



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E  
ANTIMICROBIANA DE *Leonurus sibiricus* L.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lucimara Lais Zachow**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2016**

**Lucimara Lais Zachow**

**EXTRAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE  
INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE *Leonurus sibiricus* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Irion Dalcol

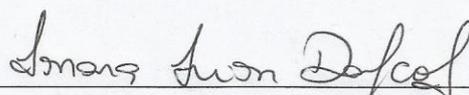
Santa Maria, RS  
2016

Lucimara Lais Zachow

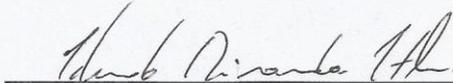
**EXTRAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE  
INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE *Leonurus sibiricus* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

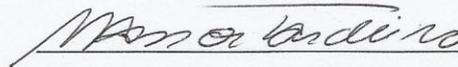
**Aprovado em 25 de fevereiro de 2016:**



**Ionara Irion Dalcol, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Eduardo Miranda Ethur, Dr. (UNIVATES)**



**Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. (UFSM)**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Nelci e Milton, principalmente pelo exemplo de seres humanos que são, despertando em mim o desejo de ser um dia um pouco do que são como pais, amigos e profissionais. Amo vocês incondicionalmente e não sei o que seria de mim sem as doses diárias de apoio e amor que recebo de vocês!*

## Agradecimentos

Á Deus, pela oportunidade da vida e por ser minha força e refúgio, orientando meus passos e protegendo o meu caminho.

Á minha família, meus pais Nelci e Milton, minha irmã Laura, cunhado Josué e minha sobrinha Ana Laura, pelo apoio, paciência e por sempre acreditarem em mim, principalmente quando eu mesma não acreditava mais. A todos meus familiares, avós, tios e primos...obrigada pelo incentivo e pela confiança que sempre depositaram em mim. Jamais conseguirei expressar meu amor e minha gratidão a vocês.

Á minha orientadora professora Ionara Irion Dalcol, pela oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente ao seu lado, pelo apoio, pela paciência, confiança, e principalmente pela amizade que construímos nesses dois anos, quando muitas vezes também fez o papel de mãe para mim.

Aos professores Dr. Ademir Farias Morel e Dr. Marco Aurélio Mostardeiro, pela disponibilidade de participarem como banca do exame de qualificação e por suas contribuições, durante a execução deste trabalho.

Aos meus queridos conterrâneos de Bom Progresso, que formaram uma verdadeira força-tarefa na busca pela planta alvo deste estudo, bem como nas coletas, e que com seus esforços tornaram este trabalho possível. Obrigada de todo meu coração!

Ás minhas amigas, irmãs e confidentes de todas as horas, Gesieli, Caroll, Sindy e Letícia, por serem meus ombros amigos, ouvidos atentos e corações abertos, sempre que precisei. Amo vocês gurias!

Á Sindy, um agradecimento especial, por termos enfrentado juntas muitos desafios, desde o tempo da graduação, a prova de seleção de mestrado, a mudança de rotina e de vida...enfim, por ter sido muito mais que uma amiga, se tornando minha família em Santa Maria e estando sempre disposta a me ajudar, na vida pessoal e profissional. Obrigada mana, sem você tudo teria sido muito mais difícil.

Ao Máicon, pelo carinho, apoio e principalmente pela paciência demonstrados neste tempo.

Ás colegas e amigas do Laboratório 2014, Janaína, Maura, Alessandra e Vanessa, por me receberem com carinho e pelo apoio técnico e emocional (tão necessário!) de todos os dias, sem falar em todos os momentos divertidos que passamos juntas, que fizeram tudo se tornar cômico ao invés de trágico. Vocês fizeram a diferença na minha vida e na minha história em Santa Maria, muito obrigada queridinhas!

Um agradecimento especial a Jana, por ter me acolhido antes mesmo de me conhecer, me dando dicas, materiais e “breves” explicações (jeitinho Jana de ser) sobre a seleção e sobre o trabalho no laboratório, além de ser minha companheira nas intermináveis filas do RU e ter colaborado imensamente com este trabalho, realizando as atividades enzimáticas, em multiplicatas infinitas...muito obrigada por tudo!

Ao aluno de iniciação científica, Geovane Saldanha, pelo seu auxílio durante a execução deste trabalho.

Aos demais colegas do NPPN, pelo convívio, pelas trocas de conhecimento e de materiais. Obrigada também pelos momentos de descontração, pelas idas ao CE e pelas peripécias aprontadas por Anes e Cia. Ltda., que renderam tão boas recordações.

Aos meninos do Laboratório 2116, pelo convívio e os muitos empréstimos de materiais, especialmente ao Paulo, pela amizade e por sempre estar disposto a ajudar, quando precisei.

Á professora Dra. Paola Mello, pelo apoio e pela disponibilidade quando do empréstimo dos equipamentos de ultrassom e micro-ondas.

Aos colegas de pós-graduação do CEPETRO e do LAQUIA, pela gentileza com que me receberam e também pelo convívio fora do laboratório, quando se tornaram queridos amigos.

Aos professores Dr. Marco Aurélio Mostardeiro e Dr. Eduardo Miranda Ethur, pela disponibilidade de participação como banca na defesa deste trabalho.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, por serem sempre solícitos.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

### EXTRAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA DE *Leonurus sibiricus* L.

AUTORA: Lucimara Lais Zachow

ORIENTADORA: Ionara Irion Dalcol

No presente trabalho foram preparados os extratos metanólico e metanólico ácido das partes aéreas de *Leonurus sibiricus* L. e isolados seis metabólitos secundários: o triterpeno esqualeno (**28**), o diterpeno do tipo labdano leojaponina (**29**), os fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol (**30**) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**), o ftalato de bis (2-etilexila) (**31**) e o alcaloide leonurina (**1**), inéditos nesta espécie com excessão do alcaloide **1**. Estes compostos isolados foram testados a fim de se determinar suas atividades antimicrobiana e de inibição enzimática frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e prolil oligopeptidase (POP). Os resultados obtidos indicaram moderado potencial antimicrobiano das amostras testadas. O diterpeno leojaponina (**29**) apresentou melhor resultado no ensaio de inibição da POP, com 72%. Com relação ao ensaio de inibição da enzima AChE, os metabólitos testados demonstraram um potencial de inibição com percentuais entre 10-17%. Além disso, objetivando-se avaliar diferentes métodos de obtenção dos extratos brutos metanólico e metanólico ácido foram preparados uma série de extratos de *L. sibiricus* a pequena escala a fim de se comparar rendimentos, perfis cromatográficos e atividades biológicas dos mesmos. De acordo com os resultados observados, o maior rendimento foi obtido através da extração a quente utilizando refluxo e MeOH/HCl 1% como solvente de extração (EB **q-MeOH**+; com 21% de rendimento). Todos os extratos ácidos apresentaram maior potencial de inibição enzimática, sendo os maiores percentuais obtidos para os extratos provenientes de extrações assistidas por ultrassom EB **CHII-MeOH**+ e **CHI-MeOH**+ (sonoreator do tipo “cup horn”) e **USII-MeOH**+ (banho ultrassônico), com 91, 80 e 84% de inibição da enzima POP, respectivamente. Em relação a AChE, os maiores percentuais de inibição também foram obtidos com os extratos preparados por tecnologia de ultrassom (EB **USI-MeOH** e **USI-MeOH**+ com 34 e 38% de inibição da AChE, respectivamente). Realizou-se ainda a extração do óleo essencial das partes aéreas frescas de *L. sibiricus* a fim de determinar sua composição química e atividade biológica. Foram identificados três constituintes principais do óleo: trans-cariofileno (31,7%),  $\alpha$ -humuleno (18,53%) e  $\gamma$ -muuruleno (19,12%). O óleo não apresentou resultados satisfatórios quando a sua atividade biológica, em todos os testes realizados.

Palavras-chave: *Leonurus sibiricus* L.. Atividades biológicas. Metodologias de extração. Óleo essencial.

## ABSTRACT

### EXTRACTION, CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ENZYME INHIBITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Leonurus sibiricus* L.

AUTHOR: Lucimara Lais Zachow

ADVISER: Ionara Irion Dalcol

In this study, methanolic and acid methanolic extracts were prepared from the aerial parts of *Leonurus sibiricus* L. and six secondary metabolites were isolated: the triterpene squalene (**28**), the labdane-type diterpenoid leojaponin (**29**), the phytosterols  $\beta$ -sitosterol (**30**) and  $\beta$ -sitosterol glycosylated (**32**), the bis phthalate (2-ethylhexyl) (**31**) and the alkaloid leunurina (**1**), which are unprecedented in this species with the exception of alkaloid **1**. These isolated compounds were tested to determine their antimicrobial activity and enzyme inhibition against to acetylcholinesterase (AChE) and proliloligopeptidase (POP) enzymes. The obtained results indicated moderate antimicrobial potential of the tested samples. The leojaponin diterpene (**29**) showed better results in the POP inhibition assay, with 72%. Regarding the assay of AChE enzyme, the metabolites tested demonstrated inhibition potential with percentages between 10-17%. Furthermore, in order to evaluate different methods of obtaining the methanolic and acid methanolic extracts, a serie of *L. sibiricus* extracts were prepared to compare yields, chromatographic profile and biological activities thereof. According to the observed results, the highest yield was obtained by hot extraction using reflux method and MeOH/HCl 1% as an extraction solvent (EB *q*-MeOH +, 21% yield). All acid extracts showed greater potential for enzyme inhibition, with the highest percentage obtained for the extracts from extraction assisted by ultrasound EB *CHII*-MeOH+ and *CHI*-MeOH+ (sonoreator like *cup horn*) and EB *USII*-MeOH+ (ultrasonic bath), with 91, 80 and 84% inhibition of POP enzyme, respectively. Considering the AChE, the highest percentages of inhibition were also obtained with extracts prepared by ultrasound technology (EB *USI*-MeOH and *USI*-MeOH+ with 34 and 38% of AChE inhibition, respectively). Moreover, it was carried out the extraction of essential oil from the fresh aerial parts of *L. sibiricus* to determine their chemical composition and biological activity. Three main constituents of the oil were identified: trans-caryophyllene (31.7%),  $\alpha$ -humulene (18.53%) and  $\gamma$ -muuruleno (19.12%). The oil did not show satisfactory results for its biological activity in all performed tests.

Keywords: *Leonurus sibiricus* L.. Biological activities. Extraction methodologies. Essential oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Leonurus sibiricus</i> L.....	20
Figura 2 - Alcaloides isolados de <i>L. sibiricus</i> , leonurina (1) e estaquidrina (2).....	21
Figura 3 - Estruturas químicas de flavonóides isolados de <i>L. sibiricus</i> , quercitina (3), isoquercitrina (4), rutina (5), genkanina (6) e apigenina (7).....	22
Figura 4 - Diterpenóides do tipo labdano isolados de <i>L. sibiricus</i> , ácido leosibirico A (8), ácido leosibirico B (9) e hispanona (10).....	22
Figura 5 - Substâncias utilizadas no tratamento da DA: tacrina (11), donezepil (12), rivastigmina (13), galantamina (14) e huperizina A (15).....	25
Figura 6 - Inibidores da POP obtidos através do Z-prolil-prolinal (16): S-17092 (17), ONO-1603 (18), JTP-4819 (19), Z-321 (20) e o KYP-2047 (21).....	27
Figura 7 - Alcaloides com potencial antimicrobiano.....	31
Figura 8 - Flavonóides com potencial antimicrobiano.....	31
Figura 9 - Quinonas com potencial antimicrobiano.....	32
Figura 10 - Mecanismo de cavitação: a) aplicação das ondas ultrassônicas no líquido, b) formação, c) crescimento e d) colapso de bolhas de gás-vapor.....	33
Figura 11 - Representação do mecanismo de rotação dipolo.....	35
Figura 12 - Banho ultrassônico.....	42
Figura 13 - Sonoreator do tipo <i>cup horn</i> .....	43
Figura 14 - Equipamento de micro-ondas focalizado.....	44
Figura 15 - Fracionamento por cromatografia a vácuo em funil de placa porosa.....	47
Figura 16 - Extração do óleo essencial utilizando aparelho do tipo Clevenger.....	53
Figura 17 - Cromatogramas dos extratos de <i>L. sibiricus</i> obtidos por diferentes métodos de extração.....	65
Figura 18 - Cromatogramas dos extratos de <i>L. sibiricus</i> obtidos por diferentes métodos de extração.....	66
Figura 19 - CG/EM do esqualeno (28).....	67
Figura 20 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do esqualeno (28) em CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz.....	68
Figura 21 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do esqualeno (28) em CDCl <sub>3</sub> a 100 MHz.....	69
Figura 22 - CG/EM da leojaponina (29).....	70
Figura 23 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da leojaponina (29) em CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz.....	71

Figura 24 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da leojaponina ( <b>29</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.....	72
Figura 25 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do $\beta$ -sitosterol ( <b>30</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.....	73
Figura 26 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do $\beta$ -sitosterol ( <b>30</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.....	74
Figura 27 - CG/EM do ftalato de bis(2-etilexila) ( <b>31</b> ).....	75
Figura 28 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ftalato de bis(2-etilexila) ( <b>31</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.....	76
Figura 29 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do ftalato de bis(2-etilexila) ( <b>31</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.....	77
Figura 30 - CG/EM da amostra PP, produto de extração de pipetas de Pasteur.....	78
Figura 31 - CG/EM da amostra PM, produto de extração de ponteiros de micropipeta.....	78
Figura 32 - CG/EM da amostra TP, produto da extração das tampas de plástico.....	79
Figura 33 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do $\beta$ -sitosterol glicosilado ( <b>32</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.....	80
Figura 34 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do $\beta$ -sitosterol glicosilado ( <b>32</b> ) em $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.....	81
Figura 35 - Cromatograma do alcaloide leonurina ( <b>1</b> ) de origem comercial (A) e isolado de <i>L. sibiricus</i> .....	82
Figura 36 - Espectro de massa de alta resolução (ESI+) do alcaloide leonurina ( <b>1</b> ) obtido comercialmente.....	83
Figura 37 - Espectro de massa de alta resolução (ESI+) do alcaloide leonurina ( <b>1</b> ) obtido isolado de <i>L. sibiricus</i> .....	83
Figura 38 - Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de <i>L. sibiricus</i> .....	85
Figura 39 - Cromatograma da amostra de FB-óleo isolada do óleo essencial.....	86
Figura 40 - CG/EM da amostra de FB-óleo isolada do óleo essencial.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coluna cromatográfica LHA a partir da FHEX do LEBM.....	46
Tabela 2 - Fracionamento através de filtração do LEBM (FLM).....	48
Tabela 3 - Coluna cromatográfica CLMA a partir da fração IV 8-9 da FLM.....	49
Tabela 4 - Coluna cromatográfica CLMC fração XVII 23-27 da FLM.....	50
Tabela 5 - Coluna cromatográfica C-FBuOH a partir da FBUOH do LEBM+.....	52
Tabela 6 - Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana.....	58
Tabela 7 - Rendimentos do LEBM e frações proveniente do fracionamento líquido-líquido.....	61
Tabela 8 - Rendimentos do LEBM+ e frações.....	61
Tabela 9 - Estudo comparativo de obtenção de extratos de <i>L. sibiricus</i> .....	63
Tabela 10 - Composição do óleo essencial de <i>Leonurus sibiricus</i> L.....	84
Tabela 11 - Atividade inibitória dos extratos de <i>L. sibiricus</i> frente às enzimas AChE e POP.....	88
Tabela 12 - CIM e CLM frente a cepas de bactérias, em µg/mL.....	90
Tabela 13 - CIM e CLM frente a cepas de fungos, em µg/mL.....	92

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Fracionamento líquido-líquido do LEBM.....	60
Esquema 2 - Fracionamento do LEBM+.....	62

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
3.1	INFORMAÇÕES BOTÂNICAS E FITOQUÍMICAS.....	18
3.1.1	<b>Família Lamiaceae</b> .....	18
3.1.2	<b>Gênero <i>Leonurus</i></b> .....	18
3.1.3	<b><i>Leonurus sibiricus</i> L.</b> .....	19
3.2	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	23
3.2.1	<b>Atividade de inibição enzimática</b> .....	23
3.2.1.1	<i>Acetilcolinesterase (AChE)</i> .....	23
3.2.1.2	<i>Prolil oligopeptidase (POP)</i> .....	25
3.2.2	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	28
3.2.2.1	<i>Micro-organismos patogênicos oportunistas</i> .....	28
3.2.2.2	<i>Agentes antimicrobianos e os produtos naturais</i> .....	30
3.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	32
3.3.1	<b>Ultrassom</b> .....	33
3.3.2	<b>Micro-ondas</b> .....	34
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	37
4.1.1	<b>Equipamentos de ultrassom</b> .....	37
4.1.2	<b>Equipamento de forno de microondas</b> .....	37
4.1.3	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência</b> .....	37
4.1.4	<b>Cromatografia gasosa</b> .....	38
4.1.5	<b>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrômetro de massa – CLUE/EM</b> .....	38
4.1.6	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C</b> .....	38
4.1.7	<b>Espectrofotômetro</b> .....	39
4.2	REAGENTES UTILIZADOS.....	39
4.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	40
4.4	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	40
4.4.1	<b>Preparação de extrato bruto empregando diferentes metodologias de extração</b> .....	41
4.4.1.1	<i>Extração por maceração</i> .....	41
4.4.1.2	<i>Extração a quente</i> .....	41
4.4.1.3	<i>Extração assistida por ultrassom</i> .....	42
4.4.1.3.1	Banho ultrassônico.....	42
4.4.1.3.2	Sonoreator do tipo <i>cup horn</i> .....	43
4.4.1.4	<i>Extração assistida por micro-ondas</i> .....	44
4.5	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO (LEBM).....	45
4.5.1	<b>Fracionamento do extrato bruto metanólico através de extração líquido-líquido</b> .....	45
4.5.2	<b>Fracionamento do extrato bruto metanólico através de cromatografia a vácuo com funil de placa porosa</b> .....	47
4.5.3	<b>Fracionamento do extrato bruto metanólico ácido (LEBM+)</b> .....	51

4.6	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	52
4.7	DADOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Leonurus sibiricus</i> L.....	54
<b>4.7.1</b>	<b>Metabólitos isolados do LEBM.....</b>	<b>54</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Metabólito isolado do LEBM+.....</b>	<b>56</b>
4.8	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	56
<b>4.8.1</b>	<b>Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE).....</b>	<b>56</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Atividade inibitória da enzima Prolil oligopeptidase (POP).....</b>	<b>57</b>
4.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
<b>4.9.1</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo.....</b>	<b>58</b>
<i>4.9.1.1</i>	<i>Método para a determinação da CIM.....</i>	<i>59</i>
<i>4.9.1.2</i>	<i>Método para a determinação da concentração letal mínima (CLM).....</i>	<i>59</i>
<b>5</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	60
<b>5.1.1</b>	<b>Rendimentos dos extratos e frações do LEBM e LEBM+.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Rendimentos e perfis cromatográficos dos extratos obtidos de acordo com o método de extração empregado.....</b>	<b>62</b>
5.2	ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Leonurus sibiricus</i> L.....	67
5.2.1	<b>Metabólitos isolados do LEBM.....</b>	67
<i>5.2.1.1</i>	<i>Esqualeno (28).....</i>	<i>67</i>
<i>5.2.1.2</i>	<i>Leojaponina (29).....</i>	<i>70</i>
<i>5.2.1.3</i>	<i><math>\beta</math>-sitosterol (30).....</i>	<i>72</i>
<i>5.2.1.4</i>	<i>Ftalato de bis (2-etilexila) (31).....</i>	<i>74</i>
<i>5.2.1.5</i>	<i><math>\beta</math>-sitosterol glicosilado (32).....</i>	<i>79</i>
<b>5.2.2</b>	<b>Metabólito isolado do LEBM+.....</b>	<b>82</b>
<i>5.2.2.1</i>	<i>Leonurina (1).....</i>	<i>82</i>
5.3	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	84
5.4	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	87
<b>5.4.1</b>	<b>Atividade enzimática.....</b>	<b>87</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
	<b>Anexo I – Artigo submetido para publicação.....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos de fontes naturais pelo homem, com fins terapêuticos, é uma prática comum a milhares de anos. Acredita-se que a ingestão de ervas e folhas tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais com tal finalidade. Neste contexto, destacam-se a medicina chinesa e egípcia, sendo até hoje referências em técnicas de preparo de vegetais medicinais, o que desperta o interesse da comunidade científica na compreensão dos mecanismos de ação e no isolamento dos princípios ativos envolvidos (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Hoje, os produtos naturais estão presentes em aproximadamente 40% dos fármacos disponíveis, seja como o princípio ativo ou análogos inspirados nos mesmos. As chamadas plantas medicinais são a principal fonte de agentes anti-infecciosos e antitumorais, representando mais de 60% dos candidatos a fármacos destas classes terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2012; LI et al., 2009).

Dentro do contexto de agentes anti-infecciosos, por exemplo, as plantas sempre tiveram um importante papel. Antes mesmo de se saber da existência dos micro-organismos patogênicos, a ideia de que produtos de fontes naturais como extratos vegetais e óleos essenciais possuíam potencial farmacológico já era aceita. Em muitos casos, essa atividade biológica era justamente o que hoje conhecemos como potencial antimicrobiano (RÍOS; RECIO, 2005). No contexto científico atual, os produtos naturais estão recebendo muito destaque na pesquisa de novos fármacos que atuem em doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC). Muitas plantas têm demonstrado ser neurologicamente bioativas, agindo em doenças como depressão, mal de Alzheimer, esquizofrenia, entre outras, sendo por vezes mais eficazes do que os medicamentos disponíveis no mercado (GOMES et al., 2009; EISSA et al., 2014).

Diante disso, compreende-se o interesse em se buscar em fontes naturais agentes farmacológicos eficientes no tratamento das mais diversas enfermidades, buscando identificar quais as substâncias presentes responsáveis pela ação terapêutica. Inserido neste panorama, o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) busca, através dos seus trabalhos, um maior entendimento da composição química e das atividades farmacológicas apresentadas pelos produtos naturais. Inspirando-se nos usos populares, o foco dos trabalhos concentra-se em elucidar a fitoquímica e o potencial

farmacológico de plantas nativas do Rio Grande do Sul, abrangendo assim um grande número de famílias e espécies vegetais estudadas.

Dentre as famílias de plantas estudadas pelo grupo, encontra-se a família Lamiaceae, ou Labiatae, pertencente a ordem das Tubliflorae Lamiales, a qual compreende 236 gêneros, com aproximadamente 7000 espécies catalogadas. As espécies que compõe a família Lamiaceae possuem uma larga variedade de atividades biológicas descritas através dos usos populares, bem como por estudos científicos, além de uma ampla variedade de fitoquímicos (KHANAM; HASSAN, 2008).

Um dos gêneros da família Lamiaceae, cujas espécies possuem relatos de usos na medicina popular é o *Leonurus*, o qual possui 23 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente na região compreendida como Eurásia, sendo bastante utilizados na cultura chinesa (SAHA et al., 2012). Deste gênero, entretanto, apenas 6 espécies já foram quimicamente estudadas, sendo 4 principais; são elas: *L. cardiaca* conhecida como “motherwort” (do inglês, erva-de-mãe) ou orelha-de-leão; *L. japonicus*, conhecida no Brasil como erva-raposa; *L. heterophyllus*, também chamada popularmente de erva-de-mãe; e por fim *L. sibiricus* L., conhecida no Brasil como “erva-de-macaé” ou “rubim”, e alvo do presente trabalho.

Na medicina popular, encontra-se relatos do uso de *Leonurus sibiricus* no tratamento de diversas enfermidades, como irregularidades menstruais, hipertensão, disfunções respiratórias, entre outros (SILVA, MOURA, 2011; ALMEIDA et al., 2005; MOON et al., 2010). Devido a isso, despertou o interesse de estudos científicos quanto aos seus efeitos farmacológicos, sendo que já foram realizados trabalhos que comprovam os efeitos antiinflamatórios e analgésicos e também a capacidade de induzir a expressão de óxido nítrico, envolvido na função muscular em geral (LEE et al., 2010; ISLAM et., 2005). Além disso, encontra-se também na literatura dados a respeito da potente ação antioxidante dos extratos de *L. sibiricus*, além da sua capacidade de aumentar a secreção de insulina, já que a planta é utilizada, inclusive no Rio Grande do Sul, para o tratamento da diabetes (SCHMIDT et al., 2013).

Assim, devido ao seu variado uso na medicina popular, inclusive no estado do Rio Grande do Sul, a *Leonurus sibiricus* foi escolhida como a planta de estudo do presente trabalho, objetivando-se avaliar, além da sua fitoquímica, atividades biológicas como antimicrobiana e enzimática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a composição química dos extratos de partes aéreas de *Leonurus sibiricus* L., bem como sua atividade biológica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os extratos metanólico e metanólico ácido das partes aéreas de *L. sibiricus*;
- Preparar os extratos metanólico e metanólico ácido das partes aéreas de *L. sibiricus* por diferentes métodos de extração utilizando, além dos métodos convencionais de maceração e extração a quente, também fontes de energia alternativa como ultrassom e micro-ondas, a fim de comparar o rendimento e a atividade biológica dos mesmos;
- Realizar o fracionamento dos extratos obtidos utilizando diferentes solventes em ordem crescente de polaridade: *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila.
- Através de hidrodestilação, obter o óleo essencial das partes aéreas frescas de *L. sibiricus* e identificar seus componentes químicos;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos e frações de *L. sibiricus*.
- Avaliar a atividade dos extratos obtidos, do óleo essencial e dos metabólitos isolados frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e prolil oligopeptidase (POP);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, óleo essencial e metabólitos isolados;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS E FITOQUÍMICAS

##### 3.1.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae, também chamada de Labiatae, possui 236 gêneros e mais de 7000 espécies, configurando-se como a maior família pertencente a ordem das Lamiales. Esta família encontra-se distribuída em praticamente todo o mundo, sendo que várias de suas espécies são cultivadas por possuírem características aromáticas e ornamentais (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2016). No Brasil, já foram identificados 32 gêneros e aproximadamente 500 espécies, nativas ou naturalizadas (HARLEY, 2012).

No uso popular, a família Lamiaceae é particularmente importante, pois as plantas que a compõe são úteis devido ao sabor, aroma e propriedades medicinais. Entre as espécies mais conhecidas e conseqüentemente mais utilizadas pelos seres humanos, encontram-se a alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill), a hortelã (*Mentha piperita*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) o orégano (*Ocimum vulgare* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a sálvia (*Salvia officinalis*) e o rubim (*Leonurus sibiricus* L.) (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2016; HARLEY, 2012; LIMA; CARDOSO, 2007; LORENZI; MATOS, 2002).

##### 3.1.2 Gênero *Leonurus*

O gênero *Leonurus* compreende 23 espécies já catalogadas, sendo que apenas 6 destas espécies já foram quimicamente estudadas, sendo 4 principais:

- *L. cardiaca*, conhecida como “motherwort” (do inglês, erva-de-mãe) ou orelha-de-leão. Em estudos realizados com esta planta já foram identificados compostos químicos da classe dos terpenos: mono- (iridóides), di-(do tipo clerodano, furanolabdano e labdano), tri-(ácidos ursólico e olianoléico); compostos nitrogenados (leonurina e estaquidrina), assim como fenilpropanóides, flavonóides, ácidos fenólicos, óleos voláteis, esteróis e

taninos. Esta planta é utilizada na medicina popular no tratamento de disfunções cardíacas, hipertireoidismo, desordens gastrointestinais, problemas no trato respiratório e inflamações de pele (WOJTYNIAK et al., 2013).

- *L. japonicus*, conhecida no Brasil como erva-raposa. Na medicina tradicional chinesa esta planta é utilizada principalmente em doenças relacionadas com a mulher, como disfunções menstruais, dismorréia, lesões uterinas, entre outras; devido a isso, vários estudos já foram realizados a fim de identificar seus componentes químicos principais; assim, foram identificados metabólitos da classe dos alcaloides, diterpenos, sesquiterpenos glicosilados, flavonas, componentes de óleos essenciais, entre outros (ZHOU et al., 2013).
- *L. heterophyllus*, também chamada popularmente de erva-de-mãe. As partes aéreas são utilizadas popularmente no tratamento de dores menstruais e pós-parto; além disso, possuem relatos de sua utilização em casos de hipertensão, problemas circulatórios e desintéria. Os pequenos frutos produzidos pela planta são utilizados no tratamento de edemas e como diuréticos. Quanto a sua fitoquímica, já foram descritos compostos das classes dos diterpenos do tipo labdano, flavonóides, iridóides, esteróis, entre outros (XANG et al., 2014; HUNG et al., 2011).

Por fim, outra espécie pertencente a este gênero é a *Leonurus sibiricus* L., planta-alvo do presente estudo e descrita no item a seguir.

### 3.1.3 *Leonurus sibiricus* L.

A *Leonurus sibiricus* L. é conhecida popularmente no Brasil e no Rio Grande do Sul, como “rubim” ou “erva-de-macaé” (Figura 1). *L. sibiricus* é uma planta arbustiva, anual ou bienal, considerada uma invasora em lavouras agrícolas. É encontrada em áreas abandonadas e possui crescimento espontâneo em praticamente todo o território do Brasil. Oriunda da Índia, sua ocorrência é observada em regiões de clima tropical da Ásia, África e América (SHAHLA et al., 2006).

Figura 1 – *Leonurus sibiricus* L.

Fonte: Portal de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares

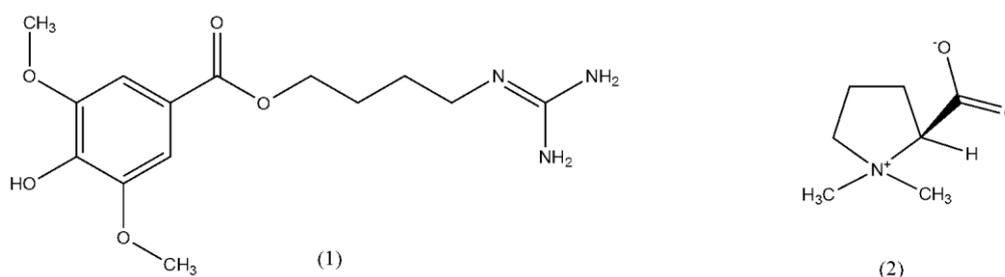
Entre os usos empíricos desta planta, pode-se destacar o uso no tratamento de irregularidades menstruais, malária, hipertensão e problemas respiratórios, como bronquite e asma (SILVA; MOURA, 2011; ALMEIDA et al., 2005; MOON et al., 2010). Devido a sua ampla utilização na medicina popular, vem despertando o interesse de estudos científicos quanto aos seus efeitos farmacológicos. Neste sentido, estudos já realizados comprovam os efeitos antiinflamatórios e analgésicos e também a capacidade de induzir a expressão de óxido nítrico, envolvido na função muscular em geral e relacionado à arteriosclerose (SHIN et al., 2009; LEE et al., 2010; ISLAM et al., 2005). Além disso, encontra-se também na literatura dados a respeito da potente ação antioxidante dos extratos de *L. sibiricus*, além da sua capacidade de aumentar a secreção de insulina, já que a planta é utilizada, inclusive no Rio Grande do Sul, para o tratamento da diabetes (SCHMIDT et al., 2013).

Apesar de seu amplo uso medicinal, Ahmed e col. (2005) observaram que o extrato bruto metanólico das partes aéreas de *L. sibiricus* de origem africana apresenta ação depressora do sistema nervoso central. Seus efeitos na literatura são descritos como moderadamente narcótico, psicoativo e “cannabis-like” (AHMED; TSLAM; CHOUDHURI, 2005; NSUALA; ENSLIN; VILJOEN, 2015; WU et al., 2011).

Quanto a sua fitoquímica, algumas classes de metabólitos secundários foram isoladas de *L. sibiricus*. Pertencentes à classe dos alcaloides, apenas dois exemplos possuem ocorrência

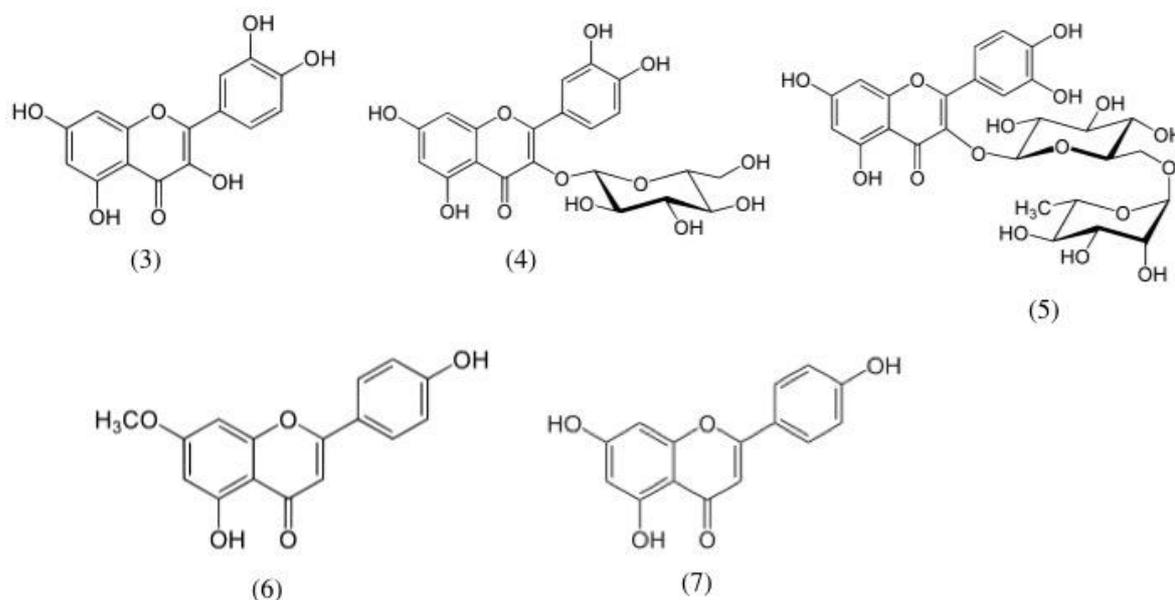
relatada na literatura sendo um deles a leonurina (1), alcaloide com ação uterotônica comprovada através de estudo científico, onde se observou elevada capacidade de diminuir hemorragias causadas por abortos e também ação antiplaquetária, diminuindo o risco de formação de coágulos sanguíneos (LI et al. 2011; LIN et al., 2007). O outro exemplar é a estaquidrina (2) que de acordo com Zhang et al. (2014) é um dos componentes majoritários de espécimes chinesas de *L. sibiricus*, e devido a isso possui inúmeros estudos quanto ao seu potencial farmacológico, como cardioprotetora e uterotônica, além de possuir comprovada baixa toxicidade e capacidade de amenizar lesões tubulares renais. As estruturas químicas destes alcaloides estão representadas na Figura 2.

Figura 2 – Alcaloides isolados de *L. sibiricus*, leonurina (1) e estaquidrina (2)



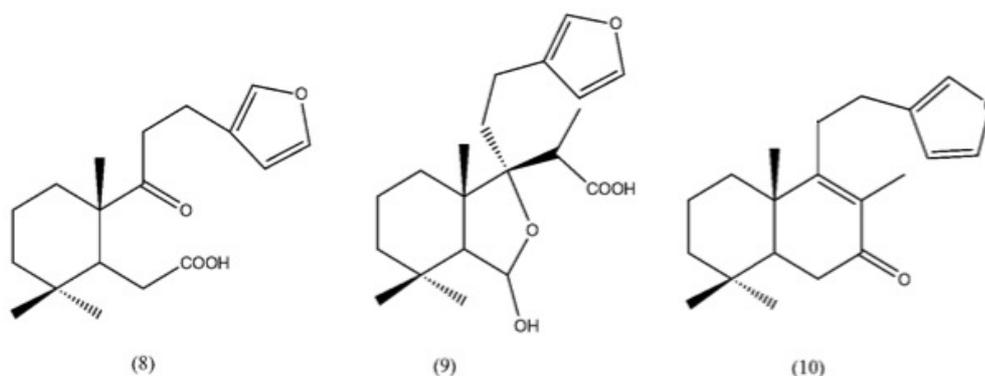
Dentre os flavonóides já isolados de *L. sibiricus* encontram-se a quercitina (3), isoquercitrina (4), rutina (5), genkanina (6) e apigenina (7) (Figura 3). Outras classes de metabólitos como mono-, sesqui- e diterpenos também já foram isolados desta espécie (PAN et al., 2006).

Figura 3 – Estruturas químicas de flavonóides isolados de *L. sibiricus*, quercitina (3), isoquercitrina (4), rutina (5), genkanina (6) e apigenina (7)



Também foram isolados de *L. sibiricus* alguns diterpenóides do tipo labdano e bis-espiro labdanos (SAVONA et al., 1982; SATOH et al., 2003; WU et al., 2011). Estudos comprovam que compostos desta classe, como o ácido leosibirico A (8), ácido leosibirico B (9) e a hispanona (10) (Figura 4), possuem a capacidade de manter os níveis de estrogênio no organismo, através da inibição da enzima estrogênio sulfotransferase (NARUKAWA et al., 2014).

Figura 4 – Diterpenóides do tipo labdano isolados de *L. sibiricus*, ácido leosibirico A (8), ácido leosibirico B (9) e hispanona (10)



## 3.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

### 3.2.1 Atividade de inibição enzimática

#### 3.2.1.1 *Acetilcolinesterase (AChE)*

A AChE (acetilcolina hidrolase, EC 3.1.1.7) é uma serina hidrolase pertencente a família das carboxilesterases do tipo B. É uma das mais eficientes enzimas do SNC estando concentrada nas sinapses colinérgicas e nas sinapses neuromusculares, onde catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) para colina e acetato, desempenhando assim um papel essencial na transmissão colinérgica. Este processo é importante, pois uma vez que ocorra a desativação da ACh na fenda sináptica, previne-se o estímulo contínuo do neurônio, o que é vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2008; FREITAS, 2009).

O centro catalítico da AChE possui uma tríade catalítica, composta por resíduos dos aminoácidos serina, histidina e glutamato; este centro catalítico divide-se em um sítio aniônico (resíduo de glutamato) que interage com o nitrogênio quaternário da ACh, e um sítio estéarico (histidina e serina) (FREITAS, 2009). A AChE está presente tanto no SNC como no sistema nervoso periférico (SNP), sendo que neste segundo é responsável pelo controle dos impulsos nervosos que modulam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos bem como na contração dos músculos lisos. No SNC, a enzima está envolvida no controle motor, na memória e também na cognição (PETRONILHO; PINTO; VILLARA, 2011).

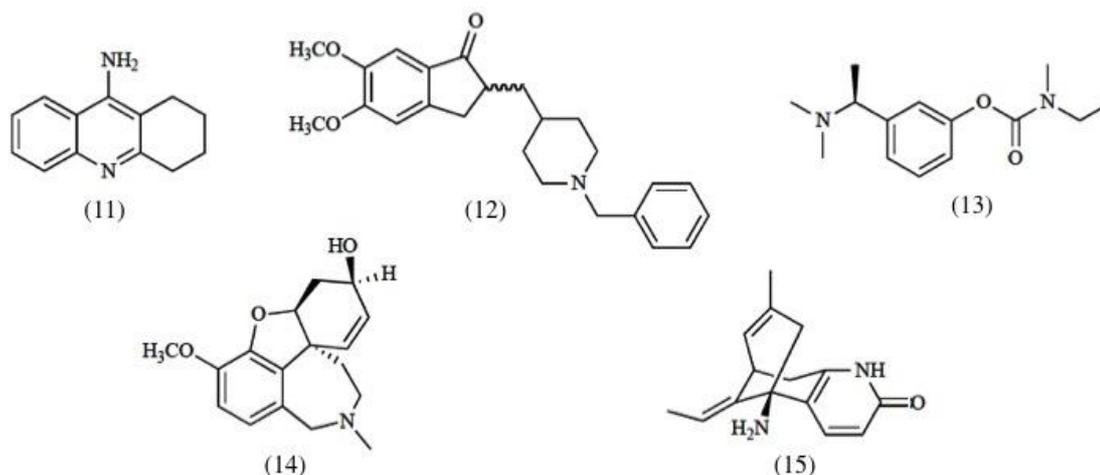
Doenças como a doença de Alzheimer (DA), que é uma enfermidade neurodegenerativa associada com a deposição de placas amilóides e emaranhados fibrilares, bem como alterações de neurotransmissores no cérebro, podem estar associadas a estes processos enzimáticos (LEE et al., 2003). Embora ainda não se tenha uma definição a respeito das causas da doença, a alteração biológica mais observada em pacientes portadores da DA é a diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) e butirilcolina (BCh) no hipocampo e córtex do cérebro (ORHAN, et al., 2012). Várias estratégias terapêuticas têm sido exploradas para aumentar a neurotransmissão colinérgica para aliviar alguns dos sintomas da DA; incluem-se nestes o uso de inibidores da AChE e butirilcolinesterase (BChE) (AChEi e BChEi, respectivamente), a administração de precursores da ACh e BCh, liberadores de ACh e BCh,

entre outros. Entre estas estratégias, a inibição da AChE provou ser o meio mais bem sucedido de equilibrar o sistema colinérgico e estabilização dos sintomas (ORHAN et al., 2012).

Atualmente, as drogas mais utilizadas no tratamento de pacientes acometidos pela DA são os AChEi, estando entre eles a tacrina (**11**), donezepil (**12**), rivastigmina (**13**) e galantamina (**14**), embora todos apresentem limitações quanto a sua eficácia e também algum tipo de efeito colateral. Destes, **11** e **12** são compostos sintéticos, aprovados pela FDA em 1993 e 1996, respectivamente, como os primeiros medicamentos para o tratamento de pacientes com perda cognitiva decorrente da DA (MURRAY et al., 2013). O fármaco **13**, por sua vez, é um derivado sintético do alcalóide fisiostigmina (eserina) isolado das sementes da fava-de-calabar (*Physostigma venenosum*) (GOODMAN & GILMAN, 2012). A fisiostigmina apresentou ótimos resultados quanto ao seu potencial de inibição da AChE, porém os efeitos colaterais apresentados por este alcalóide eram bastante severos e por isso buscou-se derivados sintéticos com efeitos colaterais mais amenos, como é o caso da rivastigmina (**13**), aprovada no ano de 2000 pela FDA (MOTA et al., 2012; MURRAY et al., 2013).

De todos os fármacos disponíveis para o uso no tratamento da DA, o **14** é o que apresenta maior eficácia. A galantamina (**14**) é um alcalóide de ocorrência natural, já isolado de espécies dos gêneros *Galanthus* e *Narcissus*, da família Amaryllidaceae, e aprovado desde 2001 pela FDA como medicamento no tratamento da DA (MOTA et al., 2012; MURRAY et al., 2013). O mecanismo de ação da galantamina se dá através da sua ligação ao sítio ativo da AChE, estimulando ainda os receptores nicotínicos pré- e pós-sinápticos os quais são, então, capazes de aumentar a liberação da ACh, levando assim ao estímulo direto da função neuronal (VIEGAS JR.; BOLZANI; FURLAN, 2004). Outro exemplo de produto de origem natural já reconhecido como AChEi é a Huperizina A (**15**), um alcalóide isolado a partir da *Huperzia spp.*, e amplamente comercializado na China como suplemento dietético para o fortalecimento da memória e no tratamento dos sintomas da DA (MURRAY et al., 2013).

Figura 5 – Substâncias utilizadas no tratamento da DA: tacrina (11), donezepil (12), rivastigmina (13), galantamina (14) e huperizina A (15)



Considerando-se estes potentes inibidores da AChE oriundos de produtos naturais e a necessidade de se buscar novos AChEi como a melhor estratégia terapêutica para a doença de Alzheimer, evidencia-se a importância da continuidade da pesquisa com produtos naturais como fonte de anticolinesterásicos com maior potencial farmacológico e menores efeitos colaterais.

### 3.2.1.2 Prolil oligopeptidase (POP)

A prolil oligopeptidase (POP) era inicialmente denominada de enzima de clivagem pós-prolina (PPCE); posteriormente, foi chamada de polil endopeptidase (PEP) e por fim, a partir de 1992 estabeleceu-se como POP (EC 3.4.21.26). Esta enzima é pertencente à família das serinas proteases, onde também são incluídas as enzimas dipeptidil peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5), acilaminoacil peptidase (ACPH, EC 3.4.19.1) e a oligopeptidase B (OB, EC 3.4.21.83) (ROSEMBLUM; KOZARICH, 2003).

A POP foi identificada pela primeira vez como enzima de clivagem de oxitocina, presente no útero humano; é uma enzima intracelular, encontrada em abundância em mamíferos e está presente em altas concentrações no cérebro (ROSEMBLUM; KOZARICH, 2003; GARCÍA-HORSMAN et al., 2007). É também conhecida como uma serina peptidase citosólica, que hidrolisa peptídeos na porção carboxílica de resíduos de prolina. Assim como

as outras serinas pertencentes ao clã SC, possui a característica de agir seletivamente na hidrólise de oligopeptídeos com não mais do que 30 resíduos de aminoácidos (TARRAGÓ et al., 2007; POLGÁR, 2002).

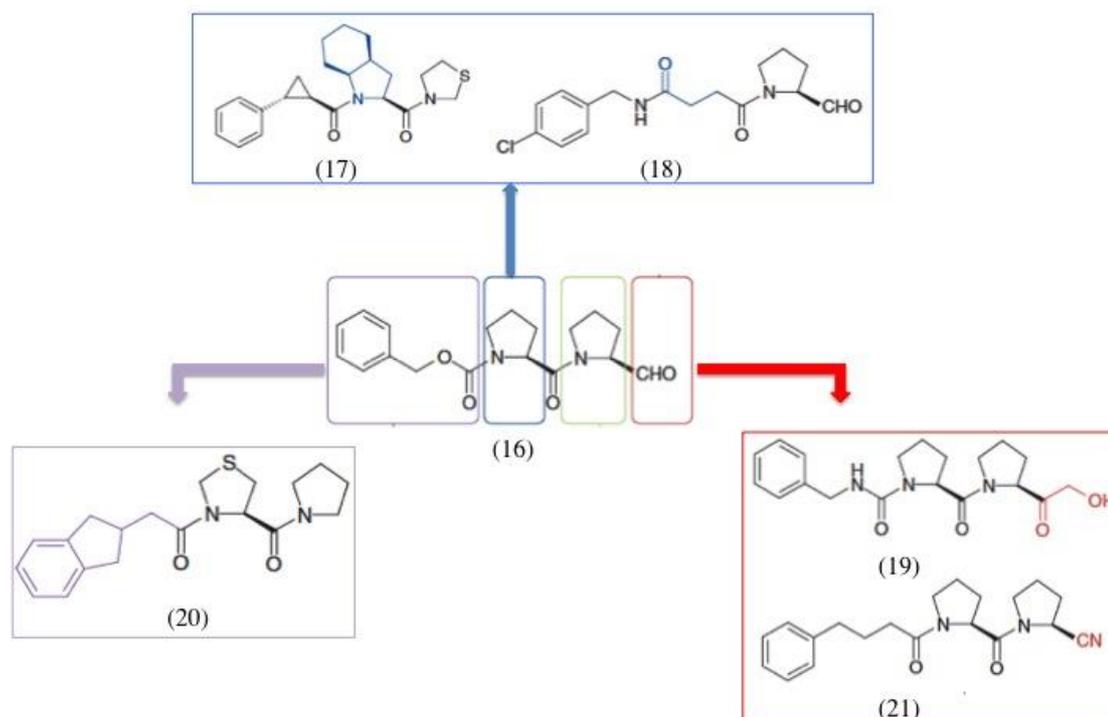
A localização da POP no cérebro levou os pesquisadores a sugerirem que esta enzima pudesse estar envolvida na maturação e degradação de hormônios peptídicos e neuropeptídeos, tais como a substância P, oxitocina, vasopressina e angiotensinas, que são substratos para a enzima (ROSEMBLUM; KOZARICH, 2003). Dentro deste contexto, estudos recentes também indicam que a POP esteja relacionada a doenças que afetam o SNC, especialmente no que diz respeito a perda de memória observada em pacientes portadores da DA, onde observa-se que o nível sérico desta enzima nestes pacientes está acima do normal (HELLINGER et al., 2015; SONG; RASKIN, 2002).

Outras disfunções do SNC também relacionadas com a atividade desta enzima são a depressão, onde os níveis de POP estão abaixo dos observados em pacientes saudáveis, a mania e a esquizofrenia, onde a concentração de POP no soro destes pacientes é bastante elevada (POLGÁR, 2002; JALKANEN, 2012; MAES et al, 1995). Além disso, pacientes acometidos por doenças como transtorno bipolar, disfunções alimentares como anorexia e bulimia, e doenças neurodegenerativas como mal de Parkinson e esclerose múltipla, também apresentam níveis de POP diferentes de pacientes saudáveis (JALKANEN, 2012; TARRAGÓ et al., 2008).

Diante disso, muitas pesquisas foram desenvolvidas a fim de se obter inibidores desta enzima. Estudos já indicaram que o uso de inibidores da POP (POPi) pode diminuir a perda de memória e elevar o nível de concentração de pacientes que sofrem de demência senil (SONG; RASKIN, 2002). Estes inibidores seriam capazes de prevenir o catabolismo de neurotransmissores como a substância P, através do bloqueio da enzima; como resultado, haveria um aumento nos níveis destes neuropeptídios, os quais são responsáveis pelas funções cognitivas (LÓPEZ et al., 2013).

Entre os POPi já desenvolvidos, o Z-prolil-prolinal (ZPP) (**16**) foi o primeiro deles, servindo como inspiração para o desenvolvimento de outros inibidores, como o S-17092 (**17**), ONO-1603 (**18**), JTP-4819 (**19**), Z-321 (**20**) e o KYP-2047 (**21**). Destes, nenhum chegou ainda a fase de mercado, estando todos em estudos pré-clínicos ou de fase II, como é o caso do **19** e do **18**. Isso se deve, em parte, ao fato de que ainda não se tem certeza a respeito da função fisiológica da POP, faltando ainda explicações sobre o seu mecanismo neuroquímico (LÓPEZ et al., 2013).

Figura 6 – Inibidores da POP obtidos através do Z-prolil-prolinal (16): S-17092 (17), ONO-1603 (18), JTP-4819 (19), Z-321 (20) e o KYP-2047 (21)



Fonte: Adaptado de López et al. (2013).

Uma gama de estratégias vem sendo aplicadas na busca por POPi; entre elas, os produtos naturais têm surgido como uma ampla fonte de inibidores. Em estudo realizado por Tarragó et al. (2007), os autores testaram o potencial de inibição de 29 extratos de plantas citadas como medicinais, pela medicina tradicional chinesa; em seu estudo, os autores observaram que dos 29 extratos testados, 16 deles apresentaram potencial de inibição da POP superior a 50%, enquanto que 5 deles alcançaram 100% de inibição, incluindo o extrato de *Rhizoma captidis*, de onde isolou-se o alcalóide berberina, o qual apresentou-se como POPi de forma dose-dependente.

Em 2002, Song e Raskin isolaram o benzofurano Kinapsina-24, a partir da espécie *Polyozellus multiflex*, o qual apresentou valor de  $CI_{50}$  (Concentração Inibitória de 50%) da enzima POP de 1,14  $\mu$ M. Em 2008, Tarragó et al. isolaram o flavonoide baicalina a partir de extratos das raízes de *Scutellaria baicalensis*, o qual apresentou-se como potente inibidor, apresentando  $CI_{50}$  de  $12 \pm 3$   $\mu$ M. Além destes, muitos outros exemplos indicam uma promissora vertente de inibidores da POP provenientes de produtos naturais, incentivando

assim a continuidade e o progresso em tais pesquisas (MARQUES et al., 2010; LAWANDI et al., 2010; HELLINGER et al., 2015).

### **3.2.2 Atividade antimicrobiana**

Apesar dos progressos significativos na erradicação e tratamento de doenças infecciosas, há ainda numerosos micro-organismos que podem causar doenças de gravidade variável. Além disso, nas últimas décadas tem se observado o aumento no número de infecções por micro-organismos multirresistentes a antibióticos e germicidas (micro-organismos resistentes a três ou mais classes de antibióticos), tornando-se um complexo problema de saúde pública (GRAU-CAMPISTANY et al., 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em seus relatórios apresentados em 2014 e 2015, as bactérias resistentes constituem uma ameaça global, sendo um dos três maiores problemas da saúde pública mundial, e as doenças causadas por estas, que eram até então controladas com certa facilidade, podem voltar a ocasionar a morte de mais de 10 milhões de pessoas até 2050 (WHO, 2014; WHO, 2015).

As doenças infecciosas são causadas, em sua maioria, pelos chamados micro-organismos oportunistas. Este tipo de micro-organismo faz parte da microbiota normal do ser humano, protegendo inclusive o hospedeiro de micróbios potencialmente patogênicos ao competir com eles por nutrientes, produzir substâncias prejudiciais aos invasores e afetar condições como a disponibilidade de oxigênio e o pH do meio. Entretanto, se houver um desequilíbrio entre a microbiota normal e os micróbios patogênicos, a consequência pode ser o surgimento de doenças (TORTORA et al., 2012).

#### *3.2.2.1 Micro-organismos patogênicos oportunistas*

Um patógeno oportunista geralmente é inofensivo em seu habitat natural, mas pode se tornar patogênico em indivíduos que se encontram debilitados ou traumatizados; hospedeiros que estejam em tratamento com antibióticos de amplo espectro; pacientes com sistema imune suprimido por drogas ou por distúrbios, entre outros. Outra característica que contribui para sua habilidade em causar doenças dos micro-organismos oportunistas é o fato de eles estarem

presentes, por exemplo, dentro e fora do organismo, ou no meio ambiente, e em números relativamente altos (TORTORA et al., 2012).

Um exemplo bastante comum de bactéria oportunista é a *Escherichia coli*, abundante no intestino delgado e que pode torna-se fatal quando acessa o trato urinário e respiratório, ao causar graves infecções. Outra bactéria encontrada com bastante abundância na pele e fossas nasais dos seres humanos é a *Staphylococcus aureus*, que pode causar uma grande variedade de infecções, de espinhas e furúnculos a pneumonias e intoxicações alimentares, endocardites, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outros (SANTOS et al., 2007; TORTORA et al., 2012).

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* também são encontradas em áreas do corpo ricas em nutrientes mas pobres em oxigênio, como o trato gastrointestinais, a vagina e a cavidade oral; nos últimos anos, tornaram-se a principal causa de infecções hospitalares, pois são responsáveis pela maioria das infecções de feridas cirúrgicas, além de apresentarem alta resistência a maioria dos antibióticos. Amplamente distribuídas em humanos e animais, assim como na água, esgoto e no solo, duas espécies de *Enterobacter*, a *E. cloacae* e *E. aerogenes* também podem causar infecções do trato urinário e infecções hospitalares (TORTORA et al., 2012).

Comumente encontrados no trato intestinal de muitos animais, especialmente aves domésticas e gado, membros do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicos; quando em condições sanitárias inadequadas, podem contaminar os alimentos e causar doenças gastrointestinais, como a salmonelose, a forma mais comum de infecção de origem alimentar. A doença mais grave causada por uma espécie de *Salmonella*, a *S. typhi*, é a febre tifóide. Espécies do gênero *Shigella* são responsáveis pela disenteria bacilar ou shigelose, também conhecida como diarreia dos viajantes, sendo que algumas linhagens podem causar uma disenteria potencialmente fatal. Diferentemente das salmonelas, elas são encontradas no trato intestinal dos seres humanos e tornam-se patogênicas, anualmente, a mais de 165 milhões de pessoas pelo mundo (TORTORA et al., 2012; KOTLHOFF et al., 1999).

Amplamente distribuídos no solo e em fontes de água, espécies de *Pseudomonas* são capazes de crescer em qualquer ambiente úmido e com traços de matérias orgânicas, como filmes de sabão ou adesivos selantes, sendo resistentes a muitos antibióticos e desinfetantes. A espécie mais sobreeminente do grupo é a *Pseudomonas aeruginosa*, considerada um modelo de patógeno oportunista, a qual sob certas condições pode infectar o trato urinário e feridas e causar infecções sanguíneas (septicemia), abscessos e meningite; um grupo de risco frente a *P. aeruginosa* são os pacientes com queimaduras, visto que nesses casos o tratamento

torna-se bastante difícil e os casos fatais chegam a 40-50% (ESTAHBANATI et al., 2002; TORTORA et al., 2012). Outro gênero de bactérias encontrado no meio ambiente é o *Bacillus*; espécies desse gênero são comuns no solo e somente algumas são prejudiciais aos seres humanos, como a *B. cereus*, ocasionalmente identificada como a causa de intoxicações alimentares, principalmente em alimentos como o arroz (TORTORA et al., 2012)

Entre os fungos a *Candida albicans* é o exemplo mais comum de micro-organismo oportunista, encontrada em pequena quantidade nas membranas mucosas do sistema geniturinário e da boca, mas que desenvolve-se abundantemente e causa sérias infecções quando ocorre um desequilíbrio entre a flora normal e os patógenos e o pH é alterado. Outras espécies do gênero *Candida*, como a *C. tropicalis*, *C. kruzei* e *C. parapslosis* também podem estar envolvidas nesse tipo de infecção, conhecida como candidíase. Fungos do gênero *Cryptococcus* são amplamente distribuídos em áreas contaminadas por fezes de pássaros, especialmente de pombos e causam uma doença chamada de criptococose; esta é a terceira causa de doença oportunista que atacam o SNC e geralmente é diagnosticada como meningoencefalite de caráter insidioso. Esse fungo é transmitido via inalação de seus esporos e infecta principalmente indivíduos com sistema imunológico suprimido, como infectados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (TORTORA et al., 2012; JUNIOR, et al., 2006).

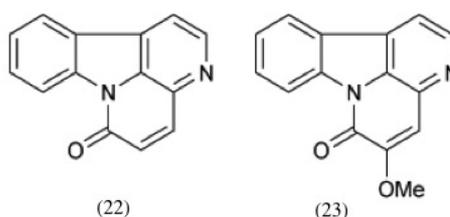
### 3.2.2.2 Agentes antimicrobianos e os produtos naturais

Em trabalho publicado por Saleem e col. (2010), os autores trazem um apanhado das principais classes de metabólitos secundários isolados de produtos naturais com potente atividade antimicrobiana, estando entre eles:

- **Alcaloides**, como a cantin-6-ona (**22**) e a 5-metoxicantin-6-ona (**23**) (Figura 7), isoladas de *Allium neapolitanum* e *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*; estes compostos demonstraram um amplo espectro de atividades frente a fungos, como *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigeli*, *Trichosporon cutaneum* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, apresentando valores de CIM

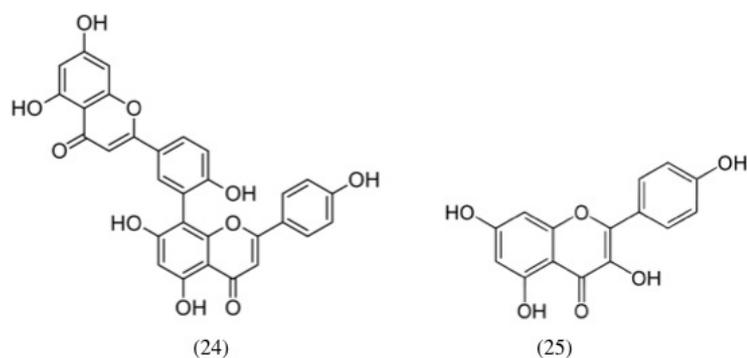
(Concentração inibitória mínima) entre 1,66 e 10, 12  $\mu\text{g/mL}$  (THOUVENEL et al., 2003).

Figura 7 – Alcaloides com potencial antimicrobiano



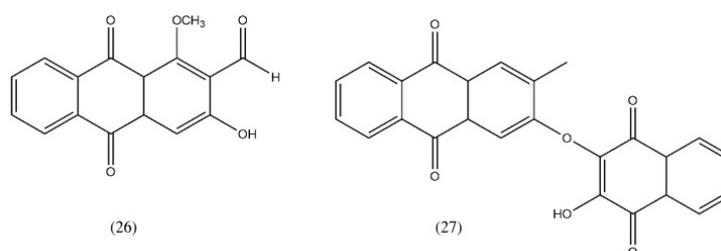
- **Flavonóides**, como a apigenina (**7**) isolada de *Sacutellaria barbata* (Lamiaceae), a qual apresentou uma potente atividade antimicrobiana frente a 20 cepas de MRSA (Meticilina Resistente *Staphylococcus aureus*), com CIM em uma faixa de 3,9-15,6  $\mu\text{g/mL}$ . Outro exemplo que os autores citam é a amentoflavona (**24**), isolada de *Selaginella tamariscina*, com CIM de 5  $\mu\text{g/mL}$  frente a fungos patogênicos como *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Além destes, também teve sua atividade antimicrobiana destacada o canferol (**25**), isolado a partir do extrato metanólico de *Vismia laurentii* o qual demonstrou amplo espectro de atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com valor máximo de CIM de 2,4  $\mu\text{g/mL}$ . Na Figura 8 estão representadas as estruturas destes flavonóides. (SATO et al., 2000; JUNG et al., 2006; KUETE et al., 2007).

Figura 8 – Flavonóides com potencial antimicrobiano



- **Quinonas**, como o damnacantal (**26**), identificado nas partes aéreas de *Saprosma fragrans* e com elevado potencial antifúngico frente a cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Saporothrix schenckii* e *Trichophyton mentagrophytes*, com CIM entre 1,56 e 12,5 µg/mL. Outro exemplo é a antraquinona newbouldiaquinona A (**27**), constituída por uma porção naftaquinona, isolada das raízes de *Newbloudia laevis* (Bignoniaceae); este metabólito apresentou-se como um excelente agente antifúngico e antibacteriano, sendo 13 vezes mais potente que a nistatina frente à *Candida albicans* e 14 vezes mais eficaz que a gentamicina, frente à *Enterobacter aerogens*. (SINGH et al., 2006; EYONG et al., 2006). As estruturas das quinonas citadas estão representadas na Figura 9.

Figura 9 – Quinonas com potencial antimicrobiano



Além destes, os autores ainda citam classes como as cumarinas, iridoides, triterpenos, entre outros (SALEEM et al., 2010). Também se encontra na literatura uma série de estudos a respeito da atividade antimicrobiana de extratos brutos de produtos naturais provenientes de plantas, organismos marinhos, fungos, entre outros, o que demonstra o grande potencial dos produtos naturais e justifica a continua pesquisa com os mesmos, na busca por novos agentes anti-infecciosos (MANDAL et al., 2007; PELÁEZ, 2006; ABREU et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

### 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Diferentes métodos de extração sólido-líquido podem ser empregados na obtenção de componentes de fontes naturais. A maceração e a extração usando refluxo estão entre as metodologias de referência ainda hoje mais utilizadas para a preparação de extratos de origem vegetal. A seleção da metodologia ideal para extração do material vegetal, com obtenção de

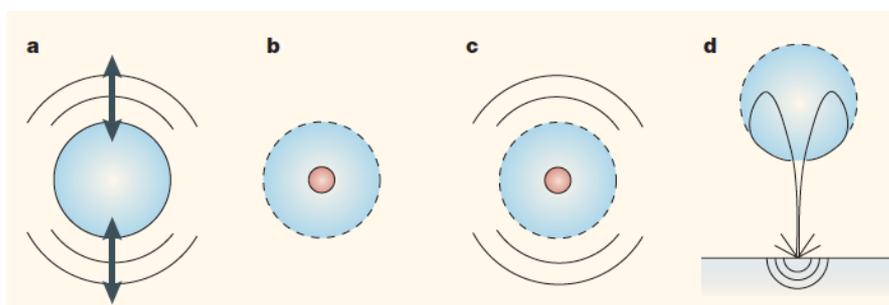
maiores rendimentos e pureza, depende da natureza dos compostos envolvidos e a sua termoestabilidade. Assim, novas metodologias de extração têm sido desenvolvidas a partir da necessidade de se ter uma extração efetiva dos compostos biotivos de plantas, sem perda desta atividade e com maior seletividade e pureza (SHIRSATH et al., 2012).

Além dos métodos de extração convencionais, vem-se utilizando fontes alternativas de energia para este processo, como extração assistida por ultrassom, micro-ondas e extração com fluido supercrítico.

### 3.3.1 Ultrassom

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas que, em meios materiais, se propagam em ciclos consecutivos de compressão e rarefação, numa faixa de frequência que vai de 20 a 100 MHz, não sendo possível sua detecção através da audição humana. O processo de compressão e expansão resulta no fenômeno de cavitação, comumente descrita como a formação, crescimento e colapso de bolhas de gás-vapor no líquido (Figura 10). A cavitação gerada usando ultrassom é conhecida por produzir efeitos físicos como a circulação de correntes de líquido e turbulência, o que pode levar a um incremento na quantidade de massa transferida, em processos de extração (VINATORU et al., 1997; AZMIR et al., 2013; SHIRSATH et al., 2012; MITRAGROTRI, 2005).

Figura 10 – Mecanismo de cavitação: a) aplicação das ondas ultrassônicas no líquido, b) formação, c) crescimento e d) colapso de bolhas de gás-vapor



Fonte: Reproduzido de Mitragotri (2005).

O controle do mecanismo de extração assistida por ultrassom é geralmente atribuída a efeitos mecânicos, de cavitação e em função da temperatura, o que resulta no rompimento das paredes celulares, diminuição do tamanho das partículas e aumento da massa transferida

através das paredes celulares do material vegetal. A implosão das bolhas geradas na cavitação levam a formação de micro-turbulências, alta velocidade de colisões entre as partículas e perturbação nas partículas micro-porosas da biomassa, com aceleração da difusão interna e externa; acelerando o processo de rompimento celular, uma maior quantidade de compostos biotivos passa das células vegetais para o solvente extrator (TOMA et al., 2001; JADHAV et al., 2009; SHIRSATH et al., 2012).

As vantagens da utilização de ultrassom incluem a redução do tempo de extração, de energia e de quantidade de solvente. Além disso, a energia das ondas ultrassônicas facilita a mistura mais efetiva, rápida transferência de energia, diminuição na temperatura de extração, quando comparada a ao extrator de Soxhlet ou refluxo, extração seletiva, incremento do rendimento dos extratos e eliminação de etapas do processo de extração (AZMIR et al., 2013). Um exemplo disso foi observado por Desgrouas et al. (2014), onde os autores realizam a extração de alcaloides assistida por ultrassom, evitando assim, etapas baseadas em alcalinização e na afinidade destes compostos por solventes clorados; o melhor resultado obtido foi utilizando uma mistura de etanol/água 1:1 como solvente extrator, com 10 minutos de sonicação, reduzindo drasticamente o tempo de extração quando comparado ao convencional, processo este que dura em média 4 horas. Além disso, o percentual do metabólito extraído, quantificado através de CLAE, se mostrou 2,5 vezes maior quando da utilização de ultrassom (DESGROUAS et al., 2014).

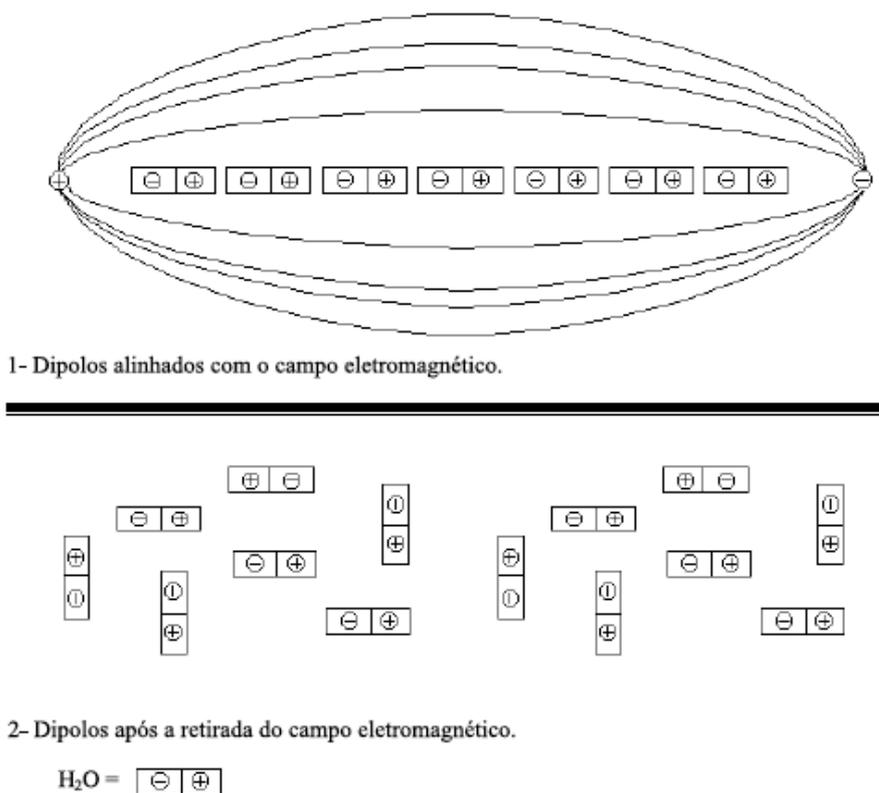
### **3.3.2 Micro-ondas**

As micro-ondas podem ser definidas como campos eletromagnéticos na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz, sendo que os aparelhos de micro-ondas comumente fabricados para uso doméstico ou em indústria são na faixa de 2,45 GHz. Estas micro-ondas são compostas por dois campos oscilantes perpendiculares, o campo elétrico e o campo magnético (JAIN et al., 2009; AZMIR et al., 2013).

A capacidade de aquecimento relacionada as micro-ondas se deve a dois mecanismos: a condução iônica e a rotação dipolo. A rotação dipolo ocorre devido ao alinhamento com o campo elétrico das moléculas que possuem um momento dipolar (seja de modo permanente ou induzida pelo campo elétrico) presentes tanto no solvente como na amostra. Quando o campo elétrico aplicado é retirado, as moléculas voltam ao estado desordenado; essa oscilação

produz colisões com as moléculas vizinhas, gerando liberação de energia térmica para o meio (Figura 11). Aplicando-se uma frequência 2,45 GHz, este fenômeno ocorre  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo, resultando em um aquecimento bastante rápido do meio (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002). O segundo mecanismo de aquecimento provocado pelas micro-ondas é a condução iônica, onde o calor é gerado através da resistência do meio a migração de íons dissolvidos no mesmo, quando estes estão sob a ação de um campo eletromagnético (JAIN et al., 2009; SANSEVERINO, 2002). No caso dos processos de extração assistida por micro-ondas, estes mecanismos agem quebrando as pontes de hidrogênio, devido a rotação dipolo das moléculas, enquanto que a migração dos íons dissolvidos aumenta a penetração do solvente nas células vegetais, facilitando a solvatação dos analitos ali presentes (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002).

Figura 11 – Representação do mecanismo de rotação dipolo



Fonte: Reproduzido de Sanseverino (2002).

Entre as vantagens de se utilizar a extração assistida por micro-ondas estão a redução da quantidade de solvente consumida, diminuição no tempo operacional, boa reprodutibilidade e menor quantidade de amostra necessária para a extração (JAIN et al., 2009). De acordo com

Azmir et al. (2013), o mecanismo de extração através das micro-ondas pode ser considerado em três etapas: inicialmente, ocorre a separação dos compostos presentes nos sítios ativos da amostra vegetal sob o aumento da pressão e da temperatura; em segundo lugar, ocorre a difusão do solvente através da matriz da amostra; em terceiro lugar, ocorre a dissipação dos solutos da matriz da amostra para o solvente (AZMIR et al., 2013).

Na literatura encontram-se exemplos de aplicações de micro-ondas na extração de diversas classes de metabólitos, como alcaloides, flavonóides (XIE et al., 2014; TATKE; JAISWAL, 2011). Em trabalho publicado por Alupului et al. (2009), os autores realizaram a extração assistida por micro-ondas do diterpeno tetracíclico esteviosídeo, a partir das partes aéreas de *Stevia rebaudiana*; neste estudo, observou-se um incremento de 20% na quantidade de analito extraído, em comparação com os métodos tradicionais de extração.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 INSTRUMENTAÇÃO**

#### **4.1.1 Equipamentos de ultrassom**

Para os procedimentos de extração do material vegetal assistida por ultrassom, foram utilizados um banho ultrassônico, de 330W de potência (Elmasonic P, Elma) e um sonreator do tipo cup-horn (com sonda VCX 130, Sonic and Materials Inc., USA). Estes equipamentos pertencem ao CEPETRO – Centro de Estudos em Petróleo, e foram gentilmente cedidos para a realização deste trabalho, sob a responsabilidade da Prof. Paola Azevedo Mello.

#### **4.1.2 Equipamento de forno de micro-ondas**

Para a obtenção do extrato bruto através da extração assistida por micro-ondas, utilizou-se um equipamento de forno de micro-ondas focalizado (*Star System. 2, CEM, Matthews, NC, EUA*), pertencente ao CEPETRO – Centro de Estudos em Petróleo, e gentilmente cedido para a realização deste trabalho, sob a responsabilidade da Prof. Paola Azevedo Mello.

#### **4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência**

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, com detector DAD e coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6mm x 150mm, 5µm). A fase móvel empregada nas análises era composta por A: água (0,045% de TFA) e B: acetonitrila (0,036% de TFA).

#### 4.1.4 Cromatografia gasosa

As análises de cromatografia gasosa (CG) foram realizadas em cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com coluna DB5; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector de 300 °C e a da coluna foi de 50-280 °C com aumento de 4 °C/min; o gás de arraste utilizado foi hidrogênio (H<sub>2</sub>) e na chama, ar sintético.

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foram realizadas em Cromatógrafo HP 6890 Série CG system com detector de massas HP 5973 Impacto de Elétrons (CG/MS-EI) e com Coluna Capilar DB5-5MS Agilent Technologies 30 m x 320 µm x 0,25 µm; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector 250 °C e do forno, a temperatura inicial foi de 60 °C e a máxima 325 °C; utilizou-se como gás de arraste, hélio (He).

#### 4.1.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrômetro de massa – CLUE/MS

Para as análises por CLUE-MS foi utilizado um cromatógrafo a líquido com sistema Acquity UPLC e espectrômetro de massa do tipo quadrupolo e tempo de voo, modelo XEVO G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA). As amostras foram diluídas em mistura de acetonitrila e H<sub>2</sub>O na proporção 1:1, contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, e analisadas por infusão direta na probe de eletrospray (ESI) no modo positivo (ESI+). O controle e a aquisição dos dados foram feitos usando o software MassLynx V 4.1. Uma alça de amostragem de 250 µL foi carregada com a amostra. O equipamento pertence ao LAQUIA – Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Paola Azevedo Mello.

#### 4.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, uni e bidimensionais (Dept 135°, COSY, NOESY e HSQC) foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III HD 400, operando a 400,13 MHz para <sup>1</sup>H e 100,62 MHz para <sup>13</sup>C, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria. Utilizou-se para a preparação das amostras, quantidades entre 3-20 mg de

amostra em 0,5 mL de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), conforme solubilidade da amostra, em tubos de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) calculadas em Hertz (Hz). A calibração dos espectros foi realizada utilizando-se como referência interna o TMS ( $\delta$  0,00),  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  77,00) e  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  49,00) para os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

#### 4.1.7 Espectrofotômetro

Para as leituras de microplacas empregadas para avaliar as atividades biológicas, utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), operando em 620 nm e 25 °C para os testes antimicrobianos, 405 nm para os testes enzimáticos com a AChE e 360/40 e 485/20 nm para os testes enzimáticos com a POP. O equipamento pertence ao NPPN, sob a responsabilidade do professor Dr. Ademir Farias Morel.

#### 4.2 REAGENTES UTILIZADOS

Os solventes utilizados nos procedimentos de extração e nas técnicas cromatográficas são de nível técnico, e purificados através de técnicas de destilação fracionada para eliminação de umidade e possíveis contaminantes. Os solventes utilizados nas análises de CLAE (HPLC/SPECTRO,  $\geq 98\%$ ) e foram obtidos comercialmente de Tedia High Purity Solvents.

A revelação das cromatoplasmas deu-se através de lâmpada ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 365 nm, Germicida), reativo de Dragendorff para alcaloides e solução de anisaldeído (ácido acético/ ácido sulfúrico/ anisaldeído 50:1:0,5) seguido de aquecimento para os demais metabólitos.

Os padrões utilizados nos ensaios antimicrobianos, nistatina, fluconazol, ampicilina e cloranfenicol foram obtidos comercialmente em farmácias de manipulação mediante apresentação de atestado de comprovação para uso em pesquisas científicas.

A enzima POP foi cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt do Instituto de Pesquisa Biomédica de Barcelona (IRB-Espanha). O substrato ZGP-AMC (N-benziloxycarbonil-Gli-

Pro-metilcumarinil-7-amida) foi obtido comercialmente de Bachem (Bubendorf, Switzerland). AChE foi adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Brasil), assim como o iodeto de acetiltiocolina (ACTI), a albumina de soro bovino e o 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzólico) (DTNB) e o controle positivo ácido clorogênico. Eserina foi adquirida de Spectrum Chemical (NJ). O padrão de leonurina (SML 0670;  $\geq 98\%$ ) foi obtida de Sigma-Aldrich.

#### 4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Leonurus sibiricus* L. foram coletadas no município de Bom Progresso (27° 32' 41" S, 53° 52' 1" O), entre os meses de novembro de 2014 e julho de 2015. O material vegetal foi identificado pelo professor Dr. Renato Zacchia e uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, sob número de registro SMDB 15.445.

#### 4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O material vegetal coletado foi seco em estufa com ar circulante a uma temperatura de 50 °C e moído em moinho de facas, obtendo-se um total 1,5 kg de material vegetal seco e pulverizado.

O extrato bruto preparado a maior escala para a utilização no processo de isolamento, foi obtido através do método de maceração, com metodologia adaptada de Lin et. al. (2007). Em um balão de fundo redondo com capacidade 5 L, foram adicionados 1,2 Kg de material vegetal e aproximadamente 2,5 L de metanol (MeOH). A maceração permaneceu por 24 horas e então foi realizada filtração e evaporação do solvente em rotoevaporador sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se ao final o extrato bruto metanólico (LEBM). Ao material vegetal restante adicionou-se aproximadamente 2,5 L de uma solução de MeOH contendo 1% de ácido clorídrico (HCl) concentrado (MeOH/HCl 1%), e a maceração foi repetida como descrito anteriormente, obtendo-se o extrato metanólico ácido (LEBM+). Obteve-se ao final dos processos de extração 102 g de LEBM e 109 g de LEBM+.

#### 4.4.1 Preparação de extrato bruto empregando diferentes metodologias de extração

Para complementação do trabalho, foram realizados testes de extração do material vegetal a pequena escala utilizando-se métodos tradicionais de extração (maceração e extração a quente), extração assistida por ultrassom e extração assistida por microondas, a fim de comparação de rendimentos, perfil cromatográfico e atividades biológicas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se a mesma quantidade de material vegetal e de solvente.

##### 4.4.1.1 Extração por maceração

Em um recipiente contendo 7,5 g de material vegetal seco e pulverizado, adicionou-se 150 mL de MeOH, e o material foi mantido em temperatura ambiente pelo período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a filtração e o solvente evaporado em rotoevaporador, sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido por três dias. Em sequência, ao material vegetal restante, adicionou-se 150 mL de uma solução de MeOH/HCl 1%, sendo os procedimentos de maceração e concentração dos extratos obtidos os mesmos descritos anteriormente. Os extratos resultantes (EB *f*-MeOH e EB *f*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

##### 4.4.1.2 Extração a quente

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL foram adicionados 7,5 g de material vegetal e 150 mL de MeOH; o balão foi mantido sob refluxo com auxílio de uma manta de aquecimento por 8 horas e então o conteúdo do balão foi filtrado e o solvente rotoevaporado sob pressão reduzida. Este procedimento foi repetido três vezes com o mesmo material vegetal. Ao final dos três dias, adicionou-se ao material vegetal restante no balão 150 mL de uma solução de MeOH/HCl 1%, e o procedimento de refluxo e concentração dos extratos repetidos conforme o anterior. Os extratos obtidos (EB *q*-MeOH e EB *q*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

#### 4.4.1.3 Extração assistida por ultrassom

Foram realizadas duas extrações assistidas por ultrassom, empregando-se banho ultrassônico e sonoreator do tipo “cup horn”. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

##### 4.4.1.3.1 Banho ultrassônico

Em um béquer de 250 mL foram adicionados 7,5 g de material vegetal e 50 mL de MeOH; o béquer foi introduzido em um banho ultrassônico de 330 W de potência e 80 MHz de frequência, e mantido em sonicação pelo período de uma hora, a uma temperatura de 40 °C (Figura 12). O conteúdo do béquer foi filtrado e o solvente rotoevaporado sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido por três vezes. Ao material vegetal restante adicionou-se 50 mL de uma solução de MeOH/HCl 1% e o procedimento de sonicação repetido como descrito anteriormente. Os extratos resultantes (EB *USI*-MeOH e EB *USI*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

Utilizando-se do mesmo banho ultrassônico foram preparados os extratos EB *USII*-MeOH e EB *USII*-MeOH+) sendo que estes foram obtidos estando a água do banho ultrassônico em uma temperatura de 5 °C.

Figura 12 - Banho ultrassônico



Fonte: Produção do próprio autor

#### 4.4.1.4.2 Sonoreator do tipo *cup horn*

Em um recipiente cônico de 250 mL foram adicionados 7,5 g de material vegetal e 50 mL de MeOH; o recipiente foi colocado em câmara com isolamento acústico acoplada a um sonoreator do tipo *cup horn* (Figura 13), com sonda ultrassônica de 130 W de potência e 20 MHz de frequência, e mantido em sonicação pelo período de uma hora a uma temperatura de 40 °C (temperatura da água circulante, mantida através de banho termostatzado). O conteúdo do recipiente foi filtrado e o solvente rotoevaporado sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido por três vezes. Ao material vegetal restante adicionou-se 50 mL de uma solução de MeOH/HCl 1% e o procedimento de sonicação repetido como descrito anteriormente. Os extratos resultantes (EB *CHI*-MeOH e EB *CHI*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

Utilizando-se do mesmo aparato, foram preparados os extratos (EB *CHII*-MeOH e EB *CHII*-MeOH+) sendo que estes foram obtidos estando a água circulante em uma temperatura de 5 °C.

Figura 13 - Sonoreator do tipo *cup horn*



Fonte: Produção do próprio autor

#### 4.4.1.4 Extração assistida por micro-ondas

Em um tubo de combustão de vidro, foram adicionados 2 g de amostra e 13 mL de MeOH e o tubo foi introduzido no interior do aparelho de micro-ondas (Figura 14). A amostra foi irradiada por 5 minutos, a uma temperatura de 70 °C, sendo aplicada uma rampa de aquecimento pelo tempo de 1 minuto. Este procedimento foi repetido por três vezes e então o conteúdo do tubo foi filtrado e o solvente rotaevaporado sob pressão reduzida. Ao material vegetal restante, adicionou-se 13 mL de uma solução de MeOH/HCl 1% e o procedimento de irradiação repetido como descrito anteriormente. Os extratos resultantes (EB *MO*-MeOH e EB *MO*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

Figura 14 - Equipamento de micro-ondas focalizado



Fonte: Produção do próprio autor

## 4.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO (LEBM)

### 4.5.1 Fracionamento do extrato bruto metanólico através de extração líquido-líquido

O LEBM (29 g) foi suspenso em água destilada e vertido em um funil de separação, sendo então fracionado, utilizando-se solventes de polaridade crescente, como *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila. Obteve-se a fração hexânica (FHEX) com 8,35 g; a fração diclorometano (FDCM) com 1,62 g e a fração acetato de etila (FAcOEt) com 0,99 g. A fração aquosa restante foi de 14,6 g.

Inicialmente, depois de análise das frações obtidas através de cromatografia em camada delgada (CCD), optou-se por trabalhar com a fração hexânica. Para isso, 8 g da FHEX foram cromatografadas em coluna (CC, denominada LHA), utilizando-se 250 g de sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh e diferentes solventes, com ordem de polaridade crescente. Foram coletadas frações de 200 mL e as frações foram analisadas por CCD e aquelas que apresentaram similaridade foram reunidas conforme Tabela 1.

Em sequência, a fração IV foi cromatografada através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como solvente de eluição HEX/DCM 1:1. Desta, foi possível obter um composto sólido, branco, com 12,4 mg. Através de nova purificação por CCDP obteve-se um sólido branco com 6 mg, o qual através de análises de CG/EM e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e comparação com dados da literatura, foi identificado como sendo o esqualeno (**28**).

As frações VIII, IX, XI, XVI, XVIII e XIX foram trabalhadas separadamente, através de técnicas cromatográficas de CCD, CC e CCDP, entretanto, não foi possível a purificação dos metabólitos secundários presentes nas mesmas. A fração X apresentava-se na forma de um óleo amarelado, o qual foi cromatografado em CC com 19 g de sílica gel e sendo eluída com HEX/DCM com proporção crescente de polaridade; coletaram-se frações de 20 mL, sendo que as mesmas foram agrupadas conforme análise em CCD, resultando em 13 frações. Destas, a fração III F-31-35 com 90 mg foi recromatografada em CCDP, sendo eluída com HEX/DCM 4:1, de onde foi possível a purificação de um sólido amorfo amarelo, com 12 mg, que através de análises de CG/EM e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN foi identificado como o diterpeno do tipo labdano leojapopina (**29**).

Tabela 1 - Coluna cromatográfica LHA a partir da FHEX do LEBM

Frações da LHA	Proporção de solvente	Peso da amostra
I – 1-3	Hexano 100%	19,0 mg
II – 4-5	Hex/DCM 10%	3,0 mg
III – 6-9	Hex/DCM 10%	4,0 mg
IV – 10-13	Hex/DCM 10%	35,0 mg
V – 14-18	Hex/DCM 20%	27,0 mg
VI – 19-21	Hex/DCM 30%	12,0 mg
VII – 22	Hex/DCM 40%	6,0 mg
VIII – 23-27	Hex/DCM 50%	168,0 mg
IX – 28-29	Hex/DCM 60%	166,0 mg
X – 30-44	Hex/DCM 70%	190,7 mg
XI – 45-50	Hex/DCM 80%	592,3 mg
XII – 51-55	Hex/DCM 90%	300,0 mg
XIII – 56-59	Diclorometano 100%	115,7 mg
XIV – 60-61	Diclorometano 100%	84,7 mg
XV – 62-70	Diclorometano 100%	473,0 mg
XVI – 71-75	DCM/AcOEt 10%	1856,0 mg
XVII – 76-80	DCM/AcOEt 20%	302,3 mg
XVIII – 81-83	DCM/AcOEt 20%	227,7 mg
XXIV – 84-88	DCM/AcOEt 50%	439,8 mg
XIX – 89-90	Acetato de etila 100%	329,6 mg
XX – 91-92	AcOEt/MeOH 20%	98,0 mg
XXI – 95-96	AcOEt/MeOH 20%	225,2 mg
XXII – 98-106	AcOEt/MeOH 50%	1468 mg
XXIII – 107-115	Metanol 100%	164,2 mg

As frações XIV e XV foram reunidas, a fração resultante foi dissolvida em clorofórmio e quando da adição de metanol, formou um precipitado que foi purificado através de técnicas de filtração e recristalização, obtendo-se um sólido branco com 70 mg. A partir de análises de CCD com padrões autênticos, anteriormente isolados pelo grupo, e análises de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, em comparação com dados da literatura, o mesmo foi identificado como sendo o beta-sitosterol (**30**).

#### 4.5.2 Fracionamento do extrato bruto metanólico através de cromatografia a vácuo com funil de placa porosa

Ao LEBM restante optou-se por aplicar uma metodologia diferente de fracionamento, visto que a aplicada inicialmente não possibilitou o isolamento de nenhum outro composto em quantidade suficiente para identificação além do esqualeno (**28**), da leojaponina (**29**) e do beta-sitosterol (**30**). Assim, uma parte do LEBM (37 g) foi fracionada através de cromatografia a vácuo em funil de placa porosa, com auxílio de sucção (denominada FLM), conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 15 - Fracionamento por cromatografia a vácuo em funil de placa porosa



Fonte: Produção do próprio autor

Para esta filtração, foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade e em diferentes proporções, do *n*-hexano ao metanol, e foram coletadas frações de 200 mL. As frações que apresentaram similaridade através da análise em CCD foram reunidas, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Fracionamento através de filtração do LEBM (FLM)

Frações da FLM	Proporção de solvente	Peso da amostra
I – 1-2	Hexano 100%	61,9 mg
II – 3-5	Hexano 100%	9,5 mg
III – 6-7	Hexano 100%	9,4 mg
IV – 8-9	Hex/ACoEt 25%	3860,0 mg
V – 10	Hex/ACoEt 25%	1675,0 mg
VI – 11	Hex/ACoEt 25%	1195,0 mg
VII – 12	Hex/ACoEt 25%	565,6 mg
VIII – 13	Hex/ACoEt 25%	245,1 mg
IX – 14	Hex/ACoEt 25%	348,4 mg
X – 15-16	Hex/ACoEt 25%	309,7 mg
XI – 17	Hex/ACoEt 50%	168,4 mg
XII – 18	Hex/ACoEt 50%	208,7 mg
XIII – 19	Hex/ACoEt 50%	276,3 mg
XIV – 20	Hex/ACoEt 50%	233,2 mg
XV – 21	Hex/ACoEt 50%	202,5 mg
XVI – 22	Acetato de etila 100%	1183,0 mg
XVII – 23-27	Acetato de etila 100%	920,0 mg
XVIII – 28-32	Acetato de etila 100%	530,0 mg
XIX – 33	AcOEt/MeOH 50%	3934,0 mg
XX – 34	AcOEt/MeOH 50%	3326 mg
XXI – 35	AcOEt/MeOH 50%	333,8 mg
XXII – 36	Metanol 100%	33,2 mg
XXIII – 37	Metanol 100%	3760,0 mg
XXIV – 38	Metanol 100%	5684,2 mg
XXV – 39	Metanol 100%	2844,0 mg
XXVI – 40	Metanol 100%	461,7 mg
XXVII – 41	Metanol 100%	869,7 mg

A fração IV 8-9 da FLM (3,86 g) foi cromatografada em coluna (denominada CLMA), utilizando-se como adsorvente 160 g de sílica gel e sistema de eluição com diferentes solventes, com aumento gradativo de polaridade. Recolheram-se frações de 20 mL, e estas

foram reunidas de acordo com análise em CCD. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Coluna cromatográfica CLMA a partir da fração IV 8-9 da FLM

Frações da CLMA	Proporção de solvente	Peso da amostra
I – 1-42	Hexano 100%	61,9 mg
II – 43-68	Hex/CHCl <sub>3</sub> 2%	9,5 mg
III – 69-82	Hex/CHCl <sub>3</sub> 5%	10,0 mg
IV – 83-98	Hex/CHCl <sub>3</sub> 15%	4,0 mg
V – 99-109	Hex/CHCl <sub>3</sub> 25%	1,4 mg
VI – 151-156	Hex/CHCl <sub>3</sub> 50%	37,5 mg
VII – 157-161	Hex/CHCl <sub>3</sub> 75%	10,0 mg
VIII – 162-170	Hex/CHCl <sub>3</sub> 90%	32,5 mg
IX – 171-173	Hex/CHCl <sub>3</sub> 90%	9,8 mg
X – 174-185	Clorofórmio 100%	36,4 mg
XI – 186-222	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1%	446,0 mg
XII – 223-249	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1%	191,0 mg
XIII – 250-260	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 5%	124,4 mg
XIV – 261-279	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10%	120,4 mg
XV – 280-283	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 50%	202,5 mg
XVI – 284-286	Metanol 100%	2172,0 mg

A fração XI 186-222 da CLMA foi recromatografada em coluna (denominada CLMB), utilizando-se como eluentes HEX/CHCl<sub>3</sub> em gradiente crescente de polaridade, sendo recolhidas frações de 20 mL e as mesmas foram agrupadas após observância de similaridade em CCD. Foram obtidas 8 frações, sendo que a fração IV 58-64 da CLMC (127 mg) apresentou-se na forma de um sólido amorfo alaranjado. Após análise em CG/EM e <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN foi identificado como o diterpeno do tipo labdano, leojaponina (**29**), já isolado anteriormente.

A fração XVII 23-27 (920,0 mg) da FLM foi cromatografada em coluna (denominada CLMC) sendo utilizado como adsorvente 40 g de sílica gel e sistema de eluição com solventes em ordem crescente de polaridade; foram recolhidas frações de 30 mL e estas foram reunidas após análise em CCD, de acordo com a similaridade que apresentaram. Os dados dessa coluna cromatográfica estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Coluna cromatográfica CLMC fração XVII 23-27 da FLM

Frações da CLMC	Proporção de solvente	Peso da amostra
I – 1-11	Hexano 100%	3,9 mg
II – 12-21	Hexano 100%	3,9 mg
III – 22-31	Hex/CHCl <sub>3</sub> 50%	23,7 mg
IV – 32-35	Hex/CHCl <sub>3</sub> 50%	4,0 mg
V – 36-37	Hex/CHCl <sub>3</sub> 50%	1,8 mg
VI – 38-44	Hex/CHCl <sub>3</sub> 50%	1,9 mg
VII – 45-53	Clorofórmio 100%	48,9 mg
VIII – 54-67	Clorofórmio 100%	52,6 mg
IX – 68-74	Clorofórmio 100%	2,0 mg
X – 75-84	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1%	2,4 mg
XI – 85-95	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1%	76,0 mg
XII – 96-106	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1%	51,7 mg
XIII – 107-110	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 2%	78,9 mg
XIV – 111-113	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 2%	203,0 mg
XV – 114-121	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 2%	81,8 mg
XVI – 122-127	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 4%	56,2 mg
XVII – 128-133	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10%	89,7 mg
XVIII – 134	Metanol 100%	75,0 mg

A fração VII 45-53 (48,9 mg) da CLMC foi cromatografada em CCDP, sendo eluída com HEX/CHCl<sub>3</sub> 2:1, de onde foi possível isolar dois metabólitos secundários de *L. sibiricus*. Utilizando-se de técnicas de análise em CG/EM e <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN, os mesmos foram identificados como ftalato de bis(2-etilexila) (**31**) (5,8 mg) e o beta-sitosterol (**30**) (6,5 mg), já isolado anteriormente.

A fração XVI – 122-127 da CLMC (56,2 mg), apresentou a formação de um precipitado branco quando da adição de metanol; o sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado várias vezes com metanol. Através de análise em CCD observou-se que este tinha comportamento semelhante a fração XVIII 28-32 da CLM, a qual também apresentava precipitado na presença de metanol. As frações foram reunidas, resultando em uma amostra de 30 mg de um precipitado que ainda apresentava impurezas; assim, esta amostra foi aplicada em CCDP, a qual foi eluída com CHCl<sub>3</sub>/MeOH 25:1, resultando no isolamento de um composto sólido

branco (10 mg), solúvel na mistura 2:1 de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , que foi identificado através de análise do ponto de fusão e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN como o  $\beta$ -sitosterol-glicosilado (**32**).

#### 4.5.3 Fracionamento do extrato bruto metanólico ácido (LEBM+)

O extrato bruto metanólico ácido (LEBM+) foi fracionado de acordo com a metodologia descrita por Lin et al. (2007). Inicialmente, o extrato (36 g) foi suspenso em *n*-hexano, utilizando-se cerca de 300 mL deste solvente. Em sequência, foram adicionados 200 mL de uma solução de água/metanol 95:5 e a solução resultante foi vertida em um funil de separação. A fração orgânica foi rotoevaporada sob pressão reduzida e a aquosa liofilizada. A fração aquosa (30 g) foi então solubilizada em metanol e adicionou-se água destilada até formar uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O 3:2 e então foi novamente adicionado *n*-hexano e realizada extração até peso constante. A fração aquosa restante foi novamente liofilizada, resultado em 27 g de amostra. Esta, foi então suspensa em água destilada e extraída com butanol, até peso constante, originando a FBuOH (5 g).

A FBuOH foi cromatografada em coluna (denominada C-FBuOH), com 100 g de sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh e diferentes solventes, com ordem de polaridade crescente. Foram coletadas frações de 20 mL e as frações foram analisadas por CCD, reunindo-se aquelas que apresentaram similaridade, conforme detalhado na Tabela 5.

Tabela 5 - Coluna cromatográfica C-FBuOH a partir da FBuOH do LEBM+

Frações da FbuOH	Proporção de solvente	Peso da amostra
I – 1-48	Diclorometano 100%	12,3 mg
II – 49-55	DCM/AcOEt 5%	0,5 mg
III – 56-57	Acetato de etila 100%	5,8 mg
IV – 58	Acetato de etila 100%	11,2 mg
V – 59-64	Acetato de etila 100%	104,7 mg
VI – 65-66	AcOEt/MeOH 5%	6,0 mg
VII – 67-68	AcOEt/MeOH 5%	4,4 mg
VIII – 69-78	AcOEt/MeOH 10%	21,5 mg
IX – 79-83	AcOEt/MeOH 10%	9,8 mg
X – 84-88	AcOEt/MeOH 15%	60,7 mg
XI – 89-111	AcOEt/MeOH 20%	276,1 mg
XII – 112-117	AcOEt/MeOH 30%	125,0 mg
XIII – 118-120	AcOEt/MeOH 40%	56,0 mg
XIV – 121-124	AcOEt/MeOH 50%	138,0 mg
XV – 125-134	Metanol 100%	232,6 mg
XVI – 22	MeOH/H <sub>2</sub> O 20%	120,0 mg

Através de análise em CCD, utilizando-se o revelador Dragendorff, foi identificada a presença de um alcalóide na fração XIII. Esta fração foi então trabalhada através de CCDP, tendo como sistema de eluição AcOEt/MeOH 1:1; foi isolado 3 mg de um composto puro com aspecto de sólido branco. Através de análise de CLAE, comparação com padrão comercial e espectrometria de massas EM-ESI, foi possível identificar este composto como sendo o alcalóide leonurina (**1**).

#### 4.6 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial das folhas de *Leonurus sibiricus* L. foi extraído utilizando a técnica de hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger. Foram utilizados 400 g de material vegetal fresco e o tempo de extração foi de 4 horas. O óleo obtido foi extraído com éter etílico e seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e posteriormente o solvente foi completamente removido com gás nitrogênio. O procedimento foi realizado em triplicata. Para determinação da massa

seca, foram pesados 5 g de material vegetal fresco, o qual foi mantido em estufa com ar circulante a 50 °C graus por 3 dias.

Figura 16 - Extração do óleo essencial utilizando aparelho do tipo Clevenger



Fonte: Produção do próprio autor

A composição química do óleo essencial foi determinada através de CG e CG/EM, cálculo do índice de retenção de Kovats e posterior comparação com dados da literatura. Dessa forma, foi possível identificar a composição de aproximadamente 90% do óleo essencial de *L. sibiricus*, sendo que o mesmo compõe-se predominantemente pelos sesquiterpenos trans-cariofileno (31,70%), alfa-humuleno (18,53%) e gama-muuruleno (19,72%). Além destes, observa-se a presença de um pico a 42 min, equivalente a 17,99%, o qual não foi possível identificar-se somente através de cálculo de IK e do espectro de massa das bibliotecas existentes na literatura. Assim, foi verificado que, para a identificação deste composto, seria necessário seu isolamento mediante técnicas cromatográficas. Realizou-se então uma CC com 90 mg de amostra do óleo, utilizando como adsorvente 30 g de sílica gel F60 (Silicycle) 240-400 mesh. O sistema de eluição foi composto por éter de petróleo: *n*-hexano e *n*-hexano:acetato de etila, com aumento gradativo de polaridade; foram coletadas frações de 20 mL de solvente, e as frações reunidas conforme similaridade observada em CCD, resultando em 8 frações.

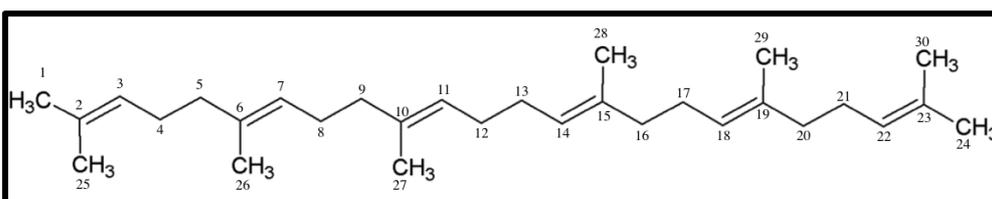
Na última fração da coluna, com 16 mg de amostra, esperava-se encontrar o composto referente ao último pico do cromatograma, já que os demais haviam sido observados nas frações anteriores nas análises por CG. Após purificação da fração por CCDP e análise por CG, observou-se que o composto isolado apresentava um tempo de retenção de 32 min,

diferente do último pico majoritário observado na amostra de origem, cujo  $t_R$  era de 42 min. Acredita-se que pode ter havido degradação durante o processo cromatográfico.

#### 4.7 DADOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DAS PARTES AÉREAS DE *Leonurus sibiricus* L.

##### 4.7.1 Metabólitos isolados do LEBM

**Esqualeno (28):** 6 mg; sólido branco; RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ : 5,11 (1H, *m*, H-



3), 5,13 (1H,

*m*, H-7), 5,16

(1H, *m*, H-11),

2,09 (4H, *m*,

H-8, -17), 2,07 (4H, *m*, H-4, -21), 2,03 (4H, *m*, H-12, -13), 2,0 (4H, *m*, H-9, -16), 1,99 (4H, *m*,

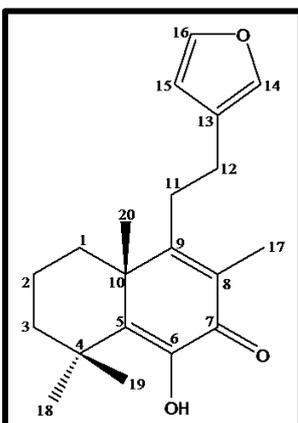
H-5, -20), 1,68, 1,61, 1,16 (*m*, demais hidrogênios); RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$

135,1 (C-10, -15), 134,8 (C-6, -19), 131,2 (C-2, -23), 124,4 (C-3, -22), 124,3 (C-11, -14),

124,3 (C-7, -18), 39,7 (C-5, -20, -9, -16), 28,2 (C-12, -13), 26,7 (C-4, -21), 26,6 (C-8, -17),

25,6 (C-1, -24), 17,6 (C-25, -30), 16,0 (C-27, -28), 15,9 (C-26, -29).

**Leo Japonina (29):** 127 mg; sólido amarelo amorfo; RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :



$\delta$ 1,55 (1H, *m*, H-1), 2,06 (1H, *m*, H-1), 1,70 (1H, *m*, H-2), 1,88 (2H,

*m*, H-2, -3), 1,40 (1H, *m*, H-3), 2,56 (3H, *m*, H-11, -12), 2,67 (1H, *m*,

H-11), 6,32 (1H, *m*, H-14), 7,38 (1H, *t*, C-15), 7,29 (1H, *m*, H-16),

1,99 (3H, *m*, H-17), 1,38 (9H, *m*, H-18, -19, -20), 6,98 (1H, *m*, -OH).

RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  29, 4 (C-1), 17,2 (C-2),

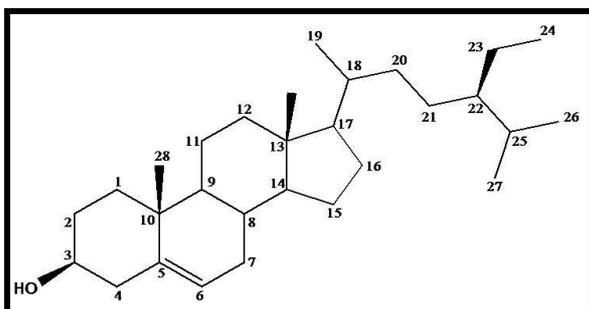
37,2 (C-3), 35,6 (C-4), 140,5 (C-5), 143,1 (C-6), 181,6 (C-7), 127,4

(C-8), 165,8 (C-9), 43,8 (C-10), 31,5 (C-11), 23,8 (C-12), 124,3 (C-

13), 110,5 (C-14), 143,1 (C-15), 138,7 (C-16), 11,6 (C-17), 28,1 (C-

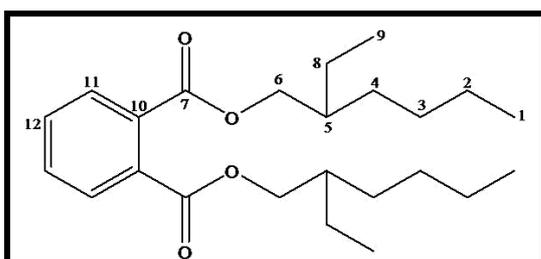
18), 27,6 (C-19), 27,9 (C-20).

**$\beta$ -Sitosterol (30):** 50 mg; sólido branco; RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ : 3,51 (1H, *m*,



H-3), 5,34 (1H, *d*, H-6), 0,68, 0,80, 0,84, 0,86, 0,96, 1,0 (3H,  $\text{CH}_3$ , H-19, -24, -26, -27, -28, -29), 1,25-2,28 (*m*, demais hidrogênios). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  37,2 (C-1), 31,9 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 31,6 (C-7), 31,6 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 26,1 (C-15), 28,2 (C-16), 56,1 (C-17), 36,1 (C-18), 19,0 (C-19), 33,9 (C-20), 26,1 (C-21), 45,8 (C-22), 23,1 (C-23), 11,9 (C-24), 29,6 (C-25), 19,8 (C-26), 19,3 (C-27), 18,7 (C-28), 11,8 (C-29).

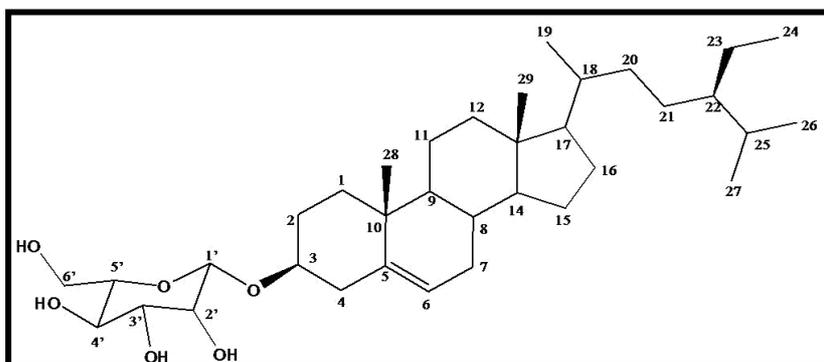
**Ftalato de bis(2-etilexila) (31):** 6,5 mg; óleo amarelado; RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em



$\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  0,90 (2H, *m*, H-1, -1'), 0,92 (4H, *m*, H-2, -2'), 0,94 (4H, *m*, H-3, -3'), 1,25 (4H, *m*, H-4, -4'), 1,61 (2H, *m*, H-5, -5'), 4,21 (4H, *m*, H-6, -6'), 1,32 (4H, *m*, H-8, 8'), 0,89 (6H, *m*, H-9, -9'), 7,69 (2H, *m*, H-11, -11'), 7,53 (2H, *m*, H-12, -12').

RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  10,9 (C-1, -1'), 22,9 (C-2, -2'), 23,8 (C-3, -3'), 28,9 (C-4, -4'), 38,8 (C-5, -5'), 68,2 (C-6, -6'), 167,7 (C-7, -7'), 30,4 (C-8, -8'), 23,9 (C-9, -9'), 132,5 (C-10, -10'), 130,8 (C-11, -11'), 128,8 (C-12, -12')

**$\beta$ -Sitosterol-glicosilado (32):** 10 mg; sólido branco; RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$



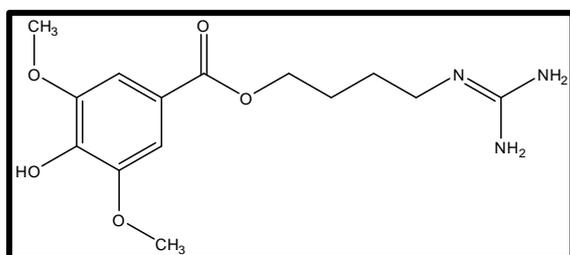
3,14 (1H, *m*, H-3), 5,19 (1H, *m*, H-6), 4,14 (1H, *m*, H-1'), 3,01-3,2 (3H, *m*, H-2', -3'-4'), 3,56 (1H, *m*, H-5'), 2,05-0,81 (*m*, demais hidrogênios). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  36,8 (C-1), 29,2 (C-2), 78,5

(C-3), 38,2 (C-4), 139,9 (C-5), 121,7 (C-6), 31,5 (C-7), 31,5 (C-8), 49,8 (C-9), 36,3 (C-10),

20,6 (C-11), 39,4 (C-12), 41,9 (C-13), 56,4 (C-14), 23,8 (C-15), 27,8 (C-16), 55,6 (C-17), 11,3 (C-18), 18,8 (C-19), 35,7 (C-20), 18,2 (C-21), 33,5 (C-22), 25,6 (C-23), 45,5 (C-24), 28,7 (C-25), 18,4 (C-26), 19,2 (C-27), 22,6 (C-28), 11,4 (C-29), 100,7 (C-1'), 73,2 (C-2'), 76,1 (C-3'), 69,8 (C-4'), 75,5 (C-5'), 61,3 (C-6').

#### 4.7.2 Metabólito isolado do LEBM+

**Leonurina (1):** Análise comparativa em CLAE com padrão comercial; análise em espectrometria de massa de alta resolução, com  $[M+H]^+$  em  $m/z$  312,15.



### 4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### 4.8.1 Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada através de um ensaio colorimétrico quantitativo, baseado na adaptação do método de Ellman et al. (1961), realizada por Rhee et al. (2001). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, 25  $\mu$ L de 15 mM ACTI, 125  $\mu$ L de 3 mM DTNB em tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo NaCl 0,1 M e 0,02 M MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O), 50  $\mu$ L de tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo 0,1 % de BSA) e 25  $\mu$ L da amostra (20 mg/mL em DMSO diluídos em tampão A para concentração 2 mg/mL); estes reagentes foram misturados e incubados a 25 °C por 2 min. Na sequência, foram adicionados 25  $\mu$ L de AChE (0,22 U/mL em tampão A) e mediu-se a absorção vinte vezes a cada 60 segundos, a 25 °C. Neste método, o que é

detectado é a coloração amarela resultante da formação do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e 5-tio-2-nitro-benzoato, formados pela reação do DTNB com o produto da hidrólise do substrato acetilcolina pela enzima, sendo detectado a 405 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se um branco (poço sem enzima) para cada amostra. Como controle positivo utilizou-se a eserina (fisostigmina) e a porcentagem de inibição foi calculada por comparação da absorbância da amostra com o ensaio em branco.

#### **4.8.2 Atividade inibitória da enzima prolil oligopeptidase (POP)**

A atividade de inibição frente à enzima POP foi determinada seguindo-se o método descrito por Toide et al. (1995). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, permitindo assim, um monitoramento simultâneo das múltiplas reações. Para cada reação foi realizada uma pré-incubação do tampão fosfato Na/K (131  $\mu$ L, pH 8.0), com a enzima POP (7 nM) e a amostra a ser testada (3  $\mu$ L) a 37 °C durante 15 minutos. As amostras-estoque a serem testadas foram preparadas em DMSO. Após a pré-incubação, adicionou-se a cada poço o substrato o ZGP-AMC (10  $\mu$ L, 3 mM em 40% de 1,4-dioxano) e a reação foi incubada por 1 h a 37 °C, sendo que a formação de N-aminometilcumarina (AMC) foi medida fluorimetricamente. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360/40 e 485/20 nm, respectivamente.

Foram realizados controles positivos e negativos contendo a amostra em DMSO (3  $\mu$ L), o substrato ZGP-AMC (10  $\mu$ L) e o tampão fosfato Na/K (131  $\mu$ L), com e sem a presença da enzima POP (7 nM) respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata, usando-se um branco para cada amostra sem a enzima. Um inibidor conhecido da POP, o ácido clorogênico, também foi utilizado como controle positivo sob as mesmas condições experimentais. A porcentagem de inibição foi calculada pela fluorescência da amostra comparando com o ensaio em branco.

## 4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 4.9.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de um composto testado capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, sob condições de cultura adequadas e padronizadas.

Para as análises foram utilizadas cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), composta de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana.

Microorganismos (ATCC)		
Gram-negativos	Gram-positivos	Fungos
<i>Pseudomas aeruginosa</i> (27853)	<i>Bacillus cereus</i> (33019)	<i>Candida albicans</i> (44373)
<i>Burkholderia cepacia</i> (17759)	<i>Enterococcus sp.</i> (6589)	<i>Candida parapslosis</i> (22018)
<i>Morganella morgani</i> (25829)	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Candida krusei</i> (6258)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Candida tropicalis</i> (750)
<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Bacillus subtilis</i> (19659)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
<i>Salmonella typhimurium</i> (14028)		<i>Cryptococcus gatti</i> (56990) <i>Sacharomyces cereviseae</i> (2601)

As substâncias utilizadas como padrões foram ampicilina e cloranfenicol para bactérias e nistatina e fluconazol para fungos, preparados conforme as normas da FDA (1991).

Os meios de cultura utilizados foram o caldo de caseína de soja (5 g de cloreto de sódio, 2,5 g de dextrose, 2,5 g de fosfato dibásico de potássio, 17 g de peptona de caseína, 3 g de

peptona de soja e 1 L de água destilada) para bactérias e o caldo sabouraud dextrosado (40 g de dextrose, 5 g de peptona de carne, 5 g de peptona de caseína e 1 L de água destilada) para os fungos.

#### *4.9.1.1 Método para a determinação da CIM*

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito pela National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS, 2003). Este teste foi realizado em placas de cultura estéreis de 96 poços. Nesta técnica, cada poço foi inoculado com os micro-organismos na concentração de  $1 \times 10^6$  células viáveis e, posteriormente, as amostras a serem testadas foram adicionadas no primeiro poço seguindo-se a diluição em série das mesmas, de 200 µg/mL até 1,56 µg/mL para substâncias puras e de 500 µg/mL até 3,9 µg/mL para extratos e frações. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para as bactérias e, por 48 horas a 25 °C para os fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano através da leitura da microplaca no espectrofluorímetro utilizando o comprimento de onda de 620 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com os padrões. Utilizou-se também um controle positivo e um negativo para cada substância testada, de forma a garantir a reprodutibilidade do ensaio.

#### *4.9.1.2 Método para a determinação da concentração letal mínima (CLM)*

A concentração letal mínima (CLM) é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99% do número das unidades formadoras de colônia (UFC), segundo Hammer et al. (1999).

Neste método, as culturas de micro-organismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas no método CIM, foram inoculadas novamente utilizando 10 µL de cada uma das soluções presentes nos poços do teste anterior e 90 µL de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de micro-organismo.

Após a incubação, cumprindo-se o tempo necessário para o crescimento de cada micro-organismo (24 h, 35-37 °C para bactérias; 48 h, 25-27 °C para fungos) determinou-se a CLM.

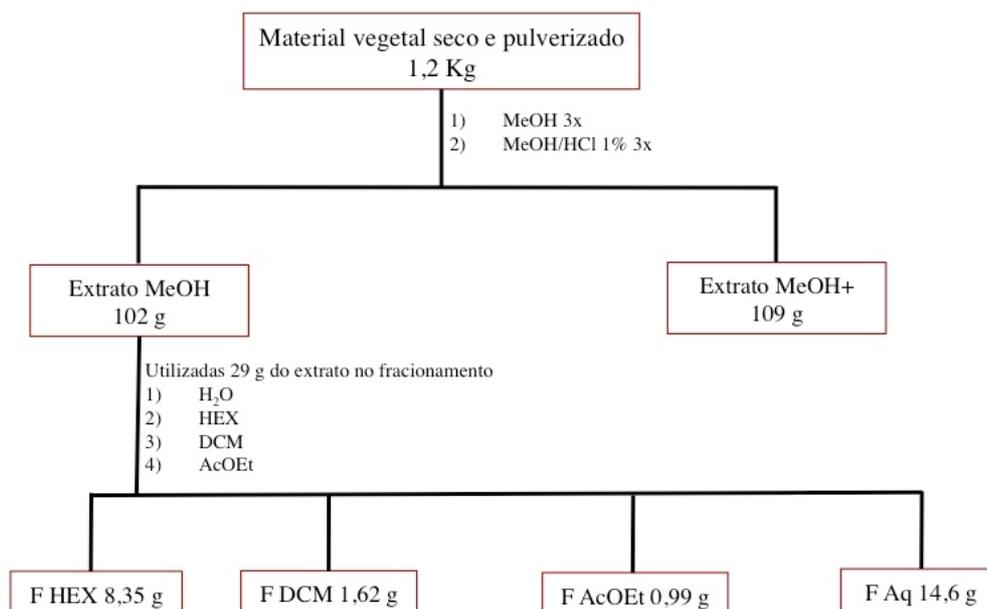
## 5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS

#### 5.1.1 Rendimentos dos extratos e frações do LEBM e LEBM+

No tratamento inicial do material vegetal foram obtidos 102 g de LEBM e 109 g do LEBM+. Inicialmente, trabalhou-se com o LEBM (29 g) objetivando o isolamento dos metabólitos secundários de *L. sibiricus* e posterior avaliação da atividade biológica. Assim, realizou-se o fracionamento do extrato utilizando-se duas metodologias distintas, conforme descrito anteriormente. No Esquema 1 está representada a metodologia de extração líquido-líquido utilizada, bem como as quantidades de amostras obtidas.

Esquema 1 - Fracionamento líquido-líquido do LEBM



A fração que apresentou melhores resultados quanto ao isolamento de metabólitos, foi a fração *n*-hexano, de onde foram isoladas três substâncias. As frações diclorometano e acetato de etila foram trabalhadas através de diversas técnicas cromatográficas, não sendo possível o isolamento em quantidades suficientes para análise e elucidação estrutural de nenhum metabólito puro. Na Tabela 7 estão expressos os rendimentos do extrato obtido e das frações.

Tabela 7 - Rendimentos do LEBM e frações provenientes do fracionamento líquido-líquido

Extrato ou Fração	Quantidade obtida (g)	Percentual em relação à massa seca	Percentual em relação ao extrato bruto (29 g)
LEBM	102	8,5%	-
FHEX	8,35	-	30,04%
FDCM	1,62	-	5,83%
FAcOEt	0,99	-	3,56%
FAq	14	-	52,8%

Considerando-se as dificuldades encontradas no trabalho de isolamento com as frações obtidas no fracionamento líquido-líquido do LEBM, optou-se pela aplicação de uma metodologia diferente para o fracionamento do LEBM. Para isso, conforme detalhado na parte experimental, realizou-se um processo de filtração em sílica gel em funil sinterizado sob sucção, obtendo-se assim diversas frações do extrato. Dessa forma, foi possível o isolamento de um número maior de substâncias, o que comprova a eficácia do método empregado. A partir das frações obtidas neste fracionamento, foram isolados os compostos  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**) e flalato de bis(2-etilexila) (**31**), além do isolamento do  $\beta$ -sitosterol (**30**) e da leojaponina (**29**), já isolados anteriormente.

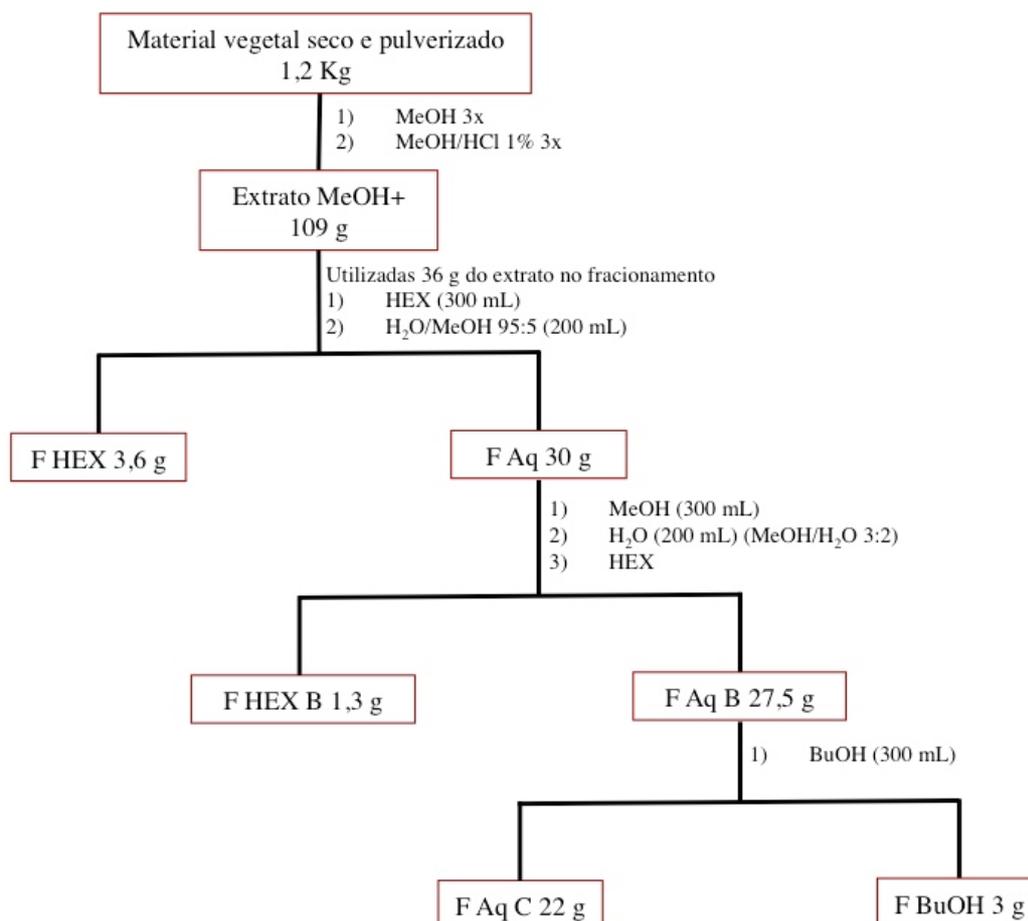
Posteriormente, trabalhou-se com o LEBM+ (36 g) com o objetivo de isolar o alcalóide detectado pelos testes com reativo de Dragendorff. Na Tabela 8 estão listados os rendimentos do extrato e das frações obtidas no decorrer do procedimento.

Tabela 8 - Rendimentos do LEBM+ e frações.

Extrato ou Fração	Quantidade obtida (g)	Percentual em relação a massa seca	Percentual em relação ao extrato bruto (36 g)
LEBM+	109	9,1%	-
F HEX	3,6	-	10%
F Aq	30	-	84%
F HEX B	1,3	-	3,6%
F Aq B	27,5	-	76,4%
F BuOH	3	-	8,3%
F Aq C	22	-	61,1%

No Esquema 2 está representado o processo de fracionamento do extrato, bem como as quantidades de frações obtidas em cada etapa.

Esquema 2 - Fracionamento do LEBM+



Seguindo a metodologia descrita na literatura, foi possível o isolamento de 3 mg de um sólido branco identificado por CCD como sendo um composto alcaloídico, que posteriormente foi caracterizado como leonurina (1).

### 5.1.2 Rendimentos e perfis cromatográficos dos extratos obtidos de acordo com o método de extração empregado

Uma vez que foi constatado por Fuchino et al. (2013) a ocorrência de degradação de componentes do extrato de *Leonurus japonicus* a temperaturas  $\geq 40$  °C, neste trabalho realizou-se testes comparativos das metodologias de maceração, extração a quente, extração

assistida por ultrassom e por micro-ondas, empregando-se também para a obtenção extratos brutos temperaturas de 40 e 5 °C.

Na Tabela 9 são apresentados os rendimentos dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração utilizados.

Tabela 9 - Estudo comparativo de obtenção de extratos de *L. sibiricus*.

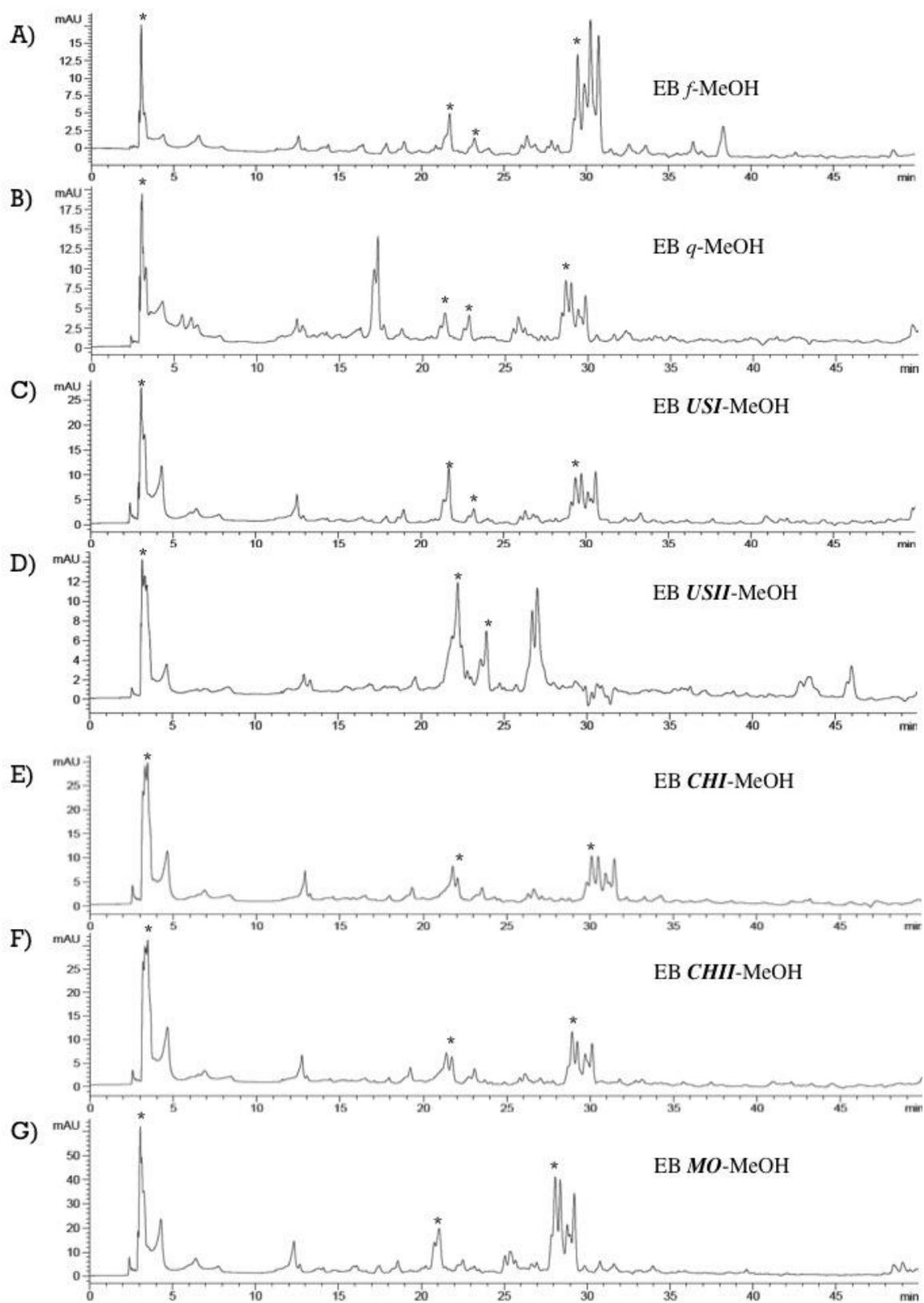
Método de extração	Condições	R (%)	
<i>Extração a frio</i>	7,5 g M.V./ 150 mL MeOH (3 x 24 h / t.a.)	16,26 ± 2,53 (EB <i>f</i> -MeOH)	17,27 ± 0,61 (EB <i>f</i> -MeOH+)
<i>Extração usando refluxo</i>	7,5 g M.V./ 150 mL MeOH (3 x 8 h / 65 °C)	15,71 ± 1,24 (EB <i>q</i> -MeOH)	22,73 ± 1,17 (EB <i>q</i> -MeOH+)
<i>Extração assistida por banho ultrassônico</i>	7,5 g M.V./ 50 mL MeOH (3 x 1 h / 40 °C)	8,58 ± 1,14 (EB <i>USI</i> -MeOH)	10,12 ± 6,89 (EB <i>USI</i> -MeOH+)
	7,5 g M.V./ 50 mL MeOH (3 x 1 h / 5 °C)	8,03 ± 0,42 (EB <i>USII</i> -MeOH)	19,72 ± 1,05 (EB <i>USII</i> -MeOH+)
<i>Extração assistida por sonoreator do tipo "Cup horn"</i>	7,5 g M.V./ 50 mL MeOH (3 x 1 h / 40 °C)	8,01 ± 0,84 (EB <i>CHI</i> -MeOH)	16,12 ± 0,32 (EB <i>CHI</i> -MeOH+)
	7,5 g M.V./ 50 mL MeOH (3 x 1 h / 5 °C)	5,51 ± 0,27 (EB <i>CHII</i> -MeOH)	13,65 ± 1,29 (EB <i>CHII</i> -MeOH+)
<i>Extração assistida por micro-ondas focalizado</i>	2,0 g M.V./ 13 mL MeOH (3 x 5 min / 70 °C)	12,04 ± 0,57 (EB <i>MO</i> -MeOH)	18,17 ± 0,77 (EB <i>MO</i> -MeOH+)

\*M.V.: material vegetal

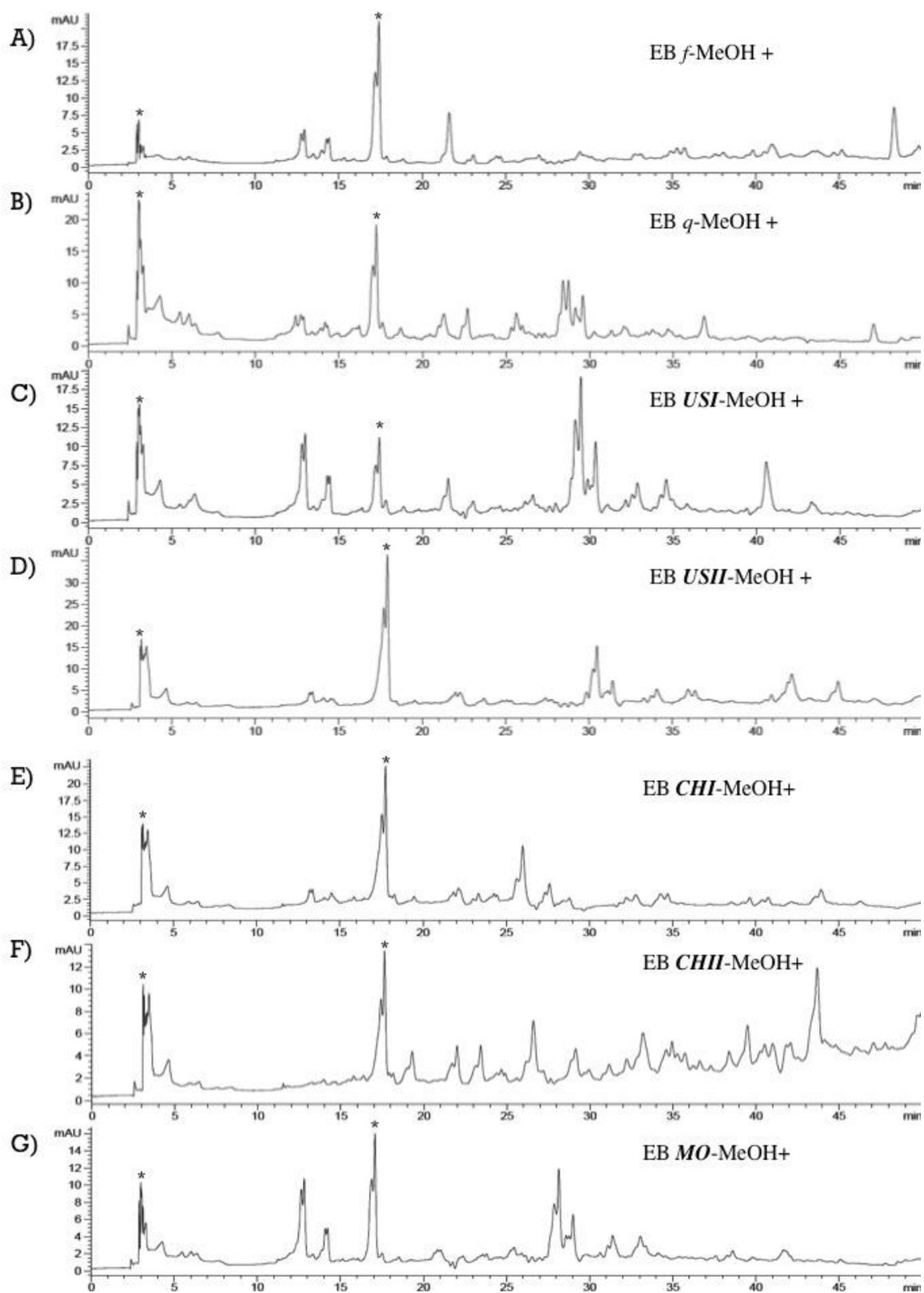
Os resultados apresentados na Tabela 9 evidenciam que, em geral, os rendimentos dos extratos preparados utilizando-se os métodos convencionais (maceração e refluxo) foram melhores que os rendimentos dos extratos preparados por ultrassom e micro-ondas, sendo este um dos motivos pelo qual optou-se por trabalhar com a técnica de maceração para a obtenção

do extrato em maior escala para a continuidade do trabalho de isolamento dos metabólitos de *L. sibiricus*. Além disso, outro fator determinante na escolha do método de extração foi a quantidade de material vegetal que poderia ser empregada em cada extração. A aparelhagem disponível no laboratório para aplicação das técnicas de extração assistidas por ultrassom e micro-ondas comportava menores quantidades de material vegetal quando em comparação aos métodos clássicos de maceração e refluxo, o que tornaria o trabalho para obtenção dos extratos em quantidades suficientes para isolamento muito mais demorado e laborioso.

Nas Figuras 17 e 18 estão representados os cromatogramas dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração empregados neste trabalho. A análise por CLAE mostra uma variação tanto qualitativa quanto quantitativa na composição dos extratos obtidos, observando-se nos cromatogramas de *EB f-MeOH* e *EB MO-MeOH* (Figura 17 A e G) o aumento de intensidade dos picos entre 29-32 min, sendo observado somente no *EB q-MeOH* a presença de picos intensos entre 16-17 min (Figura 17 B). Comumente a todos os cromatogramas da Figura 18, encontra-se um conjunto de picos intensos entre 16-19 min. Pode-se observar que o cromatograma de *EB CHII-MeOH+* é o que apresenta maior quantidade de sinais, especialmente entre 20-50 min, caracterizando-se como um extrato com maior quantidade de substâncias apolares.

Figura 17 - Cromatogramas dos extratos de *L. sibiricus* obtidos por diferentes métodos de extração

\* Picos coincidentes

Figura 18 - Cromatogramas dos extratos de *L. sibiricus* obtidos por diferentes métodos de extração

\* Picos coincidentes

## 5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PARTES AÉREAS DE *Leonurus sibiricus* L.

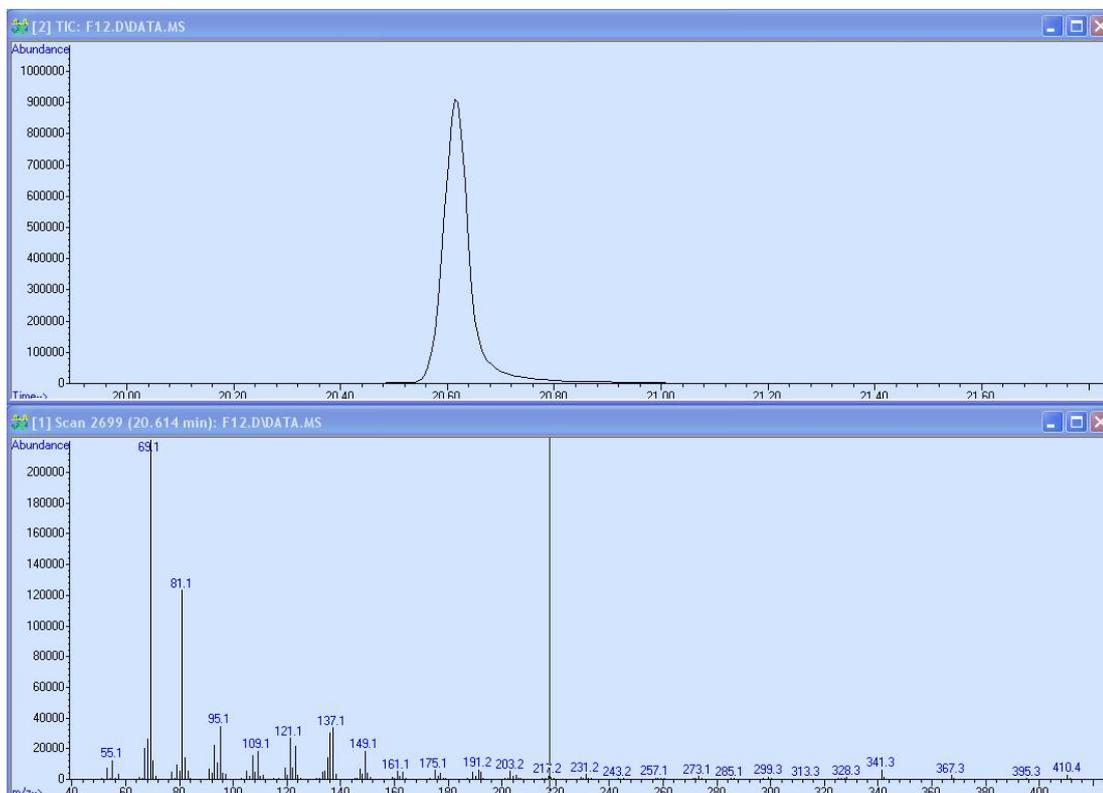
### 5.2.1 Metabólitos isolados do LEBM

#### 5.2.1.1 Esqualeno (28)

O esqualeno (**28**) é um triterpeno poliinsaturado, de fórmula molecular  $C_{30}H_{50}$ , que contém seis unidades de isopreno e é um precursor bioquímico do colesterol e outros esteróis. É bastante comum em óleos de fígado de peixes e óleos vegetais (KOWERT et al., 2014).

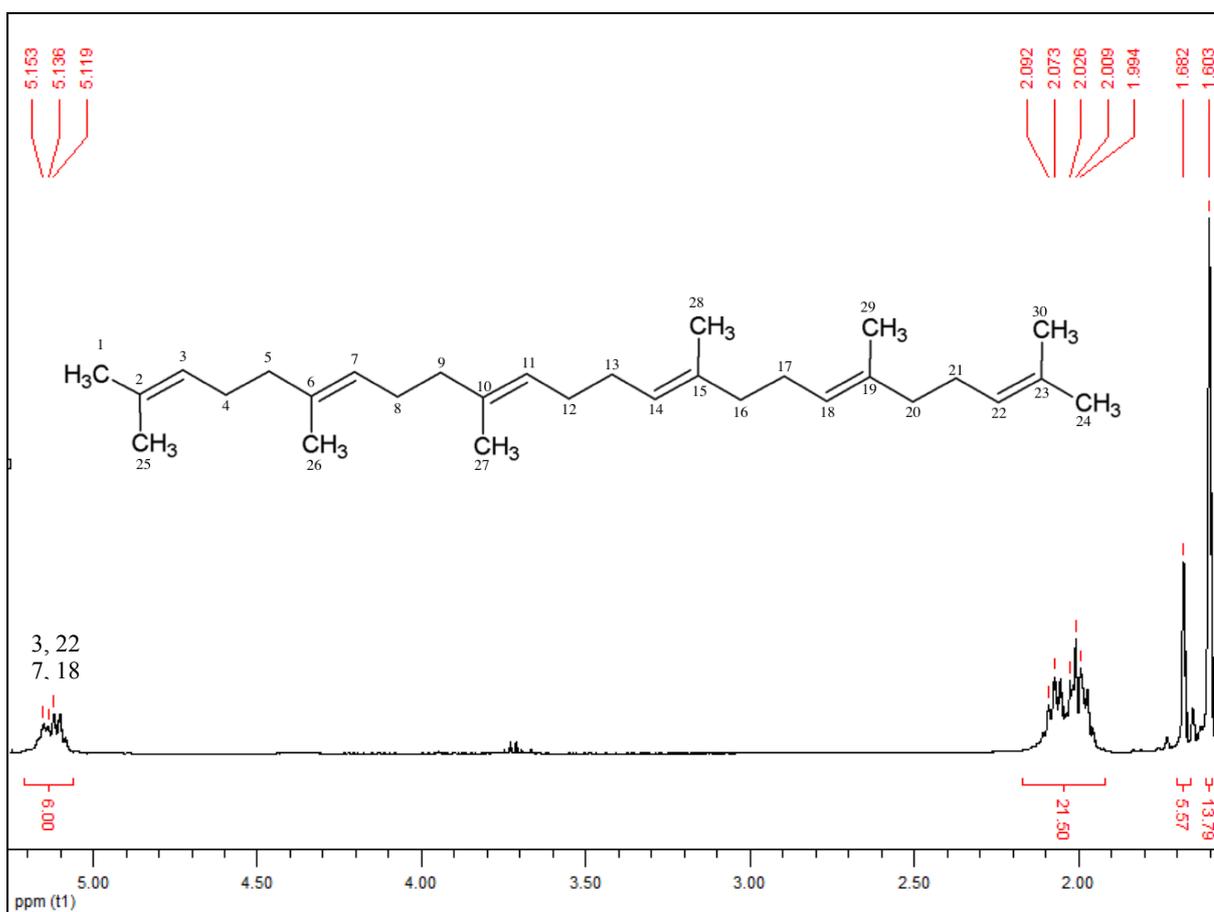
O triterpeno **28** foi isolado da fração *n*-hexano do extrato bruto metanólico das partes aéreas de *L. sibiricus*. Através da análise em CG/EM foi possível confirmar a massa molecular do produto isolado, como 410 g/mol. Na Figura 19 estão representados o cromatograma e o espectro de massa do composto **28** com as fragmentações referentes a molécula.

Figura 19 - CG/EM do esqualeno (**28**)

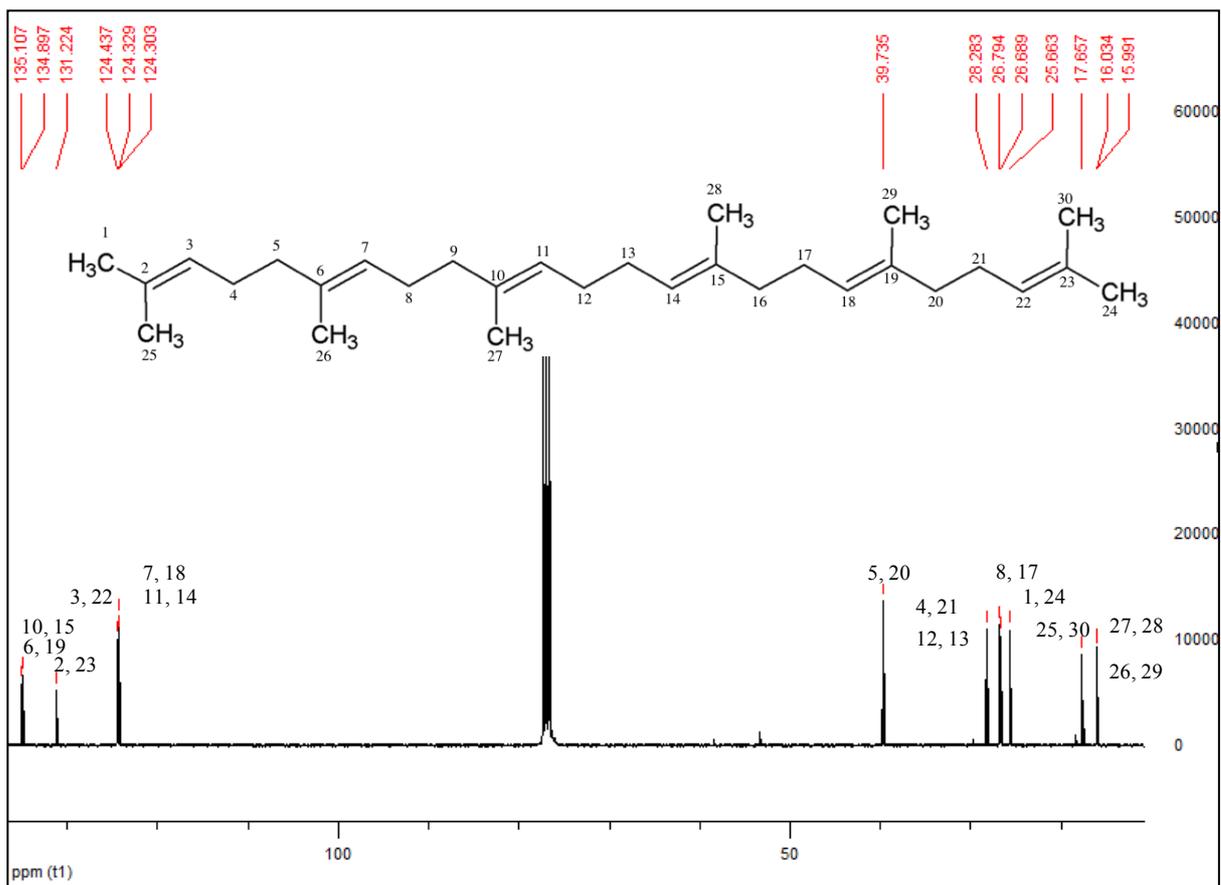


A Figura 20 apresenta o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **28**, onde é possível se identificar os sinais referentes aos prótons vinílicos, já que são hidrogênios mais desblindados pela anisotropia da ligação dupla. Esses sinais são observados na região entre 5,11 e 5,13 ppm, e são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos C-3/22, C-7/18 e C-11/14. Os dados obtidos nas análises de RMN foram comparados com dados da literatura, a fim de se confirmar a estrutura de **28** (POGLIANI et al., 1994).

Figura 20 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do esqualeno (**28**) em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz



Na Figura 21 está representado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **28**. Assim como no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , os sinais referentes aos carbonos da dupla ligação podem ser observados da região de campo baixo do espectro. Os carbonos não hidrogenados são os mais desblindados, sendo encontrados em 135,1 e 134,8 ppm, referentes aos carbonos C-10/15 e C-6/19, respectivamente. Já pico observado em 131,2 ppm também é referente a carbonos desidrogenados C-2/23, entretanto, estes possuem como substituintes duas metilas o que acarreta em pequeno efeito de blindagem.

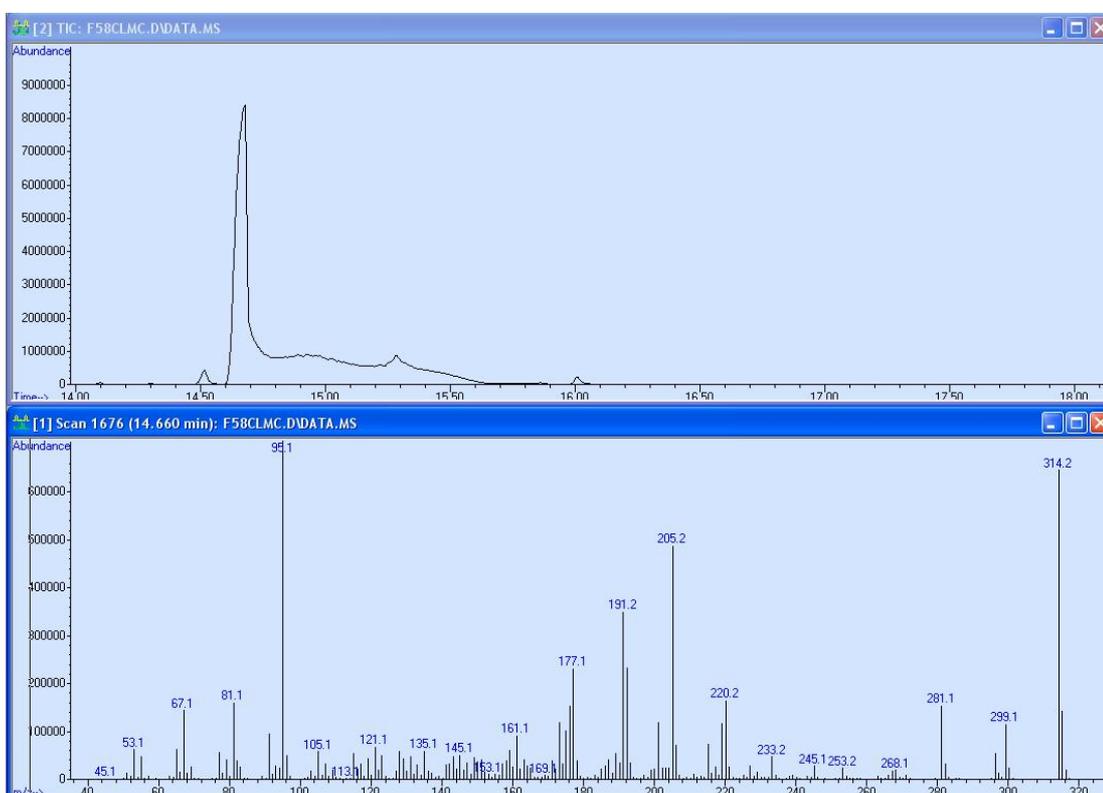
Figura 21 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do esqualeno (**28**) em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz

Embora seja mais comumente encontrado em organismos aquáticos, o esqualeno (**28**) também já foi isolado de plantas superiores. Ragasa et al. (2013) descreve o isolamento de **28** a partir do extrato diclorometano dos frutos de *Amona muricata*, enquanto que em artigo publicado por Zhou et al. (2011), os autores observam a presença de **28** no óleo essencial de *Coriandrum sativum*, em uma proporção de 0,2% em relação ao total da amostra analisada. Oliveira et al. (2015) também descreveram a presença de **28** no óleo essencial de *Leonotis nepetifolia*, planta esta que pertence a família Lamiaceae, assim como *Leonurus sibiricus*. Não foram encontrados na literatura trabalhos referentes a identificação de esqualeno em *L. sibiricus*, bem como em nenhuma outra planta pertencente ao gênero *Leonurus*, sendo portanto, inédito o isolamento no presente trabalho deste metabólito em *L. sibiricus*.

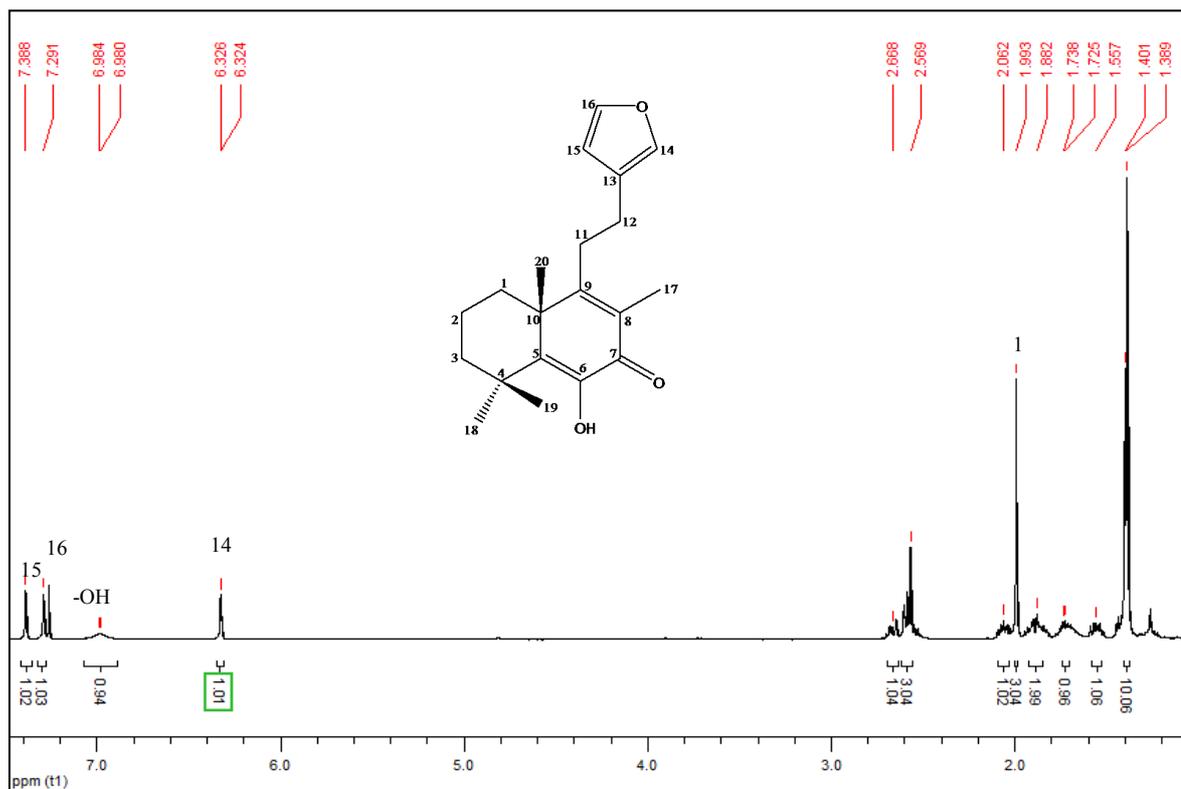
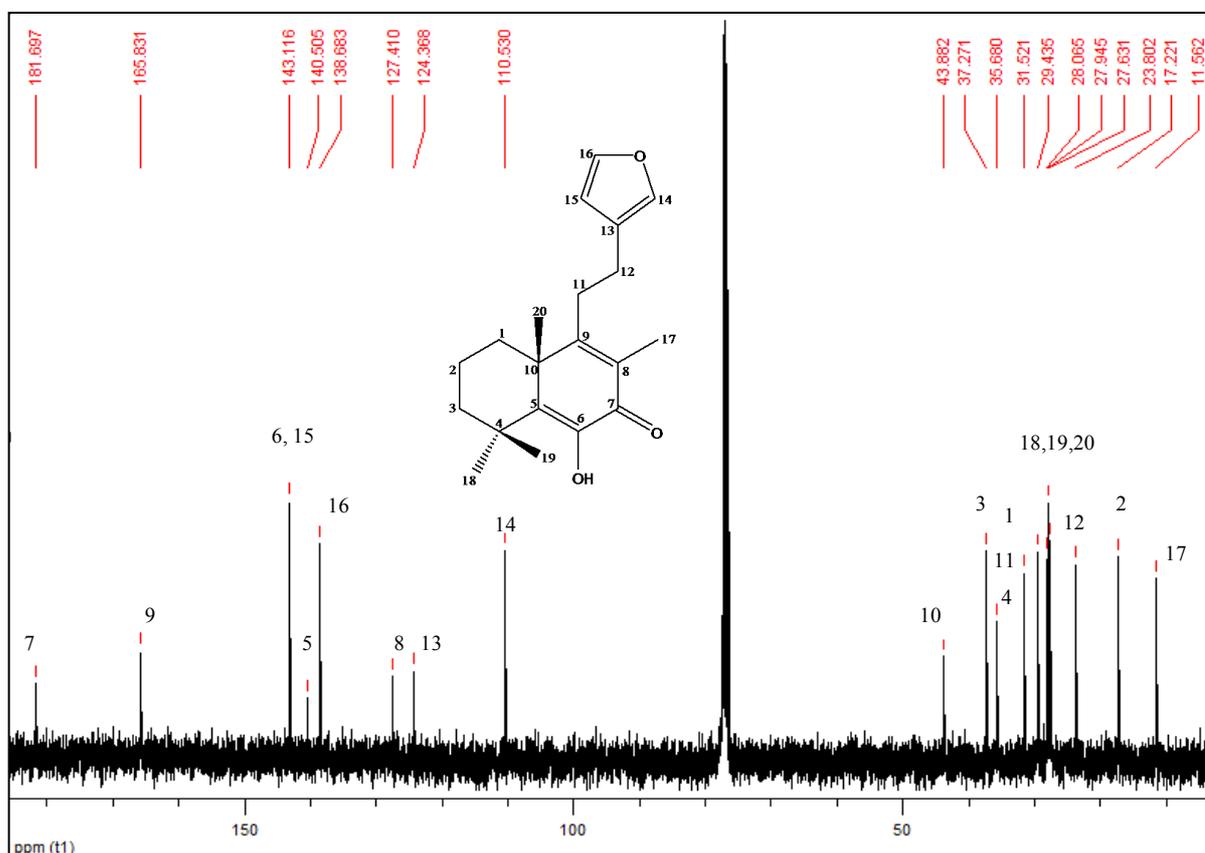
### 5.2.1.2 Leojaponina (29)

A leojaponina (**29**) é um diterpeno do tipo labdano, de fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_3$ , e foi isolada duas vezes durante a realização deste trabalho, da FHEX e após o fracionamento através de filtração, do LEBM. A estrutura de **29** foi confirmada após análise em CG/EM e RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ . Na Figura 22, apresentam-se o cromatograma e o espectro de massa do composto **29**, sendo possível confirmar a sua massa molecular, 314 g/mol, assim como as fragmentações apresentadas pela molécula.

Figura 22 - CG/EM da leojaponina (**29**)



No espectro de RMN  $^1H$  de **29** (Figura 23), observa-se sinais referentes a hidrogênios de anel furano a 7,38, 7,29 e 6,32 ppm, atribuídos aos prótons ligados aos carbonos C-15, C-16 e C-14, respectivamente. Outro sinal observado na região de campo baixo é o sinal referente ao hidrogênio da hidroxila, em 6,9 ppm ligada ao carbono C-6.

Figura 23 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da leojaponina (**29**) em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHzFigura 24 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da leojaponina (**29**) em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz

Através da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **29** (Figura 24) e com o auxílio de dados existentes na literatura foi possível relacionar todos os sinais do espectro com os carbonos pertencentes a estrutura de **29**. (ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2006). O sinal presente a 181,7 ppm é característico de carbonila cetônica de diterpenos da classe da leojaponina, sendo, portanto atribuído ao C-7 de **29**. Os sinais referentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  do anel cicloexeno e do anel furano também foram identificados na região entre 165,8 e 110,5 ppm.

O composto **29** foi isolado pela primeira vez por Romero-González et al. (2006) a partir do extrato hexânico de *Leonurus japonicus*, quando também foram isolados outros cinco compostos diterpênicos do tipo labdano: hispanolona, prehispanolona, preleoeterina, epi-preleoeterina e iso-preleoeterina. Wu et al. (2015) também identificou este metabólito em outra espécie de *Leonurus* que não a *L. sibiricus*. Não há relatos na literatura a respeito da ocorrência de leojaponina (**29**) na espécie *Leonurus sibiricus* sendo, portanto, este mais um resultado inédito do presente trabalho. Wu et al. (2011) isolou seis compostos diterpenóides do tipo labdano diferentes da leojaponina a partir do extrato hexânico das partes aéreas de *L. sibiricus*. Narukawa et al. (2014) isolou, a partir das partes aéreas de *L. sibiricus*, 14 compostos desta classe; o autor avaliou a atividade destes compostos como inibidores da enzima estrogênio sufotransferase, onde vários deles apresentaram capacidade inibitória satisfatória.

#### 5.2.1.3 $\beta$ -sitosterol (**30**)

O  $\beta$ -sitosterol, cuja fórmula molecular é  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ , é um dos fitoesteróis mais comuns em espécies vegetais, juntamente com o campesterol e o estigmasterol. Este metabólito foi isolado duas vezes durante a realização deste trabalho, a partir da FHEX oriunda do fracionamento líquido-líquido e da CLMC proveniente do fracionamento por filtração em sílica, sendo inicialmente identificado através de CCD com amostras de padrões autênticos, isolados anteriormente pelo grupo. Na Figura 25 encontra-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **30** sendo que, através da análise conjunta com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 26) e por comparação com dados da literatura, resultou na confirmação de **30** como sendo o  $\beta$ -sitosterol (VENKATA; PRAKASH, 2012). Na Figura 25 pode-se observar dois sinais bastante característicos de **30**, em 5,35 ppm referente ao hidrogênio conectado ao C-6 da dupla ligação, e o sinal em 3,5 ppm, região característica do hidrogênio ligado ao C-3. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **30** os sinais referentes aos carbonos da dupla ligação C-5 e C-6 podem ser

observados a 140,7 e 121,7 ppm, respectivamente. O sinal característico de carbono ligado a hidroxila é observado em 71,8 ppm, sendo portanto atribuído ao C-3.

Figura 25 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do  $\beta$ -sitosterol (**30**) em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

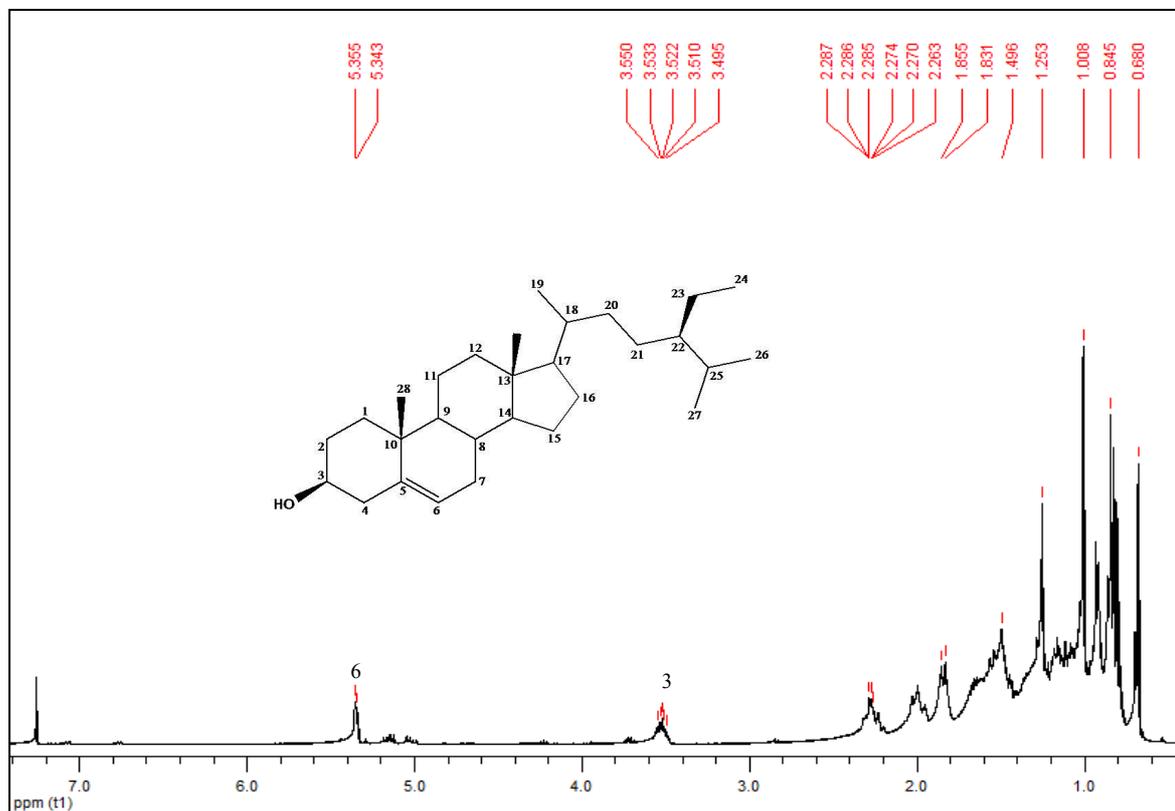
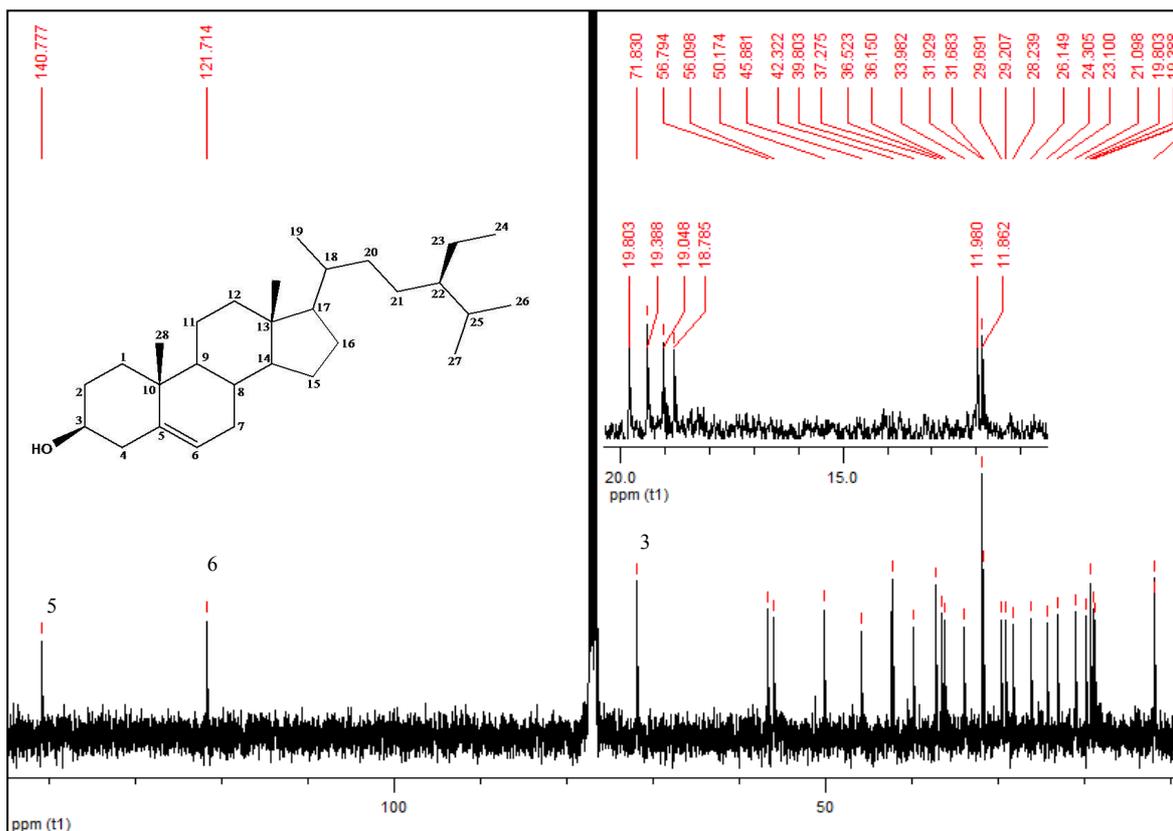


Figura 26 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol (**30**) em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz



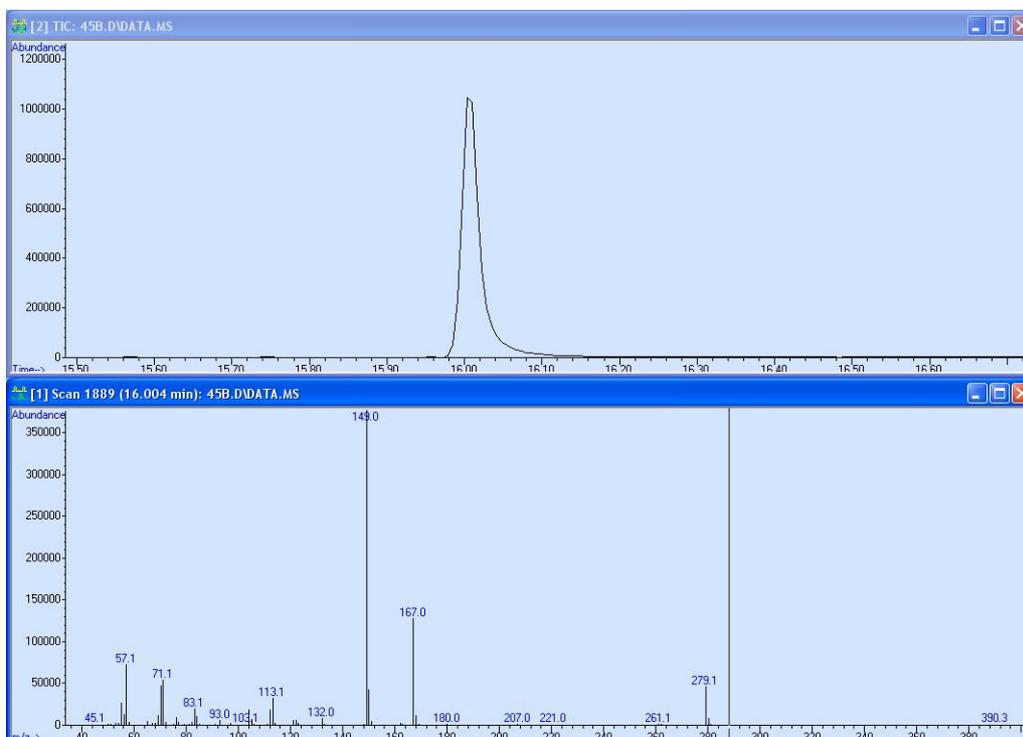
O composto **30** já foi isolado de diversas espécies de plantas, inclusive da família Lamiaceae (VENKATA; PRAKASH, 2012; RUNGSIMAKAN; ROWAN, 2014). Entretanto, não há na literatura registros de sua obtenção a partir da espécie *L. sibiricus*. Dentro do gênero *Leonurus* apenas a espécie *L. heterophyllus* Sweet já possibilitou o isolamento deste metabólito (XANG et al., 2014). Quanto ao seu potencial farmacológico, existem na literatura comprovações quanto aos efeitos antioxidante, cardioprotetor e com potencial inibitório do desenvolvimento de células cancerígenas (VIVANCOS; MORENO, 2005).

#### 5.2.1.4 Ftalato de bis (2-etilexila) (**31**)

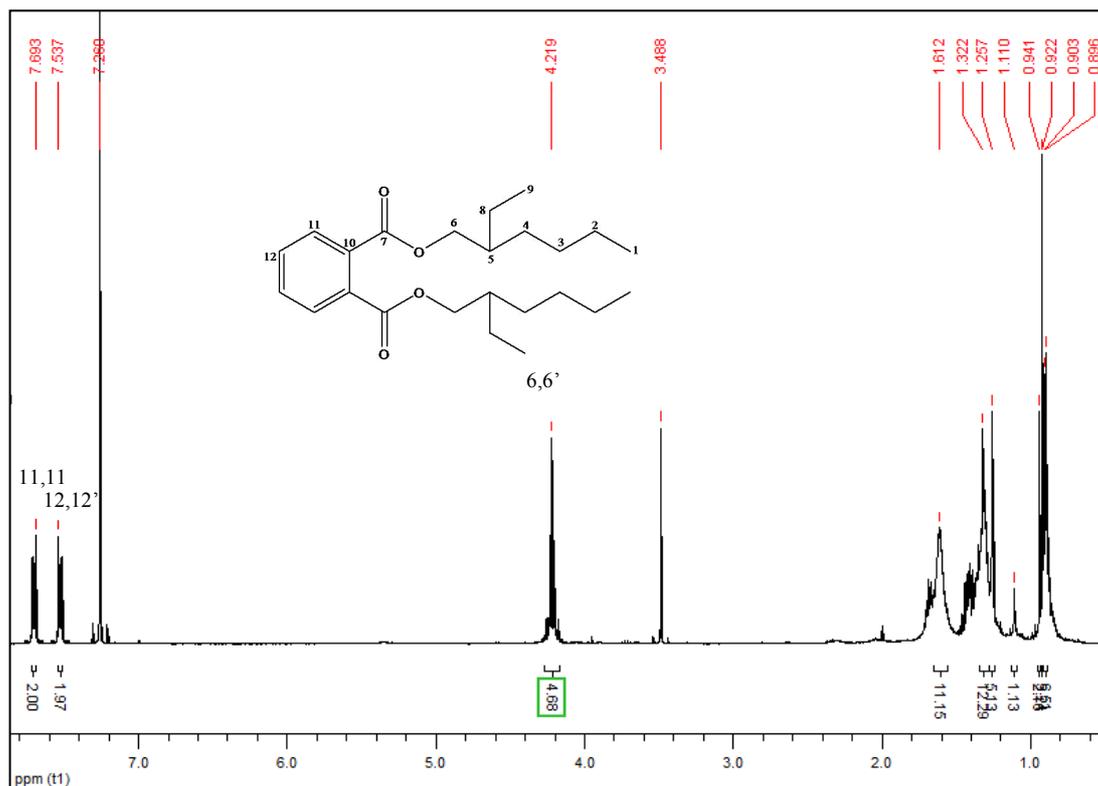
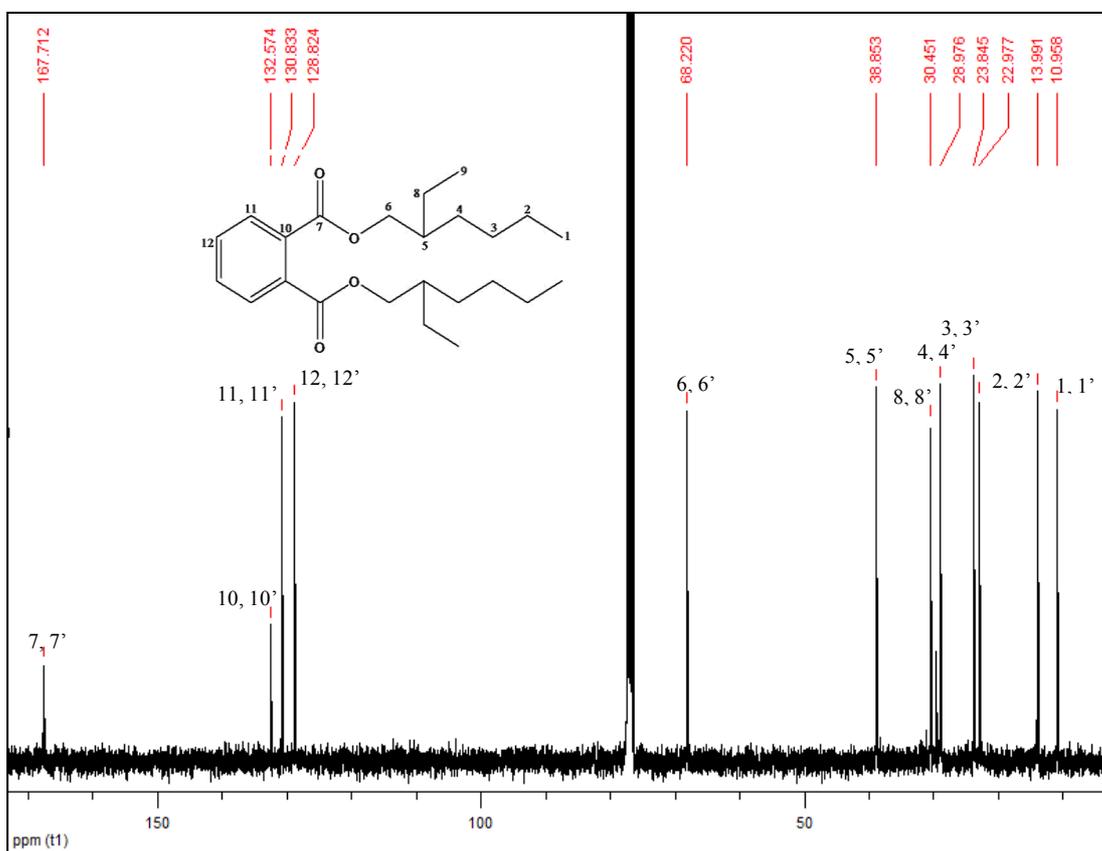
A partir do tratamento da amostra através de técnicas cromatográficas isolou-se uma substância de aspecto de óleo amarelado, o qual foi identificado como sendo o ftalato de bis(2-etilexila) (**31**), com fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ . Na Figura 27 encontra-se o cromatograma de CG/EM de **31**, bem como seu espectro de massa, confirmando a massa

molar de 390 g/mol e mostrando as fragmentações referentes ao ftalato de bis(2-etilexila), confirmadas através de comparação com a literatura (JAWORWK; CZAPLICKA, 2013).

Figura 27 - CG/EM do ftalato de bis(2-etilexila) (**31**)



Nas Figuras 28 e 29 apresentam-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **31**, respectivamente. Os dados observados nos espectros foram comparados com dados encontrados na literatura, confirmando assim a estrutura do composto isolado. Para fins de comparação dos dados de RMN, utilizou-se para a elucidação estrutural do composto **31** a mesma numeração utilizada por Amade et al. (1993). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Figura 28 pode-se observar entre 7,69 e 7,53 ppm sinais referentes a hidrogênio aromáticos, condizentes com os encontrados nos carbonos C-11/11' e C12/12', respectivamente. Em 4,21 ppm observa-se a presença de um sinal com integração referente a quatro hidrogênios, sendo relacionado aos hidrogênios ligados aos carbonos C-6 e C-6' próximos aos grupamentos éster presentes na molécula. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **31** (Figura 29) alguns sinais são facilmente identificados e relacionados com a molécula sugerida como, por exemplo, o sinal observado em 167,7 ppm típico de carbonila de grupamento éster, assim como os sinais em 132,5, 130,8 e 128,8 ppm, bastante comuns quando há na estrutura uma porção aromática. Neste caso, tais sinais são referentes aos carbonos C-10/10', C-11/11' e C-12/12' do ftalato de bis(2-etilexila), respectivamente.

Figura 28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ftalato de bis(2-etilexila) (**31**) em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHzFigura 29 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ftalato de bis(2-etilexila) (**31**) em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz

Os ftalatos são ésteres derivados do ácido ftálico e são amplamente utilizados como plastificantes pela indústria. Embora sejam mais comuns como derivados sintéticos, pode-se encontrar na literatura exemplos de isolamento de ftalatos a partir de produtos naturais. Khan et al. (2014) relatam a obtenção de ftalatos a partir dos extratos de *Lonicera quinquelocularis*, entre eles o ftalato de bis(2-etilhexila), além do ftalato de dioctila e, pela primeira vez, relatam o isolamento do ftalato de bis (7-acetoxi-2-etil-5-metilheptila). Outro relato na literatura do isolamento desta classe de compostos é de Amade et al. (1993), o qual obteve o ftalato de bis (2-etilhexila) a partir de cepas do fungo *Penicillium olsonii*, o qual é encontrado em algas marinhas.

Conforme Radulović e Blagojević (2012), a presença de ftalatos no processo de isolamento de produtos naturais pode ser devido a possíveis artefatos como contaminação externa das amostras, uma vez que para serem derivados biossintéticos dos policetídeos deveriam apresentar em sua estrutura hidroxilas fenólicas (MAKENZIE, et al., 2004). A fim de verificar-se se o ftalato isolado no presente trabalho também poderia ser proveniente de um processo de contaminação, foi realizada uma série de testes de extração com possíveis fontes externas de ftalatos (que não o material vegetal de trabalho). Foram avaliados os materiais de uso rotineiro no laboratório: pipetas plásticas descartáveis (PP), pontas de micropipetas descartáveis (PM) e tampas de borracha (TB) utilizadas em frascos de estocagem de amostras. Os testes de extração destes materiais empregaram como solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, solventes utilizados nas diferentes etapas do processo de isolamento.

No processo de extração os materiais a serem testados foram mantidos submersos em uma mistura de proporções iguais (1:1) dos solventes citados anteriormente, sendo que ao final de três dias o conteúdo do béquer foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Foram obtidas três amostras (PP, PM e TB), as quais apresentaram aspecto semelhante entre si, na forma de óleo amarelado. As amostras foram encaminhadas para análise em CG/EM a fim de se comparar com o cromatograma obtido do ftalato de bis (2-etilhexila) isolado de *L. sibiricus* no presente trabalho. Os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 30, 31 e 32.

Figura 30 - CG/EM da amostra PP, produto de extração de pipetas de Pasteur

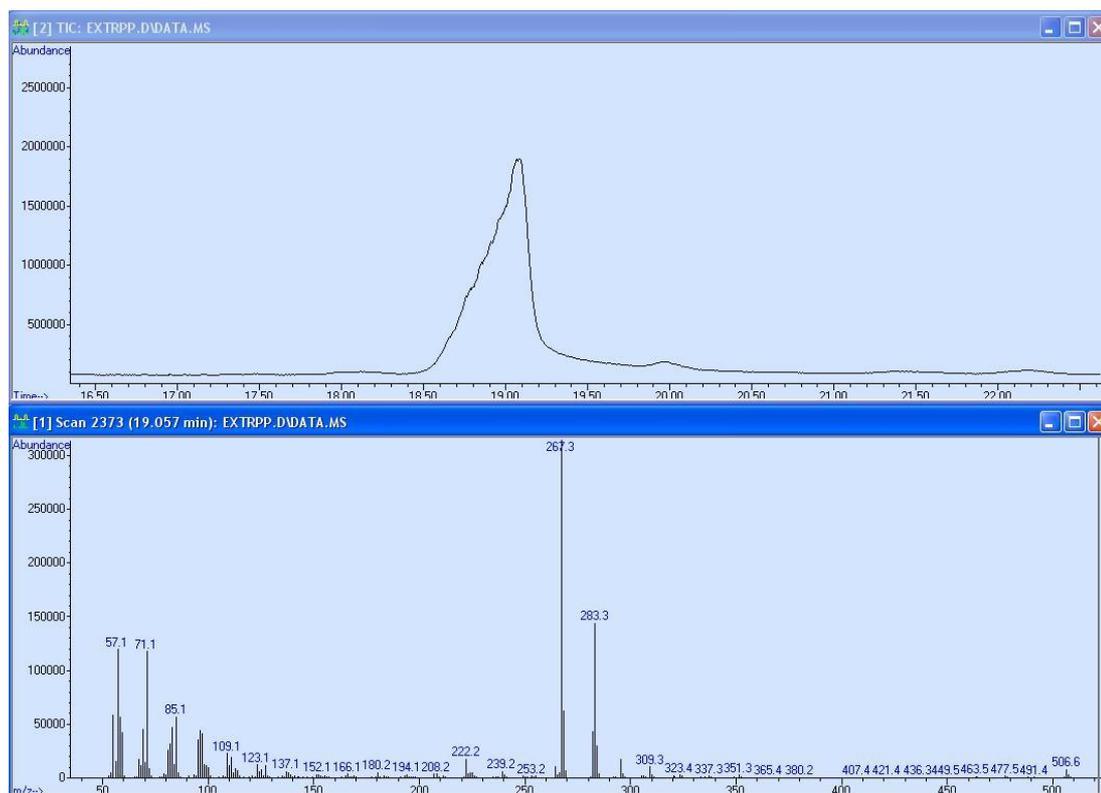


Figura 31 - CG/EM da amostra PM, produto de extração de ponteiros de micropipeta

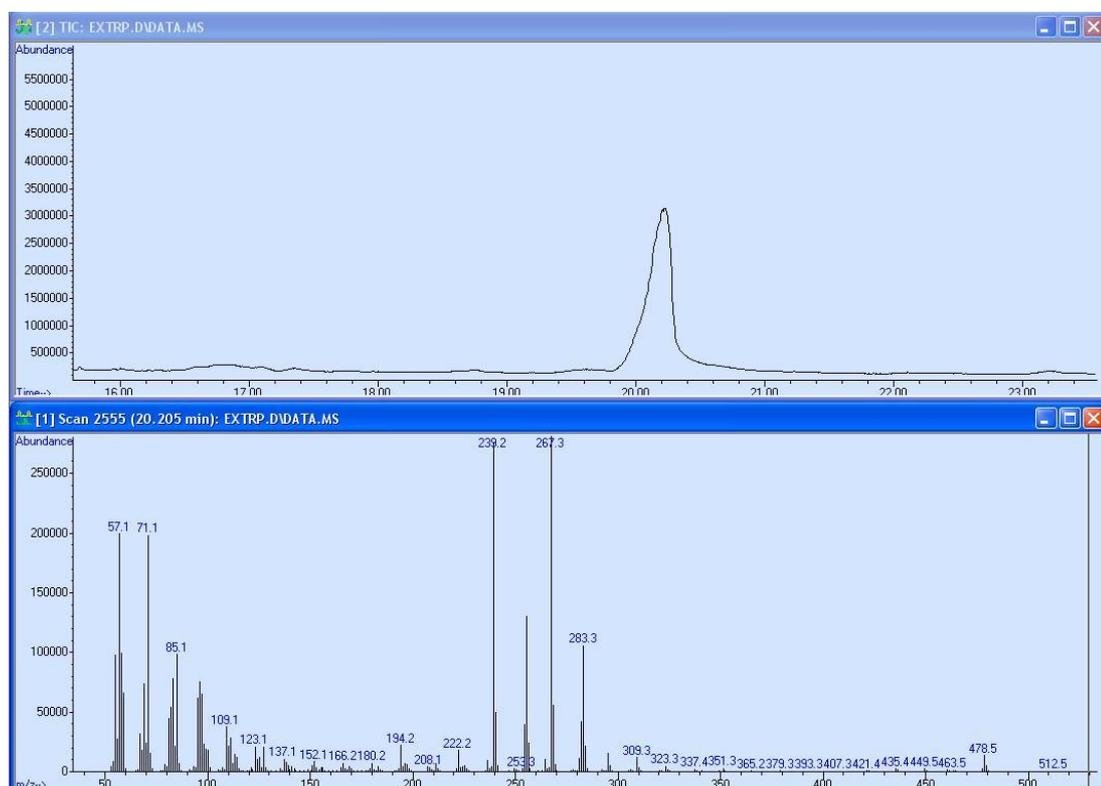
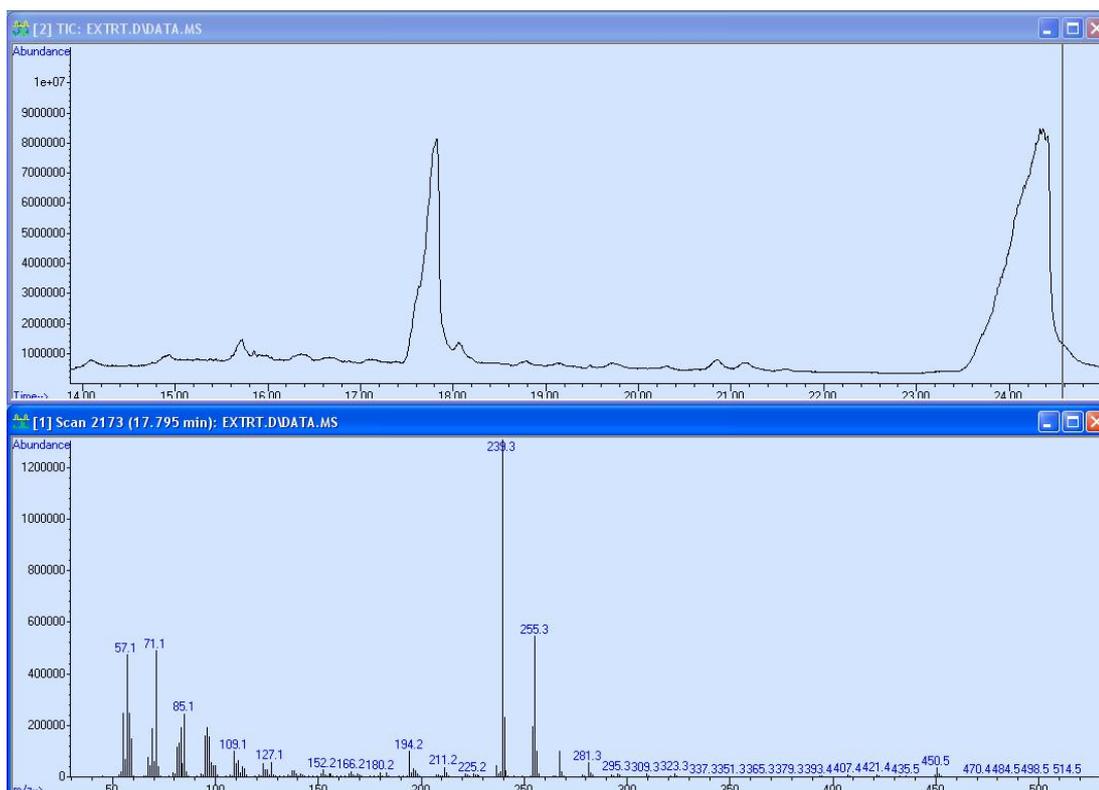


Figura 32 - CG/EM da amostra TP, produto da extração das tampas de plástico



Através da análise dos cromatogramas obtidos nas Figuras 30-32 em comparação com o cromatograma da Figura 27, evidencia-se que os materiais plásticos de uso no laboratório não se apresentaram como possível fonte do ftalato de bis (2-etilhexila). Assim, estes testes apontam que o ftalato isolado neste trabalho é oriundo de *L. sibiricus*, descartando-se a possibilidade de contaminação.

#### 5.2.1.5 $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**)

O  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**), assim como **30**, pertence a classe dos fitoesteróis, e possui fórmula molecular  $C_{35}H_{60}O_6$ . Foi isolado a partir da F XVI – 122-127 da CLMC, proveniente do fracionamento por filtração, e inicialmente identificado a partir de CCD com padrão autêntico anteriormente isolado pelo grupo; os dados de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  foram comparados com dados da literatura (KHATUN et al., 2012).

Na Figura 33 observa-se o espectro de RMN  $^1H$  do  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**). Em comparação com o espectro de RMN de  $^{13}C$  do  $\beta$ -sitosterol (**30**) da Figura 25, observa-se no espectro de RMN  $^{13}C$  de **32** (Figura 34) um aumento no número de sinais na região entre 78,7

e 56,4 ppm relativos aos carbonos da porção glicose, os quais possuem proximidade com grupamentos hidroxilas e por isso são observados nessa região do espectro. Outro sinal que pode ser atribuído é o sinal a 100,7 ppm referente ao carbono anomérico C-1', o qual esta conectado ao carbono C-3 da porção esterol

Figura 33 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**) em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

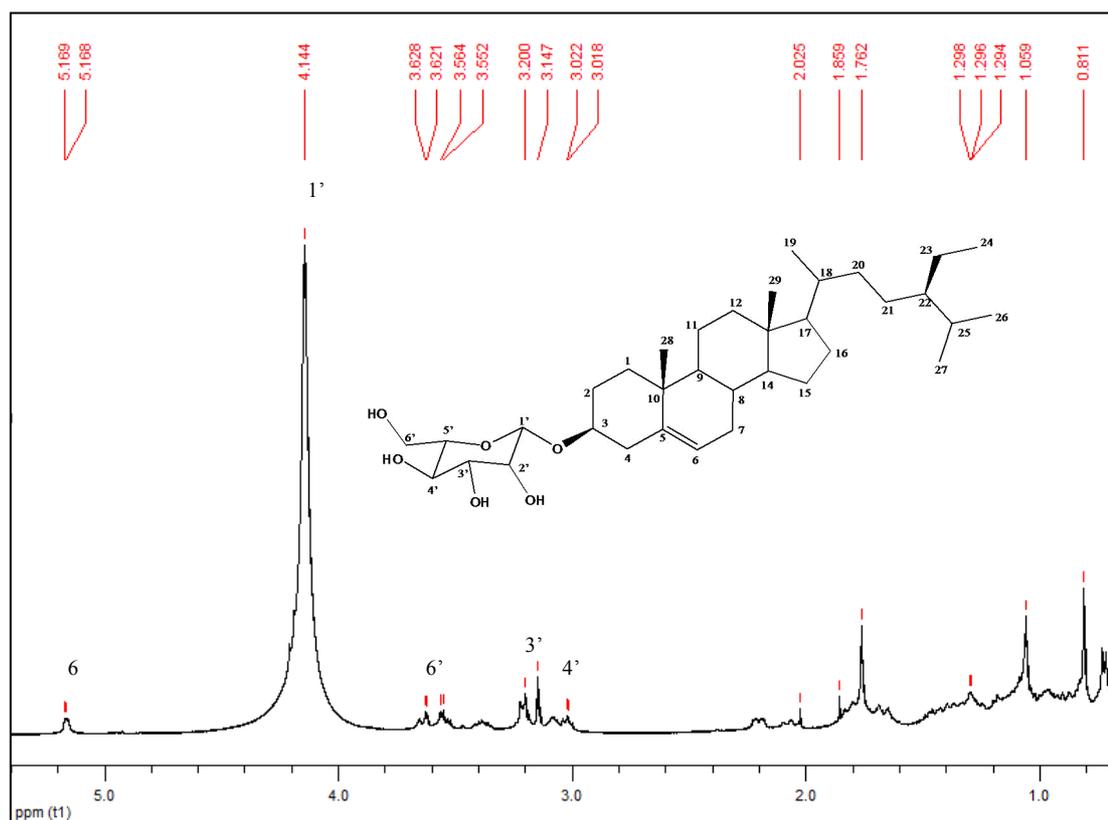
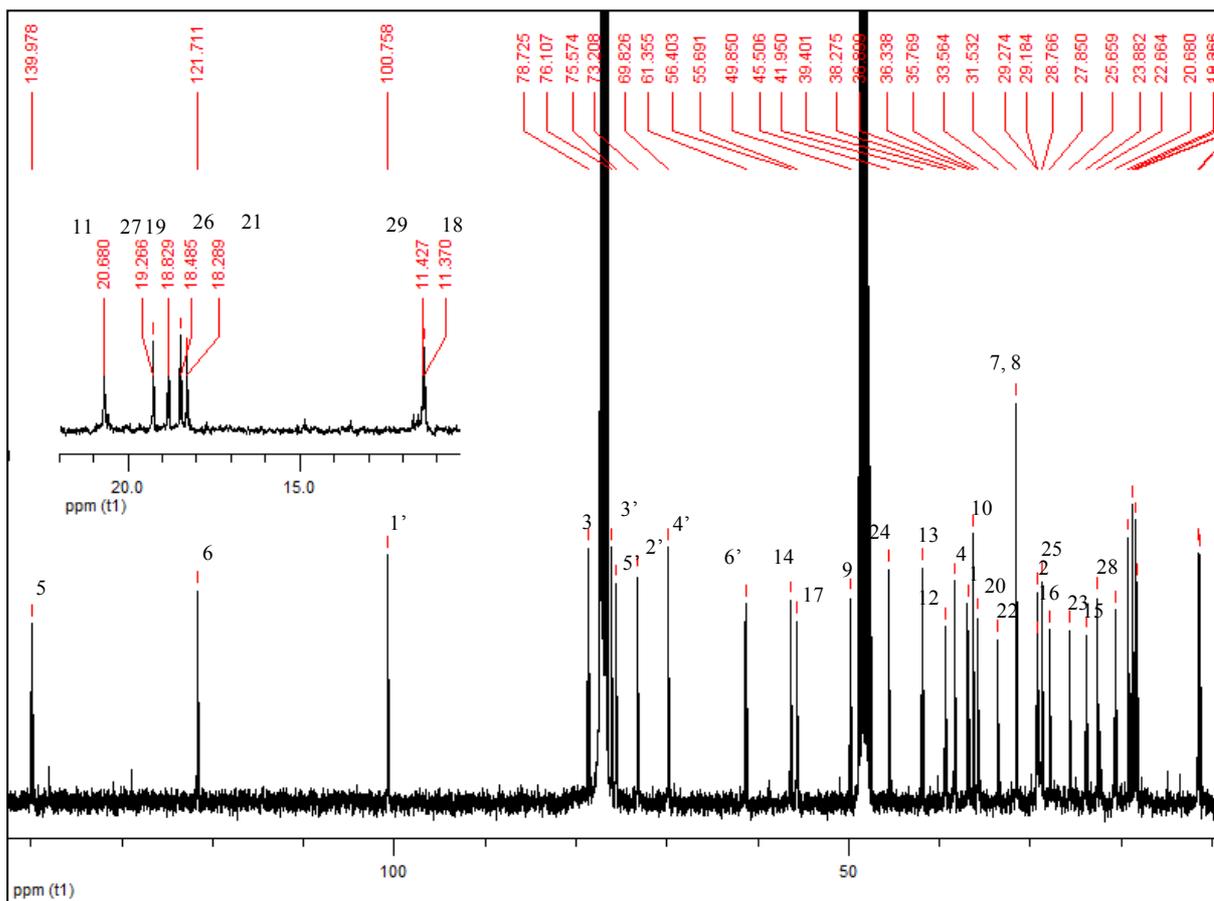


Figura 34 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**32**) em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz



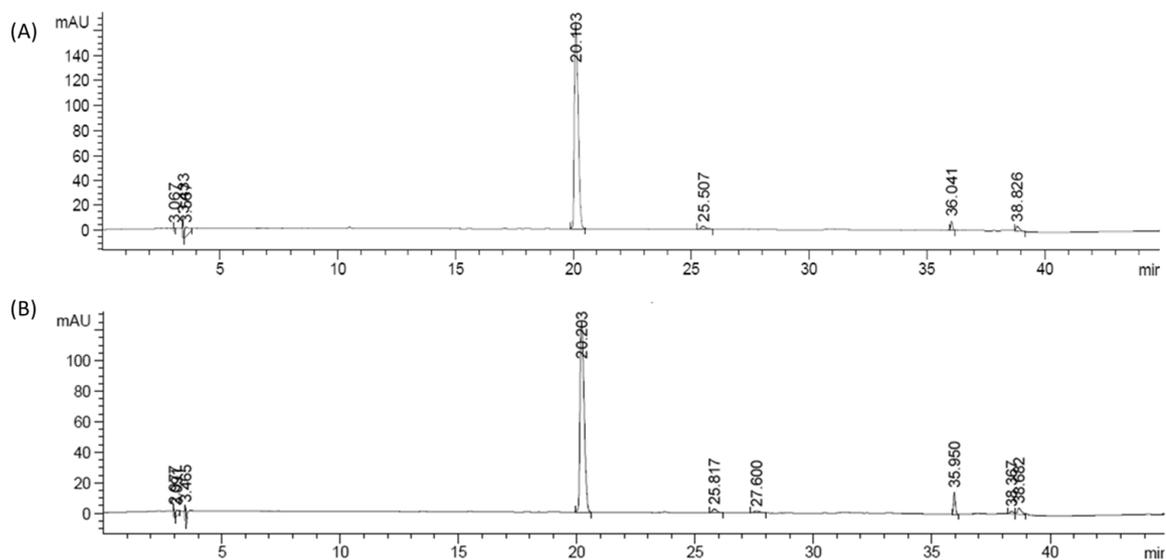
Os esteróis são conhecidos por sua capacidade de reduzir o colesterol no plasma sanguíneo. Considerando-se que os esteróis glicosilados possuem uma parte mais hidrofílica (grupo glicose), esta porção pode ser responsável por criar uma barreira mais eficaz a esterificação do colesterol, resultando no impedimento da entrada de colesterol nos vasos sanguíneos. Em estudo realizado por Ju et al. (2004) os autores observam a capacidade de **30** e **32** como moduladores do crescimento *in vitro* e *in vivo* de células humanas de câncer de mama dependentes de estrogênio, comprovando o efeito benéfico destes fitoesteróis na prevenção do câncer.

## 5.2.2 Metabólito isolado do LEBM+

### 5.2.2.1 Leonurina (1)

O alcaloide leonurina foi isolado a partir do LEBM+, sendo obtido como um sólido amorfo branco, e identificado através de análise comparativa por CLAE com utilização de padrão comercial. Foram empregados gradientes de fase móvel diferentes, a fim de se comprovar a similaridade entre o padrão de leonurina e o composto isolado no presente trabalho. Na Figura 35 encontra-se o cromatograma obtido utilizando-se como fase móvel A: água (0,045% de TFA) e B: acetonitrila (0,036% de TFA). A eluição iniciou com 95% A; após 30 min, 50% e após 10min 100% B, mantendo este solvente por mais 5min. Observa-se que o pico referente a leonurina obtida comercialmente (Figura 35A) e o pico referente ao composto isolado apresentam iguais tempos de retenção (Figura 35B).

Figura 35 - Cromatograma do alcaloide leonurina (1) de origem comercial (A) e isolado de *L. sibiricus* (B)



Nos demais gradientes empregados em CLAE também se observou a coincidência dos tempos de retenção dos picos tanto da amostra comercial como do alcalóide isolado do LEBM+ de *L. sibiricus*, confirmando o isolamento do metabólito. O composto isolado no presente trabalho e o padrão comercial foram também comparados através de espectrometria de massa. Conforme é possível observar nas Figuras 36 e 37 as duas amostras apresentam o

mesmo pico majoritário referente a molécula protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  312,15, novamente confirmando o isolamento do alcalóide leonurina (**1**).

Figura 36 - Espectro de massa de alta resolução (ESI+) do alcaloide leonurina (**1**) obtido comercialmente

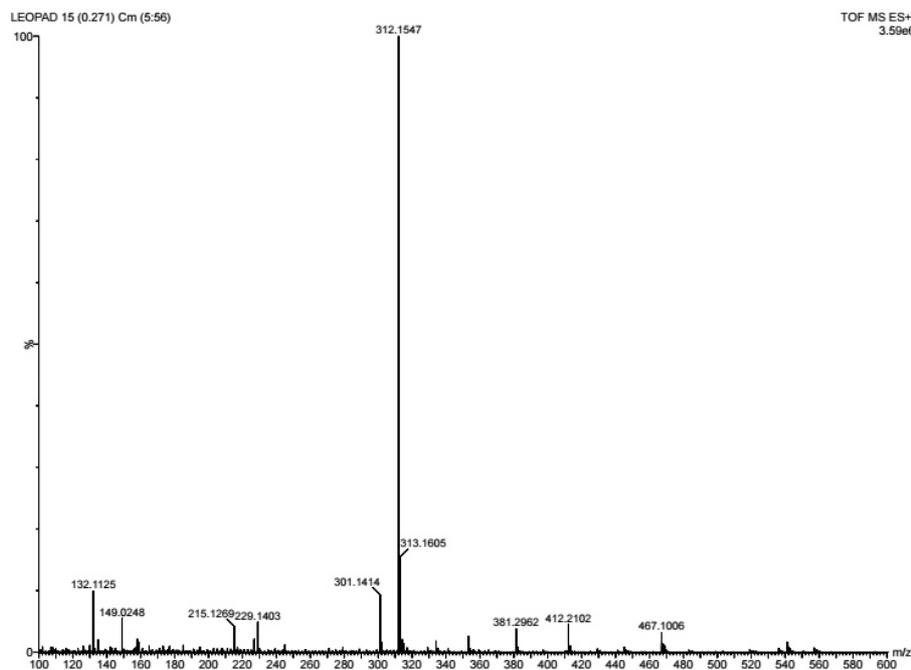
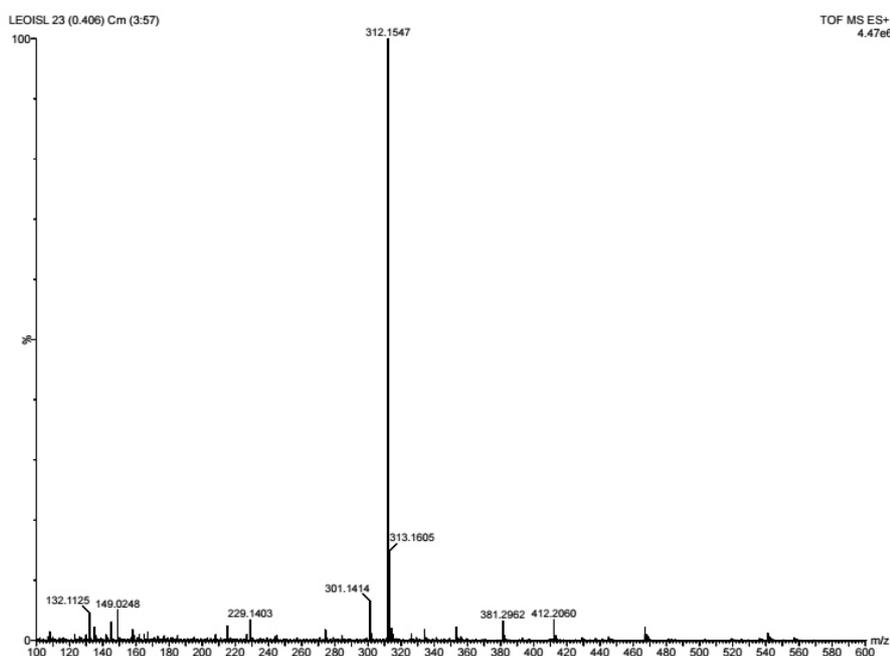


Figura 37 - Espectro de massa de alta resolução (ESI+) do alcaloide leonurina (**1**) obtido isolado de *L. sibiricus*



Quanto ao potencial farmacológico de leonurina, estudos comprovaram sua atividade protetora em doenças uterinas e cardiovasculares (LI et al., 2011; ZHU et al., 2012). Além disso, também já foram obtidos bons resultados quando da utilização deste alcalóide como neuroprotetor, recuperando atividade cerebral de ratos que sofreram acidente vascular cerebral induzido (LIN, 2011). Este alcalóide já foi isolado de algumas espécies do gênero *Leonurus*, incluindo *L. sibiricus*, *L. heterophyllus* e *L. japonicus* (LIN et al, 2007; XANG et al., 2014).

### 5.3 RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

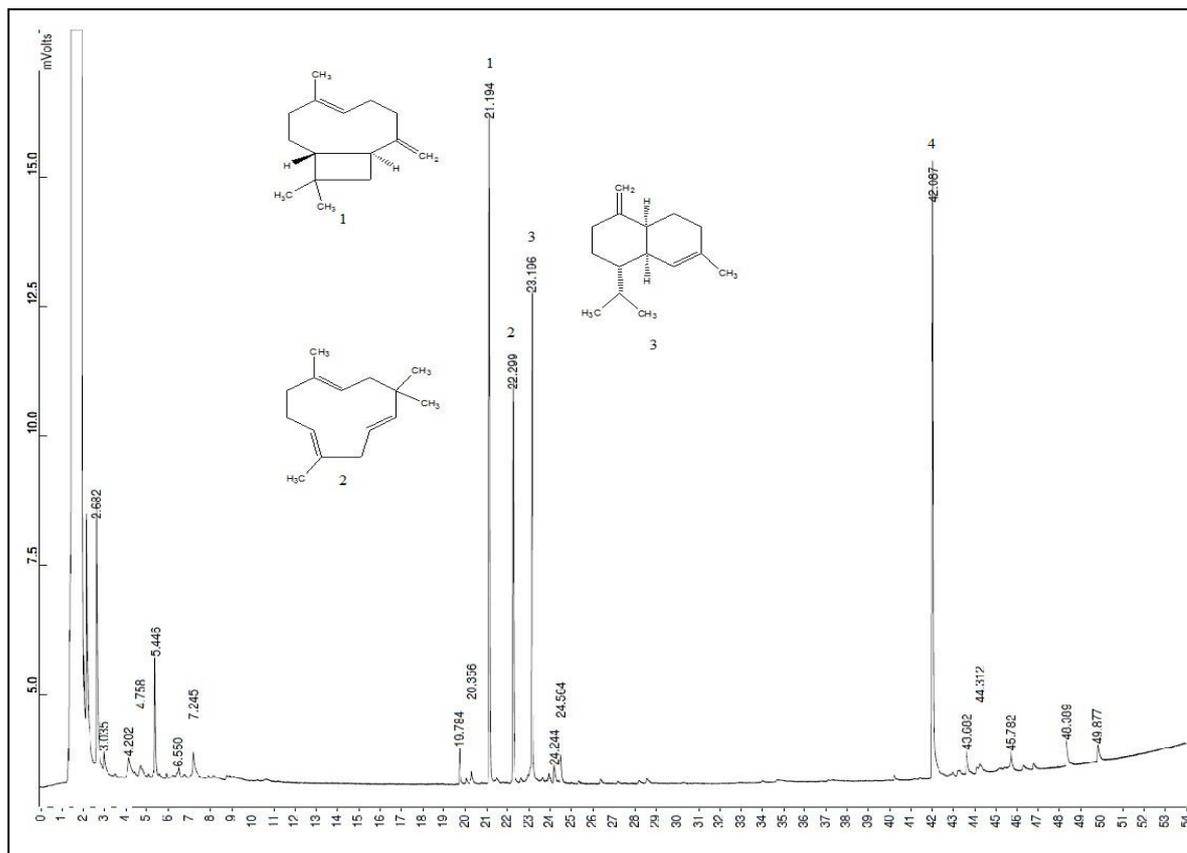
As extrações do óleo essencial das partes aéreas frescas de *L. sibiricus* apresentaram um rendimento de  $29,2 \pm 2,1$  mg (0,008%). Através da determinação da massa seca foi constatado um percentual de umidade no material vegetal de 72%. A composição química do óleo essencial obtido foi determinada através da análise por cromatografia gasosa, posterior cálculo do índice de retenção de Kovats e comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007). Os dados desta análise estão apresentados na Tabela 10 (ADAMS, 2007).

Tabela 10 - Composição do óleo essencial de *Leonurus sibiricus* L.

Pico	Substância	% no óleo	IK calculado	IK literatura
1	trans-cariofileno	31,70	1416	1419
2	$\alpha$ -humuleno	18,53	1450	1455
3	$\gamma$ -muuruleno	19,72	1480	1480
4	N.I.	17,99	2080	-
<b>Total</b>	-	<b>87,94</b>	-	-

Os quatro principais picos presentes no cromatograma representam aproximadamente 90% da composição total do óleo. O perfil cromatográfico do óleo essencial de *L. sibiricus* está representado na Figura 38.

Figura 38 - Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *L. sibiricus*



Não foi possível a identificação através dos dados da literatura do componente relativo ao pico a 42,09 min, sendo, portanto que se fez necessário o isolamento do mesmo através de CC e CCDP, o que resultou na amostra FB-óleo, com 10 mg. Entretanto, uma vez purificado este componente por cromatografia, observou-se que o mesmo não correspondia mais ao pico com  $t_R$  42,09 min, sendo o tempo de retenção do composto isolado de 32,21 min, conforme demonstrado na Figura 39. Acredita-se que possa ter acontecido um processo de degradação do componente inicial.

A amostra FB-óleo foi então encaminhada para análise em CG/EM e buscou-se a sua identificação através de comparação com a literatura; porém, não foi encontrada na literatura uma substância compatível com os dados apresentados pela amostra, conforme demonstrado na Figura 40, além de ser possível observar-se impurezas na amostra que impossibilitaram a análise em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Assim, objetiva-se dar continuidade neste trabalho realizando-se nova extração do óleo essencial, onde se buscará a identificação deste composto.

Figura 39 - Cromatograma da amostra de FB-óleo isolada do óleo essencial

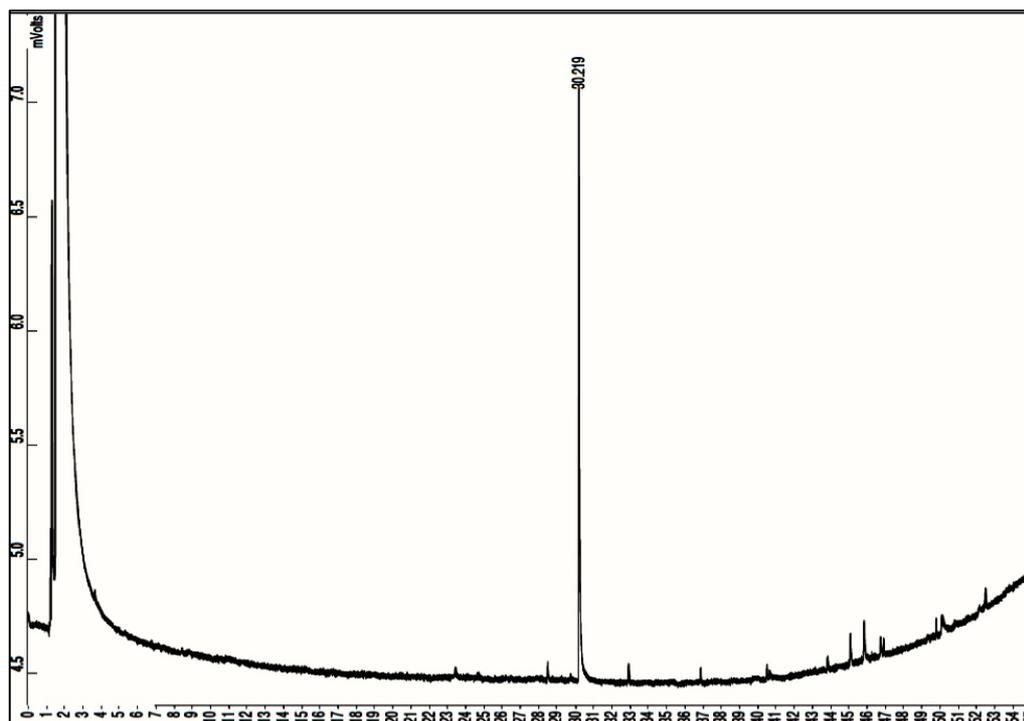
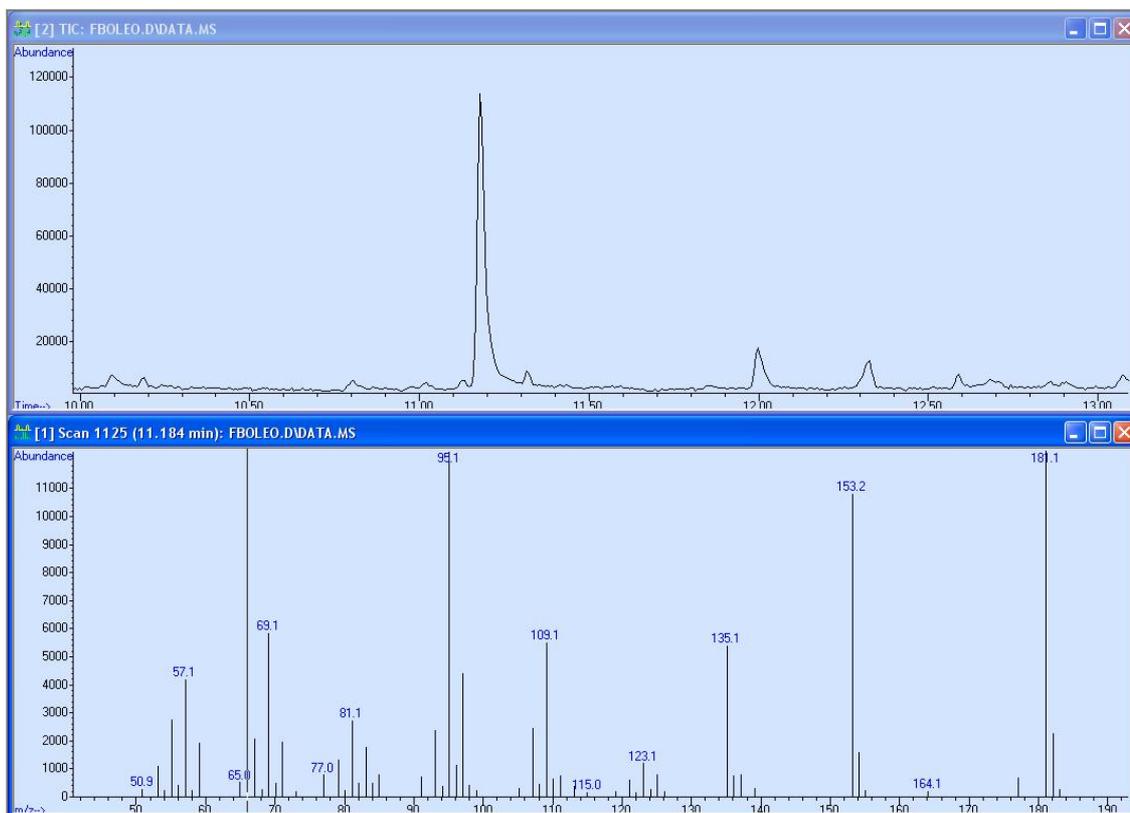


Figura 40 - CG/EM da amostra de FB-óleo isolada do óleo essencial



## 5.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos testes realizados de inibição das enzimas acetilcolinesterase e prolil oligopeptidase, e também os testes antibacteriano e antifúngico.

### 5.4.1 Atividade enzimática

No presente trabalho foram avaliados os potenciais de inibição dos diferentes extratos obtidos e compostos isolados, frente às enzimas AChE e POP. Os resultados apresentados na Tabela 11.

No que se refere ao potencial de inibição da enzima AChE, pode-se observar na Tabela 11 que os extratos de *L. sibiricus* apresentaram percentuais inibitórios na faixa de 5- 38%, sendo os extratos mais ativos frente a esta enzima EB *USI*-MeOH e EB *USI*-MeOH+, com percentuais de inibição a 200 µg/mL de 38 e 35%, respectivamente. Considerando-se que na literatura encontram-se vários trabalhos em que são considerados ativos extratos e frações em concentrações superiores as testadas neste trabalho (na faixa de até 1000 µg/mL) e percentuais de inibição semelhantes aos observados neste trabalho, pode-se afirmar que principalmente os extratos EB *USI*-MeOH e EB *USI*-MeOH+ apresentam considerável atividade de inibição da AChE (MOTA et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2007; ADEWUSI et al., 2010). Como os perfis cromatográficos destes extratos foram similares aos demais, observando-se uma diferença mais quantitativa do que qualitativa dos metabólitos, a quantidade dos metabólitos poderia ser uma explicação para maior atividade observada para EB *USI*-MeOH e EB *USI*-MeOH+ pode ser relacionada a proporção entre os metabólitos que compõe a amostra e um possível efeito sinérgico dos mesmos.

Quanto à inibição da POP, foram observados altos percentuais de inibição por parte dos extratos, estando sete deles acima de 50%. Os maiores percentuais verificados foram de 84, 80 e 91% dos extratos EB *USII*-MeOH+, EB *CHI*-MeOH+ e EB *CHII*-MeOH+, respectivamente. Os extratos EB *q*-MeOH, EB *q*-MeOH+ e EB *MO*-MeOH foram os únicos inativos frente à enzima POP; pode-se atribuir este resultado ao fato de que estes extratos foram obtidos a uma temperatura de extração superior a 40 °C o que, de acordo com a literatura, pode ter provocado a degradação de compostos importantes relacionados à atividade enzimática dos extratos.

Tabela 11 - Atividade inibitória dos extratos de *L. sibiricus* frente às enzimas AChE e POP.

Extrato	% Inibição AChE [200 µg/ mL]	% Inibição POP [200 µg/ mL]
EB <i>f</i> -MeOH	13,19 ± 0,6	58,07 ± 5,4
EB <i>f</i> -MeOH+	8,72 ± 1,9	53,08 ± 5,6
EB <i>q</i> -MeOH	16,80 ± 0,3	N. A.
EB <i>q</i> -MeOH+	7,54 ± 0,8	N. A.
EB <i>USI</i> -MeOH	38,00 ± 3,2	32,23 ± 2,4
EB <i>USI</i> -MeOH+	34,83 ± 2,2	51,28 ± 2,0
EB <i>USII</i> -MeOH	11,81 ± 2,3	48,44 ± 0,5
EB <i>USII</i> -MeOH+	5,05 ± 0,1	84,45 ± 1,0
EB <i>CHI</i> -MeOH	11,83 ± 0,8	41,43 ± 2,2
EB <i>CHI</i> -MeOH+	9,16 ± 0,6	80,45 ± 0,5
EB <i>CHII</i> -MeOH	12,58 ± 0,3	68,42 ± 0,2
EB <i>CHII</i> -MeOH+	13,02 ± 0,1	91,42 ± 0,7
EB <i>MO</i> -MeOH	15,18 ± 0,1	N. A.
EB <i>MO</i> -MeOH+	10,97 ± 0,3	18,06 ± 0,7
Óleo essencial	14,42 ± 0,01	N. A.
Leojaponina ( <b>29</b> ) <sup>b</sup>	16,87 ± 4,1	71,84 ± 9,8
β-Sitosterol ( <b>30</b> ) <sup>b</sup>	17,72 ± 1,8	N. A.
β-Sitosterol glicosilado ( <b>32</b> ) <sup>b</sup>	10,25 ± 1,8	42,15 ± 5,3
Leonurina ( <b>1</b> ) <sup>b</sup>	N. T.	28,65 ± 0,7
Eserina (12 µM) <sup>c</sup>	74,9 ± 0,8	N.T.
Ác. Clorogênico (80 µM) <sup>c</sup>	N.T.	87,90 ± 1,4

<sup>a</sup> N.T.: não testada; N.A.: não ativa, <sup>b</sup> compostos testados a 150 µM, <sup>c</sup> controles positivos utilizados nos ensaios.

Quanto aos compostos isolados, todos apresentaram inibição da AChE inferior a 20%, demonstrando baixo potencial de inibição uma vez que se trata de substâncias puras. Frente à enzima POP, entretanto, foram observados percentuais de inibição mais elevados, como no caso da Leojaponina (**29**), com uma inibição de aproximadamente 72%; os demais compostos isolados de *L. sibiricus* apresentaram inibições entre 42 e 28%, sendo que o  $\beta$ -Sitosterol (**30**) e a amostra de óleo essencial se mostraram não ativos, o que pode ser atribuído a sua baixa solubilidade em DMSO e tampão fosfato, solventes utilizados nos ensaios.

Não há na literatura registros de estudos com *L. sibiricus* frente a estas enzimas, nem mesmo das substâncias isoladas no presente trabalho. Além de serem resultados inéditos, os percentuais de inibição como os apresentados por **29** remetem a possibilidade de modificações estruturais deste metabólito, buscando o incremento da atividade enzimática e assim uma nova perspectiva de continuidade para o trabalho.

#### **5.4.2 Atividade antimicrobiana**

No presente trabalho, foram avaliadas as atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos obtidos através de diferentes métodos de extração, bem como do óleo essencial das partes aéreas de *L. sibiricus*, as frações obtidas no processo de fracionamento do LEBM e os compostos isolados. As amostras foram testadas através do método de microdiluição em caldo, descrito na parte experimental, frente a 18 cepas de microorganismos oportunistas.

Os resultados da atividade antibacteriana, testada frente a 11 cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas estão apresentados na Tabela 12, descritos como a CIM e a CLM.

Tabela 12 - CIM e CLM frente a cepas de bactérias, em µg/mL

Amostra/Cepa	<i>Sa</i>	<i>Bs</i>	<i>Bc</i>	<i>Et</i>	<i>Ea</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Bk</i>	<i>Ss</i>	<i>St</i>	<i>Mm</i>
EB <i>f</i> -MeOH	125/>500	62,5/>500	62,5/>500	62,5/>500	62,5/>500	62,5/>500	15,6/>500	62,5/>500	31,/>500	125/>500	62,5/>500
EB <i>f</i> -MeOH+	125/>500	250/>500	125/>500	125/>500	125/>500	62,5/>500	15,6/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	31,2/>500
EB <i>q</i> -MeOH	125/>500	125/>500	62,5/>500	31,2/>500	62,5/>500	125/>500	15,6/>500	62,5/>500	62,5/>500	125/>500	31,2/>500
EB <i>q</i> -MeOH+	125/>500	250/>500	125/>500	125/>500	125/>500	125/>500	<3,9/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500
EB <i>USI</i> -MeOH	125/>500	<3,9/>500	62,5/>500	62,5/>500	3,9/>500	62,5/>500	15,6/>500	62,5/>500	31,2/>500	62,5/>500	62,5/>500
EB <i>USI</i> -MeOH+	15,6/>500	<3,9/>500	62,5/>500	62,5/>500	7,8/>500	31,2/>500	15,6/>500	62,5/>500	31,2/>500	62,5/>500	62,5/>500
EB <i>USII</i> -MeOH	15,6/>500	125/>500	125/>500	62,5/>500	31,2/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	31,2/>500
EB <i>USII</i> -MeOH+	125/>500	125/>500	125/>500	62,5/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500
EB <i>CHI</i> -MeOH	125/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	15,6/>500	125/>500	62,5/>500	62,5/>500
EB <i>CHI</i> -MeOH+	125/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	15,6/>500	125/>500	62,5/>500	62,5/>500
EB <i>CHII</i> -MeOH	125/500	<3,9/>500	62,5/>500	62,5/>500	3,9/>500	62,5/>500	15,6/>500	62,5/>500	31,2/>500	62,5/>500	62,5/>500
EB <i>CHII</i> -MeOH+	125/500	250/>500	125/>500	125/>500	125/>500	125/>500	<3,9/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500
EB <i>MO</i> -MeOH	125/500	250/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	<3,9/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500
EB <i>MO</i> -MeOH+	125/500	250/>500	125/>500	125/>500	125/>500	125/>500	<3,9/>500	125/>500	62,5/>500	125/>500	62,5/>500
Óleo essencial	N.T.	15,6/>500	N.T.	62,5/>500	N.T.	N.T.	31,2/>500	31,2/>500	62,5/>500	125/>500	N.T.
Leojaponina (28)	N.T.	100/>200	N.T.	50/>200	N.T.	N.T.	25/>200	50/>200	25/>200	50/>200	N.T.
β-sitosterol (30)	N.T.	100/200	N.T.	100/>200	N.T.	N.T.	100/200	100/>200	100/>200	200/>200	N.T.
β-sitosterol glicosilado (32)	N.T.	50/>200	N.T.	25/>200	N.T.	N.T.	50/>200	50/>200	25/>200	50/>200	N.T.
Cloranfenicol	1,56/25	<1,56/12,5	1,56/12,5	<1,56/>200	1,56/12,5	<1,56/200	6,25/200	3,12/100	1,56/6,2	<1,56/200	1,56/12,5
Ampicilina	<1,56/>200	<1,56/>200	25/200	<1,56/>200	25/200	<1,56/200	6,25/200	50/100	6,25/200	<1,56/50	12,5/200

*Sa*-*Staphylococcus aureus*; *Bs*-*Bacillus subtilis*; *Bc*-*Bacillus cereus*; *Et*-*Enterococcus sp.*; *Ea*-*Enterobacter aerogenes*; *Ec*-*Escherichia coli*; *Pa*-*Pseudomonas aeruginosa*; *Bk*-*Burkholderia cepacia*; *Ss*-*Shigella sonnei*; *St*-*Salmonella typhimurium*; *Mm*- *Morganella morganii*. . N.T.: não testado

De acordo com os dados da Tabela 12, pode-se observar que os melhores resultados de CIM obtidos frente aos micro-organismos Gram-positivos foram para as cepas de *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes*; frente às cepas de *B. cereus*, os extratos EB *USI*-MeOH, EB *USI*-MeOH+ e EB *CHII*-MeOH apresentaram CIM inferior à última concentração testada, de 3,9 µg/mL; frente à *E. aerogenes*, observou-se que todas as amostras apresentaram CIM igual ou inferior a 125 µg/mL, sendo que os extratos EB *USI*-MeOH e EB *CHII*-MeOH apresentaram concentração de 3,9 µg/mL como CIM. Entre os micro-organismos Gram-negativos, os melhores resultados observados foram para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella sonnei*, sendo que frente à cepa de *P. aeruginosa* os extratos EB *q*-MeOH+, EB *CHII*-MeOH+, EB *MO*-MeOH e EB *MO*-MeOH+ apresentaram valor de CIM <3,9 µg/mL.

Pode-se concluir com este ensaio que os micro-organismos Gram-positivos são mais sensíveis aos extratos neutros, enquanto que os Gram-negativos apresentam maior sensibilidade aos extratos metanólicos ácidos e com exceção do EB *CHII*-MeOH+, aos extratos preparados a uma temperatura mais elevada.

Quanto aos metabólitos isolados de *L. sibiricus*, os melhores resultados foram apresentados pela leojaponina (**28**) e o β-sitosterol glicosilado (**32**), com CIM de 25 µg/mL, frente às cepas de *P. aeruginosa* e *Shigella sonnei*.

É importante salientar que há na literatura apenas um registro da atividade antibacteriana de *L. sibiricus*, sendo que os autores observaram, através do método de difusão em ágar, um maior potencial antibacteriano desta planta frente às cepas de *Escherichia coli* e *Streptococcus pyogenes* (AHMED et al., 2006). Não há nenhum relato a respeito da atividade antifúngica de *L. sibiricus*.

Tabela 13 - CIM e CLM frente a cepas de fungos, em µg/mL

Amostra/Cepa	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Ck</i>	<i>Cp</i>	<i>Ct</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
EB <i>f</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	250/>500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>f</i> -MeOH+	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	250/>500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>q</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/500	250/500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>q</i> -MeOH+	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	250/>500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>USI</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/500	125/500	125/500
EB <i>USI</i> -MeOH+	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>USII</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/>500	125/500	62,5/>500
EB <i>USII</i> -MeOH+	62,5/500	125/>500	62,5/250	500/500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>CHI</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/>500	125/500	62,5/>500
EB <i>CHI</i> -MeOH+	62,5/500	125/>500	62,5/250	500/500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>CHII</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/500	31,2/500	62,5/500
EB <i>CHII</i> -MeOH+	62,5/>500	125/>500	62,5/250	250/500	125/500	125/>500	125/>500
EB <i>MO</i> -MeOH	62,5/>500	125/>500	62,5/500	250/500	125/500	125/500	62,5/500
EB <i>MO</i> -MeOH+	62,5/>500	125/>500	62,5/>500	>500/>500	125/>500	125/>500	62,5/>500
Óleo essencial	62,5/>500	125/>500	>500/>500	>500/>500	>500/>500	>500/>500	>500/>500
Leojaponina (28)	N. T.	25/>200	25/>200	50/>200	50/>200	N. T.	25/>200
β-sitosterol (30)	25/>200	25/>200	12,5/100	50/>200	50/200	50/200	50/>200
β-sitosterol glicosilado (32)	N. T.	25/>200	25/>200	50/>200	50/>200	N. T.	25/>200
Nistatina	1,56/>200	<1,56/>200	<1,56/6,25	6,25/12,5	<1,56/1,56	<1,56/25	<1,56/1,56
Fluconazol	<1,56/>200	<1,56/>200	6,25/100	1,56/3,12	1,56/200	3,12/100	6,5/100

*Cg*-*Cryptococcus gatti*; *Cn*-*Cryptococcus neoformans*; *Ck*-*Candida krusei*; *Cp*-*Candida parapslosis*; *Ct*-*Candida tropicalis*; *Ca*-*Candida albicans*; *Sc*-*Sacharomyces cerevisae*

Os resultados observados na Tabela 13, referentes à atividade antifúngica, as amostras demonstram um maior potencial de inibição frente às cepas de *Cryptococcus gatti*, *Candida krusei* e *Sacharomyces cerevisiae*; frente as cepas de *C. neoformans*, *C. tropicalis*, *C. albicans* a atividade antifúngica observada pode ser considerada moderada, enquanto que para *C. parapslosis* a atividade antifúngica demonstrada pelos extratos de *L. sibiricus* foi baixa.

Quanto aos metabólitos isolados de *L. sibiricus*, os mesmos não apresentaram atividade antifúngica elevada, sendo o melhor resultado obtido para o **30**, frente a cepa de *C. krusei*, com CIM igual a 12,5 µg/mL. Assim como no ensaio de atividade antibacteriana, as amostras não demonstraram atividade fungicida, apenas fúgiostática, ou seja, não foram letais as cepas testadas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho, pode-se concluir:

- *Leonurus sibiricus* L. possui uma interessante variedade de compostos químicos, sendo que os metabólitos secundários isolados neste estudo são inéditos nesta espécie, com excessão do alcaloide leonurina;
- Quanto aos ensaios de atividade antimicrobiana, pode-se considerar que os extratos de *L. sibiricus* demonstraram moderado potencial antimicrobiano; as amostras testadas não possuem atividade bactericida e fungicida, apresentando apenas atividade bacteriostática.
- Os resultados de inibição enzimática demonstraram um maior potencial inibitório das amostras de *L. sibiricus* frente à enzima POP, onde extratos chegaram a inibir 91% da atividade da enzima; no entanto, demonstraram moderado potencial de inibição frente a enzima AChE, sendo que o maior percentual observado dentre todas as amostras testadas foi de 38%, com o extrato EB *USI*-MeOH.
- Não há na literatura qualquer relato a respeito da atividade enzimática de *L. sibiricus* frente às enzimas POP e AChE, bem como da atividade antifúngica, o que torna os resultados obtidos neste estudo bastante relevantes;
- Entre os compostos isolados o que apresentou maior potencial farmacológico, demonstrando elevada capacidade inibitória frente a POP (72%) foi a leojaponina, diterpeno do tipo labdano que ainda não havia sido isolada de *L. sibiricus*; considerando a quantidade razoável deste metabólito isolada de *L. sibiricus*, podem ser estudadas, na continuidade deste trabalho, modificações estruturais desta substância, a fim de incrementar sua atividade biológica;
- Com relação aos testes comparativos dos diferentes métodos de extração empregados, pode-se concluir que considerando o isolamento de metabólitos o principal objetivo do trabalho, o melhor método de extração permanece sendo a maceração, visto que uma maior quantidade de material vegetal pode ser

empregada e o rendimento do extrato se mostrou satisfatório quando comparado aos métodos de extração a quente, assistida por ultrassom e por micro-ondas.

A fim de se obter resultados mais satisfatórios no que se refere ao estudo de comparação dos diferentes métodos de extração utilizados, ainda está em fase de análise a identificação dos principais componentes presentes nos mesmos, a fim de se comparar a composição química, objetivando encontrar as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas observadas.

Levando em consideração o fato de que são encontrados na literatura dados que sugerem efeitos narcóticos, psicoativos e de “cannabis like” para *L. sibiricus* demonstra-se ainda mais a importância de se identificar seus metabólitos secundários, bem como suas atividades biológicas, tendo em vista que se trata de uma planta utilizada na medicina popular.

## REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. et al. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, Vol. 29, p. 1007-1021, 2012.

ADAMS, R. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4 ed. 2007.

ADEWUSI, E. A. et al. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: A Review. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9 (49), p. 8257-8276, 2010.

AHMED, F.; et al. Antibacterial activity of *Leonurus sibiricus* aerial parts. **Fitoterapia**, Vol. 77, p. 316-317, 2006.

AHMED, F.; TSLAM, M.A.; CHOUDHURI, M.S.K.; Central nervous system depressant activity of *Leonurus sibiricus*. **Niger Journal of Natural Products and Medicine**, Vol. 9, p. 35-37, 2005.

ALMEIDA, L. F. R.; et al. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. – Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Vol. 8 (1), p.35-38, 2005.

ALUPULUI, et al. Ultrasonic vs. Microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. **AIDIC Conference Series**, Vol. 9, p. 1-7, 2009.

AMADE, P.; et al. Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium Olsonii* bainier and sartory. **The Journal Of Antibiotics**, Vol 47 (2), p. 201-207, 1993.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, Vol. 117, p. 426-436, 2013.

DESGROUAS, C. et al. Rapid and green extraction, assisted by microwave and ultrasound of cepharanthine from *Stephania rotunda* Lour. **Separation and Purification Technology**, Vol. 123, p. 9-14, 2014.

EYONG, K. O. et al. Newbouldiaquinone A: A naphthoquinone–anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*. **Phytochemistry**, (67), p. 605-609, 2006.

EISSA, T. A. F. et al. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 51, p. 317-332, 2014.

ELLMAN, G. L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 7, p. 88-95, 1961.

Encyclopædia Britannica. **Britannica Academic**, 2016. Disponível em: <<http://academic-eb-britannica.ez47.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/328710/Lamiaceae>>. Acesso em 12 Jan. 2016.

ESTAHBANATI, H. K.; KASHANI, P. P.; GHANAATPISHEH, F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. **Burns**, Vol. 28, 340-348, 2002.

Food and Drugs Administration (FDA): Code of Federal Regulations, Cap. 21, 300, 1991.

FREITAS, A. Filogenia da Sensibilidade da Acetilcolinesterase Cerebral de Peixe ao Metilparaoxon como um Possível Marcador Ambiental. Dissertação de mestrado. FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

FUCHINO, H. et al. Two New Labdane Diterpenes from Fresh Leaves of *Leonurus japonicus* and Their Degradation during Drying. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 61(5), p. 497-503, 2013.

GARCÍA-HOSMAN, J. A. et al. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. **Neuropeptides**, Vol. 41, p. 1–24, 2007.

GOMES, N. G. M. et al. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Vol. 33, p. 1372-1389, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 12ª edição. Ed. McGraw Hill, 2012.

GRAU-CAMPISTANY, A; RABANAL, F; PUJOL, M; CAJAL, Y. Membrane Interaction of polymixin B and synthetic analogues studied in biometric systems: Implications for antibacterial action. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III**, IBSN: 978-81-7895-605-3, p. 61-75, 2013.

HAMMER, K. A.; et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 86, p. 985-990, 1999.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia** Vol. 63(1), p. 129-144, 2012.

HELLINGER, R. et al. Inhibition of Human Prolyl Oligopeptidase Activity by the Cyclotide Pysol 2 Isolated from *Psychotria solitudinum*. **Journal of Natural Products**, Vol. 78, p. 1073-1082, 2015.

HUNG, T. M.; et al. Labdane-type Diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. **Phytotherapy Research**, Vol. 25, p- 611–614, 2011.

ISLAM, M. A.; et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Leonurus sibiricus*. **Fitoterapia**, Vol. 76, p. 359-362, 2005.

JADHAV, D. et al. Extraction of vanillin from vanilla ponds: a comparison study of

conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of food engineering*, Vol. 93, p. 421-426, 2009.

JAIN, T. et al. Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*, Vol. 2 (1), p. 19-25, 2009.

JALKANEN, A. The Potential of Prolyl Oligopeptidase as a Drug Target. Dissertation in Health Sciences - University of Eastern Finland, Kuopio, 2012.

JAWORWK, K.; CZAPLICKA, M. Determination of Phthalates in Polymer Materials – Comparison of GC/MS and GC/ECD Methods. *Polímeros*, Vol 23 (6), p. 718-724, 2013.

JU, Y. H. et al.  $\beta$ -Sitosterol,  $\beta$ -Sitosterol Glucoside, and a Mixture of  $\beta$ -Sitosterol and  $\beta$ -Sitosterol Glucoside Modulate the Growth of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells In Vitro and in Ovariectomized Athymic Mice. *The Journal of Nutrition*, Vol. 134, p. 1145-1151, 2004.

JUNG, H. J. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Archives of Pharmacal Research*. Vol. 29 (9), p. 746-751, 2006.

JUNIOR, V. C. P. et al. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. 39(2), p. 230-232, 2006.

KAUFMANN, B; CHRISTEN, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, Vol. 13, p. 105-113, 2002.

KHAN, D.; et al. New Cholinesterase Inhibitory Constituents from *Lonicera quinquelocularis*. *Plos One*, Vol. 9 (4), p. 1-7, 2014.

KHANAM, M; HASSAN, M. A. *Flora of Bangladesh*, Vol. 58, p. 43-45, 2008.

KHATUN, M.; et al. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka University Journal of Science*, Vol 60(1), p. 5-10, 2012.

KOTLHOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 77 (8), p. 651-666, 1999.

KOWERT, B. A.; et al. Diffusion of Squalene in n- Alkanes and Squalane. *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 118, p. 2157-2163, 2014.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 109, p. 372-379, 2007.

LAWANDI, J. et al. Inhibitors of Prolyl Oligopeptidases for the Therapy of Human Diseases: Defining Diseases and Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 53, p. 3423–3438, 2010.

LEE, K. Y.; et al. New Acetylcholinesterase-Inhibitory Pregnane Glycosides of *Cynanchum atratum* roots. **Helvetica Chimica Acta**, Vol. 86, p. 474-483, 2003.

LEE, M. J.; et al. *Leonurus sibiricus* herb extract suppress oxidative stress and ameliorates hypercholesterolemia in C57BL/6 mice and TNF- $\alpha$  induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human umbilical vein endothelial cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry Journal**, Vol. 74 (2), p. 279-284, 2010.

LI, J. W. H.; et al. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, Vol. 325, p. 161-165, 2009.

LI, X.; et al. Effects of leonurine hydrochloride on medically induced incomplete abortion in early pregnancy rats. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Vol. 159, p. 375-380, 2011.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, Vol. 3 (3), p. 14-24, 2007.

LIN, H-C.; et al. Antiplatelet Effect of Leonurine from *Leonurus sibiricus*. **Taiwan Pharmaceutical Journal**, Vol. 59, p. 149-152, 2007.

LIN, H.C. The Neuroprotective Effect of Leonurine and the Underlying Mechanism in Experimental Ischemic Stroke. **Dissertação de mestrado**. Hebei Medical University, 2011.

LÓPEZ, A. et al. Peptide POP inhibitors for the treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. **Future Medicinal Chemistry**, Vol. 5 (13), p. 1509-1523, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas, Ed. Inst Plantarum Ltda, 2002.

MACKENZIE, S. E.; et al. Isolation of sterols from the marine fungus *Corollospora lacera*. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 50 (12), p. 1069-1072, 2004.

MAES, M.; et al. Alteration in Plasma Prolyl Endopeptidase Activity in Depression, Mania, and Schizophrenia: Effects of Antidepressants, Mood Stabilizers and Antipsychotic Drugs. **Psychiatry Research**, Vol. 58, p. 217-225, 1995.

MANDAL, S. M. et al. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, Vol. 69, p. 568-569, 2007.

MARQUES, M. R. et al. Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. **Fitoterapia**, Vol. 81, p. 552-556, 2010.

MUKHERJEE, P. K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine** Vol. 14, p. 289-300, 2007.

MITRAGOTRI, S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. **Nature**, Vol. 4, p. 255-260, 2005.

MOON, H. T; et al. Bis-spirolabdane Type Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Journal of Natural Products**, Vol. 73, p. 123-126, 2010.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Vol. 14 (4), p.624-628, 2012.

MURRAY, A. P. et al. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. **Current Neuropharmacology**, Vol. 11, p. 388-413, 2013.

NARUKAWA, Y; et al. New diterpenoids with strogen sulfotransferase inhibitory activity from *Leonurus sibiricus* L. **Journal of Natural Medicine**, Vol. 68, p. 125-131, 2014.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NSUALA, B.N.; ENSLIN, G.; VILJOEN, A. "Wild cannabis": A review of the traditional use and phytochemistry of *Leonotis leonurus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 174, p. 520-539, 2015.

OLIVEIRA, A. A. et al. Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. **SpringerPlus**, Vol. 371 (2), p. 1-6, 2013.

OLIVEIRA, A. P.; et al. Estudo Fitoquímico, Atividade Antimicrobiana e Citotóxica de Espécimes de *Leonotis nepetifolia* L. R. (Br). **Química Nova**, Vol. XY (00), p. 1-6, 2015.

OLIVEIRA, M. H; et al. Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista eletrônica de Farmácia**, Vol. IX (1), p. 62-88, 2012.

ORHAN, I. E.; et al.; Enzyme inhibitory and antioxidante activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, Vol. 37, p. 213-218, 2012.

ORHAN, I. E.; et al. Profiling in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. **Food Chemistry**, Vol. 132, p. 1360-1367, 2012.

PAN, S-M.; et al. Phenols from the Aerial Parts of *Leonurus sibiricus*. **The Chinese Pharmaceutical Journal**, Vol. 58, p. 35-40, 2006.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, Vol. 71, p. 981-990, 2006.

PETRONILHO, E. C; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra química. **Revista Militar de Ciências e Tecnologia**, Vol. 27, p. 3-14, 2011.

POLGÁR, L. The prolyl oligopeptidase Family. **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**, Vol. 59, p. 349-362, 2002.

POGLIANI, et al. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene

derivatives. **Chemistry and Physics of Lipids**, Vol. 70, p. 21-34, 1994.

RADULOVIĆ, N. S.; BLAGOJEVIĆ, P. D. The Most Frequently Encountered Volatile Contaminants of Essential Oils and Plant Extracts Introduced During the Isolation Procedure: Fast and Easy Profiling, **Phytochemical Analysis**, Vol. 23 (2), p. 131–142, 2012.

RAGASA, C. Y.; et al. Sterols and Triterpenes From the Fruit of *Annona muricata* Linn. **Similliman Journal**, Vol. 54 (1), p. 106-112, 2013.

RHEE, I.K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, Vol. 915, p.217-23, 2001.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 100, p. 80–84, 2005.

ROMERO-GONZÁLEZ, R. R.; et al. Labdane diterpenes from *Leonurus Japonicus* leaves. **Phytochemistry**, Vol. 67, p. 965-970, 2006.

ROSEMBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, Vol. 7, p. 496–504, 2003.

RUNGSIMAKAN, S.; ROWAN, M. G. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. var. Blue Jeans. **Phytochemistry**, Vol. 108, p. 177–188, 2014.

SAHA, M. R.; et al. *In Vitro* Cytotoxic and Anthelmintic Activities of Leaf and Root Extracts of *Leonurus sibiricus* L. **Journal of scientific research**, Vol. 4 (3), p. 721-727, 2012.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Report**, Vol. 27, p. 238-254, 2010.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, Vol. 25 (4), p. 660-667, 2002.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Vol. 43 (6), p. 413-423, 2007.

SATO, Y. et al. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 72, p. 483-488, 2000.

SATOH, M; et al. Studies on the Constituents of *Leonurus sibiricus* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 51 (3), p. 341-342, 2003.

SAVONA, G. et al. Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Phytochemistry**, Vol. 21 (11), p. 2699-2701, 1982.

SCHMIDT, S. et al. Extracts from *Leonurus sibiricus* L. increase insulin secretion and proliferation of rat INS-1E insulinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 150, p. 85-94, 2013.

SHAHLA, S.; et al. Comparative Fluorescent Banding in Two Forms of *Leonurus sibiricus* L. **Cytologia**, Vol. 76 (3), p. 361-366, 2006.

SHIN, H-Y. et al. Anti-inflammatory activity of Motherwort (*Leonurus sibiricus* L.). **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, Vol. 31(2), p. 209-213, 2009.

SHIRSATH, S.R.; SONAWANEA, S.H.; GOGATEB, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**. Vol. 53, p. 10-23, 2012.

SILVA, I.; MOURA, R. Lamiaceae and Asteraceae Species Used in Southeast Brazil by Folk Medicine for Respiratory Diseases: What do the Scientific Evidences Say. **Revista Fitos**, Vol. 6 (01), p. 21-28, 2011.

SINGH, D. N. et al. Antifungal anthraquinones from *Saprosma fragrans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. (16), p. 4512-4514, 2006.

SONG, H-S.; RASKIN, I. A Prolyl Endopeptidase-Inhibiting Benzofuran Dimer from *Polyozellus multiflex*. **Journal of Natural Products**, Vol. 65, p 76-78, 2002.

TARRAGÓ, T. et al. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 16 p. 7516–7524, 2008.

TARRAGÓ, T. et al. The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. **ChemMedChem** , Vol. 2, p. 354-359, 2007.

TATKE, P.; JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. **Research Journal of Medicinal Plant**, Vol. 5 (1), p. 21-31, 2011.

THOUVENEL, C. et al. Antifungal Compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Phytotherapy Research**, Vol. 17, p. 678-680, 2003.

TOIDE, K. et al. JTP-4819: a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor with Potential as a Cognitive Enhancer. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. Vol. 274, p. 1370-1378, 1995.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonic Sonochemistry**, Vol. 8, p. 137-142, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10<sup>a</sup> edição. Ed. Artmed, 2012.

TRIPATHI, A.; SRIVASTAVA, U.C. Acetylcholinesterase : A Versatile Enzyme Of Nervous System. **Annals of Neurosciences**, Vol. 15 (4), p. 1-12, 2008.

VENKATA, S. P. C.; PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, Vol. 1 (9), p. 239-242, 2012.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Vol. 29 (2), p. 326-377, 2006.

VIEGAS, C. R.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, Vol. 27 (4), p. 655-660, 2004.

VINATORU, M. et al. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. **Ultrasonic Sonochemistry**, Vol. 4, p. 135-139, 1997.

VIVANCOS, M.; MORENO, J. J.  $\beta$ -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 39, p. 91-97, 2005.

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em: 05 Mai 2015.

WHO. **Bulletin of the World Health Organization**. Vol. 93 (4), p. 209-284, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/volumes/93/4/en/>>. Acesso em: 05 Mai 2015.

WOJTYNIAK, K.; et al. *Leonurus cardiaca* L. (Motherwort): A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Phytotherapy Research**, Vol. 27, p. 1115-1120, 2013.

WU, H.; et al. Isoleojaponin, a New Halimane Diterpene Isolated from *Leonurus japonicas*. **Melecules**, Vol. 20, p 839-845, 2015.

WU, H.; et al. Labdane Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Journal of Natural Products**, Vol. 74 (4), p. 831-836, 2011.

XANG, X.; et. Al. *Leonurus japonicus* Houtt.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an importante traditional Chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 152, p. 14-32, 2014.

XIE, D.-T. et al. Microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Stephania sinica*. **Separation and Purification Technology**, Vol.130, P. 173–181, 2014.

ZHANG, C. et al. The Effect of Stachydrine on the Expression of Caspase-12 in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction. **The Journal of Urology**, Vol. 192, p. 1549-1554, 2014.

ZHU, Q.; et al. Quantification of leonurine, a novel potential cardiovascular agent, in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study in rats. **Biomedical Chromatography**, Vol. 26, p. 518–523, 2012.

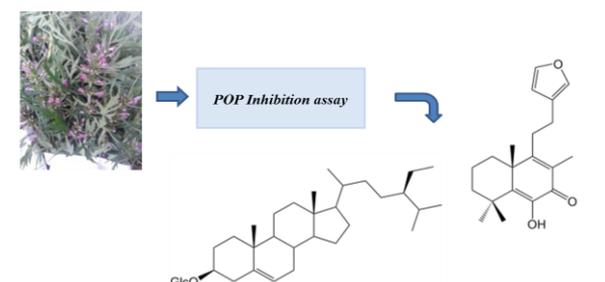
ZHOU, Q-M.; et al. Aromatic compounds from *Leonurus japonicus* Houtt. **Biochemical Systematics and Ecology**, Vol. 51, p. 101–103, 2013.

ZHOU, Z-F.; et al. Analysis of the Essential Oils of *Coriandrum sativum* Using GC-MS Coupled with Chemometric Resolution Methods. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 59 (1), p. 28-34, 2011.

# **ANEXO I**

Artigo submetido para publicação

## Graphical Abstract



Chemical investigation of *Leonurus sibiricus* L. used in Brazilian folk medicine led to the isolation of leojaponin and  $\beta$ -sitosterol glucoside, molecules with potential to be a valuable tool for the design of novel inhibitors of prolyl oligopeptidase.

EXTRAÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA PROLIL OLIGOPEPTIDASE E ACETILCOLINESTERASE DE *Leonurus sibiricus* L.

Lucimara L. Zachow, Janaína M. Ávila, Geovane A. Saldanha, Marco A. Mostardeiro, Ubiratan F. da Silva, Ademir F. Morel e Ionara I. Dalcol \*

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

-----marque uma alternativa, não apague o texto em azul-----

--

( ) Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

-----

----

\*e-mail: iidalcol@gmail.com

EXTRACTION, CHEMICAL COMPOSITION, PROLYL OLIGOPEPTIDASE AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF *Leonurus sibiricus* L.

Chemical investigation of *Leonurus sibiricus* L. (aerial parts) used in Brazilian folk medicine led to the isolation and identification of leojaponin, bis(2-ethylhexyl) phthalate,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol glucoside and the alkaloid leonurine. The methanol and methanol/1% HCl extracts from *L. sibiricus* were evaluated in as inhibitors of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and prolyl oligopeptidase (POP). The extracts obtained by maceration showed weak activity against AChE and moderate inhibition of POP (53-58%). The isolated components leojaponin and  $\beta$ -sitosterol glucoside, at a concentration of 150  $\mu$ M, inhibit 72 and 42% of POP activity, respectively.

Keywords: Labiatae; *Leonurus sibiricus*; antimicrobial activity, prolyl oligopeptidase, acetylcholinesterase

## INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae (Labiatae) possui 236 gêneros e mais de 7000 espécies catalogadas, configurando-se como a maior família pertencente a ordem das Lamiales. As espécies que compõe esta família possuem uma larga variedade de atividades biológicas descritas através dos usos populares, bem como por estudos científicos, além de uma ampla variedade de fitoquímicos.<sup>1</sup> Espécies do gênero *Leonurus* são usadas de forma diversificada na medicina popular, sendo bastante empregadas na cultura chinesa.<sup>2-3</sup> Deste gênero, entretanto, poucas espécies foram quimicamente estudadas, citando-se principalmente *L. caridaca*, *L. japonmicus*, *L. heterophyllus* e *L. sibiricus*.<sup>4-9</sup> *Leonurus sibiricus* L., conhecida popularmente no Brasil e no Rio Grande do Sul como “rubim” ou “erva-de-macacé”, é oriunda de países orientais como China e Japão mas naturalizada em praticamente todo o território do Brasil, ocorrendo principalmente em áreas abandonadas pois possui crescimento espontâneo.<sup>3</sup>

Na medicina tradicional brasileira há registros do uso de *L. sibiricus* no tratamento de distúrbios digestivos, infecções virais, hipertensão, dores de cabeça e doenças respiratórias.<sup>3,10</sup>

Em relação à sua composição química, a literatura relata a presença de alcaloides, mono, sesqui e diterpenos, furano-lactonas e também flavonoides,<sup>8-9,11-13</sup> os quais possuem conhecida atividade antioxidante. A ampla utilização na medicina popular explica o interesse no estudo de *L. sibiricus*. Estudos já realizados comprovam os efeitos anti-inflamatório e analgésico e a sua capacidade de induzir a expressão de óxido nítrico, envolvido na função muscular em geral.<sup>8,12,14</sup> Além disso, foi observada potente ação antioxidante dos extratos de *L. sibiricus* e capacidade de aumentar a secreção de insulina, sendo a planta utilizada no Rio Grande do Sul no tratamento da diabetes.<sup>15-16</sup> Apesar de seu amplo uso medicinal, Ahmed e col.<sup>17</sup> observaram que o extrato bruto metanólico das partes aéreas de *L. sibiricus* de origem africana apresenta ação depressora do sistema nervoso central. Seus efeitos na literatura são descritos como moderadamente narcótico, psicoativo e “cannabis-like”.<sup>2,9</sup>

Considerando-se seu espectro de efeitos farmacológicos e o seu extensivo uso popular, torna-se importante o estudo mais aprofundado de *L. sibiricus* naturalizada no Brasil. Assim, no presente trabalho esta espécie foi escolhida para estudo, objetivando-se avaliar dois métodos de obtenção do extrato bruto metanólico (maceração e extração a quente), realizar o isolamento de seus metabólitos secundários, verificar a capacidade de inibição das enzimas prolil oligopeptidase (POP) e acetilcolinesterase (AChE) tanto de seu extrato bruto como das frações obtidas e compostos isolados.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Geral

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, com detector DAD e coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6mm x 150mm, 5µm). A fase móvel empregada nas análises era composta por A: água (0,045% de TFA) e B: acetonitrila (0,036% de TFA). As análises de cromatografia gasosa (CG) foram realizadas em cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com coluna DB5; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector de 300 °C e a da coluna foi de 50-280 °C com aumento de 4 °C/min; o gás de arraste utilizado foi hidrogênio (H<sub>2</sub>) e na chama, ar sintético. As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foram realizadas em Cromatógrafo HP 6890 Série CG system com detector de massas HP 5973 Impacto de Elétrons (CG/MS-EI) e com Coluna Capilar DB5-5MS Agilent Technologies 30m x 32µm x 0,25 µm; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector 250 °C e do forno, a temperatura inicial foi de 60 °C e a máxima 325 °C; utilizou-se hélio como gás de arraste. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, uni e bidimensionais (Dept 135°, COSY, NOESY e HSQC) foram realizados em espectrômetro Bruker Avance DPX 400, operando a 400,13 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e 100,62 MHz para RMN de <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (*J*) calculadas em Hertz (Hz). A calibração dos espectros foi realizada utilizando-se como referência interna o TMS e o CDCl<sub>3</sub>. Para as leituras de microplacas empregadas para avaliar as atividades biológicas, utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), operando em 620 nm e 25 °C para os testes antimicrobianos, 405 nm para os testes enzimáticos com acetilcolinesterase (AChE) e 360/40 e 485/20 nm para os testes enzimáticos com prolil oligopeptidase (POP).

A enzima POP foi cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt do Instituto de Pesquisa Biomédica de Barcelona (IRB-Espanha). O substrato ZGP-AMC (N-benziloxicarbonil-Gli-Pro-metilcumarinil-7-amida) foi obtido comercialmente de Bachem (Bubendorf, Switzerland). AChE foi adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Brasil), assim como o iodeto de acetiltiocolina (ACTI), a albumina de soro bovino e o 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e o controle positivo ácido clorogênico. Eserina foi adquirida de Spectrum Chemical (NJ). O padrão de leonurina (SML 0670; ≥ 98%) foi obtida de Sigma-Aldrich.

### *Coleta, identificação e preparação do material botânico*

*Leonurus sibiricus* L. foi coletado no município de Bom Progresso (27° 32' 41" S, 53° 52' 1" O), entre os meses de novembro de 2014 e julho de 2015. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Renato Zacchia e uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria- UFSM, sob número de registro SMDB 15.445. O material vegetal coletado foi seco em estufa com ar circulante a uma temperatura de 50 °C e moído em moinho de facas, obtendo-se um total 1,5 kg de material vegetal seco e pulverizado.

### Testes de obtenção dos extratos metanólicos

Foram realizados testes de extração do material vegetal (partes aéreas) a pequena escala utilizando-se os métodos tradicionais de maceração e extração usando refluxo. Os procedimentos foram realizados em triplicata a partir de metodologia adaptada de Lin *et al.*<sup>12</sup>

#### *Extração por maceração*

Em um recipiente contendo 7,5 g de material vegetal seco e pulverizado, adicionou-se 150 mL de MeOH, e o material foi mantido em temperatura ambiente pelo período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a filtração e o solvente evaporado a 35-40 °C em rotoevaporador sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido três vezes. Em sequência, adicionou-se ao material vegetal residual 150 mL de uma solução de MeOH/ HCl 1%, sendo os procedimentos de extração por maceração e concentração dos extratos obtidos os mesmos descritos anteriormente. Os extratos resultantes (EB *f*-MeOH e EB *f*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

#### *Extração usando refluxo*

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL foram adicionados 7,5 g de material vegetal e 150 mL de MeOH; o balão foi mantido sob refluxo com auxílio de uma manta de aquecimento por 8 horas. O procedimento foi repetido três vezes. Em sequência,

adicionou-se ao material vegetal residual 150 mL de uma solução de MeOH/ HCl 1%, e o procedimento de aquecimento e concentração dos extratos repetidos conforme descrito anteriormente. Os extratos obtidos (EB *q*-MeOH e EB *q*-MeOH+) foram liofilizados e quantificados.

#### Preparação do extrato a maior escala e isolamento

Os extratos brutos de *L. sibiricus* foram preparados em maior escala por maceração utilizando-se 1,2 Kg de material vegetal seco e moído e 1 L de metanol como solvente. Após três extrações de 24 horas cada, obteve-se 102 g do extrato bruto metanólico (LEBM). Ao material vegetal residual foi adicionado 1 L de uma solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico (MeOH/HCl 1%), sendo a extração repetida como descrito anteriormente com a obtenção de 109 g de extrato metanólico ácido (LEBM+).<sup>12</sup>

O extrato LEBM (37 g) foi submetido à cromatografia líquida a vácuo em funil de placa porosa utilizando-se sucessivas lavagens com os solventes *n*-hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade e em diferentes proporções. Os filtrados obtidos (frações de 200 mL) que apresentaram similaridade através da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram reunidos e concentrados em rotaevaporador a pressão reduzida à temperatura de 40 °C. Desta forma foram obtidas 27 frações (F I → F XXVII). A fração F IV (3,86 g; eluída com 25% acetato de etila em *n*-hexano) foi cromatografada em coluna cromatográfica de sílica gel (160 g) como fase estacionária e os solventes *n*-hexano, cloroformio e metanol, em ordem crescente de polaridade, como fase móvel, fornecendo 16 frações (F 1 → F 16).

A fração F 6 (37,5 mg) foi submetida a nova purificação por cromatografia em CCD preparativa, utilizando-se como sistema de eluição *n*-hexano: CHCl<sub>3</sub> (4:1). A fração F 11 (446 mg) foi recromatografada em coluna cromatográfica de sílica gel (30 g) utilizando-se como fase móvel *n*-hexano e CHCl<sub>3</sub> em gradiente crescente de polaridade, sendo recolhidas frações de 20 mL e as mesmas sendo agrupadas após observância de similaridade em CCD. Foram obtidas oito frações, sendo que a fração F11-4 (127 mg) apresentou-se na forma de um sólido amorfo alaranjado. Após análise do sólido por CG/EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, este foi identificado como o diterpeno do tipo labdano leojaponina (1; 127 mg).

A fração F XVII (880 mg) proveniente da cromatografia líquida a vácuo foi purificada em coluna cromatográfica sendo utilizado 40 g de sílica gel e *n*-hexano/CHCl<sub>3</sub>/MeOH em ordem

crescente de polaridade como fase móvel. Foram recolhidas frações de 30 mL e estas foram reunidas após análise em CCD, de acordo com sua similaridade. A fração FG (49 mg) resultante foi recromatografada em CCDP usando *n*-hexano: CHCl<sub>3</sub> (2:1), quando foi possível isolar dois compostos. Utilizando-se de técnicas de análise em CG/EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, os mesmos foram identificados como ftalato de bis(2-etilexila) (2) (5,8 mg) e β-sitosterol (3) (50 mg).

A fração F P (56 mg) formou um precipitado branco quando foi adicionado excesso de MeOH. Através da análise por CCD observou-se a presença deste mesmo sólido na fração F XVIII (530 mg) da cromatografia líquida a vácuo. Assim, as frações foram reunidas e o sólido foi purificado por meio de sucessivas lavagens com MeOH, fornecendo 30 mg de um composto que foi purificado por CCDP usando CHCl<sub>3</sub>/MeOH (25:1) e que foi identificado através de análise do ponto de fusão, comparação por CCD com padrão autêntico previamente isolado em laboratório e <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN como sendo o composto β-sitosterol-glicosilado (4).

O extrato bruto metanólico ácido (LEBM+) foi fracionado de acordo com o procedimento descrito por Lin *et al.*,<sup>12</sup> sendo parte do extrato LEBM+ (36 g) suspenso em 300 mL de *n*-hexano. A esta suspensão foram adicionados 200 mL de H<sub>2</sub>O: MeOH (95:5), a fração orgânica separada foi seca em rotaevaporador a pressão reduzida e a fração aquosa liofilizada. A fração aquosa resultante (27 g) foi redissolvida em H<sub>2</sub>O e extraída com butanol até peso constante, originando a FBuOH (5 g). A FBuOH foi cromatografada em coluna cromatográfica de sílica gel F60 (100 g) usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ AcOEt/ MeOH/ H<sub>2</sub>O em ordem crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas frações de 20 mL, sendo reunidas conforme similaridade. A análise por CCD utilizando-se como revelador o reativo de Dragendorff indicou a presença de um alcalóide na fração F XIII. Esta fração foi purificada através de CCDP tendo como sistema de eluição AcOEt/MeOH 1:1, sendo isolado 3 mg de um sólido branco identificado por espectrometria de massas de alta resolução (IES-EM) e comparação com padrão autêntico comercial por CLAE como sendo a leonurina (5).

#### *Leojaponina (1)*

RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz, δ CDCl<sub>3</sub>): 1,55 (1H, *m*, H-1a), 2,06 (1H, *m*, H-1b), 1,70 (1H, *m*, H-2a), 1,88 (2H, *m*, H-2b, H-3a), 1,40 (1H, *m*, H-3b), 2,56 (3H, *m*, H-11a, H-12), 2,67 (1H, *m*, H-11b), 6,32 (1H, H-14), 7,38 (1H, H-15), 7,29 (1H, H-16), 1,99 (3H, *s*, H-17), 1,38 (9H, *m*, H-18, H-19, H-20), 6,98 (1H, *s*, OH). RMN de <sup>13</sup>C (100,62 MHz, δ CDCl<sub>3</sub>) 29,4 (C-1), 17,2 (C-2), 37,2 (C-3), 35,6 (C-4), 140,5 (C-5), 143,1 (C-6), 181,6 (C-7), 127,4 (C-8), 165,8 (C-9),

43,8 (C-10), 31,5 (C-11), 23,8 (C-12), 124,3 (C-13), 110,5 (C-14), 143,1 (C-15), 138,7 (C-16), 11,6 (C-17), 28,1 (C-18), 27,6 (C-19), 27,9 (C-20).

#### Atividade enzimática

A avaliação da atividade inibitória da enzima AChE foi realizada através de um ensaio colorimétrico quantitativo, baseado na adaptação do método de Ellman<sup>18</sup> descrita por Rhee *et al.*<sup>19</sup> Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, 25 µL de 15 mM ACTI, 125 µL de 3 mM DTNB em tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo NaCl 0,1 M e 0,02 M MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O), 50 µL de tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo 0,1% de BSA) e 25 µL da amostra (20 mg/mL em DMSO diluídos em tampão A para concentração 2 mg/mL); estes reagentes foram misturados e incubados a 25 °C por 2 min. Na sequência, foram adicionados 25 µL de AChE (0,22 U/mL em tampão A) e a absorvância monitorada a cada 60 s durante 300 s em 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se um branco (poço sem enzima) para cada amostra. Como controle positivo utilizou-se a eserina (fisostigmina). As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se a absorvância da amostra com o ensaio em branco (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula: % inibição = 100-(Abs amostra/Abs controle x 100). Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados obtidos através de média ± desvio padrão.

A atividade de inibição frente à POP foi determinada seguindo-se o método descrito por Toide *et al.*<sup>20</sup> Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, permitindo assim, um monitoramento simultâneo das múltiplas reações. Para cada reação foi realizada uma pré-incubação durante 15 min em tampão fosfato Na/K (131 µL, pH 8,0) da enzima POP (7 nM) com a amostra a ser testada (3 µL) a 37 °C. As soluções estoque das amostras a serem testadas foram preparadas em DMSO. Após a pré-incubação, adicionou-se a cada poço o substrato o ZGP-AMC (10 µL, 3 mM em 40% de 1,4-dioxano) e a reação foi incubada por 1 h a 37 °C. A reação foi interrompida com acetato de sódio (150 µL, 1 M, pH 4,0) e a formação de N-aminometilcumarina (AMC) foi medida fluorimetricamente. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360/40 e 485/20 nm, respectivamente. Foram realizados controles positivos e negativos contendo a DMSO/amostra e substrato no tampão de trabalho com e sem a presença da enzima, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata, usando-se um branco para cada amostra sem a enzima. Um inibidor conhecido da POP, também foi utilizado como controle positivo sob as mesmas condições experimentais. A porcentagem de inibição foi calculada pela fluorescência da amostra comparando com o ensaio em branco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Extração, isolamento e caracterização estrutural dos metabólitos

Diferentes métodos de extração sólido-líquido podem ser empregados na obtenção de componentes de fontes naturais. A maceração e a extração usando refluxo estão entre as metodologias de referência ainda hoje mais utilizadas para a preparação de extratos de origem vegetal. Uma vez que foi constatado por Fuchino *et al.*<sup>6</sup> a ocorrência de degradação de componentes do extrato de *Leonurus japonicus* a temperaturas  $\geq 40$  °C, neste trabalho inicialmente realizou-se testes comparativos das metodologias de maceração e usando refluxo para a obtenção extratos brutos de *L. sibiricus* oriunda do Brasil. Após a obtenção em triplicata dos extratos brutos, os mesmos foram avaliados quanto a rendimentos e perfis cromatográficos. A Tabela 1 apresenta as condições utilizadas nas extrações e os rendimentos obtidos, onde não se evidencia grande diferença de valores entre os extratos preparados. A análise por CLAE mostra uma variação tanto qualitativa quanto quantitativa na composição dos extratos obtidos por maceração e usando refluxo (Figura 1), observando-se no cromatograma de EB *q*-MeOH a diminuição de intensidade dos picos entre 29-32 min e a presença de picos intensos entre 16-17 min (Figura 1B). Quanto aos perfis cromatográficos dos extratos obtidos por extração com metanol/HCl (Figuras 1C e 1D), observa-se unicamente no cromatograma de EB *q*-MeOH+ (Figura 1D) a presença de um conjunto de picos entre 28-30 min. Assim, o fator determinante para a escolha do método de extração empregado para extração em maior escala do material vegetal foi o melhor resultado apresentado nos ensaios preliminares de inibição das enzimas prolil oligopeptidase (POP) e acetilcolinesterase (AChE) dos extratos obtidos por maceração (Tabela 2).

Tabela 1. Obtenção dos extratos de *L. sibiricus*.

Método de extração	Condições	R (%)	
<i>Maceração</i>	7,5 g M.V./ 150 mL MeOH (3 x 24 h / t.a.)	EB <i>f</i> -MeOH 16,26 ± 2,5	EB <i>f</i> -MeOH+ 17,27 ± 0,6
<i>Extração refluxo</i>	<i>usando</i> 7,5 g M.V./ 150 mL MeOH (3 x 8 h / 65 °C)	EB <i>q</i> -MeOH 15,71 ± 1,2	EB <i>q</i> -MeOH+ 22,73 ± 1,2

\*M.V.: material vegetal

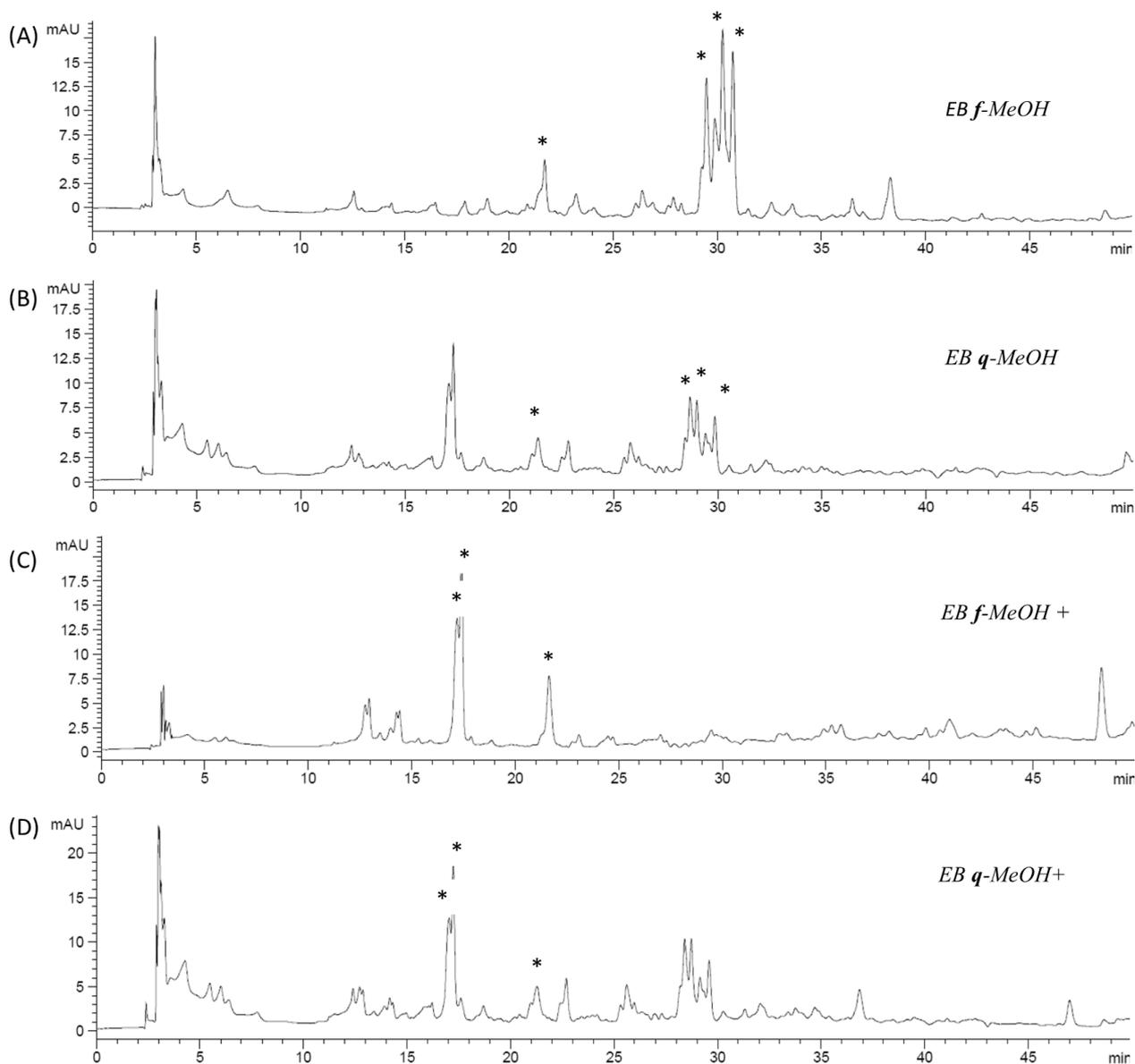


Figura 1. Cromatogramas dos extratos de *Leonurus sibiricus* a  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , por CLAE-DAD de (A) EB f-MeOH, (B) EB q-MeOH, (C) EB f-MeOH+ e (D) EB q-MeOH+ nas seguintes condições: fase móvel A: água (0,045% de TFA) e B: acetonitrila (0,036% de TFA). Programação de eluição utilizada: 5% B (5 min isocrático), seguido por 5- 20% de B (30 min), 20- 30% B (10 min) e 30- 100% B (10 min),  $\lambda = 250\text{ nm}$ . Fluxo de  $1,0\text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20\text{ }\mu\text{L}$ . \*Picos coincidentes

O estudo químico do extrato bruto LEBM, preparado a maior escala por maceração resultou no isolamento dos compostos leojaponina (1),<sup>21</sup> ftalato de bis(2-etilexila) (2),<sup>22</sup>  $\beta$ -sitosterol

(3),<sup>23</sup> e  $\beta$ -sitosterol-glicosilado (4)<sup>24</sup> (Figura 2). As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas por CCD em comparação com amostras de padrões autênticos (3 e 4), espectrometria de massas e análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em comparação dos dados da literatura.

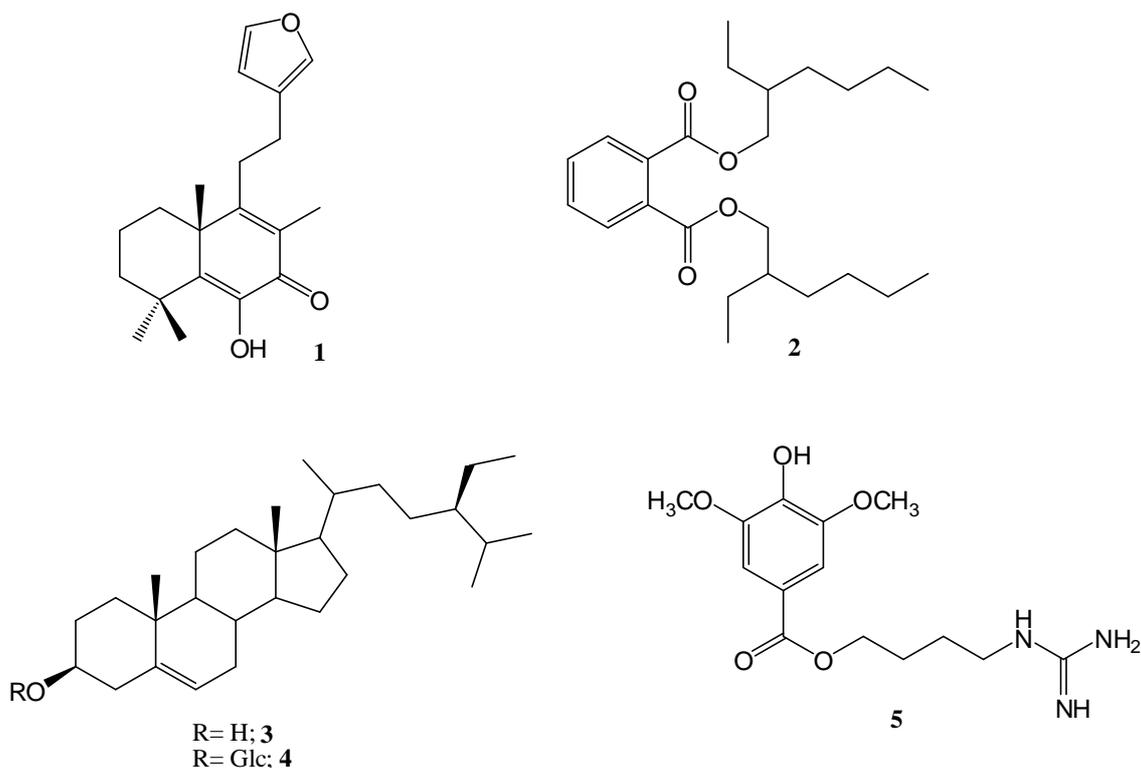


Figura 2. Estruturas dos compostos isolados de *Leonurus sibiricus*

A estrutura do diterpeno do tipo labdano leojaponina (1) foi elucidada com base na análise de CG/EM, RMN 1D e 2D e comparação com dados da literatura.<sup>21</sup> Na análise por CG/EM um único pico foi registrado no cromatograma da amostra com  $t_{\text{R}} = 14,660$  min, em cujo espectro de massas se observou o pico do íon molecular em  $m/z$  314 ( $\text{M}^{+\bullet}$ ), confirmando a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ , além de outros picos classificados como principais ( $m/z$  299, 220, 205, 191 e 95). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1 foram identificados os sinais característicos de diterpenos do tipo labdano, bem como sinais referentes a hidrogênios de anel furano a  $\delta_{\text{H}}$  7,38, 7,29 e 6,32 ppm, atribuídos aos prótons ligados aos carbonos C-15, C-16 e C-14, respectivamente, os sinais dos hidrogênios dos quatro grupos metila entre  $\delta_{\text{H}}$  1,99-1,38 ppm e um sinal a  $\delta_{\text{H}}$  6,98 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono C-6. Através

da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 1 e com o auxílio de dados da literatura<sup>21</sup> foi possível relacionar todos os sinais do espectro com os carbonos da estrutura de 1. O sinal observado a  $\delta_{\text{C}}$  181,7 ppm é característico de carbonila do grupo cetona de diterpenos da classe da leojaponina sendo, portanto atribuído a seu C-7. Os sinais referentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  do anel cicloexeno e do anel furano também foram identificados na região entre  $\delta_{\text{C}}$  165,8 e 110,5 ppm. Para confirmação da existência de sobreposição de sinais em 143,1 ppm, referentes aos C-6 e C-15, foram utilizados espectros de DEPT e COSY.

O composto 2 isolado de *L. sibiricus* foi identificado como sendo o ftalato de bis(2-etilhexila), com fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ , através da análise por CG/EM, onde se observa o pico do íon molecular em  $m/z$  390 ( $\text{M}+\bullet$ ) bem como picos dos principais fragmentos da molécula ( $m/z$  279, 167, 149 e 57) e espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os dados observados nos espectros foram comparados com dados encontrados na literatura, confirmando assim a estrutura do composto isolado.<sup>22</sup> Segundo Radulović e Blagojević,<sup>25</sup> a presença de ftalatos no processo de isolamento de produtos naturais pode ser atribuída a possíveis artefatos como contaminação externa das amostras. Assim, neste trabalho foi realizada uma série de testes de extração com possíveis fontes externas de contaminação (materiais de uso rotineiro no laboratório: pipetas plásticas e pontas de micropipetas descartáveis e tampas de borracha utilizadas em frascos de estocagem de amostras). Os testes de extração destes materiais empregaram como solventes *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, solventes utilizados nas diferentes etapas do processo de isolamento, sendo após evaporação parcial dos solventes, os resíduos analisados por CG/EM a fim de se comparar com o cromatograma de 2. Entretanto, na análise dos cromatogramas dos resíduos de extração dos materiais usados no laboratório não se observa a presença do ftalato de bis (2-etilhexila) indicando, portanto, que 2 isolado neste trabalho pode ser oriundo do material vegetal. Embora sejam mais comuns como derivados sintéticos, pode-se encontrar na literatura exemplos de isolamento de ftalatos a partir de fontes naturais.<sup>22,26</sup>

A análise de LEBM+ por CCD utilizando-se como revelador o reativo de Dragendorff mostrou a presença de uma mancha laranja indicativa de alcaloide. O alcaloide leonurina (5) foi isolado em pequena quantidade a partir deste extrato na forma de um sólido amorfo branco, sendo identificado através de IES-EM e análise comparativa por CLAE com a utilização de um padrão adquirido comercialmente (Figura 3). Foram empregados diferentes gradientes de fase móvel e diferentes eluentes a fim de se comprovar a similaridade entre o padrão de leonurina e o composto isolado 5.

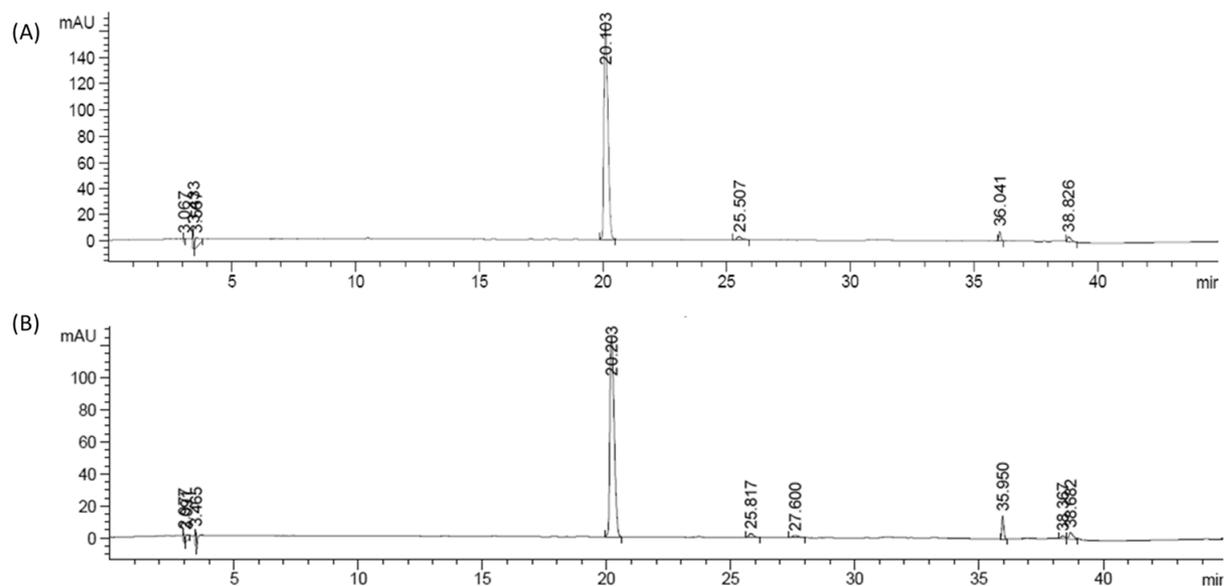


Figura 3. Cromatogramas de CLAE-DAD de (A) padrão comercial de leonurina e (B) leonurina isolada de *L. sibiricus*, nas seguintes condições: fase móvel A: água (0,045% de TFA) e B: acetonitrila (0,036% de TFA). Programação de eluição utilizada: 5- 50% de B (30 min), seguido por 50- 100% B (10 min) e 100% B (isocrático 5 min),  $\lambda = 300$  nm. Fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu$ L

#### Atividade de inibição das enzimas POP e AChE

A manutenção dos níveis corretos das enzimas POP e AChE no organismo está diretamente relacionada a diferentes enfermidades que acometem o sistema nervoso central (SNC).<sup>27</sup> Dentre as enfermidades de maior incidência na atualidade está a doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa associada com a deposição de placas amilóides e emaranhados fibrilares e alterações de neurotransmissores como a acetilcolina no cérebro.<sup>28,29</sup> Várias estratégias terapêuticas têm sido exploradas para aumentar a neurotransmissão colinérgica para aliviar alguns dos sintomas da DA, sendo que as principais envolvem o uso de inibidores colinesterásicos. A inibição da AChE provou ser o meio mais bem sucedido de equilibrar o sistema colinérgico para a estabilização dos sintomas da DA.<sup>30</sup> Dentro deste contexto, várias pesquisas científicas também indicam o envolvimento da enzima POP na DA, especialmente no que diz respeito a perda de memória observada em pacientes acometidos pela doença.<sup>31,32</sup> Outras disfunções do SNC também estão relacionadas aos níveis desta enzima no organismo

como, por exemplo, a depressão, a mania e a esquizofrenia.<sup>33</sup> Desta forma, evidencia-se a necessidade da busca por inibidores destas enzimas. Assim, justifica-se no presente trabalho a avaliação *in vitro* dos potenciais de inibição dos extratos obtidos de *Leonurus sibiricus* frente às enzimas citadas.

No que se refere ao potencial de inibição da enzima AChE não foi observada alta capacidade inibitória dos extratos testados, mesmo na concentração de 200 µg/mL (Tabela 2). Uma vez que não foi observada inibição da AChE pelos extratos, não foram realizadas análises de inibição desta enzima com os compostos isolados de *L. sibiricus*. Quanto aos ensaios frente a POP, no entanto, verificou-se uma capacidade de inibição na faixa de 53-58% dos extratos obtidos por maceração (EB *f*-MeOH e EB *f*-MeOH+). Não há na literatura trabalhos referentes à avaliação de *L. sibiricus* como agente inibidor desta enzima, sendo os resultados obtidos importantes porque indicam a presença de potenciais inibidores da enzima entre os vários metabólitos produzidos por *L. sibiricus*. É possível que a atividade inibitória da POP esteja relacionada, ao menos em parte, com a ação de *L. sibiricus* no SNC observada por Ahmed e col.<sup>20</sup> Para a verificação desta hipótese, foram selecionados os compostos 1, 4 e 5 na concentração de 150 µM para a realização de ensaios preliminares de inibição da POP. Dentre estes, destacaram-se como inibidores moderados da POP os compostos leojaponina (1) e β-sitosterol glicosilado (4), com percentuais de inibição de  $71,84 \pm 9,8$  e  $42,15 \pm 5,3$ , respectivamente (Tabela 2). A partir destes dados, o diterpeno 1 foi selecionado para darmos início a um estudo de otimização de sua estrutura para obtenção de novos derivados que possam apresentar potencial inibitório da POP intensificado.

Tabela 2. Atividade inibitória dos extratos de *L. sibiricus* frente às enzimas AChE e POP.<sup>a</sup>

Extrato	% Inibição AChE [200 µg/ mL]	% Inibição POP [200 µg/ mL]
EB <i>f</i> -MeOH	13,19 ± 0,6	58,07 ± 5,4
EB <i>f</i> -MeOH+	8,72 ± 1,9	53,08 ± 5,6
EB <i>q</i> -MeOH	16,80 ± 0,3	N.A.
EB <i>q</i> -MeOH+	7,54 ± 0,8	N.A.
Leojaponina (1)	N.T.	71,84 ± 9,8
β-sitosterol glicosilado (4)	N.T.	42,15 ± 5,3
Leonurina (5)	N.T.	28,65 ± 0,7
Eserina (12 µM)	74,9 ± 0,8	N.T.
Ác. Clorogênico (80 µM)	N.T.	87,90 ± 1,4

<sup>a</sup>N.T.: não testada; N.A.: não ativa, <sup>b</sup> compostos testados a 150 µM, <sup>c</sup> controles positivos utilizados nos ensaios.

## CONCLUSÃO

As pesquisas relacionadas à identificação de compostos de origem natural tem permitido a descoberta de inibidores de importantes enzimas-alvo da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos, tais como a AChE e a POP. A partir da espécie *Leonurus sibiricus*, foram isolados e identificados dois compostos com moderada capacidade de inibir a enzima POP, o diterpeno do tipo labdano leojaponina (1) e o fitoesteroide β-sitosterol glicosilado (4). Estes compostos mostram importante potencial como moléculas de partida para a obtenção de novos derivados com maior atividade inibitória da POP que sejam candidatos ao seguimento dos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas como a DA e o transtorno bipolar.

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ernest Giralt (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona- Espanha) por haver fornecido a enzima POP e aos professores Dr. Érico M. Flores e Dra. Paola A. Mello (UFSM) pelas análises por espectrometria de massas. Este projeto tem fomento da FAPERGS e CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Encyclopædia Britannica*. Britannica Academic, 2016. Disponível em: <http://academic-britannica.ez47.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/328710/Lamiaceae>, acessada em Janeiro 2016.
2. Nsuala, B.N.; Enslin, G.; Viljoen, A. *J. Ethnopharmacol.*, 2015, 174, 520.
  3. Lorenzi, H.; Matos, F.J. *Em Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*, Inst Plantarum Ltda Ed: São Paulo. 2002.
  4. Wojtyniak, K.; Szymański, M.; Matławska, I.; *Phytother Res.*, 2013, 27,1115.
  5. Shang, X.; Pan, H.; Wang, X.; He, H.; Li, M.; *J. Ethnopharmacol.* 2014, 15, 14.
  6. Fuchino, H.; Daikonya, A.; Kumagai, T.; Goda, Y.; Takahashi, Y.; Kawahara, N.; *Chem. Pharm. Bull*, 2013, 61, 497.
  7. Hung, T.M.; Luan, T.C.; Vinh, B.T.; Cuong, T.D.; Min, B.S.; 3307 *Phytother. Res.*,2011, 25, 611.
  8. Moon, H.T.; Jin,Q.; Shin, J.E.; Choi,E.J.; Han, H.; Kim, Y.S.; Woo, E.; *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 123.
  9. Wu, H.; Fronczek, F.R.; Ferreira, D.; Burandt, C.L.Jr.; Zjawiony, J.K. *J Nat Prod.* 2011, 74, 831.
  10. Christo, A.G.; Guedes-Bruni, R.R.; Silva, A.G.; *Braz. J. Pharmacogn.*, 2010, 20, 494.
  11. Pan, S.; Ding, H.; Chang, W.; Lin, H.; *Chin. Pharm. J.*, 2006, 58, 35.
  12. Lin, H.; Pan, S.; Ding, H.; Chou, T.; Chang, W.; *Taiwan Pharm. J.*; 2007, 59, 149.
  13. Narukawa, Y.; Niimura, A.; Noguchi, H.; Tamura, H.; Kiuchi, F.; *J Nat Med.*, 2014, 68, 125.
  14. Islam, M.A.; Ahmed, F.; Das, A.K.; Bachar, S.C.; *Fitoterapia*, 2005, 76, 359.

15. Schmidt, S.; Jakab, M.; Jav, S.; Streif, D.; Pitschmann, A.; Zehl, M.; Purevsuren, S.; Glasl, S.; Ritter, M.; *J Ethnopharmacol.* 2013, *150*, 85.
16. Sitarek, P.; Skala, E.; Wysokińska, H.; Wielanek, M.; Szemraj, J.; Toma, M.; Śliwiński, T.; *Oxid Med Cell Longev.*, 2016, ID 5738193.
17. Ahmed, F.; Tslam, M.A.; Choudhuri, M.S.K.; *Niger J Nat Prod Med.*, 2005, *9*, 35.
18. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M.; *Biochem. Pharmacol.*, 1961, *7*, 88.
19. Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkaninam, K.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr. A.*, 2001, *915*, 217.
20. Toide, K.; Iwamoto, Y.; Fujiwara, H.; Abe, H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, *274*, 1370.
21. Romero-González, R.R.; Avila-Núñez, J.L.; Aubert, L.; Alonso-Amelot, M.E.; *Phytochemistry*, 2006, *67*, 965.
22. Amade, P.; Mallea, M.; Bouaïcha, N.; *J. Antibiot.*, 1994, *47*, 201.
23. Venkata, S.P.C.; Prakash, I.; *Int. Curr. Pharm. J.*, 2012, *1*, 239.
24. Khatun, M.; Billah, M.; Quader, M.A.; *Dhaka Univ. J. Sci.*, 2012, *60*, 5.
25. Radulovic, N.S.; Blagojevic, P.D.; *Phytochem. Anal.*, 2012, *23*, 131.
26. Khan, D.; Khan, H.U.; Khan, F.; Khan, S.; Badshah, S.; Khan, A.S.; Samad, A.; Ali, F.; Khan, I.; Muhammad, N.; *Plos One*, 2014, *9*, e94952.
27. Gomes, N.G.M.; Campos, M.G.; Órfão, J.M.C.; Ribeiro, C.A.F.; *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2009, *33*, 1372.
28. Grutzendler, J.; Helmin, K.; Tsai, J.; Gan, W.B.; *Ann N Y Acad Sci.*, 2007, *1097*, 30.
29. Bores, G.M.; Huger, F.P.; Petko, W.; Mutlib, A.E.; Camacho, F.; Rush, D.K.; Selk, D.E.; Wolf, V.; Kosley, R.W. Jr.; Davis, L.; Vargas, H.M; *American Soc Pharm Exp Ther*, 1996, *277*, 728.
30. Hyde, C.; Peters, J.; Bond, M.; Rogers, G.; Hoyle, M.; Anderson, R.; Jeffreys, M.; Davis, S.; Thokala, P.; Moxham, T.; *Age Ageing.*, 2013, *42*, 14.
31. Orhan, I.E.; *Cur Med. Chem.*, 2012, *19*, 2252.
32. Green, R.C.; *Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease and Other Dementias*. 2<sup>th</sup> ed., Professional Comm Inc.: New York, 2005.
33. Polgár, L.; *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, *59*, 349.