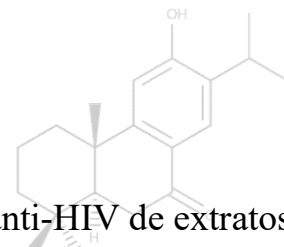
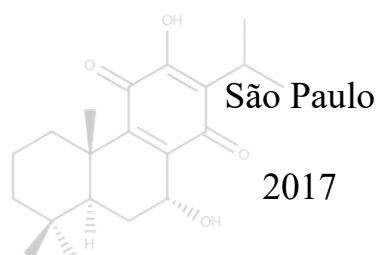
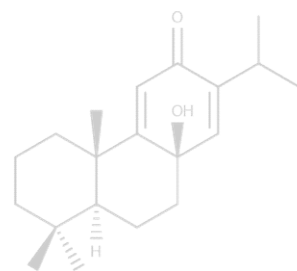
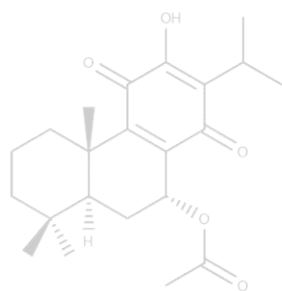
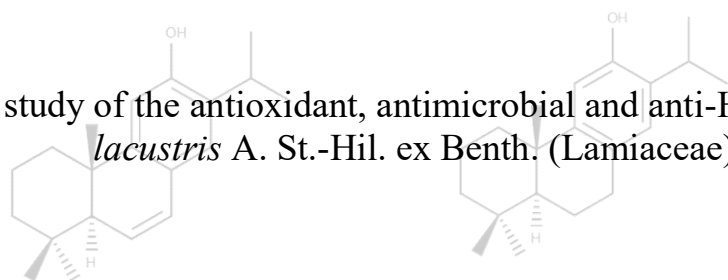


Estudo *in vitro* dos potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV de extratos de *Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. (Lamiaceae)



*In vitro* study of the antioxidant, antimicrobial and anti-HIV potential of *Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. (Lamiaceae) extracts





Wilton Ricardo Sala de Carvalho

Exemplar corrigido.

O original encontra-se disponível no instituto de biociências da USP.

Estudo *in vitro* dos potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV de extratos de  
*Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. (Lamiaceae)

*In vitro* study of the antioxidant, antimicrobial and anti-HIV potential of *Hyptis*  
*lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. (Lamiaceae) extracts

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo, para  
a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na  
Área de Recursos Econômicos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Maria Furlan

São Paulo

2017

Sala de Carvalho, Wilton Ricardo  
Estudo *in vitro* dos potenciais antioxidante,  
antimicrobiano e anti-HIV de extratos de  
*Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth.  
(Lamiaceae)

150 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de  
Biociências de Universidade de São Paulo.  
Departamento de Botânica

Palavra-chave: *Hyptis*, substâncias fenólicas,  
diterpenoides, antioxidante, antimicrobiano,  
anti-HIV.

Universidade de São Paulo. Instituto de  
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Sartorelli

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Furlan  
Orientadora



*Aos meus pais, meu irmão e meus avós,  
que sempre me apoiaram nas decisões  
e foram de extrema importância  
até chegar neste momento.*



## Agradecimentos

São tantas as pessoas que participaram e ainda participam dessa minha jornada que espero não esquecer de ninguém!

Primeiramente à minha amada família, em especial aos meus pais, Amábile e Milton, que sempre me apoiaram na decisão de perseguir a área acadêmica e me ajudaram de diversas formas, tantas que não caberiam nessas páginas, para eu chegar até esse momento. À minha avó Valentina, que como o próprio nome já diz, sempre foi muito valente no seu apoio para a realização desse meu desejo e foi a maior responsável por me transmitir a paixão por trabalhar com plantas. Ao meu irmão Milton que sempre esteve do meu lado demonstrando interesse na área que trabalho. Amo todos vocês!

À Jéssica Cassimiro, por estar aguentando a minha amizade por quase oito anos e por ter me apresentado a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria de Moraes e com isso fosse possível conseguir o estágio no Instituto de Botânica (Ibt), se não fosse por essas duas pessoas incríveis dificilmente eu teria conhecido a minha orientadora Cláudia Furlan!

Principalmente à Cláudia por ter aceitado ser minha orientadora e me introduzido no incrível mundo da fitoquímica, sem me esquecer também de todos os ensinamentos, dedicação, apoio e paciência (sei que precisou de muita), nesses dois anos e pelos próximos quatro anos no mínimo!

Aos professores do laboratório que sempre estão servindo de inspiração e exemplo de como deve ser um pesquisador. Aos professores Maria Luiza e Antônio Salatino que são grandes exemplos de amor à pesquisa, amor esse transmitido em suas aulas incríveis. À professora Deborah pelo grande exemplo de profissional e por aguentar as minhas muitas invasões na sua sala. Ao professor Marcelo pela disciplina incrível, pela ajuda nas identificações, pela transmissão de muito conhecimento e pelos “puxões de orelha” quando conversávamos sobre as identificações por RMN, sem a sua ajuda não teria conseguido identificar os compostos apresentados nesse trabalho!

Aos funcionários do laboratório, Aline, Leandro e Mourisa, por ajudarem nos experimentos e pelas risadas nos momentos de descontração!

Às minhas “irmãs” de orientadora, Dalila, Fernanda Anselmo, Fernanda Rezende, Janayne, Kátia e Pâmela, por todas as dicas, ajudas, ensinamentos, risadas e por me aguentarem convivendo na mesma sala!

Aos veteranos do laboratório, em especial à Alice, Carmen, Cinthia e Priscila, que me receberam de braços abertos e facilitaram o meu começo, com muitas risadas, ensinamentos e dicas!

Aos que entraram junto comigo, em especial ao Miguel, Lucas e a Cris, que são grandes amigos e me ajudaram em muitos momentos!

Ao pessoal do Botânica no Inverno, de A a Z, pelos momentos de aprendizado, descontração e diversão, dos quais alguns se tornaram grandes amigos e me ajudaram com dicas de como conseguir inspiração nos momentos que esta me faltava durante a escrita!

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por conceder toda a infraestrutura para a realização do projeto; à FAPESP pelo financiamento do projeto temático; à CAPES por conceder a bolsa de mestrado!

Espero não ter esquecido ninguém, aos que esqueci me perdoem, mas são muitos nomes para lembrar e poucas páginas para escrever!



## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Histórico sobre plantas medicinais.....	1
1.2. Metabolismo secundário ou especial.....	4
1.3. Relações oxidativas.....	17
1.4. Ataques microscópicos.....	21
1.5. Mundo Viral.....	24
1.6. Potencial brasileiro na prospecção de novos fármacos .....	27
2. Contextualização e Hipóteses do estudo.....	31
3. Objetivos.....	33
3.1 Objetivos gerais .....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4. Material e métodos .....	35
4.1 Produção dos extratos e triagem fitoquímica .....	35
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> de atividade antioxidante .....	37
4.2.1 Ensaio antirradicalar: DPPH.....	37
4.2.2 Ensaio antirradicalar: ABTS.....	37
4.2.3 Atividade quelante de ferro .....	38
4.2.4 Atividade redutora de ferro (III) a ferro (II) - FRAP.....	38
4.2.5 <i>ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)</i> .....	38
4.3 Ensaio de atividade antibacteriana .....	39
4.4 Ensaio de atividade anti-HIV.....	40
5. Resultados e Discussão .....	41
5.1 Doseamento e identificação dos constituintes fitoquímicos .....	41
5.1.1 Rendimento .....	41
5.1.2 Doseamento e identificação dos constituintes fenólicos.....	42
5.1.3 Doseamento e identificação de terpenoides .....	55
5.5 Atividade antioxidante .....	77
5.6 Atividade antibacteriana .....	91
5.7 Atividade anti-HIV.....	102
6. Conclusões .....	107
7. Resumo .....	109
8. Abstratct .....	111
9. Referências Bibliográficas.....	113
10. Anexos .....	129



## 1. Introdução

### 1.1. Histórico sobre plantas medicinais

Segundo o ministério da saúde (2009), o termo planta medicinal se refere a qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Com base nessa definição, desde a antiguidade, diversas civilizações registraram observações sobre o uso terapêutico das plantas medicinais, sendo que as civilizações primitivas dependiam fundamentalmente das plantas para curar suas enfermidades (Almeida, 2011).

O primeiro registro escrito da aplicação medicinal de plantas data de 2600 a.e.c., reportando a existência de um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia, com cerca de 1000 medicamentos derivados de plantas (Atanasov et al., 2015). Apesar da medicina Egípcia datar de cerca de 2900 a.e.c., registros escritos só surgiram posteriormente, cerca de 1550 a.e.c., com o Papiro de Ebers, obra que descreve a utilização de diversos medicamentos baseados em plantas, como as propriedades sedativas do ópio (*Papaver somniferum* L.), anti-inflamatória da mirra (*Commiphora myrrha* (Nees) Engl), digestivas do rícino (*Ricinus communis* L.), da alcaravia (*Carum carvi* L.) e da hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), e de estimulante cardíaco da cila (*Drimia indica* (Roxb.) Jessop) (Atanasov et al., 2015). Outros países também possuem relatos de utilização medicinal de plantas, como exemplo a China, com o livro “Prescrições para 52 doenças”, escrito durante a Dinastia Han, que traz a descrição de cerca de 208 plantas para o tratamento de 52 doenças, entre elas a descrição sobre os benefícios da *Artemisia annua* L. para o tratamento de “febres”; o PenTs’ao, de 2000 a.e.c., escrito pelo herborista chinês Shen Nung, é um dos registros mais antigos que descreve o uso de centenas de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças; a Índia, com um tratado médico com mais de 500 plantas denominado Caraka, baseado na medicina Ayurvédica; e os Gregos e Romanos, com o livro *De Materia Medica*, escrito pelo grego Pandamius Dioscorides, com cerca de 600 plantas e por Plínio, o Velho, com o livro História Natural (Alves, 2013; Dias et al., 2012; Almeida, 2011).

Durante as últimas décadas o sistema tradicional de medicina se tornou um tópico de importância global. Atualmente a Europa é considerada o maior mercado de plantas medicinais, não somente sendo importadores, mas também grandes produtores de uma variedade delas, sendo comumente usadas para complementar o tratamento com medicamentos alopáticos (WHO, 2010). Estimativas sugerem que, em estados anteriormente pertencentes à União Soviética que adquiriram a sua independência recentemente (NIS, Newly Independent States) e países do Leste e Centro Europeu (CCEE, Countries of Central e Eastern Europe), uma grande proporção da população tem utilizado plantas medicinais em seus cuidados básicos de saúde, devido à sua importância cultural,

---

histórica e principalmente devido às dificuldades econômicas que esses países enfrentam, o que os levam a buscar tratamentos alternativos mais baratos (WHO, 2010).

A elucidação dos mecanismos biológicos e bioquímicos de produtos naturais tem tido um valor inestimável como ferramenta para decifrar a lógica da biossíntese e no desenvolvimento de novos medicamentos no combate de diversos tipos de doenças, como as infecciosas, o câncer, alterações na quantidade de lipídios e como imunomoduladores, com os produtos naturais e seus derivados sendo tradicionalmente a fonte mais comum de medicamentos (Basso et al., 2005). Se levarmos em consideração o período de 1981 até o final de 2014, 73% das drogas aprovadas no tratamento de diversas doenças causadas por bactérias foram derivadas de produtos naturais, demonstrando uma potencial área para expansão (Newman e Cragg, 2016).

A procura de compostos bioativos em espécies vegetais pode seguir cinco caminhos principais: aleatório, na qual uma espécie vegetal é escolhida aleatoriamente para se realizar os estudos; estudos Etnobotânicos, no qual a planta é escolhida para estudo através do conhecimento de seu uso pelas populações tradicionais; com este método, se tem uma taxa de sucesso até 5 vezes maior do que a escolha aleatória da espécie; uma abordagem ecológica, na qual se analisam plantas tóxicas a animais, indicando a presença de compostos que possam ser usados de forma medicinal (Basso et al., 2005; Ministério Da Saúde, 2006); quimiosistemática, na qual se analisam espécies pertencentes ao mesmo gênero ou família de espécies que apresentam atividade medicinal, já que há a grande possibilidade de produzirem compostos semelhantes; e uma abordagem computacional, na qual as espécies são selecionadas de acordo com previsões de bioatividade *in silico* dos constituintes de determinadas plantas (Atanasov et al., 2015).

Existe no mundo um grande número de espécies vegetais que sintetizam uma alta diversidade de compostos bioativos com diferentes estruturas; apesar desse grande potencial, há uma estimativa de que somente 6% das espécies foram estudadas do ponto de vista farmacológico, e somente 15% fitoquimicamente (Atanasov et al., 2015). Apesar dessa baixa porcentagem, diversos medicamentos importantes e ainda em uso foram descobertos a partir de matrizes vegetais, ou são, direta ou indiretamente, derivados destas. Grandes exemplos de compostos de origem vegetal com grande importância para a indústria farmacêutica são as duas drogas extraídas da vinca-de-Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), a vimblastina (Velban<sup>®</sup>) e a vincristina (Tecnocris<sup>®</sup>), ambas usadas no tratamento contra o câncer (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

No Brasil, durante o governo do general Médici em 1971, foi criada a Central de Medicamentos (CEME), com o objetivo de promover a produção de medicamentos destinados à população de baixa renda. Um dos programas de destaque desse órgão, na área de Pesquisa e Desenvolvimento, foi o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais (PPPM). Criado em 1982,

---



esse programa tinha como metodologia e objetivo a comprovação do potencial medicinal de diversas plantas que eram utilizadas na medicina tradicional. Foram investidos cerca de US\$ 8 milhões em financiamentos de 110 projetos de pesquisa envolvendo 24 instituições, incluindo a Universidade de São Paulo (USP) com 5 projetos, verificando a ação medicinal de 55 espécies de plantas e comprovando a ação semelhante ao utilizado na medicina tradicional de 9 dessas espécies, mas falhando em seu objetivo principal de colocar no mercado um medicamento fitoterápico totalmente brasileiro, devido à descontinuidade do apoio governamental, que em 1998 fechou a CEME (Alves, 2013; Ministério Da Saúde, 2006).

Atualmente, o Brasil conta com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), cujo principal objetivo é o de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Para atingir esse objetivo as principais propostas são: construir e aperfeiçoar o marco regulatório em todas as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos; desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa; desenvolver tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos; desenvolver capacitação e formação técnico-científica; e inserir serviços de fitoterapia no SUS (Ministério Da Saúde, 2009), demonstrando um crescimento de interesse no uso de plantas com potencial medicinal.

## **1.2. Metabolismo secundário ou especial**

Todos os organismos necessitam converter compostos orgânicos que os permitam sobreviver, crescer e se reproduzir, produzindo energia e blocos construtores que os permitam construir seus tecidos e estruturas. As principais classes de substâncias responsáveis por esses processos são os carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos, e o conjunto de reações que levam à formação desses produtos essenciais é denominado metabolismo primário ou central (Dewick, 2009).

Em contraste com as rotas do metabolismo primário, que é comumente encontrada em todos os organismos, existe uma área do metabolismo que leva à formação de produtos que possuem uma distribuição mais restrita na natureza, o metabolismo secundário ou especial, que não possui função diretamente conectada com crescimento e desenvolvimento, no qual determinados produtos são sintetizados somente por determinados grupos de organismos, sendo uma expressão da individualidade da espécie e não sendo produzidos em todas as circunstâncias, podendo ser sintetizados como formas de defesa ou atrativos, mas exercendo um papel importante para o indivíduo (Dewick, 2009; Taiz et al., 2017). São os metabólitos secundários (produtos naturais) que fornecem as substâncias farmacologicamente mais ativas para o uso medicinal humano (Dewick, 2009).

O metabolismo primário e o secundário estão, apesar dessa divisão didática, relacionados, pois os produtos do metabolismo primário servem de blocos construtores para os metabólitos secundários, sendo precursores das quatro principais vias de síntese dos metabólitos secundários: a via do acetato-malonato, a via do ácido chiquímico, a via do metileritritol fosfato e a via do mevalonato (Dewick, 2009).

A figura 1 esquematiza a relação entre o metabolismo primário e o secundário, mostrando os precursores do metabolismo primário e sua relação com as vias do metabolismo secundário.

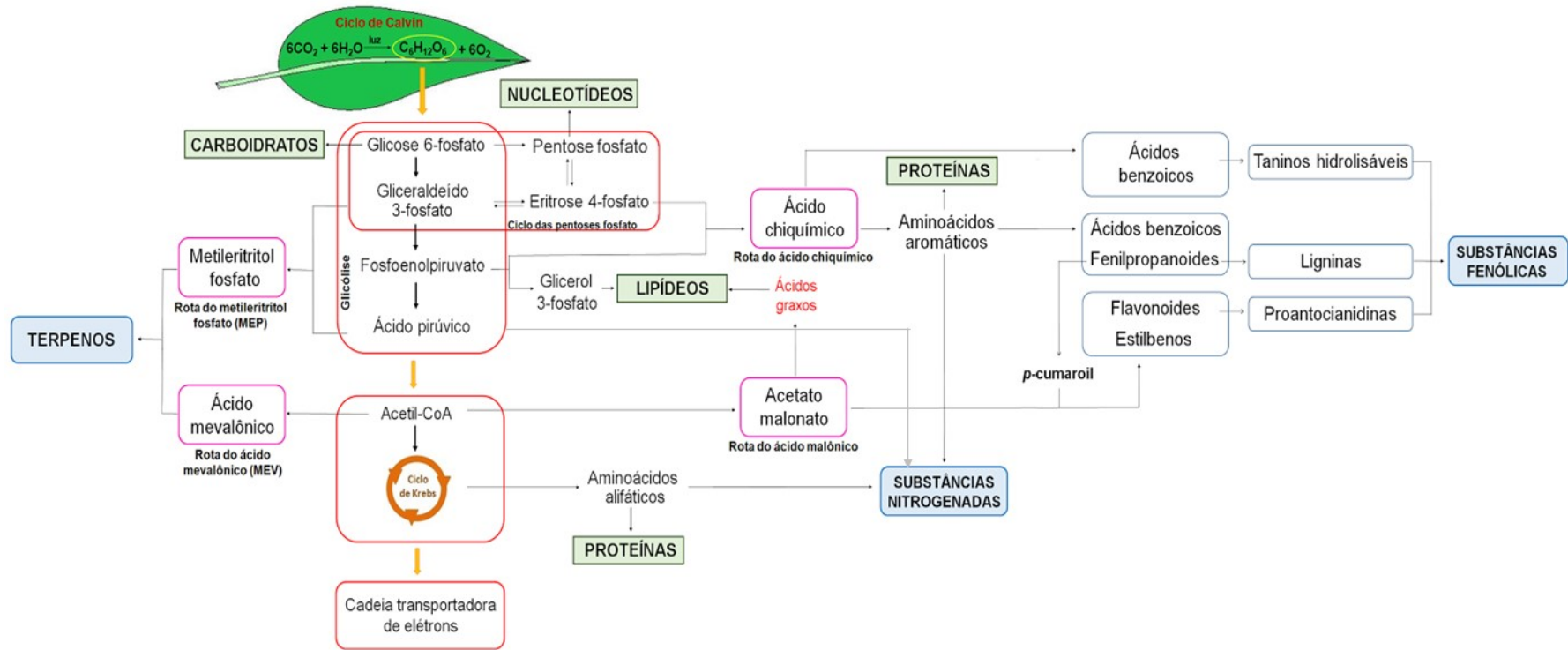


Figura 1: Relação entre os produtos do metabolismo primário precursores das principais vias do metabolismo secundário e as principais classes de substâncias produzidas por essas vias. Adaptado de Moreira (2015).

A via do acetato-malonato utiliza como molécula iniciadora a acetil-CoA, formada pela descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico pela via da glicólise (Dewick, 2009). A acetil-CoA pode se condensar com uma molécula de malonil-CoA que sofrerá uma descarboxilação e formará um  $\beta$ -ceto-éster, a estrutura base que originará todas as substâncias derivadas dessa via de síntese. A partir desse ponto, a via pode seguir três caminhos diferentes: continuar condensando moléculas de malonil-CoA e formar uma cadeia altamente reativa de poli- $\beta$ -ceto-éster que sofrerá ciclização, originando os compostos aromáticos; no segundo caminho, o  $\beta$ -ceto-éster poderá continuar igual, ou sofrer uma redução, ou uma redução seguida de desidratação, ou uma redução completa antes de condensar com outras molécula de malonil-CoA, repetindo o ciclo, até formarem uma cadeia com sequências de metilenos, hidroxilas e carbonilas, que originarão os macrolídeos, classe de substâncias produzidas somente por fungos e bactérias; o terceiro caminho consiste em o  $\beta$ -ceto-éster sofrer uma sequência de redução, desidratação e redução antes de condensar com outras moléculas de malonil-CoA, repetindo o ciclo até formar uma cadeia carbônica saturada do tamanho necessário que originarão os derivados de ácidos graxos, como os ácidos graxos saturados, insaturados e os poliactilenos. Apesar de ser mais comum a acetil-CoA ser utilizada como molécula iniciadora e a de malonil-CoA como extensora para a síntese de diversas estruturas, outras moléculas podem ser usadas nessas duas etapas, como a de *p*-cumaroil-CoA na formação de flavonoides (Dewick, 2009).

A figura 2 representa um esquema sumarizado da via do acetato-malonato.

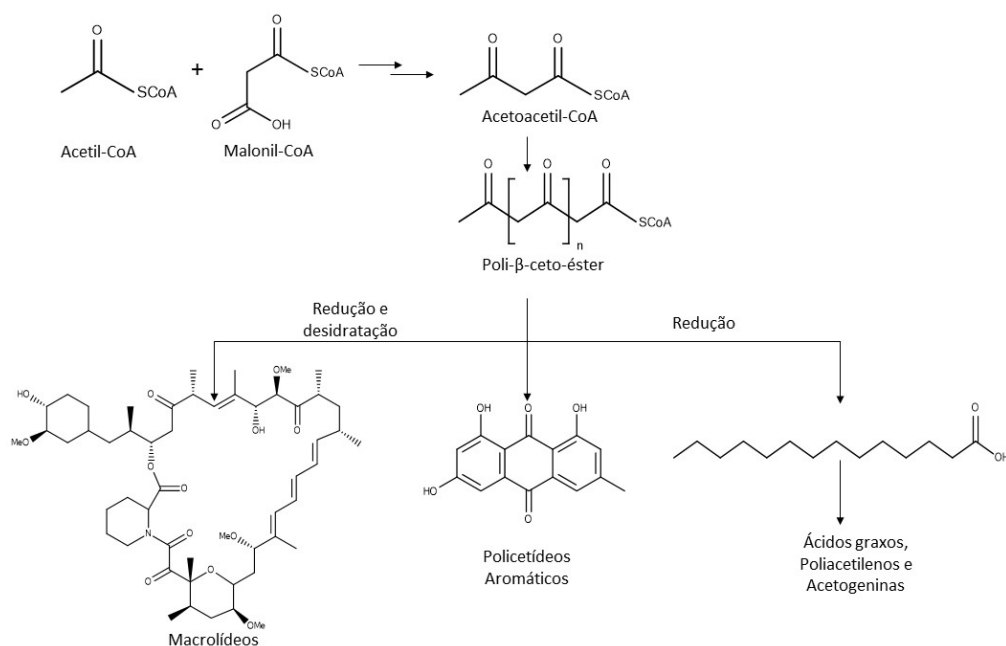


Figura 2: Esquematização simplificada da via do acetato-malonato. Adaptado de Dewick (2009).

A via do mevalonato (MEV) se inicia com a condensação de três moléculas de acetil-CoA formando uma molécula de HMG-CoA (3-Hidroxi-3-Metilglutaril-CoA), seguida de 3 reduções para a formação do ácido mevalônico, substância que batiza a via. O ácido mevalônico sofrerá uma sequência de duas fosforilações que originará o ácido mevalônico-5-difosfato que por descarboxilação produzirá o IPP (Isopentenil difosfato), juntamente com o DMAPP (Dimetilalil difosfato), seu isômero, no qual pode ser convertido em uma reação reversível, pela ação da enzima IPP isomerase (Dewick, 2009; Kutchan et al., 2015). Essas duas moléculas são precursoras de todas as classes de terpenoides biossintetizadas (Dewick, 2009; Kutchan et al., 2015).

Os terpenoides também podem ser sintetizados por uma outra rota biossintética, denominada via do metileritritol fosfato (MEP). Essa via tem início com a condensação de uma molécula de piruvato com uma de gliceraldeído 3-fosfato, ambas provenientes da glicólise, formando o intermediário chamado 1-Deoxi-D-Xilulose-5-Fosfato, seguido de um rearranjo estrutural e redução para formar uma molécula de 2C-Metil-D-Eritritol-4-Fosfato. Essa molécula sofre uma série de reações, incluindo fosforilações e reduções, para formar IPP e DMAPP (Kutchan et al., 2015).

Em plantas, a via do MEV ocorre principalmente no citoplasma da célula, enquanto a via MEP ocorre principalmente nos cloroplastos das células, mas podendo ocorrer intercâmbio entre os produtos de uma via com a outra (Dewick, 2009; Kutchan et al., 2015). Em animais e em fungos os produtos terpenoídicos são derivados somente da via do MEV, enquanto em plantas, algas e a maior parte das bactérias são produzidos pelas duas vias (Dewick, 2009).

Após a formação do IPP e do DMAPP, o próximo passo na biossíntese dos terpenoides é a condensação cabeça-cauda, através de mecanismos de carbocátions mediados por enzimas denominadas preniltransferases, dessas duas moléculas para formarem uma estrutura de 10 carbonos denominada geranyl difosfato (GPP), precursora dos monoterpenoides e iridoides; através da condensação cabeça-cauda de mais uma molécula de IPP, será formado o farnesil difosfato (FPP), com 15 carbonos, precursor dos sesquiterpenoides; através da condensação cabeça-cauda de mais uma molécula de IPP, ocorrerá a formação de uma estrutura com 20 carbonos denominada geranylgeranyl difosfato (GGPP), precursora dos diterpenoides; através da condensação cauda-cauda de duas moléculas de FPP, há a formação do esqualeno, com 30 carbonos, precursor dos triterpenoides e esteroides; e com a condensação cauda-cauda de duas moléculas de GGPP, há a formação do fitoeno, com 40 carbonos, precursor dos carotenoides (Kutchan et al., 2015).

Através da ionização do grupo fosfato das prenilas difosfato há a produção de um carbocátion que reagirá com uma dupla ligação da própria estrutura, produzindo um ciclo, com isso o carbocátion irá mudar de posição e poderá ocorrer uma série de rearranjos, como mudanças de alquila e hidreto, outras ciclizações ou a desprotonação para terminar a série de reações (Kutchan et

---

al., 2015). Dependendo da molécula inicial na qual ocorrerão essas reações, irão se formar os esqueletos básicos de cada tipo de terpenoide, por exemplo, se essa série de reações ocorrer no GGPP, haverá a formação do esqueleto básico da maior parte dos diterpenoides, sendo que esses esqueletos podem sofrer modificações para gerar uma grande diversidade de moléculas, cuja as modificações mais comuns são oxidações, reduções, isomerizações, glicosilações e acilações (Kutchan et al., 2015).

A figura 3 representa uma esquematização simplificada da biossíntese dos terpenoides.

Uma das classes de terpenoides de maior ocorrência em Lamiaceae é a dos diterpenoides, formados pela ciclização do GGPP, através da formação de carbocátions pela perda do grupo difosfato ou pela protonação da dupla ligação na cabeça da cadeia antes da perda do grupo difosfato, seguido de diferentes rearranjos estruturais, originando diversos esqueletos carbônicos básicos (figura 4) (Dewick, 2009).

Um dos tipos de maior ocorrência em Lamiaceae é o dos abietanos aromáticos, que possuem o anel C aromático. Esses diterpenoides são sintetizados a partir do labdadienil PP que forma um carbocátion através da perda do grupo fosfato e cicliza formando o abietadieno, que através de rearranjos origina o miltiradieno, precursor do abietatrieno (figura 4) (Gonzáles, 2015). O abietatrieno é o composto que origina o restante dos diterpenoides abietanos aromáticos através de diversas incorporações de oxigênios (Gonzáles, 2015).

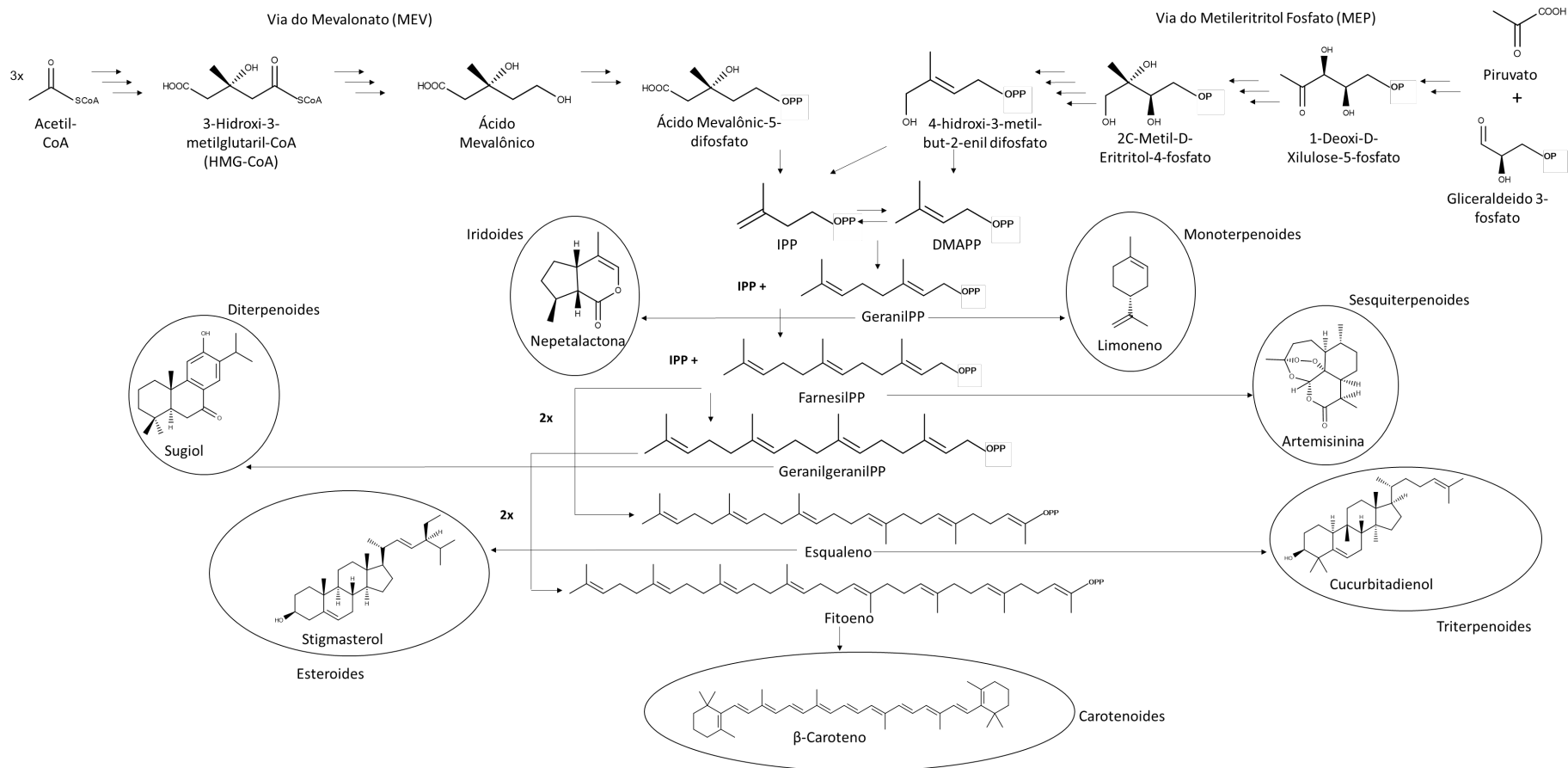


Figura 3: Esquematização simplificada da biossíntese dos terpenoides pelas vias do Mevalonato (MEV) e do Metileritritol fosfato (MEP), com alguns exemplos de moléculas produzidas por elas. Adaptado de Dewick (2009).

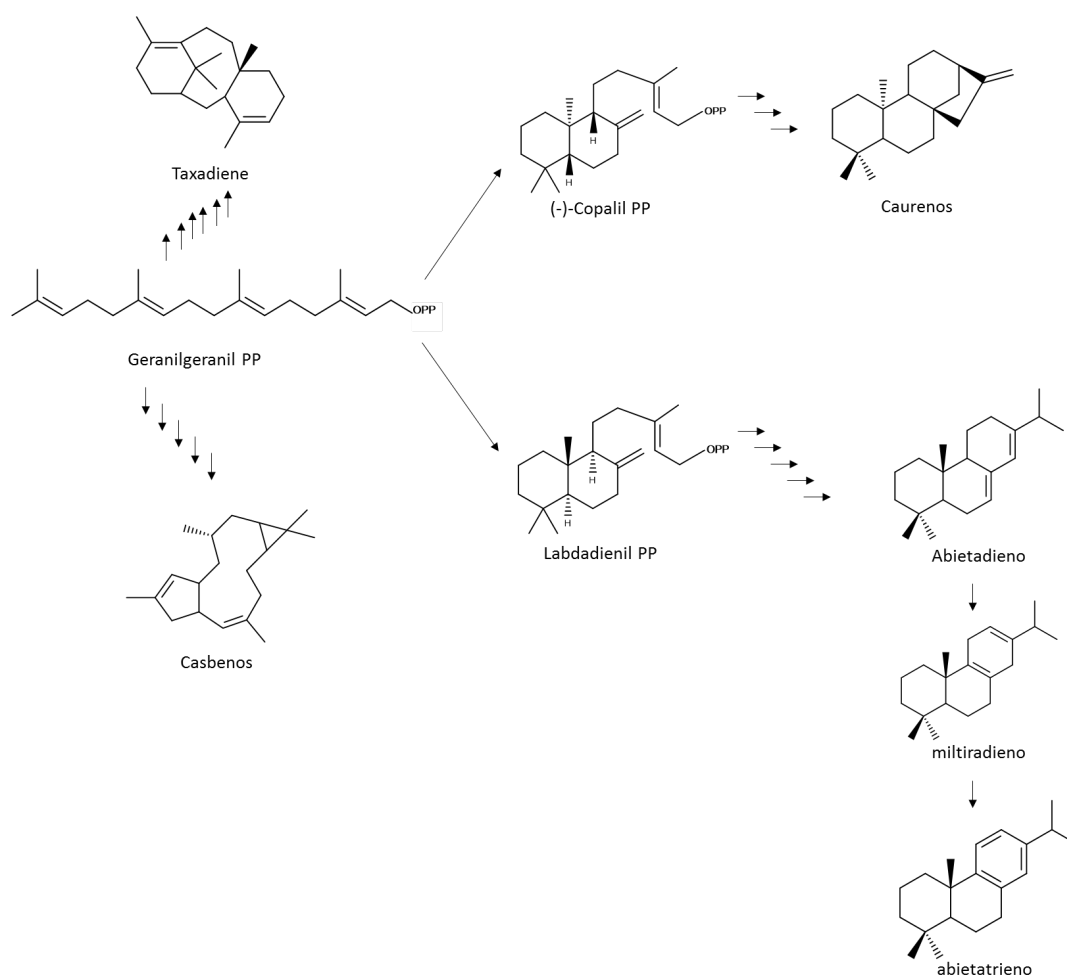


Figura 4: Biossíntese dos principais esqueletos carbônicos dos diterpenóides cíclicos. Adaptado de Dewick (2009).

A via do ácido chiquímico tem início através da reação de dois produtos provenientes de vias do metabolismo primário, o fosfoenolpiruvato, proveniente da glicólise e a eritrose-4-fosfato, proveniente da via das pentoses fosfato, que sofrem condensação originando uma molécula de ácido 3-deidroquínico. O ácido pode seguir dois caminhos diferentes: uma redução, originando o ácido quínico, que pode esterificar com o ácido cafeico originando os derivados de ácido clorogênico, comuns em Lamiaceae; ou uma desidratação, originando o ácido 3-deidrochiquímico (Dewick, 2009).

O ácido 3-deidrochiquímico pode seguir três caminhos diferentes, pode sofrer uma redução, originando o ácido chiquímico, molécula que batiza a via; ou uma desidratação, seguida de enolização para originar o ácido protocateico; ou ainda uma oxidação, seguida de enolização para formar o ácido gálico, precursor dos taninos hidrolisáveis (Dewick, 2009).



Os taninos hidrolisáveis podem ser subclassificados em três tipos diferentes: os galotaninos, formados por ésteres de ácido gálico, geralmente seis ou mais unidades, com glicose, podendo os ácidos gálicos estarem esterificados entre si, que, ao serem hidrolisados por ácidos fracos, liberam ácido gálico e glicose; os elagitaninos, ésteres de ácido gálico com glicose, nos quais dois ou mais grupos galoils sofrem acoplamento oxidativo produzindo um grupo funcional denominado ácido hexahidroxi-difênico, ao serem hidrolisados por ácidos fracos, liberam como subprodutos glicose, ácido gálico e ácido hidroxidifênico que espontaneamente lactoniza em ácido elágico (Dewick, 2009); e as galoilglucoses formadas por uma a cinco unidades de ácido gálico esterificados à uma glicose central (Engström, 2016).

O ácido chiquímico, em uma série de reações, incorpora uma molécula de fosfoenolpiruvato produzindo o ácido corísmico. Em plantas, o ácido pode sofrer uma aminação originando o ácido antranílico, precursor de alcaloides e do aminoácido L-triptofano, ou sofrer um rearranjo, tornando a cadeia lateral derivada do fosfoenolpiruvato diretamente ligada ao ciclo, originando o ácido prefênico (Dewick, 2009).

O ácido prefênico pode seguir três vias diferentes dependendo da espécie em que se está analisando. Na primeira possibilidade ocorre uma aromatização descarboxilativa, produzindo o ácido fenilpirúvico que após uma reação de transaminação forma a L-fenilalanina, que pode sofrer uma hidroxilação originando a L-tirosina. A segunda possibilidade é o ácido prefênico sofrer uma aromatização descarboxilativa sem ocorrer a perda da hidroxila, originando o ácido 4-hidroxifenilpirúvico, formando a L-tirosina após uma reação de transaminação. A terceira possibilidade é a ocorrência da transaminação primeiramente, formando o ácido L-arogênico, que após a aromatização descarboxilativa, é convertido em L-fenilalanina ou L-tirosina (Dewick, 2009).

São esses aminoácidos que serão os precursores dos produtos seguintes da via do ácido chiquímico, se eles serão derivados da L-fenilalanina ou da L-tirosina depende da espécie em estudo. Espécies pertencentes à Poaceae comumente seguem a via da L-tirosina como substrato para ação da enzima tirosina amônia liase (TAL) para a desaminação e produção de ácido *p*-cumárico. Outras famílias comumente seguem a via que utiliza a L-fenilalanina como substrato para ação da fenilalanina amônia liase (PAL), ocorrendo a desaminação e formação do ácido cinâmico, que através de uma hidroxilação, origina o ácido *p*-cumárico, moléculas precursoras das classes de substâncias fenólicas produzidas pela via do ácido chiquímico (Dewick, 2009).

O ácido cinâmico pode sofrer uma série de reações de hidroxilações em seu anel aromático seguidas ou não de metilações em suas hidroxilas para originar os derivados de ácidos cinâmicos, que ocorrem em sua forma livre ou esterificados com outras moléculas, como o ácido quínico (derivados de ácido clorogênico), o ácido 4-hidroxifenilático (ácido rosmarínico), com glicose

---

(ácido sinápico), ou outras moléculas. Esses derivados podem sofrer uma hidroxilação na posição 2 e ciclizar, formando uma lactona, originando as cumarinas, ou podem também sofrer reduções de seu grupo ácido em aldeídos e álcoois, originando os fenilpropanoides. Ou até mesmo formar derivados de ácido benzoico pela clivagem da cadeia lateral na dupla ligação, ocorrendo assim a perda de dois átomos de carbono (Dewick, 2009).

Os álcoois de fenilpropanoides (cumaril, coniferil, sinapil), podem dimerizar ou polimerizar, através de acoplamento oxidativo, originando, respectivamente, as lignanas e as ligninas. As lignanas são subdivididas em lignanas, quando o acoplamento ocorre entre os carbonos da cadeia lateral e em neolignanas, quando o acoplamento ocorre entre quaisquer outros átomos (Dewick, 2009). A proporção de cada álcool nas ligninas depende da espécie em que ocorre, do órgão lignificado e até da camada da parede celular (Taiz et al., 2017). Gimnospermas polimerizam, principalmente, coniferil; eudicotiledôneas coniferil e sinapil e monocotiledôneas coniferil, sinapil e cumaril (Dewick, 2009).

A figura 5 representa uma esquematização simplificada das etapas iniciais da biossíntese dos compostos fenólicos pela via do ácido chiquímico.

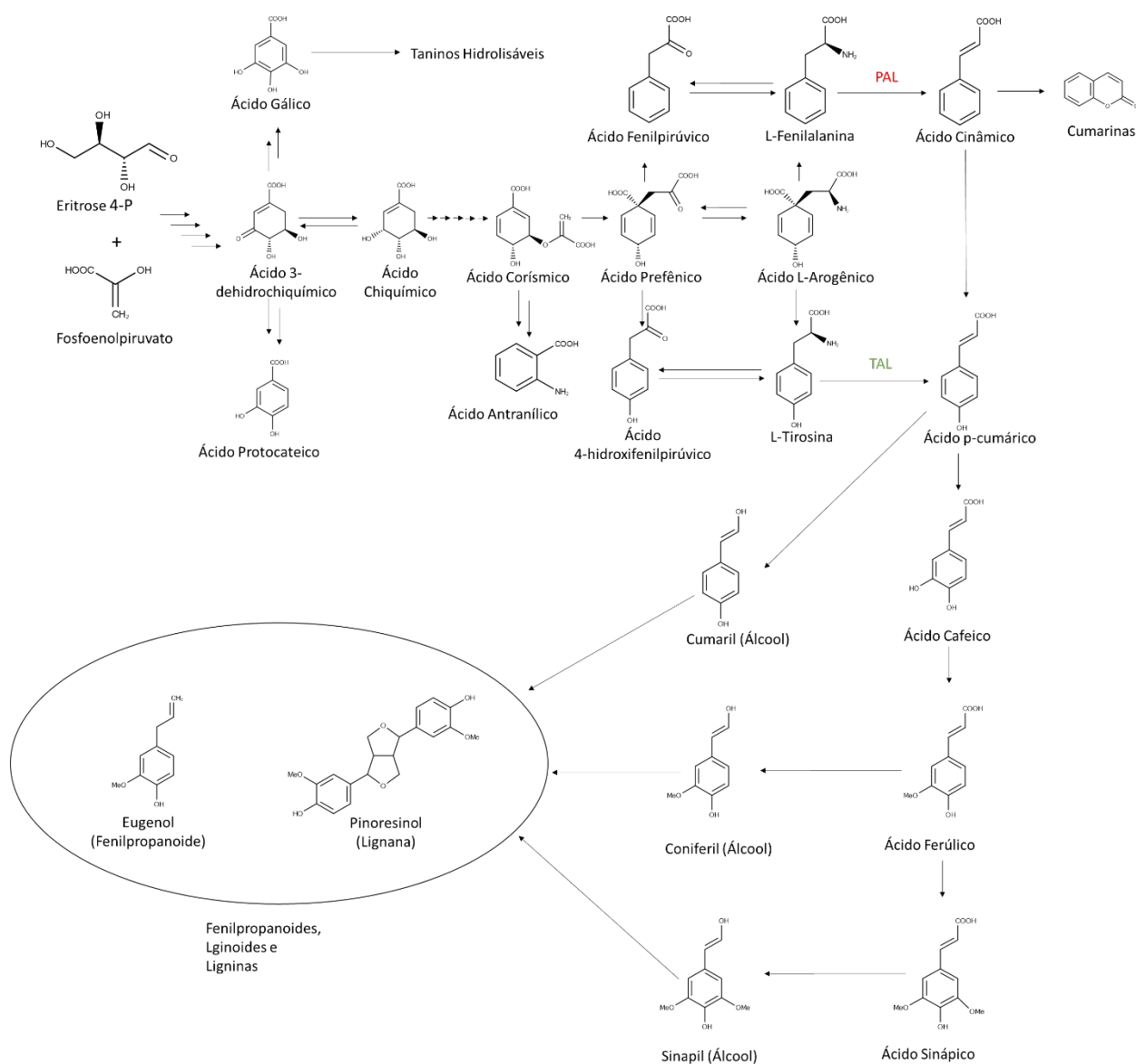


Figura 5: Esquematização simplificada das primeiras etapas da via do ácido chiquímico. Adaptado de Dewick (2009).

Os derivados de ácido cinâmico podem servir como moléculas iniciadoras de enzimas policetídeos sintase (PKS) III para a síntese de compostos fenólicos de biossíntese mista com a via do acetato-malonato, produzindo mais uma série de classes de compostos fenólicos (Dewick, 2009). Dentre esses compostos, os mais comuns e de maior destaque são os estilbenos e os flavonoides. Os estilbenos são formados pela condensação do ácido *p*-cumárico com 3 moléculas de malonil-CoA seguida de descarboxilação e condensação de aldol para a formação do segundo anel aromático, processos mediados pela estilbeno sintase. Os flavonoides são sintetizados pela condensação do ácido *p*-cumárico com 3 moléculas de malonil-CoA, seguida de descarboxilação e condensação de

claisen para a formação do segundo anel aromático, processos mediados pela chalcona sintase (Dewick, 2009).

As chalconas são a primeira de uma série de classes de flavonoides sintetizadas pelos organismos que possuem as enzimas da via do ácido chiquímico. A partir da chalcona pode ocorrer o ataque da hidroxila à dupla ligação na posição 3, formando um ciclo de 5 unidades, produzindo as auronas, ou na posição 2, formando um ciclo de 6 unidades (anel C), produzindo as flavanonas. As flavanonas podem ser reduzidas formando uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, originando as flavonas, ou sofrer uma hidroxilação na posição 3, produzindo os dihidroflavonóis. A partir dos dihidroflavonóis, pode ocorrer a formação de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, originando os flavonóis, ou sofrer uma redução no grupo ceto do anel C, produzindo uma hidroxila e formando os flavandióis. Os flavandióis podem sofrer uma redução, formando as catequinas, ou uma hidroxilação na posição 1 do anel C, seguida de duas desidratações e originar as antocianidinas, que, ao serem reduzidas, também formam catequinas (Dewick, 2009).

Outra classe de metabólitos sintetizados utilizando como precursor as flavanonas, são os isoflavonoides, comuns em espécies de Fabaceae, na qual, através de ação enzimática, há uma troca de posição do anel aromático B, que passa a se ligar na posição 3 do anel C (Dewick, 2009).

Os flavanolignoides são metabólitos secundários produzidos pelo acoplamento oxidativo de derivados de ácido cinâmico com flavonoides, comum em espécies de Asteraceae (Dewick, 2009).

A figura 6 representa uma esquematização simplificada da biossíntese dos estilbenos e flavonoides sintetizados pelas vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato.

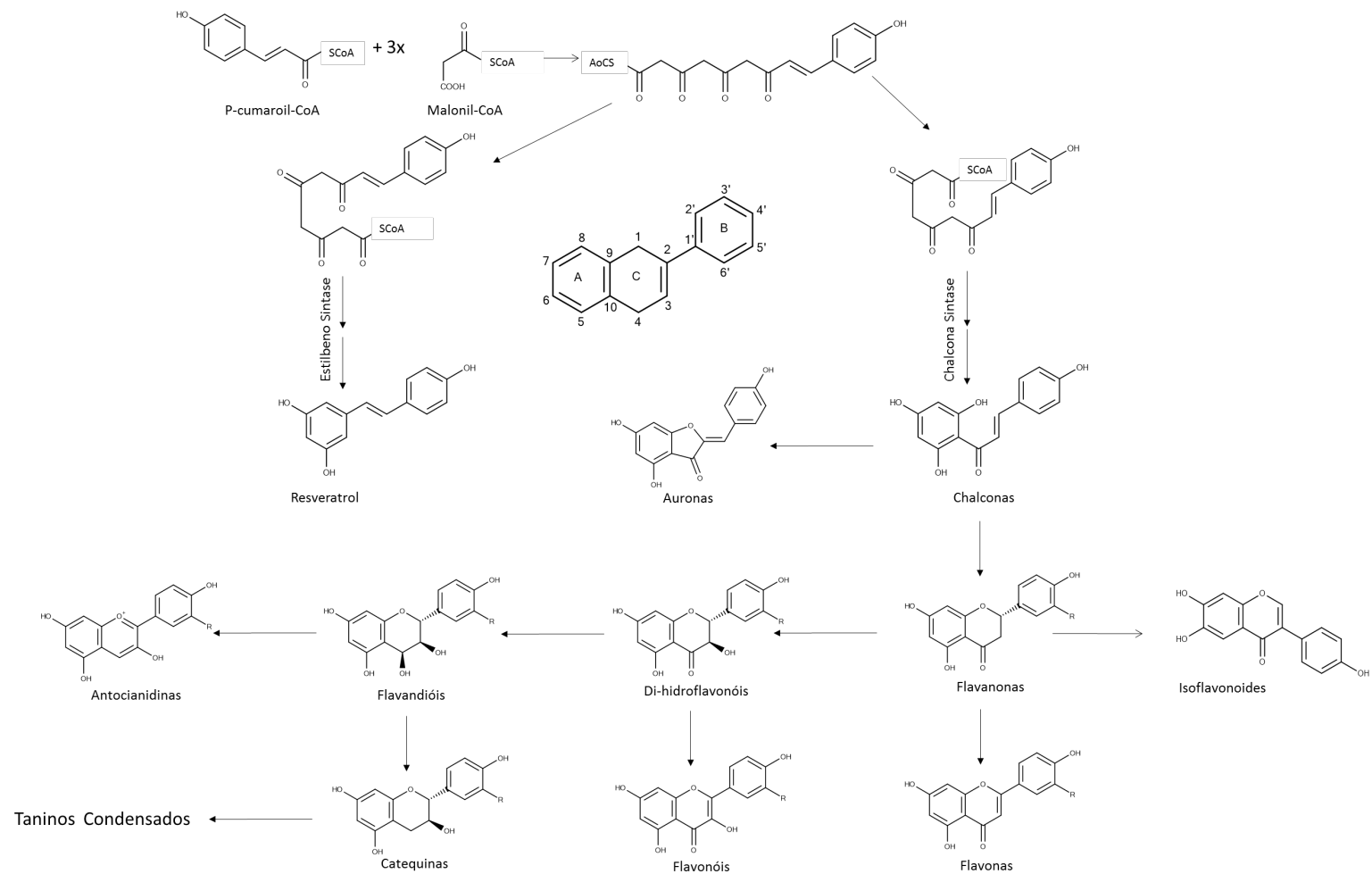


Figura 6: Esquematização simplificada de biossíntese dos estilbenos e flavonoides, com a representação do núcleo principal dos flavonoides e a respectiva numeração de seus carbonos. Adaptado de Dewick (2009).

Outra classe dentre os metabólitos secundários que merece destaque é a dos compostos nitrogenados, como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e os alcaloides (Kutchan et al., 2015).

Os glicosídeos cianogênicos são  $\beta$ -glicosídeos de  $\alpha$ -hidroxinitrilas, dos quais a aglicona é sintetizada a partir de cinco aminoácidos principais: a valina, a leucina, a isoleucina, a tirosina e a fenilalanina, que posteriormente podem sofrer modificações através de hidroxilações. Em sua forma glicosilada não são tóxicos, mas quando entram em contato com enzimas do tipo glicosidases, a sua glicose é clivada liberando a aglicona que rapidamente é decomposta em uma cetona ou aldeído e um cianidreto (HCN). O HCN, quando entra na corrente sanguínea, é convertido em íon cianeto e transportado pela hemoglobina até o interior das células, onde possui uma grande afinidade pelo citocromo c oxidase, impedindo a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, causando uma “asfixia celular” (Kutchan et al., 2015).

Os glicosinolatos são compostos nitrogenados com um átomo de carbono central ligado a um enxofre com um açúcar e por um nitrogênio com um grupo oxima sulfonada, sendo que o carbono central também está ligado a um grupo lateral definido pelo aminoácido de qual se origina, podendo ser a alanina, metionina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e triptofano. Assim como os glicosídeos cianogênicos, em sua forma glicosilada não são tóxicos, mas ao reagirem com enzimas do tipo tioglicosidases (mirosinases) a glicose é clivada em sua ligação com o enxofre e pode liberar diversos subprodutos que são tóxicos aos herbívoros de pequeno porte, como tiocianatos, isotiocianatos e nitrilas (Kutchan et al., 2015).

Os alcaloides podem ser considerados a classe de compostos nitrogenados mais importante do ponto de vista farmacológico, sendo que foram muito utilizados ao longo da história e até hoje são prescritos como fármacos para o tratamento de diversas enfermidades ou como modelos para a síntese de novas drogas. Para as plantas, são importantes como compostos de defesa contra o ataque de herbívoros e patógenos. São substâncias nas quais o nitrogênio é derivado de um aminoácido precursor e mantêm em sua estrutura tanto o nitrogênio quanto parte da estrutura carbônica do aminoácido, sendo que o restante é proveniente de outras rotas biossintéticas (Dewick, 2009).

Uma das classificações mais comuns dos alcaloides é de acordo com o aminoácido que o originou, sendo a L-ornitina, a L-lisina, o L-ácido aspártico, a L-histidina, a L-tirosina, o L-triptofano e o ácido antranílico os aminoácidos precursores da maior parte dos alcaloides conhecidos (Dewick, 2009).

### 1.3. Relações oxidativas

Como consequência do surgimento de organismos fotossintetizantes a concentração de oxigênio atmosférico aumentou consideravelmente. Como resultado desse advento, surgiram organismos que evoluíram mecanismos fisiológicos para usar oxigênio na produção de energia e, paralelamente, desenvolveram mecanismos fisiológicos para proteção contra os efeitos das espécies reativas (ER) produzidas por esse metabolismo (Constantini et al., 2010).

Evidências demonstram que as ER, associadas com baixos níveis de vitaminas A, C, E e níveis reduzidos de enzimas que capturam e eliminam essas espécies, causam um aumento no estresse oxidativo do corpo humano (Velloso et al., 2007), culminando com o surgimento de diversas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Sousa et al., 2007; Pisoschi e Pop, 2015). O aparecimento dessas doenças está relacionado com o aumento da expressão de genes da oncogene, a geração de compostos mutagênicos, promoção da atividade aterogênica, aparecimento de placas senis e ocorrência da inflamação (Pisoschi e Pop, 2015).

Os tipos mais comuns de ER são as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o radical peroxila ( $LOO^{\cdot}$ ); e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN's), como o Óxido Nítrico (NO) e o Dióxido de Nitrogênio ( $NO_2$ ). Dentre essas ER temos os Radicais Livres, definidos como quaisquer átomos ou moléculas contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, tornando-os altamente reativos e capazes de reagirem com qualquer substrato, assumindo uma função oxidante ou redutora de elétrons, sendo que o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares é o radical hidroxila (Shami e Moreira, 2004; Nunes et al., 2012). Os três principais substratos sobre os quais os radicais livres reagem são os lipídios, por peroxidação lipídica, o DNA e as proteínas, através de sua oxidação (Constantini et al., 2010).

Segundo Niki (2009), a peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que tem início quando uma espécie reativa abstrai um hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado, originando radicais carbônicos, para em seguida sofrer a adição de oxigênio e formar o radical peroxila. O dano aos lipídios começa a se propagar quando o radical peroxila captura o hidrogênio de outro ácido graxo polinsaturado, recomeçando a reação e formando o hidroperóxido de lipídio (LOOH) que, através de reações com metais de transição, irá se quebrar em uma variedade de compostos, como álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos (Niki, 2009; Antolovich et al., 2001). Um esquema contendo as reações de peroxidação lipídica está representado na figura 7. A peroxidação lipídica induz à perda de integridade, fluidez e permeabilidade de membranas celulares; modifica as lipoproteínas de

---

baixa densidade (LDL) e os subprodutos da quebra dos hidroperóxidos são tóxicos e potencialmente mutagênicos e carcinogênicos (Niki, 2009).

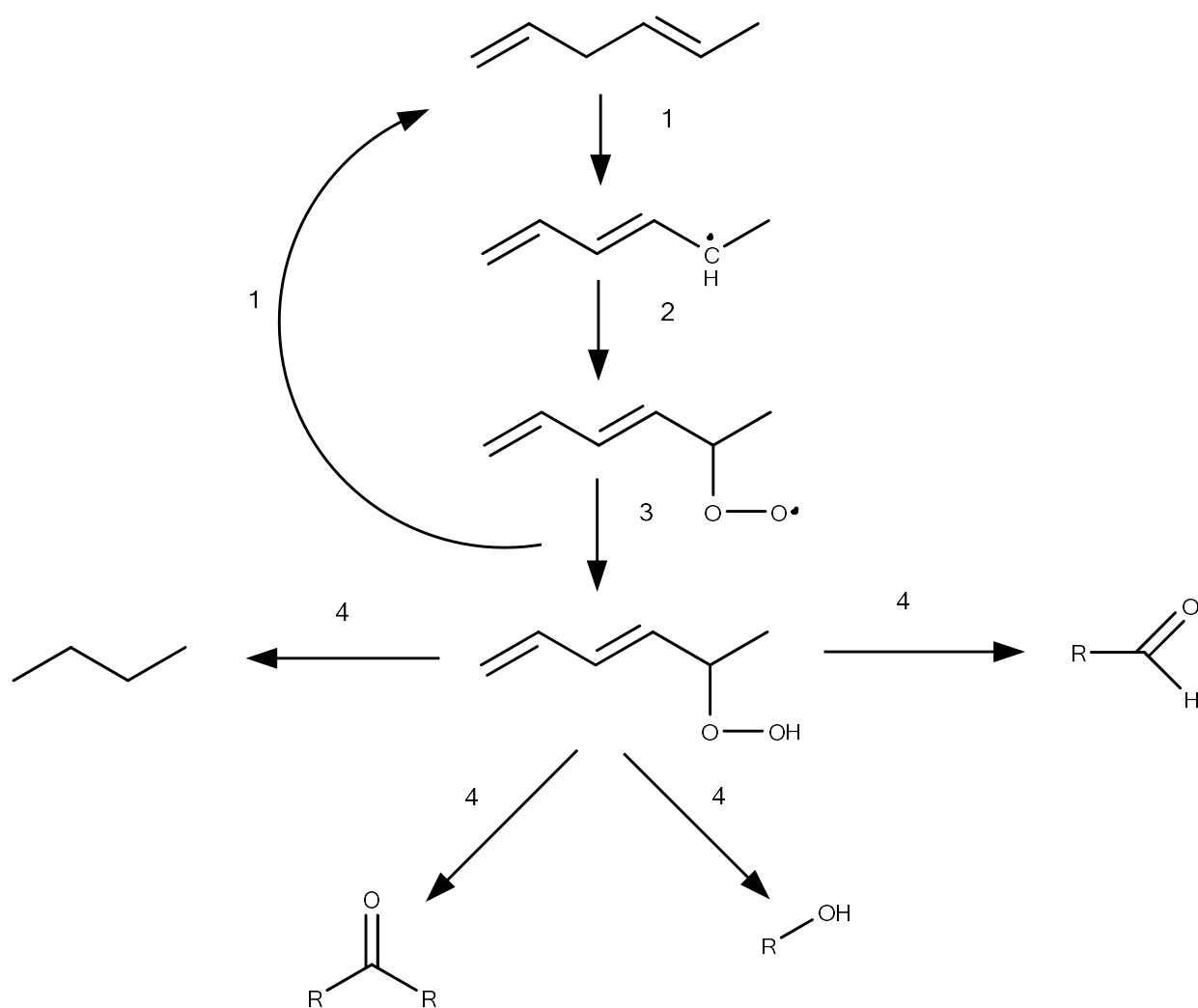


Figura 7: Esquema da reação em cadeia de peroxidação lipídica; o ácido graxo polinsaturado perde um hidrogênio para uma espécie reativa (1), originando um radical carbônico que sofre a adição de oxigênio (2), formando o radical peroxila que captura o hidrogênio de outro ácido graxo (3), reiniciando o ciclo e produzindo o hidroperóxido de lipídio, este, por sua vez, se fragmenta em diversos subprodutos (4), como hidrocarbonetos, cetonas, álcoois e aldeídos. Adaptado de Dotan et al. (2004).



O dano ao DNA, frente a uma espécie reativa, pode ocorrer de cinco formas diferentes: pela oxidação das bases nitrogenadas (Cadet et al., 2010), pela oxidação de locais não inseridos na base, pela oxidação entre as ligações das duplas fitas, da quebra das fitas (Ravanat et al., 2014) e da interferência entre as ligações com as proteínas de reparo (Sallmyr et al., 2008). Todos esses mecanismos de ação levam a processos mutagênicos e carcinogênicos que podem culminar com o aparecimento de várias doenças associadas à velhice (Cadet et al., 1999).

Segundo Chakravarti e Chakravarti (2007), as proteínas podem sofrer danos frente a uma espécie reativa de duas formas: diretamente, quando a espécie reativa oxida a proteína; e indiretamente, quando subprodutos de outras reações mediadas por espécies reativas, como da peroxidação lipídica, reagem com as proteínas. Os mecanismos de danos às proteínas são a oxidação do grupo tiol, carbonilação, oxidação da cadeia lateral, fragmentação, desdobramento e alteração da conformação da proteína (Pisoschi e Pop, 2015). Essas reações fazem com que as cadeias laterais e as ligações peptídicas das proteínas se modifiquem e, portanto, tenham a sua atividade inibida, causando alterações na atividade celular (Pisoschi e Pop, 2015).

Apesar de nos humanos o excesso de ER ser causador de diversas doenças, a formação de radicais livres é um processo fisiológico que cumpre funções biológicas importantes. A sua geração ocorre, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, sendo a primeira, por meio da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte geradora, tanto de energia quanto de ER. Apesar de ser um processo natural, alguns fatores exógenos podem aumentar a produção dessas ER, tais como os xenobióticos, radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo e ingestão de álcool (Barbosa et al., 2010).

Como forma de proteção e redução dos efeitos das ER existem substâncias denominadas antioxidantes. Por definição, antioxidantes são quaisquer compostos que em pequenas concentrações em comparação com o substrato, são capazes de atrasar ou prevenir a oxidação do substrato (Pisoschi e Pop, 2015). Geralmente são classificados em dois tipos: os enzimáticos, produzidos pelo nosso organismo e os não enzimáticos, adquiridos através da nossa dieta. Esses compostos podem agir de três formas diferentes, a preventiva, se caracterizando pela proteção contra a formação de substâncias agressoras, através de diversos processos como a quelatação de íons metálicos; a de interceptação, caracterizada pela captura das ER antes que elas causem dano aos substratos; e a de reparo (Santos e Cruz, 2001; Niki, 2010).

Como antioxidantes enzimáticos podemos citar a enzima superóxido dismutase (SOD), que reage com  $O_2^{\cdot-}$  convertendo-o em oxigênio e  $H_2O_2$ , que pode ser convertido em água e oxigênio pela ação da enzima catalase (Huang et al., 2005; Pisoschi e Pop, 2015); a glutathione peroxidase, peroxiredoxina, tioredoxina, e redutase, todas responsáveis por catalisarem a redução do  $H_2O_2$  e

---

hidroperóxidos em água ou álcoois (Pisoschi e Pop, 2015). Há outros tipos de antioxidantes endógenos que podem agir sobre diversos tipos de ER, como os tióis, que interagem com a maioria das ER fisiológicas; o ácido úrico, responsável pela captura do oxigênio singlete e os radicais peroxila e hidroxila; a bilirrubina, protetora contra a peroxidação lipídica, a melatonina, que captura radicais oxigenados e nitrogenados; e proteínas queladoras de metais (Pisoschi e Pop, 2015). Apesar dessa variedade de antioxidantes endógenos que nosso organismo possui, pessoas em estado de estresse oxidativo podem necessitar de antioxidantes exógenos e, justamente por isso é necessária a ingestão de alimentos que possuam substâncias antioxidantes não enzimáticas em nossa dieta (Huang et al., 2005; Pisoschi e Pop, 2015).

Os antioxidantes não enzimáticos são adquiridos através da alimentação, principalmente de verduras, frutas e legumes, e entre eles podemos citar as vitaminas C, A e E, os compostos fenólicos e os carotenoides. Os antioxidantes mais comumente encontrados nas plantas são os compostos fenólicos, dentre os quais os mais estudados são o ácido gálico e os flavonoides, como a quercetina, a miricetina e a rutina. Os flavonoides atuam tanto em compartimentos celulares lipofílicos quanto hidrofílicos (Cerqueira et al., 2007; Procházková et al., 2011; Nunes et al., 2012).

Testes *in vitro* têm demonstrado a importância de dietas ricas em frutas e vegetais pela presença de antioxidantes que ajudam no combate às ER, que em consumo moderado, são benéficos à saúde humana (Nunes et al., 2012). Em contrapartida alguns testes *in vitro* e *in vivo* demonstram que, em certas condições e concentrações erradas, algumas das substâncias com efeitos antioxidantes podem apresentar o efeito contrário, de pró-oxidante, sendo necessários mais estudos para estabelecer o papel desses compostos na prevenção de doenças (Cerqueira et al., 2007; Procházková et al., 2011).

#### 1.4. Ataques microscópicos

Antimicrobianos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias; no caso de bactérias podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte de microrganismos, ou bacteriostáticos, quando inibem o seu crescimento (Guimarães et al., 2010).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de doenças (CDC, 2015), localizado em Atlanta, EUA, agentes antimicrobianos têm sido usados desde a década de 1940 para o tratamento de doenças infecciosas e, quando usados de maneira correta, trazem enormes benefícios. Contudo, o seu uso intensivo, associado ao uso dessas substâncias em animais para o abate, fez com que os microrganismos patogênicos adquirissem resistência a uma ou diversas classes de agentes antimicrobianos. O uso prolongado da terapia antimicrobiana pode levar ao desenvolvimento da resistência em um microrganismo que inicialmente era sensível ao antibiótico, mas que, com o tempo, gradualmente se adapta e desenvolve mecanismos de resistência a determinado antibiótico (Giedraitienė et al., 2011).

Desde o final da década de 1980 houve poucas descobertas de novas classes de antibióticos (Silver, 2011), sendo que em relação a bactérias Gram-positivas poucos antibióticos foram disponibilizados, mas em relação a bactérias Gram-negativas nenhum antibiótico foi disponibilizado nos últimos 40 anos (Brown, 2015). Este fato, associado à aquisição de resistência a parte desses antibióticos por bactérias patogênicas comuns como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella spp*, *Shigella sp.*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycobacterium tuberculosis*, agravam esse quadro mundial, pois doenças infecciosas representam uma das maiores causas de mortes, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Apesar dos países desenvolvidos terem mecanismos eficientes de controle dessas doenças, como vacinação e terapia com antibióticos, a cada ano, novas doenças infecciosas surgem e as que estavam sob controle estão se tornando resistentes aos medicamentos (Davies, 2011).

Relatórios recentes do *World Economic Forum Global Risks* listaram a resistência antibiótica como uma das grandes ameaças à saúde humana. É estimado que, na Europa, cerca de 25.000 pessoas morrem todos os anos devido a infecções causadas por bactérias resistentes a uma miríade de antibióticos e que isso custa à economia da União Europeia € 1,5 bilhões anualmente. Nos Estados Unidos da América, anualmente, mais de 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes; como consequência deste fato, há cerca de 23.000 mortes por ano (Blair, et al., 2014). O índice de resistência de bactérias Gram-negativa e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ultrapassa os 50% em 5 das 6 regiões mundiais da Organização Mundial da

---

Saúde, sendo que nos EUA a MRSA causou 80.000 infecções e 11.000 mortes em 2011, um índice muito alto (Calcoen et al., 2015).

Ironicamente o quadro se agrava conforme a medicina avança em outras áreas e, conseqüentemente, aumenta a expectativa de vida da população, criando indivíduos idosos vulneráveis a infecções, principalmente devido à imunodepressão causada pelo tratamento de câncer comum nessa faixa etária e de pessoas transplantadas (Davies, 2011). Além de bactérias resistentes a medicamentos, temos encontrado doenças causadas por outros tipos de patógenos adquirindo resistência, como *Plasmodium* sp. e Influenza (WHO, 2014). Essa resistência é causada pelo uso indiscriminado e sem conhecimento desses medicamentos, pois muitas vezes são tomados sem a necessidade real (Daza-Pérez, 1998).

Um importante motivo para a ocorrência de novas infecções causadas por microrganismos resistentes se deve à falha de muitos hospitais ao aplicar medidas de controle de infecções dentro de sua própria instituição assim como fora dela, sendo que as bactérias causadoras de muitas infecções hospitalares e nas comunidades em torno dela, são geneticamente relacionadas (Giedraitienė et al., 2011).

Entre os anos de 1980 e 2000, poucos novos protótipos de antibióticos foram descobertos, sendo que as principais ferramentas usadas para a sua descoberta foram a genômica e a triagem de coleções de compostos, enquanto que as triagens de compostos naturais foram pouco utilizadas. Esse quadro está sendo revertido nos últimos anos, pois algumas empresas farmacêuticas têm retomado essa última estratégia de procura (Guimarães et al., 2010), sendo que produtos derivados de microrganismos e de plantas ocupam a maior parte dos compostos antimicrobianos descobertos até o momento, devido à produção de substâncias com grande diversidade estrutural (Balouiri et al., 2016). Quando consideramos as MRSA, de 1995 a 2014, 276 projetos de pesquisa de antibióticos foram realizados, com uma taxa de sucesso de 4,6%, resultando na descoberta de 9 antibióticos; um pertencendo a uma nova classe, a das oxazolidinonas, uma situação não muito otimista já que a resistência a uma substância de uma determinada classe pode inferir na resistência a todos os produtos dessa classe (Calcoen et al., 2015).

Segundo Brown (2015), os antibióticos podem ser classificados pelo seu mecanismo de ação. Segundo essa classificação, temos substâncias inibidoras de síntese de ácido nucleico (Quinolonas), disruptoras da membrana plasmática (Polimixinas), inibidoras da RNA polimerase (Rifamicinas), inibidoras de síntese de proteínas (Macrolídeos e Tetraciclinas), inibidoras da síntese de folatos (Sulfonamidas) e inibidoras de síntese de parede celular (Penicilinas e  $\beta$ -lactâmicos). A resistência a antibióticos pode ocorrer por dois mecanismos: através de mutações aleatórias durante a replicação do DNA, ou através da transferência de plasmídeos; o grande problema se deve ao fato

---

de que a resistência à determinada classe de antibiótico pode conferir resistência aos que possuem o mesmo sítio de ação (Brown, 2015). Justamente por esse fato se tem necessidade de descobrir novas substâncias que atuem por mecanismos diferentes dos fármacos em uso (Guimarães et al., 2010).

Uma das classes de produtos naturais que possui um efeito moderado de atividade antimicrobiana é a dos flavonoides; apesar do seu efeito não ser tão alto, seu esqueleto pode servir como base para modificações estruturais que possam aumentar a sua atividade (Cushnie e Lamb, 2005). Alguns compostos fenólicos também podem agir sinergicamente com antibióticos já utilizados, de forma que esses produtos naturais bloqueiem a ação do mecanismo de resistência e permitam a ação do antibiótico (Hemaiswarya et al., 2008), como é o caso do galato de epigalocatequina que inibe  $\beta$ -lactamases (Hu et al., 2001), inibe a penicilinase (Zhao et al., 2002) e que bloqueia bombas de efluxo (Roccaro et al., 2004) e da baicalina, uma flavona glicosilada que inibe as  $\beta$ -lactamases (Liu et al., 2000).

Terpenoides também possuem ação sinérgica com antibióticos, principalmente bloqueando bombas de efluxo, como os diterpenoides ácido carnósico, encontrado em *Rosmarinus officinalis* L. (Oluwatuyi et al., 2004), ácido isopimárico (Simonetti et al., 2004) e os diterpenos de *Lycopus europaeus* L., também pertencente à Lamiaceae (Gibbons et al., 2003).

Diante desse quadro, Dias et al. (2012) propõem que uma combinação de técnicas metabolômicas com processos de descobertas de produtos naturais será extremamente benéfica para a descoberta de novas drogas. Esforço que já vem sendo feito, pois dos 40 compostos que em 2011 estavam em testes clínicos, 20 são derivados de produtos naturais (Butler e Cooper, 2011). Brown (2015), também propõe a combinação de novas substâncias descobertas, ou até mesmo substâncias conhecidas com baixa atividade antimicrobiana, em combinação com antibióticos já utilizados, mas que atualmente são ineficientes contra determinadas bactérias que adquiriram resistência; dessa forma a primeira iria inibir o mecanismo de resistência da bactéria enquanto o antibiótico a eliminaria. Com isso a possibilidade do uso de produtos naturais para combater a infecção de microrganismos seria ampliada, aumentando a importância de pesquisas direcionadas nessa área.

### 1.5. Mundo Viral

A AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) é uma patologia que afeta o mundo inteiro. Segundo estimativas da UNAIDS (2013), cerca de 35,3 milhões de pessoas vivem com essa doença, demonstrando um incremento em relação aos anos anteriores; desses casos 2,3 milhões são recentes e 1,6 milhões de portadores faleceram em decorrência de doenças oportunistas. O Brasil não demonstra um quadro muito diferente segundo o Ministério da Saúde (2012), de 1980 a 2012, foram notificados um total de 656.701 casos de AIDS; nesse mesmo período o caso de óbitos por doenças oportunistas foi de 253.706.

A AIDS também preocupa países desenvolvidos como os EUA. Com base nessa preocupação e visando diminuir a incidência de novos casos de AIDS e, quando ocorrerem, permitir que todas as pessoas, independentemente de idade, orientação sexual, etnia, gênero, identidade de gênero, ou condição sócio-econômica, tenham acesso a tratamento de qualidade, livre de estigmas e discriminação, o governo dos EUA criou a “Estratégia Nacional dos Estados Unidos da América contra o HIV/AIDS” (*National HIV/AIDS Strategy for United States: Updated to 2020*), sendo uma das ações em 2013, um aumento de verba de US\$ 100 milhões para pesquisas de tratamento e cura da AIDS (ONAP, 2015).

A AIDS é causada por um vírus de genoma composto por RNA, denominado HIV, pertencendo à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus*. Ao entrar no organismo, o vírus se liga a receptores CD4 presentes na superfície dos linfócitos T, sofre uma mudança conformacional e se liga a dois receptores de quimiocinas. Após a ligação, entra na célula através da fusão da membrana viral com a membrana plasmática e libera o complexo pré-integração, proporcionando o começo da infecção. Esse complexo é levado em direção aos nucleoporos através da rede de microtúbulos. O próximo passo é o início da fase de replicação viral, caracterizada pela transcrição do RNA em DNA viral, mediada pela ação da enzima transcriptase reversa, este último, por sua vez, será levado ao núcleo da célula e se integrará, pela ação da enzima integrase, ao DNA da célula hospedeira. Esta inicia a produção de polipeptídios virais que serão transportados ao citoplasma da célula hospedeira e serão clivados pelas proteases virais em proteínas maduras, as quais, juntamente com outros componentes celulares, serão incorporadas em vírions ativos e infectantes (Peterlin e Trono, 2003). O vírus é encontrado em altas concentrações no sangue e no sêmen, sendo que outros fluidos corporais, como saliva e lágrimas, também apresentam o vírus, mas evidências de sua transmissão por esses fluidos são escassas (Daniyal et al., 2016). São sobre essas três enzimas, protease, transcriptase reversa e integrase, e sobre os receptores celulares que os antiretrovirais agem (Costa, 2009).

Atualmente, a terapia inicial consiste em uma combinação de pelo menos três medicamentos: dois Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR), associados com uma terceira droga, que pode ser um Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INNTR), um Inibidor de Protease (IP) ou um Inibidor de Integrase (Thompson et al., 2012; Lee et al., 2014). Atualmente o FDA (Food and Drug Administration, 2016) possui 24 medicamentos aprovados para o uso na terapia antiretroviral. Desses, 7 são INTR, 4 INNTR, 8 IP, 3 Inibidores de Integrase, 1 inibidor de fusão (bloqueia a entrada do vírus nas células CD4), 1 inibidor de entrada (bloqueia as proteínas das células CD4 que se conectam ao vírus) e 1 intensificador farmacocinético (aumenta a efetividade da terapia), sendo que a melhor combinação para a terapia é definida pelo médico responsável de acordo com cada paciente.

Os INTR usados são o abacavir, didanosine, emtricitabine, lamivudine, stavudine, fumarato de tenofovir disoproxil e zidovudine (AZT); os INNTR são o efavirenz, etravirine, nevirapine e rilpivirine; os inibidores de protease são o atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir e tipranavir; os inibidores de integrase são o dolutegravir, elvitegravir e o raltegravir; o inibidor de fusão é o enfuvirtida; o inibidor de entrada é o maraviroque; e o intensificador farmacocinético é o cobicistat (FDA, 2016).

Muitas drogas derivadas de produtos naturais também demonstraram um grande potencial para utilização como agente antiretroviral. O MPC-4326, um terpenoide derivado do ácido betulínico, inibe a maturação do vírus impedindo a clivagem de parte da proteína em IC<sub>50</sub> de 10 nM. Porém, os testes clínicos em fase 2 com esse composto foram descontinuados pela empresa farmacêutica responsável por estratégia de negócios e por não ser eficaz em HIV que apresenta polimorfismo de ocorrência natural (Adamson, 2012; NIH, 2015<sup>a</sup>).

A carragenana, um sacarídeo comumente encontrado em algas vermelhas, demonstrou atividade antiviral pela aplicação de um gel vaginal e bloqueando a ligação à proteína gp120. Novamente, os testes clínicos foram suspensos durante a fase 3 por não ser efetivo em proteger as mulheres contra HIV adquirido em relações sexuais (Singh, et al., 2014; NIH, 2015<sup>b</sup>).

Apesar dos resultados positivos no tratamento, a cura da AIDS não foi atingida, devido aos vírus residentes nos Linfócitos T de memória não serem erradicados. Além disso, o HIV-1 apresenta uma considerável variação em pacientes devido à alta taxa de replicação viral, à alta quantidade de vírus presente no organismo e aos erros que ocorrem durante a replicação pela ação da RNA polimerase II do hospedeiro ou pela Transcriptase reversa, causando mutações que conferem um alto índice de resistência aos medicamentos utilizados nas terapias (Abram et al., 2010; Tang e Shafer, 2012). Esses dois motivos fazem com que os pacientes infectados com os vírus resistentes tenham poucas possibilidades de tratamento e risco aumentado de mortalidade,

---

aumentando a necessidade da descoberta e desenvolvimento de potenciais novos fármacos (Melo et al., 2006; Adamson, 2012; Tang e Shafer, 2012). Nesse cenário, substâncias provenientes de produtos naturais se tornam uma grande fonte de pesquisas. Alguns extratos e substâncias isoladas de plantas apresentam eficiência clínica comprovada na inibição das diversas fases de entrada e replicação do vírus, entre essas substâncias podemos citar os terpenos e os polifenóis (taninos, cumarinas e flavonoides) (Ferreira et al., 2010).

O diterpeno SJ23B, isolado de *Euphorbia hyberna* L., internaliza o receptor celular CD4 e os correceptores celulares CXCR4 e CCR5, impedindo a penetração do vírus; os polifénóis como a geraniina e corilangina, apresentam atividade bloqueadora de receptores celulares e inibidora da transcriptase reversa e da integrase; as cumarinas como os calanolídeos e os soulatrolídeos, possuem atividade inibidora da transcriptase reversa; a flavona baicalina apresenta atividade inibidora da transcriptase reversa; e o éster de fenilpropanoide ácido L-chicórico apresenta atividade inibidora da integrase (Ferreira et al., 2010). A proantocianidina A2, isolada de *Pometia pinnata* J. R. Forst & G. Forst, apresentou promissora atividade inibitória da HIV-1 integrase (Suedee et al., 2013).

Muitos extratos de plantas também possuem atividade anti-HIV, como o extrato da raiz de *Pelargonium sidoides* DC., que possui uma alta atividade contra a fusão do vírus, apresentando IC<sub>50</sub> de 8,0 µg mL<sup>-1</sup> (Helfer et al., 2014). Os extratos etanólicos de 3 plantas medicinais tradicionalmente utilizadas na Tailândia apresentaram boa atividade inibidora da integrase, com concentrações inibitórias promissoras para futuras investigações, entre elas *Pometia pinnata* J.R. Forst. & G. Forst (IC<sub>50</sub> 8,8 µg mL<sup>-1</sup>), *Averrhoa carambola* L. (IC<sub>50</sub> 47,6 µg mL<sup>-1</sup>) e *Garcinia cowa* Roxb. Ex DC. (IC<sub>50</sub> 75,5 µg mL<sup>-1</sup>) (Suedee et al., 2013).



### 1.6. Potencial brasileiro na prospecção de novos fármacos

Lamiaceae é caracterizada por possuir plantas de porte herbáceo, arbustivo ou arbóreo, frequentemente aromáticas (com grande abundância de óleos voláteis). Em corte transversal o caule geralmente apresenta formato quadrangular. Seus representantes apresentam folhas opostas, geralmente decussadas; inflorescências geralmente compostas de cimeiras terminais ou axilares, com flores bissexuadas, comumente zigomorfas, com 2 ou 4 estames e filetes adnatos à corola; geralmente possuem 2 carpelos, com ovário súpero e 2 óvulos por carpelo; o disco nectarífero geralmente é presente; fruto em forma de drupa ou esquizocarpo e endosperma escasso ou ausente (Silva-Luz et al., 2012).

Possui cerca de 7.200 espécies agrupadas em cerca de 240 gêneros (Pastore, 2010), com distribuição cosmopolita, mas ocorrendo principalmente em regiões com clima mediterrâneo, como no Oriente Médio e nas montanhas tropicais. São de grande interesse econômico por possuírem óleos voláteis usados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (Judd et al., 2002). No Brasil há vários centros de diversidade dessa família, como: Sul do Brasil; campos de altitude da Serra do Mar; Cerrado do Planalto Central; e os campos rupestres da Serra do Espinhaço. Apesar da sua importância econômica, no Brasil, as espécies são pouco utilizadas em escala comercial, apesar de seu cultivo ser mais fácil em comparação com as espécies de ocorrência na Europa (Harley, 1996).

Segundo Pastore (2010), esta família está dividida em 7 subfamílias: Ajugoideae, Lamioideae, Protantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae, Viticoideae e Nepetoideae, sendo que esta última está dividida em três tribos (Elsholtzieae, Mentheae e Ocimeae). Nesta última subfamília ocorrem as espécies com maior interesse econômico devido à presença de óleos voláteis. A tribo Ocimeae é dividida em sete subtribos, uma delas Hyptidinae (Zhong et al., 2010), dentro da qual se localiza o gênero *Hyptis* Jacq., neste estudo representado pela espécie *Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth..

*Hyptis* é caracterizado por possuir plantas com porte arbustivo, subarbustivo ou herbáceo, perene ou anual, fortemente aromáticas, caule quadrangular, folhas com diversos padrões de venação, inflorescências em capítulos e flores com 4 estames epipétalos e ovário 4-lobado (Silva-Luz et al., 2012). Em estudo recente de Harley e Pastore (2012), com base em dados moleculares, os autores propõem a monofilia do gênero após nova circunscrição, com cerca de 144 espécies incluídas em 10 seções. *Hyptis* apresenta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, desde a América do Norte até o Caribe e ao Sul até a Argentina, com poucas espécies no Velho Mundo. As duas espécies mais estudadas fitoquimicamente, *H. pectinata* (L.) Poit e *H. suaveolens* Poit., atualmente estão posicionadas em *Mesosphaerum* P. Browne (Harley e Pastore, 2012).

---

Na região Nordeste do Brasil, muitas espécies de Hyptidinae são usadas na medicina popular para tratamento de diversas doenças, como gripe e constipação (*Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore), doenças respiratórias (*Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore), perturbações estomacais e intestinais (*Medusantha martiusii* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore), cólicas e doenças hepáticas (*Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze), perturbações nasais e auriculares (*Mesosphaerum sidifolium* (L'Hérit) Harley & J.F.B. Pastore) e para combater Febre (*Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze) (Agra et al., 2008). Com algumas dessas espécies apresentando efeitos medicinais comprovados, como *Eplingiella fruticosa* (efeito antinociceptivo) (Silva et al. 2006); *Gymneia interrupta* (Pohl ex. Benth) Harley & J.F.B. Pastore (efeito antifúngico) (Oliveira et al. 2004); e *Medusantha martiusii* (contra *Staphylococcus aureus*) (Coutinho et al. 2008).

Em *Mesosphaerum suaveolens*, foram encontrados diterpenos, com efeitos antimicrobiano, antifúngico, antitumoral, hipoglicemiante, hipotensivo, vasodilatador, espasmogênico e, contraditoriamente, espasmolítico. Em *Mesosphaerum pectinatum* foram encontrados diversos terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas e triterpenos), tendo essa espécie apresentado efeitos moluscicida, antimicrobiano, antiedematogênico, antinociceptivo (Basílio et al., 2006) e, mais recentemente, efeito contra a Leishmaniose (Falcao et al., 2013), efeito anti-inflamatório e contra diversas doenças bucais (Falcao et al., 2016).

Com relação às espécies de *Hyptis*, segundo a nova circunscrição de Harley e Pastore (2012), algumas poucas foram estudadas fitoquimicamente e com relação ao seu potencial biológico. *Hyptis atrorubens* Poit. é utilizada na medicina tradicional de diversos países como antimicrobiano, principalmente para o tratamento de dermatites, pé-de-atleta, dor de garganta e resfriado (Abedini et al., 2013). Em testes *in vitro* o seu extrato apresentou atividade citotóxica contra uma linhagem de células de leucemia e atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Abedini et al., 2013).

*Hyptis brevipes* Poit. é muito utilizada na medicina tradicional de diversos países para o tratamento de infecções gastrointestinais, cólicas, dores, perturbações da pele (Correa, 1931), asma, malária (Adjanohoun et al., 1986) e repelente de mosquito (Seyoum et al., 2002). Os extratos de suas partes aéreas apresentaram potencial tóxico (Gupta et al., 1996), atividade antifúngica e antimicrobiana (Goun et al., 2003).

*Hyptis capitata* Jacq. é tradicionalmente usada em países asiáticos contra resfriado, febre e asma (Lee et al., 1988). Na espécie foram encontrados monoterpenos, sesquiterpenos (Thoppil e Jose, 1995), triterpenos, flavonoides e lignanas (Almtorp et al., 1991). Um triterpenoide encontrado

---

nessa espécie, o ácido oleanólico, inibiu a replicação de HIV, bem como outros triterpenoides, tais como os ácidos pomólico e ursólico (Kashiwada et al., 1998).

*Hyptis lacustris* é tradicionalmente usada pela tribo Yanesha do Peru para o tratamento de Uta de água, uma espécie de úlcera na pele com grande quantidade de material, com um aspecto aquoso e muito dolorido; conhecida pela sociedade como leishmaniose cutânea. Os Yanesha cortam a folha e aplicam o exsudato sobre a área afetada uma vez ao dia até a cura (Céline et al., 2009). Céline et al. (2009) verificaram, em ensaio realizado com amastigotas de *Leishmania amazonensis*, uso semelhante ao etnobotânico, sendo que o extrato etanólico das folhas de *H. lacustris* apresentou MIC<sub>50</sub> de 10 µg mL<sup>-1</sup> nesse ensaio.



---

## 2. Contextualização e Hipóteses do estudo

A biodiversidade tem sido cada vez mais reconhecida como um dos elementos centrais para o desenvolvimento e bem-estar da humanidade, devido ao seu potencial como matéria-prima para diferentes campos do conhecimento, como a medicina e diversos setores da indústria (Ferro et al., 2006; Sharma e Sarkar, 2013).

Segundo Simões e Schenkel (2002), o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado para o mundo de 350.000 a 550.000, mas com um número pequeno de pesquisadores dedicados aos estudos dessa biodiversidade, tanto que a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira possui somente 11 monografias de plantas nativas (25%) do total de 44 (Pupo e Gallo, 2007), criando uma situação paradoxal, pois as plantas brasileiras são consideradas altamente promissoras do ponto de vista medicinal, mas são pouco conhecidas.

Os estudos sobre as atividades farmacológicas de espécies vegetais se demonstram promissores ao obtermos dados de um aumento de 461% na procura de produtos à base de Kava-Kava (*Piper methysticum* G. Forst), com efeito ansiolítico, anestésico e anticonvulsivo e aumento de 190% para Hipérico (*Hypericum perforatum* L.) (Blumenthal et al., 2000).

Outro dado importante é que aproximadamente 15% das intervenções de drogas registradas na base de dados ClinicalTrials.gov são relacionadas a espécies vegetais, com 60% das fontes dessas substâncias pertencentes a 10 famílias taxonômicas (Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae, Rosaceae, Solanaceae, Poaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Brassicaceae e Amaryllidaceae) (Sharma e Sarkar, 2013). Esse é um número pequeno de estudos frente ao fato de que, de 1981 até 2014, 73% das drogas aprovadas no tratamento de doenças causadas por bactérias são derivados de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016). Essa importância também vem sendo reforçada pelo fato do Brasil possuir um programa que tem como princípio o uso sustentável da biodiversidade brasileira para a ampliação das opções terapêuticas do Sistema Único de Saúde – SUS (Ministério Da Saúde, 2009), aliado ao fato de que no Brasil o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 160 milhões por ano (Carvalho et al., 2008).

Esse número pequeno de investigações de produtos naturais pelas grandes empresas farmacêuticas pode ser devido à dificuldade e preocupação legítima ao acesso à biodiversidade, regulamentado pela Convenção da Diversidade Biológica das Nações Unidas, que prevê, entre outras normas, que: os países possuem direito soberano sobre os recursos genéticos de seu território; o acesso a esses recursos por instituições estrangeiras requer o consentimento prioritário da autoridade do país fonte; os benefícios do uso dos recursos genéticos devem ser compartilhados de maneira justa e igualitária com o país fonte; o país fonte deve estar envolvido na pesquisa sobre

---

o recurso genético, quando possível, e se beneficiar de transferência de tecnologia (Harvey et al., 2015). Outra possível dificuldade está associada ao repetido isolamento de compostos conhecidos, já que a sua concentração nas plantas é geralmente baixa, ou de sintetizá-los durante a manufatura farmacêutica (Harvey et al., 2015; Atanasov et al., 2015), além da variação de sua concentração ser dependente das condições ambientais e de solo durante a sua coleta, das relações com outros organismos em determinado ambiente e de seu armazenamento (Atanasov et al., 2015).

Devido a essas dificuldades, o interesse das empresas farmacêuticas por fármacos baseados em produtos naturais está declinando gradualmente, e essas pesquisas vem ficando restritas somente aos intitutos de pesquisa, universidades e a empresas emergentes (Atanasov et al., 2015).

Apesar dessas dificuldades, muitos compostos produzidos pelo uso de técnicas de química combinatória foram ineficazes na prática, por isso é reconhecida a importância da diversidade dentro de um espaço químico biologicamente relevante, sendo que coleções de produtos naturais exibem uma grande diversidade de farmacóforos e estereoquímica que contribuem para a descoberta de uma possível ação medicinal (Harvey et al., 2015).

Alguns dos problemas relacionados à utilização de produtos naturais na indústria farmacêutica podem ser revertidos através de diversas técnicas, como a semi-síntese a partir de um precursor mais comum, bioengenharia, cultivo das espécies medicinais, cultura de células e cultura de tecidos (Atanasov et al., 2015), talvez estimulando o interesse das grandes empresas farmacêuticas. Interesse esse que mostra uma tendência em seu aumento nesses últimos anos (Newman e Cragg, 2016).

Com base nesses dados, por ser uma planta nativa do Brasil e por pertencer a uma subtribo já relatada por suas atividades biológicas, o presente trabalho tem por meta estudar o potencial biológico de *Hyptis lacustris* A.St.-Hil. ex Benth., pois pouco se sabe sobre sua composição química e atividades biológicas. Assim como outras espécies pertencentes à Lamiaceae, *Hyptis lacustris*, espécie de ocorrência na Mata Atlântica, deve apresentar em sua composição, substâncias fenólicas e terpenoides com potencial biológico, em especial, antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos gerais

Estudar o potencial biológico de *Hyptis lacustris* e contribuir para o conhecimento da química do gênero, gerando subsídios para posterior utilização de substâncias biologicamente ativas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV-1, *in vitro*, do extrato e frações produzidos a partir de folhas e eixos caulinares de *Hyptis lacustris*.
- Avaliar o potencial antimicrobiano de isolados obtidos a partir da fase hexânica do extrato bruto de *Hyptis lacustris*.





## 4. Material e métodos

### 4.1 Produção dos extratos e triagem fitoquímica

Folhas e eixos caulinares de *H. lacustris* foram coletados na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, no município de Santo André-SP, nas coordenadas 23° 46' 25" S e 23° 40' 18" W, na altitude de 786 m, em 23/07/2014. Amostras testemunhas foram coletadas para confecção de exsicata identificada pela pesquisadora Cintia Luíza da Silva-Luz (Silva-Luz 296), sendo depositada no Herbário da Universidade de São Paulo (SPF).

O material vegetal foi seco em estufa a 60 °C com ventilação forçada por 1 semana. O material seco foi triturado em moinho de facas e o pó obtido extraído por maceração em etanol 70% na proporção de 1 g de material vegetal moído para 6 mL de solvente, por sete dias à temperatura ambiente, com troca de solvente a cada dois dias. O extrato bruto hidroetanólico (EE) foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado para obtenção do rendimento. Parte do extrato liofilizado foi solubilizada em metanol 50%, na proporção de 5 g de extrato para cada 250 mL de solvente, e submetida à partição líquido-líquido em série com hexano, diclorometano e acetato de etila (3 séries de 250 mL de cada solvente), para originar as fases de hexano (FH), de diclorometano (FD), de acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM). As fases foram concentradas e liofilizadas para a obtenção de seus rendimentos.

A caracterização das substâncias presentes no extrato e fases foi realizada por uso de Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), para as fases de hexano (FH) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), para as todas as fases. O extrato bruto hidroetanólico e as fases obtidas a partir deste foram retomados em DMSO na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

A análise via CLAE-DAD foi feita utilizando o sistema agilent 1260, com detecção a 352 nm (para evidenciar constituintes flavonoídicos) e a 280 nm (que permitiu a análise de outros fenólicos e diterpenoides abietanos), seguindo metodologia de Santos et al. (2016). A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5 µm) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a metodologia com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetado para a análise foi de 3 µL. Foram utilizadas amostras autênticas de ácido gálico, catequinas, ácido elágico, ácido rosmarínico, rutina, luteolina e apigenina para a identificação preliminar dos constituintes por seus espectros de absorção UV/Visível e tempos de retenção. Para o doseamento dos constituintes individualmente, foram utilizadas as áreas dos picos no cromatograma (CLAE-DAD) comparadas a curvas de

calibração obtidas com as amostras autênticas de ácido *p*-cumárico (0,75 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ácido clorogênico (0,75 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e luteolina (0,75 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os valores foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de extrato.

A análise via CG-EM foi realizada utilizando o sistema agilent 6850/5975B com espectrometria de massas de impacto eletrônico. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  em coluna capilar de sílica HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de arraste a 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . A programação da temperatura se iniciou com 150  $^{\circ}\text{C}$ , aumentando 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 325  $^{\circ}\text{C}$ , a temperatura de injeção foi de 320  $^{\circ}\text{C}$  com pressão inicial de 13,33 psi. O tempo total de corrida da metodologia foi de 46 min com fluxo de 14,1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Parte da fase de acetato de etila, 1 grama por corrida, foi submetida à cromatografia de coluna por exclusão utilizando Sephadex (LH-20) como adsorvente e metanol como fase móvel; as frações foram coletadas de acordo com as faixas observadas utilizando luz UV como detector.

As fases e as frações com maior separação de substâncias, foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa para a obtenção de substâncias isoladas.

As fases e frações com constituintes mais polares foram retomadas em metanol e submetidas à CLAE-DAD semi-preparativa no sistema agilent 1200, com coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) a 40  $^{\circ}\text{C}$ . Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), começando a metodologia com 12% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0 min) e aumentando para 33% (0-24 min), com 5 min de *post run* na sequência. O fluxo de solvente foi de 2,5  $\text{mL min}^{-1}$ . O volume de amostra injetada foi de 450  $\mu\text{L}$ .

A fase hexânica e as frações com constituintes apolares foram retomadas em metanol e submetidas à CLAE semi-preparativa com coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 mm x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) a 40  $^{\circ}\text{C}$ . Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), começando a metodologia com 50% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0-10 min) e aumentando para 100% (10-20 min), com 5 min de *post run*. O fluxo de solvente foi de 4,1  $\text{mL min}^{-1}$ . O volume de amostra injetada foi de 450  $\mu\text{L}$ .

Os constituintes isolados foram analisados pelo Instituto de Química da USP (IQ-USP) para a análise em RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 em um Bruker Avance III em 500 MHz para os diterpenoides e em um 300 Mhz para os compostos fenólicos.

## 4.2 Ensaio *in vitro* de atividade antioxidante

O extrato bruto hidroetanólico e fases liofilizados foram retomados em DMSO 10% para atingirem as concentrações que variaram de 12,5 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde foram testados quanto ao seu potencial antioxidante em espectrofotômetro para microplacas. Para os testes de atividade antioxidante em que ocorre perda de absorvância no comprimento de onda analisado, foi calculada a porcentagem de inibição da oxidação, segundo Dudonné (2009), pela fórmula: [(Absorvância do controle negativo – absorvância da amostra)/absorvância do controle negativo] x 100. Para os ensaios analisados pelo aumento de absorvância (FRAP) e pelo aumento de área sob a curva (ORAC) foi calculada a porcentagem de atividade pela fórmula: [(Absorvância da amostra/absorvância do controle positivo)\*100]. A porcentagem de atividade antioxidante foi plotada contra a concentração das amostras ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a determinação da concentração efetiva capaz de proporcionar 50% de atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) (Mavundza et al., 2010). Todos os resultados também foram expressos em mg equivalentes ao padrão utilizado por grama de extrato.

### 4.2.1 Ensaio antirradicalar: DPPH

O teste foi realizado de acordo com protocolo descrito por Santos et al. (2016). Uma solução de DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (0,20 mM) em metanol foi preparada e armazenada em frasco âmbar para utilização imediata. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  dessa solução foi misturada a 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra ou padrões nas diferentes concentrações em microplacas. Após a incubação por 20 minutos em local escuro e com temperatura ambiente, a absorvância foi detectada a 515 nm com a utilização do espectrofotômetro. Foram utilizadas como controle positivo as soluções metanólicas dos padrões Trolox (12,5 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e quercetina (15 a 240  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como brancos foram utilizados DMSO 10% e metanol.

### 4.2.2 Ensaio antirradicalar: ABTS

O teste de atividade de sequestro do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) foi realizado de acordo com o método descrito por Santos et al. (2016). Primeiramente foram preparadas uma solução de ABTS (7 mM) em água ultrapura e uma solução de persulfato de potássio 2,6 mM (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Essas duas soluções foram misturadas na proporção de 1:1 e mantidas no escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas para a formação do radical ABTS. Passado esse período de incubação, 1 mL da mistura de ABTS\* foi diluída em 30 mL de metanol e medida a absorvância (1,1 ± 0,2 a 734 nm). Na microplaca foram adicionados 280  $\mu\text{L}$  da solução de ABTS\* diluída e 20  $\mu\text{L}$  de amostra ou padrões para, em seguida, ser incubada no escuro em temperatura ambiente por 2 horas. A absorvância foi detectada a 734 nm com o uso do espectrofotômetro. Foram utilizadas como controle positivo, soluções metanólicas dos padrões

Trollox (12 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e quercetina (3 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como brancos foram utilizados DMSO 10% e metanol.

#### **4.2.3 Atividade quelante de ferro**

A atividade dos extratos como quelante de metais foi avaliada segundo o método descrito por Santos et al. (2016). Para a realização do teste foram preparados, no momento da análise, soluções aquosas de sulfato de amônio ferroso (1 mM), acetato de amônio 10% e ferrozine (6,1 mM). Em microplacas foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  das amostras, 130  $\mu\text{L}$  de tampão acetato 10% e 10  $\mu\text{L}$  de sulfato de amônio ferroso. Após um período de cinco minutos foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de ferrozine 6,1 mM e incubados por 10 minutos com agitação constante em 100 rpm, seguidos da medida da absorbância a 562 nm. Como controle positivo foi usado uma solução metanólica de ácido gálico (10 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e como brancos foram utilizados DMSO 10% e metanol.

#### **4.2.4 Atividade redutora de ferro (III) a ferro (II) - FRAP**

A atividade dos extratos na redução de ferro (III) foi avaliada segundo o método descrito por Santos et al. (2016). Como primeira etapa para realização do teste foram preparadas soluções aquosas de ácido clorídrico (40 mM), cloreto férrico (20 mM) e tampão acetato (0,3 mM); em seguida foi preparada uma solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) em ácido clorídrico (40 mM). A solução FRAP, suficiente para uma placa, foi preparada misturando-se 25 mL de tampão acetato (0,3 M pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de cloreto férrico (20 mM). Para o preparo da microplaca foram adicionados 265  $\mu\text{L}$  de solução FRAP, 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra ou padrões e 25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, após o qual foi realizada a detecção da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Foram utilizadas como controle positivo soluções metanólicas dos padrões Trolox (12 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e quercetina (6 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como brancos foram utilizados DMSO 10% e metanol.

#### **4.2.5 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

A capacidade antioxidante dos extratos também foi avaliada pelo método *ORAC* de acordo com o protocolo descrito por Santos et al. (2016). Para a realização do teste foram preparadas soluções de tampão fosfato (75 mM, pH 7), de estoque de fluoresceína (286,6  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato e de AAPH (2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina)) (75mM) em tampão fosfato. A solução estoque de fluoresceína foi posteriormente diluída em tampão fosfato para a formação da solução mãe (4,34  $\mu\text{M}$ ). A solução mãe foi diluída na proporção de 1:500 para formar a solução de uso (8,68 nM). Para o preparo da microplaca foram misturados 25  $\mu\text{L}$  de cada amostra ou padrão (preparados em tampão fosfato) e 150  $\mu\text{L}$  de solução de fluoresceína para atingir a concentração de 67,95 nM no poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 min e em seguida foram adicionados 25  $\mu\text{L}$

---

de AAPH. A fluorescência foi medida em intervalos de 1 min durante 120 min de leitura da placa. Como controle positivo foi usada solução metanólica de Trolox (6,25 a 100  $\mu\text{M}$ ). Como controle negativo foi usado tampão fosfato. A capacidade antioxidante foi calculada utilizando a área sob a curva (AUC), segundo a fórmula:

$$[(\text{AUC}) = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_n/f_0].$$

Na qual  $f_0$  é a fluorescência inicial em 0 minutos e  $f_n$  é a fluorescência lida em n minutos. A partir da subtração da AUC da amostra pela AUC do branco foi obtida a net AUC. Os valores de ORAC foram calculados usando a equação de regressão entre as concentrações de Trolox e a net AUC.

### 4.3 Ensaio de atividade antibacteriana

A avaliação do potencial antimicrobiano foi realizada segundo o método descrito por Sedano-Partida et al., (submetido). Foram utilizados pré-inóculos de duas bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145 Vitroids™) e *Escherichia coli* (MG1655) e uma Gram-positiva, *Bacillus subtilis* (PY79), utilizando o meio de cultura Luria-Bertani (LB). Os pré-inóculos foram incubados, com agitação, a 35°C por 16 horas, para as bactérias Gram-negativas, e por 18 horas para a bactéria Gram-positiva. Após o tempo de incubação dos pré-inóculos uma alíquota foi adicionada em meio LB líquido até a concentração de células ser ajustada para  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (absorbância de 0,08 a 0,1).

Um volume de 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultura LB contendo a bactéria diluída foi transferido para as cavidades da microplaca, em seguida, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas em DMSO 4% em concentrações no poço de 8,125 a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as fases e o extrato bruto hidroetanólico, e de 3,125 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as substâncias isoladas.

A placa foi incubada em 35°C por 18 horas para as bactérias Gram-negativas e 20 horas para a Gram-positiva, com agitação de 120 rpm, com a leitura sendo feita novamente após esse período. Foram utilizados dois controles negativos, um contendo 20  $\mu\text{L}$  de DMSO 4% e 180  $\mu\text{L}$  de meio LB com bactéria; e um com 20  $\mu\text{L}$  de DMSO 4% e 180  $\mu\text{L}$  de meio sem bactéria. Para o controle positivo foram utilizadas soluções em DMSO 4% dos padrões ampicilina, gentamicina e canamicina. Após a leitura, 2  $\mu\text{L}$  de cada poço foram retirados e adicionados a nova microplaca com meio LB sólido e foram incubados por 25 horas para verificar o crescimento bacteriano. Na placa em que foi realizada a leitura foram adicionados a cada poço 20  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,01%, incubada por 1 hora e, após esse período, foi observado se houve alteração na cor, indicando efeito bactericida ou bacteriostático.

O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi realizado pela seguinte fórmula:  $[(\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle negativo}] \times 100$ . A porcentagem de atividade antibacteriana foi plotada contra a concentração das amostras ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a determinação da concentração mínima necessária para se inibir 50% do crescimento bacteriano ( $\text{MIC}_{50}$ ).

#### **4.4 Ensaio de atividade anti-HIV**

Os ensaios foram realizados por meio de método colorimétrico de inibição da transcriptase reversa com o uso do kit produzido pela Roche (cat nº 11468120910). Os procedimentos e os preparos das soluções foram realizados seguindo o protocolo disponibilizado juntamente com o kit. As amostras foram diluídas em DMSO 10% para atingir diferentes concentrações (125 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), como controle positivo foi utilizado o antiviral Foscarnet em DMSO 10% (75 a 3000  $\text{ng mL}^{-1}$ ).

Foram acrescentados a microtubos 20  $\mu\text{L}$  das amostras ou padrões, 19  $\mu\text{L}$  de tampão de lise, 20  $\mu\text{L}$  de oligo (dT)<sub>15</sub> + poli-A e 1  $\mu\text{L}$  da enzima HIV-1 RT. Para o branco foi utilizado DMSO 10% sem adição da enzima e para o controle negativo DMSO 10% com adição da enzima. A solução foi incubada por 1h a 37°C. 60  $\mu\text{L}$  foram transferidos para a placa nos módulos de reação do kit, onde foram incubados por mais 1h a 37°C. Após esse período o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por quatro vezes. Após a completa remoção do tampão de lavagem foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma mistura de 198  $\mu\text{L}$  de tampão conjugado e 2  $\mu\text{L}$  de solução anticorpo. Após uma nova incubação de 1h a 37°C, novamente foi realizada a lavagem e, por fim, adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução ABTS para a leitura de absorbância a 405 e 490 nm, após incubação de 15 minutos em 25°C.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da atividade da enzima foi feita a subtração das absorbâncias de 405 e 490 nm e a utilização da seguinte fórmula:  $100 - [(\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle negativo}] \times 100$  (Kumar e Pandey, 2014). A porcentagem de atividade anti-HIV foi plotada contra a concentração das amostras ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a determinação da concentração necessária para se inibir em 50% a atividade da enzima ( $\text{IC}_{50}$ ).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Doseamento e identificação dos constituintes fitoquímicos

#### 5.1.1 Rendimento

Para a produção do extrato a partir do material vegetal seco, foi utilizada a metodologia de extração por maceração em etanol 70%, de forma a priorizar a extração de constituintes mais polares como os compostos fenólicos. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo e seco em liofilizador para a obtenção do extrato bruto hidroetanólico, com um rendimento de 17,39% sobre a massa vegetal seca (tabela 1). Posteriormente o extrato bruto hidroetanólico foi solubilizado em metanol 50% e particionado com hexano, diclorometano e acetato de etila, com o intuito de haver uma melhor separação dos constituintes do extrato bruto hidroetanólico; todas as fases obtidas foram concentradas, liofilizadas e pesadas para a obtenção dos rendimentos em relação ao extrato bruto hidroetanólico. A fase hidrometanólica apresentou o maior rendimento (50,90%), seguida da fase de acetato de etila (20,46%), da fase hexânica (13,20%) e da fase diclorometânica (11,31%), evidenciando uma maior presença de compostos polares, pois as fases obtidas com solventes mais polares foram as que apresentaram maior rendimento (tabela 1). Em comparação com outras espécies pertencentes à mesma subtribo, *H. lacustris* apresentou um rendimento de extrato bruto hidroetanólico superior ao verificado por Medoatinsa et al. (2015) para *Mesosphaerum suaveolens* (8%); e um pouco maior do encontrado para *Eplingiella fruticosa* (15%) (Andrade et al., 2010).

Tabela 1: Rendimento do extrato bruto hidroetanólico sobre a massa vegetal seca e das fases sobre o extrato bruto hidroetanólico, todos os valores estão expressos em porcentagem.

Extrato	Rendimento (%)	Fases	Rendimento (%)
Bruto	17,39	Hexânica	13,20
		Diclorometânica	11,31
		Acetato de Etila	20,46
		Hidrometanólica	50,90

### **5.1.2 Doseamento e identificação dos constituintes fenólicos**

Após os cálculos de rendimento, o extrato e suas respectivas fases foram submetidos à análise qualitativa e quantitativa por CLAE-DAD em comprimentos de ondas para detecção de 280 nm e 352 nm. Na figura 8 são apresentados os cromatogramas obtidos em 280 nm, o cromatograma da fase hexânica (figura 15) está apresentado no próximo item por conter somente constituintes diterpenoídicos. A escolha da representação em 280 nm se deve à maior variedade de substâncias e a maior absorção que elas possuem nesse comprimento de onda. Comparando os espectros UV/Visível (figura 9) e o tempo de retenção dos componentes majoritários com amostras autênticas analisadas na mesma metodologia, foi possível identificar alguns dos compostos conforme apresentado na tabela 2.



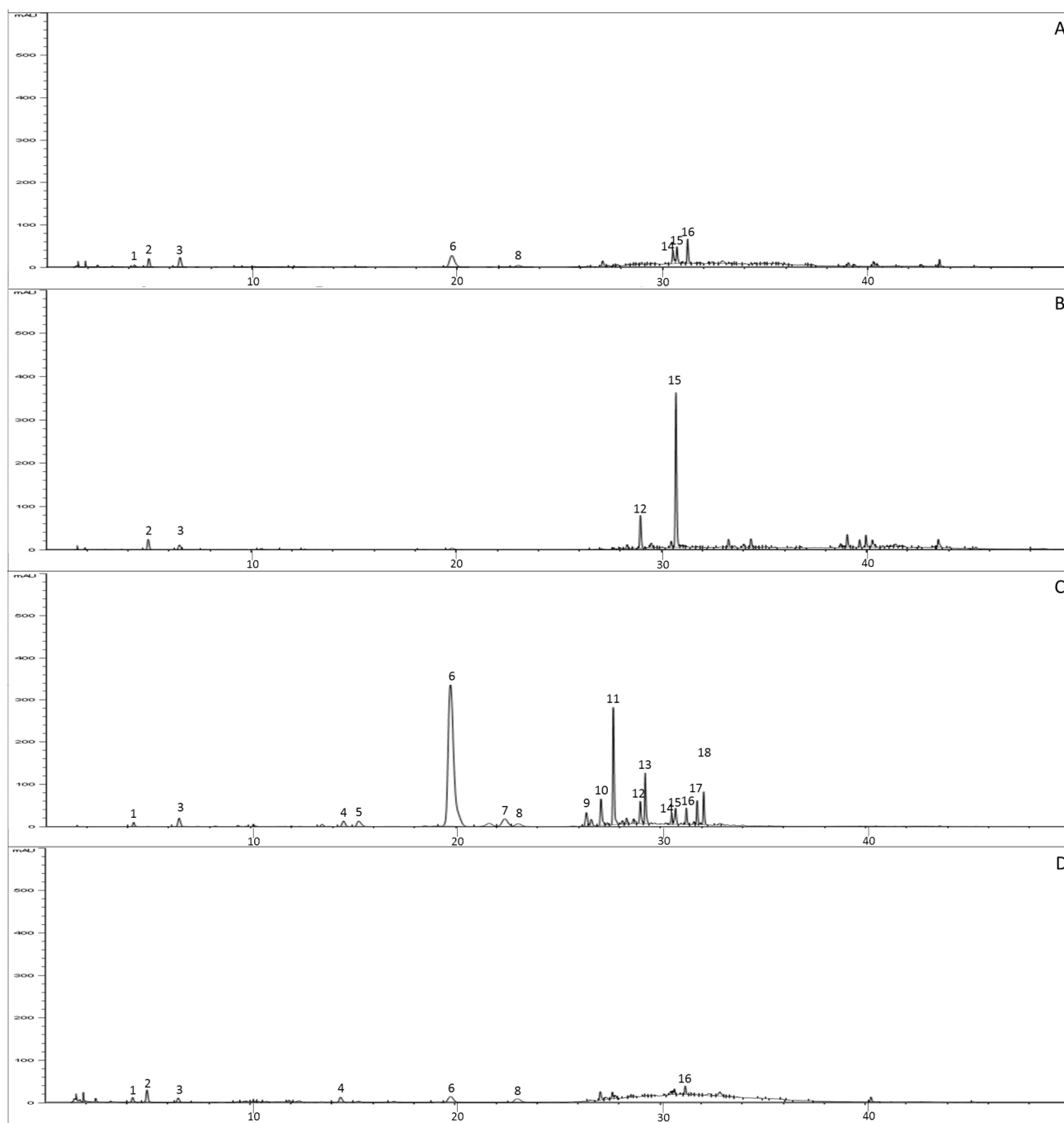


Figura 8: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) do extrato bruto hidroetanólico de *Hyptis lacustris* e suas fases. A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5  $\mu$ m) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a metodologia com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de 3  $\mu$ L. A: extrato bruto hidroetanólico; B: fase diclorometânica; C: fase de acetato de etila; D: fase hidrometanólica. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações dos constituintes fenólicos apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Constituintes fenólicos majoritários do extrato bruto hidroetanólico (EE) e suas respectivas fases FD: diclorometânica, FAE: acetato de etila e FHM: hidrometanólica), analisadas por CLAE-DAD.

Constituinte	Tr (min)	Uv/Visível (nm)	Sugestão	Doseamento (mg eq. padrão g <sup>-1</sup> de extrato)			
				EE	FD	FAE	FHM
1	4,250	290 (om); 325	Ácido clorogênico	0,57	-	1,15	0,80
2	4,959	280; 310	Derivado de ácido cinâmico	1,27	1,40	1,41	1,64
3	6,478	290 (om); 320	Ácido cafeico	1,71	0,99	2,65	0,91
4	14,495	260; 270 (om); 290 (om); 350	Rutina	-	-	0,23	0,97
5	15,249	270; 335	Derivado de Apigenina	-	-	0,93	-
6	19,711	285 (om); 325	Ácido Rosmarínico	3,83	0,83	57,12	2,02
7	22,359	270; 335	Apiina	-	-	2,90	-
8	23,016	255; 285; 305; 335 (om)	Flavonoide com açúcar acetilado	0,91	-	2,69	2,47
9	26,583	290 (om); 320	Derivado de ácido clorogênico	-	-	1,82	-
10	27,056	255; 285; 305; 335 (om)	Flavonoide com açúcar acetilado	0,34	-	9,71	0,94
11	27,657	290 (om); 325	Derivado de ácido clorogênico	-	0,45	14,59	0,84
12	28,973	250; 270 (om); 290 (om); 345	Luteolina	*	5,05	1,25	-
13	29,215	285; 340	Flavona	-	-	7,53	-
14	30,497	251; 340	Nepetoidina A	1,96	0,28	*	*
15	30,696	270; 290 (om); 335	Flavona	2,42	26,32	1,92	*
16	31,218	252; 305 (om); 340	Nepetoidina B	3,18	-	0,57	0,65
17	31,748	290 (om); 325	Derivado de ácido clorogênico	-	-	2,36	-

Tabela 2 - Continuação

Constituinte	Tr (min)	Uv/Visível (nm)	Sugestão	Doseamento (mg eq. padrão g <sup>-1</sup> de extrato)			
				EE	FD	FAE	FHM
18	32,067	251 (om); 290; 350	Flavonoide	-	-	1,79	-
			Derivados de ácido clorogênico <sup>a</sup>	9,54	1,56	77,61	4,31
			Derivados de ácido cinâmico <sup>a</sup>	2,98	2,39	4,06	2,55
			Flavonoides <sup>b</sup>	3,67	31,37	28,95	4,38
			<b>Total</b>	16,19	35,32	110,62	11,24

Tr: Tempo de retenção médio em minutos. \*: possuem a substância, mas em baixa quantidade.

<sup>a</sup>miligramas ao ácido *p*-cumárico por grama de massa seca (mg *p*-CE g<sup>-1</sup>),

<sup>b</sup>miligramas a luteolina por grama de massa seca (mg LE g<sup>-1</sup>)

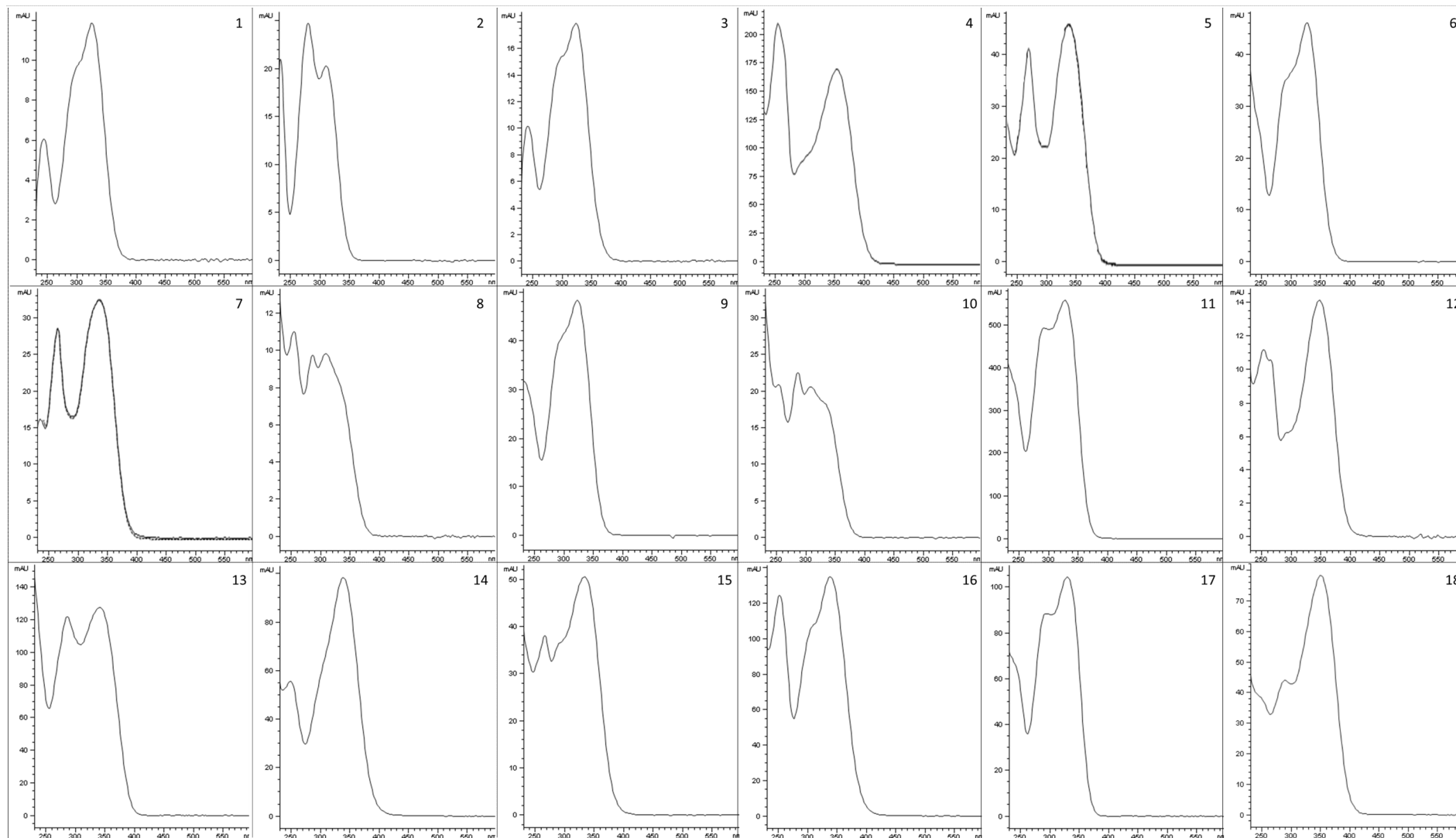


Figura 9: Espectros de absorção UV/Visível dos constituintes fenólicos detectados por CLAE-DAD (280 nm) no extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* e suas fases. Números de 1 ao 18 correspondem aos constituintes apresentados na tabela 2.

Os constituintes ácido clorogênico (**1**), ácido cafeico (**3**), rutina (**4**), ácido rosmarínico (**6**), apiina (**7**) e luteolina (**12**), foram identificados de acordo com os seus tempos de retenção e com os espectros de absorção UV/Visível, em comparação com as amostras autênticas analisadas utilizando a mesma metodologia.

Os constituintes **5**, **8**, **10**, **13**, **15**, e **18**, foram propostos como flavonoides devido às características de seus espectros de absorção UV/Visível, com duas bandas de absorção máxima, uma entre 270 a 290 nm, correspondente ao anel A da estrutura, e a outra entre 305 a 350, correspondente ao anel B (Markham, 1982), sendo que alguns constituintes (**8** e **10**), possuem uma terceira banda de absorção. Os flavonoides aqui presentes provavelmente pertencem à classe das flavonas, pois a banda I se apresenta entre 310 - 350 nm, característica marcante de flavonas (Tsimogiannis et al., 2007; Markham, 1982), além disso, essa é uma classe mais presente em Lamiaceae do que a dos flavonóis (Valant-Vetschera e Wollenweber, 2006). Os compostos **8** e **10**, pela presença de uma terceira banda de absorção, podem corresponder a flavonoides acilados, que possuem espectro de absorção com essas características e são de ocorrência mais comum, mas pela presença do ombro em 335 nm e pelos relatos de ocorrência em Lamiaceae, os compostos foram propostos serem flavonoides com açúcares acetilados, compostos de ocorrência mais restrita (Chari et al., 1981; Uriarte-Pueyo e Calvo, 2010) que já foram descritos em Lamiaceae (Venditti et al., 2013) e, dentro de Lamiaceae, na subfamília Nepetoideae (Marin et al., 2001).

Os constituintes **9**, **11** e **17**, foram propostos como derivados de ácido clorogênico devido aos seus espectros de absorção UV/Visível possuírem uma banda de absorção máxima entre 310 e 325 nm, com um ombro entre 280 e 290 nm, espectro característico dessa classe de compostos fenólicos. A exceção é o constituinte **2**, que possui dois picos nesses mesmos comprimentos de ondas, portanto sendo classificado como derivado de ácido cinâmico.

Os picos **14** e **16** foram propostos serem as substâncias Nepetoidina A e Nepetoidina B, respectivamente, dois ésteres de ácido cafeico. Essa proposição foi baseada no trabalho publicado por Grayer et al. (2003) no qual eles analisaram 166 espécies de 78 gêneros pertencentes a Lamiaceae e famílias relacionadas, quanto à presença das Nepetoidinas A e B. Foi verificada a presença das duas substâncias em 110 das 116 espécies de Nepetoideae estudadas, sendo que nas espécies de outras subfamílias pertencentes à Lamiaceae ou de famílias relacionadas, não foram encontradas nenhuma das duas. Os autores propõem que essas duas substâncias sejam consideradas caracteres quimiotaxonômicos dessa subfamília. Com base no fato de *H. lacustris* pertencer à subfamília Nepetoideae e os espectros UV/Visível dos picos **14** e **16** serem similares aos espectros publicados no estudo acima citado (figura 10), foi proposta a presença de Nepetoidinas A e B

---

respectivamente. Essas duas substâncias também foram relatadas para *Mesosphaerum pectinatum* (Falcao et al., 2013).

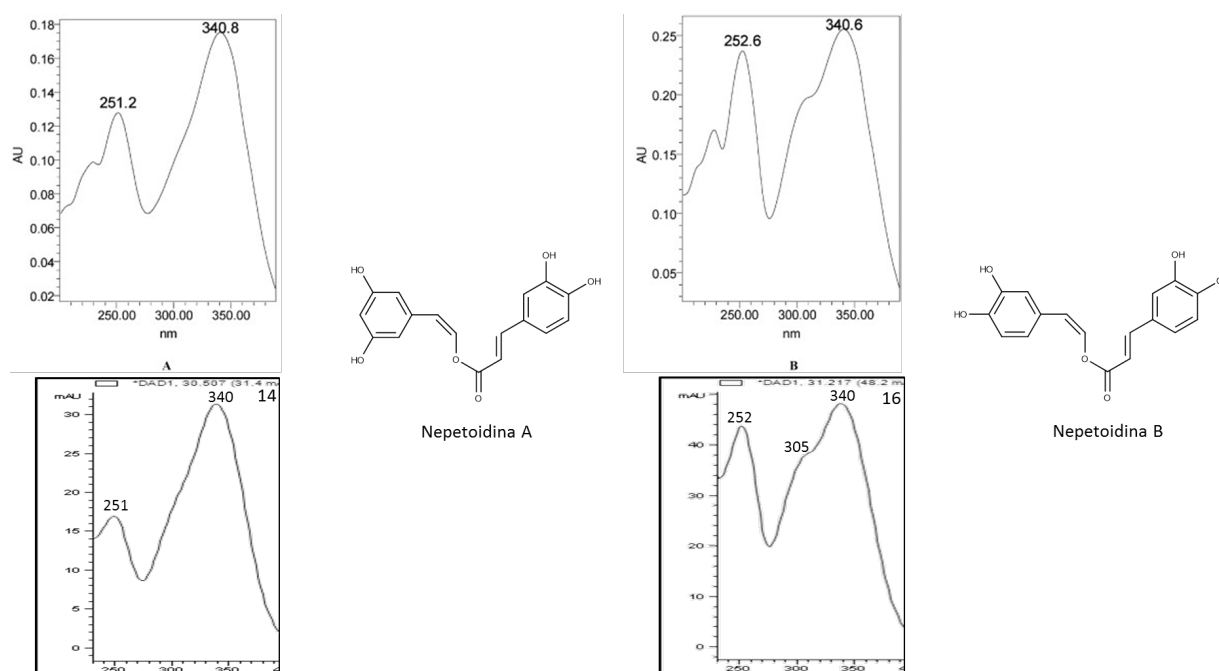


Figura 10: Comparação entre os espectros UV/Visível das Nepetoidinas A e B obtidos por Grayer et al. (2003) com os espectros das substâncias **14** e **16** obtidos deste estudo.

A grande abundância do ácido rosmarínico (**6**) era esperada por dois fatores: o primeiro por ser uma substância encontrada em altas concentrações na subfamília Nepetoideae, mas, apesar de estar presente nessa subfamília, não pode ser considerado como uma característica quimiotaxonômica, pois também ocorre em outras 39 famílias, como Boraginaceae, em samambaias, antóceros e em algumas monocotiledôneas (Petersen e Simmonds, 2003; Kim et al., 2015); o segundo fator é o solvente utilizado na extração, pois, segundo Segóvia et al. (2014), etanol 70% é o solvente mais eficiente para a obtenção de extratos ricos em ácido rosmarínico. Assim como *Hyptis lacustris*, outras espécies pertencentes à subtribo Hyptidinae possuem o ácido rosmarínico como componente majoritário, como é o caso de *Hyptis atrorubens* (Abedini et al., 2013), *Hyptis capitata* (Almtorp et al., 1991), *Mesosphaerum suaveolens* (Wicha et al., 2015), *Mesosphaerum pectinatum* (Falcão et al., 2013; Falcão et al., 2016), em sua fração de acetato de etila e *Condea verticillata* (Kuhnt et al., 1993), sendo que as três últimas espécies pertenciam ao gênero *Hyptis* antes da reclassificação proposta por Harley e Pastore (2012).

Para uma maior separação dos constituintes com o intuito de facilitar a obtenção de substâncias isoladas, a fase de acetato de etila e o extrato bruto, foram submetidos ao fracionamento por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (CC).

O Sephadex LH-20 é um dextrano reticulado e frizado que foi hidroxipropilado para produzir um meio cromatográfico com características tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, dilatando-se em água e outros solventes orgânicos e possuindo por finalidade a separação de produtos naturais de acordo com o seu tamanho molecular. O tamanho da partícula molhada e o limite de exclusão do meio variam dependendo do solvente usado no preparo do sephadex LH-20 (GE, 2007).

A separação da fase de acetato de etila (2 g) resultou em 8 frações denominadas: FAC1 (143,2 mg), FAC2 (630,6 mg), FAC3 (124,3 mg), FAC4 (452,3 mg), FAC5 (312,7 mg), FAC6 (219,3 mg), FAC7 (78 mg), FAC8 (18,9 mg), das quais, pela análise por CLAE-DAD, duas dessas frações resultaram em uma separação efetiva, com somente um pico majoritário (FAC6 e FAC7), e duas diretamente em compostos isolados (FAC1 e FAC2), todas as quatro frações estão apresentadas na figura 11 e seus picos majoritários (**6**, **11**, **13**) na tabela 3.

A fase hidrometanólica foi submetida à separação por CLAE semi-preparativa, mas como os compostos isolados foram os mesmos obtidos pela coluna de sephadex e as massas obtidas foram baixas, menores que 1 mg, eles não foram submetidos à análise por RMN.

Tabela 3: Frações obtidas por cromatografia em coluna sephadex LH-20 da fase de acetato de etila; a numeração do seu constituinte está de acordo com os compostos majoritários apresentados na tabela 2.

Fração	Constituinte	Uv/Visível (nm)	Massa (mg)	Identificação
FAC 6 e 7	6	285 (om); 325	303,0	Ácido Rosmarínico
FAC 1	11	290 (om); 325	151,1	Derivado de ácido clorogênico
FAC 2	13	285; 340	633,9	Flavona

Tr: Tempo de retenção médio em minutos

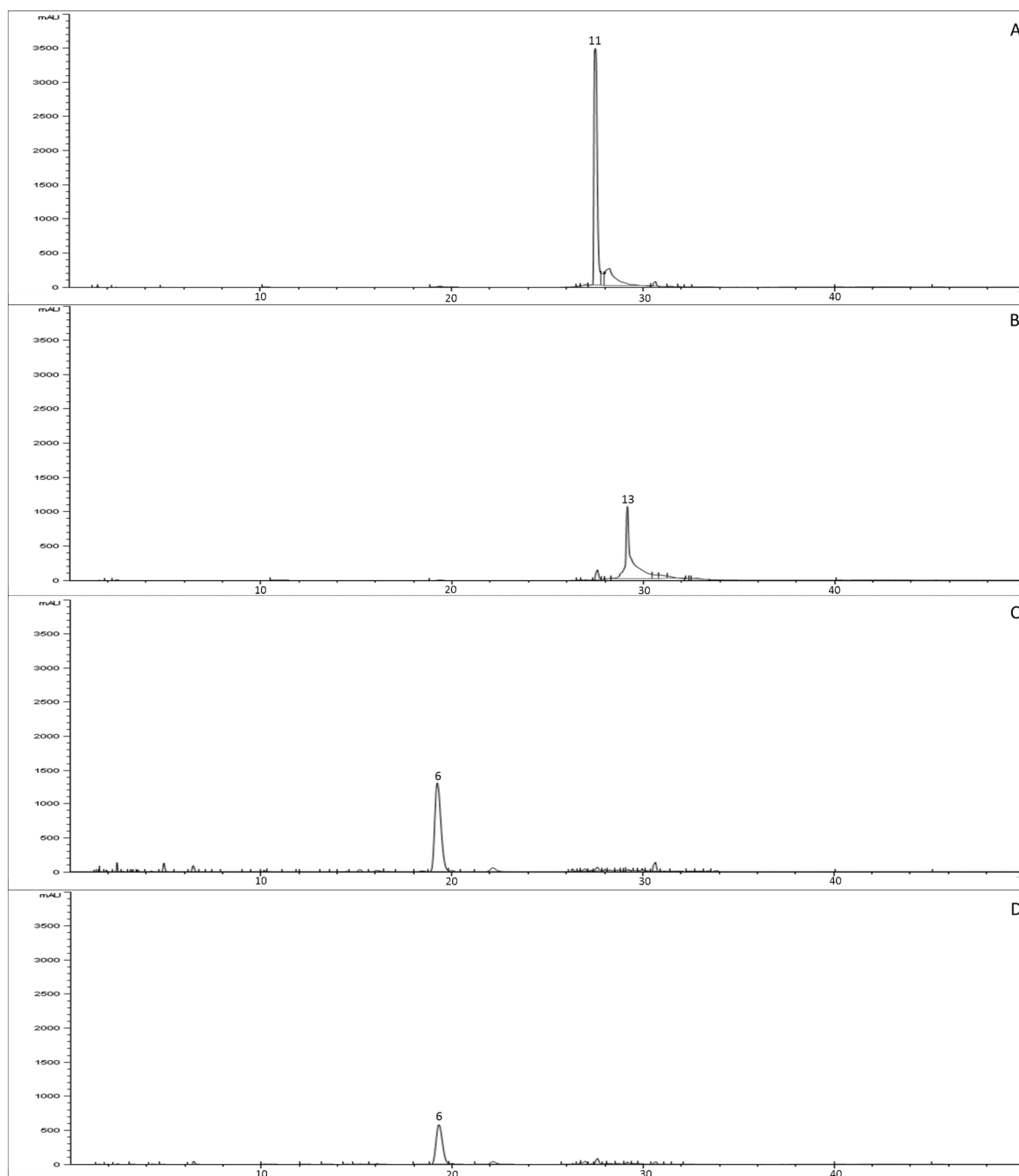


Figura 11: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) de quatro frações obtidas a partir do fracionamento da fase de acetato de etila de *Hyptis lacustris* em Cromatografia de Coluna de Sephadex (CC). A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5  $\mu$ m) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a metodologia com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de 3  $\mu$ L. A: Fração FAC1; B: Fração FAC2; C: Fração FAC6; D: Fração FAC7. Os números acima de cada pico correspondem aos componentes majoritários apresentados na tabela 2 e 3.



As frações com as substâncias **6**, **11** e **13** foram submetidas à análise por RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ).

A fração FAC7 apresentou as seguintes características nas metodologias utilizadas para sua análise: Tret (19,711 min); UV (MeOH)  $\lambda/\text{nm}$ : 285 (om), 325 nm. Com base nessas características o composto foi proposto ser o ácido rosmarínico em comparação com o espectro de absorção UV/Visível e o tempo de retenção da amostra autêntica analisada nas mesmas condições de corrida no CLAE-DAD, para a sua comprovação foram realizadas análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Ao ser submetida à análise por RMN  $^1\text{H}$ , não foi possível identificar o composto isolado, pois apesar de na análise por CLAE-DAD aparecer um pico como majoritário, os picos minoritários presentes na fração interferiram no espectro de hidrogênio, não aparecendo sinais visíveis do composto majoritário (**6**), sendo necessária a análise por RMN  $^{13}\text{C}$ . De acordo com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , a substância possui 18 carbonos, os quais correspondem a 6 metinos de anéis aromáticos,  $\delta_{\text{C}}$ : 115,65 (C-2), 115,41 (C-5), 120,25 (C-6), 117,07 (C-2'), 115,88 (C-5') e 121,65 ppm (C-6'); 2 metinos referentes à ligação dupla da cadeia lateral do ácido cafeico esterificado,  $\delta_{\text{C}}$ : 145,33 (C-7) e 115,32 ppm (C-8); 1 carbono quaternário referente ao éster,  $\delta_{\text{C}}$ : 166,58 ppm (C-9); 2 carbonos quaternários referentes aos carbonos dos anéis aromáticos nos quais estão ligados às cadeias laterais,  $\delta_{\text{C}}$ : 125,92 (C-1) e 129,61 ppm (C-1'); 1 carbono quaternário referente ao ácido carboxílico do ácido 3,4-dihidroxifenilático,  $\delta_{\text{C}}$ : 171,78 ppm (C-9'); 4 carbonos quaternários referentes aos carbonos dos anéis aromáticos ligados às hidroxilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 144,14 (C-3), 144,24 (C-4), 146,20 (C-3') e 149,01 ppm (C-4'); 1 metino correspondente ao carbono ligado ao ácido carboxílico,  $\delta_{\text{C}}$ : 76,81 ppm (C-8') e 1 metileno referente ao carbono da cadeia lateral do ácido 3,4-dihidroxifenilático,  $\delta_{\text{C}}$ : 37,46 ppm (C-7'). No espectro de carbono, além de aparecer os sinais referentes ao ácido rosmarínico (tabela 4), também apareceram sinais referentes aos compostos minoritários e aos açúcares livres presentes na fração. Com base nesses sinais, a substância foi identificada como ácido rosmarínico (**6**), através da comparação com o RMN de  $^{13}\text{C}$  descrito na literatura (Ticli et al., 2005) (tabela 4), corroborando a identificação prévia de comparação com a amostra autêntica.

Tabela 4: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 6 em DMSO- $d_6$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 6 ( $\delta$ em ppm)	Ácido Rosmarínico (Ticli et al., 2005)
	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
C1	125,92	125,9
C2	115,65	115,4
C3	144,14	143,0
C4	144,24	144,6
C5	116,41	116,3
C6	120,25	119,9
C7	145,33	145,2
C8	115,32	115,2
C9	166,58	166,6
C1'	129,61	130,3
C2'	117,07	116,9
C3'	146,20	146,3
C4'	149,01	148,9
C5'	115,88	115,7
C6'	121,65	120,8
C7'	37,46	37,6
C8'	76,81	76,5
C9'	171,78	172,8

A fração FAC1 (**11**) apresentou as seguintes características: Tret (27,469 min); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{nm}}$ : 290 (om), 325 nm;  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO + resquícios de  $\text{H}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7,48 (d;  $J= 15,9$  Hz; 1H); 7,20 (dd;  $J= 8,7; 1,6$  Hz; 2H); 7,11 (s; 1H); 7,02 (dt;  $J= 8,2; 2,7$  Hz; 3H); 6,72 (d;  $J= 8,3$  Hz; 1H); 6,69 (s; 1H); 6,67 (d;  $J= 1,7; 1$  Hz; 1H); 6,66 (s); 6,63 (d;  $J= 8,0$  Hz; 1H); 6,52 (dd;  $J= 8,1; 1,5$  Hz; 1H); 6,35 (d;  $J= 15,9$  Hz; 1H); 5,75 (s); 5,01 (dd;  $J= 8,5; 4,1$  Hz; 1H); 3,00 (dd; 14,1; 3,9 Hz; 2H); 2,89 (dd; 14,2; 8,7 Hz; 2H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO + resquícios de  $\text{H}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 171,38; 166,20; 160,37; 147,55; 145,62; 145,56; 145,38; 144,42; 129,35; 127,99; 124,75; 120,86; 120,45; 117,47; 117,13; 116,08; 115,86; 73,79; 71,11; 36,69; 12,22.

A fração FAC2 apresentou as seguintes características: Tret (29,162 min); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 285 (om), 340 nm. Ao ser submetida à análise por RMN, ficou evidenciado uma maior proporção de açúcares, impedindo a identificação do composto fenólico obtido, pois os deslocamentos referentes a esse composto não apareciam nos espectros tanto de carbono quanto de hidrogênio. Não foi possível verificar a presença desses açúcares pela análise em CLAE-DAD pois não absorvem nos comprimentos de onda analisados, assim aparecendo somente um pico referente a uma substância (**13**).

Os compostos fenólicos identificados dos extratos, fases e frações de *H. lacustris* estão listados na figura 12. Todas as fases, frações e isolados obtidos e de onde foram obtidos estão esquematizados na figura 13.

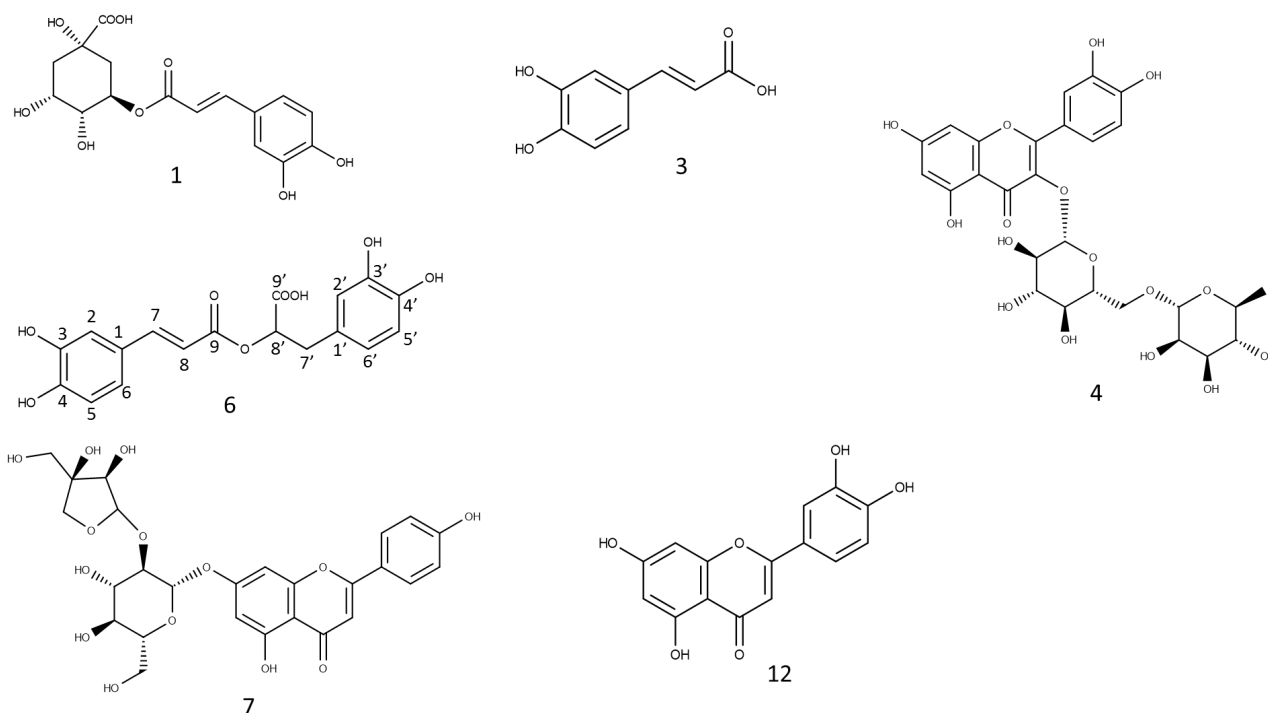


Figura 12: Estrutura dos compostos fenólicos do extrato bruto hidroetanólico, fases e frações de *H. lacustris*, identificados por espectro Uv/Visível em HPLC-DAD em comparação com o espectro de amostras autênticas em condições de corrida iguais, (1): ácido clorogênico; (3): ácido cafeico; (4): rutina; (6): ácido rosmarínico; (7): apiína; (12): luteolina.

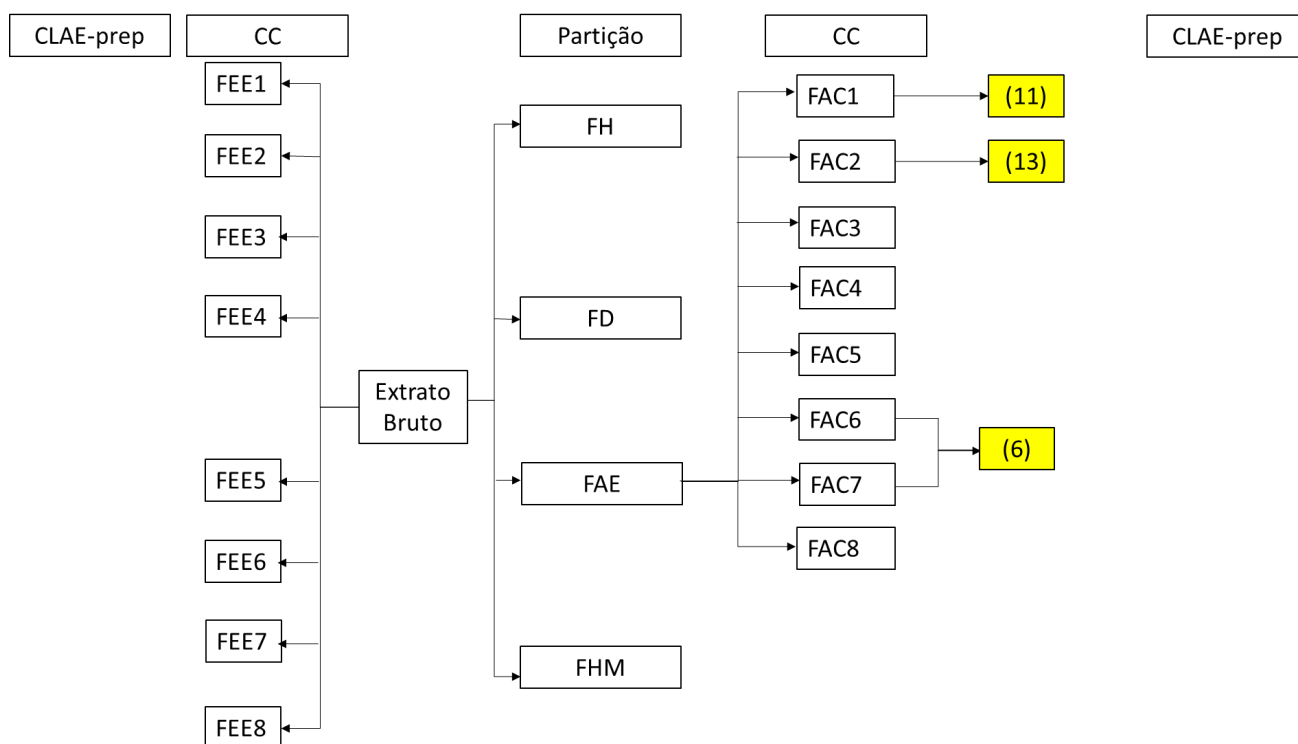


Figura 13: Fluxograma de extração, partição, fracionamento e isolamento dos constituintes majoritários de *Hyptis lacustris*. (CC) corresponde às frações e isolados obtidos por separação em cromatografia de coluna Sephadex; (Partição) corresponde às fases obtidas por partição líquido a líquido; (CLAE-prep) corresponde aos isolados obtidos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa. FH: fase hexânica, FD: fase diclorometânica, FAE: fase de acetato de etila, FHM: fase hidrometanólica, FAC: fração de acetato de etila, FEE: fração do extrato bruto hidroetanólico. Os números dos isolados estão de acordo com os apresentados na tabela 2 e 3. Em amarelo, destaque para os isolados fenólicos.

### 5.1.3 Doseamento e identificação de terpenoides

A fase hexânica, por ser a fase mais apolar, foi submetida à análise qualitativa por CG-EM, sendo obtido o cromatograma apresentado na figura 14; os padrões de fragmentação obtidos por impacto eletrônico são apresentados na tabela 5. Essa fase também foi submetida à análise por CLAE-DAD em comprimentos de ondas de 280 nm e 352 nm, sendo obtidos os cromatogramas apresentados na figura 15, juntamente com os cromatogramas do extrato bruto hidroetanólico e da fase diclorometânica, que também apresentaram compostos apolares. A porcentagem relativa desses compostos em suas respectivas amostras está apresentada na tabela 6 e os espectros de absorção UV/Visível das substâncias majoritárias estão demonstradas na figura 16.

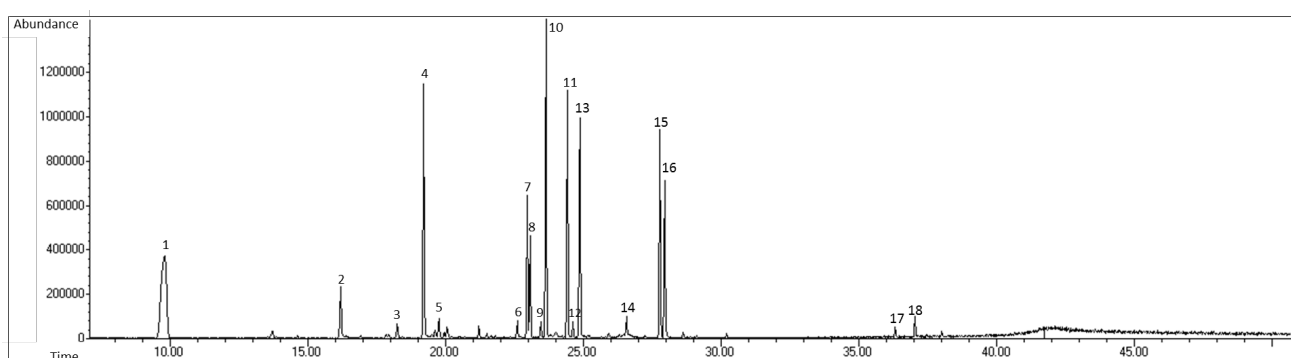


Figura 14: Cromatograma da fase hexânica de *Hyptis lacustris* obtido por análise em CG-MS. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  em coluna capilar de sílica HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de arraste a 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . A programação da temperatura se iniciou com 150  $^{\circ}\text{C}$ , aumentando 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 325  $^{\circ}\text{C}$ , a temperatura de injeção foi de 320  $^{\circ}\text{C}$  com pressão inicial de 13,33 psi. O tempo total de corrida da metodologia foi de 46 min com fluxo de 14,1  $\text{mL min}^{-1}$ . Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações dos componentes apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Principais constituintes da fase hexânica e seus respectivos dados de CG-MS, com sua possível identificação, nos quais MM: massa molecular do contituente, m/z: razão massa/carga dos fragmentos.

Constituinte	Tr (min)	MM	MS: m/z (intensidade, %)	Constituinte	Porcentagem relativa (%)
1	9,813	224	149 (41); 109 (31); 108 (23); 107 (25); 95 (22); 93 (31); 81 (30); 79 (27); 59 (100)	Derivado de Eudesmol	18,98
2	16,205	256	213 (23); 129 (40); 97 (25); 85 (25); 83 (32); 71 (47); 69 (48); 60 (100); 57 (78); 55 (79)	Ácido hexadecanóico	2,97
3	18,261	374	255 (41); 185 (61); 173 (94); 171 (26); 159 (100); 157 (23); 143 (25); 129 (36); 128 (31); 69 (57)	7- <i>O</i> -acetilhorminona <sup>a</sup>	1,16
4	19,217	278	123 (22); 95 (17); 83 (17); 81 (26); 71 (100); 69 (30); 68 (22); 57 (34); 56 (17); 55 (31)	Derivado de Fitol	9,35
5	19,762	274	111 (15); 97 (37); 95 (19); 84 (100); 83 (35); 71 (31); 69 (33); 57 (44); 56 (24); 55 (42)	NI	1,08
6	22,606	284	269 (58); 227 (49); 201 (98); 199 (100); 187 (98); 185 (41); 173 (46); 129 (40); 128 (48); 69 (65)	Diterpenoide abietano	1,37
7	22,975	284	284 (36); 213 (54); 227 (19); 202 (100); 200 (36); 199 (65); 185 (44); 171 (24); 159 (50); 157 (37)	6,7-Dehidroferruginol (Otto et al., 2001; 2002)	6,07

Continuação

	Tr (min)	MM	MS: m/z (intensidade, %)	Constituinte	Porcentagem relativa (%)
8	23,076	286	286 (85); 271 (100); 201 (69); 189 (95); 187 (41); 175 (98); 173 (27); 159 (31); 69 (76); 55 (29)	Ferruginol	4,50
9	23,470	314	314 (52); 245 (75); 244 (71); 232 (100); 231 (52); 128 (39); 99 (36); 83 (46); 69 (53); 55 (72)	6,7-Dehidroroyleanona (Kusumoto et al., 2009)	0,93
10	23,655	316	317 (21); 316 (100); 301 (23); 231 (38); 220 (27); 219 (43); 205 (48); 91 (25); 69 (38); 55 (42)	Royleanona (Areche et al., 2009)	12,44
11	24,435	360	331 (50); 316 (92); 247 (42); 245 (61); 231 (45); 220 (53); 109 (48); 83 (62); 69 (82); 55 (100)	Diterpenoide abietano	9,75
12	24,636	360	300 (20); 245 (14); 233 (13); 231 (14); 229 (18); 189 (100); 109 (17); 83 (13); 69 (31); 55 (34)	Diterpenoide abietano	1,03
13	24,879	298	299 (25); 298 (100); 283 (45); 237 (11); 165 (11); 152 (10); 141 (10); 128 (19); 115 (15); 55 (11)	Diterpenoide abietano	10,37
14	26,574	167	207 (15); 167 (26); 149 (100); 71 (22); 70 (20); 57 (32); 55 (23); 44 (21); 43 (22); 41 (21)	Ácido fitálico (contaminante)	1,93

Continuação

	Tr (min)	MM	MS: m/z (intensidade, %)	Constituinte	Porcentagem relativa (%)
15	27,790	300	300 (58); 285 (100); 243 (34); 217 (57); 215 (51); 203 (51); 201 (29); 163 (21); 69 (30); 55 (23)	Sugiol	8,41
16	27,958	388	389 (28); 388 (100); 374 (26); 373 (94); 305 (35); 303 (24); 291 (19); 75 (18); 69 (25); 55 (19);	NI	7,94
17	36,330	412	159 (47); 157 (31); 97 (60); 93 (47); 83 (78); 81 (59); 79 (29); 69 (66); 67 (30); 55 (100)	Stigmasterol	0,71
18	37,043	414	213 (58); 159 (65); 145 (73); 107 (71); 95 (77); 93 (77); 81 (70); 69 (76); 57 (85); 55 (100)	Sitosterol	1,01

Tr: Tempo de retenção médio em minutos; <sup>a</sup> Identificado por RMN



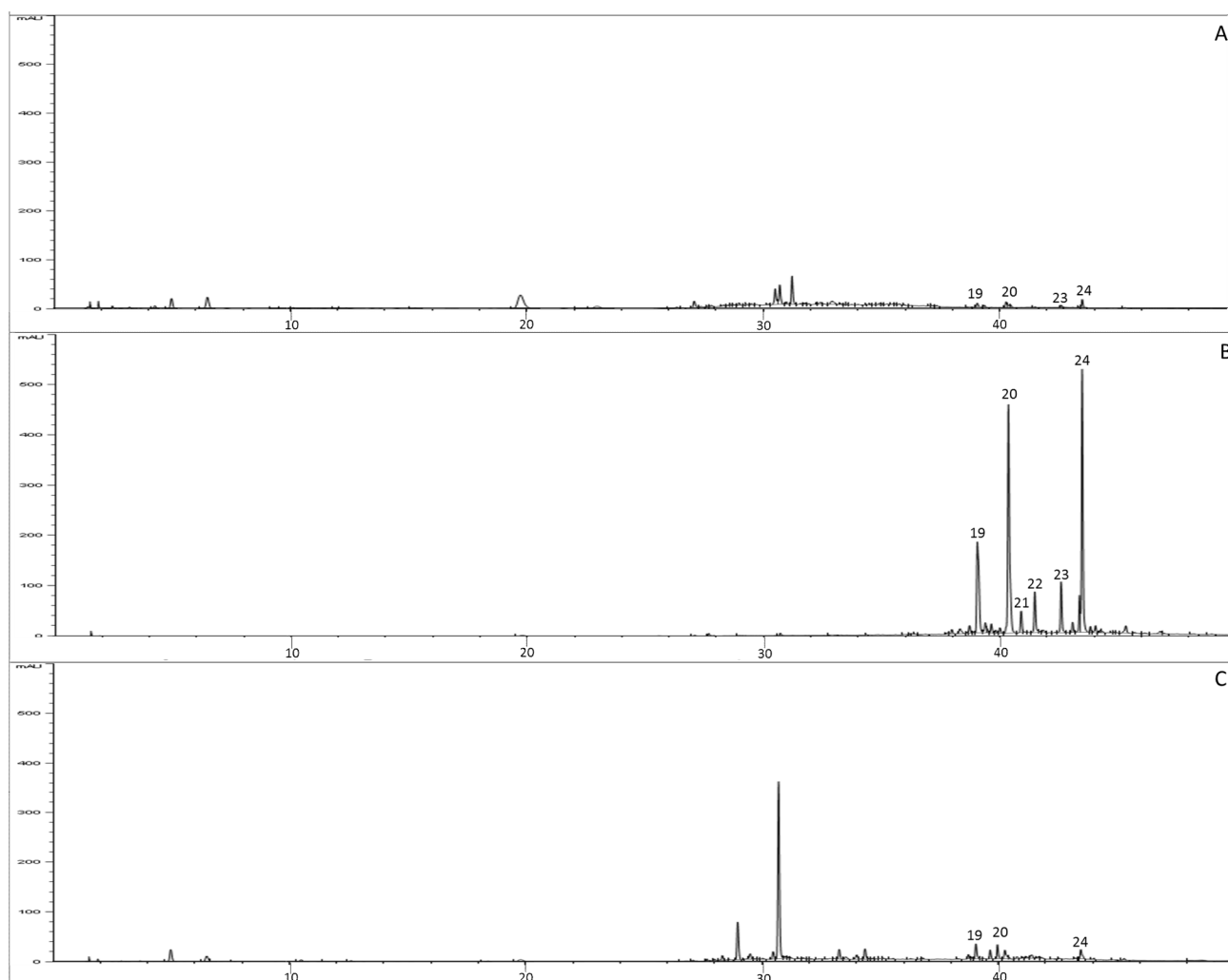


Figura 15: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) do extrato bruto hidroetanólico de *Hyptis lacustris* e de suas fases. A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5  $\mu$ m) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a metodologia com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de 3  $\mu$ L. A: extrato bruto hidroetanólico; B: fase hexânica; C: fase diclorometânica. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações dos constituintes terpenoides majoritários da tabela 6.

Tabela 6: Constituintes terpenoidicos majoritários do extrato bruto hidroetanólico (EE) e suas respectivas fases (FH: hexânica e FD: diclorometânica), analisadas por CLAE-DAD.

Constituinte	Tr (min)	UV/Visível (nm)	Sugestão	Porcentagem relativa (%)		
				EE	FH	FD
19	39,055	280; 300 (om)	Sugiol	2,09	14,93	3,98
20	40,369	270	Horminona	0,89	29,81	-
21	40,909	280	Diterpenoide abietano	-	2,46	-
22	41,485	271	7-O-acetilhorminona	-	4,55	1,34
23	42,600	275	6,7-Dehidroferruginol	0,83	5,50	-
24	43,501	271	Diterpenoide abietano	3,15	27,05	3,01
Total				5,96	84,30	8,33

Tr: Tempo de retenção médio em minuto

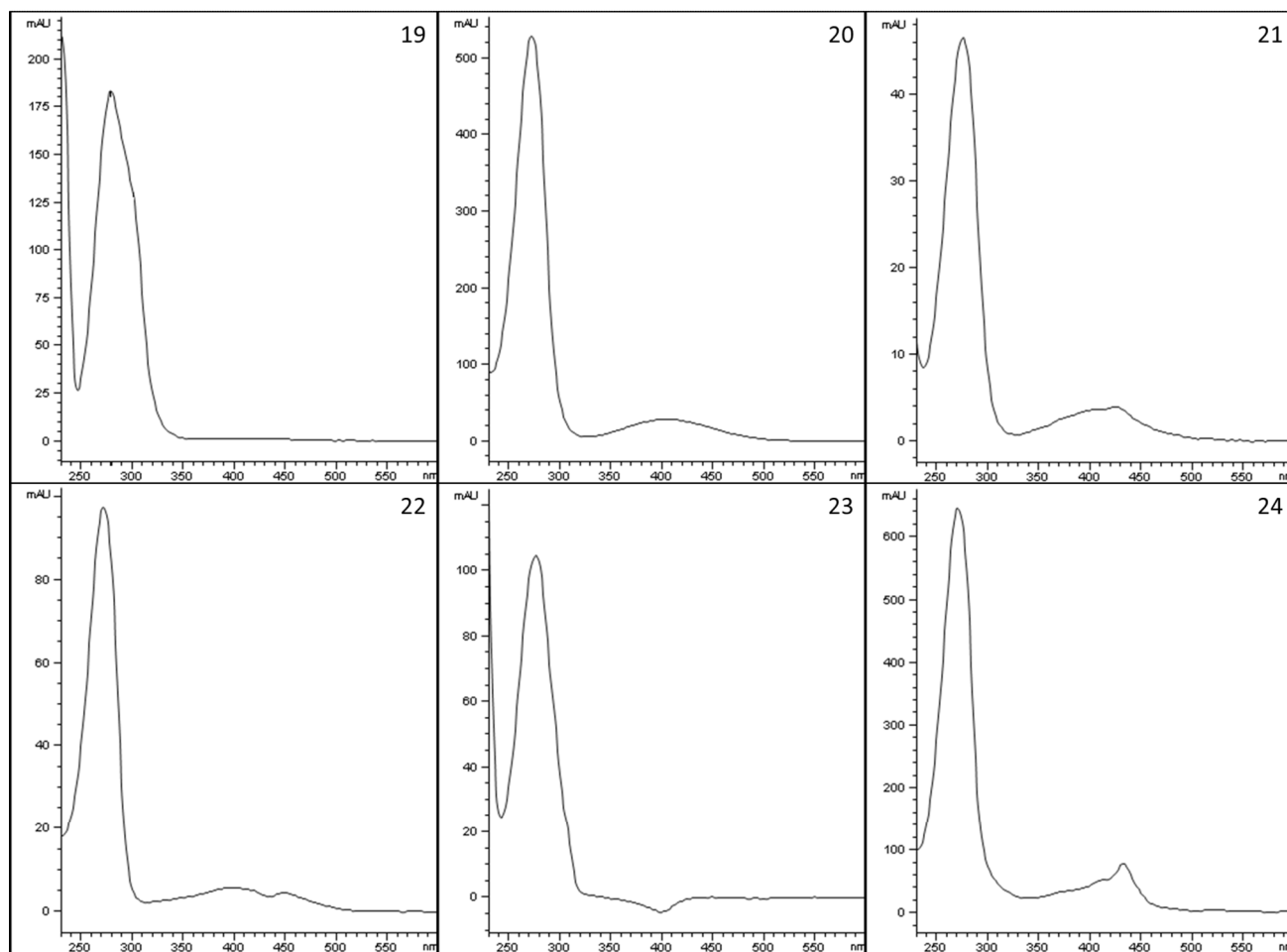


Figura 16: Espectros de absorção UV/Visível dos constituintes terpenoidicos detectados por CLAE-DAD (280 nm) no extrato bruto hidroetanólico e nas fases hexânica e diclorometânica de *H. lacustris*. Números de 19 ao 24 correspondem aos compostos apresentados na tabela 6.

A fase hexânica foi submetida à CLAE semi-preparativa para as coletas dos picos majoritários, sendo obtidas 6 frações (FH19, FH20, FH22, FH23, FH24 e FH25) (figura 17 e 18).

As frações FH19, FH20, FH22, FH23, FH24 e FH25 foram submetidas à análise por CG-EM e RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e DEPT 135.

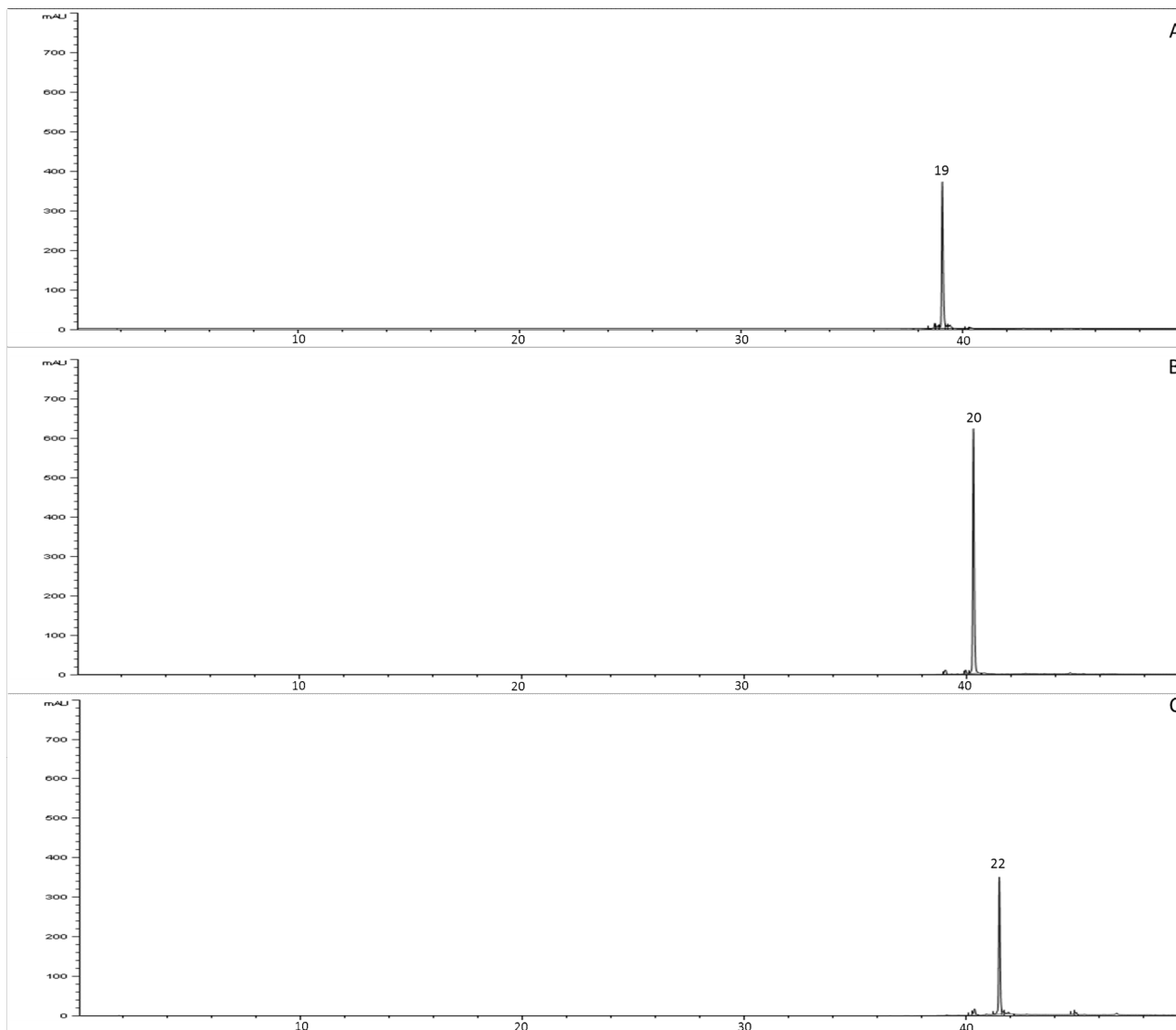


Figura 17: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) das frações hexânicas FH19, FH20 e FH22 obtidas por CLAE-DAD semi-preparativa. A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5  $\mu$ m) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a metodologia com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de 3  $\mu$ L. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações dos constituintes terpenoidicos majoritários da tabela 6.

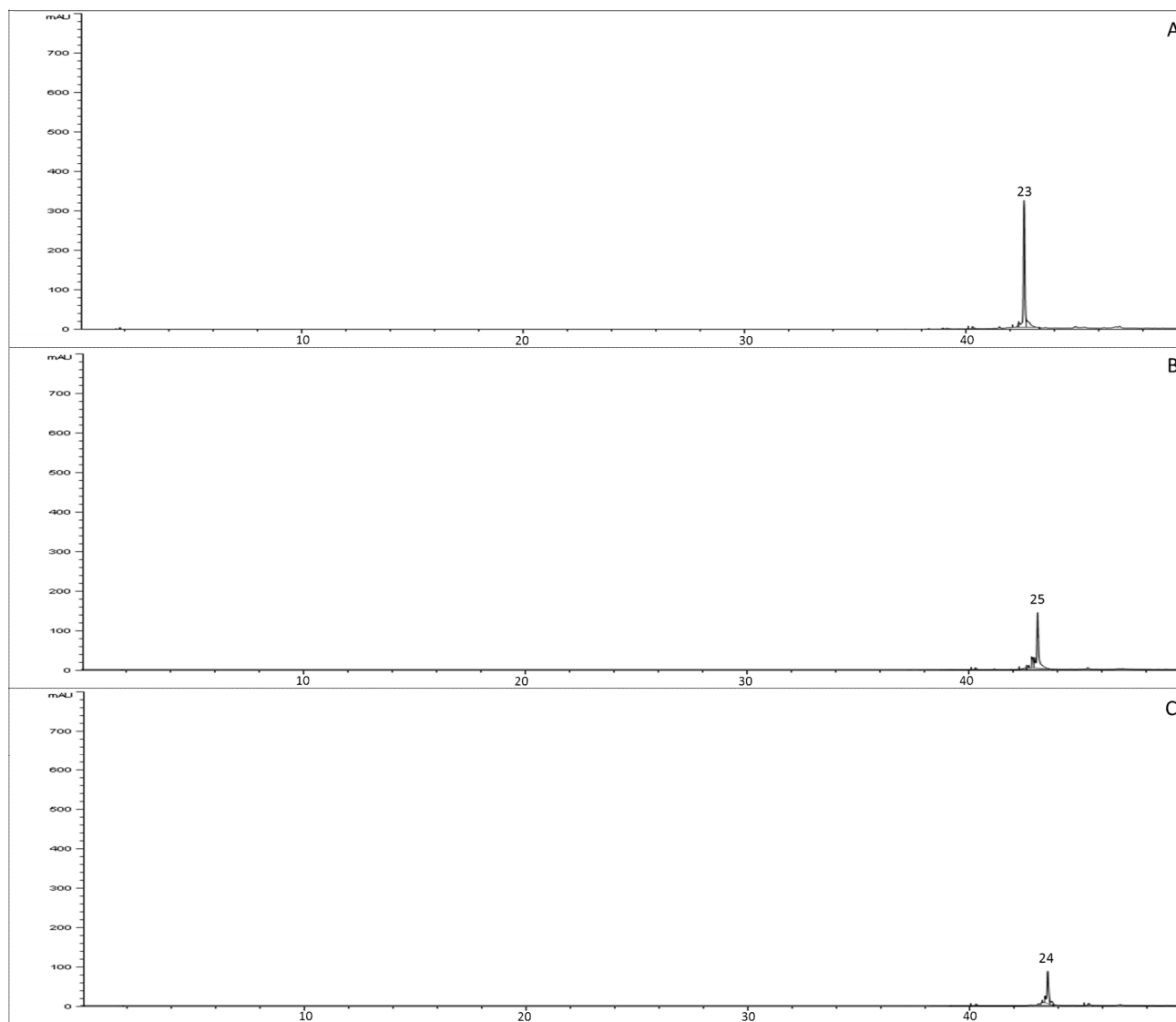


Figura 18: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) das frações hexânicas FH23, FH24 e FH25 obtidas por CLAE-DAD semi-preparativa. A coluna usada foi a Zorbax C18 (4.6 x 150 mm x 3,5  $\mu$ m) a 45 °C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), começando a metodologia com 10% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, aumentando para 50% (22-32 min), aumentando para 100% (32-42 min) e mantendo isocrático por mais 8 min. O fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . O volume de 3  $\mu$ L. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações dos constituintes terpenoidicos majoritários da tabela 6.

Os constituintes de 20 ao 24 foram propostos como diterpenoides abietanos devido às características de seus espectros de absorção UV/Visível (figura 16). Todos possuem somente uma banda máxima de absorção entre 270 e 284 nm, indicando a presença de um anel aromático em sua estrutura tricíclica. Além disso, essa subclasse de diterpenoides é muito comum em espécies pertencentes à Lamiaceae (González, 2015) e ao gênero *Hyptis*, como *Hyptis crassifolia* Mart. ex Benth. (Lima et al., 2015) e espécies anteriormente pertencentes ao gênero, como *Medusantha martiusii* (Costa-Lotufo et al., 2003), por exemplo.

Os diterpenoides abietanos aromáticos são a maior subclasse de abietanos de ocorrência natural, sendo descritos até 2015 cerca de 200 substâncias. São caracterizados por possuírem um esqueleto tricíclico, denominado esqueleto abietano (figura 19), no qual o anel C, nessa subclasse, é aromático e seu esqueleto possui diferentes graus de oxigenação em diversas posições do anel B e C, sendo que o anel B também pode possuir ligações dupla (González, 2015). Os compostos dessa classe também podem ser classificados de acordo com o número de ligações duplas; quando possuem três ligações duplas são denominados abietatrienos, quando possuem quatro, são denominados abietatetraenos (González, 2015). Os primeiros membros desse grupo sintetizados são o ácido dehidroabiético e o ferruginol, sintetizados a partir de reações de ciclizações e rearranjos do geranilgeranil difosfato, formando o esqueleto tricíclico, e aromatização do anel C (González, 2015).

Apesar de pelos cromatogramas (CLAE-DAD) as frações parecerem ser constituídas por somente uma substância, das 6 frações submetidas às técnicas de RMN somente três (FH19, FH20 e FH22) foram confirmadas como compostos isolados (**19**, **20** e **22**). A fração FH25 foi verificada ser uma mistura de dois diterpenoides abietanos e ácidos graxos. As frações FH23 e FH24 foram analisadas por RMN (figura A10 e A11), mas resultaram em espectros com maior proporção de sinais indicativos da presença de ácidos graxos em sua constituição, representados pelos sinais na região entre 10 e 60 ppm, do que sinais representativos aos diterpenoides abietanos, não sendo possível a identificação desses últimos por RMN. Tal contaminação por ácidos graxos não foi notada na análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, uma vez que estes não absorvem nos comprimentos de ondas utilizados para detecção.

A fração FH19 (substância **19**) apresentou as seguintes características: Tret (39,055 min); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 280, 300 (om) nm; MM (300) m/z (%): 300 (64); 285 (100); 243 (22); 229 (16); 217 (53); 215 (29); 201 (15); 187 (19); 128 (16); 69 (18). De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura A2) e DEPT 135 (figura A3), a substância possui 20 carbonos correspondentes a 5 metilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 21,22 (C-16), 21,05 (C-17), 20,63 (C-18), 31,83 (C-19) e 22,30 (C-20) ppm; 4 metilenos,  $\delta_{\text{C}}$ : 37,63 (C-1), 18,82 (C-2), 41,29 (C-3) e 35,86 ppm (C-6); 4 metinos, dos quais 1 está inserido em um anel saturado de 6 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 49,44 ppm (C-5), um em uma cadeia lateral,  $\delta_{\text{C}}$ : 26,50 ppm (C-15) e dois em um anel aromático,  $\delta_{\text{C}}$ : 109,33 (C-11) e 126,20 ppm (C-14); e 7 carbonos quaternários, dos quais dois estão inseridos em um ciclo saturado de 6 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 32,60 (C-4) e 37,74 ppm (C-10), um correspondente a uma cetona de um ciclo saturado,  $\delta_{\text{C}}$ : 199,40 ppm (C-7), dois inseridos nas intersecções do anel aromático com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 123,25 (C-8) e 156,56 ppm (C-9), um inserido no anel aromático ligado a uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 133,34 ppm (C-13) e um inserido no anel aromático ligado a uma hidroxila,  $\delta_{\text{C}}$ : 160,18 ppm (C-12). Esses dados sugerem que o composto é um diterpenoide abietano, confirmado pela presença, no espectro de  $^1\text{H}$  (figura A1), de um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,13 ppm (H-15), característica comum dessa classe de metabólitos. A posição da hidroxila no anel aromático foi definida pela presença de dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,65 (H-11) e 7,78 ppm (H-14), indicando um anel aromático com dois hidrogênios em posição para. Com base nesses sinais, a substância foi proposta ser o sugiol (**19**), proposição confirmada pelo padrão de fragmentação obtido por CG-EM, em comparação com a biblioteca NIST (Tabela 5) e com o seu espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN em comparação com a literatura (Ara, et al., 1989) (tabela 7). O sugiol é uma substância pertencente à classe dos diterpenoides do tipo abietanos que possuem como característica o esqueleto tricíclico, cujo o anel C pode ser aromático, e uma cadeia lateral de três carbonos ligada a esse anel (Marcos et al., 2010). Esse constituinte possui o anel C aromático com uma hidroxila ligada a ele e já foi relatado em espécies pertencentes ao gênero *Hyptis*, como *Hyptis crassifolia* (Lima et al., 2015).

Tabela 7: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do composto **19** em  $\text{CDCl}_3$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 19 ( $\delta$ em ppm)			Sugiol (Kolak et al., 2005; Fronza et al., 2011)		Sugiol (Ara et al., 1989)	
	DEPT 135	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$
C1	CH <sub>2</sub>	2,15 (brd; $J=12,6$ ) 1,54-1,56 (m)	37,63	2,25 (brdt; $J=3,0; 13,0$ ) 1,56 (m)	37,3		
C2	CH <sub>2</sub>	1,67-1,70 (m) 1,77 (dd; $J= 13,4; 4,5$ )	18,82	1,68 (m) 1,79 (m)	18,4		
C3	CH <sub>2</sub>	1,30-1,32 (m) 1,51-1,53 (m)	41,29	1,30 (m) 1,55 (m)	40,9		
C4	C		32,60		32,7		
C5	CH	1,89 (sl)	49,44	1,88 (dd; $J= 13,5; 4,2$ )	49,1		
C6	CH <sub>2</sub>	2,52 (d; $J= 13,3$ ) 2,57 (dd; $J= 4,4; 18,1$ )	35,86	2,52 (dd; $J= 13,5; 17,5$ ) 2,64 (dd; $J= 3,5; 17,5$ )	35,4		
C7	C=O		199,4		199,2		
C8	C		123,25		122,4		
C9	C		156,56		156,3		
C10	C		37,74		37,4		
C11	CH	6,65 (s)	109,33	6,70 (s)	109,0		
C12	C-OH		160,18		160,3		
C13	C		133,34		133,0		
C14	CH	7,78 (s)	126,20	7,87 (s)	125,6		
C15	CH	3,13 (sept; $J= 7,0$ )	26,50	3,20 (sept)	26,1		
C16	CH <sub>3</sub>	1,17 (d)	21,22	0,95 (d; $J=7,0$ )	21,8		
C17	CH <sub>3</sub>	1,15 (d)	21,05	0,95 (d; $J=7,0$ )	21,6		
C18	CH <sub>3</sub>	0,92 (s)	20,63	1,22 (s)	20,7		
C19	CH <sub>3</sub>	0,85(s)	31,83	1,22 (s)	31,9		
C20	CH <sub>3</sub>	0,82 (s)	22,30	1,22 (s)	22,5		



A fração FH20 (substância **20**) apresentou as seguintes características: Tret (40,369 min); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 270 nm. Não foi possível obter seu padrão de fragmentação por CG-EM. De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura A5) e DEPT 135 (figura A6), a substância possui 20 carbonos correspondentes a 5 metilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 23,98 (C-15), 19,77 (C-16), 19,88 (C-17), 33,15 (C-18), 21,70 (C-19) e 18,38 ppm (C-20); 4 metilenos,  $\delta_{\text{C}}$ : 35,78 (C-1), 18,85 (C-2), 41,07 (C-3) e 25,77 ppm (C-6); 3 metinos, dos quais um está inserido em uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 23,98 ppm (C-15), um inserido em um ciclo saturado de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 45,75 ppm (C-5) e um inserido em um ciclo saturado de seis carbonos ligado a uma hidroxila,  $\delta_{\text{C}}$ : 63,20 ppm (C-7); e 8 carbonos quaternários, dos quais dois estão inseridos em ciclos saturados de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 33,04 (C-4) e 39,13 ppm (C-10), dois inseridos em intersecções do anel *p*-quinona com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 143,15 (C-8) e 147,84 ppm (C-9), dois são correspondentes a duas cetonas do anel *p*-quinona,  $\delta_{\text{C}}$ : 183,86 (C-11) e 189,12 ppm (C-14), um é um carbono do anel *p*-quinona ligado a uma hidroxila,  $\delta_{\text{C}}$ : 151,07 ppm (C-12) e um inserido em um anel *p*-quinona ligado a uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 124,20 ppm (C-13). Esses dados sugerem que o composto é um diterpenoide abietano, confirmado pela presença de um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,09 ppm (H-15), característica comum dessa classe de metabólitos. Como o espectro de  $^1\text{H}$  (figura A4) não apresentou nenhum sinal na região de deslocamento característico de hidrogênio de anéis aromáticos, foi proposto ser um diterpenoide abietano com o seu anel aromático completamente substituído. Com base nesses sinais, a substância foi proposta ser a horminona (**20**), proposição confirmada pela comparação com o RMN de  $^{13}\text{C}$  descrito na literatura (Rüedi, 1984; Tezuka et al., 1998) (tabela 8). Essa classe de metabólitos são diterpenoides abietanos caracterizados por possuírem um cromóforo no anel aromático com uma benzoquinona em posição *para* ou *orto*, com ocorrência restrita em Lamiaceae (Cavalcanti et al., 2008; Ladeiras et al., 2016), no qual os compostos com a benzoquinona na posição *para* são conhecidos como royleanonas (Ladeiras et al., 2016). Dentro de Nepetoideae, a sua ocorrência já foi descrita em *Eplingiella fruticosa* (Marletti et al., 1976), anteriormente pertencente ao gênero *Hyptis*.

Tabela 8: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do composto **20** em  $\text{CDCl}_3$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 20 ( $\delta$ em ppm)			horminona (Tezuka et al., 1998)	
	DEPT 135	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$
C1	$\text{CH}_2$	1,12 (brd; $J= 4,0$ ) 2,63 (dt; $J= 13,0; 3,0; 3,0$ )	35,78	1,18 (td; $J= 13,5; 3,5$ ) 2,70 (dtd; $J= 13,5; 3,5; 1,5$ )	35,8
C2	$\text{CH}_2$	1,47 (t; $J= 3,6$ ) 1,70 (dt; $J= 13,5; 3,5$ )	18,85	1,47 (dtd; $J= 13,5; 3,5; 1,5$ ) 1,73 (qt; $J= 13,5; 3,5$ )	18,9
C3	$\text{CH}_2$	1,20 (brd; $J= 4,2$ ) 1,56 (dd; $J= 13,2; 4,8$ )	41,07	1,25 (dt; $J= 13,5; 3,5$ ) 1,56 (dt; $J= 13,5; 3,5$ )	41,1
C4	C		33,04		33,0
C5	CH	1,51 (dd; $J= 8,3; 4,2$ )	45,75	1,54 (brd; $J= 13,5$ )	45,7
C6	$\text{CH}_2$	1,63 (dt; $J= 13,5; 3,5$ ) 1,89 (d; $J= 13,9$ )	25,77	1,61 (td; $J= 13,5; 4,5$ ) 1,97 (brd; $J= 13,5$ )	25,8
C7	HC-OH	4,66 (dd; $J= 4,7; 1,3$ )	63,20	4,73 (brd; $J= 4,5$ )	63,2
C8	C		143,15		143,2
C9	C		147,84		147,8
C10	C		39,13		39,1
C11	C=O		183,86		183,9
C12	C-OH		151,07		151,1
C13	C		124,20		124,2
C14	C=O		189,12		189,1
C15	CH	3,09 (sept; $J= 7,0$ )	23,98	3,16 (sept)	24,0
C16	$\text{CH}_3$	1,15 (d)	19,77	1,21 (d; $J= 7,0$ )	19,8
C17	$\text{CH}_3$	1,14 (d; $J= 2,8$ )	19,88	1,22 (d; $J= 7,0$ )	19,9
C18	$\text{CH}_3$	0,91 (s)	33,15	0,98 (s)	33,1
C19	$\text{CH}_3$	0,83 (s)	21,7	0,90 (s)	21,7
C20	$\text{CH}_3$	1,15 (s)	18,38	1,21 (s)	18,4

A fração FH22 (substância **22**) apresentou as seguintes características: Tret (41,485 min); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 271 nm; MM (374); m/z (%): 255 (96); 208 (32); 207 (100); 185 (77); 173 (89); 159 (99); 143 (37); 129 (50); 73 (53); 69 (58). De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura A8) e DEPT 135 (figura A9), a substância possui 22 carbonos correspondentes a 6 metilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 19,69 (C-16), 19,87 (C-17), 32,96 (C-18), 21,62 (C-19), 18,49 (C-20) e 21,11 ppm (COC); 4 metilenos,  $\delta_{\text{C}}$ : 35,79 (C-1), 18,80 (C-2), 40,99 (C-3) e 24,62 ppm (C-6); 3 metinos, dos quais um está inserido em um ciclo saturado de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 46,13 ppm (C-5), um inserido em um ciclo de seis carbonos ligado a um oxigênio,  $\delta_{\text{C}}$ : 64,51 ppm (C-7) e um inserido em uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 24,17 ppm (C-15); e 9 carbonos quaternários, dos quais dois estão inseridos em ciclos saturados de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 32,90 (C-4) e 39,07 ppm (C-10), dois inseridos na intersecção do anel *p*-quinona com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 139,44 (C-8) e 149,94 ppm (C-9), dois são duas cetonas do anel *p*-quinona,  $\delta_{\text{C}}$ : 183,72 (C-11) e 185,45 ppm (C-14), um é um carbono do anel *p*-quinona ligado a uma hidroxila,  $\delta_{\text{C}}$ : 150,77 ppm (C-12), um inserido no anel *p*-quinona ligado a uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 124,67 ppm (C-13) e um é um carbono de um grupo acetila ligado ao oxigênio do carbono 7,  $\delta_{\text{C}}$ : 169,48 ppm (OCO). Esses dados sugerem que o composto é um diterpenoide abietano, confirmado pela presença de um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,09 ppm (H-15), característica comum dessa classe de metabólitos. Como o espectro de  $^1\text{H}$  (figura A7) não apresentou nenhum sinal na região de deslocamento característico de hidrogênio de anéis aromáticos, foi proposto ser um diterpenoide abietano com o seu anel aromático completamente substituído, a presença da acetila foi proposta pela presença de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,96 ppm (COCH<sub>3</sub>), correspondente à metila desse grupo. Com base nesses sinais, a substância foi identificada como a 7-*O*-acetilhorminona (**22**) pela comparação com o RMN de  $^{13}\text{C}$  descrito na literatura (Tezuka et al., 1998) (tabela 9). Dentro de Nepetoideae a sua ocorrência já foi relatada em *Medusantha martiusii* (Araújo et al. 2006) e em *Condea verticillata* (Porter et al., 2009).

Tabela 9: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do composto **22** em  $\text{CDCl}_3$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 22 ( $\delta$ em ppm)			7-O-acetilhorminona (Tezuka et al., 1998)	
	DEPT 135	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$
C1	CH <sub>2</sub>	2,66 (dt; $J= 2,9; 13,2$ ) 1,18 (sl)	35,79	2,73 (dtd; $J= 13,5; 3,5; 1,5$ ) 1,22 (td; $J= 13,5; 3,5$ )	35,8
C2	CH <sub>2</sub>	1,68-1,73 (m) 1,62-1,64 (m)	18,80	1,75 (qt; $J= 13,5; 3,5$ ) 1,57 (dq; $J= 13,5; 3,5$ )	18,8
C3	CH <sub>2</sub>	1,43 (dl; $J= 1,4$ ) 1,26-1,30 (m)	40,99	1,49 (dtd; $J= 13,5; 3,5; 1,5$ ) 1,23 (td; $J= 13,5; 3,5$ )	41,0
C4	C		32,9		33,0
C5	CH	1,40-1,41 (m)	46,13	1,48 (dd; $J= 13,5; 1,5$ )	46,1
C6	CH <sub>2</sub>	1,65-1,67 (m) 1,87 (brd; $J= 13,5$ )	24,62	1,61 (ddd; $J= 14,5; 13,0; 4,0$ ) 1,95 (dt; $J= 14,5; 1,5$ )	24,6
C7	CH-O	5,86 (dd; $J= 4,0; 1,7$ )	64,51	5,94 (dd; $J= 4,0; 1,5$ )	64,5
C8	C		139,44		139,4
C9	C		149,94		150,0
C10	C		39,07		39,1
C11	C=O		183,72		183,7
C12	C-OH		150,77		150,8
C13	C		124,67		124,7
C14	C=O		185,45		185,4
C15	CH	3,09 (sept; $J= 7,0$ )	24,17	3,16 (sept; $J= 7,0$ )	24,1
C16	CH <sub>3</sub>	1,12 (d; $J= 7,0$ )	19,69	1,19 (d; $J= 7,0$ )	19,7
C17	CH <sub>3</sub>	1,16 (d; $J= 7,0$ )	19,87	1,23 (d; $J= 7,0$ )	19,9
C18	CH <sub>3</sub>	0,82 (s)	32,96	0,89 (s)	33,0
C19	CH <sub>3</sub>	0,81 (s)	21,62	0,88 (s)	21,6
C20	CH <sub>3</sub>	1,17 (s)	18,49	1,24 (s)	18,5
	COCH <sub>3</sub>	1,96 (s)	21,11	2,03 (s)	21,1
	OCO		169,48		169,4
	OH	7,07 (s)		7,18 (brs)	

A fração FH23 apresentou um composto com as seguintes características: Tret (42,600 min); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 275 nm; MM (284); m/z (%): 284 (53); 213 (65); 207 (84); 202 (100); 200 (37); 199 (67); 185 (40); 159 (52); 157 (36); 73 (42). Em comparação com o espectro de massas presente na literatura (Otto et al., 2001; 2002), a substância foi proposta ser o diterpenoide abietano 6,7-Dehidroferruginol (**23**). Dentro de Lamiaceae essa substância já foi descrita em *Salvia apiana* Jeps. (González et al., 1992) e em *Salvia munzii* Epling (Luis e Grillo, 1993).

A fração FH24 apresentou uma substância com as seguintes características: Tret (43,501); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 271 nm; MM (284); m/z (%): 187 (45); 69 (44); 44 (100); 43 (67); 41 (60).

A fração FH25 (substâncias **25** e **26**) é composta por dois diterpenoides abietanos e ácidos graxos, dos quais um dos diterpenoides apresentou as seguintes características: Tret (43,012); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 284 nm; MM (286); m/z (%): 286 (78); 271 (100); 207 (46); 201 (60); 189 (94); 187 (36); 175 (95); 149 (47); 147 (43); 69 (84). De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura A13) e DEPT 135 (figura A14) desse diterpenoide, a substância possui 20 carbonos, correspondentes a 5 metilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 22,63 (C-16), 22,75 (C-17), 33,31 (C-18), 21,75 (C-19) e 24,80 ppm (C-20); 5 metilenos,  $\delta_{\text{C}}$ : 38,87 (C-1), 19,32 (C-2), 41,68 (C-3), 19,23 (C-6) e 29,70 ppm (C-7); 4 metinos, cujo um sinal é indicativo de um carbono inserido em um ciclo saturado de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 50,35 ppm (C-5), dois de carbonos inseridos em um anel aromático,  $\delta_{\text{C}}$ : 110,95 (C-11) e 126,60 ppm (C-14) e um de uma cadeia lateral de 3 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 26,79 ppm (C-15); e 6 carbonos quaternários, dos quais 2 sinais são indicativos de carbonos inseridos em ciclos saturados de 6 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 33,44 (C-4) e 37,50 ppm (C-10), dois de carbonos inseridos na intersecção do anel aromático com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 127,69 (C-8) e 148,63 ppm (C-9), um sinal indicativo de um carbono de anel aromático ligado a uma hidroxila,  $\delta_{\text{C}}$ : 150,70 ppm (C-12) e um sinal indicativo de um carbono de anel aromático ligado a uma cadeia lateral de 3 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 131,39 ppm (C-13). Esses dados sugerem a presença de um diterpenoide abietano, confirmado pela presença de um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,11 ppm (H-15), característica comum dessa classe de metabólitos secundários. A posição dos metinos no anel aromático foi proposta estar localizada em *para* em relação uma a outra, devido a dois simpletos no espectro de  $^1\text{H}$  (figura A12), em  $\delta_{\text{H}}$  6,63 (H-11) e 6,83 ppm (H-14). Com base nesses sinais, a substância foi identificada como Ferruginol (**25**), através da comparação com o RMN de  $^{13}\text{C}$  descrito na literatura (Fronza et. al., 2011) (tabela 10). Dentro de Lamiaceae esta substância já foi descrita em espécies de *Salvia*, e dentro de *Hyptidinaea* em *Oocephalus crassifolius* (Mart. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (Lima et. al., 2015) e em *Hyptis rhomboidea* M. Martens & Galeotti (Lin et. al., 1993).

Tabela 10: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do composto **25** em  $\text{CDCl}_3$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 25 ( $\delta$ em ppm)			Ferruginol (Fronza et al., 2011)	
	DEPT 135	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$
C1	CH <sub>2</sub>	1,36 (sl)	38,87	1,39 (m)	38,8
C2	CH <sub>2</sub>	1,56-1,58 (m)	19,32	1,57 (m)	19,3
		1,71-1,73 (m)		1,73 (m)	
C3	CH <sub>2</sub>	1,40-1,42 (m)	41,68	1,41 (m)	41,7
C4	C		33,44		33,3
C5	CH	1,32-1,34 (m)	50,35	1,32 (dd)	50,3
C6	CH <sub>2</sub>	1,61-1,64 (m)	19,23	1,65 (m)	19,2
		1,86-1,88 (m)		1,84 (m)	
C7	CH <sub>2</sub>	1,76-1,78 (m)	29,70	1,79 (m)	29,7
		2,77 (m)		2,83 (m)	
C8	C		127,69		127,3
C9	C		148,63		148,6
C10	C		37,50		37,4
C11	CH	6,63 (s)	110,95	6,62 (s)	111,0
C12	C-OH		150,70		150,6
C13	C		131,39		131,5
C14	CH	6,83 (s)	126,60	6,83 (s)	126,5
C15	CH	3,11 (sept; J = 7,0)	26,79	3,11 (sept; J = 6,8)	26,7
C16	CH <sub>3</sub>	1,25 (sl)	22,63	1,20 (s)	22,6
C17	CH <sub>3</sub>	1,23 (sl)	22,75	1,20 (s)	22,8
C18	CH <sub>3</sub>	0,85 (s)	33,31	0,85 (s)	33,4
C19	CH <sub>3</sub>	0,89 (s)	21,75	0,90 (s)	21,6
C20	CH <sub>3</sub>	1,14 (s)	24,80	1,15 (s)	24,7

O segundo diterpenoide constituinte da fração FH25 apresentou as seguintes características: Tret (43,012); UV (MeOH)  $\lambda$ /nm: 284 nm, sendo que não foi possível obter o seu padrão de fragmentação pelo CG/EM. De acordo com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura A16) e DEPT 135 (figura A17) da amostra, a substância possui 20 carbonos, correspondentes a 5 metilas,  $\delta_{\text{C}}$ : 22,63 (C-16), 22,56 (C-17), 33,50 (C-18), 21,82 (C-19) e 20,25 ppm (C-20); 5 metilenos,  $\delta_{\text{C}}$ : 38,42 (C-1), 19,23 (C-2), 41,80 (C-3), 18,30 (C-6) e 40,69 ppm (C-7); 4 metinos, dos quais um está inserido em um ciclo saturado de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 55,20 ppm (C-5), dois inseridos em um ciclo de seis carbonos com duas insaturações,  $\delta_{\text{C}}$ : 122,60 (C-11) e 145,41 ppm (C-14) e um inserido em uma cadeia lateral de 3 carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 25,92 ppm (C-15); e 6 carbonos quaternários, dos quais 2 estão inseridos em ciclos saturados de seis carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 34,24 (C-4) e 38,75 ppm (C-10), um inserido na intersecção do anel C com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 168,95 ppm (C-9), um ligado a uma hidroxila na intersecção do anel C com o anel B da estrutura,  $\delta_{\text{C}}$ : 69,32 ppm (C-8), um é uma cetona no anel C,  $\delta_{\text{C}}$ : 187,34 ppm (C-12) e um ao anel C da estrutura ligado a uma cadeia lateral de três carbonos,  $\delta_{\text{C}}$ : 141,93 ppm (C-13). Esses dados sugerem que o composto é um diterpenoide abietano, confirmado pela presença de um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  2,92 ppm (H-15), característica comum dessa classe de metabólitos. A presença de dois sinais no espectro de  $^1\text{H}$  (figura A15), em deslocamentos de  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (H-14) e 6,02 ppm (H-11), indica a presença de dois hidrogênios em insaturações no anel C. Com base nesses sinais, a substância foi identificada como o diterpenoide 8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-ona (**26**), através da comparação com o RMN de  $^{13}\text{C}$  descrito na literatura (Politi et al., 2003) (tabela 11). Dentro de Lamiaceae esse composto já foi encontrado em duas espécies pertencentes ao gênero *Salvia* L. (Guerrero et al., 2006), mas não foi descrita até o momento no gênero *Hyptis*.

Tabela 11: Dados de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do composto **26** em  $\text{CDCl}_3$  em comparação com dados da literatura.

Carbono	Composto 26 ( $\delta$ em ppm)			8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one (Politi et al., 2003)	
	DEPT 135	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (multiplicidade; J em Hz)	$^{13}\text{C}$
C1	CH <sub>2</sub>		38,42		38,3
C2	CH <sub>2</sub>		19,23		19,2
C3	CH <sub>2</sub>		41,80		42,3
C4	C		34,24		34,4
C5	CH		55,20		55,3
C6	CH <sub>2</sub>		18,30		18,2
C7	CH <sub>2</sub>		40,69		40,3
C8	C		69,32		70,0
C9	C		168,95		170,0
C10	C		38,75		38,6
C11	CH	6,02 (s)	122,60	6,04 (s)	122,6
C12	C=O		187,34		188,0
C13	C		141,93		143,0
C14	CH	6,39 (d; $J= 1,0$ )	145,41	6,40 (s)	145,9
C15	CH	2,92 (sept; $J= 7,0$ )	25,92	2,94 (sept; $J= 7,0$ )	26,2
C16	CH <sub>3</sub>	1,11 (d; $J= 7,0$ )	22,63	1,10 (d; $J= 7,0$ )	22,3
C17	CH <sub>3</sub>	1,06 (d; $J= 6,0$ )	22,56	1,08 (d; $J= 7,0$ )	22,3
C18	CH <sub>3</sub>	0,92 (s)	33,50	0,91 (s)	34,0
C19	CH <sub>3</sub>	0,99 (s)	21,82	0,97 (s)	22,0
C20	CH <sub>3</sub>	1,36 (s)	20,25	1,37 (s)	20,8



Os três diterpenoides abietanos aromáticos isolados e os identificados das frações de *H. lacustris* estão representados na figura 19, com a massa de cada fração e sua identificação representada na tabela 12.

Todas as fases, frações e isolados obtidos e de onde foram obtidos estão esquematizados na figura 20.

Tabela 12: Frações obtidas através da submissão à CLAE-DAD semi-preparativa da fase hexânica. A numeração dos constituintes está de acordo com os compostos majoritários apresentados na tabela 5.

Fração	Constituinte	Uv/Visível (nm)	Massa (mg)	Sugestão
FH19	19	280; 300 (om)	10,2	Sugiol
FH20	20	270	20,8	Horminona
FH22	22	271	14,1	7- <i>O</i> -acetilhorminona
FH23	23	275	7,6	6,7-dehidroferruginol
FH24	24	271	10,1	Diterpenoide
	25	284		Ferruginol
FH25	26		6,9	8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one

Tr: Tempo de retenção médio em minutos

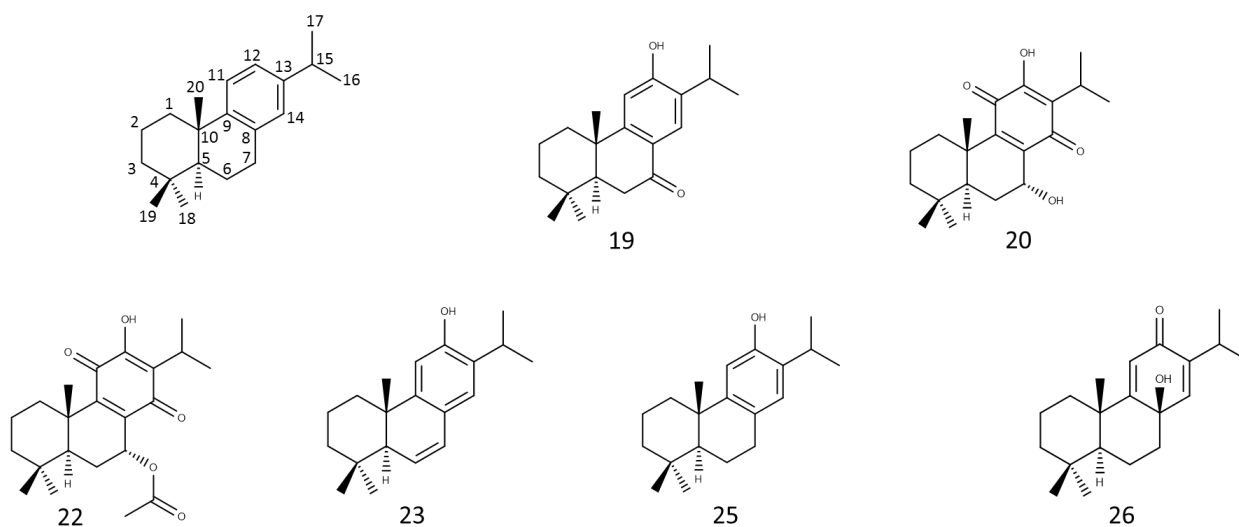


Figura 19: Numeração do esqueleto de carbono dos diterpenoides abietanos aromáticos e a estrutura dos isolados e dos compostos das frações identificados de *H. lacustris*, (**19**): Sugiol; (**20**): Horminona; (**22**): 7-*O*-acetilhorminona; (**23**) 6,7-dehidroferruginol; (**25**) Ferruginol; (**26**) 8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one.

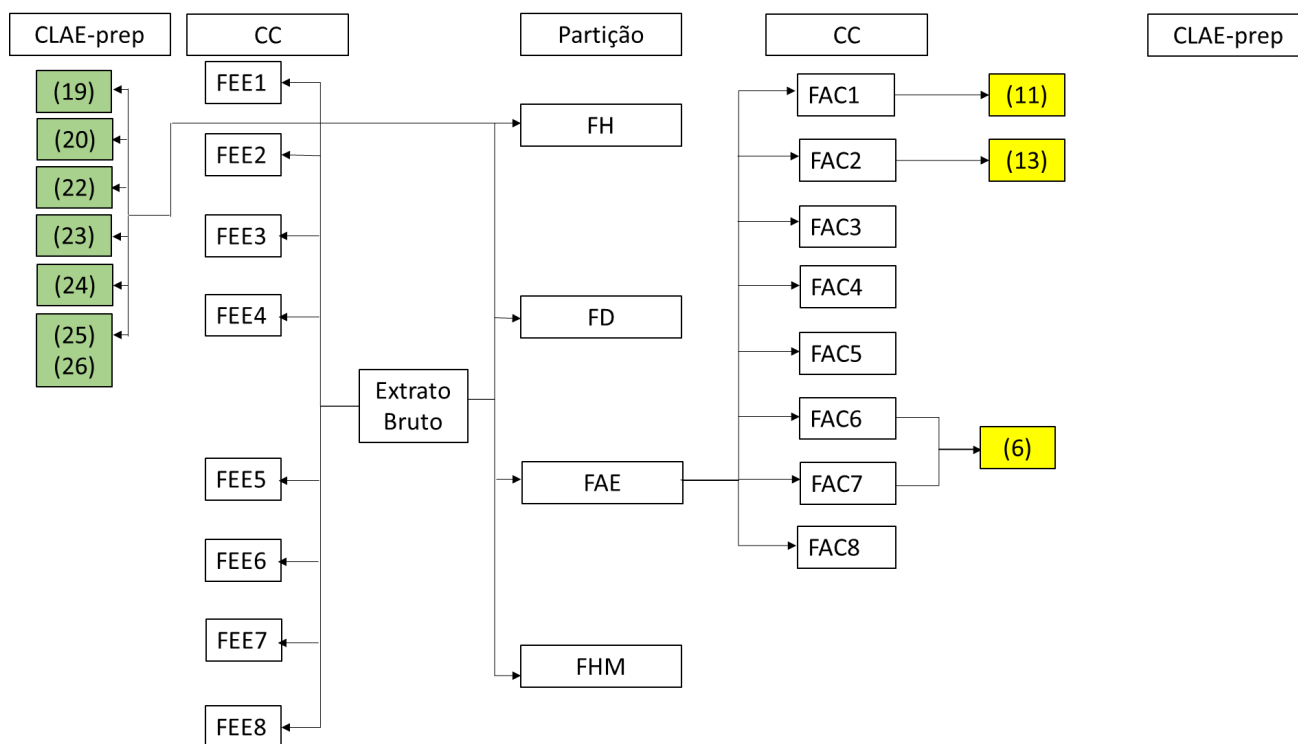


Figura 20: Fluxograma de extração, partição, fracionamento e isolamento dos constituintes majoritários de *Hyptis lacustris*. (CC) corresponde às frações e isolados obtidos por separação por cromatografia de coluna Sephadex; (Partição) corresponde às fases obtidas por partição líquido a líquido; (CLAE-prep) corresponde aos isolados obtidos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa. FH: fase hexânica, FD: fase diclorometânica, FAE: fase de acetato de etila, FHM: fase hidrometanólica, FAC: fração de acetato de etila, FEE: fração do extrato bruto hidroetanólico. Os números dos isolados estão de acordo com os representados na tabela 2, 3, 6 e 12. Em verde, destaque para os isolados diterpenoides e em amarelo os isolados fenólicos.

### 5.5 Atividade antioxidante

Para se analisar a atividade antioxidante *in vitro* foram utilizadas diversas metodologias, como: a atividade do sequestro dos radicais DPPH e ABTS, atividade quelante de ferro, atividade redutora do íon  $\text{Fe}^{3+}$  a íon  $\text{Fe}^{2+}$  (FRAP) e *ORAC*. O uso de diferentes ensaios se deve ao fato de que não existe uma metodologia universal para avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra (Dotan et al., 2004; Niki, 2010), por isso optou-se por utilizar diversos ensaios, cada um com os seus pontos positivos e negativos conforme discutidos a seguir.

Todos os ensaios antioxidantes realizados foram expressos em miligramas equivalentes ao padrão por grama de extrato seco e em  $\text{EC}_{50}$ , que define a concentração necessária de determinada amostra para se ter 50% de efetividade no ensaio utilizado.

O teste de atividade de sequestro do radical DPPH é um dos preferidos a ser utilizado por ser relativamente simples de se reproduzir e utilizar um radical estável com alta absorção no visível e com um coeficiente de extinção molar alto, o que o torna fácil de se analisar com o auxílio de um espectrofotômetro UV/Visível (Niki, 2010). Esse ensaio define a capacidade que determinada substância tem em transferir elétrons (Floegel et al., 2011), ou doar átomos de hidrogênio para estabilizar o radical livre (Antolovich et al., 2001; Molyneaux, 2004) (figura 21). Nesse processo, o radical DPPH, que possui uma coloração roxa com absorbância máxima em 515 nm, adquire uma coloração amarelada, dada pela presença do grupo picril (Molyneaux, 2004), a atividade é dada pela perda da absorbância em 515 nm (Sousa et al., 2007; Li et al., 2009).

A ocorrência de um dos mecanismos, o de abstração de hidrogênio pelo DPPH ou de transferência de elétrons, depende de dois fatores; a natureza do solvente (a sua polaridade principalmente) e o potencial redutor das amostras envolvidas, sendo que em solventes apolares a abstração de Hidrogênio é predominante, mas na presença de radicais fortemente oxidantes, o mecanismo de transferência de elétrons é mais ativo, mesmo nesses meios (Foti et al., 2004).

Como o solvente utilizado nesse ensaio foi o metanol, que é um forte solvente acceptor de ligações com hidrogênio, há o impedimento que esses hidrogênios sejam abstraídos rapidamente pelo radical DPPH; o mecanismo de estabilização predominante é o de transferência de elétrons, com o de abstração de hidrogênio ocorrendo lentamente, se tornando uma reação marginal (Foti et al., 2004).

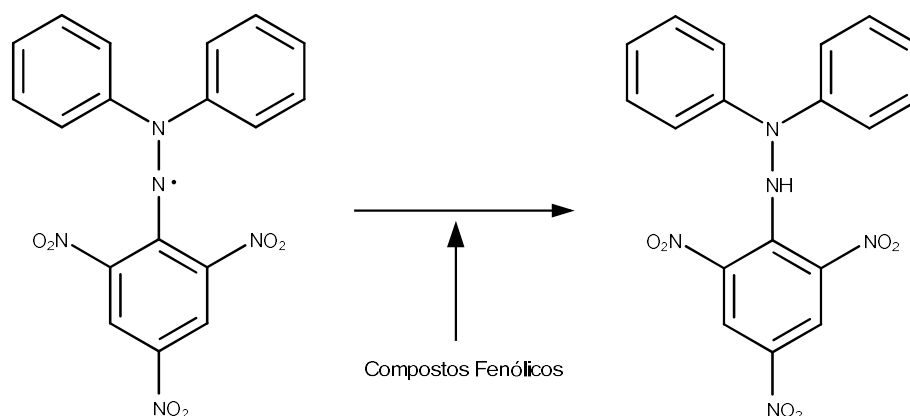


Figura 21: Reação de estabilização do Radical DPPH frente a um composto fenólico doador de hidrogênio. Adaptado de Rufino et al. (2007a).

Analisando a atividade do sequestro do radical DPPH em miligramas equivalentes de trolox por grama de extrato seco ( $\text{mg ET g}^{-1}$ ), os valores variaram de 31,65 a 580,56  $\text{mg ET g}^{-1}$ , sendo a fase de acetato de etila (580,56  $\text{mg ET g}^{-1}$ ) a que apresentou o maior conteúdo de substâncias equivalentes ao padrão trolox, um reconhecido antioxidante sintético, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (265,63  $\text{mg ET g}^{-1}$ ), a fase hidrometanólica (176,73  $\text{mg ET g}^{-1}$ ), a fase diclorometânica (97,07  $\text{mg ET g}^{-1}$ ) e a fase hexânica (31,65  $\text{mg ET g}^{-1}$ ) (tabela 13).

Quando expresso em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato seco ( $\text{mg EQ g}^{-1}$ ), os valores variaram de 24,52 a 566,74  $\text{mg EQ g}^{-1}$ , apresentando um perfil semelhante aos resultados obtidos em miligramas equivalentes de trolox por grama de extrato seco, com a fase de acetato de etila (566,74  $\text{mg EQ g}^{-1}$ ) apresentando maior conteúdo de substâncias equivalentes ao padrão quercetina, um flavonol com grande atividade antioxidante.

Analisando a atividade antioxidante quanto ao seu  $\text{EC}_{50}$ , que define a concentração necessária para se atingir 50% de efetividade no teste e, indicando que, quanto menor a concentração, mais efetiva é aquela substância antioxidante, o perfil foi parecido com as outras duas representações: a fase de acetato de etila (16,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentou a maior atividade, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (24,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pela fase hidrometanólica (41,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pela fase diclorometânica (78,78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e pela fase hexânica (200,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os padrões utilizados apresentaram  $\text{EC}_{50}$  baixos, com o trolox (5,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e a quercetina (5,64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentando valores similares e o ácido rosmarínico (1,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentando a melhor atividade entre os padrões testados (tabela 13).

Comparando os resultados das amostras com os padrões, temos que a fase de acetato de etila pode ser considerada um bom antioxidante por essa metodologia, pois apresenta valor próximo ao apresentado pelos padrões utilizados, que são substâncias isoladas com reconhecida atividade antioxidante.

Tabela 13: Conteúdo de substâncias antioxidantes representadas em miligramas equivalentes de padrão por grama de extrato seco e em EC<sub>50</sub> do extrato bruto hidroetanólico e das diferentes fases na atividade de sequestro do radical DPPH.

Amostras	mg ET g <sup>-1</sup>	mg EQ g <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Extrato bruto	265,63 ± 29,55	208,41 ± 12,70	24,79
Fase hexânica	31,65 ± 1,22	24,52 ± 0,68	200,74
Fase diclorometânica	97,07 ± 6,23	59,78 ± 5,85	78,78
Fase de acetato de etila	580,56 ± 49,05	566,74 ± 30,03	16,73
Fase hidrometanólica	176,73 ± 8,00	111,35 ± 10,94	41,43
Trolox	-	-	5,90
Quercetina	-	-	5,64
Ácido rosmarínico <sup>#</sup>	-	-	1,65

<sup>#</sup>: resultado gentilmente cedido pela doutoranda Kátia Pereira dos Santos.

Em comparação com outras espécies pertencentes à mesma subtribo, o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* (EC<sub>50</sub>: 24,79 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou uma atividade de sequestro do radical DPPH menor do que *Mesosphaerum suaveolens* (EC<sub>50</sub>: 11,70 µg mL<sup>-1</sup>) (Scio et al., 2012); mas, em contrapartida, atividade maior do que outras espécies, como *Medusantha martiusii* (EC<sub>50</sub>: 134 µg mL<sup>-1</sup>) (Santos et al., 2010), *Eplingiella fruticosa* (EC<sub>50</sub>: 35 µg mL<sup>-1</sup>) (Andrade et al., 2010), *Condea fasciculata* Benth. (EC<sub>50</sub>: 35 µg mL<sup>-1</sup>) (Silva et al., 2009), *Condea elegans* Briq. (EC<sub>50</sub>: 89,91 µg mL<sup>-1</sup>), *Hyptis tetracephala* Bordinon (EC<sub>50</sub>: 36,06 µg mL<sup>-1</sup>), *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze (EC<sub>50</sub>: 63,83 µg mL<sup>-1</sup>) e *Raphiodon echinus* Benth. (EC<sub>50</sub>: 61,58 µg mL<sup>-1</sup>) (Mensor et al., 2001). Todas espécies muito utilizadas na medicina popular de diversas regiões do mundo.

A fase de acetato de etila (EC<sub>50</sub>: 16,73 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou uma maior atividade em relação à de *Eplingiella fruticosa* (EC<sub>50</sub>: 36,67 µg mL<sup>-1</sup>) (Andrade et al., 2010), atividade semelhante à de *Condea elegans* (EC<sub>50</sub>: 14,67 µg mL<sup>-1</sup>) e de *Raphiodon echinus* (EC<sub>50</sub>: 10,64 µg mL<sup>-1</sup>) (Mensor et al., 2001).

A fase de Hexano ( $EC_{50}$ : 200,74  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentou uma atividade consideravelmente menor que à de *Eplingiella fruticosa* ( $EC_{50}$ : 78,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Andrade et al., 2010), mas maior do que às de *Condea elegans* e *Raphiodon echinus* que não apresentaram atividade (Mensor et al., 2001).

A fase diclorometânica ( $EC_{50}$ : 78,78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentou uma atividade consideravelmente maior do que à de *Condea elegans* ( $EC_{50}$ : 231,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e um pouco maior do que à de *Raphiodon echinus* ( $EC_{50}$ : 98,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Mensor et al., 2001).

Em comparação com espécies pertencentes à Lamiaceae o extrato bruto hidroetanólico ( $EC_{50}$ : 24,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentou atividade maior do que o de *Mentha arvensis* L. ( $EC_{50}$ : 63,38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Santos et al., 2010).

A metodologia de atividade de sequestro do radical ABTS segue um princípio semelhante à do DPPH, na qual um radical sintético é usado para medir a capacidade de determinada amostra em transferir elétrons (Floegel et al., 2011), doar átomos de hidrogênio ou até mesmo pela combinação dos dois mecanismos e, assim, estabilizando o radical livre (Nenadis et al., 2004). O ABTS, quando na sua forma radicalar, possui uma coloração azul/verde com absorção máxima em 734 nm, a partir do momento em que é estabilizado se torna incolor e, dessa forma, a sua atividade é fornecida pela perda de absorbância em 734 nm, quanto maior a perda, mais ativa é a amostra (figura 22).

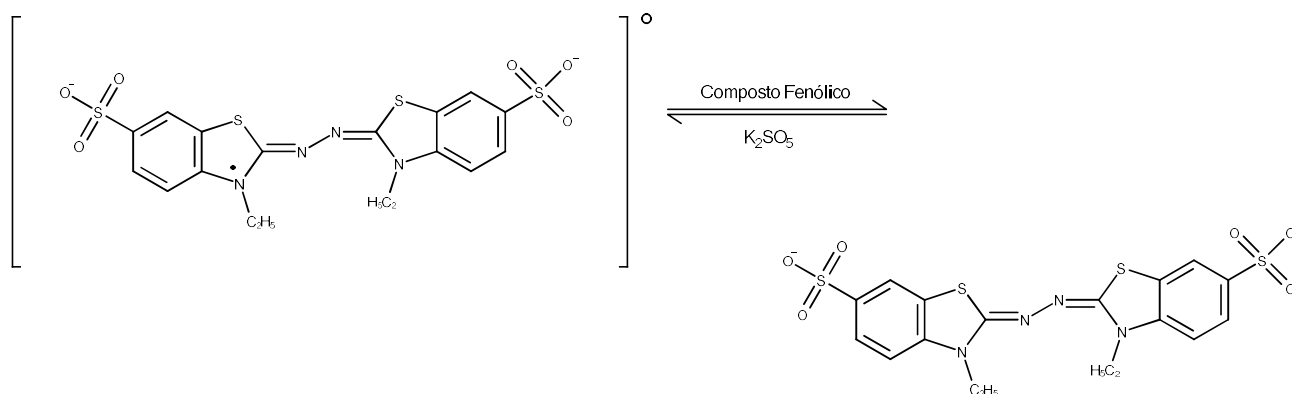


Figura 22: Reação de estabilização do Radical ABTS<sup>•+</sup> frente a um composto fenólico doador de elétrons. Adaptado de Rufino et al. (2007b).

Analisando a atividade de sequestro do radical ABTS expresso em miligramas equivalentes de trolox por grama de extrato seco (mg ET g<sup>-1</sup>), os valores variaram de 47,64 a 400,93 mg ET g<sup>-1</sup>, sendo que a fase que possui maior conteúdo de substâncias equivalentes ao trolox é a de acetato de etila (400,93 mg ET g<sup>-1</sup>), seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (395,79 mg ET g<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (270,12 mg ET g<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (100,43 mg ET g<sup>-1</sup>) e a de menor conteúdo foi a fase hexânica (47,64 mg ET g<sup>-1</sup>) (tabela 14).

Quando expresso em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ g<sup>-1</sup>), os valores variaram entre 63,92 e 636,36 mg EQ g<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (636,36 mg EQ g<sup>-1</sup>) a que apresentou maior conteúdo de substâncias equivalentes à quercetina.

Em relação à EC<sub>50</sub>, os valores variaram de 5,18 a 65,23 µg mL<sup>-1</sup>, sendo que a amostra que teve maior atividade antioxidante foi a fase de acetato de etila (5,18 µg mL<sup>-1</sup>), seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (9,03 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (15,44 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (40,28 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (65,23 µg mL<sup>-1</sup>). Como era esperado, os padrões utilizados apresentaram valores inferiores, com o ácido rosmarínico (2,33 µg mL<sup>-1</sup>) e o trolox (3,86 µg mL<sup>-1</sup>) sendo mais efetivos do que a quercetina (5,49 µg mL<sup>-1</sup>) (tabela 14). Novamente, assim como no teste de atividade de sequestro do radical DPPH, a fase de acetato de etila, que é uma mistura de substâncias, apresentou um bom potencial antioxidante, pois apresentou atividade semelhante à quercetina.

Tabela 14: Conteúdo de substâncias antioxidantes representadas em miligramas equivalentes de padrão por grama de extrato seco e em EC<sub>50</sub> do extrato bruto hidroetanólico e das diferentes fases na atividade de sequestro do radical ABTS.

<b>Amostras</b>	<b>mg ET g<sup>-1</sup></b>	<b>mg EQ g<sup>-1</sup></b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
Extrato bruto	395,79 ± 4,57	434,55 ± 42,12	9,03
Fase hexânica	47,64 ± 1,11	63,92 ± 3,19	65,23
Fase diclorometânica	100,43 ± 8,83	131,27 ± 6,65	40,28
Fase de acetato de etila	400,93 ± 0,15	636,36 ± 0,27	5,18
Fase hidrometanólica	270,12 ± 21,10	302,51 ± 19,50	15,44
Trolox			3,86
Quercetina			5,49
Ácido rosmarínico <sup>#</sup>			2,33

<sup>#</sup>: resultado gentilmente cedido pela doutoranda Kátia Pereira dos Santos.

Comparando a atividade de sequestro do radical ABTS com três espécies do gênero *Mentha*, analisadas por Lordêllo (2015), *M. piperita* (EC<sub>50</sub>: 30 µg mL<sup>-1</sup>), *M. rotundifolia* (L.) Huds. (EC<sub>50</sub>: 40 µg mL<sup>-1</sup>) e *M. villosa* Huds. (EC<sub>50</sub>: 40 µg mL<sup>-1</sup>), o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* (EC<sub>50</sub>: 9,03 µg mL<sup>-1</sup>), apresentou uma atividade superior à de todas as espécies analisadas. Esse resultado era esperado, pois, como discutido anteriormente, o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* apresentou alta proporção de compostos fenólicos, classes de compostos com reconhecida atividade antioxidante (Procházková et al., 2011).

A fase de acetato de etila (EC<sub>50</sub>: 5,18 µg mL<sup>-1</sup>) também apresentou uma atividade maior do que a mesma fase de *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (EC<sub>50</sub>: 22 µg mL<sup>-1</sup>), uma reconhecida planta medicinal utilizada na medicina tradicional chinesa, sendo considerada uma planta medicinal de alto nível pelo antigo livro tradicional de medicina chinesa chamado *Shennong's Classic of Herbology* (Li et al., 2009).

A metodologia da atividade quelante de ferro analisa a capacidade de determinada amostra em formar quelatos com íons Ferro. Essa propriedade é importante pois os íons metálicos, quando em excesso no nosso organismo, causam efeitos deletérios através da capacidade de transferirem elétrons para moléculas não radicalares, assim intermediando a formação de muitas espécies reativas de oxigênio (ERO's). Ao serem quelados, eles se tornam indisponíveis para a consequente produção de radicais livres, inclusive a do radical hidroxila, um dos mais reativos no organismo e produzido pela reação de Fenton, na qual a transferência de um elétron do íon Fe<sup>2+</sup> para o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) faz com que ele se degrade e origine radicais hidroxilas (OH<sup>•</sup>) (Heim et al., 2002). A atividade nessa metodologia é dada pela capacidade que determinada amostra tem de quelar os íons Fe<sup>2+</sup> existentes no complexo com o Ferrozine (Ebrahimzadeh et al., 2008). Quando o íon está presente o Ferrozine possui uma coloração avermelhada com absorvância máxima em 562 nm, ao perder o íon para alguma substância quelante ocorre a perda dessa coloração e, conseqüentemente, a perda da absorvância em 562 nm, com isso a atividade é dada pela perda de absorvância, quanto maior a perda, mais eficiente é a amostra (figura 23).



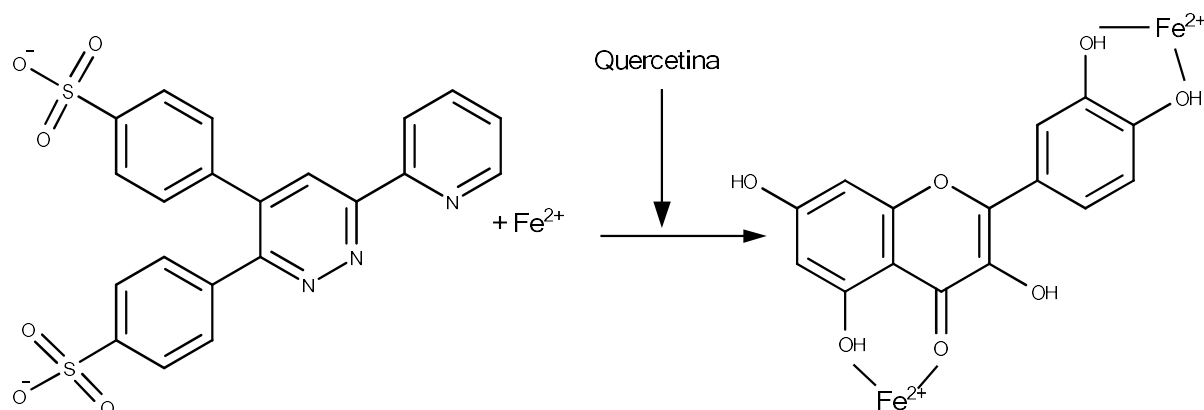


Figura 23: Reação de quelação do íon ferro presente no complexo com ferrozina por uma molécula de quercetina. Adaptado de Gutierrez e Gehlen (2002).

Analisando a atividade expressa em miligramas equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG g<sup>-1</sup>), os valores variaram de 13,17 a 167,38 mg EAG g<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (167,38 mg EAG g<sup>-1</sup>), novamente a que apresentou maior conteúdo de substâncias equivalentes ao ácido gálico, seguida pela fase hidrometanólica (79,12 mg EAG g<sup>-1</sup>), pelo extrato bruto hidroetanólico (76,26 mg EAG g<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (26,99 mg EAG g<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (13,17 mg EAG g<sup>-1</sup>) (tabela 15).

Quando analisados por EC<sub>50</sub>, os valores variaram de 44,75 a 445,99 µg mL<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato (44,75 µg mL<sup>-1</sup>) a que apresentou maior atividade antioxidante, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (90,99 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (118,86 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (354,09 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (445,99 µg mL<sup>-1</sup>), em comparação com o ácido gálico (4,56 µg mL<sup>-1</sup>) nenhuma das amostras apresentou um valor próximo, indicando baixa capacidade quelante de ferro (tabela 15).

Tabela 15: Conteúdo de substâncias antioxidantes representadas em miligramas equivalentes de padrão por grama de extrato seco e em EC<sub>50</sub> do extrato bruto hidroetanólico e das diferentes fases na atividade quelante de ferro.

Amostras	mg EAG g <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Extrato bruto	76,26 ± 8,45	90,99
Fase hexânica	13,17 ± 1,17	445,99
Fase diclorometânica	26,99 ± 3,28	354,09
Fase de acetato de etila	167,38 ± 17,58	44,75
Fase hidrometanólica	79,12 ± 10,31	118,86
Ácido gálico		4,56

Comparando a atividade quelante de ferro do extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* (EC<sub>50</sub>: 90,99 µg mL<sup>-1</sup>) com três espécies pertencentes ao gênero *Mentha*, analisadas por Lordêllo (2015), temos que a atividade foi menor do que *M. piperita* (EC<sub>50</sub>: 10 µg mL<sup>-1</sup>), *M. rotundifolia* (EC<sub>50</sub>: 20 µg mL<sup>-1</sup>) e *M. villosa* (EC<sub>50</sub>: 20 µg mL<sup>-1</sup>), indicando, novamente, que *H. lacustris* não apresenta uma boa capacidade quelante de metais em comparação com essas espécies.

Quando comparada com espécies medicinais utilizadas no Irã e analisadas por Ebrahimzadeh et al. (2008), o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* apresentou uma atividade antioxidante menor apenas quando comparada à *Melilotus arvensis* Wallr. (EC<sub>50</sub>: 80 µg mL<sup>-1</sup>), mas a atividade foi superior à de *Epilobium hirsutum* L. (EC<sub>50</sub>: 490 µg mL<sup>-1</sup>).

A metodologia da atividade redutora do íon Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> (FRAP), analisa a capacidade que determinada amostra tem de transferir elétrons e, conseqüentemente, reduzir íons metálicos ou radicais livres, medindo assim a sua capacidade redutora (Heim et al., 2002; Niki, 2010). Apesar de também medir a capacidade redutora de determinada amostra, assim como o ensaio de sequestro do radical ABTS, o FRAP foi escolhido por medir a capacidade em condições de pH diferente. Segundo Huang et al. (2005), o valor do pH é um fator determinante na capacidade que uma amostra possui em reduzir um substrato. Em condições ácidas a sua capacidade pode diminuir devido à protonação do composto antioxidante, enquanto condições básicas facilitam a dissociação dos prótons, aumentando a capacidade redutora. Para esse ensaio utiliza-se um complexo incolor de TPTZ com íon Fe<sup>3+</sup>, que ao ser reduzido a Fe<sup>2+</sup> ganha uma coloração azul intensa com absorção máxima em 593 nm; portanto, a atividade redutora de determinada amostra é proporcional ao ganho de absorbância; quanto maior o ganho mais eficiente é a amostra (figura 24). É importante lembrar que o íon Fe<sup>2+</sup> é mais reativo do que o íon Fe<sup>3+</sup> em decompor peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hidroperóxidos, fazendo com que eles produzam radicais livres e, por isso, antioxidantes que

tenham alta atividade redutora de íons metálicos podem apresentar, em determinadas condições, efeitos pró-oxidantes (Niki, 2010).

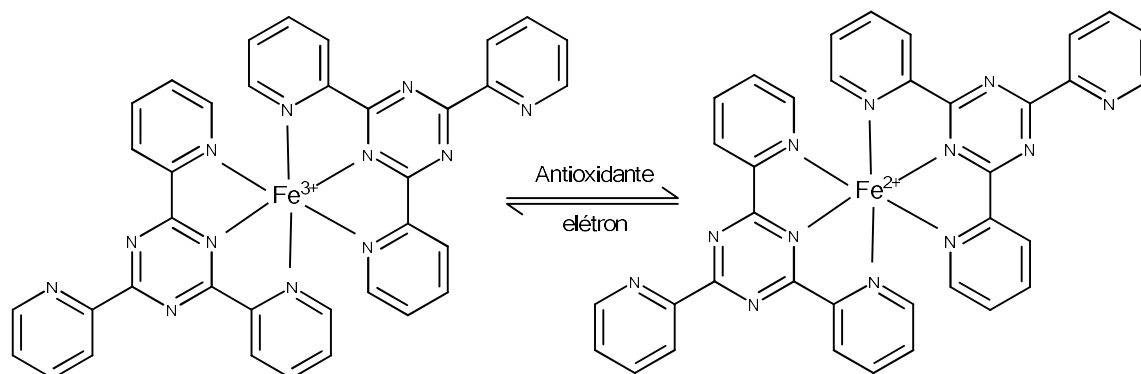


Figura 24: Reação redutora do íon Fe<sup>3+</sup> do TPTZ para íon Fe<sup>2+</sup>. Adaptado de Rufino et al. (2006).

Analisando a atividade expressa em miligramas equivalentes de trolox por grama de extrato (mg ET g<sup>-1</sup>), os valores variaram de 39,44 a 758,94 mg ET g<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (758,94 mg ET g<sup>-1</sup>) a que apresentou maior conteúdo de substâncias equivalentes ao trolox, seguida pela fase hidrometanólica (375,48 mg ET g<sup>-1</sup>), pelo extrato bruto hidroetanólico (366,96 mg ET g<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (96,32 mg ET g<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (39,44 mg ET g<sup>-1</sup>) (tabela 16).

Quando analisados em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ g<sup>-1</sup>), os valores variaram de 19,56 a 392,04 mg EQ g<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (392,04 mg EQ g<sup>-1</sup>) a que apresentou maior valor (tabela 16).

Quando analisados por EC<sub>50</sub>, os valores variaram de 2,59 a 43,94 µg mL<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (2,59 µg mL<sup>-1</sup>) a que apresentou maior atividade, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (5,35 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (5,89 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (18,86 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (43,94 µg mL<sup>-1</sup>). Quando comparadas aos controles, todas as amostras apresentaram atividades inferiores, tanto ao trolox (1,88 µg mL<sup>-1</sup>), quanto à quercetina (0,94 µg mL<sup>-1</sup>) e ao ácido rosmarínico (0,24 µg mL<sup>-1</sup>) (tabela 16), sendo que a fase de acetato apresentou valores próximos ao dos controles positivos, indicando uma boa atividade, pois estamos comparando padrões que comprovadamente possuem atividade antioxidante com uma fase que é uma mistura de substâncias.

Tabela 16: Conteúdo de substâncias antioxidantes representadas em miligramas equivalentes de padrão por grama de extrato seco e em EC<sub>50</sub> do extrato bruto hidroetanólico e das diferentes fases na atividade redutora de íon Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>.

Amostras	mg ET g <sup>-1</sup>	mg EQ g <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Extrato bruto	366,96 ± 9,59	181,74 ± 6,87	5,35
Fase hexânica	39,44 ± 1,98	19,56 ± 0,51	43,94
Fase diclorometânica	96,32 ± 8,42	52,86 ± 4,86	18,86
Fase de acetato de etila	758,94 ± 30,68	392,04 ± 8,01	2,59
Fase hidrometanólica	375,48 ± 14,75	194,74 ± 6,61	5,89
Trolox			1,88
Quercetina			0,94
Ácido rosmarínico <sup>#</sup>			0,24

<sup>#</sup>: resultado gentilmente cedido pela doutoranda Kátia Pereira dos Santos.

Em comparação com outras espécies pertencentes à mesma subtribo, o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* (EC<sub>50</sub>: 5,35 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou atividade consideravelmente maior do que à de *M. suaveolens* (EC<sub>50</sub>: 30,48 µg mL<sup>-1</sup>) (Scio et al., 2012). A atividade também foi maior em relação à de *Marantodes pumilum* (Blume) Kuntze (EC<sub>50</sub>: 474 µg mL<sup>-1</sup>), uma espécie muito utilizada na medicina tradicional da Malásia (Varghese et al., 2011).

Em comparação com espécies utilizadas na medicina popular de Sri Lanka, analisadas por Samaradivakara et al. (2016), o extrato bruto hidroetanólico de *H lacustris* (366,96 mg ET g<sup>-1</sup>), apresentou conteúdo de substâncias antioxidantes maior do que muitas espécies como *Plectranthus aegyptiacus* (Forssk.) C. Chr. (94,53 mg ET g<sup>-1</sup>), *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. (233,6 mg ET g<sup>-1</sup>), *Barleria prionitis* L. (111,3 mg ET g<sup>-1</sup>) e *Tarenna asiatica* (L.) Kuntze Ex. K. Schum. (223,6 mg ET g<sup>-1</sup>), mas apresentou menor conteúdo quando comparada à *Toona ciliata* M. Roem. (4090 mg ET g<sup>-1</sup>), *Evolvulus alsinoides* (L.) L. (1922,6 mg ET g<sup>-1</sup>) e *Micrococcus paniculata* L. (715 mg ET g<sup>-1</sup>).

O ensaio *ORAC* é baseado na capacidade que o radical peroxila, gerado pela decomposição térmica do AAPH, tem em oxidar a fluoresceína, capturando um hidrogênio da sua estrutura e fazendo com que ela perca a capacidade de emitir fluorescência ao longo de um determinado tempo (Niki, 2010). Ao ser adicionada uma amostra antioxidante, esta irá ter seus hidrogênios capturados pelos radicais peroxilas de forma a estabilizá-los e impedir que oxidem a fluoresceína, mantendo a emissão de fluorescência por um maior período de tempo, de forma que quanto maior esse período, maior a atividade antioxidante de determinada amostra (Dávalos et al., 2004). A vantagem da realização desse ensaio se deve ao fato de que simula as condições presentes no nosso organismo,

como a temperatura em 37°C, a presença de oxigênio para a formação do radical peroxila e o próprio radical utilizado, que é uma espécie reativa de oxigênio semelhante às produzida pelo nosso organismo.

Analisando a amostra expressa em miligramas equivalentes de trolox por grama de extrato (mg ET g<sup>-1</sup>), os valores variaram de 2405,88 a 247,56 mg ET g<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (2405,88 mg ET g<sup>-1</sup>) a que apresentou maior conteúdo de substâncias equivalentes ao trolox, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (991,33 mg ET g<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (711,56 mg ET g<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (562,34 mg ET g<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (247,56 mg ET g<sup>-1</sup>) (tabela 17).

Em relação aos resultados expressos em EC<sub>50</sub>, os valores variaram entre 0,81 e 7,50 µg mL<sup>-1</sup>, sendo a fase de acetato de etila (0,81 µg mL<sup>-1</sup>) a que apresentou maior atividade, seguida pelo extrato bruto hidroetanólico (1,49 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase hidrometanólica (3,55 µg mL<sup>-1</sup>), pela fase diclorometânica (3,90 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase hexânica (7,50 µg mL<sup>-1</sup>). Em comparação com o trolox (1,72 µg mL<sup>-1</sup>) o extrato bruto hidroetanólico apresentou atividade semelhante enquanto a fase de acetato de etila apresentou atividade superior, indicando um potencial antioxidante alto por parte das amostras, fato demonstrado pela alta atividade dessas amostras em comparação com o ácido rosmarínico (4,79 µg mL<sup>-1</sup>) (tabela 17).

Tabela 17: Conteúdo de substâncias antioxidantes representadas em miligramas equivalentes de padrão por grama de extrato seco e em EC<sub>50</sub> do extrato bruto hidroetanólico e das diferentes fases no ensaio *ORAC*.

Amostras	mg ET g <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Extrato bruto	991,33 ± 74,85	1,49
Fase hexânica	247,56 ± 20,95	7,50
Fase diclorometânica	562,34 ± 10,33	3,90
Fase de acetato de etila	2405,88 ± 1,84	0,81
Fase hidrometanólica	711,56 ± 18,35	3,55
Trolox		1,72
Ácido rosmarínico <sup>#</sup>		4,79

<sup>#</sup>: resultado gentilmente cedido pela doutoranda Kátia Pereira dos Santos.

Comparando a atividade antioxidante de *H. lacustris*, pela metodologia do *ORAC*, com diversas plantas medicinais utilizadas no Sri Lanka e analisadas por Samaradivakara et al., (2016), temos que o extrato bruto hidroetanólico (991,33 mg ET g<sup>-1</sup>), apresentou conteúdo de substâncias antioxidantes maior do que o extrato bruto da maioria das espécies analisadas, inclusive outra planta pertencente à Lamiaceae, *Plectranthus zatarhendi* (123,82 mg ET g<sup>-1</sup>), mas consideravelmente

menor que *Camellia sinensis* L. Kuntze (1362,82 mg ET g<sup>-1</sup>), muito utilizada como bebida, e *Toona ciliata* (1192,83 mg ET g<sup>-1</sup>).

Em todas as metodologias utilizadas para a análise do potencial antioxidante, a amostra que apresentou a maior atividade foi a fase de acetato de etila; isso provavelmente se deve à alta concentração de ácido rosmarínico, o componente majoritário dessa fase (tabela 2) e que possui reconhecida atividade antioxidante frente à peroxidação lipídica (Pérez-Fons et al., 2010). Em estudo realizado por Segovia et al. (2014), com extratos de *Borago officinalis* L. obtido por diferentes condições de extrações, variando temperatura e proporção entre etanol e água, foi verificado que quanto maior a concentração de ácido rosmarínico no extrato, maior a atividade antioxidante da amostra em neutralizar radicais peroxilas, portanto em transferir hidrogênios.

A suposição do ácido rosmarínico ser o maior responsável pela atividade da fase de acetato de etila é demonstrada pelos valores de EC<sub>50</sub> que essa substância apresentou nos ensaios testados, sendo que em todas as metodologias em que foi utilizado apresentou maior nível de atividade do que o trolox e a quercetina, somente no *ORAC* que apresentou menor atividade em comparação ao trolox e às amostras testadas, podendo ser devido à sinergia dos constituintes das fases, e no ensaio quelante de ferro no qual não apresentou atividade nas concentrações testadas.

Sevgi et al. (2015), avaliaram dez derivados de ácidos cinâmicos quanto à sua atividade antioxidante pelo uso de quatro metodologias diferentes, a de captura do radical DPPH, a do sistema β-caroteno/ácido linoleico, do poder redutor e da atividade quelante de ferro. Os derivados cinâmicos que apresentaram maior atividade antioxidante em todas as metodologias testadas foram o ácido rosmarínico e o ácido cafeico, substâncias que possuem hidroxilas em posição *orto* no anel aromático. O ácido rosmarínico é o constituinte majoritário em *H. lacustris* e, juntamente com o ácido cafeico, ambos estão presentes em altas concentrações no extrato bruto hidroetanólico e na fase de acetato de etila (tabela 2). Provavelmente, pela presença desses dois compostos, tanto a fase de acetato de etila quanto o extrato bruto hidroetanólico foram, respectivamente, as amostras que apresentaram a maior atividade antioxidante em todas as metodologias testadas.

A sequência de fases que tiveram maior atividade antioxidante em todas as metodologias utilizadas foi: acetato de etila > hidrometanólica > diclorometânica > hexânica. Exceção para a atividade quelante de ferro, na qual a fase hexânica foi mais ativa do que a diclorometânica. Cruzando esses resultados com os de doseamento, podemos observar que as fases com maior atividade são justamente aquelas com maior quantidade de derivados de ácido clorogênico (tabela 2).

Segundo Procházková et al. (2011), o número de hidroxilas de um flavonoide influencia a sua atividade antioxidante, ou seja, quanto maior o seu número maior é a atividade redutora e a de captura de radicais livres, o seu número também influencia a sua polaridade, por isso estão presentes em maior quantidade na fase de acetato de etila e hidrometanólica, que são solventes mais polares. Apesar da fase diclorometânica possuir uma alta proporção de flavonoides, essa não apresentou uma boa atividade antioxidante provavelmente devido aos flavonoides presentes nessa fase serem metoxilados, evidenciado pelo alto tempo de retenção apresentado na metodologia analisada pela CLAE-DAD, fato que pode diminuir a sua capacidade antioxidante.

Essa informação também é verdadeira em relação aos compostos fenólicos de uma forma geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior será a atividade antioxidante. Terpinc et al. (2011) testaram a capacidade antioxidante de diversos derivados de ácidos cinâmicos e suas respectivas formas descarboxiladas. Os resultados demonstraram que, entre os derivados descarboxilados, aqueles que tiveram maior atividade antioxidante nas diferentes metodologias testadas foram aqueles que possuem maior número de substituintes doadores de elétrons (hidroxilas e metoxilas) no anel aromático, sendo o ácido cafeico em sua forma descarboxilada, o que apresentou maior atividade, que possui duas hidroxilas em posição *orto* no anel aromático. Essa configuração do grupo catecol é responsável por um aumento da atividade antioxidante principalmente devido à estabilização por ressonância do radical fenoxila com a subsequente formação de uma *orto*-quinona (Texeira et al., 2013). Essa relação foi demonstrada por Piazzon et al. (2012), que testaram a atividade antioxidante nas metodologias FRAP e de captura do radical ABTS utilizando ácido cafeico e ferúlico em comparação com as suas formas sulfatadas, suas formas em conjugação com ácido glucurônico e a derivados de ácido benzoico. Ao substituir as hidroxilas do anel aromático por algum outro substituinte, a atividade antioxidante diminui, principalmente se a substituição ocorrer na hidroxila localizada na posição 4 do anel aromático; a presença da cadeia lateral de três carbonos também influencia na atividade antioxidante, sendo que o ácido ferúlico apresentou maior atividade em comparação com o ácido vanílico, devido ao efeito de estabilização de ressonância do radical fenoxila.

Segundo Procházková et al. (2011), duas hidroxilas em posição *orto* no anel aromático B é um bom sitio para quelar íons metálicos, demonstrando que substâncias com hidroxilas em posição *orto* são, potencialmente, boas quelantes de metais. Esse fator pode ter influenciado a atividade da fase de acetato de etila, que apresenta uma boa atividade quelante de metais, provavelmente por possuir alta quantidade de ácido rosmarínico, ácido clorogênico e ácido cafeico (tabela 2), e alguns flavonoides, todas moléculas que possuem hidroxilas vizinhas em seu anel aromático.

Seguindo o princípio pregado por diversos pesquisadores da relação entre o número de hidroxilas de fenilpropanoides e flavonoides com a alta atividade antioxidante (Prochazkova et al., 2011; Terpin et al., 2011; Piazzon et al., 2012; Texeira et al., 2013) e extrapolando para outros metabólitos que possuem anéis aromáticos em sua estrutura, a baixa atividade da fase hexânica frente às outras fases nas metodologias testadas pode ser explicada pela sua composição predominante de diterpenoides abietanos, cujo o anel aromático só possui uma hidroxila ou uma hidroxila em uma quinona (tabelas 5 e 6), possuindo poucos grupos doadores de hidrogênio, o que dificulta também à transferência de elétrons e, conseqüentemente, a sua capacidade redutora.



### 5.6 Atividade antibacteriana

Para se analisar a atividade antibacteriana foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo segundo Sedano-Partida et al. (submetido), na qual foi analisada a atividade antibacteriana contra três cepas de bactérias, duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e uma Gram-positiva (*Bacillus subtilis*). A escolha de se realizar o ensaio tanto com bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, se deve à diferença entre a constituição da parede celular dos dois tipos, o que influencia a efetividade das substâncias com potencial antibiótico.

As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa constituída de múltiplas camadas cujo principal componente é o peptidoglicano, sendo este essencial para a estrutura, replicação e sobrevivência das bactérias em ambientes hostis, mas também possuindo outros componentes, como proteínas, polissacarídeos complexos, ácidos teicoicos e lipoteicoicos (Murray et al., 2014).

As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa que as Gram-positivas, contendo duas camadas externas à membrana citoplasmática. A primeira camada externa à membrana citoplasmática é composta de uma fina camada de peptidoglicano e, diferentemente das Gram-positivas, sem ácidos teicoicos e lipoteicoicos. Externamente a essa camada existe uma membrana, exclusiva de bactérias Gram-negativas, que mantém a estrutura bacteriana e funciona como uma barreira de proteção contra condições adversas e de permeabilidade a grandes moléculas e moléculas hidrofóbicas, como alguns antimicrobianos. O espaço entre a membrana externa e a membrana citoplasmática é denominado espaço periplasmático, que nas bactérias patogênicas contém muitos fatores de virulência como as  $\beta$ -lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impedindo a sua ação antimicrobiana (Murray et al., 2014).

Devido à diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, determinada substância pode possuir atividade antibacteriana contra um tipo, mas não possuir contra outro, pois cada uma possui mecanismos de defesa diferentes. Por exemplo, bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a uma diversidade de classes de antibióticos pela sua membrana mais externa funcionar como uma barreira, limitando a entrada de antibióticos nas células; também possuem uma variedade de bombas de efluxo responsáveis por transportarem moléculas, como os antibióticos, para fora da célula, fazendo com que o microrganismo sobreviva a altas concentrações dessas substâncias, sendo que sua superexpressão origina elevados níveis de resistência bacteriana (Blair et al., 2014). Os antibióticos que apresentam uma efetividade maior contra esses tipos de bactérias são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas, assim conseguindo atravessar os canais proteicos de porina (Guimarães et al., 2010).

---

As bactérias Gram-positivas possuem um mecanismo de defesa aos antibióticos que inexistem nas bactérias Gram-negativas, os ácidos teicoicos. Essa função foi demonstrada ao bloquear sua síntese em cepas de *Bacillus subtilis*, tornando-as sensíveis a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Substâncias que bloqueiem a síntese dos ácidos teicoicos constituem um importante sítio de ação para terapia em conjunto com outros antibióticos (Brown et al., 2013).

Além desses mecanismos, temos outros que são comuns nos dois tipos de bactérias, como a diminuição da entrada de substâncias e as bombas de efluxo; ambos são mais comuns em bactérias Gram-negativas; modificação do sítio de ligação dos antibióticos às células, que são muito específicos e qualquer alteração pode impedir a ação do antibiótico; e até mesmo a inativação da substância através de produção de enzimas que causam a sua hidrólise ou por transferência de algum grupo químico (Giedraitienė et al., 2011; Blair et al., 2014).

*Escherichia coli* foi escolhida como espécie para se testar o potencial antibacteriano devido ser uma bactéria frequentemente causadora de infecções hospitalares. Na Inglaterra, infecções por *E. coli* resistentes a antibióticos são responsáveis por 36% das infecções do sistema sanguíneo e 30% da mortalidade de pacientes, sendo que por volta de 5.000 pacientes anualmente morrem por infecções causadas por bactérias Gram-negativas (Davies, 2011). As formas de resistência a antibióticos mais comuns presentes em *E. coli* são alterações do sítio de ligação de penicilinas, degradação enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (ambos mecanismos de resistência contra antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos), bombas de efluxo de antibióticos de diversas classes e alterações dos sítios de ação de sulfonamidas e de trimetoprimas (Giedraitienė et al., 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* foi escolhida por ser uma bactéria altamente resistente aos antibióticos utilizados atualmente, com exceção da colistina, uma polimixina altamente tóxica (Brown, 2015). É uma bactéria oportunista, sendo uma das maiores causas de infecções do trato urinário, em vítimas de queimaduras, em pacientes com cateteres e causadoras de pneumonia em pacientes hospitalares. É também uma das principais causadoras de morte em pacientes com fibrose cística, sua infecção é muito difícil de ser erradicada devido à resistência aos antibióticos (Stover et al., 2000). Em *P. aeruginosa*, os mecanismos de resistência mais comuns são alterações na membrana, diminuindo a entrada de antibióticos do tipo aminoglicosídeos, e degradação enzimática dos  $\beta$ -lactâmicos e das fosfomicinas (Giedraitienė et al., 2011).

*Bacillus subtilis*, uma bactéria Gram-positiva importante para o meio ambiente, para o setor industrial e medicina, é uma importante fonte de enzimas, e é a espécie melhor caracterizada bioquimicamente, inclusive tendo o seu genoma sequenciado (Kunst et al., 1997). Foi escolhida como exemplar para se testar o potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas. Em *B. subtilis* o mecanismo de resistência mais comum é a degradação enzimática de antibióticos da classe das fosfomicinas (Giedraitienė et al., 2011).

Diante desse quadro, nos últimos anos, pesquisadores têm voltado a atenção para fontes naturais na descoberta de novos antibióticos, pois os produtos naturais apresentam estruturas químicas complexas que podem interagir com alvos macromoleculares em bactérias patogênicas e, dentre esses organismos, as plantas são uma importante fonte de obtenção dessas substâncias, uma vez que muitas substâncias vegetais são sintetizadas como defesas químicas ao ataque de microrganismos patogênicos (Guimarães et al., 2010).

Os padrões utilizados como controle positivo no presente estudo foram a gentamicina, a canamicina e a ampicilina. A gentamicina e a canamicina são antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, caracterizados por serem açúcares aminados que agem principalmente inibindo a síntese de proteínas, se ligando à subunidade 30S do ribossomo da bactéria (Guimarães et al., 2010; Blair et al., 2014). Diversos mecanismos de resistência já foram identificados contra esse tipo de substância, como a modificação da estrutura dos antibióticos. Estes, geralmente são moléculas grandes, possuem diversas hidroxilas e grupos amidas expostos, sendo muito suscetíveis à hidrólise; outro mecanismo de resistência a essa classe é a metilação da respectiva subunidade do ribossomo, o que altera o sítio de ligação e impede a ação do antibiótico (Blair et al., 2014). A Gentamicina é clinicamente o antibiótico mais importante pertencente à classe dos aminoglicosídeos, sendo usado para o tratamento de infecções graves, particularmente efetivo contra bactérias patogênicas como *Escherichia spp* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto a canamicina é muito utilizada no combate a microrganismos que apresentam resistência à gentamicina (Dewick, 2009). Essa classe de antibióticos deve ser administrada por via injetável por não ter uma boa absorção no intestino, além de ser cuidadosamente administrada por possuir efeitos ototóxicos e nefrotóxicos (Guimarães et al., 2010).

A ampicilina é um antibiótico semi-sintético da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, mais especificamente da classe das aminopenicilinas, caracterizada por possuir cadeias laterais contendo um grupo amino básico (Dewick, 2009). Essa classe de antibióticos é particularmente efetiva contra bactérias Gram-negativas, pois a sua cadeia lateral polar aumenta a solubilidade em água e a penetração na parede celular desses microrganismos. Seu principal mecanismo de ação é se ligar a proteínas e peptidases, que estão envolvidas na formação de ligações cruzadas entre as cadeias

---

peptídicas da estrutura peptideoglicana em estágios avançados da biossíntese da parede celular das bactérias, com as penicilinas ocupando o sítio ativo da enzima, causando a sua inibição e consequentemente impedindo a biossíntese da parede celular (Dewick, 2009; Guimarães et al., 2010). O principal mecanismo de resistência dos microrganismos contra essa classe de antibióticos é pela produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico dessas substâncias, e assim as inativando (Dewick, 2009; Guimarães et al., 2010).

Os resultados do ensaio antimicrobiano estão expressos em  $MIC_{50}$  (tabela 18), que nos informa a concentração mínima necessária para se ter 50% de inibição do crescimento bacteriano. O  $MIC_{50}$  foi calculado com base na absorbância em 595 nm; quanto menor a absorbância nesse comprimento de onda, menor a quantidade de bactérias presente no meio, indicando uma alta capacidade inibitória da amostra. Para definir se a amostra apresentou atividade bactericida ou bacteriostática, foi realizado o ensaio da conversão da resazurina em resofurina. Esse ensaio se baseia no princípio de que bactérias vivas, com seu metabolismo em funcionamento, são capazes de converter a substância azul chamada de resazurina em uma substância de coloração rosa denominada resofurina (figura 25) (Riss et al., 2016). Os poços que inibiram o crescimento bacteriano e adquiriram a coloração rosa foram interpretados como possuindo atividade bacteriostática, inibidora de crescimento; se a coloração no poço foi azul, esse resultado foi interpretado como atividade bactericida, matando as bactérias.

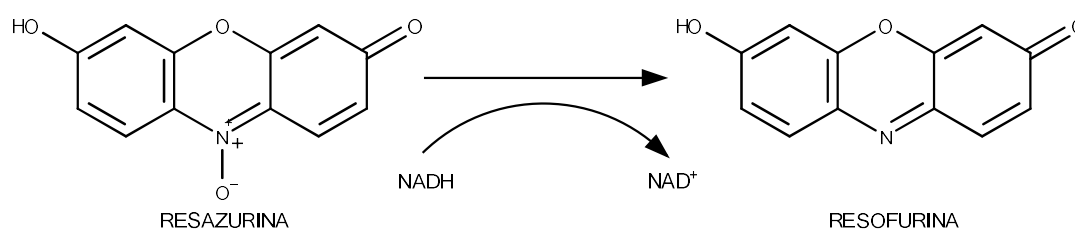


Figura 25: Reação de redução metabólica da resazurina na presença de uma célula viável. Adaptado de Riss et al. (2016).

Em relação à atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, as fases e o extrato não apresentaram atividade nas concentrações testadas. Dos padrões utilizados no ensaio, somente a ampicilina não apresentou atividade contra a cepa, sendo que a gentamicina ( $MIC_{50}$  2,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi mais efetiva do que a canamicina ( $MIC_{50}$  54,44  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Em relação à atividade contra *E. coli*, os valores de MIC<sub>50</sub> variaram entre 523,22 e 1199,91 µg mL<sup>-1</sup>, com a fase hexânica (523,22 µg mL<sup>-1</sup>) apresentando o melhor resultado de MIC<sub>50</sub>, seguida pela fase de acetato de etila (862,64 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase diclorometânica (1199,91 µg mL<sup>-1</sup>); o extrato bruto hidroetanólico e a fase hidrometanólica não apresentaram atividade contra essa cepa e as fases que apresentaram tiveram somente atividade bacteriostática. Dos três padrões utilizados no ensaio, somente a gentamicina (MIC<sub>50</sub> 0,40 µg mL<sup>-1</sup>) e a canamicina (MIC<sub>50</sub> 1,77 µg mL<sup>-1</sup>) foram efetivas.

Em relação à atividade contra *B. subtilis*, os valores de MIC<sub>50</sub> variaram entre 8,87 e 1022,49 µg mL<sup>-1</sup>, com a fase hexânica (8,87 µg mL<sup>-1</sup>) apresentando alta atividade, seguida pela fase diclorometânica (86,00 µg mL<sup>-1</sup>), pelo extrato bruto hidroetanólico (92,57 µg mL<sup>-1</sup>) e pela fase de acetato de etila (1022,49 µg mL<sup>-1</sup>); a fase hidrometanólica não apresentou atividade contra essa cepa. Dos três padrões utilizados no ensaio, somente a gentamicina (MIC<sub>50</sub> 11,02 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou atividade.

Tabela 18: Atividade antimicrobiana (MIC<sub>50</sub> µg mL<sup>-1</sup>) do extrato bruto hidroetanólico e de suas respectivas fases obtidas de *Hyptis lacustris*, juntamente com os antibióticos utilizados no ensaio, contra três cepas bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Amostras	MIC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Extrato bruto	-	-	92,57
Fase hexânica	-	523,22	8,87
Fase diclorometânica	-	1199,91	86,00
Fase de acetato de etila	-	862,64	1022,49
Fase hidrometanólica	-	-	-
Gentamicina	2,63	0,40	11,02
Canamicina	54,44	1,77	-

Analisando os resultados apresentados, podemos inferir que o extrato bruto hidroetanólico e as fases de *Hyptis lacustris* não apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e que a fase que apresentou maior atividade contra as duas cepas bacterianas restantes foi a fase hexânica. Com base nos resultados obtidos, a fase hexânica, com valores de MIC<sub>50</sub> similares à gentamicina, foi escolhida para se submeter à cromatografia semi-preparativa. Os isolados obtidos foram testados quanto a sua atividade contra *B. subtilis*. *E. coli* não foi escolhida para se realizar o ensaio, pois os valores de MIC<sub>50</sub> da fase que apresentou maior atividade (fase hexânica 523,22 µg mL<sup>-1</sup>) foi

superior a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , valor considerado limiar para continuidade de pesquisas com amostras que são misturas de substâncias (Cos et al., 2006).

Em comparação com o extrato bruto hidrometanólico de *Hyptis atrorubens*, testado contra diversas cepas bacterianas, entre elas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (8131 e ATCC 27583) e *Escherichia coli* (8137, 8138, 8157 e ATCC 25922), a atividade do extrato bruto hidroetanólico de *Hyptis lacustris* não apresentou atividade nas concentrações testadas, sendo, portanto, inferior em atividade se comparado ao extrato bruto de *H. atrorubens* ( $\text{MIC}_{50}$   $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contra *P. aeruginosa* 8131. Em relação à atividade contra *E. coli*, *H. lacustris* e *H. atrorubens*, não apresentaram atividade contra nenhuma cepa (Abedini et al., 2013).

A alta atividade antimicrobiana da fase hexânica e do extrato bruto hidroetanólico contra *B. subtilis*, provavelmente se deve à presença dos diterpenoides abietanos aromáticos (tabelas 5 e 6), pois já foram demonstradas atividades de diversas substâncias dessa classe contra bactérias (González, 2015).

Dentre esses compostos podemos citar o ácido dehidroabiético, que apresenta tanto atividade bactericida ( $\text{MIC}_{50}$   $70 \mu\text{M}$ ), quanto atividade antibiofilme ( $\text{MIC}_{50}$   $27,8 \mu\text{M}$ ) frente a bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* (Fallarero et al., 2013).

Ferruginol, dos quais ele e seus derivados estão presentes na fase hexânica de *H. lacustris* (tabelas 5 e 6), apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *B. subtilis* e *S. aureus* em  $\text{MIC}_{50}$  de  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente (Muhammad et al., 1992). Em ensaio realizado por Moujir et al. (1996), foi demonstrada atividade de diversos diterpenoides abietanos, entre eles o ferruginol e a horminona, também presentes na fase hexânica de *H. lacustris* (tabela 6), contra cepas de bactérias do gênero *Bacillus* e *Staphylococcus* em valores de  $\text{MIC}_{50}$  que variam de 5 a acima de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em ensaios realizados por Smith et al. (2007), o ferruginol se demonstrou um excelente composto antimicrobiano, demonstrando atividade contra 5 cepas de *S. aureus* isoladas clinicamente e que apresentam mecanismos de resistência contra antibióticos utilizados atualmente, demonstrando valores de  $\text{MIC}_{50}$  que variou de 4 a  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ , menor do que alguns dos antibióticos usados clinicamente, como tetraciclina, oxalicina, norfloxacina e eritromicina, que apresentaram valores de  $\text{MIC}_{50}$  que variaram de 32 a  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nesse mesmo trabalho o ferruginol demonstrou um grande potencial para ser usado em associação com esses mesmos antibióticos, pois, ao ser administrado conjuntamente, o valor de  $\text{MIC}_{50}$  dos antibióticos foi reduzido, indicando sua ação inibitória sobre os mecanismos de resistência dessas cepas.

Em ensaio realizado por Politi et al. (2003), pela metodologia de microdiluição em caldo, o ferruginol apresentou MIC de  $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  contra *B. subtilis*, mas outra substância identificada em *H. lacustris*, a  $8\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-ona, não apresentou atividade contra nenhuma cepa de bactéria, sugerindo que, apesar de estar presente na fase hexânica, ela não é uma das responsáveis pela sua atividade.

O 6-7-dehidroferruginol, composto também presente na fase hexânica de *H. lacustris* (tabelas 5 e 6), já foi reportado possuir atividade antibacteriana contra diversas cepas de bactérias Gram-positivas, entre elas *B. subtilis* (Becerra et al., 2002).

Ulubelen et al. (2001), demonstraram, em metodologia diferente da usada no presente trabalho, que tanto a 7-O-acetilhorminona, quanto a horminona, ambas presentes na fase hexânica de *H. lacustris* (tabelas 5 e 6), possuem atividade contra bactérias Gram-positivas, entre elas *B. subtilis*, com MIC de 3 e  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, sugerindo que ambos os compostos podem ser os responsáveis pela alta atividade desta fase (tabela 18). Ambas as substâncias também apresentaram atividade frente a outra bactéria do mesmo gênero, *Bacillus cereus*, com MICs de 200 e  $100 \mu\text{M}$  respectivamente (Rungsimakan e Rowan, 2014).

1-Oxoferruginol, diterpenoide abietano isolado do gênero *Salvia*, apresentou atividade contra três cepas de bactérias Gram-positivas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) em valores de MIC<sub>50</sub> de  $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Ulubelen et al., 2000).

O 2 $\beta$ -acetoxiferruginol, obtido do caule de *Prumnopitys andina* Poepp. Ex Endl. (Podocarpaceae), apresentou MIC de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  contra duas cepas de *S. aureus* que apresentam como mecanismo de resistência a antibióticos dois tipos de bombas de efluxo (Smith et al., 2008).

Abietanos fenólicos também se demonstraram promissores quanto à atividade antimicrobiana, sendo que apresentaram atividade bacteriostática com MIC<sub>50</sub> menor que  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à *B. subtilis* e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  contra *S. aureus*, apresentando, ainda, atividade bactericida contra essa cepa na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Dellar et al., 1996).

Euroabienol, obtido de *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae), apresentou valores de MIC de  $22 \mu\text{g mL}^{-1}$  para *S. aureus* e valores de MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) de  $179 \mu\text{g mL}^{-1}$  para *Sarcina lutea*, ambas bactérias Gram-positivas, indicando uma boa atividade desse composto contra bactérias desse tipo (Radulovic et al., 2010).

Oluwatuyi et al. (2004) analisaram a capacidade do ácido carnósico e do carnosol, obtidos de *Rosmarinus officinalis* L., em inibir o mecanismo de resistência de cepas de *S. aureus* com bombas de efluxo contra eritromicina, e de cepas com bombas de efluxo contra multidrogas. Os autores observaram que o ácido carnósico e o carnosol em concentrações de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  potencializaram de 32 a 16 vezes, respectivamente, a atividade da eritromicina e da inibição da

bomba de efluxo de multidrogas em concentrações de 50  $\mu\text{M}$ . Utilizando metodologia de microdiluição em caldo, Bernardes et al. (2010) verificaram que esses dois compostos também possuem atividade contra bactérias Gram-positivas do gênero *Streptococcus* causadoras de cáries dentais, em valores de MIC que variam de 15 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o ácido carnósico e 35 a 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o carnosol. Horiuchi et al. (2007), verificaram que ambos compostos apresentaram atividade potencializadora de antibióticos aminoglicosídeos contra bactérias Gram-positivas do gênero *Enterococcus* resistentes à Vancomicina (VRE), reduzindo o MIC desses antibióticos em cerca de 8 a 128 vezes.

Coleon U, obtido do gênero *Plectranthus* (Lamiaceae), foi analisado quanto à sua atividade antimicrobiana pela metodologia de microdiluição em caldo contra duas cepas de bactérias Gram-positivas, uma de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e uma de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), apresentando valores de MIC de 0,98 e 31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Gaspar-Marques et al., 2006). Quando analisado em relação à sua atividade frente a *B. subtilis*, apresentou alta atividade, com valores de MIC de 3,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Wellsow et al., 2006).

Salae et al. (2012), analisando o potencial antimicrobiano de diterpenoides obtidos de *Premna obtusifolia* R. Br. (Verbenaceae), verificaram que os abietanos 6 $\alpha$ ,11,12-trihidroxi-7 $\beta$ ,20-epoxi-8,11,13-abietatrieno e o 14-deoxicoleon, apresentaram MIC que variaram de 2,34 a 37,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para bactérias Gram-positivas, entre elas, *B. subtilis*, *E. faecalis*, MRSA e VRE.

Todos esses exemplos de diterpenoides abietanos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, associados à composição da fase hexânica ser, em grande parte, composta por representantes dessa classe, leva a crer que os diterpenoides são os responsáveis pela atividade dessa amostra. Essa proposição ganha força associada ao fato de que essa classe de compostos é ativa contra bactérias Gram-positivas e pouco ativa, ou sem atividade, contra bactérias Gram-negativas (Urzúa et al., 2008). Resultado semelhante ao obtido no presente estudo, no qual a fase hexânica, com alta presença de diterpenoides abietanos (tabelas 5 e 6), apresentou alta atividade contra *B. subtilis*, baixa atividade contra *E. coli* e foi inativa contra *P. aeruginosa* (tabela 18). Apesar do mecanismo de ação desses compostos variarem, foi sugerido que o principal mecanismo é a capacidade dessas substâncias de cruzar ou danificar as membranas celulares das bactérias (Urzúa et al., 2008).

O isolamento da fase hexânica resultou nas substâncias sugiol (**19**) e horminona (**20**), ambas testadas frente à *B. subtilis* e com resultados de MIC<sub>50</sub> apresentados na tabela 19.



Tabela 19: Atividade antimicrobiana (MIC<sub>50</sub>) frente à *Bacillus subtilis*, de isolados obtidos de *Hyptis lacustris* e os antibióticos utilizados no ensaio.

<i>Bacillus subtilis</i>		
Amostras	MIC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	MIC <sub>50</sub> (µM)
Sugiol	57,36	190,92
Horminona	27,25	81,97
Gentamicina	11,02	23,67
Canamicina	-	-
Ampicilina	-	-

O sugiol (**19**) apresentou atividade (MIC<sub>50</sub> 190,92 µM) menor do que a apresentada pela gentamicina (MIC<sub>50</sub> 23,67 µM) e abaixo do valor considerado potencial para compostos puros (MIC<sub>50</sub> 25 µM), indicando, segundo Cos et al. (2006), não ter potencial para continuar pesquisas quanto à sua atividade antimicrobiana, mas podendo ser utilizado como base para a semisíntese de compostos com maior atividade. Essa substância já possui reconhecida atividade contra bactérias Gram-positivas. Em estudo realizado por Yoshikawa et al. (2008), pelo uso da metodologia de difusão de disco, foi verificado que o sugiol (10 mg mL<sup>-1</sup>) apresentou zona de inibição de 20 mm contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

Em ensaio realizado por Pereda-Miranda et al. (1992), utilizando a metodologia da difusão de disco, foi verificada a atividade do sugiol contra *B. subtilis*, com MIC<sub>50</sub> de 40 µg mL<sup>-1</sup>. No presente estudo, verificou-se MIC<sub>50</sub> de 57,35 µg mL<sup>-1</sup> contra *B. subtilis*, mas utilizando-se a metodologia de microdiluição em caldo. A diferença nos valores de MIC pode ser devida às diferentes metodologias aplicadas nas análises.

A horminona (**20**) apresentou atividade (MIC<sub>50</sub> 81,97 µM) menor do que a gentamicina (MIC<sub>50</sub> 23,67 µM) e abaixo do valor considerado potencial para compostos puros (MIC<sub>50</sub> = 25 µM), segundo Cos et al. (2006). Essa substância já foi testada contra diversas cepas de bactérias Gram-positivas, *S. aureus* (MIC<sub>50</sub> de 12 µg mL<sup>-1</sup>), *S. epidermidis* (MIC<sub>50</sub> de 20 µg mL<sup>-1</sup>), *B. subtilis* (MIC<sub>50</sub> de 13 µg mL<sup>-1</sup>), *B. pumilus* (MIC<sub>50</sub> de 10 µg mL<sup>-1</sup>). Também foi testada frente a bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e não apresentou nenhuma atividade contra essas cepas (Moujir et al., 1996), resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. A diferença entre os valores de MIC<sub>50</sub> frente à *B. subtilis* de ambos os trabalhos pode ser devida às diferentes metodologias usadas nos trabalhos. Enquanto Moujir et al. (1996) avaliaram o crescimento por placas de agar (MIC<sub>50</sub> de 13 µg mL<sup>-1</sup>), o presente trabalho avaliou o crescimento em microdiluição

em caldo por leitura de absorbância em leitor microplacas (MIC<sub>50</sub> de 27,25 µg mL<sup>-1</sup>), sendo considerado um método mais sensível e preciso.

Em relação à concentração mínima inibitória (MIC), a horminona apresentou valores que variam de 7,81 a 15,63 µg mL<sup>-1</sup> para cepas de *S. aureus* resistentes à metecilina e valores que variam de 15,63 a 31,25 µg mL<sup>-1</sup> para cepas de *Enterococcus* resistentes à Vancomicina (Gaspar-Marques et al., 2006), indicando que essa substância é efetiva contra bactérias Gram-positivas, assim como foi observado no presente trabalho utilizando a mesma metodologia de ensaio contra *B. subtilis* (MIC 3,125 µg mL<sup>-1</sup>).

Em ensaio realizado por Ulubelen et al. (2001), utilizando metodologia de macrodiluição diluição em tubos, a horminona apresentou atividade contra *B. subtilis* ATCC 663 (MIC 1,5 µg mL<sup>-1</sup>), enquanto no presente trabalho, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, o valor observado de MIC foi de 3,125 µg mL<sup>-1</sup>. A diferença em valores entre os dois trabalhos pode ser devido a utilização de cepas diferentes, mas fica evidenciado que a substância possui boa atividade contra *B. subtilis*.

A atividade desse composto contra bactérias Gram-positivas fica evidenciada com o trabalho de Rungsimakan e Rowan (2014), no qual, utilizando metodologia em microplacas, verificou que a horminona apresentou MIC de 100 µM contra *Bacillus cereus*. No presente trabalho, essa substância apresentou um MIC de 9,40 µM contra *B. subtilis*, uma atividade maior do que contra *B. cereus*, mas indicando o potencial contra bactérias Gram-positivas.

A alta atividade antimicrobiana de diterpenoides abietanos contra bactérias Gram-positivas se deve a duas características importantes de sua estrutura básica, a presença de um anel decalínico lipofílico capaz de se inserir na membrana celular da bactéria, e um fragmento hidrofílico com um grupo doador de ligação de hidrogênio (HBD) capaz de interagir com grupos aceptores de ligações de hidrogênio na membrana, assim perturbando a conformação da mesma (Urzúa et al., 2008).

Tanto o sugiol quanto a horminona apresentam em sua estrutura essas duas características, a presença do anel decalínico lipofílico que se insere na membrana e o fragmento hidrofílico representado pelo anel aromático com uma hidroxila em posição orto ao grupo isopropila (figura 26), sendo a hidroxila o grupo HBD que interage com o grupo fosforilado da membrana, causando a sua perturbação e matando a bactéria, possivelmente explicando a atividade do sugiol e da horminona contra *B. subtilis*.

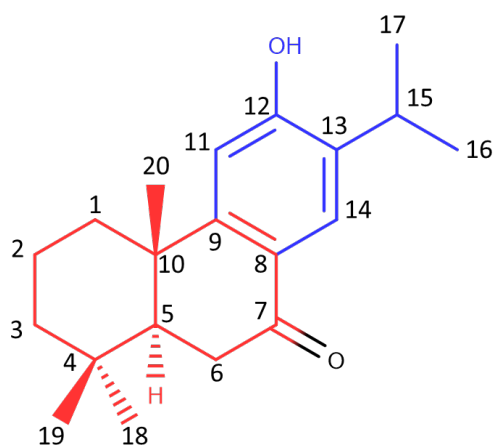


Figura 26: Estrutura do Sugiol, no qual a parte em vermelho representa o anel decalínico lipofílico e a parte em azul a estrutura hidrofílica. A numeração dos carbonos segue a numeração oficial dos diterpenoides abietanos.

Outras variações nessa estrutura básica conferem um maior potencial antimicrobiano, como um grupo carboxílico ou uma metoxila na posição C-18. Diterpenoides abietanos fenólicos com hidroxilas em posição *orto* no anel aromático também possuem atividade antimicrobiana (González, 2015), apesar dessa característica possivelmente diminuir sua atividade, pois dois grupos HBD em posição *orto* diminuem a capacidade de interação com os grupos aceptores de ligações de hidrogênio da membrana da bactéria e, assim diminuem a sua capacidade de alterar a conformação desta (Urzúa et al., 2008).

Segundo Gaspar-Marques et al. (2006), em estudos de relações de atividade-estrutura, a eficiente atividade das royleanonas é devida à presença da 12-hidroxi-p-benzoquinona no anel aromático (anel C), simultaneamente com a presença do oxigênio na posição 7, sendo que as royleanonas com essa característica possuem atividade maior do que as que não possuem oxigênio na posição 7, explicando a atividade observada, neste estudo, para a horminona, composto que pertence a classe das royleanonas.

### 5.7 Atividade anti-HIV

A transcriptase reversa é uma enzima presente nos retrovírus com uma importância fundamental em sua replicação, sendo responsável pela transcrição do RNA viral em DNA viral que será integrado ao genoma da célula hospedeira e, conseqüentemente, gerará novas partículas virais (Peterlin e Trono, 2003; Malmsten, 2005).

O ensaio consiste na capacidade que a enzima transcriptase reversa (HIV-1 RT) possui de sintetizar DNA utilizando como precursores nucleotídeos marcados com digoxigenina e biotina. O DNA marcado se ligará a um anticorpo de digoxigenina conjugada com peroxidase, que possui a capacidade de reagir com ABTS e convertê-lo em sua forma radicalar com coloração verde e cuja absorbância é medida com intuito de verificar a formação do DNA. Se a amostra tiver a capacidade de inibir a atividade da HIV-1 RT não haverá a formação de DNA marcado, portanto não havendo a conversão do ABTS para sua forma radicalar e conseqüentemente, não haverá a formação da coloração verde; portanto, quanto mais eficiente a amostra, menor será a absorção do meio.

Os resultados da capacidade inibitória da transcriptase reversa do extrato bruto hidroetanólico e de suas respectivas fases estão apresentados em MIC<sub>50</sub>. As amostras não apresentaram resultados promissores, sendo que a única amostra que apresentou um valor satisfatório de MIC<sub>50</sub> foi a fase hidrometanólica (MIC<sub>50</sub> 230 µg mL<sup>-1</sup>). O extrato bruto hidroetanólico e as fases hexânica, diclorometânica e de acetato de etila, em suas maiores concentrações (1000 µg mL<sup>-1</sup>), não atingiram atividade inibitória próxima a 50%, não sendo, portanto, amostras recomendáveis para futuras pesquisas.

A possível ausência de atividade da fase hexânica pode ser explicada pela sua composição majoritária em diterpenoides abietanos. Em revisão das bioatividades apresentadas por essa classe de metabólitos, realizada por Gonzáles et al. (2015), somente o carnosol e o ácido carnósico apresentaram atividade anti-HIV pelo mecanismo de inibição de protease; nesse levantamento não foram encontrados diterpenoides com atividade inibitória da transcriptase reversa.

Em comparação com outra espécie pertencente ao mesmo gênero, a atividade apresentada pela fase mais ativa de *Hyptis lacustris* (hidrometanólica: MIC<sub>50</sub> 230 µg mL<sup>-1</sup>) foi menor do que o extrato aquoso de *Hyptis lantanifolia* Poit. (MIC<sub>50</sub> 8 µg mL<sup>-1</sup>), uma planta muito utilizada pela medicina popular do Panamá (Matsuse et al., 1998), demonstrando que dentro do gênero, *H. lacustris* não foi efetiva na inibição da HIV-1 RT, mas que espécies pertencentes a esse gênero podem ser uma fonte importante de substâncias inibidoras dessa enzima.

A maior atividade da fase hidrometanólica em relação às outras fases pode ser explicada pela alta proporção de flavonoides (25,29%), possivelmente flavonoides com hidroxilas como grupos substituintes devido ao baixo tempo de retenção no cromatograma em relação aos outros compostos presentes na mesma fase (tabela 2), já que flavonoides possuem reconhecida atividade inibidora da HIV-1 RT (Khan e Ather, 2007). Apesar da alta proporção de flavonoides na fase diclorometânica, eles são diferentes dos encontrados na fase hidrometanólica, apresentando substituições como metoxilas ou prenilas, que reduziriam a atividade dessas substâncias.

Em comparação com outras espécies pertencentes à Lamiaceae, Klos et al. (2009), analisaram a atividade inibitória da HIV-1 RT de *Leonotis leonurus* (L.) R. Br., uma planta nativa da África do Sul, demonstrando que na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o seu extrato aquoso apresentou 60% de inibição da atividade enzimática. Já o extrato etanólico apresentou somente 39% de inibição corroborando os resultados do presente trabalho, também observando que as substâncias responsáveis por inibirem a enzima são as que possuem maior polaridade e, portanto, majoritariamente presentes nas amostras de solventes mais polares.

Em comparação com outras espécies pertencentes à Lamiaceae, tanto o extrato bruto hidroetanólico de *H. lacustris* quanto o de *Plectranthus barbatus* Andrews, não apresentaram atividade inibidora da HIV-1 RT, sendo que a maior concentração final na reação testada para *P. barbatus* foi de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Kapewangolo et al., 2013), enquanto que para *H. lacustris*, esta foi 333  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A atividade inibidora da HIV-1 RT dos flavonoides e diversas classes de metabólitos secundários já foi demonstrada em diversos estudos realizados (Barkat et al., 2014).

Kitamura et al. (1998) avaliaram o potencial anti-HIV-1 da flavona baicalina, demonstrando que na concentração de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  essa substância inibiu a atividade da HIV-1 RT em 50 %. Na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi capaz de inibir quase completamente a atividade da enzima. Uma das sugestões de mecanismo de ação desse composto é pela interferência na ligação entre o RNA viral e o sítio ativo da enzima.

Mujovo et al. (2008), avaliaram o potencial inibidor da HIV-1 RT da flavona 5,7-dimetoxi-6-metilflavona, isolada de *Hoslundia opposita* Vahl. (Lamiaceae), verificando a inibição de 52% da atividade enzimática quando em concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Lin et al. (1997) demonstraram a significativa atividade inibidora da HIV-1 RT de biflavonas, compostos com duas unidades de apigeninas ligadas por ligações C-C ou C-O-C. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  variaram de 65  $\mu\text{M}$  para robustaflavona, 62  $\mu\text{M}$  para hinokiflavona, 119  $\mu\text{M}$  para amentoflavona e 100  $\mu\text{M}$  para agathisflavona. Outras duas biflavonas, a ochnaflavona 7''-O-metil éter e a 2'',3''-dihidroochnaflavona 7''-O-metil éter, apresentaram forte atividade inibidora da HIV-1

RT, com valores de IC<sub>50</sub> de 2,0 e 2,4 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, valores próximos ao inibidor não nucleosídeo de RT nevirapina (Reutrakul et al., 2007).

Apesar de não especificar por qual mecanismo os compostos inibem a replicação viral, Hu et al. (1994) fizeram um estudo de relação entre estrutura e atividade de diversas flavonas contra a replicação do vírus HIV-1, demonstrando que flavonas sem grupos funcionais no anel B e com hidroxilas nas posições C-5 e C-7 demonstram alta atividade anti-HIV, a exemplo da crisina (EC<sub>50</sub> 5 µM). A adição de mais uma hidroxila na posição C-4' (apigenina, EC<sub>50</sub> 9 µM) diminui a atividade, a adição de uma molécula de açúcar em C-7 e uma metoxila em C-4', mantem a atividade da apigenina, mas ao substituir a metoxila por uma hidroxila a atividade diminui, e a adição de mais uma molécula de açúcar faz com que ocorra a ausência de atividade. A ausência de qualquer hidroxila na flavona diminui consideravelmente a atividade (EC<sub>50</sub> = 50 µM), demonstrando que é importante a presença de oxigênios na estrutura para se ter atividade anti-HIV, mas, ao aumentar em demasia a polaridade dos compostos, com a adição de açúcar ou mais hidroxilas, a atividade diminui consideravelmente, o mesmo vale ao diminuir a sua polaridade, como a flavona sem hidroxilas (Hu et al., 1994).

Essas relações podem explicar a maior atividade apresentada pela fase hidrometanólica, que possui a segunda maior porcentagem relativa de flavonoides (25,29%), apesar da fase diclorometânica apresentar maior porcentagem relativa (53,68%), em grande parte ela é referente a somente um flavonoide pouco polar (tabela 2). Como flavonoides pouco polares também possuem a sua atividade diminuída, pode ser devido a esse motivo a baixa atividade desta fase.

Outra hipótese que pode explicar a maior atividade da fase hidrometanólica frente às outras fases, é a da proporção similar entre constituintes derivados do ácido clorogênico e de flavonoides (tabela 20), atribuindo um efeito aditivo ou sinérgico a essa fase. Em levantamento realizado por Vlietinck et al. (1997), há casos de derivados de ácido clorogênico e de ácidos galloilquínicos com atividade *in vitro* inibidora da HIV RT. Usualmente, a atividade inibidora dos derivados de ácido cafeico é pelo mecanismo de inibição da integrase, mas, um levantamento realizado por Bailly e Cotellet (2005) relatou que alguns de seus derivados, como o ácido rosmarínico e o ácido litospermico, na presença de íons Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> também inibiram a atividade da HIV RT.

Apesar da fase hidrometanólica possuir uma maior quantidade de rutina em comparação com as outras fases (tabela 2), essa substância não é a responsável pela maior atividade dessa fase, pois em estudo realizado por Nutan et al. (2013), no qual foram utilizadas diversas metodologias de análise da atividade anti-HIV, inclusive a de inibição da transcriptase reversa pelo mesmo kit do presente estudo, a rutina não apresentou atividade em nenhuma das metodologias empregadas.

Tabela 20: Porcentagem relativa das classes de metabólitos presente em *Hyptis lacustris* nas suas diferentes fases. EE: Extrato bruto hidroetanólico; FH: Fase hexânica; FD: Fase diclorometânica; FAE: Fase de acetato de etila; FHM: Fase hidrometanólica.

	% Relativa				
	EE	FH	FD	FAE	FHM
Derivado de ácido clorogênico	43,46	0,33	4,58	69,50	27,13
Derivado de ácido cinâmico	15,14	-	6,78	3,13	13,95
Flavonoides	19,28	0,31	53,68	14,51	25,29
Diterpenoides	6,97	84,30	8,34	-	-





---

## 6. Conclusões

- Com relação à composição química de *H. lacustris*, a espécie apresentou como constituintes majoritários substâncias pertencentes a quatro classes: derivados de ácido clorogênico, derivados de ácido cinâmico, flavonoides e diterpenoides, corroborando estudos realizados com espécies pertencentes à Lamiaceae.
- Entre as substâncias fenólicas, foram identificados em *H. lacustris*: ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, apiina, rutina e luteolina, corroborando estudos que apontam o ácido rosmarínico como um marcador para o gênero.
- Foram identificados 6 diterpenoides abietanos: sugiol, horminona, 7-*O*-acetilhorminona, 6,7-dehidroferruginol, ferruginol e 8β-hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one, sendo este último descrito pela primeira vez para o gênero *Hyptis*.
- A fase de acetato de etila foi a mais ativa em todos os ensaios antioxidantes realizados, o que pode estar relacionado à maior presença de compostos fenólicos, principalmente metabólitos com hidroxilas em posição *orto* no anel aromático, característica que confere alta atividade antioxidante.
- A fase hexânica foi a mais promissora quanto à atividade antimicrobiana frente à *B. subtilis*, e nenhuma fase foi ativa em relação as bactérias Gram-negativas testadas. Os dois diterpenoides isolados a partir da fase hexânica, o sugiol e a horminona, apresentaram atividade contra *B. subtilis*, sendo a horminona mais ativa. A presença de diterpenoides abietanos, compostos com reconhecida atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positiva, sugere que a atividade apresentada pela fase hexânica de *H. lacustris* está relacionada à sua composição química, particularmente à presença de diterpenoides.
- *H. lacustris* não apresentou potencial comprovado como fonte de substâncias com atividade anti-HIV.
- Em suma, *H. lacustris* apresentou potencial atividade antioxidante e antimicrobiana comprovadas por valores de EC<sub>50</sub> e MIC<sub>50</sub> próximos aos padrões comerciais, conferindo à espécie *status* promissor para futuras pesquisas nessas áreas.



## 7. Resumo

*Hyptis* Jacq., Lamiaceae, subtribo Hyptidinae, ocorre nas regiões semiáridas tropicais da América e da África. Compreendendo cerca de 144 espécies, e é composto por ervas ou arbustos com caule quadrangular e estames epipétalos. Conhecido por ser fortemente aromático e comumente utilizado na medicina tradicional para o tratamento de infecções gastrointestinais, cólicas, dores, perturbações da pele, malária e como repelente de mosquitos. Este trabalho propõe uma avaliação dos potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV-1 de diferentes extratos e fases produzidas a partir de folhas e eixos caulinares de *H. lacustris* e a realização de triagem fitoquímica dos mesmos. Para tanto, fragmentos de caule e folhas foram secos em estufa e triturados; o pó obtido foi submetido à maceração em etanol por sete dias, à temperatura ambiente. O extrato bruto hidroetanólico foi liofilizado e, parte do extrato, particionada com hexano, diclorometano e acetato de etila. Após as fases serem secas, foi realizada a caracterização das substâncias por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). As frações obtidas foram identificadas com o auxílio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135, sendo isolados e identificados três diterpenoides abietanos: sugiol, horminona e 7-*O*-acetilhorminona. Os diterpenoides abietanos de duas frações foram identificados com técnicas de RMN e CG-EM, uma fração constituída por uma mistura de ácidos graxos com o diterpenoide abietano 6,7-dehidroferruginol e uma fração constituída por dois diterpenoides abietanos (8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one e ferruginol) e ácidos graxos. A avaliação do potencial antioxidante foi realizada pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, atividade redutora de ferro (III), atividade quelante de ferro e ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*). A fase de acetato de etila foi a mais promissora nos ensaios realizados, com valores de EC<sub>50</sub> de 16,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para DPPH, 5,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ABTS, 44,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para quelante, 5,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para FRAP e 0,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o ORAC. Para o teste de potencial antimicrobiano utilizou-se o método de microdiluição em caldo dos inóculos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. A fase hexânica foi a mais promissora contra *B. subtilis* (MIC<sub>50</sub> de 8,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com o sugiol e a horminona apresentando MIC<sub>50</sub> de 190,92 e 81,97  $\mu\text{M}$  respectivamente. Os ensaios para a avaliação do potencial anti-HIV-1 foram realizados por meio de método colorimétrico com o uso do Kit Elisa RT (Roche), sendo a fase hidrometanólica a mais promissora, MIC<sub>50</sub> de 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Palavras-chaves: *Hyptis*, substâncias fenólicas, diterpenoides abietanos, antioxidante, antimicrobiano, anti-HIV.



---

## 8. Abstract

*Hyptis* Jacq. belongs to Lamiaceae, subtribe Hyptidinae, occurring in the semiarid tropical regions of America and Africa. Comprising 144 species, this genus has herbs or shrubs with squared stems and epipetals stamens. *Hyptis* is heavily fragrant and used in popular medicine for the treatment of gastrointestinal infections, cramps, pains, skins diseases, malaria and mosquito repellent. The aims of this research was evaluate the antioxidant, antimicrobial and anti-HIV potential of different extracts and phases produced with leaves and stems of *H. lacustris*, and performe their phytochemical screening. Fragments of stems and leaves were dried and powdered; the powder was macerated in ethanol 70% for seven days in room temperature. The ethanol extract was freeze-dried and part of it was partitioned with hexane, dichloromethane and ethyl acetate. Phases were chemical characterized by the use of gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) and high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). The obtained fractions were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and DEPT 135, and were identified three isolated abietane diterpenes: sugiol, horminone and 7-*O*-acetylhorminone. The abietane diterpenoids components of two fractions were identified by NMR and GC-MS techniques: one fraction as a mixture of fatty acids and 6,7-dehydroferruginol; and the other a mixture of fatty acids and two abietane diterpenoids (8 $\beta$ -hydroxy-9(11),13-abietadien-12-one and ferruginol). The antioxidant potential was evaluated using the following methods: DPPH and ABTS radical scavenging, iron reducing ability, iron chelating activity and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). The ethyl acetate phase was the most promising in all assays,  $\text{EC}_{50}$  of 16.73  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for DPPH, 5.18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for ABTS, 44.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for iron chelating, 5.35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for iron reducing and 0.81  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for ORAC. For the antimicrobial assay was used the broth microdilution method with *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The hexane phase was the most promising against *B. subtilis* ( $\text{MIC}_{50}$  8.87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sugiol and horminone also had activity against *B. subtilis*,  $\text{MIC}_{50}$  190.92 and 81.97  $\mu\text{M}$ , respectively. A colorimetric assay kit produced by Roche was used to evaluate the anti-HIV potential, being the hydromethanolic phase the most promising among all phases, presenting  $\text{MIC}_{50}$  of 230  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Key-words: *Hyptis*, Phenolic substances, abietans diterpenoids, antioxidant, antimicrobial, anti-HIV.



---

## 9. Referências Bibliográficas

- Abedini, A.; Roumy, V.; Mahieux, S.; Biabiany, M.; Standaert-Vitse, A.; Rivière, C.; Sahpaz, S.; Bailleul, F.; Neut, C.; Hennebelle, T. 2013. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.
- Abram, M.E.; Ferris, A.L.; Shao, W.; Alvord, W.G.; Hughes, S.H. 2010. Nature, position, and frequency of mutations made in single cycle of HIV-1 replication. **Journal of Virology** **84** (19): 9864-9878.
- Adamson, C.S. 2012. Protease-Mediated maturation of HIV: Inhibitors of protease and the maturation process. **Molecular Biology International** **2012**: 13p.
- Adjanohoun, E.; Ahyi, M.R.A.; Aké, A.L.; Akpagana, K.; Chibon, P.; El-Hadj, A.; Eymen, I.; Goutote, E.; Ginko, S.; Hodouto, K.K.; Hougnon, P.; Kita, A.; Kéoula, Y.; Klouga-Ocloo, W.P.; Lo, I.; Siamevi, K.; Taffame, K.K.; Garba, M.; Gassita, J.N.; Gbeassor, M. 1986. **Médecine traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques du Togo**. ACCT. Paris, p. 671.
- Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18** (3): 472-508.
- Almeida, M.Z. 2011. **Plantas Mediciniais**. 3ed. EDUFBA. Bahia.
- Almtorp, G.T.; Hazell, A.C.; Torssell, K.B.G. 1991. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. **Phytochemistry** **30** (8): 2753-6
- Alves, L.F. 2013. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química** **5** (3): 450-513.
- Andrade, A.M.; Oliveira, J.P.R.; Santos, A.L.L.M.; Franco, C.R.P.; Antonioli, A.R.; Estevam, C.S.; Thomazzi, S.M. 2010. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **20** (6): 962-968.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. 2001. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst** **127**: 183-198.
- Ara, I.; Siddiqui, B.S.; Faizi, S.; Siddiqui, S. 1989. Structurally novel diterpenoids constituents from the stem bark of *Azadirachta indica* (Meliaceae). **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**: 343-345.
- Araujo, E.C.C.; Lima, M.A.S.; Montenegro, R.C.; Nogueira, M.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R. 2006. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Z. Naturforsch** **61**: 177-183.
- Areche, C.; Schmeda-Hirschmann, G.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J.A. 2009. Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **61**: 1689-1697.
-

- Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; Rollinger, J.M.; Schuster, D.; Breuss, J.M.; Bochkov, B.; Mihovilovic, D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V.M.; Stupner, H. 2015. Discover and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology advances** **33** (8): 1582-1614.
- Bailly, F.; Cotelle, P. 2005. Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet. **Current Medicinal Chemistry** **12**: 1811-1818.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis** **6**: 71-79.
- Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição** **23** (4): 629-643.
- Barkat, A.; Rizwanullah; Naim, J.; Pottou, F.H.; Kumar, R. 2014. Phytoconstituents as potential anti-HIV agents: a systematic review. **International Journal of Biomedical Research** **5** (5): 299-313.
- Basílio, I.J.L.D.; Agra, M.F.; Rocha, E.A. 2006. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense** **25** (4): 518-525
- Basso, L.A.; Silva, L.H.P.; Fett-Neto, A.G.; Junior, W.F.A.; Moreira, I.S.; Palma, M.S.; Calixto, J.B.; Filho, S.A.; Santos, R.R.; Soares, M.B.P.; Santos, D.S. 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100** (6): 475-506.
- Becerra, J.; Flores, C.; Mena, J.; Aqueveque, P.; Alarcón, J.; Bittner, M.; Hernández, V.; Hoeneisen, M.; Ruiz, E.; Silva, M. 2002. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** **47** (2): 151-157.
- Bernardes, W.A.; Lucarini, R.; Tozatti, M.G.; Souza, M.G.M.; Silva, M.L.A.; Filho, A.A.S.; Martins, C.H.G.; Crotti, A.E.M.; Pauletti, P.M.; Groppo, M.; Cunha, W.R. 2010. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry and Biodiversity** **7**: 1835-1840.
- Blair, J.M.A.; Richmond, G.E.; Piddock, L.J.V. 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology** **9** (10): 1165-1177.
- Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J. 2000. **Herbal medicine – Expanded commission and monographs**. Concílio Americano de Botânica. Austin.
- Brown, D. 2015. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? **Nature Reviews: Drug Discovery** **14**: 821-832.
- Brown, S.; Junior, J.P.S.M.; Walker, S. 2013. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology** **67**.
-



- 
- Butler, M.S.; Cooper, M.A. 2011. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **The Journal of Antibiotics** **64**: 413-425.
- Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J.; Ravanat, J.; Sauvaigo, S. 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** **424** (1-2): 9-21.
- Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J-L. 2010. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radical Biology & Medicine** **49**: 9-21.
- Calcoen, D.; Elias, L.; Yu, X. 2015. What does it take to produce a breakthrough drug? **Nature Reviews Drug Discovery** **14**: 161-162.
- Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel, A.; Perfeito, J.P.S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18** (2): 314-319.
- Cavalcanti, B.C.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Moraes, M.O.; Araujo, E.C.C.; Lima, M.A.S.; Silveira, E.R.; Saffi, J.; Henriques, J.A.P.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L.V. 2008. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology** **46** (1): 388-392.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2015. **About Antimicrobial Resistance: A Brief Overview**. Disponível em: <http://www.cdc.gov>.
- Céline, V.; Adriana, P.; Eric, D.; Joaquina, A-C.; Yannick, E.; Augusto, L.F.; Rosario, R.; Dionicia G.; Michel, S.; Denis, C.; Geneviève, B. 2009. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology** **123**: 413-422.
- Cerqueira, F.M.; Medeiros, M.H.G.; Augusto, O. 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova** **30** (2): 441-449.
- Chakravarti, B.; Chakravarti, D.N. 2007. Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology** **53**: 128-139.
- Chari, V.M.; Grayer-Barkmeijer, R.J.; Harborne, J.B.; Österdahl, B-G. 1981. An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filiformis*. **Phytochemistry** **20** (8): 1977-1979.
- Constantini, D.; Rowe, M.; Butler, M.W.; McGraw, K.J. 2010. The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals: from molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. **Functional Ecology** **24**: 950-959.
- Correa, M.P. 1931. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, p. 363
- Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V.; Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology** **106**: 290-302.
- Costa, I.B.; 2009. **Epidemiologia molecular do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) em mulheres (mães e grávidas), dos estados do Acre e Tocantins, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Pará.
-

- Costa-Lotufo, L.V.; Araújo, E.C.C.; Lima, M.A.S.; Moraes, M.E.A.; Pessoa, C.; Silveira, E.R.; Moraes, M.O. 2003. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie** **58**: 78-79.
- Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Siqueira-Junior, J.P.; Lima, E.O. 2008. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18** (Supl.): 670-675.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of antimicrobial agents** **26**: 343-356.
- Daniyal, M.; Akram, M.; Hamid, A.; Nawaz, A.; Usmanghani, K.; Ahmed, S.; Hameed, L. 2016. Comprehensive review on treatment of HIV. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** **29** (4): 1331-1338.
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. 2004. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 48-54.
- Davies, S.C. 2011. Infections and the rise of antimicrobial resistance. **Annual Report of the Chief Medical Officer**. Vol. 2. Encontrado em: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/138331/CMO\\_Annual\\_Report\\_Volume\\_2\\_2011.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/138331/CMO_Annual_Report_Volume_2_2011.pdf) > Último acesso em: 22 Setembro 2016.
- Daza-Pérez, R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importância em la toma de decisiones em la práctica diária. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud** **22** (3): 57-67.
- Dellar, J.E.; Cole, M.D.; Waterman, P.G. 1996. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. **Phytochemistry** **41** (3): 735-738.
- Dewick, P.M. 2009. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3ed. John Wiley & Sons Ltd. United Kingdom.
- Dias, D.A.; Urban, S.; Roessner, U. 2012. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites** **2**: 303-336.
- Dotan, Y.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as an universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research** **43** (3): 200-227.
- Dudoneé, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plants extracts of industrial interest using DDPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **57** (5): 1768-1774.
- Ebrahimzadeh, M.A.; Pourmorad, F.; Bekhradnia, A.R. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **African Journal of Biotechnology** **7** (18): 3188-3192.

- Engström, M. 2016. **Understanding the bioactivity of plant tannins: developments in analysis methods and structure-activity studies**. Doctoral thesis of the program of Laboratory of Organic Chemistry and Chemical Biology/Natural compound chemistry, in University of Turku, Finland.
- Falcao, R.E.A.; Nascimento, P.L.A.; Souza, S.A.; Silva, T.M.G.; Queiroz, A.C.; Matta, C.B.B.; Moreira, M.S.A.; Camara, C.A.; Silva, T.M.S. 2013. Antileishmanial Phenilpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** **2013** (2013).
- Falcao, R.E.A.; Souza, S.A.; Camara, C.A.; Quintans, J.S.S.; Santos, P.L.; correia, M.T.S.; Silva, T.M.S.; Lima, A.A.N.; Quintans-Junior, L.J.; Guimarães, A.G. 2016. Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **26** (2): 203-208.
- Fallarero, A.; Skogman, M.; Kujala, J.; Rajaratnam, M.; Moreira, V.M.; Yli-Kauhaluoma, J.; Vuorela, P. 2013. (+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro*. **International Journal of Molecular Science** **14**: 12054-12072.
- Ferreira, R.C.S.; Riffel, A.; Sant'ana, A.E.G. 2010. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova** **33** (8): 1743-1755.
- Ferro, A.F.P.; Bonacelli, M.B.M.; Assad, A.L.D. 2006. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção** **13** (3): 489-501.
- Floegel, A.; Dae-Ok, K.; Sang-Jin, C.; Sung, I.K.; Ock, K.C. 2011. Comparisson of ABTS/DPPH assays to measure antioxidante capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis** **24**: 1043-1048.
- Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH<sup>•</sup> radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry** **69** (7): 2310-2314.
- FDA, Food and Drug Administration. 2016. **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm> . Último acesso em: 09 Janeiro 2017.
- Fronza, M.; Murillo, R.; Slusarczyk, S.; Adams, M.; Hamburger, M.; Heinzmann, B.; Laufer, S.; Merfort, I. 2011. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **19**: 4876-4881.
- Gaspar-Marques, C.; Rijo, P.; Simões, M.F.; Duarte, M.A.; Rodriguez, B. 2006. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicilin and vancomycin-resistant bacteria. **Phytomedicine** **13** (4): 267-271.
- General Eletrics Healthcare. 2007. Sephadex LH-20. **Data File 18-1107-22-AB**. Disponível em: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722\\_20161012161239.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722_20161012161239.pdf)

- Gibbons, S.; Oluwatuyi, M.; Veitch, N.C.; Gray, A.I. 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry** **62**: 83-87.
- Giedraitienė, A.; Vitkauskienė, A.; Naginienė, R.; Pavilonis, A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)** **47** (3): 137-146.
- González, A.G.; Aguiar, Z.E.; Grillo, T.A.; Luis, J.G. 1992. Diterpenes and diterpene quinones from the roots of *Salvia apiana*. **Phytochemistry** **31** (5): 1691-1695.
- González, M.A. 2015. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. **Natural Products Reports** **32**: 684-704.
- Goun, E.; Cunningham, G.; Chu, D.; Nguyen, C.; Miles, D. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, **74** (6): 592-596.
- Grayer, R.J.; Eckert, M.R.; Veitch, N.C.; Kite, G.C.; Marin, P.D.; Kokubun, T.; Simmonds, M.S.J.; Paton, A.J. 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A e B, in the Lamiaceae. **Phytochemistry** **64**: 519-528.
- Guerrero, I.C.; Andrés, L.S.; León, L.G.; Machín, R.P.; Padrón, J.M.; Luis, J.G.; Delgadillo, J. 2006. Abietane diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with cytotoxic activity against human cancer cell lines. **Journal of Natural Products** **69**: 1803-1805.
- Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova** **33** (3): 667-679.
- Gupta, M.P.; Monge, A.; Karikas, G.A.; Lopez De Cerain, A.; Lolis, P.N.; Leonl, E.; Trujillo, M.; Suarez, O.; Wilson, F.; Montenegro, G.; Noriegal, Y.; Santana, A.I.; Correa, M.; Sanchez, C. 1996. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. **International Journal of Pharmacognosy** **34** (1): 19-27.
- Gutierrez, A.C.; Gehlen, M.H. 2002. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al<sup>3+</sup>. **Spectrochimica Acta Part A** **58**: 83-89.
- Harley, R.M. 1996. The Labiatae of Bahia: a preliminary check-list. **Sitientibus** **15**. 11-21
- Harley, R.M.; Pastore, J.F.B. 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa** **58**: 1-55.
- Harvey, A.L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R.J. 2015. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery** **14**: 111-129.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry** **13**: 572-584.
- Helfer, M.; Koppensteiner, H.; Schneider, M.; Rebensburg, S.; Forcisi, S.; Müller, C.; Schmitti-Kopplin, P.; Schindler, M.; Brack-Werner, R. 2014. The root extract of the medicinal plant *Pelargonium sidoides* is a potent HIV-1 attachment inhibitor. **PLoS ONE** **9** (1).
- Hemaiswarya, S.; Kruthiventi A.K.; Doble, M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine** **15**: 639-652.
-

- 
- Horiuchi, K.; Shiota, S.; Kuroda, T.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Tsuchiya, T. 2007. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** **30** (2): 287-290.
- Hu, C-Q.; Chen, K.; Shi, Q.; Kilkuskie, R.E.; Cheng, Y-C.; Lee, K-H. 1994. Anti-Aids agents 10. Acacetin-7-O- $\beta$ -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products** **57** (1): 42-51.
- Hu, Z-Q.; Zhao, W-H, Hara, Y. Shimamura, T. 2001. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **48**: 361-364.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **53**: 1841-1856.
- Judd, W.; Campbell, C.; Kellogg, E.; Stevens, P.; Donoghue, M. 2002. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2ed. Sinauer Associates. Sunderland.
- Kapewangolo, P.; Hussein, A.A.; Meyer, D. 2013. Inhibition of HIV-1 enzymes, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Plectranthus barbatus*. **Journal of Ethnopharmacology** **149** (1): 184-190.
- Kashiwada, Y.; Wang, H.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, L. M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.; Yeh, E.; Lee, K. 1998. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products** **61** (9): 1090-1095.
- Khan, M.T.H.; Ather, A. 2007. Potential of phenolic molecules of natural origin and their derivatives as anti-HIV agentes. **Biotechnology Annual Review** **13**: 223-264.
- Kim, G.; Park Y.S.; Jin Y. 2015. Production and application of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology** **99**: 2083-2092.
- Kitamura, K.; Honda, M.; Yoshizaki, H.; Yamamoto, S.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Ono, K.; Tokunaga, T. 1998. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. **Antiviral Research** **37** (2): 131-140.
- Klos, M.; Van de Venter, M.; Milne, P.J.; Traore, H.N.; Meyer, D.; Oosthuizen, V. 2009. *In vitro* anti-HIV activity of five selected South African medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology** **124** (2): 182-188.
- Kolak, U.; Topçu, G.; Birteksöz, S.; Ötük, G.; Ulubelen, A. 2005. Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena*. **Turkish Journal of Chemistry** **29**: 177-186.
- Kuhnt, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M. 1993. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry** **36** (2): 485-489.
- Kumar, S.; Pandey, A.K. 2014. Medicinal attributes of *Solanum xanthocarpum* fruit consumed by several tribal communities as food: an *in vitro* antioxidant, anticancer and anti HIV perspective. **BMC Complementary and Alternative Medicine** **14** (112).
-

- Kutchan, T.M.; Gershenzon, J.; Moller, B.L.; Gang, D.R. 2015. Natural Products. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L (Ed). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2ed. West Sussex: Wiley Blackwell. 1132-1206.
- Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A.M.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M.G.; Bessières, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; Borris, R.; Boursier, L.; Brans, A.; Braun, M.; Brignell, S.C.; Bron, S.; Brouillet, S.; Bruschi, C.V.; Caldwell, B.; Capuano, V.; Carter, N.M.; Choi, S.K.; Codani, J.J.; Connerton, I.F.; Cummings, N.J.; Daniel, R.A.; Denizot, F.; Devine, K.M.; Düsterhöft, A.; Ehrlich, S.D.; Emmerson, P.T.; Entian, K.D.; Errington, J.; Fabret, C.; Ferrari, E.; Foulger, D.; Fritz, C.; Fujita, M.; Fuma, S.; Gallizi, A.; Galleron, N.; Ghim, S.Y.; Glaser, P.; Goffeau, A.; Golightly, E.J.; Grandi, G.; Guiseppi, G.; Guy, B.J.; Haga, K.; Haiechi, J.; Harwood, C.R.; Hénaut, A.; Hilbert, H.; Holsappel, S.; Hosono, S.; Hullo, M.F.; Itaya, M.; Jones, L.; Joris, B.; Karamata, D.; Kasahara, Y.; Klaerr-Blanchard, M.; Klein, C.; Kobayashi, Y.; Koetter, P.; Koningstein, G.; Krogh, S.; Kumano, M.; Kurita, K.; Lapidus, A.; Lardinois, S.; Lauber, J.; Lazarevic, V.; Lee, S.M.; Levine, A.; Liu, H.; Masuda, S.; Mauël, C.; Médigue, C.; Medina, N.; Mellado, R.P.; Mizuno, M.; Moestl, D.; Nakai, S.; Noback, M.; Noone, D.; O'Reilly, M.; Ogawa, K.; Ogiwara, A.; Oudega, B.; Park, S.H.; Parro, V.; Pohl, T.M.; Portetelle, D.; Porwollik, S.; Prescott, A.M.; Presecan, E.; Pujic, P.; Purnelle, B.; Rapoport, G.; Rey, M.; Reynolds, S.; Rieger, M.; Rivolta, C.; Rocha, E.; Roche, B.; Rose, M.; Sadaie, Y.; Sato, T.; Scanlan, E.; Schleich, S.; Schroeter, R.; Scoffone, F.; Sekiguchi, J.; Sekowska, A.; Seror, S.J.; Serron, P.; Shin, B.S.; Soldo, B.; Sorokin, A.; Tacconi, E.; Takagi, T.; Takahashi, K.; Takemaru, K.; Takeuchi, M.; Tamakoshi, A.; Tanaka, T.; Terpstra, P.; Tognoni, A.; Tosato, V.; Uchiyama, S.; Vandenbol, M.; Vannier, F.; Vassaroti, A.; Viari, A.; Wambutt, R.; Wedler, E.; Weitzenegger, T.; Winters, P.; Wipat, A.; Yamamoto, H.; Yamane, K.; Yasumoto, K.; Yata, K.; Yoshida, K.; Yoshikawa, H.F.; Zumstein, E.; Yoshikawa, H.; Danchin, A. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature** **390**: 249-256.
- Kusumoto, N.; Ashitani, T.; Hayasaka, Y.; Murayama, T.; Ogiyama, K.; Takahashi, K. 2009. Antitermitic activities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones. **Journal of Chemical Ecology** **35**: 635-642.
- Ladeiras, D.; Monteiro, C.M.; Pereira, F.; Reis, C.P.; Afonso, C.A.M.; Rijo, P. 2016. Reactivity of diterpenoid quinones: Royleanones. **Current Pharmaceutical Design** **22**: 1682-1714.
- Lee, F.J.; Amin, J.; Carr, A. 2014. Efficacy of Initial Antiretroviral Therapy for HIV-1 Infection in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of 114 Studies with up to 144 Weeks Follow-Up. **PLoS ONE** **9** (5).
- Lee, K.H.; Lin, Y.M.; Wu, T.S.; Zhang, D. E. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J.J.; Wu, R.Y.; Yang, T.H. 1988. Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica** **54** (4): 308-11.
-

- 
- Li, X.; Wu, X.; Huang, L. 2009. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui). **Molecules** **14**: 5349-5361.
- Lima, K.S.B.; Guedes, M.L.S.; Silveira, E.R. 2015. Abietane diterpenes from *Hyptis crassifolia* Mart. Ex Benth (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** **26** (1): 32-39.
- Lin, Y.-M.; Anderson, H.; Flavin, M.T.; Pai, Y.-H. S. 1997. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products** **60** (9): 884-888.
- Lin, Y.L.; Lee, H.P.; Huang, R.L.; Ou, J.C.; Kuo, Y.H. 1993. Studies on the constituents of *Hyptis rhomboids*. **Zhonghua Yaoxue Zazhi** **45** (1): 61-68.
- Liu, I.X.; Durham, D.G.; Richards, M.E. 2000. Baicalin synergy with  $\beta$ -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other  $\beta$ -lactam-resistant strains of *S. aureus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. **52**: 361-366.
- Lordêllo D.M.S. 2015. **Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* e estudo comparativo de atividade antioxidante em espécies de Mentas**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras para obtenção do título de Mestre.
- Luis, J.G.; Grillo, T.A. 1993. New diterpenes from *Salvia munzii*: Chemical and biogenetic aspects. **Tetrahedron** **49** (28): 6277-6284.
- Malmsten, A. 2005. Reverse transcriptase activity assays for retrovirus quantitation and characterization. **Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from the Faculty of Medicine 1**.
- Marcos, I.S.; Beneitez, A.; Moro, R.F.; Basabe, P.; Díez, D.; Urones, J.G. 2010. Lateral lithiation in terpenes: synthesis of (+)-ferruginol and (+)-sugiol. **Tetrahedron** **66**: 7773-7780.
- Marin, P.D.; Grayer, R.J.; Veitch, N.C.; Kite, G.C.; Harborne, J.B. 2001. Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. **Phytochemistry** **58**: 943-947.
- Markham, K. 1982. **Techniques of flavonoid identification**. New Zealand.
- Marletti, F.; Delle-Monache, F.; Marini-Bettolo, G.B.; Arujo, C.M.M.; Cavalcanti, M.S.B.; D'Albuquerque, I.L.; Lima, O.G. 1976. Diterpenoid quinones of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). **Gazzetta Chimica Italiana** **106**: 119-126.
- Matsuse, I.T.; Lim, Y.A.; Hattori, M.; Correa, M.; Gupta, M.P. 1998. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology** **64**: 15-22.
- Mavundza, E.; Tshikalange, T.E.; Lall, N.; Hussein, A.A.; Mudau, F.N.; Meyer, J.J.M. 2010. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of flavonoids isolated from *Athrixia phyllicoides*. **Journal of Medicinal Plants Research** **4**: 2584-2587.
- Medoatinsa, S.E.; Dossa, C.P.A.; Viwami, F.; Bogninou-Agbidinokoun, G.S.R.; Noudogbessi, J.P.; Lagnika, L.; Ahissou, H.; Sohounhloue, D.C.K. 2015. *In vitro* antiplasmodial and antioxidant activities of ethanolic and hydroethanolic extracts of *Hyptis suaveolens*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** **4** (8): 101-112.
-

- Melo, E.B.; Bruni, A.T.; Ferreira, M.M.C. 2006. Inibidores da HIV-Integrase: potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS. **Química Nova** **29** (3): 555-562.
- Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; Santos, T.C.; Coube, C.S.; Leitão, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research** **15**: 127-130.
- Ministério da Saúde. 2006. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.**
- Ministério da Saúde. 2009. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.**
- Ministério da Saúde. 2012. **Boletim Epidemiológico AIDS DST 1.**
- Molyneaux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** **26** (2): 211-219.
- Moreira, F.A. 2015. **Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae).** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na Área de Recursos Econômicos Vegetais.
- Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A.M.; Andrés, L.S.; Luis, J.G. 1996. Bioactive diterpenoids isolated from *Salvia mellifera*. **Phytoterapy Research** **10**: 172-174.
- Muhammad, I.; Mossa, J.S.; El-Ferally, F.S. 1992. Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. **Phytoterapy Research** **6**: 261-264.
- Mujovo, S.F.; Hussein, A.A.; Meyer, J.J.M.; Fourie, B.; Muthivhi, T.; Lall, N. 2008. Bioactive compounds from *Lippia javanica* and *Hoslundia opposita*. **Natural Product Research** **22** (12): 1047-1054.
- Murray, P.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A. 2014. **Microbiologia Médica.** 7ed. Elsevier. Rio de Janeiro.
- Nenadis, N.; Wang, L.; Tsimidou, M.; Zhang, H. 2004. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS<sup>•+</sup> Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 4669-4674.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products** **79**: 629-661.
- NIH, National Institute of Health. 2015<sup>a</sup>. **MPC-4326.** Disponível em: <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/print/526/mpc-4326/0/1/professional>. Último acesso em: 10 Janeiro 2017.
- NIH, National Institute of Health. 2015<sup>b</sup>. **Carrageenan.** Disponível em: <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/print/400/carrageenan/0/1/professional>. Último acesso em: 10 Janeiro 2017.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine** **47** (5): 469-484.
-



- 
- Niki, E. 2010. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine** **49** (4): 503-515.
- Nunes, X.P.; Silva, F.S.; Almeida, J.R.G.S.; Lima, J.T.; Ribeiro, L.A.A.; Júnior, L.J.Q.; Filho, J.M.B. 2012. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of natural Products. **Phytochemicals and Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**.
- Nutan; Modi, M.; Dezzutti, C.S.; Kulshreshtha, S.; Rawat, A.K.S.; Srivastava, S.K.; Malhotra, S.; Verma, A.; Ranga, U.; Gupta, S.K. 2013. Extracts from *Acacia catechu* suppress HIV-1 replication by inhibiting the activities of the viral protease and Tat. **Virology Journal** **10**: 309-341.
- Oksman-Caldentey, K.M.; Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science** **9** (9).
- Oliveira, C.M.A.; Silva, M.R.R.; Kato, L.; Silva, C.C.; Ferreira, H.D.; Souza, L.K.H. 2004. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** **15** (5): 756-759.
- Oluwatuyi, M.; Kaatz, G.W.; Gibbons, S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry** **65**: 3249-3254.
- ONAP, Office of National AIDS Policy. 2015. **National HIV/AIDS Strategy for the United States: Updated to 2020**. Disponível em: <https://www.aids.gov/federal-resources/national-hiv-aids-strategy/overview/>
- Otto, A.; Simoneit, B.R.T. 2001. Chemosystematics and diagenesis of terpenoid in fósfil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. **Geochimica et Chosmochimica Acta** **65** (20): 3505-3527.
- Otto, A.; Simoneit, B.R.T.; Wilde, V.; Kunzmann, L.; Puttmann, W. 2002. Terpenoid composition of three fósfil resins from cretaceous and tertiary conifers. **Review of Paleobotany & Palynology** **120**: 203-215.
- Pastore, J.F.B. 2010. **Filogenia molecular da subtribo Hyptidinae Endl (Labiatae) e suas implicações taxonômicas**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Botânica.
- Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; López, R. 1992. A novel antimicrobial abietane-type diterpene from *Salvia albocaerulea*. **Planta Medica** **58**: 223-224.
- Pérez-Fons, L.; Gárzon, M.T.; Micol, V. 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane pospholipid order. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **58**: 161-171.
- Peterlin, B.M.; Trono, D. 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. **Nature Reviews: Immunology** **3**: 97-107.
- Petersen, M.; Simmonds, M.S.J. 2003. Molecules of interest Rosmarinic acid. **Phytochemistry** **62**: 121-125.
-

- Piazzon, A.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Mattivi, F.; Mandoj, F.; Nardini, M. 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **60**: 12312-12323.
- Pisoschi, A.M.; Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicine Chemistry** **97**: 55-74.
- Politi, M.; Braca, A.; Tommasi, N.; Morelli, I.; Manunta, A.; Battinelli, L.; Mazzanti, G. 2003. Antimicrobial diterpenes from the seeds of *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupaceae*. **Planta Medica** **69**: 468-470.
- Porter, R.B.; Biggs, D.A.; Reynolds, W.F. 2009. Abietane diterpenoids from *Hyptis verticillata*. **Natural products communications** **4**: 15-18.
- Procházková, D.; Bousová, I.; Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia** **82**: 513-523.
- Pupo, M.T.; Gallo, M.B.C. 2007. Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova** **30** (6): 1446-1455.
- Radulovic, N.; Denic, M.; Stojanovic-Radic, Z. 2010. Antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **20**: 4988-4991.
- Ravanat, J.-L.; Breton, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Grand, A.; Rachidi, W.; Sauvaigo, S. 2014. Radiation-mediated formation of complex damage to DNA: a chemical aspect overview. **The British Journal of Radiology** **87**.
- Reutrakul, V.; Ningnuek, N.; Pohmakotr, M.; Yoosook, C.; Napaswad, C.; Kasisit, J.; Santisuk, T.; Tuchinda, P. 2007. Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*. **Planta Medica** **73**: 683-688.
- Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. 2016. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**. Encontrado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Último acesso em: 10 Novembro 2016.
- Roccaro, A.S.; Blanco, A.R.; Giuliano, F.; Rusciano, D.; Enea, V. 2004. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in Staphilococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **48** (6): 1968-1973.
- Rüedi, P. 1984. 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxy-7-oxoroleanon, ein Diterpen-Epoxychinon aus einer abessinischen *Plectranthus*-Art (Labiatae). **Helvetica Chimica Acta** **67**: 1116-1120.
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. 2006. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado técnico on-line** **125**. Embrapa Agroindústria Tropical.
-

- 
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. 2007a. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico on-line 127**. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. 2007b. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>. **Comunicado técnico on-line 128**. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Rungsimakan, S.; Rowan, M.G. 2014. Terpenoids, flavonoids, and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. **Phytochemistry 108**: 177-188.
- Salae, A-W.; Rodjun, A.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Kanjana-Opas, A.; Tewtrakul, S.; Fun, H-K. 2012. Potential anti-inflammatory diterpenes from *Premna obtusifolia*. **Tetrahedron 68** (3): 819-829.
- Sallmyr, A.; Fan, J.; Rassool, F.V. 2008. Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repairs. **Cancer Letters 270**: 1-9.
- Samaradivakara, S.P.; Samarasekera, R.; Handunnetti, S.M.; Weerasena, O.V.D.S.J. 2016. Cholinesterase, protease inhibitory and antioxidant capacities of Sri Lankan medicinal plants. **Industrial Crops and Products 83**: 227-234.
- Santos, A.K.L.; Costa, J.G.M.; Menezes, I.R.A.; Cansanção, I.F.; Santos, K.K.A.; Matias, E.E.F.; Coutinho, H.D.M. 2010. Antioxidant activity of five brazilian plants used as traditional medicines nad food in Brazil. **Pharmacognosy Magazine 6** (24): 335-338.
- Santos, H.S.; Cruz, W.M.S. 2001. A Terapia Nutricional com Vitaminas Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico Oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia 47** (3): 303-308.
- Santos, K.P.; Sedano-Partida, M.D.; Motta, L.B.; Cordeiro, I.; Furlan, C.M. 2016. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. **Brazilian Journal of Botany 39** (4): 1021-1030.
- Scio, E.; Mendes, R.F.; Motta, E.V.S.; Bellozi, P.M.Q.; Aragão, D.M.O.; Mello, J.; Fabri, R.L.; Moreira, J.R.; Assis, I.V.L.; Bouzada, M.L.M. 2012. Antimicrobial and Antioxidant activities of some plant extracts. **Phytochemichals and Nutraceuticals: Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**: 21-42.
- Sedano-Partida, M.D.; Sala-Carvalho, W.R.; Santos, K.P.; Silva-Luz, C.L.; Furlan, C.M. Anti-HIV and antibacterial potential of *Hyptis radicans* (Pohl) Harley & J.F.B. Pastore and *Hyptis multibracteata* Benth. (Lamiaceae). Submetido à **Industrial Crops and Products**.
- Segóvia, F.; Lupo, B.; Peiró, S.; Gordon, M.H.; Almajano, M.P. 2014. Extractions of antioxidants from Borage (*Borago officinalis* L.) leaves – optimization by response surface method and application in oil-in-water emulsions. **Antioxidants 3**: 339-357.
- Sevgi, K.; Tepe, B.; Sarikurkcü, C. 2015. Antioxidant and DNA damage protection potential of selected phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology 77**: 12-21.
-

- Seyoum, A.; Palsson, K.; Kung, A.S.; Kabiru, E.W.; Lwande, W.; Killeen, G.F.; Hassanali, A.; Knols, B.G. 2002. Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **96**: 225-231.
- Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. 2004. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição** **17** (2): 227-236.
- Sharma, V.; Sarkar, I.N. 2013. Leveraging biodiversity knowledge for potential phyto-therapeutic applications. **Journal of the American Medical Information Association** **20**: 668-679.
- Silva, A.B.L.; Dias, K.S.; Marques, M.S.; Menezes, I.A.C.; Santos, T.C.; Mello, I.C.M.; Lisboa, A.C.C.D.; Cavalcanti, S.C.H.; Marçal, R.M.; Antonioli, A.R. 2006. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. Ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **16** (4): 475-479.
- Silva, C.G.; Raulino, R.J.; Cerqueira, D.M.; Mannarino, S.C.; Pereira, M.D.; Panek, A.D.; Silva, J.F.M.; Menezes, F.S.; Eleutherio, E.C.A. 2009. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercetrin and *Hyptis fasciculata*. **Phytomedicine** **16** (8): 761-767.
- Silva-Luz, C.L.; Gomes, C.G.; Pirani, J.R.; Harley, R.M. 2012. Flora da Serra da Cipó, Minas Gerais: *Lamiaceae*. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **30** (2): 109-155.
- Silver, L.L. 2011. Challenges of antibacterial Discovery. **Clinical microbiology reviews** **24** (1): 71-109.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P. 2002. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **12** (1): 35-40.
- Simonetti, G.; Simonetti, N.; Villa, A. 2004. Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia Sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. **Journal of Chemotherapy** **16** (2): 122-127.
- Singh, O.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. 2014. Microbicides for the treatment of sexually transmitted HIV infections. **Journal of Pharmaceutics** **2014**: 18p.
- Smith, E.C.J.; Wareham, N.; Zloh, M.; Gibbons, S. 2008. 2 $\beta$ -acetoxyferruginol-a new antibacterial abietane diterpene from the bark of *Prumnopitys andina*. **Phytochemistry Letters** **1**: 49-53.
- Smith, E.C.J.; Williamson, E.M.; Wareham, N.; Kaatz, G.W.; Gibbons, S. 2007. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry** **68**: 210-217.
- Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr., G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova** **30** (2): 351-355.
- Stover, C.K.; Pham, X.Q.; Erwin, A.L.; Mizoguchi, S.D.; Warrenner, P.; Hickey, M.J.; Brinkman, F.S.L.; Hufnagle, W.O.; Kowalik, D.J.; Lagrou, M.; Garber, R.L., Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L.L.; Coulter, S.N.; Folger, K.R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.;
-

- Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G.K.S.; Wu, Z.; Paulsen, I.T.; Reizer, J.; Saler, M.H.; Hancock, R.E.W.; Lory, S.; Olson, M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, na opportunistic pathogen. **Nature** **406**: 959-964.
- Suedee, A.; Tewtrakul, S.; Panichayupakaranant, P. 2013. Anti-HIV-1 integrase compound from *Pometia pinnata* leaves. **Pharmaceutical Biology** **51** (10): 1256-1261.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.M.; Murphy, A. 2017. **Plant physiology and development**. 6 ed. Sinauer Associates.
- Tang, M.W.; Shafer, R.W. 2012. HIV-1 antiretroviral resistance scientific principles and clinical applicatons. **Drugs** **72** (9): 1-25.
- Terpinc, P.; Polak, T.; Šegatin, N.; Hanzlowsky, A.; Ulrih, N.P.; Abramovič, H. 2011. Antioxidants properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. **Food Chemistry** **128** (1): 62-69.
- Teixeira J.; Gaspar, A.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Borges, F. 2013. Hydroxycinnamic acid antioxidants: na eletrochemical overview. **BioMed Research International** **2013**.
- Tezuka, Y.; Kasimu, R.; Li, J.X.; Basnet, P.; Tanaka, K.; Namba, T.; Kadota, S. 1998. Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang. (Xinjiang-Danshen). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **46** (1): 107-112.
- Thompson, M.A.; Aberg, J.A.; Hoy, J.F.; Telenti, A.; Benson, C.; Cahn, P.; Eron JR., J.J.; Gunthard, H.F.; Hammer, S.M.; Reiss, P.; Richman, D.D.; Rizzardini, G.; Thomas, D.L.; Jacobsen, D.M.; Volberding, P.A. 2012. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2012 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. **Journal of The American Medical Association** **308** (4): 387-402.
- Thoppil, J. E.; Jose, J. 1995. Chemical composition of essential oil in two ethnomedicinal species of *Hyptis*. **Acta Pharmaceutical (Zagreb)** **45** (4): 551-3.
- Ticli, F.K.; Hage, L.I.S.; Cambraia, R.S.; Pereira, P.S.; Magro, Â.J.; Fontes, M.R.M.; Stábeli, R.G.; Giglio, J.R.; França, S.C.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V. 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon** **46**: 318-327.
- Tsimogiannis, D.; Samiotaki, M.; Panayotou, G.; Oreopoulou, V. 2007. Charachterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules** **12**: 593-606.
- Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Kolak, U.; Bozok-Johansson, C.; Çelik, C.; Voelter, W. 2000. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. **Planta Medica** **66**: 458-462.
- Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Topcu, G.; Gören, A.C.; Voelter, W. 2001. Antibacterial Diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. **Journal of Natural Products** **64** (4): 549-551.
- UNAIDS, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2013. **Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013**.
- Uriarte-Pueyo, I.; Calvo, M.I. 2010. Structure-activity relationship of acetylated flavone glycosides from *Galeopsis ladanum* L. (Lamiaceae). **Food Chemistry** **120**: 679-683.

- Urzúa, A.; Rezende, M.C.; Mascayano, C.; Vásquez, L. 2008. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules** **13**: 882-891.
- Valant-Vetschera, K.M.; Wollenweber, E. 2006. Flavones and Flavonols. In: Andersen, O.M.; Markham, K.R. (Ed). **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Florida: Taylor and Francis Group. 617-748.
- Varghese, C.; Ambrose, C.; Veerasamy, R.; Hui, P.N.; May, C.S. 2011. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Labisa pumila* var. *Alata*, na indigenous planta of Malaysia. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology** **4** (2): 1418-1422.
- Velloso, J.C.R.; Barbosa, V.F.; Khalil N.M.; Santos, V.A.F.F.M.; Furlan, M.; Brunetti, I.L.; Oliveira, O.M.M.F. 2007. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** **43** (3): 447-453.
- Venditti, A.; Bianco, A.; Maggi, F.; Nicoletti, M. 2013. Polar constituents composition of endemic *Sideritis italica* (Mill.) Greuter et Burter from Central Italy. **Natural Product Research** **27** (15): 1408-1412.
- Vlietinck, A.J.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Pieters, L.A. 1997. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human Immunodeficiency virus (HIV) Infection. **Planta Medica** **64**: 97-109.
- Wellsow J.; Grayer, R.J.; Veitch, N.C.; Kokubun, T.; Lelli, R.; Kite, G.C.; Simmonds, M.S.J. 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. **Phytochemistry** **67** (16): 1818-1825.
- Wicha, P.; Tocharus, J.; Nakaew, A.; Pantan, R.; Suksamrarn, A.; Tocharus, C. 2015. Ethyl rosmarinate relaxes rat aorta by an endothelium-independent pathway. **European Journal of Pharmacology** **766**: 9-15.
- WHO, World Health Organization. 2014. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**.
- WHO, World Health Organization. 2010. **Monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)**.
- Yoshikawa, K.; Kokudo, N.; Tanaka, M.; Nakano, T.; Shibata, H.; Aragaki, N.; Higuchi, T.; Hashimoto, T. 2008. Novel abietane diterpenoids and aromatic compounds from *Cladonia rangiferina* and their antimicrobial activity against antibiotics resistant bacteria. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **56** (1): 89-92.
- Zhao, W-H.; Hu, Z-Q.; Hara, Y.; Shimamura, T. 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy** **46** (7): 2266-2268.
- Zhong, J-S.; Li, J.; Li, L.; Conran, J.G.; Li, H-W. 2010. Phylogeny of *Isodon* (Schrad. Ex Benth.) Spach (Lamiaceae) and related genera inferred from nuclear ribosomal ITS, *trnL-trnF* region, and *rps16* intron sequences and morphology. **Systematic Botany** **35** (1): 207-219.
-

## 10. Anexos

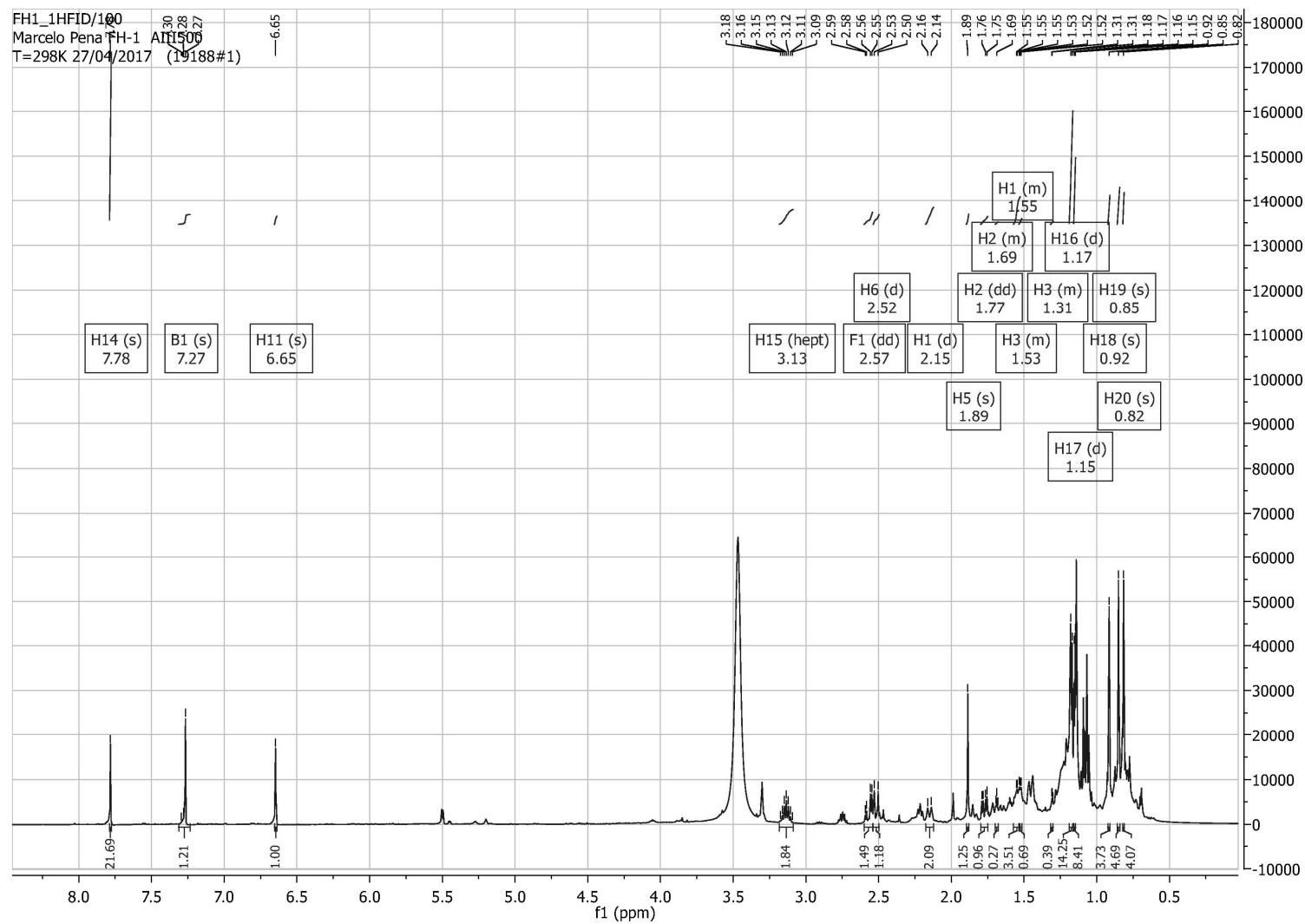


Figura A1: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH19, composto Sugiol (19).

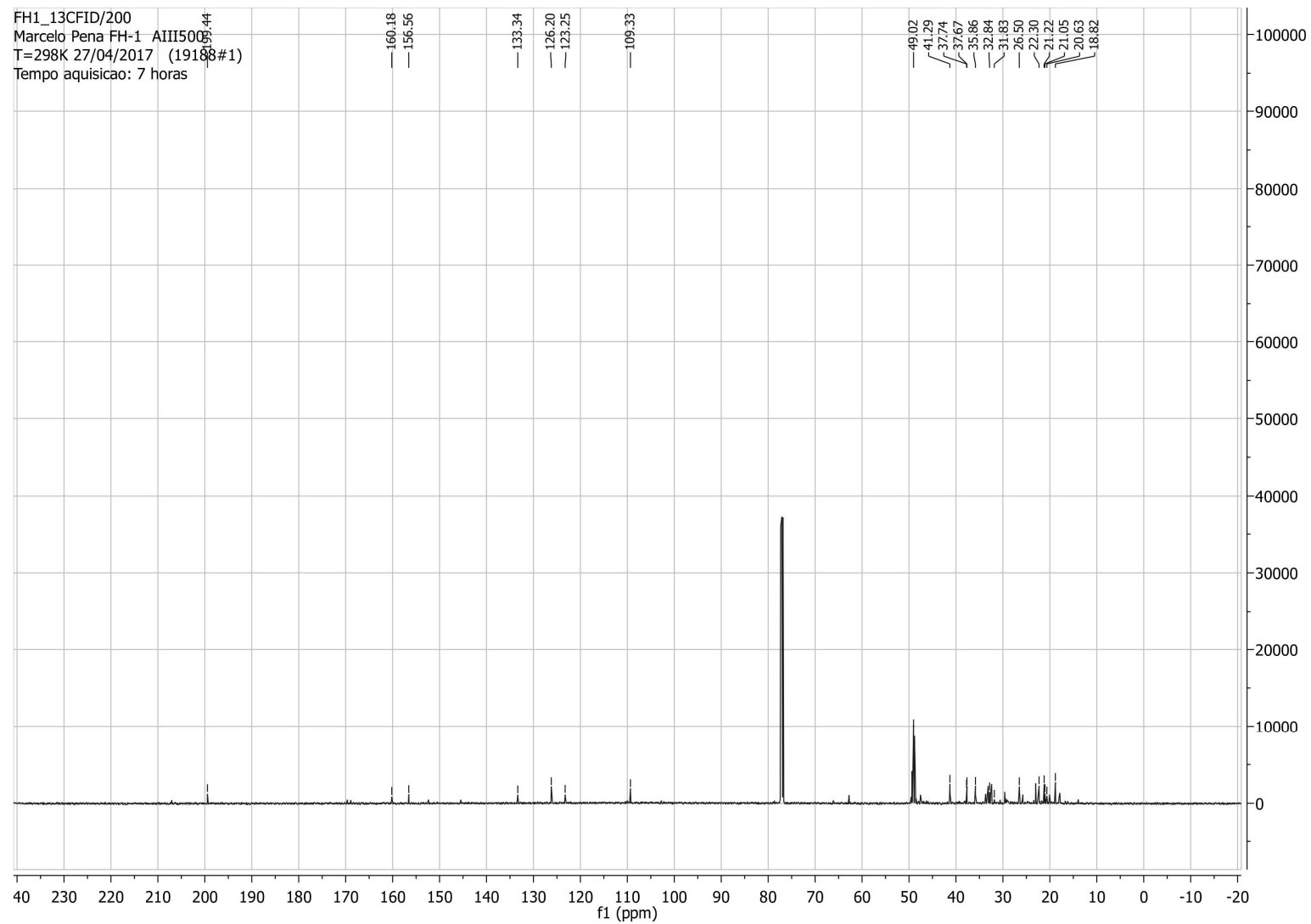


Figura A2: Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta/\text{ppm}$ , 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH19, composto Sugiol (**19**).



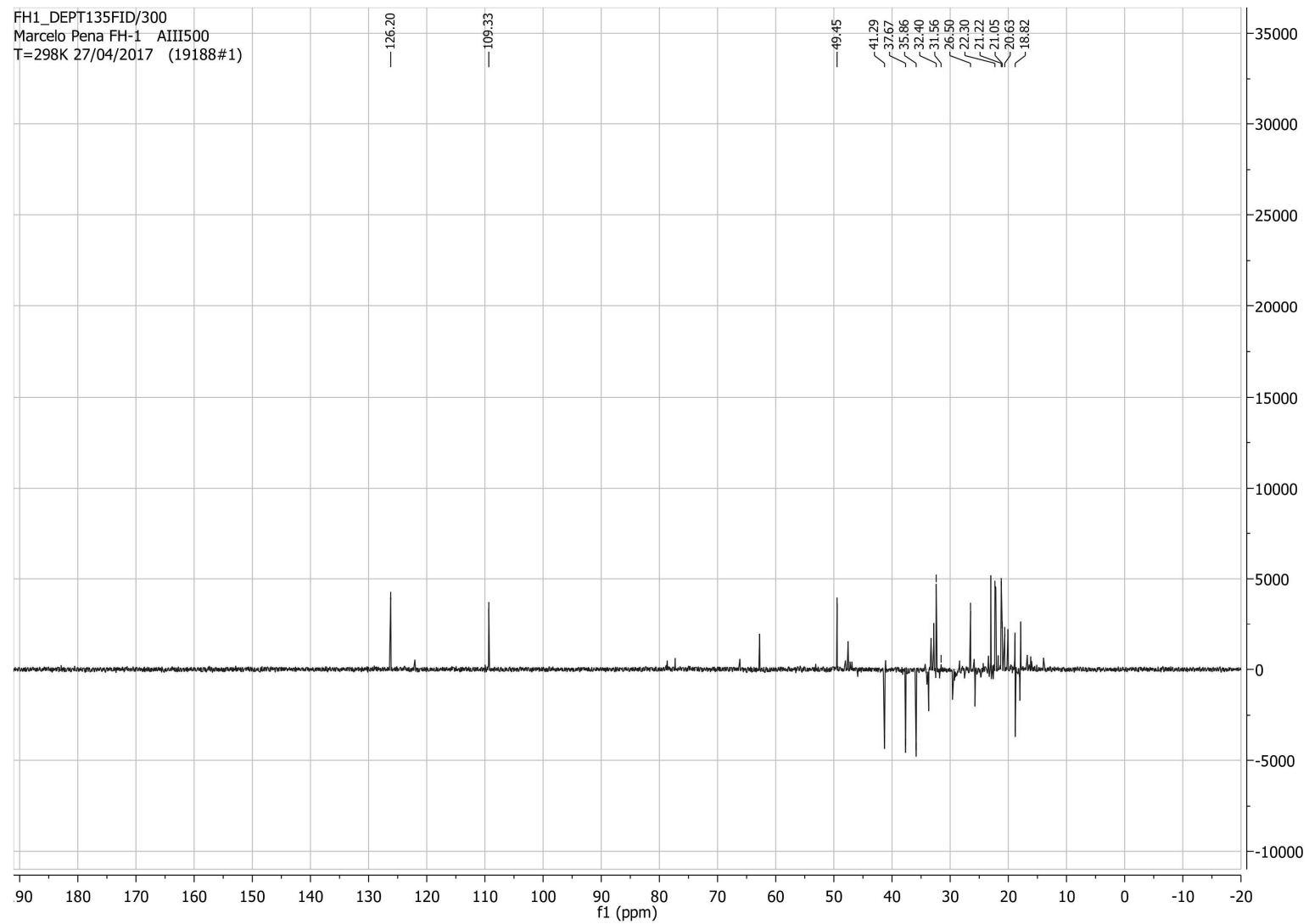


Figura A3: Espectro de RMN DEPT 135 ( $\delta$ /ppm, 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH19, composto Sugiol (**19**).



Figura A4: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH20, composto Horminona (**20**).

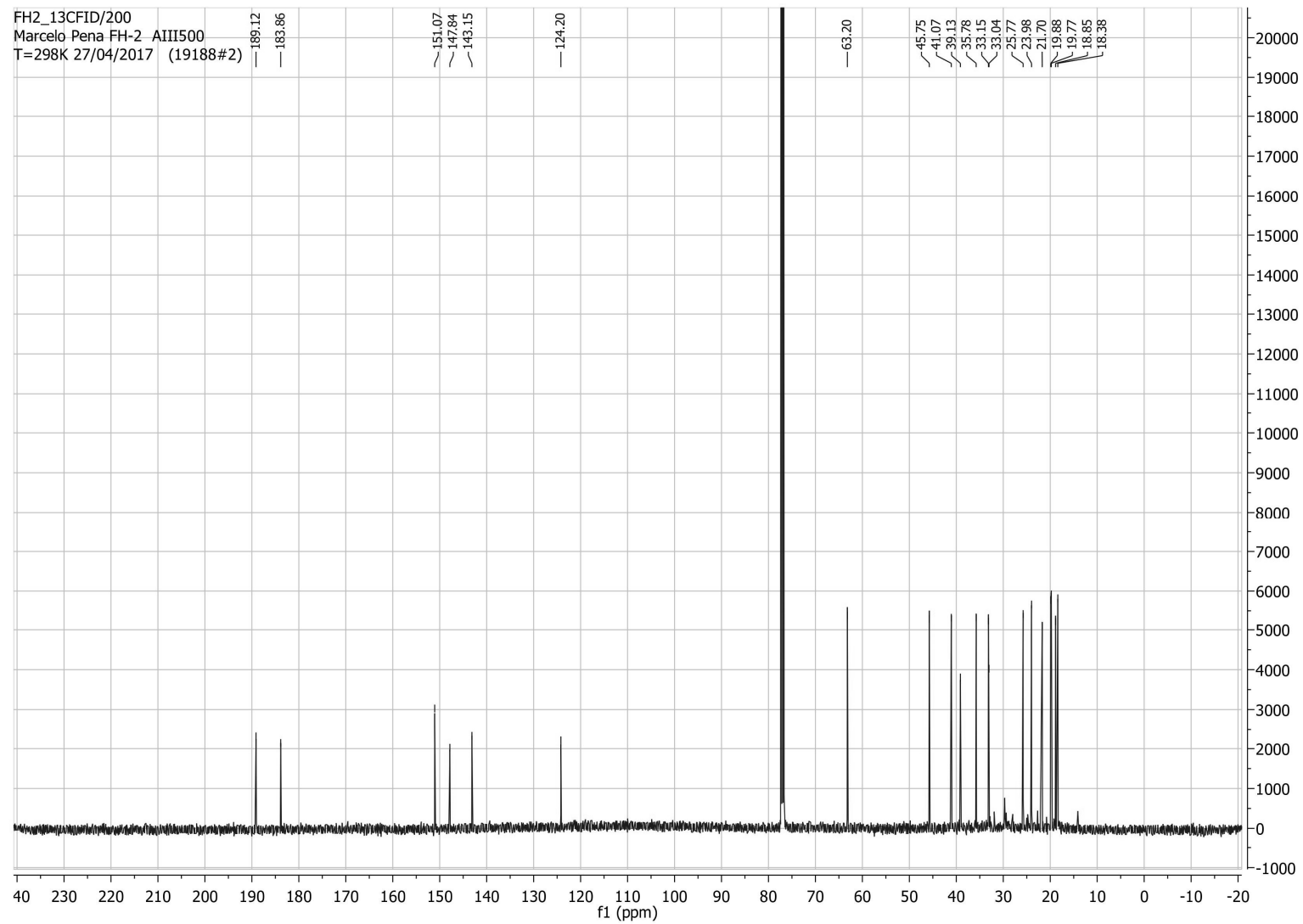


Figura A5: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH20, composto Horminona (**20**).

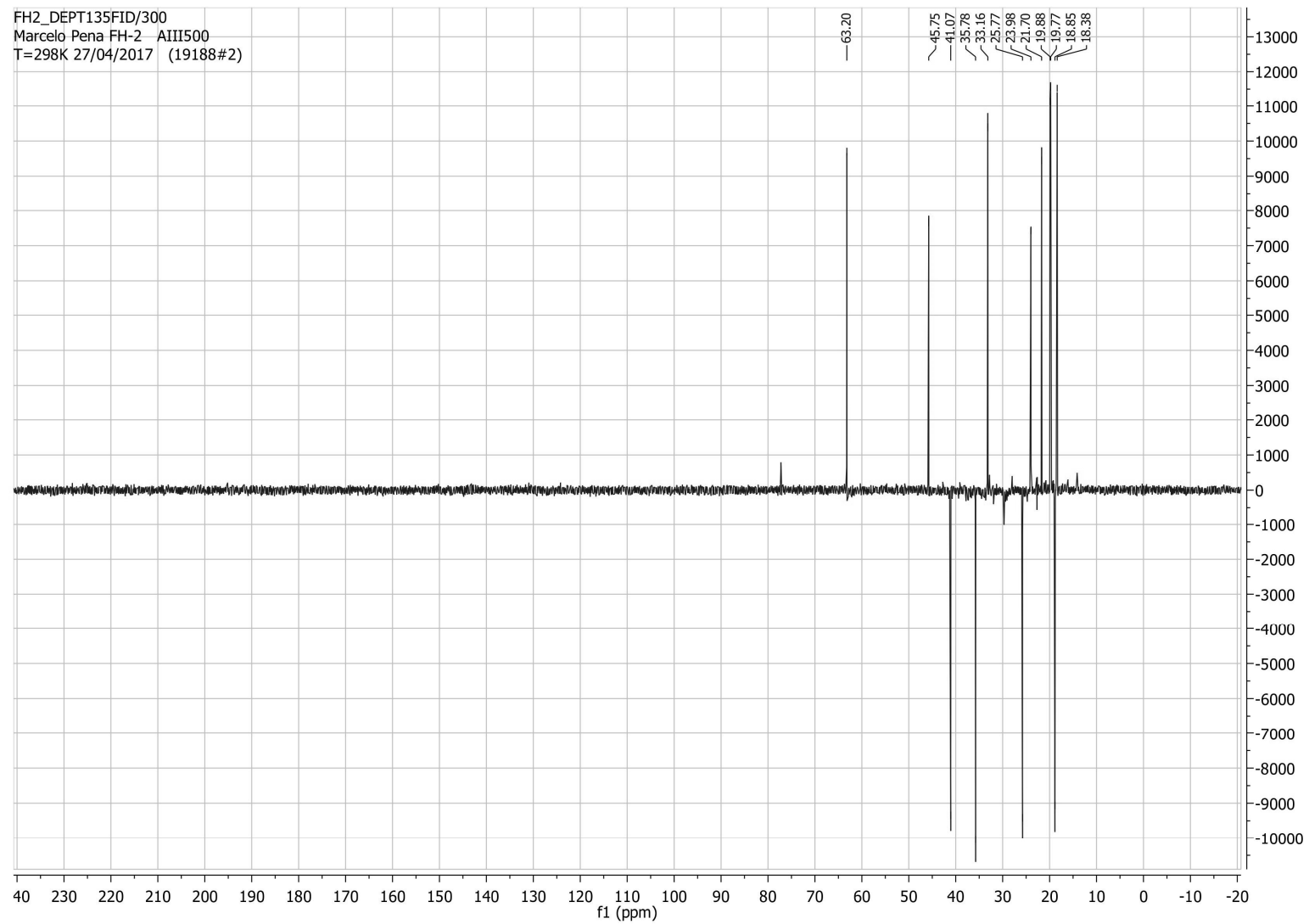


Figura A6: Espectro de RMN DEPT 135 ( $\delta$ /ppm, 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH20, composto Horminona (**20**).

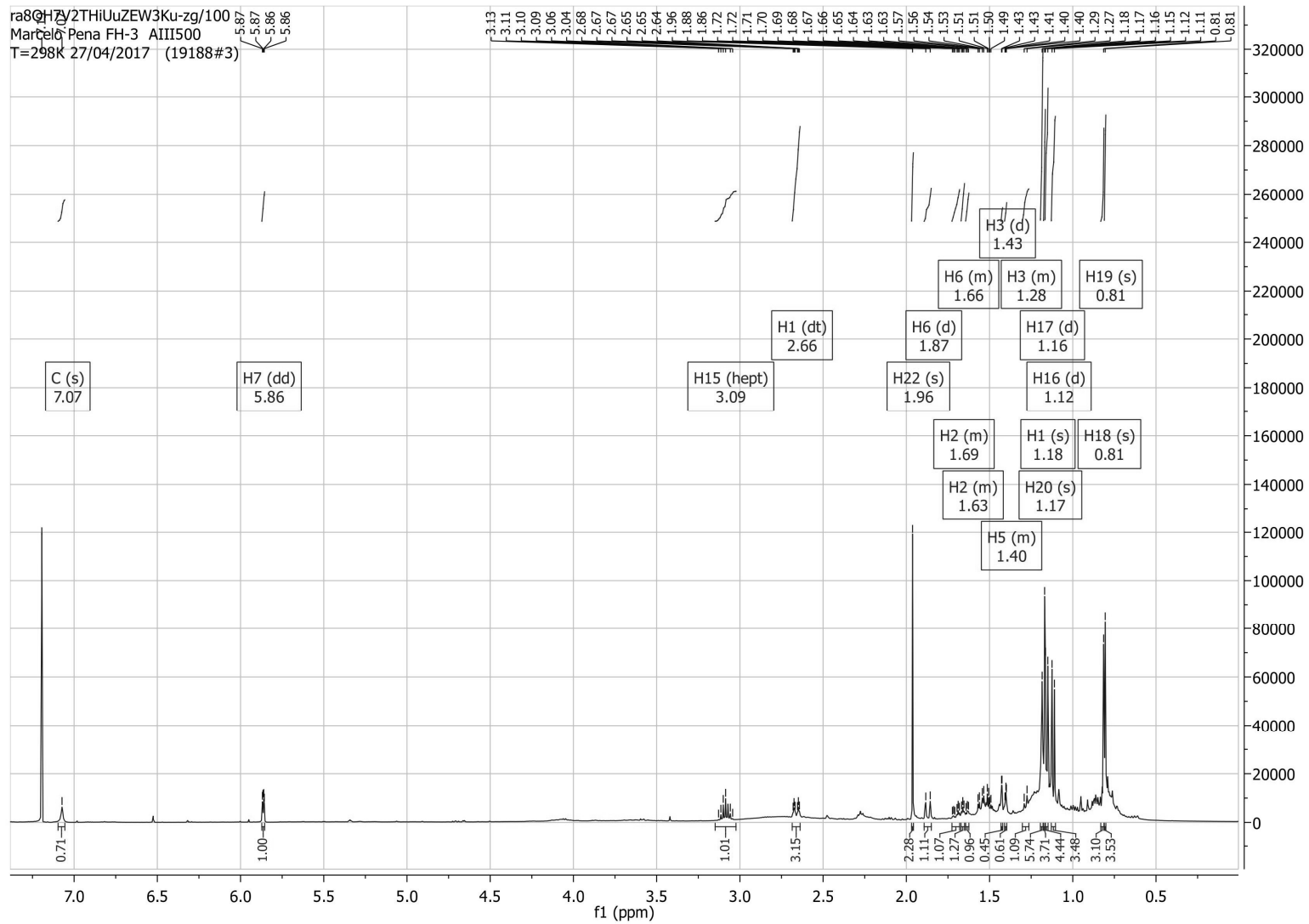


Figura A7: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH22, composto 7-*O*-acetilhorninona (**22**).

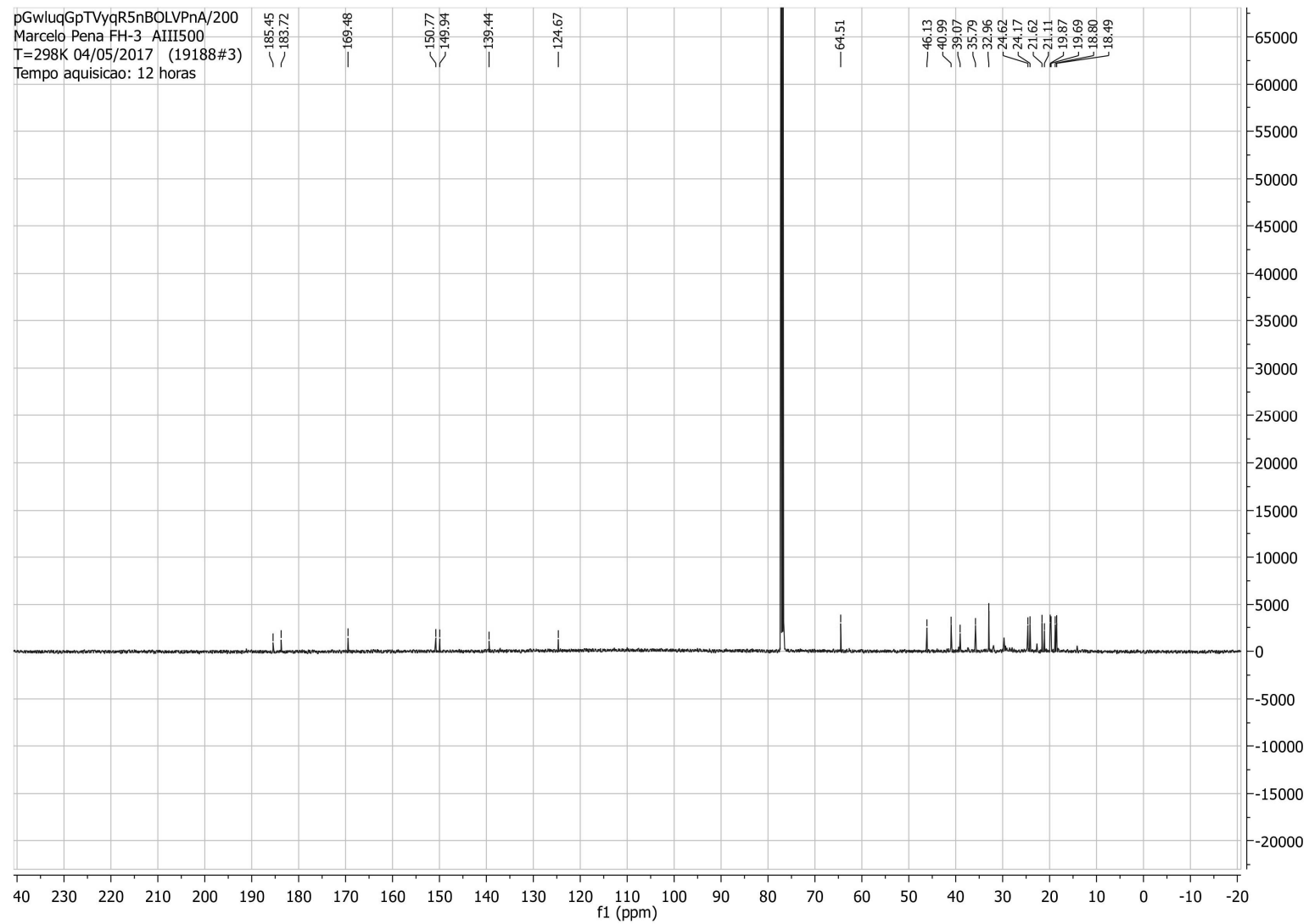


Figura A8: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH22, composto 7-*O*-acetilhorninona (**22**).

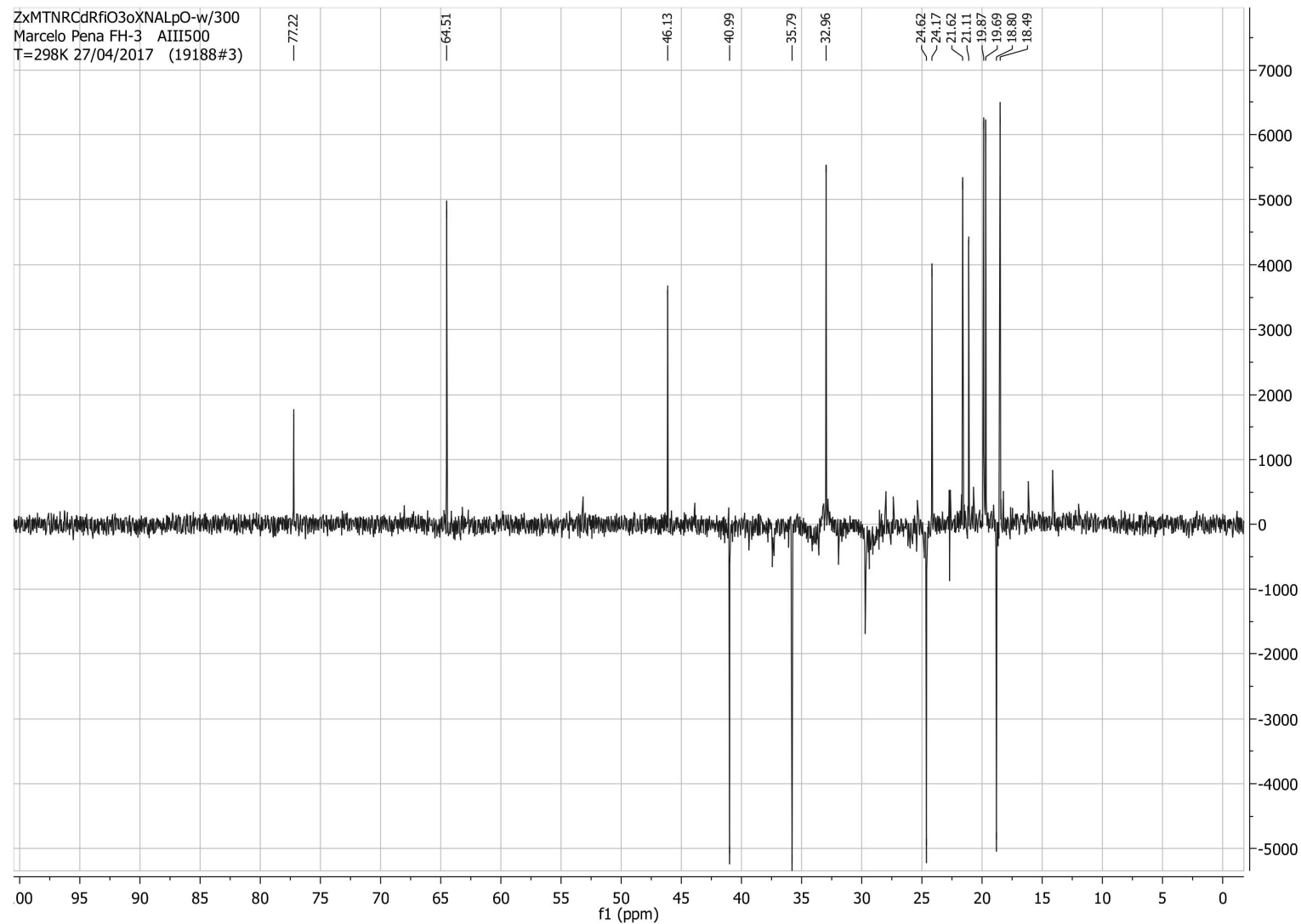


Figura A9: Espectro de RMN DEPT 135 ( $\delta$ /ppm, 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH22, composto 7-*O*-acetilhorninona (**22**).

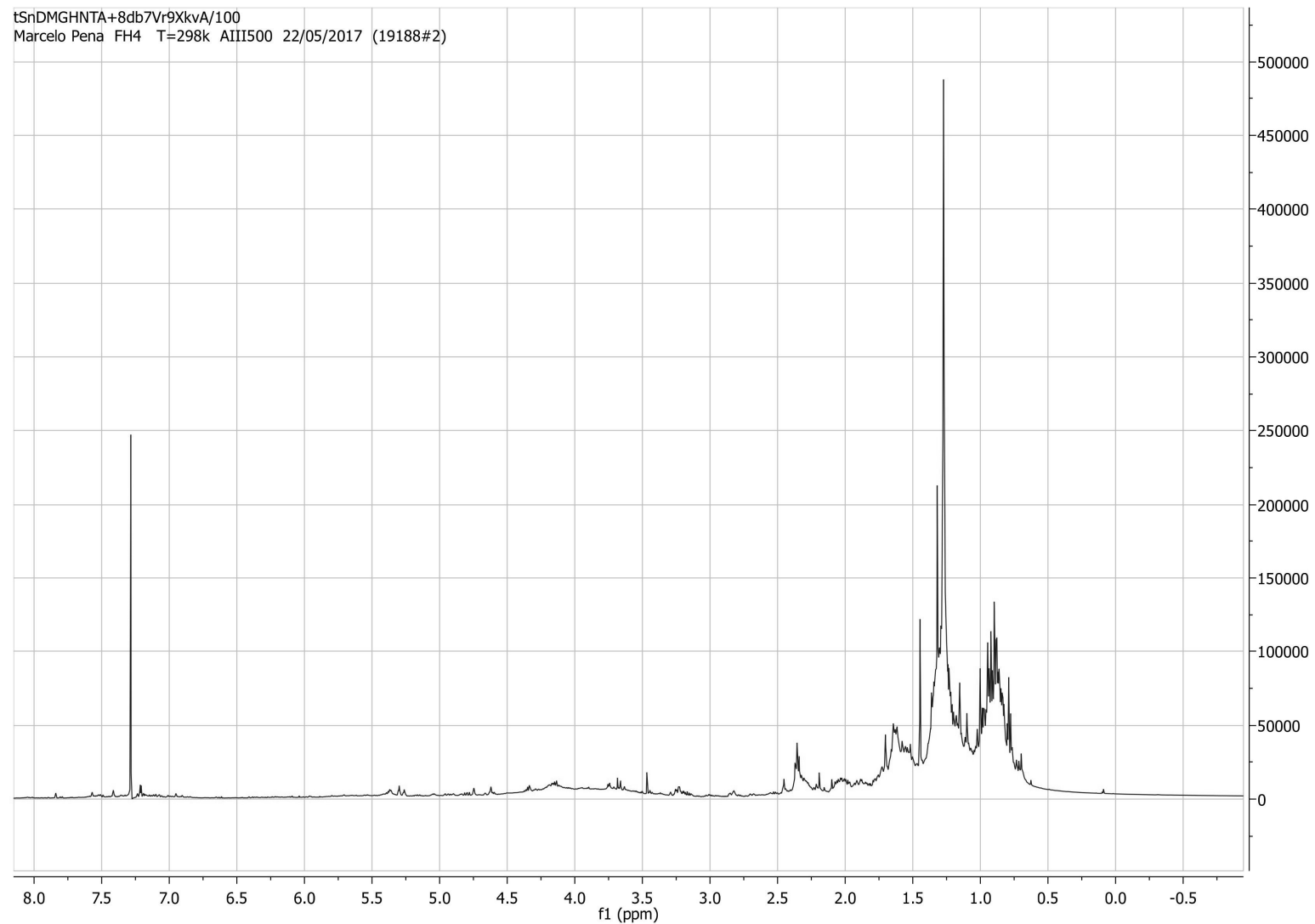


Figura A10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ /ppm, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH23.



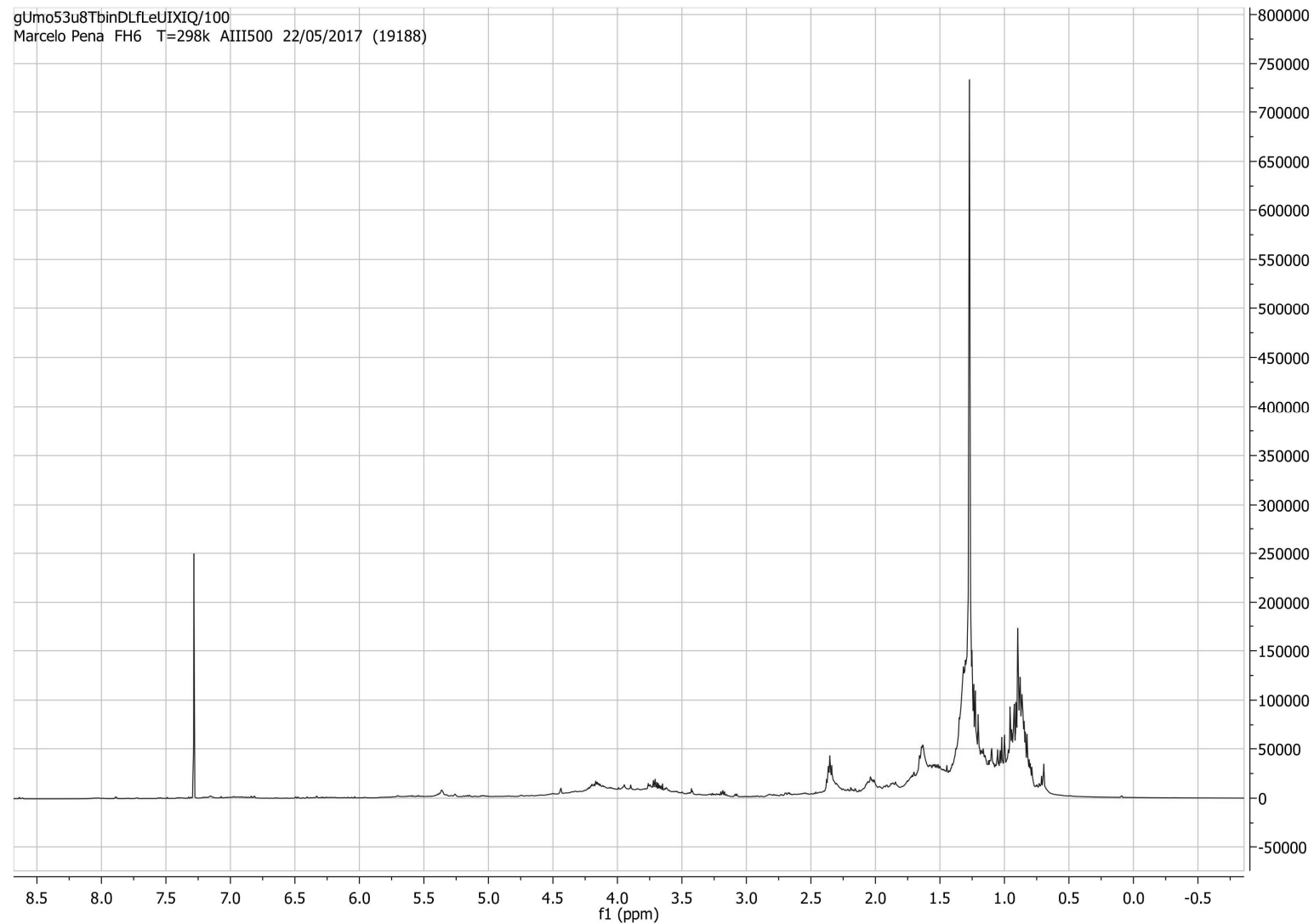


Figura A11: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ /ppm, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH24.

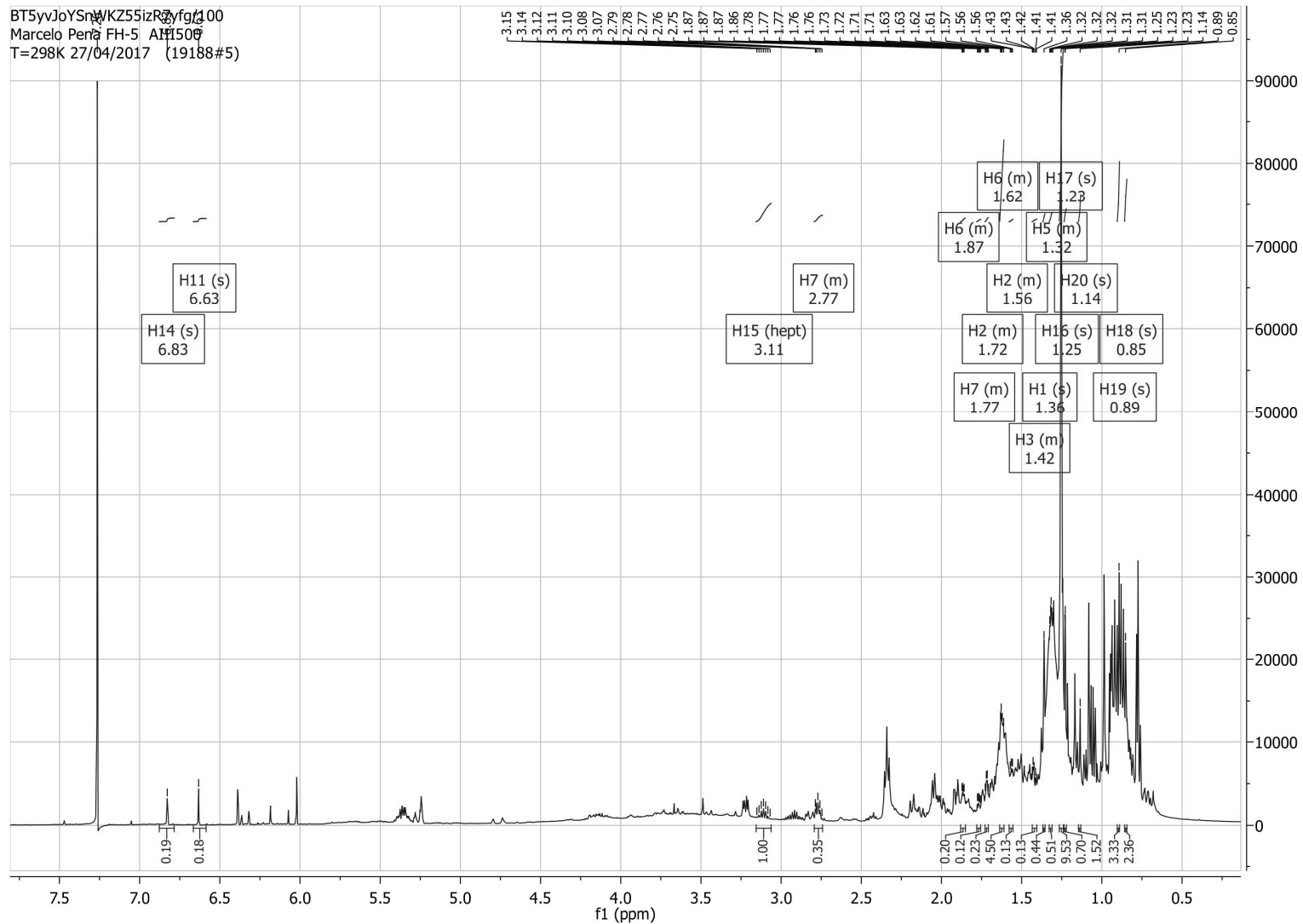


Figura A12: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (δ/ppm, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da fração FH25, composto Ferruginol (**25**).

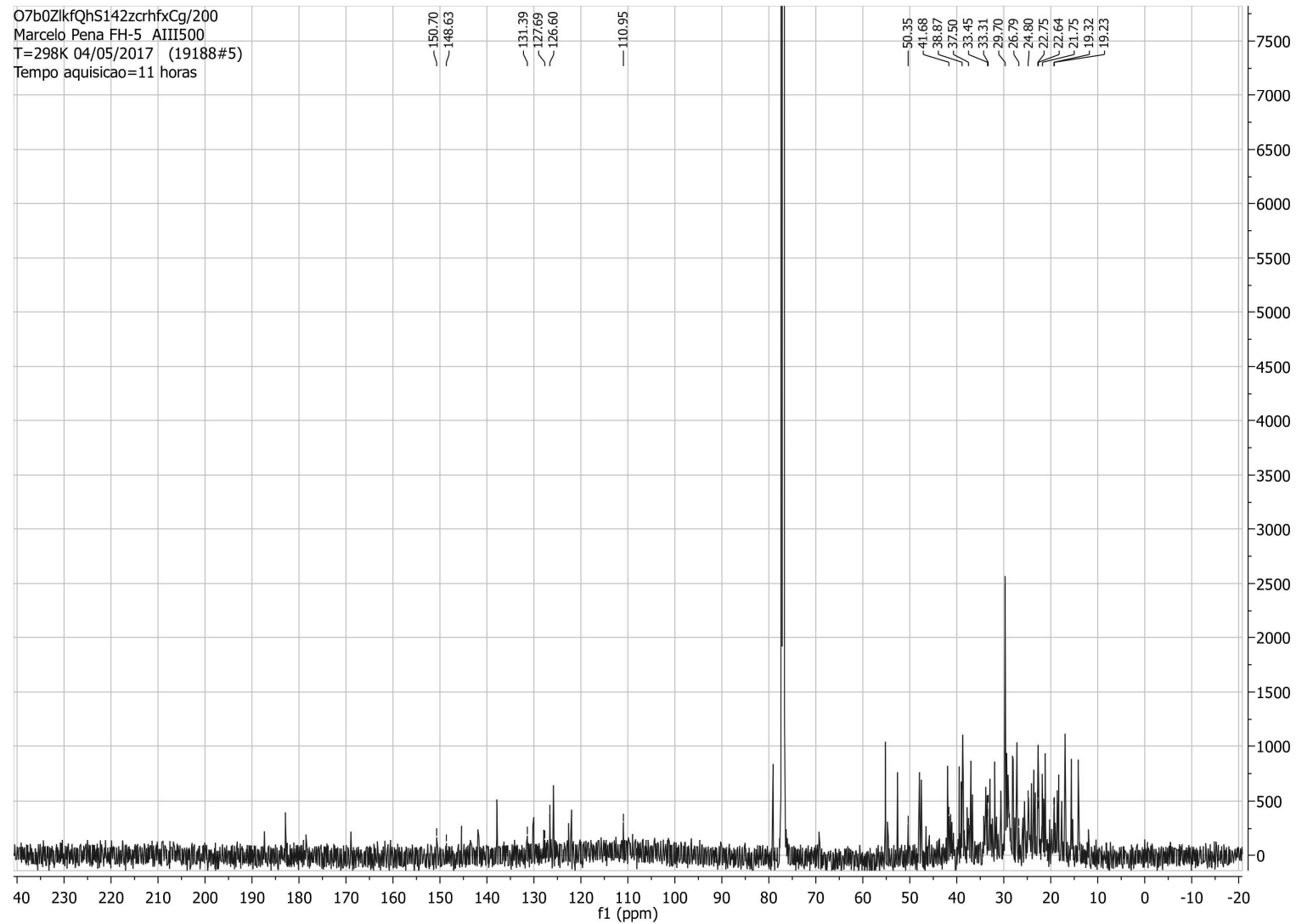


Figura A13: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH25, composto Ferruginol (**25**).

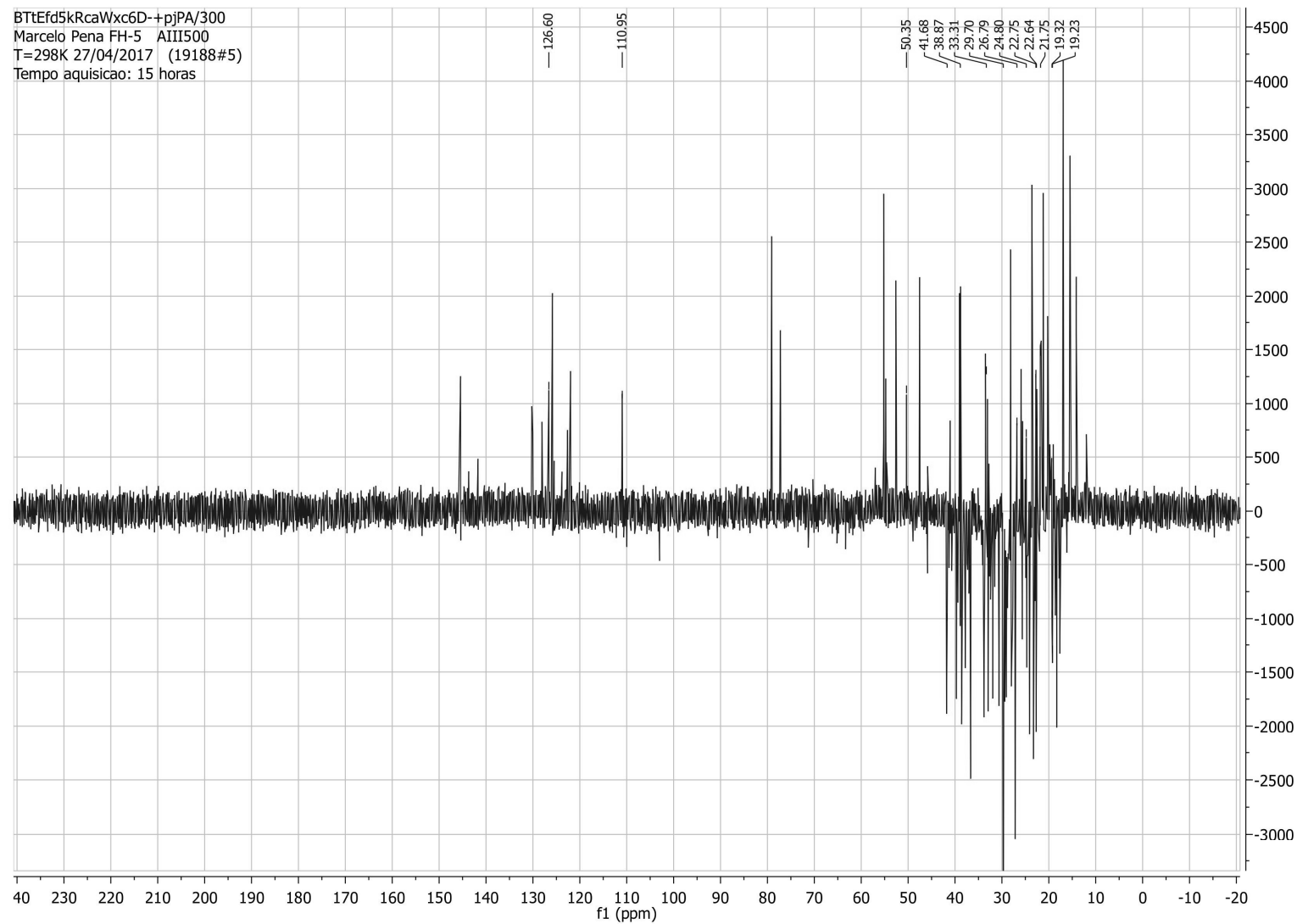


Figura A14: Espectro de RMN DEPT 135 ( $\delta$ /ppm, 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH25, composto Ferruginol (**25**).

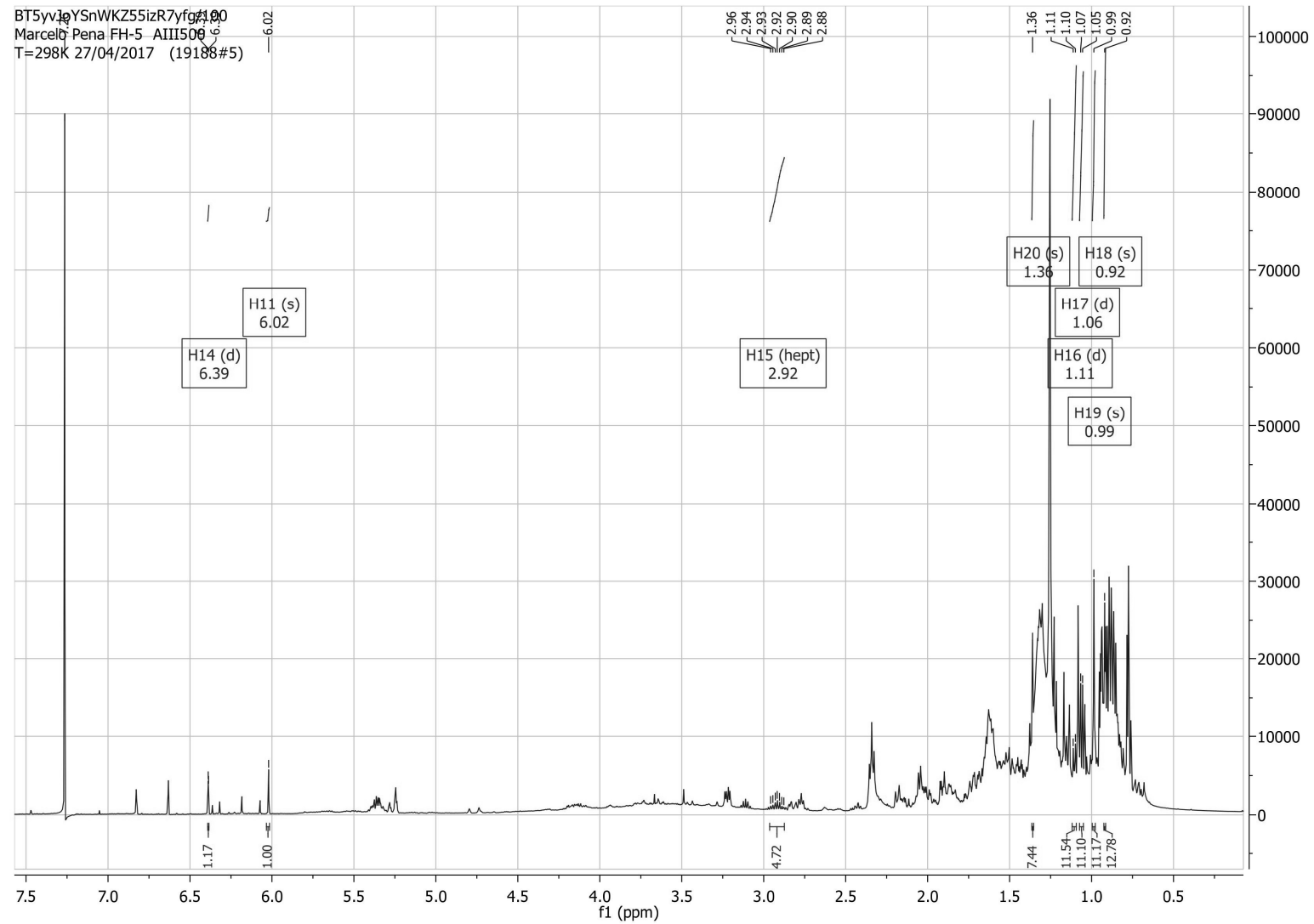


Figura A15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH25, composto 8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one (**26**).

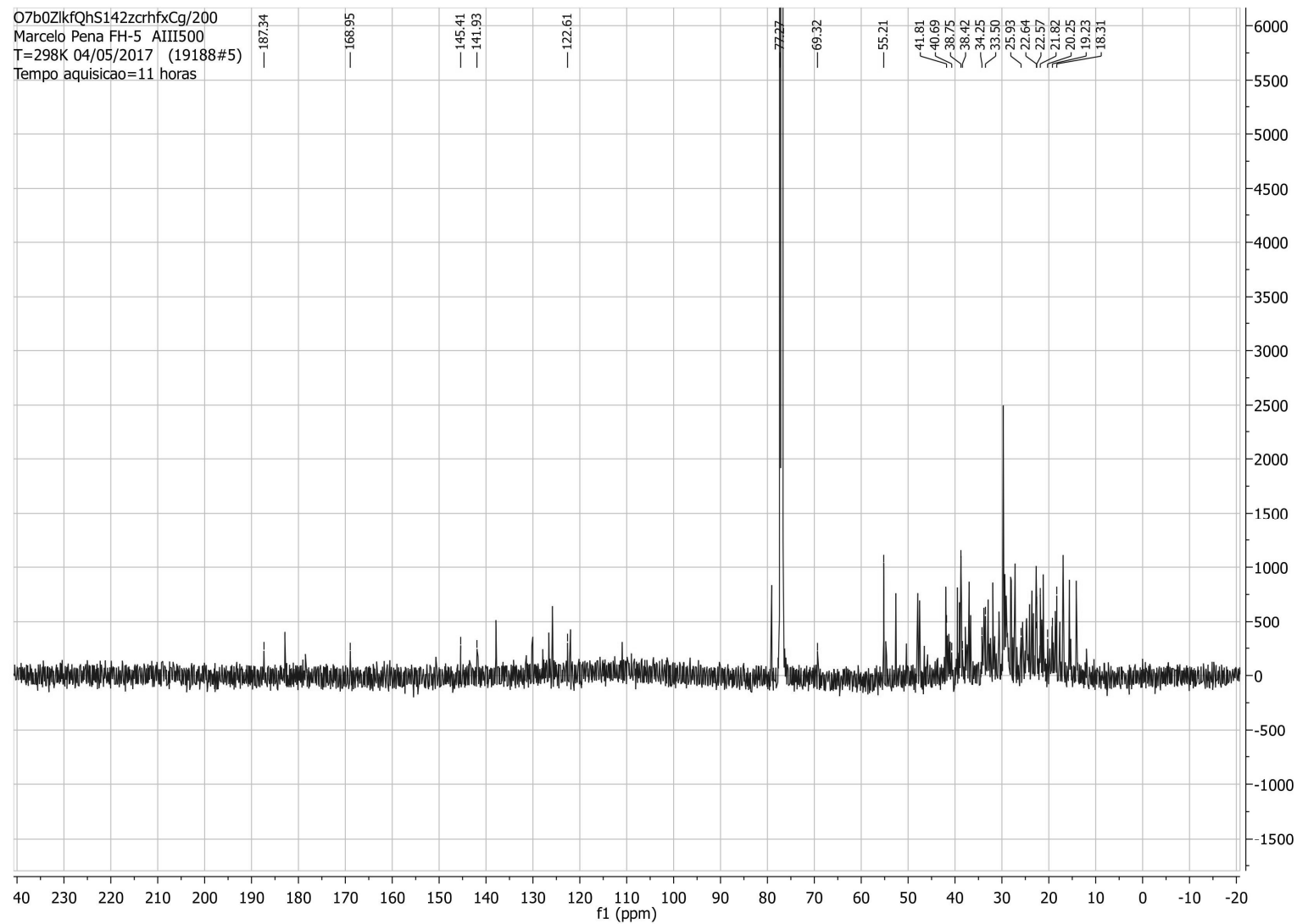


Figura A16: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta/\text{ppm}$ , 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH25, composto 8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one (**26**).

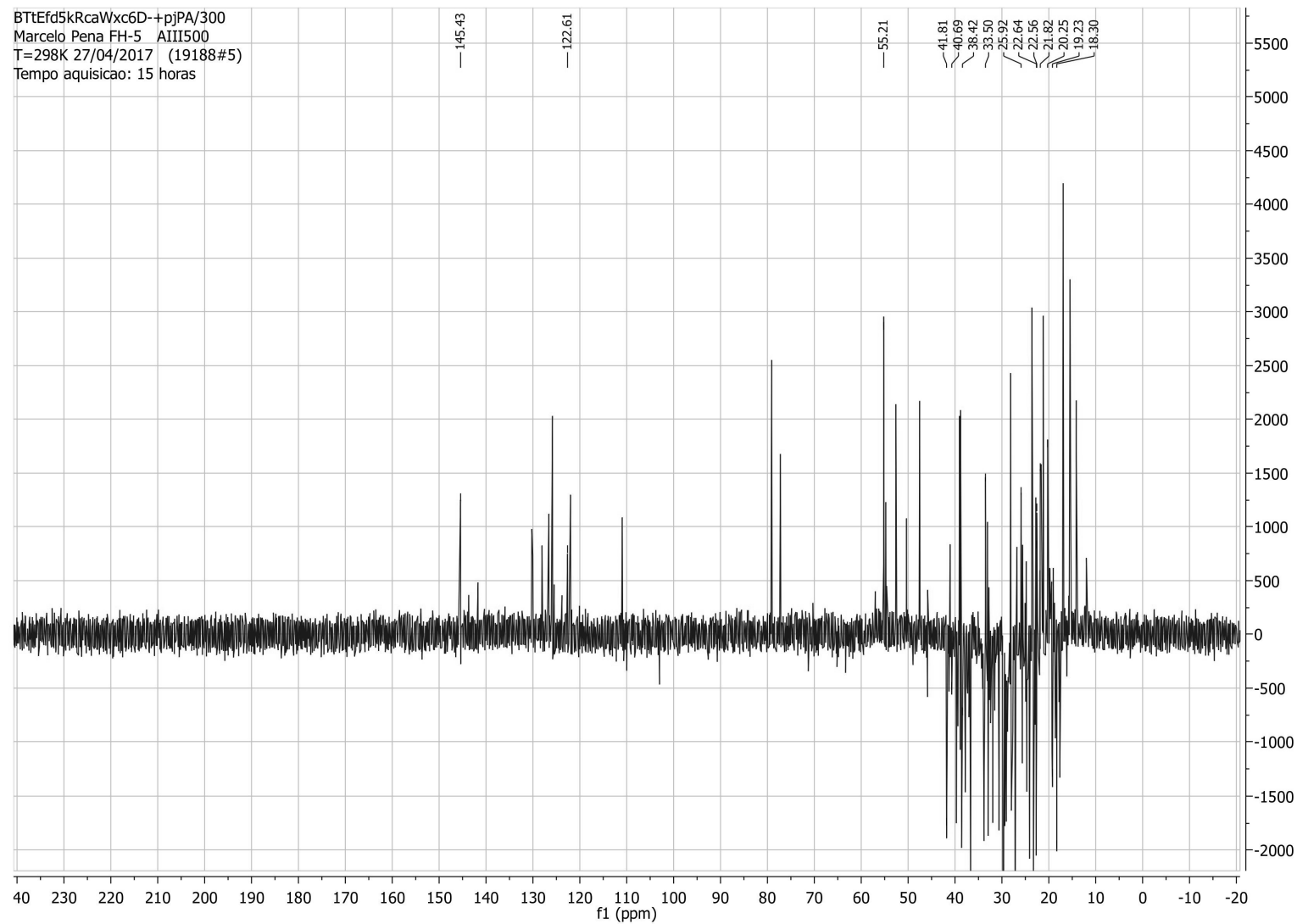


Figura A17: Espectro de RMN DEPT 135 ( $\delta$ /ppm, 126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração FH25, composto 8 $\beta$ -hidroxi-9(11),13-abietadien-12-one (**26**).

Tabela A1: Curvas utilizadas para o doseamento de compostos fenólicos do extrato e das respectivas fases de *Hyptis lacustris*.

Método	Doseamento	Substância referência	( $\mu\text{g}$ )	Equação da reta	R <sup>2</sup>
CLAE-DAD	Derivados de ácido clorogênico	Ácido p-cumárico	0,0045 – 0,45	$y = 25027x - 46,052$	0,9991
	Derivados de ácido cinâmico	Ácido p-cumárico	0,0045 – 0,45	$y = 25027x - 46,052$	0,9991
	Flavonoides	Luteolina	0,0045 – 0,45	$y = 10554x + 62,701$	0,9986

Tabela A2: Curvas utilizadas para o doseamento de substâncias equivalentes aos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante dos extratos e fases de *Hyptis lacustris*.

Ensaio	Substância referência	Quantidade ( $\mu\text{g}$ )	Equação da reta	R <sup>2</sup>
DPPH	Trolox	0,25 – 2,50	$y = -0,3973 + 1,0666$	0,9907
	Quercetina	0,30 – 2,40	$y = -0,3703 + 0,9513$	0,9976
ABTS	Trolox	0,24 – 4,0	$y = -0,6355x + 1,3183$	0,9986
	Quercetina	0,06 – 1,20	$y = -0,3469x + 1,1481$	0,9819
Quelante	Ácido gálico	0,10 – 1,00	$y = -0,4543 + 0,6981$	0,9518
FRAP	Trolox	0,12 – 1,25	$y = 0,855x + 0,0992$	0,9966
	Quercetina	0,06 – 0,60	$y = 1,889x + 0,0885$	0,9963
ORAC	Trolox	0,039 – 0,625	$y = 130,79x - 0,6809$	0,9941



Tabela A3: Curvas utilizadas para o cálculo de EC<sub>50</sub> dos padrões e das fases de *Hyptis lacustris* para os ensaios antioxidantes.

Ensaio	Amostras	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta	R <sup>2</sup>
DPPH	EE	5,68 – 90,90	$y = 1,9486x + 1,7023$	0,9755
	FH	102,27 – 181,82	$y = 0,2964x - 9,4979$	0,9717
	FD	11,36 – 113,64	$y = 0,6604x - 2,0203$	0,9742
	FAE	1,14 – 36,36	$y = 3,6214x - 10,598$	0,9972
	FHM	5,68 – 90,90	$y = 0,8985x + 12,777$	0,9701
	Trolox	1,13 – 10,90	$y = 7,8164x + 3,8718$	0,9985
	Quercetina	1,36 – 11,36	$y = 8,2853x + 3,2567$	0,9907
ABTS	EE	2,08 – 33,33	$y = 5,9745x - 3,9674$	0,9989
	FH	66,67 – 133,33	$y = 0,3419x + 27,699$	0,9834
	FD	8,33 – 83,33	$y = 1,1932x + 1,9403$	0,9859
	FAE	2,08 – 33,33	$y = 11,066x - 7,3442$	0,9982
	FHM	2,08 – 33,33	$y = 2,9297x + 4,7595$	0,9951
	Trolox	0,80 – 13,33	$y = 16,373x - 13,211$	0,9986
	Quercetina	0,20 – 4,00	$y = 9,021x + 0,4838$	0,9819

Ensaio	Amostras	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Quelante	EE	3,91 – 62,50	$y = 0,4064x + 13,021$	0,9926
	FH	7,81 – 93,75	$y = 0,096x + 7,1851$	0,7981
	FD	7,81 – 93,75	$y = 0,1091x + 11,369$	0,8242
	FAE	3,91 – 62,50	$y = 0,8585x + 11,583$	0,9889
	FHM	3,91 – 62,50	$y = 0,3698x + 6,0466$	0,9715
	Ácido gálico	0,625 – 6,25	$y = 9,9113x + 4,8084$	0,9518
FRAP	EE	0,52 – 8,33	$y = 7,7123x + 8,7714$	0,9993
	FH	4,17 – 50,00	$y = 0,9807x + 6,9039$	0,9928
	FD	0,52 – 33,33	$y = 2,2158x + 8,203$	0,9987
	FAE	0,13 – 4,17	$y = 15,775x + 9,2061$	0,9973
	FHM	0,13 – 8,33	$y = 6,9641x + 8,9643$	0,9997
	Trolox	0,40 – 4,17	$y = 22,103x + 8,3866$	0,9954
	Quercetina	0,20 – 2,00	$y = 45,836x + 6,7148$	0,9958
ORAC	EE	0,12 – 1,95	$y = 36,43x - 4,4746$	0,9982
	FH	1,95 – 15,62	$y = 6,3401x + 8,3954$	0,9463
	FD	1,95 – 15,62	$y = 11,693x + 10,109$	0,9231
	FAE	0,12 – 1,95	$y = 47,153x + 11,738$	0,9746
	FHM	1,95 – 15,62	$y = 11,873x + 13,089$	0,9570
	Trolox	0,19 – 3,125	$y = 32,847x - 0,855$	0,9941

Tabela A4: Curvas utilizadas para o cálculo de MIC<sub>50</sub> do extrato, fases e substâncias isoladas obtidas de *Hyptis lacustris* e dos padrões para o ensaio antimicrobiano.

Bactéria	Amostra	Concentração	Equação da reta	R <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	0,39 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 14,367 \ln(x) + 36,104$	0,9631
	Canamicina	12,5 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 61,377 \ln(x) - 195,33$	0,8477
<i>Escherichia coli</i>	FH	125 – 2000 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 16,601 \ln(x) - 53,939$	0,9019
	FD	250 – 2000 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 16,152 \ln(x) - 64,57$	0,9452
	FAE	125 – 2000 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 14,154 \ln(x) - 45,646$	0,9189
	Gentamicina	0,39 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 7,4093 \ln(x) + 56,826$	0,9211
	Canamicina	0,78 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 8,9734 \ln(x) + 44,921$	0,9611
<i>Bacillus subtilis</i>	EE	9,37 – 300 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 45,091 \ln(x) - 154,17$	0,9608
	FH	9,37 – 300 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 10,719 \ln(x) + 26,598$	0,9928
	FD	9,37 – 300 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 31,629 \ln(x) - 90,887$	0,8462
	FAE	250 – 2000 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 32,505 \ln(x) - 175,26$	0,9524
	Sugiol	6,25 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 21,518 \ln(x) - 37,135$	0,9937
	Horminona	3,12 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 20,881 \ln(x) - 19,01$	0,9854
	Gentamicina	1,56 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 12,938 \ln(x) + 18,956$	0,9272
	Canamicina	0,78 – 100 µg mL <sup>-1</sup>	$y = 2,6985 \ln(x) + 19,329$	0,9440

Tabela A5: Curvas utilizadas para o cálculo de MIC<sub>50</sub> da fase Hidrometanólica de *Hyptis lacustris* e do padrão para o ensaio inibidor de transcriptase reversa do HIV-1.

Ensaio	Amostra	Concentração	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Anti-HIV	FHM	41,7 – 333,3 µg mL <sup>-1</sup>	12,653 ln(x) – 18,932	0,8281
	Foscarnet	75 – 6000 ng mL <sup>-1</sup>	Y = 23,163 ln(x) – 94,726	0,9638