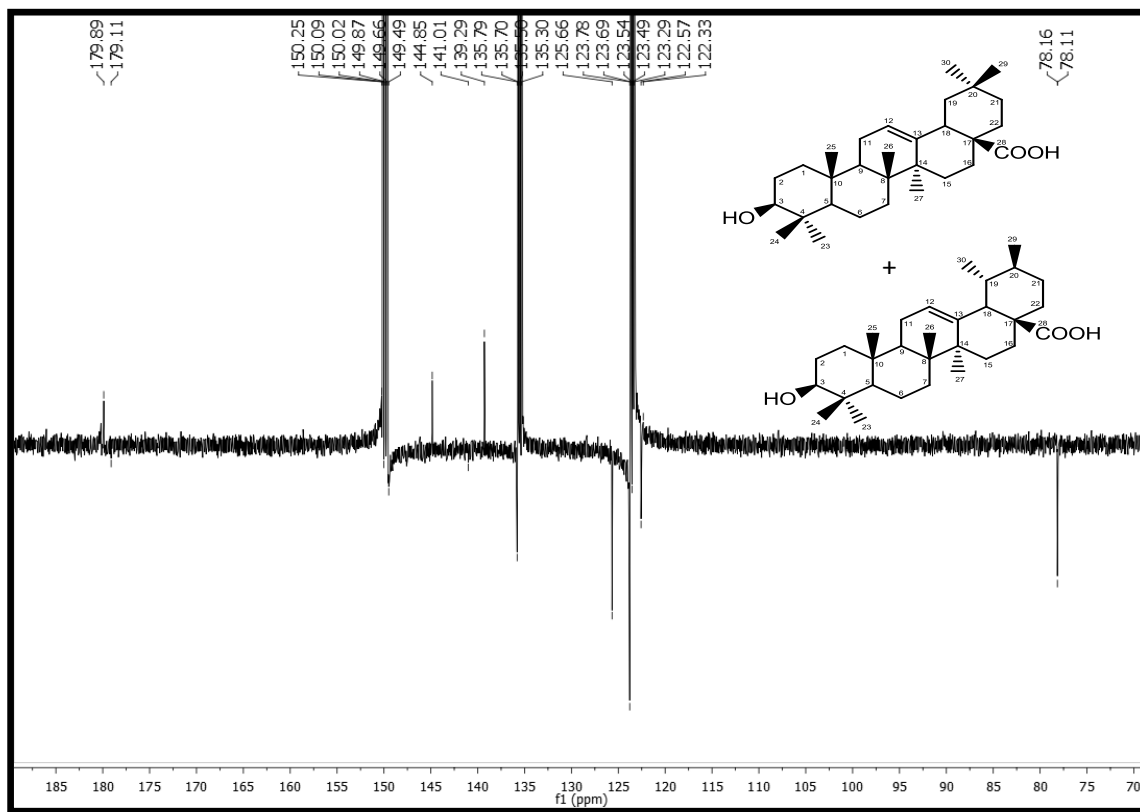


Figura 74 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6.

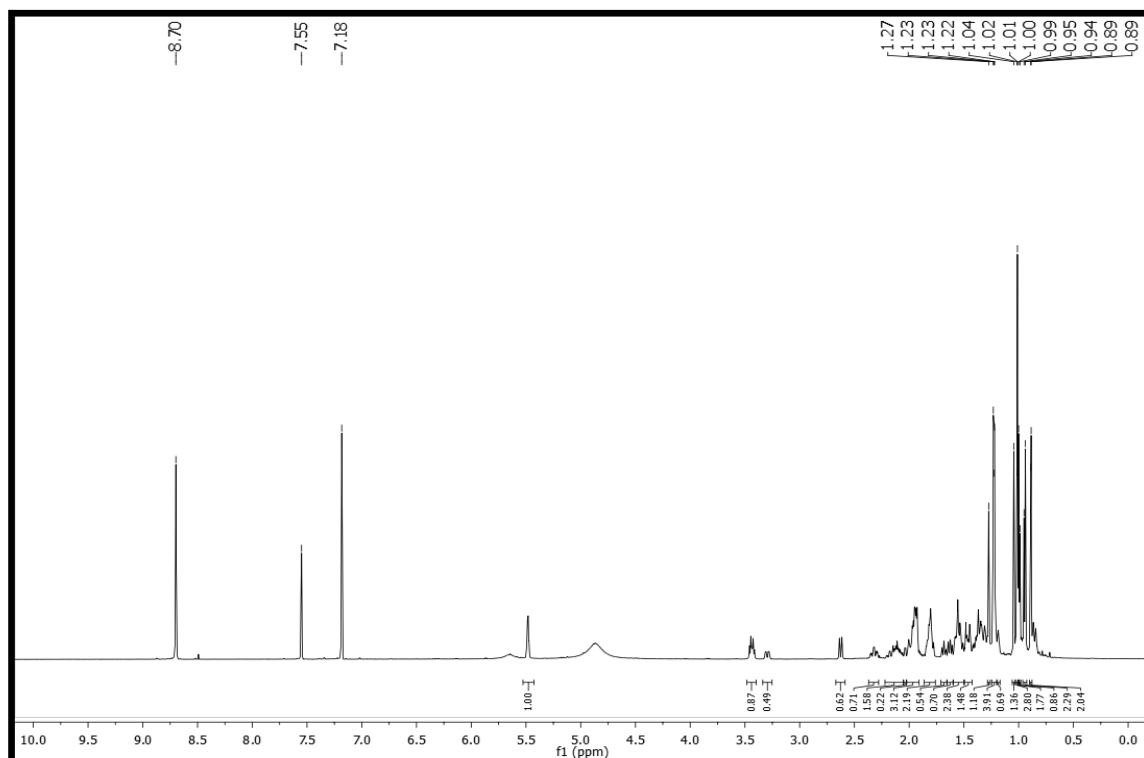


Figura 75 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 0,85-1,30 ppm.

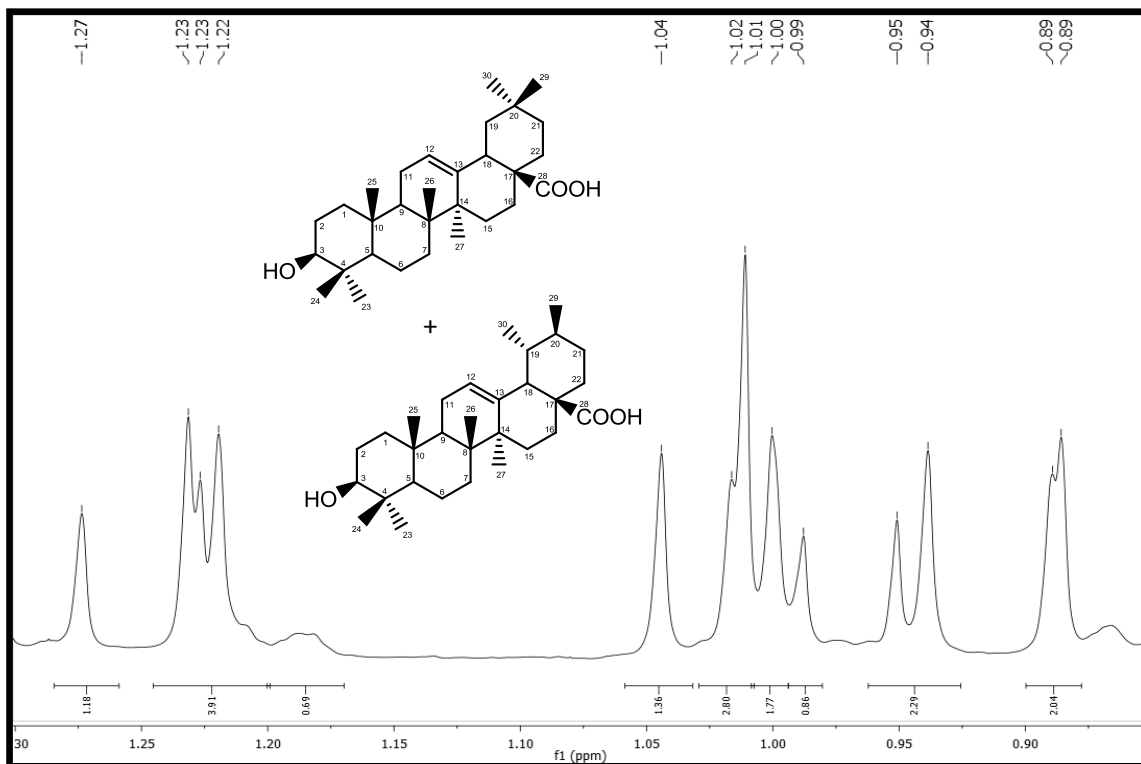


Figura 76 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 1,45-2,35 ppm.

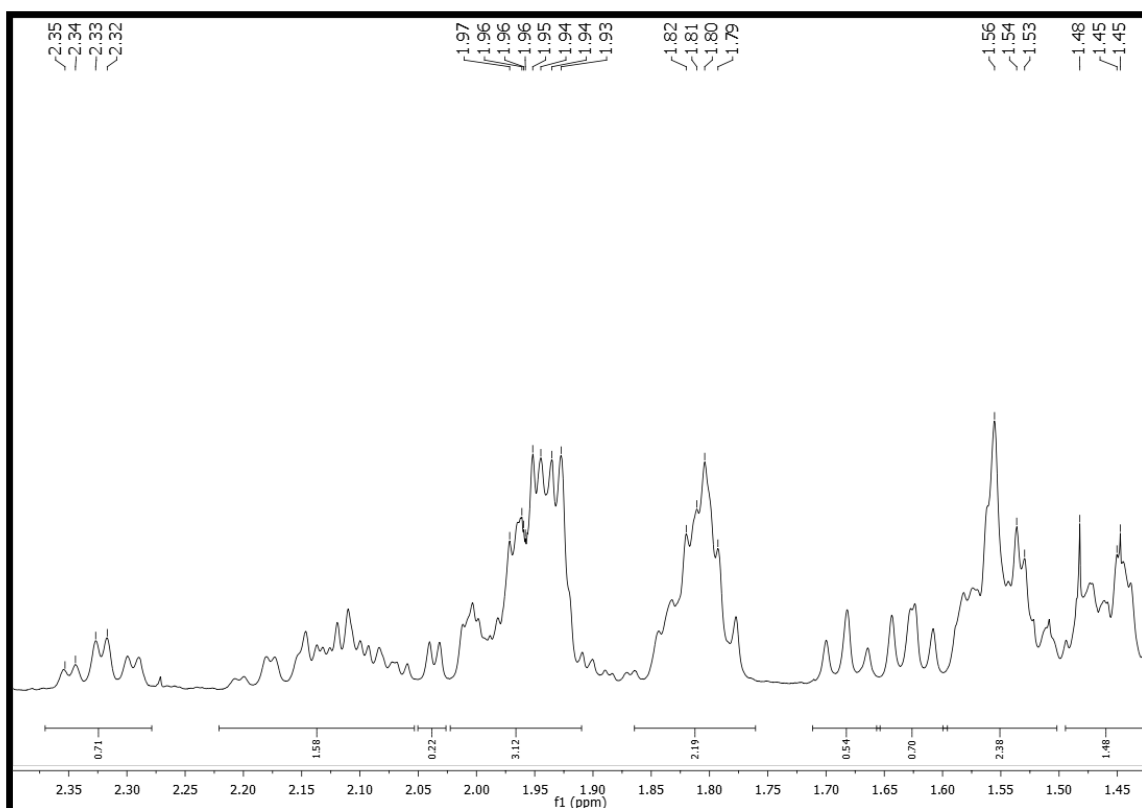
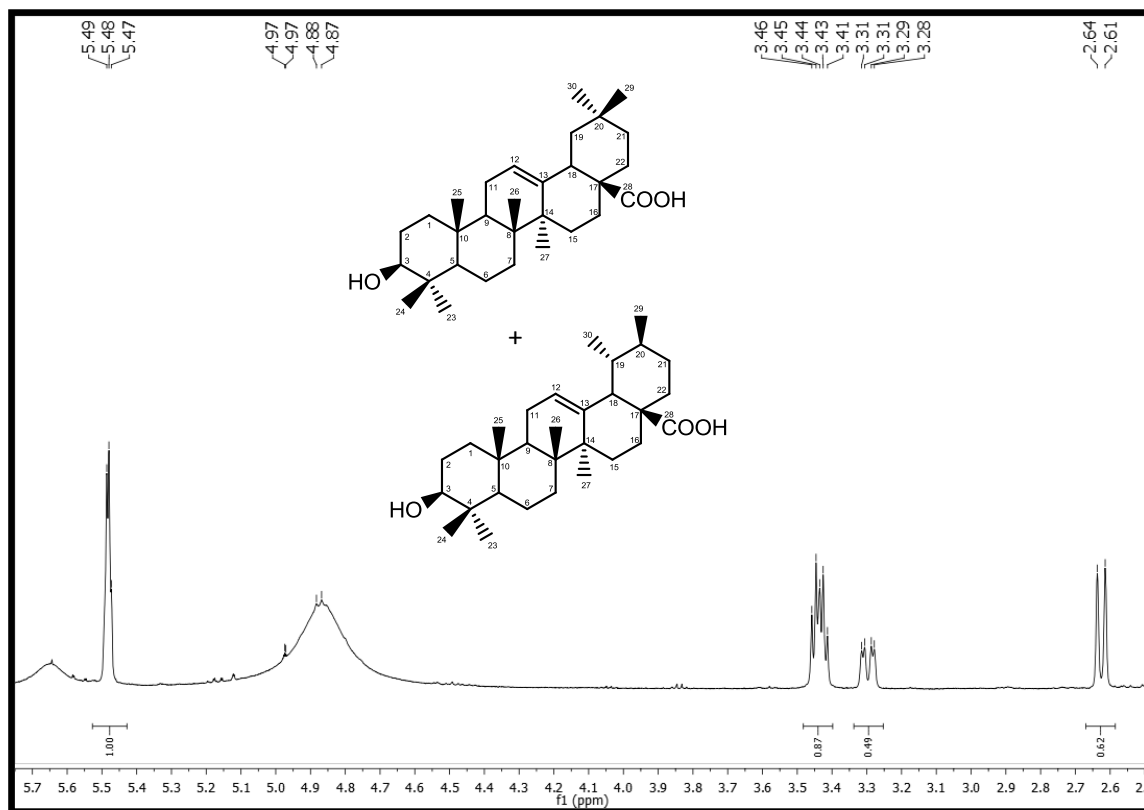


Figura 77 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Hm-6 na região de 2,5-5,7 ppm.



5.7 Identificação estrutural de Hm-7

A substância codificada como Hm-7 foi isolada na forma de um pó amorfo com rendimento de 0,0036%. O espectro de infravermelho (Figura 78, p. 118) mostrou uma absorção larga em 3.427 cm^{-1} e outra absorção em 1.691 cm^{-1} característicos de hidroxila e carbonila de ácido carboxílico, respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 79 -81 p. 118-119) foi observado a presença de trinta átomos de carbonos. Destes oito foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, oito a carbonos metilênicos, sete a carbonos metínicos e sete a carbonos metílicos. Os sinais em deslocamento químico δ 139,9 e 127,9 foram atribuídos a C-13 e C-12, respectivamente de triterpenos do tipo ursano. A ausência de um CH em δ_{C} 39,9 juntamente com o deslocamento químico em δ_{C} 72,6 infere uma oxigenação em C-19. Observou-se ainda os sinais em δ_{C} 180,6 atribuído a carbonila de ácido em C-28 e dois carbonos oximetínicos em δ_{C} 83,7 e 68,5 que comparados com a literatura foram atribuídos a C-3 e C-2, respectivamente.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 82-84, p. 120-121) foi possível observar um envelope de sinais com multicplidade resolvidas e não resolvidas na região de δ_{H} 2,2 a 0,8. Nesse envelope foi detectado a presença de sete metilas com deslocamentos químicos compatíveis para triterpenos derivados da serie ursano. Observou-se ainda sinal em δ_{C} 4,09 (ddd, $J = 11,1, 9,6, 4,2$) e um sinal em δ_{H} 3,39 (d, $J = 9,6$). Esses sinais foram atribuídos a H-2 e H-3, respectivamente. A constante de acoplamento de $J = 9,6\text{ Hz}$ é característico de uma relação antiperiplanar (axial-axial) entre H-2 e H-3. Os demais dados de RMN de Hm-7 estão na Tabela 9 (p. 117).

Assim, após analisar os dados de RMN e comparar com a literatura (COSTA et al., 2008) foi possível identificar Hm-7 como sendo o triterpeno da serie ursano, o ácido $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido tormêntico). Esse composto já foi isolado de outras espécies de Lamiaceae, porém, esse é o primeiro relato para *Hyptis macrostachys*.

Tabela 9 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de Hm-7 com os dados da literatura para o ácido 2 α ,3 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-oico (ácido tormêntico) em MeOH (50 MHz).

Nº	Tipo de carbono	δ_c de Hm-7 em MeOD	δ_c (COSTA et al., 2008) em MeOD
1	CH ₂	48,2	48,3
2	CH	68,5	69,0
3	CH	83,7	84,3
4	C	40,3	40,3
5	CH	55,9	56,4
6	CH ₂	18,9	19,4
7	CH ₂	33,4	33,8
8	C	41,0	40,9
9	CH	47,9	48,1
10	C	39,9	39,1
11	CH ₂	24,8	24,5
12	CH	127,9	128,3
13	C	139,9	140,4
14	C	42,3	42,6
15	CH ₂	29,2	29,7
16	CH ₂	26,8	26,8
17	C	47,7	48,8
18	CH	54,5	55,1
19	C	72,6	73,2
20	CH	42,4	42,8
21	CH ₂	27,0	27,3
22	CH ₂	38,4	39,0
23	CH ₃	27,4	29,8
24	CH ₃	17,4	18,1
25	CH ₃	17,1	17,3
26	CH ₃	17,6	17,6
27	CH ₃	24,6	25,1
28	COOH	181,6	181,1
29	CH ₃	17,2	17,2
30	CH ₃	27,0	27,5

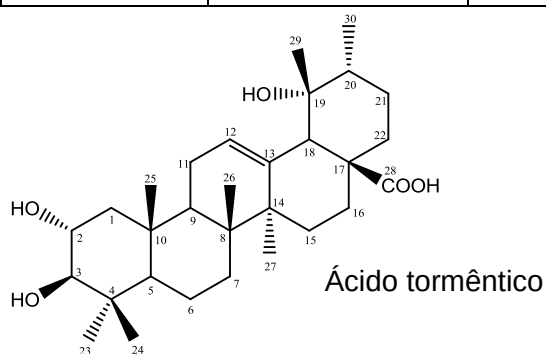


Figura 78 – Espectro de IV de Hm-7 obtido em pastilha de KBr.

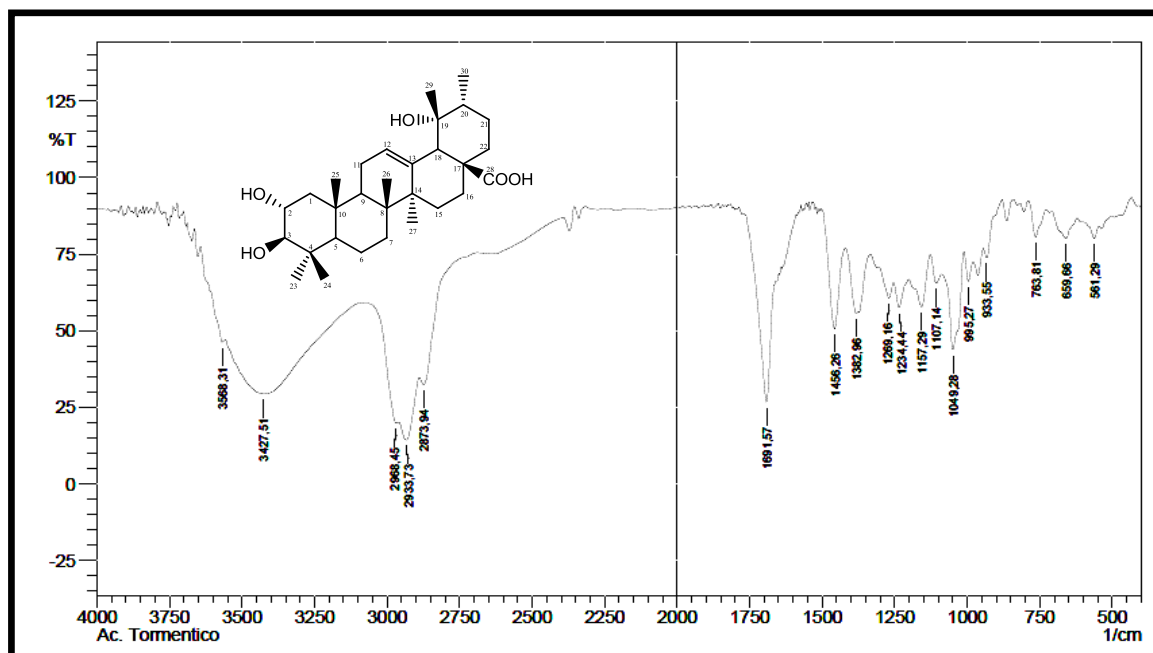
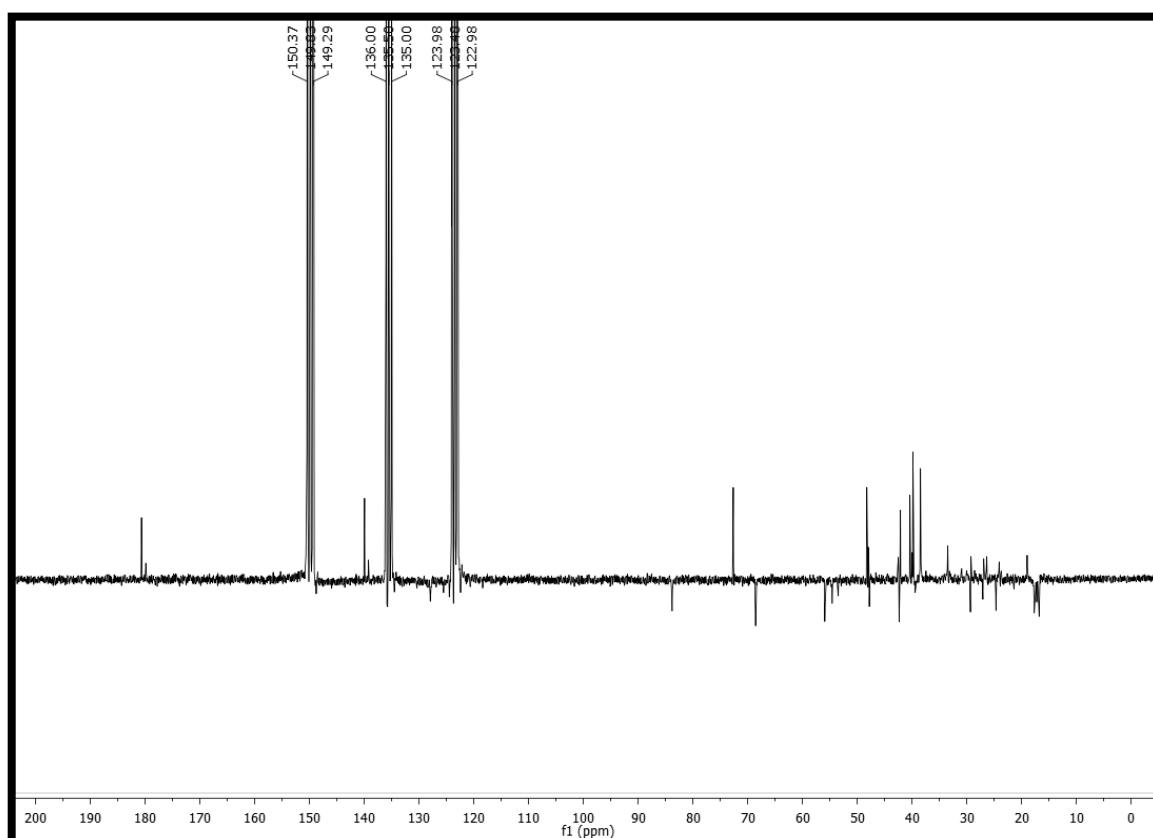
Figura 79 – Espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7.

Figura 80 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 36-86 ppm.

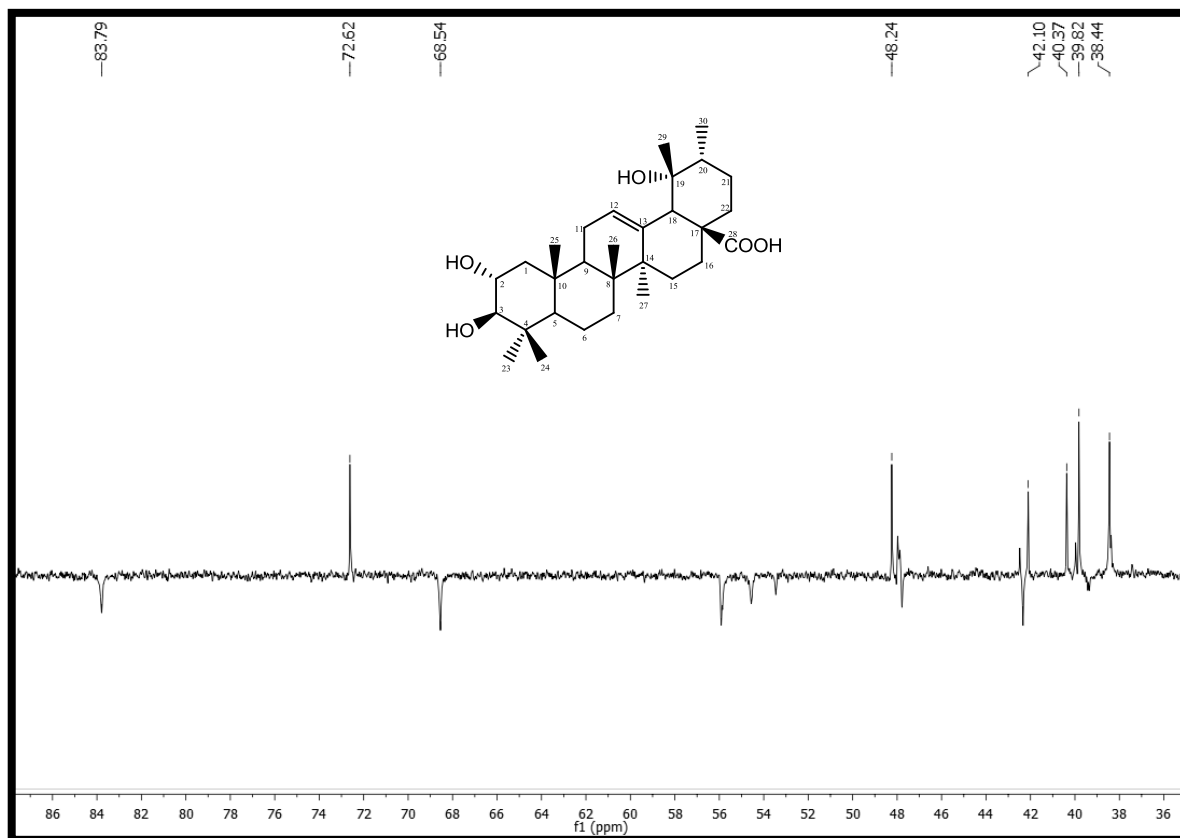


Figura 81 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 115-185 ppm.

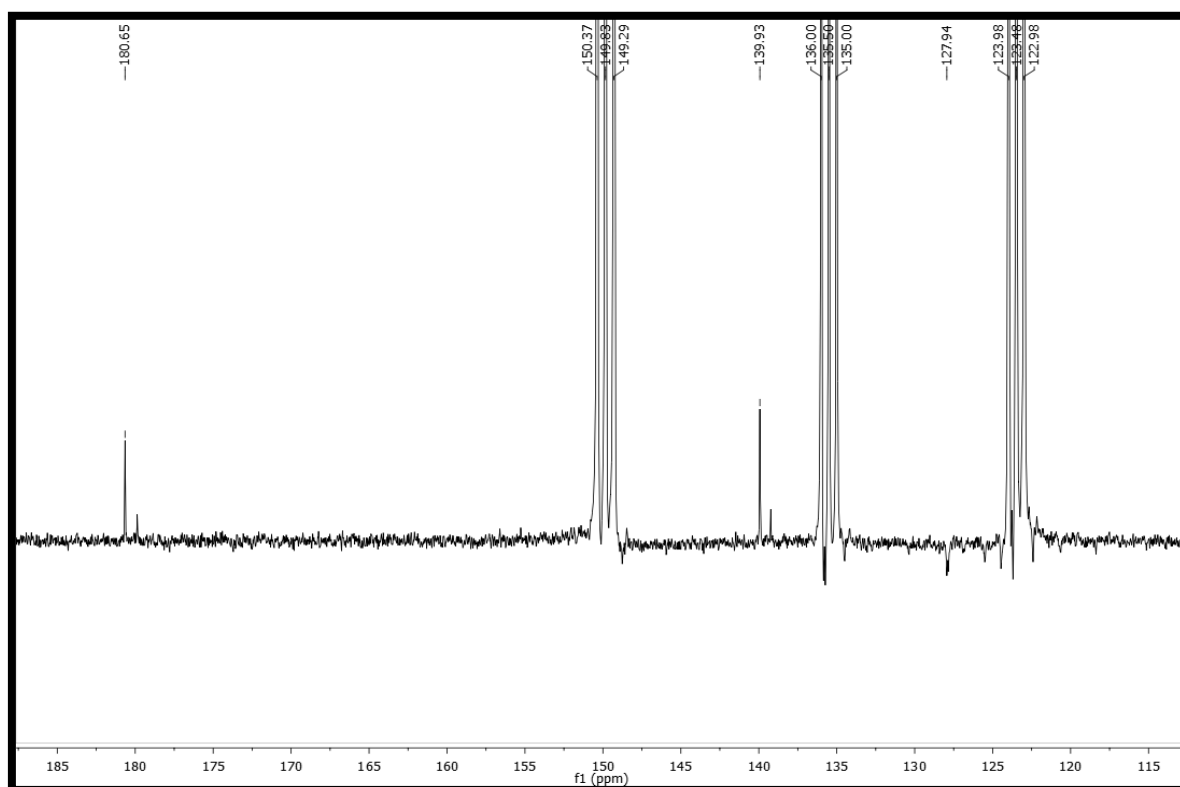


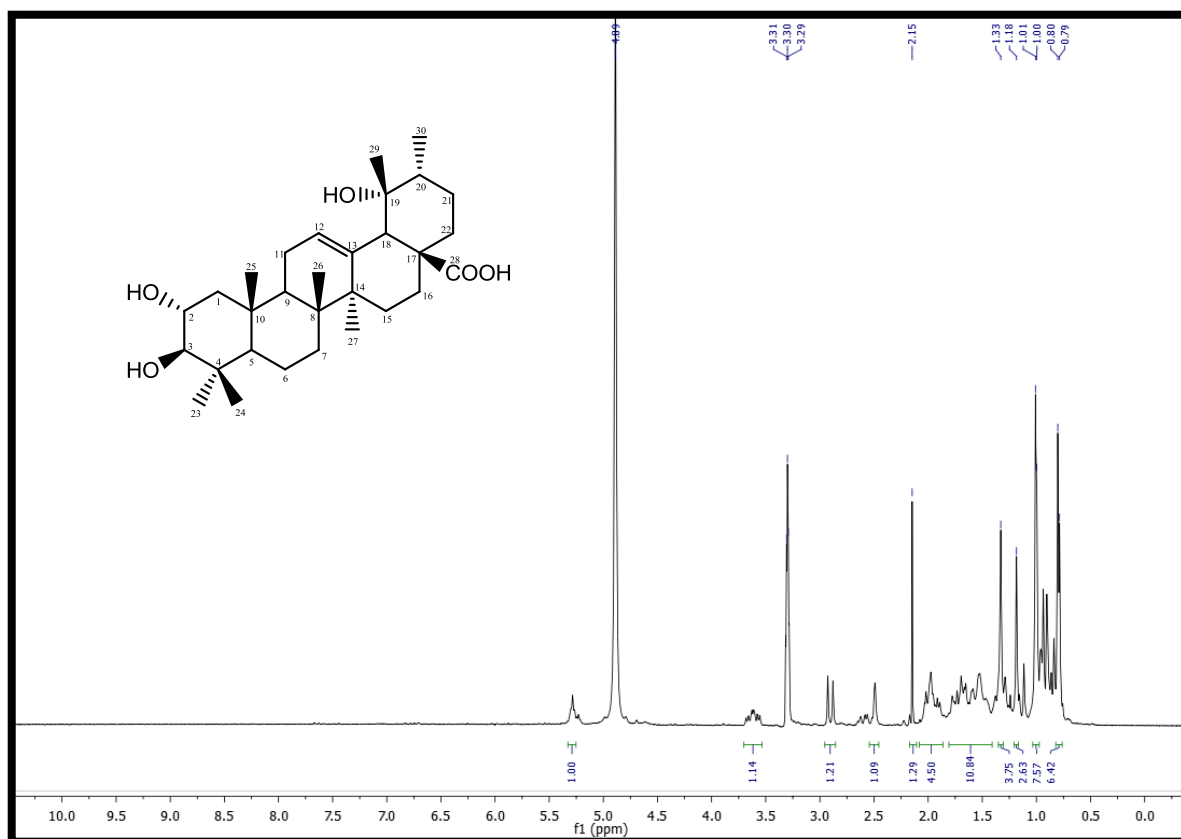
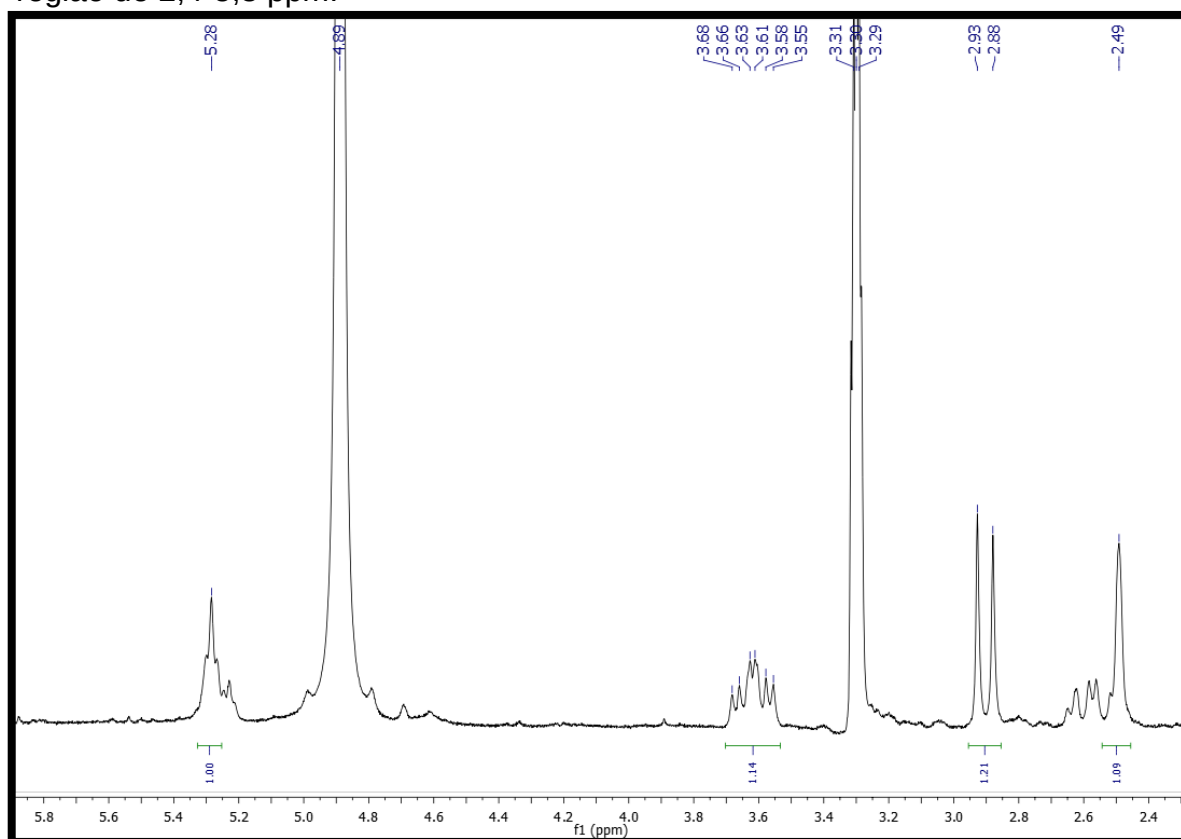
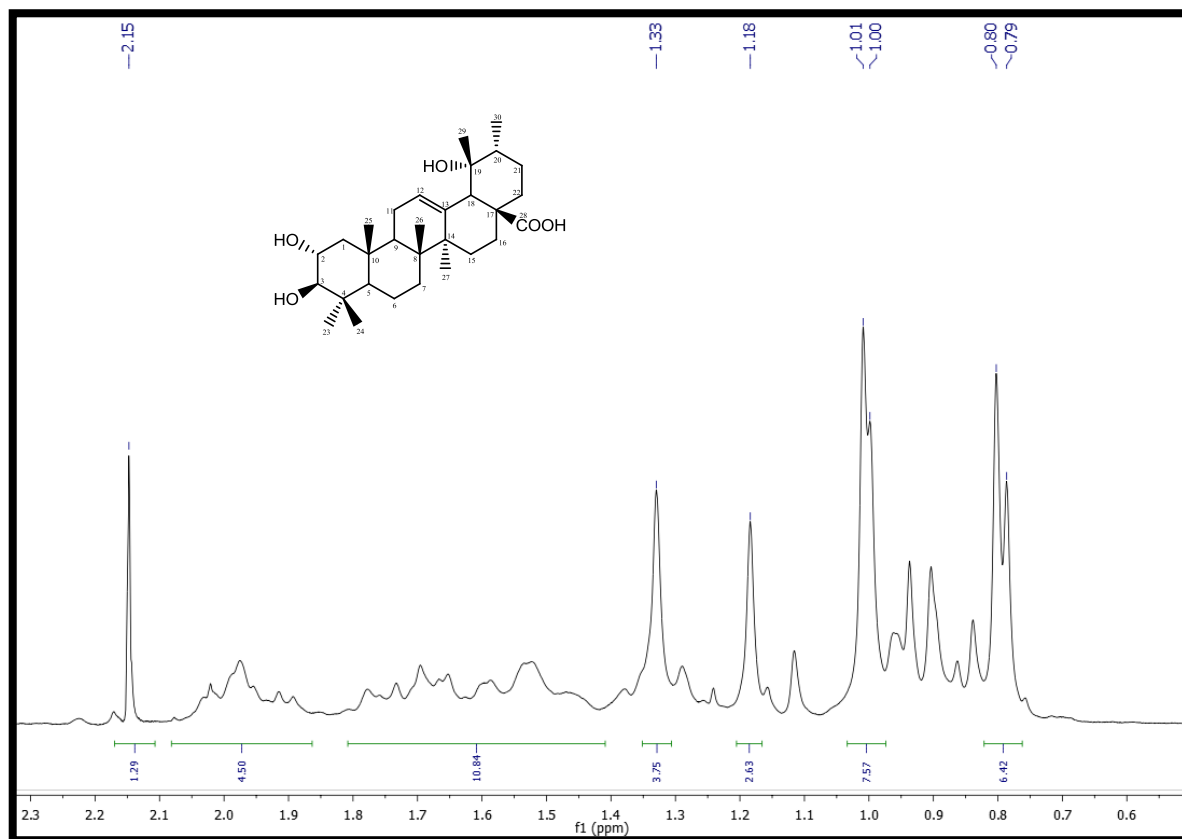
Figura 82 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7.**Figura 83** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 2,4-5,8 ppm.

Figura 84 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Hm-7 na região de 0,6-2,3 ppm.



5.8 Identificação estrutural de Hu-1

O composto codificado como Hu-1 foi isolado na forma de pó branco amorfo com rendimento de 0,0035%. O espectro de massas obtido por impacto de elétrons mostrou o pico do íon molecular em $m/z = 286$ compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O$ (Figura 85, p. 125).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 86-88, p. 125-126) observou-se a presença de 18 sinais correspondentes a 20 átomos de carbono. Destes, cinco foram atribuídos a carbonos não hydrogenados, sendo os sinais em δ_c 134,5; 146,5 e 145,8 atribuídos a carbonos sp^2 . Seis sinais referentes a carbonos metínicos, sendo três carbonos sp^3 e três carbonos sp^2 , quatro carbonos metilênicos e cinco carbonos metilínicos.

No espectro de RMN 1H (Figuras 89-94, p. 127-129) foi possível observar três sinais para hidrogênios aromáticos com deslocamentos em δ_H 7,17 (d, $J = 8,0$ Hz), 6,98 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz) e um singleto largo em δ_H 6,88. Observamos ainda um dubleto com integração para seis hidrogênios em δ_H 1,21 e constante de acoplamento de 7,0 Hz, além de um septeto em δ_H 2,80 atribuídos a unidade isopropila. Esses sinais são compatíveis com esqueleto de diterpeno do tipo abietano e foram atribuídos a H-11, H-12, H-14, H-15 e 3H-16 e 3H-17, respectivamente (ULUBELEN; TOPCU, 1992). Observou-se ainda três singletos em δ_H 0,95, 0,98 e 1,19 que por comparação com a literatura (URONES et al., 1997), foram atribuídos as metilas CH_3 -18, CH_3 -19 e CH_3 -20. Observou-se também um tripleto de tripleto em δ_H 4,03 atribuído a um hidrogênio oximetínico, os demais deslocamentos químicos estão compilados na Tabela 10 (p. 124).

No espectro de HMQC (Figuras 95-98, p. 130-131) foi possível observar as correlações diretas entre os sinais em δ_H 0,95 com δ_c 22,5, δ_H 0,98 com δ_c 33,3 e 1,19 com δ_c 25,6 atribuídos aos carbonos das metilas CH_3 -18, CH_3 -19 e CH_3 -20, respectivamente. Observou-se ainda as correlações dos sinais em δ_H 7,17 (H-11), 6,98 (H-12) e 6,88 (H-14) com os carbonos 123,9; 123,9 e 126,9, estes atribuídos a C-11, C-12 e C-14, respectivamente. As demais correlações estão compiladas na Tabela 10 (p. 124).

Para o completo assinalamento de hidrogênios e carbonos foi realizado o experimento de HMBC. Nesse espectro (Figuras 99-105, p. 132-135) observaram-

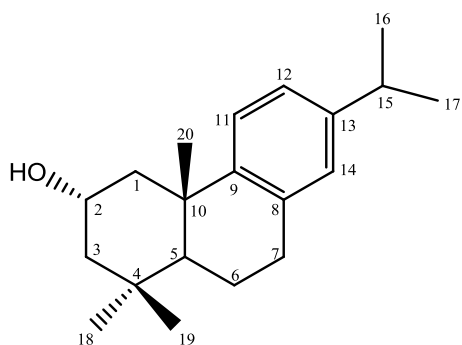
se as seguintes correlações: δ_H 1,19 (CH₃-20) com os sinais em δ_C 146,5; 49,7; 39,2 e 47,9 que foram atribuídos a C-9, C-5, C-10 e C-1 respectivamente. Com a correlação de CH₃-20 com C-9, esse carbono fica assinalado inequivocamente não permitindo a inversão de deslocamento químico com C-14 como proposto na literatura (ULUBELEN; TOPCU, 1992). Da mesma forma, a correlação de 1,19 (CH₃-20) com 47,9 assinala inequivocamente esse carbono para C-1, permitindo assim uma troca de C-1 com C-3, corrigindo a literatura. Essa proposta ainda é reforçada pela correlação do sinal δ_H 0,98 (CH₃-19) com o carbono em δ_C 50,9 atribuído a C-3. Ainda foi possível observar a correlação do sinal em δ_H 7,17 (H-11) com 134,5; 39,2 e 145,8 que foram atribuídos a C-8, C-10 e C-13, respectivamente. A correlação direta de H-11 com 123,9 atribui esse carbono a C-11 e corrige o da literatura na qual esse carbono tinha sido atribuído a C-14. Observou-se ainda a correlação do sinal em δ_H 0,95 (CH₃-18) com 49,7 que foi atribuído a C-5. No HMQC esse carbono se correlacionou com o sinal em δ_H 1,33 que foi atribuído a H-5. No HMBC esse sinal se correlacionou com 18,8 e 30,2 que foram atribuídos a C-6 e C-7, respectivamente. O assinalamento de C-7 ainda foi reforçado através da correlação de 6,88 (H-14) com 30,2 (C-7). Por fim, a correlação em 1,33 (H-5) com C-1, C-3, C-6 e C-7 assinalados a hidroxila foi inserida em C-2. Essa proposta foi reforçada através das correlações do sinal em δ 2,62 (H-1) com 65,6 e de 1,82 (H-3) com esse mesmo carbono. As demais correlações estão copiladas na Tabela 10 (p. 124).

No COSY (Figuras 106-107, p. 135-136) observaram-se as correlações dos sinais em 7,17 (H-11) com 6,98 (H-12) e de 2,80 (H-15) com 1,21 (3H-16 e 3H-17), confirmando o sistema aromático e a unidade isopropila. Observou ainda correlação de 4,03 (H-2) com 1,33 (H-1) e 1,82 (H-3), confirmando H-2 e reforçando a inserção da hidroxila nesse carbono.

A estereoquímica relativa da hidroxila em C-2 foi determinada através da análise do NOESY (Figuras 108-109, p. 136-137). Assim a correlação do sinal em δ_H 4,03 com o sinal em 0,98 (CH₃-19) estabeleceu a hidroxila em α -equatorial (p. 125). Após análise de todos os dados de RMN uni e bidimensionais foi possível concluir que Hu-1 trata-se do pomiferin D. Esse composto está sendo relatado pela primeira vez na espécie em estudo, porém aqui, seus dados de RMN estão assinalados completo e inequivocamente.

Tabela 10 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz) de Hu-1 (pomiferin D) em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC	COSY
	δ_{H}	δ_{C}		
1	1,33 eq (m); 2,62 dt ($J = 12,0; 3,0$)	47,9	C-2, C-3, C-5, C-10	H1
2	4,03 (tt, $J = 15,0; 4,0$)	65,6		H1, H3
3	1,82 eq (dd, $J = 2,5; J = 4,0$) 1,6 ax (m)	50,9	C-2, C-4, C-19, C-18, C-5, C-1	H3
4	-	34,8		
5	1,33 (m)	49,7	C-3, C-4, C-6, C-7, C-18, C-19, C-20	H6
6	1,82 (m)	18,8	C-4, C-5, C-7, C-10	H5, H7
7	2,92 ax (m) 2,88 eq dd ($J = 8,0; 11,0$)	30,2	C-5, C-6	H6, H7
8	-	134,5		
9	-	146,5		
10	-	39,2		
11	7,17 (d), $J = 8,0$)	123,9	C-8, C-10, C-13	H12
12	6,98 (dd, $J = 8,0; 2,0$)	123,9	C-9, C-11, C-14, C-15	H11
13	-	145,8		
14	6,88 (sl)	126,9	C-7, C-9, C-12, C-15	
15	2,80 (m)	33,4	C-16, C-17	H16
16	1,21 (d, $J = 7,0$)	23,9	C-13, C-15, C-17	
17	1,21 (d, $J = 7,0$)	23,9	C-13, C-15, C-17	
18	0,95 (s)	22,5	C-3, C-4, C-5, C-19	
19	0,98 (s)	33,3	C-3, C-4, C-5, C-18	
20	1,19 (s)	25,6	C-1, C-5, C-9, C-10	



Pomiferin D

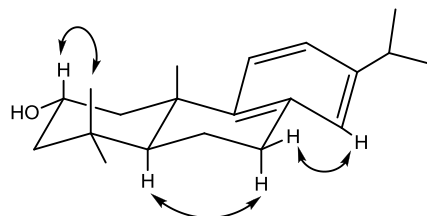


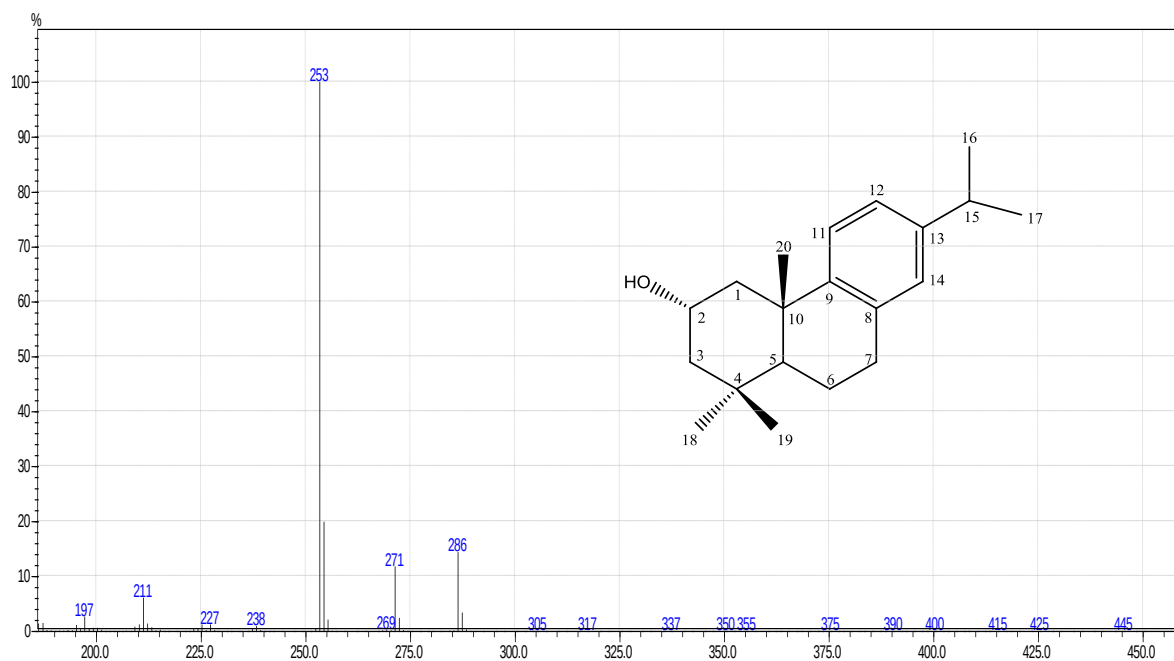
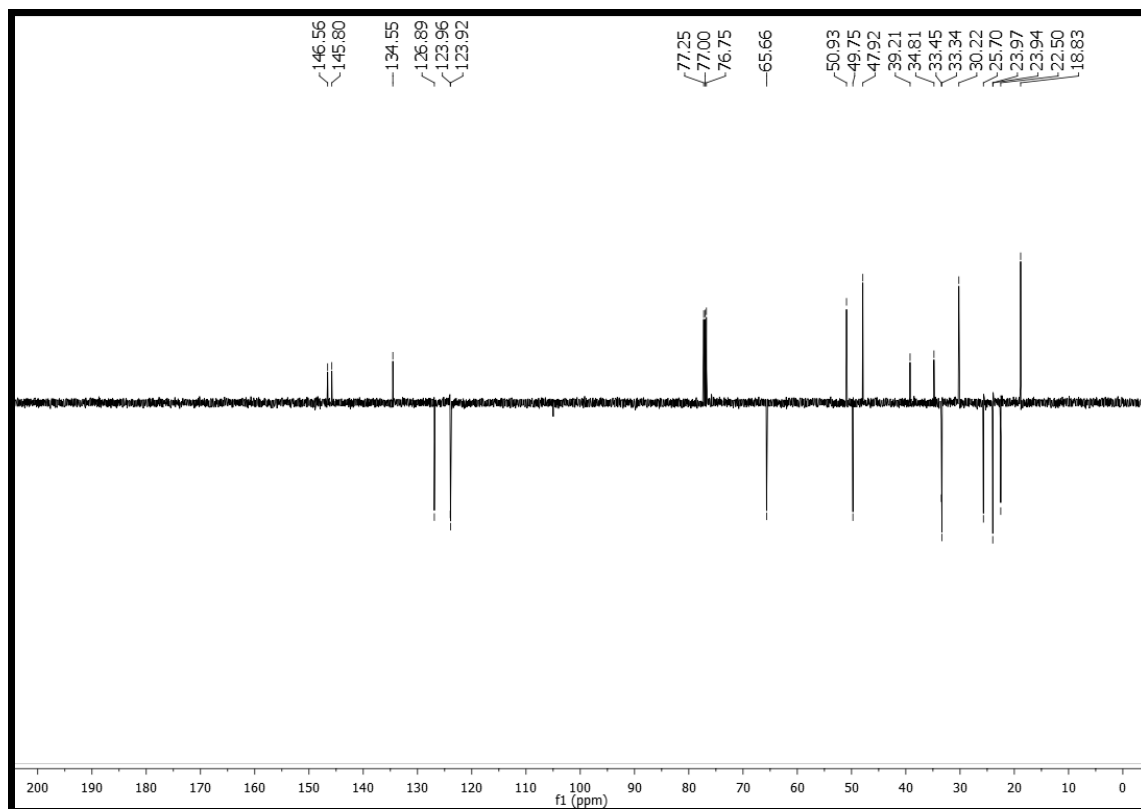
Figura 85 – Espectro de massas de alta resolução de Hu-1 por IES⁺.**Figura 86** – Espectro de RMN ¹³C-APT (500 MHz, CDCl₃) de Hu-1.

Figura 87 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 68-16 ppm.

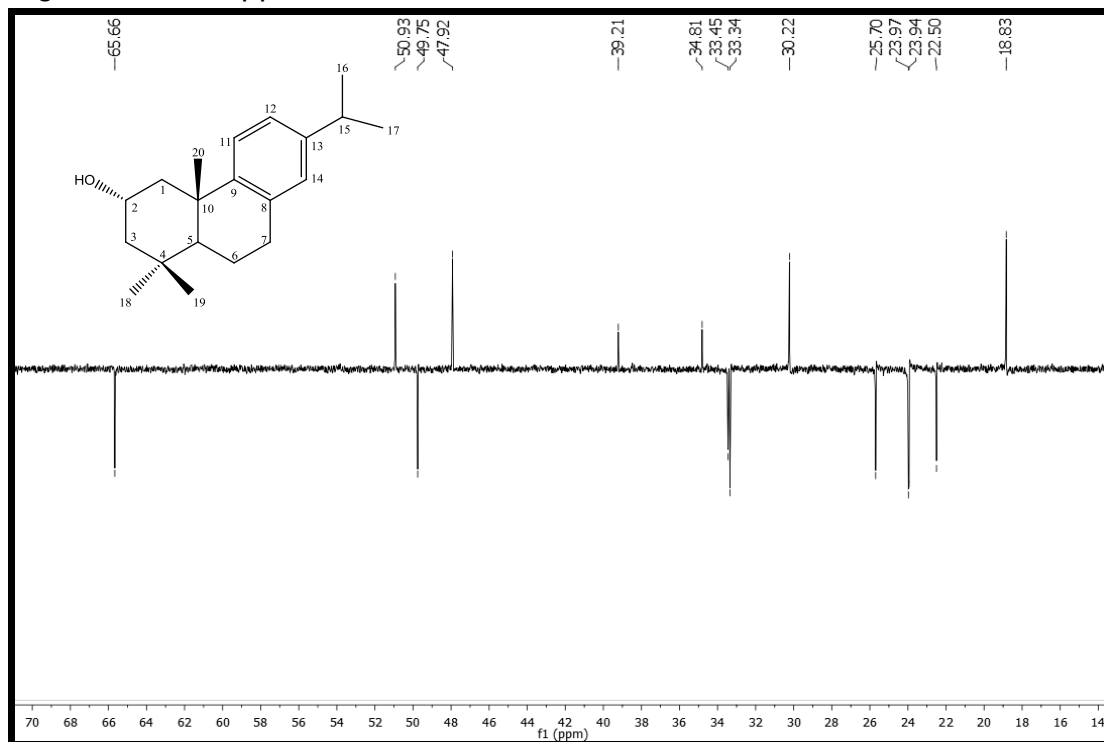


Figura 88 – Expansão espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 150-60 ppm.

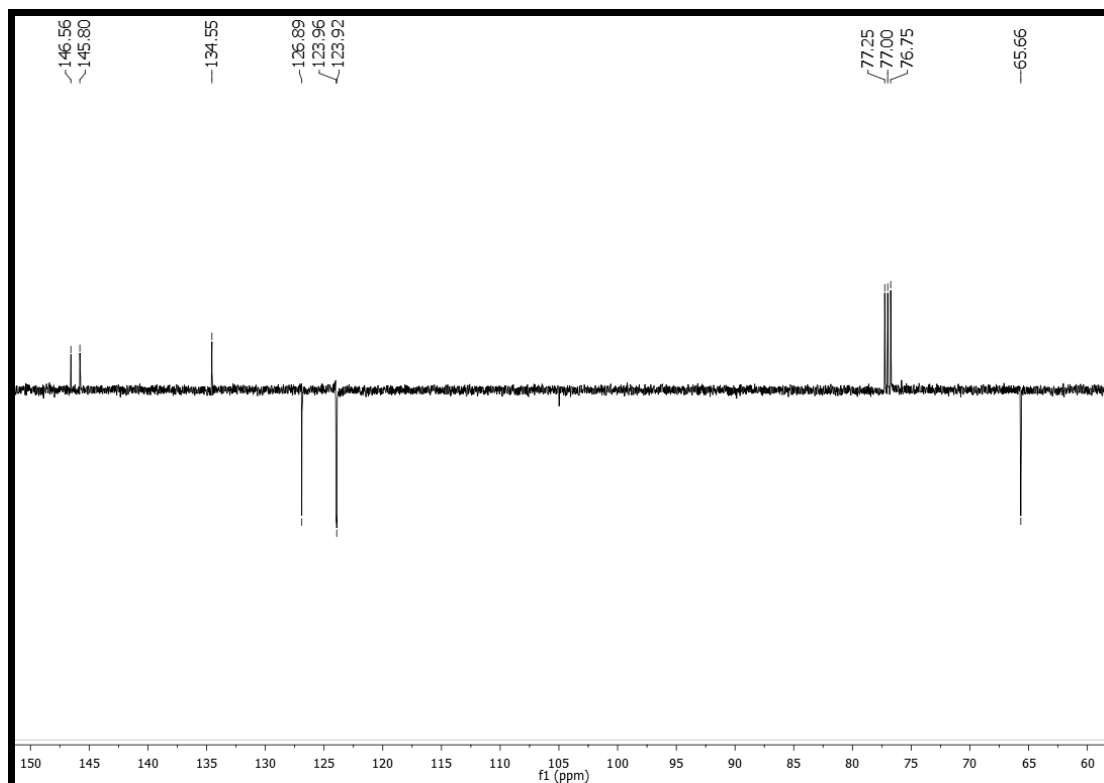


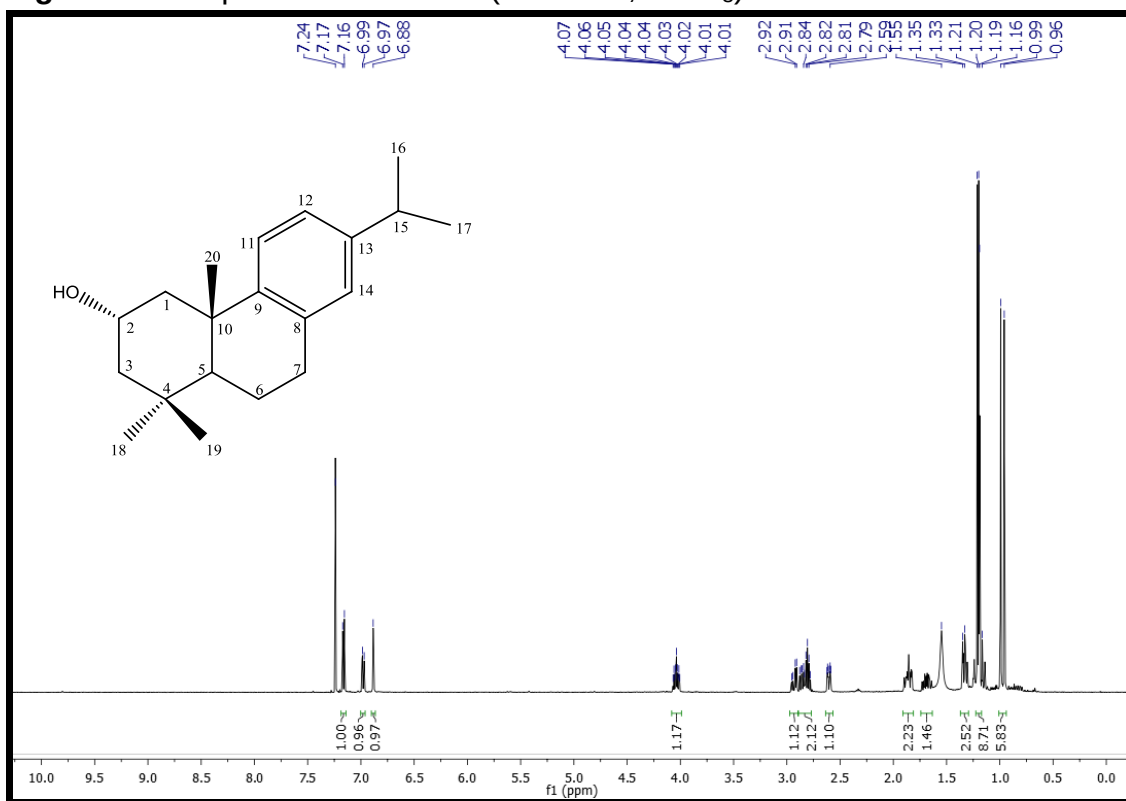
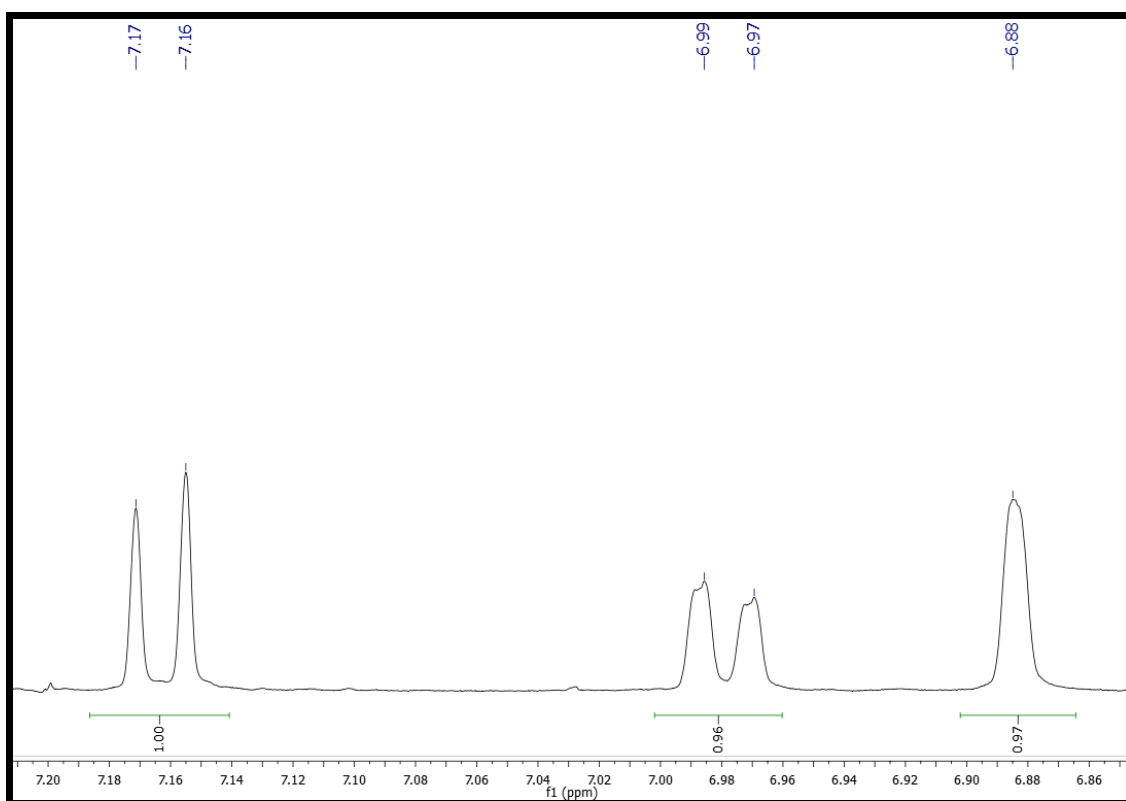
Figura 89 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1.**Figura 90** – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 7,18-6,86 ppm.

Figura 91 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 4,09-3,99 ppm.

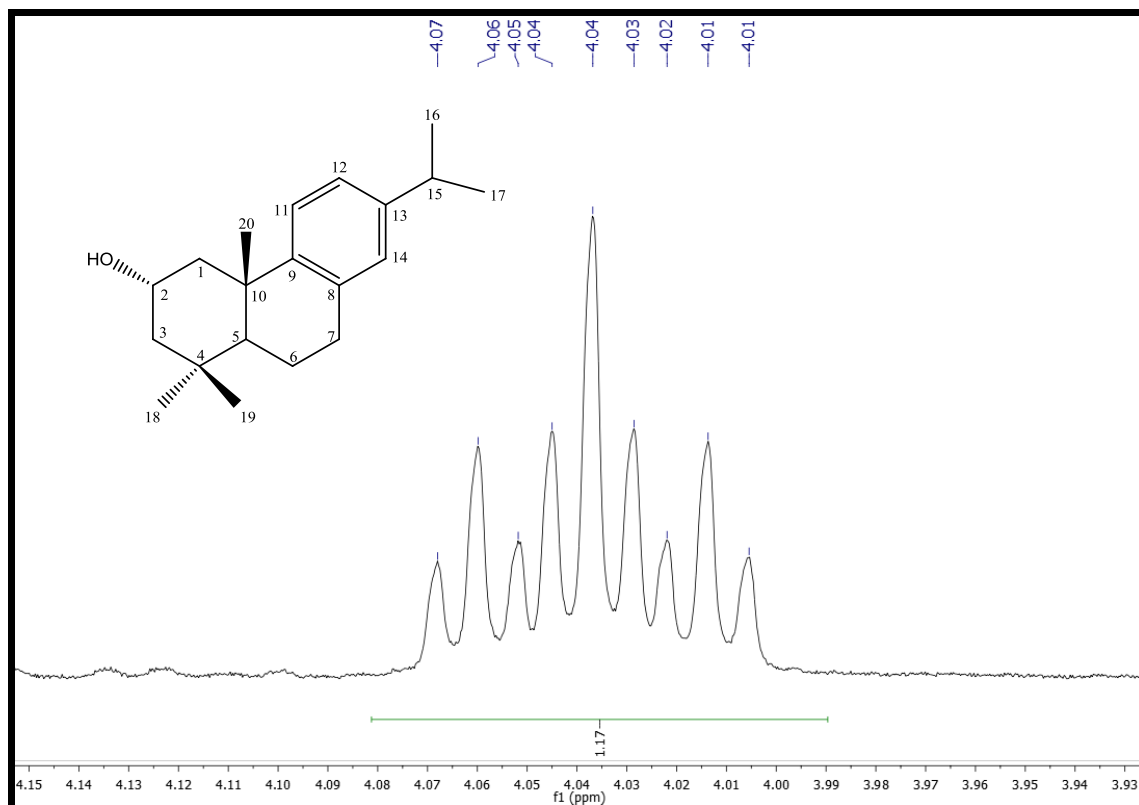


Figura 92 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 3,00-2,56 ppm.

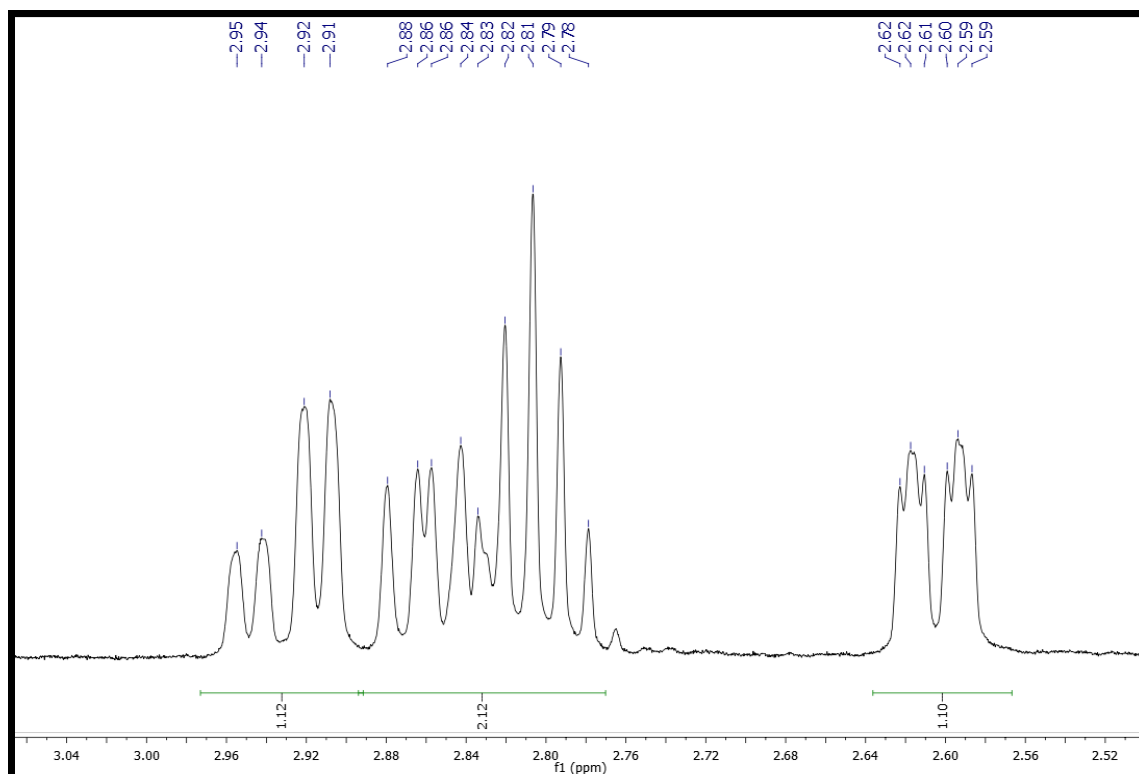


Figura 93 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 1,93-1,63 ppm.

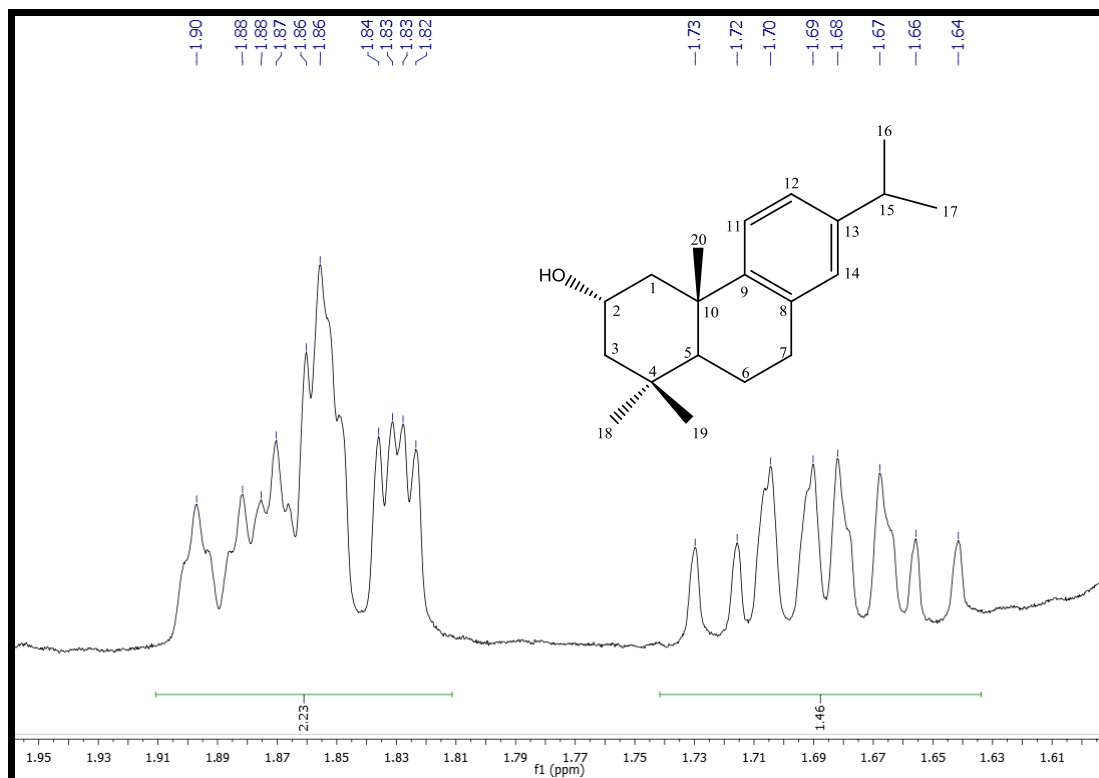


Figura 94 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 1,40-0,95 ppm.

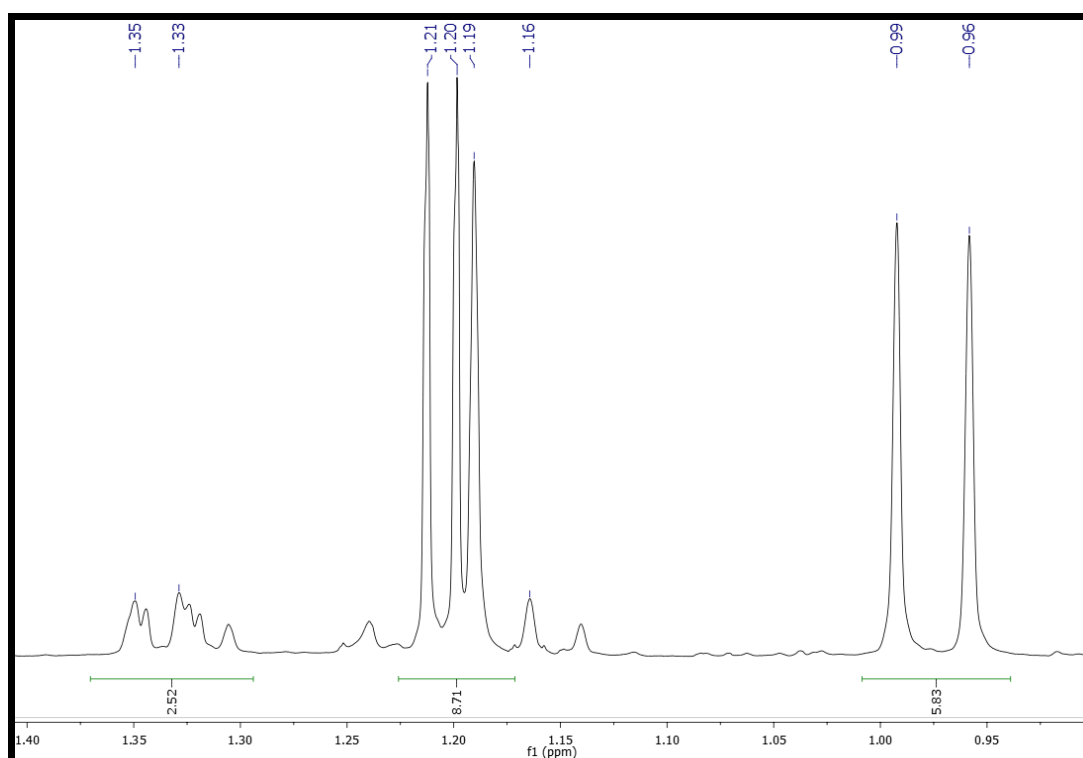


Figura 95 – Espectro de correlação de RMN ^{13}C HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1.

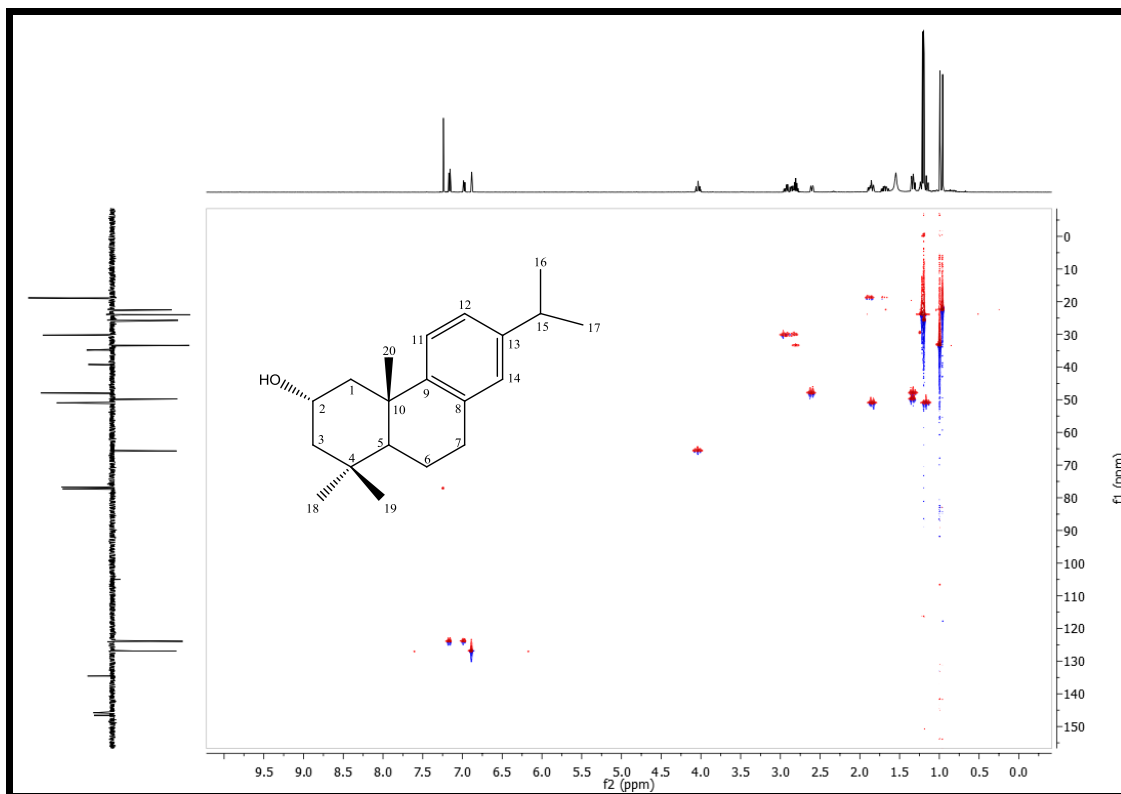


Figura 96 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 15-75 ppm x 0,8-4,2 ppm.

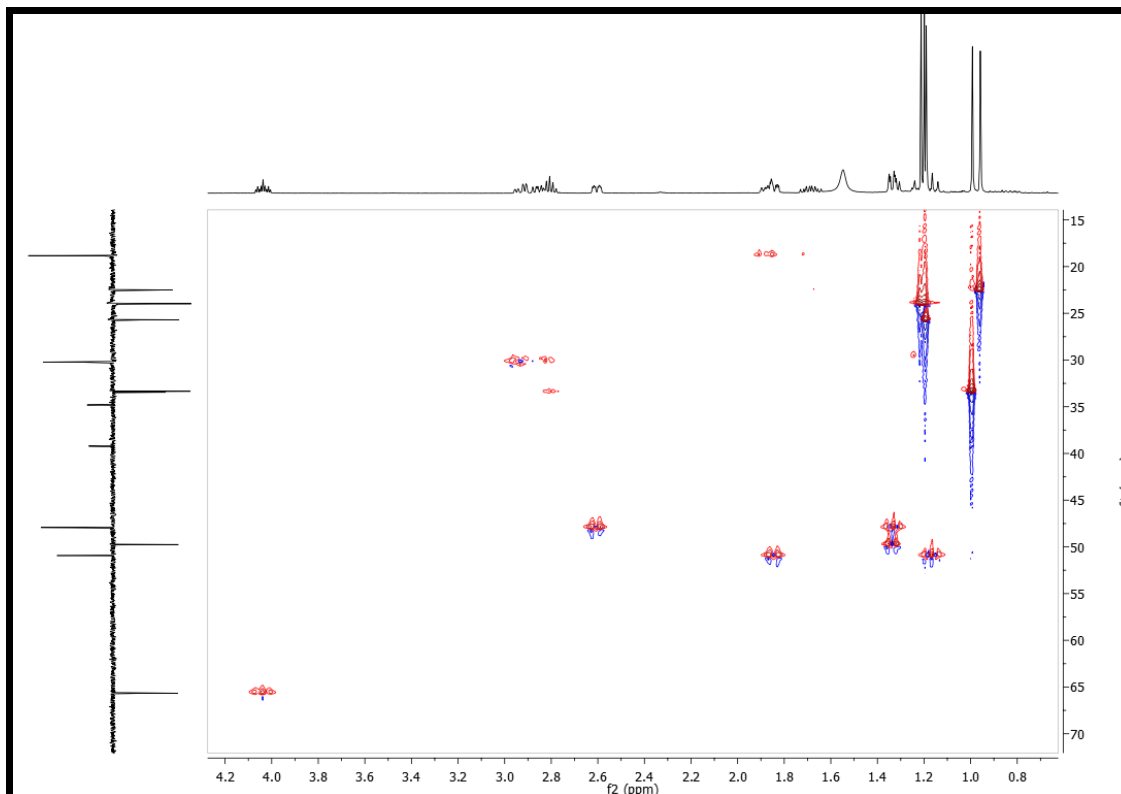


Figura 97– Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 46-53 ppm x 1,1-2,7 ppm.

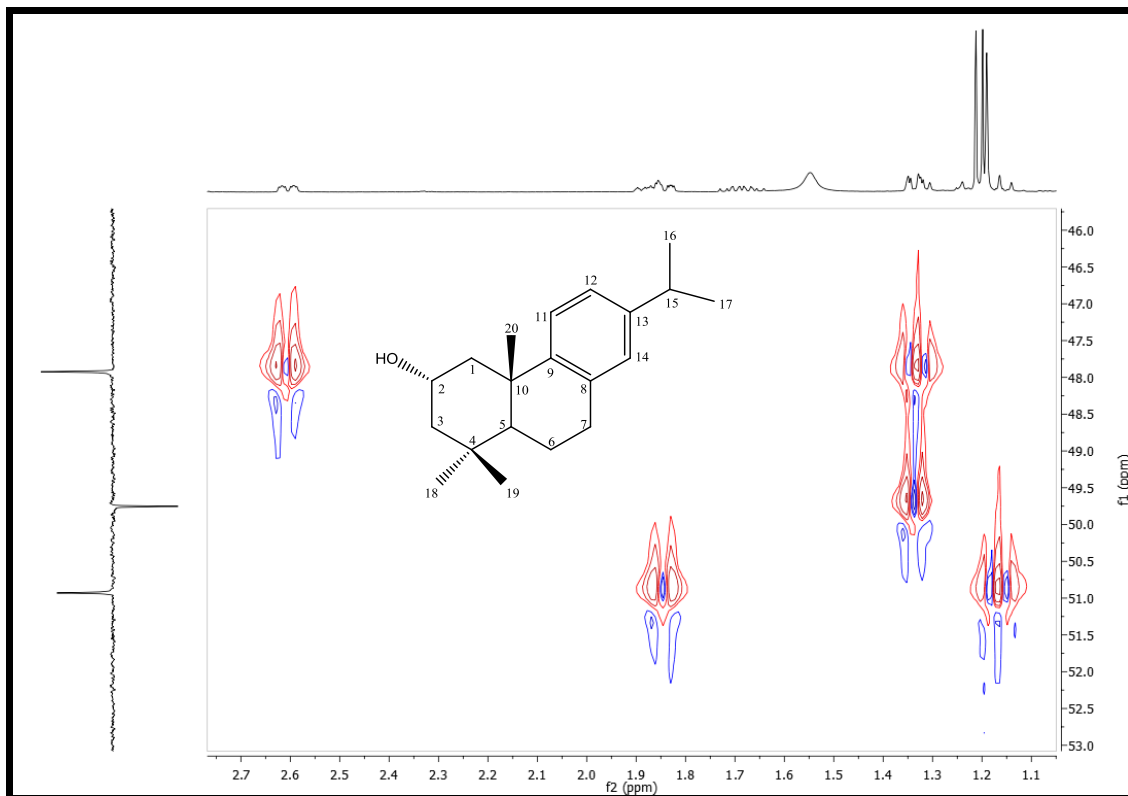


Figura 98 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 122-129 ppm x 7,35-6,80 ppm.

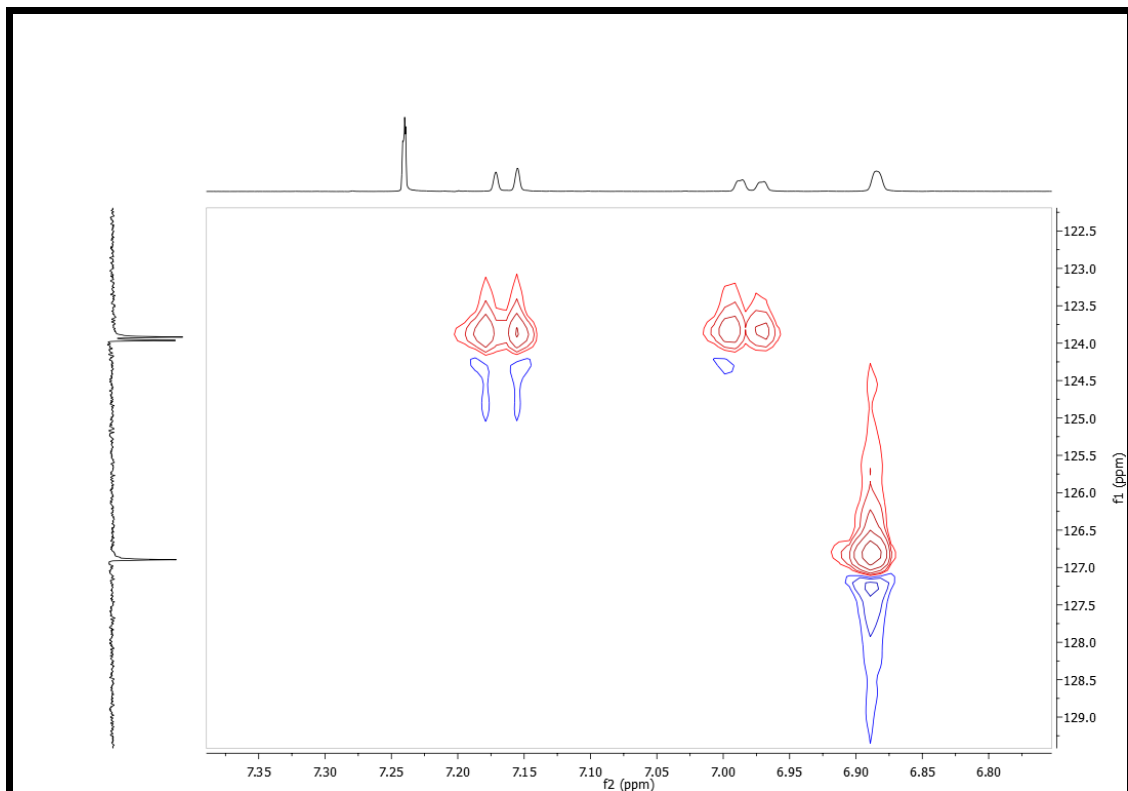


Figura 99 – Espectro de correlação de RMN ^{13}C HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1.

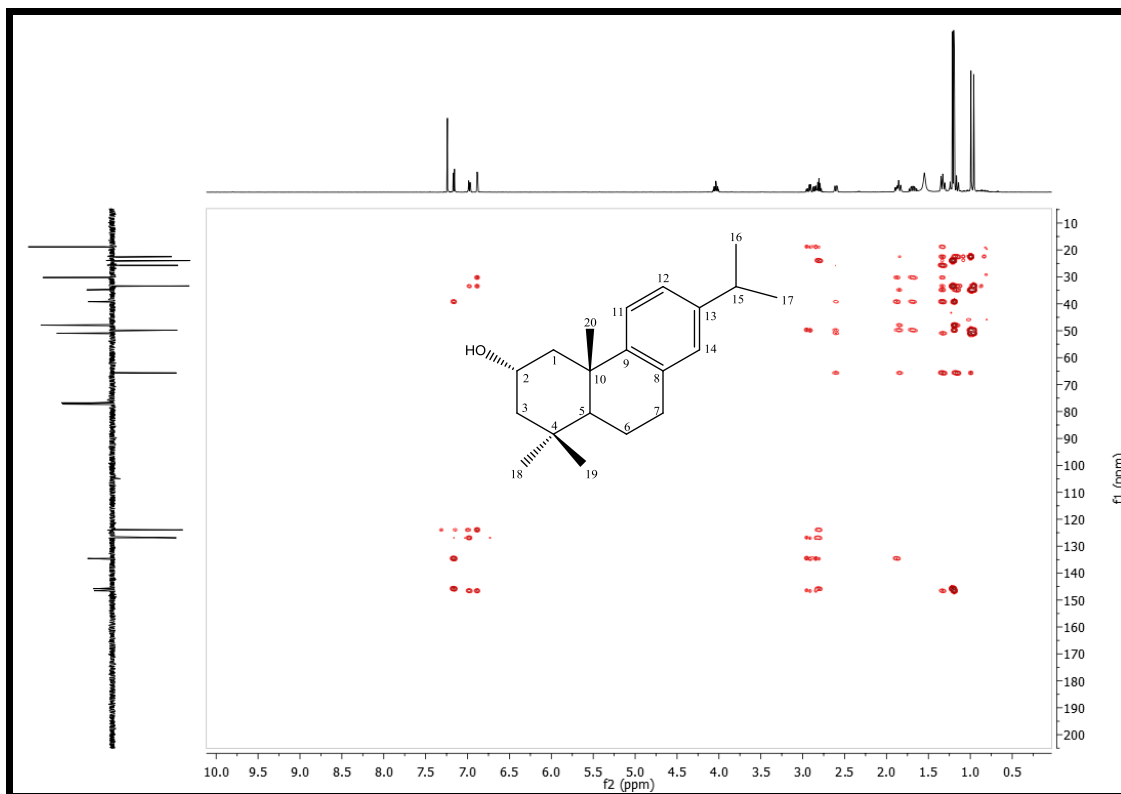


Figura 100 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 115-155 ppm x 1,0-7,5 ppm.

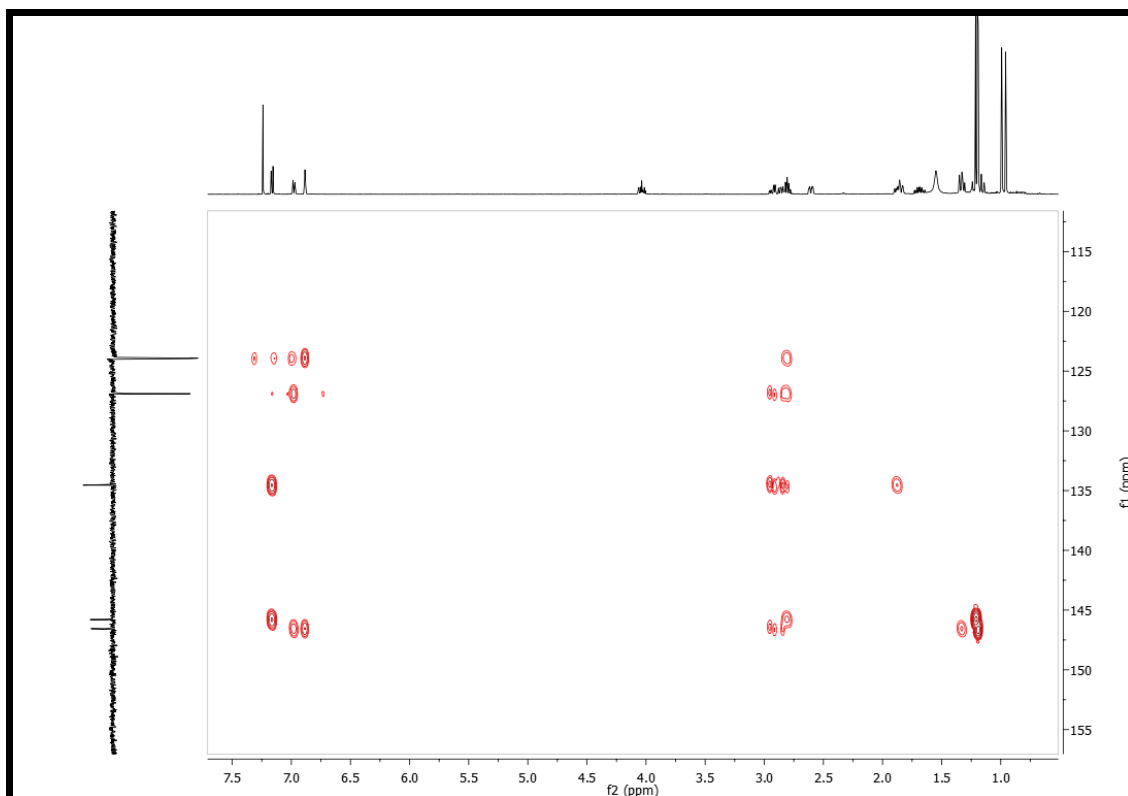


Figura 101 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 20-150 ppm x 6,85-7,35 ppm.

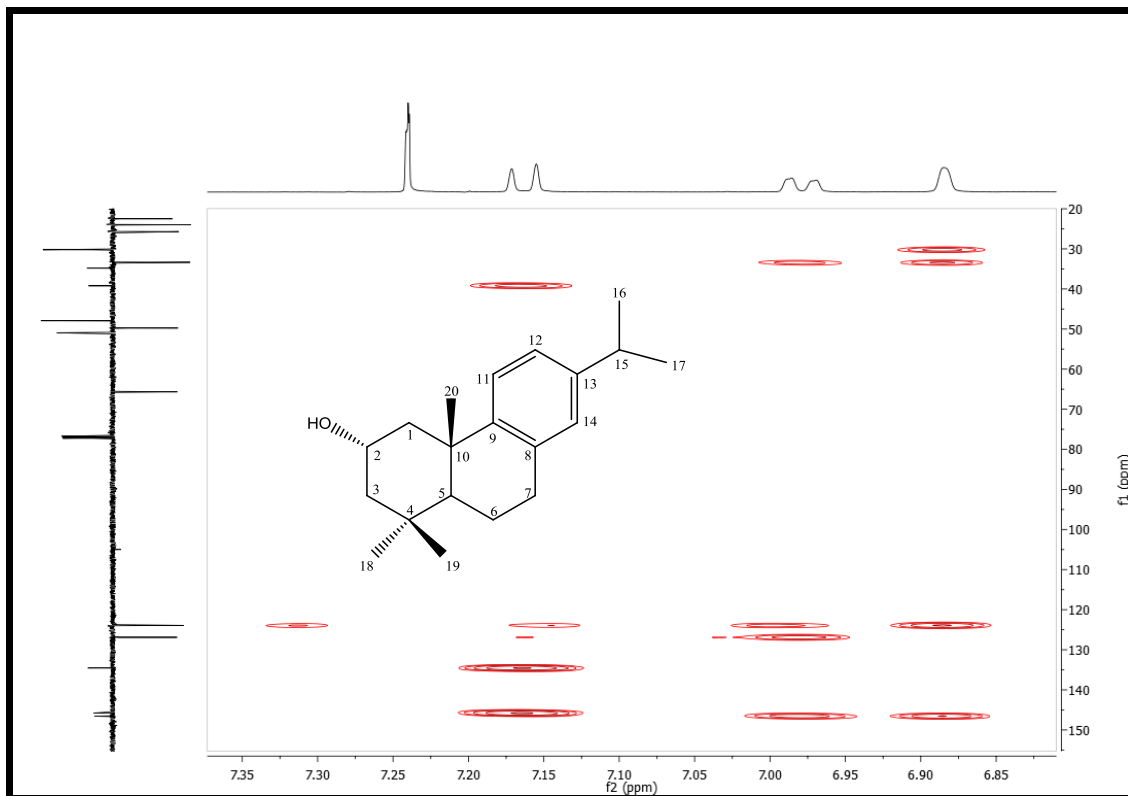


Figura 102 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 115-155 ppm x 1,0-7,5 ppm.

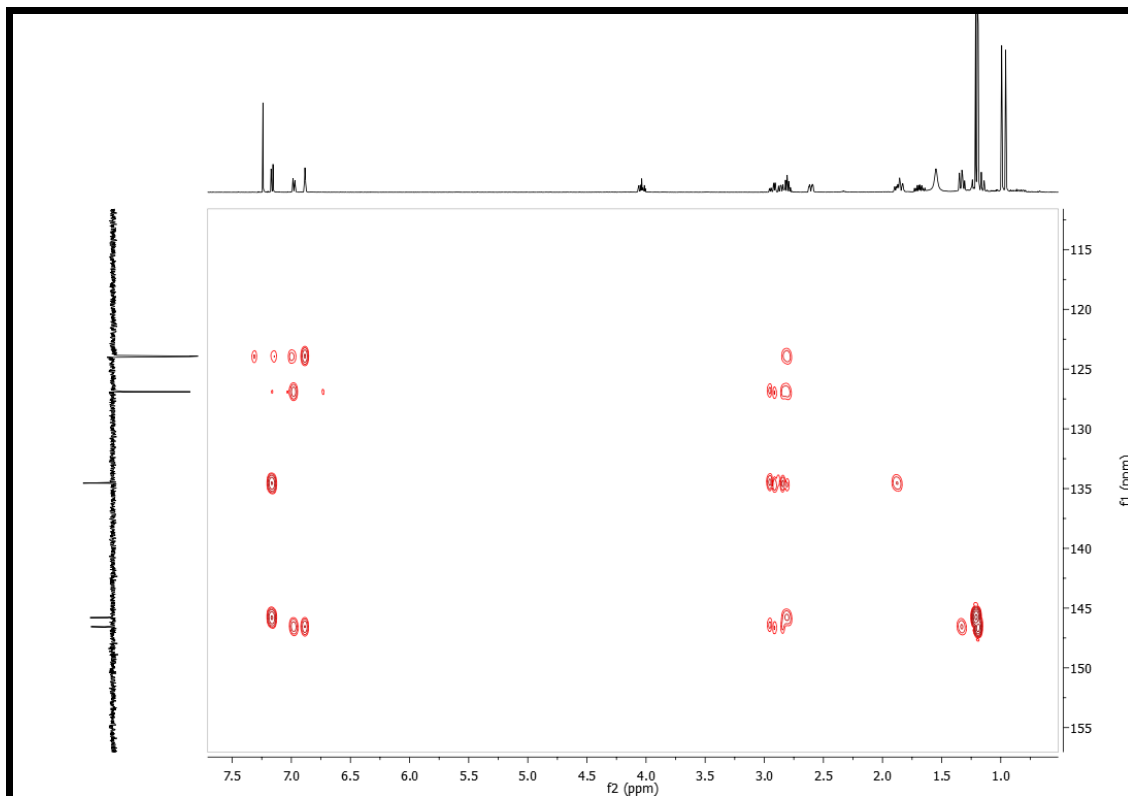


Figura 103 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 20-65 ppm x 0,92-1,40 ppm.

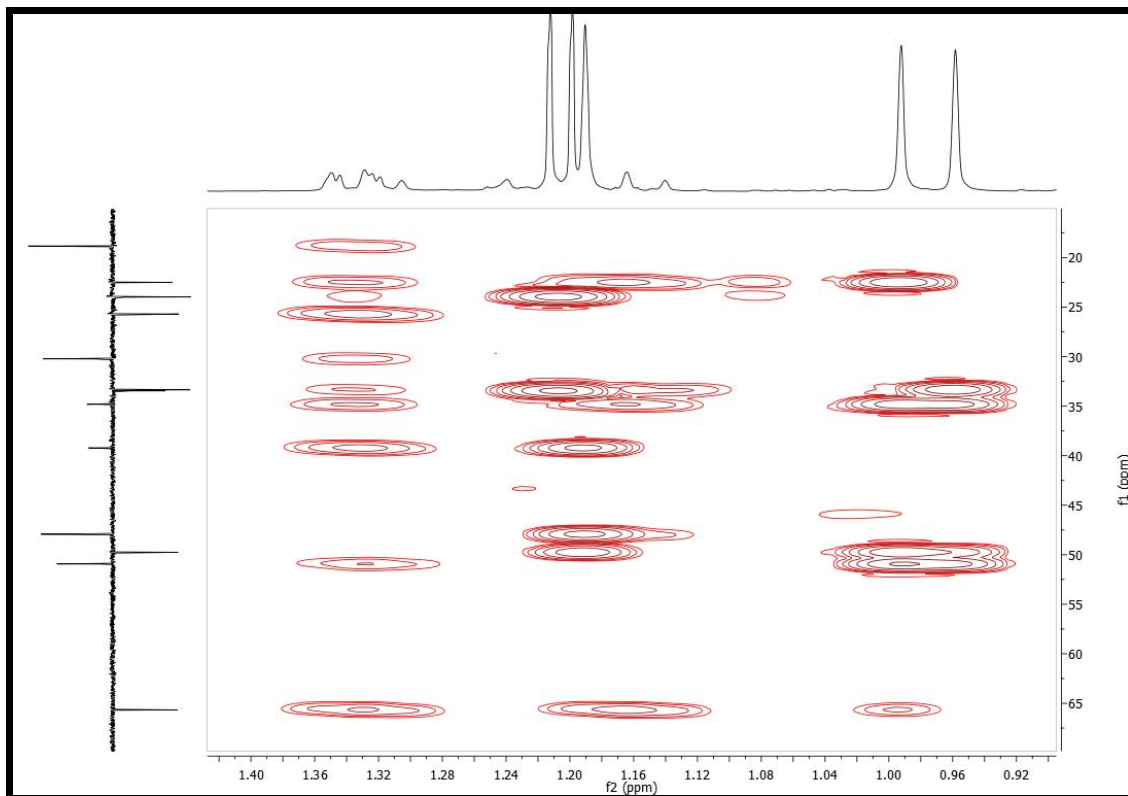


Figura 104 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 15-65 ppm x 1,5-3,1 ppm.

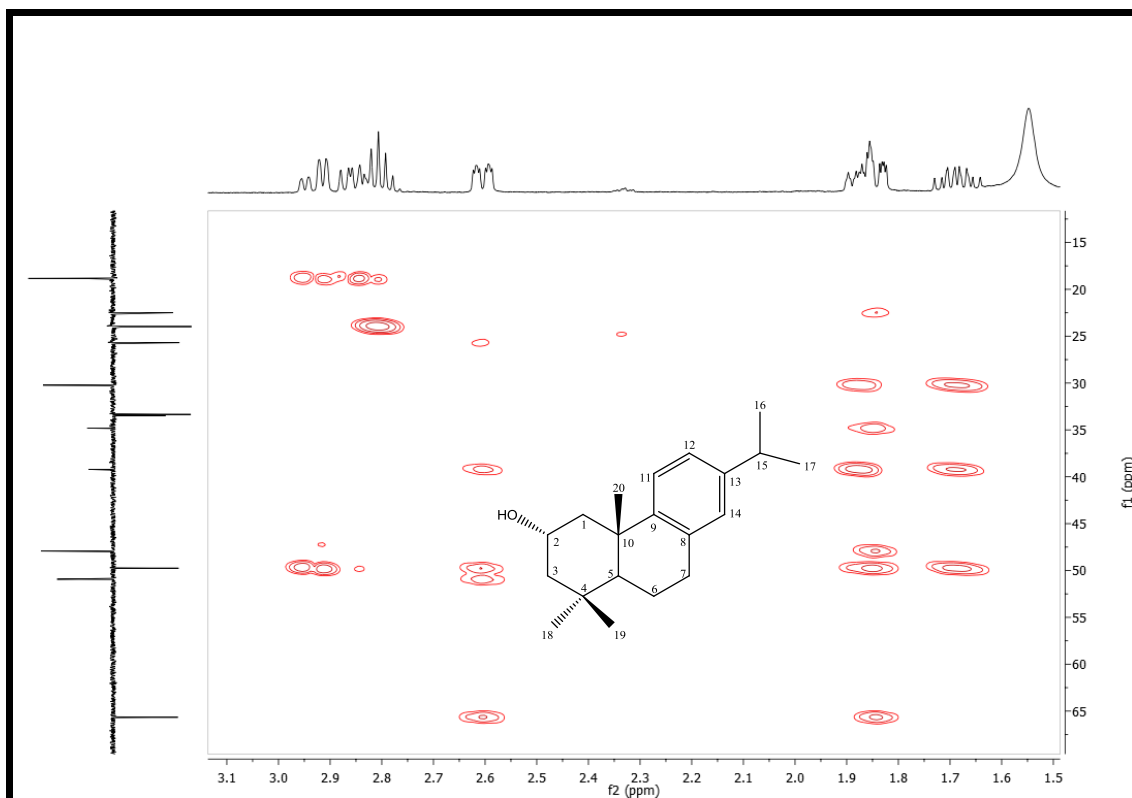


Figura 105 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 144-148 ppm x 1,14-141 ppm.

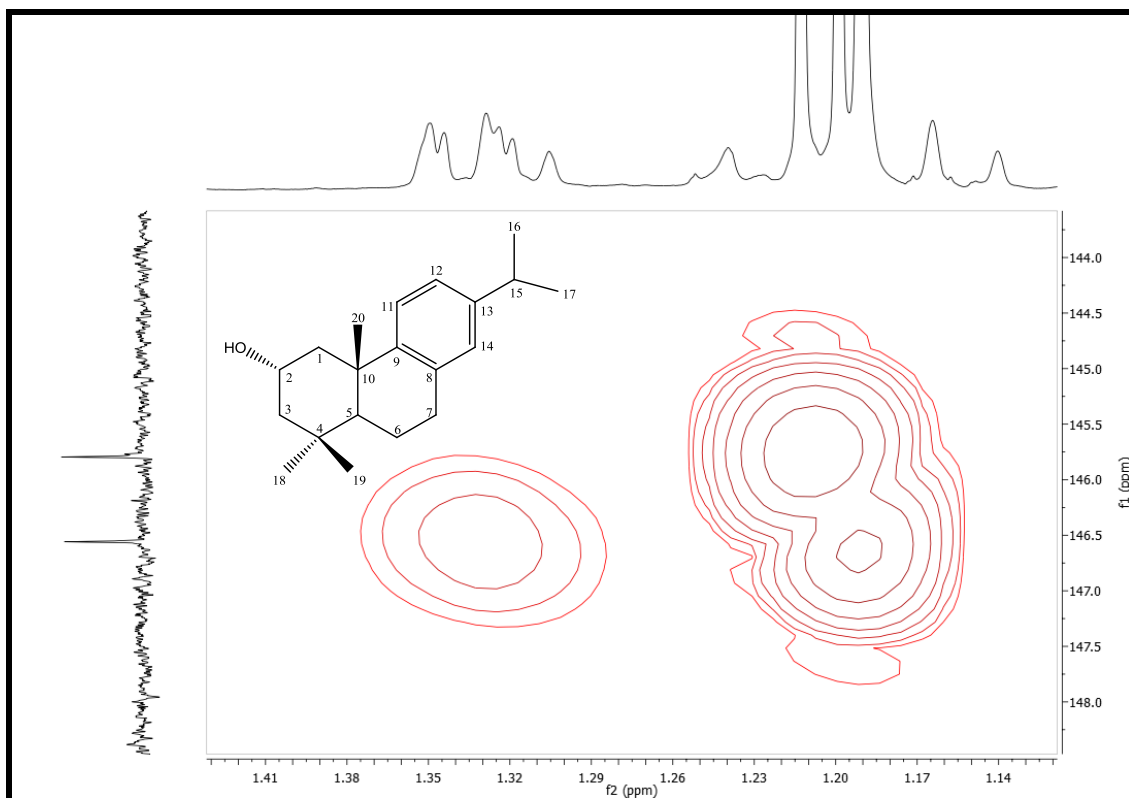


Figura 106 – Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1.

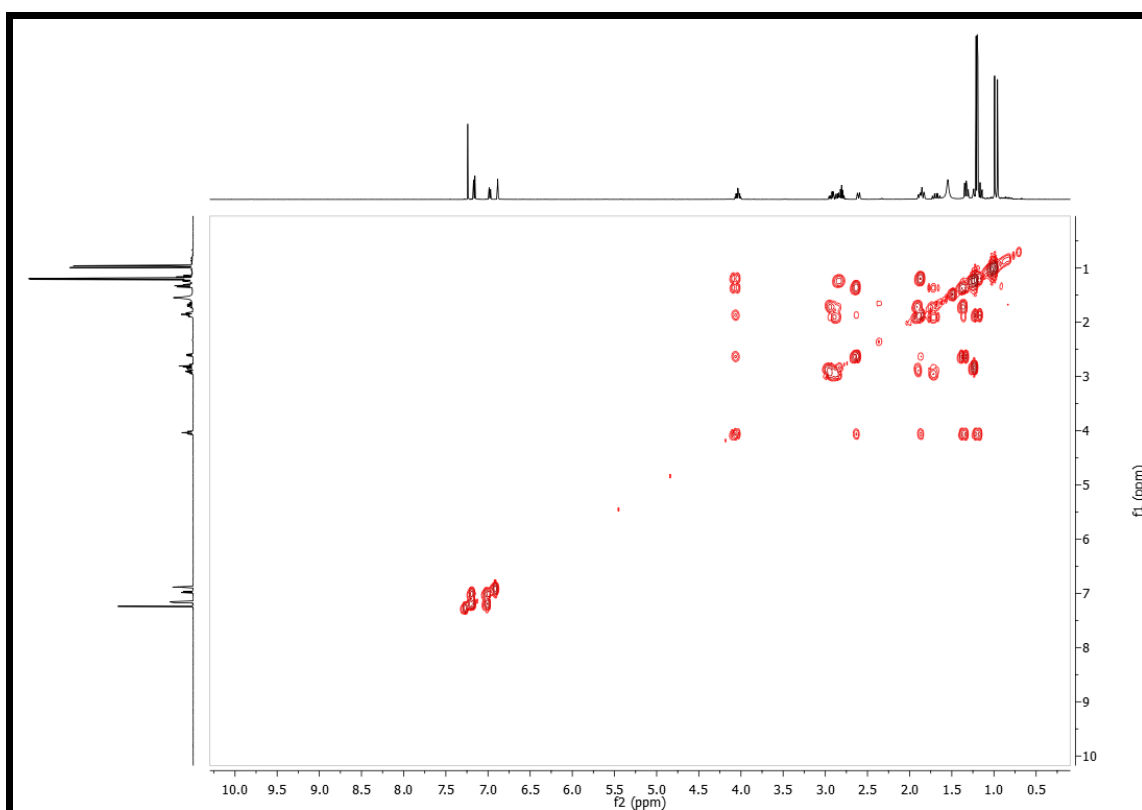


Figura 107 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 0,5-4,5 x 0,6-4,4 ppm.

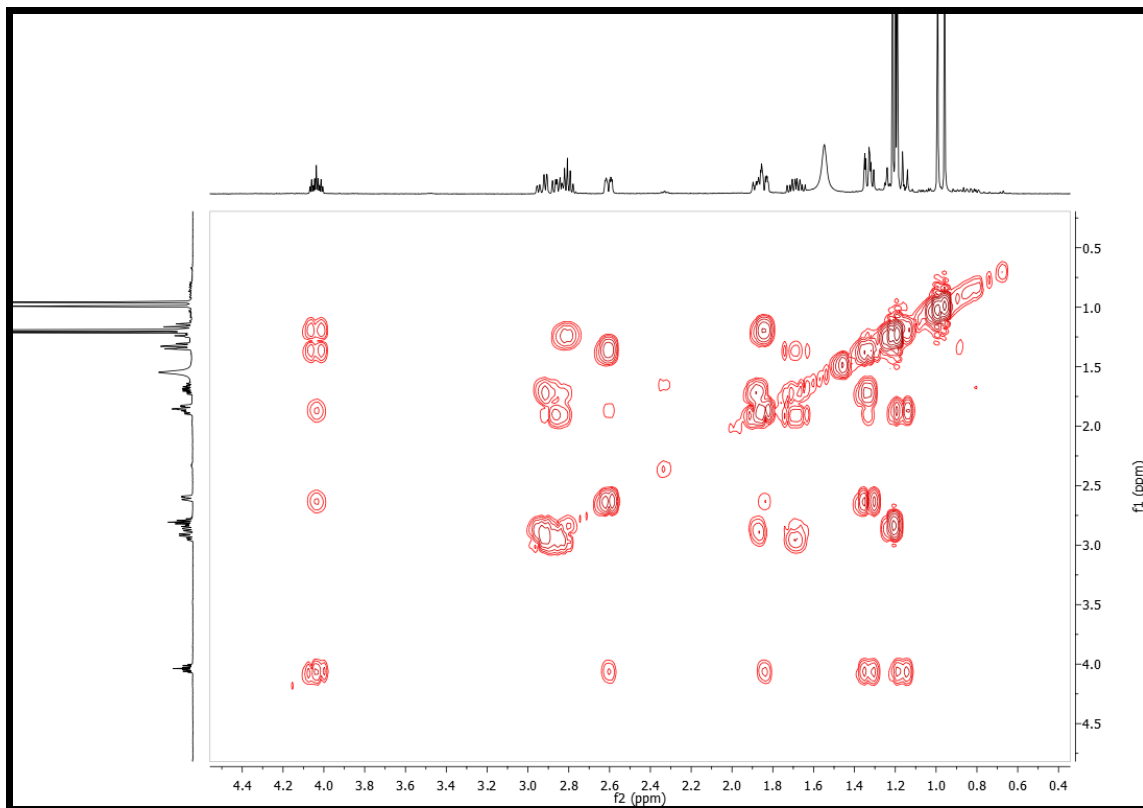


Figura 108 – Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1.

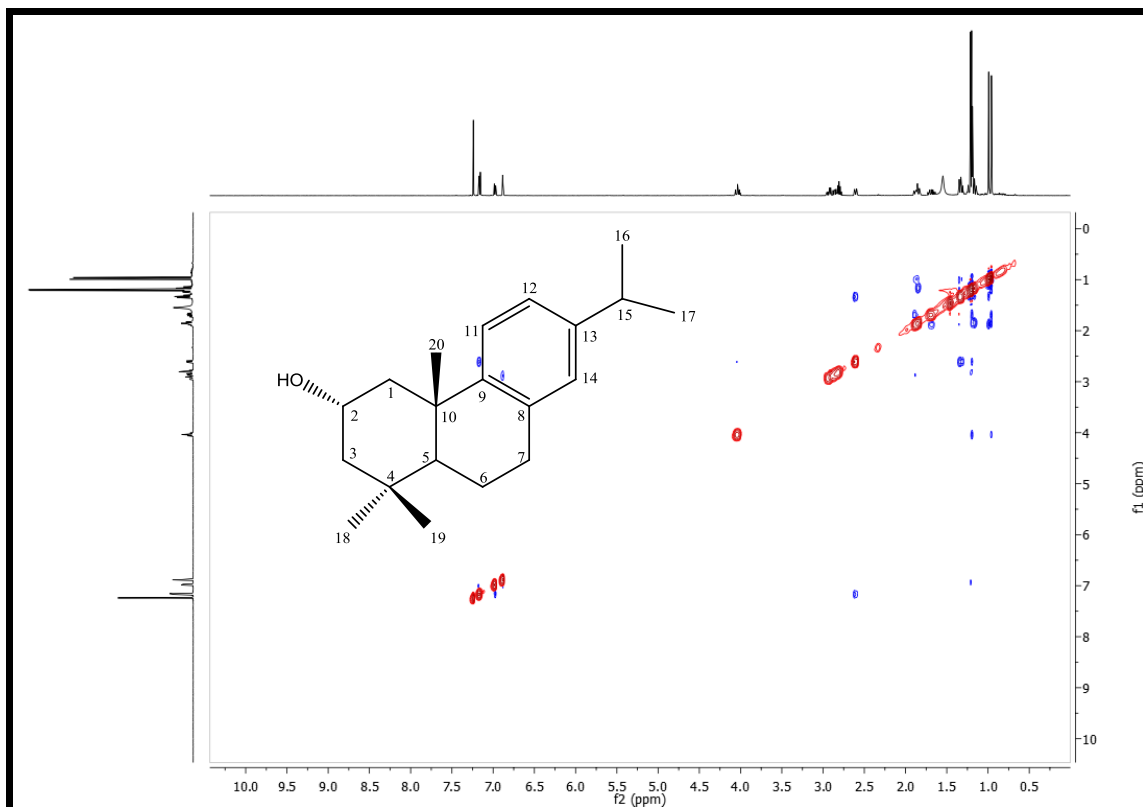
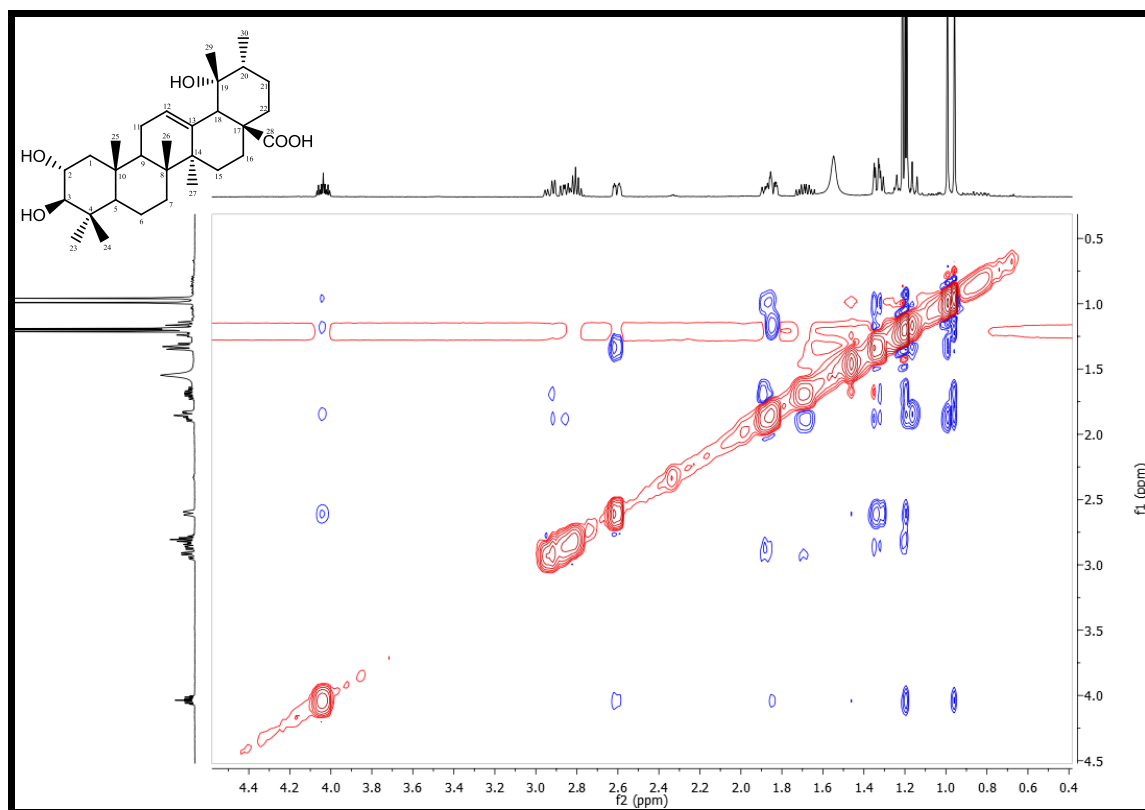


Figura 109 – Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (500 MHz, CDCl_3) de Hu-1 na região de 0,5-4,5 ppm x 0,4-4,4 ppm.



5.9 Identificação estrutural de Hu-2

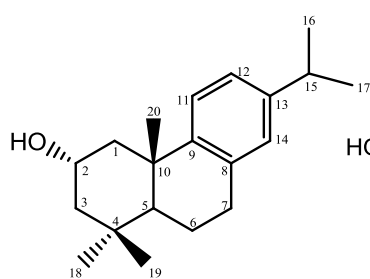
O composto codificado como Hu-2 foi isolado na forma de um óleo esverdeado com rendimento de 0,0005%. No espectro de RMN de ^{13}C -APT (Figuras 110-112, p. 140-141) observou-se a presença de 20 sinais, correspondentes a vinte átomos de carbonos. Destes, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, sendo os sinais em δ_{C} 151,2; 147,2; 132,0 e 126,7 atribuídos a carbonos sp^2 . Cinco sinais referentes a carbonos metínicos sendo três carbonos sp^3 e dois carbonos sp^2 , quatro carbonos metilênicos e cinco carbonos metílicos. Os dados observados para Hu-2 são semelhantes a Hu-1, no entanto algumas diferenças são observadas. Foi observado um sinal de carbono a mais em deslocamento químico δ_{C} 151,2 correspondente a um carbono sp^2 oxigenado. Observou-se ainda a presença de apenas dois carbonos metínicos sp^2 diferenciando de Hu-1, que apresentava três. Além disso, o deslocamento químico em δ_{C} 110,5 está sofrendo proteção de 13 ppm. Essa informação juntamente com a presença de apenas dois carbonos metínicos sp^2 infere uma oxigenação em C-12 e um efeito de proteção justifica o deslocamento químico em δ_{C} 110,5 atribuído ao C-11. Essa proposta ainda é corroborada pelo deslocamento químico em δ_{C} 26,7 que foi atribuído a C-15, sofrendo proteção γ do grupo OH em C-12. Os demais sinais são semelhantes a Hu-1.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 113-116, p. 141-143) foi possível observar dois singletos na região de prótons aromáticos em δ_{H} 6,81 e 6,64 que foram atribuídos a H-14 e H-11, respectivamente. Observou-se ainda um tripleto de tripleto em δ_{H} 4,05 que foi atribuído a H-2. Além dos sinais em δ_{H} 0,93 (s), 0,97 (s), 1,17 (s), 1,96 (d, $J = 7,0$ Hz) 1,21 (d, $J = 7,0$ Hz) que foram atribuídos a CH_3 -18, CH_3 -19, CH_3 -20, CH_3 -17 e CH_3 -16 respectivamente.

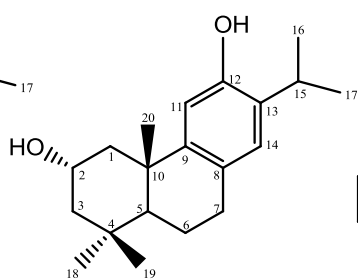
Após análise desses dados e comparação com dados da literatura (Tabela 11, p. 139) foi possível identificar Hu-2 como sendo o salviol. Esse composto já foi relatado em outras espécies de Lamiaceae. Porém está sendo relatado pela primeira vez em *Hyptis umbrosa*. Além disso, essa é a primeira vez que seus dados de RMN ^{13}C -APT são apresentados.

Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C -APT de Hu-2 (salviol) com os dados da literatura.

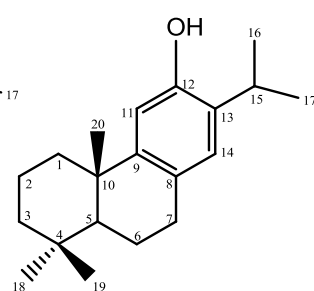
Nº	Hu-1 δ_c	Hu-2 CDCl_3	Mod.1 (CHANG; CHENG; WANG, 2001) CDCl_3
1	47,9	47,8	38,6
2	65,6	65,0	19,1
3	50,9	50,7	41,5
4	34,8	34,8	33,2
5	49,7	49,6	50,2
6	18,8	18,9	19,1
7	30,2	29,5	29,6
8	134,5	126,2	126,2
9	146,5	147,2	148,1
10	39,2	37,2	37,2
11	123,9	110,9	110,8
12	123,9	151,2	150,9
13	145,8	132,8	131,6
14	126,2	126,0	126,4
15	33,4	26,7	26,4
16	23,9	22,5	22,5
17	23,9	22,7	22,6
18	22,5	22,4	21,4
19	33,3	33,3	33,7
20	25,6	25,6	24,6



Hu-1 (Pomiferin D)



Hu-2 (Salviol)



Mod.1

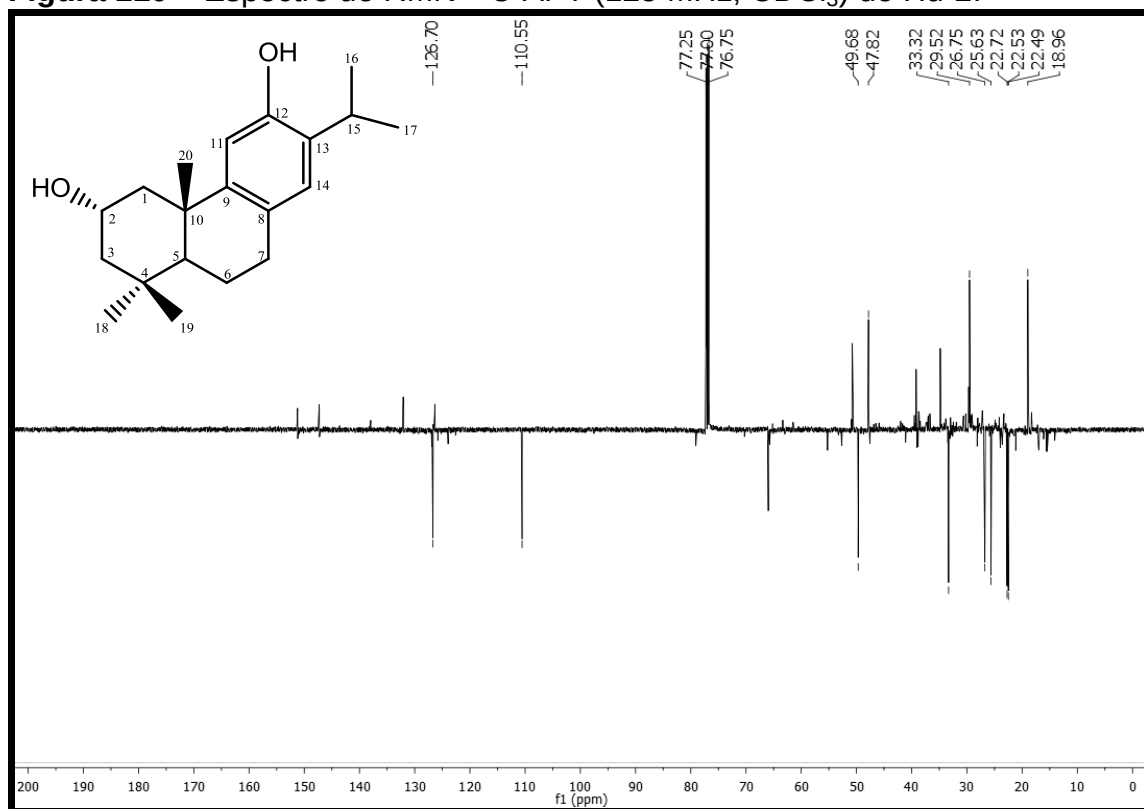
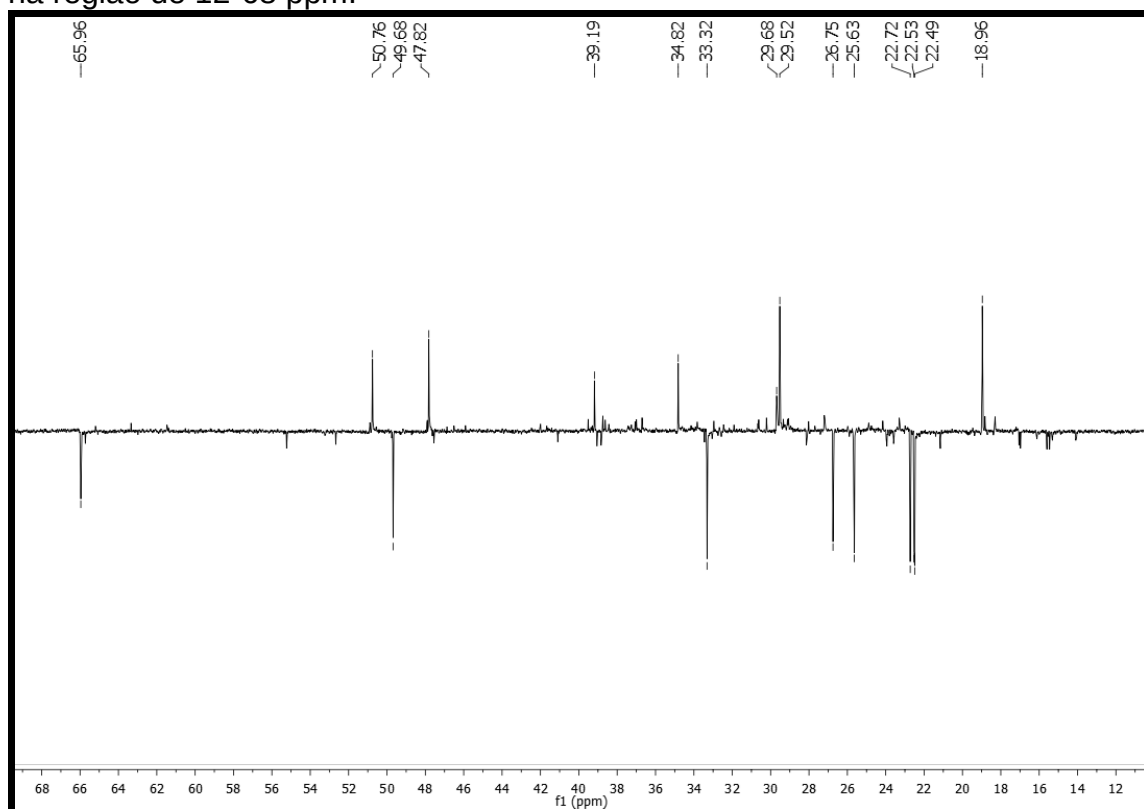
Figura 110 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2.**Figura 111** – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 12-68 ppm.

Figura 112 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 104-154 ppm.

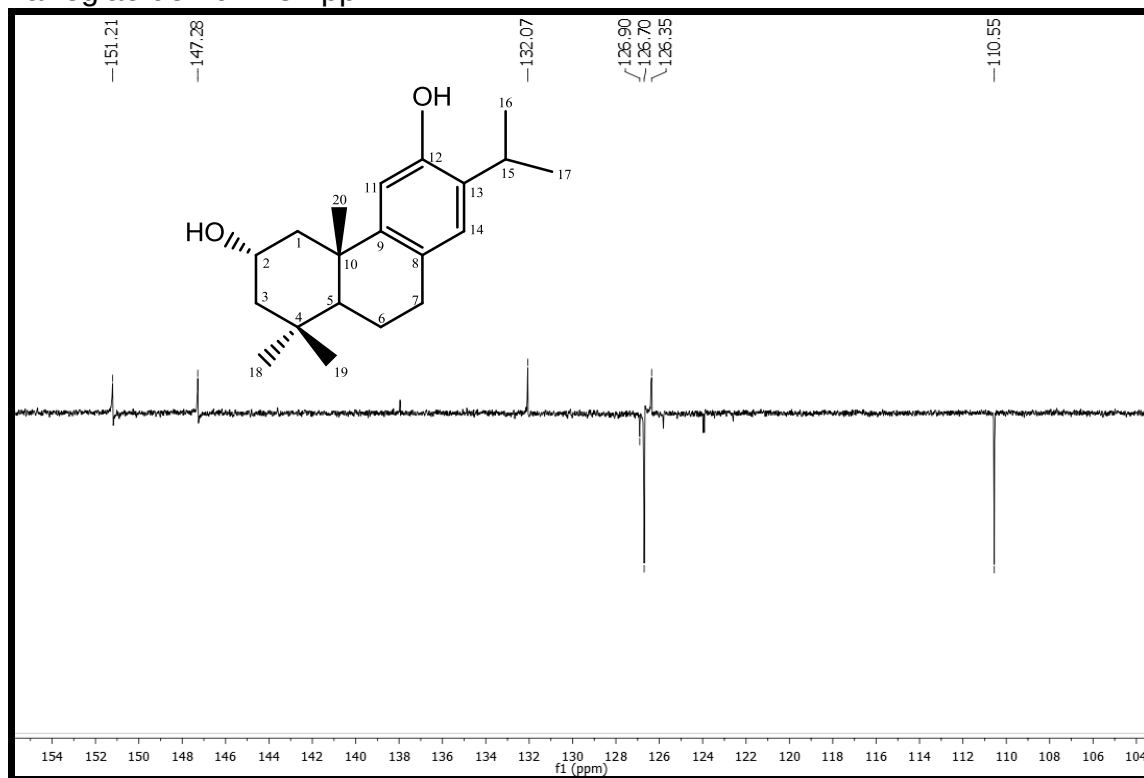


Figura 113 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2.

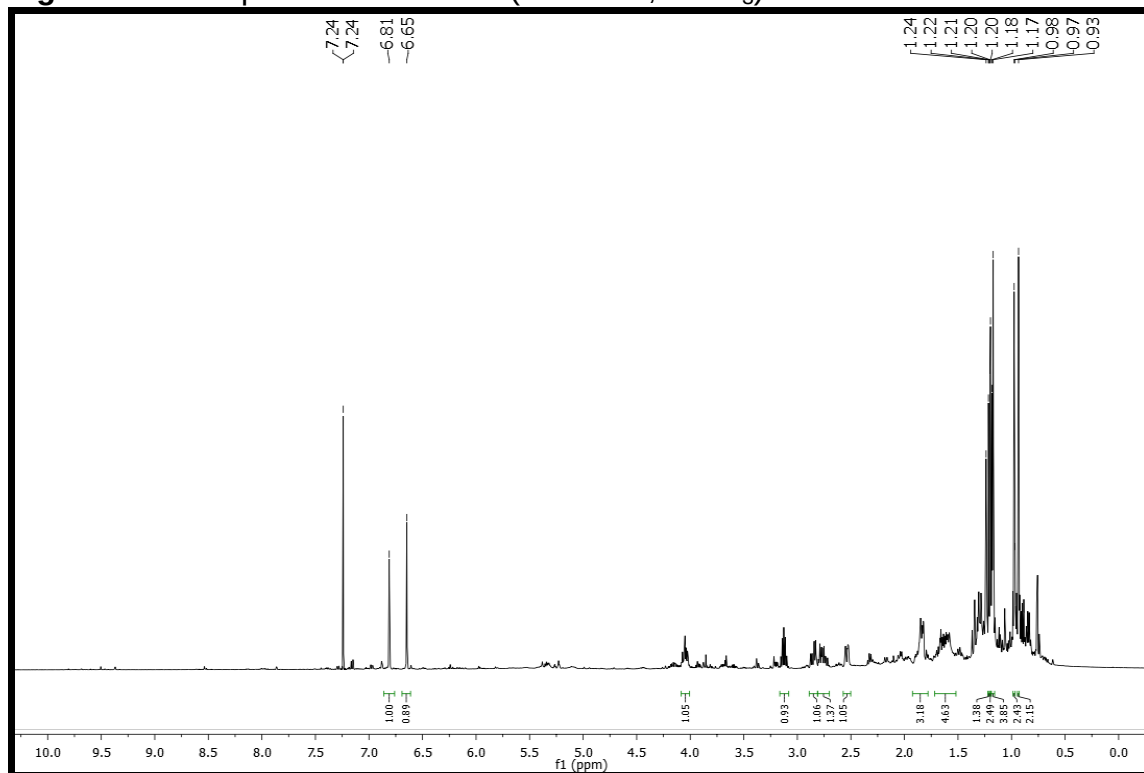


Figura 114 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 2,52-3,16 ppm.

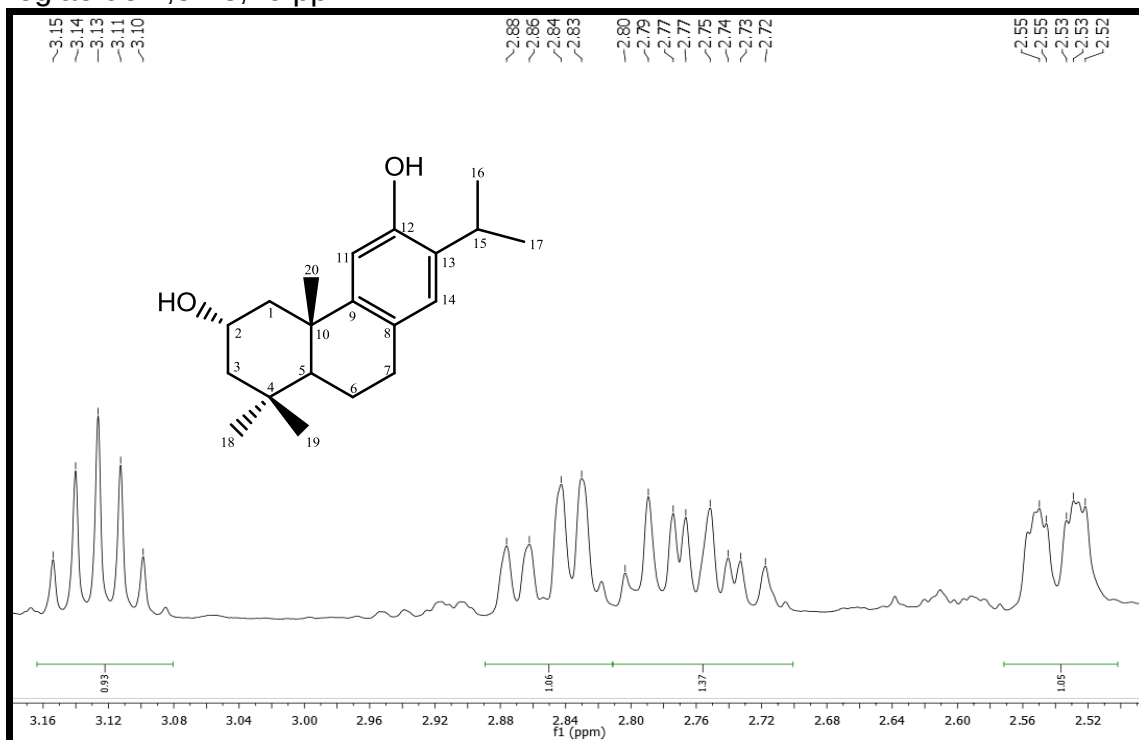


Figura 115 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 0,91-1,25 ppm.

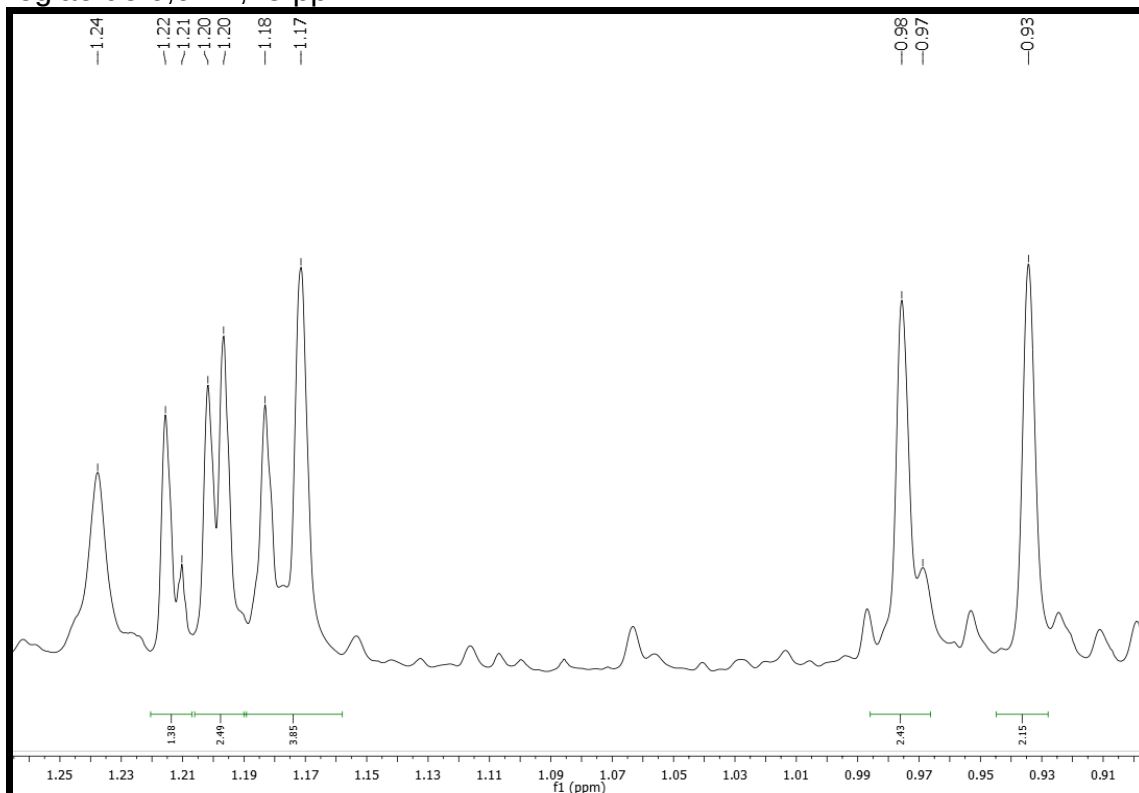
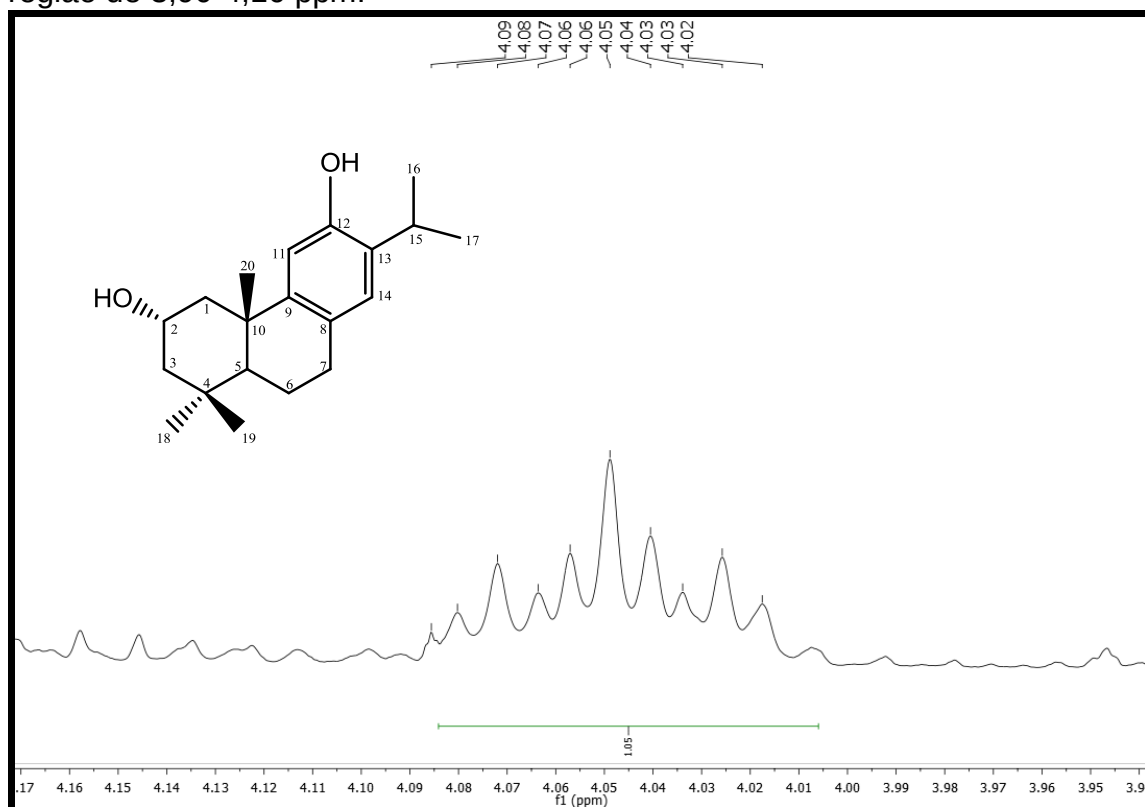


Figura 116 – Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hu-2 na região de 3,90-4,16 ppm.



5.10 Identificação dos constituintes voláteis de *Hyptis macrostachys* Benth.

O óleo essencial das folhas de *H. macrostachys* foi obtido por hidrodestilação com rendimento de 0,12% em relação ao peso do material fresco utilizado. Pela análise em CG-EM foi possível identificar 56 componentes (Figura 117, p. 144) correspondendo a 98,37% do total do óleo em uma mistura complexa. Sendo que o 1,8-cineol (36,3%), β -pineno (13,51%), fenchona (8,48%), β -cariofileno (6,77%), α -pineno (4,48%) e germacreno D (3,39%) foram os constituintes majoritários (Tabela 12, p. 145).

Essa composição química é compatível com dados da literatura para constituintes voláteis de espécies de *Hyptis* (MARTINS et al., 2006), bem como, de outras espécies de Lamiaceae.

Figura 117 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de *Hyptis macrostachys*.

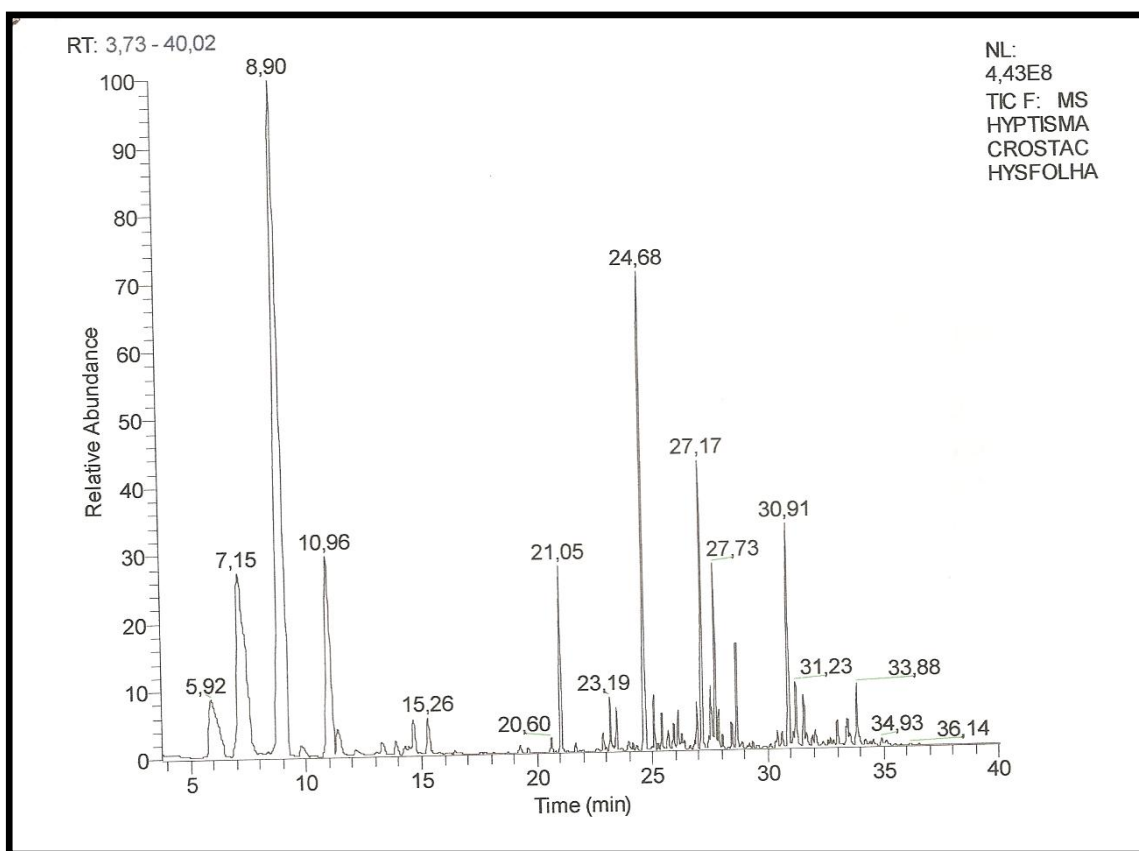


Tabela 12 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Hyptis macrostachys*.

Composto	Área (%)	IR
2Z-hexanol	0,07	864
α -pineno	4,48	933
β -pineno	13,51	997
α -terpineno	0,05	1015
1,8-cineol	36,3	10,31
γ -terpineno	0,48	1056
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	0,05	1069
Fenchona	8,48	1088
Linalol	1,08	1099
Exo-fenchol	0,28	1118
Canfora	0,44	1146
Pinocarvona	0,38	1160
Borneal	0,22	1170
4-terpineol	1,15	1178
α -terpineol	0,87	1193
Timol	0,16	1287
Carvacrol	0,07	1295
δ -elemeno	2,53	1329
α -cubebeno	0,12	1344
α -ilangeno	0,06	1366
α -copaeno	0,28	1372
β -bourboneno	0,73	1380
β -elemeno	0,61	1386
<i>E</i> - β -damascona	0,2	1399
β -cariofileno	6,77	1416
β -copaeno	0,66	1426
Aromadrendano	0,47	1434
<i>Cis</i> -muurola-3,5-dieno	0,28	1440
<i>Trans</i> -muurola-3,5-dieno	0,36	1447
α -humuleno	0,5	1451
9-epi- <i>E</i> -cariofileno	0,24	1455
Dauca-5,8-dieno	0,11	1458
γ -muuroleno	0,67	1471
Germacreno D	3,39	1477
<i>Cis</i> - β -guaiano	0,12	1484
Viridifloreno	0,72	1487
Biciclogermacreno	2,05	1491
α -muuroleno	0,39	1494
δ -amorfenos	0,19	1498

Tabela 12 – (Continuação).

γ -cadieno	0,31	1508
δ -cadieno	1,24	1514
<i>E</i> -nerolidol	0,27	1559
Maaliol	0,24	1564
Espatulanol	2,81	1572
Óxido de cariofileno	0,18	1577
Globulol	1,00	1580
Viridiflorol	0,58	1589
Guaiol	0,23	1591
Rosifoliol	0,26	1603
Junenol	0,07	1616
5-epi- α -eudesmol	0,09	1619
Epi- α -cadinol	0,13	1637
Epi- α -muurolol	0,33	1639
α -muurolol	0,18	1642
α -cadinol	0,77	1650
Selin-11- <i>en</i> -4 α -ol	0,16	1660

Índice de retenção = índice de Kovats; Componentes identificados baseados na IR e no CG-EM, e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5 (30 m).

5.11 Identificação dos constituintes voláteis de *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.

O óleo essencial das folhas de *H. umbrosa* foi obtido por hidrodestilação com rendimento de 0,6% em relação ao peso do material fresco utilizado. Pela análise em CG-EM foi possível identificar 59 componentes (Figura 118, p. 147) correspondendo a 92,9% do total do óleo em uma mistura complexa. Sendo que, fenchona (24,8%), cubebol (6,9%), limoneno (5,4%), espatulenol (4,5%), β -cariofileno (4,6%) e α -cadinol (4,7%) foram componentes majoritários.

Os demais componentes estão listados na Tabela 13 (p. 148). Essa composição química é compatível com dados da literatura para constituintes voláteis de espécies de *Hyptis* (MARTINS et al., 2006) bem como de outras espécies de Lamiaceae.

Figura 118 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de *Hyptis umbrosa*.

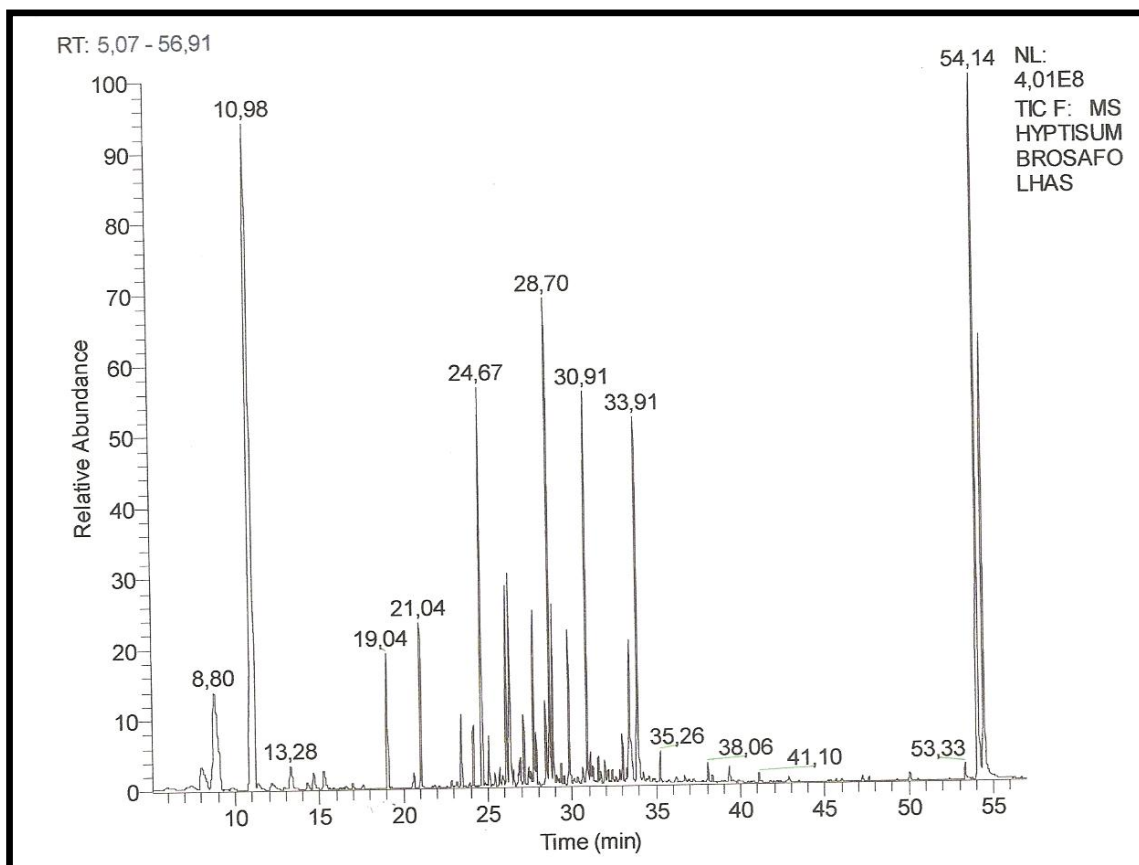


Tabela 13 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Hyptis umbrosa*.

Composto	Área (%)	IR
α -pineno	0,1	934
α -fecheno	0,1	946
Miriceno	0,4	986
α -felandreno	1,3	1007
Limoneno	5,4	1028
γ -terpeneno	0,1	1056
Terpinoleno	0,1	1083
Fechona	24,8	1088
Linalol	0,2	1099
Endo-fenchol	0,3	1118
Butanoato de 3-metil-2-butenil 2-metil	0,1	1137
Canfora	0,7	1146
Borneol	0,2	1170
4-terpineol	0,4	1178
α -terpineol	0,5	1193
Geraniol	0,1	1248
Acetato de bornila	1,9	1282
δ -elemeno	2,0	1329
α -cubebeno	0,1	1372
α -copaeno	0,1	1379
β -elemeno	0,8	1386
α -gurjuneno	0,7	1403
β -cariofileno	4,6	1416
γ -elemeno	0,5	1426
α -guaieno	0,2	1434
<i>Trans</i> -muurola-3,5-dieno	0,3	1442
α -humuleno	2,2	1451
Duaca-5,8-dieno	2,4	1456
<i>Trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	0,5	1458
10-epi- β -acoradieno	0,2	1462
γ -gurjuneno	0,2	1469
γ -muuroleno	0,3	1471
Germacreno D	0,8	1477
β -selinemo	0,2	1484
<i>Trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	0,2	1487
Biciclogermacreno	1,7	1494
α -muuroleno	0,6	1494
γ -cadieno	1,0	1509

Tabela 13 – (Continuação).

Cubebol	6,9	1515
δ -cadieno	1,8	1521
α -cadieno	0,2	1532
α -calacoreno	0,1	1545
Elemol	1,8	1555
Palustrol	0,2	1565
Espatulenol	4,5	1572
Óxido de cariofileno	0,3	1577
Globulol	0,4	1589
Viridifloral	0,1	1592
Guail	0,1	1595
Ledol	0,3	1599
Epóxido de humuleno II	0,2	1604
1,10-di-epi-cubebol	0,2	1610
10-epi- γ -eudesmol	0,5	1627
Epóxido de aloaromadendreno	0,2	1634
Epi- α -cadinol	1,1	1637
Epi- α -muurolol	1,4	1640
α -muurolol	0,4	1642
α -cadinol	4,7	1651
Shiobunol	0,4	1687
Dehidroabietol (tentativa)-espectro A	10,8	
n.i (espectro-B)	6,6	

Índice de retenção = índice de Kovats; Componentes identificados baseados no IR e na CG-EM, e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5 (30 m).

Conclusões

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies de *Hyptis*, *H. macrostachys* e *H. umbrosa*, levou ao isolamento de nove substâncias pertencentes a duas classes de metabólitos, dentre elas, terpenoide e lactona.

O extrato etanólico bruto (EEB) e a fase diclorometânica obtidos das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* levou ao isolamento de dois diterpenos, o beier-15-en-17-ol (eritroxilol B) e o ácido labda-8(17),14-dien-9,13-epoxi,12 α -hidroxi-19-oico (hiptenol); dois triterpenos, o 3- β -acetoxi-oleano-12-en-28-oico (acetato de ácido oleanólico) e o ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico); e uma pirona, a 6*R*-[(5'*S*,6'*S*-diacetoxi)-1'*Z*,3'*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-pirano-2-ona (hiptenolídeo). Sendo esta pirona um produto natural inédito.

Da fase acetato de etila das folhas e dos caules de *Hyptis macrostachys* foram isolados três triterpenos, sendo uma mistura de ácido oleanano e ácido ursano, e o ácido 2 α ,3 β ,19 α -hidroxi-urs-12-em-28-oico (ácido tormêntico).

Do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas e dos caules de *Hyptis umbrosa* foram isolados dois diterpenos, o pomiferin D e o salviol.

A constituição química dos óleos essenciais de *Hyptis macrostachys* e *Hyptis umbrosa* foi majoritariamente de monoterpenos e sesquiterpenos. Sendo o 1,8-cineol o constituinte majoritário em *Hyptis macrostachys* e a fechona em *Hyptis umbrosa*, compatíveis com a composição química de óleos essenciais de outras espécies de Lamiaceae.

O EEB das folhas e caule de *H. macrostachys*, assim como o hiptenolídeo, apresentou atividade espasmolítica em íleo de cobaia.

Com isso, esses resultados contribuíram com o estudo fitoquímico das espécies do semiárido paraibano, *H. macrostachys* e *H. umbrosa*, com a identificação estrutural de nove substâncias, sendo duas inéditas na literatura (hiptenol e hiptenolídeo).

Referências

REFERÊNCIAS

- ABAD, A.; AGULLÓ C.; ARNÓ, M.; MARIN, M. L.; ZARAGOZÁ, R. J. Synthesis of C-17-functionalized beyerane diterpenes. Synthesis of (–)-erythroxylo B, (–)-erythroxydiol A and (–)-benuol. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 1, p. 2987-2991, 1994.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by cromatography/mass spectroscopy**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, 1995.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- ALI, M. S.; IBRAHIM, S. A.; AHMED, S.; LOBKOVSKY, E. Guaiane sesquiterpene lactones from *Salvia nubicola* (Lamiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 98–104, 2007.
- ALLAKURTTI, S.; MÄKELÄ, T.; KOSKIMIES, S.; YLI-KAUHALUOMA, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 1-13. 2006.
- ALMTORP, G. T.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2753-2756, 1991.
- ARAÚJO, E. C.; LIMA, M. A.; SILVEIRA, E. R. Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 1049-1052, 2004.
- ARRIGONI-BLANKA, M. F.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; CAMPOS, D. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, p. 334-339, 2008.
- 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 two-dimensional NMR experiments. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 1171-1173, 1993.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, P. P. P., BARBOSA, C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Brig. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 2, p. 114-115, 1992.

BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; LEAL, C. K. A.; ABRANTES, H. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARDOSO, M. G. et al. Óleos essenciais - Universidade Federal de Lavras. Boletim Técnico. 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. A dialética do conhecimento no uso de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, n. 2, p. 19-21, 2001.

CAVALCANTI, B. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MORAES, M. O.; ARAUJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; SAFFID, J.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 388-392, 2008.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHANG, S. T.; CHENG, S. S.; WANG, S. Y. Antitermic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, p. 717-724, 2001.

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, n. 2, p. 295 - 297, 2005.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 463-482, 2000.

COSTA, H. N. R.; SANTOS, M. C.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R. C.; PILO-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade

antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae), **Química nova**, v. 31, n. 4, p. 744-750, 2008.

CUNHA, P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. **Calouste Gulbenkian**. 2003.

DARIAS, V.; BRAVO, L.; RABANAL, R.M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; MARTÍN-HERRERA, D. A. Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several Lamiaceae species from the Canary Islands. **Planta Medica**, v. 56, n. 1, p. 70-72, 1990.

DEWICK, P. M. The mevalone and deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and Steroids. In: **Medicinal Natural Products**, John Wiley & Sons Ltda. p. 168, 2002.

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 81-83, 2003.

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

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal Natural Products**, v. 69, n. 1, p. 62-67, 2006.

GUILLÉN, M. D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 3, p. 359-363, 1996.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 67-71, 2003.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e perspectiva terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**: 2. Ed. – Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 221-256.

HORVATH, T.; LINDEN, A.; YOSHIZAKI, F.; EUGSTER, C. H.; RÜEDI, P. Abietanes and a novel 20-norabietanoid from *Plectranthus cyaneus* (Lamiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 2346-2353, 2004.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N.; P.; DIANA-MARTIN, A. B.; RYAN-BARRY, C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10576-10581, 2010.

KASHIWADA, Y.; WANG, H. K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUSA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L. M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.;

- IKESHIRO, Y.; HU, C. Q.; YEH, E.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV Activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1090-1095, 1998.
- LEE, K. H.; LIN, Y. M.; WU, T. S.; ZHANG, 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, n. 4, p. 308-311, 1988.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14-24, 2007.
- MALAN, K. A.; BELISSIERE, J. M.; PELLERIN, F. Variation in the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata*, L Poit. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 23, n. 2, p.86-89, 1989.
- MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Variação química dos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens*. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.
- MATIDA, A. K.; ZELNIK, R.; PANIZZA, S. Presença dos ácidos ursólicos e 2 α -hidroxi-ursólico *Hyptis umbrosa* Salzmänn e *Eriope crassipes* Benthām (Labiatae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 183-187, 1986.
- MATOS, F. J. A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1999.
- MELO; R. C. A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 2, p. 193–200, 2005.
- MERALGEMAN, T. L; PEDROSA, D. S.; GIL, R. R. Diterpenes from *Stevia gilliesii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 45-53, 2004.
- MIRALLES, J. Distilled Labiatae oils from Spain. **Perfumer & Flavourist**, v. 23, n. 3, p. 15-17, 1998.
- MONACHE, F. D.; MARLETTI, F.; MARINI-BETTOLO, G.; MELLO, J. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Diterpenoids of *Hyptis fruticosa*-(Labiatae). 2. Hyptol. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, p. 319 - 321, 1977.
- MONACHE, F.D.; MONACHE, G.D.; GACS BAITZ, E.; BARROS COELHO, J. S.; ALBUQUERQUE, I. L.; ANDRADE CHIAPPETA, A.; MELLO, J. F. Umbrosone, an ortho-quinone from *Hyptis umbrosa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 3971-3972, 1990.
- MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GHOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 377-378, 1984.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2ª Ed. Itajaí. Univale. 2009, p. 259-278.

OGIHARA, K.; IRAHA, R.; HIGA, M.; YOGI, SEIICHI. Studies on Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* II. **Bulletin of the College of Science, University of Ryukyus**, v. 64, p. 53-59, 1997.

OHSAKI, A.; KISHIMOTO, Y.; ISOBE, T.; FUKUYAMA, Y. New labdane diterpenoids from *Hyptis fasciculata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53 n. 12. p. 1577-1579, 2005.

PATORA, J.; KLIMEK, B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). **Acta Poloniac Pharmaceutica-Drug Research**, v. 59, n. 2, p. 139-143, 2002.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Jounal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7-12, 2003.

PEERZADA, N. Chemical composition of the essential oil *Hyptis suaveolens*. **Molecules**, v. 2, p. 165-168, 1997.

PEREDA-MIRANDA, R.; GARCIA, M.; DELGADO, G. Structure and stereochemistry of four α -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2971-2974, 1990.

PEREDA-MIRANDA, R.; SERRANO, M. F.; ROJAS, C. M. C. G. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenil-5,6-dihydro- α -pyrone from *Hyptis spincigera*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 47-53, 2001.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RADÜNZ, L. L. Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 27, n. 3, p. 9-13, 2002.

RAMAN, L. U.; CABRÓN, J. I.; DEL RIO, R. E.; HERNANDE, R. D.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M.; JOSEPH-NATHAN, P. Grindelane diterpenes of *Stevia subpubescens*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 226-229, 2000.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1992.

ROLIM, T. L.; BRITO, M. T.; PITA, J. C. L. R.; MEIRELES, D. R. P.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CASTELLO BRANCO, M. V. S. Investigation of antitumor mechanisms of essential oil of *Hyptis umbrosa* Salzm. (Lamiaceae) in *Ehrlich ascites* tumor model. In: **European Cell Death Organisation (ECDO) Meeting**, França, 2013a.

ROLIM, T. L.; GONZAGA, J. C. O.; MEIRELES, D. R. P.; PITA, J. C. L. R.; ABRANTES, R. A.; SOUSA, T. K. G.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CASTELLO BRANCO, M. V. S. Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda do óleo essencial de *Hyptis umbrosa* Salzm. (Lamiaceae). In: **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, Porto Alegre-RS, 2013b.

SANTOS, M. R. V. CARVALHO, A. A. MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 186-191. 2007.

SANTOS, P. O.; COSTA, M. J. C.; ALVES, J. A. B.; NASCIMENTO, P. F. C.; MELO, D. L. F. M.; BARBOSA-JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C.; BLANKI, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; ALVES, P. B.; NASCIMENTO, M. P. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648-1652, 2008.

SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 224-234, 2012.

SHARMA, P. P.; ROY, R. K.; GUPTA, A. D. Pentacyclic triterpinoids from *Betula utilis* and *Hyptis suaveolens*. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 2, n. 2, p. 1558-1532, 2010.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283. 2003.

SOUZA, I. L. L. Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae) e de seu composto isolado HM308. **Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia**. Universidade Federal da Paraíba. 2013.

SOUZA, I. L. L.; OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MATINS, I. R. R.; SANTOS-JUNIOR, M. S. M.; COSTA, V. C. O., TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 2436-2443, 2013.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TRAORE-KEITA, F.; GASQUET, M.; DI GIORGIO, C.; OLLIVIER, E.; DELMAS, F.; KEITA, A.; DOUMBO, O.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 1, p. 45-47, 2000.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G. Abietane diterpenoids from *Salvia pomifera*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3949-3951, 1992.

URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L. C. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1035-1030, 1998.

VASCONCELOS, M. A. Investigação das atividades tóxica e antidiarreica de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia**. Universidade Federal de Alagoas. 2011.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 5, p. 249-255, 1993.

YOGEEESWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 657-666. 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

ZELLNER, B. D.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; ALVES, R. J. V.; BARBOSA, J. P.; COSTA, G. L.; REZENDE, C. M. Screening of the odour-activity and bioactivity of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**. v. 20, n. 2, p. 322-332, 2009.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo publicado na revista Journal of Medicinal Plants Research.

academicJournals

Vol. 7(33), pp. 2436-2443, 3 September, 2013
DOI: 10.5897/JMPR2013.4484
ISSN 1996-0875 ©2013 Academic Journals
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

Journal of Medicinal Plants Research

Full Length Research Paper

Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae)

Iara Leão Luna de Souza¹, Gislaine Alves de Oliveira¹, Rafael de Almeida Travassos¹, Luiz Henrique César Vasconcelos¹, Ana Carolina de Carvalho Correia¹, Italo Rossi Roseno Martins¹, Massilon da Silva Moreira dos Santos Júnior¹, Vicente Carlos de Oliveira Costa¹, Josean Fachine Tavares^{1,2}, Marcelo Sobral da Silva^{1,2} and Bagnólia Araújo da Silva^{1,2*}

¹Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58.051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Accepted 26 August, 2013

Hyptis is a worldwide genus cited by its medicinal uses. *Hyptis macrostachys* Benth., a species popularly known in Brazil as “alfavaca-brava” and “hortelã-do-mato”, is used in folk medicine to relief asthma, cough and bronchitis symptoms. Thus, this study investigated a possible spasmolytic effect of the aerial parts ethanol extract from *H. macrostachys* Benth. (HM-EtOH_{PA}) on several smooth muscle models. On the rat aorta, the uterus was observed and guinea pig trachea HM-EtOH_{PA} did not show relevant spasmolytic action in all tested concentrations (243 to 729 µg/ml). However, on guinea pig ileum, HM-EtOH_{PA} (9 to 729 µg/ml) significantly ($p < 0.001$) inhibited in a concentration-dependent manner the contractions induced by carbachol (CCh) 10^{-6} M and histamine 10^{-6} M as well as relaxed this organ in an equipotent and concentration-dependent (1 to 729 µg/ml) manner when pre-contracted with CCh 10^{-6} M, histamine 10^{-6} M and KCl 40 mM, suggesting its actions in the voltage-gated calcium channels (Ca_v) blockade. Since HM-EtOH_{PA} (9 to 729 µg/ml) inhibited Ca²⁺-induced contractions in Ca²⁺-free depolarizing medium and relaxed ileum pre-contracted with S(-)-Bay K8644 (3×10^{-7} M) in a concentration-dependent manner, the hypothesis of Ca_v was confirmed. Thus, *H. macrostachys* Benth. showed a selective spasmolytic action on guinea pig ileum by blocking Ca²⁺ entry through Ca_v.

Key words: Lamiaceae, *Hyptis macrostachys* Benth., relaxant, antispasmodic, calcium channel.

INTRODUCTION

Plants are a known source of chemical constituents with spasmolytic activity that relieve colicky pain, which constitute a very important symptom of gastrointestinal motility disorders such as dyspepsia (indigestion), intestinal spasms, peptic and duodenal ulceration, nausea and vomiting, constipation and irritable bowel syndrome (Williamson et al., 1996; Sadraei et al., 2003).

Lamiaceae members have been used for centuries in folk medicine (Deo et al., 2011), being characterized as a flowering family and also called of mint family (Harley et al., 2004). The *Hyptis* genus includes around 400 species distributed in American, West Africa, Fiji Island (Oceania) and Western India (Raja, 2012). In Brazil, *Hyptis* species are found in the northern region and have high economic

*Corresponding author. E-mail: bagnoliasilva@yahoo.com or bagnolia@pq.cnpq.br. Tel: +55-83-32167126. Fax: +55-83-3216-7502.

Apêndice B – Artigo aceito para publicação na revista Phytochemistry Letters.

G Model
PHYTOL 659 1–6

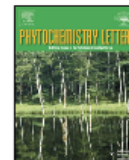
ARTICLE IN PRESS

Phytochemistry Letters xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytolHyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*

Vicente Carlos de O. Costa^a, Josean F. Tavares^b, Andreza B. Silva^b, Marcelo C. Duarte^b,
Maria de F. Agra^a, Jose M. Barbosa-Filho^b, Iara L.L. de Souza^b, Bagnólia A. da Silva^b,
Marcelo S. Silva^{b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 July 2013
Received in revised form 2 January 2014
Accepted 14 January 2014
Available online xxx

Keywords:
Hyptis macrostachys
Hyptenolide
Spasmolytic activity

ABSTRACT

A new α -pyrone was isolated from aerial parts of *Hyptis macrostachys* Benth. Its structure was determined as 6R-[(5'S,6'S-diacetoxy)-1'Z,3'E-heptenyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one, named hyptenolide based on a combination of 1D and 2D NMR techniques and CD data. Hyptenolide inhibited the contractions induced by CCh ($IC_{50} = 1.7 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ M) or histamine ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.05 \times 10^{-4}$ M) in guinea pig ileum, demonstrating for the first time a pharmacological activity for the pyrone.

© 2014 Published by Elsevier B.V. on behalf of Phytochemical Society of Europe.

1. Introduction

The family Lamiaceae includes 295 genera and about 7775 species, consisting of herbaceous and shrubby plants. It is a group with cosmopolitan distribution, occurring mainly in open savannas and mountainous regions with a tropical to subtropical climate. It is estimated that at least 22 genera and 402 species occur in Brazil (Basilio et al., 2006). The Lamiaceae with their special metabolism show a variety of small molecules classes, including representative of the acetic acid, shikimic acid and mixed pathways (Falcão and Menezes, 2003). *Hyptis* is a genus with approximately 400 species distributed from the southern United States down to Argentina (Santos et al., 2007; Raja, 2012). This genus is rich in species of great economic and ethnopharmacological importance, and populations utilize them for various medicinal purposes (Falcão et al., 2003). In northeastern Brazil, these plants are commonly used in the form of infusion and decoction, where they are indicated in the treatment of various diseases especially of the airways and are extensively sold in open markets (Basilio et al., 2006). α -Pyrone with potent antitumor activity have been isolated from species of this genus (Deng et al., 2009). *Hyptis macrostachys* Benth. is a species found in the semi-arid northeastern region of Brazil, where it is popularly known as

"alfavaca-brava" and "hortelã-do-mato." It is utilized in popular medicine against asthma, cough and bronchitis (Agra et al., 2007). A preliminary pharmacological screening aimed at investigating the possible spasmolytic activity of the crude ethanolic extract of aerial parts of *H. macrostachys* Benth. (HM-EtOH_{PA}) in various isolated smooth muscles (rat aorta, rat uterus, and guinea pig trachea and ileum) revealed that HM-EtOH_{PA} showed a greater spasmolytic effect in guinea pig ileum (Souza et al., 2013). In this article, we describe the isolation and structural characterization of a new α -pyrone, 6R-[(5'S,6'S-diacetoxy)-1'Z,3'E-heptenyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one, named hyptenolide (1) (Fig. 1), and report the possible spasmolytic activity of this compound in guinea pig trachea and ileum.

2. Results and discussion

2.1. Structure elucidation

Compound 1 was isolated as a brown oil, $[\alpha]_D^{20} +45$ (c. 0.001 in CHCl₃). The mass spectrum obtained by HR-ESI-MS showed a peak at m/z 331.1167 $[M+Na]^+$, compatible with the molecular formula C₁₆H₂₀O₆. The IR spectrum showed a maximum absorption at 1739 and 1635 cm⁻¹ due to the presence of an α,β -unsaturated δ -lactone. The ¹H NMR spectrum demonstrated two methyl groups of acetoxyl with chemical shift at δ_H 2.06 (s, 3H) and δ_H 2.00 (s, 3H) as well as a signal at δ_H 1.17 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz), which was attributed to a terminal primary methyl group. The signals at

* Corresponding author. Tel.: +55 83 3216 7427.
E-mail address: marcelosilva@lufpb.br (M.S. Silva).