

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Salvia lachnostachys*
(LAMIACEAE)

Curitiba

2017

CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Salvia lachnostachys*
(LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

Curitiba

2017

O48c

Oliveira, Crithian Santos
Constituintes químicos e atividade citotóxica de *Salvia lachnostachys*
(Lamiaceae) / Crithian Santos Oliveira. – Curitiba, 2017.
110 f. : il. color ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Maria Élide Alves Stefanello
Bibliografia: p. 106-110.

1. Lamiaceae. 2. *Salvia lachnostachys*. 3. Diterpenos. 4. Triterpenos. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Stefanello, Maria Élide Alves. III. Título.

CDD: 547.7342

TERMO DE APROVAÇÃO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *SALVIA*
LACHNOSTACHYS (LAMIACEAE)**

por

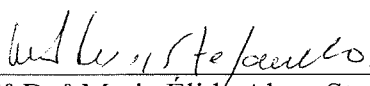
CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de


Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

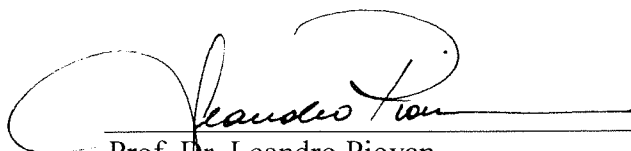
Orientador:



Prof.ª Dr.ª Maria Elida Alves Stefanello
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Yohandra Reyes Torres
Dep. de Química – UNICENTRO



Prof. Dr. Leandro Piovan
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 19 de abril de 2017.

Dedico essa dissertação primeiramente à minha família, em especial à minha mãe Eilice, e aos meus amigos, por todo apoio e suporte durante toda essa jornada, além da minha orientadora Maria Élica pelo exemplo profissional demonstrado todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, principalmente a minha mãe Eilice Amaral, minhas irmãs Kassandra e Alessandra, por todo amor, apoio e incentivo que recebo diariamente.

A Deus, pela vida e pela oportunidade de tudo isso acontecer, estando sempre presente em todos os momentos.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello, pela orientação, dedicação e ensinamentos, um exemplo a seguir de pessoa e profissional.

Aos meus colegas de laboratório. Em especial a Vanessa Winiewski e Magali Amorim. Obrigada pelo companheirismo, por dividirem comigo momentos de angústias e alegrias, além de ajuda no trabalho.

A minha amiga Amanda Queiroz, pelo apoio, amizade e por dividir comigo momentos de ansiedade e angústia. Sempre posta a dar uma palavra amiga e me incentivar a não desistir.

À Dra. Maria Helena Verdan, pela amizade e toda a ajuda desde o início do trabalho, e mesmo depois estando longe sempre disposta a ajudar.

Aos Professores da banca Prof. Dr. Leandro Piovan e Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres pelo aceite e disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao Professor Dr. Andersson Barison pelas sugestões e contribuições no exame de qualificação.

Aos Professores que fizeram parte da minha formação como mestre, Andersson Barison, Francisco de Assis Marques, Beatriz H. L. N. S. Maia, Leandro Piovan, e Bruno J. Gonçalves da Silva.

Ao Professor Dr. Marcos José Salvador do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos ensaios de atividade biológica.

À Profa. Dra. Élide Pereira dos Santos do Departamento de Botânica (UFPR) pela coleta e identificação da espécie de *Salvia lachnostachys*.

Ao centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, pelo auxílio e disponibilidade dos equipamentos.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFPR, pela estrutura e oportunidades.

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura.

À CAPES pela bolsa de estudo e à FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelo apoio financeiro (processo 38394/2014).

A todos que direta e indiretamente auxiliaram para a realização deste trabalho.
Obrigado!

"Não sou obrigado a vencer, mas tenho o dever de ser verdadeiro. Não sou obrigado a ter sucesso, mas tenho o dever de corresponder à luz que tenho."

(Abraham Lincoln)

RESUMO

A família Lamiaceae (200 gêneros e 3000 espécies) está representada no Brasil por 47 gêneros e 518 espécies. *Salvia* é um dos maiores gêneros da família, compreendendo cerca de 1000 espécies, mas no Brasil abrange apenas 60 espécies. *Salvia lachnostachys* Benth é uma espécie endêmica do Brasil, de hábito herbáceo, encontrada principalmente na Mata Atlântica do Sul e Sudeste do país. Um estudo químico preliminar dessa espécie relatou o isolamento de triterpenos, como os ácidos ursólico e oleanólico, e do diterpeno fruticulina A. O extrato etanólico de *S. lachnostachys* apresentou atividade ansiolítica em camundongos e atividade anti-inflamatória. Visando contribuir para o conhecimento químico e biológico desta espécie, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico das folhas de *S. lachnostachys* guiado por ensaios de atividade citotóxica contra linhagens de células humanas. As folhas secas e moídas foram extraídas com solventes (hexano e etanol) e o extrato etanólico foi fracionado através de técnicas cromatográficas. Diversos métodos espectroscópicos como UV-Vis, RMN e EM, foram utilizados para identificação das substâncias isoladas. Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados com extratos brutos, frações e substâncias puras. Foi utilizado o método da sulforrodamina B e várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo glioma, mama, ovário resistente, rim, pulmão, leucemia, cólon (apenas para extratos e frações), ovário (substâncias puras) e próstata (substâncias puras). A linhagem de célula normal de queratinócito foi utilizada em todos os ensaios. O extrato em hexano foi inativo, enquanto que o extrato em etanol apresentou atividade, inibindo o crescimento de todas as linhagens de células avaliadas. A concentração para inibição do crescimento de 50% das células (GI_{50}) variou entre 25,0–44,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato etanólico foi fracionado por cromatografia líquida a vácuo, eluída com hexano, hexano: CH_2Cl_2 1:1, CH_2Cl_2 , acetona e metanol, rendendo cinco frações. Todas as frações foram ativas, sendo a maior atividade detectada na fração eluída com hexano. O estudo fitoquímico das frações eluídas com hexano e hexano: CH_2Cl_2 1:1 levou ao isolamento de 10 substâncias: fruticulina A (**SL1**), isofruticulina A (**SL2**), 7,20-diidrofruticulina A (**SL3**), fruticulina B (**SL4**), 20-hidroxi-fruticulina B (**SL5**), lachnostachyona (**SL6**), ácido oleanólico (**SL7**), ácido ursólico (**SL8**), uvaol (**SL9**) e eritrodiool (**SL10**). As substâncias **SL2**, **SL5** e **SL6** são inéditas. As substâncias **SL1** e **SL2** apresentaram atividade citotóxica semelhante. Ambas inibiram o crescimento das células de todas as linhagens de células testadas, com exceção da linhagem de leucemia, com $GI_{50} = 3,7\text{--}7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. **SL4** apresentou menor atividade, pois não inibiu o crescimento das linhagens de células de ovário resistente a múltiplos fármacos, e inibiu o crescimento das demais linhagens com $GI_{50} = 16,4\text{--}37,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. As outras substâncias isoladas não foram testadas.

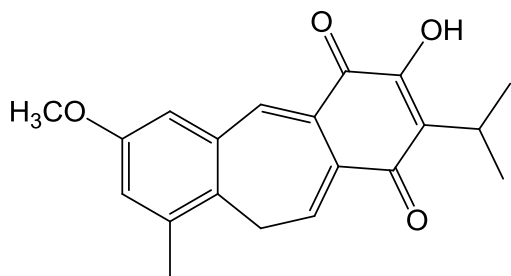
Palavras chaves: Lamiaceae, *Salvia lachnostachys*, diterpenos, triterpenos, atividade citotóxica.

ABSTRACT

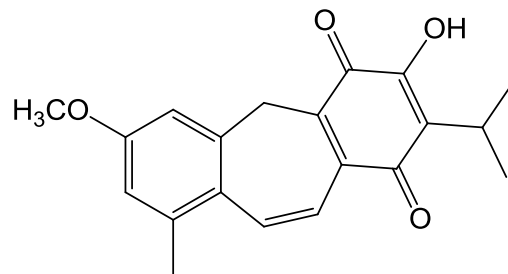
The Lamiaceae family (150 genera and 3000 species) is represented in Brazil by 47 genera and 518 species. *Salvia* is one of the largest genus of the family, comprising about 1000 species, but with only 60 species in Brazil. *Salvia lachnostachys* Benth is an endemic species of Brazil, with herbaceous habit, found mainly in the Atlantic Forest of South and Southeast regions of the country. In previous chemical study triterpenes, such as ursolic and oleanolic acids, and the diterpene fruticuline A were reported from this species. Ethanolic extract of *S. lachnostachys* displayed anxiolytic and anti-inflammatory activities in mice. Aiming to contribute to the chemical and biological knowledge of this species, this work describes the phytochemical study of *S. lachnostachys* leaves guided by cytotoxic assays against human cell lines. Dried and powdered leaves were extracted with solvents (hexane and ethanol), and the ethanolic extract was fractionated by chromatographic techniques. Several spectroscopic methods, such as UV-Vis, NMR and MS were used to identify the isolated compounds. The cytotoxicity of crude extracts, fractions and pure compounds was evaluated. It is used the sulforhodamine B method and a panel of human tumor cell lines, including glioma, breast, ovarian-resistant, kidney, lung, leukemia, colon (extracts and fractions only), ovarian (pure compounds) and prostate (pure compounds) cell lines. Keratinocyte, no cancer cell line, was also used in all assays. The hexane extract was inactive, while the ethanolic extract was active against all tested cell lines. The concentration needed to inhibit 50% of growth (GI_{50}) was 25.0 – 44.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The ethanol extract was fractionated by vacuum liquid chromatography eluted with hexane, hexane: CH_2Cl_2 1:1, CH_2Cl_2 , acetone and methanol, yielding five fractions. All fractions were active, but the most activity was observed in the fraction eluted with hexane. The phytochemical study of fractions eluted with hexane and hexane: CH_2Cl_2 1:1 led to the isolation of 10 compounds: fruticuline A (**SL1**), isofruticuline A (**SL2**), 7,20-dihydrofruticuline A (**SL3**), fruticuline B (**SL4**), 20-hydroxyfruticuline B (**SL5**), lachnostachyone (**SL6**), oleanolic acid (**SL7**), ursolic acid (**SL8**), uvaol (**SL9**) and erythrodiol (**SL10**). Compounds **SL2**, **SL5** and **SL6** are new. Compounds **SL1** and **SL2** showed similar activity. Both inhibited the growth of all tested cell lines, with exception of leukemia cell lines, with $GI_{50} = 3.7\text{--}7.4 \mu\text{mol L}^{-1}$. **SL4** was less active, because it did not inhibit the growth of ovarian-resistant cell lines, and caused growth inhibition of remaining cell lines with $GI_{50} = 16.4\text{--}37.1 \mu\text{mol L}^{-1}$). The other isolated compounds were not tested.

Key words: Lamiaceae, *Salvia lachnostachys*, triterpenes, diterpenes, cytotoxicity activity.

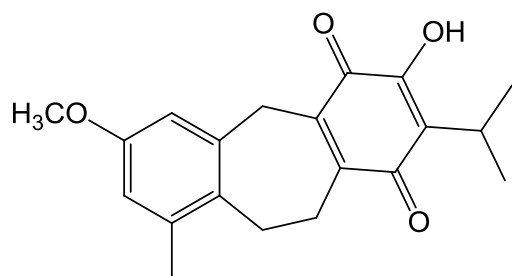
ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



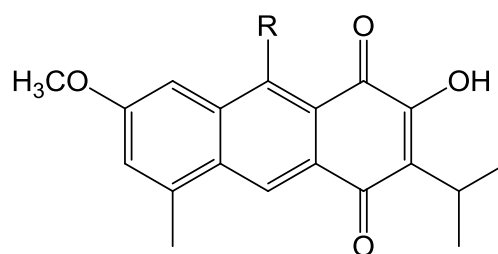
SL1



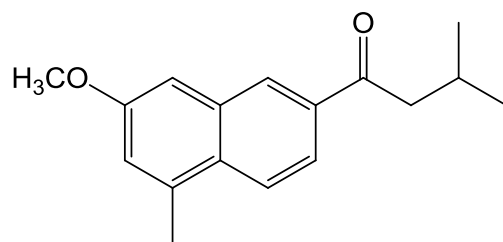
SL2



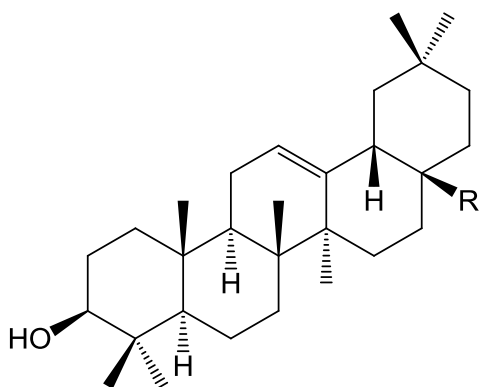
SL3



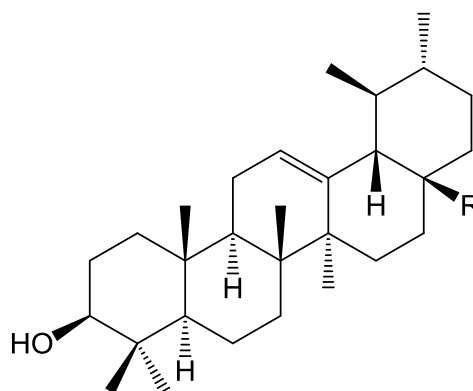
SL4 - R = H
SL5 - R = OH



SL6



SL7 - R = COOH
SL10 - R = CH₂OH



SL8 - R = COOH
SL9 - R = CH₂OH

**OS RESULTADOS PARCIAIS DESSE TRABALHO FORAM DESCRITOS NO
SEGUINTE ARTIGO:**

OLIVEIRA, C. S.; SALVADOR, M.J.; CARVALHO, J.E.; SANTOS, E. P.; BARISSON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Citotoxic abietane-derivate diterpenoids of *Salvia lachnostachys*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 140-143, 2016.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Alguns metabólicos secundários isolados de espécies da família Lamiaceae: mentol (1), timol (2), espatulenol (3), globulol (4), eugenol (5), metilchavicol (6) e ácido rosmarínico (7).	22
FIGURA 2. Esqueletos diterpênicos dos tipos abietano (8a) e clerodano (8b).	23
FIGURA 3. Metabólicos secundários biologicamente ativos isolados de <i>S. officinalis</i>	24
FIGURA 4. Diterpenos salvinatorina A (14) e salvinatorina B (15) de <i>S. divinorum</i>	25
FIGURA 5. Terpenoides isolados de <i>S. corrugata</i>	26
FIGURA 6. Principais metabólicos do óleo essencial de <i>S. borjoensis</i> (26, 27 e 28), <i>S. cordata</i> (26 e 29), <i>S. ovalifolia</i> (28), <i>S. procurrens</i> (28 e 30) e <i>S. melissiflora</i> (31)...	28
FIGURA 7. Constituintes químicos de <i>S. guaranitica</i>	29
FIGURA 8. Diterpenos com esqueleto clerodano isolados de <i>S. splendens</i>	29
FIGURA 9. Fotos de <i>Salvia lachnostachys</i> no campo, detalhe das folhas e flores.	30
FIGURA 10. Cromatograma da purificação da fração LNA18.	36
FIGURA 11. Cromatograma da purificação da fração LNA 20'/12.....	38
FIGURA 12. Espectro UV-Vis (MeOH) da substância SL1	47
FIGURA 13. Espectro de RMN de ^1H de SL1 (CDCl_3 , 400 MHz).	48
FIGURA 14. Espectro de RMN de ^1H de SL1 , com ampliação da região entre 6,9 e 7,0 ppm.....	48
FIGURA 15. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de SL1 (CDCl_3 , 100 MHz).	49
FIGURA 16. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL1 (CDCl_3 , 400 MHz).	49
FIGURA 17. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL1 (CDCl_3 , 400 MHz).	50
FIGURA 18. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL1	50
FIGURA 19. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo de SL2	53
FIGURA 20. Espectro UV-Vis (MeOH) da substância SL2	54
FIGURA 21. Espectro de RMN de ^1H de SL2 (CDCl_3 , 600 MHz).	54
FIGURA 22. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL2 com ampliação da região aromática referente aos hidrogênios H-1 e H-3 (CDCl_3 , 600 MHz).....	55
FIGURA 23. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL2 (CDCl_3 , 600 MHz).	55
FIGURA 24. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL2 (CDCl_3 , 600 MHz).	56
FIGURA 25. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL2	56

FIGURA 26. Espectro de RMN de ^1H de SL3 , com ampliação da região dos grupos metilênicos (CDCl_3 , 400 MHz).....	59
FIGURA 27. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL3 (CDCl_3 , 400 MHz).	59
FIGURA 28. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	60
FIGURA 29. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL3	60
FIGURA 30. Espectro de UV-Vis (MeOH) da substância SL4	63
FIGURA 31. Espectro de RMN de ^1H de SL4 , com ampliação da região aromática (CDCl_3 , 400 MHz).	64
FIGURA 32. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL4 (CDCl_3 , 400 MHz).	64
FIGURA 33. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL4 (CDCl_3 , 400 MHz).....	65
FIGURA 34. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL4	65
FIGURA 35. Espectro de RMN de ^1H de SL5 , com ampliação das regiões aromática e da hidroxila quelada em C-20 (CDCl_3 , 400 MHz).	68
FIGURA 36. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL5 (CDCl_3 , 400 MHz).	68
FIGURA 37. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL5 (CDCl_3 , 400 MHz).....	69
FIGURA 38. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL5	69
FIGURA 39. Espectro de Massas de Alta resolução no modo positivo de SL6	72
FIGURA 40. Espectro UV-Vis da substância SL6 (MeOH).....	72
FIGURA 41. Espectro de RMN de ^1H de SL6 , com ampliação das regiões aromática e alifática (CDCl_3 , 600 MHz).	73
FIGURA 42. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL6 (CDCl_3 , 600 MHz).	73
FIGURA 43. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL6 (CDCl_3 , 600 MHz).....	74
FIGURA 44. Esquema mostrando a possível formação do esqueleto de SL6	74
FIGURA 45. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL6	75
FIGURA 46. Espectro de RMN de ^1H de SL7 (CDCl_3 , 400 MHz).	77
FIGURA 47. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL7 (CDCl_3 , 400 MHz).	77
FIGURA 48. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL7 , com ampliação na região de hidrogênios metilênicos e metínicos (CDCl_3 , 400 MHz).....	78
FIGURA 49. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL7 (CDCl_3 , 400	

MHz).....	78
FIGURA 50. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL7	79
FIGURA 51. Espectro de RMN de ^1H de SL8 (CDCl_3 , 400 MHz).	82
FIGURA 52. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ sobreposto com DEPT-135 de SL8 (CDCl_3 , 100 MHz).	82
FIGURA 53. Ampliação do espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ sobreposto com DEPT-135 de SL8 na região de carbonos metilênicos e metínicos (CDCl_3 , 100 MHz).....	83
FIGURA 54. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL8 (CDCl_3 , 400 MHz).	83
FIGURA 55. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL8 (CDCl_3 , 400 MHz).	84
FIGURA 56. Espectro de RMN de ^1H de SL9 e SL10 (CDCl_3 , 400 MHz).	87
FIGURA 57. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H SL9 e SL10 (CDCl_3 , 400 MHz).....	88
FIGURA 58. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de SL9 e SL10 (CDCl_3 , 400 MHz).	88
FIGURA 59. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL9 e SL10 (CDCl_3 , 400 MHz).	89
FIGURA 60. Ampliação do mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de SL9 e SL10 , na região de hidrogênios alifáticos (CDCl_3 , 400 MHz).	89
FIGURA 61. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de SL9 e SL10 respectivamente.	90
FIGURA 62. Estruturas das substâncias SL1 , SL2 e SL4 que foram avaliadas nos ensaios de atividade citotóxica <i>in vitro</i> contra linhagens de células tumorais humanas.....	95
FIGURA 63. Biossíntese do ácido mevalônico a partir do acetil-SCoA.....	97
FIGURA 64. Formação do difosfato de geranylgeranila (GGPP) a partir do ácido mevalônico.....	99
FIGURA 65. Rota biossintética para a formação do esqueleto abietano a partir do geranylgeranildifosfato (GGPP).	100
FIGURA 66. Possível formação do esqueleto icetaxano a partir do esqueleto abietano.	101
FIGURA 67. Proposta de biogênese das substâncias SL1 , SL2 e SL3 a partir do precursor icetaxeno.	102
FIGURA 68. Proposta de biogênese das substâncias SL4 e SL5 a partir da substância SL1	103
FIGURA 69. Proposta de biogênese da substância SL6 a partir do abietadieno.....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies da família Lamiaceae reconhecidas por seu uso condimentar com seus respectivos nomes populares.	21
TABELA 2. Espécies de <i>Salvia</i> nativas do Brasil.	27
TABELA 3. Rendimento das frações do extrato em etanol (EE).	33
TABELA 4. Fracionamento por cromatografia em coluna da fração do extrato etanólico em hexano (LNA).	35
TABELA 5. Fracionamento por cromatografia em coluna da subfração LNA20s.	38
TABELA 6. Fracionamento por cromatografia em coluna da fração LNB.	40
TABELA 7. Fracionamento por cromatografia em coluna da subfração LNB5.	41
TABELA 8. Frações obtidas da coluna cromatografia da fração LNB6.	41
TABELA 9. Dados de RMN de SL1 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparados com dados da literatura para fruticulina A.	51
TABELA 10. Dados de RMN de SL2 (CDCl ₃ , 600 MHz).	57
TABELA 11. Dados de RMN de SL3 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparados com dados da literatura para a 7,20-diidrofruticulina A.	61
TABELA 12. Dados de RMN de SL4 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparados com dados da literatura para fruticulina B.	66
TABELA 13. Dados de RMN de SL5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	70
TABELA 14. Dados de RMN de SL6 (CDCl ₃ , 600 MHz).	75
TABELA 15. Dados de RMN de SL7 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparados com dados da literatura para o ácido oleanólico.	80
TABELA 16. Dados de RMN de SL8 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparados com dados da literatura para o ácido ursólico.	85
TABELA 17. Dados de RMN de SL9 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparado com dados da literatura para o uvaol.	91
TABELA 18. Dados de RMN de SL10 (CDCl ₃ , 400 MHz) comparado com dados da literatura para o eritrodiool.	92
TABELA 19. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato em etanol de <i>S. lachnostachys</i> e das frações do extrato contra linhagens de células tumorais humanas (GI ₅₀ µg mL ⁻¹).	93
TABELA 20. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> das substâncias SL1 , SL2 e SL4 contra linhagens de células tumorais humanas (GI ₅₀ µmol L ⁻¹).	96

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Procedimento de extração das folhas de <i>Salvia lachnostachys</i>	34
ESQUEMA 2. Procedimento experimental do fracionamento da fração em hexano (LNA).....	37
ESQUEMA 3. Fracionamento da subfração LNA 20.	39
ESQUEMA 4. Fracionamento da fração LNB.....	42

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

786.0	Linhagem de células tumorais de rim
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT-135	Intensificação dos níveis através da transferência de polarização sem efeito de distorção
EE	Extrato em etanol
EH	Extrato em hexano
EM-AR	Espectrometria de massas de alta resolução
GI ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
HaCat	Linhagem de células não tumorais de queratinócito
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i> (correlação nuclear a múltiplas ligações)
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (correlação heteronuclear a uma ligação)
HT-29	Linhagem de células tumorais de colón
K526	Linhagem de células tumorais de leucemia
LNA	Fração em hexano
LNB	Fração em hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1
LNC	Fração em CH ₂ Cl ₂
LND	Fração em acetona
LNE	Fração em MeOH
MCF-7	Linhagem de células tumorais de mama
NCI-ADR/RES	Linhagem de células tumorais de ovário resistente a múltiplos fármacos
NCI-H460	Linhagem de células tumorais de pulmão, tipo não pequenas células
OVCAR-3	Linhagem de células tumorais de ovário
PC-3	Linhagem de células tumorais de próstata
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano

t_R	Tempo de retenção
U251	Linhagem de células de glioma
UACC-62	Linhagem de células de melanoma
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV-Vis	Ultravioleta na região do visível
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
FAMÍLIA LAMIACEAE.....	21
GÊNERO <i>SALVIA</i>	23
OBJETIVOS	31
GERAIS	31
ESPECÍFICOS	31
MATERIAS E MÉTODOS	31
PROCEDIMENTOS GERAIS.....	31
ESTUDO FITOQUÍMICO	32
1.1.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	32
1.1.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	32
1.1.3. ISOLAMENTO DOS METABÓLICOS SECUNDÁRIOS.....	33
ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	43
DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SL1	46
DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA SL2	52
IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SL3	57
IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SL4	62
DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA SL5	66
DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA SL6	70
IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SL7	76
IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SL8	81
IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SL9 E SL10	86
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	93
PROPOSTA DE BIOGÊNESE PARA OS DITERPENÓIDES	96
CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	106

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais (metabólitos secundários) são substâncias específicas de cada reino, família ou gênero, que não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo. Podem ser produzidos em respostas a estímulos externos, como por exemplo, as variações ambientais relacionadas a estações do ano, níveis de umidade, nutrientes, etc (STROHL, 2000). As fontes de metabólitos secundários são plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos (VAISHNAV & DEMAINE, 2010).

As plantas são a principal fonte de produtos naturais. Cada espécie produz um conjunto de metabólitos secundários adequado às demandas particulares do seu nicho ecológico. A diversidade química dos metabólitos secundários reflete as diferenças entre os organismos, com suas particularidades morfológicas e enzimáticas (HARTMANN, 2007). O metabolismo secundário vegetal tem sido uma rica fonte de novas substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se tornaram extremamente importantes na terapia atual (NEWMAN *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2010).

É estimado que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores (McCHESNEY *et al.*, 2007). Apesar de um intenso trabalho nas últimas décadas, apenas 15% destas espécies têm sido sistematicamente investigadas, química e/ou farmacologicamente (NEWMAN *et al.*, 2008).

A investigação química ou estudo fitoquímico é importante para a descoberta de novas moléculas, que possam ser utilizadas diretamente na terapia ou como modelo de novas drogas. Além desse aspecto utilitário, os estudos fitoquímicos contribuem para a compreensão das relações filogenéticas entre os táxons (quimiosistemática) e para documentar a composição química de espécies que podem vir a ser extintas em um futuro próximo.

Apesar dos muitos estudos químicos já realizados, a nossa flora ainda é pouco conhecida e aproveitada. Existe um grande número de espécies que nunca tiveram qualquer estudo químico ou farmacológico. Além disso, era comum no passado, que as pesquisas em fitoquímica e em farmacologia fossem realizadas por grupos isolados. Muitas substâncias foram identificadas sem que houvesse qualquer avaliação farmacológica das mesmas, enquanto muitos estudos farmacológicos foram conduzidos sem o isolamento das substâncias ativas. Assim, com relação ao uso como fitoterápico essas plantas podem ser consideradas como não estudadas.

1. 1. FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae (nome antigo: Labiatae) compreende atualmente cerca de 200 gêneros e 3000 espécies. Existem no mundo seis regiões onde a família Lamiaceae apresenta grande diversidade: região mediterrânea e Ásia Central, sul da África e Madagascar, China, Austrália, América do Norte e México e América do Sul (HARLEY *et al.*, 2004). Na América do Sul, dois gêneros da família se destacam por apresentar grande variedade de espécies, *Salvia* e *Hyptis*. No Brasil a família está representada por 47 gêneros e 518 espécies (SANTOS, 2017).

As principais espécies de Lamiaceae utilizadas no Brasil são amplamente reconhecidas por seu uso condimentar (TABELA 1) e por apresentar atividade biológica, principalmente como antioxidante (LORENZI & MATOS, 2002). A família produz uma variedade de metabólitos secundários, sendo reconhecida principalmente por seus óleos essenciais, que são encontrados em tricomas glandulares na superfície das folhas. Os óleos essenciais de Lamiaceae são constituídos principalmente de monoterpenos como o mentol (1), extraído de espécies de *Mentha* e o timol (2), extraído de espécies de *Thymus*, sesquiterpenos como espatulenol (3) e globulol (4) extraídos de *Hyptidendron* e, fenilpropanoides voláteis como o eugenol (5) e o metilchavicol (6), que são encontrados em espécie de *Ocimum*. Outra característica da família é a produção de diterpenos, de vários tipos, que são encontrados em todos os gêneros. Na família também estão presentes constituintes fenólicos, como o ácido rosmarínico (7) (FIGURA 1) (LORENZI & MATOS, 2002; HARLEY *et al.*, 2004; LEMES *et al.*, 2011).

TABELA 1. Espécies da família Lamiaceae reconhecidas por seu uso condimentar com seus respectivos nomes populares (LORENZI & MATOS, 2002).

Espécie	Nome popular
<i>Hyptis suaveolens</i>	Alfavacão
<i>Melissa officinalis</i>	Cidreira
<i>Mentha arvensis</i>	Hortelã-do-Brasil
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjericão
<i>Ocimum vulgare</i>	Orégano
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim
<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia

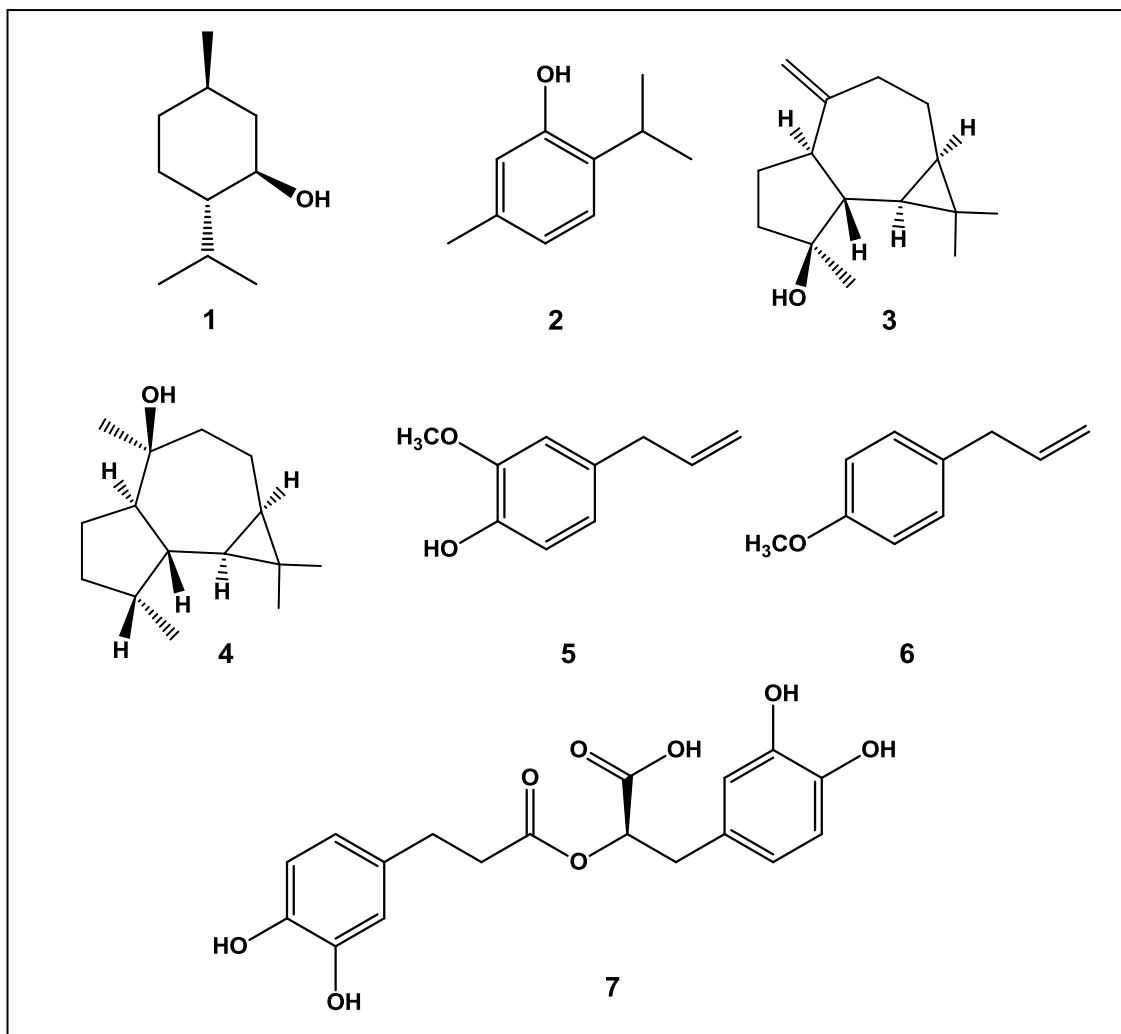


FIGURA 1. Alguns metabólicos secundários isolados de espécies da família Lamiaceae: mentol (1), timol (2), espatulenol (3), globulol (4), eugenol (5), metilchavicol (6) e ácido rosmarínico (7).

As lamiáceas variam desde ervas anuais, bianuais ou perenes, até subarbustos, arbustos ou árvores. Os ramos são em geral retangulares, com folhas simples e opostas e cálice tubuloso (HARLEY *et al.*, 2004).

Vários gêneros contêm espécies usadas na medicina popular, sendo que a família Lamiaceae ocupa o terceiro lugar em ordem de importância etnofarmacológica, com muitas espécies apresentando substâncias biologicamente ativas incluindo espécies de *Salvia* (HARLEY *et al.*, 2004).

1. 2. GÊNERO SALVIA

Salvia é um dos maiores gêneros da família Lamiaceae, compreendendo cerca de 1000 espécies de ervas aromáticas, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Os principais centros de diversidade são o Mediterrâneo, a Ásia Central, o México e os Andes. São reconhecidos quatro subgêneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* e *Calosphace*. Os dois primeiros são encontrados principalmente na Europa, enquanto que *Leonia* está representado na América do Norte e *Calosphace* é exclusivo das Américas Central e do Sul. *Calosphace* é o maior subgênero de *Salvia*, com cerca de 500 espécies (SANTOS, 2017).

Muitas espécies de *Salvia* encontram uso na medicina popular no tratamento de transtornos digestivos (cólicas, diarreias, indigestão, constipação), problemas do aparelho respiratório (gripe, resfriado, tuberculose, infecções), transtornos hepáticos, febre e problemas de pele, como feridas e urticária, sendo que várias espécies apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e anti-inflamatória (KAMATOU *et al.*, 2008, YESILYURT *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2012).

Os principais constituintes químicos do gênero *Salvia* são flavonóides e terpenóides. Estes podem ser voláteis e estarem presentes nos óleos essenciais (monoterpenos e sesquiterpenos) ou fixos, e serem encontrados em extratos (diterpenos, triterpenos, flavonoides e outros compostos fenólicos) (TOPÇU, 2006; CIOFFI *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2012). Diterpenos são amplamente distribuídos, principalmente aqueles com esqueleto abietano (**8a**) e clerodano (**8b**) (FIGURA 2) (KABOUCHE & KABOUCHE, 2008; WU *et al.*, 2012).

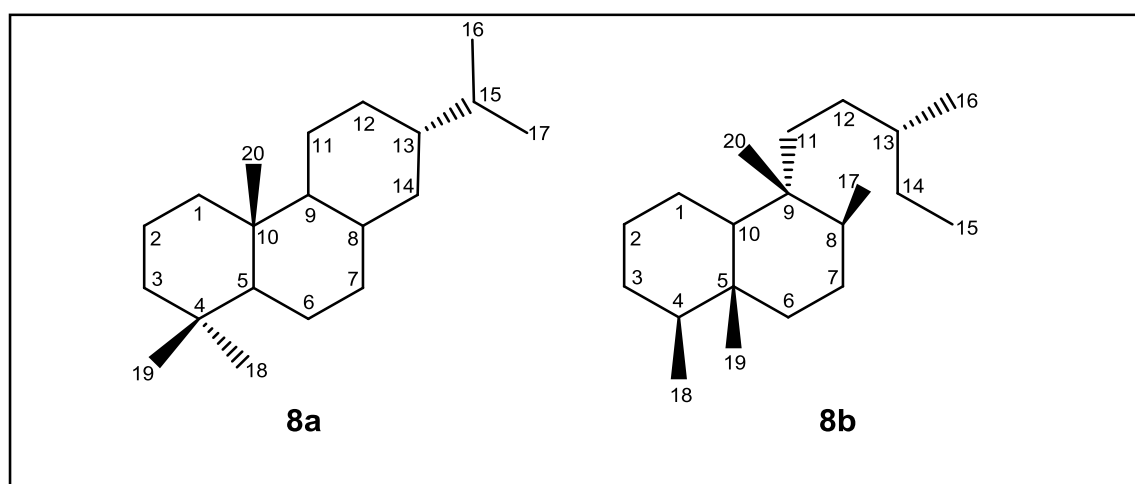


FIGURA 2. Esqueletos diterpênicos dos tipos abietano (**8a**) e clerodano (**8b**).

O grande número de espécies de *Salvia* já estudadas inviabiliza uma revisão bibliográfica completa, de modo que serão descritas apenas algumas espécies, a fim de ilustrar as características do gênero.

S. officinalis é uma espécie que merece destaque, por ser amplamente conhecida como condimento e conservante de alimentos (TABELA 1, p. 20), além de ser utilizada no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias e do sistema nervoso. É uma planta que tem origem na região mediterrânea oriental, porém é cultivada em todo o mundo. Já foi reportada como uma opção para a terapia de perda de memória de ratos diabéticos (FERHAT *et al.*, 2009).

S. officinalis apresenta em sua composição três diterpenos, roioleanone (**9**), horminone (**10**) e 7-O-acetil-herminone (**11**), que são capazes de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* (SLAMENOVA *et al.*, 2004). Foi comprovado ainda que os sesquiterpenos α -humuleno (**12**) e *E*-cariofileno (**13**) (FIGURA 3), também presentes nessa planta, têm capacidade de inibir o crescimento celular de linhagens de células *in vitro* de adenocarcinoma renal (ACHN) e carcinoma de próstata (LNCaP) (LOIZZO *et al.*, 2007; EL HADRI *et al.*, 2010).

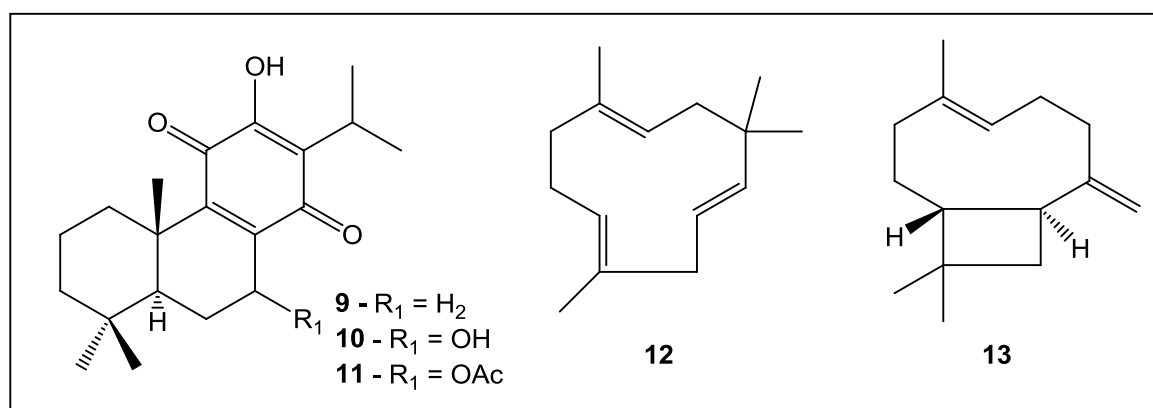


FIGURA 3. Metabólicos secundários biologicamente ativos isolados de *S. officinalis*.

Dentre as espécies nativas da América, destaca-se *S. divinorum*, uma planta proveniente do México, utilizada na medicina popular para o tratamento de diarreia, inflamações abdominais, dor de cabeça e reumatismo. Em sua composição são encontrados os diterpenos, salvinatorina A (96%, **14**) e salvinatorina B (4%, **15**) (FIGURA 4). Salvinatorina A é considerada a mais potente substância psicoativa natural, enquanto que salvinatorina B não apresenta quaisquer efeitos psicoativos, apesar da semelhança estrutural entre ambas. *S. divinorum* também é utilizada em rituais espirituais pelos Xamãs no México. As folhas são queimadas para a preparação do ambiente do ritual e

também são mascaradas durante a cerimônia, causando alucinações nos participantes (HARDING *et al.*, 2005).

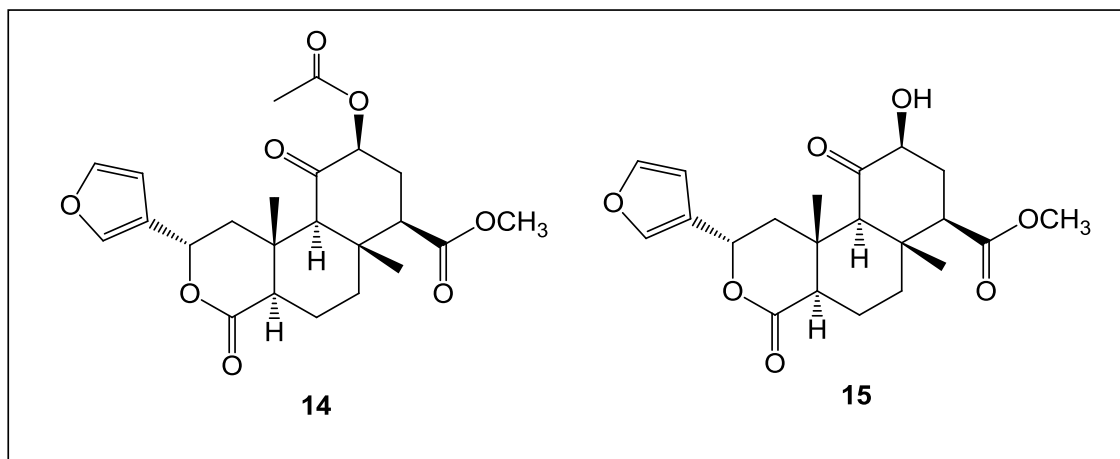


FIGURA 4. Diterpenos salvinorina A (**14**) e salvinorina B (**15**) de *S. divinorum*

Outra espécie americana que tem recebido atenção nos últimos anos é *S. corrugata*, uma planta ornamental que tem sido cultivada na Europa. As folhas acumulam os triterpenos ácido ursólico (**16**) e ácido oleanólico (**17**), além dos diterpenos fruticulina A (**18**) e demetilfruticulina A (**19**), que foram identificados como as substâncias majoritárias do extrato em metanol de suas folhas. Além disso, foram isolados mais seis diterpenos minoritários, 7 α ,19-diacetoxi-roileanona (**20**), 11,12,19-triidroxiabieta-8,11,13-trieno (**21**), conacitona (**22**), diidrofruticulina A (**23**), 7 β -acetoxi-20-hidroxi-19,20-epoxiroileanona (**24**), e 7 β ,20-epoxi-7 β -etoxi-6 β ,20:19,20 diepoxiroileanona (**25**) (FIGURA 5) (BISIO *et al.*, 2008; 2016). As substâncias **20**, **21**, **22** e **24** apresentaram atividade antimicrobiana (BISIO *et al.*, 2008; 2016), enquanto que demetilfruticulina A (**19**) mostrou atividade citotóxica (MONTICONE *et al.*, 2010; GIANNONI *et al.*, 2010; GIACOMELLI *et al.*, 2013).

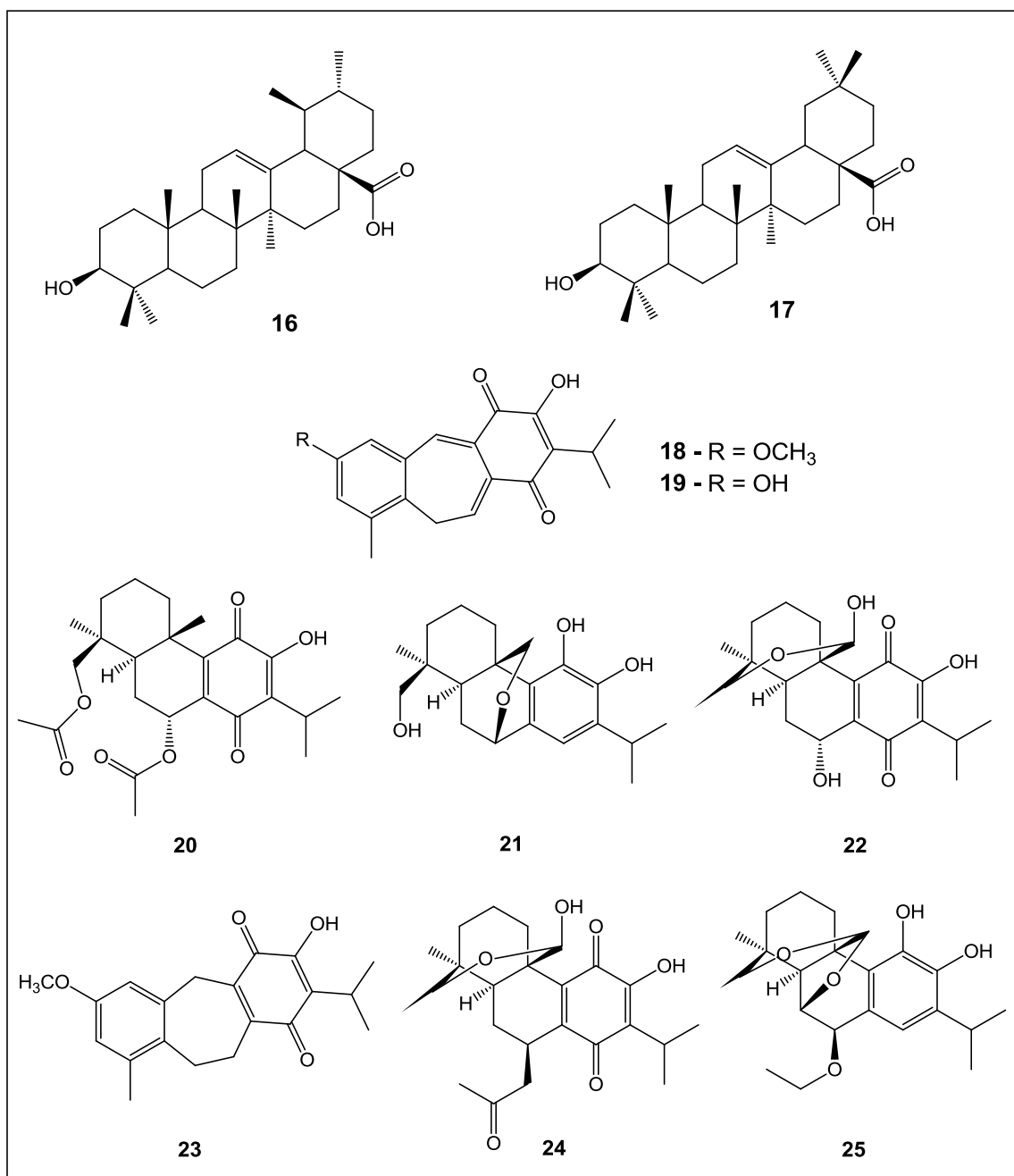


FIGURA 5. Terpenoides isolados de *S. corrugata*.

No Brasil são encontradas 68 espécies de *Salvia*, das quais oito são espécies exóticas: *S. coccinea*, *S. farinacea*, *S. hispanica*, *S. involucrata*, *S. leucantha*, *S. microphylla*, *S. officinalis* e *S. pratensis*. Estas são cultivadas em vários estados brasileiros devido ao seu uso na culinária e na medicina popular (SANTOS, 2017).

O número de espécies nativas do Brasil é relativamente pequeno, compreendendo 60 espécies, distribuídas nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. A maioria é endêmica e poucas tiveram alguma investigação química (TABELA 2)

(SANTOS, 2017). Os estudos químicos com as espécies brasileiras de *Salvia* serão detalhados a seguir.

TABELA 2. Espécies de *Salvia* nativas do Brasil.

Espécie	Espécie	Espécie
<i>S. aliciae</i> ¹	<i>S. espirito-santensis</i> ¹	<i>S. ovalifolia</i> ²
<i>S. altissima</i> ¹	<i>S. expansa</i> ¹	<i>S. pallida</i> ¹
<i>S. arenaria</i> ¹	<i>S. fruticetorum</i> ¹	<i>S. persicifolia</i> ¹
<i>S. articulata</i> ¹	<i>S. grewiifolia</i> ¹	<i>S. procurrens</i> ²
<i>S. balaustina</i> ¹	<i>S. guaranítica</i> ^{1,2}	<i>S. propinqua</i> ¹
<i>S. benthamiana</i> ¹	<i>S. harleyana</i> ¹	<i>S. regnelliana</i> ¹
<i>S. borjoensis</i> ²	<i>S. hatschbachii</i> ¹	<i>S. rivularis</i> ¹
<i>S. brevipes</i> ¹	<i>S. hilarii</i> ¹	<i>S. rosmarinoides</i> ¹
<i>S. calcicola</i> ¹	<i>S. itatiaiensis</i> ¹	<i>S. salicifolia</i> ¹
<i>S. campos-portoi</i> ¹	<i>S. lachnostachys</i> ^{1,2}	<i>S. scabrida</i> ¹
<i>S. cardiophylla</i> ²	<i>S. longibracteolata</i> ¹	<i>S. scoparia</i> ¹
<i>S. cerradicola</i> ¹	<i>S. macrocalyx</i> ¹	<i>S. secunda</i> ¹
<i>S. chapadensis</i> ¹	<i>S. mattogrossensis</i> ¹	<i>S. sellowiana</i> ¹
<i>S. confertiflora</i> ¹	<i>S. melissiflora</i> ^{1,2}	<i>S. splendens</i> ²
<i>S. congestiflora</i> ¹	<i>S. mentiens</i> ¹	<i>S. subrotunda</i> ¹
<i>S. consimilis</i> ¹	<i>S. minarum</i> ¹	<i>S. tenuiflora</i> ¹
<i>S. cordata</i> ^{1,2}	<i>S. neovidensis</i> ¹	<i>S. tomentella</i> ¹
<i>S. curta</i> ¹	<i>S. nervosa</i> ¹	<i>S. uliginosa</i> ²
<i>S. decurrens</i> ¹	<i>S. oligantha</i> ¹	<i>S. víscida</i> ¹
<i>S. diamantina</i> ¹	<i>S. ombrophila</i> ¹	<i>S. xanthotricha</i> ¹

¹ espécie endêmica; ² espécie com algum estudo químico.

Os principais metabólicos do óleo essencial de *Salvia borjoensis* são os sequiterpenos espatulenol (38,2%, **26**) e β -cariofileno (15,5%, **27**), além de nonadecanal (15,9%, **28**). O óleo de *S. cordata* apresenta como constituinte principal o globulol (32,3%, **29**), acompanhado de **26** (11,6%). O óleo essencial de *S. ovalifolia* contém 56,7% de nonadecanal (**28**), enquanto que em *S. procurrens* os componentes majoritários são o ácido hexadecanóico (22,2%, **30**) e nonadecanal (13,2%) (PINTO, 2012). O ácido hexadecanóico (11,3%) também é um dos constituintes principais do óleo de *S. melissiflora*, juntamente com o ácido linoléico (29,3%, **31**) (FIGURA 6) (KASSUYA *et al.*, 2009).

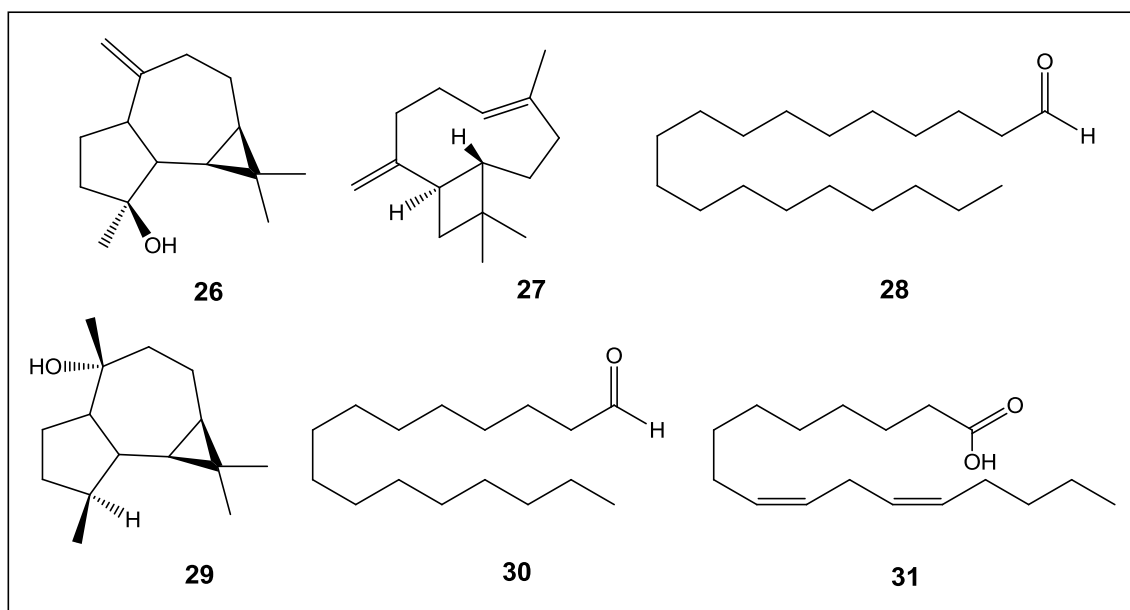


FIGURA 6. Principais metabólicos do óleo essencial de *S. borjoensis* (**26**, **27** e **28**), *S. cordata* (**26** e **29**), *S. ovalifolia* (**28**), *S. procurrens* (**28** e **30**) e *S. melissiflora* (**31**).

S. guaranítica é uma planta brasileira, originária do Paraná, que se tornou cosmopolita. O seu óleo essencial é rico em sesquiterpenos, principalmente β -cariofileno (**27**) (FIGURAS 6) (VALVERDU *et al.*, 2005; CARRER *et al.*, 2007).

A partir de extratos de *S. guaranítica* foram isolados o ácido ursólico (**16**, FIGURA 5), o esteróide sitosterol e seu glucosídeo (**32** e **33**), o cafeato de etila (**34**) e o flavonoide circsiliol (**35**), que apresentou atividade sedativa e hipnótica (FIGURA 7) (MATIDA *et al.*, 1996; MARDER *et al.*, 1996; VIOLA *et al.*, 1997).

S. uliginosa, uma erva perene nativa do Brasil, forneceu três flavonóides glicosilados (**36**, **37** e **38**) a partir de um exemplar cultivado no Japão (FIGURA 7) (VEITCH *et al.*, 1998).

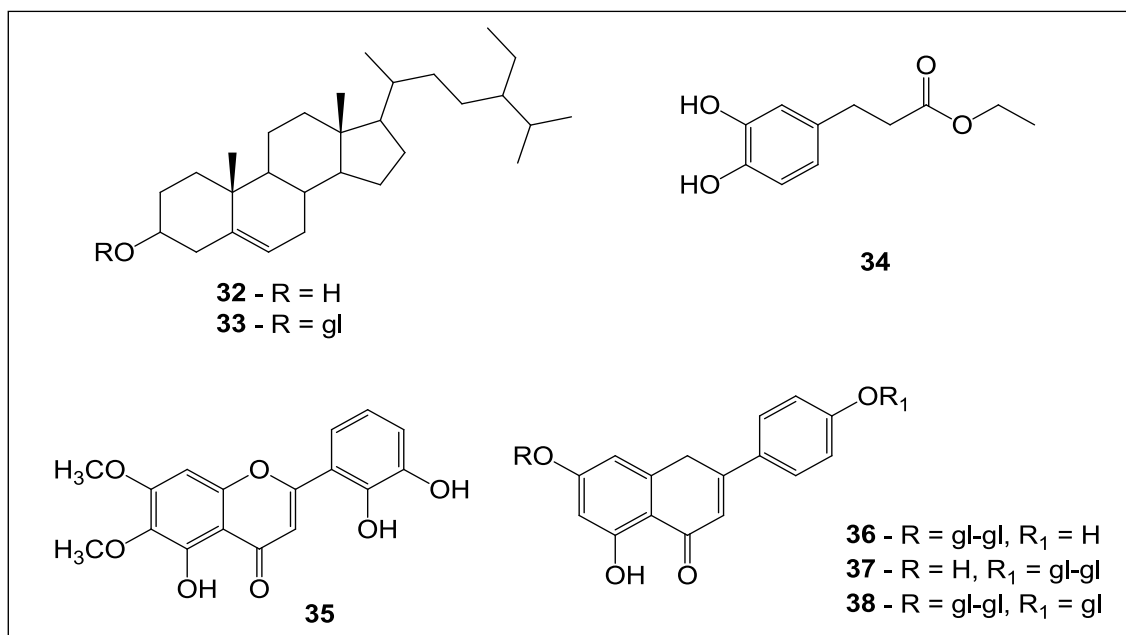


FIGURA 7. Constituintes químicos de *S. guaranitica*.

S. splendens, outra espécie brasileira muito cultivada por suas características ornamentais, forneceu uma série de diterpenos, (**39-43**) com esqueleto clerodano (**7**) (FIGURAS 2 e 8) (HU *et al.*, 1997; FONTANA *et al.*, 2006).

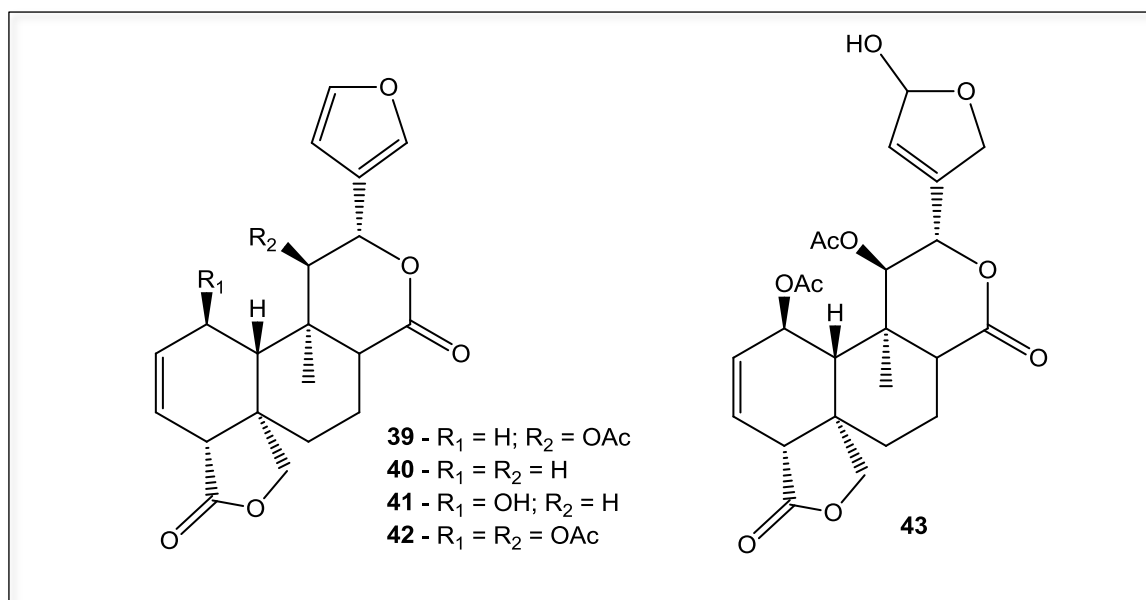


FIGURA 8. Diterpenos com esqueleto clerodano isolados de *S. splendens*.

S. lachnostachys Benth. (FIGURA 9) é uma planta endêmica do Brasil, encontrada na Mata Atlântica do Sul e Sudeste do país. É considerada uma erva ou subarbusto perene, com aproximadamente 40-70 cm de altura. Suas folhas são revestidas de tricomas.

Um estudo fitoquímico anterior dessa espécie relatou o isolamento dos triterpenos ácido ursólico (**16**) e ácido oleanólico (**17**), além do *nor*-diterpeno fruticulina A (**18**) (FIGURA 5) (ERBANO *et al.*, 2012). O extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* e o diterpeno fruticulina A (**18**) apresentaram atividade anti-inflamatória, antihiperalgésica (PICCINELLI *et al.*, 2014), antinociceptiva e antidepressiva (SANTOS *et al.*, 2017).



FIGURA 9. Fotos de *Salvia lachnostachys* no campo, detalhe das folhas e flores.

FONTE: O autor.

A importância medicinal do gênero e a presença de metabólitos secundários, com uma grande diversidade em seus esqueletos, como os terpenoides justificaram uma nova investigação fitoquímica das folhas de *S. lachnostachys*.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Realizar o estudo fitoquímico e biológico da espécie *S. lachnostachys* Benth, visando contribuir para o conhecimento da química das sálvias brasileiras e para a descoberta de substâncias com potencial terapêutico.

2.2. ESPECÍFICOS

Isolar e identificar os principais metabólitos secundários das folhas de *S. lachnostachys*. Realizar ensaios de atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas com os extratos e substâncias isoladas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

Nas separações por cromatografia em coluna (CC), usou-se gel de sílica 60. Para preparar as placas cromatográficas preparativas (CCDP), espalhou-se uma suspensão de gel de sílica 60 PF₂₅₄ em mistura com água destilada numa proporção de 15 g/30 mL, sobre placas de vidro 20x20 cm, usando um espalhador, que forneceu uma espessura de 1,00 mm. Para as análises por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas placas prontas recobertas com gel de sílica na espessura de 0,25 mm. Na revelação destas placas usou-se radiação UV (366 e 254 nm) e, solução a 5% de H₂SO₄ em etanol. Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analíticos.

Para identificação das substâncias isoladas, foi utilizada principalmente a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros foram obtidos em espectrômetros DPX-200, Avance III 400 e/ou Avance III 600 (Bruker), operando 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla (T), respectivamente, e observado a 200, 400 ou 600 MHz para ¹H e 50, 100 ou 150 MHz para ¹³C, usando-se técnicas uni e bidimensionais (HSQC e HMBC). O solvente utilizado para as análises foi CDCl₃ e, TMS como referência interna. Os espectros foram obtidos no Centro de RMN da UFPR. Os dados obtidos foram comparados com aqueles publicados na literatura. Os espectros de massas de alta resolução (EM) foram obtidos no laboratório Thompson (UNICAMP) em um espectrômetro LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific), com ionização por “spray” de

elétrons. Os espectros no UV-vis foram obtidos no departamento de Química da UFPR em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC, utilizando MeOH como solvente. As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida Waters composto por bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower software. Foi utilizada uma coluna semi-preparativa, Phenomenex Nucleosil 100A C18, com injeções a partir de 25 µL, com diâmetro de partícula de 5 µm e tamanho 250x10 mm. Os solventes orgânicos utilizados foram metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC. Estes foram filtrados em membrana de náilon 0,45 µm (Millipore) e degaseificados por 30 min em banho de ultrassom antes de serem usados. As substâncias puras foram coletadas manualmente, e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo.

3.2. ESTUDO FITOQUÍMICO

3.2.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *S. lachnostachys* Benth foram coletadas em Curitiba/Paraná em maio de 2010. A planta foi identificada pela Dra. Élide Pereira dos Santos (Departamento de Botânica, UFPR). Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Paraná (E. P. Santos 1251).

3.2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

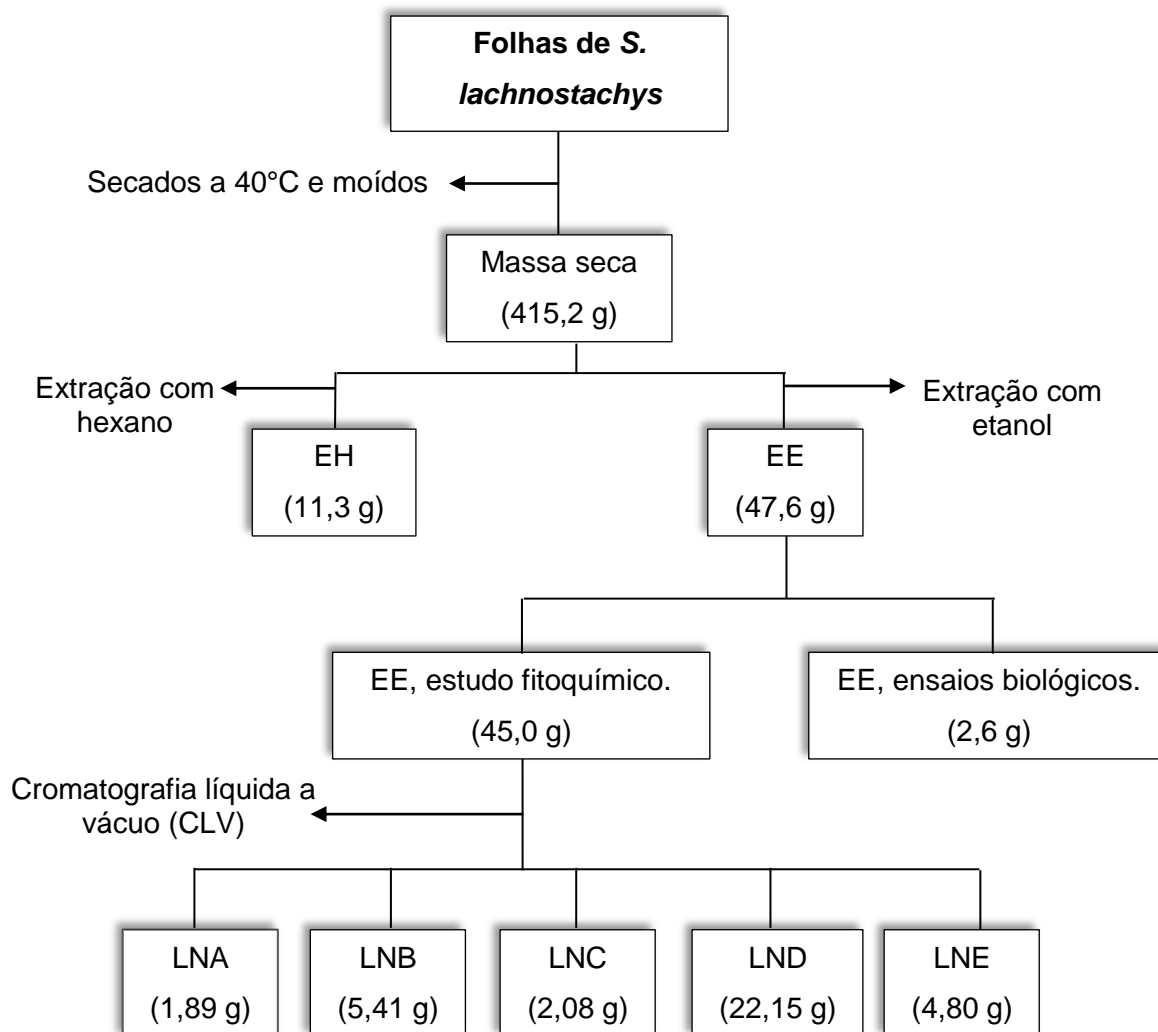
As folhas de *S. lachnostachys* foram secadas em estufa em temperatura de 40°C e então trituradas. O material seco resultante (415,2 g) foi extraído com hexano e etanol pela técnica de maceração a frio, que consiste em deixar o material em contato com o solvente à temperatura ambiente, por 24 h, e após esse tempo, remover o solvente por filtração, e adicionar uma nova porção de solvente. Este procedimento foi repetido por três vezes, para cada solvente, utilizando 1,5 L de solvente em cada vez. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo, resultando nos extratos em hexano (EH, 11,3 g) e em etanol (EE, 47,6). EH e EE foram armazenados em um refrigerador. Parte do extrato em etanol (2,6 g) foi reservada para ensaios biológicos, e o restante (45,0 g) utilizado para o estudo fitoquímico (ESQUEMA 1).

3.2.3. ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O extrato em etanol (EE, 45,0 g) foi fracionado em uma única etapa através de cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando como fase estacionária gel de sílica, eluída com hexano, hexano:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, acetona e por fim MeOH. Após a evaporação do solvente foram obtidas as seguintes frações: hexano (LNA, 1,89 g), hexano:CH₂Cl₂ 1:1 (LNB, 5,41 g), CH₂Cl₂ (LNC, 2,08 g), acetona (LND, 22,15 g) e MeOH (LNE, 4,80 g). Uma parte de cada fração foi reservada para ensaios biológicos (TABELA 3; ESQUEMA 1).

TABELA 3. Rendimento das frações do extrato em etanol (EE).

Fração	Solvente	Massa (g)	Rendimento (%)
LNA	hexano	1,89	3,97
LNB	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	5,41	11,36
LNC	CH ₂ Cl ₂	2,08	4,37
LND	acetona	22,15	46,53
LNE	MeOH	4,80	10,01



ESQUEMA 1. Procedimento de extração das folhas de *Salvia lachnostachys*. EE submetida a CLV eluída com hexano (LNA), hexano:CH₂Cl₂ 1:1 (LNB), CH₂Cl₂ (LNC), acetona (LND) e metanol (LNE).

A fração LNA (1,89 g) foi submetida à CC, eluída com hexano, hexano:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:acetona 98:2, 95:5, 9:1 e 1:1 e por fim acetona pura. Nesse processo foram recolhidas 71 subfrações de aproximadamente 15 mL, as quais foram reunidas em 14 subfrações após comparação por CCDA (TABELA 4).

TABELA 4. Fracionamento por cromatografia em coluna da fração do extrato etanólico em hexano (LNA).

Subfrações	Código	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas/ identificadas
1-4	LNA1	hexano	11,0	-
5-8	LNA5	hexano	279,7	-
9-12	LNA9	hexano	55,8	-
13-17	LNA13	hexano	28,2	-
18-19	LNA18	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	37,3	SL1, SL2, SL3, SL4 e SL6
20-25	LNA20	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	478,4	SL1, SL4, SL5 e SL6
26-27	LNA26	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	31,1	SL1
28-43	LNA28	CH ₂ Cl ₂	356,4	SL1
44-49	LNA44	CH ₂ Cl ₂ :acetona 95:5	74,3	-
50-54	LNA50	CH ₂ Cl ₂ :acetona 9:1	44,9	-
55-59	LNA55	CH ₂ Cl ₂ :acetona 1:1	279,9	-
60-63	LNA60	CH ₂ Cl ₂ :acetona 1:1	23,3	-
64-67	LNA64	acetona	34,3	-
68-71	LNA68	acetona	17,2	-

A subfração LNA18 (37,3 mg) foi purificada por CLAE (método isocrático MeOH:ACN 1:1 com fluxo de 2,5 mL min⁻¹, por 15 min). A amostra foi dissolvida em 4 mL de ACN e foram realizadas 22 injeções de 250 µL. O cromatograma (FIGURA 10) apresentou três picos, que foram coletados manualmente, rendendo as substâncias **SL6** (t_R = 5,56 min; 1,8 mg), **SL1 + SL4** (t_R = 6,53 min; 4,2 mg), e **SL2** (t_R = 7,80 min; 2,7 mg). Também foi obtido um resíduo (7,9 mg) que foi submetido a uma CCDP, eluída em hexano:AcOEt 8:2, fornecendo as substâncias **SL4** (1,8 mg), **SL2 + SL3** (1,2 mg), e **SL6** (2,4 mg). (ESQUEMA 2).

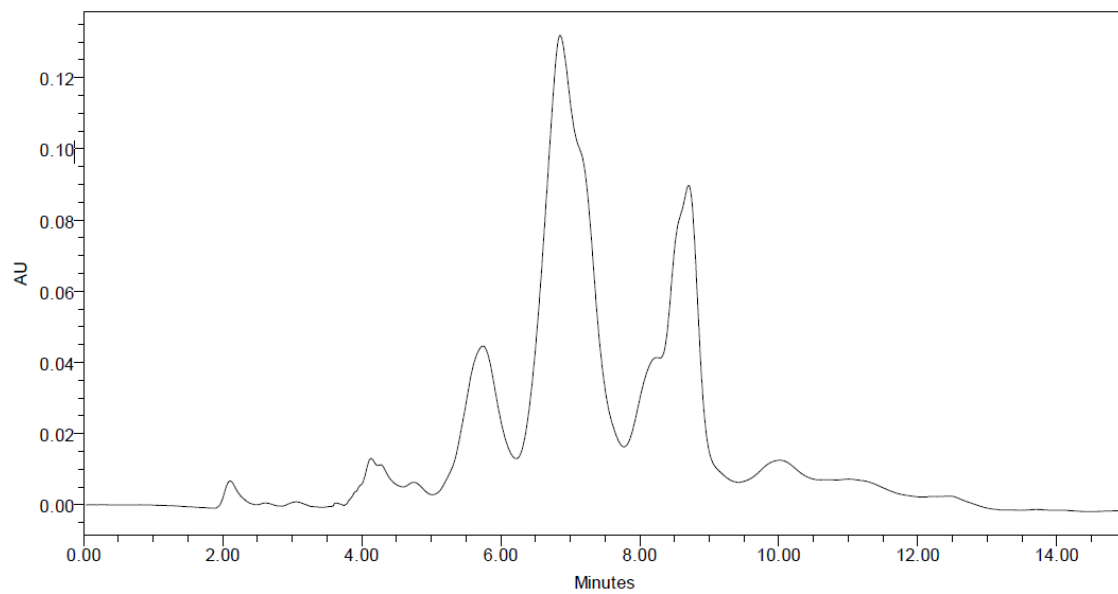
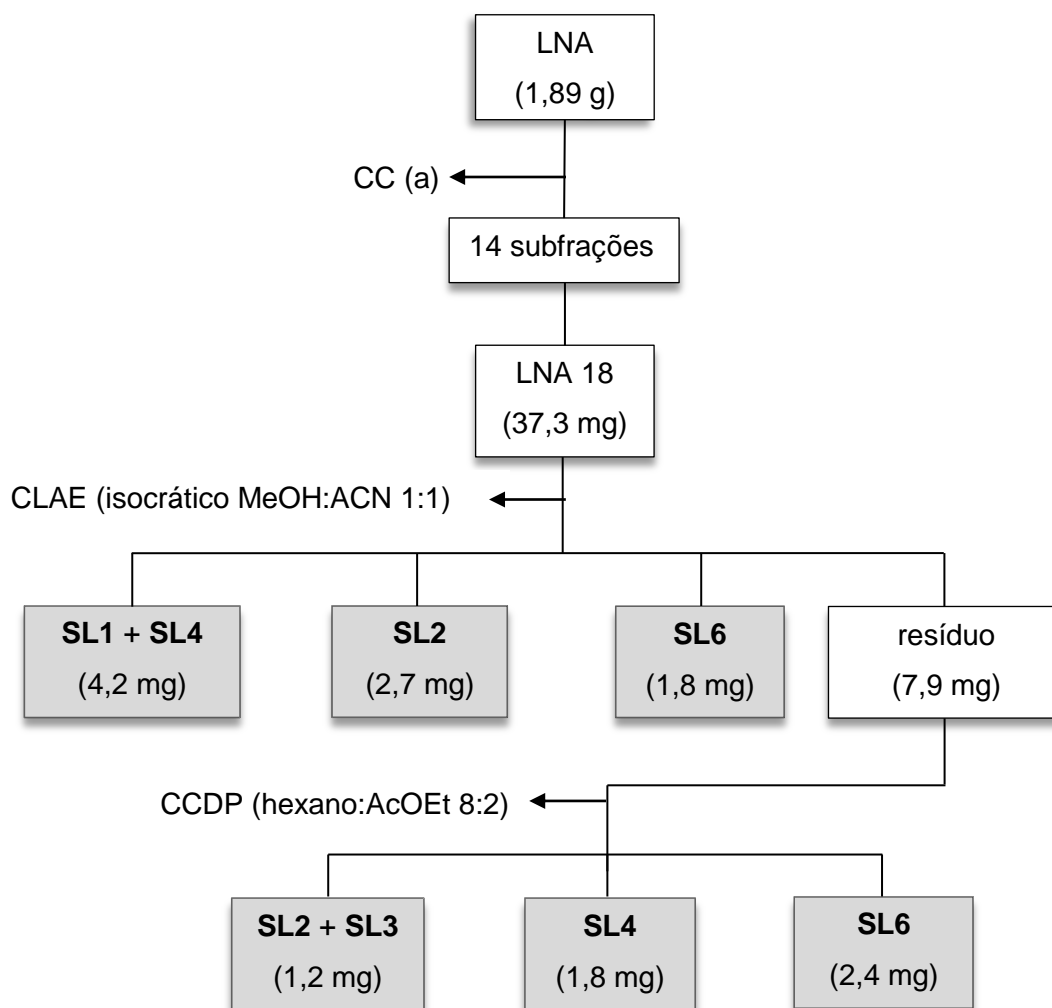


FIGURA 10. Cromatograma da purificação da fração LNA18.



ESQUEMA 2. Procedimento experimental do fracionamento da fração em hexano (LNA). (a) coluna cromatográfica eluída em hexano, hexano:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:acetona 98:2, 95:5, 9:1 e 1:1 e por fim acetona pura.

A subfração LNA20 foi recristalizada em hexano, fornecendo como precipitado uma mistura de **SL1** e **SL4** (338,8 mg), e um sobrenadante (LNA20s, 117,6 mg) que foi submetido à uma CC eluída com hexano, hexano:CH₂Cl₂ 1:1, mistura de CH₂Cl₂:AcOEt 99:1, 95:5, 8:2, 1:1 e finalmente em MeOH. Foram recolhidas 51 subfrações (10 mL) que foram reunidas em 12, após análise por CCDA (TABELA 5).

TABELA 5. Fracionamento por cromatografia em coluna da subfração LNA20s.

Fração	Código	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas/identificadas
1-11	LNA 20s/1	hexano	24,5	-
12	LNA 20s/12	hexano	12,4	SL1, SL4 e SL5
13-14	LNA 20s/13	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	14,2	SL4
15-20	LNA 20s/15	hexano:CH ₂ Cl ₂ 1:1	18,8	SL1 + SL4 + SL6
21-24	LNA 20s/21	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 99:1	9,8	-
25	LNA 20s/25	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 95:5	4,2	-
26-30	LNA 20s/26	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 8:2	17,7	-
31-35	LNA 20s/31	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 1:1	7,0	-
36	LNA 20s/36	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 1:1	2,6	-
37-45	LNA 20s/37	AcOEt	8,3	-
41	LNA 20s/41	MeOH	4,2	-
42-59	LNA 20s/42	MeOH	10,2	-

A subfração 20s/12 (12,4 mg) foi purificada por CLAE (método isocrático MeOH:ACN 1:1 com fluxo de 2,5 mL min⁻¹, por 12 min). A amostra foi dissolvida em 2 mL de ACN, sendo injetado um volume de 250 µL em cada análise. O procedimento foi repetido 8 vezes. O cromatograma (FIGURA 11) apresentou três picos, que foram coletados manualmente, fornecendo as substâncias **SL5** ($t_R = 6,53$ min; 1,9 mg), **SL1** ($t_R = 7,0$ min; 2,1 mg) e **SL4** ($t_R = 11,2$ min; 3,7 mg) (ESQUEMA 3).

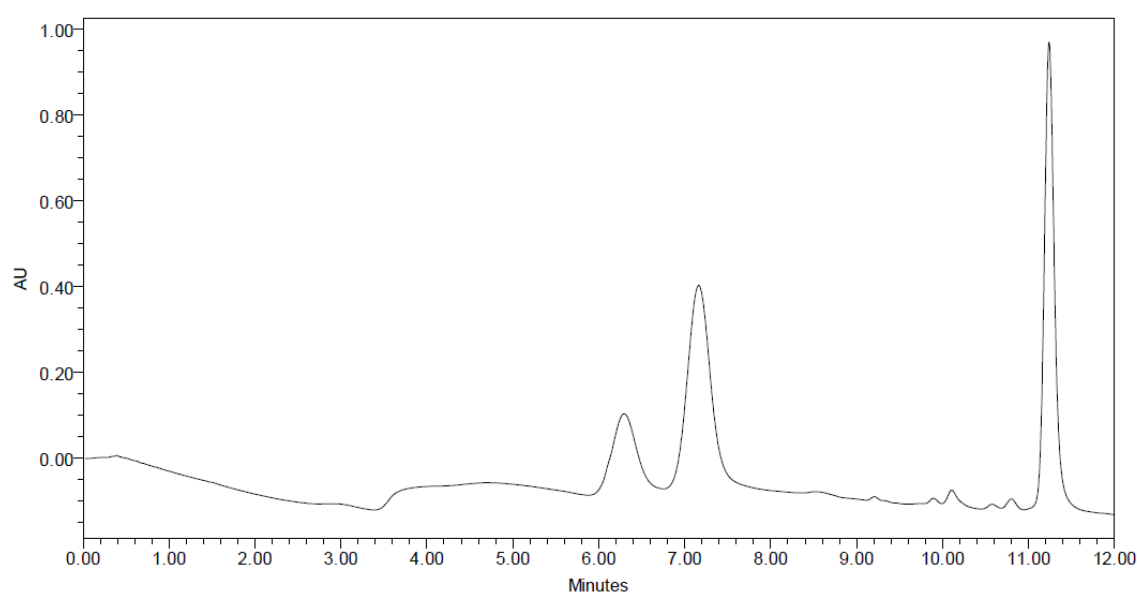
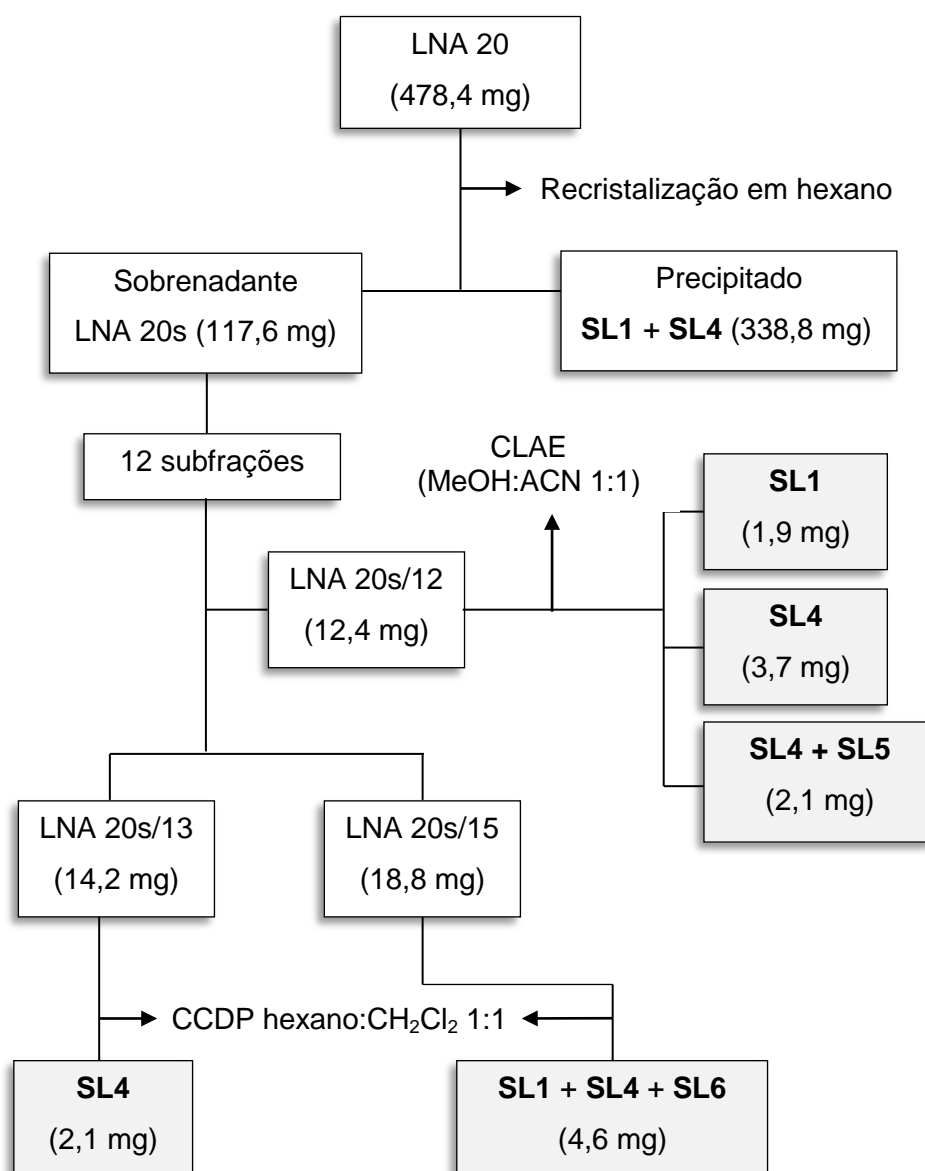


FIGURA 11. Cromatograma da purificação da fração LNA 20'/12.

A subfração LNA20s/13 (14,2 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH₂Cl₂ 1:1, resultando no isolamento de **SL4** (2,1 mg) (ESQUEMA 3).

A subfração LNA20s/15 (18,8 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH₂Cl₂ 1:1, resultado no isolamento de uma mistura de **SL1 + SL4 + SL6** (4,6 mg) (ESQUEMA 3).



ESQUEMA 3. Fracionamento da subfração LNA 20.

A subfração LNA26 (31,1 mg) forneceu **SL1** (14,8 mg) após CCDP em hexano:CH₂Cl₂ 1:1.

A subfração LNA28 (356,4 mg) foi analisada por CCDA, revelando a presença de **SL1**.

A fração LNB (5,41 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica eluída com hexano: CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:acetona 9:1, CH₂Cl₂:acetona 1:1, acetona e por fim MeOH puro. Foram recolhidas 24 subfrações de aproximadamente 100 mL as quais foram agrupadas em 13 (TABELA 6), após comparação por CCDA.

TABELA 6. Fracionamento por cromatografia em coluna da fração LNB.

Subfração	Código	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas/identificadas (mg)
1-3	LNB1	hexano: CH ₂ Cl ₂ 1:1	28,9	-
4	LNB2	CH ₂ Cl ₂	10,6	-
5-9	LNB3	CH ₂ Cl ₂	70,7	-
10	LNB4	CH ₂ Cl ₂ :acetona 9:1	37,1	-
11-14	LNB5	CH ₂ Cl ₂ :acetona 9:1	2000,9	SL7, SL9 + SL10
15-17	LNB6	CH ₂ Cl ₂ :acetona 1:1	856,1	SL7 +SL8
18	LNB7	Acetona	104,7	-
19	LNB8	Acetona	75,4	-
20	LNB9	Acetona	26,6	-
21	LNB10	MeOH	50,5	-
22	LNB11	MeOH	178,1	-
23	LNB12	MeOH	32,5	-
24	LNB13	MeOH	13,1	-

A subfração LNB5 (2,09 g) foi submetida à CC eluída em CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH 8:2, CH₂Cl₂:MeOH 1:1, CH₂Cl₂:MeOH 2:8 e por fim MeOH puro. Foram recolhidas 28 subfrações (30 mL cada), que após análise por CCDA foram agrupadas em 13 subfrações (TABELA 7).

TABELA 7. Fracionamento por cromatografia em coluna da subfração LNB5

Subfração	Código	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas/identificadas (mg)
1-4	LNB5-1	CH ₂ Cl ₂	11,1	-
5-6	LNB5-5	CH ₂ Cl ₂	9,2	-
7-10	LNB5-7	CH ₂ Cl ₂	34,1	-
11	LNB5-11	CH ₂ Cl ₂	9,5	-
12-13	LNB5-12	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	19,3	-
14	LNB5-14	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	2,1	-
15-17	LNB5-15	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1	30,1	-
18-19	LNB5-18	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1	39,8	SL9 + SL10
20	LNB5-20	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 2:8	121,3	-
21-24	LNB5-21	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 2:8	1014,1	-
25-26	LNB5-25	MeOH	108,5	SL7
27	LNB5-27	MeOH	66,4	-
28	LNB5-28	MeOH	75,9	-

A subfração LNB5-18 (39,8 mg) foi purificada por CCDP eluída em CH₂Cl₂:MeOH 95:5 (duas vezes), rendendo **SL9 + SL10** (4,1 mg) (ESQUEMA 4).

A subfração LNB5-25 (108,5 mg) foi submetida à CCDP eluída em CH₂Cl₂:MeOH 95:5, rendendo **SL7** (58,9 mg). (ESQUEMA 4).

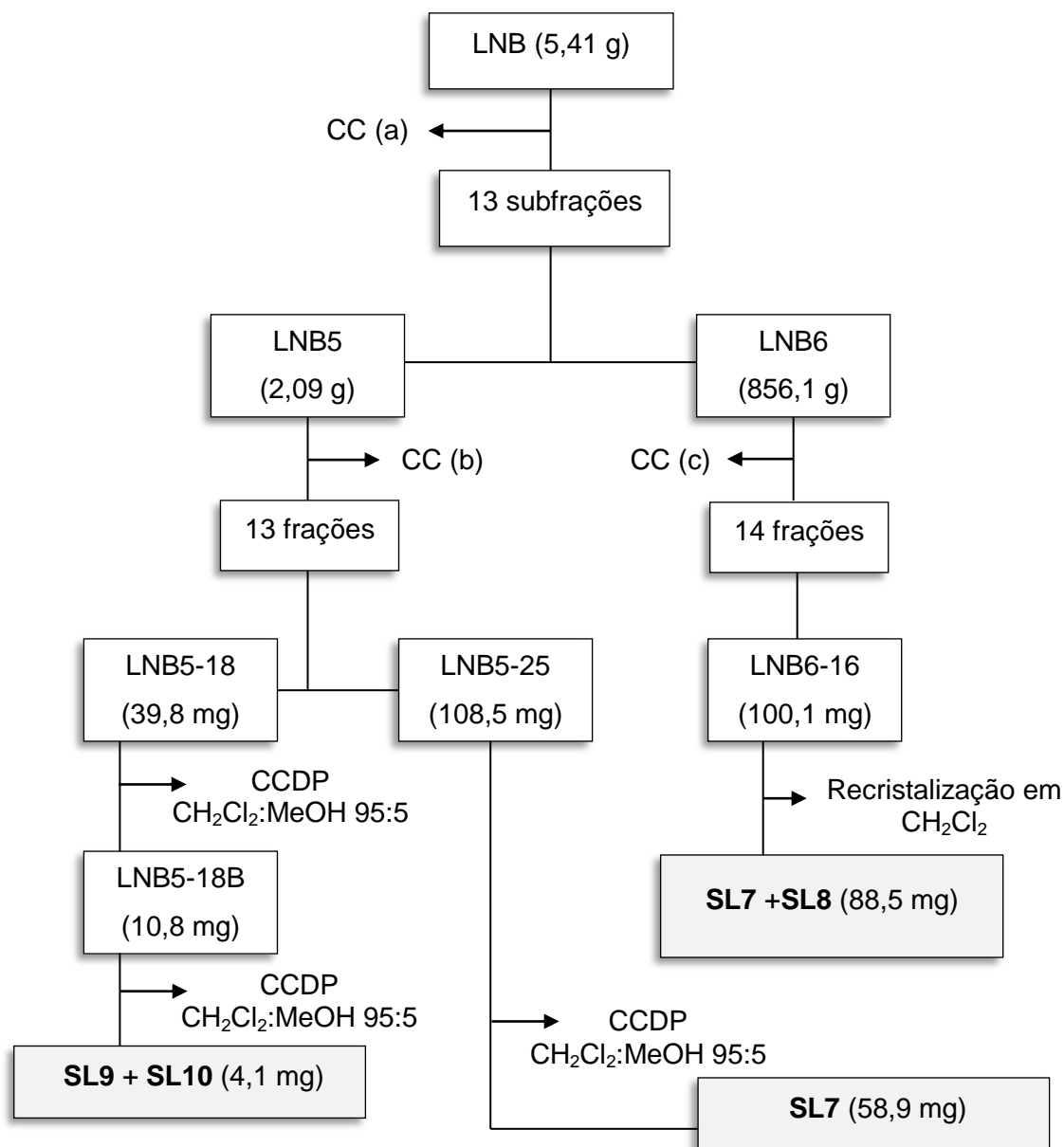
A subfração LNB6 (856,1 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica eluída com misturas de CH₂Cl₂:MeOH 95:5, em ordem crescente de polaridade até MeOH puro. Nesse processo foram recolhidas 52 subfrações de aproximadamente 5 mL as quais foram reunidas em 14 subfrações (TABELA 8), após comparação por CCDA.

A subfração LNB6-16 (100,1 mg) foi recristalizada em CH₂Cl₂, rendendo **SL7 + SL8** (88,5 mg) (ESQUEMA 4).

TABELA 8. Frações obtidas da coluna cromatografia da fração LNB6.

Subfração	Código	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas/identificadas
1-8	LNB6-1	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5	7,1	-
9-12	LNB6-9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5	13,3	-
13-15	LNB6-13	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	76,3	-
16-20	LNB6-16	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	100,1	SL7 + SL8
21	LNB6-21	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	29,3	-
22	LNB6-22	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	23,0	-

23-24	LNB6-23	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	41,0	-
25-26	LNB6-25	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 7:3	35,7	-
27-29	LNB6-27	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 7:3	10,8	-
30-38	LNB6-30	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1	27,9	-
39	LNB6-39	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1	1,3	-
40-46	LNB6-40	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 2:8	62,1	-
47-48	LNB6-47	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:9	21,7	-
49-52	LNB6-49	MeOH	20,4	-



ESQUEMA 4. Fracionamento da fração LNB. (a) CC eluída em hexano:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:acetona 9:1, 1:1 e acetona pura. (b) CC em CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH 8:2, 1:1, 2:8 e MeOH puro. (c) CH₂Cl₂:MeOH 95:5, após aumentando gradativamente a polaridade até MeOH puro.

3.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados com os extratos brutos em hexano e etanol (EH, EE), as frações do extrato etanólico (LNA, LNB, LNC, LND e LNE) e as substâncias puras **SL1**, **SL2** e **SL4**. Foram utilizadas as seguintes linhagens de células: U251 (glioma, SNC), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786.0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata, somente nos ensaios com as substâncias puras), OVCAR-3 (ovário, somente nos ensaios com as substâncias puras), HT-29 (colón, somente nos ensaios com os extratos brutos e frações), K562 (leucemia) e HaCat (queratinócito, célula não tumoral). O ensaio foi realizado como descrito na literatura (SKEHAN *et al.*, 1990). Resumidamente, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (100 células/poço) e expostas a várias concentrações de amostras (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em DMSO (0,1%) a 37°C, com 5% de CO_2 durante 48 h. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Foi adicionado ácido tricloroacético (solução a 50%) e, após incubação durante 30 min a 4°C, as placas foram lavadas com água e deixadas secando a temperatura ambiente. A proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular utilizando sulforrodamina B como reagente. Os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração necessária para atingir 50% de inibição de crescimento (GI_{50}) foi calculada em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos e frações, e em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os compostos isolados. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e DMSO como o controle negativo. Os testes foram realizados pelo Dr. José Marcos Salvador, da UNICAMP.

3.4. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

SL1

Fruticulina A: sólido amarelo; massa molar calculada $C_{20}H_{20}O_4$: 324,3356; CLAE: $t_R=$ 7,0 min (isocrático, ACN:MeOH 1:1) (FIGURA 11, p. 38); UV-Vis $\lambda_{m\acute{a}x}$ (MeOH) (log ϵ): 215 (3,67), 276 (3,25), 318 (3,26), 401 (2,79) (FIGURA 12, p. 47); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 13-18, p. 46-50; TABELA 9, p. 51).

SL2

Isofruticulina A: sólido vermelho; EM-AR: m/z $[M-1]^-$ 323,1290 (calculado para $C_{20}H_{19}O_4$ 323,3356) (FIGURA 19, p. 53); CLAE: $t_R=$ 7,80 min (isocrático, ACN:MeOH 1:1) (FIGURA 10, p. 36); UV-Vis $\lambda_{m\acute{a}x}$ (MeOH) (log ϵ): 242 (3,09), 289 (3,15) 508 (2,44) (FIGURA 20, p. 54); RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 600 MHz) (FIGURAS 21-25, p. 54-56; TABELA 10, p. 57).

SL3

7,20-Diidrofruticulina A: Sólido vermelho; massa molar calculada $C_{20}H_{22}O_4$: 326,3476; RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 26-29, p. 59-60; TABELA 11 p. 61).

SL4

Fruticulina B: Sólido alaranjado; massa molar calculada para $C_{19}H_{18}O_4$: 310,3074; CLAE: $t_R=$ 11,2 min (isocrático, ACN:MeOH 1:1) (FIGURA 11, p. 38); UV-Vis $\lambda_{m\acute{a}x}$ (MeOH) (log ϵ): 237 (4,12), 304 (3,18), 339 (3,58) (FIGURA 30, p. 63); RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 31-34, p. 64-65; TABELA 12, p. 66).

SL5

20-Hidroxifruticulina B: Sólido vermelho; massa molar calculada para $C_{19}H_{18}O_5$: 326,3064; CLAE: $t_R=$ 6,53 min (isocrático, ACN:MeOH 1:1) (FIGURA 11, p. 38); RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 35-38, p. 68-69; TABELA 13, p. 70).

SL6

Lachnostachyona: Sólido vermelho; EM-AR: m/z $[M+1]^+$ 257,1542 (calculado para $C_{17}H_{21}O_2$ 257,3148) (FIGURA 39, p. 72); CLAE: $t_R=$ 5,56 min (isocrático, ACN:MeOH 1:1) (FIGURA 10, p. 36); UV-Vis: $\lambda_{m\acute{a}x}$ (MeOH) (log ϵ): 262 (3,28), 286 (3,11) 360 (2,28) (FIGURA 40, p. 72); RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 600 MHz) (FIGURAS 41-43 e 45, p. 73-75; TABELA 14, p. 75).

SL7

Ácido oleanólico: Sólido branco; massa molar calculada $C_{30}H_{48}O_3$: 456,6414; RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 46-50, p. 77-79; TABELA 15, p. 80).

SL8

Ácido ursólico: Sólido branco; massa molar calculada $C_{30}H_{48}O_3$: 456,6414; RMN de 1H , ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 51-55, p. 82-84; TABELA 16, p. 85).

SL9 e SL10

Uvaol e Eritrodiol: Sólido branco; massa molar calculada $C_{30}H_{50}O_2$: 442,6580; RMN de 1H , HSQC, HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) (FIGURAS 56-61, p. 87-90; TABELAS 17 e 18, p. 91 e 92).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico do extrato em etanol das folhas de *S. lachnostachys* resultou no isolamento e identificação de dez substâncias, das quais seis são diterpenos (**SL1-SL6**) e quatro são triterpenos (**SL7-SL10**). As substâncias **SL2**, **SL5** e **SL6** são inéditas na literatura.

4.1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **SL1**

A substância **SL1** foi isolada como um sólido amarelo. O espectro de UV-Vis apresentou quatro bandas de absorção, sendo três em 215, 276 e 318 nm, característicos de cromóforo benzeno substituído, outra mais fraca em 401 nm, referente às conjugações de ligações duplas presente na estrutura de **SL1** (FIGURA 12). O seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 13) apresentou sinais de um grupo isopropila (δ_{H} 1,26, *d*, $J = 7,0$ Hz, 6H; 3,37, hept, $J = 7,0$ Hz, 1H), de um grupo metila ligado a anel aromático em δ_{H} 2,44 (*s*, 3H), de um grupo metileno em δ_{H} 3,14 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 2H) e, de um grupo metoxila em δ_{H} 3,79 (*s*, 3H). Foram também observados dois dupletos em δ_{H} 6,86 e 6,98, com uma constante de acoplamento de 2,6 Hz, que é típica de hidrogênios de um anel aromático em orientação *meta*. O segundo duplete estava parcialmente sobreposto por um tripleto (δ_{H} 6,97, *t*, $J = 7,6$ Hz, 1H) (FIGURA 14), cuja constante de acoplamento indicou estar vizinho ao grupo metileno observado em δ_{H} 3,14. Havia ainda dois simpletos em δ_{H} 7,65 e 8,16, integrando para um hidrogênio cada.

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 15) apresentou um total de 20 sinais. Destes, um deles em δ_{C} 55,4 foi atribuído ao grupo metoxila. Portanto **SL1** tem 19 carbonos no seu esqueleto, indicando um *nor*-diterpeno. Os sinais de grupos carbonila em δ_{C} 183,2 e 184,0 sugeriram a presença de uma quinona. A posição dos grupos substituintes foi determinada pelas correlações observadas nos mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC, FIGURA 16) e a longa distância (HMBC, FIGURA 17). O sinal em δ_{H} 7,65 (*s*) foi atribuído a uma hidroxila, visto a ausência de correlação no HSQC. As principais correlações serão discutidas a seguir.

O H-20 (8,16, *s*) está ligado ao carbono δ_{C} 140,8 (C-20) e apresentou no HMBC correlações com os carbonos em δ_{C} 112,0 (C-1), 127,0 (C-5), 133,1 (C-8) e 183,2 (C-11). A hidroxila também mostrou correlações no HMBC com C-11, portanto está localizada em C-12. Outras correlações do grupo hidroxila foram com os carbonos em

δ_C 154,6, que só pode ser C-12, e em δ_C 132,0 (C-13). O hepteto em δ_H 3,37 (H-15) mostrou correlações no HMBC com C-12 e com o outro grupo carbonila em δ_C 184,0, comprovando a posição do grupo isopropila em C-13. O grupo metila (δ_H 2,44, H-18) mostrou no HMBC correlações com os carbonos em δ_C 121,5 (C-3), 136,1 (C-4) e C-5, enquanto que o H-3 (δ_H 6,98, *d*, $J = 2,6$ Hz) mostrou correlações com C-4, C-1 e um carbono em δ_C 157,4 (C-2). Portanto, o grupo metila está em C-4 e o grupo metoxila em C-2, pois o sinal em δ_H 3,79 mostra uma única correlação no HMBC com C-2. Estas e as demais correlações observadas no HSQC e HMBC (FIGURA 18; TABELA 9) permitiram propor a estrutura abaixo, a qual foi confirmada por comparação com dados da literatura (BISIO *et al.*, 2008). Essa substância é um *nor*-diterpeno conhecido como fruticulina A e já foi isolada de *S. lachnostachys* (ERBANO *et al.*, 2012).

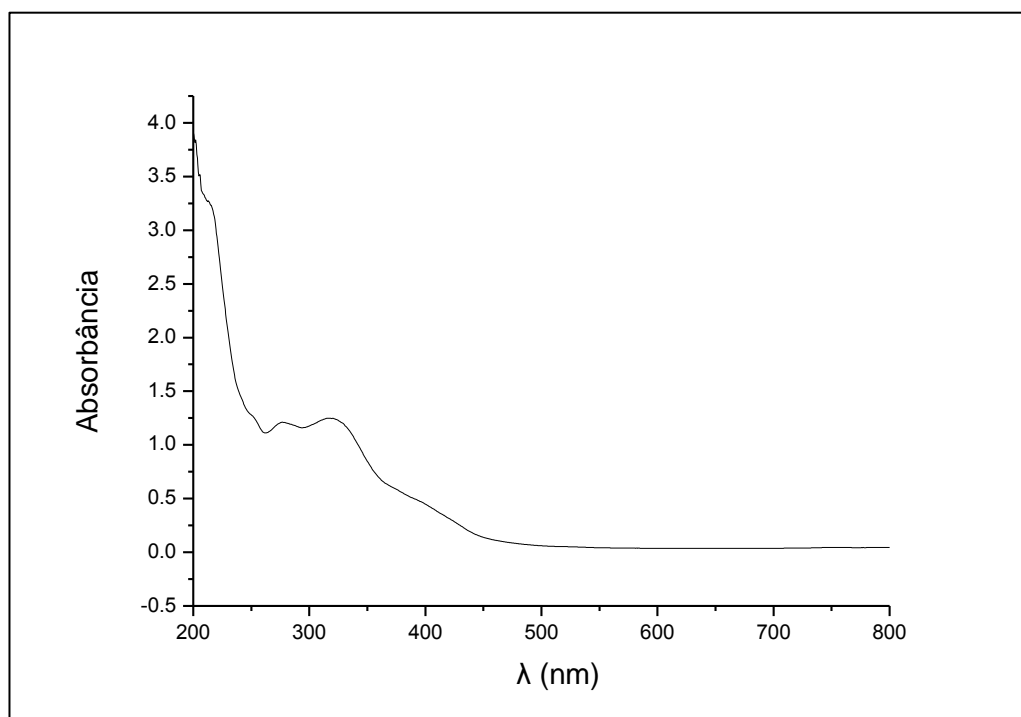
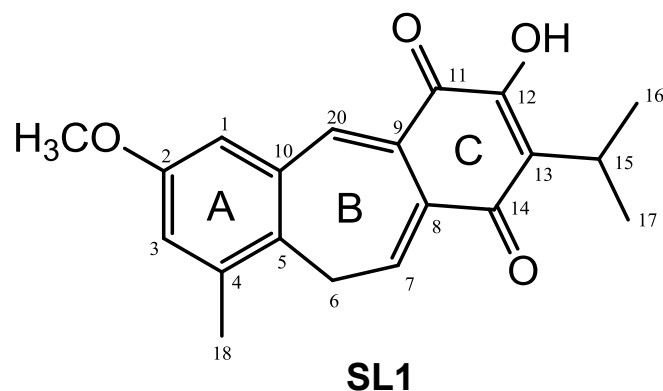


FIGURA 12. Espectro UV-Vis (MeOH) da substância **SL1**.

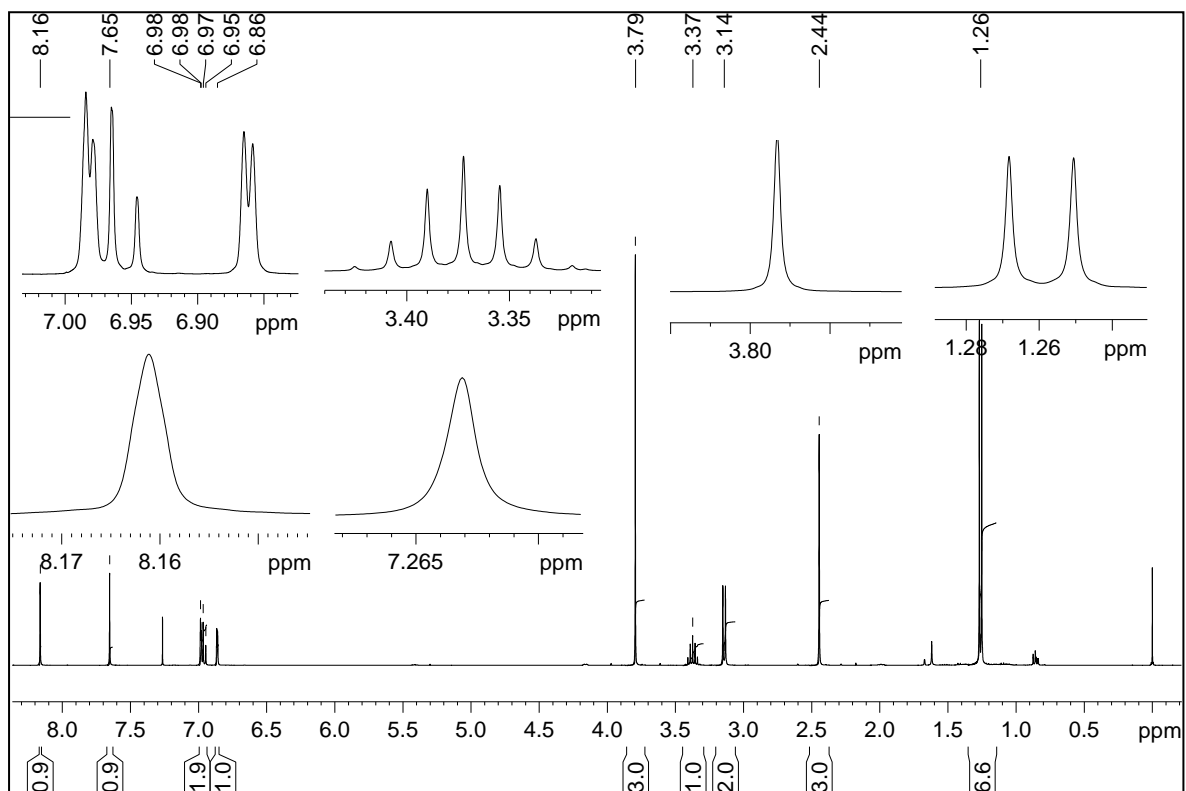


FIGURA 13. Espectro de RMN de ^1H de **SL1** (CDCl_3 , 400 MHz).

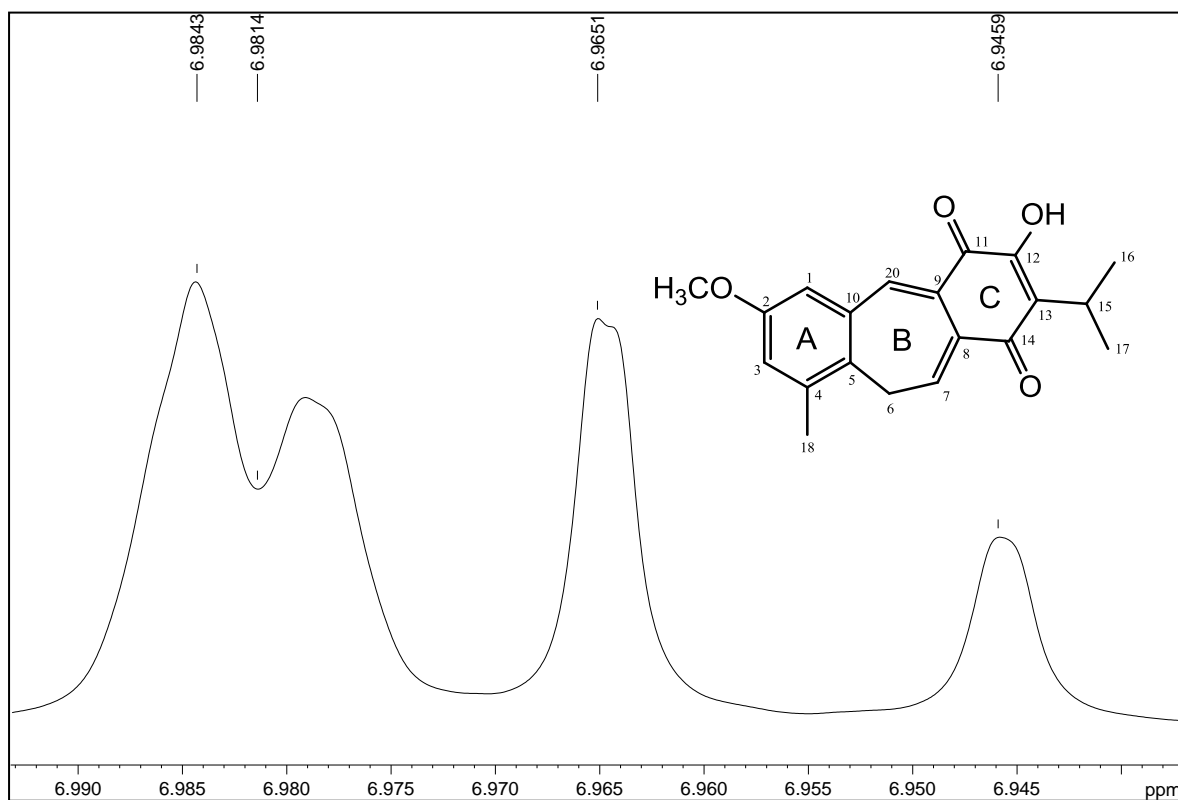


FIGURA 14. Espectro de RMN de ^1H de **SL1**, com ampliação da região entre 6,9 e 7,0 ppm.

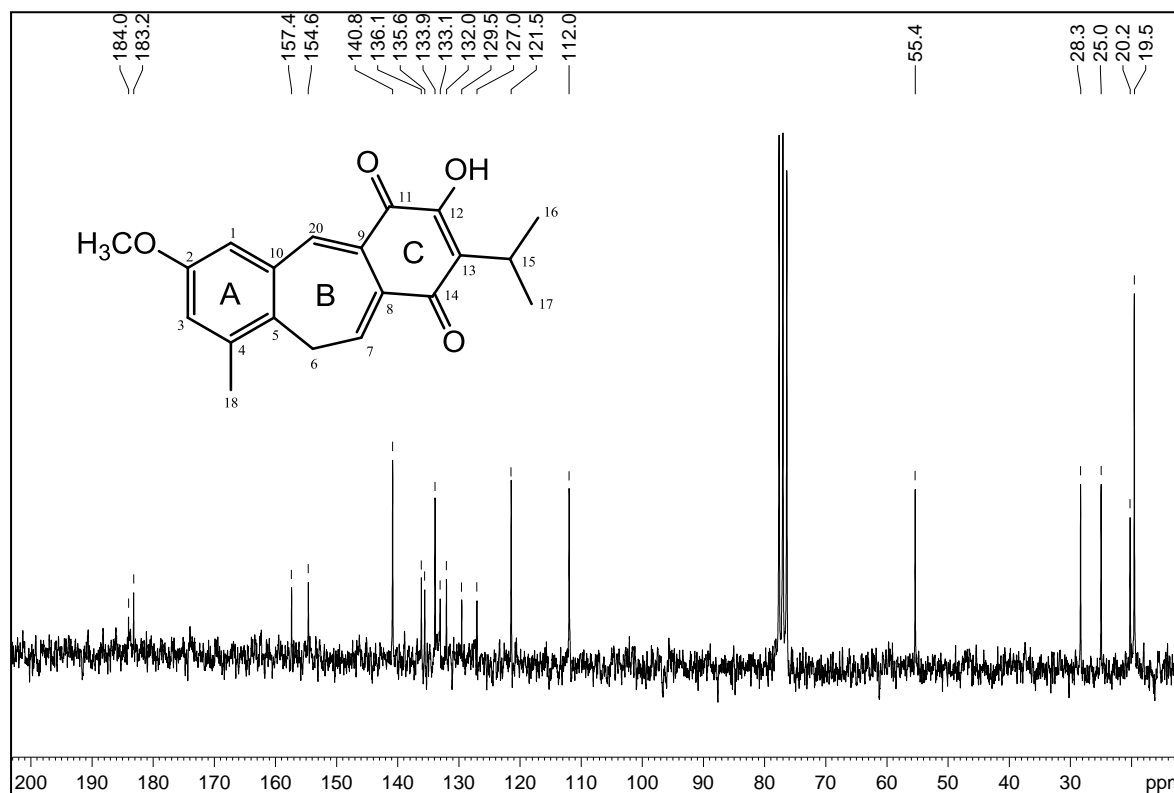


FIGURA 15. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **SL1** (CDCl_3 , 100 MHz).

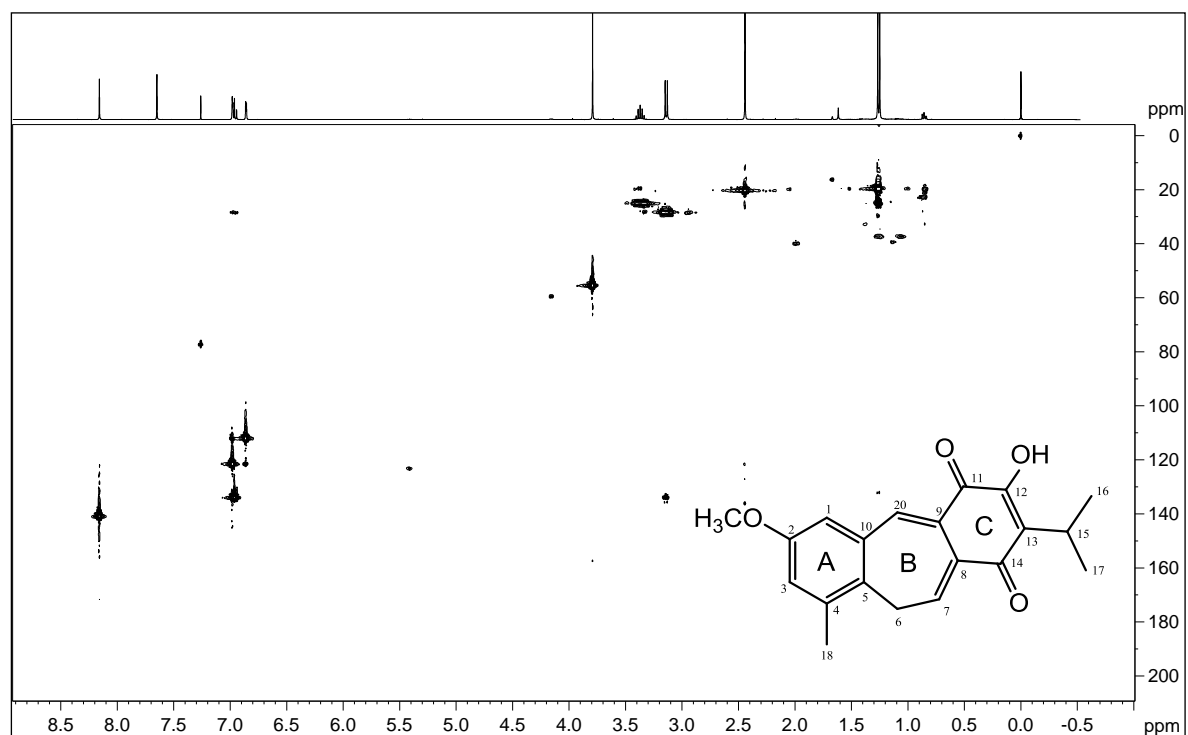


FIGURA 16. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL1** (CDCl_3 , 400 MHz).

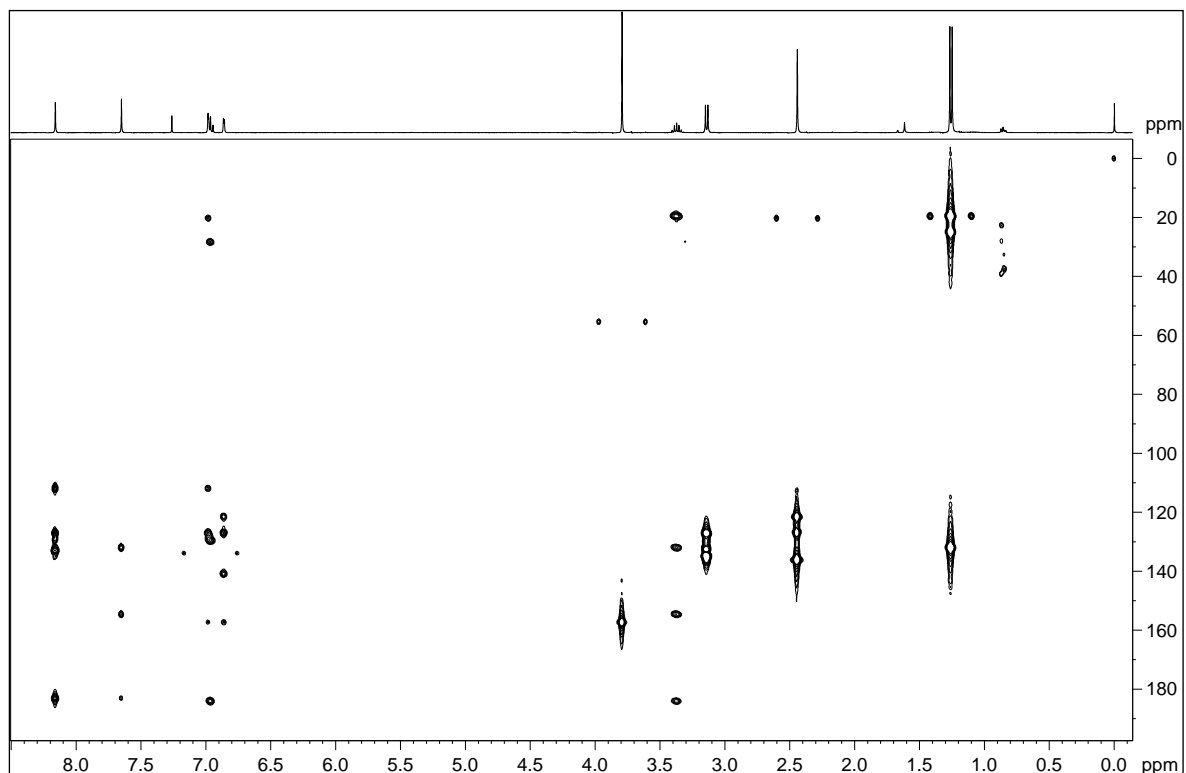


FIGURA 17. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL1** (CDCl_3 , 400 MHz).

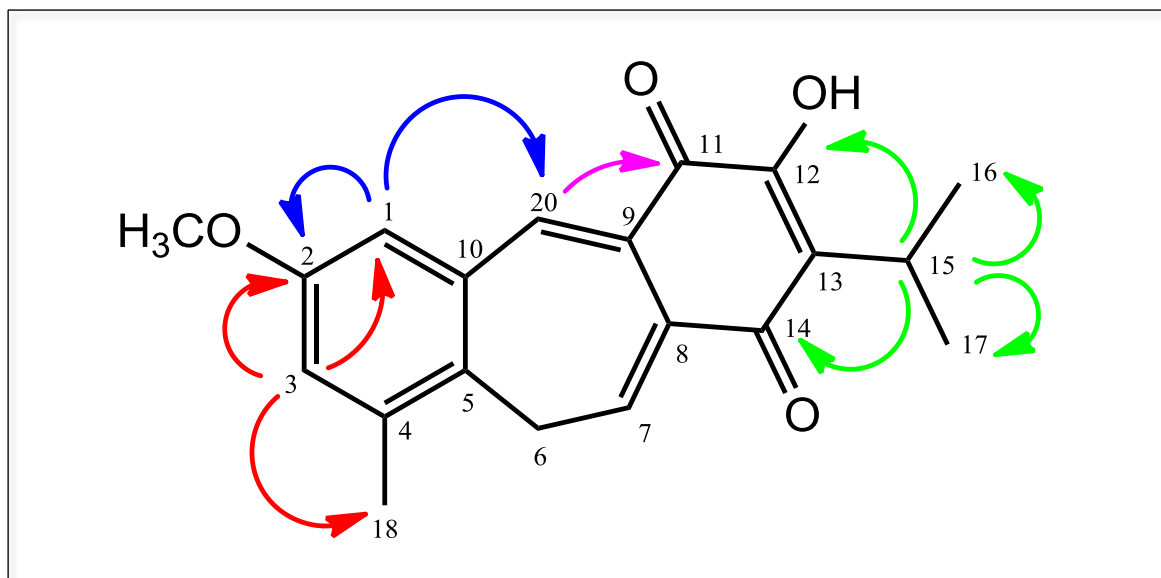


FIGURA 18. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL1**.

TABELA 9. Dados de RMN de **SL1** (CDCl₃, 400 MHz) comparados com dados da literatura para fruticulina A (CDCl₃, 600 MHz, BISIO *et al.*, 2008).

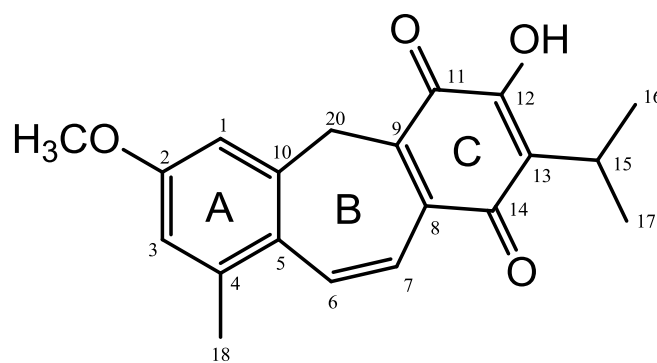
Pos.	SL1			Fruticulina A	
	δ_C	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (m, J em Hz)
1	112,0	6,86 (<i>d</i> , 2,6)	2, 3, 5, 20	112,0	6,89 (<i>d</i> , 1,8)
2	157,4	-	-	157,4	-
3	121,5	6,98 (<i>d</i> , 2,6)	1, 2, 18	121,5	7,0 (<i>d</i> , 1,8)
4	136,1	-	-	135,6	-
5	127,0	-	-	127,1	-
6	28,3	3,14 (<i>d</i> , 7,6)	5, 10	28,3	3,17 (<i>d</i> , 7,6)
7	133,9	6,97 (<i>t</i> , 7,6)	6, 9, 14	134,0	6,98 (<i>t</i> , 7,6)
8	133,1	-	-	133,1	-
9	129,5	-	-	129,5	-
10	135,6	-	-	136,2	-
11	183,2	-	-	183,2	-
12	154,6	-	-	154,7	-
13	132,0	-	-	132,0	-
14	184,0	-	-	184,1	-
15	25,0	3,37 (<i>hept</i> , 7,0)	12, 13, 14, 16, 17	25,0	3,39 (<i>m</i>)
16	19,5	1,26 (<i>d</i> , 7,0)	13, 15, 17	19,6	1,28 (<i>d</i> , 7,0)
17	19,5	1,26 (<i>d</i> , 7,0)	13, 15, 17	19,6	1,28 (<i>d</i> , 7,0)
18	20,2	2,44 (<i>s</i>)	3, 5, 10	20,3	2,47 (<i>s</i>)
20	140,8	8,16 (<i>s</i>)	1, 5, 8, 11	140,9	8,19 (<i>s</i>)
OH	-	7,65 (<i>s</i>)	11, 12, 13	-	-
OCH₃	55,4	3,79 (<i>s</i>)	2	55,4	3,82

4.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA **SL2**.

A substância **SL2** foi isolada como um sólido vermelho, com fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_4$ (pico $[M - 1]^-$ em m/z 323,1290, FIGURA 19), compatível com onze graus de instauração. O espectro de UV-vis apresentou três bandas de absorção, sendo duas intensas em 242 e 289 nm, características do cromóforo benzeno substituído, e outra mais fraca na região do visível (508 nm), indicando conjugação entre várias ligações duplas presente no esqueleto carbônico de **SL1**, a qual justifica a sua coloração vermelha (FIGURA 20). O espectro de RMN de 1H (FIGURA 21) revelou semelhanças com o espectro da substância **SL1**. Foram observados os sinais para o grupo isopropílico (δ_H 1,20, *d*, $J = 7,0$ Hz, 6H; δ_H 3,20, *hept*, $J = 7,0$ Hz, 1H), para um grupo metila (δ_H 2,40, *s*, 3H) e um grupo metoxila (δ_H 3,82, *s*, 3H). Foi observado também na região de hidrogênios aromáticos um sinal em δ_H 6,70 integrando para dois hidrogênios, que o mapa de correlação direta 1H - ^{13}C (HSQC, FIGURAS 22 e 23) mostrou tratar-se de dois hidrogênios não equivalentes, em δ_H 6,69 e δ_H 6,70, ligados aos carbonos em δ_C 110,3 (C-1) e δ_C 115,6 (C-3), respectivamente. Através das correlações a longa distância (HMBC, FIGURA 24) foi possível determinar que o sinal em δ_H 6,69 apresentava correlações com os carbonos em δ_C 162,0 (C-2), δ_C 115,6 (C-3) e 30,6 (C-20). Por outro lado o sinal em δ_H 6,70 revelou correlações com os carbonos em δ_C 110,3 (C-1), δ_C 162,0 (C-2) e δ_C 20,6 (C-18). Esses dados são muito semelhantes aos do anel A de **SL1** (fruticulina A), de modo que pode-se deduzir que os hidrogênios em δ_H 6,69 e δ_H 6,70 correspondem a dois hidrogênios em *meta*, e **SL2** tem um anel aromático tetrassubstituído como **SL1**. As correlações observadas no HMBC para o hepteto em δ_H 3,20 (H-15) também mostraram que **SL2** tinha um anel contendo o grupo *para*-quinona, uma hidroxila e um grupo isopropila como o anel C de **SL1**.

No entanto, os sinais característicos do anel B de **SL1** (simpleto em δ_H 8,16, duplete em δ_H 3,14 e um tripleto em δ_H 6,96) estavam ausentes. Em seu lugar foram observados um simpleto em δ_H 3,41, integrando para dois hidrogênios, e dois dupletos na região de hidrogênios olefínicos (δ_H 7,20 e δ_H 7,62; $J = 12,1$ Hz). O valor da constante de acoplamento é muito elevado para hidrogênios em *orto* em um anel aromático, sendo esperado para ligações duplas em um anel de sete membros. No HMBC tanto os hidrogênios do grupo metila (δ_H 2,40) como o hidrogênio em δ_H 7,62 (H-6) mostraram correlação com o carbono em δ_C 138,4 (C-4), localizando essa ligação dupla em C-6 e C-7. Essa posição foi ainda confirmada pelas correlações no HMBC do outro hidrogênio da ligação dupla (δ_H 7,20, H-7) que mostrou correlações com o grupo carbonila em δ_C 186,7 (C-14), enquanto que o grupo metileno em δ_H 3,41 (H-20) mostrou

correlações com o outro grupo carbonila em 181,8 (C-11). Estas e as demais correlações nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 10; FIGURA 25) confirmam a estrutura de **SL2** como um isômero da fruticulina A (**SL1**), que foi nomeado isofruticulina A. Esta substância é inédita na literatura.



SL2

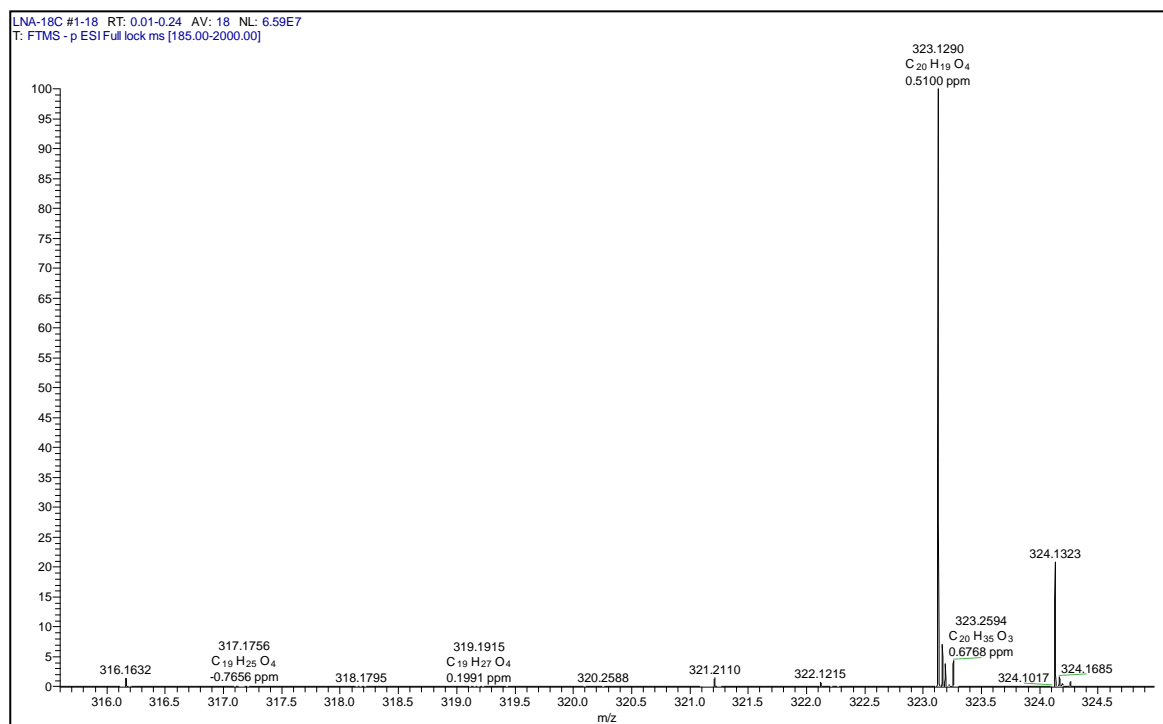


FIGURA 19. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo de **SL2**.

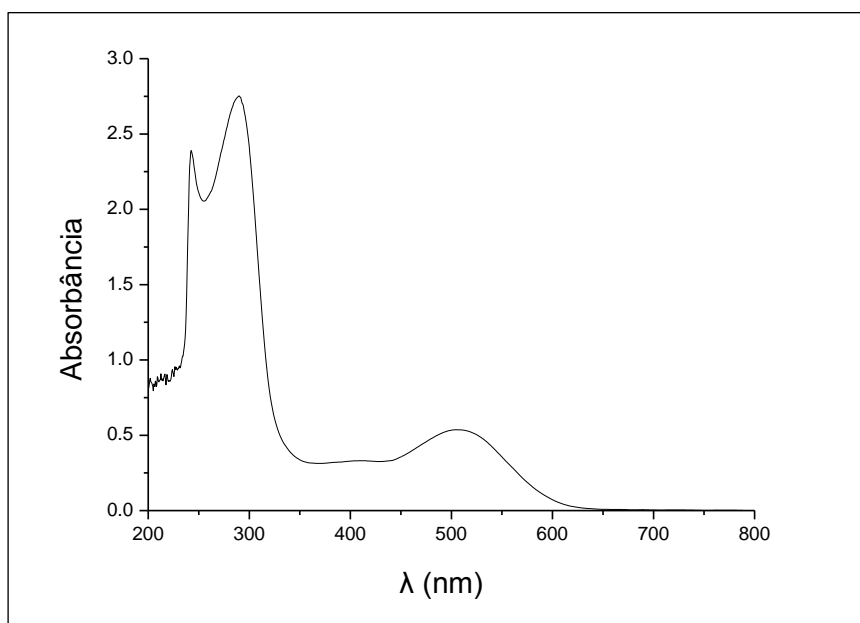


FIGURA 20. Espectro UV-Vis (MeOH) da substância **SL2**.

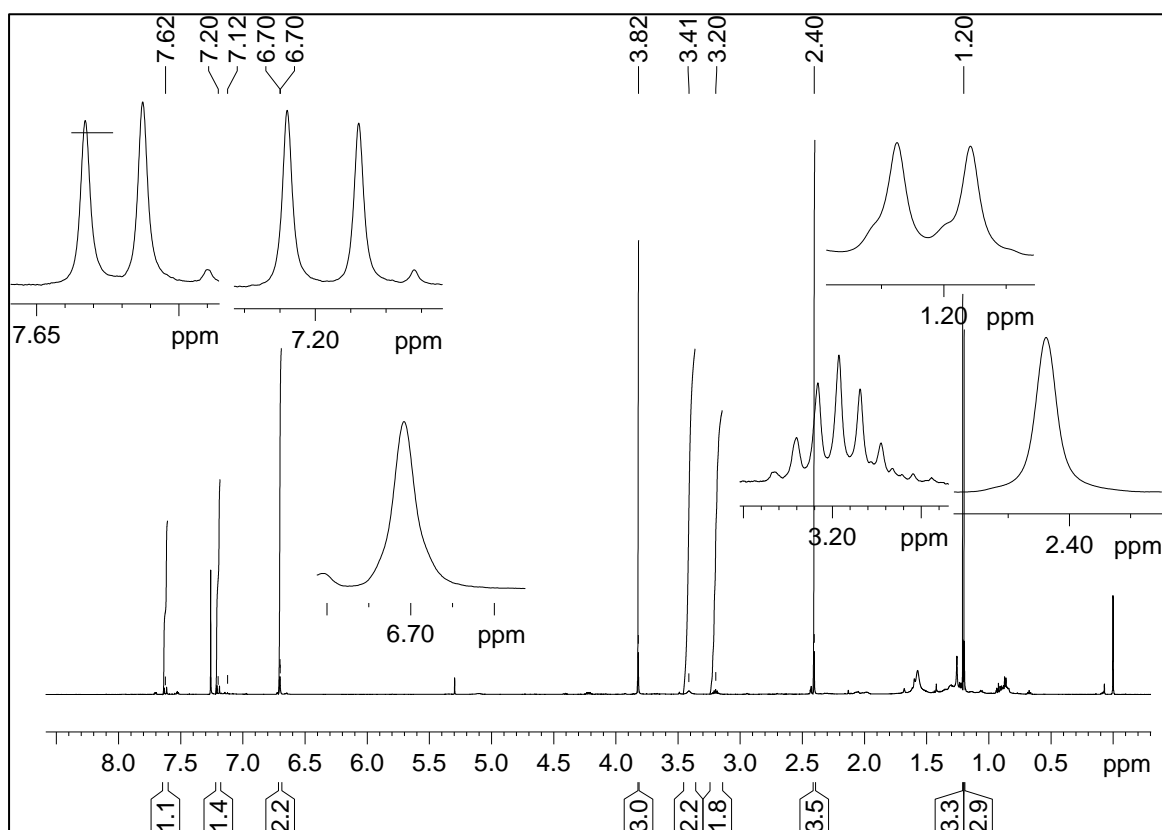


FIGURA 21. Espectro de RMN de ^1H de **SL2** (CDCl_3 , 600 MHz).

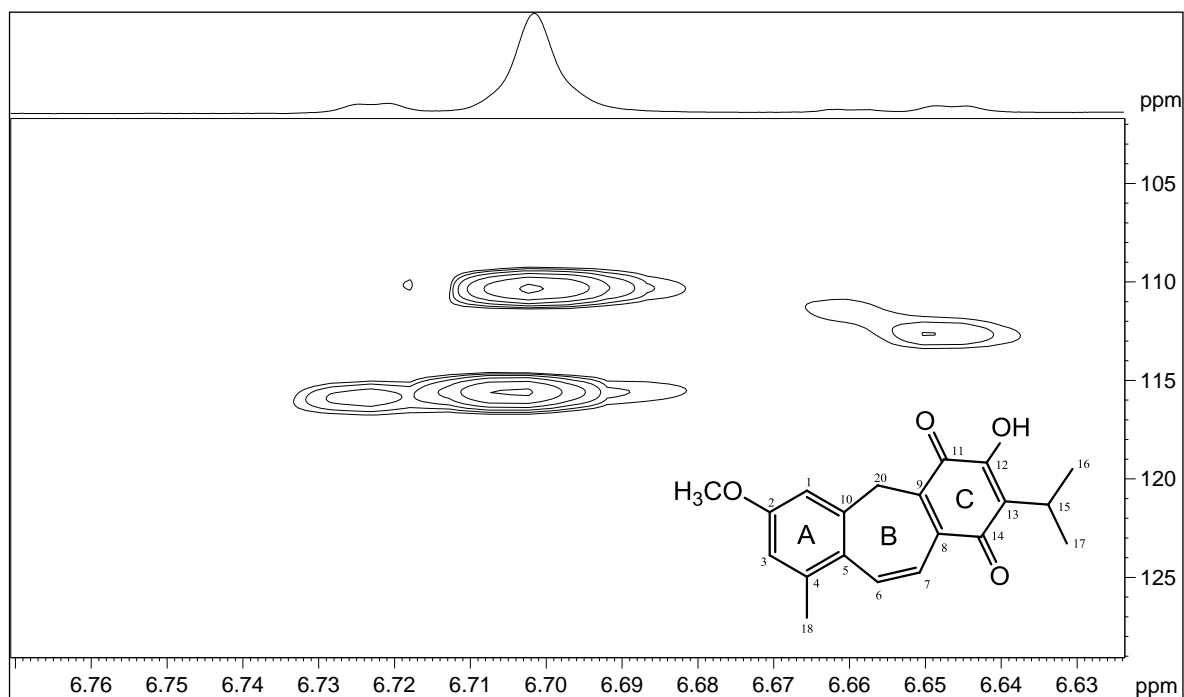


FIGURA 22. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL2** com ampliação da região aromática referente aos hidrogênios H-1 e H-3 (CDCl_3 , 600 MHz).

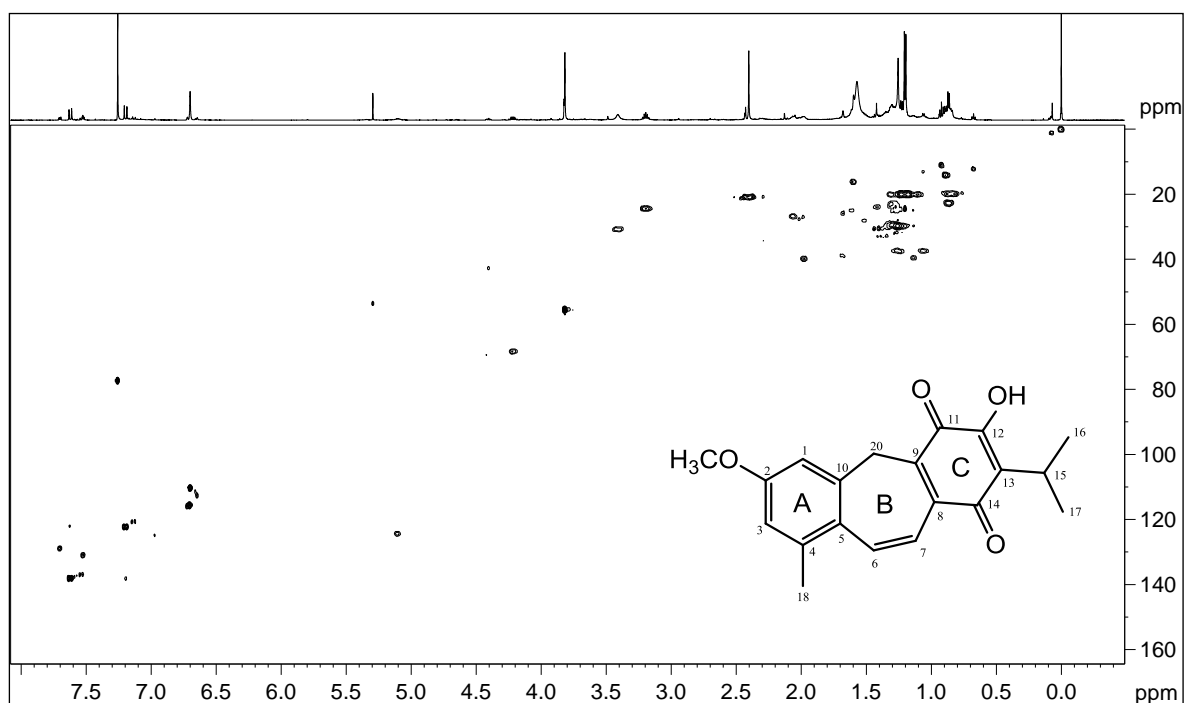


FIGURA 23. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL2** (CDCl_3 , 600 MHz).

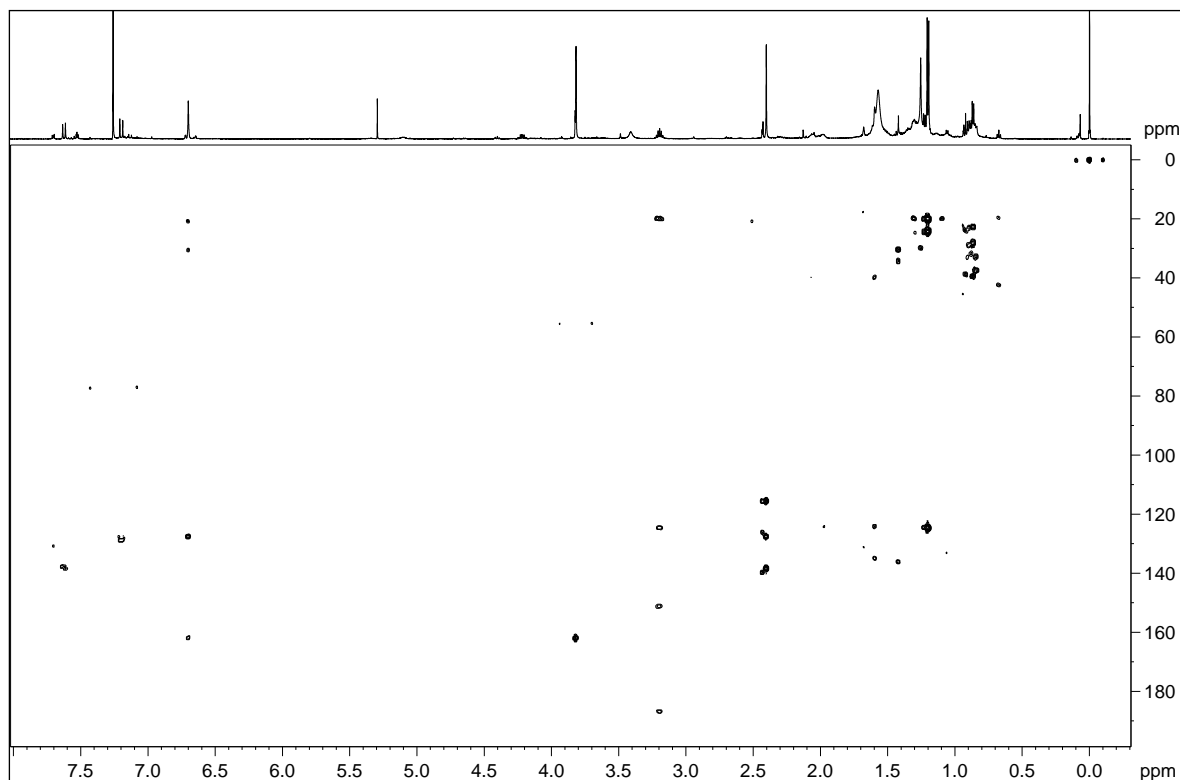


FIGURA 24. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL2** (CDCl_3 , 600 MHz).

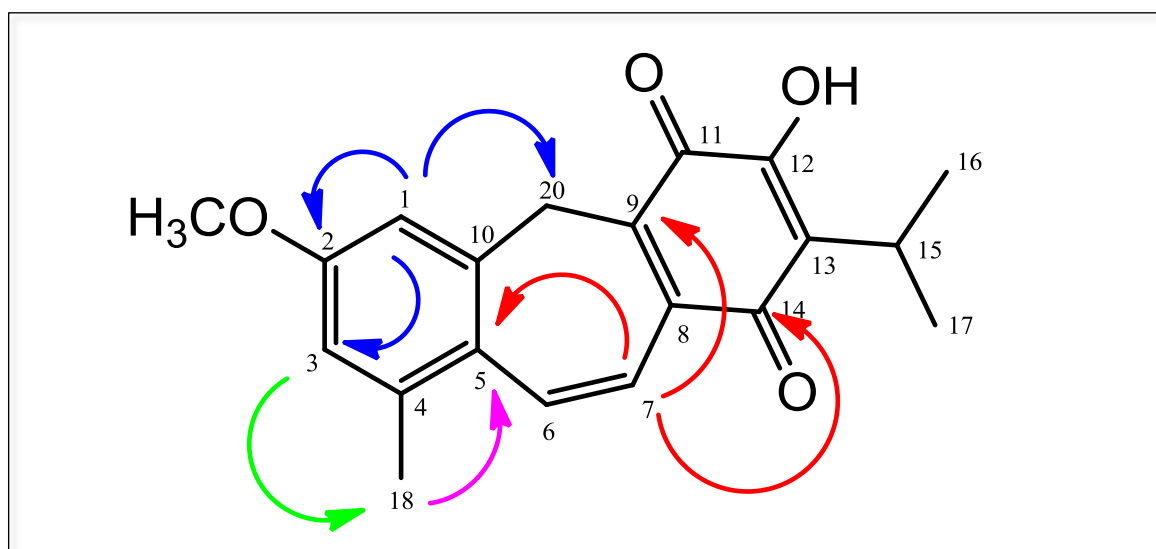


FIGURA 25. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL2**.

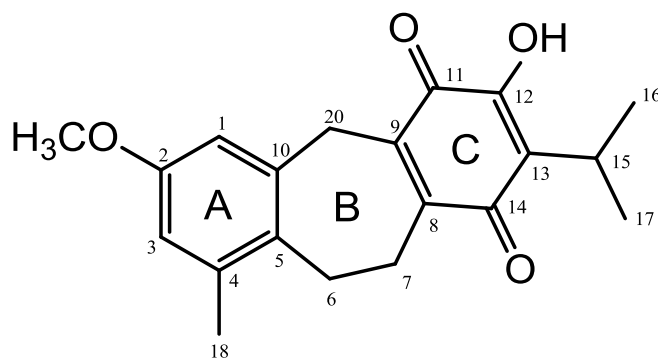
TABELA 10. Dados de RMN de **SL2** (CDCl₃, 600 MHz).

Posição	δ_c	δ_H (m, J em Hz)	HMBC
1	110,3	6,69 (s)	2, 3, 5, 20
2	162,0	-	-
3	115,6	6,70 (s)	1, 2, 5, 18
4	138,4	-	-
5	127,6	-	-
6	138,1	7,62 (d, 12,1)	4, 8
7	122,4	7,20 (d, 12,1)	5, 9, 14
8	137,9	-	-
9	128,8	-	-
10	137,9	-	-
11	181,8	-	-
12	151,1	-	-
13	124,5	-	-
14	186,7	-	-
15	24,4	3,20 (hept, 7,0)	12, 13, 14, 16, 17
16	20,0	1,20 (d, 7,0)	13, 15, 17
17	20,0	1,20 (d, 7,0)	13, 15, 16
18	20,6	2,40 (s)	3, 4, 5
20	30,6	3,41 (s)	1, 5, 8, 11
OCH ₃	55,4	3,82 (s)	-
OH	-	7,12 (s)	-

4.3. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **SL3**.

A substância **SL3** foi obtida como um sólido vermelho que mostrou uma única mancha nas análises por CCDA. Entretanto, seu espectro de RMN ¹H revelou uma mistura de ao menos duas substâncias, pois apresentou alguns sinais duplicados, com valores de integral diferentes. Comparando o espectro de **SL3** com outras substâncias já isoladas, foi observada a presença de **SL2** como constituinte majoritário. Por integração dos grupos metila, obteve-se a proporção de 2:1 de **SL2** em relação a **SL3**. Até o momento não foi possível obter a substância **SL3** pura, porém isso não impediu a sua identificação. De acordo com a integração dos sinais no espectro de hidrogênio, e as correlações observadas nos mapas de contorno, foi possível elucidar a sua estrutura. Os dados de RMN de ¹H de **SL3** (FIGURA 26) foram muito similares aos de **SL1** e **SL2**, diferindo principalmente pela ausência dos hidrogênios olefínicos do anel B, e presença

de três grupos metilênicos em δ_{H} 2,79 (*m*, 2H), 3,04 (*m*, 2H), e 3,95 (*m*, 2H). Portanto o anel B deve ter sido hidrogenado em comparação em **SL1** e **SL2**. As correlações a uma ligação (HSQC, FIGURA 27) e a longa distância (HMBC, FIGURA 28) confirmaram essa hipótese. O mapa de correlação HSQC indicou que os hidrogênios em δ_{H} 3,04 (H-7) estavam ligados ao carbono em δ_{C} 24,3, os hidrogênios em δ_{H} 2,79 (H-6) ao carbono em δ_{C} 27,3, e os hidrogênios em δ_{H} 3,95 (H-20) ao carbono em δ_{C} 28,7. No HMBC, H-20 mostrou correlações com os carbonos em δ_{C} 112,0 (C-1) e 183,7 (C-11), enquanto que H-7 mostrou correlações com os carbonos em δ_{C} 136,7 (C-4), 130,9 (C-5), 27,3 (C-6), 146,1 (C-9) e 139,9 (C-10). Não foi observado o sinal referente à carbonila em C-14. Diante desses dados e das demais correlações no HSQC e HMBC (TABELA 11; FIGURA 29) **SL3** foi identificada como 7,20-diidrofruticulina A, uma substância que foi primeiramente obtida por hidrogenação catalítica da fruticulina A (**SL1**) (RODRIGUEZ-HAHN *et al.*, 1989) e, recentemente isolada de *S. corrugata* (BISIO *et al.*, 2016). Os nossos dados de RMN coincidem, dentro do erro experimental, com aqueles publicados por BISIO *et al.* (2016) (TABELA 11).

**SL3**

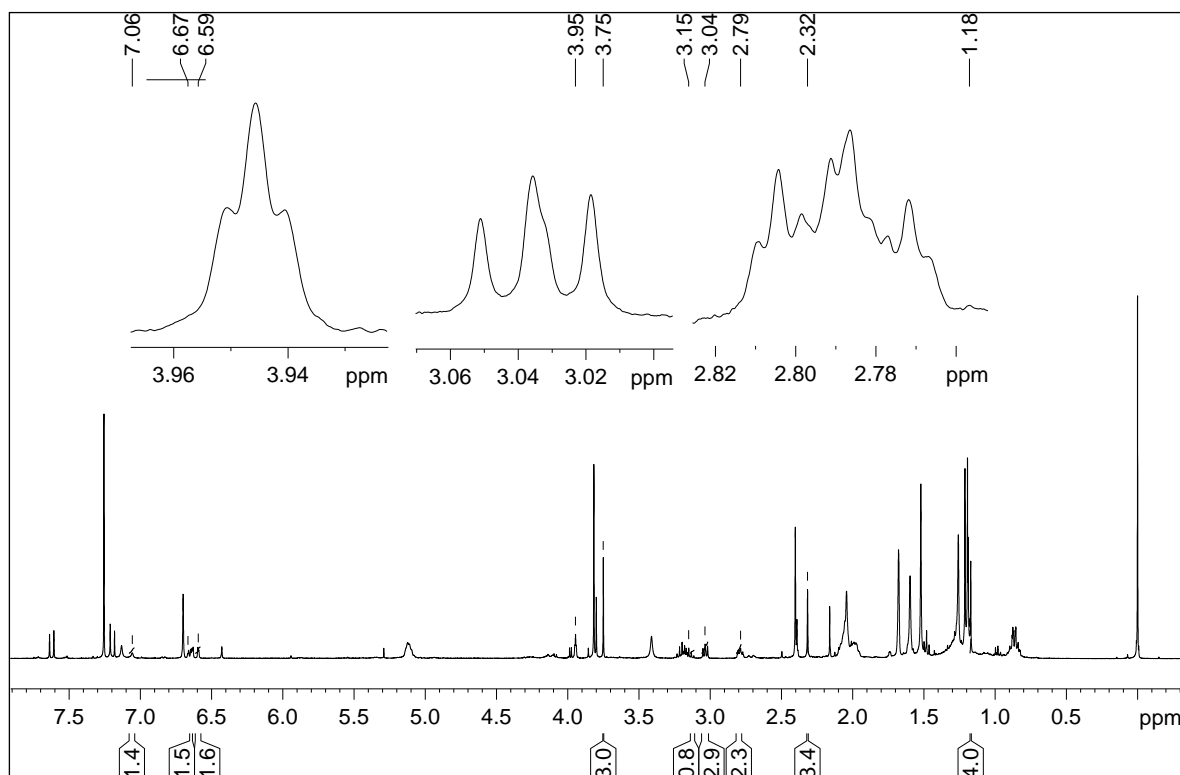


FIGURA 26. Espectro de RMN de ^1H de **SL3**, com ampliação da região dos grupos metilênicos (CDCl_3 , 400 MHz).

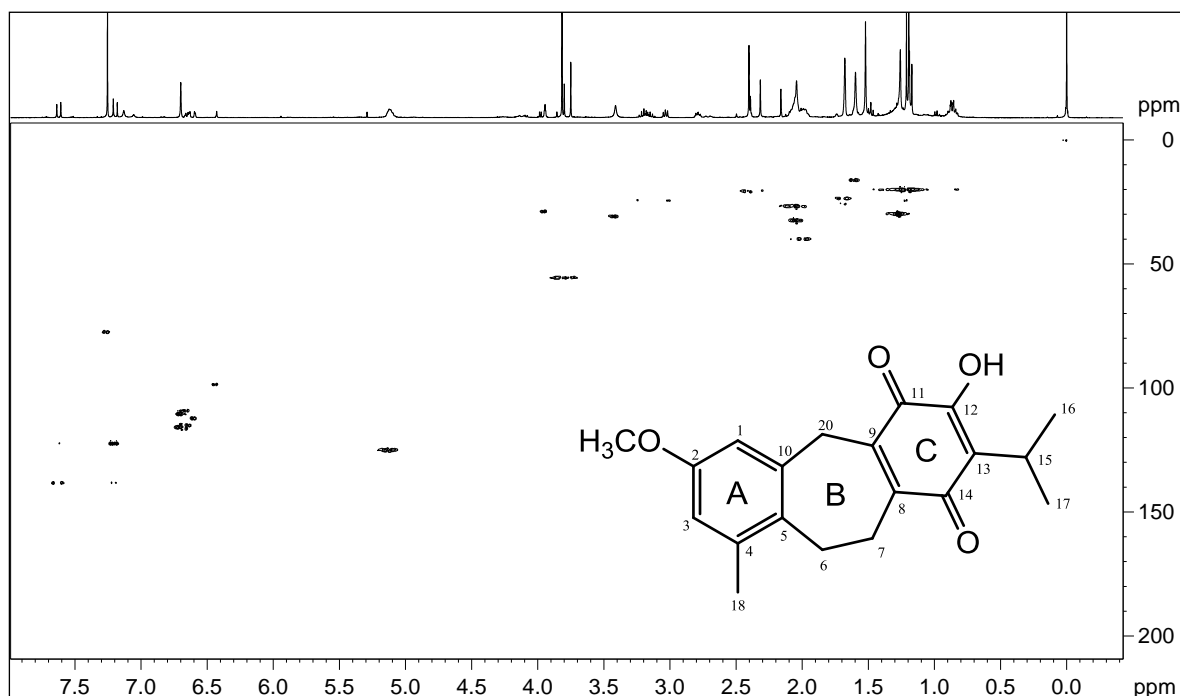


FIGURA 27. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) de **SL3** (CDCl_3 , 400 MHz).

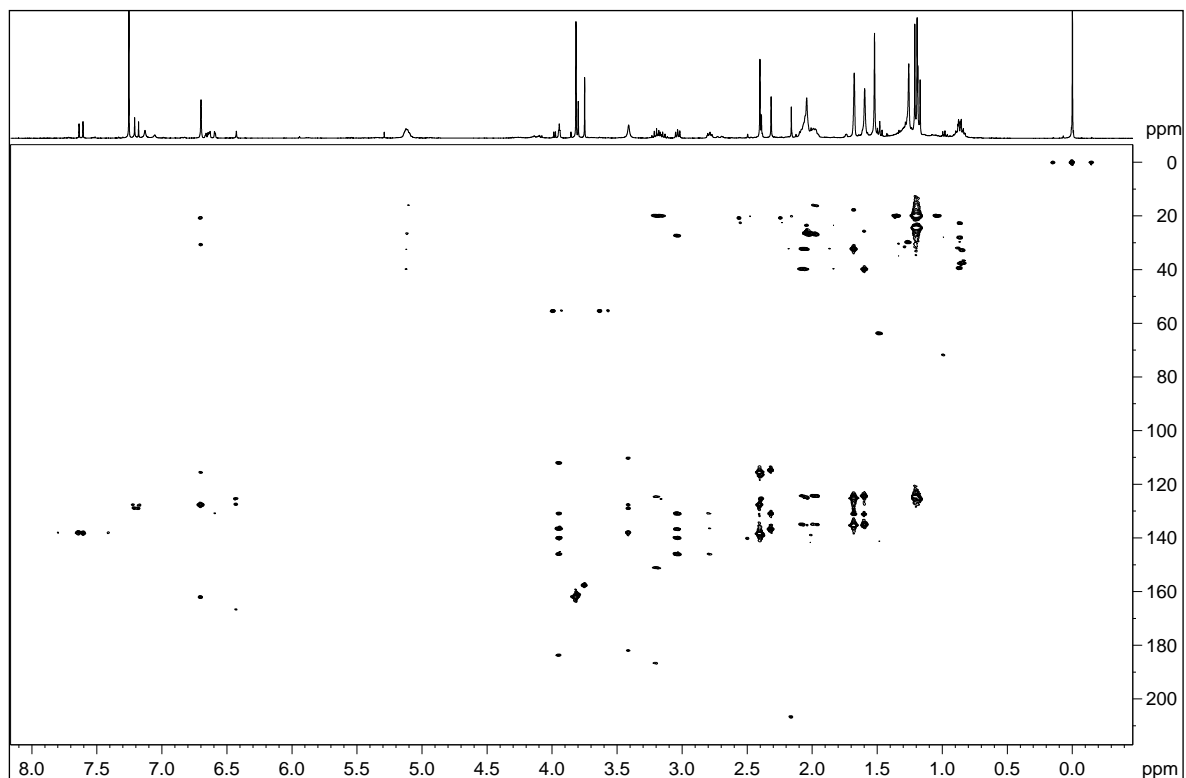


FIGURA 28. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL3** (CDCl_3 , 400 MHz).

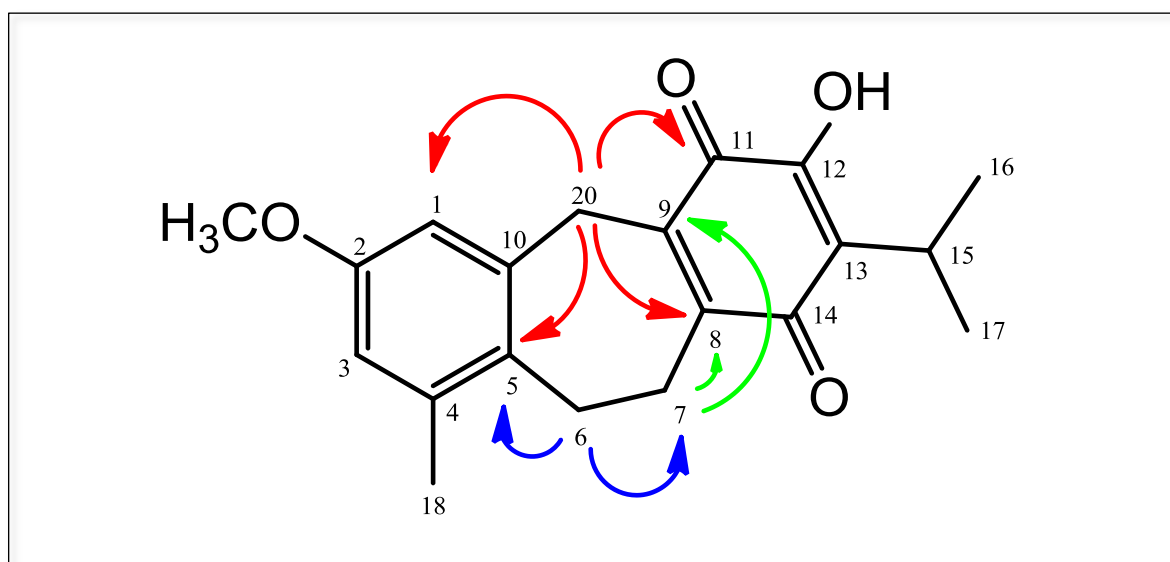


FIGURA 29. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL3**.

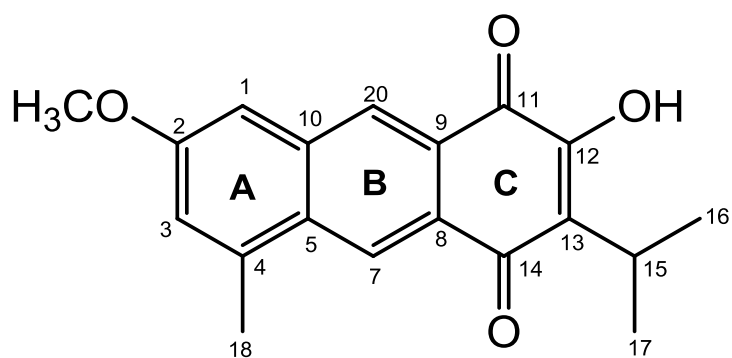
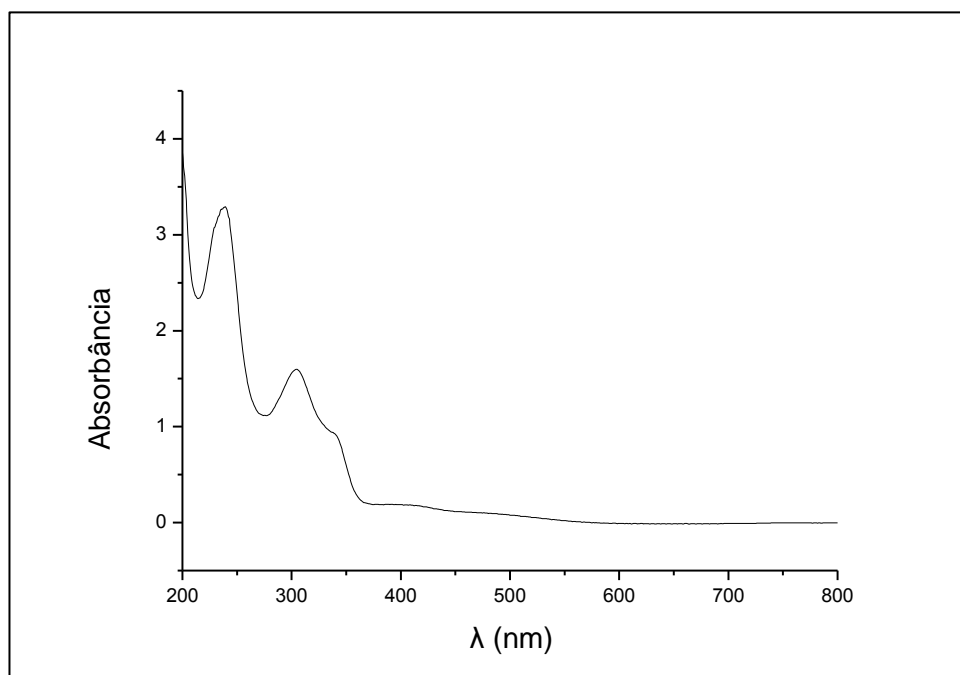
TABELA 11. Dados de RMN de **SL3** (CDCl₃, 400 MHz) comparados com dados da literatura para a 7,20-diidrofruticulina A (CDCl₃, 600 MHz, BISIO *et al.*, 2016).

Pos.	SL3			7,20-diidrofruticulina A	
	δ_C	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (m, J em Hz)
1	112,0	6,59 (d, 2,5)	3, 5	112,9	6,60 (d, 1,4)
2	157,7	-	-	158,7	-
3	114,8	6,67 (d, 2,5)	-	115,6	6,64 (d, 1,4)
4	136,7	-	-	137,6	-
5	130,9	-	-	132,3	-
6	27,3	2,79 (m)	4, 5, 9	27,9	2,79 (m)
					2,81 (m)
					3,03 (m)
7	24,3	3,04 (m)	4, 5, 7, 9, 10	24,9	3,05 (m)
8	146,1	-	-	147,4	-
9	146,1	-	-	147,6	-
10	139,9	-	-	139,6	-
11	183,7	-	-	185,2	-
12	150,0	-	-	151,4	-
13	125,5	-	-	126,6	-
14	n.o.	-	-	188,9	-
15	24,4	3,15 (hept, 7,0)	12, 13, 16, 17	25,5	3,15 (hept, 7,0)
16	20,0	1,18 (d, 7,0)	13, 15, 17	21,3	1,18 (d, 7,0)
17	20,0	1,18 (d, 7,0)	13, 15, 16	21,3	1,17 (d, 7,0)
18	20,3	2,32 (s)	3, 4, 5	20,3	2,32 (s)
20	28,7	3,95 (m)	1, 4, 5, 8, 9, 10, 11	29,8	3,94 (s)
OH	-	7,06 (s)	-	-	-
OCH ₃	55,4	3,75 (s)	2	56,1	3,75 (s)

n.o. = não observado.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **SL4**.

A substância **SL4** foi isolada como um sólido cristalino alaranjado. O espectro UV-vis apresentou três bandas de absorção, sendo duas em 237 e 304 nm, característicos de cromóforo benzeno substituído, outra mais fraca em 339 nm, a qual justifica as conjugações de ligações duplas presente na substância **SL1** (FIGURA 30). O seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 31) apresentou semelhanças com o espectro de **SL1**. Foram observados os sinais do grupo isopropila, δ_{H} 1,35 (*d*, $J = 7,2$ Hz, 6H) e δ_{H} 3,49 (*hept*, $J = 7,2$ Hz, 1H), de um grupo metila ligado ao anel aromático em δ_{H} 2,74 (*s*, 3H), de um grupo metoxila (δ_{H} 3,95, *s*, 3H), de um grupo hidroxila (δ_{H} 7,55, *s*) e de quatro hidrogênios na região de aromáticos, sendo dois simpletos integrando para um hidrogênio cada (δ_{H} 8,45 e 8,69) e dois sinais típicos de hidrogênios em *meta* em anel aromático (δ_{H} 7,14 e 7,16, *d*, $J = 2,4$ Hz). Esses dados sugerem a presença de dois anéis aromáticos. Um deles é idêntico ao anel A em **SL1**, **SL2**, e **SL3**. O outro apresenta os hidrogênios mais desprotegidos, que devem estar em *para* e próximos aos grupos carbonila de uma quinona. No espectro de RMN de ^1H de **SL4** não foram observados sinais de quaisquer hidrogênios alifáticos, além daqueles do grupo isopropila, sugerindo que a substância **SL4** é aromática e não tem anel de sete membros como as substâncias apresentadas anteriormente. No HMBC foi observado que o hidrogênio em δ_{H} 8,45 fazia correlações com os carbonos δ_{C} 106,1 (C-1), δ_{C} 126,8 (C-8), δ_{C} 130,5 (C-5), e δ_{C} 181,7 (C-11), enquanto que o hidrogênio em δ_{H} 8,69 mostrava correlações com os carbonos em δ_{C} 136,5 (C-10), 126,2 (C-9), 139,2 (C-4) e 184,3 (C-14) (FIGURA 34). Essas e as demais correlações observadas (TABELA 12) levaram à estrutura abaixo, que foi identificada como fruticulina B, uma substância já isolada de *S. fruticulosa* (RODRIGUEZ-HAHN *et al.*, 1989). Embora conhecida, fruticulina B é rara na natureza. De acordo com a nossa revisão bibliográfica, esse é o segundo relato de isolamento desta substância. As atribuições de RMN de ^1H de H-7 e H-20 diferem daquelas da literatura (TABELA 12) em função das correlações observadas nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 32) e HMBC (FIGURA 33). Os dados de RMN de ^{13}C foram obtidos pela primeira vez.

**SL4**FIGURA 30. Espectro de UV-Vis (MeOH) da substância **SL4**.

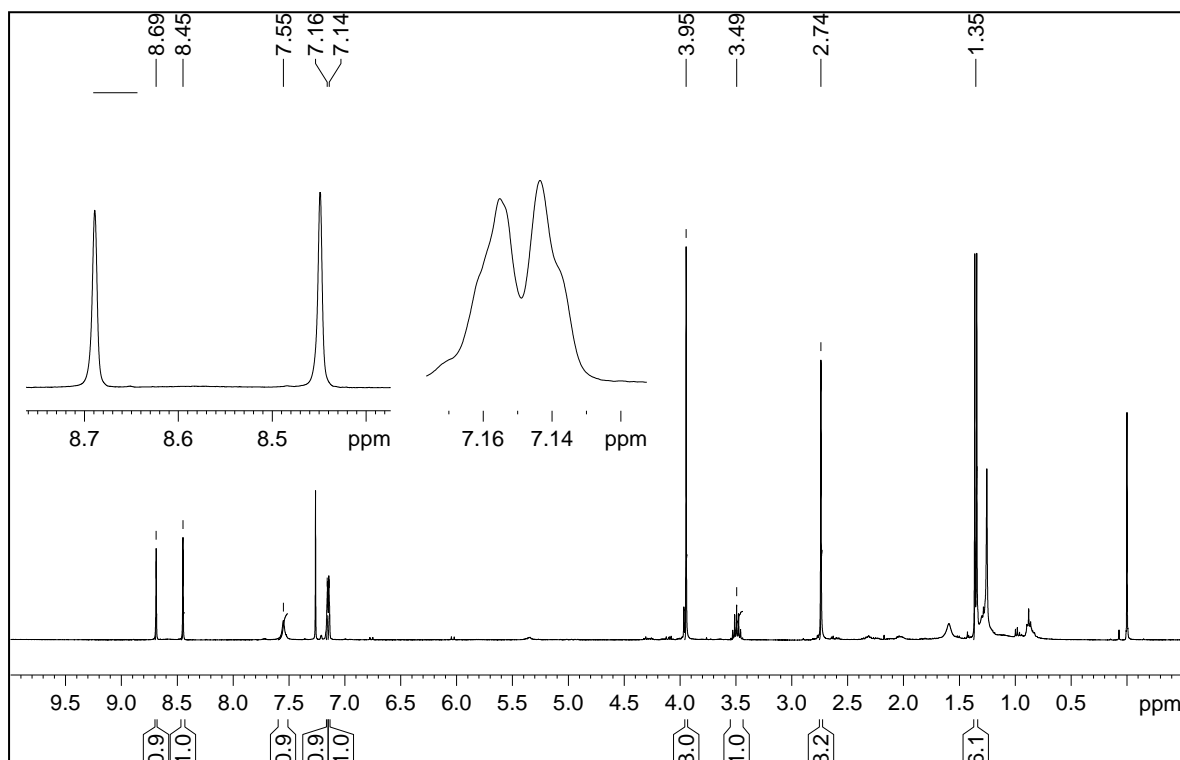


FIGURA 31. Espectro de RMN de ^1H de **SL4**, com ampliação da região aromática (CDCl_3 , 400 MHz).

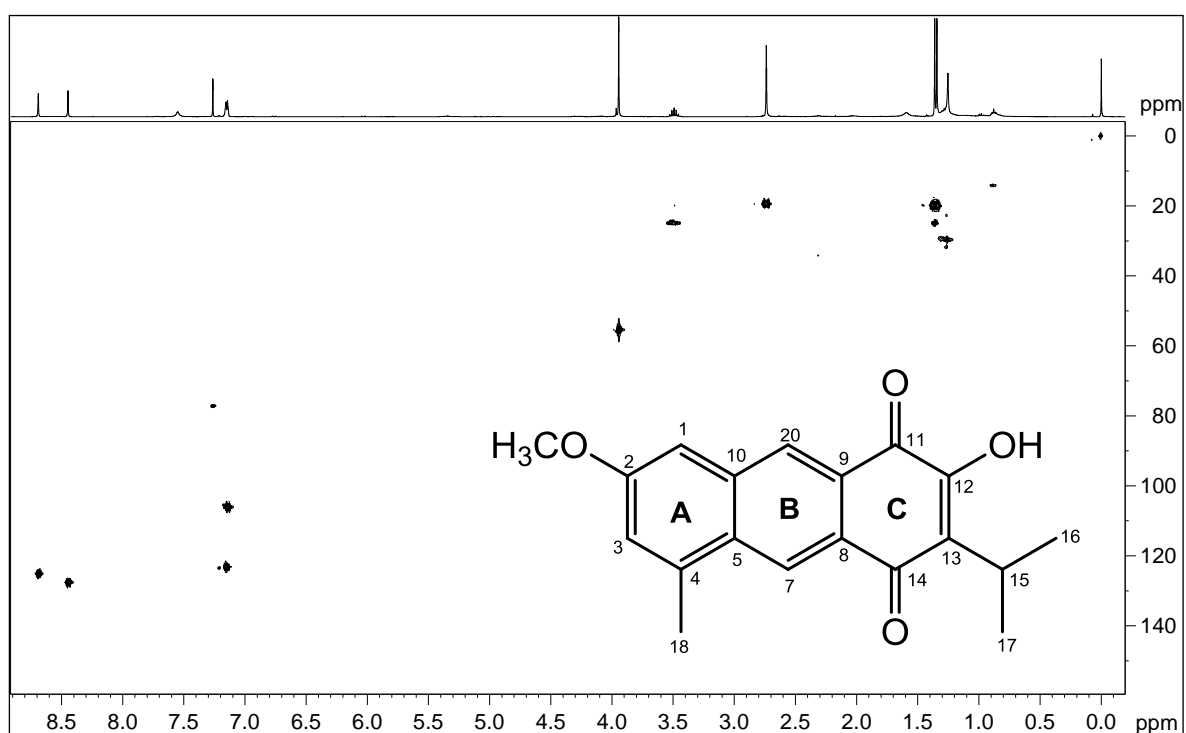


FIGURA 32. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL4** (CDCl_3 , 400 MHz).

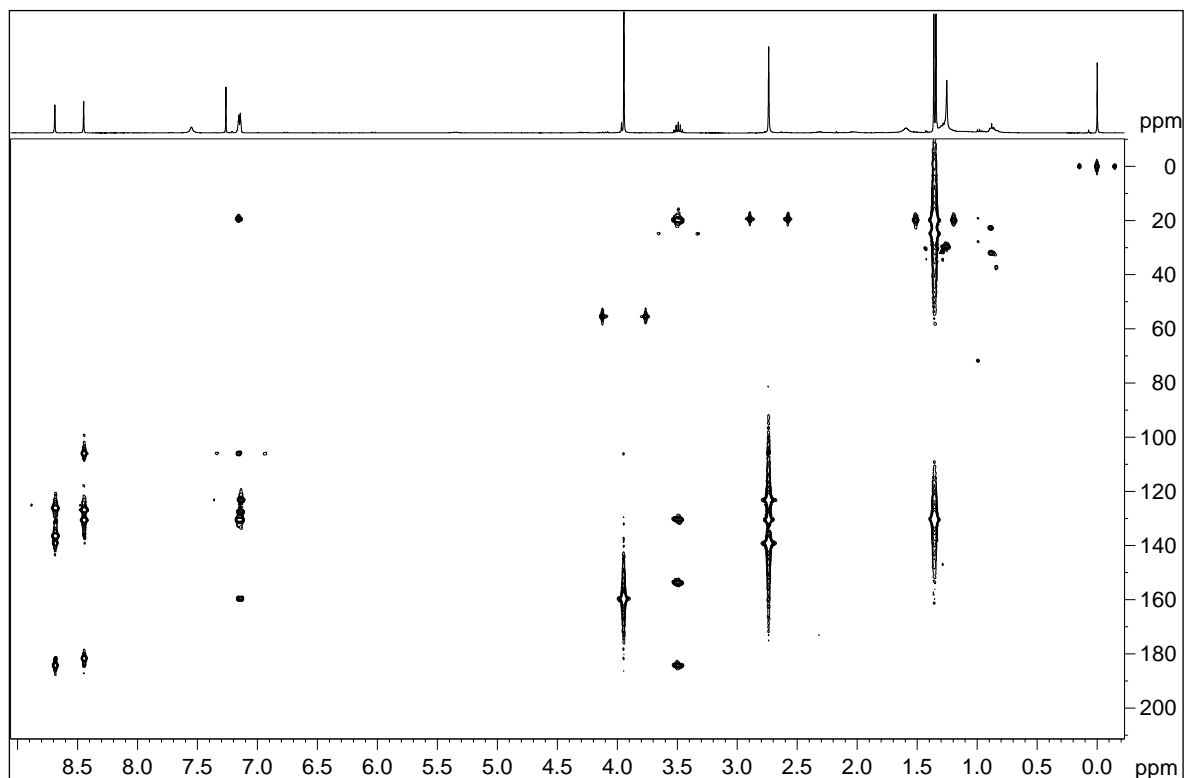


FIGURA 33. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL4** (CDCl_3 , 400 MHz).

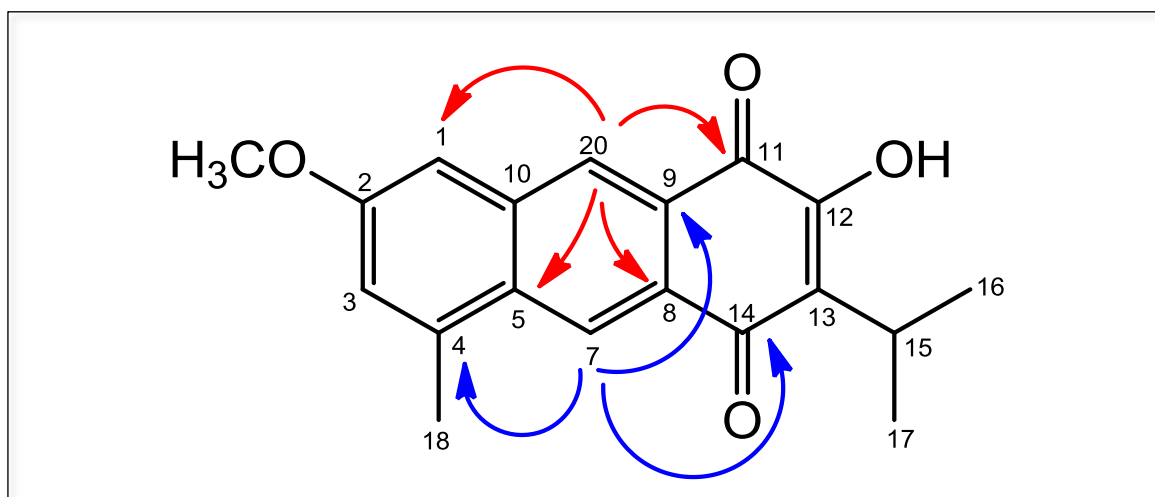


FIGURA 34. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL4**.

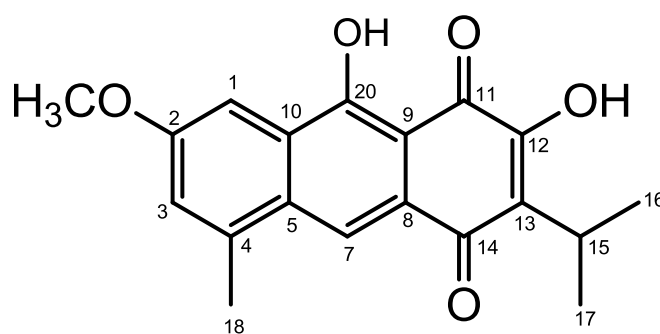
TABELA 12. Dados de RMN de **SL4** (CDCl₃, 400 MHz) comparados com dados da literatura para fruticulina B (CDCl₃, 80 MHz, RODRIGUEZ-HAHN *et al.*, 1989).

Pos.	SL4			Fruticulina B
	δ_C	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_H (m, J em Hz)
1	106,1	7,14 (d, 2,4)	2, 3, 5, 20	7,10 (s)
2	159,7	-	-	-
3	123,2	7,16 (d, 2,4)	1, 2, 5, 18	7,10 (s)
4	139,2	-	-	-
5	130,5	-	-	-
7	125,2	8,69 (s)	4, 9, 10, 14	8,40 (s)
8	126,8	-	-	-
9	126,2	-	-	-
10	136,5	-	-	-
11	181,7	-	-	-
12	153,7	-	-	-
13	130,3	-	-	-
14	184,3	-	-	-
15	24,8	3,49 (hept, 7,2)	12, 14, 16, 17	3,45 (hept, 7,0)
16	19,9	1,35 (d, 7,2)	13, 15, 17	1,35 (d, 7,0)
17	19,9	1,35 (d, 7,2)	13, 15, 16	1,35 (d, 7,0)
18	19,5	2,74 (s)	3, 4, 5	2,70 (s)
20	127,6	8,45 (s)	1, 5, 8, 11	8,65 (s)
OH	-	7,55 (s)	-	7,50 (s)
OCH ₃	55,4	3,95 (s)	2	3,95 (s)

4.5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA **SL5**.

A substância **SL5** foi isolada como um sólido vermelho em mistura com **SL4**. Apesar disso foi possível deduzir a sua estrutura e fazer a atribuição dos sinais de RMN. O seu espectro de RMN de ¹H (FIGURA 35) apresentou semelhanças com o da substância **SL4**, sendo observados os sinais característicos dos anéis A e C (TABELA 13). Entretanto, foi observado apenas um hidrogênio desprotegido (δ_H 8,24, s), juntamente com o sinal de uma hidroxila em ligação de hidrogênio intramolecular (δ_H 12,6). Esse dado sugeriu a presença de uma hidroxila nas posições C-7 ou C-20.

Considerando que os hidrogênios em δ_H 3,48 (H-15) e δ_H 8,24 (H-7) mostram correlações no HMBC com o mesmo grupo carbonila (δ_C 183,6, C-14), a hidroxila deve estar em C-20. As demais correlações nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 36) e HMBC (FIGURAS 37 e 38) confirmaram a estrutura **SL5**, uma substância inédita, identificada como 20-hidroxifruticulina B.



SL5

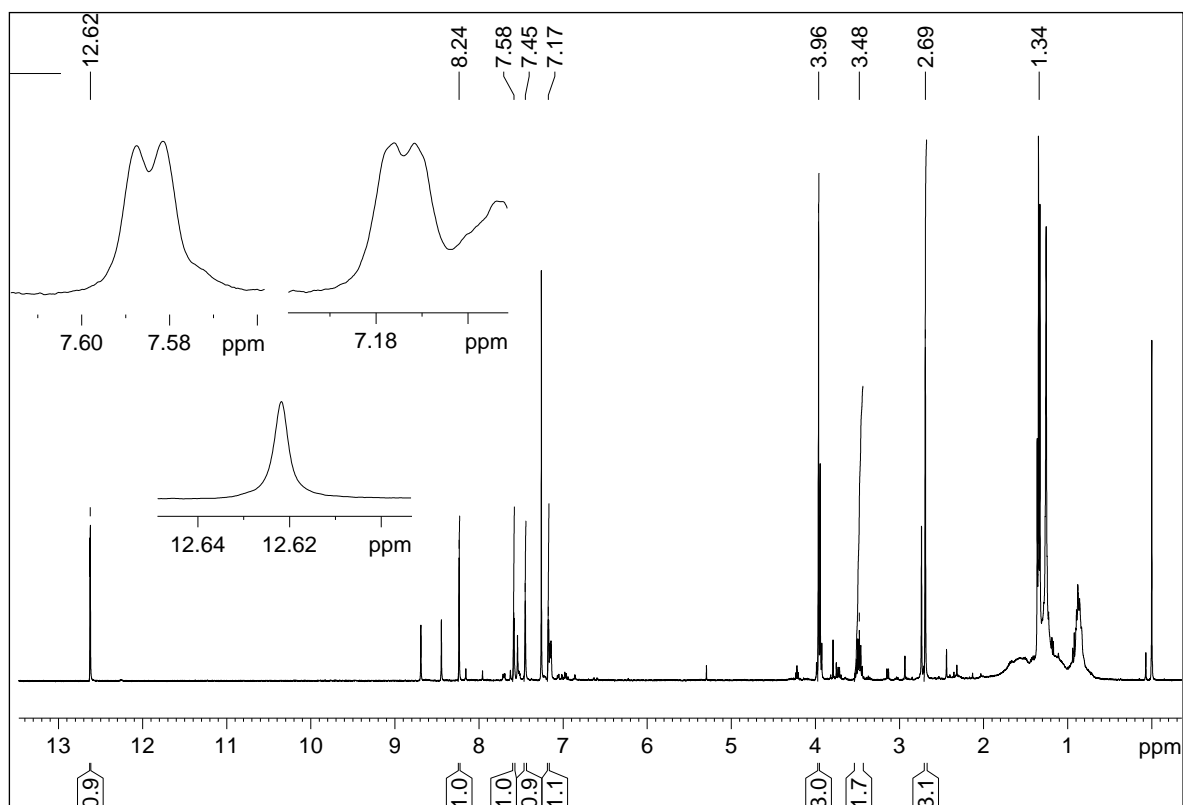


FIGURA 35. Espectro de RMN de ^1H de **SL5**, com ampliação das regiões aromática e da hidroxila quelada em C-20 (CDCl_3 , 400 MHz).

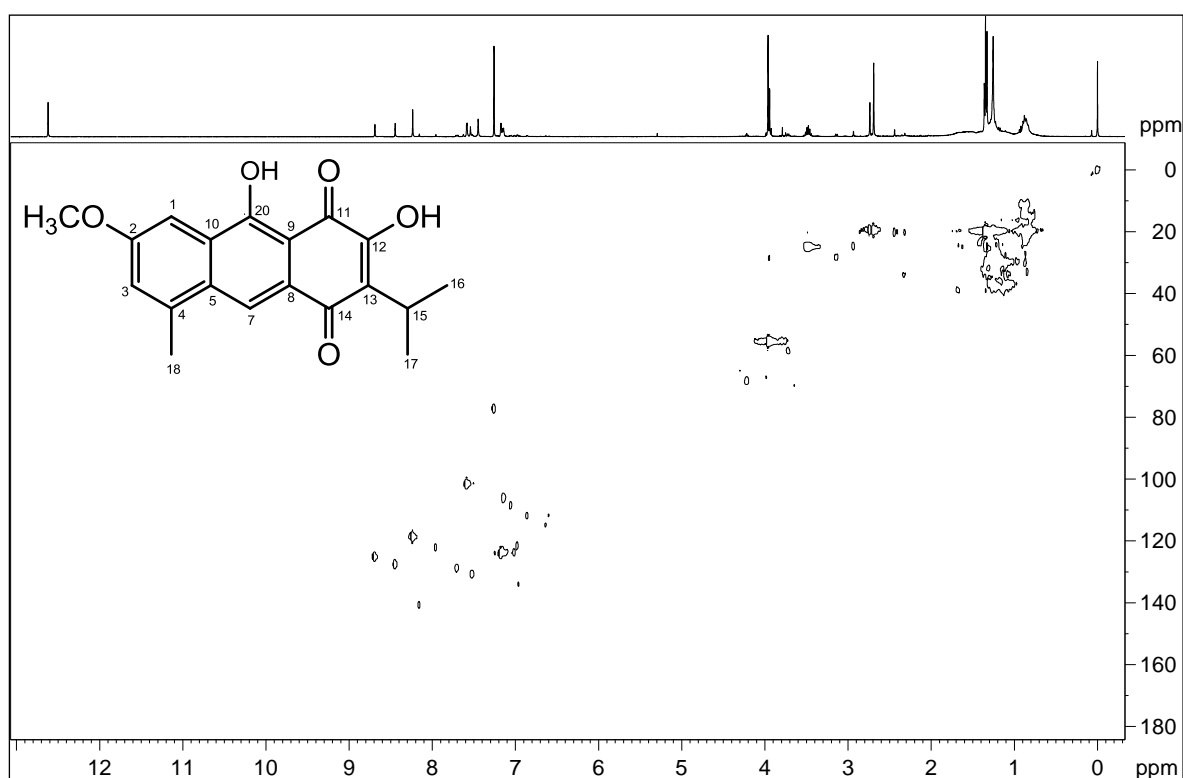


FIGURA 36. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) de **SL5** (CDCl_3 , 400 MHz).

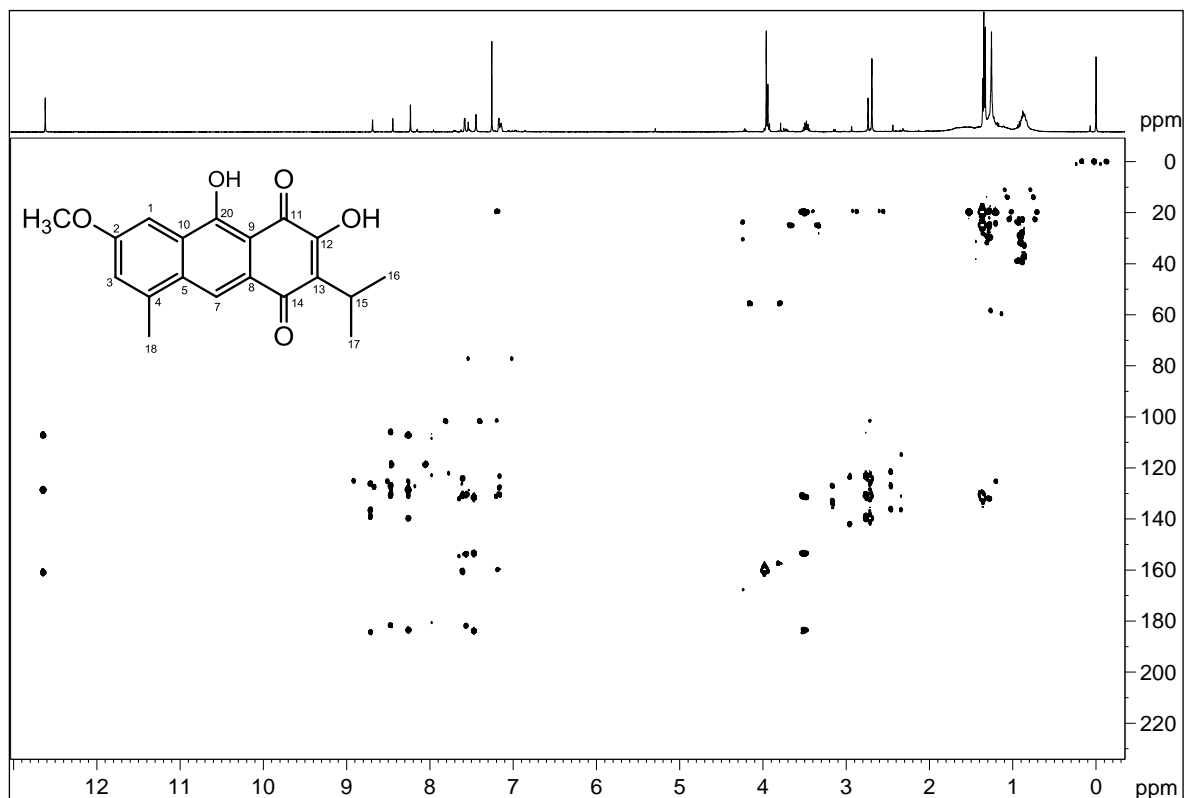


FIGURA 37. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL5** (CDCl_3 , 400 MHz).

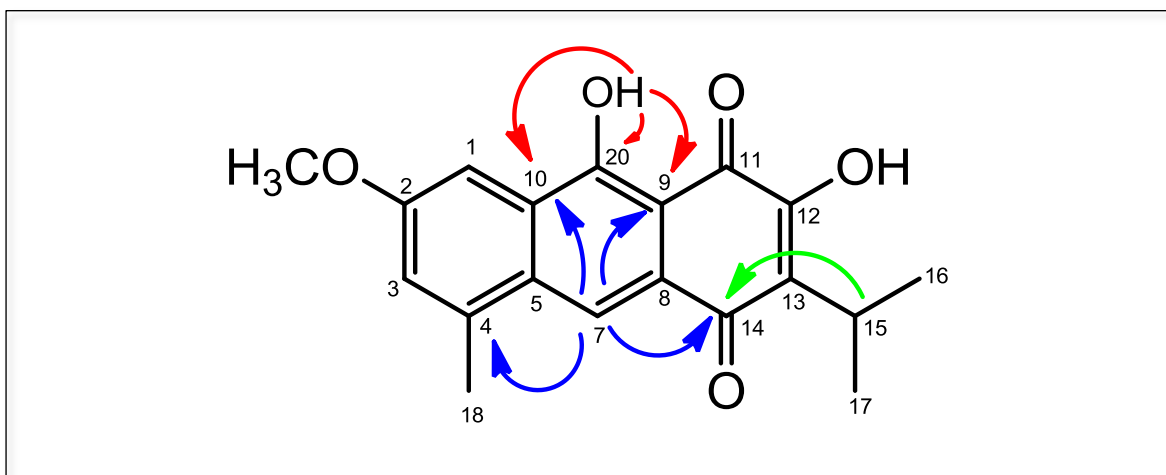


FIGURA 38. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL5**.

TABELA 13. Dados de RMN de **SL5** (CDCl₃, 400 MHz)

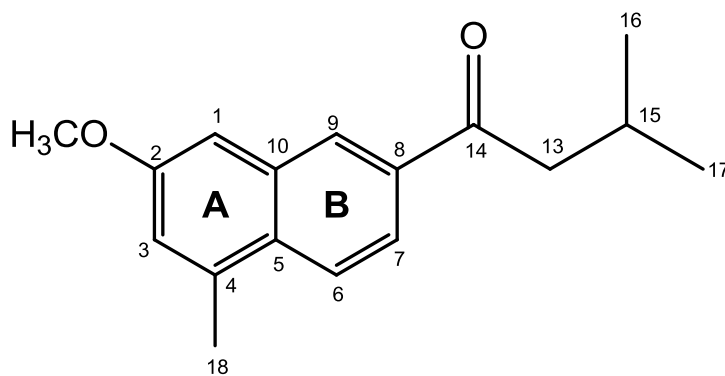
Posição	δ_c	δ_H (m, J em Hz)	HMBC
1	101,6	7,58 (d, 2,4)	3, 5, 20
2	159,8	-	-
3	124,2	7,17 (d, 2,4)	1, 18
4	139,8	-	-
5	131,1	-	-
7	118,8	8,24 (s)	4, 9, 10, 14
8	n.o.	-	-
9	107,2	-	-
10	128,6	-	-
11	183,9	-	-
12	153,5	-	-
13	131,6	-	-
14	183,6	-	-
15	25,0	3,48 (hept, 6,9)	12, 13, 14, 16, 17
16	19,9	1,34 (d, 6,9)	12, 15, 17
17	19,9	1,34 (d, 6,9)	12, 15, 16
18	19,6	2,69 (s)	3, 4, 5
OCH ₃	55,7	3,96 (s)	2
OH-12	-	7,45 (sl)	11, 12, 13
OH-20	-	12,6 (sl)	9, 10, 20

n.o. = não observado.

4.6. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA **SL6**.

A substância **SL6** foi isolada como um sólido vermelho com fórmula molecular C₁₇H₂₀O₂, dada pelo espectro de massas de alta resolução que apresentou um pico em *m/z* 257,1542 para o íon *pseudo*-molecular [M + H]⁺ (FIGURA 39). O espectro de UV-Vis apresentou duas bandas intensas de absorção, em 262 e 286 nm, características do cromóforo benzeno substituído (FIGURA 40). O seu espectro de RMN de ¹H (FIGURA 41) apresentou sinais de hidrogênios na região de aromáticos, distribuídos em dois sistemas de spins. No primeiro foi observado um simpleto largo, centrado em δ_H 7,11, integrando para dois hidrogênios. No segundo conjunto de spin foram observados três sinais em δ_H 7,95 (d, J = 8,7 Hz), 7,90 (dd, J = 8,7 e 1,7 Hz) e 8,34 (d, J = 1,7 Hz), indicando um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. A presença de um duplete em δ_H 2,95

($J = 6,8, 2H$) revelou um grupo metileno vizinho a um hidrogênio metínico. Também foram observados um hepteto em $\delta_H 3,36$ ($J = 6,8$ Hz, 1H), e um duplete em $\delta_H 1,03$ ($J = 6,8$ Hz, 6H). Em conjunto, esses sinais de hidrogênios alifáticos indicam a presença de um grupo isobutílico na substância **SL6**. Além destes, dois simpletos em $\delta_H 2,67$ e $\delta_H 3,93$ integrando para três hidrogênios cada indicaram, respectivamente, um grupo metila ligado ao anel aromático e um grupo metoxila. As correlações observadas no HSQC (FIGURA 42) e HMBC (FIGURA 43) mostraram que os grupos metoxila e metila estavam ligados ao mesmo anel aromático, como o anel A das substâncias anteriores. Porém como o anel B de **SL6** era 1,3,4-trissubstituído, deveria ter uma cadeia lateral ao invés do anel C presente nos demais diterpenos. No HMBC os hidrogênios em $\delta_H 8,34$ (H-9) e $\delta_H 7,90$ (H-7) apresentaram correlação com um carbono em $\delta_C 200,5$ (C-14), estabelecendo a cadeia lateral em C-8, com um grupo carbonila de cetona vizinho ao anel aromático. Com estas e as demais correlações do HSQC e do HMBC (FIGURA 45; TABELA 14), a substância **SL6** foi identificada como 1-(7-metoxi-5-metil-naftalen-2-il)-3-metilbutan-1-ona, para a qual foi atribuído o nome lachnostachyona. Esta substância é inédita na literatura, e parece ser um derivado de um diterpeno com esqueleto abietano que perdeu quatro átomos de carbono: C-11, C-12, C-19 e C-20. A numeração dada ao esqueleto carbônico seguiu essa possível origem biogenética (FIGURA 44).

**SL6**

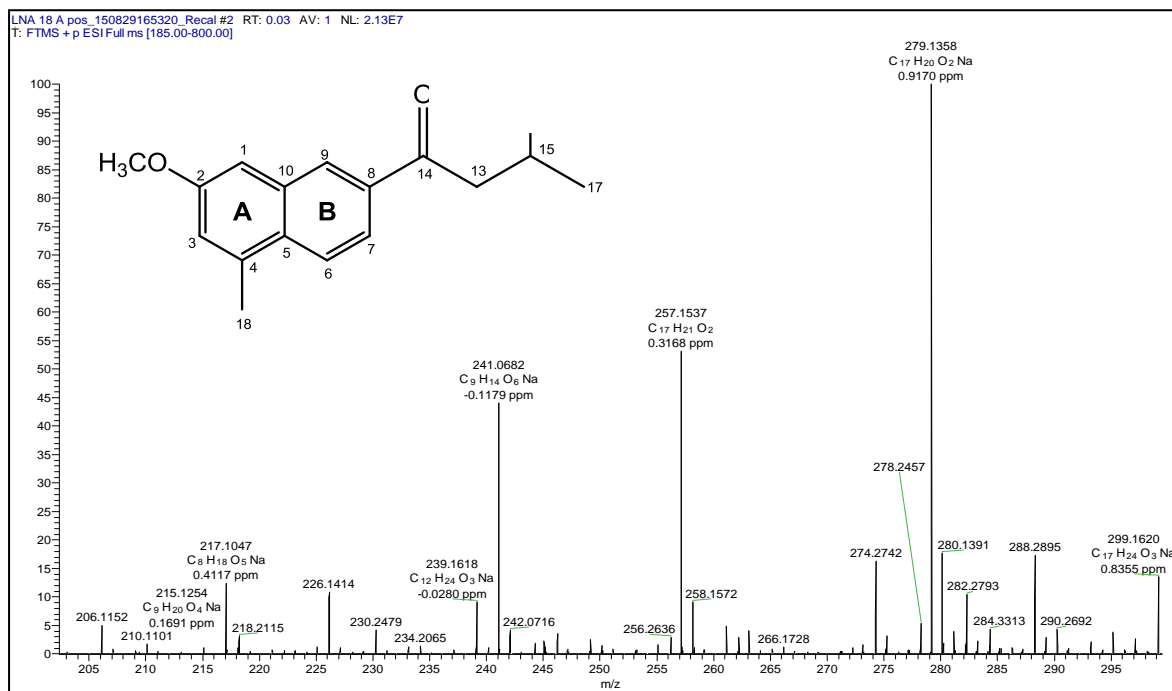


FIGURA 39. Espectro de Massas de Alta resolução no modo positivo de **SL6**.

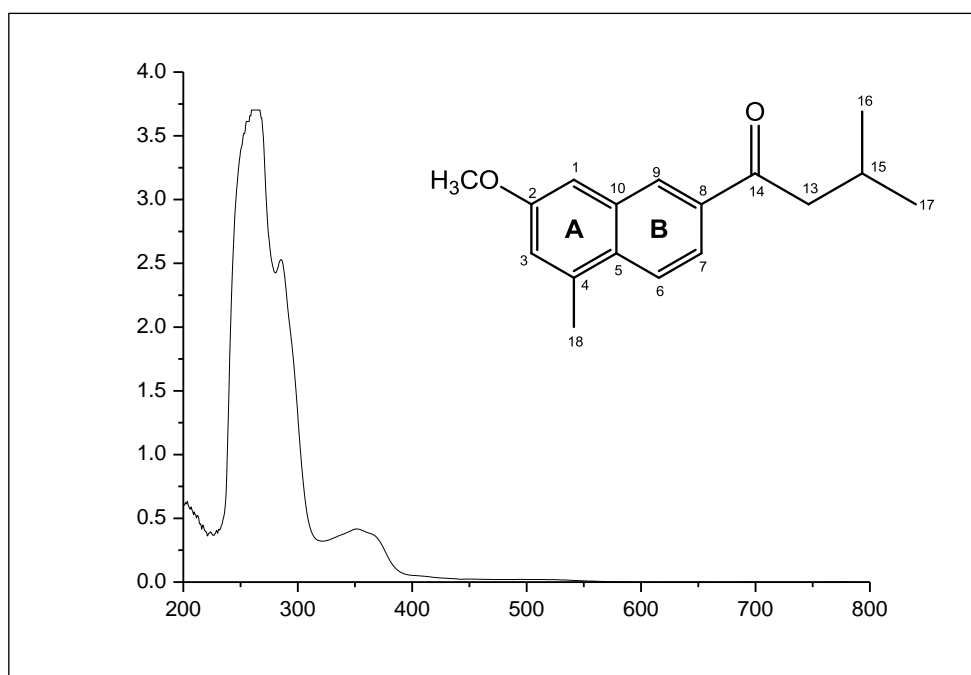


FIGURA 40. Espectro UV-Vis da substância **SL6** (MeOH).

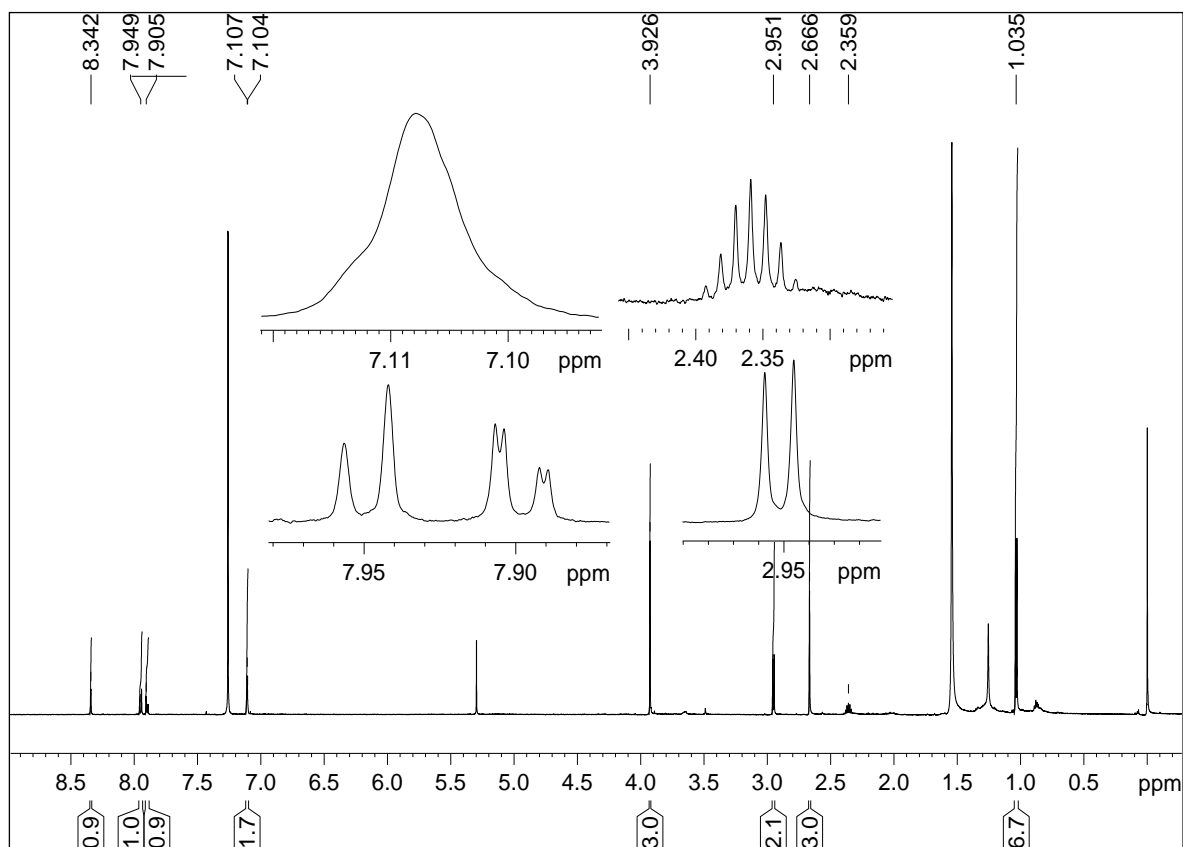


FIGURA 41. Espectro de RMN de ^1H de **SL6**, com ampliação das regiões aromática e alifática (CDCl_3 , 600 MHz).

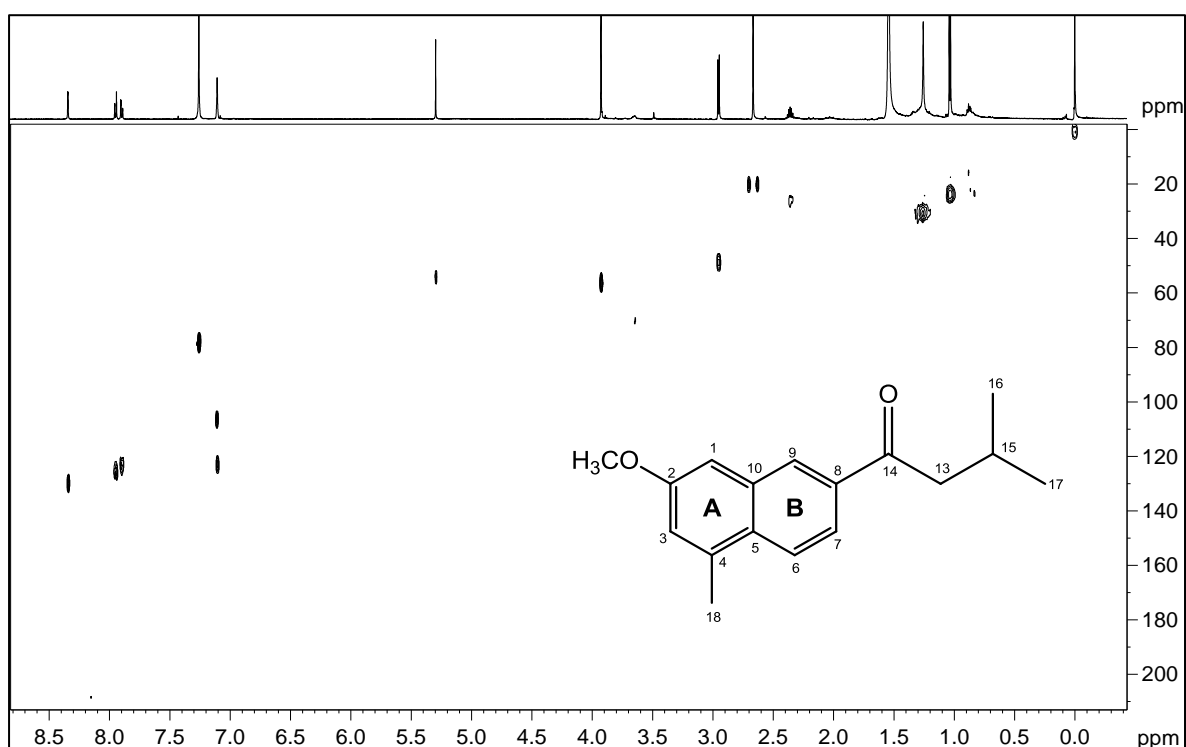


FIGURA 42. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL6** (CDCl_3 , 600 MHz).

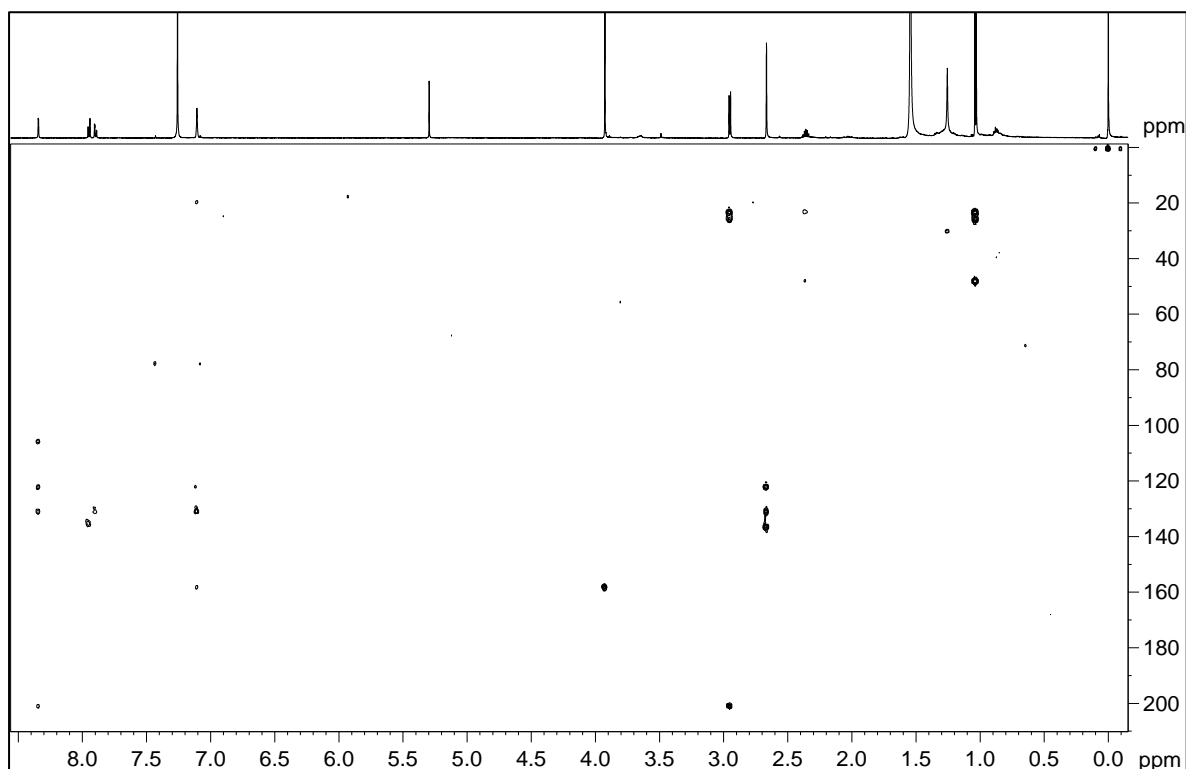


FIGURA 43. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL6** (CDCl_3 , 600 MHz).

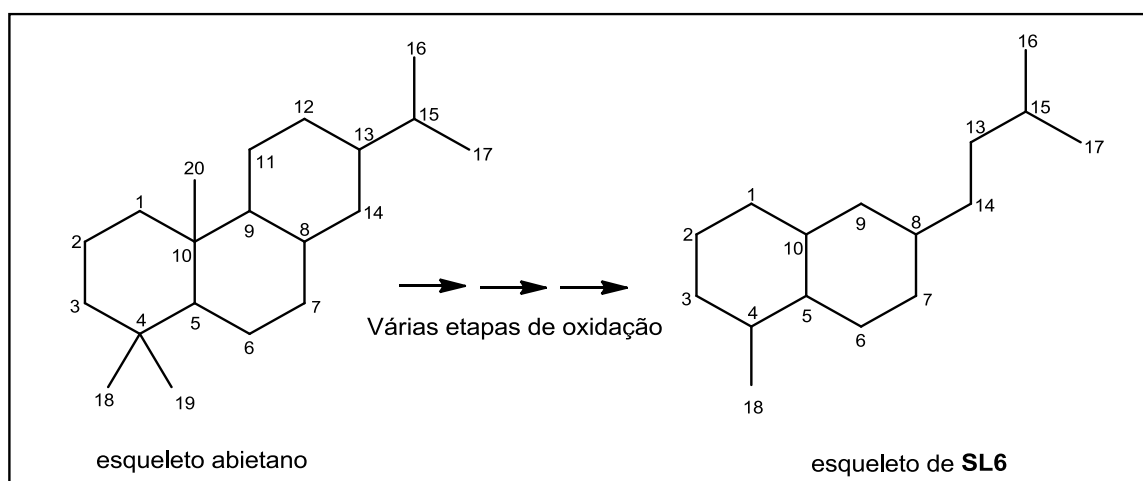


FIGURA 44. Esquema mostrando a possível formação do esqueleto de **SL6**.

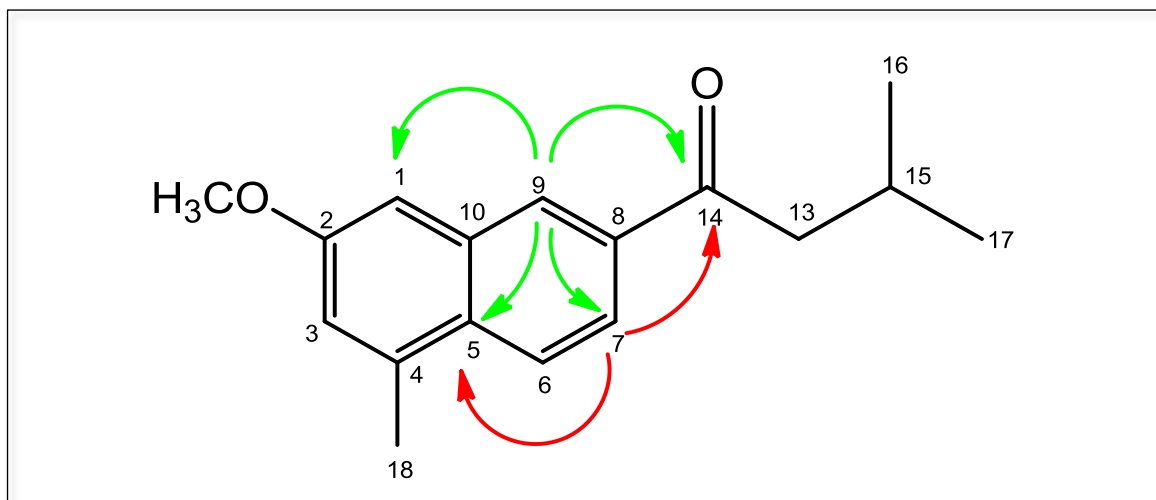


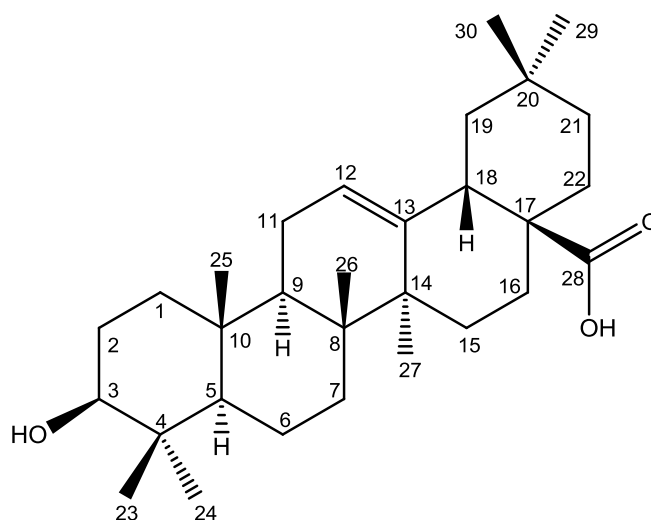
FIGURA 45. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL6**.

TABELA 14. Dados de RMN de **SL6** (CDCl_3 , 600 MHz).

Posição	δ_c	δ_H (m, J em Hz)	HMBC
1	105,5	7,107 (m)	2, 5, 9
2	157,7	-	-
3	121,9	7,104 (m)	1, 5
4	136,3	-	-
5	130,5	-	-
6	124,5	7,95 (d, 8,7)	4, 8
7	121,9	7,90 (dd, 8,7 e 1,7)	5, 14
8	135,4	-	-
9	129,1	8,34 (d, 1,7)	1, 7, 5, 14
10	134,1	-	-
13	47,8	2,95 (d, 6,8)	14, 15, 16, 17
14	200,5	-	-
15	25,5	2,36 (hept, 6,8)	16, 17
16	22,9	1,03 (d, 6,8)	13, 15, 17
17	22,9	1,03 (d, 6,8)	13, 15, 16
18	19,3	2,67 (s)	3, 4, 5
OCH_3	55,5	3,93 (s)	2

4.7. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **SL7**.

A substância **SL7** foi isolada como um sólido branco. No seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 46) foram observados sete simpletos característicos de grupos metila em δ_{H} 0,77 (H-26), 0,78 (H-24), 0,91 (H-29), 0,92 (H-25), 0,93 (H-30), 0,99 (H-23) e 1,14 (H-27), além de vários multipletos de hidrogênios metilênicos e metínicos. Entre estes sinais destacam-se, um tripleto em δ_{H} 5,28 ($J = 3,5$ Hz; 1H) característico de um hidrogênio olefínico (H-12), um duplo duplete em 3,21 ($J = 11,2$ e 4,7 Hz; 1H) pertencente a um hidrogênio carbinólico (H-3) e um duplo duplete em δ_{H} 2,83 ($J = 13,9$ e 4,3 Hz; 1H) compatível com um hidrogênio alílico (H-18). Esses dados indicam um triterpeno, em que um dos grupos metila foi substituído. O esqueleto carbônico de triterpenos com uma única ligação dupla pode ser determinado a partir dos deslocamentos químicos dos carbonos dessa ligação (OLEA & ROQUE, 1990). No caso de **SL7**, a análise dos mapas de contorno HSQC (FIGURAS 47 e 48) e HMBC (FIGURAS 49 e 50) mostrou que os deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla eram δ_{C} 122,4 (C-12) e 143,5 (C-13). Esse par indica o esqueleto olean-12-eno (OLEA & ROQUE, 1990). Com essa informação e a observação no HMBC de correlação entre H-18 e um carbono em δ_{C} 181,1 (C-28), **SL7** foi identificada como o ácido oleanólico (MAHATO & KUNDU, 1994; ALVES *et al.*, 2000). Essa substância é bastante comum no gênero *Salvia*, e já havia sido identificada anteriormente em *S. lachnostachys* como componente de uma mistura (ERBANO *et al.*, 2012), porém agora conseguimos obtê-la pura.



SL7

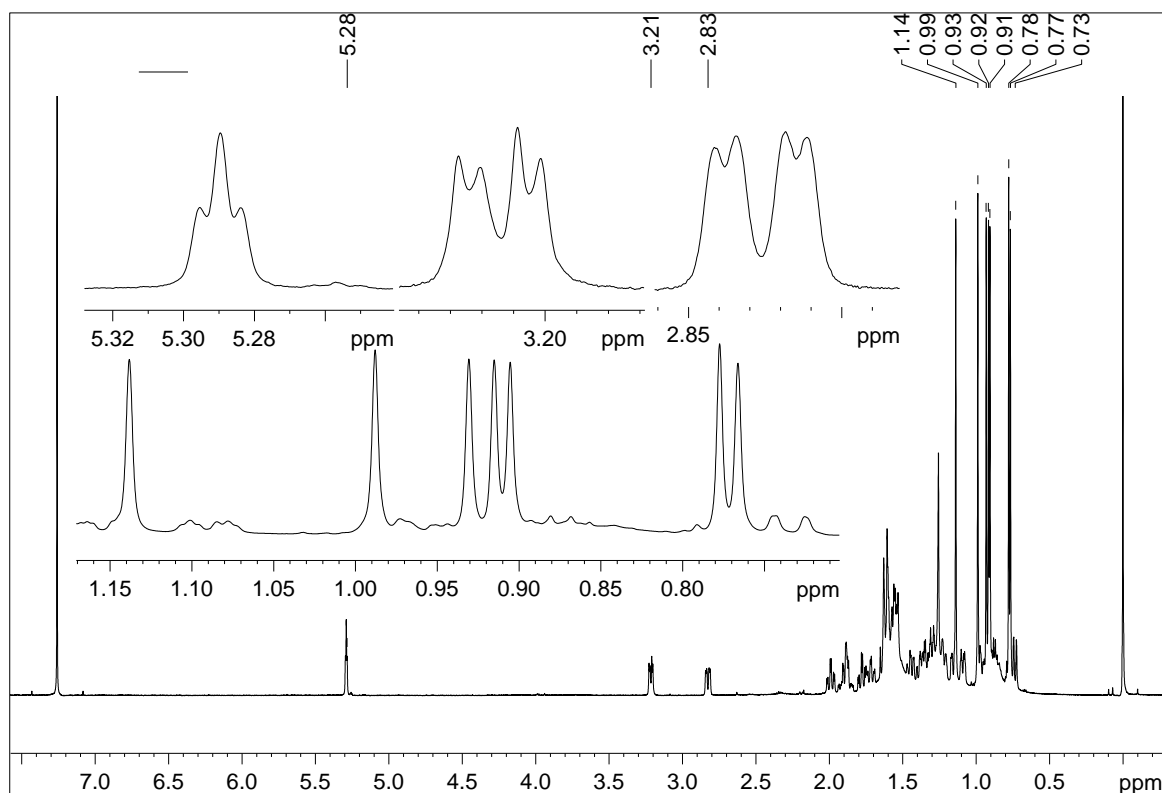


FIGURA 46. Espectro de RMN de ^1H de **SL7** (CDCl_3 , 400 MHz).

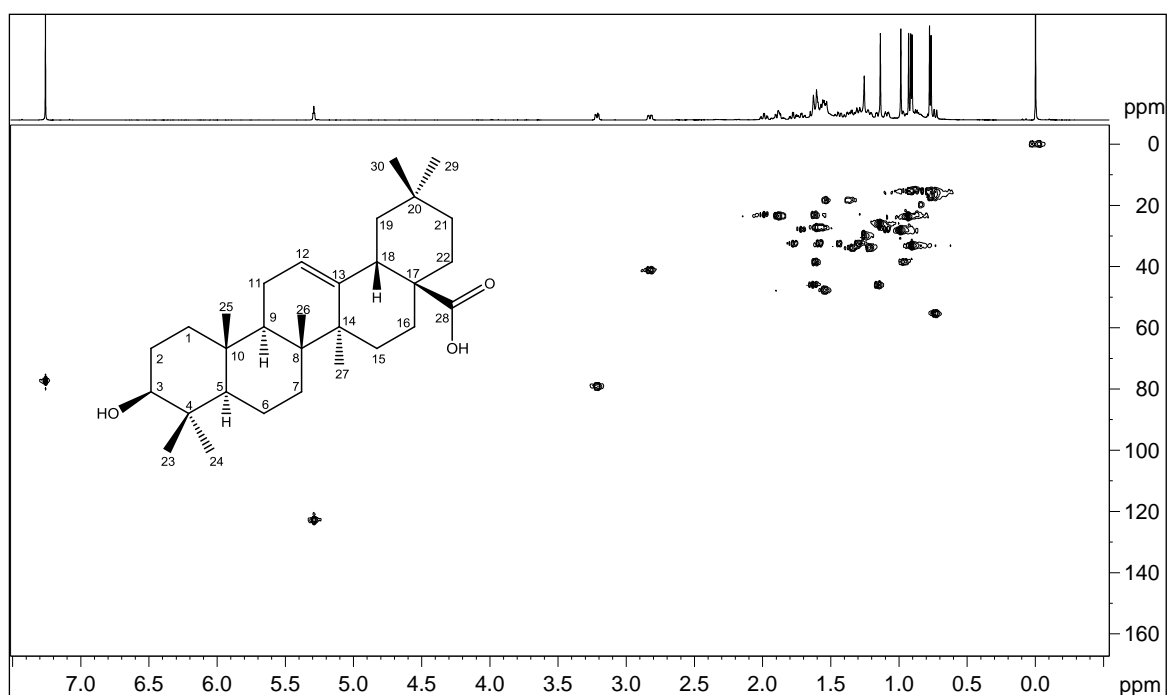


FIGURA 47. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) de **SL7** (CDCl_3 , 400 MHz).

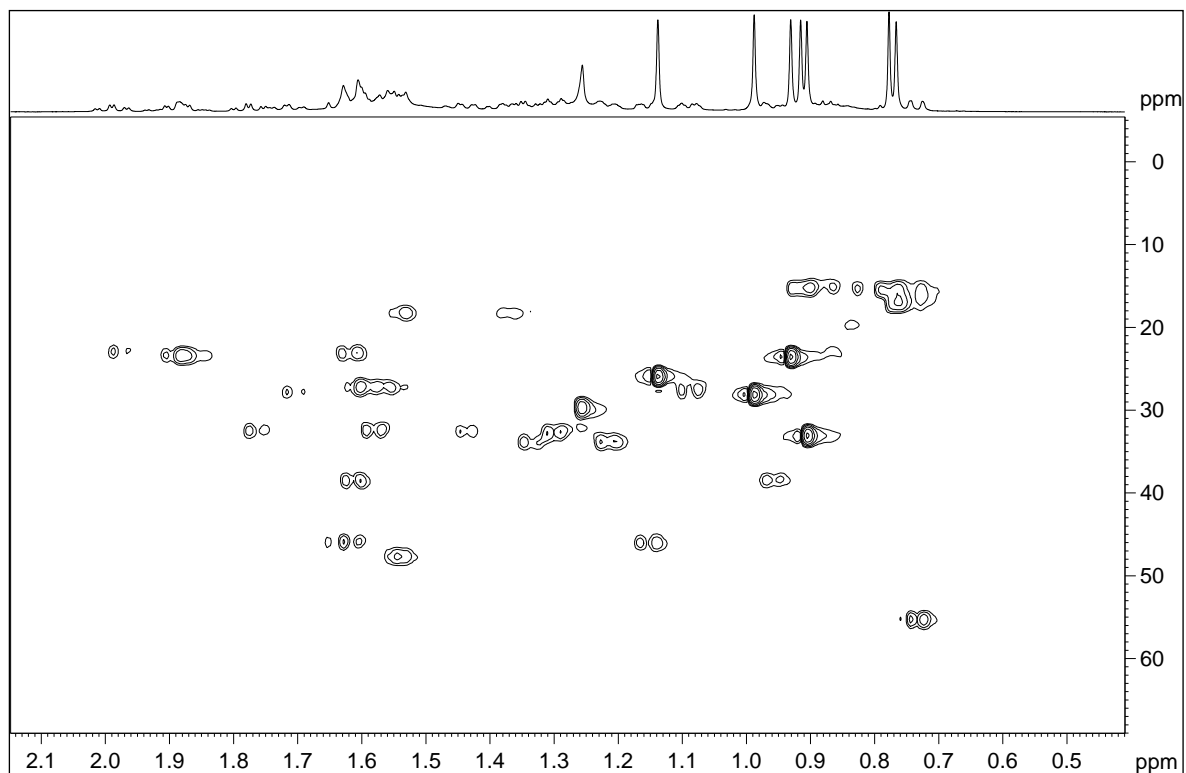


FIGURA 48. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL7**, com ampliação na região de hidrogênios metilênicos e metínicos (CDCl_3 , 400 MHz).

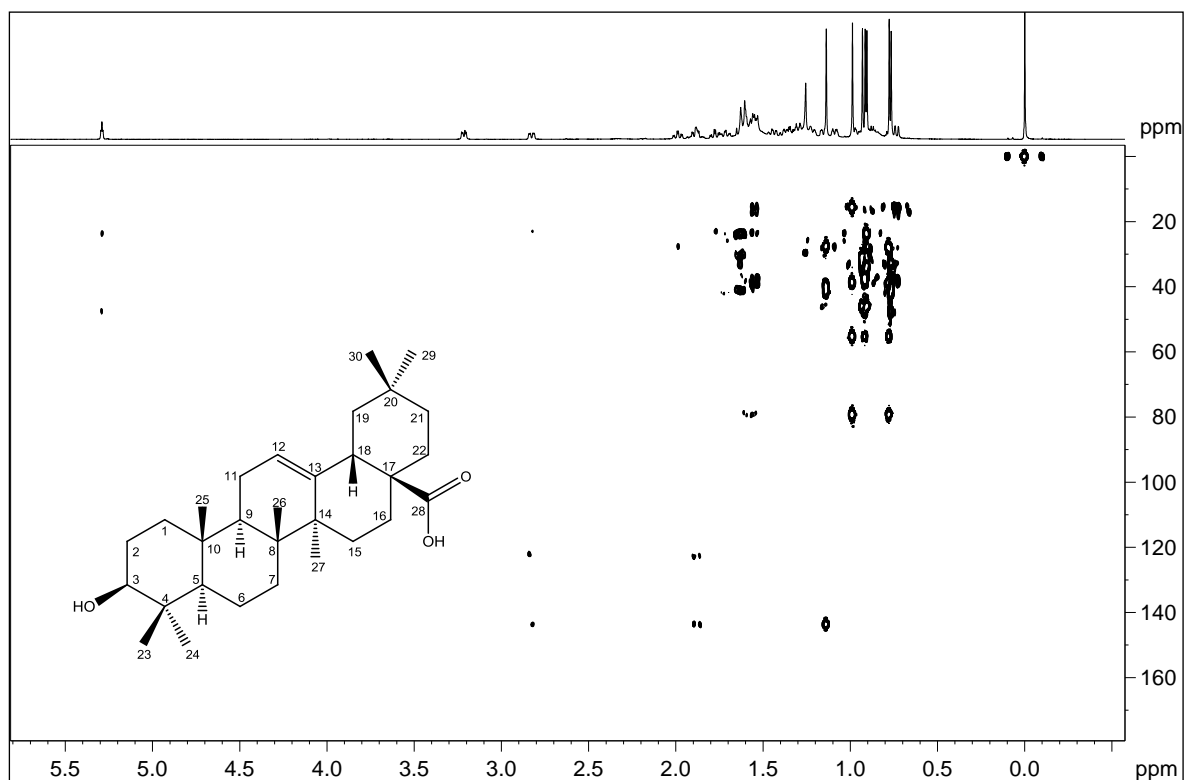


FIGURA 49. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL7** (CDCl_3 , 400 MHz).

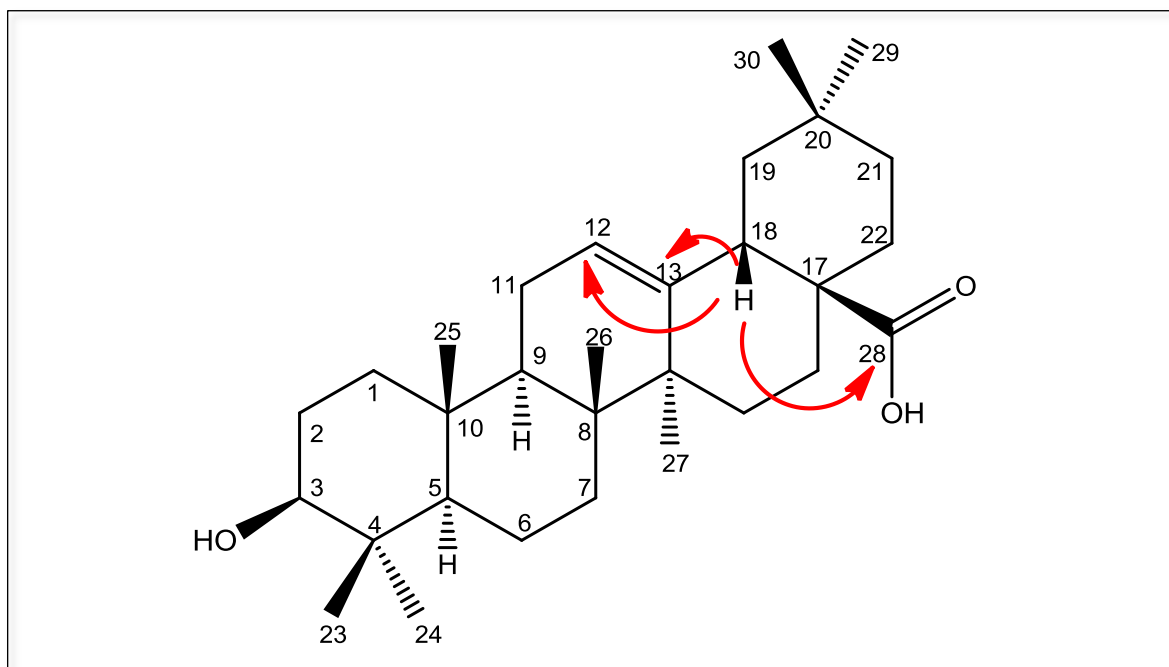


FIGURA 50. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL7**.

TABELA 15. Dados de RMN de **SL7** (CDCl₃, 400 MHz) comparados com dados da literatura para o ácido oleanólico (CDCl₃, 50 MHz, MAHATO & KUNDU, 1994; C₅D₅N, 600 MHz, SEEBACHER *et al.*, 2003).

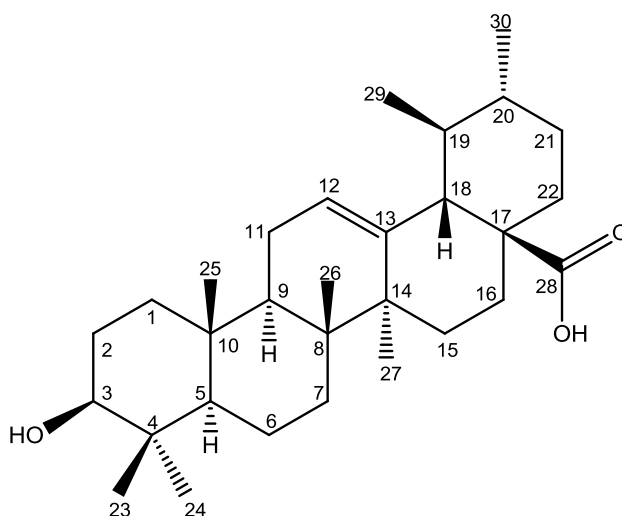
Pos.	SL7			Ácido oleanólico		
	δ_C	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_C^*	δ_C^{**}	δ_H (m, J em Hz)**
1	38,5	1,60 (m)	-	38,5	39,0	1,02, 1,57 (m)
2	28,1	1,63 (m)	-	27,4	28,1	1,82 (m)
3	79,2	3,21 (dd, 11,2, 4,7)	8, 10, 24	78,7	78,2	3,44 (dd)
4	38,7	-	-	38,7	39,4	-
5	55,2	0,73 (dd, 11,6, 1,9)	24, 10	55,2	55,9	0,88 (dd)
6	18,8	1,54 (m)	-	18,3	18,8	1,39, 1,58 (m)
7	32,6	1,34, 1,49 (m)	-	32,6	33,4	1,36, 1,53 (m)
8	39,9	-	-	39,3	39,8	-
9	47,4	1,55 (m)	-	47,6	48,2	1,71 (t)
10	37,4	-	-	37,0	37,4	-
11	23,5	1,86, 1,89 (m)	12, 13	23,1	23,8	1,96 (m)
12	122,4	5,28 (t, 3,5)		122,1	122,6	5,49 (s)
13	143,5	-	-	143,4	144,8	-
14	41,2	-	-	41,6	42,2	-
15	27,6	1,60 (m)	12, 14	27,7	28,4	2,19, 1,22 (m)
16	23,7	0,99 (m)	17	23,4	23,8	1,96 (m) 2,12 (t)
17	47,3	-	13, 14, 16	46,6	46,7	-
18	41,2	2,83 (dd, 13,9, 4,3)	12, 13, 28	41,3	42,1	3,30 (dd)
19	45,5	0,97 (m)	-	45,8	46,6	1,32, 1,83 (m)
20	30,8	-	-	30,6	31,0	-
21	33,6	1,62 (m)	-	33,8	34,3	1,23, 1,46 (m)
22	33,9	1,30 (m)	-	32,3	33,2	2,04, 1,82 (m)
23	28,1	0,99 (s)	3, 4, 5, 24	28,1	28,8	1,24 (s)
24	15,5	0,78 (s)	2, 3, 4, 5	15,6	16,5	1,02 (s)
25	15,9	0,92 (s)	5, 10	15,3	15,6	0,93 (s)
26	16,9	0,77 (s)	7, 8, 9, 14	16,8	17,5	1,04 (s)
27	25,9	1,14 (s)	13, 14, 15	26,0	26,2	1,30 (s)
28	181,1	-	-	181,0	180,0	-
29	33,2	0,91 (s)	19, 20, 21	33,1	33,4	0,97 (s)
30	23,6	0,93 (s)	19, 20	23,6	23,8	1,02 (s)

* CDCl₃, 50 MHz, ** C₅D₅N, 600 MHz

4.8. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **SL8**.

A substância **SL8** foi isolada como um sólido branco. O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 51) apresentou sinais de diversos grupos metila, metilênicos e metínicos, indicando que era também um triterpeno. Na região de hidrogênios olefínicos foram observados dois tripletos em δ_{H} 5,24 e δ_{H} 5,28, com uma integração relativa de 2:1, indicando uma mistura de triterpenos. Através do HSQC (FIGURA 54) foi observado que o hidrogênio em δ_{H} 5,24 estava ligado ao carbono em δ_{C} 125,7, enquanto o hidrogênio em δ_{H} 5,28 estava ligado ao carbono em δ_{C} 122,4. Considerando os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 (FIGURAS 52 e 53) observa-se mais de 30 carbonos, incluindo dois pares de carbonos olefínicos, um deles em δ_{C} 125,7 e 138,3, que é típico do esqueleto ursan-12-eno e outro em δ_{C} 122,4 e 143,5 que é característico do esqueleto olean-12-eno (OLEA & ROQUE, 1990). A presença de sinais de dois grupos carboxila (δ_{C} 180,9 e 181,1) mostrou tratar-se de dois ácidos triterpênicos. Com esses dados e os mapas de correlações a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC, FIGURA 55) foi possível atribuir os deslocamentos químicos e identificar o constituinte principal (**SL8**) como sendo o ácido ursólico (MAHATU & KUNDU, 1994), e o constituinte minoritário como o ácido oleanólico (**SL7**) já descrito.

Devido à semelhança estrutural entre **SL7** (ácido oleanólico) e **SL8** (ácido ursólico) é comum isolar os dois isômeros em misturas. Porém por meio de dados de RMN pode-se distinguir as duas substâncias, principalmente pelos deslocamentos químicos de H-18, C-18, C-12 e C-29 e, pela multiplicidade de H-29 (TABELA 16). A mistura desses dois triterpenos já havia sido obtida anteriormente na espécie *S. lachnostachys* (ERBANO *et al.*, 2012).



SL8

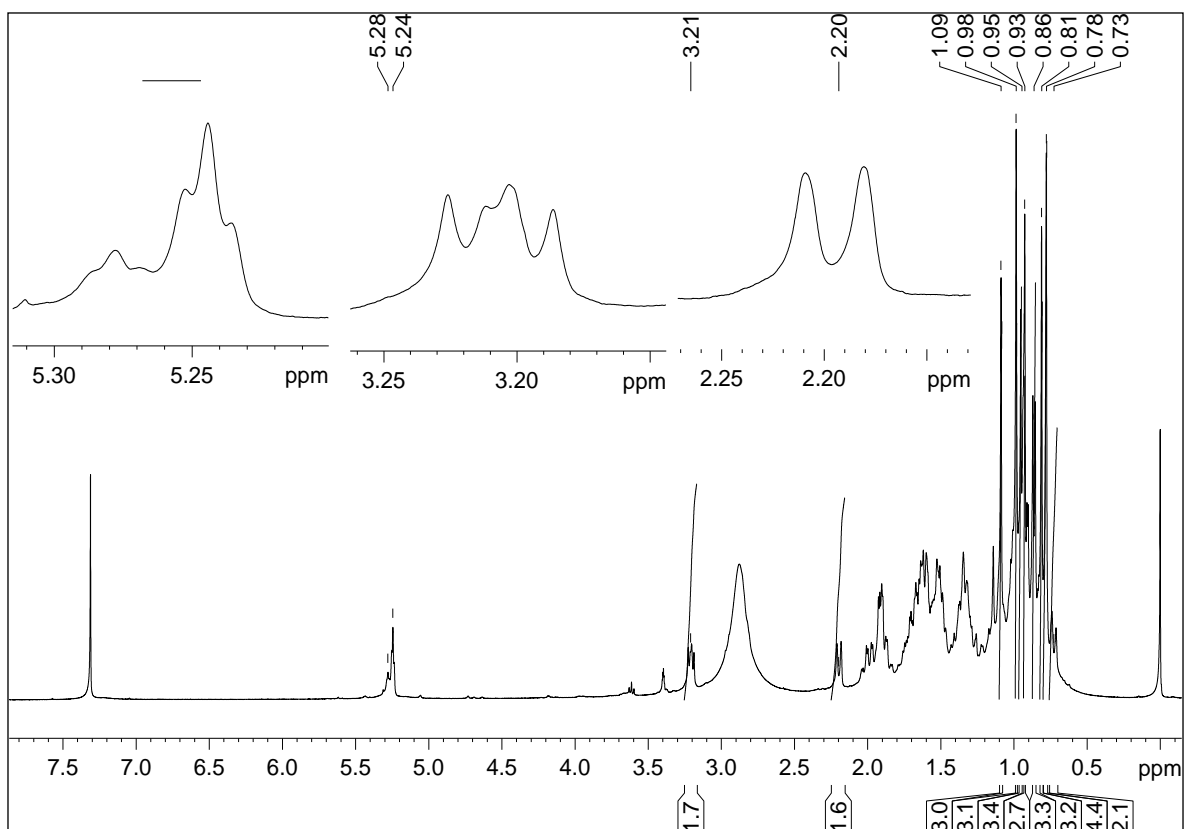


FIGURA 51. Espectro de RMN de ^1H de **SL8** (CDCl_3 , 400 MHz).

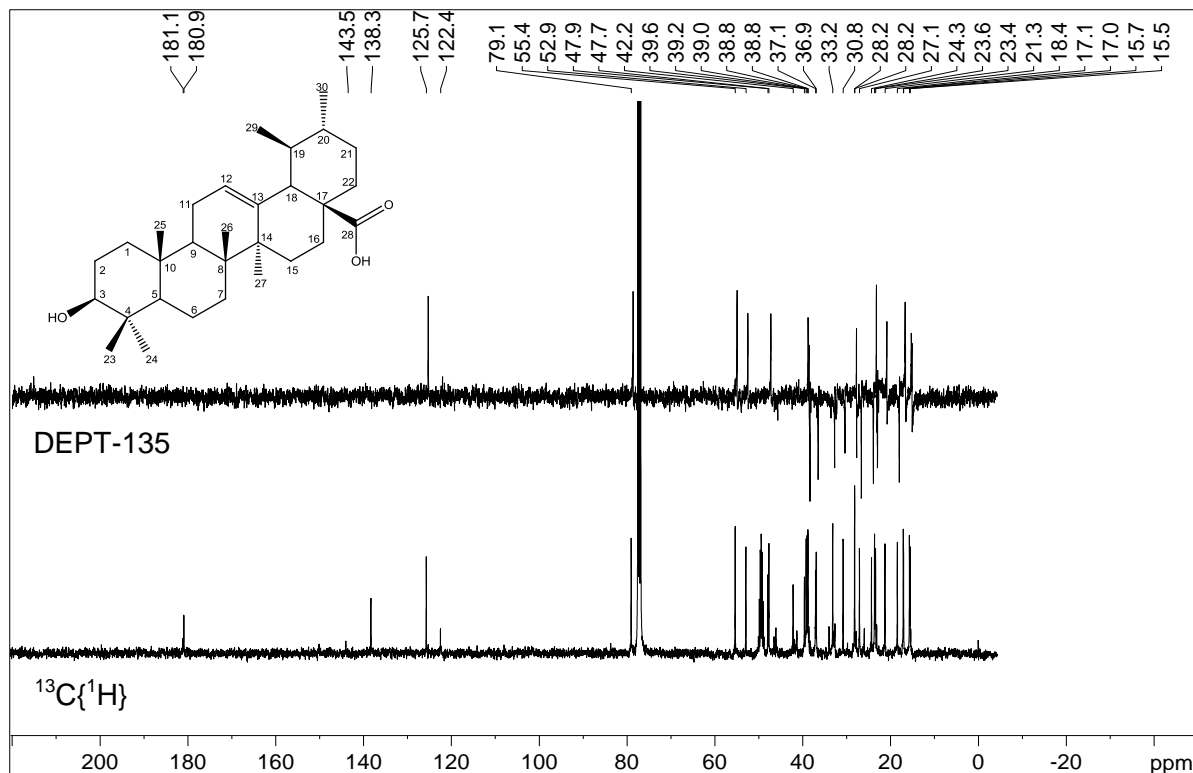


FIGURA 52. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ sobreposto com DEPT-135 de **SL8** (CDCl_3 , 100 MHz).

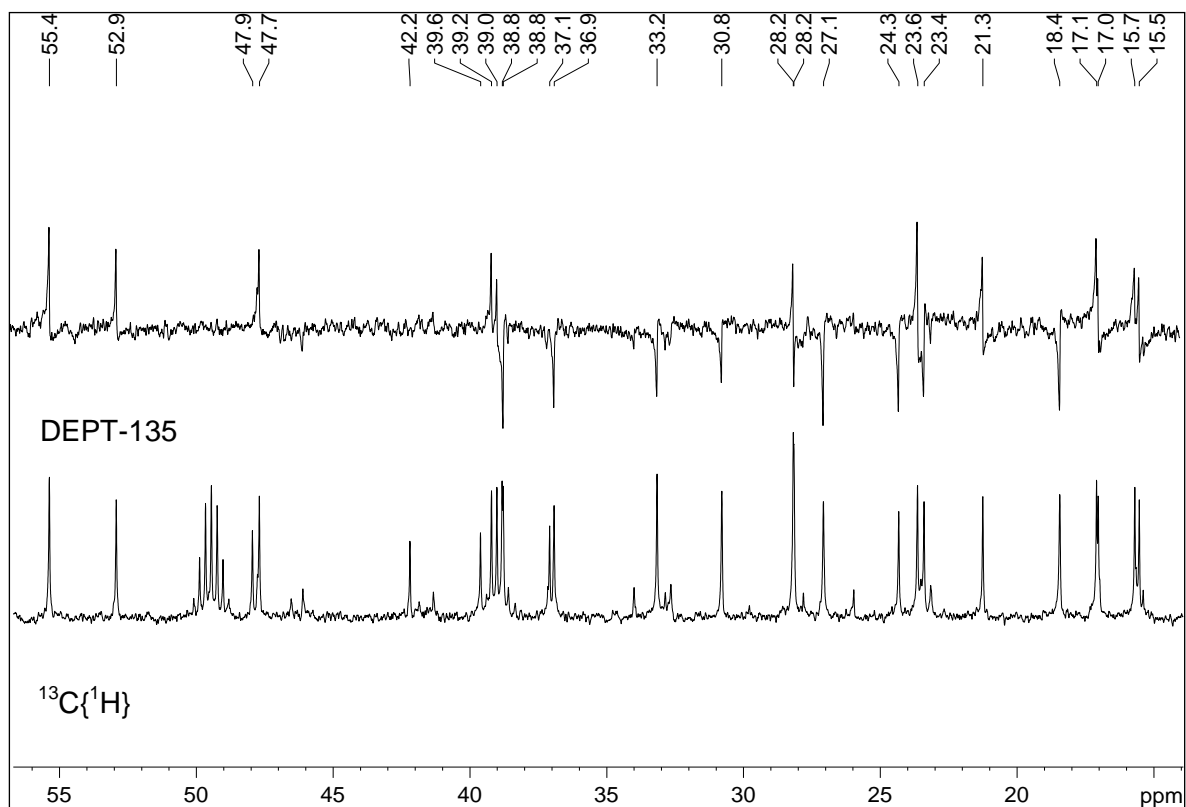


FIGURA 53. Ampliação do espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ sobreposto com DEPT-135 de **SL8** na região de carbonos metilênicos e metínicos (CDCl_3 , 100 MHz).

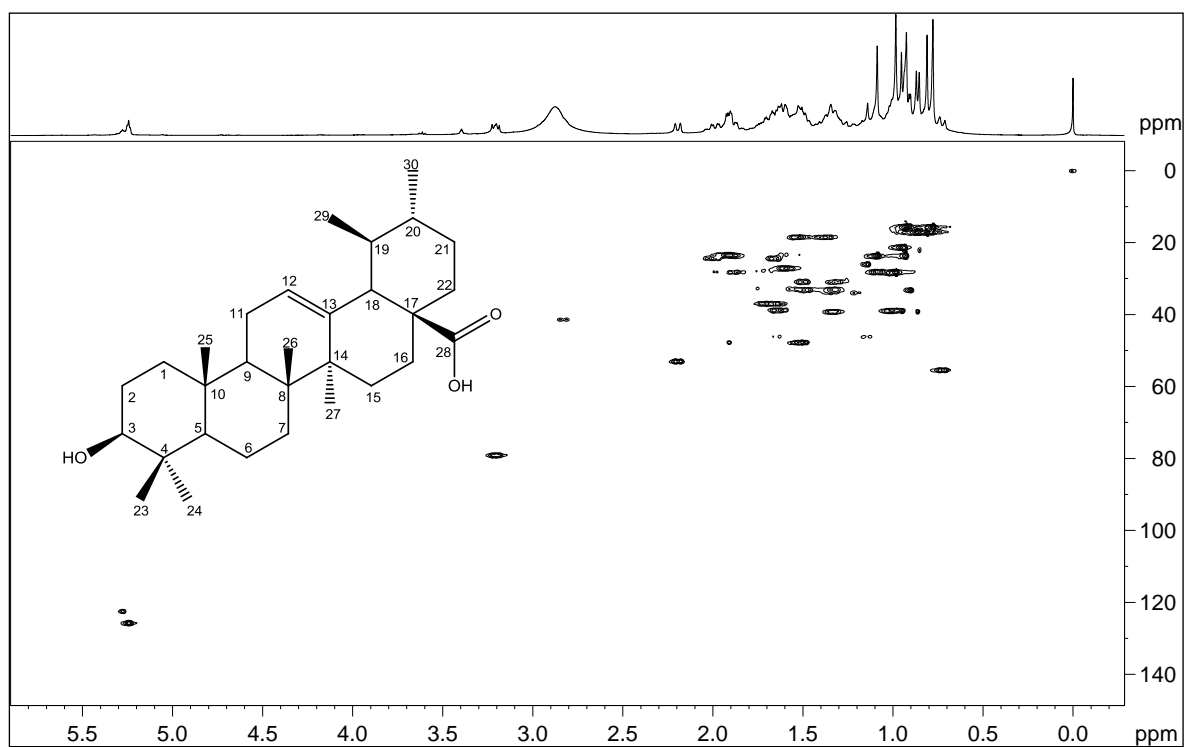


FIGURA 54. Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) de **SL8** (CDCl_3 , 400 MHz).

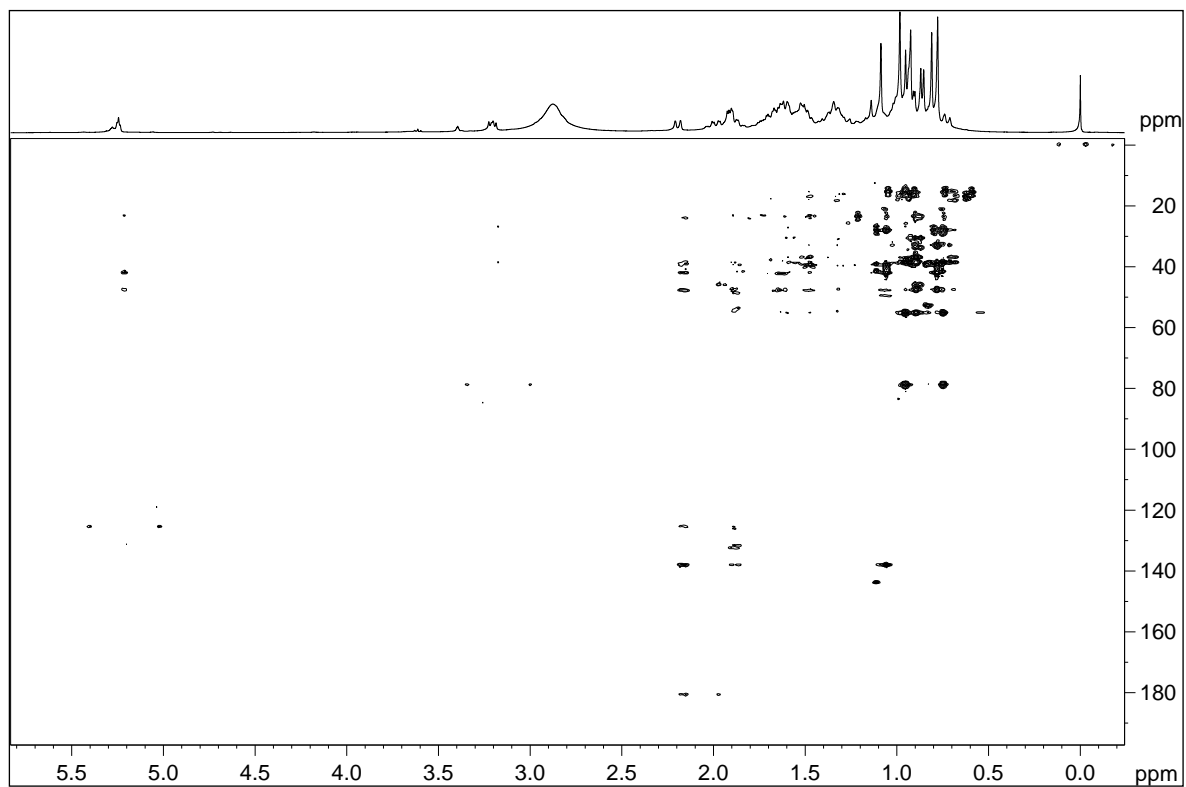


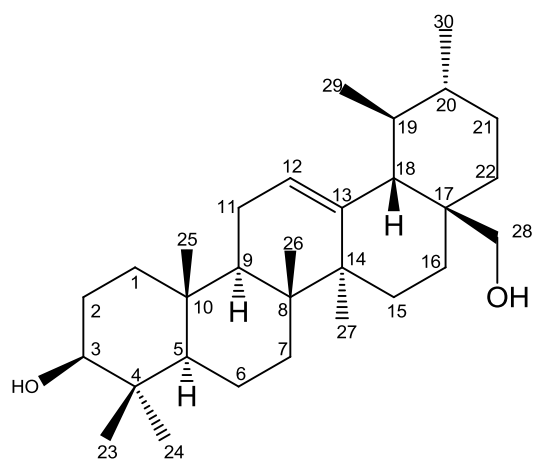
FIGURA 55. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL8** (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 16. Dados de RMN de **SL8** (CDCl_3 , 400 MHz) comparados com dados da literatura para o ácido ursólico ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz, SEEBACHER *et al.*, 2003).

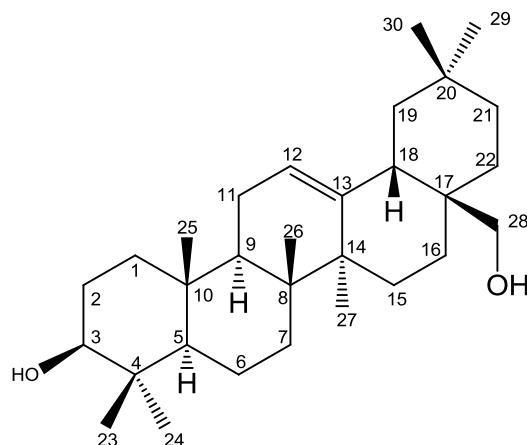
Pos.	SL8			Ácido ursólico	
	δ_{C}	δ_{H} (m, J em Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (m, J em Hz)
1	38,8	1,60 (m)	-	39,2	1,58, 1,0 (m)
2	28,2	1,87 (m)	-	28,2	1,81 (m)
3	79,1	3,21 (dd, 9,3, 5,7)	2, 4, 24	78,2	3,44 (dd)
4	38,8	-	-	39,6	-
5	55,4	0,72 (d, 11,3)	-	55,9	0,88 (d)
6	18,4	1,49 (m)	-	18,8	1,39, 1,58 (m)
7	33,2	n.o	-	33,7	1,39, 1,59 (m)
8	39,6	-	-	40,1	-
9	47,7	1,50 (m)	-	48,1	1,65 (m)
10	36,9	-	-	37,5	-
11	23,4	1,89 (m)	-	23,7	1,96 (m)
12	125,7	5,24 (t, 3,4)	9, 11, 14	125,7	5,49 (s)
13	138,3	-	-	139,3	-
14	42,2	-	-	42,6	-
15	27,1	n.o	-	28,8	3,33 (t), 1,22 (m)
16	24,3	n.o	-	25,0	2,14 (t), 2,01 (m)
17	47,9	-	-	48,1	-
18	52,9	2,21 (d, 11,5)	12, 13, 17, 19, 20, 28	53,6	2,63 (d)
19	39,0	1,00 (m)	-	39,5	1,49 (m)
20	39,2	0,95 (m)	-	39,4	1,05 (m)
21	30,8	n.o	-	31,1	1,49, 1,40 (m)
22	37,1	n.o	-	37,4	1,97 (m)
23	28,2	0,98 (s)	3, 4, 5, 24	28,8	1,24 (s)
24	15,7	0,78 (s)	2, 3, 4, 5, 9, 10	16,5	1,02 (s)
25	15,5	0,92 (s)	9, 10	15,7	0,92 (s)
26	17,0	0,81 (s)	-	17,5	1,06 (s)
27	23,6	1,09 (s)	8, 13, 14	24,0	1,24 (s)
28	180,9	-	-	179,7	-
29	17,1	0,86 (d, 6,4)	18, 19, 20	17,5	1,02 (d)
30	21,3	0,94 (d, 6,2)	19	21,4	0,97 (d)

4.9. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS **SL9** E **SL10**

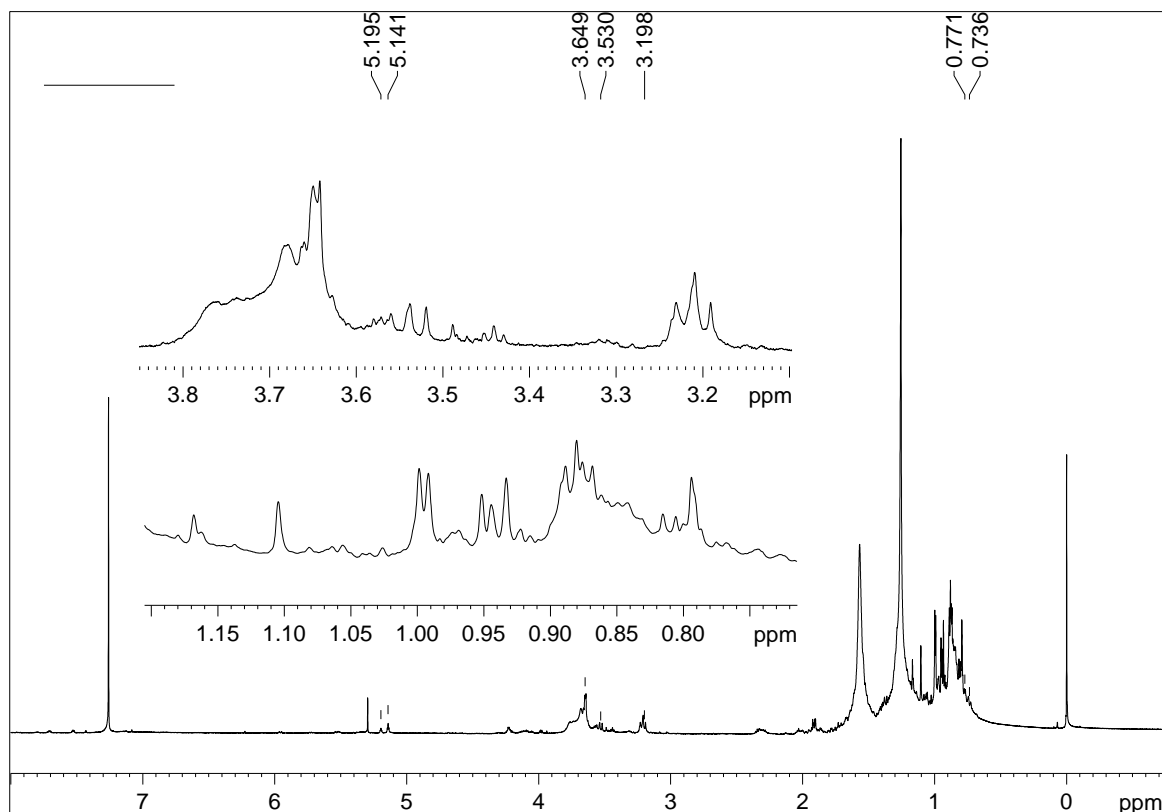
As substâncias **SL9** e **SL10** foram isoladas em mistura como um sólido branco. O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 56) apresentou um perfil muito semelhante ao da mistura de triterpenos isolada anteriormente (**SL7** e **SL8**). Além de um sinal muito intenso de uma substância alifática de cadeia longa (δ_{H} 1,25), foram observados vários sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos entre δ_{H} 0,7 e 1,9, além de dois tripletos característicos de hidrogênios olefínicos de triterpenos em δ_{H} 5,14 ($J = 3,7$ Hz) e δ_{H} 5,20 ($J = 3,5$ Hz), integrando na proporção de 2,5:1 (FIGURA 57). No HSQC (FIGURA 58) os hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,14 e δ_{H} 5,20 mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 125,0 e 122,2, respectivamente. No mapa de correlação a longa distância (HMBC, FIGURA 60 e 61) foram observados sinais em δ_{C} 138,6 e 144,4. Têm-se, então, os pares de carbonos olefínicos em δ_{C} 125,0/138,6 característico do esqueleto urs-12-eno, que é a substância majoritária (**SL9**), e δ_{C} 122,2/144,4, característico do esqueleto olean-12-eno, que é a substância minoritária (**SL10**) (OLEA & ROQUE, 1990). No espectro de RMN de ^1H também foram observados multipletos em δ_{H} 3,20, 3,53 e 3,65. O primeiro pode ser atribuído ao hidrogênio oximetínico (H-3) da mistura de triterpenos. No HSQC o multipletto em δ_{H} 3,20 mostrava correlações com dois carbonos, sendo um deles em δ_{C} 78,8, que é típico de C-3 em triterpenos, e outro em δ_{C} 69,8. O multipletto em δ_{H} 3,54 também mostrava correlação com o carbono em δ_{C} 69,8 enquanto que o multipletto em δ_{H} 3,65 tinha correlação com um carbono em δ_{C} 70,2. Portanto, temos dois grupos hidroximetileno, um em δ_{H} 3,54 e 3,21, associado ao carbono em δ_{C} 69,8, que pertence ao constituinte minoritário da mistura, e outro em δ_{H} 3,65, associado ao carbono em δ_{C} 70,2. A posição desse grupo em C-28 foi definida através das correlações observadas no HMBC (TABELAS 17 e 18). Embora tenham faltado várias correlações, foi possível atribuir os sinais de todos os grupos metila para os dois triterpenos, com exceção da metila em C-28. A comparação com dados da literatura levou à identificação dos triterpenos uvaol (**SL9**, majoritário) e eritrodíol (**SL10**, minoritário) (MAHATO & KUNDU *et al.*, 1994; LEMES *et al.*, 2011).



SL9



SL10

FIGURA 56. Espectro de RMN de ^1H de SL9 e SL10 (CDCl_3 , 400 MHz).

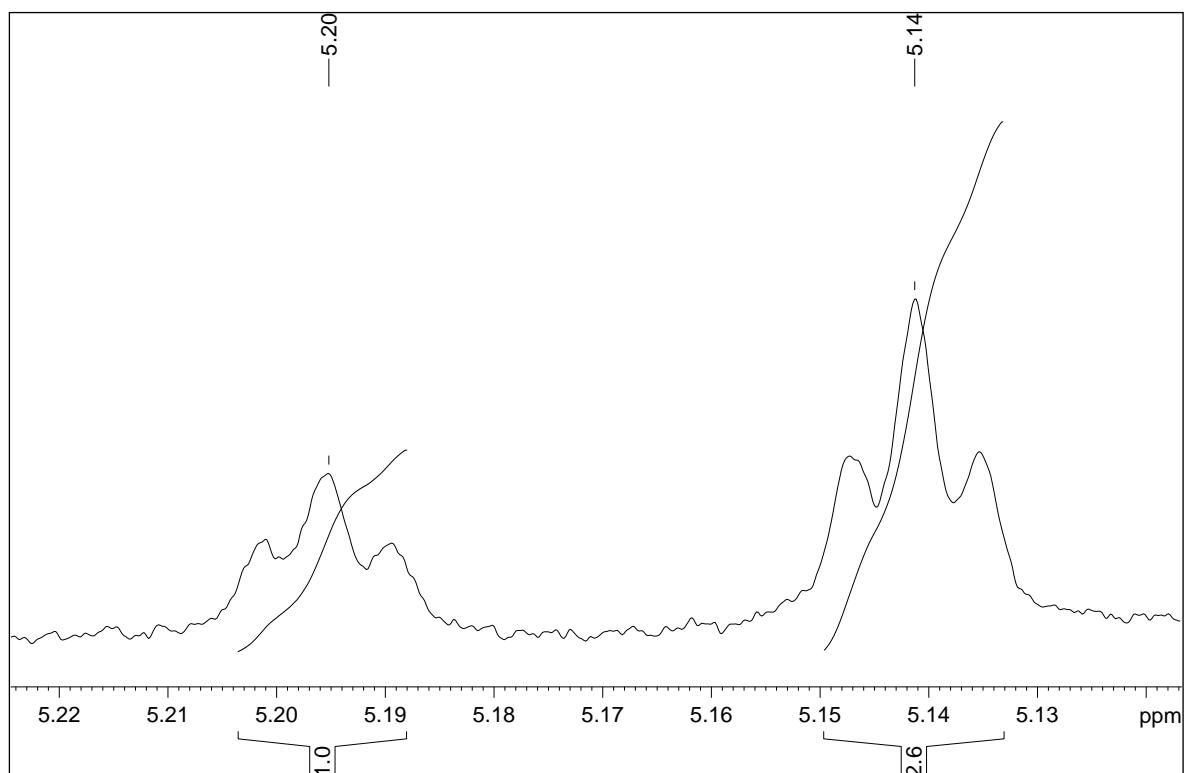


FIGURA 57. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H **SL9** e **SL10** (CDCl_3 , 400 MHz).

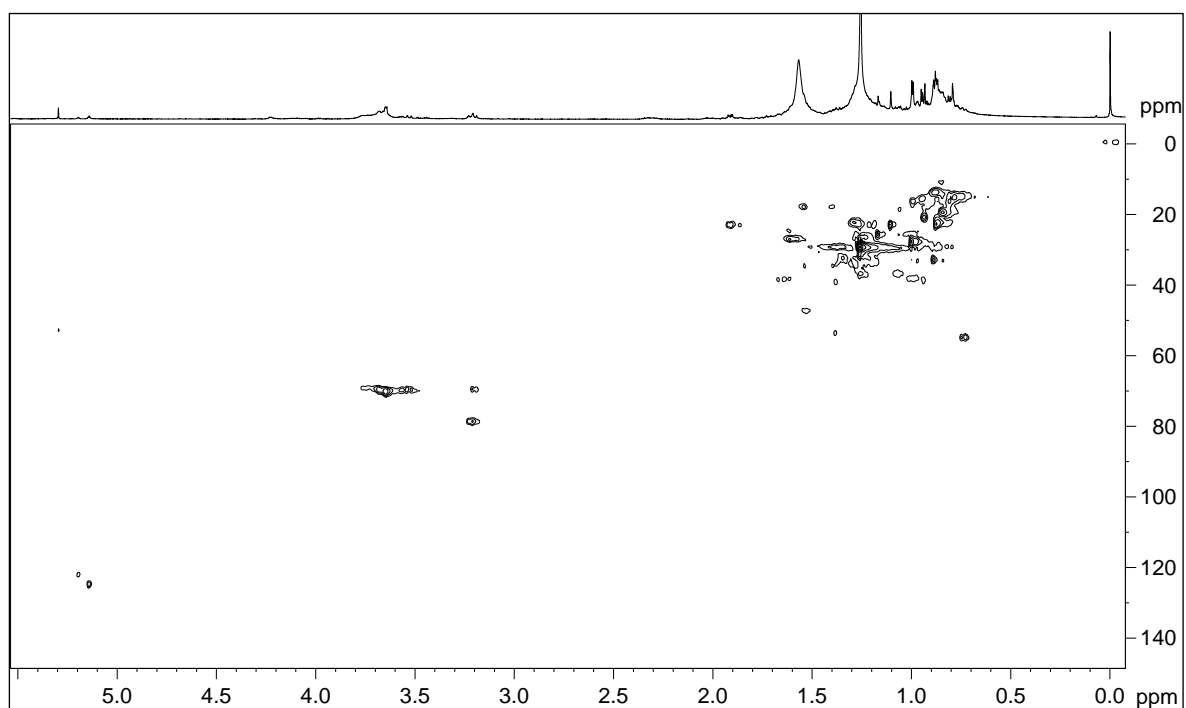


FIGURA 58. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) de **SL9** e **SL10** (CDCl_3 , 400 MHz).

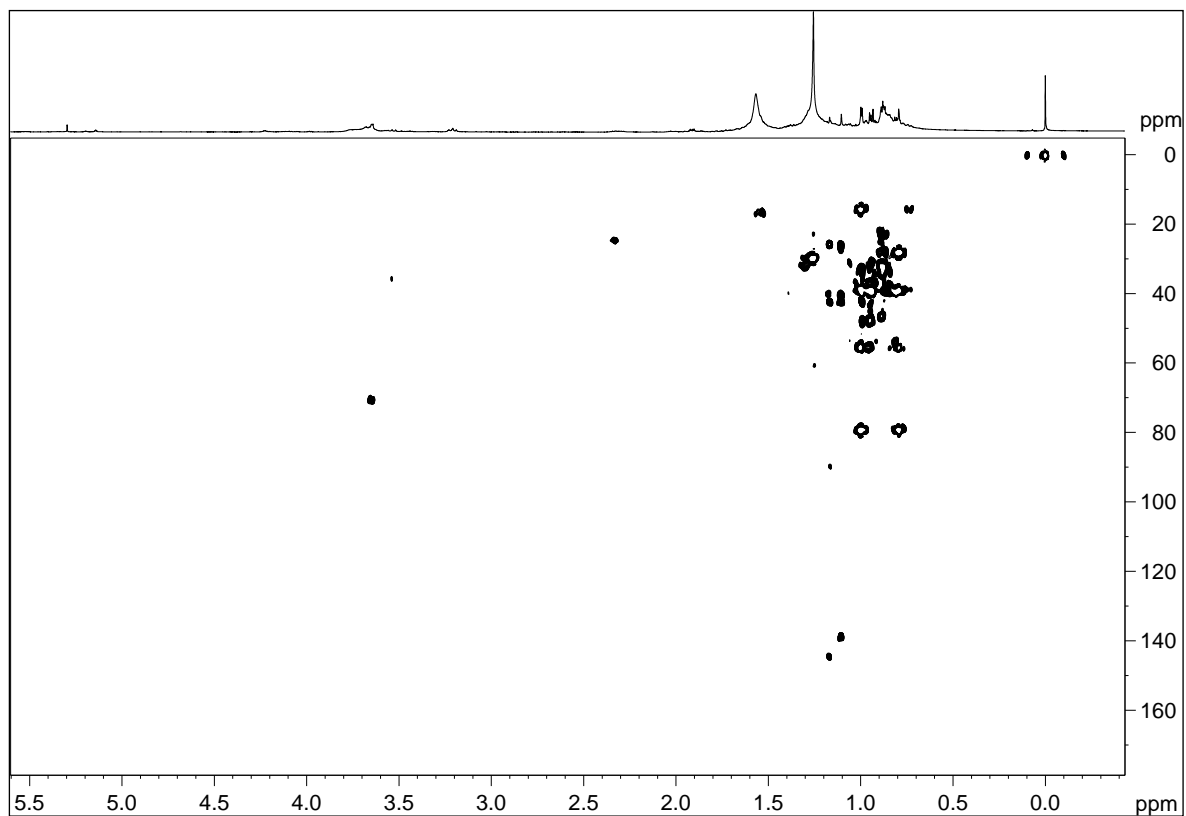


FIGURA 59. Mapa de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL9** e **SL10** (CDCl_3 , 400 MHz).

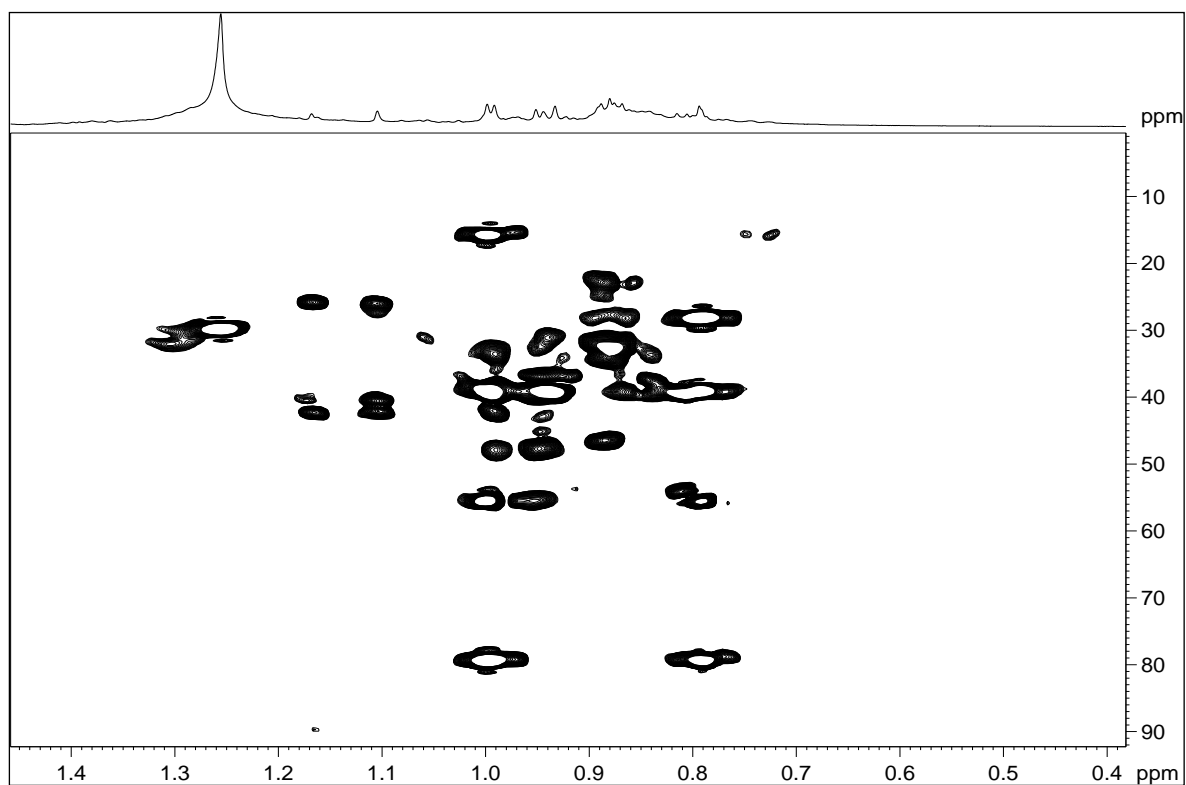


FIGURA 60. Ampliação do mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) de **SL9** e **SL10**, na região de hidrogênios alifáticos (CDCl_3 , 400 MHz).

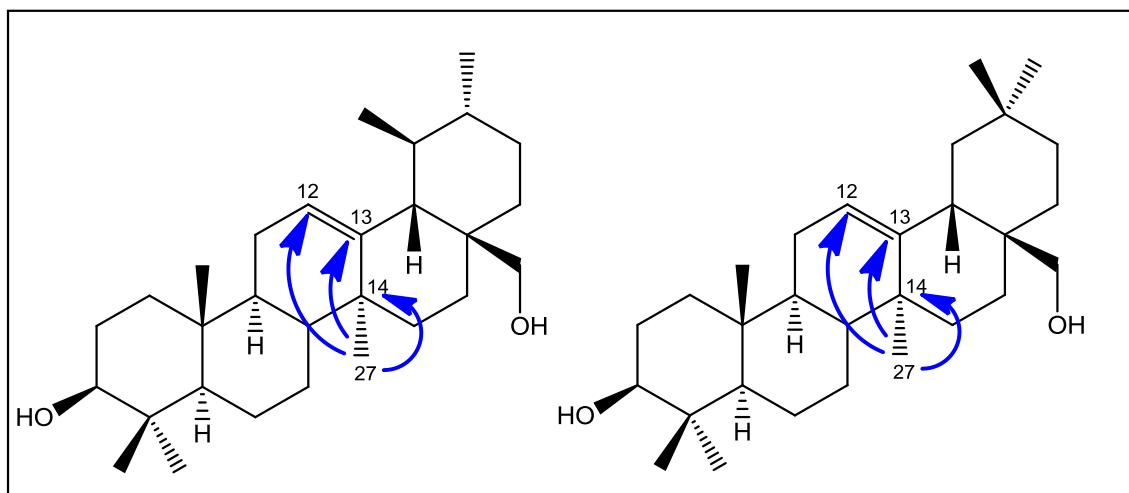


FIGURA 61. Principais correlações observadas no mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância de **SL9** e **SL10** respectivamente.

TABELA 17. Dados de RMN de **SL9** (CDCl₃, 400 MHz) comparado com dados da literatura para uvaol (CDCl₃, 200 MHz, LEMES *et al.*, 2011).

Pos.	SL9			Uvaol	
	δ_c	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_c	δ_H (m, J em Hz)
1	39,0	1,63 (m)	-	38,7	-
2	27,9	1,61 (m)	-	27,7	-
3	78,8	3,20 (m, sobreposto com H-3 e H-28 de SL10)	4, 23, 24	79,5	3,21 (dd, 10,5; 3,5)
4	39,0	-	-	39,0	-
5	55,1	0,74 (d, 11,2)	4, 25	55,6	-
6	18,1	1,40 e 1,54, m	-	18,8	-
7	33,4	n.o*	-	33,0	-
8	39,4	-	-	39,0	-
9	47,5	1,52 (m)	8, 14, 26	48,1	-
10	n.o*	-	-	37,8	-
11	23,1	1,91 (dd, 8,7; 3,6)	-	23,8	-
12	125,0	5,14 (t, 3,6)	-	125,5	5,13 (t, 3,0)
13	138,6	-	-	139,2	-
14	42,1	-	-	42,5	-
15	26,2	n.o*	-	27,2	-
16	n.o*	n.o*	-	23,2	-
17	n.o*	-	-	36,8	-
18	53,8	-	-	54,5	-
19	39,2	-	-	39,3	-
20	39,3	-	-	39,9	-
21	n.o*	n.o*	-	31,1	-
22	n.o*	n.o*	-	31,1	-
23	28,0	1,00 (s)	3, 4, 5, 24	28,6	-
24	15,4	0,79 (s)	3, 4, 5, 23	15,6	-
25	16,5	0,99 (s)	1, 9	16,1	-
26	16,5	0,99 (s)	7, 9, 14	17,2	-
27	23,0	1,10 (s)	8, 13, 14, 15	23,7	-
28	70,2	3,65 (m)	-	70,2	-
29	16,7	0,81 (d, 6,1)	18, 19, 20	16,7	-
30	20,8	0,91 (d, 6,8)	19, 20	21,8	-
OH-28	-	3,65	28	-	-

*Vários deslocamentos químicos não puderam ser atribuídos devido à ausência de correlações e sobreposição de sinais.

TABELA 18. Dados de RMN de **SL10** (CDCl₃, 400 MHz) comparado com dados da literatura para eritrodíol (CDCl₃, 200 MHz, LEMES *et al.*, 2011).

Pos.	SL10			Eritrodíol	
	δ_c	δ_H (m, J em Hz)	HMBC	δ_c	δ_H (m, J em Hz)
1	39,0	1,63 (m)	-	38,7	-
2	27,9	1,61 (m)	-	27,7	-
3	78,8	3,20 (m, sobreposto com H-28 e H-3 de SL9)	4, 23, 24	79,5	3,21 (dd, 10,5 e 3,5)
4	39,0	-	-	39,0	-
5	55,1	0,74 (d, 11,2)	4, 25	55,6	-
6	18,1	1,40 e 1,54, m	-	18,8	-
7	33,4	n.o*	-	32,7	-
8	39,4	-	-	39,4	-
9	47,5	1,52 (m)	8, 14, 26	48,1	-
10	n.o*	-	-	37,8	-
11	23,1	1,91 (dd, 8,7; 3,6)	-	23,8	-
12	122,2	5,20 (t, 3,6)	-	122,8	5,18 (t, 3,0)
13	144,4	-	-	144,7	-
14	41,7	-	-	42,5	-
15	25,6	n.o*	-	26,0	-
16	n.o*	n.o*	-	23,2	-
17	35,5	-	-	36,9	-
18	42,4	n.o*	-	42,8	-
19	46,3	-	-	46,5	-
20	n.o*	-	-	31,1	-
21	n.o*	n.o*	-	34,5	-
22	n.o*	n.o*	-	31,5	-
23	28,0	1,00 (s)	3, 4, 5, 24	28,6	-
24	15,4	0,79 (s)	3, 4, 5, 23	15,6	-
25	15,7	0,95 (s)	1, 9	15,6	-
26	16,5	0,99 (s)	7, 14	16,7	-
27	25,7	1,17 (s)	8, 13, 14,15	26,4	-
28	69,8	3,21 (m) 3,53 (d, 11,0)	17	70,4	-
29	32,9	0,89 (s)	19	33,3	-
30	22,7	0,87 (s)	-	23,8	-

*Vários deslocamentos químicos não puderam ser atribuídos devido à ausência de correlações e sobreposição de sinais.

4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

As folhas de *Salvia lachnostachys* foram extraídas com hexano e etanol sucessivamente. Ambos os extratos (EH, EE) foram testados em *in vitro* contra sete linhagens de células tumorais humanas: glioma (U251), mama (MCF-7), ovário resistente a vários fármacos (NCI-ADR/Res), rim (786.0), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29) e leucemia (K562). Também foi utilizada a linhagem de célula normal de queratinócito (HaCat). Apenas o extrato em etanol (EE) mostrou atividade, pois inibiu o crescimento de todas as linhagens de células testadas, sendo a concentração necessária para inibição de 50% do crescimento (GI_{50}) inferior a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. A linhagem de célula de leucemia foi a mais susceptível ($GI_{50} = 25 \mu\text{g mL}^{-1}$). EE foi fracionado por cromatografia líquida a vácuo, rendendo cinco frações (LNA, LNB, LNC, LND e LNE), que foram testadas contra as mesmas linhagens de células. Todas as frações foram ativas, porém, a maior atividade citotóxica foi observada na fração LNA com valores de GI_{50} variando entre $3,9\text{-}19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nesta fração a maior atividade foi observada contra a linhagem de glioma (U251) com $GI_{50} = 3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. A segunda fração mais ativa foi LNC, que se destaca por apresentar a maior atividade contra células de leucemia ($GI_{50} = 12,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). A fração LNE foi a que apresentou menor atividade (TABELA 19).

TABELA 19. Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato em etanol de *S. lachnostachys* e das frações do extrato contra linhagens de células tumorais humanas ($GI_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$).

Linhagens de células	GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						Doxo ^b
	EE	LNA	LNB	LNC	LND	LNE	
Glioma (U251)	32,0	3,9	8,4	13,5	28,0	48,0	0,07
Mama (MCF-7)	30,0	6,0	25,8	12,5	23,2	49,0	0,03
Ovário resistente (NCI-ADR/Res)	42,4	8,2	30,4	25,0	58,1	40,0	0,12
Rim (786.0)	26,0	6,7	19,8	13,2	26,4	42,0	0,04
Pulmão (NCI-H460)	44,0	12,4	22,0	14,4	53,3	49,0	0,10
Cólon (HT-29)	32,6	7,4	25,0	20,3	27,0	50,5	0,25
Leucemia (K562)	25,0	19,5	14,4	12,6	24,0	96,0	0,03
Queratinócitos (HaCat)	33,5	8,0	5,2	14,8	31,5	102,0	0,03

GI_{50} = concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular. Os valores são média de três análises, e os coeficientes de variação obtidos foram $\leq 5\%$. **Doxo** = doxorubicina, que foi utilizada como controle positivo. **EE** = extrato em etanol; **LNA** = fração em hexano; **LNB** = fração em hexano:CH₂Cl₂ 1:1; **LNC** = fração em CH₂Cl₂; **LND** = fração em acetona; **LNE** = fração em MeOH. O extrato em hexano apresentou $GI_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as linhagens de células testadas.

As substâncias **SL1** (fruticulina A), **SL2** (isofruticulina A) e **SL4** (fruticulina B), (FIGURA 62) isoladas da fração mais ativa, foram testadas nas mesmas condições contra oito linhagens de células tumorais humanas, incluindo as linhagens do grupo anterior, excetuando-se a linhagem de cólon (HT-29) e adicionando-se as linhagens de próstata (PC-3) e ovário (OVCAR-3) (TABELA 20).

As substâncias **SL1** e **SL2** apresentaram atividade citotóxica similar ($GI_{50} < 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) contra todas as linhagens de células tumorais, com exceção da linhagem de leucemia. Um estudo anterior investigou a ação citotóxica de **SL1** contra células de hepatoma (Hepa1c1c7), encontrando um valor de $GI_{50} = 37,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (GIACOMELLI *et al.*, 2013). O nosso estudo mostra que esta substância é muito mais ativa frente a outras linhagens celulares. Por outro lado, BURMISTROVA *et al.* (2013) investigaram a atividade citotóxica de 30 diterpenos contra cinco linhagens celulares e encontraram resultados semelhantes aos nossos para os diterpenos com esqueleto abietano.

A substância **SL2** ($GI_{50} 3,7-5,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi ligeiramente mais ativa do que **SL1** ($GI_{50} 4,6-7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Ambas foram tóxicas frente às células não cancerosas (queratinócito), mas **SL1** ($GI_{50} 4,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi mais tóxica que **SL2** ($GI_{50} 6,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Considerando uma possível aplicação terapêutica, **SL2** é uma substância mais promissora que **SL1**, pois é mais ativa contra as células tumorais do que contra as células não tumorais. Tanto **SL1** como **SL2** foram menos ativas do que o controle positivo (doxorrubicina), mas também foram menos tóxicas, o que é uma vantagem na terapia. Em comparação com a doxorrubicina o melhor resultado obtido foi da substância **SL2** contra a linhagem de células tumorais de ovário (OVCAR-3), pois inibiu o crescimento destas células com uma concentração cerca de oito vezes maior do que a doxorrubicina, mas sendo aproximadamente 100 vezes menos tóxica. As substâncias **SL1** e **SL2** têm uma grande semelhança estrutural, diferindo apenas na posição das ligações duplas do anel B, o que justifica a semelhança de atividade frente às linhagens de células tumorais humanas. Estudos realizados com vários diterpenos do tipo abietano têm sugerido que a presença de uma quinona no anel C e uma estrutura planar favorece a atividade citotóxica (FRONZA *et al.*, 2011). Pode ser que a posição das ligações duplas em **SL2** torne esta molécula mais plana que **SL1**, o que explicaria sua maior atividade citotóxica.

A substância **SL4** (fruticulina B) apresentou resultados bem diferentes de **SL1** e **SL2**. Adotando o critério de BURMISTROVA *et al.* (2013), que considera ativa uma substância pura com $GI_{50} < 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ podemos dizer que **SL4** apresentou atividade moderada/fraca contra quatro linhagens de células tumorais: mama, pulmão, ovário e leucemia ($GI_{50} 16,4-28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). É notável que **SL4** foi menos ativa que **SL1** e **SL2** frente a todas as linhagens de células testadas, exceto quanto a linhagem de leucemia,

para a qual foi mais ativa (GI_{50} 28,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As três substâncias testadas têm um grupo quinona no anel C, mas diferem quanto ao esqueleto carbônico. **SL1** e **SL2** apresentam um esqueleto icetexano, com três anéis não lineares e o anel central com sete membros, enquanto que **SL4** tem três anéis lineares de seis membros, como no antraceno. Uma vez que a planaridade é considerada um requisito importante para a atividade citotóxica (FRONZA *et al.*, 2011), **SL4** deveria ser a substância mais ativa, pois os seus três anéis são coplanares. Entretanto essa substância só foi mais potente que **SL1** e **SL2** em relação à linhagem de leucemia. Outro dado interessante é que **SL4** foi o menos tóxico dos três diterpenos, com $GI_{50} = 29,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a linhagem de célula não tumoral (cerca de 500 vezes menos tóxico que a doxorrubicina). É importante notar que todos os diterpenos do tipo abietano que apresentaram atividade citotóxica em estudos anteriores tinham anéis não lineares (FRONZA *et al.*, 2011; 2012; BURMISTROVA *et al.*, 2013). Os nossos resultados mostram que anéis não lineares são um requisito estrutural importante para a citotoxicidade dos diterpenos abietanos frente à maioria das linhagens celulares, mas não para a linhagem de leucemia K562. Embora **SL4** não possa ser considerada promissora para o tratamento dessa doença, pois o valor de GI_{50} foi elevado, poderia servir como modelo para a síntese de fármacos com possível ação anti-leucêmica.

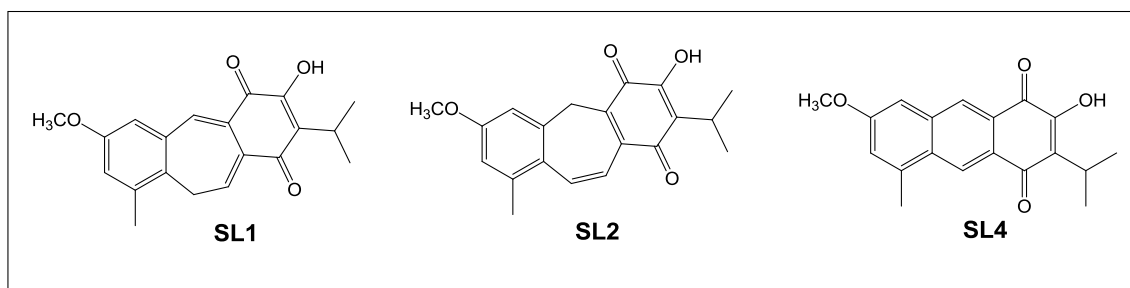


FIGURA 62. Estruturas das substâncias **SL1**, **SL2** e **SL4** que foram avaliadas nos ensaios de atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas.

TABELA 20. Atividade citotóxica *in vitro* das substâncias **SL1**, **SL2** e **SL4** contra linhagens de células tumorais humanas (GI_{50} $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Linhagem de células	GI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	SL1	SL2	SL4	Doxo
Glioma (U251)	5,5	4,6	32,8	0,13
Mama (MCF-7)	5,2	3,7	19,9	0,05
Ovário resistente (NCI-ADR/Res)	7,4	5,6	116,4	0,20
Rim (786.0)	5,2	4,6	36,3	0,07
Pulmão (NCI-H460)	7,4	5,2	22,6	0,05
Próstata (PC-3)	4,6	3,7	37,1	0,18
Ovário (OVCAR-3)	4,9	3,8	16,4	0,46
Leucemia (K562)	380	300	28,5	0,06
Queratinócitos (HaCat)	4,9	6,5	29,3	0,06

GI_{50} = concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular. Os valores são média de três análises, e os coeficientes de variação obtidos foram $\leq 5\%$. **Doxo** = doxorrubicina, que foi utilizada como controle positivo. Substâncias puras avaliadas: **SL1** (fruticulina A), **SL2** (isofruticulina A) e **SL4** (fruticulina B).

5. PROPOSTA DE BIOGÊNESE PARA OS DITERPENÓIDES

Os metabólitos secundários são produzidos nos organismos vivos através de uma série de reações catalisadas por enzimas. O conhecimento dessas reações é o objeto de estudo da biossíntese, sendo que as principais rotas biossintéticas foram elucidadas há muito tempo. Sabe-se que existem duas rotas principais que formam os metabólitos secundários: a via do chiquimato e a via do acetato/mevalonato. A partir dos precursores básicos (ácido chiquímico, ácido acético) as rotas biossintéticas se ramificam, gerando diferentes metabólitos. Cada substância pode ser facilmente associada a um desses precursores básicos. Para algumas substâncias a biossíntese completa já foi desvendada, mas para a maioria faltam informações sobre os intermediários formados durante a sua síntese, bem como sobre as enzimas envolvidas. Nestes casos fala-se em biogênese da substância ao invés de biossíntese. Propostas de biogênese consideram o conhecimento acumulado sobre a biossíntese de certas classes de substâncias, para sugerir uma possível rota biossintética para uma dada substância.

Os terpenoides são formados através da via do acetato/mevalonato, ou seja, o ácido mevalônico é o precursor. As diferentes classes de terpenoides são definidas de acordo com as unidades isoprênicas. A biossíntese do ácido mevalônico consiste

primeiramente na condensação de Claisen entre duas moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima acetoacetil-CoA sintase. Uma terceira unidade de acetil-CoA é incorporada por uma adição aldólica, catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase. A seguir ocorre a hidrólise e formação do HMG-CoA, subsequentemente ocorre a redução do tioéster para álcool, em seguida mais uma redução do álcool para aldeído e eliminação de SCoA, catalisada pelas enzimas HMG-CoA redutase e NADPH. E por fim uma nova redução nas mesmas condições origina o ácido mevalônico (MVA) (FIGURA 63) (DEWICK, 2009; CLAYDEN *et al.*, 2012).

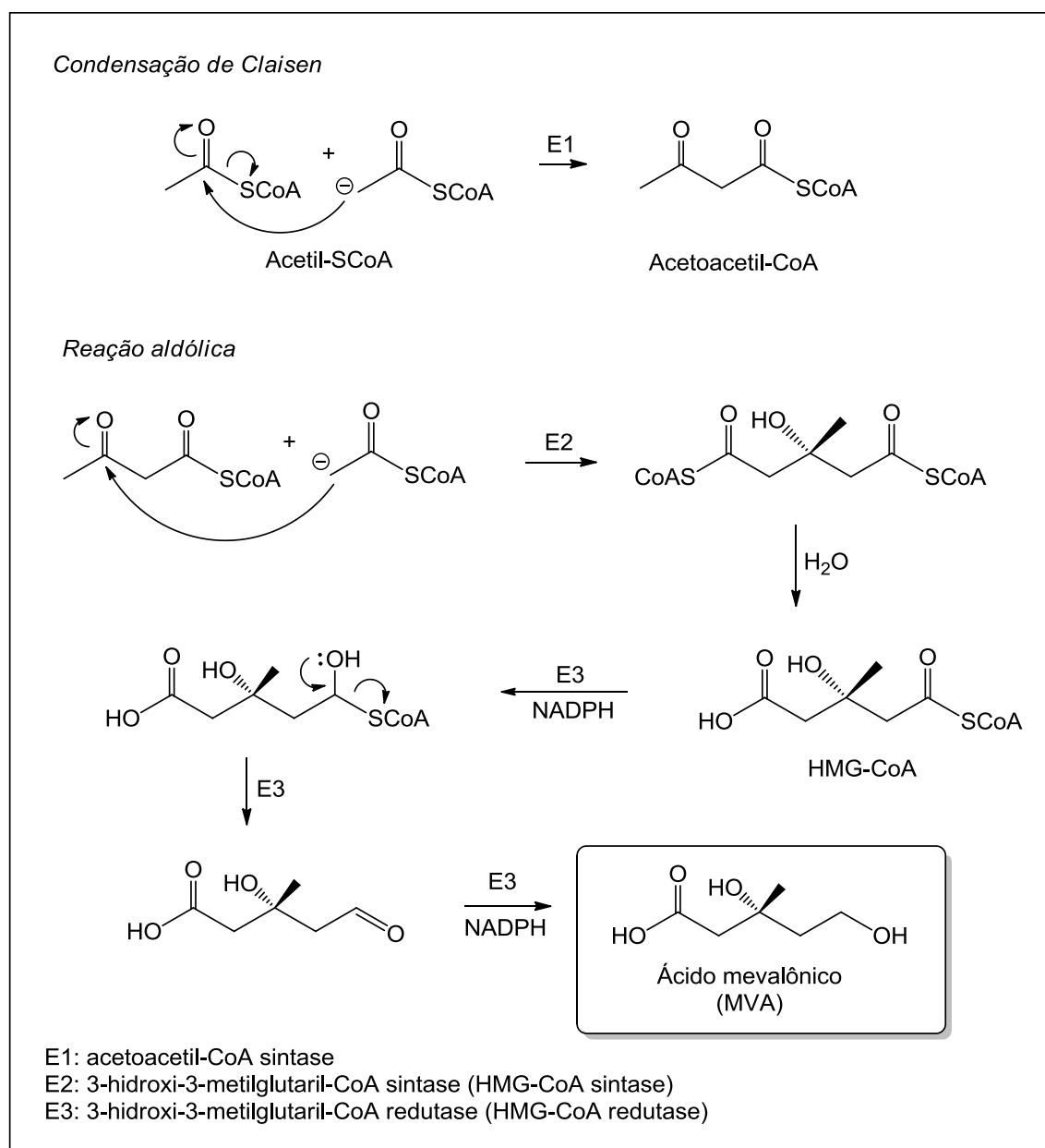


FIGURA 63. Biossíntese do ácido mevalônico a partir do acetil-SCoA (DEWICK, 2009; CLAYDEN *et al.*, 2012).

O ácido mevalônico é fosforilado em duas etapas, envolvendo duas enzimas, mevalonato quinase (E4) e fosfomevalonato quinase (E5), ambas dependentes de ATP (trifosfato de adenosina). Inicialmente a fosforilação ocorre no álcool primário, em seguida no álcool terciário, o que favorece a sulfod Descarboxilação catalisada pela enzima 5-difosfomevalonato descarboxilase (E6), fornecendo o fosfato de isopentenila (IPP), que é a primeira unidade isoprênica. O IPP é isomerizado a outra unidade isoprênica, difosfato de dimetila (DMAPP), por uma isomerase (E7, IPP isomerase) que incorpora um hidrogênio da água em C-4 e remove de modo estereoespecífico o hidrogênio *pro-R* (H_R) de C-2. Esta reação é utilizada para fornecer as quantidades necessárias de unidades isoprênicas para o metabolismo. O DMAPP possui um bom grupo abandonador, o dissulfato, que pode ionizar para formar um cátion alílico que é estabilizado por deslocalização da carga positiva. Por outro lado, o IPP possui uma ligação dupla terminal, a qual é mais provável que atue como um nucleófilo. Devido a isto, a adição nucleofílica após a perda do dissulfato, catalisada pela enzima difosfato geranyl sintase (E8) é favorecida entre essas duas moléculas (IPP+DMAPP), formando o difosfato de geranila (GPP), que é o precursor dos monoterpenos. Com a adição de mais duas unidades de IPP o difosfato de geranylgeranila (GGPP) é gerado, e a partir dele são formados os diterpenos (FIGURA 64) (DEWICK, 2009).

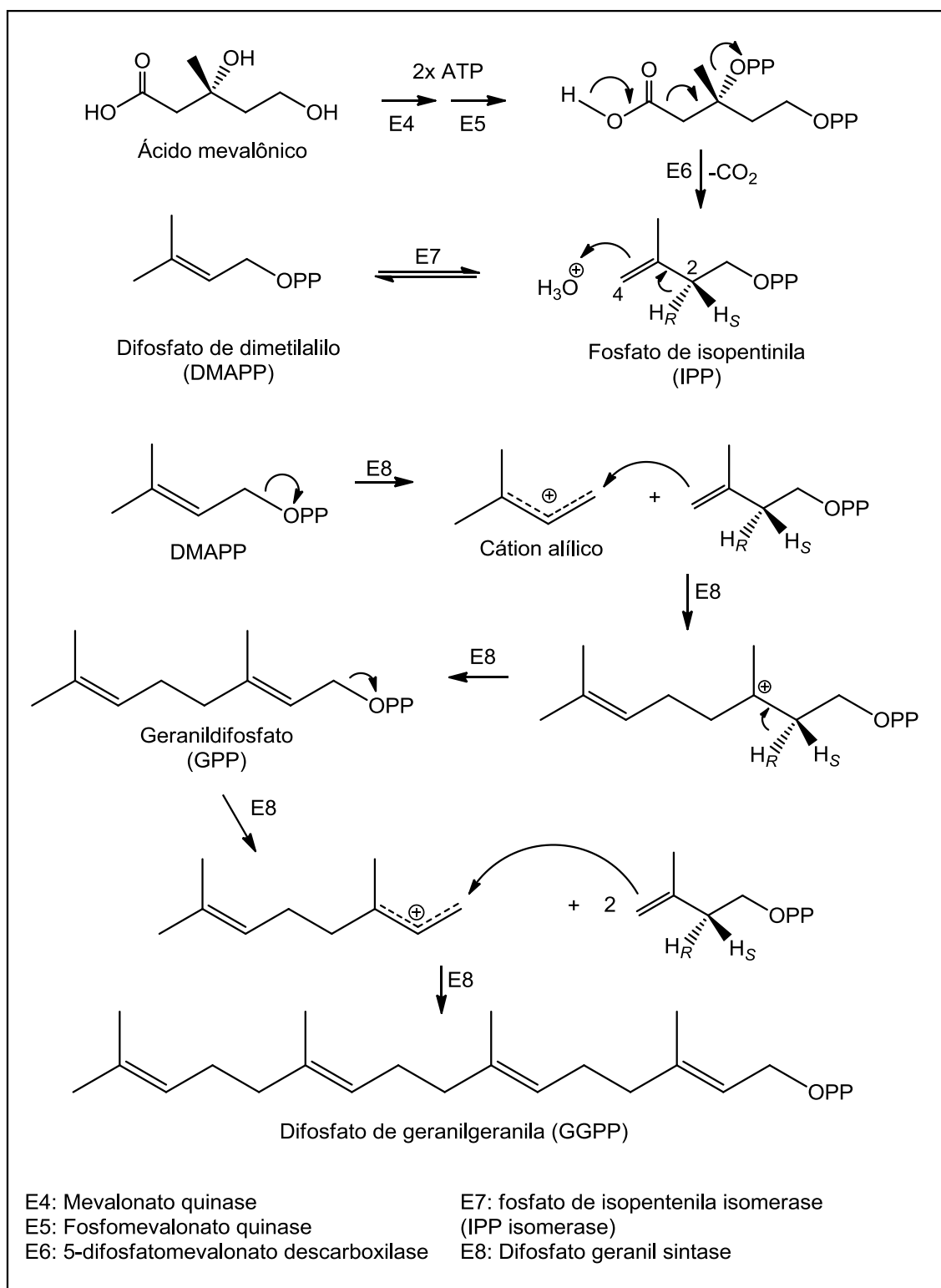


FIGURA 64. Formação do difosfato de geranilgeranila (GGPP) a partir do ácido mevalônico (DEWICK, 2009).

Após a formação do GGPP ocorre uma reação eletrocíclica catalisada pela enzima difosfato de copalil-sintase (E9), promovendo a formação do difosfato de copalila. Em seguida ocorre a perda do difosfato catalisado pela enzima difosfato

abietadieno (E10) sintase, e formação de um carbocátion terciário pela perda de um hidrogênio em C-14 (reação do tipo E₂) e formação do sandaracopimaradieno. Subsequentemente, ocorre uma transferência intramolecular do mesmo hidrogênio perdido na formação do alceno, que é utilizado para protonar o outro alceno vizinho, formando um carbocátion secundário em C-15. O carbocátion secundário é imediatamente estabilizado pela migração da metila de C-13 para C-15, formando um carbocátion terciário em C-13, que novamente é estabilizado pela perda de um hidrogênio em C-7. Desse modo, é formada a estrutura do abietadieno (FIGURA 65) (DEWICK, 2009).

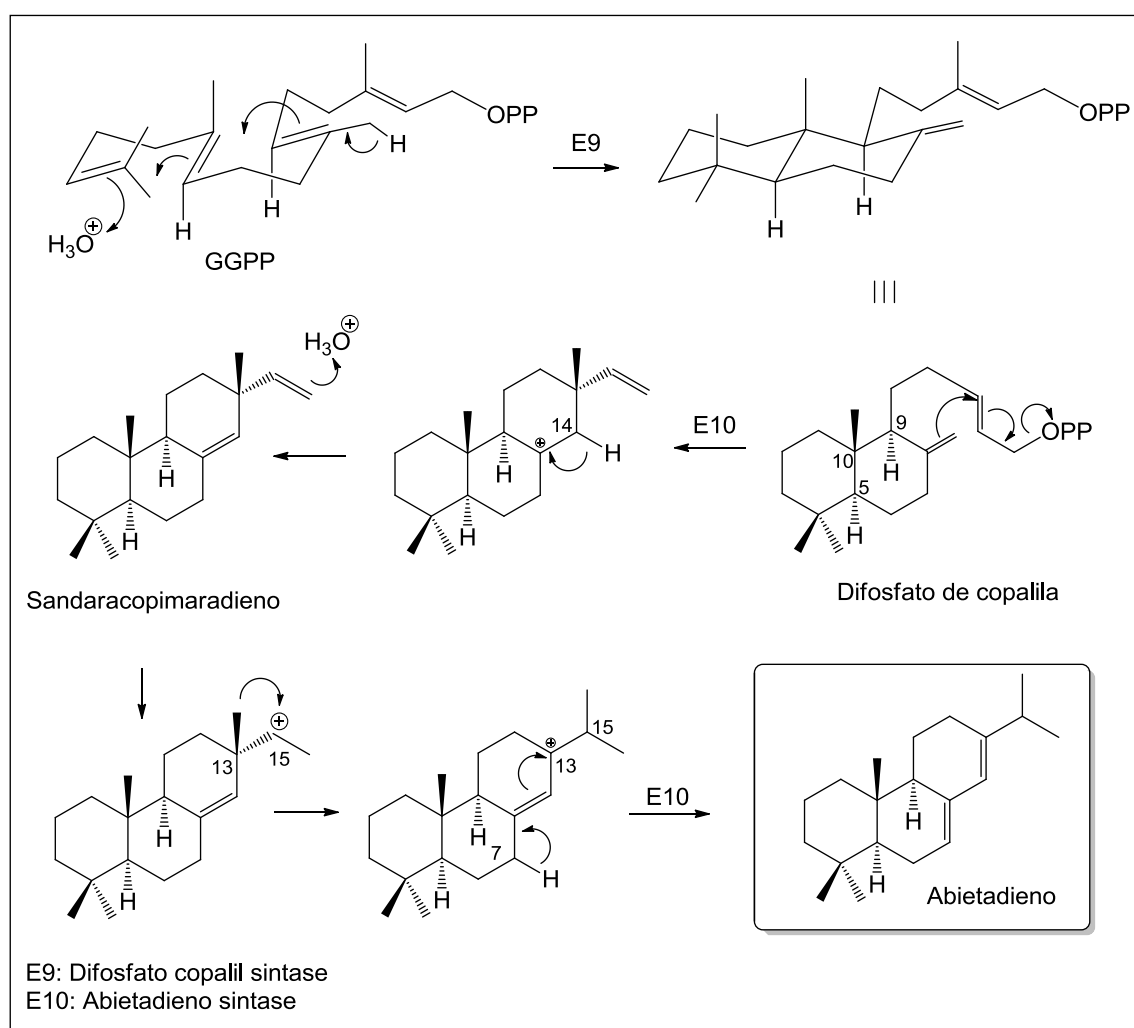


FIGURA 65. Rota biossintética para a formação do esqueleto abietano a partir do geranylgeranildifosfato (GGPP) (DEWICK, 2009).

Uma vez formado o esqueleto diterpênico tricíclico (FIGURA 65), acredita-se que a obtenção de um esqueleto icetaxeno é possível através da passagem por um

intermediário constituído de carbocátion primário (formado pela perda de um grupo hidreto ou um grupo hidróxido), o que possibilita a migração da ligação C-9/C-20, fornecendo o carbocátion terciário, precursor do esqueleto diterpênico icetaxeno (FIGURA 66) (SIMMONS & SARPONG, 2009).

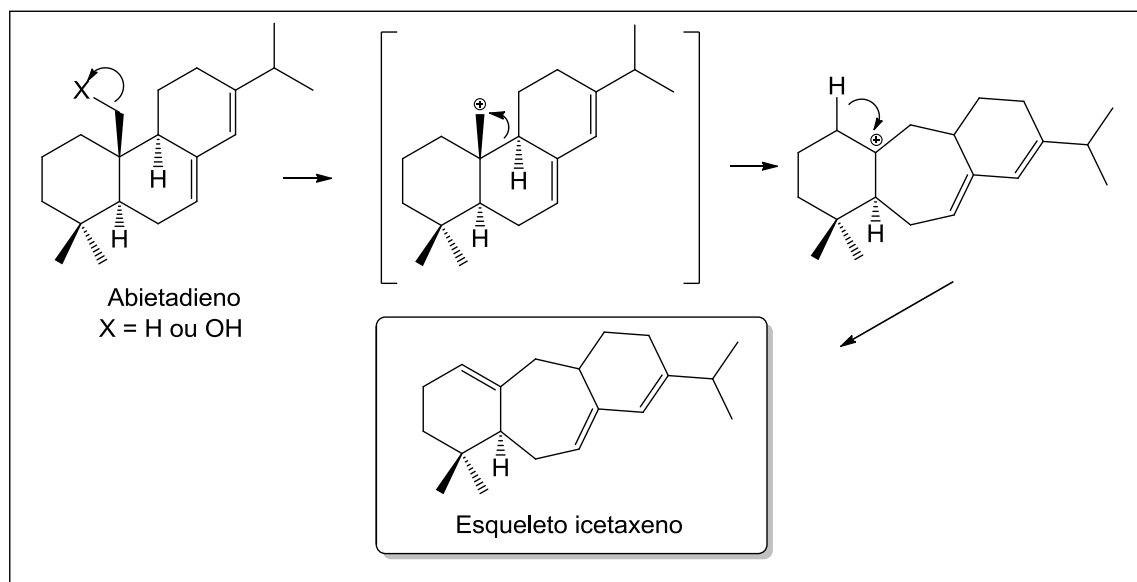


FIGURA 66. Possível formação do esqueleto icetaxano a partir do esqueleto abietano (SIMMONS & SARPONG, 2009).

Após a formação do precursor icetaxeno, poderia ocorrer oxidação em C-19 para formação do ácido carboxílico, seguido por uma descarboxilação catalisada por uma enzima específica (descarboxilase). Em seguida, outra oxidação resultaria na aromatização do anel A. Várias reações de oxidação e isomerização levariam à formação do grupo *para*-quinona (anel C). Em seguida, uma *O*-metilação promovida pela SAM (adenosina metionina), levaria à formação da substância **SL3**. Uma oxidação em **SL3** em C-7 e C-20 formaria **SL1**. A substância **SL2** poderia ser formada a partir de **SL1** por uma isomerização no anel B (FIGURA 67).

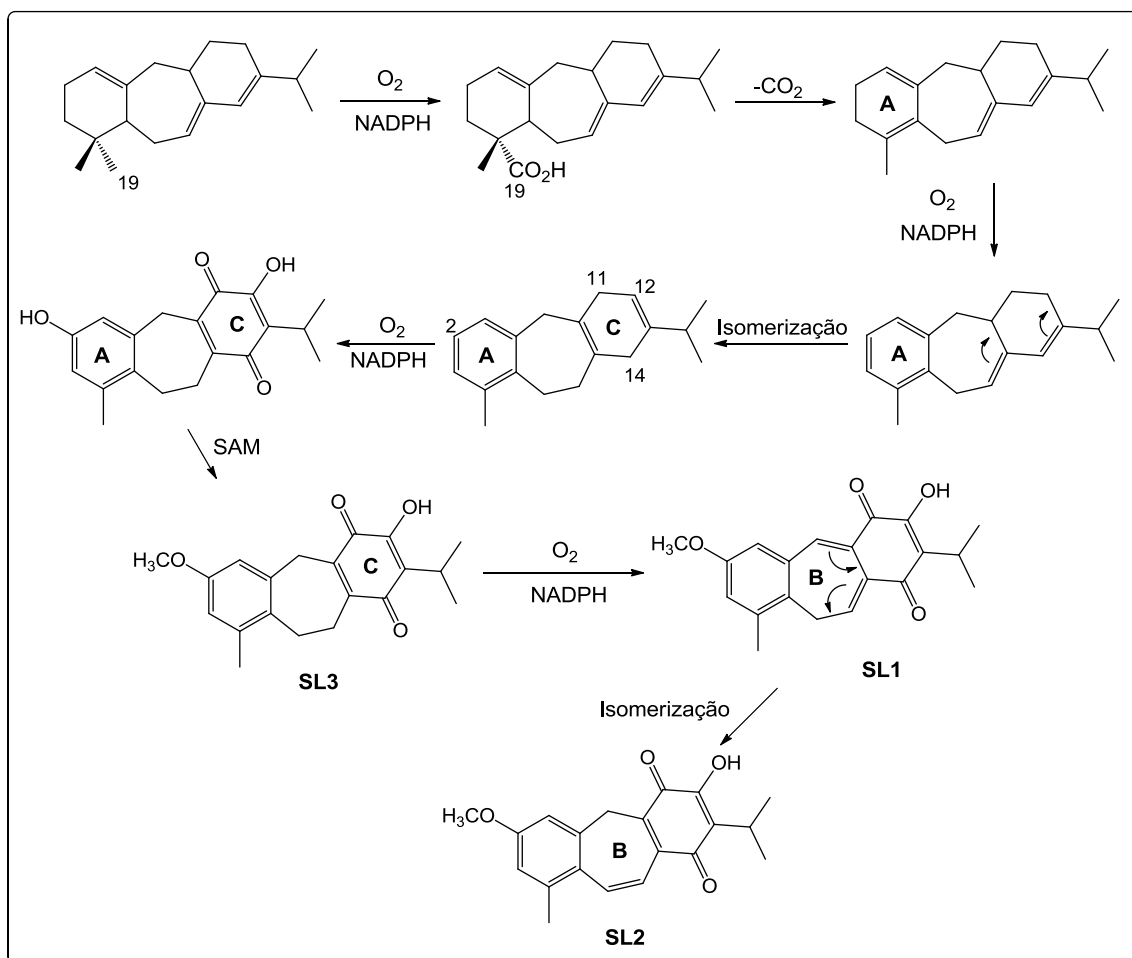


FIGURA 67. Proposta de biogênese das substâncias **SL1**, **SL2** e **SL3** a partir do precursor icetaxeno.

As substâncias **SL4** e **SL5** poderiam ser provenientes de **SL1**. Uma reação de eliminação levaria à formação de **SL4**, enquanto que uma nova oxidação geraria **SL5**. (FIGURA 68).

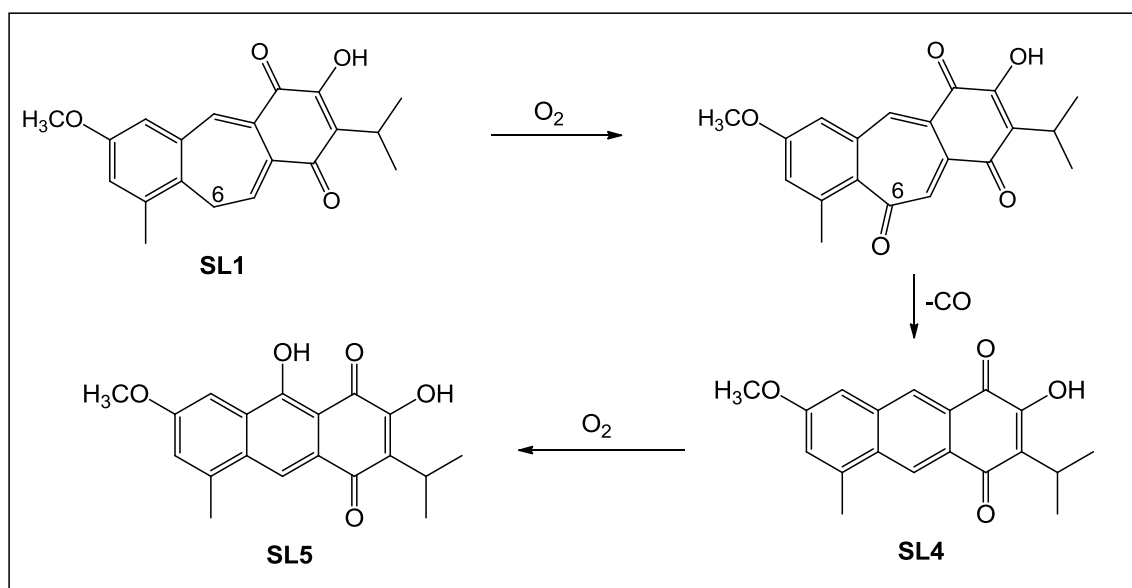


FIGURA 68. Proposta de biogênese das substâncias **SL4** e **SL5** a partir da substância **SL1**.

A substância **SL6** parece diferir das demais descritas acima, não tendo como precursor um icetaxeno, mas sim o abietadieno. Podemos supor uma série de oxidações no abietadieno, levando a um intermediário com o grupo carboxila nas posições C-19 e C-20. Através de reações de descarboxilação e desidrogenação haveria a aromatização do anel A. Uma isomerização seria favorecida, pois estenderia a conjugação, dando maior estabilidade à molécula. Após, poderia haver uma quebra oxidativa entre C-11/C-12 (anel C), com formação de um diol, que através de uma nova oxidação formaria dois grupos carboxila. A oxidação em C-14, seguida de descarboxilação resultaria na perda de C-11 e C-12. A formação de **SL6** seria finalizada por uma O-metilação realizada pela SAM (adenosina metionina) (FIGURA 69).

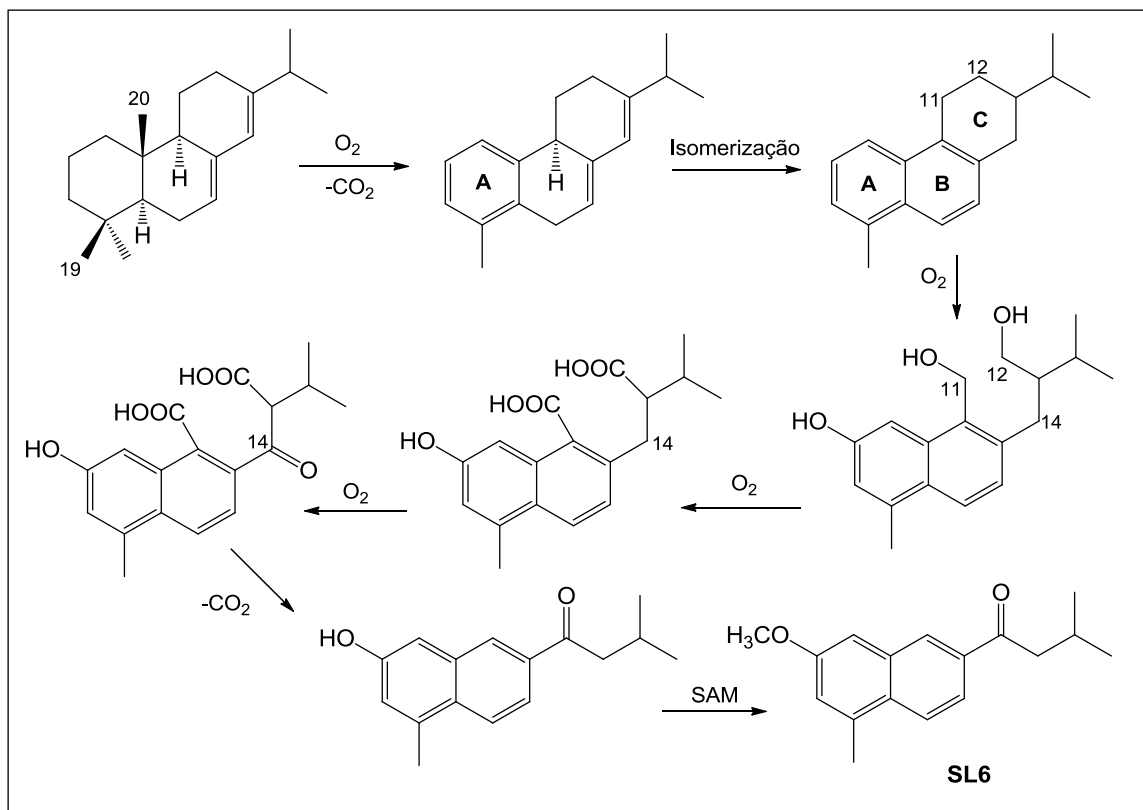


FIGURA 69. Proposta de biogênese da substância **SL6** a partir do abietadieno.

6. CONCLUSÃO

As folhas de *Salvia lachnostachys* revelaram até o momento a presença de diterpenos e triterpenos, o que é típico do gênero. No total foram isoladas dez substâncias, sendo seis diterpenóides derivados do esqueleto abietano: fruticulina A (**SL1**), isofruticulina A (**SL2**), 7,20-diidrofruticulina A (**SL3**), fruticulina B (**SL4**), 20-hidroxi-fruticulina B (**SL5**) e lachnostachyona (**SL6**). As outras quatro são triterpenoides com esqueleto urs-12-eno ou olean-12-eno: ácido oleanólico (**SL7**), ácido ursólico (**SL8**), uvaol (**SL9**) e eritrodiol (**SL10**). Dessas substâncias **SL2**, **SL5** e **SL6** são inéditas na literatura, enquanto que **SL3**, **SL4**, **SL9** e **SL10** estão sendo descritas pela primeira vez na espécie.

O extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas, a qual pode ser explicada pela presença de diterpenos, principalmente fruticulina A (**SL1**) e isofruticulina A (**SL2**), que apresentaram forte atividade citotóxica ($GI_{50} < 10 \mu\text{mol L}^{-1}$), além de fruticulina B (**SL4**) que exibiu atividade moderada para algumas das linhagens de células testadas ($GI_{50} = 16,4\text{-}28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Vários diterpenos isolados de *Salvia* apresentam atividade citotóxica, mas este é o primeiro relato da atividade de fruticulina A, isofruticulina A e fruticulina B. Além destas, é possível que *S. lachnostachys* contenha outras substâncias com atividade citotóxica, pois várias frações ativas não foram examinadas. Portanto, essa planta brasileira é uma fonte promissora de substâncias novas e com atividade citotóxica.

7. REFERÊNCIAS

BISIO, A., FRATERNALE, D., SCHITO, A.M., PARRICCHI, A., DAL PIAZ, F., RICCI, D., GIACOMINI, M., RUFFONI, B., DE TOMMASI, N. Establishment and analysis of *in vitro* biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.122, p. 276-285, 2016.

BISIO, A.; ROMUSSI, G.; RUSSO, E.; CAFAGGI, S.; SCHITO, A. M.; REPETTO, B.; TOMMASI, N. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 10468-10472, 2008.

BURMISTROVA, O; SIMÕES, M. F.; RIJO, P.; QUINTANA, J.; BERMEJO, J.; ESTÉVEZ, F. Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. **Journal of Natural Products**, v.76, p.1413-1423, 2013.

CARRER, R. P.; VANDERLINDE, R.; DUTRA, S.; MARCON, A.; ECHEVERRIGARY, S. Essential oil variation among Brazilian accessions of *Salvia guaranítica* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 430-434, 2007.

CIOFFI, G., BADER, A., MALAFRONTA, A., PIAZ, F. D., TOMMASI, N. Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palestina* Benth. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1005-1012, 2008.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**, 2^a Edition. Oxford University Press., 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**, 3rd Edition, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2009.

EL HADRI; A., DEL RIO, G. M. A.; SANZ, J. S. Cytotoxic activity of α -humulene and *trans*-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 76, p. 343-356, 2010.

ERBANO, M.; EHRENFRIED, C. A.; STEFANELLO, M. E. A.; SANTOS, E. P., Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**, v.75, p. 1737-1744, 2012.

FARHAT, M. B., JORDAN, M. J., CHAQUECH-HAMADA, R., LANDOULSI, A., SOTOMAYOR, J. A. Compounds and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia*

officinalis L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10349-10356, 2009.

FONTANA, G., SAVONA, G., RODRIGUEZ, B. Clerodane diterpenoids from *Salvia splendens*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1734-1738, 2006.

FRONZA, M., MURILLO, R., SLUSARCZYK, S., ADAMS, M., HAMBURGER, M., HEINZMANN, B., LAUFER, S., MERFORT, I. *In vitro* cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 4876-4881, 2011.

GIACOMELLI, E.; BERTRAND, S.; NIEVERGELT, A.; SIMOES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; RIVARA-MINTEN, E.; CUENDET, M.; BISIO, A.; WOLFENDER, J.L. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugata*. **Phytochemistry**, v. 96, p. 257-264, 2013.

GIANNONI, P., NARCISI, R., DE TOTERO, D., ROMUSSI, G., QUARTO, R., BISIO, A. The administration of demethyl fruticulin A from *Salvia corrugata* to mammalian cells lines induces "anoikis", a special form of apoptosis. **Phytomedicine**, v.17, p. 449-456, 2010.

HARDING, W. W., TIDGEWELL, K., SCHMIDT, M. Salvicins A and B, new neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*. **Organic Letters**, v.7, p. 3017-3020, 2005.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P.; SANTOS, J.S.; PASTORE, J.F., *Lamiaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>. Acesso em: 13 Fev. 2015.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty yeas research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HU, D., KAZUYOSHI, K., TAKAISHI, Y. Diterpenoids from *Salvia splendens*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 781-784, 1997.

KABOUCHE, A.; KABOUCHE, Z., Bioactive diterpenoids of *Salvia* species. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.35, 753-833, 2008.

KAMATOU, G. P. P., MAKUNGA, N. P., RAMOGOLA, W. P. N., VILJOEN, A. M. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 664-672, 2008.

KASSUYA, C. A. L.; WISNIEWSKI-JR, A.; SIMIONATTO, E. L., SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 919-921, 2009.

KONTOGIANNI, V. G.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A.; GEROTHANASIS, I, P. Rapid and novel discrimination and qualification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 188-195, 2009.

LEMES, G. F.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. Constituintes químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 34, p. 39-42, 2011.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, p. 3293-3299, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. **Nova Odessa**, p. 512, 2002.

MABBERLEY, D. J. *The Plant-book - a portable dictionary of the higher plants*, Cambridge University Press, Cambridge, 1993.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p. 1517-1575, 1994.

MARDER, M., VIOLA, H., WASOWSKI, C. Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors. **Phytomedicine**, v. 3, p. 29-31, 1996.

MATIDA, A. K.; ROSSI, M. H.; BLUMENTHAL, E. E. A. 3-β-O-β-D-glucopyranosyl-sitosterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 45, p. 147-151, 1996.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T., Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MIN-HUI, L.; QIAN-QUAN, L.; YAN-ZE, L.; ZHAN-HU, C.; NA, Z.; LU-QI, H.; PEI-GEN, X. Pharmacophylogenetic study on plants of genus *Salvia* L. from China. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, n.3, p. 164-181, 2013.

MONTICONE, M.; BISIO, A, DAGA, A.; GIANNONI, P.; GIARETTI, W.; MAFFEI, M.; PFEFFER, U, ROMEO, F.; QUARTO, R, ROMUSSI, G.; CORTE, G.; CASTAGNOLA, P. Demethyl fruticulín A (SCO-1) causes apoptosis by inducing reactive oxygen species in mitochondria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 1149-1159, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I., Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. **Wermuth's-The Practice of Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 159-186, 2008.

OLEA, G. S. R.; ROQUE, F. N. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v. 13, p. 278-281, 1990.

PICCINELLI, A. C.; AQUINO, D. F. S.; MORATO, P. N.; KURAOKA-OLIVEIRA, A. M.; STRAPASSON, R. L. B.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory and antihyperalgesic activities of ethanolic extract and fruticulín A from *Salvia lachnostachys* leaves in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, artigo ID 835914, 8p, 2014.

PINTO, P. S.; Terpenóides em espécies do gênero *Salvia*. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2012.

RODRIGUEZ-HAHN, L., ESQUIVEL, B., SANCHEZ, C., ESTEBANES, L., CÁRDENAS, J., SORIANO-GARCIA, M., TOSCANO, R., RAMAMOORTHY, T. P. Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticulín B. **Phytochemistry**, v.28, p. 567-570, 1989.

SANTOS, E.P. *Salvia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. J. Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8292>. Acesso em 10 fev. 2017.

SANTOS, J. A; PICCINELLI, A. C; FORMAGIO, M. D; OLIVEIRA, C.S; SANTOS, E. P. STEFANELLO, M. E. A; JUNIOR, U. L; OLIVEIRA, R. J; SUGIZAKI, M. M; KASSUYA, C. A. L. Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticulín A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents. **Plos One**, p. 1-12, 2017.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, ROBERT.; KUNERT, O. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 636-638, 2003.

SIMMONS, E. M; SARPONG, R. Structure, biosynthetic relations and chemical

synthesis of the icetexane diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 9, p. 1195-1217, 2009.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p. 1107-1118, 1990.

SLAMENOVA, D.; MASTEROVA, I.; LABAJ, J. Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 94, p. 282-290, 2004.

STROHL, W. R., The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

TOPÇU, G., Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. **Journal of Natural Products**, v.69, p. 482-487, 2006.

VAISHNAV, P. & DEMAIN, A. L., Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223–229, 2010.

VALLVERDU, C.; VILA, R. ; LORENZO, D. Composition of the essential oil of cultivated *Salvia guaranitica* from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 421-424, 2005.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J.; IRWIN, J. L.; TAKEDA, K. Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 389-393, 1998.

VIOLA, H., WASOWSKI, C., MARDER, M. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* and of its active principle, cirsiolol. **Phytomedicine**, v. 4, p. 47-52, 1997.

WU, Y.-B.; NI, Z.-Y.; SHI, Q.-W.; DONG, M.; KIYOTA, H.; GU, Y.-C.; CONG, B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. **Chemistry Review**, v. 112, p. 5967-6026, 2012.

YESILYURT, V. B., HALFON, B., OSTURK, M., TOPÇU, G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronela*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 31-39, 2008.

ZHOU, X.; LI, Y.; CHEN, X. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 1, p. 38-45, 2010.

