



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FELIPE GABRIEL HENRIQUE JULIÃO**

**REVISÃO SISTEMÁTICA DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE  
HYPTOLACTONAS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS  
DE *Hyptis pectinata* (L.) Poit. FRENTE A *Streptococcus pyogenes***

***SYSTEMATIC REVIEW OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF  
HYPTOLACTONES AND INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL  
POTENTIAL OF SECONDARY METABOLITES ISOLATED OF *Hyptis  
pectinata* (L.) Poit. AGAINST *Streptococcus pyogenes****





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FELIPE GABRIEL HENRIQUE JULIÃO**

**REVISÃO SISTEMÁTICA DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE  
HYPTOLACTONAS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS  
DE *Hyptis pectinata* (L.) Poit. FRENTE A *Streptococcus pyogenes***

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

***SYSTEMATIC REVIEW OF THE BIOLOGICAL OF HYPTOLACTONES  
AND INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF  
SECONDARY METABOLITES ISOLATED OF *Hyptis pectinata* (L.)  
Poit. AGAINST *Streptococcus pyogenes****

*Master dissertation presented to the  
PostGraduate Program in Chemistry of  
the Federal University of Sergipe to  
obtain MSc. in Chemistry.*

**SÃO CRISTÓVÃO – SE**  
**Fevereiro, 2022**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

J94r Julião, Felipe Gabriel Henrique

Revisão sistemática dos efeitos biológicos de hyptolactonas e investigação do potencial antibacteriano de metabólitos secundários isolados de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. frente a *Streptococcus pyogenes* / Felipe Gabriel Henrique Julião ; orientador James Almada da Silva - São Cristóvão, 2022.  
211 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Química. 2. Plantas medicinais Silva, James Almada da orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Felipe Gabriel Henrique Julião apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 14/02/2022.

---

Prof. Dr. James Almada da Silva  
Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto-UFS

---

Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira  
Departamento de Farmácia- UFS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

*Dedico este trabalho aos meus pais, Dárcio  
Silva Julião e Maria da Glória Silva  
Henrique Julião.*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Meus sinceros agradecimentos:

- A Deus por me dar a oportunidade de estar finalizando minha primeira pós-graduação, sendo que isso não é a realidade de muitos brasileiros de baixa renda. Sinto-me muito privilegiado em ser o primeiro membro de minha família encaminhado a obter o título de mestre; Aos meus pais, Dárcio Silva Julião e Maria da Glória Silva Henrique Julião, e ao meu irmão, Francisco de Assis Henrique Neto, as pessoas mais importantes de minha vida. Sem meus pais, não estaria aqui escrevendo estes agradecimentos, tudo que consegui nesta jornada foi graças a eles. Na infância, inúmeras vezes, vi meu pai chegar em casa do trabalho tarde da noite em uma bicicleta para que nunca faltasse nada dentro de casa. Esse e outros momentos sempre me incentivam a querer vencer na vida;

- A Universidade Federal de Sergipe (UFS) por toda a infraestrutura, especialmente, o Departamento de Química (DQI) e o Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFS – Campus São Cristóvão, e os laboratórios que frequentei durante 10 meses para realização das atividades experimentais, Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) e Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia (LaBMIC) da UFS – Campus Lagarto;

- Ao maravilhoso Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante (coordenador do LaBMIC), entrou em minha vida para fazer com que gostasse de trabalhar com bactérias; As maravilhosas Profas. Dras. Maria de Lara Palmeira de Macedo Arguelho (orientadora do meu TCC) e Valéria Regina de Souza Moraes por todo suporte prestado desde a minha graduação;

- Aos secretários do PPGQ, Helder Rodrigues e Valdirene Prudente; A equipe do LPNBio e LaBMIC, em especial, os pesquisadores, Rosana Andrade, Sandrielly Santana e Ítalo Rosa, e os técnicos, Rute Lisboa, Daniela de Vasconcelos, Denis Jacinto e Sidnei de Oliveira, muito obrigado por todo suporte, guardarei essa equipe com carinho; Aos amigos que fiz na graduação, Grazielle Oliveira, Gustavo Santana, Flavia Dória, Jeferson Santos, Jennyfer Santos, Crislaine Cardoso e Matheus Henrique, e nesta pós-graduação, Valéria Vieira, adorei compartilhar conhecimento com vocês; As amigas Vitória Shiévila e Rute Teles, obrigado pelos 10 meses maravilhosos que passei morando com vocês, guardarei nossos momentos de descontrações com carinho; A minha comadre e amiga, Islaine Santos, agradeço por todo o companheirismo nesses dois anos de luta;

- Ao II CONCAF – Congresso de Ciências Aplicadas à Farmácia (2021), pelo certificado de menção honrosa a minha revisão sistemática, resultando em terceiro lugar na modalidade revisão da literatura dentre os anais do evento;

- Por fim, ao meu pai acadêmico e meu orientador, Prof. Dr. James Almada da Silva (coordenador do LPNBio), obrigado por todos os momentos de ensino, risadas e broncas merecidamente levadas. Saiba que é uma inspiração para minha vida profissional, continue sendo essa pessoa prestativa e de grande coração.

“Pode haver 100 pessoas em uma sala e 99 não acreditam em você, mas tudo o que  
você precisa é que apenas uma acredite.”

(Lady Gaga)

## RESUMO

*Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae), popularmente conhecida no Brasil como “sambacaitá” ou “canudinho”, é uma planta utilizada na medicina popular para tratar inflamações, infecções, dores e tumores. Dentre as substâncias bioativas presentes na espécie, destacam-se o hyptolido e pectinolidos, metabólitos secundários da classe das hyptolactonas. A semelhança estrutural de algumas hyptolactonas à pironetina, um produto natural com efeitos citotóxicos comprovados, nos leva a acreditar que essas substâncias têm grande potencial biológico. Com base nisso, foi realizado um levantamento bibliográfico por meio de revisão sistemática das hyptolactonas e suas atividades biológicas em diferentes bases de dados. Das 86 hyptolactonas isoladas de plantas e fungos, 57 apresentaram, principalmente, atividade citotóxica contra células cancerígenas, antibacteriana e antifúngica. Diante dos resultados encontrados, este estudo teve como objetivo isolar os pectinolidos e hyptolido, e pela primeira vez, avaliar os seus efeitos contra *Streptococcus pyogenes*, bactéria responsável por causar infecções na garganta. Os extratos brutos das folhas e inflorescências de *H. pectinata* foram submetidos a partição líquido-líquido e as frações diclorometano, submetidas à cromatografia líquida clássica para a obtenção das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP). Essas frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e suas substâncias isoladas por CLAE. Após elucidação das estruturas químicas por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, as FEHP e as substâncias isoladas: hyptolido, pectinolidos E, G e Q (inérita) foram avaliadas frente a *S. pyogenes*. As FEHP das folhas e inflorescências apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 64 µg/mL e concentrações bactericida mínima (CBM) de 256 e 512 µg/mL, respectivamente. Os pectinolidos E e G, apresentaram CIM de 256 µg/mL, entretanto, apenas o pectinolido G foi bactericida nesta concentração. As evidências geradas neste estudo, aliadas aos resultados existentes de efeito citotóxico e antibacteriano, dessas substâncias e de outras hyptolactonas, possibilitam ao hyptolido e pectinolidos uma maior ampliação de suas potencialidades, havendo chances a se tornarem protótipos a fármacos que devem ser comprovadas a partir de novos estudos.

**Palavras-chave:** hyptolido; pectinolidos; revisão sistemática; potencial antibacteriano.

## ABSTRACT

*Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae), popularly known in Brazil as “sambacaitá” or “canudinho”, it is a plant used in folk medicine to treat inflammation, infections, pain and tumors. Among the bioactive substances present in the species, highlighted, the hyptolide and pectinolides, secondary metabolites of the hyptolactone class. The structural similarity of some hypolactones to pironetin, a natural product with increased cytotoxic effects, leads us to believe that these substances have great biological potential. Based on this, a bibliographic survey was carried out through a systematic review of hyptolactones and their biological activities in different databases. Of the 86 hyptolactones isolated from plants and fungi, 57 showed mainly cytotoxic, antibacterial, and antifungal activity against cancer cells. In view of the results found, this study aimed to isolate pectinolides and hyptolide, and for the first time, evaluate their effect against *Streptococcus pyogenes*, the bacterium responsible for causing throat infection. The crude extracts of leaves and inflorescences of *H. pectinata* were submitted to liquid-liquid partition and the dichloromethane fractions were submitted to classical liquid chromatography to obtain fractions enriched in hyptolide and pectinolides (FEHP). These fractions were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and their substances isolated by HPLC. After elucidating the chemical structures by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, the FEHP and the isolated substances: hyptolide, pectinolides E, G and Q (inedited) were evaluated against *S. pyogenes*. The FEHP from leaves and inflorescences showed minimum inhibitory concentration (MIC) of 64 µg/mL and minimum bactericidal concentration (MBC) of 256 and 512 µg/mL, respectively. Pectinolides E and G had a MIC of 256 µg/mL, however, only pectinolide G was bactericidal at this concentration. The evidence generated in this study, together with the existing results of the cytotoxic and antibacterial effect of these substances and other hyptolactones, allow hyptolide and pectinolides to further expand their potential, with chances of becoming prototypes for drugs that must be proven from further studies.

**Keywords:** *hyptolide; pectinolides; systematic review; antibacterial potential.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas químicas do hyptolido e dos 17 pectinolidos. ....	26
<b>Figura 2</b> – Esqueletos gerais das estruturas químicas de metabólitos secundários denominados hyptolactonas ( <b>A</b> , <b>B</b> , <b>C</b> e <b>D</b> ). Representam os esqueletos gerais dos pectinolidos, as ilustrações <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> . Representa o esqueleto geral do hyptolido, a ilustração <b>A</b> . ....	27
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da pironetina. ....	28
<b>Figura 4</b> – Mecanismo reacional da reação (adição de Michael) entre a pironetina e o resíduo de aminoácido cisteína (Cys316) da $\alpha$ -tubulina para formação do complexo tubulina-RB3-TTL-pironetina. O contorno verde-primavera representa o local de ligação da $\alpha$ -tubulina. ....	29
<b>Figura 5</b> – Ilustrações do produto formado após a reação de adição de Michael entre a pironetina e o resíduo de aminoácido Cys316 da $\alpha$ -tubulina ( <b>A</b> ). Visão geral ( <b>B</b> ) e ampliada ( <b>C</b> ) do complexo tubulina-RB3-TTL-pironetina, em que a pironetina está ligada à $\alpha$ 2-tubulina ( $\alpha$ 2-Tub). As estruturas químicas da pironetina e dos aminoácidos Cys316 (C316) e Lys352 (K352) são mostradas em bastões coloridos: vermelho para o oxigênio, azul-marinho para o nitrogênio, amarelo para o enxofre, verde-água para os carbonos dos aminoácidos e ciano para os carbonos da pironetina. O contorno verde-primavera representa o local de ligação da $\alpha$ -tubulina. ....	30
<b>Figura 6</b> – Fotografia da espécie <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit., com destaque para as suas inflorescências. ....	37
<b>Figura 7</b> – Fluxograma PRISMA com as diferentes fases de uma revisão sistemática para inclusão de estudos de metabólitos secundários denominados hyptolactonas. ....	59
<b>Figura 8</b> – Quantidade de artigos publicados entre o período de 1964-2021 dos 60 artigos envolvendo as hyptolactonas, adicionados na revisão sistemática. ....	60
<b>Figura 9</b> – Representação das estruturas químicas das 86 hyptolactonas. ....	63
<b>Figura 10</b> – Gráfico de setores com valores percentuais de atividades biológicas atribuídas a 57 hyptolactonas: 46 originadas de plantas e 11 originadas de fungos ( <b>A</b> ); atribuídas a 46 hyptolactonas originadas de plantas ( <b>B</b> ); atribuídas a 11 hyptolactonas originadas de fungos ( <b>C</b> ). ....	68
<b>Figura 11</b> – Percentuais das atividades biológicas atribuídas a 57 hyptolactonas. ..	70
<b>Figura 12</b> – Fluxograma com o número total de hyptolactonas com efeitos biológicos comprovados, presentes nos 60 artigos incluídos no estudo. ....	72
<b>Figura 13</b> – Resultado individual da avaliação do risco de viés dos estudos de intervenções em animais, adicionados nesta revisão sistemática, com base nas diretrizes da ferramenta SYRCLE. ....	103
<b>Figura 14</b> – Resultado geral da avaliação do risco de viés dos estudos de intervenções em animais, adicionados nesta revisão sistemática, com base nas diretrizes da ferramenta SYRCLE. ....	104

**Figura 15** – Complexo entre o pectinólido C (**36**) e  $\alpha$ -tubulina, mostrando a distância entre o grupo amino residual do aminoácido lisina (Lys352) e o carbono  $\beta$  da lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $H_2N-C\beta$ ). Os valores da energia de acoplamento ( $E_i$ ) e distância da ligação  $H_2N-C\beta$  são indicados..... 128

**Figura 16** – Foto representativa das PLL com diclorometano dos extratos brutos de *Hyptis pectinata* (**A**); CLC da fração diclorometano das inflorescências (**B**) e folhas (**C**) da espécie..... 143

**Figura 17** – Cromatograma do padrão analítico pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min) (**A**) e espectro de absorção de UV do pectinólido J' (**B**), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L..... 145

**Figura 18** – Cromatograma do padrão analítico hyptólido ( $t_R = 14,2$  min) (**A**) e espectro de absorção de UV do hyptólido (**B**), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL..... 145

**Figura 19** – Cromatograma do padrão analítico pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min) (**A**) e espectro de absorção de UV do pectinólido E (**B**), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL..... 146

**Figura 20** – Cromatograma da fração HPInD-C obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL..... 148

**Figura 21** – Cromatogramas da fração HPInD-C e dos padrões pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptólido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 148

**Figura 22** – Cromatograma da fração HPInD-D (**A**) e espectros de absorção de UV (**B**) das substâncias presentes na fração HPInD-D com tempos de retenção em 14,2 (possível hyptólido); 18,7 e 25,5 min, obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPInD-D: 14,2; 18,7 e 25,5 min. .... 150

**Figura 23** – Cromatogramas da fração HPInD-D e dos padrões pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptólido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPInD-D: 14,2; 18,7 e 25,5 min. 151

- Figura 24** – Efeito da conjugação sobre o  $\lambda_{\text{max}}$  de cetonas. .... 152
- Figura 25** – Cromatograma da fração HPInD-E, obtido por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 153
- Figura 26** – Cromatogramas da fração HPInD-E e dos padrões pectinolido J' ( $t_{\text{R}}$  = 9,2 min), hyptolido ( $t_{\text{R}}$  = 14,2 min) e pectinolido E ( $t_{\text{R}}$  = 18,4 min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 154
- Figura 27** – Cromatograma da fração HPFD-C obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 155
- Figura 28** – Cromatogramas da fração HPFD-C e dos padrões pectinolido J' ( $t_{\text{R}}$  = 9,2 min), hyptolido ( $t_{\text{R}}$  = 14,2 min) e pectinolido E ( $t_{\text{R}}$  = 18,4 min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 156
- Figura 29** – Cromatograma da fração HPFD-D (A) e espectros de absorção de UV (B) das substâncias presentes na fração HPFD-D com tempos de retenção em 9,2 min (possível pectinolido J'); 14,8 e 19,4 (hyptolido e pectinolido E, respectivamente), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPFD-D: 9,0; 14,8 e 19,4 min. .... 158
- Figura 30** – Cromatogramas da fração HPFD-D e dos padrões pectinolido J' ( $t_{\text{R}}$  = 9,2 min), hyptolido ( $t_{\text{R}}$  = 14,2 min) e pectinolido E ( $t_{\text{R}}$  = 18,4 min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPFD-D: 9,0; 14,8 e 19,4 min. .. 159
- Figura 31** – Cromatograma da fração HPFD-E obtida por CLAE (Shimadzu®), utilizando coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 160
- Figura 32** – Cromatogramas da fração HPFD-E e dos padrões pectinolido J' ( $t_{\text{R}}$  = 9,2 min), hyptolido ( $t_{\text{R}}$  = 14,2 min) e pectinolido E ( $t_{\text{R}}$  = 18,4 min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Concentração da amostra de 1 mg/mL. .... 160
- Figura 33** – Cromatograma da fração HPInD-D obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico (A), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6x250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), a 25°C, fase móvel

metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Cromatograma da fração HPIInD-D obtida por CLAE em modo semipreparativo (B), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL. .... 162

**Figura 34** – Cromatograma com demonstrações dos picos presentes na fração HPIInD-D, obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo semipreparativo, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL. .... 163

**Figura 35** – Cromatograma da fração HPFD-D obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico (A), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Cromatograma da fração HPFD-D obtida por CLAE em modo semipreparativo (B), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL. .... 164

**Figura 36** – Cromatograma com demonstrações dos picos presentes na fração HPFD-D, obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo semipreparativo, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL. .... 165

**Figura 37** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) do pectinólido E. .... 167

**Figura 38** – Espectro COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do pectinólido E. .... 169

**Figura 39** – Espectro HSQC-ED <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do pectinólido E. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C}. .... 170

**Figura 40** – Espectro HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do pectinólido E. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C}. .... 171

**Figura 41** – Espectro de massas do pectinólido E, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K. .... 171

**Figura 42** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) do hyptólido. .... 175

**Figura 43** – Espectro COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do hyptólido. .... 177

**Figura 44** – Espectro HSQC-ED <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do hyptólido. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C}. .... 178

**Figura 45** – Espectro HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K) do hyptólido. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C}. .... 179

**Figura 46** – Espectro de massas do hyptólido, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K. .... 179

**Figura 47** – Estruturas químicas do hyptólido e pectinólido E. .... 181

- Figura 48** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinólido G. .... 183
- Figura 49** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G. .... 185
- Figura 50** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ . .... 186
- Figura 51** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ . .... 187
- Figura 52** – Espectro de massas do pectinólido G, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K. .... 187
- Figura 53** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinólido Q. .... 191
- Figura 54** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q. .... 193
- Figura 55** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ . .... 194
- Figura 56** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ . .... 195
- Figura 57** – Espectro de massas do pectinólido Q, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K. .... 195
- Figura 58** – Estruturas químicas dos pectinólidos G e Q obtidos neste estudo. .... 197
- Figura 59** – Avaliação da CIM do DMSO frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas. .... 200
- Figura 60** – Avaliação da CIM das frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) das inflorescências (A) e folhas (B) de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas. .... 201
- Figura 61** – Ilustração (A) e avaliação (B) da CIM das frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) das inflorescências e folhas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por ensaio de redução da resazurina 0,01% (m/v). .... 203
- Figura 62** – Avaliação da CBM das frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) das inflorescências (A) e folhas (B) de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por semeio na superfície do ágar sangue em placas de Petri. .... 204
- Figura 63** – Avaliação da CIM de hyptolactonas isoladas de *H. pectinata* (A-D) frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas. .... 206
- Figura 64** – Ilustração (A) e avaliação (B) da CIM de hyptolactonas (hyptólido, pectinólidos Q, E e G) isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por ensaio de redução da resazurina 0,01% (m/v). .... 208

**Figura 65** – Avaliação da CBM das hyptolactonas: pectinolido G (**A**) e pectinolido E (**B**), isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por semeio na superfície do ágar sangue em placas de Petri. ....209

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Estratégias de busca adotadas para busca dos registros nas bases de dados. ....	52
<b>Quadro 2</b> – Atividades biológicas e respectivos percentuais das hyptolactonas naturais de plantas e fungos. ....	71
<b>Quadro 3</b> – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.....	74
<b>Quadro 4</b> – Diretrizes da ferramenta SYRCLE para avaliação do risco de viés. ....	102
<b>Quadro 5</b> – Classificações das 45 hyptolactonas com efeitos citotóxicos frente às células cancerígenas avaliados.....	125
<b>Quadro 6</b> – Classificações das 20 hyptolactonas com efeitos antibacterianos avaliados. ....	129

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do pectinólido E, observados neste estudo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e no estudo de Boalino *et al.*, 2003 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  e 2 gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) [17]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses. .... 172
- Tabela 2** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do hyptólido, observados neste estudo (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e no estudo de Achmad *et al.*, 1987 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) [26]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses. .... 180
- Tabela 3** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do pectinólido G, observados neste estudo (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) e no estudo de Boalino *et al.*, 2003 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) [17]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses. .... 188
- Tabela 4** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos pectinólidos Q e G (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), observados neste estudo. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses. .... 196
- Tabela 5** – Resultados da avaliação da CIM (microdiluição em caldo) e CBM (semeio em ágar sangue) das frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) e substâncias isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes*. .... 210

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- $\delta_c$  – Deslocamento químico do hidrogênio
- $\delta_H$  – Deslocamento químico do carbono
- $\lambda_{max}$  – Comprimento de onda máximo
- BHI – *Brain heart infusion*
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica
- CCR5 – C-C receptor quimiocina tipo 5
- CFM – Concentração fungicida mínima
- CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória em 50%
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLC – Cromatografia líquida clássica
- DAD – Detector de arranjo de diodos
- DE<sub>50</sub> – Dose efetiva em 50%
- DL<sub>50</sub> – Dose letal em 50%
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DP – Desvio padrão
- EAU – Extração assistida por ultrassom
- EM – Espectrometria de massas
- FEHP – Fração enriquecida em hyptolido e pectinolidos
- Fração HPFD – Fração diclorometano das folhas de *H. pectinata*
- Fração HPIInD – Fração diclorometano das inflorescências de *H. pectinata*
- HOMO – Orbital ocupado de maior energia (*highest occupied molecular orbital*)
- IC95% – Intervalo de confiança de 95%
- IG<sub>50</sub> – Inibição de crescimento (*grownt*) em 50%
- J* – Constante de acoplamento
- LUMO – Orbital desocupado de menor energia (*lowest unoccupied molecular orbital*)
- MAO-B – Monoamina oxidase B
- MDRSA – *Staphylococcus aureus* multirresistente às drogas (*Multidrug-resistant Staphylococcus aureus*)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

PLL – Partição líquido-líquido

PRISMA – *Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*

Rf – Fator de retenção

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RoB – *Risk of bias*

SisGen – Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado

SYRCLE – *Systematic review center for laboratory animal experimentation*

t<sub>R</sub> – Tempo de retenção

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

ZI – Zona de inibição

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1   FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>24</b>
<b>1       INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2       REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>32</b>
2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	32
2.2     Plantas medicinais e fitoterápicos .....	33
2.3     Família Lamiaceae .....	34
2.4     Gênero <i>Hyptis</i> .....	35
2.5 <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.: uso tradicional e potencial biológico .....	36
2.5.1   Potencial biológico dos extratos brutos de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit. ....	37
2.5.1.1 Atividade antiedematogênica e antinociceptiva .....	37
2.5.1.2 Atividade leishmanicida .....	38
2.5.1.3 Atividade citotóxica e antitumoral .....	38
2.5.1.4 Atividade antibacteriana .....	39
2.5.2   Metabólitos secundários isolados de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit. e seus potenciais biológicos .....	40
2.5.2.1 Hyptolido .....	40
2.5.2.2 Pectinolidos .....	43
2.6     Revisões literárias envolvendo as hyptolactonas .....	47
<b>CAPÍTULO 2   REVISÃO SISTEMÁTICA.....</b>	<b>49</b>
<b>3       OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
3.1     Objetivo geral .....	49
3.2     Objetivos específicos.....	49
<b>4       METODOLOGIA .....</b>	<b>50</b>
4.1     Critérios de elegibilidade .....	50
4.2     Fontes de informação.....	51
4.3     Estratégias de busca .....	51
4.4     Processo de seleção .....	52
4.5     Processo de coleta de dados .....	54
4.6     Nomenclatura da classe das hyptolactonas .....	55

4.7	Risco de viés .....	55
4.8	Avaliação de confiabilidade .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1	Seleção de estudos .....	57
5.2	Processo de determinação da nomenclatura hyptolactona .....	60
5.3	Características dos estudos .....	61
5.3.1	Efeitos biológicos das hyptolactonas.....	67
5.3.2	Sumarização dos resultados .....	73
5.4	Avaliação do risco de viés dos estudos.....	102
5.5	Confiabilidade de evidência.....	105
5.6	Escassez de avaliações das atividades biológicas <i>in vivo</i> das hyptolactonas .....	105
5.7	Hyptolactonas e suas atividades biológicas .....	106
5.7.1	Anamarina .....	106
5.7.2	Argentilactona.....	106
5.7.3	Boronolidos .....	110
5.7.4	Brevipolidos.....	111
5.7.5	Fupironas .....	113
5.7.6	Gamahonolidos .....	114
5.7.7	Hyptenolido .....	114
5.7.8	Lippialactona .....	114
5.7.9	Monticolidos e monticofuranolido .....	115
5.7.10	Olguinas e neohyptolido .....	115
5.7.11	Spicigera lactona .....	117
5.7.12	Spicigerolido .....	118
5.7.13	Synargentolidos.....	119
5.7.14	Syndenolido.....	119
5.7.15	Synparvolidos .....	119
5.7.16	Synrotolido .....	119
5.7.17	Umuravumbolidos.....	120
5.7.18	Xylariaopironas.....	120
5.7.19	Outras hyptolactonas (Miscelânea) .....	122

5.8	Relação do grupo lactona $\alpha,\beta$ -insaturada e a atividade biológica .....	125
5.8.1	Efeito citotóxico .....	125
5.8.2	Efeito antibacteriano.....	128
5.9	Limitações .....	130
5.10	Registro e protocolo .....	131
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>132</b>

### **CAPÍTULO 3 | ISOLAMENTO DO HYPTOLIDO E PECTINOLIDOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO..... 133**

<b>7</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>133</b>
7.1	Objetivo geral .....	133
7.2	Objetivos específicos.....	133
<b>8</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>134</b>
8.1	Obtenção dos extratos brutos .....	134
8.2	Obtenção das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos .....	134
8.3	Análise, isolamento e purificação do hyptolido e pectinolidos .....	135
8.4	Elucidação das estruturas químicas.....	136
8.4.1	Ressonância magnética nuclear.....	136
8.4.2	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	137
8.5	Atividade antibacteriana .....	138
8.5.1	Cepas bacterianas, condições de cultivo e inóculo .....	138
8.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	138
8.5.2.1	Viabilidade celular por monitoramento de absorvância .....	140
8.5.2.2	Viabilidade celular por redução da resazurina.....	140
8.5.3	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) .....	141
<b>9</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>142</b>
9.1	Obtenção dos extratos brutos e fracionamento por partição líquido-líquido (PLL).....	142
9.2	Fracionamento por cromatografia líquida clássica (CLC).....	142
9.3	Análise das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	143
9.3.1	Análises das frações obtidas do extrato diclorometano das inflorescências de <i>Hyptis pectinata</i> (HPIInD) .....	147

9.3.1.1	Fração HPIInD-C.....	147
9.3.1.2	Fração HPIInD-D.....	149
9.3.1.3	Fração HPIInD-E.....	153
9.3.2	Análises das frações obtidas do extrato diclorometano das folhas de <i>Hyptis pectinata</i> (HPFD).....	154
9.3.2.1	Fração HPFD-C.....	155
9.3.2.2	Fração HPFD-D.....	156
9.3.2.3	Fração HPFD-E.....	159
9.4	Isolamento e purificação dos metabólitos secundários por CLAE.....	161
9.4.1	Isolamento e purificação das substâncias da fração HPIInD-D.....	161
9.4.2	Isolamento e purificação das substâncias da fração HPFD-D.....	163
9.5	Elucidação das estruturas químicas do hyptolido e pectinolidos.....	166
9.5.1	Pectinolido E.....	166
9.5.2	Hyptolido.....	175
9.5.3	Pectinolido G.....	182
9.5.4	Pectinolido Q.....	190
9.6	Atividade antibacteriana frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	199
9.6.1	Avaliação do efeito antibacteriano do DMSO.....	199
9.6.2	Avaliação do efeito antibacteriano das FEHP.....	200
9.6.2.1	Concentração inibitória mínima (CIM).....	200
9.6.2.1.1	Viabilidade celular por monitoramento de absorvância.....	201
9.6.2.1.2	Viabilidade celular por redução da resazurina.....	202
9.6.2.2	Concentração bactericida mínima (CBM).....	203
9.6.3	Avaliação do efeito antibacteriano das substâncias isoladas.....	205
9.6.3.1	Concentração inibitória mínima (CIM).....	205
9.6.3.1.1	Viabilidade celular por monitoramento de absorvância.....	205
9.6.3.1.2	Viabilidade celular por redução da resazurina.....	207
9.6.3.2	Concentração bactericida mínima (CBM).....	208
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>211</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>212</b>

# CAPÍTULO 1

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1 INTRODUÇÃO

As inflamações nos tecidos da garganta, geralmente, são atribuídas às reações fisiológicas primárias, como alergias, fatores ambientais, como poeira, fumaça e baixa umidade. No entanto, tais inflamações podem ser ocasionadas por infecções virais ou infecções bacterianas [1,2].

As doenças infecciosas causadas por bactérias do gênero *Streptococcus* ocorrem com mais frequência no grupo etário infantil e podem ser atribuídas à má higiene ou à baixa imunidade [3]. Dentre elas, estão as infecções piogênicas (supurativas) do trato respiratório, como amigdalite, faringite e pneumonia, e infecções em outros locais, como endocardite, escarlatina, adenite cervical, linfangite, erisipela, septicemia e impetigo. O diagnóstico tardio envolve complicações não supurativas, como glomerulonefrite difusa aguda, febre reumática e bacteremia [4,5]. Dentre as bactérias patogênicas que acometem as infecções na garganta, pode-se destacar *Streptococcus pyogenes*.

O microrganismo *S. pyogenes* é uma espécie bacteriana gram-positiva que causa uma variedade de doenças, dentre elas, as infecções na garganta, como a amigdalite, faringite e faringoamigdalite [4,6,7]. O agravamento dessas infecções pode favorecer o espalhamento da bactéria para outros locais do corpo, quando não tratadas corretamente, e podem acarretar doenças mais graves, como a febre reumática e a síndrome do choque tóxico [4,5,8]. O ser humano é seu único hospedeiro, podendo ser encontrada na pele (assintomaticamente), nariz, mucosas da garganta e nasofaringe. Devido a sua localização no ser humano, a espécie *S. pyogenes* pode ser facilmente disseminada de pessoa para pessoa por vias respiratórias e por compartilhamento de fômites [4].

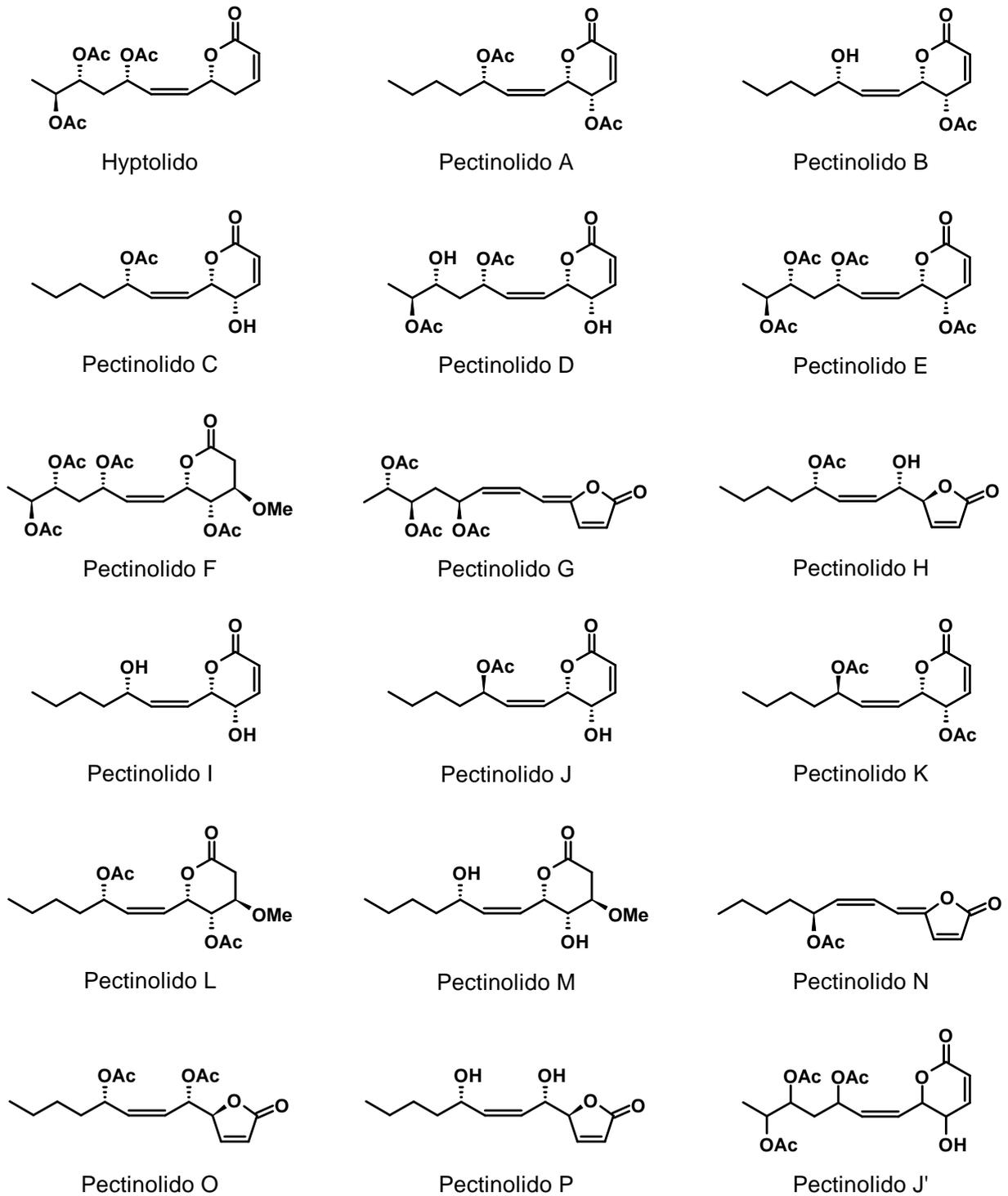
Os estreptococos  $\beta$ -hemolíticos do grupo A de Lancefield, como *S. pyogenes*, são sensíveis a certos antibióticos, sendo a penicilina um dos fármacos de escolha para seu tratamento [4]. Há diversos esforços no intuito de se descobrir novos antimicrobianos a partir de fontes naturais. Certos fármacos são derivados de

produtos naturais, isolados de plantas [9] e organismos marinhos [10]. Essas substâncias bioativas fazem parte dos metabólitos secundários que são biossintetizados por esses organismos, e intrinsicamente são importantes biologicamente, como por exemplo, para a defesa das plantas contra predadores [11].

A espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (sinônimo de *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze) [12], popularmente conhecida no Brasil como “sambacaitá” ou “canudinho”, é uma planta encontrada no nordeste brasileiro, utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções, inflamações, como exemplo, as inflamações na garganta, dores e tumores [13–15]. Apresenta potencial anti-inflamatório [14,15], antimicrobiano e citotóxico frente às células cancerígenas [9,16], como demonstrado por alguns autores, devido à presença de metabólitos secundários bioativos em suas partes aéreas.

Dentre os metabólicos secundários isolados da espécie, destacam-se o hyptolido e os pectinolidos, sendo os metabólitos secundários mais presentes em suas partes aéreas, principalmente nas folhas e inflorescências [16]. Até o momento, já foram isolados um único hyptolido e dezessete pectinolidos, identificados como pectinolidos A-P e J' [9,16–20].

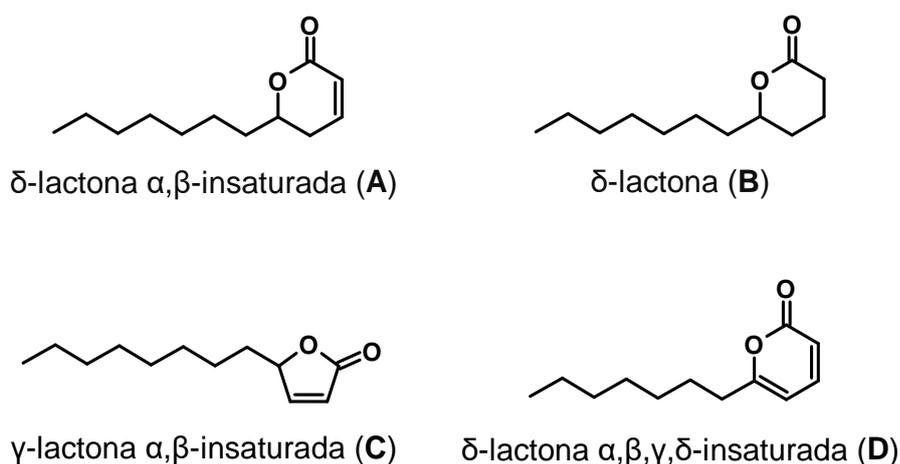
O hyptolido e os pectinolidos A-E, I-K e J' fazem parte do grupo 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona [9,16,17,19], também conhecido como 6-heptil-5,6-di-hidro- $\alpha$ -pirona, as substâncias desse grupo são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas com uma cadeia lateral de sete carbonos [16,19,21]. Os oito pectinolidos restantes são análogos ao grupo 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona: os pectinolidos F, L e M são  $\delta$ -lactonas sem insaturações no anel [17,19] com uma cadeia lateral de sete carbonos; os pectinolidos G, H, N-P são  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, também conhecidas como 2(5*H*)-furanonas ou butenolidos [17,19,20]. Em comparação com as  $\delta$ -lactonas, os anéis das  $\gamma$ -lactonas possuem um carbono a menos, resultando em uma cadeia lateral de oito carbonos. Suas estruturas químicas são demonstradas na Figura 1.

**Figura 1** – Estruturas químicas do hyptolido e dos 17 pectinolidos.

**Fonte:** Próprio autor.

O hyptolido e os pectinolidos fazem parte de uma mesma classe, denominada neste presente estudo de hyptolactonas. Englobam as hyptolactonas, as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas,  $\delta$ -lactonas sem insaturações no anel, ambas com uma cadeia lateral de sete carbonos, as  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas com uma cadeias lateral de oito carbonos [9,16–20] e também fazem parte da classe, as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas com uma cadeia lateral de sete carbonos [22–24]. Uma representação dos esqueletos gerais das hyptolactonas são demonstradas na Figura 2.

**Figura 2** – Esqueletos gerais das estruturas químicas de metabólitos secundários denominados hyptolactonas (**A**, **B**, **C** e **D**). Representam os esqueletos gerais dos pectinolidos, as ilustrações **A**, **B** e **C**. Representa o esqueleto geral do hyptolido, a ilustração **A**.



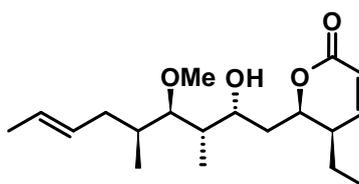
**Fonte:** Próprio autor.

A nomenclatura hyptolactona, uma contração das palavras hyptolido e lactona, foi determinada neste estudo com a finalidade de unificar os metabólitos secundários do grupo 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona e seus análogos. A origem do nome atribuído à classe foi devido ao hyptolido, primeira 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona obtida de fonte natural [25,26].

Atribuiu-se o efeito biológico de  $\gamma$ - e  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas ao caráter eletrofílico do carbono insaturado  $\beta$ -carbonila, o que permite a ocorrência de reações de adição nucleofílica, denominadas “adição de Michael”, com alguns resíduos de aminoácidos de proteínas em meio biológico [27–29]. Diante disso, os pectinolidos e

o hyptolido destacaram-se por apresentar efeitos citotóxicos frente às células humanas de câncer de fibrossarcoma, pulmão, melanoma, nasofaringe, epidermóide, próstata, colorretal, mamário [9], cervical [19], laringe [30] e leucemia linfocítica murina (P-388) [9], efeito antifúngico frente a *Candida albicans*, efeito antibacteriano frente às bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, bactérias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa* [9,18,31]. Vale mencionar que as hyptolactonas são estruturalmente relacionadas ao inibidor mitótico pironetina (6-nonil-5,6-di-hidro-2H-piran-2-ona) (Figura 3), um produto natural anticâncer isolado de espécies do gênero *Streptomyces* [32–34], que tem efeito citotóxico contra células de câncer resistentes a fármacos como o paclitaxel e vindesina [35].

**Figura 3** – Estrutura química da pironetina.



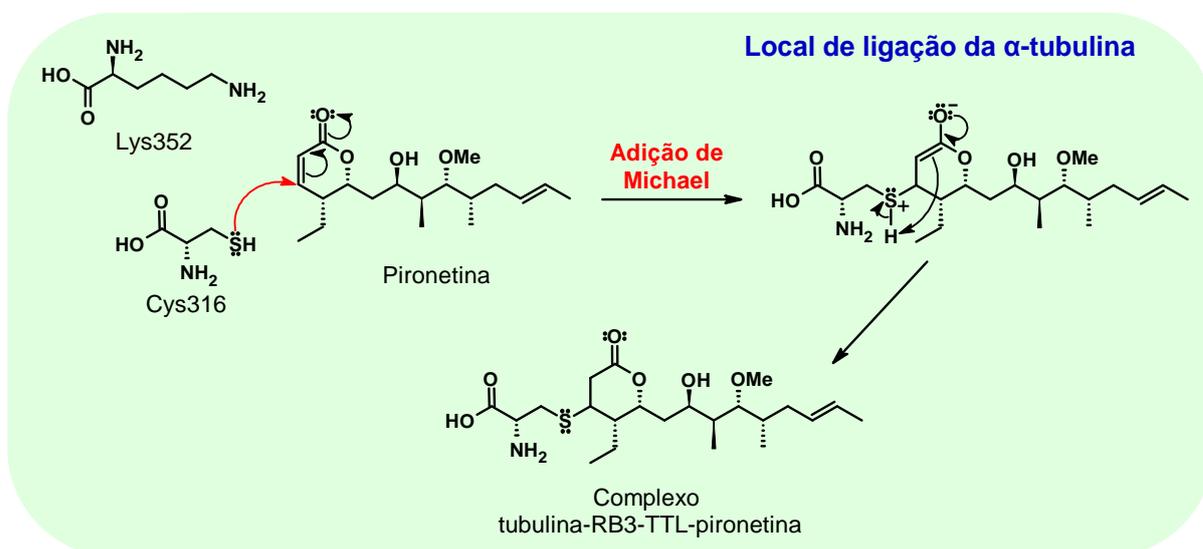
**Fonte:** Próprio autor.

A pironetina difere de outros fármacos anticânceres, não apenas por possuir uma estrutura contendo um resíduo de pirano e uma cadeia alquila mais simples do que as estruturas de outros antimitóticos, mas por ser a primeira substância a se ligar covalentemente à  $\alpha$ -tubulina, causando apoptose por desestruturação dos microtúbulos por adição de Michael [27–29]. Acredita-se que a ligação  $\alpha,\beta$ -insaturada à carbonila da lactona presente na pironetina, seja o motivo de sua eficácia contra linhagens de células tumorais.

Originalmente foi relatado que a  $\alpha$ -tubulina liga-se à pironetina por meio de resíduo de aminoácido lisina (Lys352) [27]. No entanto, estudos cristalográficos demonstraram que a ligação ocorre por meio de um resíduo de aminoácido cisteína (Cys316), o que é esperado pois o resíduo de cisteína tem poder nucleofílico maior do que o resíduo de lisina. Além disso, devido à proximidade de Lys352 à Cys316 é

possível que esses resíduos estejam envolvidos na transferência de prótons, fortalecendo a ligação da pironetina. A ligação da Cys316 à pironetina forma um complexo proteico, denominado tubulina-RB3-TTL-pironetina. O complexo é formado por heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulinas, a proteína semelhante a estamina, denominada RB3, e a tubulina tirosina ligase (TTL) [28,29] (Figura 4).

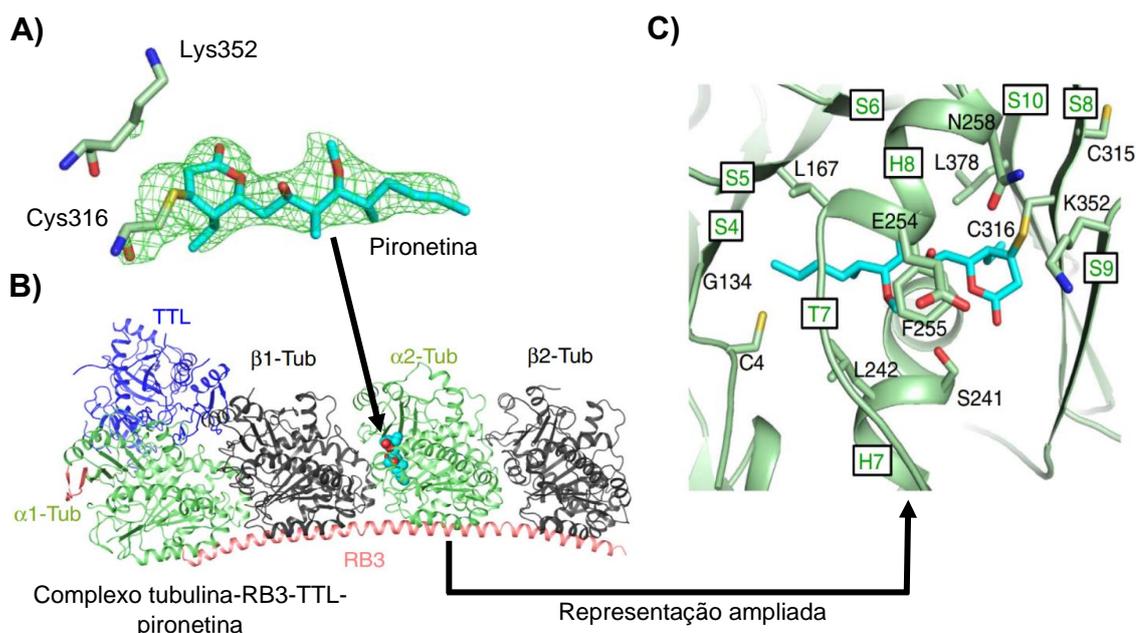
**Figura 4** – Mecanismo reacional da reação (adição de Michael) entre a pironetina e o resíduo de aminoácido cisteína (Cys316) da  $\alpha$ -tubulina para formação do complexo tubulina-RB3-TTL-pironetina. O contorno verde-primavera representa o local de ligação da  $\alpha$ -tubulina.



**Fonte:** Adaptações de Clayden, Greeves e Warren (2012) [36].

Ilustrações do produto formado após a reação de adição de Michael entre a pironetina e o resíduo de aminoácido Cys316 da  $\alpha$ -tubulina são demonstrados na Figura 5A-C.

**Figura 5** – Ilustrações do produto formado após a reação de adição de Michael entre a pironetina e o resíduo de aminoácido Cys316 da  $\alpha$ -tubulina (A). Visão geral (B) e ampliada (C) do complexo tubulina-RB3-TTL-pironetina, em que a pironetina está ligada à  $\alpha$ 2-tubulina ( $\alpha$ 2-Tub). As estruturas químicas da pironetina e dos aminoácidos Cys316 (C316) e Lys352 (K352) são mostradas em bastões coloridos: vermelho para o oxigênio, azul-marinho para o nitrogênio, amarelo para o enxofre, verde-água para os carbonos dos aminoácidos e ciano para os carbonos da pironetina. O contorno verde-primavera representa o local de ligação da  $\alpha$ -tubulina.



**Fonte:** Ilustrações adaptadas de Yang *et al.* (2016) [28].

Apesar da escassez de dados, as hyptolactonas estruturalmente relacionadas à pironetina possuem um grande potencial terapêutico, devido à presença da lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, como já mencionado anteriormente sobre o efeito citotóxico em células cancerígenas. Apesar de efeitos antimicrobianos comprovados, não há relatos científicos que correlacione o efeito antimicrobiano das hyptolactonas à  $\alpha,\beta$ -insaturação da lactona. Acredita-se que essa parte da molécula seja essencial para suas atividades biológicas (grupo farmacóforo), e assim como em células cancerígenas, onde seu mecanismo de ação envolve especificamente um determinado tipo de aminoácido, podemos supor que esse farmacóforo deva interagir com determinados aminoácidos de proteínas vitais presentes em microrganismos.

Uma das possíveis maneiras de averiguar a autenticidade dessa informação, seria através da busca por estudos de metabólitos secundários que sejam 5,6-di-

hidro-2*H*-piran-2-ona e análogos nas bases de dados científicas eletrônicas. Este tipo de busca bibliográfica foi realizado neste trabalho, utilizando o sistema metodológico de uma revisão sistemática, que se inicia por meio de uma pergunta formulada de forma pontual. A revisão sistemática difere das revisões narrativas de literatura por utilizar uma metodologia rigorosa na avaliação de estudos sobre um tema em questão de forma sistematizada e explícita na identificação, seleção dos estudos, extração dos dados e análise dos resultados [37,38]. Esta revisão foi a primeira revisão sistemática sobre essa classe de metabólitos secundários.

Os efeitos antibacterianos dos pectinólidos e o hyptólido foram avaliados e comprovados frente às bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e as bactérias gram-negativas, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, com melhores resultados de inibição frente às bactérias gram-positivas [9,18,31]. Para a parte experimental desta dissertação foi escolhida a bactéria gram-positiva, *Streptococcus pyogenes*, responsável por certas infecções/inflamações na garganta, para avaliação do potencial antimicrobiano dessas substâncias. Além das comprovações científicas, o fato de *Hyptis pectinata* ser usada na medicina popular contra inflamações na garganta, e o ineditismo da revisão sistemática, torna o estudo promissor.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Streptococcus pyogenes*

Pertencentes a família Streptococcaceae, as espécies do gênero *Streptococcus* são bactérias gram-positivas, ovóides ou esféricas, geralmente anaeróbicas facultativas, catalase-negativas, sendo a grande maioria imóveis e com crescimento menor que 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estão morfológicamente dispostas em cadeias *in vitro* e comumente em pares em organismos vivos [4].

A espécie *S. pyogenes* é frequentemente associada às infecções primárias das amígdalas e faringe, sendo elas a amigdalite, faringite e faringoamigdalite. A amigdalite é uma infecção ou inflamação nas amígdalas, enquanto a faringite é uma infecção ou inflamação na faringe. Já a faringoamigdalite é uma infecção ou inflamação simultânea na faringe e amígdalas, por serem anatomicamente próximas [4,6,7].

São através de suas fímbrias que *S. pyogenes*, e outras bactérias do gênero *Streptococcus*, fixam-se às células epiteliais da orofaringe ou nasofaringe. O contato próximo com outras pessoas facilita a disseminação desses microrganismos, a partir de secreção nasal ou gotículas de saliva. Outras possibilidades de disseminação que ocorrem com menor frequência é através de poeira, alimentos ou roupas contaminadas [4].

De acordo com dados de uma pesquisa canadense, a incidência de infecções causadas por bactérias do gênero *Streptococcus* é de 1,5 casos por 100.000 habitantes [39]. Essas infecções podem ocorrer em qualquer faixa etária, porém são comuns em crianças. Strömberg, Schwan e Cars investigaram a taxa de portadores de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos através de cultura de orofaringe. No período de 2 anos, 382 amostras de adultos e crianças escolares foram obtidas a cada 3 meses, totalizando 2.226 amostras. Os autores observaram uma taxa de portadores de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos de 11,3% para crianças de quatro anos, 5,9% para crianças de idade escolar e 0,8% para adultos [3].

O período de incubação usual das inflamações estreptocócicas é de 12 a 24 horas. Além da dor ao ingerir, o paciente pode apresentar febre alta, mal-estar geral e astenia, acompanhados por náuseas, vômitos e dor abdominal. A maiores

preocupações frente a esses dados é o agravamento por complicações, como por exemplo, a síndrome do choque tóxico, glomerulonefrite difusa aguda e a febre reumática [4,5,7,8]. No Brasil, há um aumento de cirurgia para troca de valvas cardíacas em crianças como consequência da febre reumática [40].

Nos países desenvolvidos, há grande investimento para a realização de testes rápidos de detecção de infecção por estreptococos em orofaringe, o que não acontece no Brasil. Apenas os sinais e os sintomas clínicos dos pacientes são verificados, e muitas vezes, ocorrem prescrições desnecessárias ou errôneas de agentes antimicrobianos [7].

A correta prescrição de agentes antimicrobianos (antibióticos) tende a eliminar, diretamente, o microrganismo causador da infecção, tendo como alvo pontos de vulnerabilidade desses patógenos [41]. Para o tratamento de infecções causadas por *S. pyogenes*, por exemplo, o antibiótico de escolha pode ser a penicilina [4]. Entretanto, devido ao uso excessivo de antibióticos, o número de patógenos resistentes a fármacos cresceu. Em contraste, o desenvolvimento de novos antibióticos diminuiu nos últimos anos [41]. Com o uso indiscriminado de medicamentos sintéticos há uma tendência na utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na medicina popular [42].

## 2.2 Plantas medicinais e fitoterápicos

Vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define que plantas medicinais consistem em qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada para fins terapêuticos, os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais com finalidade profilática, curativa ou paliativa, em que em suas composições não incluam substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais [43]. A eficácia e segurança dos fitoterápicos são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas [44]. Os cuidados ao utilizar os fitoterápicos são os mesmos como qualquer tipo de medicamento, é necessária atenção às datas de validade e contraindicações, o uso excessivo ou indevido pode desencadear riscos à saúde [42].

De acordo com a ANVISA, são utilizados como fitoterápicos muitos derivados vegetais utilizados popularmente, como exemplo, administração oral de extrato/tintura das partes aéreas de *Passiflora incarnata* L. (maracujá), como ansiolítico leve; administração tópica de extrato obtido do gel mucilaginoso das folhas de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (babosa), como cicatrizante nas lesões provocadas por queimaduras térmicas (1° e 2° graus); administração oral de extrato/tintura das folhas de *Peumus boldus* Molina (boldo) para ação colagoga e colerética, contra dispepsias funcionais e distúrbios gastrointestinais espásticos; administração oral de extrato/tintura das folhas de *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) para ação expectorante e broncodilatador; administração oral de óleo essencial/extrato/tintura das folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto) para ação expectorante, antisséptica e antibacteriana das vias aéreas superiores [45].

De acordo com as observações de Filho e Zanchett (2020), algumas vantagens atribuídas aos fitoterápicos estão relacionadas a: menor custo em comparação aos medicamentos alopáticos; imensa flora brasileira, correspondendo a cerca de um terço da flora mundial; o país possui áreas com climas propícios para o cultivo de plantas, possibilitando o cultivo em alta escala de material vegetal para uso como insumo na produção de fitoterápicos; uso crescente de fitoterápicos no sistema público de saúde; diversidade de estruturas moleculares produzidas pelas plantas e interações sinérgicas entre os componentes químicos do fitoterápico, atuando por diferentes mecanismos de ação [46].

A natureza, portanto, é essencial para as descobertas de novos e efetivos agentes medicinais. Dentre as famílias botânicas, em que foram comprovadas atividades biológicas na matéria-prima das partes de suas espécies, como também, em substâncias isoladas, em especial, efeitos antibacterianos, pode-se citar a família Lamiaceae [18,31,47,48].

### **2.3 Família Lamiaceae**

A Lamiaceae (antiga Labiatae) é uma família botânica de plantas com mais de 236 gêneros e mais de 7173 espécies. Suas espécies estão distribuídas ao redor do mundo, principalmente em regiões temperadas e tropicais, e têm grande importância econômica como plantas ornamentais, fonte de óleos essenciais e como condimentos

culinários, apreciadas pelo aroma ou pelo sabor atribuído aos alimentos, como o orégano, manjeriço, erva-cidreira, alecrim, sálvia, tomilho e hortelã [49–51].

A Lamiaceae é conhecida por uma riqueza de espécies que possuem propriedades medicinais, com intenso histórico de uso na medicina popular. Vários estudos já foram realizados em diferentes espécies da família Lamiaceae, como por exemplo, a *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), que teve seu óleo avaliado no tratamento da alopecia androgenética (calvície) [52]. Outro exemplo é o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), que demonstrou ter atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Enterobacter sakazakii* [47].

Nepetoideae é uma subfamília botânica da família Lamiaceae. Suas espécies encontradas na América tropical são distribuídas em duas tribos, Mentheae e Ocimeae. A tribo Mentheae é composta principalmente de espécies de regiões temperadas, enquanto a tribo Ocimeae é composta de espécies de regiões tropicais [53]. A Hyptidinae, uma subtribo da Ocimeae, é composta de aproximadamente 400 espécies, encontradas principalmente do sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina. A grande diversidade das espécies dessa subtribo está situada no Brasil, principalmente na Mata Atlântica e Cerrado. As espécies da Hyptidinae foram distribuídas anteriormente em nove gêneros, sendo *Hyptis* o maior dentre eles, com mais de 300 espécies [54].

## 2.4 Gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* abrange cerca de 309 espécies, sendo um dos principais gêneros encontrados nos países sul-americanos, distribuído nos países da América do Sul, América Central e sul dos Estados Unidos. Suas espécies são de grande importância econômica devido aos seus constituintes aromáticos, propriedades etnofarmacológicas e histórico de uso na medicina popular, cujos conhecimentos são transmitidos de geração a geração [50,55]. Por exemplo, na Nicarágua, a espécie *Hyptis verticillata* Jacq. é usada popularmente para náuseas, asma e dores no corpo [56]; uma comunidade indígena do México, utiliza essa mesma espécie contra gastralgia [57]; no Brasil, o chá das folhas frescas da espécie *Hyptis mutabilis* Briq. é

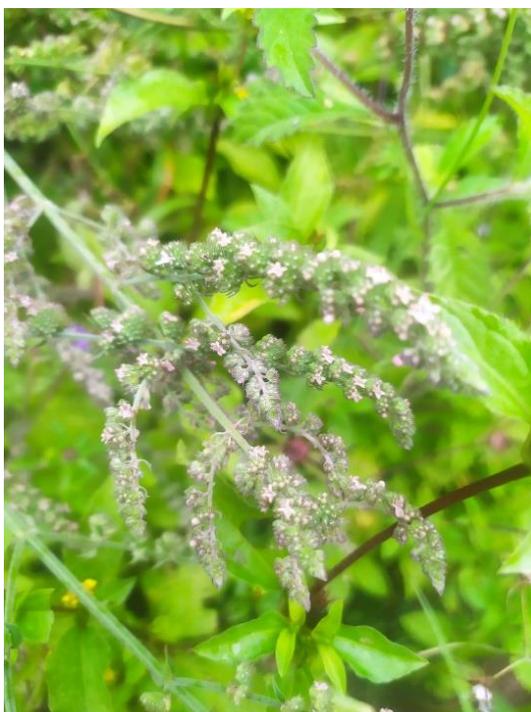
utilizado no tratamento de doenças uterina do muco cervical, gastrite, úlcera gástrica, úlceras de pele infectadas e conjuntivite [58].

Das espécies desse gênero, encontradas no nordeste brasileiro e conhecidas por suas propriedades terapêuticas, a *Hyptis pectinata* (L.) Poit. merece destaque, sendo bastante utilizadas na medicina popular para tratamento de inflamações, infecções, dores e tumores [13–15].

## 2.5 *Hyptis pectinata* (L.) Poit.: uso tradicional e potencial biológico

A espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit. é uma planta encontrada no nordeste brasileiro, nos estados de Sergipe, Pernambuco e Alagoas, presente em áreas silvestres ou cultivada em ambientes residenciais [14–16,59–61]. A espécie também pode ser encontrada em países tropicais como México [20], Indonésia [62] e Barbados [17]. É formalmente conhecida como *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze [12], entretanto, nas buscas por estudos envolvendo a espécie nas bases de dados eletrônicas PubMed Central, Science Direct, Scopus e Web of Science, realizadas em maio de 2020 e dezembro de 2021, observou-se que a nomenclatura *Hyptis pectinata* é mais adotada por pesquisadores. Foram realizadas duas buscas em cada base de dados, utilizando um termo por busca: "hyptis pectinata" ou "mesosphaerum pectinatum". As buscas foram filtradas para que os termos aparecessem nos títulos, resumos ou palavras-chave dos artigos. Fotografia da espécie é demonstrada na Figura 6.

**Figura 6** – Fotografia da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit., com destaque para as suas inflorescências.



**Fonte:** Próprio autor.

Por meio de decocção e infusão, na medicina popular, o chá de suas partes aéreas administrado por via oral ou por inalação é usado no tratamento de rinofaringite, congestão nasal e pulmonar, tosse, distúrbios gástricos, febre, infecções bacterianas, inflamações na garganta, dor e tumores. As folhas também são usadas para inflamações de pele e propriedades antimicóticas [13,14,63]. Seu uso popular despertou interesse científico para a investigação dos seus constituintes químicos e atividades farmacológicas de seus extratos brutos [14,31,59,60] e óleos essenciais [15,48,64]. Seus extratos brutos tiveram seus potenciais anti-inflamatório, antitumoral, leishmanicida, citotóxico e antibacteriano avaliados.

#### 2.5.1 *Potencial biológico dos extratos brutos de Hyptis pectinata* (L.) Poit.

##### 2.5.1.1 *Atividade antiedematogênica e antinociceptiva*

Bispo *et al.* (2001) avaliaram o efeito antiedematogênico e antinociceptivo do extrato aquoso das folhas de *H. pectinata* em ratos e camundongos, respectivamente,

usando diferentes estímulos à dor, como calor e agentes químicos. Na avaliação do efeito antinociceptivo usando um modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina, o extrato aquoso (200 mg/kg) administrado por via oral (v.o) reduziu em 51% e 70% as contorções abdominais, respectivamente. Na avaliação do efeito antinociceptivo usando o teste de chapa quente, os animais tratados por v.o. com o extrato na dose 200 mg/kg, tiveram um tempo de retardo da reação térmica em 47%. O extrato aquoso (600 mg/kg; v.o.) também inibiu em 34,1% o edema da pata do animal induzido por carragenina. Já na dose de 300 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, a inibição do edema da pata do animal induzido por injeção ácido araquidônico foi de 32,8%. Esses resultados indicam que o extrato aquoso de *H. pectinata*, nas doses testadas, possui efeitos antiedematogênicos e antinociceptivos [14].

#### 2.5.1.2 Atividade leishmanicida

Falção *et al.* (2013) obtiveram o extrato etanólico das folhas de *H. pectinata*, e do fracionamento do extrato com hexano e acetato de etila, isolaram o ácido sambacaitárico, ácido 3-O-metilsambacaitárico, ácido rosmarínico, ácido 3-O-metilrosmarínico, cafeato de etila, nepetoidina A, nepetoidina B, circsiliol, circimaritina, 7-O-metil-luteolina e genkwanino da fração acetato de etila. O extrato e seus derivados tiveram o efeito leishmanicida avaliado. O extrato, as frações hexano e acetato de etila, as substâncias, ácido sambacaitárico e ácido 3-O-metilrosmarínico, exibiram atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *Leishmania braziliensis* com concentração inibitória em 50% (CI<sub>50</sub>) de 0,7; 0,2; 0,4; 2,5 e 2,0 µg/mL, respectivamente. Merece destaque a fração hexano, por ter apresentado efeito leishmanicida maior do que o fármaco de referência, pentamidina (CI<sub>50</sub> = 0,3 µg/mL) [60].

#### 2.5.1.3 Atividade citotóxica e antitumoral

Barbosa *et al.* (2012) avaliaram o efeito citotóxico e antitumoral do extrato hidroetanólico de toda a *H. pectinata*. No ensaio *in vitro*, o extrato (50 µg/mL) apresentou citotoxicidade contra células humana de câncer colorretal (HCT-8) com 62% de inibição. No ensaio *in vivo*, o extrato inibiu a proliferação de células de câncer

de sarcoma murino (S180) em 70,5% na dose de 100 mg/kg. Esse extrato não apresentou efeito hemolítico e nem citotoxicidade contra células mononucleares do sangue periférico mesmo na maior concentração testada (1000 µg/mL). A análise histopatológica do baço, fígado e rins dos animais tratados mostrou ausência de lesões [59].

Os extratos etanólicos das inflorescências, folhas, ramos e raízes de *H. pectinata* foram avaliados frente às células cancerígenas (MDA-MB-231) e epiteliais (MCF-10A) de mama humano. Os extratos das inflorescências e folhas diminuíram a viabilidade das células MDA-MB-231 com  $CI_{50}$  de 52,01 e 45,91 µg/mL, respectivamente, e foram mais eficazes que o extrato das raízes ( $CI_{50}$  = 82,84 µg/mL) e ramos. A viabilidade celular na presença do extrato dos ramos (100 µg/mL) foi superior a 50%, portanto, não foi possível determinar o  $CI_{50}$ . Além disso, os extratos não apresentaram toxicidade em células normais (MCF-10A), apresentando  $CI_{50}$  > 200 µg/mL [16].

#### 2.5.1.4 Atividade antibacteriana

Bambang *et al.* (2020) avaliaram o efeito antibacteriano do extrato metanólico de toda a *H. pectinata* frente às bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi*, nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/mL. O extrato inibiu o crescimento das espécies nas três concentrações avaliadas, a inibição foi maior na concentração de 75 mg/mL, e no geral, os melhores resultados foram frente às bactérias gram-positivas, em especial, frente a *B. subtilis* [31].

Esses resultados sugerem que *H. pectinata* possui grande potencial biológico, demonstrando efeito anti-inflamatório, citotóxico, antitumoral, leishmanicida e antibacteriano dos extratos com baixa toxicidade. Tanto o potencial citotóxico, quanto o potencial antibacteriano da espécie podem ser atribuídos ao hyptolido e aos pectinolidos, presentes nos extratos metanólicos [17,31,62,65], etanólico [16] ou hidroetanólicos [25,26,66] das partes aéreas da espécie, com comprovação científica de efeito citotóxico em algumas linhagens de células cancerígenas [9,16,19,30] e efeito antibacteriano em algumas linhagens de cepas bacterianas, principalmente, frente às bactérias gram-positivas [9,18,67].

## 2.5.2 Metabólitos secundários isolados de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e seus potenciais biológicos

### 2.5.2.1 Hyptolido

O hyptolido foi isolado primeiramente por Gorter (1920), proveniente do extrato hidroetanólico das folhas de *H. pectinata* [66], entretanto, sua estrutura foi revisada e passou-se a ser uma 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona a partir dos estudos de isolamento de Birch e Butler (1964) [25] e Achmad *et al.* (1987) [26], proveniente dos extratos hidroetanólicos das folhas da espécie. Sua estereoquímica só foi determinada por Achmad *et al.* (1987), desse modo, ficou definida a estereoquímica absoluta dessa substância, como demonstrada na Figura 1, página 26.

Proveniente do extrato metanólico das partes aéreas de *H. pectinata*, Rojas *et al.* (1992) isolaram o hyptolido. Seu potencial antibacteriano *in vitro* foi avaliado frente a *B. subtilis*, a substância apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 100 µg/mL [65]. Como controle positivo foi utilizado a estreptomicina (CIM = 1,56 µg/mL). De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essa substância possui moderada atividade antimicrobiana (CIM entre 10-100 µg/mL) [68].

Proveniente do extrato metanólico das folhas de *H. pectinata*, Bambang *et al.* (2020) isolaram o hyptolido, e a partir dele, sintetizaram o epóxi-hyptolido. Seus efeitos antibacterianos foram avaliados por difusão em placa nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/mL frente às bactérias gram-positivas: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. mutans*, e bactérias gram-negativas: *E. coli* e *S. Typhi*. Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina (25 mg/mL). A atividade antibacteriana foi avaliada medindo-se o diâmetro da zona de inibição (ZI) ao redor dos discos. De acordo com os autores, o diâmetro da ZI foi considerado resistente ou não sensível (8 mm), moderadamente sensível (8–14 mm), relativamente sensível (14–20 mm) e extremamente sensível (< 20 mm).

Frente a *B. subtilis* e *S. aureus*, a substância natural apresentou um melhor resultado de inibição em comparação com o epóxi-hyptolido nas três concentrações avaliadas, entretanto, o epóxi-hyptolido apresentou uma maior inibição nas concentrações de 25 e 50 mg/mL frente a *S. mutans*, para as bactérias gram-negativas, o epóxi-hyptolido apresentou melhor inibição nas três concentrações

avaliadas. No geral, o melhor resultado de inibição do crescimento microbiano para o hyptolido foi em 75 mg/mL, a sensibilidade das bactérias gram-positivas ao hyptolido variaram de extremamente sensível para *B. subtilis* (ZI = 28,0 mm) a relativamente sensível para *S. mutans* (ZI = 20,0 mm) e *S. aureus* (ZI = 15,5 mm), para as bactérias gram-negativas a sensibilidade variou de relativamente sensível para *S. Typhi* e moderadamente sensível para *E. coli*, os valores exatos de ZI não foram demonstrados [31].

Proveniente do extrato triclorometano das partes aéreas de *H. pectinata*, Pereda-Miranda *et al.* (1993) isolaram o hyptolido, e pela primeira vez, os pectinólidos A-C. Seus efeitos antibacterianos e antifúngico foram avaliados *in vitro* frente às bactérias gram-positivas: *B. subtilis* e *S. aureus*, bactérias gram-negativas: *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e frente ao fungo *Candida albicans* [9]. Para *B. subtilis*, obteve-se a mesma CIM determinada por Rojas *et al.* (1992) (100 µg/mL) [65]. Para os demais microrganismos, a CIM não foi determinada. Com controle positivo foi utilizado a estreptomicina (CIM = 3,12 µg/mL) [9].

Pereda-Miranda *et al.* (1993) também avaliaram seu efeito citotóxico frente às células humanas de câncer colorretal (Col2), mamário (BC1 e ZR75-1), fibrossarcoma (HT-1080), pulmão (Lu1), melanoma (Mel2), nasofaringe (KB), epidermóide (A431), próstata (LNCaP), células KB resistente a vimblastina (KB-V) e leucemia linfocítica murina (P-388), com melhores resultados citotóxicos em células P-388, BC1, KB e A431, com dose efetiva em 50% (DE<sub>50</sub>) de 1,6; 2,4; 3,6 e 3,7 µg/mL, respectivamente [9]. O Instituto Nacional do Câncer (INC) dos Estados Unidos considera que substâncias com valores de CI<sub>50</sub> ≤ 4,0 µg/mL apresentam forte atividade antineoplásica [69]. Raciocínio semelhante pode ser atribuído a valores de DE<sub>50</sub>, de acordo com Lu *et al.* (1997), um fármaco pode ser considerado um modesto agente anticâncer quando DE<sub>50</sub> < 4 µg/mL [70]. Logo, essa hyptolactona possui potencial para se tornar um fármaco antitumoral frente às linhagens avaliadas.

Proveniente do extrato etanólico das inflorescências de *H. pectinata*, Santana *et al.* (2019) isolaram o hyptolido, pectinólido E, e pela primeira vez, o pectinólido J'. Seus potenciais biológicos foram avaliados quanto ao efeito citotóxico em células cancerígenas humanas de mama (MDA-MB-231). Os resultados mostraram que o pectinólido J', hyptolido e pectinólido E nas concentrações de 76,8; 73,6 e 85,2 µg/mL,

respectivamente, inibiram a proliferação em 80,2%; 89,4% e 96,0%, respectivamente. No entanto, nas concentrações imediatamente inferiores (38,4; 36,8 e 42,6 µg/mL, respectivamente), nenhuma substância foi citotóxica. Considerando que as substâncias isoladamente tiveram baixa atividade citotóxica, os autores testaram as substâncias em mistura nas mesmas proporções presentes no extrato. Foi preparada uma solução mista nas proporções de 32,5; 12,5 e 55%, respectivamente, as maiores concentrações de cada substância foram de 25,0, 9,2 e 46,9 µg/mL, respectivamente, o  $CI_{50}$  de cada substância foi calculado por meio da equação de Hill, desse modo, as substâncias apresentaram-se mais potentes com  $CI_{50}$  de 15,2; 5,6 e 28,5 µg/mL, respectivamente [16]. O hyptolido é um promissor protótipo a fármaco antitumoral em células cancerígenas dessa linhagem por apresentar  $CI_{50}$  muito próximo a 4,0 µg/mL, valor considerado potente pelo INC estadunidense, enquanto os pectinolidos E e J' podem ser considerados moderadamente ativos [69]. Como controle positivo, foi utilizado doxorubicina (5 µg/mL), concentração que inibiu cerca de 90% a proliferação celular [16].

No estudo de reatribuição estrutural, configuração absoluta e conformação do pectinolido E, Mendoza-Espinoza *et al.* (2009) avaliaram a citotoxicidade de hyptolido e spicigerolido [30], uma  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada pertencente à classe das hyptolactonas, presente nas partes aéreas de *Hyptis spicigera* Lam. [96]. Suas citotoxicidades foram avaliadas frente às células humanas tumorais de câncer de laringe (Hep-2), de nasofaringe (KB) e cervical (HeLa). O hyptolido foi mais potente do que o spicigerolido nas três linhagens celulares testadas com  $CI_{50}$  de 6,2; 3,6 e 2,8 µg/mL, respectivamente. Como controle positivo, foi utilizado a ellipticina ( $CI_{50} = 0,4$  µg/mL) [30]. Apesar da diferença entre os valores de  $CI_{50}$  do hyptolido e o fármaco de referência, a hyptolactona apresentou forte atividade antineoplásica para células KB e HeLa ( $CI_{50} \leq 4,0$  µg/mL), e moderada para células Hep-2 [69]. Portanto, o hyptolido é um promissor protótipo a fármaco antitumoral em células KB e HeLa.

A fim de obter informações sobre o mecanismo de ação citotóxica do hyptolido e spicigerolido, Mendoza-Espinoza *et al.* (2009) também avaliaram a progressão do ciclo celular de células HeLa por citometria de fluxo, mais especificamente, a fase interface do ciclo celular, que é subdividida em três fases: fase G1 (crescimento da célula), seguida pela fase S (síntese de DNA) e seguida pela fase G2 (crescimento da célula). Após 48h de exposição ao hyptolídeo, foi observada um impedimento

moderado da fase S, refletida por uma redução de 42 a 57% da população celular e diminuição da proporção de células nas fases G1 e G2 [30].

Proveniente do extrato metanólico das folhas de *H. pectinata*, Suzery, Cahyono e Amalina (2020) isolaram o hyptolido e avaliaram seus efeitos citotóxicos *in vitro* em células de câncer de mama humano MCF-7 e T47D com  $CI_{50}$  de 76,76 e 181,55  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Apesar do valor elevado de  $CI_{50}$ , os resultados sugerem que o hyptolido tem potencial como agente quimioterápico em células MCF-7 por induzir a apoptose celular [62].

#### 2.5.2.2 Pectinolidos

Devido ao uso popular de *H. pectinata* como antisséptico, Rojas *et al.* (1992) fizeram uma avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto dessa espécie, assim como de outras plantas medicinais mexicanas. O hyptolido foi ativo contra *B. subtilis*, o que despertou interesse de estudos de outros metabólitos secundários bioativos nas partes aéreas de *H. pectinata* [65].

Em comparação com os dados da literatura de hyptolactonas isoladas de espécies das famílias Annonaceae [71], Aristolochiaceae [72], Lamiaceae [9], Lauraceae [73] e Verbenaceae [74], Clavicipitaceae [75], Nectriaceae [22], Trichocomaceae [24] e Xylariaceae [23], a subclasse dos pectinolidos é a que apresenta o maior número de hyptolactonas. Até o presente estudo foram encontradas nas partes aéreas de *H. pectinata* (Lamiaceae) 17 pectinolidos e o hyptolido [9,16–20], o que faz da *H. pectinata* a espécie que possui a maior quantidade de hyptolactonas. As estruturas químicas dos pectinolidos são demonstradas na Figura 1, página 26.

Proveniente do extrato triclorometano das partes aéreas de *H. pectinata*, Pereda-Miranda *et al.* (1993) isolaram, pela primeira vez, os pectinolidos A-C e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos. Em seguida, avaliaram seus efeitos citotóxicos e antimicrobianos. Os efeitos citotóxicos foram avaliados frente às células de câncer colorretal (Col2), mamário (BC1 e ZR75-1), fibrossarcoma (HT-1080), pulmão (Lu1), melanoma (Mel2), nasofaringe (KB), epidermóide (A431), próstata (LNCaP), células KB resistente a vimblastina (KB-V) e leucemia linfocítica murina (P-388), enquanto seus efeitos antimicrobianos foram

avaliados *in vitro* frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As substâncias apresentaram semelhantes efeitos citotóxicos em todas as linhagens avaliadas, com DE<sub>50</sub> entre 0,1-3,3 µg/mL [9]. De acordo com Lu *et al.* (1997), um fármaco pode ser considerado um modesto agente anticâncer quando DE<sub>50</sub> < 4,0 µg/mL [70], logo, essas substâncias têm potenciais como protótipos a fármacos antitumorais frente às linhagens avaliadas.

Contra a bactéria *B. subtilis*, os pectinólidos A-C apresentaram CIM de 6,25; 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente, enquanto, contra *S. aureus* as CIM foram de 12,5; 100 e 100 µg/mL, respectivamente. Frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e frente ao fungo *C. albicans*, os pectinólidos A e B apresentaram CIM entre 200-300 µg/mL, enquanto para o pectinólido C, a CIM não foi determinada [9]. O controle positivo (estreptomicina) foi utilizado para as bactérias *B. subtilis* e *S. aureus*, com CIM de 3,12 e 6,25 µg/mL, respectivamente. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana, determinada por Ríos e Recio (2005), contra *B. subtilis*, o pectinólido A apresentou forte atividade (CIM < 10 µg/mL), os pectinólidos B e C apresentaram moderada atividade (CIM entre 10 e 100 µg/mL). Contra *S. aureus*, as substâncias apresentaram moderada atividade, e para os demais microrganismos, os valores de CIM caracterizou ausência de atividade antimicrobiana (CIM > 100 µg/mL) [68]. Logo, essas substâncias têm potenciais com como agentes antibacterianos, havendo chances a ser protótipos a fármacos que devem ser comprovadas a partir de novos estudos.

Boalino *et al.* (2003) isolaram o pectinólido E, e pela primeira vez, os pectinólidos D, F e G, provenientes do extrato metanólico das partes aéreas de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada, seus efeito biológicos não foram avaliados [17]. Mendoza-Espinoza *et al.* (2009) [30] realizaram um estudo de reatribuição estrutural, configuração absoluta e conformação da hypurticina, metabólito secundário isolado das partes aéreas de *H. urticoides* por de Vivar, Vidales e Pérez (1991) [76], foi observado que sua estrutura química corresponde ao do pectinólido E.

Fragoso-Serrano, Gibbons e Pereda-Miranda (2005) isolaram os pectinólidos A-C, e pela primeira vez, o pectinólido H, provenientes do extrato triclorometano das folhas de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi

determinada. As substâncias tiveram seus efeitos citotóxicos avaliados em células cancerígenas humanas de nasofaringe (KB) e aos seus efeitos antibacterianos *in vitro* contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, duas cepas de *S. aureus* multirresistente às drogas (MDRSA, *Multidrug-resistant S. aureus*): XU-212 e SA-1199B e uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, *Methicillin-resistant S. aureus*): EMRSA-15. Como controle positivo foi utilizado a tetraciclina com CIM de 0,008; 128; 64 e 0,15 µg/mL, respectivamente.

O pectinólido A apresentou CIM de 32 µg/mL para ATCC 25923 e 128 µg/mL para as demais cepas. O pectinólido B apresentou CIM de 128 µg/mL para ATCC 25923 e 256 µg/mL para as demais cepas. O pectinólido C apresentou CIM de 64; 256; 128 e 128 µg/mL, respectivamente, enquanto o pectinólido H apresentou CIM de 32 µg/mL para ATCC 25923 e 64 µg/mL para as demais cepas [18]. De acordo com a escala proposta por Ríos e Recio (2005) de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, os pectinólidos A e C apresentaram moderada atividade antibacteriana frente à cepa ATCC 25923 (CIM entre 10-100 µg/mL), e atividade inativa para as demais cepas (CIM > 100 µg/mL). O pectinólido B apresentou-se inativo às cepas avaliadas, o pectinólido H apresentou atividade moderada frente as quatro cepas avaliadas. Os pectinólidos A, C e H possuem potenciais como agentes antibacterianos, em especial, o pectinólido H com melhores resultados, principalmente frente à cepa SA-1199B com mesmo CIM obtido para fármaco de referência [18] [68].

Nos ensaios de citotoxicidade para as células KB, os pectinólidos A e C apresentaram DE<sub>50</sub> de 0,63 e 2,52 µg/mL, respectivamente, enquanto os pectinólidos B e H apresentaram DE<sub>50</sub> > 20 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado a elipticina (DE<sub>50</sub> = 0,10 µg/mL) [18]. Os pectinólidos A e C possuem potenciais como protótipo a fármaco antitumoral frente às células KB, devido aos baixos valores obtidos (DE < 4,0 µg/mL) [70], além disso, os valores são semelhantes ao do fármaco de referência.

Martínez-Fructuoso *et al.* (2019) isolaram os pectinólidos A-C e pela primeira vez, os pectinólidos I-M, provenientes dos extratos diclorometano das partes aéreas de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada. Os efeitos citotóxicos dessas substâncias foram avaliados em células humanas de câncer mamário (MCF-7), cervical (HeLa) e colorretal (HCT-15). O pectinólido K apresentou as melhores atividades citotóxicas com CI<sub>50</sub> de 0,5; 0,7 e 0,8 µM, seguido

do pectinólido C com  $CI_{50}$  de 1,0; 0,3 e 2,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Como controle positivo foi utilizado a vimblastina, com  $CI_{50}$  de 0,012; 0,011 e 0,011  $\mu\text{M}$ , e a pironetina, com  $CI_{50}$  de 0,015; 0,092 e  $< 0,015$   $\mu\text{M}$ , respectivamente [19]. Apesar da diferença de valores entre essas hyptolactonas e os fármacos de referência, as substâncias inibiram a proliferação celular em baixas concentrações, logo, apresentam potencial como protótipo a fármaco antitumoral, sendo necessários estudos mais aprofundados de seus efeitos citotóxicos.

A atividade citotóxica dessas substâncias foi apoiada por estudos *in silico*, estudos de *docking molecular* indicaram que as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas da classe das hyptolactonas possuem alta afinidade pelo sítio de ligação da  $\alpha$ -tubulina à pironetina, o que pode ser um possível mecanismo que contribui para os seus potenciais citotóxicos. Das oito substâncias avaliadas, os pectinólidos L e M, que não possuem insaturação nos anéis lactônicos, não foram citotóxicos [19]. A ausência da  $\alpha,\beta$ -insaturação sugere que o efeito biológico das hyptolactonas é devida a presença da  $\alpha,\beta$ -insaturação na lactona.

Santana *et al.* (2019) isolaram o pectinólido E e o hyptólido, já conhecidos, e pela primeira vez, o pectinólido J', provenientes do extrato etanólico das inflorescências de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada. Essas hyptolactonas foram avaliadas quanto ao efeito citotóxico em células cancerígenas humanas de mama (MDA-MB-231). Considerando que as substâncias isoladamente tiveram baixa atividade citotóxica, os autores testaram as substâncias em mistura na mesma proporção em que elas se encontram no extrato. Desse modo, as substâncias apresentaram-se mais potentes com  $CI_{50}$  de 15,2; 5,6 e 28,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [16]. Os detalhes dessa avaliação foram mencionados anteriormente no item 2.5.2.1.

Martínez-Fructuoso *et al.* (2020) isolaram, pela primeira vez, os pectinólidos N-P, provenientes do extrato diclorometano das partes aéreas de *H. pectinata* e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos [20]. Até o momento, não há relatos científicos contendo atividades biológicas dos pectinólidos D, F, G, N-P.

Até o momento, não há relatos científicos que avaliaram a toxicidade do hyptólido e pectinólidos frente às células normais. Entretanto, a argenticlactona, uma

hyptolactona presente no óleo essencial de *H. ovalifolia*, teve seu efeito citotóxico e genotóxico avaliados frente às células normais de fibroblastos de pulmão humano (MRC5), a substância não apresentou citotoxicidade e nem genotoxicidade [77]. Além disso, a 4-deacetóxi-10-*epi*-olguina, hyptolactona presente nas partes aéreas de *H. oblongifolia* [78] e as xylariaopironas E-G, hyptolactonas presentes no fungo *Xylariales* sp. [79], não apresentaram efeito de letalidade frente a *Artemia salina* Linnaeus, sendo um indicativo de baixa toxicidade para essas substâncias [78]. Como relatado no item 2.5.1.3, os extratos etanólicos das inflorescências, folhas, ramos e raízes de *H. pectinata* não apresentaram citotoxicidade frente às células normais de mama humano (MCF-10A) [16]. Com estes resultados, alinhados aos resultados de toxicidade dessas outras hyptolactonas, podemos supor que o hyptolido e os pectinolidos podem ser atóxicos ou apresentarem baixas toxicidades.

## 2.6 Revisões literárias envolvendo as hyptolactonas

O hyptolido e os pectinolidos tiveram seus efeitos antibacterianos e citotóxicos frente às células tumorais avaliados [9,18]. Vale destacar que os pectinolidos L e M não possuem insaturação nas lactonas e não apresentaram citotoxicidade [19], nos levando a acreditar que o potencial terapêutico desses metabólitos secundários é devido à presença de lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada que age como eletrófilo em reações de “adição de Michael” [28]. Como relatado nos parágrafos finais da introdução desta dissertação, uma das possíveis maneiras de averiguar a autenticidade dessa informação seria através da busca por estudos de revisão por metabólitos secundários que sejam 5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona e análogos nas bases de dados científicas eletrônicas.

Em agosto de 2020 e em dezembro de 2021 foram feitas buscas por artigos de revisão envolvendo essas substâncias, nas bases de dados Science Direct, Scopus, PubMed e Web of Science, com a seguinte estratégia de busca: "5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone" OR "5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one" AND "review". A busca foi filtrada para que os termos aparecessem nos títulos, resumos ou palavras-chave dos artigos. Foram encontrados apenas 4 artigos de revisão nas bases de dados PubMed, Science Direct e Scopus, entretanto, nenhum deles apresentaram informações sucintas, correlacionando o potencial terapêutico dessas substâncias a presença de lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

Na tentativa de obter mais informações a respeito dessa classe de metabólitos secundário, seria necessária uma busca bibliográfica mais aprofundada. Essa busca bibliográfica poderia ser realizada utilizando as diretrizes de uma revisão sistemática. Assim como outros tipos de estudo de revisão, a revisão sistemática utiliza como fonte de informação a literatura sobre determinado tema, entretanto seu desenvolvimento utiliza metodologias sistematizadas e explícitas na identificação e avaliação dos estudos relevantes sobre uma questão abordada objetiva e imparcial, envolvendo o trabalho de pelo menos dois revisores que avaliam de forma independente cada referência selecionada, a fim de obter uma maior qualidade metodológica [37,38].

Com base no exposto, o capítulo 2 desta dissertação foi voltado ao levantamento bibliográfico de todas as hyptolactonas provenientes de fontes naturais e os seus potenciais biológicos por meio de uma revisão sistemática. O capítulo 3 foi desenvolvido com base no que foi observado no capítulo 2, sobre os efeitos antimicrobianos das hyptolactonas, no qual foi relatado o isolamento do hyptolido e pectinólidos das partes aéreas de *H. pectinata* para investigação do potencial antibacteriano frente a espécie *S. pyogenes*.

# CAPÍTULO 2

## REVISÃO SISTEMÁTICA

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar um levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários denominados hyptolactonas, originadas de fontes naturais, e suas atividades biológicas por meio de revisão sistemática.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Buscar os trabalhos científicos nas bases de dados eletrônicas PubMed Central (PMC), Science Direct, Scopus e Web of Science por meio de estratégias de busca formulada;
- Realizar a triagem dos resultados da busca de forma independente entre os revisores para inclusão de artigos em síntese qualitativa;
- Tabular todos os metabólitos secundários denominados hyptolactonas originados de fontes naturais;
- Tabular todos os metabólitos secundários denominados hyptolactonas com atividades biológicas;
- Avaliar o risco de viés dos artigos envolvendo análise do potencial biológico das hyptolactonas em estudos de intervenções em animais, de acordo com ferramenta SYRCLE (*systematic review center for laboratory animal experimentation*), de maneira independente entre os revisores;
- Avaliar a qualidade metodológica entre os dois revisores por meio do Coeficiente Kappa de Cohen, nas etapas de triagem e inclusão dos artigos no estudo e na etapa de avaliação do risco de viés.

## 4 METODOLOGIA

A revisão sistemática foi realizada de acordo com a recomendação PRISMA 2020 (*Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*). Após formular uma pergunta de revisão, a recomendação consiste em um *checklist* com 27 itens e um fluxograma representando todo o processo desde a busca até a inclusão dos estudos, com o objetivo de aumentar a qualidade e confiabilidade de revisões sistemáticas e meta-análises [37,38].

### 4.1 Critérios de elegibilidade

A revisão sistemática foi elaborada por dois revisores: Felipe Gabriel Henrique Julião (FGHJ) e Prof. Dr. James Almada da Silva (JAS), respectivamente, orientando e orientador. Seu desenvolvimento foi realizado com o intuito de responder a seguinte pergunta: “Quais são as hyptolactonas originadas de fontes naturais e os seus potenciais biológicos?”

A pergunta de revisão foi formulada de acordo com a Estratégia PCC, representada pelo mnemônico: população (P), conceito (C) e contexto (C). A estratégia PCC é utilizada por fornecer uma visão ampla de um tópico na formulação de uma pergunta [80], nesse caso, seria a identificação de todas as hyptolactonas originadas de fontes naturais e de maneira geral, os seus potenciais biológicos. A atribuição do mnemônico para a pergunta adotada foi formulada da seguinte maneira: hyptolactonas (população); identificar o número máximo de hyptolactonas existentes e seus potenciais biológicos (conceito); originadas de fontes naturais, podendo ser isoladas ou sintéticas (contexto).

Como o objetivo desta revisão sistemática é identificar todas os metabólitos secundários denominados hyptolactonas, originados de fontes naturais e os seus potenciais biológicos, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: artigos de diferentes datas de publicações, idiomas e periódicos; artigos de isolamentos das hyptolactonas com ou sem demonstrações de efeitos biológicos; e artigos de sínteses das hyptolactonas com demonstrações de efeitos biológicos. Como critérios de exclusão: artigos de revisão, notas, capítulos de livro e resumos por não serem artigos completos originais; artigos de sínteses das hyptolactonas sem demonstrações de efeitos biológicos; artigos de isolamentos ou sínteses das hyptolactonas com

resultados pré-especificados das atividades biológicas, mas que não foram devidamente relatados nos estudos; e estudos de metabólitos secundários de diferentes estruturas químicas.

## 4.2 Fontes de informação

Para a adição dos artigos de interesse no estudo, a recomendação PRISMA 2020 estabelece três etapas: identificação, triagem e inclusão dos estudos, demonstradas em um fluxograma [37,38]. A etapa de identificação dos estudos foi realizada pelo revisor FGHJ. Foram utilizadas as bases de dados eletrônicas: PubMed Central (PMC), Science Direct, Scopus e Web of Science por meio de estratégias de busca formuladas pelos revisores (FGHJ e JAS). Logo após a etapa de triagem e inclusão, os revisores entraram em consenso para identificação de estudos adicionais por meio de citações dos artigos adicionados e nas quatro bases de dados adotadas, dessa vez, sem as estratégias de busca formuladas, a identificação destes estudos foi realizada pelo revisor FGHJ. A primeira busca das publicações científicas foi realizada em 20 de agosto de 2020 e a última busca foi realizada em 21 de dezembro de 2021.

## 4.3 Estratégias de busca

Foram utilizadas as plataformas DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e MeSH (*Medical Subject Headings*) para busca de descritores referentes as palavras-chave 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone, 5,6-dihydro-2H-pyran-2-one, 6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one,  $\delta$ -lactone e  $\alpha$ -pyrone para formular estratégias de busca para a localização de relatos científicos nas bases de dados adotadas, entretanto, nenhum descritor foi encontrado. Dessa forma, formulou-se as estratégias de busca por meio destas palavras-chave e suas variações, alinhadas aos operadores booleanos. Foi utilizada a mesma estratégia de busca nas bases de dados PMC e Scopus, sendo reduzida na Web of Science, por apresentar melhores resultados, e na Science Direct, devido ao limite de operadores booleanos suportados. As estratégias de busca são demonstradas no Quadro 1.

**Quadro 1** – Estratégias de busca adotadas para busca dos registros nas bases de dados.

Bases de dados	Estratégias de busca
PMC	"δ-lactone" OR "delta-lactone" OR "δ-lactones" OR "delta-lactones" OR "α-pyrone" OR "α-pyrones" AND "5,6-dihydro-α-pyrone" OR "5,6-dihydro-α-pyrones" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones"
Science Direct	"δ-lactone" AND "5,6-dihydro-α-pyrone" OR "5,6-dihydro-α-pyrones" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones"
Scopus	"δ-lactone" OR "delta-lactone" OR "δ-lactones" OR "delta-lactones" OR "α-pyrone" OR "α-pyrones" AND "5,6-dihydro-α-pyrone" OR "5,6-dihydro-α-pyrones" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones"
Web of Science	"δ-lactone" OR "δ-lactones" OR "α-pyrone" OR "α-pyrones" AND "5,6-dihydro-α-pyrone" OR "5,6-dihydro-α-pyrones" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one" OR "6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones"

**Fonte:** Próprio autor.

Para as bases de dados Science Direct, Scopus e Web of Science, a busca dos registros foi filtrada para que os termos das estratégias de busca aparecessem nos títulos, resumos ou palavras-chave. A busca foi realizada sem ausência dos filtros adotados na PMC, devido a pequena quantidade de registros encontrados ao realizar tal combinação com a estratégia de busca adotada ou com uma estratégia de busca menos delimitada. A não utilização dos filtros não impossibilitou a presença dos termos selecionados nos títulos, resumos ou palavras-chave dos registros com a estratégia de busca adotada.

#### 4.4 Processo de seleção

Após a extração dos registros das bases de dados, os relatos duplicados e os sem acesso foram descartados na etapa de identificação pelo revisor FGHJ. A

avaliação dos estudos para serem adicionados na revisão sistemática foi realizada na etapa de triagem e inclusão, realizadas pelos dois revisores de forma independente, as discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão.

A etapa de triagem da recomendação PRISMA 2020, utilizando estratégia(s) de busca formulada(s), é dividida em três subtriagens [37,38]. A primeira e segunda triagem foram realizadas com base nos termos das estratégias de busca presentes nos títulos, resumos ou palavras-chave dos registros, seguida da terceira triagem, utilizando o texto completo dos estudos elegíveis para inclusão. Foram analisados registros de diferentes datas de publicações, idiomas e periódicos na primeira triagem, os artigos de revisão, notas, capítulos de livro e resumos foram removidos por não serem artigos completos originais.

Os artigos remanescentes foram submetidos a segunda triagem e foram excluídos os artigos de sínteses de metabólitos secundários denominados hyptolactonas sem demonstrações de efeitos biológicos; e estudos de metabólitos secundários de diferentes estruturas químicas. Foram selecionados, os artigos de isolamentos de metabólitos secundários denominados hyptolactonas com ou sem demonstrações de efeitos biológicos; artigos de isolamentos de metabólitos secundários denominados hyptolactonas com demonstrações de efeitos biológicos, apoiados por estudos *in silico*; e artigos de sínteses de metabólitos secundários denominados hyptolactonas com demonstrações de efeitos biológicos. Na terceira e última triagem, os artigos selecionados foram avaliados em texto completo para serem incluídos no estudo, com a finalidade de excluir artigos com resultados pré-especificados das atividades biológicas, mas que não foram devidamente relatados nos estudos.

Com a etapa de inclusão dos estudos finalizada, foi feita a extração de dados dos artigos pelos dois revisores. Ao analisar os dados, os revisores entraram em consenso para inclusão de novos estudos por meio de citações dos artigos anteriormente adicionados e nas quatro bases de dados adotadas (PMC, Science Direct, Scopus e Web of Science), sem as estratégias de busca formuladas. Esses estudos não foram identificados pelas estratégias de busca por não possuírem os termos escolhidos nos títulos, resumos ou palavras-chave, ou por não estarem indexados nessas bases de dados.

#### 4.5 Processo de coleta de dados

Por meio das estratégias de busca formuladas, os registros extraídos das bases de dados pelo revisor FGHJ, foram adicionados a plataforma *online* Rayyan. É uma plataforma automatizada que auxilia pesquisadores no desenvolvimentos de revisões sistematizadas (revisões sistemáticas, meta-análises, revisões de escopo, etc.), útil para eliminação de duplicatas, organização e triagens dos registros, facilitando na separação de registros incluídos e excluídos, e decisões colaborativas [81].

Primeiramente, foi feita uma varredura para detecção de registros duplicados (indexador em mais de uma base de dados), os registros duplicados não detectados pela plataforma foram removidos manualmente. O mesmo revisor fez um mapeamento (tentativa de *download*) de todos os registros remanescentes, a fim de remover os registros sem acesso. Apesar de estarem indexados nas bases de dados adotadas, alguns registros não foram acessados, mesmo recorrendo a outras bases de dados ou páginas da web.

Logo após, seguiu-se com as etapas de triagem e inclusão, realizadas pelos dois revisores (FGHJ e JAS) por meio da opção de ocultação de procedimento presente na plataforma, garantindo a independência de cada revisor nessas etapas. Além das informações de ano de publicação, autores, títulos e resumos, a plataforma disponibiliza as informações do tipo de publicação de cada registro, auxiliando na exclusão dos artigos de revisão, notas, capítulos de livro e resumos por não serem artigos completos originais. Os revisores delimitaram os artigos passíveis de inclusão e exclusão, e ao finalizar, os resultados foram comparados de maneira automática, eventuais discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão.

Após a finalização da etapa de inclusão, foi realizada a extração dos dados dos artigos pelos dois revisores, organizados em documentos do programa Microsoft Word 2019. Ao analisar os dados, foi necessária a realização de uma nova busca por artigos por meio de outros métodos (relatados no item 4.4). A nova etapa de identificação foi realizada pelo revisor FGHJ, e as etapas de triagem e inclusão seguiu-se da mesma maneira demonstrada no parágrafo anterior.

Posteriormente, os revisores extraíram os dados dos artigos e todo o conteúdo seguinte (demonstrado em tópicos) presente nesta revisão sistemática, foi realizado

pelos dois participantes, e após a conclusão de cada tópico, foi verificada novamente a precisão quando as informações sobre qualquer um dos tópicos não foram claras.

#### 4.6 Nomenclatura da classe das hyptolactonas

Como foi relatado na introdução desta dissertação, os metabólitos secundários do grupo 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona e seus análogos não possuíam uma nomenclatura específica que englobassem essa classe de substâncias. Na etapa de triagem e inclusão foram avaliados registros de diferentes datas de publicações, idiomas e periódicos. No Rayyan foi possível determinar qual foi o primeiro artigo que relatou a obtenção desses metabólitos secundários, por meio de um filtro de ano de publicação dos artigos incluídos no estudo, e a partir da primeira substância isolada, a nomenclatura foi estabelecida. A nomenclatura adotada foi determinada em consenso pelos dois revisores.

#### 4.7 Risco de viés

Foi adicionado na revisão sistemática artigos envolvendo a análise do potencial biológico das hyptolactonas em estudos de intervenções em animais. Para esses artigos foi necessário avaliar o risco de viés (*risk of bias*), a fim de determinar a confiabilidade das intervenções. O procedimento foi realizado de acordo com a ferramenta SYRCLE, desenvolvida para avaliar o risco de viés em estudos de intervenções em animais [82], baseada na ferramenta RoB (*Risk of bias*) da *Cochrane Collaboration*, desenvolvida para avaliar o risco de viés de intervenções em estudos clínicos randomizados em seres humanos [83].

A ferramenta SYRCLE consiste em 10 questões de sinalização, referentes a 10 domínios. Os domínios englobam 6 tipos de vieses: viés de seleção, viés de desempenho, viés de detecção, viés de atrito, viés de relato e outro(s) vieses(vieses). Para o domínio outros vieses, ficou a critério dos revisores adicionar outros tipos de questões que pudessem levantar preocupações sobre a possibilidade de vieses, nesta revisão sistemática, foi determinada uma única pergunta na questão de sinalização que engloba esse domínio. Como resposta para cada questão de sinalização foi utilizado o julgamento: “sim”, sinalizando baixo risco de viés; “incerto”, sinalizando risco incerto de viés; ou “não”, sinalizando alto risco de viés. Assim, houve uma maior

transparência e aplicabilidade nos estudos com maiores quantidades de sim no julgamento, indicando procedimentos menos enviesados. As discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão.

A avaliação individual e avaliação geral do risco de viés dos estudos foram desenvolvidas nos programas computacionais Microsoft Word 2019 e Microsoft Excel 2019, respectivamente. As avaliações foram feitas pelos dois revisores de forma independente, as discordâncias foram resolvidas por meio de discussão.

#### **4.8 Avaliação de confiabilidade**

Foi utilizado o Coeficiente Kappa de Cohen [84] para avaliação da qualidade metodológica entre os dois revisores nas etapas de triagem e inclusão dos artigos no estudo e na etapa de avaliação do risco de viés, ambas realizadas independentemente entre os mesmos. O método adotado é usado para descrever e testar o grau de concordância e confiabilidade entre dois avaliadores em uma análise específica, fornecendo uma ideia do quanto os resultados se afastam daqueles esperados [84–86]. A análise estatística foi realizada na plataforma *online* GraphPad.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de estudos

Por meio de estratégias de busca formuladas, na etapa de identificação foram encontrados 292 registros nas quatro bases de dados consultadas. Desses, 39 registros foram encontrados no PubMed Central (PMC), 48 no Science Direct, 74 no Scopus e 131 no Web of Science. Foram removidos 92 registros antes da etapa de triagem, sendo 81 registros por estarem indexados em duas ou mais bases de dados e 11 registros sem acesso, resultando em 200 registros para serem avaliados na etapa de triagem.

Na primeira triagem foram excluídos 15 registros (11 artigos de revisão, 2 resumos, 1 capítulo de livro e 1 nota) por não serem artigos completos originais, restando 185 artigos avaliados na segunda triagem. Desses, foram excluídos 157 artigos, sendo 6 artigos de sínteses de metabólitos secundários denominados hyptolactonas sem demonstrações de efeitos biológicos, e 151 estudos de metabólitos secundários de diferentes estruturas químicas. Na terceira e última triagem, os 28 artigos selecionados foram avaliados em texto completo para elegibilidade, com a finalidade de excluir artigos com resultados pré-especificados das atividades biológicas, mas que não foram devidamente relatados nos estudos, entretanto, nenhum artigo foi excluído.

Os 28 artigos foram incluídos no estudo, sendo 23 artigos de isolamentos de metabólitos secundários denominados hyptolactonas. Desses, 11 artigos não avaliaram os efeitos biológicos [17,20,73,87–94]; 11 avaliaram os efeitos biológicos [22,23,71,78,95–101]; e 1 avaliou os efeitos biológicos, apoiados por estudos *in silico* [19]. Dentre os artigos de sínteses incluídos, em 3 avaliaram seus efeitos biológicos [102–104], entretanto, em outro artigo [30], os autores não informaram como obtiveram as hyptolactonas avaliadas biologicamente, supõem-se que suas obtenções ocorreram por sínteses, devido ao tipo de conteúdo abordado no estudo, resultando em 4 artigos de sínteses com demonstrações de efeitos biológicos. Por fim, foi incluído 1 artigo que relatou seus isolamentos e sínteses, em ambos os métodos de obtenções, com demonstrações de efeitos biológicos [9].

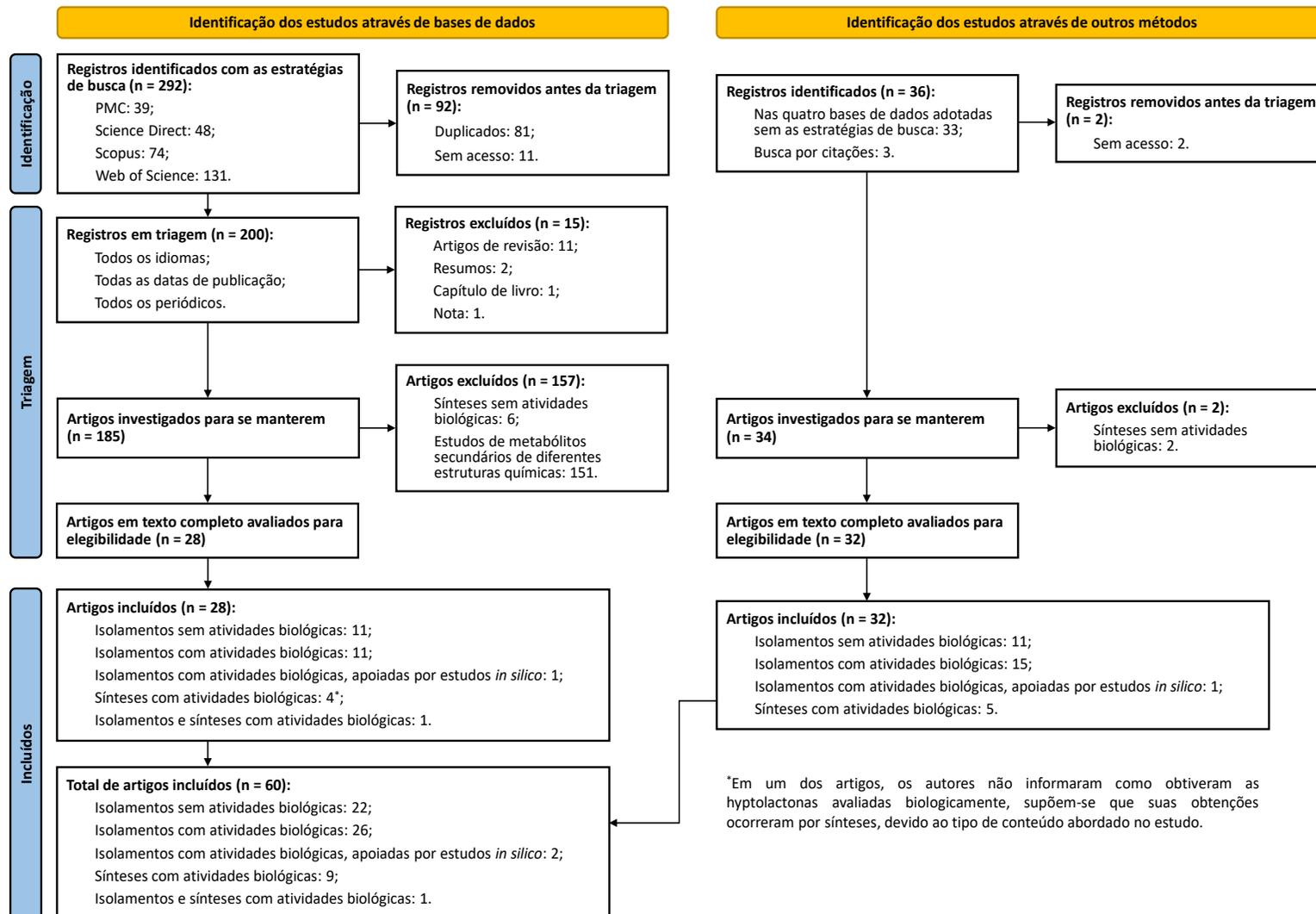
Posteriormente, os revisores entraram em consenso para inclusão de estudos através de outros métodos. Foram identificados 36 registros, sendo 3 identificados por meio de citações dos artigos anteriormente adicionados e 33 identificados por meio de busca nas quatro bases de dados adotadas (PMC, Science Direct, Scopus e Web of Science), sem as estratégias de busca formuladas.

Dos 36 registros identificados, foram removidos 2 registros sem acesso, resultando em 34 artigos avaliados na etapa de triagem, desta vez, dividida em duas subtriagens. Desses, 2 artigos foram excluídos na primeira triagem por serem artigos de sínteses de metabólitos secundários denominados hyptolactonas sem demonstrações de efeitos biológicos. Na segunda triagem, os 32 artigos selecionados foram avaliados em texto completo para elegibilidade com a finalidade de excluir artigos com resultados pré-especificados das atividades biológicas, mas que não foram devidamente relatados nos estudos, entretanto, nenhum artigo foi excluído.

Os 32 artigos foram incluídos no estudo, sendo 5 artigos de sínteses de metabólitos secundários denominados hyptolactonas com demonstrações de efeitos biológicos [105–109] e 27 artigos que relataram seus isolamentos. Dentre os artigos de isolamentos, 11 artigos não avaliaram os efeitos biológicos [25,26,72,76,110–116]; 15 avaliaram os efeitos biológicos [16,18,79,117–120,24,31,62,65,70,74,75,77]; e 1 avaliou os efeitos biológicos, apoiados por estudos *in silico* [121].

No contexto geral, dos 234 registros avaliados independentemente pelos dois revisores (registros das etapas de triagem e inclusão), foram adicionados à revisão sistemática 60 artigos envolvendo as hyptolactonas, sendo 22 artigos de isolamentos sem demonstrações de efeitos biológicos [17,20,90–94,110–114,25,115,116,26,72,73,76,87–89]; 26 artigos de isolamentos com demonstrações de efeitos biológicos [16,18,74,75,77–79,95–99,22,100,101,117–120,23,24,31,62,65,70,71]; 2 artigos de isolamentos com demonstrações de efeitos biológicos, apoiados por estudos *in silico* [19,121]; 9 artigos de sínteses com demonstrações de efeitos biológicos [30,102–109]; e 1 artigo de isolamentos e sínteses, em ambos os métodos de obtenções, com demonstrações de efeitos biológicos [9]. Um fluxograma ilustrando os estágios progressivos para inclusão dos artigos na revisão sistemática, elaborado de acordo com a recomendação PRISMA 2020 [37,38], é demonstrado na Figura 7.

**Figura 7 – Fluxograma PRISMA com as diferentes fases de uma revisão sistemática para inclusão de estudos de metabólitos secundários denominados hyptolactonas.**



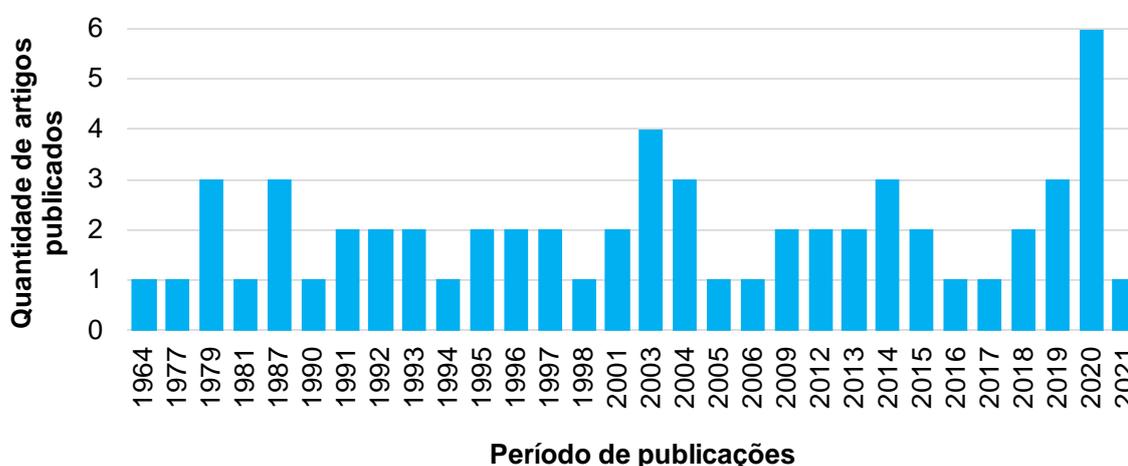
Fonte: Próprio autor.

Como relatado no item 4.3 da metodologia, a busca dos relatos científicos nas bases de dados Science Direct, Scopus e Web of Science foi filtrada para que os termos das estratégias de busca aparecessem nos títulos, resumos ou palavras-chave dos registros, diferentemente da PMC, ao utilizar os filtros, foram encontrados apenas 2 registros, logo, a busca dos relatos científicos foi realizada sem ausência de filtros, resultando em 39 registros. a diferença de resultados pode ser atribuída ao fato da PMC ser uma base de dados voltada a revistas científicas da área da saúde.

## 5.2 Processo de determinação da nomenclatura hyptolactona

Foi observado que os 60 artigos adicionados na revisão sistemática foram todos escritos em inglês e publicados entre os anos de 1964-2021. Desses, foi publicado um artigo por ano em 1964 [25], 1977 [72], 1981 [114], 1990 [78], 1994 [90], 1998 [94], 2005 [18], 2006 [102], 2016 [119], 2017 [95] e 2021 [87]; foram publicados dois artigos por ano em 1991 [76,89], 1992 [65,75], 1993 [9,116], 1995 [73,91], 1996 [92,93], 1997 [70,117], 2001 [96,105], 2009 [30,98], 2012 [103,108], 2013 [74,99], 2015 [77,101] e 2018 [23,120], foram publicados três artigos por ano em 1979 [111–113], 1987 [26,88,115], 2004 [97,107,118], 2014 [100,109,121] e 2019 [16,19,24]; foram publicados quatro artigos por ano em 2003 [17,71,106,110]; por fim, foram publicados seis artigos por ano em 2020 [20,22,31,62,79,104]. Uma melhor representação está sendo demonstrada na Figura 8.

**Figura 8** – Quantidade de artigos publicados entre o período de 1964-2021 dos 60 artigos envolvendo as hyptolactonas, adicionados na revisão sistemática.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se na Figura 8 que o primeiro relato desses metabólitos secundários foi no estudo de Birch e Butler (1964), com o isolamento do hyptolido das folhas de *H. pectinata* [25]. Como relatado no item 2.5.2.1 (página 40), essa lactona foi isolada primeiramente das folhas da espécie por Gorter (1920) [66], entretanto, sua estrutura química foi revisada e passou-se a ser uma  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada com uma cadeia lateral de sete carbonos, ou comumente chamada de 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona, a partir dos estudos de Birch e Butler (1964) e Achmad *et al.* (1987) [26]. Os autores desta revisão sistemática atribuíram a nomenclatura hyptolactona (hyptolido + lactona), devido ao hyptolido ser a primeira 6-heptil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona, obtida de fonte natural, com o objetivo de unificar os metabólitos secundários desse grupamento e seus análogos:  $\delta$ -lactona e  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada, ambas com uma cadeia lateral de sete carbonos; e  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada com uma cadeia lateral de oito carbonos.

### 5.3 Características dos estudos

Após a etapa de inclusão dos artigos na revisão sistemática, verificou-se que há 86 metabólitos secundários da classe das hyptolactonas. Dos 86 metabólitos secundários encontrados, 72 foram encontrados em plantas das famílias Annonaceae [71], Aristolochiaceae [72], Lamiaceae [9], Lauraceae [73] e Verbenaceae [74], e 14 metabólitos secundários foram encontrados em fungos das famílias Clavicipitaceae [75], Nectriaceae [22], Trichocomaceae [24] e Xylariaceae [23].

As hyptolactonas isoladas de plantas foram: anamarina (**1**) [111], argentilactona (**2**) [117], boronolido (**3**) [115], brevipolidos A-O (**4-18**) [95,98,99,118], deacetilboronolido (**19**) [113], deacetilumuravumbolido/desacetilumuravumbolido (**20**) [91,113], hyptenolido (**23**) [100], hyptolido (**24**) [62], lippialactona (**25**) [74], monticolidos A-F (**26-31**) [19,87], monticofuranolido A (**78**) [20], neohyptolido (**32**) [101], olguina (**33**) [112], pectinolidos A-E (**34-38**), pectinolido F (**84**), pectinolidos G-H (**79-80**), pectinolidos I-K (**39-41**), pectinolidos L-M (**85-86**), pectinolidos N-P (**81-83**), pectinolido J' (**42**) [9,16–20], spicigera lactona (**43**) [116], spicigerolido (**44**) [96], synargentolidos A-E (**45-49**) [94], syndenolido (**50**) [90], synparvolidos A-C (**51-53**) [93], synrotolido (**54**) [88], umuravumbolido (**55**) [113], 1',2'-dideacetilboronolido (**57**) [114], 4-deacetóxi-10-*epi*-olguina (**58**) [78], 10-*epi*-olguina (**59**) [70], 6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*S*,2*R*-(di-hidróxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**60**), 6*R*-

[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*R*-(hidróxi)-2*R*-(metóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**61**), 6*R*-[1*R*,2*R*,5*R*,6*S*-(tetra-acetilóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**62**) [78], (6*R*)-(5'-oxo-hepten-1'*E*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**63**), (6*S*)-(5'-oxo-hepten-1'*Z*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**64**) [71,122], 6*R*-[2*R*,4*S*,6*S*-(triacetóxi)-heptil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**65**) [73,123] e (2'-acetóxi)-6-hept-4-enil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**66**) [92].

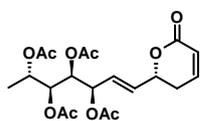
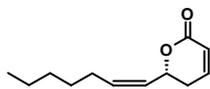
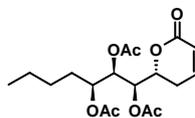
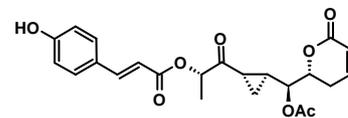
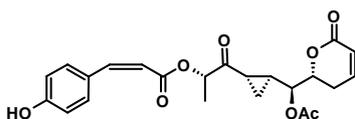
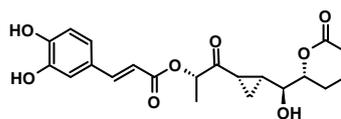
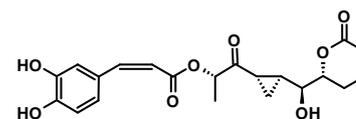
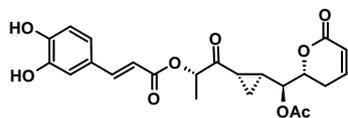
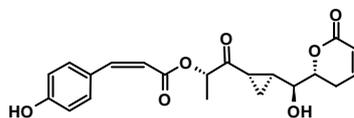
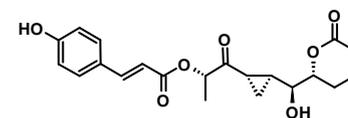
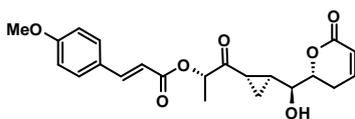
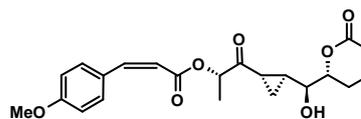
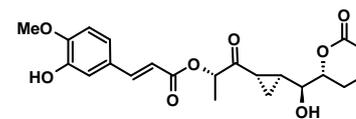
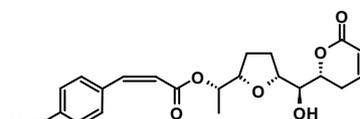
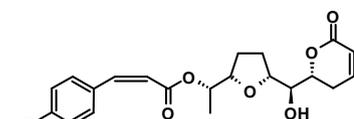
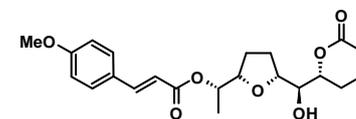
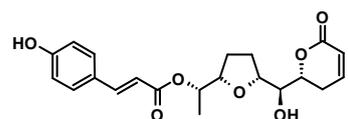
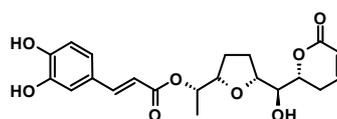
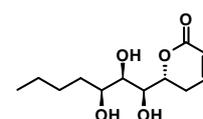
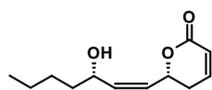
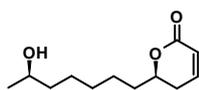
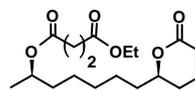
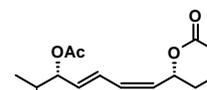
As hyptolactonas isoladas de fungos foram: fupironas A-B (**67-68**) [22], gamahonolidos A-B (**21-22**) [75], xylariaopirona A (**69**), xylariaopirona B (**56**), xylariaopirona C-G (**70-74**) [23,79], 6-(2'*R*-hidróxi-3'*E*,5'*E*-dieno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**75**), 6-(2'*S*-hidróxi-5'*E*-eno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**76**) e 6-(2'*S*-hidróxi-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**77**) [24].

A classe das hyptolactonas é composta de 66  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas e 20 lactonas análogas. Dentre as 66  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, 63 foram isoladas de plantas: **1** [111], **2** [117], **3** [115], **4-18** [95,98,99,118], **19** [113], **20** [91], **23** [100], **24** [62], **25** [74], **26**, **27** [19], **28-31** [87], **32** [101], **33** [112], **34-36** [9], **37**, **38** [17], **39-41** [19], **42** [16], **43** [116], **44** [96], **45-49** [94], **50** [90], **51-53** [93], **54** [88], **55** [113], **57** [114], **58** [78], **59** [70], **60-62** [78], **63**, **64** [71,122], **65** [73,123] e **66** [92], e 3 isoladas de fungos: **21**, **22** [6] e **56** [23] (Figura 9).

Dentre as 20 lactonas análogas, 11 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas, ambas isoladas de fungos: **67**, **68** [22], **69-74** [23,79], **75**, **76** e **77** [24]. Três são  $\delta$ -lactonas sem insaturações no anel: **84-86**, ambas isoladas de plantas [17,19], e 6 são  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, ambas isoladas de plantas: **78** [20], **79** [17], **80** [18] e **81-83** [20]. Como os anéis das  $\gamma$ -lactonas possui um carbono a menos em comparação às  $\delta$ -lactonas, elas possuem um carbono a mais na cadeia lateral (Figura 9).

**Figura 9** – Representação das estruturas químicas das 86 hyptolactonas.

(continua)

 **$\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas**Anamarina  
(1)Argentilactona  
(2)Boronolido  
(3)Brevipolido A  
(4)Brevipolido B  
(5)Brevipolido C  
(6)Brevipolido D  
(7)Brevipolido E  
(8)Brevipolido F  
(9)Brevipolido G  
(10)Brevipolido H  
(11)Brevipolido I  
(12)Brevipolido J  
(13)Brevipolido K  
(14)Brevipolido L  
(15)Brevipolido M  
(16)Brevipolido N  
(17)Brevipolido O  
(18)Deacetilboronolido  
(19)Desacetilumravumbolido  
(20)Gamahonolido A\*  
(21)Gamahonolido B\*  
(22)Hyptenolido  
(23)

**Figura 9** – Representação das estruturas químicas das 86 hyptolactonas.

(continuação)

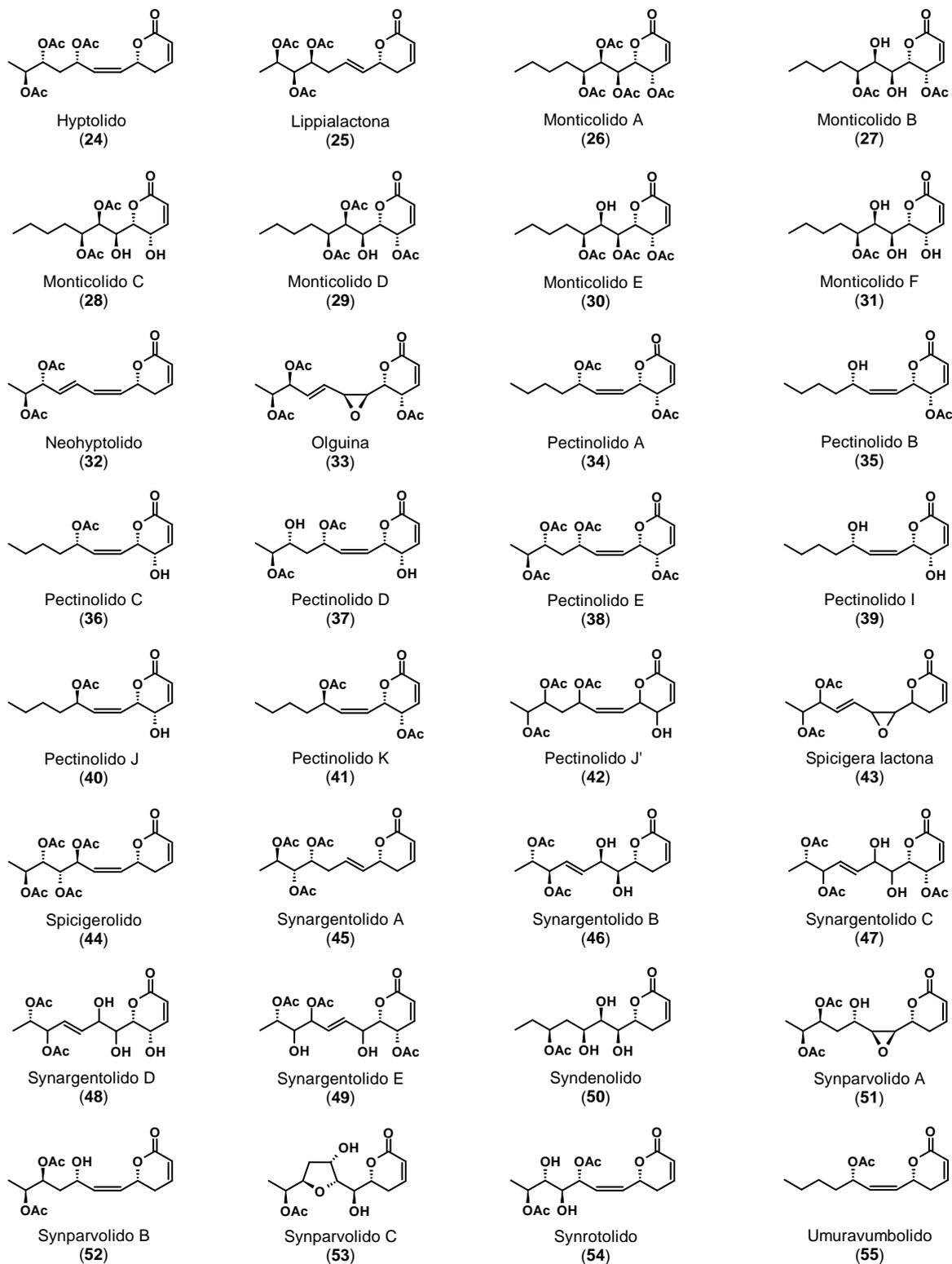
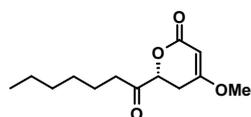
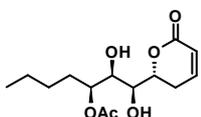
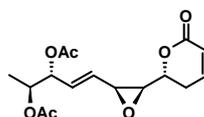
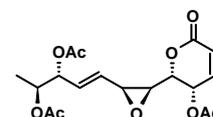
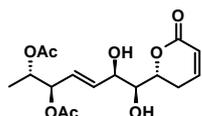
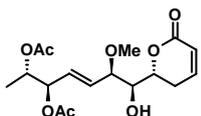
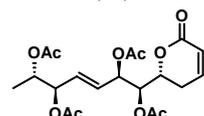
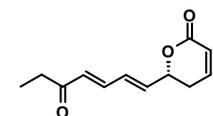
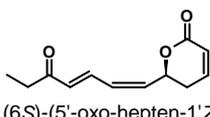
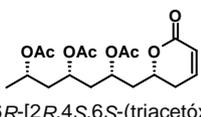
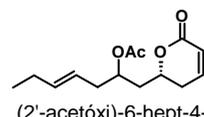
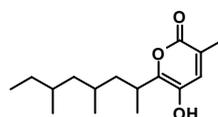
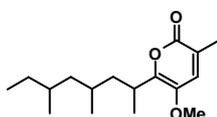
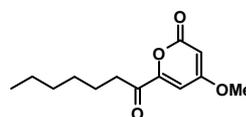
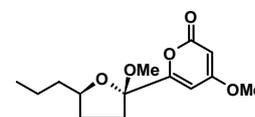
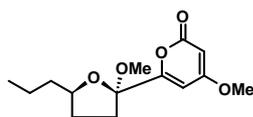
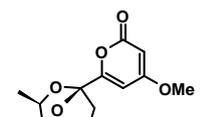
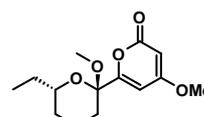
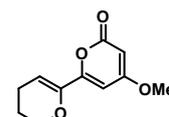
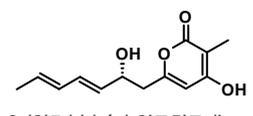
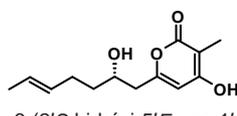
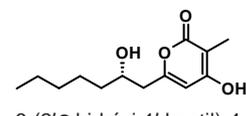


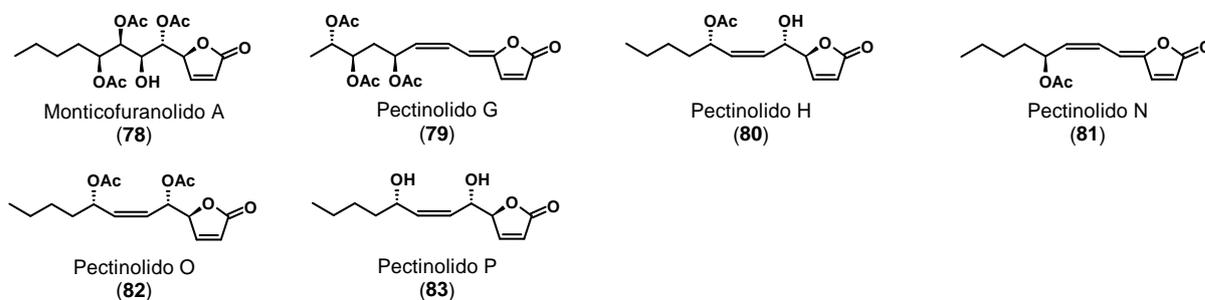
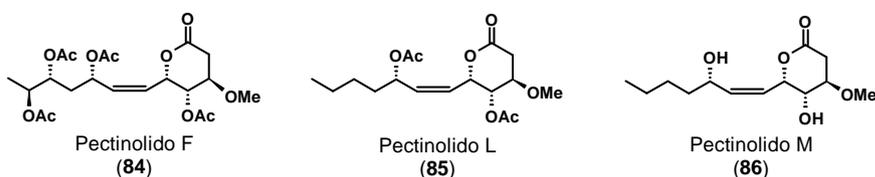
Figura 9 – Representação das estruturas químicas das 86 hyptolactonas.

(continuação)

Xylariaopirona B\*  
(56)1',2'-Dideacetilboronolido  
(57)4-Deacetóxi-10-*epi*-olguina  
(58)10-*epi*-Olguina  
(59)6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*S*,2*R*-(di-hidróxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(60)6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*R*-(hidróxi)-2*R*-(metóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(61)6*R*-[1*R*,2*R*,5*R*,6*S*-(tetra-acetilóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(62)(6*R*)-(5'-oxo-hepten-1'*E*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(63)(6*S*)-(5'-oxo-hepten-1'*Z*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(64)6*R*-[2*R*,4*S*,6*S*-(triacetóxi)-heptil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(65)(2'-acetóxi)-6-hept-4-enil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona  
(66) **$\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas**Fupirona A\*  
(67)Fupirona B\*  
(68)Xylariaopirona A\*  
(69)Xylariaopirona C\*  
(70)Xylariaopirona D\*  
(71)Xylariaopirona E\*  
(72)Xylariaopirona F\*  
(73)Xylariaopirona G\*  
(74)6-(2'*R*-hidróxi-3'*E*,5'*E*-dieno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona\*  
(75)6-(2'*S*-hidróxi-5'*E*-eno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona\*  
(76)6-(2'*S*-hidróxi-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona\*  
(77)

**Figura 9** – Representação das estruturas químicas das 86 hyptolactonas.

(conclusão)

 **$\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas** **$\delta$ -lactonas****Fonte:** Próprio autor.**Nota:** \*Hyptolactonas isoladas de fungos.

As hyptolactonas estão presentes majoritariamente em plantas da família Lamiaceae, correspondendo a 67 das 72 hyptolactonas isoladas de plantas. São elas: **1** [111], **2** [120], **3** [115], **4-18** [95,98,99], **19** [113], **20** [91], **23** [100], **24** [62], **26**, **27** [19], **28-31** [87], **32** [101], **33** [112], **34-36** [9], **37**, **38** [17], **39-41** [19], **42** [16], **43** [116], **44** [96], **45-49** [94], **50** [90], **51-53** [93], **54** [88], **55** [113], **57** [114], **58** [78], **59** [70], **60-62** [78], **78** [20], **79** [17], **80** [18], **81-83** [20], **84** [17], **85** e **86** [19].

A substância **2** também foi encontrada na família Aristolochiaceae [72], e juntamente com a substância **63** e **64** foram encontradas na família Annonaceae [71,122]. As substâncias **10-12** também foram encontradas na família Verbenaceae [118], assim como a substância **25** [74]. Na família Lauraceae foram encontradas as substâncias **65** [73,123] e **66** [92].

Das hyptolactonas presentes em fungos, as substâncias **21** e **22** foram encontradas na família Clavicipitaceae [75], **67** e **68** na família Nectriaceae [22], **56**,

**69-74** na família Xylariaceae [23,79], e as substâncias **75**, **76** e **77** na família Trichocomaceae [24].

### 5.3.1 *Efeitos biológicos das hyptolactonas*

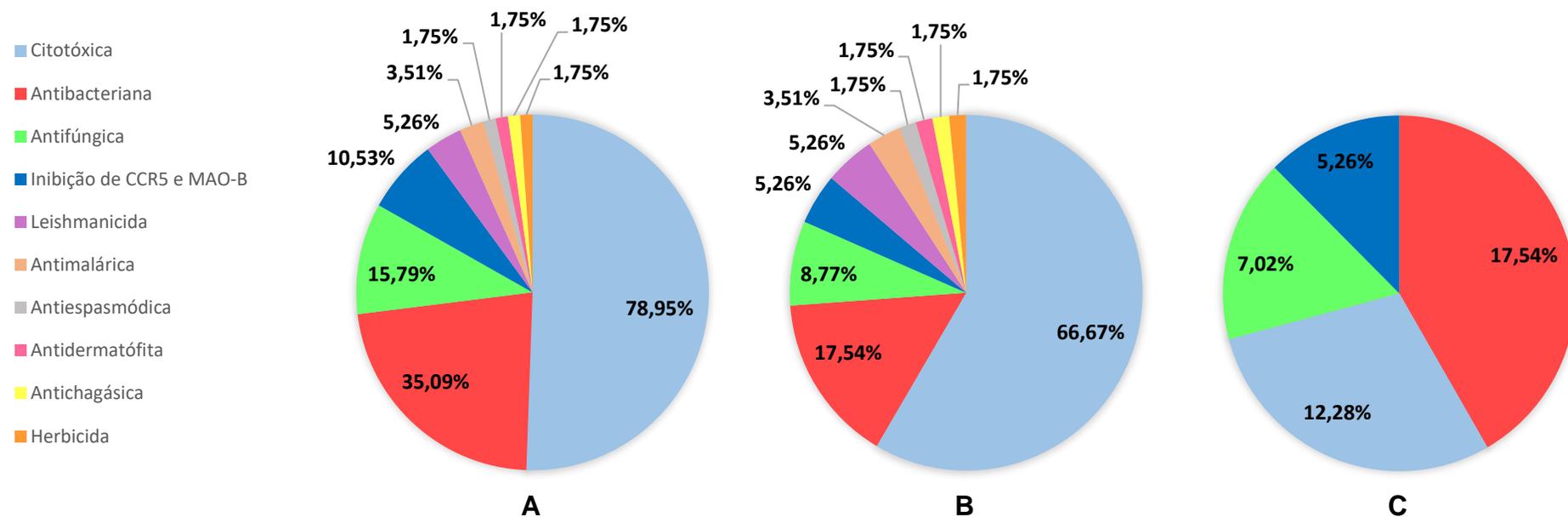
Das 86 hyptolactonas presentes na revisão sistemática, 27 não foram submetidas a ensaios biológicos, sendo 26 originadas de plantas e 1 originada de fungo. Dentre as originadas de plantas, 20 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas: **1** [111], **28-31** [87], **33** [112], **37** [17], **43** [116], **45-49** [94], **50** [90], **51-53** [93], **57** [114], **65** [73,123] e **66** [92]; 5 são  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas: **79** [17], **81-83** e **78** [20], e apenas 1  $\delta$ -lactona: **84** [17]. Das lactonas provenientes de fungos, apenas a substância **22** ( $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada), não teve seu potencial biológico avaliado [75].

Tiveram seus potenciais biológicos avaliados 59 hyptolactonas, sendo 46 originadas de plantas e 13 originadas de fungos. As hyptolactonas **67** e **68**, originadas de fungo, foram avaliadas quanto ao efeito antibacteriano, entretanto, os resultados não foram apresentados [22]. Desse modo, das 59 hyptolactonas, 57 tiveram algum tipo de atividade biológica comprovada. A essas 57 substâncias foram atribuídas atividade citotóxica frente às células cancerígenas (78,95%), antibacteriana (35,09%), antifúngica (15,79%), inibição de CCR5<sup>1</sup> e monoamina oxidase B (MAO-B) (10,53%), leishmanicida (5,26%), antimalárica (3,51%), antiespasmódica (1,75%), antidermatófito (1,75%), antichagásica (1,75%) e herbicida (1,75%). Gráficos de setores com valores percentuais das 46 hyptolactonas provenientes de plantas e das 11 hyptolactonas provenientes de fungos com efeitos biológicos comprovados são demonstrados na Figura 10.

---

<sup>1</sup> C-C receptor quimiocina tipo 5 (CCR5), um dos principais correceptores do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).

**Figura 10** – Gráfico de setores com valores percentuais de atividades biológicas atribuídas a 57 hyptolactonas: 46 originadas de plantas e 11 originadas de fungos (A); atribuídas a 46 hyptolactonas originadas de plantas (B); atribuídas a 11 hyptolactonas originadas de fungos (C).



Fonte: Próprio autor.

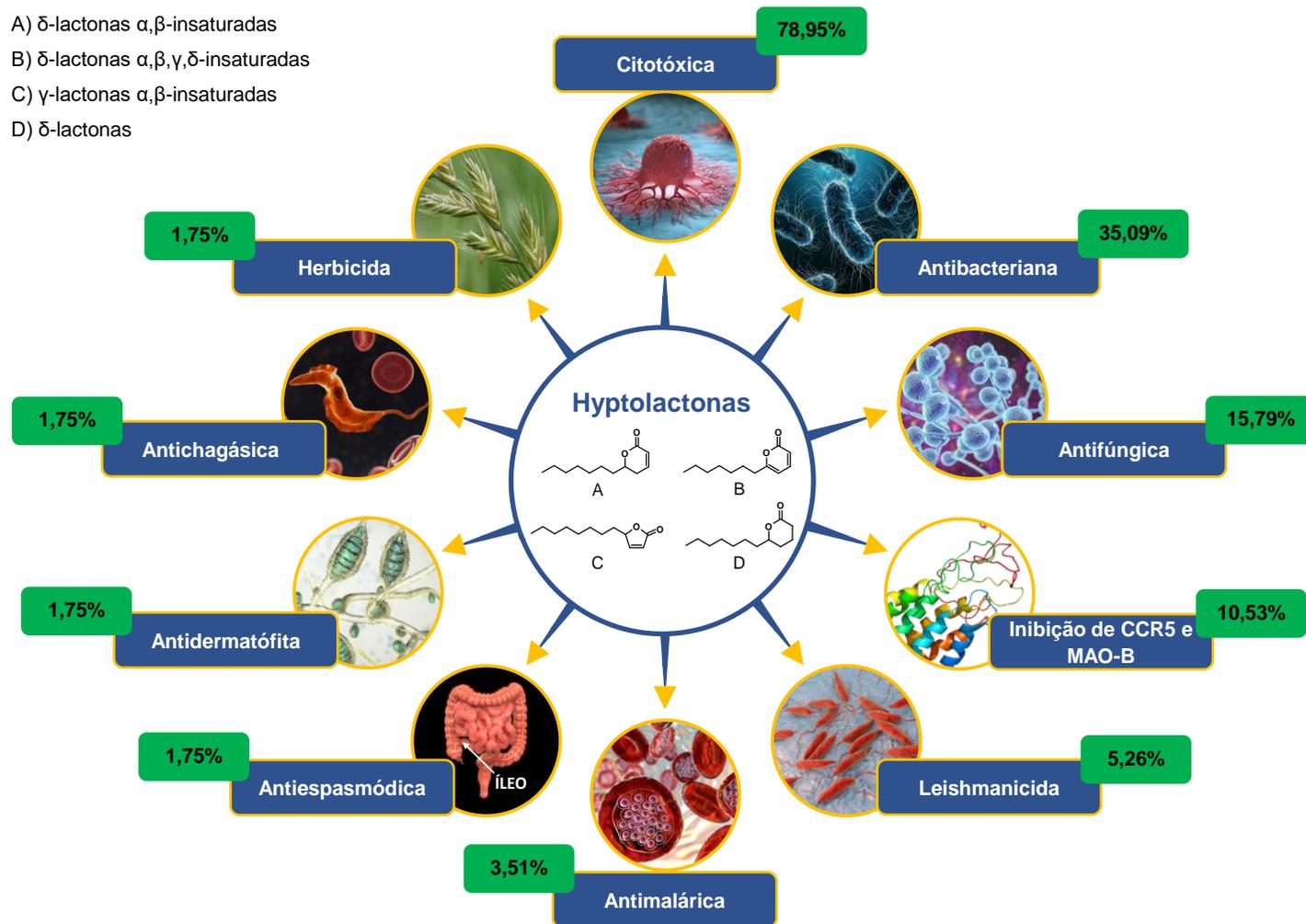
Como pode ser observado na Figura 10, a atividade biológica predominante foi a citotóxica frente às células tumorais. Dentre as 45 hyptolactonas com atividade citotóxica (78,95%), 38 foram originadas de plantas: **2** [107], **3** [9], **4-18** [95,98,99], **20** [108], **24** [16], **26**, **27** [19], **34-36**, **80** [18], **39-41**, **85**, **86** [19], **38**, **42** [16], **44** [96], **54** [109], **55** [108], **58** [78], **59** [70] e **62** [78], e 7 foram originadas de fungos: **56**, **69-71** [23], **75**, **76** e **77** [24].

A segunda atividade biológica mais utilizada nos estudos foi a atividade antibacteriana, com 20 hyptolactonas avaliadas (35,09%). Dessas, 10 foram originadas de plantas: **24** [9], **32** [101], **34-36** [18], **58** [101], **60-62** [65] e **80** [18], e 10 foram originadas de fungos: **56**, **69-74** [23,79], **75-77** [24]. A atividade antifúngica foi atribuída a 9 hyptolactonas (15,79%), dentre elas, 5 foram originadas de plantas: **2** [119], **24**, **34-36** [9] e 4 originadas de fungos: **21** [75], **75-77** [24]. Foram atribuídas a atividade de inibição de CCR5 e MAO-B as 6 hyptolactonas (10,53%): **10-12** (originadas de plantas) foram atribuídas a inibição de CCR5 [118], **72-74** (originadas de fungos) foram atribuídas a inibição de MAO-B [79].

A atividade leishmanicida, antimalárica, antiespasmódica, antidermatófito, antichagásica e herbicida foram avaliadas apenas utilizando as hyptolactonas originadas de plantas: **2** [117], **63** e **64** [71,122] quanto ao potencial leishmanicida (5,26%); **2** [71] e **25** [74] quanto ao potencial antimalárico (3,51%); **2** quanto ao potencial antichagásico [102] e antidermatófito [97]; **3** quanto ao potencial herbicida [103]; e **23** quanto ao potencial antiespasmódico [100], correspondendo a 1,75% cada uma dessas atividades.

Uma representação com as 10 atividades biológicas atribuídas as 57 hyptolactonas está demonstrada na Figura 11, enquanto no Quadro 2 é demonstrada as atividades biológicas das 57 hyptolactonas isoladas de plantas e fungos, e seus respectivos percentuais, e como observado, as hyptolactonas isoladas de fungos incluídas no estudo foram obtidas em menores quantidades, conseqüentemente, uma menor variedade de ensaios biológicos foi realizada. Um fluxograma ilustrando o número total de hyptolactonas com efeitos biológicos comprovados presentes nos 60 artigos incluídos nesse estudo é demonstrado na Figura 12.

**Figura 11** – Percentuais das atividades biológicas atribuídas a 57 hyptolactonas.



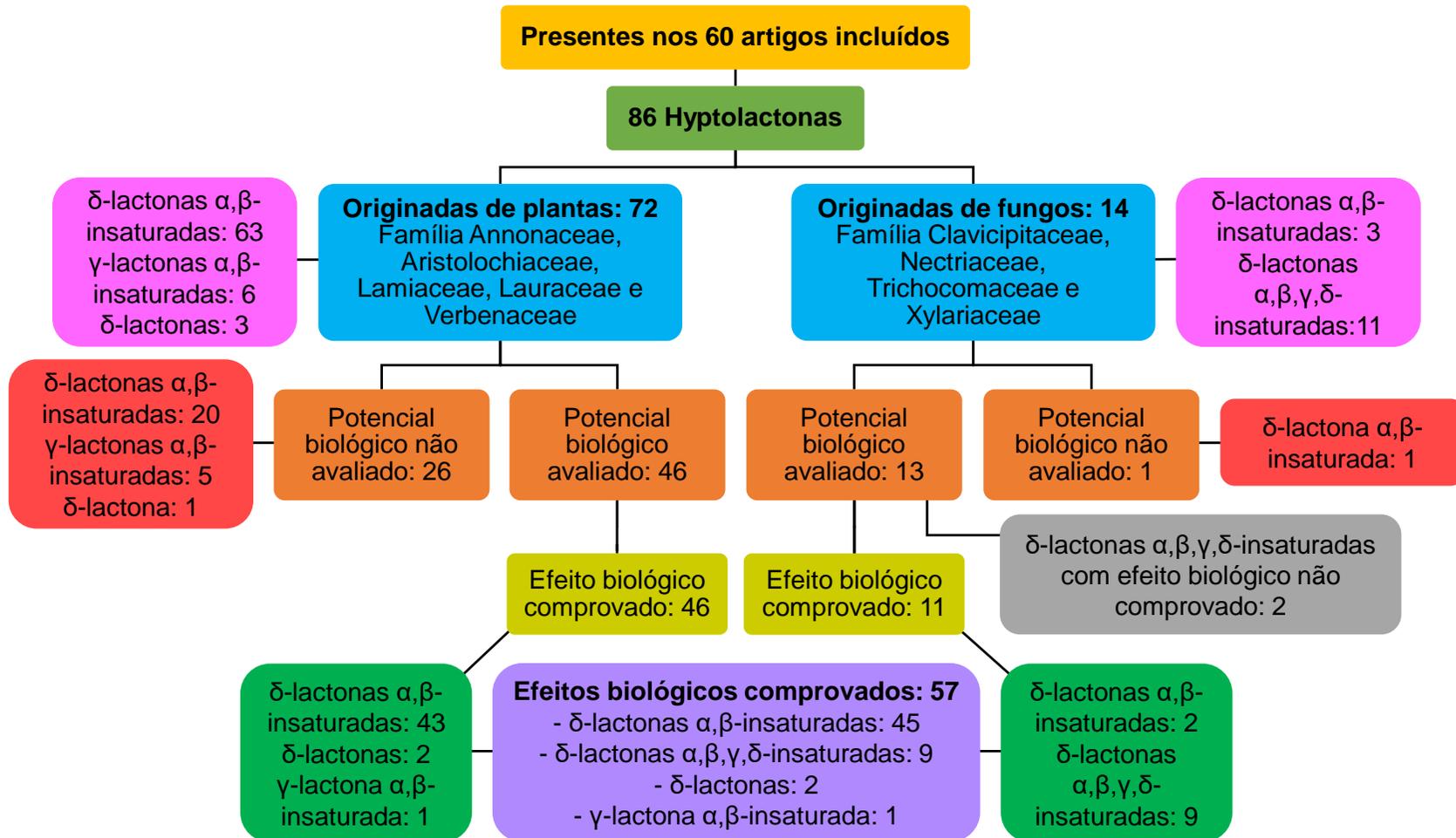
Fonte: Próprio autor.

**Quadro 2** – Atividades biológicas e respectivos percentuais das hyptolactonas naturais de plantas e fungos.

<b>Atividades biológicas (%)</b>	<b>Hyptolactonas</b>	<b>Ref.</b>
<b>Naturais de plantas</b>		
Citotóxica (66,67%)	2	[107]
	4-18	[95,98,99]
	20 e 55	[108]
	26, 27, 39-41, 85 e 86	[19]
	3 e 34-36	[9]
	24, 38 e 42	[16]
	80	[18]
	44	[96]
	54	[109]
	58 e 62	[78]
	59	[70]
Antibacteriana (17,54%)	24	[9]
	32	[101]
	34-36 e 80	[18]
	58	[101]
	60-62	[65]
Inibição de CCR5 (5,26%)	10-12	[118]
Antifúngica (8,77%)	24, 34-36	[9]
Antichagásica (1,75%)	2	[119]
Antidermatófito (1,75%)		[102]
Antimalárica (3,51%)		[97]
		[71]
Herbicida (1,75%)	25	[74]
Leishmanicida (5,26%)	3	[103]
	2	[117]
Antiespasmódica (1,75%)	63 e 64	[71]
	23	[100]
<b>Naturais de fungos</b>		
Citotóxica (12,28%)	56, 69-71	[23]
	75-77	[24]
Antibacteriana (17,54%)	56, 69-74	[23,79]
	75-77	[24]
Antifúngica (7,02%)	21	[75]
	75-77	[24]
Inibição de MAO-B (5,26%)	72-74	[79]

**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 12** – Fluxograma com o número total de hyptolactonas com efeitos biológicos comprovados, presentes nos 60 artigos incluídos no estudo.



Fonte: Próprio autor.

### 5.3.2 Sumarização dos resultados

O Quadro 3 fornece informações taxonômicas, efeitos biológicos, modelos biológicos e doses/concentrações/potências das 57 hyptolactonas que apresentaram atividades biológicas. Muitas hyptolactonas possuem em comum os modelos biológicos que foram utilizados, como por exemplo, os ensaios de citotoxicidade em células tumorais e ensaios antibacterianos. Determinados resultados apresentaram as respostas biológicas na forma de concentração inibitória em 50% (CI<sub>50</sub>), dose efetiva em 50% (DE<sub>50</sub>), inibição de crescimento (*grownt*) em 50% (IG<sub>50</sub>), concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). As informações quanto a família e a espécie de cada metabólito secundário nos ajudaram a observar quais hyptolactonas provem de espécies de taxonomias em comum. A taxonomia facilitou na determinação de quantas hyptolactonas foram isoladas de plantas e fungos, e em quais espécies e famílias essas substâncias foram encontradas majoritariamente.

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continua)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
2	<i>Annona haematantha</i> Miq.	Annonaceae	Leishmanicida <sup>α</sup>	Patas e baços de BALB/c infectados com <i>Leishmania amazonenses</i>	25 mg/kg	[117]
	<i>Raimondia cf. monoica</i> Saff.	Annonaceae	Antimalárico <sup>β</sup>	<i>Plasmodium falciparum</i>	DE <sub>50</sub> = 0,1 µg/mL	[71]
	<i>Hyptis ovalifolia</i> Benth.	Lamiaceae	Antidermatófito <sup>β</sup>	<i>Microsporum canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> .	CIM = 7,8-125 µg/mL	[97]
			CIM = 18 µg/mL na presença de glicose			
			9 µg/mL <sup>I</sup>	[77] [119]		
			Leveduras de <i>P. lutzii</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>P. americana</i> e <i>P. restrepiensis</i>	CFM = 4,5-36 µg/mL	[120]	
Mutantes silenciados de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	9, 18 e 36 µg/mL	[119]				

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
2	<i>Hyptis ovalifolia</i> Benth.	Lamiaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	Leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	36 µg/mL <sup>II</sup>	[120]
				Micélios de <i>P. lutzii</i>	9-72 µg/mL na presença de acetato e glicose	[121]
			Antifúngico <sup>γ</sup>	Isocitrato liase de <i>P. lutzii</i> ( <i>PblCL</i> )	18 µg/mL <sup>III</sup>	
				<i>PblCL</i> nativa de leveduras	CI <sub>50</sub> = 50 µM na presença de acetato	
					CI <sub>50</sub> = 80 µM na presença de glicose	
			<i>PblCL</i> recombinante de leveduras	CI <sub>50</sub> = 28,8 µM		
	Citotóxico <sup>β</sup>	A549 <sup>a</sup>	> 36 µg/mL	[120]		
	Sintetizada	-	Leishmanicida <sup>β</sup>	Promastigotas de <i>L. mexicana</i>	10 µg/mL	[105]
			Antichagásico <sup>β</sup>	Tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	CI <sub>50</sub> = 0,94 mM	[102]
			Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 14,7 µM	[107]
NCI-ADR <sup>a</sup>				CI <sub>50</sub> = 11,0 µM		
NCI 460 <sup>a</sup>				CI <sub>50</sub> = 14,3 µM		
UACC62 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 55,0 µM					
786-0 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 73,6 µM					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
2	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	OVCAR03 <sup>a</sup>	Cl <sub>50</sub> = 33,8 μM	[107]
				PCO 3 <sup>a</sup>	Cl <sub>50</sub> = 29,0 μM	
				HT-29 <sup>a</sup>	Cl <sub>50</sub> = 42,3 μM	
3	Sintetizada	-	Herbicida <sup>β</sup>	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	1 mM Broto: 20%. Raiz: 48%	[103]
				<i>Lactuca sativa</i> L.	1 mM Broto e raiz: 0%	
			Citotóxico <sup>β</sup>	BC1 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 2,8 μg/mL	[9]
				HT-1080 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 4,5 μg/mL	
				Lu1 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 3,9 μg/mL	
				Mel2 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 3,3 μg/mL	
				Col2 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 4,0 μg/mL	
				KB <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 4,0 μg/mL	
				KB-V <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 8,6 μg/mL	
				P-388 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 1,0 μg/mL	
				A431 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 6,5 μg/mL	
				LNCaP <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 3,2 μg/mL	
ZR75-1 <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 8,7 μg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
4	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> > 10 μM	[98]
				HT-29	DE <sub>50</sub> = 5,8 μM	
5	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> = 6,1 μM	[98]
				HT-29	DE <sub>50</sub> = 6,1 μM	
6	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> > 10 μM	[98]
7	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> > 10 μM	[98]
8	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> > 10 μM	[98]
9	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> = 6,7 μM	[98]
				HT-29	DE <sub>50</sub> = 7,5 μM	
10	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Verbenaceae	Inibição de CCR5 <sup>β,b</sup>	MIP-1 <sup>α</sup> <sup>b</sup>	CI <sub>50</sub> = 10 μg/mL	[118]
				MIP-1 <sup>β</sup> <sup>b</sup>	CI <sub>50</sub> = 7,2 μg/mL	
				RANTES <sup>b</sup>	CI <sub>50</sub> > 10 μg/mL	
	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	DE <sub>50</sub> = 3,6 μM	[98]
				HCT-15 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 8,4 μg/mL	[99]
MCF-7	CI <sub>50</sub> = 5,1 μg/mL					
KB	CI <sub>50</sub> = 0,3 μg/mL					
PC-3 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 5,1 μg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
10	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HeLa <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 0,07 µg/mL	[99]
				Hep-2 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 3,4 µg/mL	
11	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Verbenaceae	Inibição de CCR5 <sup>β</sup>	MIP-1α	CI <sub>50</sub> > 10 µg/mL	[118]
				MIP-1β	CI <sub>50</sub> = 5,5 µg/mL	
				RANTES	CI <sub>50</sub> = 8,7 µg/mL	
	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	CI <sub>50</sub> = 6,8 µg/mL	[99]
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 5,2 µg/mL	
				KB	CI <sub>50</sub> = 2,0 µg/mL	
PC-3	CI <sub>50</sub> = 5,4 µg/mL					
HeLa	CI <sub>50</sub> = 5,8 µg/mL					
Hep-2	CI <sub>50</sub> = 8,3 µg/mL					
12	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Verbenaceae	Inibição de CCR5 <sup>β</sup>	MIP-1α	CI <sub>50</sub> = 8,8 µg/mL	[118]
				MIP-1β	CI <sub>50</sub> = 6,0 µg/mL	
				RANTES	CI <sub>50</sub> > 10 µg/mL	
	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	CI <sub>50</sub> = 5,6 µg/mL	[99]
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 7,1 µg/mL	
				KB	CI <sub>50</sub> = 1,9 µg/mL	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
12	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	PC-3	Cl <sub>50</sub> = 4,7 µg/mL	[99]
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 4,4 µg/mL	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> = 6,3 µg/mL	
13	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> = 10,7 µg/mL	[99]
				MCF-7	Cl <sub>50</sub> = 3,5 µg/mL	
				KB	Cl <sub>50</sub> = 1,2 µg/mL	
				PC-3	Cl <sub>50</sub> = 5,8 µg/mL	
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 2,3 µg/mL	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> = 6,1 µg/mL	
14	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> > 10 µM	[95]
				MCF-7	Cl <sub>50</sub> > 10 µM	
				KB	Cl <sub>50</sub> = 9,5 µM	
				PC-3	Cl <sub>50</sub> = 10,0 µM	
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 4,2 µM	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> > 10 µM	
15	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> > 10 µM	[95]
				MCF-7	Cl <sub>50</sub> = 9,3 µM	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
15	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	KB	Cl <sub>50</sub> = 7,5 μM	[95]
				PC-3	Cl <sub>50</sub> = 8,8 μM	
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 3,3 μM	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> = 7,7 μM	
16	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	[95]
				MCF-7	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	
				KB	Cl <sub>50</sub> = 1,7 μM	
				PC-3	Cl <sub>50</sub> = 7,5 μM	
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 6,0 μM	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> = 5,7 μM	
17	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	[95]
				MCF-7	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	
				KB	Cl <sub>50</sub> = 3,6 μM	
				PC-3	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	
				HeLa	Cl <sub>50</sub> = 9,5 μM	
				Hep-2	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	
18	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	[95]

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
18	<i>Hyptis brevipes</i> Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> > 10 μM	[95]
				KB	CI <sub>50</sub> = 4,9 μM	
				PC-3	CI <sub>50</sub> > 10 μM	
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 6,9 μM	
				Hep-2	CI <sub>50</sub> = 9,4 μM	
20	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	HeLa	CI <sub>50</sub> = 3,48 μM	[108]
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 8,19 μM	
				A549	CI <sub>50</sub> = 1,54 μM	
21*	<i>Epichloë typhina</i>	Clavicipitaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>Cladosporium herbarum</i>	25 μg/spot <sup>IV</sup>	[75]
23	<i>Hyptis macrostachys</i> Benth.	Lamiaceae	Antiespasmódico <sup>Δ</sup>	Íleo de <i>Cavia porcellus</i>	CI <sub>50</sub> = 90 μM induzida por histamina	[100]
					CI <sub>50</sub> = 170 μM induzida por carbacol	
				Traqueia de <i>C. porcellus</i>	> 100 μM com e sem indução por carbacol	
24	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>Candida albicans</i>	CIM > 500 μg/mL	[9]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM > 100 μg/mL	
				<i>Escherichia coli</i>	CIM > 500 μg/mL	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
24	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM > 500 µg/mL	[9]
				<i>Bacillus subtilis</i>	CIM = 100 µg/mL	[65]
					75 mg/mL (ZI = 28,0 mm) <sup>Y</sup>	[31]
				<i>S. aureus</i>	75 mg/mL (ZI = 15,5 mm)	
				<i>Streptococcus mutans</i>	75 mg/mL (ZI = 20,0 mm)	
				<i>E. coli</i>	75 mg/mL (moderadamente sensível)	
			<i>Salmonella Typhi</i>	75 mg/mL (relativamente sensível)		
			Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 76,76 µg/mL	[62]
				T47D <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 181,55 µg/mL	
				MDA-MB-231 <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> = 5,6 µg/mL	[16]
				BC1	DE <sub>50</sub> = 2,4 µg/mL	[9]
HT-1080	DE <sub>50</sub> = 9,6 µg/mL					
Lu1	DE <sub>50</sub> = 4,9 µg/mL					
Mel2	DE <sub>50</sub> = 12,2 µg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.	
24	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	Col2	DE <sub>50</sub> = 4,7 µg/mL	[9]	
				KB	DE <sub>50</sub> = 3,6 µg/mL		
				KB-V	DE <sub>50</sub> = 4,5 µg/mL		
				P-388	DE <sub>50</sub> = 1,6 µg/mL		
				A431	DE <sub>50</sub> = 3,7 µg/mL		
				LNCaP	DE <sub>50</sub> = 7,5 µg/mL		
	Não informada	-			Hep-2	CI <sub>50</sub> = 6,2 µg/mL	[30]
					KB	CI <sub>50</sub> = 3,6 µg/mL	
					HeLa	CI <sub>50</sub> = 2,8 µg/mL	
25	<i>Lippia javanica</i> (Burm.f.) Spreng.	Verbenaceae	Antimalárico <sup>β</sup>	<i>P. falciparum</i> sensível à cloroquina	CI <sub>50</sub> = 9,1 µg/mL	[74]	
26	<i>Hyptis monticola</i> Mart. ex Benth.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>γ</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 7,7 µM	[19]	
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 2,7 µM		
				HCT-15	CI <sub>50</sub> >10 µM		
27	<i>Hyptis monticola</i> Mart. ex Benth.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>γ</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 9,8 µM	[19]	
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 6,9 µM		

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
27	<i>Hyptis monticola</i> Mart. ex Benth.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>Y</sup>	HCT-15	CI <sub>50</sub> = 9,9 µM	[19]
32	<i>Neohyptis paniculata</i> (Baker) J.K.Morton	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	MDRSA <sup>c</sup>	CIM = 64 µg/mL	[101]
				MRSA <sup>c</sup>		
				<i>S. aureus</i>	CIM = 128 µg/mL	
34	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>C. albicans</i>	CIM = 250 µg/mL	[9]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 6,25 µg/mL	
				<i>S. aureus</i>	CIM = 12,5 µg/mL	
				<i>E. coli</i>	CIM = 200 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>S. aureus</i>	CIM = 32 µg/mL	
			Citotóxico <sup>β</sup>	MDRSA	CIM = 128 µg/mL	[18]
				MRSA		
			Citotóxico <sup>β</sup>	BC1	DE <sub>50</sub> = 1,0 µg/mL	[9]
				HT-1080	DE <sub>50</sub> = 1,7 µg/mL	
Lu1	DE <sub>50</sub> = 0,9 µg/mL					
Mel2	DE <sub>50</sub> = 0,7 µg/mL					
Col2	DE <sub>50</sub> = 1,0 µg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
34	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	KB	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	[9]
					DE <sub>50</sub> = 0,63 µg/mL	[18]
				KB-V	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	[9]
				P-388	DE <sub>50</sub> = 0,9 µg/mL	
				A431	DE <sub>50</sub> = 1,4 µg/mL	
				LNCaP	DE <sub>50</sub> = 0,7 µg/mL	
				ZR75-1	DE <sub>50</sub> = 3,6 µg/mL	
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 3,2 µM	[19]
				HeLa		
HCT-15	CI <sub>50</sub> = 5,7 µM					
35	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>C. albicans</i>	CIM = 300 µg/mL	[9]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 25 µg/mL	
				<i>S. aureus</i>	CIM = 100 µg/mL	
				<i>E. coli</i>	CIM = 300 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>		
			<i>S. aureus</i>	CIM = 128 µg/mL	[18]	
			MDRSA	CIM = 256 µg/mL		

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
35	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	MRSA	CIM = 256 µg/mL	[18]
			Citotóxico <sup>β</sup>	BC1	DE <sub>50</sub> = 2,5 µg/mL	[9]
				HT-1080	DE <sub>50</sub> = 2,3 µg/mL	
				Lu1	DE <sub>50</sub> = 3,8 µg/mL	
				Mel2	DE <sub>50</sub> = 2,2 µg/mL	
				Col2	DE <sub>50</sub> = 1,1 µg/mL	
				KB	DE <sub>50</sub> = 1,4 µg/mL	
				KB-V	DE <sub>50</sub> = 2,0 µg/mL	[9]
				P-388	DE <sub>50</sub> = 0,1 µg/mL	
				A431	DE <sub>50</sub> = 0,6 µg/mL	
				LNCaP	DE <sub>50</sub> = 0,9 µg/mL	
				ZR75-1	DE <sub>50</sub> = 1,6 µg/mL	
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 9,3 µM	[19]
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 4,1 µM	
HCT-15	CI <sub>50</sub> = 5,2 µM					
36	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>C. albicans</i>	CIM > 500 µg/mL	[9]

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
36	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 12,5 µg/mL	[9]
				<i>S. aureus</i>	CIM = 100 µg/mL	
				<i>E. coli</i>	CIM > 500 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>S. aureus</i>	CIM = 64 µg/mL	[18]
				MDRSA	CIM = 128 e 256 µg/mL	
			MRSA	CIM = 128 µg/mL		
			Citotóxico <sup>β</sup>	BC1	DE <sub>50</sub> = 2,0 µg/mL	[9]
				HT-1080	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	
				Lu1	DE <sub>50</sub> = 2,3 µg/mL	
				Mel2	DE <sub>50</sub> = 3,3 µg/mL	
				Col2	DE <sub>50</sub> = 1,6 µg/mL	
				KB	DE <sub>50</sub> = 1,7 µg/mL	[18]
					DE <sub>50</sub> = 2,52 µg/mL	
KB-V	DE <sub>50</sub> = 3,2 µg/mL	[9]				
P-388	DE <sub>50</sub> = 2,2 µg/mL					
A431	DE <sub>50</sub> = 0,8 µg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
36	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	LNCaP	DE <sub>50</sub> = 0,8 µg/mL	[9]
				ZR75-1	DE <sub>50</sub> = 1,9 µg/mL	
			Citotóxico <sup>γ</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 1,0 µM	[19]
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 0,3 µM	
				HCT-15	CI <sub>50</sub> = 2,3 µM	
38	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MDA-MB-231	CI <sub>50</sub> = 28,5 µg/mL	[16]
39	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 5,9 µM	[19]
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 6,2 µM	
				HCT-15	CI <sub>50</sub> = 7,4 µM	
40	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 1,3 µM	[19]
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 1,4 µM	
				HCT-15	CI <sub>50</sub> = 9,5 µM	
41	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>γ</sup>	MCF-7	CI <sub>50</sub> = 0,5 µM	[19]
				HeLa	CI <sub>50</sub> = 0,7 µM	
				HCT-15	CI <sub>50</sub> = 0,8 µM	
42	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MDA-MB-231	CI <sub>50</sub> = 15,2 µg/mL	[16]
44	<i>Hyptis spicigera</i> Lam.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	KB	DE <sub>50</sub> = 1,5 µg/mL	[96]

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
44	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	HCT-15	DE <sub>50</sub> = 17,4 µg/mL	[106]
				SQC-1 UIISO <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 15,9 µg/mL	
				KB	DE <sub>50</sub> = 5,8 µg/mL	
				OVCAR <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 19,0 µg/mL	
	Não informada			Hep-2	CI <sub>50</sub> = 9,4 µg/mL	[30]
				KB	CI <sub>50</sub> = 5,4 µg/mL	
HeLa	CI <sub>50</sub> = 15,9 µg/mL					
54	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	HeLa	IG <sub>50</sub> = 7,4 µM	[109]
				PANC 1 <sup>a</sup>	IG <sub>50</sub> = 0,06 µM	
				HepG2 <sup>a</sup>	IG <sub>50</sub> = 5,7 µM	
				SK-N-SH <sup>a</sup>	IG <sub>50</sub> = 10,2 µM	
55	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	HeLa	CI <sub>50</sub> = 0,245 µM	[108]
				MDA-MB-231	CI <sub>50</sub> = 0,565 µM	
				MCF-7	CI <sub>50</sub> = 1,926 µM	
				A549	CI <sub>50</sub> = 0,936 µM	
56*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>Erwinia carotovora</i>	CIM = 20,5 µg/mL	[23]
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.	
56*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	HepG2	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	[23]	
				CaSki			
				MDA-MB-231			
58	<i>Neohyptis paniculata</i> (Baker) J.K.Morton	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	MDRSA	CIM = 64 e 128 µg/mL	[101]	
				MRSA	CIM = 64 e 128 µg/mL		
				<i>S. aureus</i>	CIM = 128 µg/mL		
	<i>Hyptis oblongifolia</i> Benth.				<i>B. subtilis</i>	CIM = 100 µg/mL	[65]
					A549	DE <sub>50</sub> = 74,8 µg/mL	[78]
					HT-29	DE <sub>50</sub> = 40,3 µg/mL	
	MCF-7	DE <sub>50</sub> = 36,8 µg/mL					
	Sintetizada	-		Citotóxico <sup>β</sup>	BC1	DE <sub>50</sub> = 4,8 µg/mL	[9]
					HT-1080	DE <sub>50</sub> = 5,7 µg/mL	
					Lu1	DE <sub>50</sub> = 3,3 µg/mL	
					Mel2	DE <sub>50</sub> = 4,1 µg/mL	
					Col2	DE <sub>50</sub> = 3,0 µg/mL	
KB					DE <sub>50</sub> = 2,9 µg/mL		
KB-V	DE <sub>50</sub> = 3,4 µg/mL						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
58	Sintetizada	-	Citotóxico <sup>β</sup>	P-388	DE <sub>50</sub> = 0,4 µg/mL	[9]
				A431	DE <sub>50</sub> = 1,9 µg/mL	
				LNCaP	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	
				ZR75-1	DE <sub>50</sub> = 4,7 µg/mL	
59	<i>Rabdosia ternifolia</i> (D.Don) H.Hara	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	BC1	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	[70]
				Lu1	DE <sub>50</sub> = 4,8 µg/mL	
				Col2	DE <sub>50</sub> = 2,1 µg/mL	
				KB	DE <sub>50</sub> = 1,8 µg/mL	
				KB-V (-VLB) <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 2,1 µg/mL	
				LNCaP	DE <sub>50</sub> = 1,2 µg/mL	
				KB-V (+VLB) <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> = 2,2 µg/mL	
60	<i>Hyptis oblongifolia</i> Benth.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 100 µg/mL	[65]
61	<i>Hyptis oblongifolia</i> Benth.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 100 µg/mL	[65]
62	<i>Hyptis oblongifolia</i> Benth.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 100 µg/mL	[65]
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	DE <sub>50</sub> = 56,3 µg/mL	[78]
				HT-29	DE <sub>50</sub> = 34,7 µg/mL	
				MCF-7	DE <sub>50</sub> = 31,2 µg/mL	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
63	<i>Raimondia cf. monoica</i> Saff.	Annonaceae	Leishmanicida <sup>β</sup>	Promastigotas de <i>L. panamensis</i>	DE <sub>50</sub> = 1,9 µg/mL	[71]
64	<i>Raimondia cf. monoica</i> Saff.	Annonaceae	Leishmanicida <sup>β</sup>	Promastigotas de <i>L. panamensis</i>	DE <sub>50</sub> = 0,42 µg/mL	[71]
69*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. carotovora</i>	CIM = 25,5 µg/mL	[23]
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	
				HepG2		
				CaSki <sup>a</sup>		
MDA-MB-231						
70*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. carotovora</i>	CIM = 22,6 µg/mL	[23]
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	
				HepG2		
				CaSki		
MDA-MB-231						
71*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. carotovora</i>	CIM = 24,7 µg/mL	[23]
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	
				HepG2		
CaSki						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
71*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MDA-MB-231	CI <sub>50</sub> > 50 µg/mL	[23]
72*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Inibição enzimática <sup>β</sup>	MAO-B <sup>d</sup>	CI <sub>50</sub> > 100 µmol/mL	[79]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. coli</i>	CIM = 25,6 µg/mL	
				<i>S. aureus</i>	CIM = 46,9 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>	CIM = 55,6 µg/mL	
<i>E. carotovora</i>	CIM > 100 µg/mL					
73*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Inibição enzimática <sup>β</sup>	MAO-B	CI <sub>50</sub> > 100 µmol/mL	[79]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. coli</i>	CIM = 32,4 µg/mL	
				<i>S. aureus</i>	CIM = 47,8 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>	CIM = 57,9 µg/mL	
<i>E. carotovora</i>	CIM > 100 µg/mL					
74*	<i>Xylariales</i> sp.	Xylariaceae	Inibição enzimática <sup>β</sup>	MAO-B	CI <sub>50</sub> = 15,6 µmol/mL	[79]
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>E. coli</i>	CIM = 57,8 µg/mL	
				<i>S. aureus</i>	CIM = 48,9 µg/mL	
				<i>P. aeruginosa</i>	CIM = 56,3 µg/mL	
<i>E. carotovora</i>	CIM > 100 µg/mL					

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
75*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>Cercospora arachidicola</i>	CIM = 12,5 µg/mL	[24]
				<i>Alternaria solani</i>		
				<i>Fusarium graminearum</i>		
				<i>Bipolaris carbonum</i>	CIM = 25 µg/mL	
				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
				<i>Cylindrocladium parasiticum</i>		
				<i>A. alternata</i> f. sp. <i>mali</i>		
				<i>C. personata</i>		
				<i>Botrytis cinerea</i>		
				<i>Ustilago scitaminea</i>	CIM = 50 µg/mL	
				<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
				<i>Rhizoctonia cerealis</i>		
				<i>Helminthosporium maydis</i>		
<i>C. orbiculare</i>						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
75*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>Ascochyta gossypii</i>	CIM = 50 µg/mL	[24]
				<i>A. alternata</i>		
				<i>B. fabiopsis</i>		
				<i>A. brassicae</i>		
				<i>C. graminicola</i>		
				<i>Exserohilum turcicum</i>		
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 50 µg/mL	
				<i>Micrococcus luteus</i>		
				<i>S. aureus</i>		
				<i>B. megaterium</i>		
				<i>Salmonella enterica</i>		
				<i>Proteus vulgaris</i>		
				<i>S. Typhi</i>		
				<i>P. aeruginosa</i>		
<i>E. coli</i>						
<i>Enterobacter aerogenes</i>						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
75*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> >100 µg/mL	[24]
				Huh7 <sup>a</sup>		
				LN229 <sup>a</sup>		
				MGC <sup>a</sup>		
				MHCC97H <sup>a</sup>		
				LOVO <sup>a</sup>		
				MDA231 <sup>a</sup>		
76*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>C. arachidicola</i>	CIM = 12,5 µg/mL	[24]
				<i>F. graminearum</i>		
				<i>A. solani</i>	CIM = 25 µg/mL	
				<i>B. carbonum</i>		
				<i>C. personata</i>		
				<i>C. parasiticum</i>		
				<i>U. scitaminea</i>		
				<i>C. graminicola</i>		
				<i>A. alternata</i> f. sp. <i>mali</i>	CIM = 50 µg/mL	
				<i>B. fabiopsis</i>		

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
76*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>B. cinerea</i>	CIM = 50 µg/mL	[24]
				<i>A. alternata</i> (Fries) Keissler		
				<i>R. cerealis</i>		
				<i>H. maydis</i>		
				<i>C. orbiculare</i>		
				<i>A. gossypii</i>		
				<i>S. sclerotiorum</i>	CIM = 100 µg/mL	
				<i>C. gloeosporioides</i>		
				<i>A. brassicae</i>	CIM > 100 µg/mL	
			<i>E. turcicum</i>			
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>S. Typhi</i>	CIM = 25 µg/mL	
				<i>B. subtilis</i>	CIM = 50 µg/mL	
				<i>M. luteus</i>		
				<i>S. aureus</i>		
<i>B. megaterium</i>						
<i>S. entérica</i>						
<i>P. vulgaris</i>						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
76*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	CIM = 50 µg/mL	[24]
				<i>E. coli</i>		
				<i>E. aerogenes</i>	CIM = 100 µg/mL	
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 100 µg/mL	
				Huh7		
				LN229		
				MGC		
				MHCC97H		
LOVO						
MDA231						
77*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>A. solani</i>	CIM = 12,5 µg/mL	[24]
				<i>C. parasiticum</i>		
				<i>A. alternata</i> f. sp. <i>mali</i>		
				<i>C. arachidicola</i>	CIM = 25 µg/mL	
				<i>B. carbonum</i>		
				<i>B. cinerea</i>		
				<i>C. graminicola</i>		

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
77*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antifúngico <sup>β</sup>	<i>R. cerealis</i>	CIM = 25 µg/mL	[24]
				<i>F. graminearum</i>	CIM = 50 µg/mL	
				<i>C. personata</i>		
				<i>U. scitaminea</i>		
				<i>H. maydis</i>		
				<i>C. orbiculare</i>		
				<i>A. gossypii</i>		
				<i>A. alternata</i> (Fries) Keissler		
				<i>C. gloeosporioides</i>	CIM = 100 µg/mL	
				<i>B. fabiopsis</i>		
			<i>A. brassicae</i>	CIM > 100 µg/mL		
			<i>S. sclerotiorum</i>			
			<i>E. turcicum</i>			
			Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>B. subtilis</i>	CIM = 50 µg/mL	
<i>M. luteus</i>						
<i>S. aureus</i>						
<i>B. megaterium</i>						

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(continuação)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
77*	<i>Penicillium ochrochloron</i>	Trichocomaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>S. enterica</i>	CIM = 50 µg/mL	[24]
				<i>P. vulgaris</i>		
				<i>S. Typhi</i>		
				<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>E. coli</i>		
				<i>E. aerogenes</i>		
			Citotóxico <sup>β</sup>	A549	CI <sub>50</sub> > 100 µg/mL	
				Huh7		
				LN229		
				MGC		
				MHCC97H		
				LOVO		
				MDA231		
80	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Antibacteriano <sup>β</sup>	<i>S. aureus</i>	CIM = 32 µg/mL	[18]
				MDRSA	CIM = 64 µg/mL	
				MRSA		
			Citotóxico <sup>β</sup>	KB	DE <sub>50</sub> > 20 µg/mL	

**Quadro 3** – Metabólitos secundários da classe das hyptolactonas, naturais de plantas ou fungos, e seus efeitos biológicos.

(conclusão)

Hypto-lactonas	Fontes	Famílias	Efeitos biológicos	Modelos biológicos	Doses/Concentrações/Potências	Ref.
85	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	[19]
				HeLa		
				HCT-15		
86	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Lamiaceae	Citotóxico <sup>β</sup>	MCF-7	Cl <sub>50</sub> > 10 μM	[19]
				HeLa		
				HCT-15		

**Fonte:** Próprio autor.**Notas:** \* Isoladas de fungos.

<sup>α</sup> Ensaio biológico *in vivo*. <sup>β</sup> Ensaio biológico *in vitro*. <sup>γ</sup> Ensaio biológico *in vitro*, apoiado por estudo *in silico*. <sup>Δ</sup> Ensaio biológico *ex vivo*.

<sup>a</sup> Linhagens celulares de cânceres:

Humanos = cerebral (LN229); cervical (HeLa, SQC-1 UISO e CaSki); colorretal (Col2, HCT-15, HT-29 e LOVO); epidermóide (A431); fibrossarcoma (HT-1080); hepático (HepG2, Huh7 e MHCC97H); intestino (MGC); laringe (Hep-2); mama (BC1, MCF-7, MDA231, MDA-MB-231, NCI-ADR, T47D, e ZR75-1 – dependente de hormônio); melanoma (Mel2 e UACC62); nasofaringe (KB, KB-V – KB resistente à vimblastina, KB-V (-VLB) e KB-V (+VLB)); neuroblastoma (SK-N-SH); ovário (OVCAR e OVCAR03); pancreático (PANC 1); próstata (LNCaP – dependente de hormônio, PC-3 e PCO 3); pulmão (A549, Lu1 e NCI 460); renal (786-0).

Murino = leucemia linfocítica (P-388).

<sup>b</sup> C-C receptor quimiocina tipo 5 - CCR5 (célula U-87-CCR5), um dos correceptores do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), a avaliação foi por meio de seus ligantes conjugados MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES. <sup>c</sup> *Staphylococcus aureus* multirresistente às drogas (*Multidrug-resistant Staphylococcus aureus* - MDRSA); *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA).

<sup>d</sup> Monoamina oxidase B (MAO-B).

<sup>I</sup> Inibição de crescimento, indução do estresse e interferência na biossíntese da parede celular. <sup>II</sup> Inibição de crescimento e interferência na biossíntese da parede celular. <sup>III</sup> Inibição em micélios, transições micélios-leveduras e leveduras na presença de acetato e glicose. <sup>IV</sup> Placa de sílica-gel de cromatografia em camada delgada. <sup>V</sup> Teste de difusão em placa, atividade antibacteriana foi avaliada medindo-se o diâmetro da zona de inibição (ZI) ao redor dos discos.

#### 5.4 Avaliação do risco de viés dos estudos

Como relatado no item 4.7, a avaliação do risco de viés dos artigos envolvendo a análise do potencial biológico das hyptolactonas em estudos de intervenções em animais foi realizada de acordo com as diretrizes da ferramenta SYRCLE [82]. Com base na ferramenta, foram adotadas 10 questões de sinalização, referentes a 10 domínios, englobando 6 tipos de vieses. Para cada questão, os revisores adotaram o julgamento: Sim, sinalizando baixo risco de viés; incerto, sinalizando risco incerto de viés; e não, sinalizando alto risco de viés. Os domínios e as questões de sinalização são demonstrados no Quadro 4.

**Quadro 4** – Diretrizes da ferramenta SYRCLE para avaliação do risco de viés.

Itens	Domínios (tipos de vieses)	Questões de sinalização
1	Geração de sequência (viés de seleção)	Foi previamente definido e aplicado um método de geração de sequência para alocar os animais?
2	Características basais (viés de seleção)	Os grupos foram inicialmente pareados (características basais semelhantes) ou foi realizado ajuste posterior para efeito de análise?
3	Ocultação de alocação (viés de seleção)	A alocação dos animais foi realizada às cegas?
4	Alojamento aleatório (viés de desempenho)	Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?
5	Ocultação (viés de desempenho)	Os cuidadores e/ou pesquisadores estavam “cegos” sobre o conhecimento de qual intervenção os animais receberam durante o experimento?
6	Avaliação aleatória de resultados (viés de detecção)	Os animais foram selecionados aleatoriamente para a avaliação dos resultados?
7	Ocultação (viés de detecção)	O avaliador interpretou os resultados às cegas?
8	Dados de resultados incompletos (viés de atrito)	Os dados de resultados incompletos (perdas e exclusões no decorrer do experimento) foram adequadamente abordados?
9	Relatório de resultados seletivos (viés de relato)	Os relatórios do estudo estão livres de relatórios seletivos de resultados?
10	Outro viés	O estudo está livre de divergências textuais, numerações, símbolos ou unidades de medidas entre o procedimento experimental e resultados?

**Fonte:** Próprio autor.

Dentre os artigos adicionados nesta revisão sistemática, apenas em dois foram conduzidas análises do potencial biológico das hyptolactonas em estudos de intervenções em animais, mais especificamente, em roedores. Os estudos de Waechter *et al.* (1977) [117] e Costa *et al.* (2014) [100], conduziram os experimentos *in vivo* e *ex vivo*, respectivamente. Os resultados individuais e gerais da avaliação do risco de viés dos estudos são representados na Figura 13 e Figura 14, respectivamente.

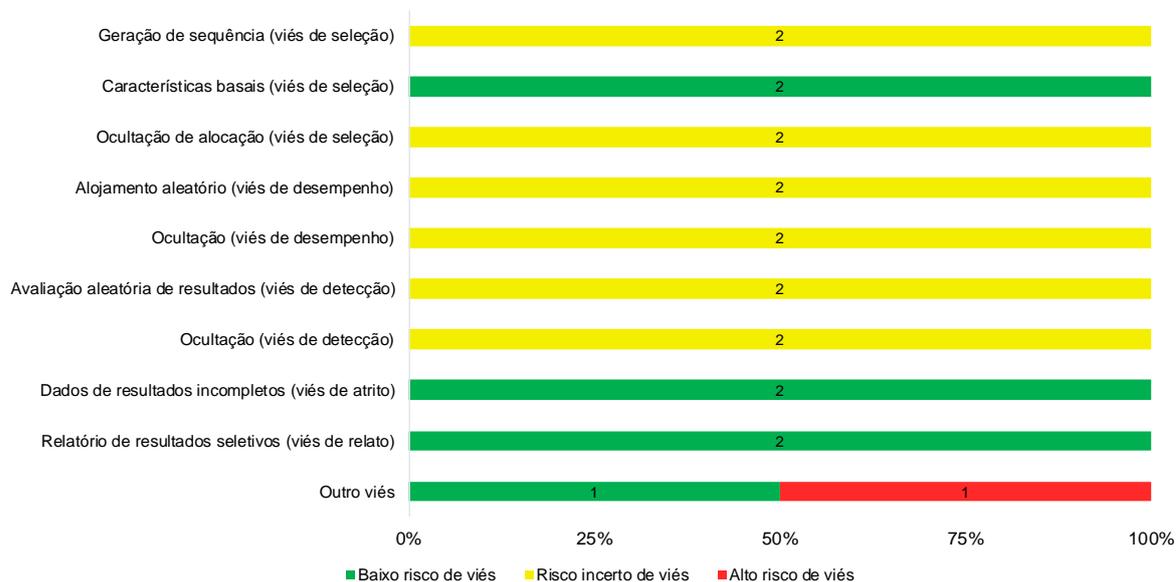
**Figura 13** – Resultado individual da avaliação do risco de viés dos estudos de intervenções em animais, adicionados nesta revisão sistemática, com base nas diretrizes da ferramenta SYRCLE.

	Costa <i>et al.</i> (2014) [100]	Waechter <i>et al.</i> (1977) [117]
Geração de sequência (viés de seleção)	●	●
Características basais (viés de seleção)	●	●
Ocultação de alocação (viés de seleção)	●	●
Alojamento aleatório (viés de desempenho)	●	●
Ocultação (viés de desempenho)	●	●
Avaliação aleatória de resultados (viés de detecção)	●	●
Ocultação (viés de detecção)	●	●
Dados de resultados incompletos (viés de atrito)	●	●
Relatório de resultados seletivos (viés de relato)	●	●
Outro viés	●	●

● Baixo risco de viés ● Risco incerto de viés ● Alto risco de viés

**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 14** – Resultado geral da avaliação do risco de viés dos estudos de intervenções em animais, adicionados nesta revisão sistemática, com base nas diretrizes da ferramenta SYRCLE.



**Fonte:** Próprio autor.

É observado na Figura 13 que os estudos tiveram resultados semelhantes, apresentando baixo risco de viés nos domínios: características basais, dados de resultados incompletos e relatório de resultados seletivos. Os estudos diferiram apenas no domínio outro viés, domínio esse, atribuído pelos autores desta revisão sistemática. Dentre os domínios adotados, pode-se dizer que o estudo de Waechter *et al.* (1977) [117] é mais enviesado que o estudo de Costa *et al.* (2014) [100].

No geral, os estudos apresentaram risco incerto de viés nos demais domínios (Figura 14), que são especificamente os domínios referentes a aleatoriedade no decorrer do experimento (randomização), diminuindo a transparência e aplicabilidade dos estudos. No campo clínico, o ensaio clínico randomizado é considerado o paradigma para avaliar a eficácia das intervenções [124]. Esse tipo de abordagem ainda não é uma prática padrão em experimentos com animais, o que compromete a qualidade dos relatórios, devido aos detalhes sobre condições de moradia ou avaliação dos resultados que muitas vezes não são relatados [82,125], principalmente em estudos mais antigos como o de Waechter *et al.* (1977) [117].

## 5.5 Confiabilidade de evidência

A avaliação da qualidade metodológica entre os dois revisores nas etapas de triagem e inclusão dos artigos (item 5.1) e na etapa de avaliação do risco de viés (item 5.4) foi determinada pelo Coeficiente Kappa de Cohen (k) [84]. A interpretação dos resultados foi de acordo com escala de Landis e Koch (1977) [85]: quanto mais próximo de 1 for a estatística, maior é a concordância entre os revisores. Nas etapas de triagem e inclusão dos artigos, o resultado, expresso por “ $k \pm DP^2$  (IC95%<sup>3</sup>)”, foi de  $0,94 \pm 0,03$  (0,88-0,99): concordância quase perfeita, e na etapa de avaliação do risco de viés, os resultados respectivamente de Waechter *et al.* (1977) [117] e Costa *et al.* (2014) [100] foram de  $0,83 \pm 0,17$  (0,50-1,00): concordância quase perfeita, e  $0,78 \pm 0,20$  (0,39-1,00): concordância substancial.

## 5.6 Escassez de avaliações das atividades biológicas *in vivo* das hyptolactonas

Como demonstrado no item 5.3.2, as hyptolactonas foram avaliadas quanto aos seus efeitos biológicos na maioria dos artigos por experimentos *in vitro*. Apenas em 1 artigo foi conduzido experimentos *in vivo* para análise do potencial biológico das hyptolactonas em estudos de intervenções em animais [117]. Levando em conta que essas substâncias apresentaram de moderado a forte potencial biológico em determinadas atividades biológicas por que os estudos de intervenções em animais são escassos?

Pelo fato dessas substâncias serem pouco conhecidas e talvez pela baixa quantidade de substâncias que se obtém de fontes naturais, há 1 único relato científico. Até o momento, existem apenas 38 artigos contendo atividades biológicas das hyptolactonas, número bastante desproporcional, ao se constatar que existem 86 hyptolactonas obtidas de plantas e fungos, entre as quais 57 tiveram seus efeitos biológicos comprovados. As substâncias **2**, **24** e os pectinolidos merecem destaque por serem os metabólitos secundários que tiveram seus efeitos biológicos comprovados em diferentes atividades biológicas (Quadro 3).

---

<sup>2</sup> Desvio padrão.

<sup>3</sup> Intervalo de confiança de 95%.

Como alternativa para a pequena quantidade de substâncias isoladas de produtos naturais, esses metabólitos secundários podem ser obtidos por meio de sínteses orgânicas. Diferente de outros metabólitos secundários com complexas estruturas químicas, em que a síntese orgânica não é viável, como por exemplo, a síntese da vimblastina [126], as hyptolactonas possuem estruturas químicas relativamente simples, entretanto, existem poucos artigos científicos que relataram suas sínteses e avaliariam seus efeitos biológicos.

Dentre os 38 artigos contendo atividades biológicas das hyptolactonas, apenas 8 são artigos que comprovaram suas sínteses [102–109]. É necessária uma maior valorização por parte da comunidade científica a respeito do potencial terapêutico dessas substâncias, o que poderia resultar na descoberta de novos fármacos e consequentemente, tratamentos terapêuticos mais seguros e mais eficazes. Apesar das dificuldades que envolvem o isolamento de substâncias, ainda é de grande importância a descoberta de novas hyptolactonas para iniciar a avaliação dos seus efeitos biológicos e assim verificar seus verdadeiros potenciais biológicos.

## 5.7 Hyptolactonas e suas atividades biológicas

### 5.7.1 Anamarina

Alemany *et al.* (1979) isolaram a anamarina (**1**), pela primeira vez, de uma espécie não identificada do gênero *Hyptis* (Lamiaceae), a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada nesse estudo (Figura 9) [111]. Até o momento, não há relatos de que essa substância tenha sido isolada novamente e muito menos de suas atividades biológicas.

### 5.7.2 Argentilactona

A argentilactona (**2**) foi isolada primeiramente dos rizomas de *Aristolochia argentina* Griseb. (Aristolochiaceae) [72]. É também encontrada nas raízes de *A. haematantha* (Annonaceae) [117] e *R. cf. monoica* (Annonaceae) [71]; em óleos essenciais de folhas, caules aéreos, partes subterrâneas, e extrato das partes subterrâneas de *A. argentina* [110]; e em óleo essencial das folhas de *H. ovalifolia* (Lamiaceae) [97], sendo a única hyptolactona incluída nesse estudo encontrada em

espécies de plantas de diferentes famílias. Nesses artigos de isolamento, a estereoquímica de seu único carbono assimétrico foi determinada (Figura 9).

Proveniente das raízes de *A. haematantha*, Waechter *et al.* (1977) determinaram a atividade leishmanicida *in vivo* dessa substância contra *L. amazonensis*. Patas e baços de camundongos BALB/c, infectados com a cepa FLA/BR/67/PH de *L. amazonensis*, foram tratados com a substância **2** (25 mg/kg) e o controle positivo, antimoniato de *N*-metilglucamina (100 mg/kg), administrados por via subcutânea (substância **2** e controle positivo) e por via oral (apenas a substância **2**). A hyptolactona reduziu em 48 e 54% a carga parasitária nos baços, administrada por via subcutânea e oral, respectivamente, e apresentou a mesma eficácia do controle positivo, reduzindo em 97 e 75% a carga parasitária nas patas, administrada por via subcutânea e oral, respectivamente. De maneira significativa, o melhor tratamento da lesão nas patas foi por via subcutânea [117]. Logo, essa substância tem potencial como agente leishmanicida.

Carmona *et al.* (2003) isolaram a (–)-argentilactona (**2**), (6*R*)-(5'-oxo-hepten-1'*E*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**63**) e (6*S*)-(5'-oxo-hepten-1'*Z*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**64**) das raízes e folhas de *R. cf. monoica*, e avaliaram quanto o efeito antimalárico. A substância **2** foi submetida a atividade antimalárica contra a cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum* (DE<sub>50</sub> de 0,1 µg/mL). Como controle positivo foi utilizado a cloroquina (DE<sub>50</sub> de 0,005 µg/mL) que mostrou-se mais potente do que essa substância [71].

Priestap *et al.* (2003) identificaram quarenta e três componentes nos óleos essenciais das folhas, caules e órgãos subterrâneos de *A. argentina*, fornecendo óleos voláteis com altas concentrações de argentilactona (57-89%) [110]. De Oliveira *et al.* (2004) isolaram a substância **2** do óleo essencial das folhas de *H. ovalifolia* e avaliaram seu potencial antidermatófito *in vitro* contra 60 cepas de *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Como controle positivo foi utilizado o itraconazol, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre 0,12-125 µg/mL). A substância **2** apresentou valores semelhantes ou melhores que o controle contra *M. canis* e *M. gypseum* com CIM variando entre 7,8 e 32,1 µg/mL [97].

Do Prado *et al.* (2014) isolaram a substância **2** do óleo essencial das folhas de *H. ovalifolia* e avaliaram *in vitro* sua atividade antifúngica frente a *Paracoccidioides*

*lutzii* (*Pb01*) em células de levedura, transição de micélio para levedura e na inibição enzimática da isocitrato liase da espécie (*PbICL*), uma enzima chave do ciclo do glioxilato. Essa substância inibiu o crescimento das leveduras com CIM de 9 e 18  $\mu\text{g/mL}$  na presença de acetato e glicose como fonte de carbono, respectivamente e a transição de micélio para levedura nas concentrações de 9, 18, 36 e 72  $\mu\text{g/mL}$  em ambas as fontes de carbono. A interferência da argetilactona (18  $\mu\text{g/mL}$ ) nas fases micélio, transição micélio-levedura e levedura de *PbICL* foi avaliada, houve inibição em todas as condições, sendo maior na presença de acetato (45%) do que na glicose (30%), a atividade de *PbICL* decresceu de levedura, micélio-levedura e micélio, respectivamente. Foi avaliado o efeito inibitório da substância na atividade de *PbICL* recombinante e nativa das leveduras, apresentando  $\text{CI}_{50}$  de 28,8  $\mu\text{M}$  para a enzima recombinante e  $\text{CI}_{50}$  de 50,0 e 80,0  $\mu\text{M}$  para enzima nativa na presença de acetato e glicose, respectivamente. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  da substância **2** foram similares ao do controle positivo, 3-nitropropinato, que apresentou  $\text{CI}_{50}$  de 25,7; 45,4 e 76,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os resultados foram apoiados por estudos *in silico* de *homology modelin*, *molecular dynamics* e *docking molecular* dessa substância com a *PbICL*. Os resultados indicaram que essa hyptolactona é um excelente candidato como agente antifúngico [121].

Prado *et al.* (2015) isolaram a substância **2** do óleo essencial de *H. ovalifolia*. Com o objetivo de avaliar se a substância induz dano ao DNA em células humanas, seu efeito citotóxico e genotóxico foram avaliados frente às células normais fibroblastos de pulmão humano (MRC5), a substância não foi citotóxica e nem genotóxica (9  $\mu\text{g/mL}$ ). Observou-se também que enzimas de vias importantes, como a da glicólise, ciclo de Krebs e o ciclo do glioxilato foram afetadas, observado após análise proteômica das células de levedura de *P. lutzii* após a incubação da substância (9  $\mu\text{g/mL}$ ). Isso quer dizer que, em geral, as vias metabólicas responsáveis pela produção de energia para a sobrevivência do fungo foram afetadas na presença dessa hyptolactona. Esses resultados sugerem que a substância **2** tem grande potencial como agente antifúngico [77].

Araújo *et al.* (2016) isolaram a substância **2** do óleo essencial das folhas de *H. ovalifolia* e avaliaram seu potencial antifúngico *in vitro* frente às células de leveduras de espécies de *Paracoccidioides* (Quadro 3). Para a *P. lutzii* foi avaliada a inibição de crescimento, indução do estresse oxidativo e interferência na biossíntese da parede

celular e para *P. brasiliensis* foi avaliada apenas a inibição de crescimento dos mutantes silenciados de seus genes, todos os mutantes avaliados foram sensíveis à substância. Os resultados sugerem que a argetilactona é um potencial candidato para terapia antifúngica [119].

Silva *et al.* (2018) isolaram a substância **2** do óleo essencial de *H. ovalifolia* e avaliaram o seu potencial antifúngico *in vitro* frente as leveduras de *P. lutzii*, *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. restrepiensis* (Quadro 3) com valores de CIM e concentração fungicida mínima (CFM) variando de 4,5 a 36 µg/mL. A substância (36 µg/mL) inibiu a atividade enzimática da malato desidrogenase, citrato sintase e piruvato desidrogenase, induziu a produção de espécies reativas de oxigênio e inibiu a biossíntese de polímeros da parede celular de *P. brasiliensis* (*Pb18*). Não apresentou citotoxicidade frente às células AMJ2-C11 (macrófago alveolar), BALB/c 3T3 clone A31 (fibroblasto murino) e A549 (câncer de pulmão), nas concentrações que inibiram o crescimento das espécies *Paracoccidioides*. Esses resultados sugerem que a substância **2** tem grande potencial como agente antifúngico [120].

Saeed *et al.* (2001) avaliaram o efeito leishmanicida *in vitro* da (*R*)-(-)-argetilactona (**2**) sintética contra *Leishmania mexicana*. Na concentração de 5 µg/mL, houve uma redução acentuada no crescimento de promastigotas, enquanto a 10 µg/mL, não houve proliferação de parasitas, levando-os a morte entre 2 e 3 dias. Segundo os autores, sua eficiência é comparável ao estibogluconato de sódio, fármaco antileishmaniaco (dados não apresentados no artigo) [105].

Sintetizados por de Fátima *et al.* (2006), a (*R*)-argetilactona (**2**) e seu estereoisômero, (*S*)-argetilactona, foram avaliados *in vitro* contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da Doença de Chagas. A (*S*)-argetilactona foi duas vezes mais potente do que a substância **2**, com  $CI_{50}$  de 0,47 e 0,94 mM, respectivamente. O controle positivo, cristal violeta, apresentou  $CI_{50}$  de 0,08 mM [102]. Apesar do fármaco de referência ser mais potente do que as duas substâncias, pode-se dizer que esses enantiômeros apresentam potencial como agente antichagásico, devido aos seus baixos valores de  $CI_{50}$ .

Sintetizados por de Fátima *et al.* (2004), os enantiômeros citados acima tiveram seus efeitos citotóxicos avaliados frente às células humanas cancerígenas de mama (MCF-7), mama com resistência a múltiplas drogas (NCI-ADR), pulmão (NCI 460),

melanoma (UACC62), ovário (OVCAR03), próstata (PCO 3), câncer colorretal (HT-29) e renal (786-0). No geral, o fármaco de referência (doxorubicina) apresentou melhores citotoxicidades, entretanto, a substância **2** provou ser mais potente para células NCI-ADR ( $CI_{50} = 11,0 \mu\text{M}$ ) que o doxorubicina ( $CI_{50} = 48,7 \mu\text{M}$ ), logo essa hyptolactona possui potencial citotóxico em células cancerígenas dessa linhagem [107].

### 5.7.3 *Boronolidos*

Dessa subclasse já foram isoladas três hyptolactonas: boronolido (**3**) [115], deacetilboronolido (**19**) [113] e 1',2'-dideacetilboronolido (**57**) [114].

Davies-Coleman e Rivett (1987) isolaram a substância **3** das folhas de *Tetradenia barberae* (N.E.Br.) Codd (Lamiaceae) [115], e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9).

Yamauchi *et al.* (2012) determinaram a atividade óptica e uma nova rota sintética total de obtenção do metabólito secundário (+)-boronolido (**3**). Essa hyptolactona e seu enantiômero sintético, (-)-boronolido, foram submetidos à atividade herbicida *in vitro* contra inibição de crescimento de broto e raiz de *L. multiflorum* (Poaceae) e *L. sativa* (Asteraceae), como controle foi utilizado os comprimentos das ervas antes da avaliação. Na concentração de 1 mM, a hyptolactona **3** apresentou melhores porcentagens de inibição do crescimento de *L. multiflorum*, inibindo em 20% e 48% o crescimento de broto e raiz, respectivamente. Entretanto, nenhuma das substâncias avaliadas afetaram o crescimento de *L. sativa* [103].

No estudo de obtenção das hyptolactonas **24**, **34-36** das partes aéreas de *H. pectinata*, Pereda-Miranda *et al.* (1993) sintetizaram a hyptolactona **3**. A substância foi submetida a ensaios citotóxicos frente às células humanas de câncer colorretal (Col2), mamário (BC1 e ZR75-1), fibrossarcoma (HT-1080), pulmão (Lu1), melanoma (Mel2), nasofaringe (KB), epidermóide (A431), próstata (LNCaP), células KB resistente a vimblastina (KB-V) e leucemia linfocítica murina (P-388) (Quadro 3). A substância **3** apresentou melhores resultados citotóxicos em células P-388, BC1, LNCaP e Mel2 com  $DE_{50} = 1,0; 2,8; 3,2$  e  $3,3 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente [9]. O Instituto Nacional do Câncer (INC) dos Estados Unidos considera que substâncias com valores

de  $CI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$  apresentam forte atividade antineoplásica [69]. Raciocínio semelhante pode ser atribuídos a valores de  $DE_{50}$ , de acordo com Lu *et al.* (1997), um fármaco pode ser considerado um moderado agente anticâncer quando  $DE_{50} < 4,0 \mu\text{g/mL}$  [70]. Logo, essa hyptolactona possui potencial para se tornar um fármaco antitumoral frente às linhagens avaliadas.

Das folhas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae), Van Puyvelde *et al.* (1979) e Van Puyvelde *et al.* (1981), isolaram pela primeira vez, os boronolidos: **19** [113] e **57** [114], respectivamente. A substância **19** também foi isolada por Davies-Coleman e Rivett (1994) das folhas de *Syncolostemon densiflorus* Benth. (Lamiaceae), juntamente com a **50** [90]. Os autores não determinaram a estereoquímica total desses boronolidos, sendo determinada posteriormente por síntese orgânica (Figura 9) [127]. Até o momento, não há relatos de atividade biológica para as hyptolactonas **19**, **50** e **57**.

#### 5.7.4 Brevipolidos

Dessa subclasse já foram isoladas quinze hyptolactonas de *H. brevipes* (Lamiaceae): brevipolidos A-O (**4-18**) [95,98,99,118]. O que faz dessa espécie e da *H. pectinata* (17 pectinolidos e o hyptolido) [9,16–20], as espécies com maiores quantidades de hyptolactonas isoladas até o presente estudo.

Deng *et al.* (2009) isolaram, pela primeira vez, os brevipolidos A-F (**4-9**) de todas as partes de *H. brevipes* [98], entretanto, não determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos das hyptolactonas **4-10**. As substâncias foram isoladas juntamente com uma outra substância já conhecida, anteriormente isolada de *L. alba* (Verbenaceae), pela primeira vez, por Hegde *et al.* (2004) [118], mais tarde essa substância recebeu o nome de brevipolido G (**10**), quando isolada de *H. brevipes* por Suárez-Ortiz *et al.* (2013) [99].

Deng *et al.* (2009), avaliaram seus efeitos citotóxicos frente às células humanas de câncer de mama (MCF-7), cólon (HT-29) e pulmão (Lu1), ensaio *in vitro* de potencial transmembrana mitocondrial (MTP) e ELISA NF- $\kappa$ B baseado em enzimas. Contra células MCF-7, as hyptolactonas **5**, **9** e **10** apresentaram efeito significativo com valores de  $DE_{50}$  de 6,1; 6,7 e 3,6  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e valores  $> 10 \mu\text{M}$  para **4**, **6-8**. Contra células HT-29, as hyptolactonas **4**, **5** e **9** apresentaram  $DE_{50}$  de 5,8; 6,1

e 7,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Contra células Lu1, nenhuma das substâncias apresentaram atividade significativa, nenhum resultado foi demonstrado [98]. Essas hyptolactonas inibiram a proliferação das células MCF-7 e HT-29 em razoáveis concentrações, sendo necessários estudos mais aprofundados de seus efeitos citotóxicos.

A substância **10** apresentou atividade em ensaio ELISA NF- $\kappa\text{B}$  baseado em enzimas com  $\text{DE}_{50}$  de 15,3  $\mu\text{M}$ , as outras substâncias não demonstraram atividade com  $> 50 \mu\text{M}$ , como controle positivo foi utilizado a rocaglamida ( $\text{DE}_{50} = 2,0 \mu\text{M}$ ). No ensaio MTP, apenas as substâncias **6** e **10** apresentaram atividade com  $\text{DE}_{50}$  de 8,5 e 75 nM, respectivamente, como controle positivo foi utilizado estaurosporina ( $\text{DE}_{50} = 2,6 \text{ nM}$ ). Nenhuma atividade potente foi encontrada em um ensaio de inibição de proteassoma para as substâncias isoladas [98].

Anteriormente, Hegde *et al.* (2004) isolaram as substâncias **10-12** de *L. alba* [118], entretanto, não atribuíram nenhuma nomenclatura e não determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos. As substâncias só foram chamados de brevipolidos G-I, respectivamente, no estudo de Suárez-Ortiz *et al.* (2013) [99]. Hegde *et al.* (2004) avaliaram o potencial inibitório das substâncias frente ao receptor de quimiocina CCR5 (célula U-87-CCR5), a avaliação foi por meio de seus ligantes conjugados MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES. As substâncias **10-12** mostraram atividade inibitória modesta contra o ligante MIP-1 $\beta$  com  $\text{CI}_{50}$  de 7,2; 5,5 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A atividade contra os outros ligantes foi menos potente ou não detectável em concentrações abaixo de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Quadro 3). Também foi avaliada a atividade antiviral em ensaio de infecção viral para determinar seu efeito na infecção de células positivas para CCR5 pelo HIV-1. Embora alguma atividade antiviral tenha sido observada, os efeitos não puderam ser distinguidos da citotoxicidade celular, que foi aparente em concentrações  $> 1 \mu\text{g/mL}$  (dados não foram demonstrados) [118].

Suárez-Ortiz *et al.* (2013) isolaram os já conhecidos brevipolidos A-F (**4-9**), e pela primeira vez, os brevipolidos G-J (**10-13**) das partes aéreas de *H. brevipes*, e diferente de Deng *et al.* (2009) e Hegde *et al.* (2004), determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9), sendo apoiada por estudos *in silico*. As substâncias **10-13** tiveram seus efeitos citotóxicos avaliados frente às células de câncer de nasofaringe (KB), laringe (Hep-2), colorretal (HCT-15), cervical (HeLa), mama (MCF-7) e próstata (PC-3), com  $\text{CI}_{50}$  de 0,3-10,7  $\mu\text{g/mL}$  (Quadro 3), como

controle positivo foi utilizado a vimblastina ( $CI_{50} = 0,001-0,006 \mu\text{g/mL}$ ) [99]. As substâncias apresentaram-se promissoras protótipos a fármaco antitumoral em células cancerígenas dessas linhagens por apresentar  $CI_{50}$  muito próximo a  $4,0 \mu\text{g/mL}$ , considerado potente pelo INC estadunidense [69].

Suárez-Ortiz *et al.* (2017) isolaram, pela primeira vez, os brevipolidos K-O (**14-18**) das partes aéreas de *H. brevipes* e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9), apoiada por estudos *in silico*. Seus potenciais citotóxicos foram avaliados frente às células de câncer de nasofaringe (KB), laringe (Hep-2), colorretal (HCT-15), cervical (HeLa), mama (MCF-7) e próstata (PC-3), como controle positivo foi utilizado a vimblastina ( $CI_{50} = 0,001-0,007 \mu\text{M}$ ). Contra as células HCT-15, nenhuma substância foi citotóxica com  $CI_{50} > 10 \mu\text{M}$ . Contra células MCF-7, a substância **15** apresentou  $CI_{50} = 9,3 \mu\text{M}$ , as demais substâncias  $> 10 \mu\text{M}$ . Para as outras linhagens celulares avaliadas, as substâncias apresentaram  $CI_{50} = 1,7-10 \mu\text{M}$  (Quadro 3) [95]. As substâncias apresentaram-se promissoras protótipos a fármaco antitumoral frente às células KB, Hep-2, HeLa e PC-3 por apresentar baixos valores de  $CI_{50}$  [128].

Sheng *et al.* (2020) sintetizam o (+)-brevipolido H (**11**) e avaliaram seu efeito citotóxico frente às células PC-3 de câncer de próstata humano resistente à castração. A substância induziu efeitos anticancerígenos causando disfunção mitocondrial e apoptose celular [104].

#### 5.7.5 Fupironas

Dessa subclasse foram isoladas duas substâncias: fupironas A-B (**67-68**). Gao *et al.* (2020) isolaram, pela primeira vez, as hyptolactonas do fungo endofítico *Fusarium* sp. F20 (Nectriaceae), isolado dos caules de *Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde (Berberidaceae), os autores não atribuíram a estereoquímica dos carbonos assimétricos (Figura 9). Essas substâncias ( $1 \text{ mg/mL}$ ) foram submetidas a ensaios antibacterianos frente às bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, bactérias gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e a ensaio de atividade inibitória de sinalização entre bactérias - QS (*Quorum Sensing*) contra *Chromobacterium violaceum*. Entretanto, nenhum efeito antibacteriano foi detectado (dados não apresentados no artigo) [22].

### 5.7.6 *Gamahonolidos*

Dessa subclasse foram isoladas duas substâncias: gamahonolidos A-B (**21-22**). Koshino *et al.* (1992) isolaram, pela primeira vez, os gamahonolidos do fungo *E. typhina* (Clavicipitaceae) isolado da erva *Phleum pratense* L. (Poaceae), e a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). A atividade antifúngica *in vitro* da substância **21** frente a *Cladosporium herbarum* foi constatada por análise bioautográfica com uma quantidade de 25 µg/spot em uma placa de sílica-gel de cromatografia em camada de delgada. A atividade inibitória da substância **22** não foi avaliada [75], e até o momento, não há relatos de sua atividade biológica.

### 5.7.7 *Hyptenolido*

Costa *et al.* (2014) obtiveram, pela primeira vez, o hyptenolido (**23**) das partes aéreas de *H. macrostachys* (Lamiaceae), e a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). O efeito antiespasmódico *ex vivo* na traqueia, induzido com carbacol (CCh), e no íleo, induzidos com CCh e histamina, de *Cavia porcellus* (porquinho-da-índia) foi investigado. O efeito foi avaliado comparando-se as respostas antes (controle) e após a adição da substância **23**. A hyptolactona não exerceu efeito relaxante na traqueia na presença ou ausência de epitélio funcional, entretanto, apresentou atividade no íleo, inibindo as contrações fásicas induzidas por CCh e histamina (Quadro 3). Ao comparar os valores de  $CI_{50}$ , a inibição das contrações fásicas induzidas por histamina foi mais potente de quando induzida por CCh [100].

### 5.7.8 *Lippialactona*

Ludere, van Ree e Vleggaar (2013) isolaram, pela primeira vez, a lippialactona (**25**) das partes aéreas de *L. javanica* (Verbenaceae), os autores não determinaram a estereoquímica de nenhum dos carbonos assimétricos, sendo determinada posteriormente por síntese orgânica (Figura 9) [129]. Essa substância foi avaliada *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina (D10) com  $CI_{50}$  de 9,1 µg/mL, a substância foi ativa frente ao microrganismo, entretanto, seu efeito foi menor quando comparado com a cloroquina ( $CI_{50} = 0,015$  µg/mL) [74].

### 5.7.9 *Monticolidos e monticofuranolido*

Da subclasse dos monticolidos já foram isoladas seis substâncias: monticolidos A-F (**26-31**), e da classe dos monticofuranolidos, apenas o monticofuranolido A (**78**). Martínez-Fructuoso *et al.* (2019) isolaram, pela primeira vez, as hyptolactonas **26** e **27** das folhas de *H. monticola* (Lamiaceae), as hyptolactonas já conhecidas **34-36**, e pela primeira vez, as hyptolactonas **39-41**, **85** e **86** das partes aéreas de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). Essas substâncias apresentaram efeitos citotóxicos *in vitro* frente às células humanas de câncer cervical (HeLa), colorretal (HCT-15) e mamário (MCF-7). Dentre os monticolidos, o **26** obteve melhores resultados citotóxicos (Quadro 3), principalmente, frente às células HeLa, com  $Cl_{50}$  de 2,7  $\mu$ M, como controle positivo foi utilizado a vimblastina, com  $Cl_{50}$  de 0,012; 0,011 e 0,011  $\mu$ M, e a pironetina, com  $Cl_{50}$  de 0,015; 0,092 e < 0,015  $\mu$ M, respectivamente [19]. Apesar da diferença de valores entre essa hyptolactona e os fármacos de referência, a hyptolactona inibiu a proliferação celular em razoável concentração frente às células HeLa, sendo necessários estudos mais aprofundados de seus efeitos citotóxicos.

A atividade citotóxica dessas substâncias foi apoiada por estudos *in silico*, estudos de *docking molecular* indicaram que as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas da classe das hyptolactonas possuem alta afinidade pelo sítio de ligação da  $\alpha$ -tubulina à pironetina, o que pode ser um possível mecanismo que contribui para os seus potenciais citotóxicos [19].

Da Silva *et al.* (2021) isolaram as substâncias **26** e **27**, e pela primeira vez, as substâncias **28-31** das folhas de *H. monticola* [87], enquanto Martínez-Fructuoso *et al.* (2020) isolaram a substância **78**, pela primeira vez, das folhas de *H. monticola* [20]. Em ambos os estudos, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). Até o momento, não existem atividades biológicas atribuídas a essas hyptolactonas.

### 5.7.10 *Olguinas e neohyptolido*

Da subclasse das olguinas já foram isoladas três substâncias: olguina (**33**) [112], 4-deacetóxi-10-*epi*-olguina (**58**) [78] e 10-*epi*-olguina (**59**) [89], e apenas o neohyptolido (**32**) da subclasse dos neohyptolidos [101].

Alemany *et al.* (1979) isolaram, pela primeira vez, a substância **33** das folhas e flores de uma espécie não identificada do gênero *Hyptis* (Lamiaceae) [112], e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9). O mesmo grupo de pesquisa isolou a substância **1** dessa mesma espécie [111]. São as únicas hyptolactonas incluídas no estudo que foram obtidas de espécies não classificadas.

A substância **58**, também chamada de 5-deacetóxi-5'-*epi*-olguina [93,96], foi isolada das partes aéreas de *H. oblongifolia* (Lamiaceae) por Pereda-Miranda, García e Delgado (1990), juntamente com as hyptolactonas **60-62**, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). A hyptolactona **58** foi submetida a ensaios citotóxicos frente às células humanas de câncer de mama (MCF-7), pulmão (A-549) e colorretal (HT-29) (Quadro 3), apresentando DE<sub>50</sub> de 36,8; 74,8 e 40,3 µg/mL, respectivamente. Além disso, essa substância não apresentou efeito de letalidade em *Artemia salina*, sendo um indicativo de baixa toxicidade para essas substâncias [78]. Essa hyptolactona não possui potencial como protótipo a fármacos antitumorais frente à essas linhagens avaliadas por apresentar DE<sub>50</sub> elevado [70].

Rojas *et al.* (1992) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* da substância **58** (CIM = 100 µg/mL) frente a *Bacillus subtilis*, como controle positivo foi utilizado a estreptomicina (CIM = 1,56 µg/mL) [65]. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essa substância possui moderada atividade antimicrobiana (CIM entre 10-100 µg/mL) [68].

Rahman e Gibbons (2015) isolaram a substância **58**, e pela primeira vez, a substância **32** das partes aéreas de *N. paniculata* (Lamiaceae), e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9). Essas hyptolactonas foram avaliadas *in vitro* frente à cepa ATCC 25923 de *S. aureus*, cepas SA1199B, RN4220, EMRSA-15, XU-212 de *S. aureus* multirresistente às drogas (MDRSA, *Multidrug-resistant S. aureus*) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, *Methicillin-resistant S. aureus*). Como controle positivo foi utilizado norfloxacino (CIM = 1-32 µg/mL) [101]. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), a substância **32** apresentou moderado efeito antibacteriano (CIM entre 10-100 µg/mL) com CIM de 64 µg/mL para

as cepas SA1199B, RN4220, EMRSA-15, XU-212, e ausência de atividade antimicrobiana (CIM > 100 µg/mL) para a cepa ATCC 25923 com CIM de 128 µg/mL. A substância **58** apresentou moderado efeito antibacteriano com CIM de 64 µg/mL para as cepas SA1199B e EMRSA-15 e efeito inativo para as demais cepas, com CIM de 128 µg/mL [68].

No estudo de obtenção das hyptolactonas **24**, **34-36** das partes aéreas de *H. pectinata*, Pereda-Miranda *et al.* (1993) sintetizaram a hyptolactona **58**. A substância foi submetida a ensaios citotóxicos frente às células humanas de câncer colorretal (Col2), mamário (BC1 e ZR75-1), fibrossarcoma (HT-1080), pulmão (Lu1), melanoma (Mel2), nasofaringe (KB), epidermóide (A431), próstata (LNCaP), células KB resistente a vimblastina (KB-V) e leucemia linfocítica murina (P-388) (Quadro 3). Essa hyptolactona apresentou melhor efeito citotóxico frente às células P-388, LNCaP, A431, KB, Col2 e Lu1 com DE<sub>50</sub> de 0,4; 1,8; 1,9; 2,9; 3,0 e 3,3 µg/mL, respectivamente [9], o que pode ser considerada uma potente atividade citotóxica (DE<sub>50</sub> < 4 µg/mL) [70], logo essa hyptolactona possui potencial para se tornar um protótipo a fármaco antitumoral frente às linhagens avaliadas.

A substância **59** foi primeiramente isolada por Almtorp, Hazell e Torssell (1991) das partes aéreas de *Hyptis capitata* Jacq. (Lamiaceae) [89] e das folhas de *R. ternifolia* (Lamiaceae) por Lu *et al.* (1997) [70]. Em ambos os estudos, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9).

Lu *et al.* (1997) avaliaram o efeito citotóxico frente às células humanas cancerígenas de mama (BC1), pulmão (Lu1), colorretal (Col2), nasofaringe (KB, KB-V(-VLB), KB-V(+VLB)) e próstata (LNCaP), com exceção das células Lu1 (DE<sub>50</sub> = 4,8 µg/mL), apresentou DE<sub>50</sub> entre 1,2 e 2,1 µg/mL para as demais linhagens (Quadro 3). Essa hyptolactona possui potencial a se tornar protótipo a fármaco antitumoral frente à essas linhagens por apresentar DE<sub>50</sub> < 4,0 µg/mL [70].

#### 5.7.11 *Spicigera lactona*

Aycard *et al.* (1993) isolaram, pela primeira vez, a spicigera lactona (**43**) das inflorescências de *H. spicigera* (Lamiaceae) e não determinaram sua estereoquímica (Figura 9) [116]. Até o presente trabalho não há relatos de que essa substância tenha sido isolada novamente e muito menos de suas atividades biológicas.

### 5.7.12 *Spicigerolido*

Pereda-Miranda, Fragoso-Serrano e Rojas (2001) isolaram, pela primeira vez, o spicigerolido (**44**) das partes aéreas desengorduradas de *H. spicigera* e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9). A substância teve seu potencial citotóxico avaliado frente às células de carcinoma nasofaríngeo humano (KB) ( $DE_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$ ). A ellipticina foi utilizado como controle positivo ( $DE_{50} = 0,4 \mu\text{g/mL}$ ) [96].

Falomir *et al.* (2003) sintetizam o (-)-spicigerolido (**44**), e avaliaram sua citotoxicidade em células humanas tumorais de câncer de ovário (OVCAR), nasofaringe (KB), células humanas de câncer colorretal (HCT-15) e cervical (SQC-1 UISO) com  $DE_{50}$  de 19,0; 5,8; 17,4 e 15,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Como controle positivo foi utilizado a ellipticina com  $DE_{50}$  de 0,13; 0,10; 0,17 e 0,04  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [106].

Mendoza-Espinoza *et al.* (2009) avaliaram a citotoxicidade das substâncias **44** e **24** frente às células humanas tumorais de câncer de laringe (Hep-2), nasofaringe (KB) e células humanas de câncer cervical (HeLa), como controle positivo foi utilizado a ellipticina ( $CI_{50} = 0,4 \mu\text{g/mL}$ ). Apesar da substância **44** ( $CI_{50} = 9,4; 5,4$  e  $15,9 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) ser menos potente que a **24** ( $CI_{50} = 6,2; 3,6$  e  $2,8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e a ellipticina, essa hyptolactona apresentou baixo valor  $CI_{50}$  frente às células KB.

A fim de obter informações sobre o mecanismo de ação citotóxica das substâncias **24** e **44**, Mendoza-Espinoza *et al.* (2009) também avaliaram a progressão do ciclo celular das células HeLa por citometria de fluxo, mais especificamente, as fases G1, S e G2 da interface do ciclo celular. Após 48h de exposição, foi observado um impedimento significativo do crescimento celular na fase G2, com redução de 14 para 23% [30].

De acordo com o que foi observado nos estudos acima, a substância **44** é um promissor protótipo a fármaco antitumoral frente à células KB, por apresentar  $DE_{50}$  e  $CI_{50} < 4,0 \mu\text{g/mL}$  [69,70], enquanto para as outras linhagens de células avaliadas, pode ser considerada moderadamente ativa.

### 5.7.13 *Synargentolidos*

Dessa subclasse já foram isoladas cinco substâncias: synargentolidos A-E (**45-49**). Collett, Davies-Coleman e Rivett (1998) isolaram, pela primeira vez, os synargentolidos **45-49** das folhas e caules de *Syncolostemon argenteus* N.E.Br. (Lamiaceae) [94]. A estereoquímica das substâncias **45** e **46** foi completamente elucidada por sínteses orgânicas nos estudos de García-Fortane *et al.* (2005) [130] e Prasad e Gutala (2013) [131], respectivamente. Até o presente estudo, a estereoquímica total das substâncias **47-49** não foi determinada (Figura 9). Não há relatos de que os synargentolidos tenham sido isolados novamente e muito menos de suas atividades biológicas.

### 5.7.14 *Syndenolido*

Davies-Coleman e Rivett (1994) isolaram, pela primeira vez, o syndenolido (**50**) das folhas de *S. densiflorus* (Lamiaceae), juntamente com uma hyptolactona já conhecida (**19**), a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos dessas hyptolactonas não foi determinada nesse estudo [90], sendo determinada posteriormente por sínteses orgânicas (Figura 9) [123,127]. Não há relatos de atividades biológicas para essas hyptolactonas, e de que a substância **50** tenha sido isolada novamente.

### 5.7.15 *Synparvolidos*

Da subclasse do *synparvolidos* já foram isoladas três substâncias: synparvolido A-C (**51-53**). Os synparvolidos foram obtidos, pela primeira vez, das folhas de *Syncolostemon parviflorus* E.Mey. ex Benth. (Lamiaceae) e a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9) [93]. Não há relatos de que os synparvolidos tenham sido isolados novamente e muito menos de suas atividades biológicas.

### 5.7.16 *Synrotolido*

Davies-Coleman, English e Rivett (1987) isolaram, pela primeira vez, a substância **54** das folhas de *Syncolostemon rotundifolius* E.Mey. ex Benth.

(Lamiaceae) e a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9) [88]. Sabitha *et al.* (2014) avaliaram a atividade citotóxica do (-)-synrotolido sintético (**54**) frente às células humanas de câncer de neuroblastoma (SK-N-SH), colorretal (HeLa), pancreático (PANC 1) e hepático (HepG2), apresentando inibição de crescimento (*growth*) em 50% (IG<sub>50</sub>) de 10,2; 7,4; 0,06 e 5,7 µM, respectivamente. Como controle positivo foi utilizada combretastatina, apresentando IG<sub>50</sub> de 4,3; 2,0; 0,04 e 3,1 µM, respectivamente. Como pode ser visto, essa hyptolactona apresentou maior potencial como agente anticâncer em células PANC 1 [109].

#### 5.7.17 *Umuravumbolidos*

Dessa subclasse já foram isoladas duas substâncias: umuravumbolido (**55**) e deacetilumuravumbolido/desacetilumuravumbolido (**20**). Juntamente com a substância **19**, Van Puyvelde *et al.* (1979) isolaram as substâncias **20** e **55**, pela primeira vez, das folhas de *T. riparia* (Lamiaceae) [113]. A estereoquímica total dessas hyptolactonas só foi elucidada (Figura 9) no estudo de Davies-Coleman e Rivett (1995), com o isolamento da substância **20** das folhas de *T. riparia* e síntese da substância **55** [91].

Sabitha *et al.* (2012) sintetizaram as substâncias **20** e **55** e investigaram seus efeitos citotóxicos frente às células humanas de câncer mamário (MDA-MB-231 e MCF-7), cervical (HeLa) e pulmonar (A549). A substância **20** não apresentou citotoxicidade para células MDA-MB-231, enquanto para as demais células, obteve-se CI<sub>50</sub> de 8,19; 3,48 e 1,54 µM, respectivamente. A substância **55** apresentou uma maior citotoxicidade, com CI<sub>50</sub> de 0,565; 1,926; 0,245 e 0,936 µM, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado a doxorubicina com CI<sub>50</sub> de 0,501; 1,05; 0,451 e 1,21 µM, respectivamente [108]. Ao comparar seus resultados com os resultados do controle positivo, supõe-se que essas hyptolactonas, principalmente a **55**, possuem potenciais como protótipos a fármacos antitumorais frente às células avaliadas.

#### 5.7.18 *Xylariaopironas*

Dessa subclasse já foram isoladas sete substâncias: xylariaopirona A (**69**), xylariaopirona B (**56**), xylariaopirona C-G (**70-74**) [23,79].

Guo *et al.* (2018) isolaram, pela primeira vez, as substâncias **56**, **69-71** do fungo endofítico *Xylariales* sp. (Xylariaceae), encontrado nas folhas de *Distylium chinense* (Franch. ex Hemsl.) Diels (Hamamelidaceae), e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9). Essas substâncias inibiram *in vitro* a proliferação do fitopatógeno *Erwinia carotovora* com valores de CIM variando entre 20,5-24,7 µg/mL (Quadro 3) [23]. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essas substâncias possuem moderada atividade antimicrobiana (CIM entre 10-100 µg/mL) [68]. Suas atividades citotóxicas foram investigadas frente às células humanas de câncer de mama (MDA-MB-231), pulmão (A549), células humanas de câncer hepático (HepG2), e cervical (CaSki). As substâncias não foram citotóxicas com  $CI_{50} > 50$  µg/mL. Como controles positivos foram utilizados anfotericina B/estreptomicina (1:1) para atividade antibacteriana, e mitomicina para atividade citotóxica, contudo os valores de suas concentrações de inibição não foram informados [23].

Yang *et al.* (2020) isolaram as substâncias **72-74**, pela primeira vez, de *Xylariales* sp. e determinaram a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos (Figura 9). As substâncias foram submetidas a ensaios *in vitro* de inibição enzimática da monoamina oxidase B (MAO-B), efeito de letalidade em *Artemia salina* e efeito antibacteriano frente ao fitopatogênico *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, e patógenos humanos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Quadro 3). Como controles positivos, para *E. coli* foi utilizado ofloxacino (CIM = 0,015 µg/mL), para *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi utilizado amoxicilina (CIM = 0,15 e 0,12 µg/mL, respectivamente), para *E. carotovora* subsp. *carotovora* foi utilizado estreptomicina (CIM = 1,54 µg/mL), para MAO-B foi utilizado a selegilina ( $CI_{50}$  = 0,5 µmol/mL) e para *Artemia salina* foi utilizado tween 20 (sua razão de inibição foi de 95%) [79].

No ensaio de inibição da MAO-B, apenas a substância **74** apresentou inibição significativa com um valor de  $CI_{50}$  de 15,6 µmol/mL, para as outras substâncias os valores foram  $> 100$  µmol/mL. No ensaio de inibição de *Artemia salina*, as substâncias não apresentaram toxicidade com inibição de  $< 20\%$ . As substâncias não demonstraram atividade frente a *E. carotovora* subsp. *carotovora* com CIM  $> 100$  µg/mL, frente aos demais microrganismos, as CIM variaram de 25,6-57,9 µg/mL [79]. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias

puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essas substâncias possuem moderada atividade antimicrobiana (CIM entre 10-100 µg/mL) [68].

#### 5.7.19 Outras hyptolactonas (Miscelânea)

Diferentemente das demais substâncias, as hyptolactonas **60-66** e **75-77** não foram atribuídas em subgrupos.

Das partes aéreas de *H. oblongifolia* (Lamiaceae), Pereda-Miranda, García e Delgado (1990), isolaram a substância **58**, e pela primeira vez, as hyptolactonas: 6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*S*,2*R*-(di-hidróxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**60**), 6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetilóxi)-1*R*-(hidróxi)-2*R*-(metóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**61**) e 6*R*-[1*R*,2*R*,5*R*,6*S*-(tetra-acetilóxi)-3*E*-heptenil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**62**), a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). As hyptolactonas **58** e **62** foram submetidas a ensaios citotóxicos frente às células humanas de câncer de mama (MCF-7), pulmão (A-549) e colorretal (HT-29) (Quadro 3). A substância **62** foi mais citotóxica nas três linhagens celulares avaliadas com DE<sub>50</sub> de 31,2; 56,3 e 34,7 µg/mL, respectivamente. Além disso, as quatro hyptolactonas não apresentaram efeito de letalidade em *Artemia salina*, sendo um indicativo de baixa toxicidade [78]. Essas hyptolactonas não possuem potencial como protótipos a fármacos antitumorais frente às linhagens avaliadas por apresentar DE<sub>50</sub> elevado [70].

Rojas *et al.* (1992) isolaram as substâncias **58**, **60-62** de *H. oblongifolia* e o hyptolido (**24**) de *H. pectinata*, a estereoquímica de todos os carbonos assimétricos foi determinada (Figura 9). As substâncias tiveram seus efeitos antibacterianos *in vitro* frente a *B. subtilis* avaliados com CIM de 100 µg/mL, como controle positivo foi utilizada a estreptomicina (CIM = 1,56 µg/mL) [65]. De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essa substância possui moderada atividade antimicrobiana (CIM entre 10-100 µg/mL) [68].

Carmona *et al.* (2003) isolaram a argetilactona (**2**) e as substâncias (6*R*)-(5'-oxo-hepten-1'*E*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**63**) e (6*S*)-(5'-oxo-hepten-1'*Z*,3'*E*-dienil)-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**64**) das folhas de *R. cf. monoica* (Lamiaceae) [71]. Entretanto, a estereoquímica das substâncias (Figura 9) só foi

completamente elucidada por sínteses orgânicas no estudo de Bouzbouz *et al.* (2004) [122].

Carmona *et al.* (2003) avaliaram o efeito leishmanicida e citotóxico das substâncias **63** e **64**. O efeito leishmanicida foi avaliado *in vitro* frente à cepa M/HOM/87/UA140 de *Leishmania panamensis*, sendo sensível a essas substâncias com DE<sub>50</sub> de 1,9 e 0,42 µg/mL, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado a glucantime (DE<sub>50</sub> de 6,7 µg/mL). Essas substâncias se mostraram citotóxicas frente às células normais promonocíticas humanas (U-937), com dose letal em 50% (DL<sub>50</sub>) de 2,1 e 1,0 µg/mL, respectivamente, portanto não são promissoras, apesar de apresentarem melhores resultados leishmanicidas do que o controle positivo [71].

A estereoquímica de todos os carbonos assimétricos do syndenolido (**50**) foi determinada por Collett *et al.* (1997), após a saponificação da 6*R*-[2*R*,4*S*,6*S*-(triacetóxi)-heptil]-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**65**) [123], isolada, pela primeira vez, das cascas de troncos maduros de *Cryptocarya latifolia* Sond. (Lauraceae) por Drewes *et al.* (1995), entretanto, sua estereoquímica ainda não havia sido determinada [73], sendo determinada totalmente (Figura 9) no estudo de Collett *et al.* (1997). A substância **65** é também conhecida como triacetato por possuir três grupos acetoxila em sua cadeia lateral. Até o momento, não há relatos de que essas substâncias tenham sido isoladas novamente, muito menos de suas atividades biológicas.

Drewes, Horn e Wijewardene (1996) isolaram, pela primeira vez, um isômero do umuravumbolido (**55**) das cascas de *C. latifolia*, denominado (2'-acetóxi)-6-hept-4-enil-5,6-di-hidro-2*H*-piran-2-ona (**66**) [92], a estereoquímica de todos os carbonos assimétrico não foi determinada (Figura 9). Até o momento, não há relatos de que essa substância tenha sido isolada novamente e muito menos de suas atividades biológicas.

Além das xylariaopironas [23,79], outras hyptolactonas encontradas em fungo endófito são as 6-(2'*R*-hidróxi-3'*E*,5'*E*-dieno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**75**), 6-(2'*S*-hidróxi-5'*E*-eno-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**76**) e 6-(2'*S*-hidróxi-1'-heptil)-4-hidróxi-3-metil-2*H*-piran-2-ona (**77**). Zhao *et al.* (2018) isolaram essas substâncias, pela primeira vez, de *P. ochrochloron* (Trichocomaceae), das raízes de *Taxus xmedia* Rehder (Taxaceae) e determinaram a estereoquímica de

todos os carbonos assimétricos (Figura 9). As substâncias tiveram seus potenciais antifúngico, antibacteriano e citotóxico avaliados.

A atividade antifúngica das substâncias **75-77** foi avaliada *in vitro* contra 20 espécies de fungos de interesses agrícolas: *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, *Alternaria brassicae*, *Cylindrocladium parasiticum*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora personata*, *Bipolaris carbonum*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis fabiopsis*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago scitaminea*, *Helminthosporium maydis*, *Ascochyta gossypii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Exserohilum turcicum*. Como controle positivo foi utilizado cetoconazol (CIM = 0,78-6,25 µg/mL). As substâncias apresentaram CIM entre 12,5 e > 100 µg/mL (Quadro 3) [24].

A atividade antibacteriana das substâncias **75-77** foi avaliada *in vitro* contra 10 espécies de bactérias: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella Typhi*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. Como controle positivo foi utilizado a ciprofloxacina (CIM entre 0,78-6,25 µg/mL). As substâncias apresentaram semelhantes atividades com CIM entre 25 e 100 µg/mL (Quadro 3) [24].

De acordo com a escala de intensidade da atividade antimicrobiana para substâncias puras, determinada por Ríos e Recio (2005), essas substâncias apresentaram moderada atividade antibacteriana (CIM entre 10-100 µg/mL) e de moderada a inativa atividade antifúngica (CIM > 100 µg/mL) [68].

Suas atividades citotóxicas foram avaliadas frente às células humanas de câncer cerebral (LN229), colorretal (LOVO), hepático (Huh7 e MHCC97H), intestinal (MGC), mamário (MDA231) e pulmonar (A549). Essas substâncias não foram citotóxicas, apresentando  $CI_{50} > 100$  µg/mL, como controle positivo foi utilizado sorafenibe ( $CI_{50}$  entre 0,31-2,44 µg/mL) [24].

## 5.8 Relação do grupo lactona $\alpha,\beta$ -insaturada e a atividade biológica

### 5.8.1 Efeito citotóxico

Como demonstrado no item 5.3.1 (página 67), a avaliação da citotoxicidade em células cancerígenas é a atividade predominante na classe das hyptolactonas (78,95%), principalmente, dentre as hyptolactonas originadas de plantas (66,67%). Das 45 hyptolactonas que foram submetidas a ensaios citotóxicos frente às células cancerígenas, 36 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, 6 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas, 2 são  $\delta$ -lactonas sem insaturação no anel e 1 é  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (Quadro 5).

**Quadro 5** – Classificações das 45 hyptolactonas com efeitos citotóxicos frente às células cancerígenas avaliados.

Classificações	Hyptolactonas	Ref.
36 $\delta$ -lactonas $\alpha,\beta$ -insaturadas	2	[107]
	3	[9]
	4-18	[95,98,99]
	20 e 55	[108]
	24, 38 e 42	[16]
	26, 27, 34-36, 39-41	[19]
	44	[96]
	54	[109]
	56*	[23]
	58 e 62	[78]
	59	[70]
6 $\delta$ -lactonas $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas	69-71*	[23]
	75-77*	[24]
2 $\delta$ -lactonas	85 e 86	[19]
1 $\gamma$ -lactona $\alpha,\beta$ -insaturada	80	[18]

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Isoladas de fungos.

As  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **3, 10, 12, 13, 16, 20, 24, 34-36, 40, 41, 44, 54, 55, 58 e 59** se destacaram por serem as substâncias presentes neste estudo que tiveram os melhores resultados de citotoxicidade frente às células tumorais.

A substância **3** apresentou efeito significativo frente à célula P-388 com  $DE_{50}$  de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  [9]. As substâncias **10**, **12**, **13** e **16** apresentaram efeito significativo frente às células KB com  $CI_{50}$  de 0,3; 1,9; 1,2  $\mu\text{g/mL}$  [99] e 1,7  $\mu\text{M}$  [80], respectivamente, a substância **44** apresentou  $DE_{50}$  de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  na mesma linhagem celular [96]. Frente à célula HeLa, a substância **10** apresentou  $CI_{50}$  de 0,07  $\mu\text{g/mL}$  [99].

A substância **20** apresentou  $CI_{50}$  de 1,54  $\mu\text{M}$  frente à célula A549 [108]. A substância **24** apresentou  $DE_{50}$  de 1,6  $\mu\text{g/mL}$  frente à célula P-388 [9]. A substância **34** apresentou-se eficiente frente às células BC1, HT-1080, Lu1, Mel2, Col2, P-388, A431, LNCaP, KB e KB-V com  $DE_{50}$  de 1,0; 1,7; 0,9; 0,7; 1,0; 0,9; 1,4; 0,7 [9]; 0,63 [18] e 1,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [9]. A substância **35** apresentou-se eficiente frente às células P-388, A43, LNCaP, ZR75-1, Col2 e KB com  $DE_{50}$  de 0,1; 0,6; 0,9; 1,6; 1,1 e 1,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [9]. A substância **36** apresentou-se eficiente frente às células A431 e LNCaP com  $DE_{50}$  de 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , e frente às células HT-1080, Col2, KB e ZR75-1 com  $DE_{50}$  de 1,8; 1,6; 1,7 e 1,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [9], frente às células MCF-7 e HeLa com  $CI_{50}$  de 1,0 e 0,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente [19].

A substância **40** apresentou  $CI_{50}$  de 1,3 e 1,4  $\mu\text{M}$  frente às células MCF-7 e HeLa, respectivamente [19]. A substância **41** apresentou-se eficiente frente às células MCF-7, HeLa e HCT-15 com  $CI_{50}$  de 0,5; 0,7 e 0,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente [19]. A substância **54** apresentou  $IG_{50}$  de 0,06  $\mu\text{M}$  frente à célula PANC 1 [109].

A substância **55** apresentou-se eficiente frente às células HeLa, MDA-MB-231, MCF-7 e A549 com  $CI_{50}$  de 0,245; 0,565; 1,926 e 0,936  $\mu\text{M}$ , respectivamente [108]. A substância **58** apresentou-se eficiente frente às células P-388, LNCaP e A431 com  $DE_{50}$  de 0,4; 1,8 e 1,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente [9]. A substância **59** apresentou-se eficiente frente às BC1 e KB com  $DE_{50}$  de 1,8  $\mu\text{g/mL}$  e frente à célula LNCaP com  $DE_{50}$  de 1,2  $\mu\text{g/mL}$  [70].

A hyptolactona **80** é a única  $\gamma$ -lactona avaliada quando ao efeito citotóxico, entretanto, não apresentou citotoxicidade frente às células KB com  $DE_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$  [18]. As  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas tiveram seus efeitos citotóxicos avaliados, as substâncias **69-71** foram avaliadas frente às células A549, HepG2, CaSki, e MDA-MB-231, entretanto, não apresentaram citotoxicidade com  $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$  [23]. As substâncias **75-77** foram avaliadas frente às células A549, Huh7, LN229, MGC, MHCC97H, LOVO e MDA231, entretanto, não apresentaram citotoxicidade com  $CI_{50}$

> 100 µg/mL [24]. As δ-lactonas **85** e **86** não possuem insaturação no anel lactônico, e não apresentaram citotoxicidade frente às células MCF-7, HeLa e HCT-15 com  $CI_{50}$  > 10 µM [19].

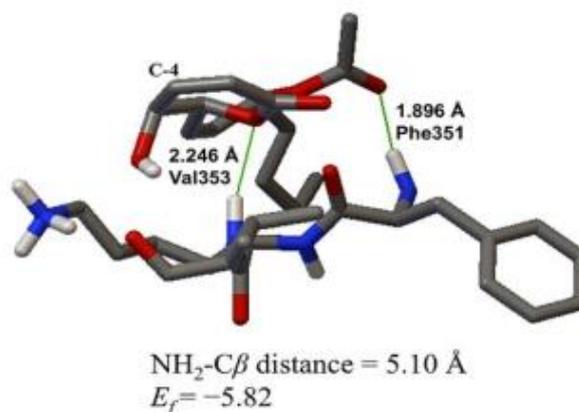
Como observado, as δ-lactonas α,β-insaturadas apresentaram atividades citotóxicas, enquanto as δ-lactonas α,β,γ,δ-insaturadas, γ-lactona α,β-insaturada e as δ-lactonas sem insaturação no anel, não apresentaram efeito citotóxico significativo, o que leva a acreditar que a α,β-insaturação é muito importante para o efeito biológico demonstrado.

As δ-lactonas α,β-insaturadas são substâncias estruturalmente relacionadas à pironetina, produto natural com forte atividade citotóxica e que apresenta em sua estrutura o grupo δ-lactona α,β-insaturada, levando-nos a acreditar que os potenciais terapêuticos das hyptolactonas é de fato devido à presença deste grupo funcional. Bañuelos-Hernández *et al.* (2014) realizaram um estudo de *docking molecular* para identificar possíveis modos de ligação entre a pironetina e a α-tubulina na formação do complexo pironetina-tubulina. O resultado indicou que há interações de ligação de hidrogênio com a pironetina por meio dos resíduos de aminoácidos da asparagina (Asn249 e Asn258) e lisina (Lys352). Observou-se também que o grupamento amino da Lys352 e o carbono β da α,β-insaturação da lactona ( $H_2N-C\beta$ ) estavam próximos o suficiente (3,69 a 5,38 Å) para favorecer uma adição de Michael ( $E_f \approx -7,00$  kcal/mol) [132].

Diante disso, Martínez-Fructuoso *et al.* (2019) realizou um estudo de *docking molecular* com as δ-lactonas α,β-insaturadas: monticolidos **26** e **27**, pectinolidos **36** e **41**, e a α-tubulina. A interação ocorreu principalmente por meio de ligações de hidrogênio estáveis com os resíduos de aminoácidos da fenilalanina (Phe351), valina (Val353) e Lys352 na mesma unidade da α-tubulina proposta para a interação da pironetina, e com energias de ligação semelhantes. Para o complexo com a substância **36**, a distância entre o grupo amino da Lys352 e o carbono β da δ-lactona α,β-insaturada foi de 5,10 Å, perto o suficiente para favorecer uma adição de Michael ( $E_f = -5,82$  kcal/mol). Outras interações foram observadas: três ligações de hidrogênio entre o oxigênio do anel da δ-lactona e o hidrogênio amídico da Val353; carbonila do resíduo acetóxi em C-3' na cadeia lateral com o hidrogênio amídico da Phe351, e a

carbonila do resíduo acetoxila em C-5 com o hidrogênio amídico da Lys352 (Figura 15) [19].

**Figura 15** – Complexo entre o pectinólido C (**36**) e  $\alpha$ -tubulina, mostrando a distância entre o grupo amino residual do aminoácido lisina (Lys352) e o carbono  $\beta$  da lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $H_2N-C\beta$ ). Os valores da energia de acoplamento ( $E_f$ ) e distância da ligação  $H_2N-C\beta$  são indicados.



**Fonte:** Martínez-Fructuoso *et al.* (2019) [19].

As demais substâncias exibiram valores semelhantes de interações observadas para a substância **36**. A análise de *docking molecular* confirmou que o grupo  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada das hyptolactonas é importante para o efeito biológico e que podem formar uma ligação covalente com a Lys352 da  $\alpha$ -tubulina por meio de adição de Michael [19].

Fármacos antitumorais, como exemplo, o paclitaxel, exerce seus efeitos antitumorais por interagir com a  $\beta$ -tubulina [133]. As hyptolactonas, assim como a pironetina [27], são as primeiras substâncias que interagem com a  $\alpha$ -tubulina e por isso, um novo mecanismo de ação para inibir a proliferação de células tumorais.

### 5.8.2 Efeito antibacteriano

Foi observado nesta revisão sistemática que até o momento não existe nenhum relato científico que correlacione o potencial herbicida, antiespasmódico e antimicrobiano das hyptolactonas com a  $\alpha,\beta$ -insaturação do anel lactônico, entretanto,

pelo fato desta parte da molécula poder ser considerada um farmacóforo, interagindo com os aminoácidos presentes em proteínas importantes de células tumorais, acreditamos que comportamento semelhante deve acontecer para com os demais alvos biológicos, interagindo com determinados aminoácidos de proteínas importantes presentes em plantas e em microrganismos, como por exemplo, as bactérias. Como demonstrado no item 5.3.1 (página 67), a segunda atividade biológica mais utilizada nos estudos foi a atividade antibacteriana, com 20 hyptolactonas avaliadas (35,09%), principalmente, dentre as hyptolactonas originadas de plantas (17,54%). Dentre as 20 hyptolactonas que foram submetidas a ensaios antibacterianos, 10 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, 9 são  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas e 1 é  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (Quadro 6).

**Quadro 6** – Classificações das 20 hyptolactonas com efeitos antibacterianos avaliados.

Classificações	Hyptolactonas	Ref.
10 $\delta$ -lactonas $\alpha,\beta$ -insaturadas	<b>24</b>	[9]
	<b>32 e 58</b>	[101]
	<b>34-36</b>	[18]
	<b>56*</b>	[23]
	<b>60-62</b>	[65]
9 $\delta$ -lactonas $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas	<b>69-74*</b>	[23,79]
	<b>75-77*</b>	[24]
1 $\gamma$ -lactona $\alpha,\beta$ -insaturada	<b>80</b>	[18]

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Isoladas de fungos.

As  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **24**, **58**, **60-62** inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis* (bactéria gram-positiva) com concentração inibitória mínima (CIM) de 100  $\mu\text{g/mL}$  [65]. Entretanto, as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **34-36** e as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas **75-77** inibiram em menores concentrações, com CIM de 6,25; 25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  para as substâncias **34-36**, respectivamente [9], e CIM de 50  $\mu\text{g/mL}$  para as substâncias **75-77** [24].

As hyptolactonas **32**, **34-36**, **58** ( $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas), **72-77** ( $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas) e **80** ( $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada) apresentaram atividade frente a

*Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva). As substâncias **32** e **58** inibiram seu crescimento com CIM de 128 µg/mL [101]. As substâncias **75-77** inibiram seu crescimento com CIM de 50 µg/mL [24]. As substâncias **34-36** e **80** inibiram seu crescimento com CIM de 12,5; 100 [9]; 64 e 32 µg/mL [18], respectivamente. As substâncias **72-74** apresentaram melhores resultados de inibição com CIM de 46,9; 47,8 e 48,9 µg/mL, respectivamente [79].

Contra *S. aureus* multirresistente às drogas (*Multidrug-resistant S. aureus* - MDRSA) e *S. aureus* resistente à metilina (*Methicillin-resistant S. aureus* - MRSA), as substâncias **34** e **36** inibiram o crescimento microbiano com CIM de 128 µg/mL, para a substância **35** a CIM foi de 256 µg/mL [18]. As substâncias **32**, **58** [101] e **80** [18] apresentaram melhor efeito antibacteriano contra MDRSA e MRSA em menor concentração, inibindo crescimento microbiano com CIM de 64 µg/mL.

As substâncias **34** e **35** inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias gram-negativas) com CIM de 200 e 300 µg/mL para cada substância [9]. As substâncias **75-77** inibiram o crescimento das duas espécies com CIM de 50 µg/mL [24]. As substâncias **72-74** apresentaram melhor atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* com CIM de 55,6; 57,9 e 56,3 µg/mL, respectivamente, as substâncias **72** e **73** apresentaram melhor atividade antibacteriana frente a *E. coli* com CIM de 25,6 e 32,4 µg/mL, respectivamente, a CIM foi de 57,8 µg/mL para a substância **74** [79].

Contra *Erwinia carotovora* (bactéria gram-negativa), a δ-lactona α,β-insaturada **56** e as δ-lactonas α,β,γ,δ-insaturadas **69-71** inibiram o crescimento microbiano com CIM de 20,5; 25,5; 22,6 e 24,7 µg/mL, respectivamente [23].

## 5.9 Limitações

Como demonstrado no item 5.8.2, as hyptolactonas apresentaram potenciais antibacterianos frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas, entretanto, mesmo com a falta de informação do potencial biológico desses metabólitos secundários, os resultados demonstraram que a α,β-insaturação do anel lactônico seja responsável por suas atividades biológicas. Por meio desta revisão sistemática, foi observado que os efeitos antibacterianos das hyptolactonas foram limitados ao gênero *Streptococcus*. Até o momento, o hyptolido (**24**) foi a única hyptolactona que

teve seu efeito antibacteriano avaliado frente a uma bactéria do gênero, a espécie *Streptococcus mutans* (bactéria gram-positiva) [31]. Por meio do que foi observado neste capítulo 2, sobre o efeito antibacteriano das hyptolactonas frente às bactérias gram-positivas, o capítulo 3 desta dissertação teve como objetivo avaliar o efeito biológico, pela primeira vez, das hyptolactonas: hyptolido e pectinolidos, isolados de *H. pectinata*, frente a *Streptococcus pyogenes* (bactéria gram-positiva).

### **5.10 Registro e protocolo**

A revisão sistemática não foi registrada pelos revisores, logo, não há um protocolo.

## 6 CONCLUSÕES

O rigor metodológico na avaliação dos estudos presentes na revisão sistemática foi fundamental para a determinação das 86 hyptolactonas existentes e suas atividades biológicas. As evidências científicas presentes nos 60 artigos incluídos neste estudo, demonstram que seus potenciais biológicos sejam devido a presença do grupo lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada na maioria das hyptolactonas. O efeito citotóxico em células cancerígenas são as atividades predominantes na classe, entretanto, apenas as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas apresentaram efeito citotóxico, enquanto as  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas,  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada e  $\delta$ -lactonas sem insaturação no anel não apresentaram citotoxicidade. O que leva a acreditar que a  $\alpha,\beta$ -insaturação é muito importante para o efeito biológico demonstrado, considerado o grupo farmacóforo da classe, e pelos resultados positivos de efeitos antimicrobianos, logo, esse grupamento químico pode ser melhor explorado para estudos envolvendo a descoberta de novos fármacos. A escassez de dados a respeito dos potenciais biológicos *in vivo* das hyptolactonas é provavelmente, consequência da falta de conhecimento científico sobre essa classe de substâncias e pela pequena quantidade que se pode isolar de plantas e fungos. Estudos mais aprofundados, em modelos *in vivo*, resultariam na descoberta de novos efeitos biológicos ou mesmo a confirmação do potencial que essas substâncias têm em se tornarem candidatos a fármaco.

# CAPÍTULO 3

## ISOLAMENTO DO HYPTOLIDO E PECTINOLIDOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

### 7 OBJETIVOS

#### 7.1 Objetivo geral

Realizar o isolamento do hyptolido e pectinolidos presentes nas folhas e inflorescências da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e investigar o potencial antibacteriano frente a *Streptococcus pyogenes*.

#### 7.2 Objetivos específicos

- Obter extratos etanólicos das folhas e inflorescências de *H. pectinata*;
- Obter as frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP) das folhas e inflorescências utilizando cromatografia líquida clássica (CLC);
- Avaliar a atividade de inibição do crescimento microbiano e o efeito bactericida das FEHP frente a *S. pyogenes*;
- Isolar o hyptolido e pectinolidos presentes nas FEHP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Elucidar as estruturas químicas dos metabólitos secundários utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM);
- Avaliar a atividade de inibição do crescimento microbiano e o efeito bactericida das substâncias isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes*.

## 8 METODOLOGIA

A espécie *H. pectinata* foi coletada no Povoado Tombo, município de Salgado/SE (Latitude: 11,035286; Longitude: 37,471435). O número do cadastro do material vegetal de estudo no SisGen é A828C50 e o número do voucher da espécie depositada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), ASE 34.715.

Após a coleta, todo o procedimento experimental para o isolamento do hyptolido e pectinolidos foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) do Departamento de Farmácia da UFS – Campus Lagarto, coordenado pelo Prof. Dr. James Almada da Silva (orientador).

### 8.1 Obtenção dos extratos brutos

Baseada na metodologia de Santana *et al.* (2019) [16], as folhas e inflorescências da espécie foram separadas e submetidas à secagem a 40 °C por 4 dias em estufa com circulação forçada de ar, até a completa desidratação. Em seguida, essas partes da planta foram pulverizadas em liquidificador, sendo tamisadas em peneira de aço de 2 mm e armazenadas em frascos até a preparação dos extratos brutos. Os materiais vegetais secos foram submetidos à extração assistida por ultrassom (EAU) em banho ultrassônico (Unique, USC-1450A, Brasil) com frequência de 25 kHz por 2h a 25 °C, utilizando etanol absoluto 99,8% (v/v) na proporção de 1:5 (m/v, material vegetal seco em gramas/volume em mL de solvente). Sendo a primeira vez que a EAU é utilizada para obtenção de extratos brutos das partes aéreas da espécie para posterior isolamento do hyptolido e pectinolidos. Os extratos brutos foram filtrados, o solvente evaporado em evaporador rotativo a 40 °C (Alpax EQ 9027, Brasil), em seguida, mantidos em dessecador por no mínimo 12h e armazenados a 4 °C.

### 8.2 Obtenção das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos

Os extratos brutos das folhas e das inflorescências foram dissolvidos em 300 mL de etanol/água 60:40 (v/v) e submetidos a partição líquido-líquido (PLL). Na PLL foram utilizados hexano (3 x 100 mL), diclorometano (3 x 100 mL) e acetato de etila (3 x 100 mL) em ordem crescente de polaridade. Os solventes de todas as frações

foram eliminados em evaporador rotativo a 40 °C e as frações diclorometano das folhas (HPFD) e inflorescências (HPInD) de *H. pectinata* foram utilizadas para a obtenção das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP) por cromatografia líquida clássica (CLC) [16]. A afinidade pelo diclorometano é devido à baixa polaridade dessas substâncias.

Cada fração diclorometano foi submetido à CLC em coluna de vidro (30 cm x 4,6 cm), preenchida com sílica-gel para coluna cromatográfica (60 Å, 0,063-0,200 mm, 70-230 Mesh. Fabricante: NEON Comercial) com eluição gradiente. A fase móvel consistiu na mistura hexano/diclorometano/acetona, nas proporções (v/v/v): 3:1:1 (400 mL), 2:2:1 (500 mL), 2:1:2 (2000 mL), 0:1:4 (500 mL), finalizando com 600 mL de metanol [16]. Foram coletadas 66 frações (50 mL/fração) da coluna onde aplicou-se a fração diclorometano das inflorescências e 58 frações (50 mL/fração) da coluna onde aplicou-se a fração diclorometano das folhas.

Em cada CLC, as frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), com a finalidade de reunir as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico. A CCDA também foi utilizada para identificar as frações que apresentariam maiores concentrações de hyptolido e pectinolidos. Para isso, utilizou-se padrões dessas substâncias previamente isolados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) da UFS - Campus Lagarto. Para a CCDA foram utilizadas placas de alumínio (4 cm x 5 cm) de superfície recoberta com sílica-gel (60G F254. Fabricante: Lemandou Chemicals, China), eluidas em 5 mL de uma solução com hexano/diclorometano/acetona 3:1:1 (v/v/v), e como revelador, a solução de vanilina sulfúrica 1% (m/v). A leitura das placas foi realizada por radiação ultravioleta (UV) em Câmara Escura UV/Transiluminador UV (Cienlab, CE-850, Brasil) com detecção em 254 e 365 nm. Posteriormente, as frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para confirmar em quais frações essas substâncias estariam presentes [16].

### **8.3 Análise, isolamento e purificação do hyptolido e pectinolidos**

A análise e o isolamento das substâncias presentes nas FEHP das inflorescências e folhas da espécie foram realizados por CLAE (Shimadzu®, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, equipado com desgaseificador

DGU-20A5R, bombas binárias LC-20AR, controladora CBM-20A e programa LC solution. As condições cromatográficas utilizadas tanto para a análise das FEHP, como na purificação dos hyptolido e pectinolidos em modo semipreparativo, seguiram a metodologia desenvolvida por Santana *et al.* (2019) [16].

Na análise por CLAE, utilizou-se coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 10 µm) a 25°C (ausência de forno), fase móvel metanol/água 50:50 (v/v) em modo isocrático, comprimento de onda de detecção de 210 nm, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção 20 µL (injeção manual). As amostras (1 mg/mL) foram solubilizadas em metanol e filtradas utilizando filtro de 0,45 µm antes da injeção. O tempo de análise foi de 30 minutos para cada amostra.

As substâncias foram isoladas da FEHP das inflorescências e folhas por CLAE em modo semipreparativo, utilizando uma coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (250 x 20 mm, 10 µm) a 25°C (ausência de forno), fase móvel metanol/água 50:50 (v/v) em modo isocrático, comprimento de onda de detecção de 210 nm, vazão de 18,9 mL/min e volume de injeção 1000 µL (injeção manual). As amostras foram solubilizadas em metanol e filtradas utilizando filtro 0,45 µm. O tempo de separação foi de 30 minutos para cada amostra. Antes da injeção das amostras, a coluna foi condicionada com a fase móvel metanol/água 50:50 (v/v) por 20 min na vazão de 1 mL/min e 18,9 mL/min em modo analítico e semipreparativo, respectivamente. Após as análises e isolamentos das substâncias por CLAE, os cromatogramas foram construídos utilizando o programa Origin™ versão 6.0.

## 8.4 Elucidação das estruturas químicas

### 8.4.1 Ressonância magnética nuclear

A elucidação das estruturas químicas das substâncias isoladas da FEHP das inflorescências e folhas foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear. As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e na Central de Análises de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), respectivamente. Em ambos os casos, os espectros unidimensionais e os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC foram obtidos.

As substâncias isoladas da FEHP das inflorescências (5 mg) foram dissolvidas em 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e analisadas em espectrômetro Bruker® Avance-III, operadas em 600 MHz a 298 K. As substâncias isoladas da FEHP das folhas (5 mg) foram dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$  e analisadas em espectrômetro Bruker Ascend™ 400, operadas em 400 MHz a 298 K.

A operação do HSQC dos experimentos realizados na UNICAMP e UNIVASF teve sua frequência editada para metileno, intitulado HSQC-*editing* [134,135] ou HSQC-*edited* (HSQC-ED) [136,137]. Esse tipo de operação fornece informações de multiplicidade semelhantes às de uma sequência  $^{13}\text{C}$  DEPT-135, onde os sinais de grupos metino e grupos metila são progressivamente aumentados e os sinais de grupo metileno são diminuídos, logo os sinais  $\text{CH}_2$  aparecem negativos em relação aos sinais CH e  $\text{CH}_3$  [134]. Os dados dos deslocamentos químicos dos carbonos ( $^{13}\text{C}$ ) de cada substância foram obtidos nos espectros do HSQC-ED e HMBC.

#### 8.4.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A quantificação relativa das substâncias nas FEHP das inflorescências e folhas, e aquisição dos espectros de massas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em ionização por *electrospray* foram realizadas no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) do Departamento de Química da UFS – Campus São Cristóvão. As análises foram realizadas no cromatógrafo da Shimadzu® (Quioto, Japão) SFC Nexera UC acoplado ao espectrômetro de massas monoquadruplo, modelo LCMS-2020, em ionização por *electrospray* no modo SCAN ( $m/z$  150 a 600) e no modo SIM positivo (4,5 kV). Foi utilizada a coluna  $\text{C}_{18}$  Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) da Shimadzu, na temperatura de 35  $^\circ\text{C}$ , com *heart block* a 200  $^\circ\text{C}$ , DL 250  $^\circ\text{C}$ , nitrogênio como gás nebulizador e gás de secagem a 1,5 e 10 L/min, respectivamente. Foi utilizada a fase móvel metanol/água 60:40 (v/v) contendo 5 mmol/L de formiato de amônio, vazão de 0,5 mL/min e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$  (injeção automática). As amostras (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram solubilizadas em metanol e filtradas utilizando filtro 0,45  $\mu\text{m}$ .

Antes da injeção das amostras, a coluna foi condicionada com a fase móvel metanol/água 60:40 (v/v) contendo 5 mmol/L de formiato de amônio, por 30 min na vazão de 0,5 mL/min.

## 8.5 Atividade antibacteriana

A FEHP das inflorescências e das folhas, hyptolido e pectinolidos tiveram seus efeitos antibacterianos avaliados *in vitro* frente a *Streptococcus pyogenes*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia (LaBMIC) do Departamento de Farmácia da UFS – Campus Lagarto, coordenado pelo Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante.

### 8.5.1 Cepas bacterianas, condições de cultivo e inóculo

A partir do estoque congelado (-20 °C), preservado em glicerol, as cepas da espécie *S. pyogenes* ATCC 19615 foram cultivadas em placa de Petri, contendo ágar nutriente acrescido de 5% de sangue (ágar sangue) e incubada em estufa microbiológica (Shel Lab, SCO2W, EUA) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h [138–140]. A partir do cultivo foi feito um inóculo de uma colônia isolada em 4 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI). A suspensão bacteriana foi incubada *overnight* a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> [141], logo após, a sua densidade foi ajustada até atingir o padrão de turbidez de 0,5 na escala de McFarland, resultando em uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL [142,143], correspondente as absorvâncias entre 0,08 a 0,13, aferida em espectrofotômetro a 625 nm [142]. Cada ensaio envolvendo o microrganismo, relatados a seguir, partiu de uma suspensão bacteriana aferida a 0,1 ± 0,01.

### 8.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM de cada fração e substância, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, baseado no estudo de Andrade (2021) [144] e no *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) [143]. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada analito, capaz de inibir o crescimento microbiano [145].

O procedimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços (fundo chato), partindo da suspensão bacteriana de concentração de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, e posteriormente diluída em caldo BHI na proporção de 1:100 (v/v), respectivamente, obtendo-se uma suspensão bacteriana diluída com concentração de 1 a 2 x 10<sup>6</sup>

UFC/mL [143]. Para determinar a concentração final de dimetilsulfóxido (DMSO) que poderia ser utilizado nos experimentos, realizou-se a avaliação do efeito antibacteriano do DMSO em diferentes concentrações. Inicialmente, o DMSO absoluto foi adicionado a suspensão bacteriana diluída, de modo que suas concentrações nos poços variassem de 8 a 0,0625% (v/v). Após essa avaliação, a concentração final do DMSO adotada foi de 1%.

Vinte miligramas da FEHP das inflorescências e das folhas, e cinco miligramas de hyptolido e pectinolidos foram dissolvidos em DMSO absoluto de modo que a concentração inicial das FEHP e substâncias nos poços fossem de 512 e 256 µg/mL, respectivamente. Foram adicionados nos poços iniciais 2 µL de cada fração e substância, dissolvidas em DMSO, e 198 µL de suspensão bacteriana diluída, obtendo-se, respectivamente, uma proporção de 1:100 (v/v). As suspensões bacterianas contendo FEHP e substâncias foram microdiluídas nos poços seguintes (já preenchidos com 100 µL de suspensão bacteriana diluída), até as concentrações finais de 8 e 4 µg/mL, respectivamente, de modo que o volume final do conteúdo nos poços fosse de 100 µL ao fim da microdiluição.

Como controle negativo de inibição de crescimento (100 µL/poço), utilizou-se o DMSO mais suspensão bacteriana, de modo que a concentração final dessa nova suspensão estivesse, respectivamente, na proporção de 1:100 (v/v). Como controle positivo de inibição de crescimento (100 µL/poço), utilizou-se o antibiótico oxacilina [146–148] mais suspensão bacteriana com DMSO 1%, de modo que a concentração final dessa nova suspensão estivesse, respectivamente, na proporção de 1:100 (v/v). A oxacilina teve seu preparo realizado (v/v) em cloreto de sódio 0,9%, de modo que sua concentração final nos poços fosse de 0,4 µg/mL.

Após a microdiluição, as placas foram incubadas em estufa microbiológica em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 24h a 37 °C. Após o período de incubação, os resultados dos ensaios de viabilidade celular para determinação da CIM de cada analito, foram obtidos, respectivamente, por monitoramento de absorbância em leitor de microplacas; e visualmente, acrescido do ensaio de redução da resazurina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 8.5.2.1 Viabilidade celular por monitoramento de absorvância

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular para determinação das CIM foram obtidos por meio da leitura de absorvância dos meios presentes nos poços em leitor de microplacas (Multiskan GO 1.00.40, EUA) a 625 nm. Utilizou-se o controle negativo de inibição de crescimento microbiano como padrão de leitura, a redução no valor da absorvância em cada poço, indicou que houve inibição do crescimento microbiano. Os resultados obtidos da leitura foram tratados em planilhas do programa Microsoft Office Excel 2019, seguido da análise estatística, utilizando análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, sendo representados na forma de gráficos por meio do programa GraphPad Prism™ 7.0.0. Os valores médios que apresentaram diferenças com valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 8.5.2.2 Viabilidade celular por redução da resazurina

Visualmente, a inibição do crescimento microbiano foi constatada pela ausência de alteração significativa na turbidez do meio, como um resultado a mais, realizou-se o ensaio colorimétrico de redução da resazurina [149,150], um indicador de reação metabólica de oxirredução. A solução aquosa de resazurina é um corante azul ( $\text{pH} \cong 7,0$ ), mas na presença de microrganismos viáveis, a resazurina (fracamente fluorescente) é reduzida à resorufina (fortemente fluorescente), tornando a solução cor-de-rosa [151–154].

Os ensaios foram realizados, baseando-se nos estudos de Nateche *et al.* (2006) [149], Buegers, Rosentritt e Handel (2007) [155], Al-Dahmash *et al.* (2021) [150] e Buegers *et al.* (2009) [156], após a leitura das placas de 96 poços em leitor de microplacas para determinação das CIM, foram acrescentados 30  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de resazurina 0,01% (m/v) em todos os poços preenchidos, e as placas incubadas por 1h30 em estufa microbiológica a 37 °C em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foi observado se houve mudança de coloração no conteúdo das placas. Nos poços em que houve mudança de coloração do azul para o rosa, caracterizou a redução da resazurina em células viáveis, indicando crescimento microbiano, enquanto nos poços em que não houve mudança de coloração, ocorreu a inibição significativa do crescimento microbiano. A CIM foi determinada visualmente,

considerando a menor concentração de cada analito nos poços em que não houve mudança de coloração [149,150].

### 8.5.3 *Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)*

Logo após o período de incubação das placas de 96 poços para determinação das CIM, determinou-se as CBM das frações e substâncias por semeio em placa. O meio presente nos poços que não foi observado crescimento bacteriano, foi semeado na superfície do ágar sangue em placas de Petri. A CBM foi determinada visualmente, considerando a menor concentração de cada analito, capaz de causar a morte da bactéria [145].

A fim de preservar a esterilização do conteúdo nas placas, o procedimento foi realizado antes de suas leituras em leitor de microplacas. Baseado na metodologia do estudo de Kong *et al.* (2014) [157], o conteúdo presente nos poços em que houve inibição do crescimento microbiano, constatada pela ausência de alteração significativa na turbidez do meio, foi semeado na superfície do ágar sangue. As placas de Petri foram incubadas por 24h em estufa microbiológica a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, a morte do microrganismo foi determinada pela não formação de “estrias” na superfície do ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Obtenção dos extratos brutos e fracionamento por partição líquido-líquido (PLL)

A partir de 244,28 g e 240,56 g das inflorescências e folhas de *H. pectinata*, foram obtidos por extração assistida por ultrassom (EAU), 21,24 g e 10,67 g de extratos brutos, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a PLL (Figura 16A) de cada extrato bruto, ao final, obtendo-se 7,09 g de fração diclorometano das inflorescências (HPInD) e 3,56 g de fração diclorometano das folhas (HPFD). No estudo de Santana *et al.* (2019), utilizou-se a PLL com diclorometano no extrato etanólico das inflorescências da espécie, como um método a mais de extração, antes do analito ser submetido a métodos cromatográficos para o isolamento do hyptolido e pectinolidos [16].

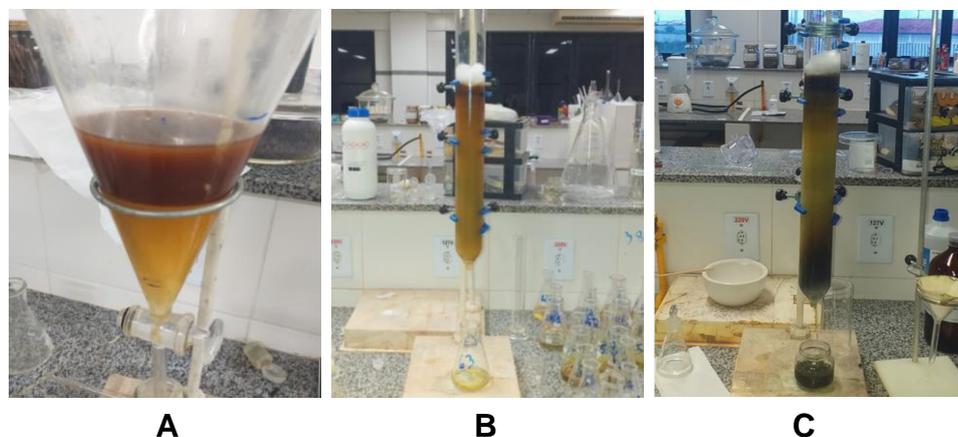
### 9.2 Fracionamento por cromatografia líquida clássica (CLC)

As frações diclorometano das inflorescências (HPInD) e folhas (HPFD), obtidas por PLL foram submetidas à CLC (Figura 16B-C, respectivamente) e monitoradas por CCDA como descrito no item 8.2 (página 134).

Da coluna onde aplicou-se a HPInD, foram coletadas 66 frações, e as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, resultando em 8 frações: HPInD-A (1-5), HPInD-B (6-9), HPInD-C (10-12), HPInD-D (13-22), HPInD-E (23-41), HPInD-F (42-59), HPInD-G (60-65) e HPInD-H (66). Foram obtidas 0,28; 0,16; 0,24; 1,43; 1,90; 0,75; 0,33 e 3,40 g de cada fração reunida, respectivamente.

Da coluna onde aplicou-se a HPFD, foram coletadas 58 frações, e as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, resultando em 6 frações: HPFD-A (1-2), HPFD-B (3-8), HPFD-C (9-16), HPFD-D (17-33), HPFD-E (34-57) e HPFD-F (58). Foram obtidas 0,01; 0,16; 0,26; 1,22; 0,47 e 0,62 g de cada fração reunida, respectivamente.

**Figura 16** – Foto representativa das PLL com diclorometano dos extratos brutos de *Hyptis pectinata* (A); CLC da fração diclorometano das inflorescências (B) e folhas (C) da espécie.



As frações HPIInD-C, HPIInD-D e HPIInD-E, HPFD-C, HPFD-D e HPFD-E, apresentaram substâncias com Rf semelhantes ao Rf dos padrões hyptolido e pectinolido E (0,33 e 0,30, respectivamente), e por isso foram selecionados para a análise por CLAE.

### 9.3 Análise das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram baseadas na metodologia proposta por Santana *et al.* (2019) [16]. Foram preparadas soluções das amostras dos padrões pectinolido E, pectinolido J', hyptolido e das frações obtidas na CLC nas concentrações de 1 mg/mL. Em seguida, foi realizada a injeção de 20  $\mu$ L de cada amostra por CLAE em modo analítico como descrito no item 8.3 (página 135)

Inicialmente, foram injetados os padrões, sendo obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisa do LPNBio [16], a fim de comparar os tempos de retenção ( $t_R$ ) dos picos de cada um dos padrões com os tempos de retenção dos picos dos cromatogramas das frações selecionadas para análise. Observou-se nos cromatogramas do pectinolido J' (Figura 17A), hyptolido (Figura 18A) e pectinolido E (Figura 19A), picos com tempos de retenção em 9,2; 14,2 e 18,4 min, respectivamente.

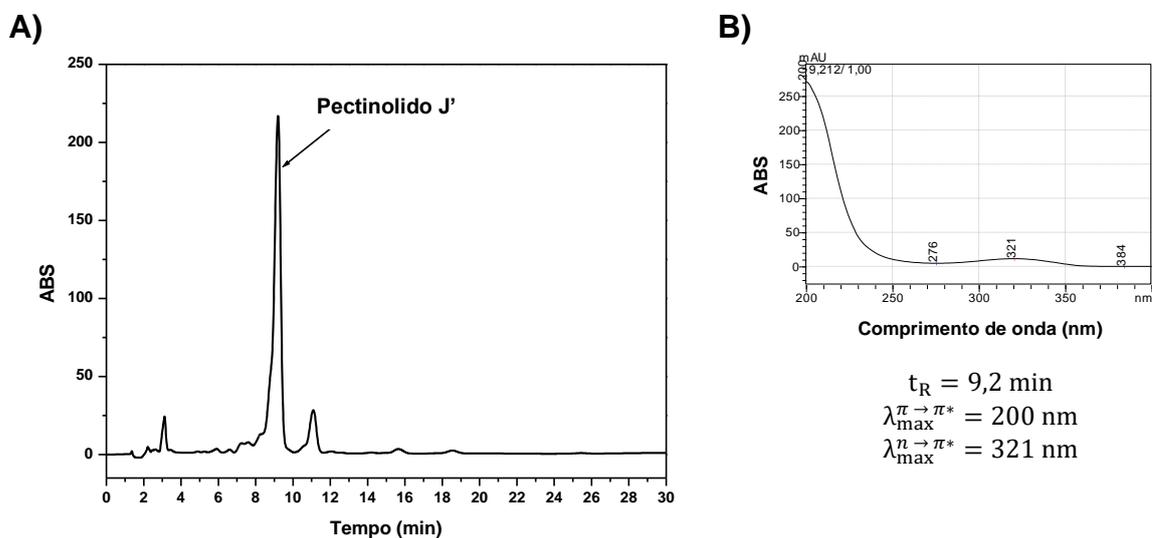
A presença de impurezas nos padrões pode ser explicada pelo longo tempo de armazenamento, apresentando pequeno grau de degradação.

Os espectros de absorção de ultravioleta (UV) das bandas referentes ao pectinolido J' (Figura 17B), hyptolido (Figura 18B) e pectinolido E (Figura 19B) também foram obtidos para comparação com as bandas dos espectros de UV das substâncias presentes nas frações analisadas. De acordo com Bruice (2006) [158], se a molécula absorve radiação na região de UV, um espectro é obtido com comprimentos de onda entre 180-400 nm, se a molécula absorve radiação na região do visível (Vis), um espectro é obtido com comprimentos de onda entre 400-780 nm. Observa-se nos espectros de UV das três substâncias, bandas de intensa absorção em torno de 200 nm e bandas de baixa absorção em torno de 320 nm para o pectinolido J' e pectinolido E. Os espectros são bastante semelhantes, pois as três substâncias apresentam estruturas químicas similares (Figura 1, página 26) com similares grupos cromóforos, responsáveis por tais absorções.

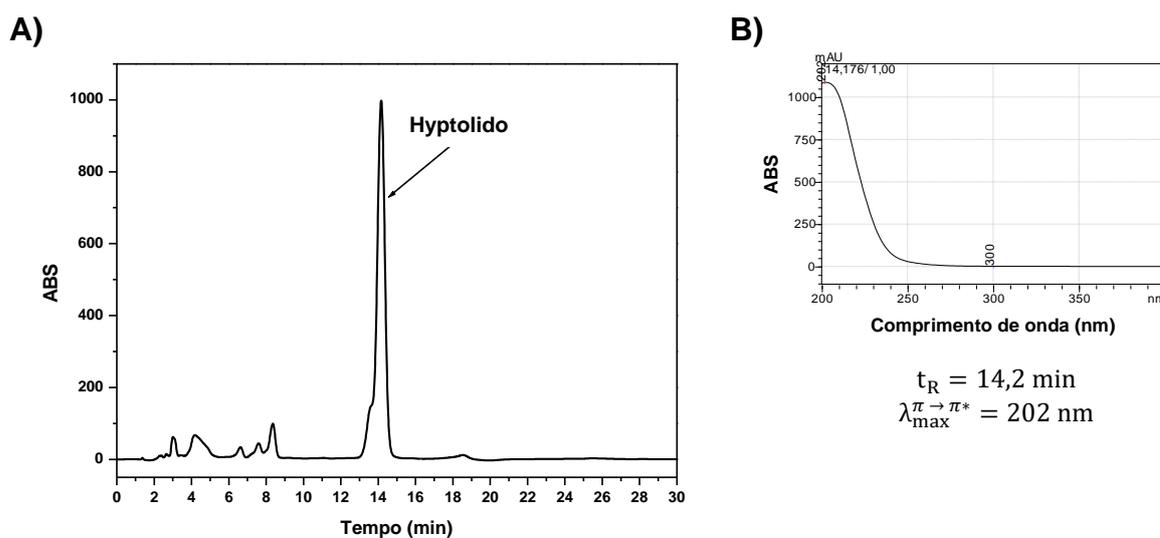
Cromóforo ou grupo cromóforo é a molécula ou parte da molécula, responsável pela absorção de radiação na região de UV-Vis em determinados comprimentos de onda. A radiação absorvida é propriedade de um átomo ou grupo de átomos e não dos elétrons individualmente, os elétrons do grupo cromóforo saem do estado fundamental (região de mais baixa energia) para o estado excitado (região de maior energia), quando a energia característica dessa transição está dentro da região do visível, pode absorver e refletir cores específicas, logo, é responsável pela cor da molécula [158,159].

Como pode ser observado na Figura 17B, Figura 18B e Figura 19B, substâncias que possuem estruturas químicas semelhantes, como os pectinolidos e hyptolido, irão absorver radiação UV em semelhantes comprimentos de onda, apresentando semelhantes "lambdas máximos" ( $\lambda_{\text{max}}$ ), correspondendo aos comprimentos de onda máximos do ponto mais alto (máximo de absorbância) das bandas de absorção [158,159].

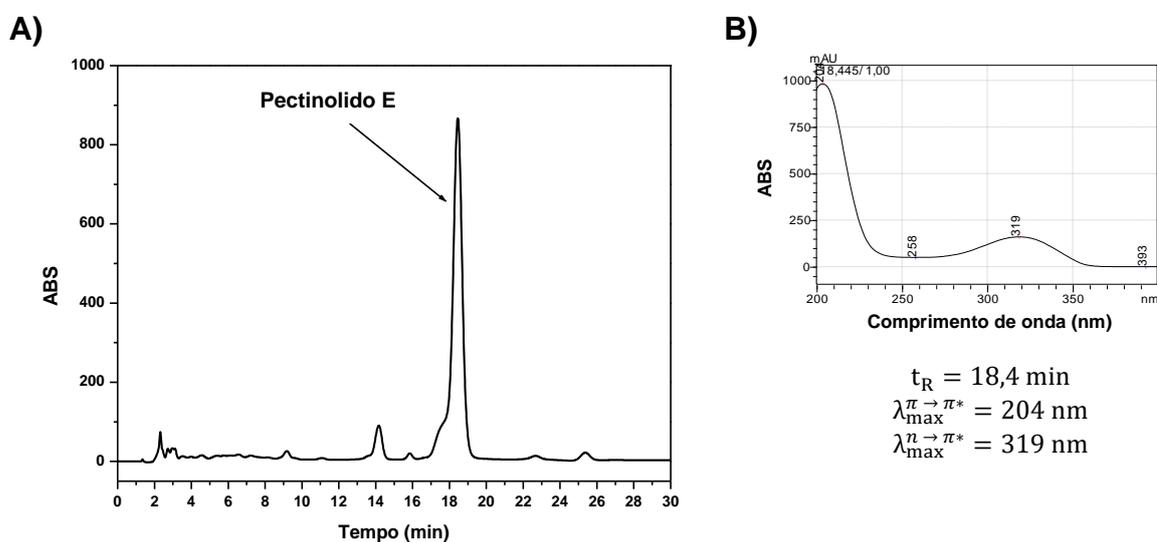
**Figura 17** – Cromatograma do padrão analítico pectinolido J' ( $t_R = 9,2$  min) (A) e espectro de absorção de UV do pectinolido J' (B), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L.



**Figura 18** – Cromatograma do padrão analítico hyptolido ( $t_R = 14,2$  min) (A) e espectro de absorção de UV do hyptolido (B), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



**Figura 19** – Cromatograma do padrão analítico pectinolido E ( $t_R = 18,4$  min) (A) e espectro de absorção de UV do pectinolido E (B), obtidos por CLAE (Shimadzu®), em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



A radiação UV-Vis possui energia suficiente para promover transições eletrônicas envolvendo elétrons de orbitais preenchidos  $\sigma$ ,  $\pi$  (ligantes), desocupados  $\sigma^*$ ,  $\pi^*$  (antiligantes) e não ligantes ( $n$ ). Quando uma molécula absorve radiação, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital de maior energia potencial. Em geral, a transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO) [158,159].

As transições mais prováveis em moléculas carbonílicas são as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ . A transição eletrônica de mais alta energia é a promoção de um elétron de um orbital molecular  $\pi$  para um orbital molecular vazio  $\pi^*$ , denomina transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  (transição permitida, alta intensidade no espectro de absorção). A transição eletrônica com a energia mais baixa é a promoção de um elétron  $n$  para um orbital molecular vazio  $\pi^*$ , denominada transição  $n \rightarrow \pi^*$  (transição proibida, baixa intensidade no espectro de absorção). Transições que envolvam uma alteração do número quântico de spin de um elétron durante a transição, não têm permissões de ocorrer, e, por isso, são denominadas transições proibidas [159].

Para moléculas carbonílicas, como exemplo, cetonas, ácidos, ésteres, amidas e outros compostos simples que contenham tanto sistemas  $\pi$  quanto

pares de elétrons isolados, apresentam duas absorções: uma transição proibida  $n \rightarrow \pi^*$  em  $\lambda_{\max} > 300$  nm (podendo ou não ser observada devido à baixa intensidade) e uma transição permitida  $\pi \rightarrow \pi^*$  em  $\lambda_{\max} < 250$  nm (alta intensidade) [159].

Com o que foi relatado, observou-se no espectro de absorção de UV do pectinolido J' (Figura 17B), uma banda de alta intensidade da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  com  $\lambda_{\max} = 200$  nm e uma banda de baixa intensidade da transição  $n \rightarrow \pi^*$  com  $\lambda_{\max} = 321$  nm. Observou-se no espectro de absorção de UV do pectinolido E (Figura 19B), uma banda de alta intensidade da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  com  $\lambda_{\max} = 204$  nm e uma banda de baixa intensidade da transição  $n \rightarrow \pi^*$  com  $\lambda_{\max} = 319$  nm. Observou-se no espectro de absorção de UV do hyptolido (Figura 18B), uma banda de alta intensidade da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  com  $\lambda_{\max} = 202$  nm.

Após a análise dos cromatogramas e dos espectros de absorção de UV dos três padrões injetados, as frações obtidas na CLC foram injetadas.

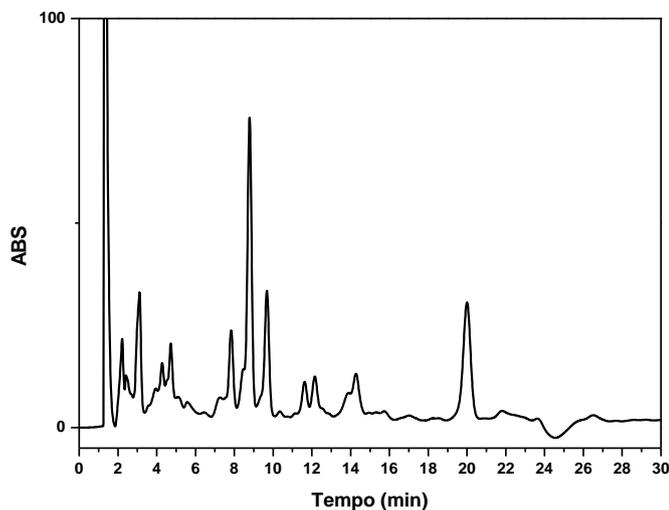
### 9.3.1 *Análises das frações obtidas do extrato diclorometano das inflorescências de Hyptis pectinata (HPInD)*

Como foi relatado no item 9.2 (página 142), apenas as frações HPInD-C, HPInD-D e HPInD-E foram escolhidas para serem analisadas por CLAE a fim de verificar em quais frações o hyptolido e os pectinolidos estavam presentes.

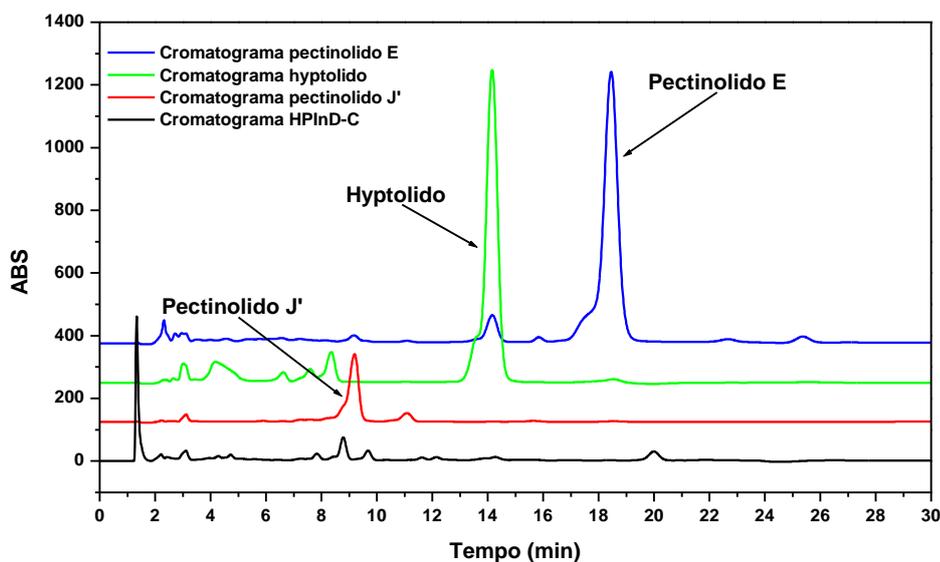
#### 9.3.1.1 *Fração HPInD-C*

A fração HPInD-C (0,24 g) não apresentou picos com tempos de retenção dos padrões (Figura 20), como pode ser observado nas sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPInD-C na Figura 21. Apesar dos picos com razoável resolução no intervalo de 7,0 a 10,0 min e o pico com boa resolução em 19,9 min, as condições cromatográficas precisariam ser otimizadas para o isolamento desses metabólitos secundários presentes nessa fração.

**Figura 20** – Cromatograma da fração HPIInD-C obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



**Figura 21** – Cromatogramas da fração HPIInD-C e dos padrões pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptólido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



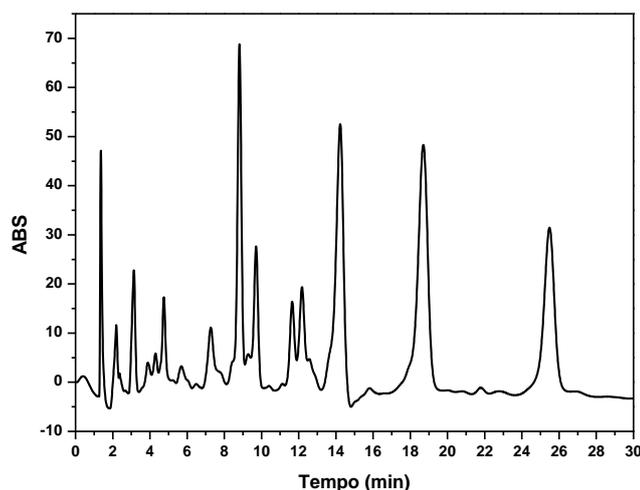
### 9.3.1.2 Fração HPIInD-D

No cromatograma da fração HPIInD-D (1,43 g), observa-se uma grande quantidade de picos, com alguns deles apresentando boas resoluções, principalmente aqueles com maiores tempos de retenção: 14,2; 18,7 e 25,5 min (Figura 22A), seus espectros de absorção de UV são demonstrados na Figura 22B. O pico em 14,2 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200$  nm) é referente ao hyptolido, observou-se banda de absorção da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  semelhante à do hyptolido padrão e o mesmo tempo de retenção ( $t_R = 14,2$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 202$  nm; Figura 18, página 145).

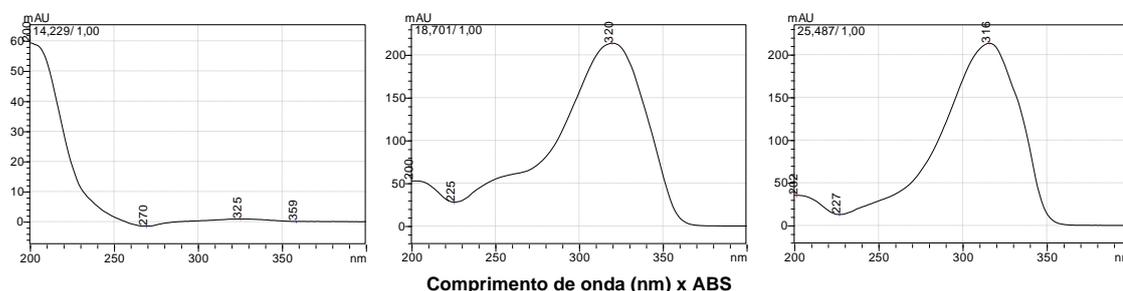
O pico em 18,7 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 320$  nm) da fração HPIInD-D, apresentou, tanto tempo de retenção como espectro de UV diferente do pectinolido E padrão ( $t_R = 18,4$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 204$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319$  nm; Figura 19, página 146), indicando que são substâncias diferentes. O pico em 25,5 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 316$  nm) apresentou excelente resolução cromatográfica e, portanto, podendo ser isolado com a injeção da amostra em modo semipreparativo. Este pico apresentou semelhança no espectro de UV do pico em 18,7 min, logo, essas substâncias, provavelmente, possuem o mesmo ou semelhante grupo cromóforo, responsável pela maior absorção em torno de 320 nm.

**Figura 22** – Cromatograma da fração HPIInD-D (A) e espectros de absorção de UV (B) das substâncias presentes na fração HPIInD-D com tempos de retenção em 14,2 (possível huptolido); 18,7 e 25,5 min, obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 μm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μL. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPIInD-D: 14,2; 18,7 e 25,5 min.

A)



B)



$$t_R = 14,2 \text{ min}$$

$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200 \text{ nm}$$

$$t_R = 18,7 \text{ min}$$

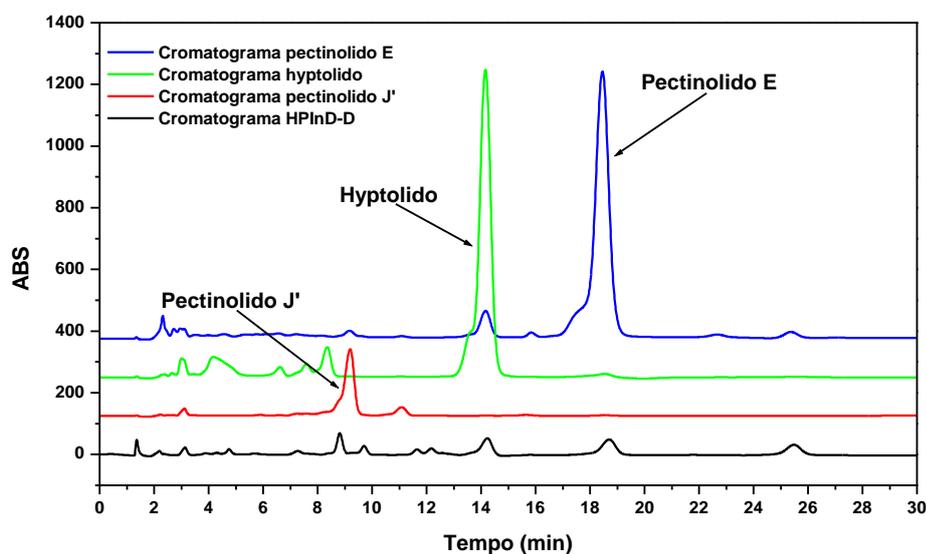
$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 320 \text{ nm}$$

$$t_R = 25,5 \text{ min}$$

$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 316 \text{ nm}$$

Para uma melhor visualização, sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPIInD-D podem ser observadas na Figura 23.

**Figura 23** – Cromatogramas da fração HPIInD-D e dos padrões pectinolido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptolido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinolido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPIInD-D: 14,2; 18,7 e 25,5 min.

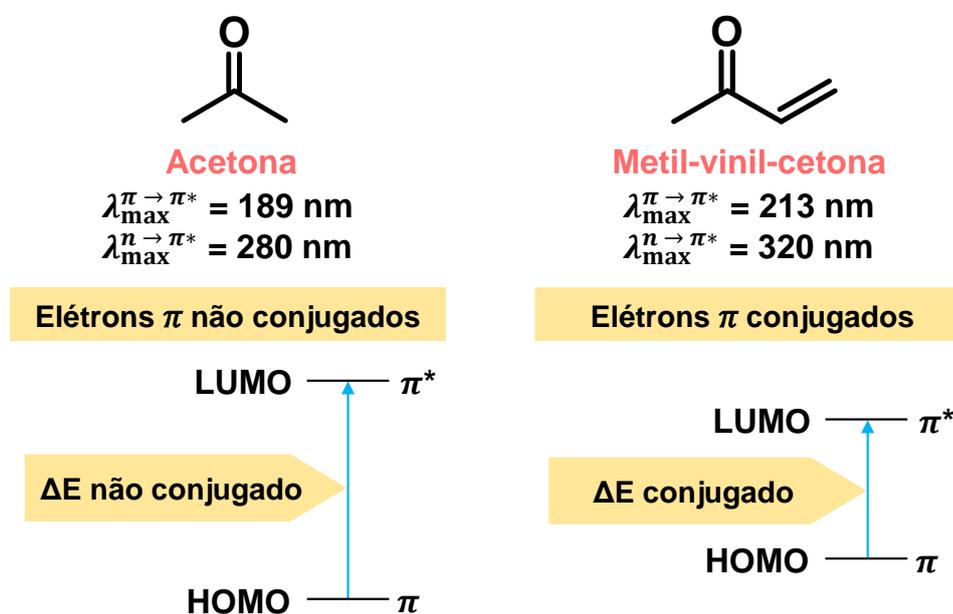


Ao comparar os espectros de UV das três substâncias presentes na fração HPIInD-D, observou-se que os  $\lambda_{max}$  da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  para as substâncias com tempos de retenção em 18,7 e 25,5 min estão mais deslocados e mais intensos, devido a dois tipos de fenômenos na absorção: deslocamento batocrômico e efeito hiperacrômico. Levando em conta que a variação de energia necessária para uma excitação eletrônica e comprimento de onda são inversamente proporcionais, o deslocamento batocrômico é um deslocamento para energia mais baixa e comprimento de onda maior. Efeito hiperacrômico é um aumento de intensidade das bandas no espectro de absorção [160].

Na presença de ligações duplas conjugadas, os níveis de energia eletrônicos de um cromóforo ficam mais próximos. A energia necessária para produzir uma transição de um nível de energia eletrônico ocupado para um nível desocupado diminui, a conjugação eleva a energia do HOMO e diminui a energia do LUMO. Quanto mais ligações duplas conjugadas existirem em uma substância, menor a energia requerida para a transição eletrônica e, portanto, maior será o comprimento de onda na qual a transição eletrônica ocorrerá, ocorrendo o deslocamento batocrômico. A

conjugação de dois cromóforos não apenas resulta em um deslocamento batocrômico, mas também aumenta a intensidade da absorção, ocorrendo efeito hiperacrômico, apresentando  $\lambda_{\max}$  das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  deslocados. Se a cadeia conjugada torna-se longa o suficiente, a banda  $n \rightarrow \pi^*$  é “enterrada” sob a banda mais intensa,  $\pi \rightarrow \pi^*$  [158,160]. Para um melhor entendimento, o efeito da conjugação sobre o  $\lambda_{\max}$  das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  de cetonas é demonstrado na Figura 24.

**Figura 24** – Efeito da conjugação sobre o  $\lambda_{\max}$  de cetonas.



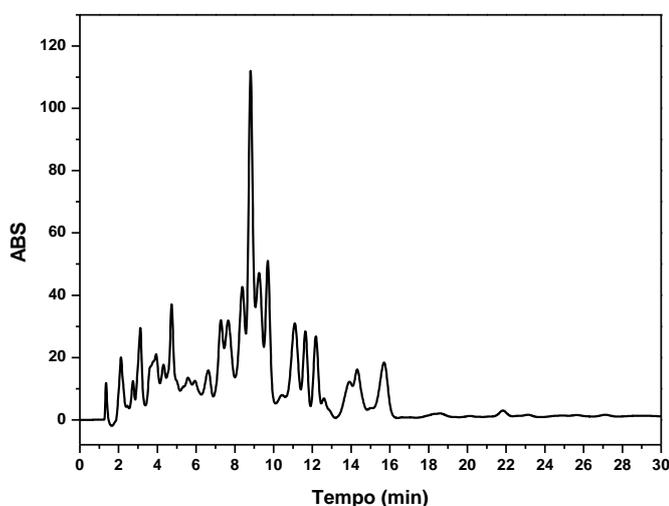
**Fonte:** Adaptação de Bruice (2006) [161] e Pavia *et al.* (2010) [162].

Com base no exposto, pode-se afirmar que as substâncias em 18,7 e 25,5 min não possuem em suas estruturas químicas como cromóforo de maior absorção, apenas o grupo lactônico  $\alpha, \beta$ -insaturado, como acontece no hyptolido e pectinolido E, e muito menos aromaticidade, substâncias aromáticas possuem espectros de absorção de UV com uma maior complexidade. Devido ao deslocamento e intensidade das bandas da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , supõe-se que as substâncias possuem o grupo  $\gamma$ - ou  $\delta$ -lactônico  $\alpha, \beta$ -insaturado com extensão da conjugação.

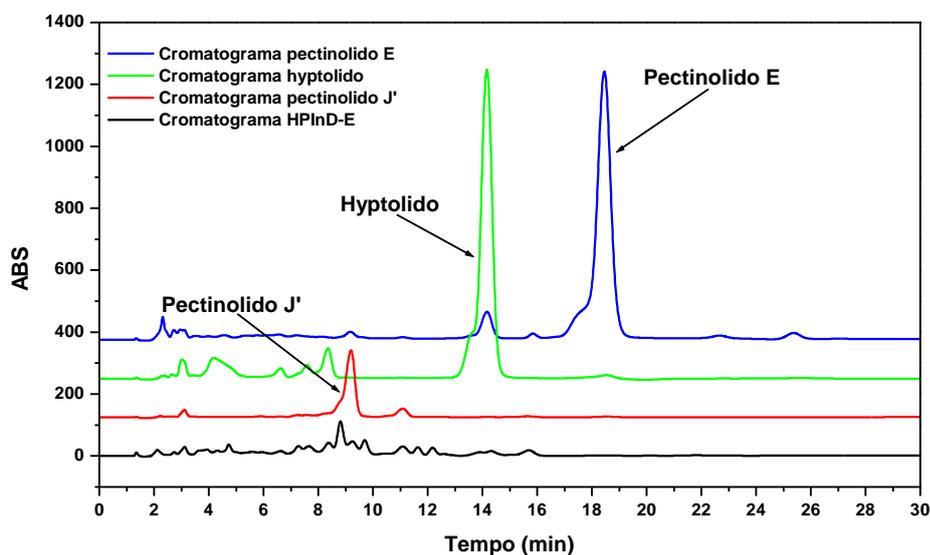
### 9.3.1.3 Fração HPIInD-E

A fração HPIInD-E (1,90 g) apresentou uma quantidade muito grande de picos com baixa resolução, apesar da presença do pico em 8,81 min, que poderia ser atribuído ao pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min). Seria necessário mudar as condições cromatográficas em CLAE para conseguir uma melhor separação cromatográfica para o isolamento desta e de outras substâncias, ou a realização de outros fracionamentos por CLC para diminuir a complexidade desta amostra (Figura 25). Para uma melhor visualização, sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPIInD-E podem ser observadas na Figura 26.

**Figura 25** – Cromatograma da fração HPIInD-E, obtido por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



**Figura 26** – Cromatogramas da fração HPInD-E e dos padrões pectinolido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptolido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinolido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



Dentre as frações analisadas (HPInD-C, HPInD-D e HPInD-E) proveniente das inflorescências de *H. pectinata*, a fração HPInD-D apresentou picos com boas resoluções, principalmente aqueles com maiores tempos de retenção: 14,2; 18,7 e 25,5 min. Diferentemente, as frações HPInD-C e HPInD-E apresentaram quantidade muito grande de picos com baixa resolução e sobrepostos, dificultando o isolamento por CLAE em modo semipreparativo por alargamento dos sinais cromatográficos. A fração HPInD-D foi considerada a fração enriquecida em hyptolido e pectinólidos (FEHP) das inflorescências e foi escolhida para o isolamento e purificação dessas substâncias.

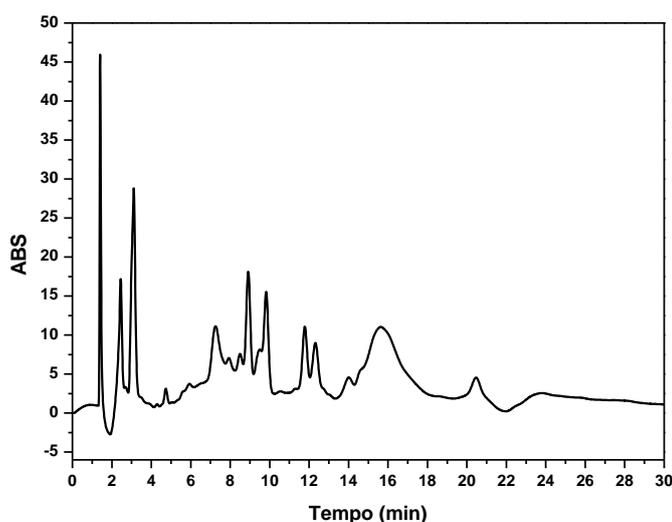
### 9.3.2 Análises das frações obtidas do extrato diclorometano das folhas de *Hyptis pectinata* (HPFD)

Como foi relatado no item 9.2 (página 142), as frações HPFD-C, HPFD-D e HPFD-E foram escolhidas para serem analisadas por CLAE a fim de verificar em quais frações o hyptolido e os pectinólidos estavam presentes.

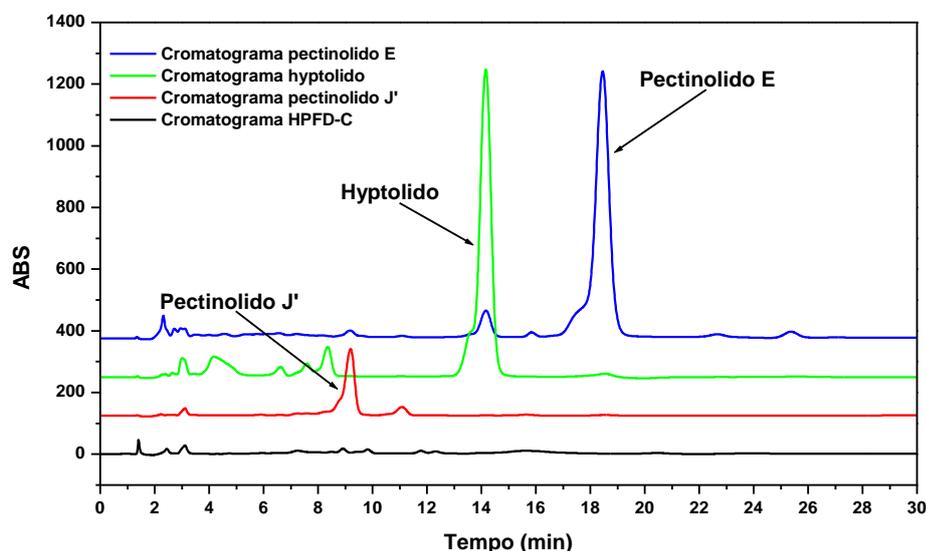
### 9.3.2.1 Fração HPFD-C

A fração HPFD-C (0,26 g) não apresentou picos com tempos de retenção dos padrões hyptolido e pectinolido E (Figura 27), logo pode-se afirmar que estes metabólitos secundários não estão presentes nesta fração. Apesar do pico em 8,92 min, que poderíamos atribuir ao pectinolido J' ( $t_R = 9,2$  min), os picos desse cromatograma apresentaram baixíssima resolução. Seus picos menos intensos e a pouca quantidade dessa fração, não viabilizaria o isolamento de metabólitos secundários. Para uma melhor visualização, sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPFD-C podem ser observados na Figura 28.

**Figura 27** – Cromatograma da fração HPFD-C obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



**Figura 28** – Cromatogramas da fração HPFD-C e dos padrões pectinólido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptólido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



### 9.3.2.2 Fração HPFD-D

No cromatograma da fração HPFD-D (1,22 g), observa-se uma grande quantidade de picos, dentre eles, os picos com tempos de retenção em 9,0; 14,8 e 19,4 min (Figura 29A). São demonstrados na Figura 29B, os espectros de absorção de UV referentes aos picos em 9,0; 14,8 e 19,4 min. Há uma grande semelhança entre esses espectros e os espectros UV dos padrões pectinólido J', hyptólido e pectinólido E, respectivamente.

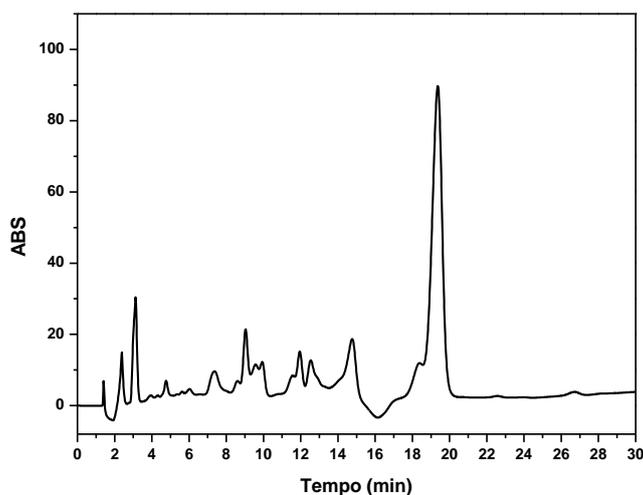
O pico em 9,0 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200$  nm), indica que a substância, possivelmente, poderia ser o pectinólido J', observou-se que diferente do espectro de absorção de UV do pectinólido J' padrão ( $t_R = 9,2$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 321$  nm; Figura 17, página 145), a banda da transição  $n \rightarrow \pi^*$  para a substância em questão não foi observada em seu espectro de absorção, possivelmente, devido à baixa concentração da substância presente na fração. O pico em 14,8 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200$  nm), indica que a substância com esse tempo de retenção poderia ser o hyptólido ( $t_R = 14,2$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 202$  nm; Figura 18, página 145).

Devido aos dados dos espectros de UV, o pico em 19,4 min ( $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 201$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319$  nm), indica que a substância com esse tempo de retenção poderia ser o pectinólido E ( $t_R = 18,4$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 204$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319$  nm; Figura 19, página 146). A diferença no tempo de retenção foi consequência da variação de temperatura ambiente por ausência de forno no equipamento.

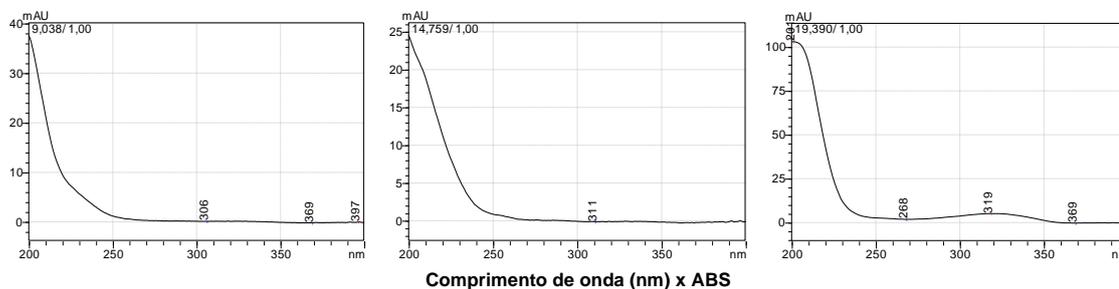
Os tempos de retenção das substâncias em cromatografia líquida podem ter variações com a variação da temperatura na coluna, pois o analito e a fase móvel podem sofrer alteração em algumas propriedades físico-químicas como solubilidade, difusividade, polaridade e viscosidade, interferindo na retenção dos analitos na coluna. Em baixas temperaturas, a viscosidade aumenta e a velocidade de difusão diminui, fazendo com que a velocidade de transferência de massa do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel seja diminuída, e com ela a eficiência de separação, aumentando a retenção das substâncias. Além disso, o aumento da viscosidade da fase móvel provoca um aumento na pressão do sistema, diminuindo a vazão e aumentando o tempo de análise [163].

**Figura 29** – Cromatograma da fração HPFD-D (A) e espectros de absorção de UV (B) das substâncias presentes na fração HPFD-D com tempos de retenção em 9,2 min (possível pectinólido J'); 14,8 e 19,4 (hyptólido e pectinólido E, respectivamente), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPFD-D: 9,0; 14,8 e 19,4 min.

A)



B)



$$t_R = 9,0 \text{ min}$$

$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200 \text{ nm}$$

$$t_R = 14,8 \text{ min}$$

$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 200 \text{ nm}$$

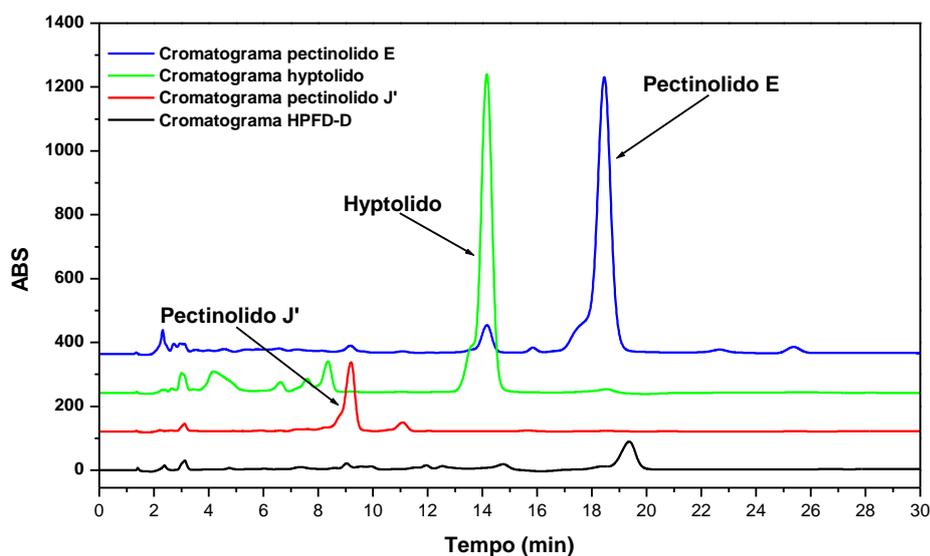
$$t_R = 19,4 \text{ min}$$

$$\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 201 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319 \text{ nm}$$

Para uma melhor visualização, sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPFD-D podem ser observados na Figura 30.

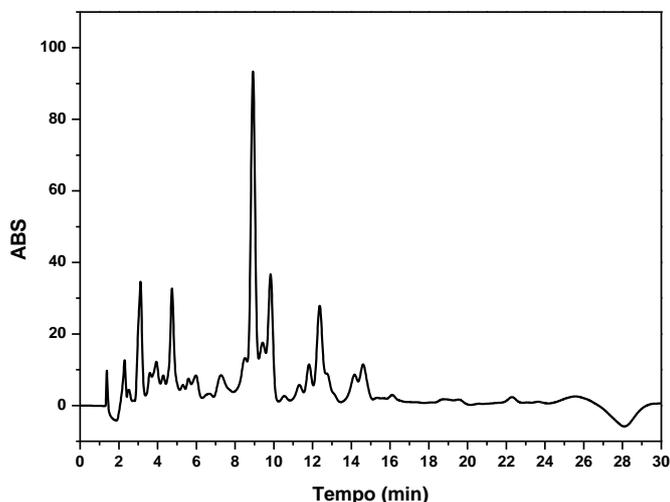
**Figura 30** – Cromatogramas da fração HPFD-D e dos padrões pectinolido J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptolido ( $t_R = 14,2$  min) e pectinolido E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ m) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L. Concentração da amostra de 1 mg/mL. Tempos de retenção das substâncias de interesse da fração HPFD-D: 9,0; 14,8 e 19,4 min.



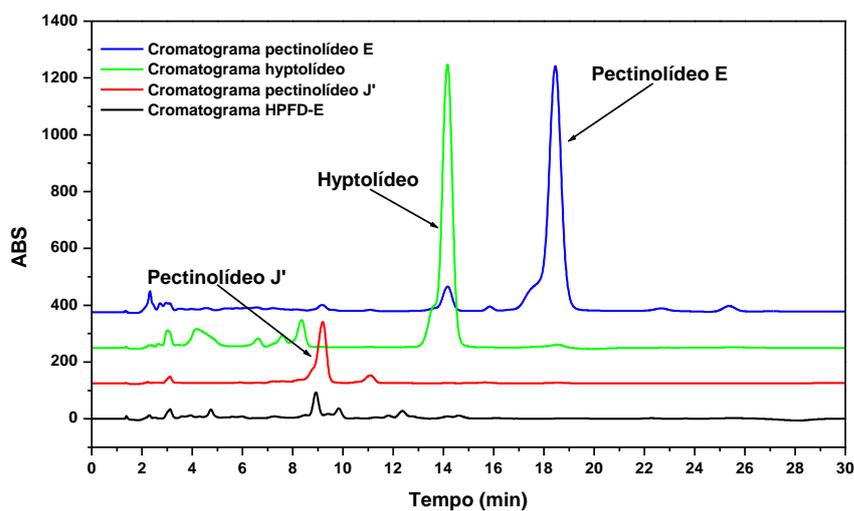
### 9.3.2.3 Fração HPFD-E

A fração HPFD-E (0,47 g) apresentou picos com tempos de retenção em 8,9 e 14,6 min, possivelmente pectinolido J' e hyptolido, respectivamente. Entretanto, não seria viável o isolamento dessas substâncias, nestas condições, devido à redução ainda maior da resolução, por alargamento dos picos cromatográficos, no modo semipreparativo (Figura 31). Para uma melhor visualização, sobreposições dos cromatogramas dos padrões e da fração HPFD-E podem ser observados na Figura 32.

**Figura 31** – Cromatograma da fração HPFD-E obtida por CLAE (Shimadzu®), utilizando coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



**Figura 32** – Cromatogramas da fração HPFD-E e dos padrões pectinolídeo J' ( $t_R = 9,2$  min), hyptolídeo ( $t_R = 14,2$  min) e pectinolídeo E ( $t_R = 18,4$  min), obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Concentração da amostra de 1 mg/mL.



Dentre as frações HPFD-C, HPFD-D e HPFD-E proveniente das folhas de *H. pectinata*, a fração HPFD-D apresentou picos com boas resoluções, principalmente aqueles com maiores tempos de retenção: 14,8 e 19,4 min. Diferentemente, as frações HPFD-C e HPFD-E apresentaram quantidade muito grande de picos com baixa resolução e sobrepostos, o que dificultaria o isolamento e purificação por CLAE. A fração HPFD-D foi considerada a fração enriquecida em hyptolido e pectinólidos (FEHP) das folhas e foi escolhida para o isolamento e purificação dessas substâncias.

#### 9.4 Isolamento e purificação dos metabólitos secundários por CLAE

Após análise da FEHP proveniente da fração diclorometano das inflorescências (HPInD-D) e folhas (HPFD), realizou-se o escalonamento das condições cromatográficas para o isolamento do hyptolido e pectinólidos por CLAE em modo semipreparativo (Figura 33), seguindo a metodologia descrita no item 8.3 (página 135). O escalonamento foi realizado de acordo com a Equação 1 [164].

$$S = \frac{R_P^2 X L_P}{R_A^2 X L_A} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $S$  é o fator de escalonamento;  $R_P$  e  $R_A$ , os raios da coluna preparativa e analítica, respectivamente, e  $L_P$  e  $L_A$ , os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

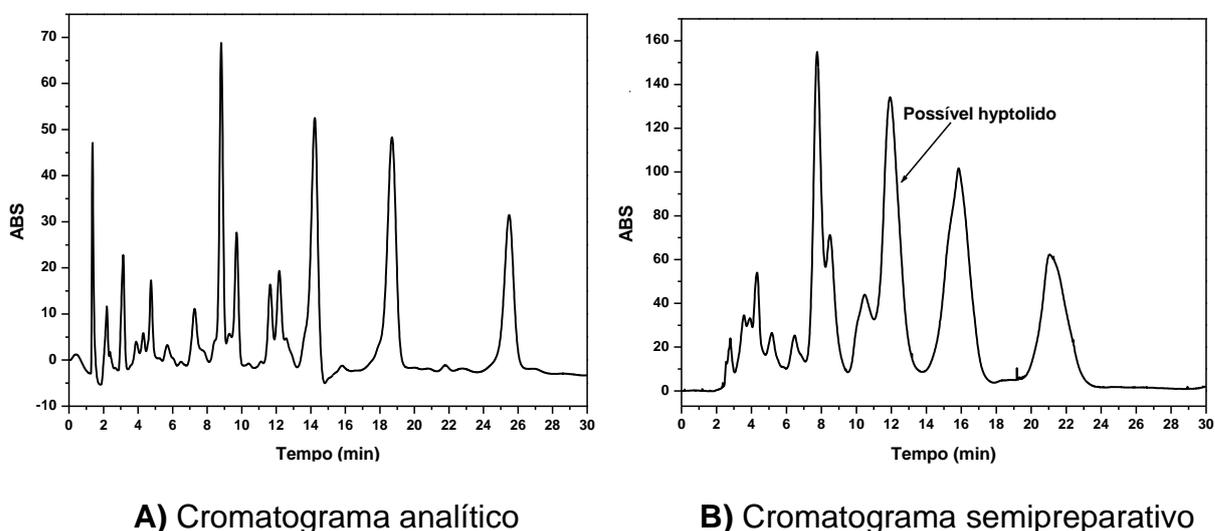
As análises cromatográficas foram baseadas na metodologia proposta por Santana *et al.* (2019). Observou-se que a fase móvel MeOH-H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) foi a melhor fase móvel dentre as fases móveis testadas para a fração diclorometano das inflorescências de *H. pectinata* para isolamento dessas substâncias [16].

##### 9.4.1 Isolamento e purificação das substâncias da fração HPInD-D

Foi obtido 1,43 g da fração HPInD-D, entretanto apenas 0,88 g foi utilizado para o isolamento dos metabólitos secundários. Esta massa foi dividida em cinco microtubos e após a dissolução e filtração das amostras realizou-se as injeções em concentração crescentes até a concentração máxima de 200 µg/mL para evitar saturação da coluna cromatográfica.

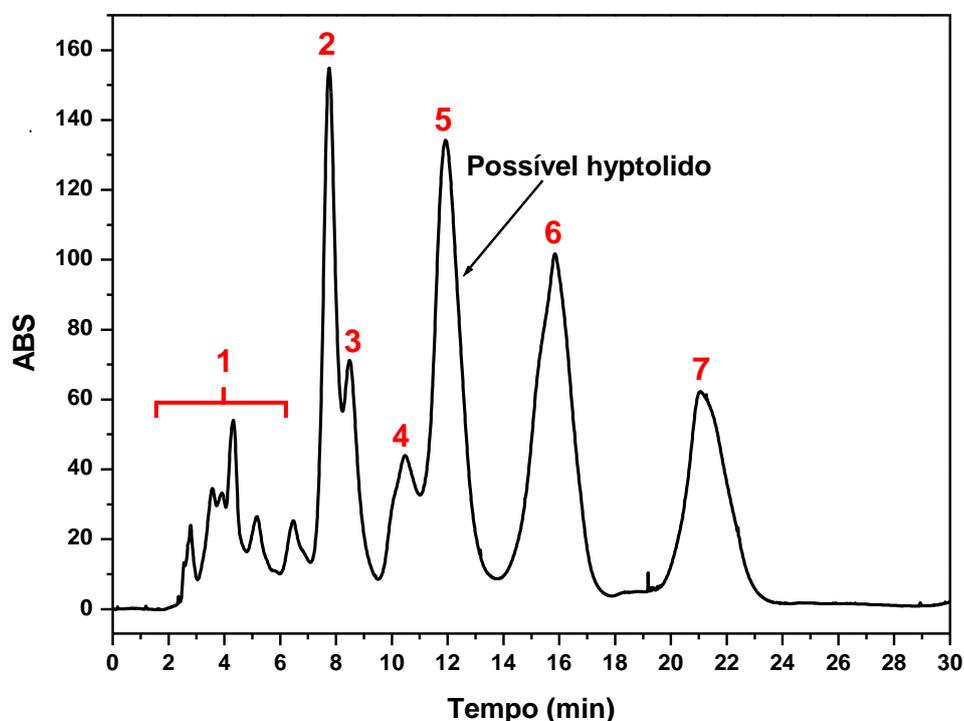
Observa-se a coeluição de alguns picos após o aumento de escala, mas isso não impediu que o isolamento fosse realizado satisfatoriamente (Figura 33).

**Figura 33** – Cromatograma da fração HPIInD-D obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico (A), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Cromatograma da fração HPIInD-D obtida por CLAE em modo semipreparativo (B), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL.



Pode ser observada na Figura 34, a identificação dos picos que foram realizadas após a injeção da amostra, apesar do maior interesse estar no pico 5 ( $t_R = 11,9$  min), pico 6 ( $t_R = 15,9$  min) e pico 7 ( $t_R = 21,1$  min).

**Figura 34** – Cromatograma com demonstrações dos picos presentes na fração HPInD-D, obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo semipreparativo, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL.



Os picos entre 2,5-7,0 min, referem-se as substâncias em mistura que tiveram suas bandas alargadas em consequência do escalonamento (picos 1). Percebe-se que o pico 2 estava coeluinto com o pico 3 ( $t_R = 8,5$  min) devido ao alargamento dos sinais. Desse modo, para tentar garantir a pureza do pico 2, a coleta foi feita a partir da metade da intensidade máxima de absorvância do pico gerado. Como esses picos estavam coeluinto, o pico 3 provavelmente não estava puro. O pico 4 ( $t_R = 10,5$  min) e pico 5 também estavam coeluinto, logo, assim como nos picos anteriores, para garantir a pureza do pico 5, a coleta foi feita a partir da metade da intensidade máxima de sua absorvância. Como o pico 6 e pico 7 estavam com ótimas resoluções, suas coletas foram feitas um pouco acima da linha de base do cromatograma.

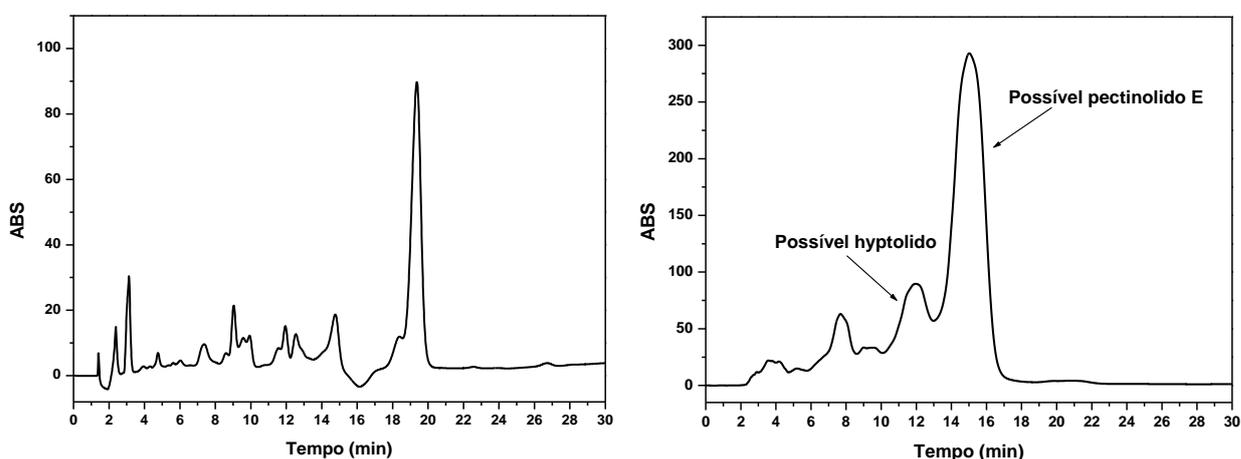
#### 9.4.2 Isolamento e purificação das substâncias da fração HPFD-D

Foram obtidos 1,22 g da fração HPFD-D, entretanto apenas 0,75 g foram utilizadas para o isolamento. Esta massa foi dividida em quatro microtubos e após a

dissolução e filtração das amostras, realizou-se as injeções em concentração crescentes até a concentração máxima de 200 µg/mL para evitar saturação da coluna cromatográfica.

Os cromatogramas analíticos e preparativo dessa fração são demonstrados na Figura 35A-B. Observa-se a coeluição de alguns picos após o aumento de escala, o que dificultou a purificação de algumas substâncias. A substância em 9,0 min (Figura 35A), está coelindo com outras substâncias por causa do alargamento dos sinais, e por isso foi inviável o seu isolamento. Observa-se que possível hyptolido coeluiu com a substância (possível pectinolido E) em 12,5 min o que poderia resultar em uma baixa pureza de ambas as substâncias (Figura 35B).

**Figura 35** – Cromatograma da fração HPFD-D obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico (A), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (4,6x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Cromatograma da fração HPFD-D obtida por CLAE em modo semipreparativo (B), coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20x250 mm, 10 µm), a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL.

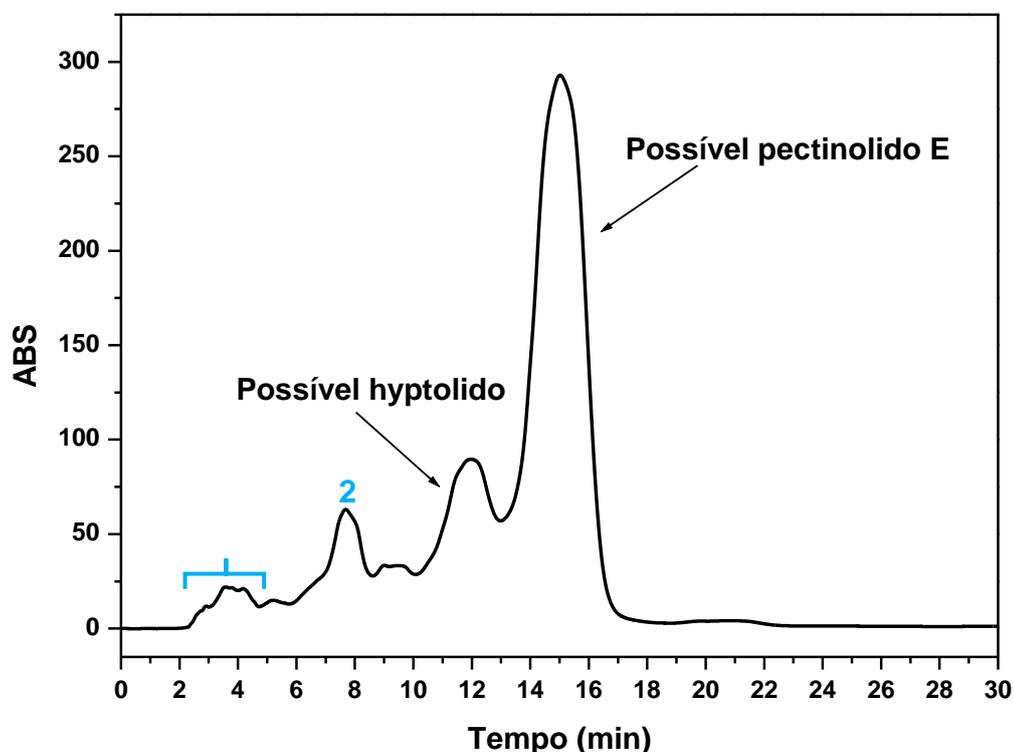


**A)** Cromatograma analítico

**B)** Cromatograma semipreparativo

No cromatograma da Figura 36 pode-se observar a identificação dos picos que foram realizadas após a injeção da amostra, apesar do maior interesse estava na coleta das substâncias do pico 4 e pico 5.

**Figura 36** – Cromatograma com demonstrações dos picos presentes na fração HPFD-D, obtida por CLAE (Shimadzu®) em modo semipreparativo, coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (20 x 250 mm, 10 µm) a 25°C, fase móvel metanol/água (50:50), detecção UV-Vis a 210 nm, vazão de 18,9 mL/min, volume de injeção de 1000 µL.



Os picos entre 2,8-5,1 min (picos 1), 7,3-8,2 min (picos 2) e 8,9-9,1 min (picos 3), referem-se as substâncias em mistura que tiveram suas bandas alargadas por consequência do escalonamento. As substâncias presentes no pico 4 (possível hyptolido) e pico 5 (possível pectinolido E) estão coeluinto proximamente. Na tentativa de garantir a pureza do dessas substâncias, as coletas foram feitas a partir da metade da intensidade máxima de absorbância do pico gerado.

Após os isolamentos das substâncias das frações HPInD-D e HPFD-D, suas estruturas químicas foram elucidadas por RMN <sup>1</sup>H, COSY, HSQC-ED, HMBC e EM, como pode ser visto nos tópicos a seguir.

## 9.5 Elucidação das estruturas químicas do hyptolido e pectinolidos

As substâncias presentes nas FEHP das inflorescências e folhas foram identificadas por RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC-*edited* (HSQC-ED), HMBC, EM em ionização por *electrospray* e comparações com os dados da literatura [17,26]. Os detalhes das análises foram apresentados no item 8.4 (página 136).

Com a elucidação das estruturas químicas, detalhadas a seguir, das FEHP das inflorescências foram obtidos o hyptolido (pico 5), pectinolido G (pico 7), e uma nova hyptolactona, pectinolido Q (pico 6). Da FEHP das folhas foi obtido o pectinolido E (pico 5). Não foi possível garantir a pureza do pico 2 das inflorescências e pico 4 (possível hyptolido) das folhas, que pode ser atribuído a perda de resolução por alargamento dos picos cromatográficos. Ambas as substâncias isoladas são óleos amarelados.

Foi obtido 1,43 g da fração HPIInD-D, entretanto, apenas 0,88 g foi utilizada para o isolamento dos metabólitos secundários, resultando em 17,9; 22,4 e 19,3 mg de hyptolido, pectinolido Q e pectinolido G, com rendimentos de 2,03; 2,55 e 2,19%, respectivamente. Foi obtido 1,22 g da fração HPFD-D, entretanto, apenas 0,75 g foi utilizada para o isolamento, resultando em 36,9 mg de pectinolido E, com rendimento de 4,92%.

Os espectros e estruturas químicas das substâncias podem ser observados na Figura 37 a Figura 57. Foram isolados duas  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas e duas  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas. Assim como suas estruturas químicas, seus espectros são similares. Por isso foi feita a análise espectral detalhada somente do pectinolido E.

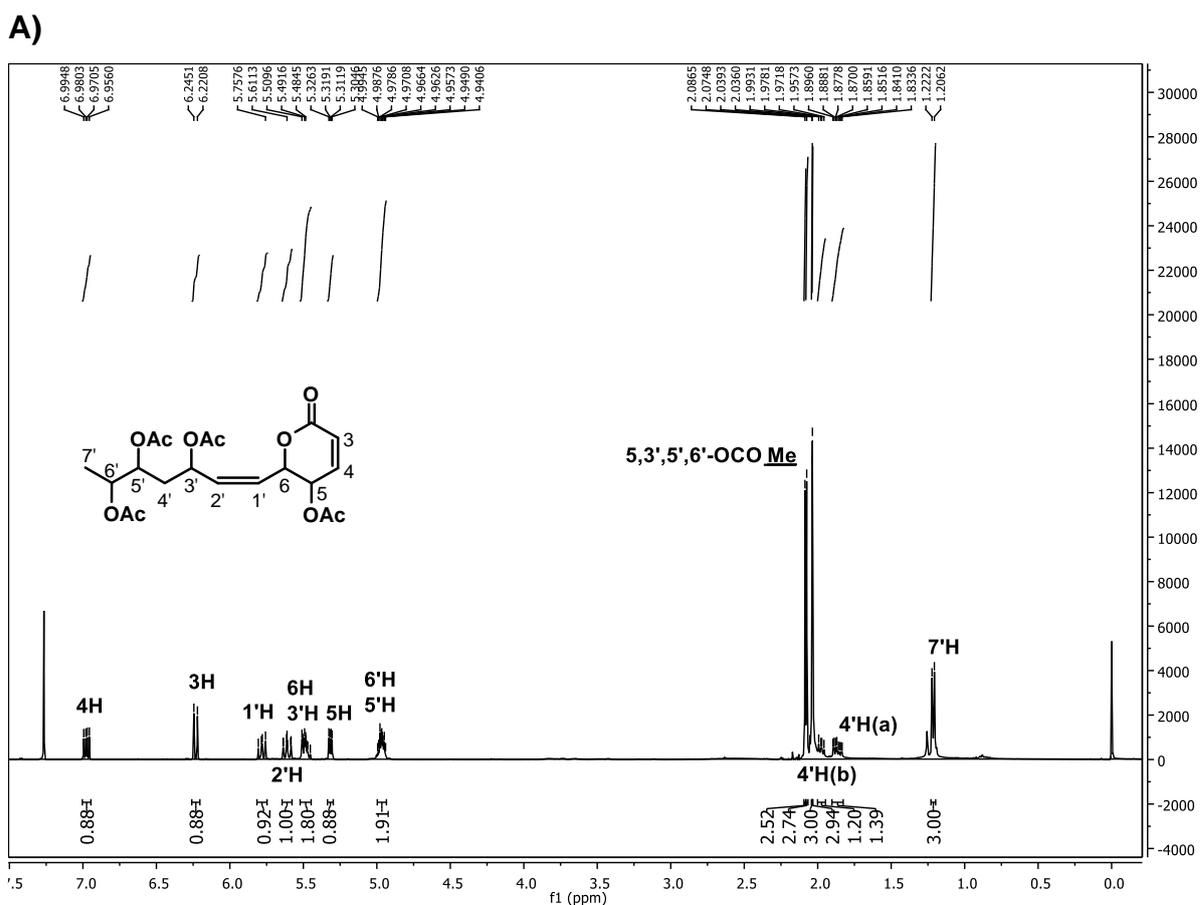
### 9.5.1 Pectinolido E

Na Figura 37 podem ser observados a estrutura química do pectinolido E (pico 5 do cromatograma da fração HPFD-D das folhas, óleo amarelado) e seu espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Na Figura 38, Figura 39, Figura 40 e Figura 41 podem ser observados o COSY, HSQC-ED, HMBC e EM, respectivamente. Por meio dos espectros HSQC-ED e HMBC foram obtidos os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$ . A determinação estrutural foi determinada com auxílio da estrutura proposta por Boalino *et al.* (2003)

[17], com isso, na Tabela 1 são demonstradas as correlações de hidrogênios e carbonos que fazem parte da molécula, observadas neste estudo e no estudo citado.

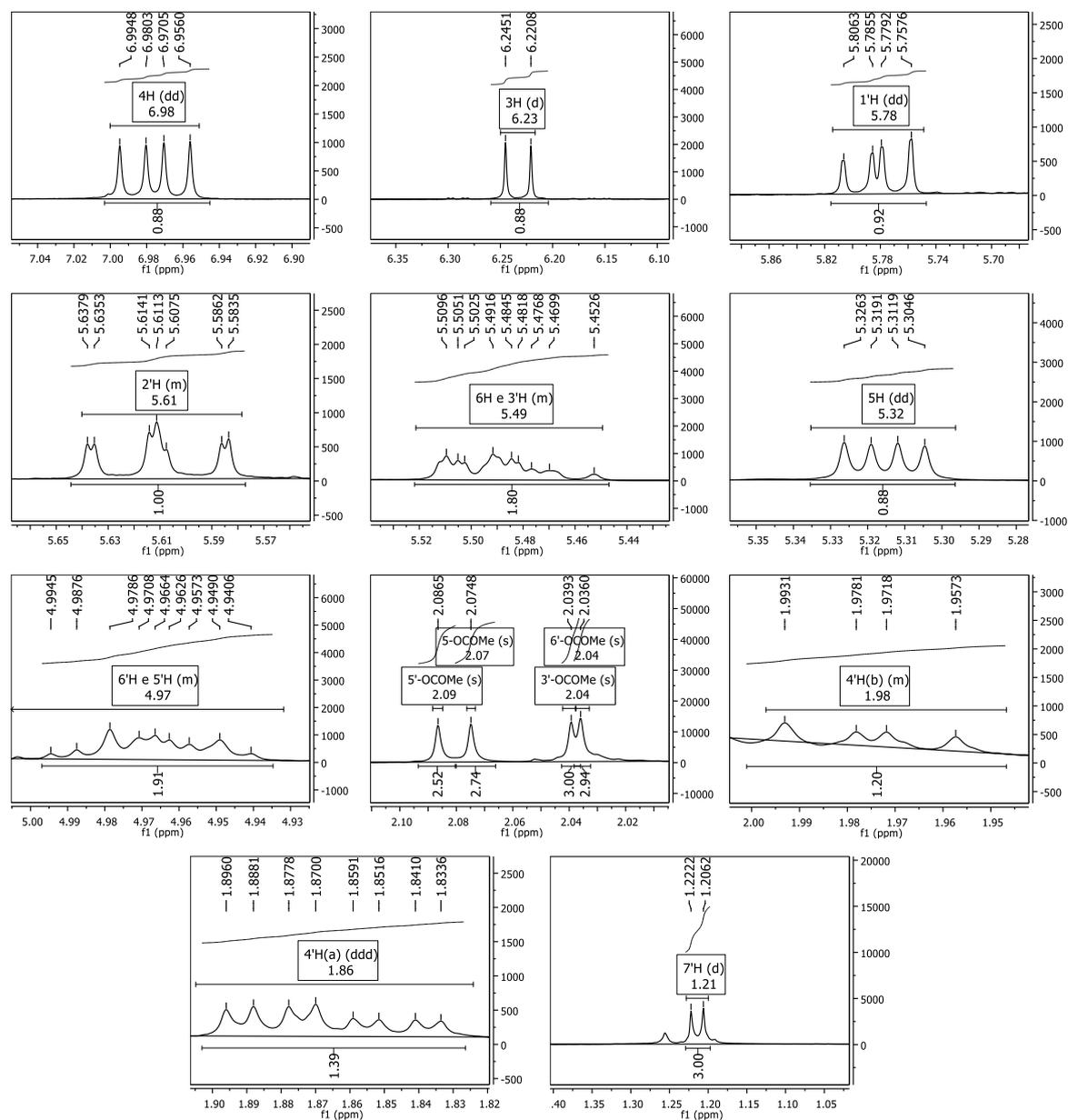
**Figura 37** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinólido E.

(continua)

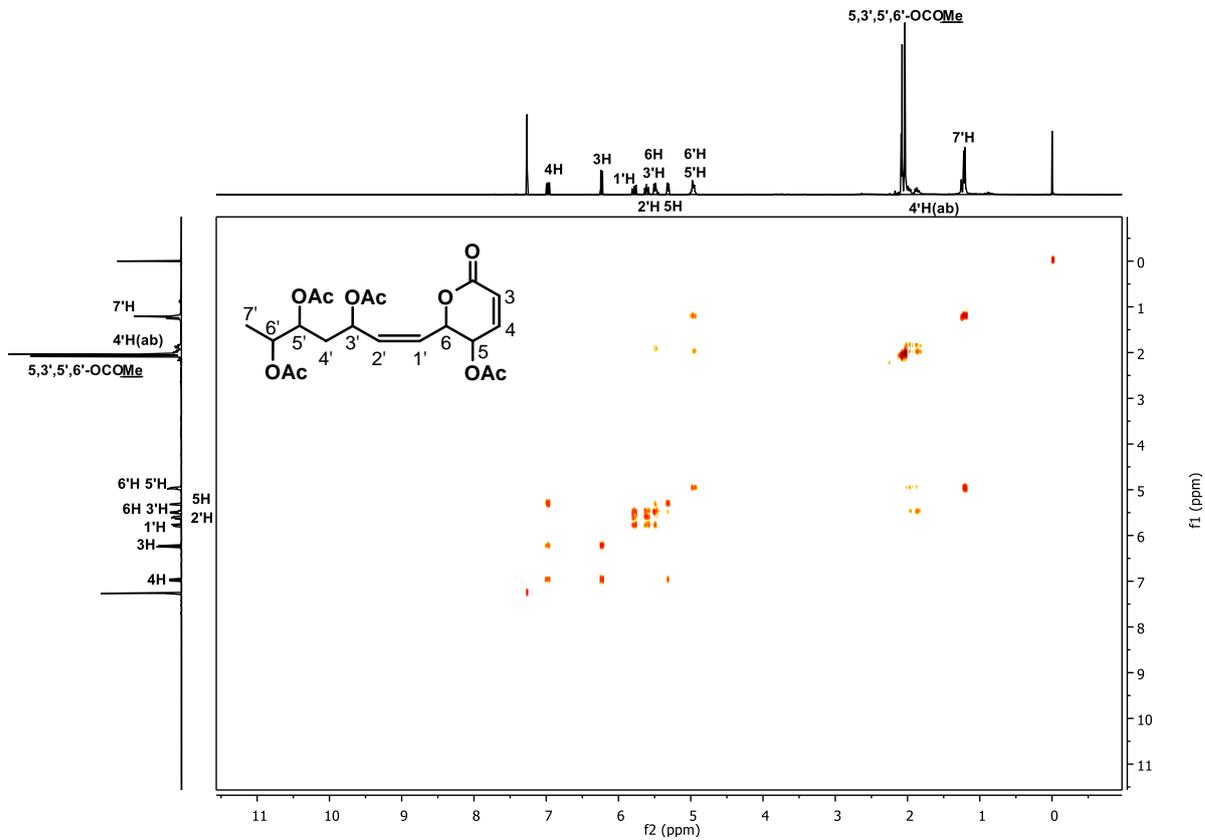


**Figura 37** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinolídeo E.

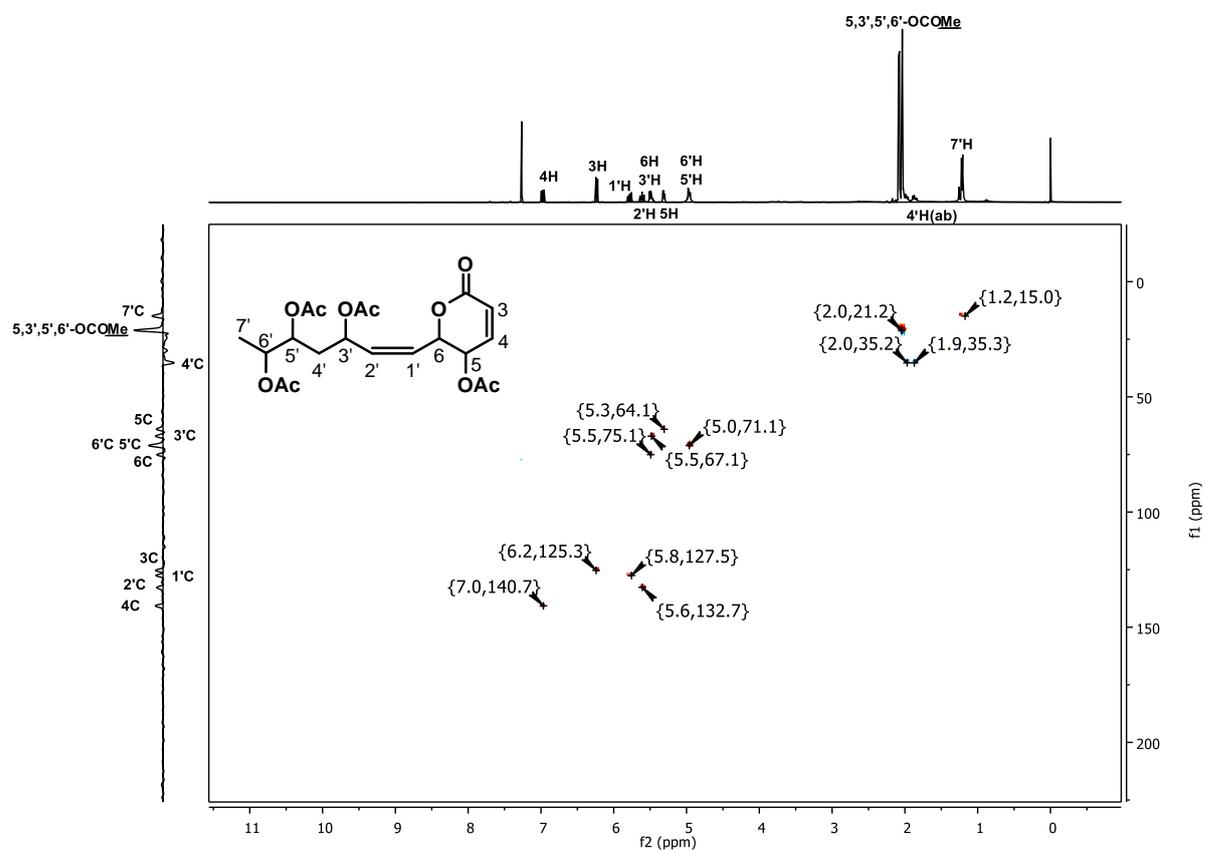
(conclusão)

**B)**

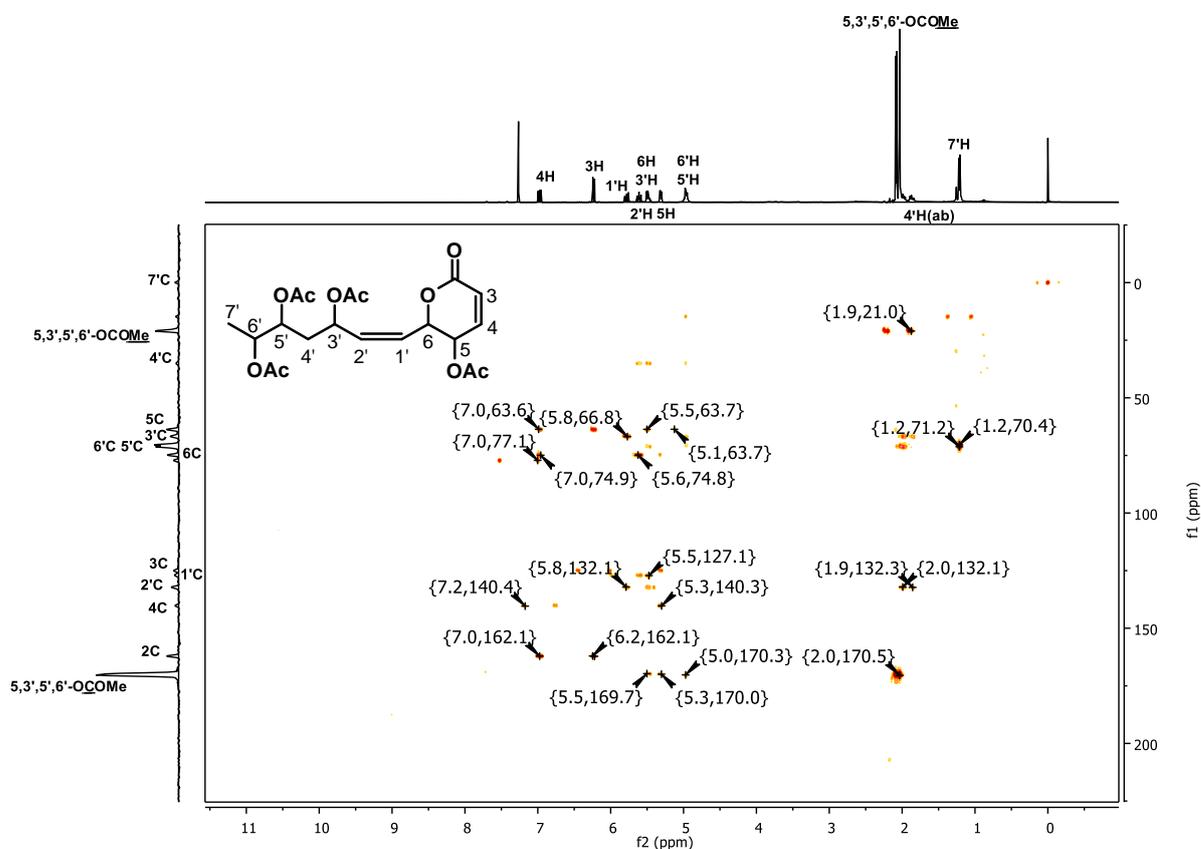
**Figura 38** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido E.



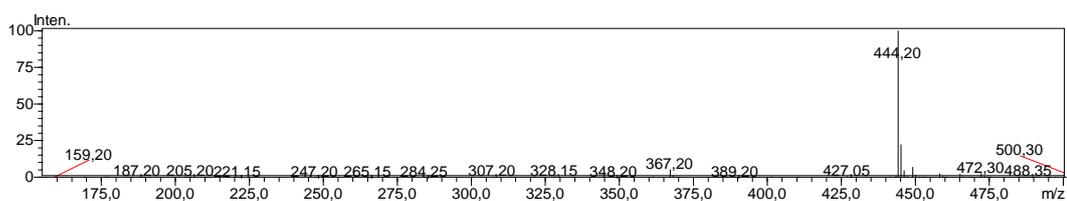
**Figura 39** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido E. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 40** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido E. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 41** – Espectro de massas do pectinólido E, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K.



**Tabela 1** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do pectinolido E, observados neste estudo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e no estudo de Boalino *et al.*, 2003 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  e 2 gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) [17]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses.

Posição	Dados experimentais		Dados da literatura	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	162,1	-	162,6
3	6,23 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9,7$ )	125,3	6,17 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 10,2$ )	128,8
4	6,98 dd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9,7$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{H}} = 5,8$ )	140,7	6,93 dd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 10,2$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{H}} = 5,1$ )	140,6
5	5,32 dd ( $^3J_{4\text{H},5\text{H}} = 5,8$ ; $^3J_{5\text{H},6\text{H}} = 2,9$ )	64,1	5,26 m	63,8
6	5,49 m	75,1	5,45 m	75,0
1'	5,78 dd ( $^3J_{1\text{H}',2\text{H}'} = 11,0$ ; $^3J_{6\text{H},1\text{H}'} = 8,5$ )	127,5	5,71 dd ( $^3J_{1\text{H}',2\text{H}'} = 10,1$ ; $^3J_{6\text{H},1\text{H}'} = 8,0$ )	127,0
2'	5,61 m	132,7	5,55 dd ( $^3J_{1\text{H}',2\text{H}'} = 10,1$ ; $^3J_{2\text{H}',3\text{H}'} = 9,2$ )	132,4
3'	5,49 m	67,1	5,43 m	67,0
4' <sub>(a)</sub>	1,86 ddd ( $^2J_{4\text{H}'a,4\text{H}'b} = 14,6$ ; $J = 7,2$ ; $3,1$ )	35,3	1,81 dd ( $^2J_{4\text{H}'a,4\text{H}'b} = 9,6$ ; $J = 4,8$ )	34,9
4' <sub>(b)</sub>	1,98 m		1,93 dd ( $^2J_{4\text{H}'a,4\text{H}'b} = 9,6$ ; $J = 4,8$ )	
5'	4,97 m	71,1	4,91 m	71,3
6'	4,97 m	70,4	4,89 m	70,8
7'	1,21 d ( $^3J_{6\text{H}',7\text{H}'} = 6,4$ )	15,0	1,13 d ( $^3J_{6\text{H}',7\text{H}'} = 6,8$ )	14,7
5-O <u>C</u> OMe	-	170,5	-	170,2
3'-O <u>C</u> OMe	-	170,5	-	170,7
5'-O <u>C</u> OMe	-	170,5	-	170,9
6'-O <u>C</u> OMe	-	170,5	-	170,1
5-OCOMe	2,07 s	21,2	2,08 s	21,1
3'-OCOMe	2,04 s	21,2	2,04 s	21,0
5'-OCOMe	2,09 s	21,2	2,10 s	20,6
6'-OCOMe	2,04 s	21,2	2,04 s	21,0

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Valores de  $\delta_{\text{C}}$  obtidos nos espectros HSQC-ED e HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Os sinais em  $\delta_H$  2,04 (6H, s), 2,07 (3H, s) e 2,09 (3H, s) observados no espectro de RMN  $^1H$  (Figura 37) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de quatro grupos acetoxila, enquanto o sinal em  $\delta_H$  1,21 (3H, d,  $^3J_{H6',H7'} = 6,4$  Hz, H-7') foi atribuído aos hidrogênios metílicos terminais H-7' da cadeia heptílica alifática. Os sinais em  $\delta_H$  1,98 (1H, m, H<sub>(b)</sub>-4') e 1,86 (1H, ddd,  $^2J_{4H'a,4H'b} = 14,6$ ;  $J = 7,2$  e  $3,1$  Hz, H<sub>(a)</sub>-4'), foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios metilênicos H<sub>(b)</sub>-4' e H<sub>(a)</sub>-4', presentes na cadeia alifática (Tabela 1).

De acordo com a análise do espectro de RMN  $^1H$  e COSY (Figura 38), os sinais em  $\delta_H$  6,23 (1H, d,  $^3J_{3H,4H} = 9,7$  Hz, H-3) e 6,98 (1H, dd,  $^3J_{3H,4H} = 9,7$  e  $^3J_{4H,5H} = 5,8$  Hz, H-4) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos da  $\delta$ -lactona, H-3 e H-4, respectivamente, enquanto os sinais observados em  $\delta_H$  5,78 (1H, dd,  $^3J_{1H',2H'} = 11,0$  e  $^3J_{6H,1H'} = 8,5$  Hz, H-1') e 5,61 (1H, m, H-2') foram atribuídos aos dois outros hidrogênios olefínicos, presentes na cadeia alifática, H-1' e H-2', respectivamente. A constante de acoplamento de 11,0 Hz, estabeleceu a isomeria *Z* a dupla ligação entre os hidrogênios H-1' e H-2'.

Os sinais em  $\delta_H$  4,97 (2H, m, H-6' e H-5'), 5,32 (1H, dd,  $^3J_{4H,5H} = 5,8$  e  $^3J_{5H,6H} = 2,9$  Hz, H-5) e 5,49 (2H, m, H-3' e H-6) foram atribuídos a cinco hidrogênios oximetínicos, H-6', H-5', H-5, H-3' e H-6. No COSY, observou-se acoplamento entre o hidrogênio H-5 em  $\delta_H$  5,32 (1H, dd,  $^3J_{4H,5H} = 5,8$  e  $^3J_{5H,6H} = 2,9$  Hz, H-5) e o hidrogênio olefínico H-4 ( $\delta_H$  6,98), entre o hidrogênio H-5 e hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  5,49 (1H, m, H-6), entre o hidrogênio H-6 e o hidrogênio olefínico H-1' ( $\delta_H$  5,78). Observou-se acoplamento entre os hidrogênios H-5' e H-6' em  $\delta_H$  4,97 (2H, m, H-6' e H-5'), entre H-6' e os hidrogênios metílicos H-7' ( $\delta_H$  1,21), e entre o hidrogênio H-5', acoplando diferentemente com os hidrogênios metilênicos H<sub>(a)</sub>-4' e H<sub>(b)</sub>-4' em  $\delta_H$  1,86 (1H, ddd,  $J = 14,6$ ;  $7,2$  e  $3,1$  Hz, H<sub>(a)</sub>-4') e 1,98 (1H, m, H<sub>(b)</sub>-4'), respectivamente. O hidrogênio H-3' em  $\delta_H$  5,49 (2H, m, H-3' e H-6), apresentou acoplamento com o hidrogênio olefínico H-2' ( $\delta_H$  5,61) e diferentemente com os hidrogênios metilênicos H<sub>(b)</sub>-4' e H<sub>(a)</sub>-4'.

Os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}C$  (Tabela 1) foram obtidos no HSQC-ED (Figura 39) e HMBC (Figura 40). A molécula apresentou treze sinais para vinte carbonos, onze desses sinais foram vistos no HSQC-ED e treze no HMBC. Os dois sinais a mais vistos no HMBC foram indicativos de carbonos carbonílicos. O sinal em

$\delta_c$  170,5 foi atribuído a quatro carbonos carbonílicos dos grupos acetoxila, o sinal em  $\delta_c$  162,1 foi atribuído ao carbono carbonílico C-2 da  $\delta$ -lactona, presentes em sua conjugação, os carbonos olefínicos C-3 ( $\alpha$ -conjugado) e C-4 ( $\beta$ -conjugado) em  $\delta_c$  125,3 e 140,7, respectivamente. No HSQC-ED, o sinal em  $\delta_c$  21,2 foi indicativo de carbonos metílicos dos quatro grupos acetoxila.

Os sinais em  $\delta_c$  127,5 e 132,7 foram atribuídos aos outros dois carbonos olefínicos, C-1'e C-2', respectivamente. Os sinais em  $\delta_c$  64,1 (C-5), 75,1 (C-6), 67,1 (C-3'), 71,1 (C-5') e 70,4 (C-6') foram indicativos de carbonos oximetínicos, e os sinais em  $\delta_c$  35,3 e 15,0 foram indicativos de carbono metilênico (C-4') e metílico (C-7') da cadeia alifática lateral, respectivamente (Tabela 1).

Uma das vantagens que confere ao HSQC-ED é o fato dos sinais dos grupos metileno estarem negativos aos sinais dos grupos metila e metino, facilitando na identificação de quantos grupos metileno fazem parte da molécula. Para o pectinólido E, observou-se um sinal negativo no espectro de carbono em  $\delta_c$  35,3 (C-4') acoplado com os hidrogênios em  $\delta_H$  1,96 (H<sub>(b)</sub>-4') e 1,86 (H<sub>(a)</sub>-4').

O HMBC e COSY confirmaram a ligação da cadeia heptílica alifática à  $\delta$ -lactona em C-6, uma vez que exibiram acoplamentos de longo alcance entre o carbono C-6 ( $\delta_c$  75,1) e os hidrogênios H-4 ( $\delta_H$  6,98), H-2' ( $\delta_H$  5,61) e H-5 ( $\delta_H$  5,32) no HMBC, e acoplamento entre os hidrogênios H-6 ( $\delta_H$  5,49) e H-1' ( $\delta_H$  5,78) no COSY. A análise de HMBC também auxiliou no posicionamento de um dos grupos acetoxila diretamente do anel lactônico, uma vez que o carbono C-5 ( $\delta_c$  64,1), ligado ao grupo acetoxila, apresentou acoplamentos com os hidrogênios olefínicos H-4 ( $\delta_H$  6,98) e H-3 ( $\delta_H$  6,23), no COSY observou-se acoplamento entre H-4 ( $\delta_H$  6,98) e H-5 ( $\delta_H$  5,32), e entre H-5 e H-6 ( $\delta_H$  5,49).

Na Figura 41 pode ser observado o espectro de massas do pectinólido E, que possui massa monoisotópica teórica de 426,15 Da (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>). O pico de baixa intensidade de razão massa/carga ( $m/z$ ) em 427,05, referiu-se ao seu íon quasimolecular [M + H]<sup>+</sup> e o pico mais intenso em  $m/z$  444,20, referiu-se ao aduto de amônio [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Os resultados são condizente com os resultados apresentados por Boalino *et al.* (2003) [17].

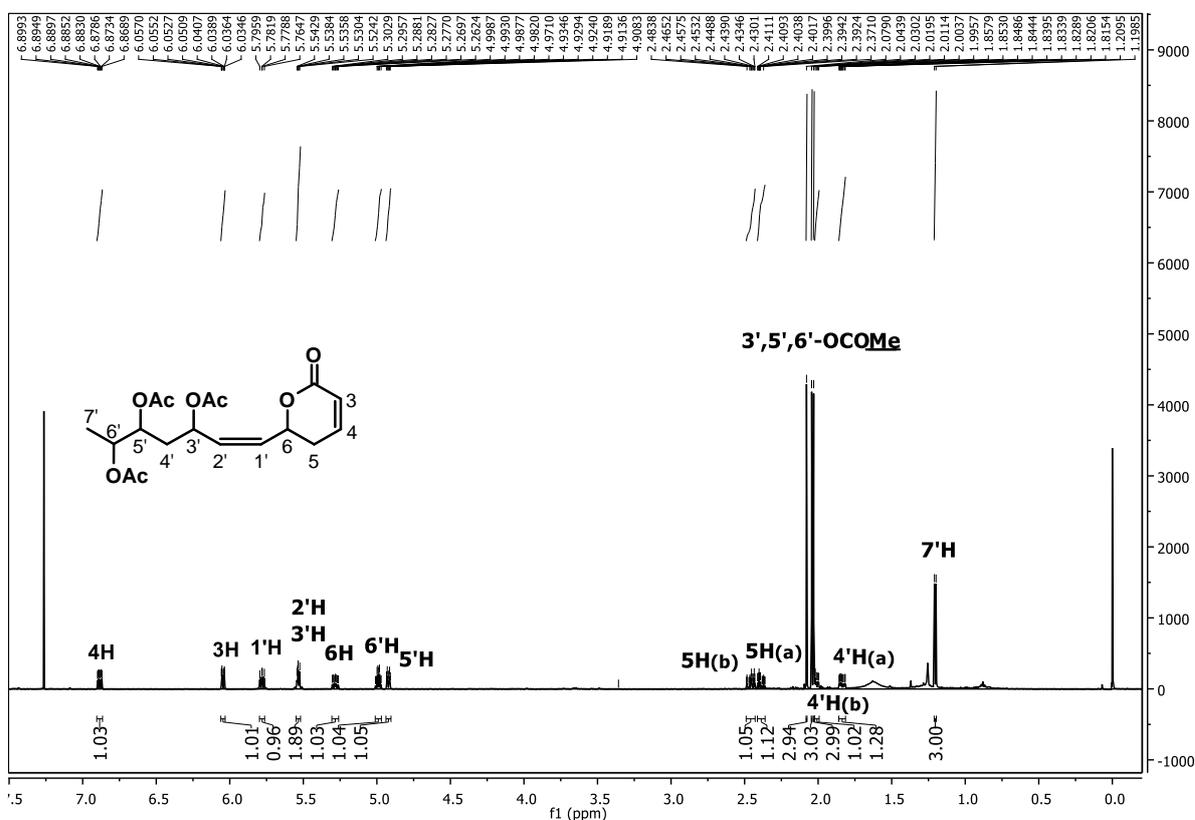
9.5.2 *Hyptolido*

Na Figura 42 podem ser observados a estrutura química do hyptolido (pico 5 da fração HPIInD-D das inflorescências, óleo amarelado) e seu espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Nas Figura 43, Figura 44, Figura 45 e Figura 46 podem ser observados o COSY, HSQC-ED, HMBC e EM, respectivamente. Por meio dos espectros HSQC-ED e HMBC foram obtidos os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$ . A determinação estrutural foi determinada com auxílio da estrutura proposta por Achmad *et al.* (1987) [26], com isso, na Tabela 2 são demonstradas as correlações de hidrogênios e carbonos que fazem parte da molécula, observadas neste estudo e no estudo citado.

**Figura 42** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do hyptolido.

(continua)

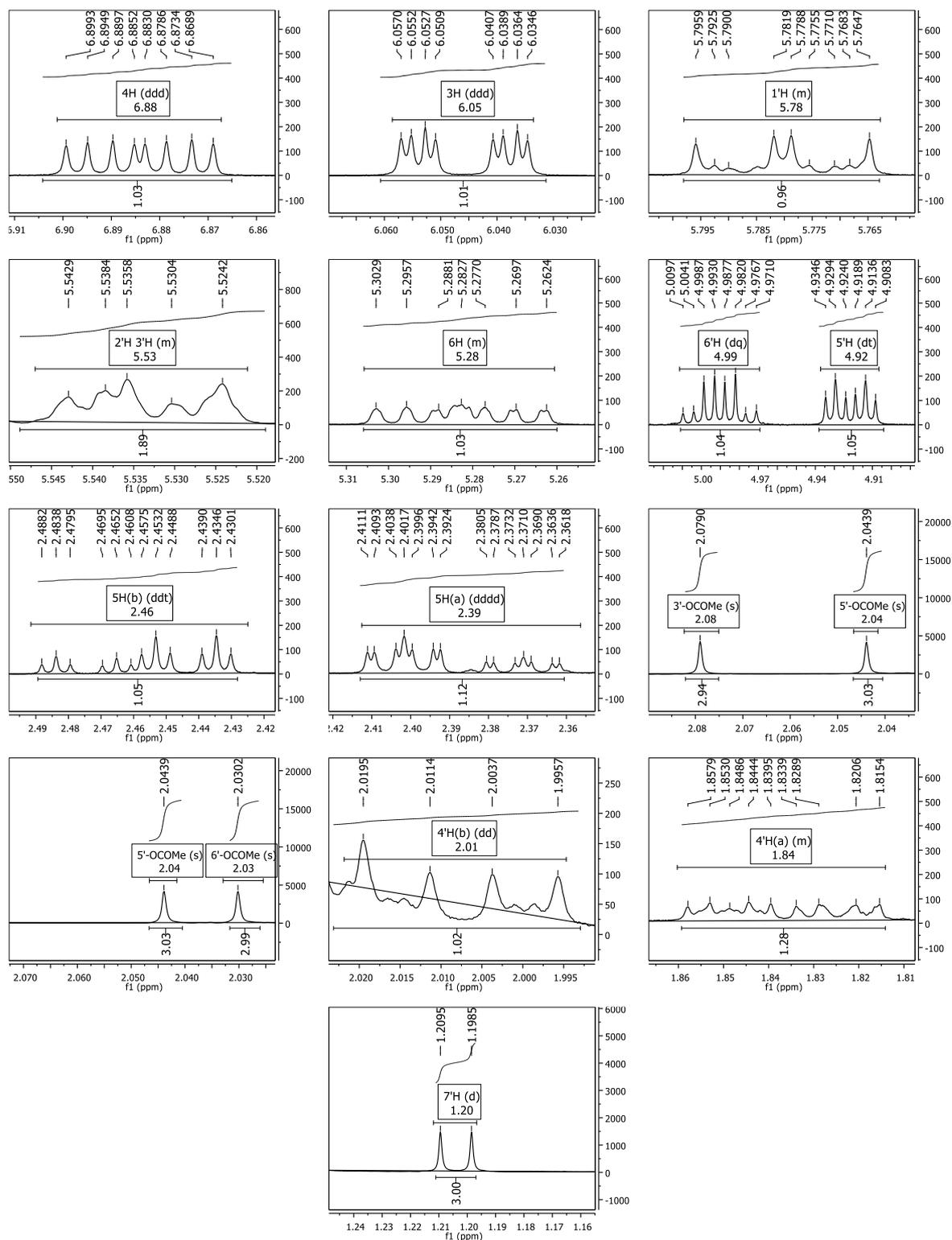
A)



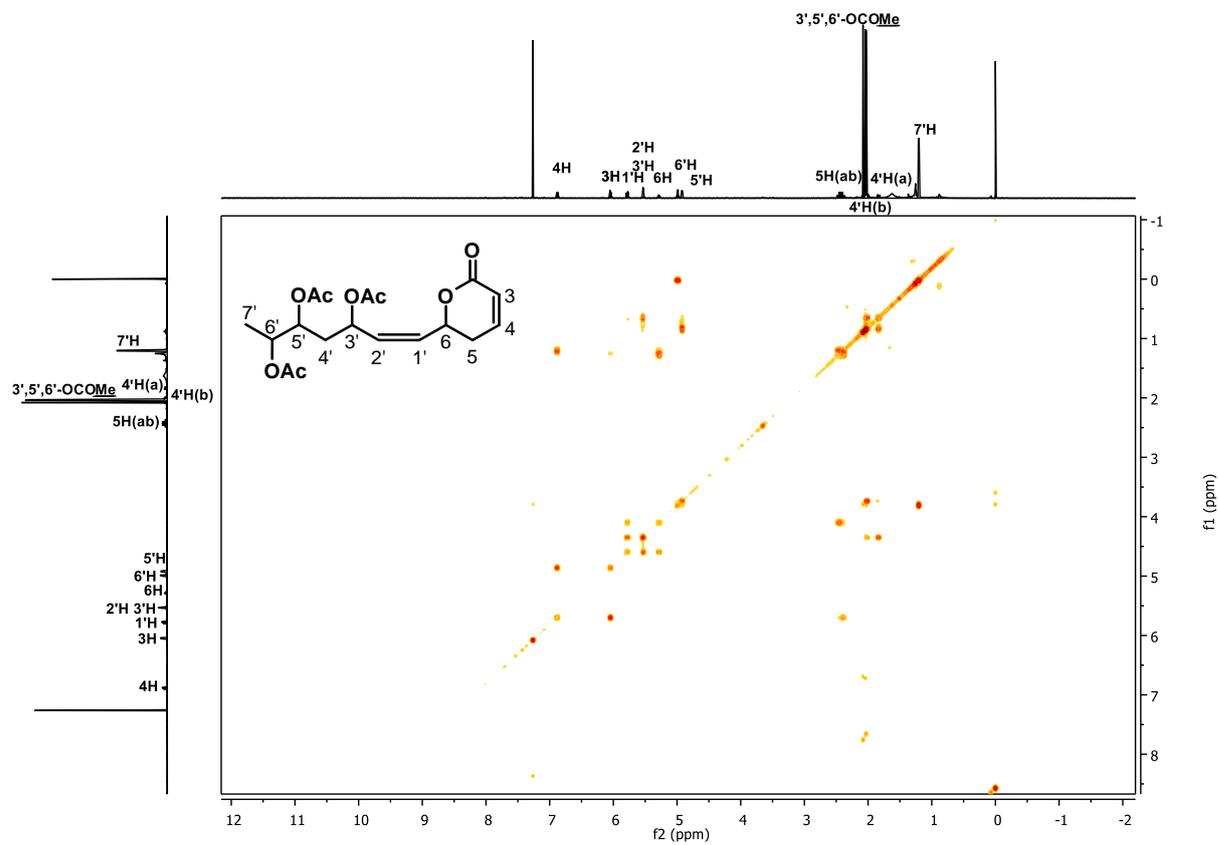
**Figura 42** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do hyptolido.

(conclusão)

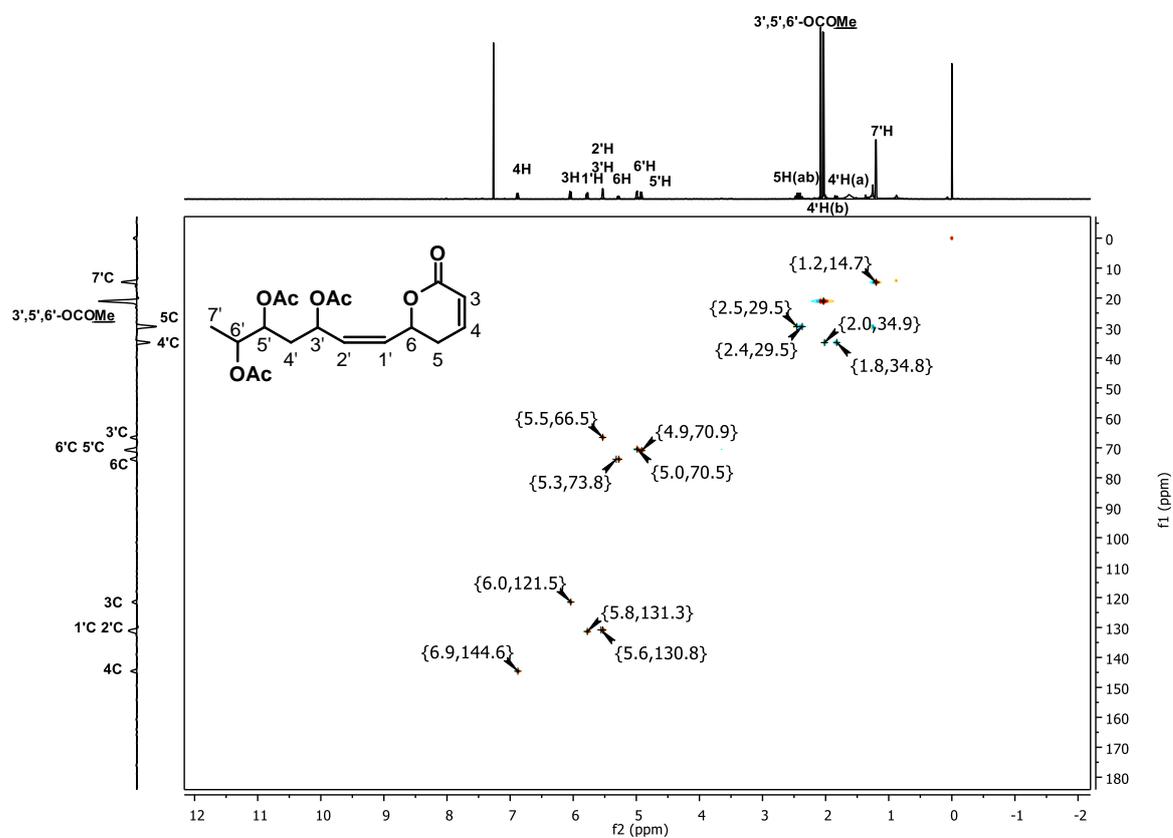
B)



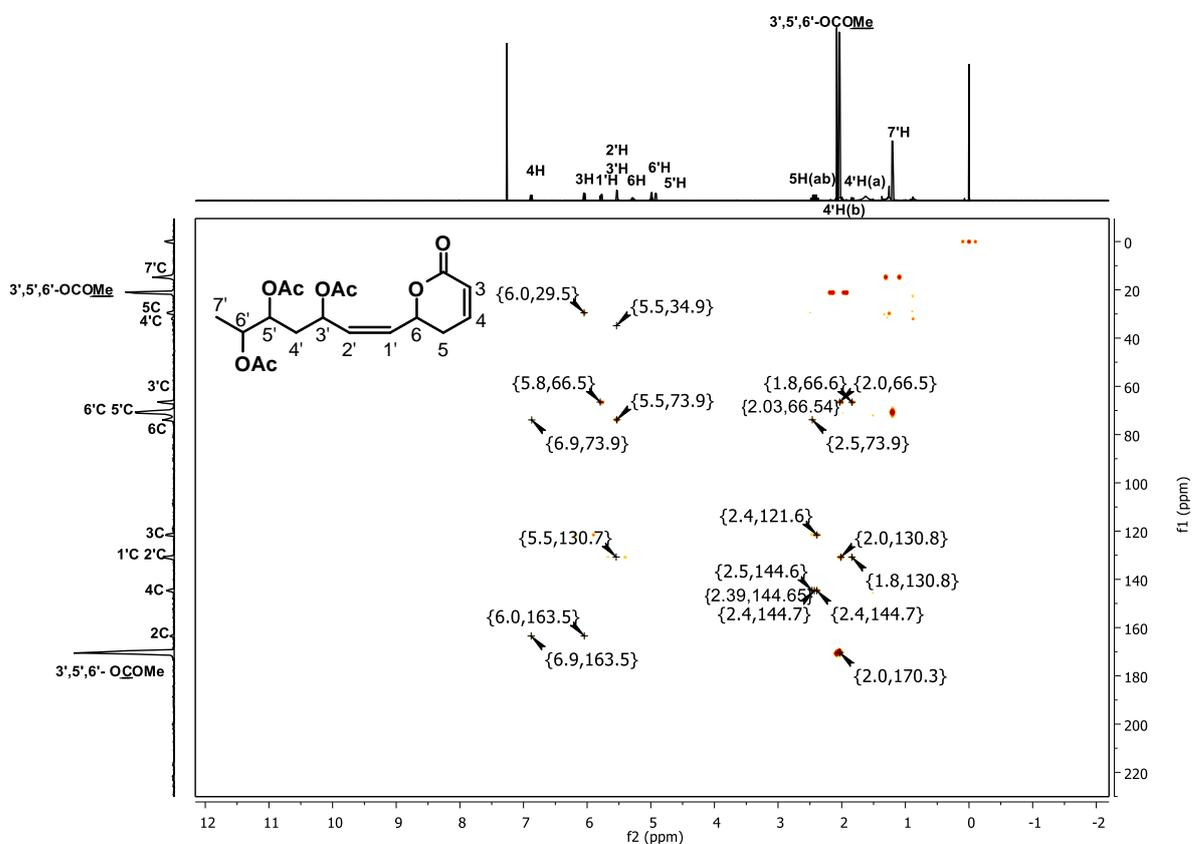
**Figura 43** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do hyptolido.



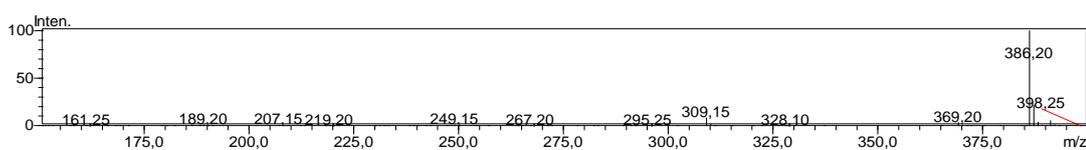
**Figura 44** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do hyptolido. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 45** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do hyptolido. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 46** – Espectro de massas do hyptolido, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K.



**Tabela 2** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do hyptolido, observados neste estudo (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e no estudo de Achmad *et al.*, 1987 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) [26]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses.

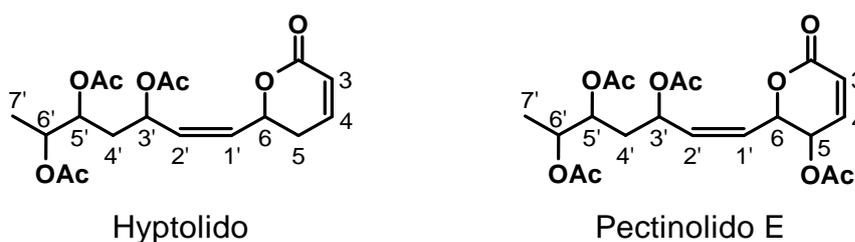
Posição	Dados experimentais		Dados da literatura	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	163,5	-	163,2
3	6,05 ddd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9,8$ ; $^5J_{3\text{H},6\text{H}} = 2,6$ ; $^4J_{3\text{H},5\text{Ha}} = 1,1$ )	121,5	6,04 ddd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 10,0$ ; $J = n/a$ ; $^4J_{3\text{H},5\text{Ha}} = 1,0$ )	121,3
4	6,88 ddd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9,8$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Ha}} = 5,7$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Hb}} = 2,7$ )	144,6	6,90 ddd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 10,0$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Ha}} = 6,0$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Hb}} = 3,0$ )	144,5
5(a)	2,39 dddd ( $^2J_{5\text{Ha},5\text{Hb}} = 18,4$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Ha}} = 5,7$ ; $^3J_{5\text{Ha},6\text{H}} = 4,4$ ; $^4J_{3\text{H},5\text{Ha}} = 1,1$ )	29,5	2,40 m	29,3
5(b)	2,46 ddt ( $^2J_{5\text{Ha},5\text{Hb}} = 18,4$ ; $^3J_{5\text{Hb},6\text{H}} = 11,2$ ; $^3J_{4\text{H},5\text{Hb}} = 2,7$ )		2,45 m	
6	5,28 m	73,8	5,30 ddd ( $^3J_{5\text{Hb},6\text{H}} = 12,0$ ; $^3J_{5\text{Ha},6\text{H}} = 4,5$ ; $^3J_{6\text{H},1'\text{H}} = 7,0$ )	73,6
1'	5,78 m	131,3	5,78 dd ( $^3J_{1'\text{H},2'\text{H}} = 10,0$ ; $^3J_{6\text{H},1'\text{H}} = 7,0$ )	131,0
2'	5,56 m	130,8	5,54 m	130,6
3'	5,53 m	66,5	5,54 m	66,3
4'(a)	1,84 m		1,84 m	
4'(b)	2,01 dd ( $^3J_{4'\text{Hb},5'\text{H}} = 9,4$ ; $^2J_{4'\text{Ha},4'\text{Hb}} = 4,9$ )	34,9	2,02 m	34,6
5'	4,92 dt ( $^3J_{4'\text{Hb},5'\text{H}} = 9,4$ ; $^3J_{5'\text{H},6'\text{H}} = 3,3$ )	70,9	4,94 m	70,7
6'	4,99 dq ( $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 6,6$ ; $^3J_{5'\text{H},6'\text{H}} = 3,3$ )	70,5	5,00 dq ( $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 6,5$ ; $^3J_{5'\text{H},6'\text{H}} = 2,9$ )	70,2
7'	1,20 d ( $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 6,6$ )	14,7	1,21 d ( $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 6,5$ )	14,5
3'-OCOMe	-	170,3	-	169,5
5'-OCOMe	-	170,3	-	170,8
6'-OCOMe	-	170,3	-	170,4
3'-OCOMe	2,08 s	21,1	2,08 s	20,8
5'-OCOMe	2,05 s	21,1	2,04 s	20,8
6'-OCOMe	2,05 s	21,1	2,03 s	20,8

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Valores de  $\delta_{\text{C}}$  obtidos nos espectros HSQC-ED e HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); n/a = não informado.

Observa-se na Figura 47 que as estruturas químicas do pectinólido E e hyptólido são semelhantes, diferindo apenas no grupo acetoxila em C-5, conseqüentemente, seus espectros unidimensionais e bidimensionais apresentaram hidrogênios e carbonos com semelhantes deslocamentos químicos.

**Figura 47** – Estruturas químicas do hyptólido e pectinólido E.



**Fonte:** Próprio autor.

Atribuiu-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do hyptólido (Figura 42), os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,39 (1H, dddd,  $^2J_{5\text{Ha},5\text{Hb}} = 18,4$ ;  $^3J_{4\text{H},5\text{Ha}} = 5,7$ ;  $^3J_{5\text{Ha},6\text{H}} = 4,4$  e  $^4J_{3\text{H},5\text{Ha}} = 1,1$  Hz, H<sub>(a)</sub>-5) e 2,46 (1H, ddt,  $^2J_{5\text{Ha},5\text{Hb}} = 18,4$ ;  $^3J_{5\text{Hb},6\text{H}} = 11,2$  e  $^3J_{4\text{H},5\text{Hb}} = 2,7$  Hz, H<sub>(b)</sub>-5) aos hidrogênios H<sub>(a)</sub>-5 e H<sub>(b)</sub>-5, respectivamente. No HSQC-ED do pectinólido E (Figura 39) observou-se correlação  $^1J_{5\text{C},5\text{H}}$  do carbono C-5 com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,32, indicativo de grupo metino. No HSQC-ED do hyptólido (Figura 44), observou-se correlações  $^1J_{5\text{C},5\text{H}}$  do carbono C-5 com os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,39 e 2,46, indicativo de grupo metileno com hidrogênios diastereotópicos.

Grupos diastereotópicos não são equivalentes e nem isócronos, têm diferentes valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN, podendo ocasionar diferentes acoplamentos com os substituintes adjacentes [165]. Como exemplo, observou-se que hidrogênio olefínico H-4 da  $\delta$ -lactona em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (1H, ddd,  $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9,8$ ;  $^3J_{4\text{H},5\text{Ha}} = 5,7$  e  $^3J_{4\text{H},5\text{Hb}} = 2,7$  Hz, H-4), apresentou constantes de acoplamento diferentes ao acoplar com os hidrogênios diastereotópicos H<sub>(a)</sub>-5 e H<sub>(b)</sub>-5 (Tabela 2). Por serem hidrogênios diastereotópicos, no COSY (Figura 43) observou-se acoplamento geminal ( $^2J_{\text{H},\text{H}}$ ) entre eles, com constante de acoplamento de 18,4 Hz.

Percebe-se que os deslocamentos químicos para os hidrogênios H-5 do hyptolido são mais protegidos do que o hidrogênio H-5 do pectinolido E, essa proteção é devido à ausência de ligação entre o carbono C-5 e o oxigênio do grupo acetoxila. Essa mesma proteção é observada nos deslocamentos químicos dos carbonos C-5 de ambas as substâncias, sinal em  $\delta_c$  64,1 e 29,5 para o pectinolido E (Tabela 1) e hyptolido (Tabela 2), respectivamente.

Diferentemente do HSQC-ED do pectinolido E, que foi observado sinal negativo para apenas um grupo metileno (C-4'), no HSQC-ED do hyptolido observou-se dois sinais negativos em  $\delta_c$  34,9 e 29,5, referentes aos dois grupos metileno presentes em sua estrutura C-4' e C-5, respectivamente. No HMBC (Figura 45) foi possível observar os sinais em  $\delta_c$  144,6 e 121,5, respectivamente referentes aos carbonos C-4 e C-3 da  $\alpha,\beta$ -insaturação da  $\delta$ -lactona, acoplando diferentemente com os hidrogênios H<sub>(a)</sub>-5 e H<sub>(b)</sub>-5.

Na Figura 46, pode ser observado o espectro de massas do hyptolido, que possui massa monoisotópica teórica de 368,15 Da (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>). O pico de baixa intensidade em  $m/z$  369,20, referiu-se ao seu íon quasimolecular [M + H]<sup>+</sup> e o pico mais intenso em  $m/z$  386,20, referiu-se ao aduto de amônio [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Os resultados são condizente com os resultados apresentados por Santana *et al.* (2019) [16]. A diferença em  $m/z$  58, entre os picos [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> do pectinolido E ( $m/z$  444,20) e hyptolido ( $m/z$  386,20), reforça a ausência do grupo acetoxila e adição de mais um hidrogênio ao carbono C-5 do hyptolido.

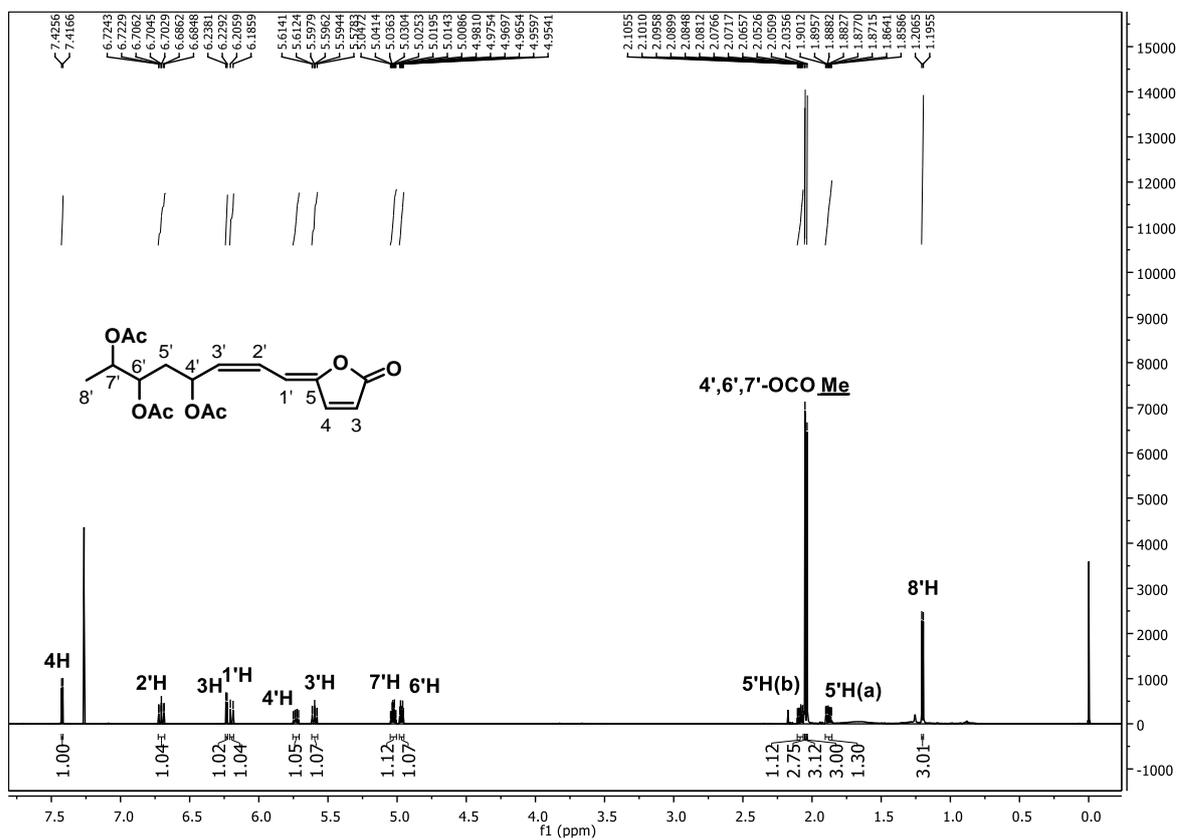
### 9.5.3 Pectinolido G

Na Figura 48 podem ser observados a estrutura química do pectinolido G (pico 7 do cromatograma da fração HPIInD-D das inflorescências, óleo amarelado) e seu espectro de RMN <sup>1</sup>H. Na Figura 49, Figura 50, Figura 51 e Figura 52 podem ser observados o COSY, HSQC-ED, HMBC e EM, respectivamente. Por meio dos espectros HSQC-ED e HMBC foram obtidos os deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup>C. A determinação estrutural foi determinada com auxílio da estrutura proposta por Boalino *et al.* (2003) [17], com isso, na Tabela 3 são demonstradas as correlações de hidrogênios e carbonos que fazem parte da molécula, observadas neste estudo e no estudo citado.

**Figura 48** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) do pectinolídeo G.

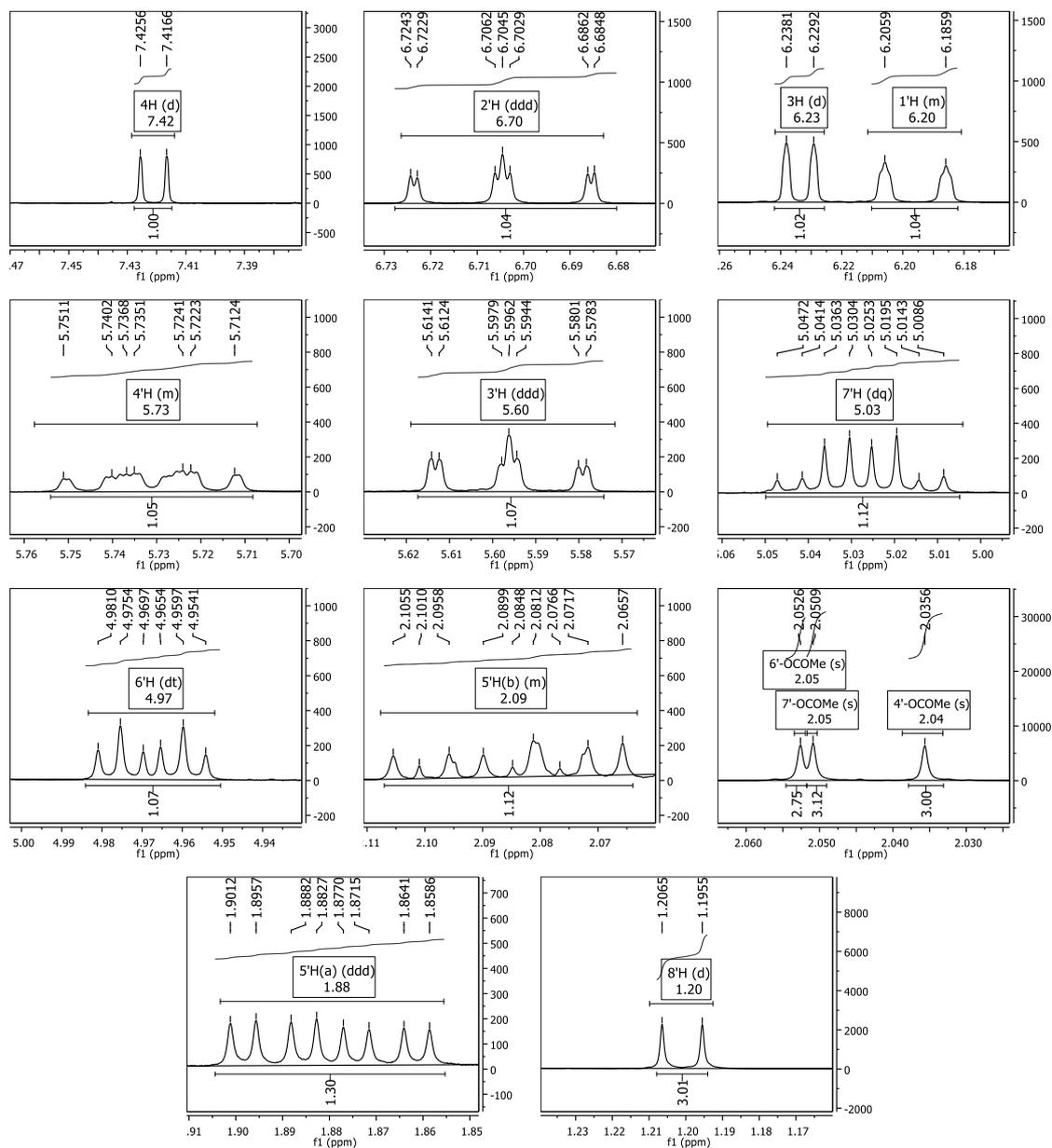
(continua)

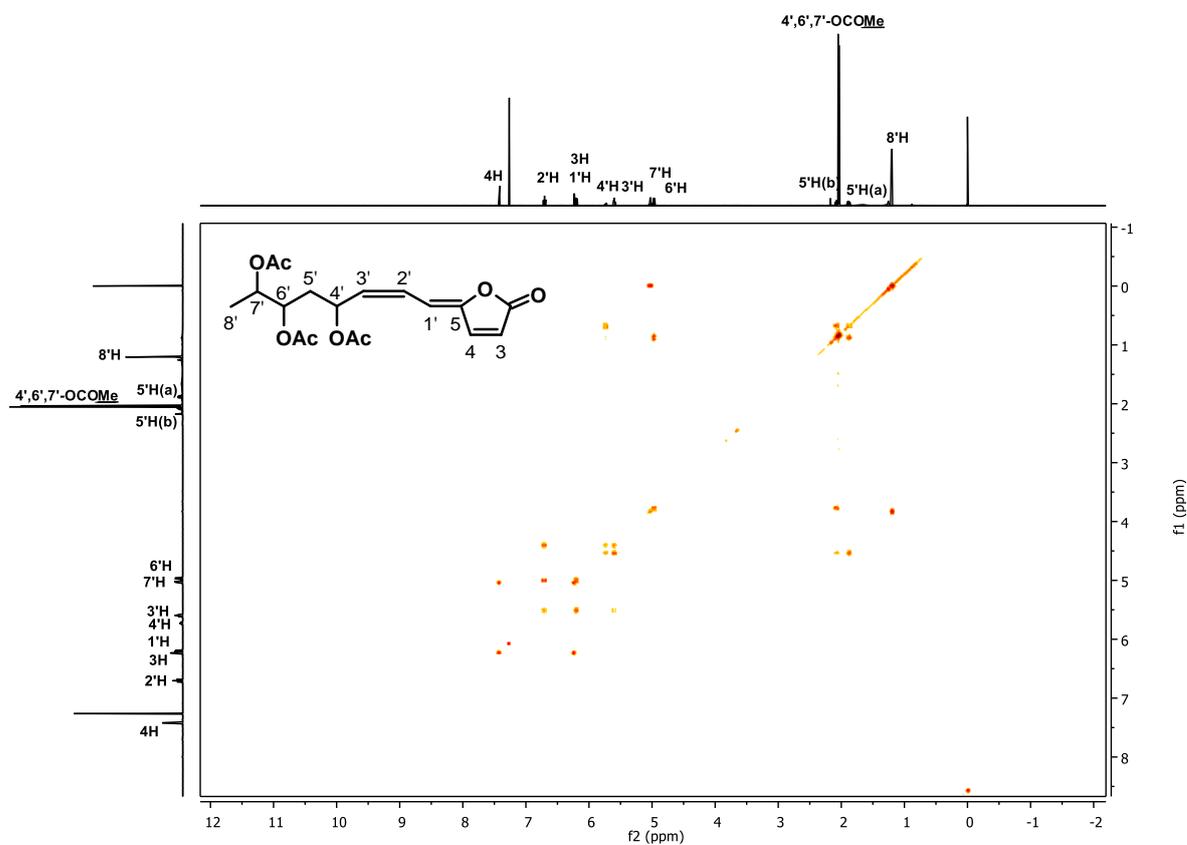
A)



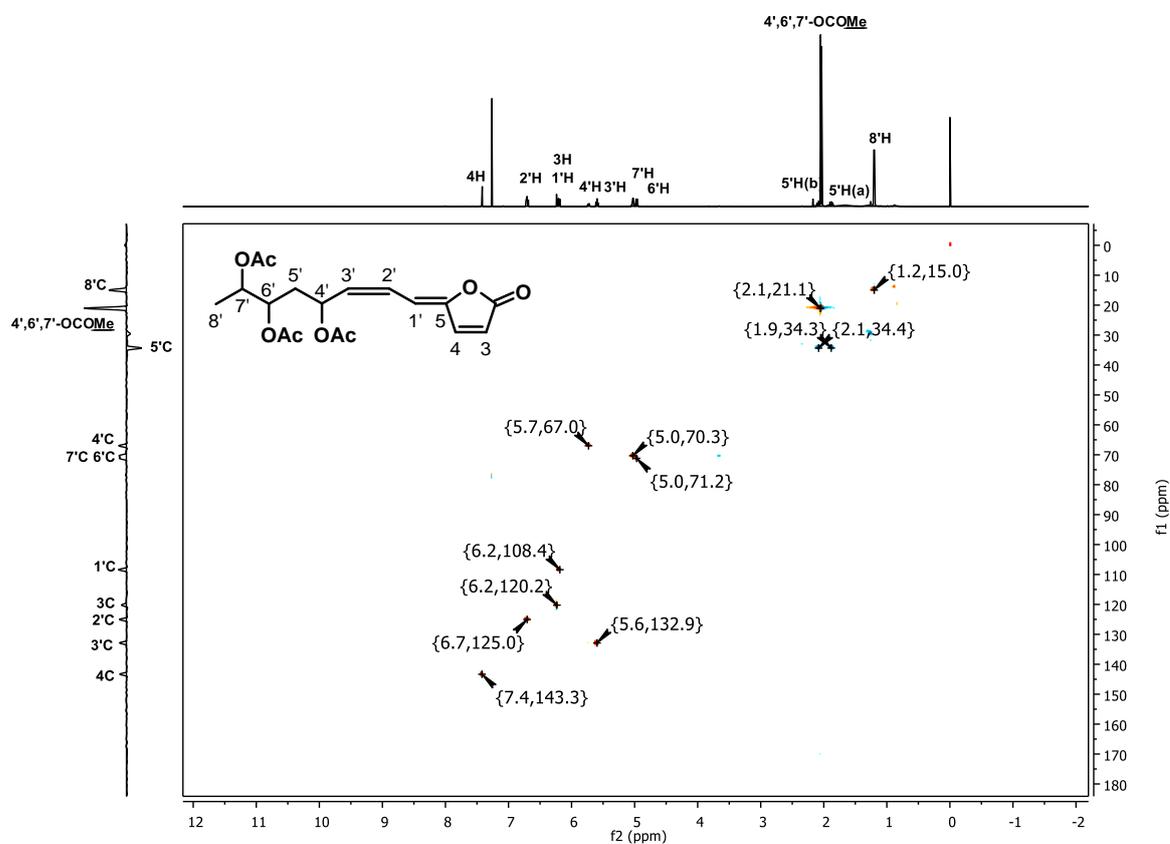
**Figura 48** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinólido G.

(conclusão)

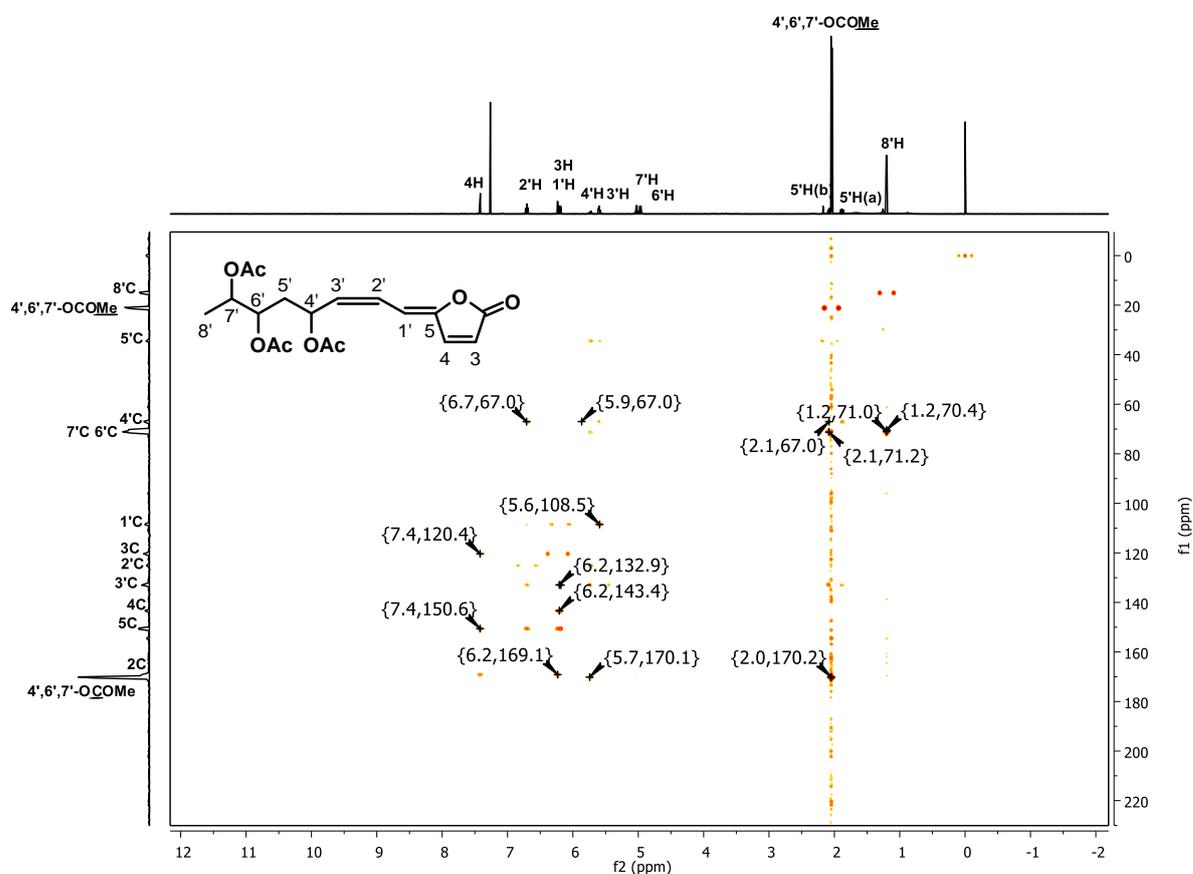
**B)**

**Figura 49** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G.

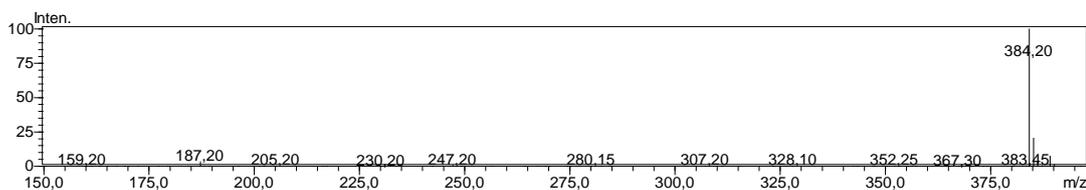
**Figura 50** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 51** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido G. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 52** – Espectro de massas do pectinólido G, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K.



**Tabela 3** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do pectinolido G, observados neste estudo (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) e no estudo de Boalino *et al.*, 2003 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) [17]. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses.

Posição	Dados experimentais		Dados da literatura	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	169,1	-	169,1
3	6,23 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	120,2	6,23 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	120,3
4	7,42 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	143,3	7,43 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	143,4
5	-	150,6	-	150,5
1'	6,20 m	108,4	6,20 d ( $^3J_{1\text{H}',2'\text{H}} = 12,0$ )	108,5
2'	6,70 ddd ( $^3J_{1\text{H}',2'\text{H}} = 11,9$ ; $^3J_{2\text{H}',3'\text{H}} = 10,9$ ; $^4J_{2\text{H}',4'\text{H}} = 0,9$ )	125,0	6,71 ddd ( $^3J_{1\text{H}',2'\text{H}} = 12,0$ ; $^3J_{2\text{H}',3'\text{H}} = 10,9$ ; $^4J_{2\text{H}',4'\text{H}} = 0,8$ )	125,0
3'	5,60 ddd ( $^3J_{2\text{H}',3'\text{H}} = 10,9$ ; $^3J_{3'\text{H},4'\text{H}} = 9,7$ ; $^4J_{3\text{H}',5'\text{Ha}} = 1,1$ )	132,9	5,60 ddd ( $^3J_{2\text{H}',3'\text{H}} = 10,9$ ; $^3J_{3'\text{H},4'\text{H}} = 9,8$ ; $^4J_{3\text{H}',5'\text{Ha}} = 1,0$ )	132,9
4'	5,73 m	67,0	5,73 m	67,0
5' <sub>(a)</sub>	1,88 ddd ( $^2J_{5\text{H}'a,5\text{H}'b} = 14,5$ ; $^3J_{4\text{H}',5'\text{Ha}} = 7,8$ ; $^4J_{3\text{H}',5'\text{Ha}} = 3,3$ )	34,4	1,88 ddd ( $^2J_{5\text{H}'a,5\text{H}'b} = 12,8$ ; $^3J_{4\text{H}',5'\text{Ha}} = 6,4$ ; $^4J_{3\text{H}',5'\text{Ha}} = 3,2$ )	34,3
5' <sub>(b)</sub>	2,09 m		2,09 m	
6'	4,97 dt ( $^3J_{5\text{H}'b,6\text{H}'} = 9,3$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	71,2	4,97 dt ( $^3J_{5\text{H}'a,6\text{H}'} = 9,3$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	71,2
7'	5,03 dq ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	70,3	5,03 dq ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	70,4
8'	1,20 d ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ )	15,0	1,20 d ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ )	15,0
4'-O <u>C</u> OMe	-	170,2	-	170,3
6'-O <u>C</u> OMe	-	170,2	-	170,1
7'-O <u>C</u> OMe	-	170,2	-	170,2
4'-O <u>C</u> OMe	2,04 s	21,1	2,02 s	21,2
6'-O <u>C</u> OMe	2,05 s	21,1	2,06 s	21,1
7'-O <u>C</u> OMe	2,05 s	21,1	2,04 s	21,0

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Valores de  $\delta_{\text{C}}$  obtidos nos espectros HSQC-ED e HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Sua estrutura química foi elucidada com auxílio dos dados espectroscópicos apresentados por Boalino *et al.* (2003) [17]. Os autores do artigo estabeleceram sua fórmula molecular como  $C_{18}H_{22}O_8$ . Em comparação com o hyptolido ( $C_{18}H_{24}O_8$ ), a ausência de hidrogênios indicou que a molécula apresentava uma insaturação a mais.

Os sinais em  $\delta_H$  2,05 (s, 6H) e 2,04 (s, 3H), observados no espectro de RMN  $^1H$  (Figura 48), foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de três grupos acetoxila. Os sinais em  $\delta_H$  6,23 (1H, d,  $^3J_{3H,4H} = 5,4$  Hz, H-3) e 7,42 (1H, d,  $^3J_{3H,4H} = 5,4$  Hz, H-4), foram atribuídos a dois hidrogênios olefínicos da  $\alpha,\beta$ -insaturação da  $\gamma$ -lactona, respectivamente H-3 e H-4. De acordo com o HSQC-ED, esses hidrogênios estão ligados aos carbonos em  $\delta_C$  120,2 e 143,3, regiões de carbonos insaturados, atribuídos aos carbonos C-3 e C-4, respectivamente (Tabela 3). O sinal em  $\delta_C$  169,1 foi atribuído a carbonila da  $\gamma$ -lactona (C-2). Os sinais em  $\delta_H$  6,70 (1H, ddd,  $^3J_{1H',2'H} = 11,9$ ;  $^3J_{2H',3'H} = 10,9$  e  $^4J_{2H',4'H} = 0,9$  Hz, H-2') e 5,60 (1H, ddd,  $^3J_{2'H,3'H} = 10,9$ ;  $^3J_{3'H,4'H} = 9,7$  e  $^4J_{3H',5'Ha} = 1,1$  Hz, H-3') foram atribuídos a mais dois hidrogênios olefínicos H-2' e H-3', respectivamente. A constante de acoplamento de 10,9 Hz, estabeleceu a isomeria Z a dupla entre os carbonos C-2' e C-3'.

Diferentemente do pectinolido E, em que foi observado deslocamento químico em  $\delta_H$  5,32 para H-5, no espectro de RMN  $^1H$  do pectinolido G não foi observado sinais nessa região. A ausência de hidrogênio no carbono C-5 ( $\delta$  150,6) foi confirmada no HSQC-ED (Figura 50), em que não foi observado acoplamento  $^1J_{5C,5H}$ , e ausência de acoplamentos  $^3J_{4H,5H}$  e  $^3J_{5H,1'H}$  no COSY (Figura 49). Além disso, o HMBC confirmou a ligação da cadeia octílica alifática a  $\gamma$ -lactona em C-5, uma vez que exibiram acoplamentos de longo alcance entre o carbono C-5 ( $\delta_C$  75,1) e os hidrogênios H-4' ( $\delta_H$  7,42), H-1' ( $\delta_H$  6,20) e H-2' ( $\delta_H$  6,70) no HMBC (Figura 51). A ausência de hidrogênio em C-5, e sinal em  $\delta_C$  150,6, sugeriu uma dupla ligação entre os carbonos C-5 e C-1' ( $\delta_C$  108,4), indicando que a molécula apresentava uma insaturação a mais em relação ao hyptolido.

O COSY, HSQC-ED e HMBC revelaram todo o sistema de spin associado à cadeia lateral (Tabela 3), a partir do carbono C-2', observou-se semelhança entre seus deslocamentos e acoplamentos da cadeia lateral, aos deslocamentos e acoplamentos da cadeia lateral do hyptolido.

Na Figura 52, é observado o espectro de massas do pectinólido G, que possui massa monoisotópica teórica de 366,13 Da ( $C_{18}H_{22}O_8$ ). O pico de baixa intensidade em  $m/z$  367,30, referiu-se ao seu íon quasimolecular  $[M + H]^+$  e o pico mais intenso em  $m/z$  384,20, referiu-se ao aduto de amônio  $[M + NH_4]^+$ . Os resultados são condizente com os resultados apresentados por Boalino *et al.* (2003) [17].

O pico 7 da fração HPIInD-D, referente a essa substância ( $t_R = 25,5$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 316$  nm; Figura 22, página 150), apresentou tempo de retenção e espectro de UV diferente do pectinólido E padrão ( $t_R = 18,4$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 204$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319$  nm; Figura 19, página 146), tratando-se de substâncias diferentes. A intensa absorção em 316 nm no espectro de UV, indicou que a substância poderia ser uma  $\gamma$ - ou  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada com ligações duplas conjugadas, relatado com mais detalhes no item 9.3.1.2. Com a elucidação de sua estrutura química, a substância em questão é uma  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada com duas ligações duplas conjugadas.

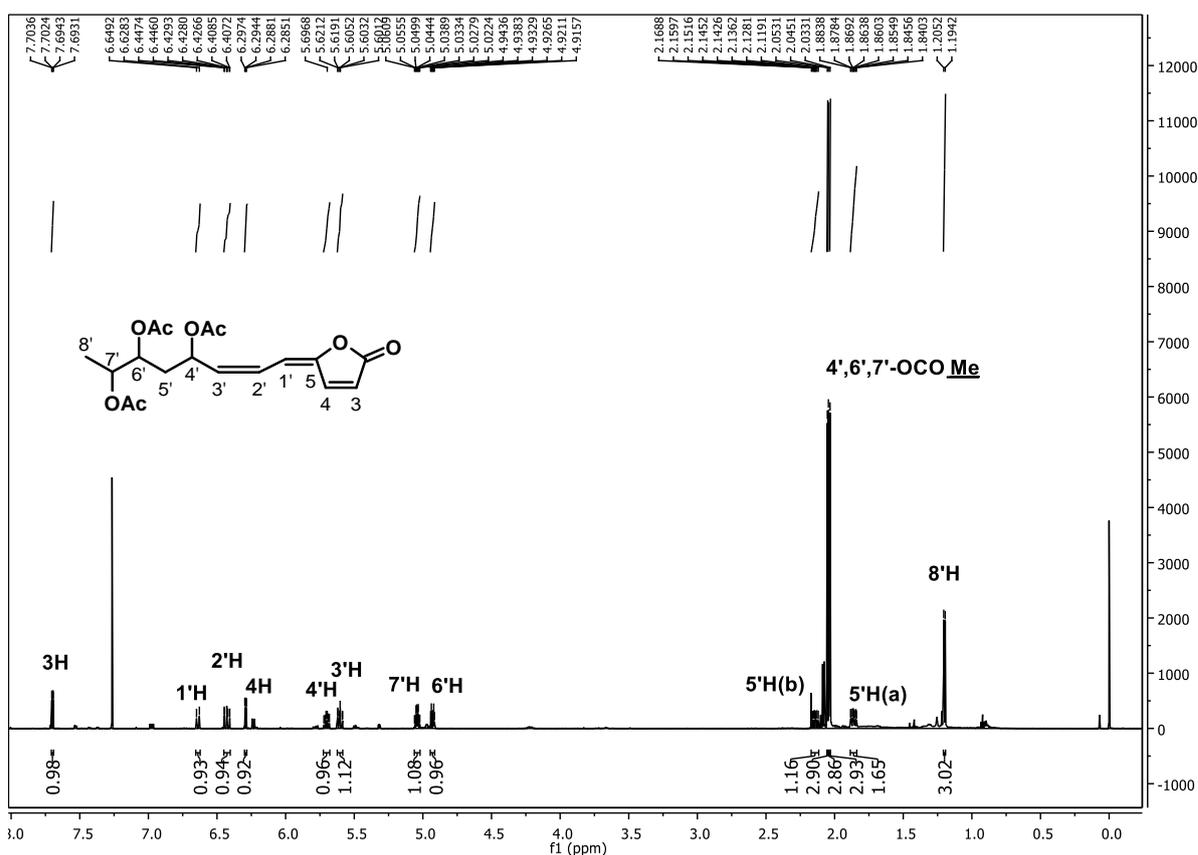
#### 9.5.4 Pectinólido Q

Na Figura 53 podem ser observados a estrutura química do pectinólido Q (pico 6 do cromatograma da fração HPIInD-D das inflorescências, óleo amarelado) e seu espectro de RMN  $^1H$ . Na Figura 54, Figura 55, Figura 56 e Figura 57 podem ser observados o COSY, HSQC-ED, HMBC e EM, respectivamente. Por meio dos espectros HSQC-ED e HMBC foram obtidos os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}C$ . Até o momento não há relato científico de isolamento dessa hyptolactona, nas páginas seguintes será relatado que sua estrutura química é semelhante à do pectinólido G, com isso, a sua determinação estrutural foi determinada com auxílio da estrutura proposta por Boalino *et al.* (2003) [17] para o pectinólido G. Na Tabela 4 são demonstradas as correlações de hidrogênios e carbonos que fazem parte do pectinólido Q, e do pectinólido G (obtido neste estudo).

**Figura 53** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinolido Q.

(continua)

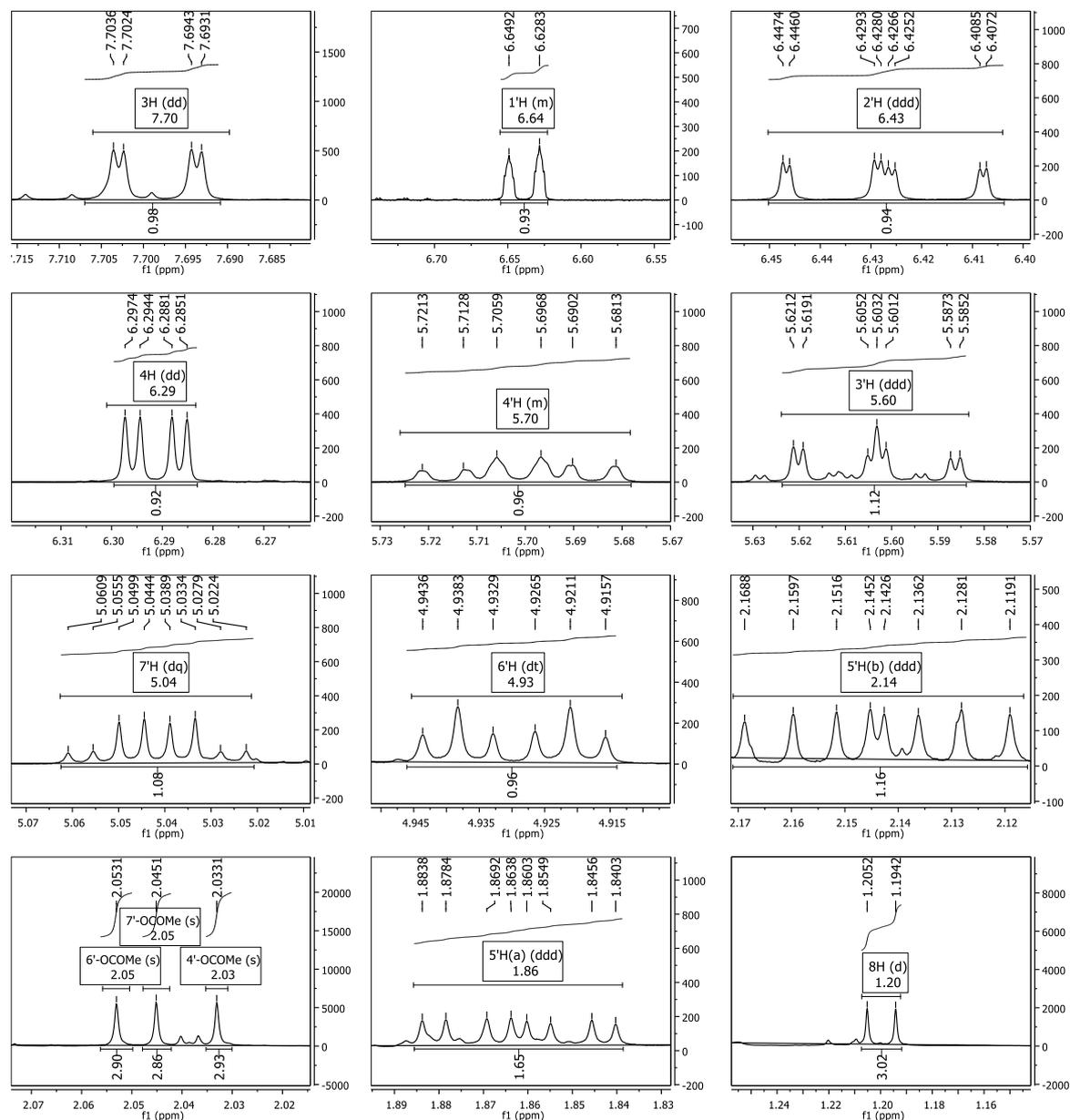
A)

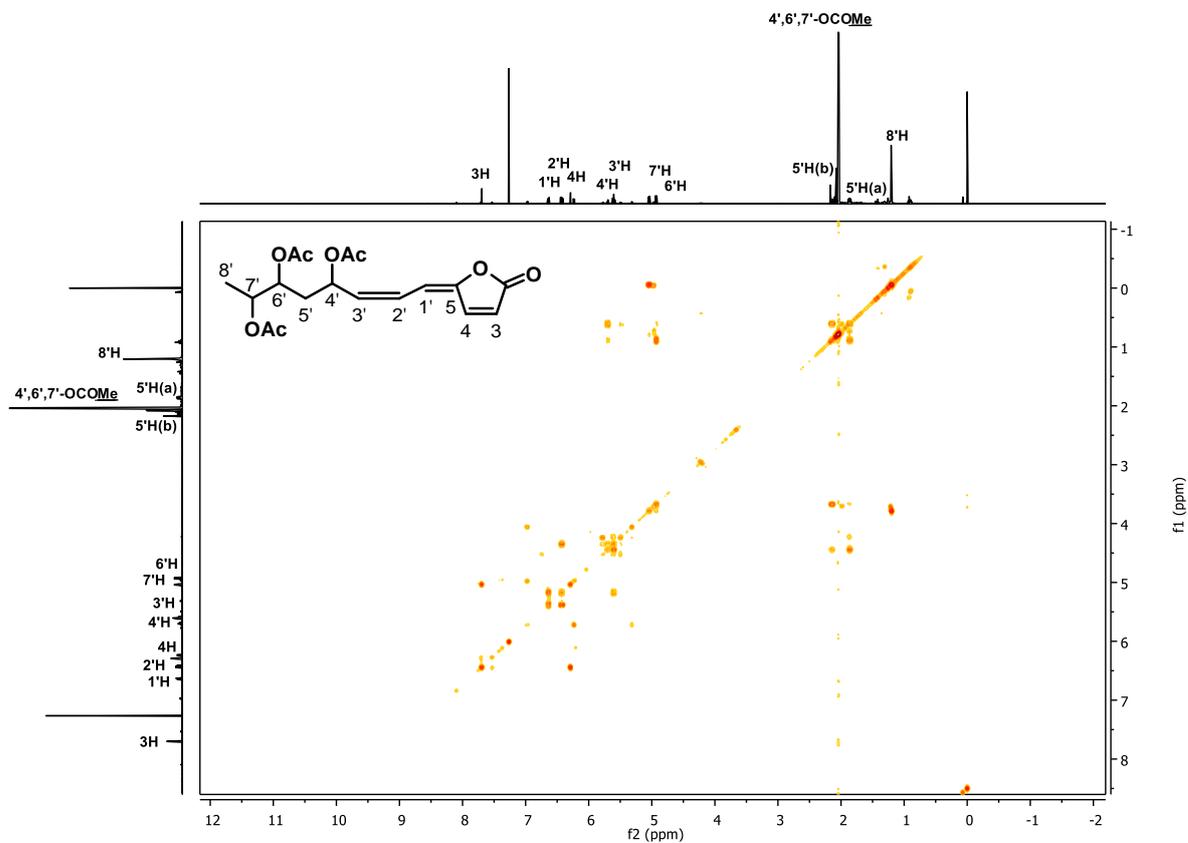


**Figura 53** – Espectro (A) e ampliações do espectro (B) de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) do pectinolido Q.

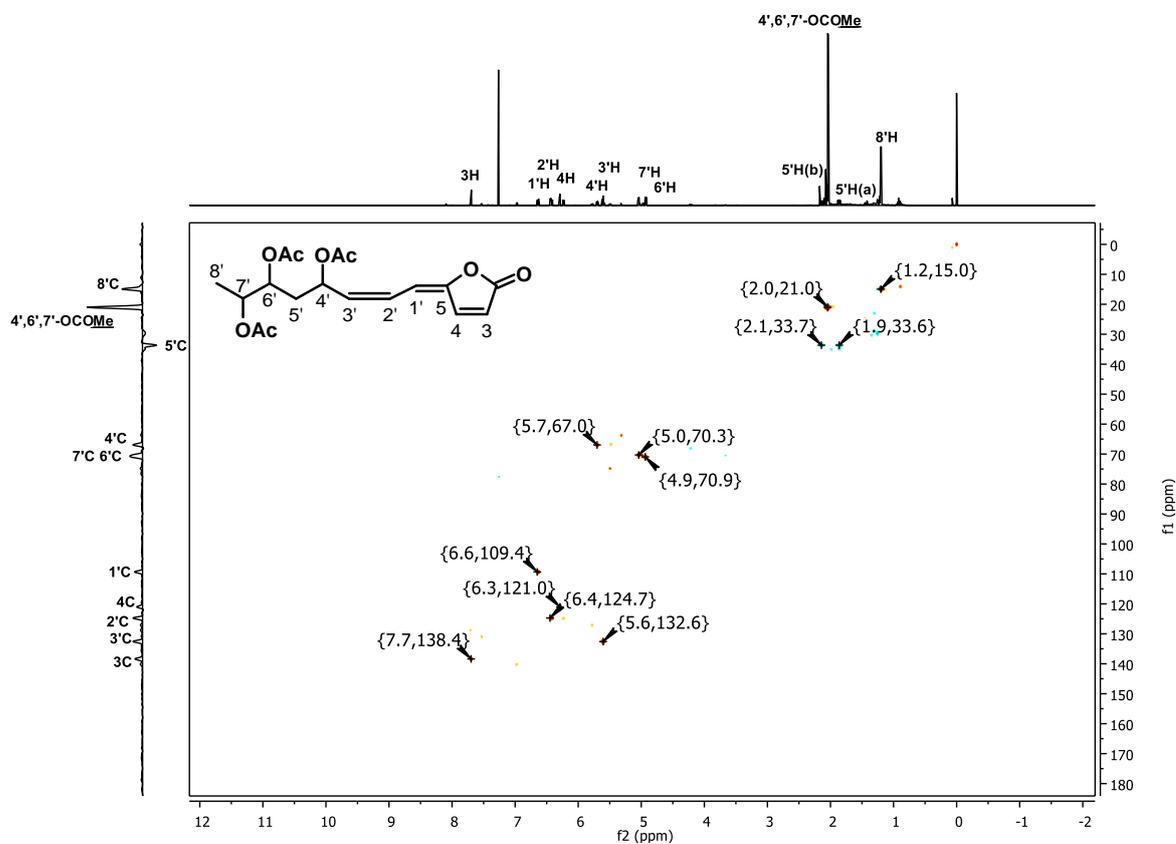
(conclusão)

B)

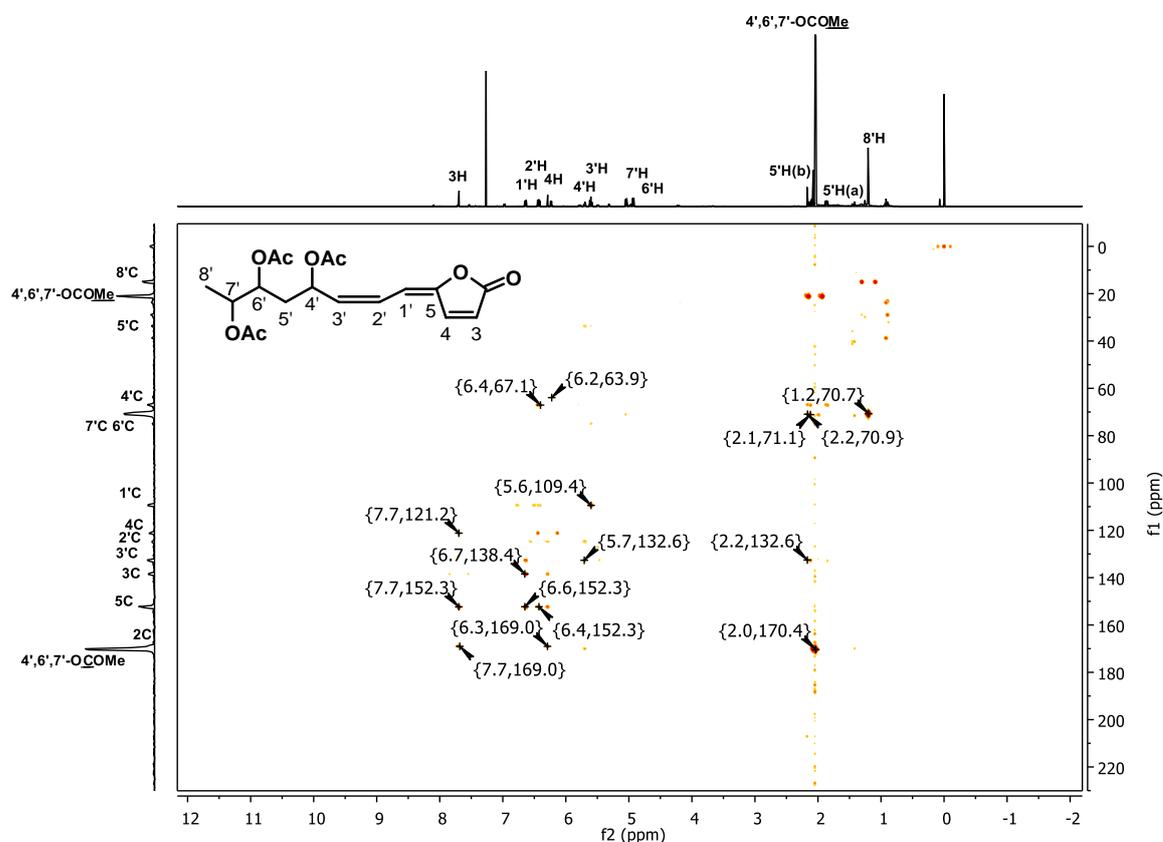


**Figura 54** – Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q.

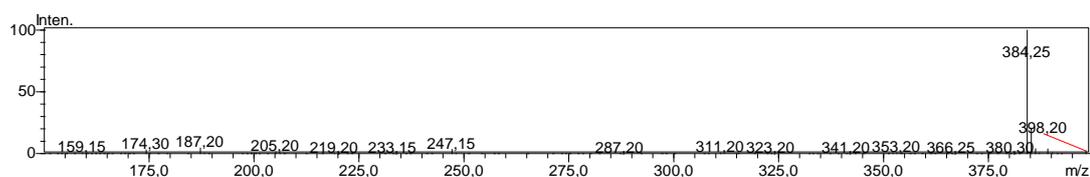
**Figura 55** – Espectro HSQC-ED  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 56** – Espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) do pectinólido Q. Os acoplamentos heteronucleares são vistos entre chaves  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**Figura 57** – Espectro de massas do pectinólido Q, obtido em ionização por *electrospray* no modo SIM positivo (4,5 kV) a 308 K.



**Tabela 4** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos pectinólidos Q e G (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), observados neste estudo. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm. Constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $J$ ) em Hz entre parênteses.

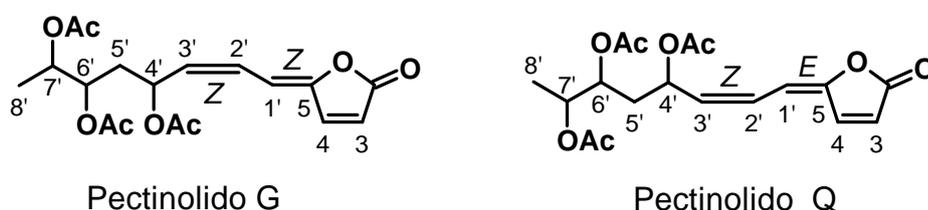
Posição	Pectinólido Q		Pectinólido G	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}^*$
2	-	169,0	-	169,1
3	7,70 dd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,6$ ; $^5J_{3\text{H},1'\text{H}} = 0,7$ )	138,4	6,23 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	120,2
4	6,29 dd ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,6$ ; $^4J_{4\text{H},1'\text{H}} = 1,8$ )	121,0	7,42 d ( $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 5,4$ )	143,3
5	-	152,3	-	150,6
1'	6,64 m	109,4	6,20 m	108,4
2'	6,43 ddd ( $^3J_{1'\text{H},2'\text{H}} = 12,5$ ; $^3J_{2'\text{H},3'\text{H}} = 10,8$ ; $^4J_{2'\text{H},4'\text{H}} = 0,8$ )	124,7	6,70 ddd ( $^3J_{1'\text{H},2'\text{H}} = 11,9$ ; $^3J_{2'\text{H},3'\text{H}} = 10,9$ ; $^4J_{2'\text{H},4'\text{H}} = 0,9$ )	125,0
3'	5,60 ddd ( $^3J_{2'\text{H},3'\text{H}} = 10,8$ ; $^3J_{3'\text{H},4'\text{H}} = 9,6$ ; $^4J_{3'\text{H},5'\text{Ha}} = 1,2$ )	132,6	5,60 ddd ( $^3J_{2'\text{H},3'\text{H}} = 10,9$ ; $^3J_{3'\text{H},4'\text{H}} = 9,7$ ; $^4J_{3'\text{H},5'\text{Ha}} = 1,1$ )	132,9
4'	5,70 m	67,0	5,73 m	67,0
5'(a)	1,86 ddd ( $^2J_{5'\text{Ha},5'\text{Hb}} = 14,1$ ; $^3J_{4'\text{H},5'\text{Ha}} = 8,7$ ; $^4J_{3'\text{H},5'\text{Ha}} = 3,2$ )	33,7	1,88 ddd ( $^2J_{5'\text{Ha},5'\text{Hb}} = 14,5$ ; $^3J_{4'\text{H},5'\text{Ha}} = 7,8$ ; $^4J_{3'\text{H},5'\text{Ha}} = 3,3$ )	34,4
5'(b)	2,14 ddd ( $^2J_{5'\text{Ha},5'\text{Hb}} = 14,1$ ; $^3J_{5'\text{Hb},6'\text{H}} = 10,3$ ; $^3J_{4'\text{H},5'\text{Hb}} = 5,5$ )		2,09 m	
6'	4,93 dt ( $^3J_{5'\text{Hb},6'\text{H}} = 10,3$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,3$ )	70,9	4,97 dt ( $^3J_{5'\text{Hb},6'\text{H}} = 9,3$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	71,2
7'	5,04 dq ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,3$ )	70,3	5,03 dq ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ ; $^3J_{6'\text{H},7'\text{H}} = 3,5$ )	70,3
8'	1,20 d ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ )	15,0	1,20 d ( $^3J_{7'\text{H},8'\text{H}} = 6,6$ )	15,0
4'-OCOMe	-	170,4	-	170,2
6'-OCOMe	-	170,4	-	170,2
7'-OCOMe	-	170,4	-	170,2
4'-OCOMe	2,03 s	21,0	2,04 s	21,1
6'-OCOMe	2,05 s	21,0	2,05 s	21,1
7'-OCOMe	2,05 s	21,0	2,05 s	21,1

**Fonte:** Próprio autor.

**Nota:** \*Valores de  $\delta_{\text{C}}$  obtidos nos espectros HSQC-ED e HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Observa-se na Figura 58 que as estruturas químicas dos pectinólidos G e Q são semelhantes. As substâncias são estereoisômeros do tipo diastereoisômeros, com mudança na isomeria *E* e *Z* da ligação dupla entre os carbonos C-5 e C-1'. Ao comparar os deslocamentos químicos desses carbonos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4), foi atribuída a isomeria *E* a dupla entre C-5 e C-1' do pectinólido Q por estarem mais deslocados. Devido à similaridade dessas  $\gamma$ -lactonas, seus espectros unidimensionais e bidimensionais apresentaram hidrogênios e carbonos com semelhantes deslocamentos químicos.

**Figura 58** – Estruturas químicas dos pectinólidos G e Q obtidos neste estudo.



**Fonte:** Próprio autor.

Como pode ser observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do pectinólido G (Tabela 4), os hidrogênios olefínicos H-3 e H-4 da  $\gamma$ -lactona, apresentaram-se como dubletos, acoplado entre si com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,23 (1H, d,  $^3J_{\text{H},4\text{H}} = 5,4$  Hz, H-3) e 7,42 (1H, d,  $^3J_{\text{H},4\text{H}} = 5,4$  Hz, H-4), respectivamente. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do pectinólido Q (Tabela 4), os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,70 (1H, dd,  $^3J_{\text{H},4\text{H}} = 5,6$  e  $^5J_{\text{H},1'\text{H}} = 0,7$  Hz, H-3) e 6,29 (1H, dd,  $^3J_{\text{H},4\text{H}} = 5,6$  e  $^4J_{\text{H},1'\text{H}} = 1,8$  Hz, H-4) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos da  $\gamma$ -lactona H-3 e H-4, respectivamente, apresentando-se como duplos dubletos. Esta multiplicidade foi o ponto “chave” para atribuição da isomeria *E* a dupla ligação entre os carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  152,3) e C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  109,4) do pectinólido Q.

Ao comparar as duas estruturas químicas (Figura 58), a diferença nas isomerias das duplas entre C-5 e C-1', faz com que seus hidrogênios H-1' sejam diferentes espacialmente. De acordo com Pavia *et al.* (2010) [166], a interação spin-spin entre acoplamento homonuclear e heteronuclear, pode ser afetada com o ângulo da ligação. Com isso, a maneira como H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  6,64) do pectinólido Q está sendo

representado espacialmente, fez com que houvesse uma efetiva interação spin-spin entre H-1' e os hidrogênios H-3 e H-4. Com isso, atribuiu-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do pectinólido Q, acoplamento  $^4J$  entre H-4 e H-1' de 1,8 Hz e acoplamento  $^5J$  entre H-3 e H-1' de 0,8 Hz.

Observou-se que diferente do pectinólido G, o hidrogênio H-3 do pectinólido Q é mais desprotegido que H-4 (Tabela 4). Devido a isomeria *E* da dupla ligação dos carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  152,3) e C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  109,4), essa desproteção pode ser ocasionada pela sobreposição dos orbitais das ligações duplas conjugadas, tornando H-3 mais desblindado que H-4.

O hidrogênio H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  6,64) do pectinólido Q apresentou-se em sinal mais deslocado que o H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  6,20) do pectinólido G (Tabela 4), esse deslocamento foi atribuído ao fato do H-1' do pectinólido Q está espacialmente mais próximo do oxigênio ligado ao carbono C-5, tornando-o mais desprotegido. Efeito contrário foi observado aos H-2' dessas substâncias, em que o H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  6,43) do pectinólido Q foi menos deslocado que o H-2' do pectinólido G ( $\delta_{\text{H}}$  6,70) por estar espacialmente mais afastado do oxigênio.

O COSY (Figura 54), HSQC-ED (Figura 55) e HMBC (Figura 56) revelaram todo o sistema de spin associado à cadeia lateral (Tabela 4). A partir do carbono C-3', observou-se semelhança entre seus deslocamentos e acoplamentos aos deslocamentos e acoplamentos da cadeia lateral do pectinólido G obtido neste estudo.

Na Figura 57 pode ser observado o espectro de massas do pectinólido Q, que possui massa monoisotópica teórica de 366,13 Da ( $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_8$ ). Diferente dos espectros de massas das hyptolactonas obtidas neste estudo, observou-se a ausência de seu íon quasimolecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . O sinal de baixa intensidade em  $m/z$  366,25, referiu-se ao seu íon molecular, condizente com o íon molecular apresentado por Boalino *et al.* (2003) para o pectinólido G [17]. O pico de maior intensidade em  $m/z$  384,25, referiu-se ao aduto de amônio  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ , pico semelhante e de mesma intensidade observou-se no espectro de massas do pectinólido G obtido neste estudo, referente ao aduto amônio em  $m/z$  384,20 (Figura 52, página 187).

O pico 6 da fração HPIInD-D, referente a essa substância ( $t_{\text{R}} = 18,7$  min;  $\lambda_{\text{max}}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 320$  nm; Figura 22, página 150), apresentou tempo de retenção

e espectro de UV diferente do pectinólido E padrão ( $t_R = 18,4$  min;  $\lambda_{\max}^{\pi \rightarrow \pi^*} = 204$  nm;  $\lambda_{\max}^{n \rightarrow \pi^*} = 319$  nm; Figura 19, página 146), tratando-se de substâncias diferentes. A intensa absorção em 320 nm no espectro de UV, indicou que a substância poderia ser uma  $\gamma$ - ou  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada com ligações duplas conjugadas, relatado com mais detalhes no item 9.3.1.2. Com a elucidação de sua estrutura química, a mais nova hyptolactona é uma  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada com duas ligações duplas conjugadas.

Após a elucidação das estruturas químicas, as hyptolactonas obtidas neste estudo (hyptólido, pectinólidos E, G e Q) e as frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) das folhas e inflorescências de *H. pectinata* tiveram seus potenciais antibacterianos avaliados frente a *S. pyogenes*.

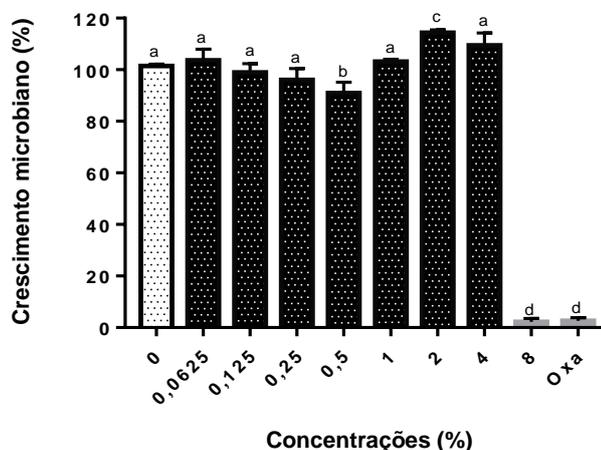
## 9.6 Atividade antibacteriana frente a *Streptococcus pyogenes*

### 9.6.1 Avaliação do efeito antibacteriano do DMSO

Inicialmente, determinou-se a CIM do DMSO frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. O DMSO é um solvente orgânico de baixa toxicidade, frequentemente utilizado em ensaios biológicos para solubilização de amostras. A ação permeante de membranas biológicas do DMSO tem permitido a sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias [167,168]. Por isso, antes de realizar os ensaios biológicos com as frações e substâncias, verificou-se em quais concentrações o DMSO não inibiria o crescimento de *S. pyogenes*, a fim de evitar interferências nos ensaios biológicos.

O DMSO foi diluído na suspensão bacteriana de modo que suas concentrações nos poços (v/v) variassem de 8 (concentração inicial) a 0,0625% (concentração final) (Figura 59).

**Figura 59** – Avaliação da CIM do DMSO frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorbância em leitor de microplacas.



**Nota:** O eixo y representa o crescimento microbiano em porcentagem, enquanto o eixo x representa as concentrações de DMSO testadas. Controle positivo de inibição: oxacilina 0,4 µg/mL (Oxa). Controle negativo de inibição: suspensão bacteriana (0). Esse gráfico foi representativo de experimentos realizados em triplicata com aplicação do teste estatístico ANOVA de via única, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras iguais indicam médias estatisticamente equivalentes, letras diferentes indicam médias com diferenças significativas.

O DMSO nas concentrações abaixo de 8% foi incapaz de inibir o crescimento de *S. pyogenes*. Na concentração de 8%, o DMSO inibiu o crescimento bacteriano em 97,76% ( $\pm 0,77$ ), enquanto para o controle positivo de inibição (oxacilina), houve inibição de 97,30% ( $\pm 0,70$ ). A CIM do DMSO frente a *S. pyogenes* foi de 8%. Desse modo, nos experimentos realizados neste trabalho, poderia utilizar o DMSO nas concentrações entre 4 e 0,0625%. Para garantir a não interferência do DMSO nos ensaios, preferiu-se utilizar o DMSO na concentração de 1%.

## 9.6.2 Avaliação do efeito antibacteriano das FEHP

### 9.6.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

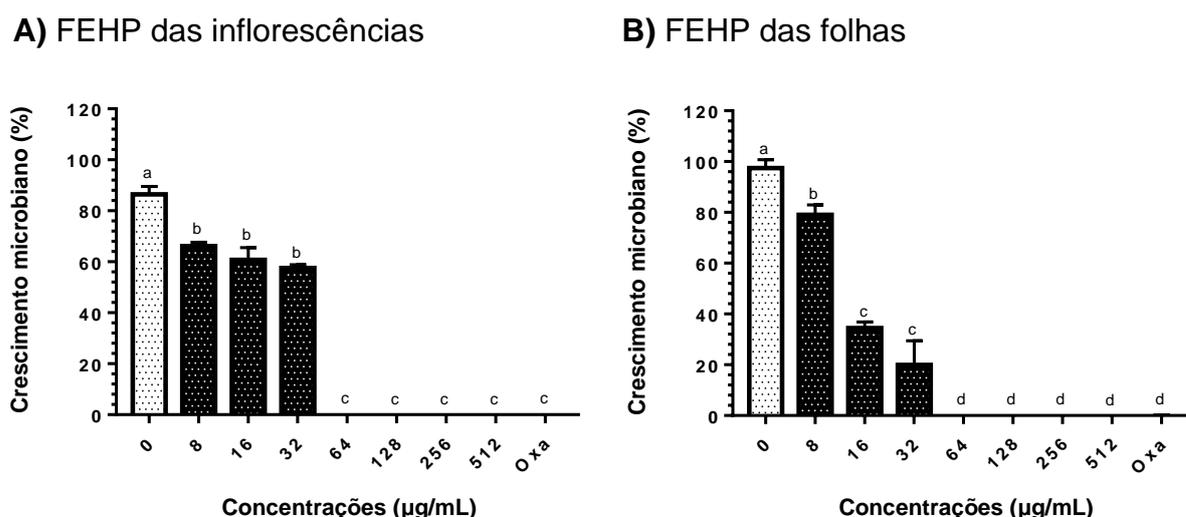
Para determinação da CIM de cada fração testada por meio método de microdiluição em caldo, as FEHP foram diluídas na suspensão bacteriana (v/v), de modo que suas concentrações variassem de 512 (concentração inicial) a 8 µg/mL (concentração final). Os resultados dos ensaios de viabilidade celular para

determinação das CIM foram obtidos por monitoramento de absorbância em leitor de microplacas; e visualmente, acrescido do ensaio de redução da resazurina.

#### 9.6.2.1.1 Viabilidade celular por monitoramento de absorbância

As FEHP inibiram o crescimento microbiano em todas as concentrações avaliadas (Figura 60). Estatisticamente, houve diferença significativa entre as concentrações avaliadas e a suspensão bacteriana (controle negativo de inibição). Nas concentrações de 8, 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$ , a FEHP das inflorescências inibiu o crescimento microbiano em 33,84 ( $\pm 0,88$ ), 39,22 ( $\pm 2,73$ ) e 42,42% ( $\pm 0,74$ ), respectivamente. Nas concentrações de 8, 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$ , a FEHP das folhas inibiu o crescimento microbiano em 29,97 ( $\pm 2,28$ ), 65,55 ( $\pm 1,40$ ) e 80,02% ( $\pm 5,46$ ). As frações apresentaram diferença significativa em comparação com a oxacilina (controle positivo de inibição) nessas concentrações. Nas concentrações de 64, 128, 256 e 512  $\mu\text{g/mL}$ , as FEHP inibiram em 100% o crescimento microbiano, assim como a oxacilina. A CIM de cada fração testada frente a *S. pyogenes* foi de 64  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 60** – Avaliação da CIM das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP) das inflorescências (A) e folhas (B) de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorbância em leitor de microplacas.



**Nota:** O eixo y representa o crescimento microbiano em porcentagem, enquanto o eixo x representa as concentrações das FEHP testadas. Controle positivo de inibição: oxacilina 0,4  $\mu\text{g/mL}$  (Oxa). Controle negativo de inibição: suspensão bacteriana (0). Cada gráfico foi representativo de experimentos realizados em triplicata com aplicação do teste estatístico ANOVA de via única, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras iguais indicam médias estatisticamente equivalentes, letras diferentes indicam médias com diferenças significativas.

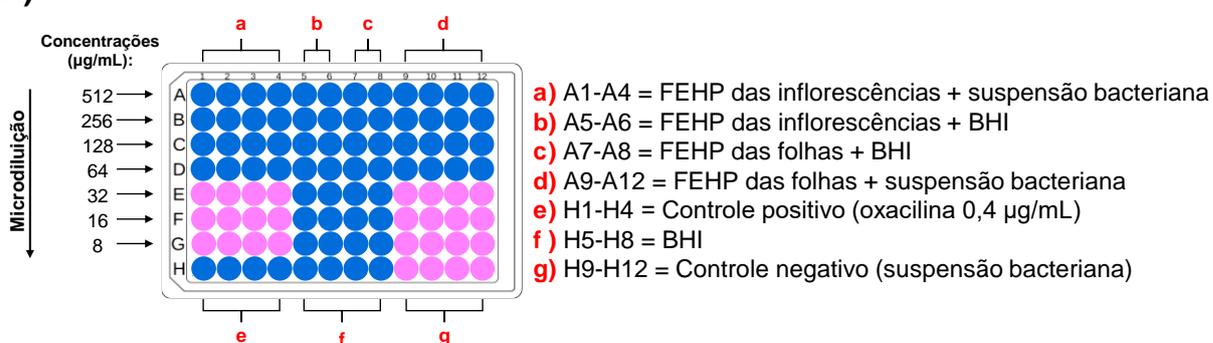
#### 9.6.2.1.2 Viabilidade celular por redução da resazurina

Visualmente, a inibição do crescimento microbiano foi constatada pela ausência de alteração significativa na turbidez do meio, como um resultado a mais, realizou-se o ensaio colorimétrico de redução da resazurina. A determinação da CIM de cada fração foi realizada por meio de adição de uma solução aquosa de resazurina 0,01% (m/v) nas placas de 96 poços.

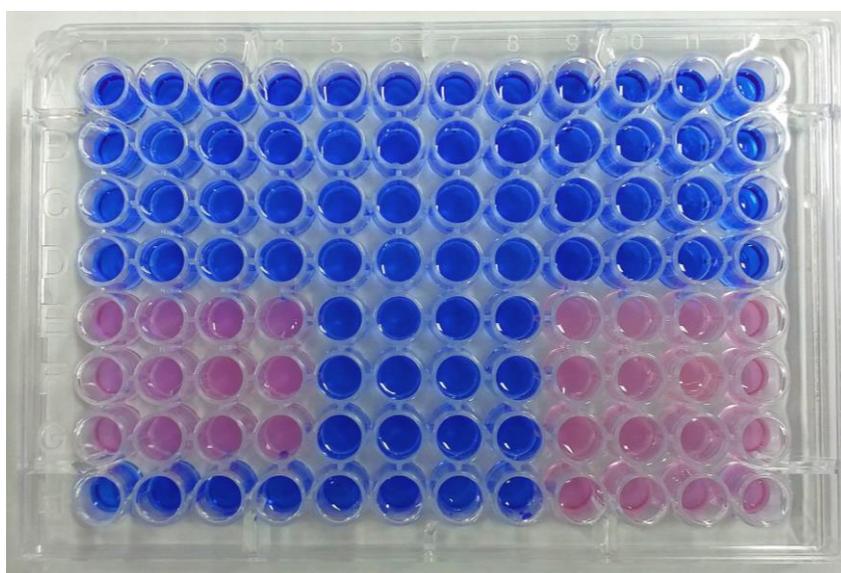
A solução aquosa de resazurina tem coloração azulada ( $\text{pH} \cong 7,0$ ), mas na presença de células viáveis, a resazurina é reduzida à resorufina, tornando a solução cor-de-rosa [151–154]. Como pode ser observado na Figura 61, a avaliação de viabilidade celular, para ambas as frações, revelou que nas concentrações de 8, 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$ , houve mudança de coloração do azul para o rosa, indicando que ocorreu a redução da resazurina à resorufina, portanto, ocorreu crescimento microbiano. Nas concentrações de 64, 128, 256 e 512  $\mu\text{g/mL}$ , não houve mudança de coloração, portanto, ocorreu a inibição significativa de crescimento microbiano. Ao comparar os resultados do ensaio de viabilidade celular por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas, a determinação das CIM por meio de redução da resazurina, também confirmou que a CIM de cada fração testada frente a *S. pyogenes* foi de 64  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 61** – Ilustração (A) e avaliação (B) da CIM das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP) das inflorescências e folhas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por ensaio de redução da resazurina 0,01% (m/v).

**A)**



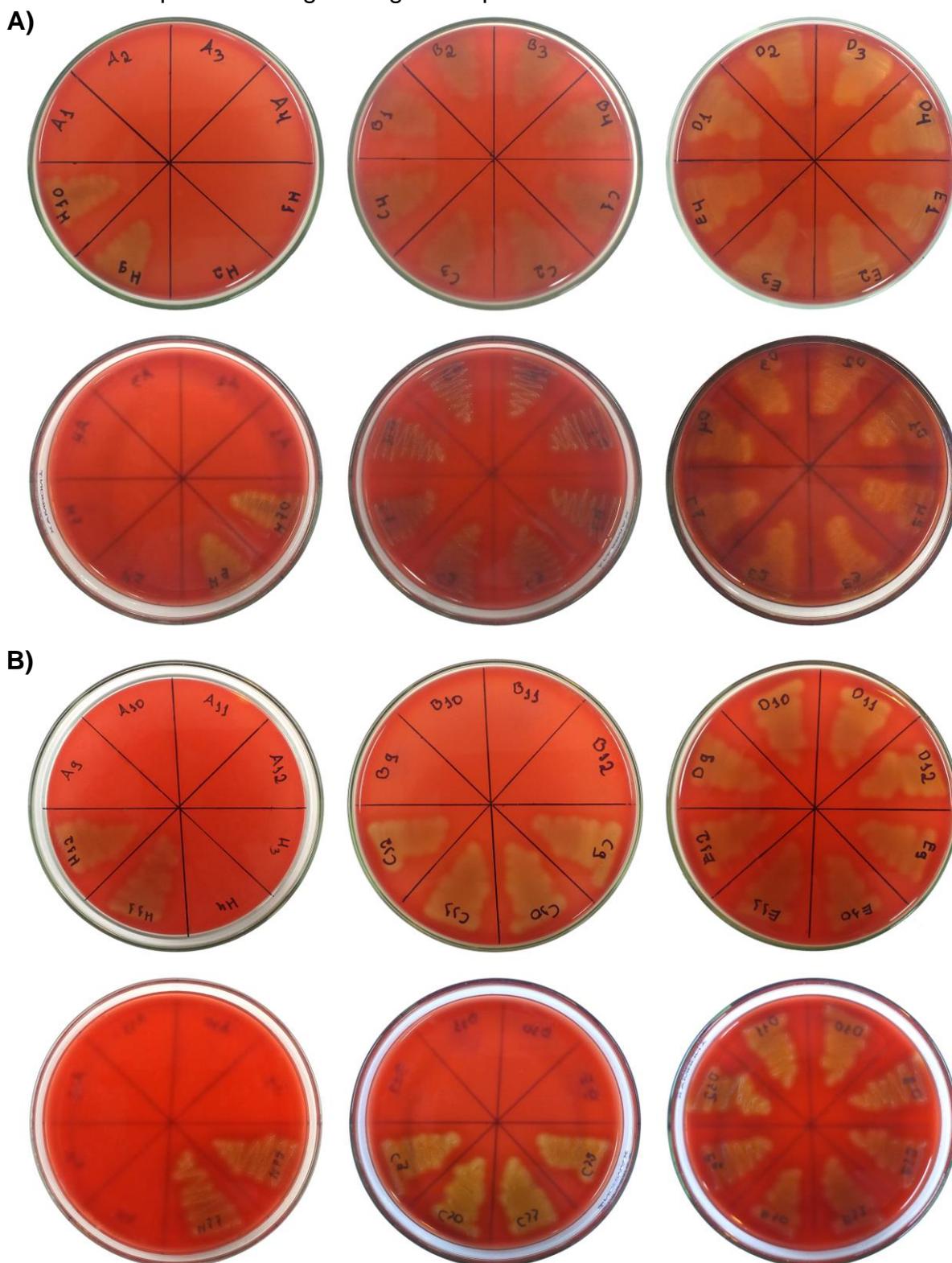
**B)**



#### 9.6.2.2 Concentração bactericida mínima (CBM)

Após os ensaios para determinar as CIM da FEHP das inflorescências e folhas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes*, realizou-se os ensaios para determinação de CBM de cada fração por semeio em placa. Determinou-se as CBM, após a realização de semeio do meio presente nos poços que não foi observado crescimento bacteriano, na superfície do ágar sangue em placas de Petri. A morte do microrganismo foi representada pela não formação de “estrias” na superfície do ágar sangue. Levando em conta que cada fração apresentou CIM de 64 µg/mL, observou-se que a FEHP das inflorescências foi bactericida em 512 µg/mL e a FEHP das folhas foi bactericida em 512 e 256 µg/mL. Conclui-se que as FEHP das inflorescências e folhas apresentaram CBM de 512 (Figura 62A) e 256 µg/mL (Figura 62B), respectivamente.

**Figura 62** – Avaliação da CBM das frações enriquecidas em hyptolido e pectinolidos (FEHP) das inflorescências (A) e folhas (B) de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por semeio na superfície do ágar sangue em placas de Petri.



**Nota:** FEHP das inflorescências (concentrações): 512 (A1-A4), 256 (B1-B4), 128 (C1-C4), 64 (D1-D4) e 32  $\mu\text{g/mL}$  (E1-E4). FEHP das folhas (concentrações): 512 (A9-A12), 256 (B9-B12), 128 (C9-C12), 64 (D9-D12) e 32  $\mu\text{g/mL}$  (E9-E12). Controle positivo de inibição (oxacilina 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ): H1-H4. Controle negativo de inibição (suspensão bacteriana): H9-H12.

Apesar da CIM de 64 µg/mL para ambas as frações, de maneira geral, a FEHP das folhas apresentou maior percentual de inibição frente a *S. pyogenes* em todas as concentrações testadas em comparação com a FEHP das inflorescências, além disso, a FEHP das folhas foi bactericida em concentração menor (256 µg/mL) que a FEHP das inflorescências (512 µg/mL).

### 9.6.3 Avaliação do efeito antibacteriano das substâncias isoladas

De acordo com o que foi observado na revisão sistemática, nenhuma hyptolactona foi avaliada frente a *Streptococcus pyogenes*, o que conferiu ao hyptolido e pectinolidos, o ineditismo frente à espécie.

#### 9.6.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Após avaliação da atividade antibacteriana das FEHP, o hyptolido e os pectinolidos E, G e Q foram avaliados frente a *S. pyogenes*. As concentrações (v/v) testadas variaram de 256 (concentração inicial) a 4 µg/mL (concentração final). Assim como adotado para as FEHP, os resultados dos ensaios de viabilidade celular para determinação de cada CIM foram obtidos por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas; e visualmente, acrescido do ensaio de redução da resazurina.

##### 9.6.3.1.1 Viabilidade celular por monitoramento de absorvância

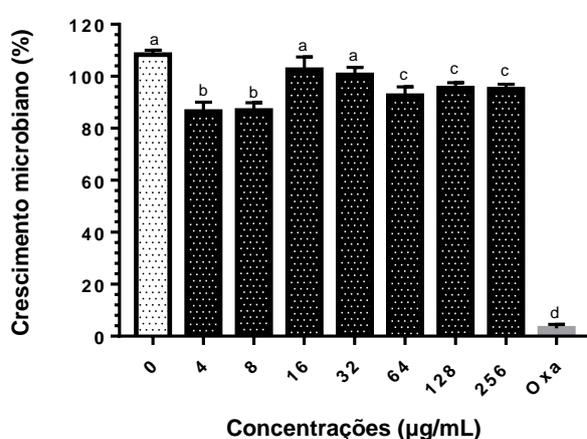
Foi observado crescimento microbiano elevado em todas as concentrações testadas do hyptolido (Figura 63A), portanto, infere-se que a CIM poderia ser obtida utilizando concentrações acima de 256 µg/mL. Nas concentrações com maior percentual da substância, foi observado diminuição do crescimento microbiano em 4,52 (± 1,19) e 4,92% (± 1,09) nas concentrações de 128 e 256 µg/mL, respectivamente. O crescimento microbiano na maioria das concentrações testadas do pectinolido Q também foi elevado (Figura 63B), entretanto, na concentração de 256 µg/mL houve inibição de 42,4% (± 2,17). Desse modo pode-se afirmar que essas hyptolactonas apresentaram fraca atividade antibacteriana.

Diferentemente das substâncias acima, foi possível determinar as CIM dos pectinolidos E e G. Pode-se observar na Figura 63C, que a CIM do pectinolido E foi

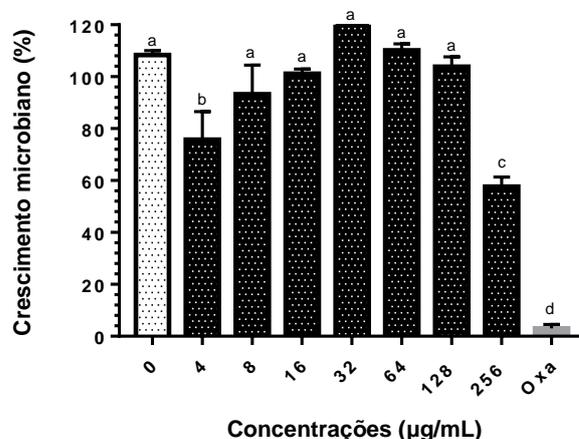
de 256  $\mu\text{g/mL}$  e na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$ , a substância inibiu o crescimento microbiano em 32,11% ( $\pm 4,32$ ). O pectinólido G (Figura 63D) também apresentou CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$ , mas na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$ , houve 100% ( $\pm 2,40$ ) de crescimento microbiano.

**Figura 63** – Avaliação da CIM de hyptolactonas isoladas de *H. pectinata* (A-D) frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas.

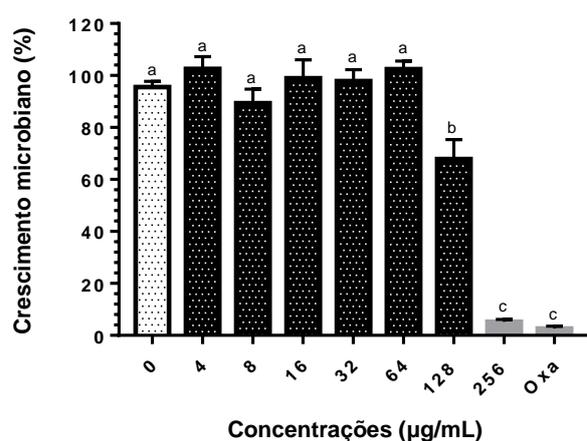
**A) Hyptolido**



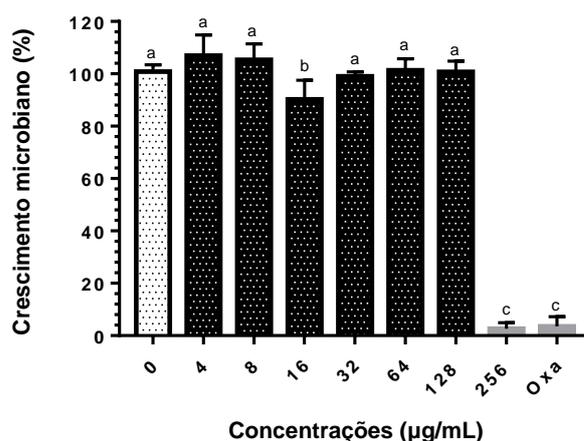
**B) Pectinólido Q**



**C) Pectinólido E**



**D) Pectinólido G**



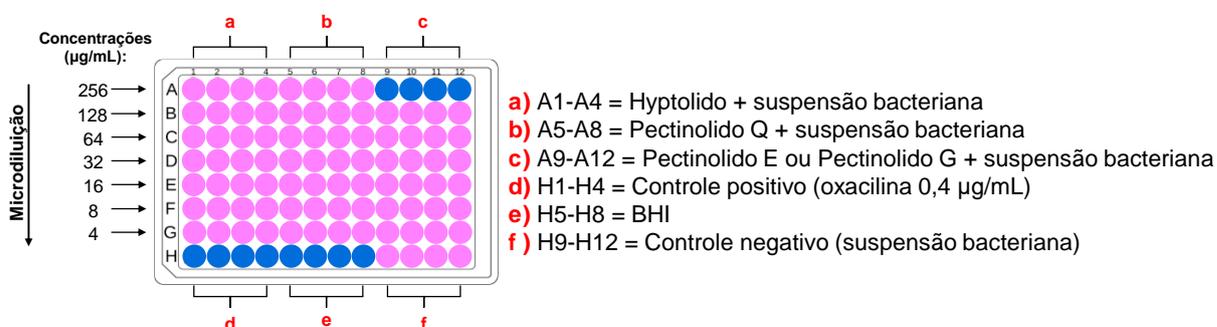
**Nota:** O eixo y representa o crescimento microbiano em porcentagem, enquanto o eixo x representa as concentrações das substâncias testadas. Controle positivo de inibição: oxacilina 0,4  $\mu\text{g/mL}$  (Oxa). Controle negativo de inibição: suspensão bacteriana (0). Cada gráfico foi representativo de experimentos realizados em triplicata com aplicação do teste estatístico ANOVA de via única, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras iguais indicam médias estatisticamente equivalentes, letras diferentes indicam médias com diferenças significativas.

#### 9.6.3.1.2 Viabilidade celular por redução da resazurina

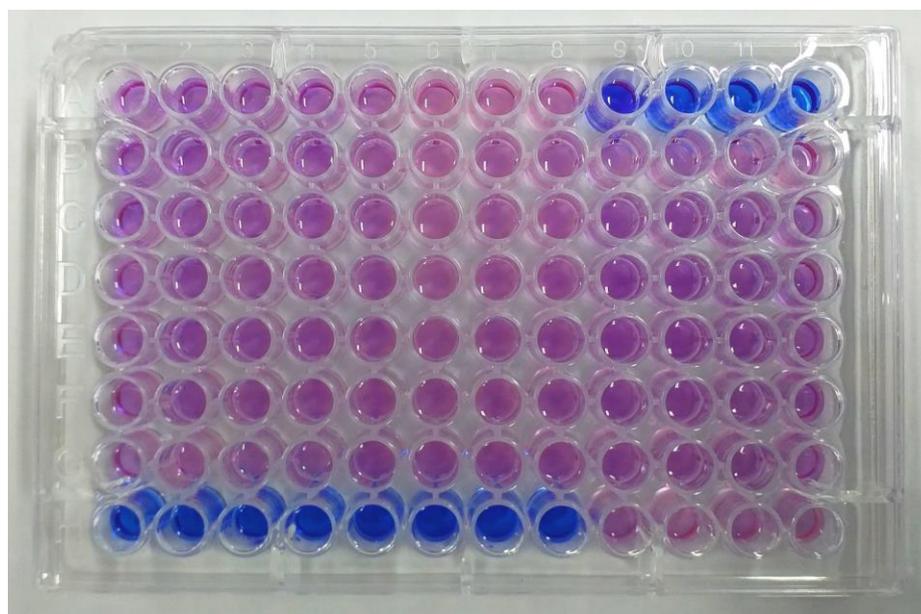
Para o hyptolido e pectinolido Q, a avaliação da viabilidade celular por redução da resazurina, revelou que em todas as concentrações avaliadas (256 a 4 µg/mL), houve mudança de coloração do azul para o rosa, indicando crescimento microbiano. Para os pectinolidos E e G, houve mudança de coloração nas concentrações entre 128 e 4 µg/mL. Essa mudança de coloração, caracterizou a redução da resazurina à resorufina, indicando que também haviam células viáveis, enquanto na concentração de 256 µg/mL, para ambas as substâncias, não houve mudança de coloração, indicando a inibição significativa do crescimento microbiano, como pode ser observado na Figura 64. Ao comparar os resultados do ensaio de viabilidade celular por monitoramento de absorvância em leitor de microplacas, a determinação das CIM por meio de redução da resazurina, também confirmou que as CIM dos pectinolidos E e G frente a *S. pyogenes* foi de 256 µg/mL.

**Figura 64** – Ilustração (A) e avaliação (B) da CIM de hyptolactonas (hyptolido, pectinolidos Q, E e G) isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por meio do método de microdiluição em caldo. Os resultados foram obtidos por ensaio de redução da resazurina 0,01% (m/v).

**A)**



**B)**

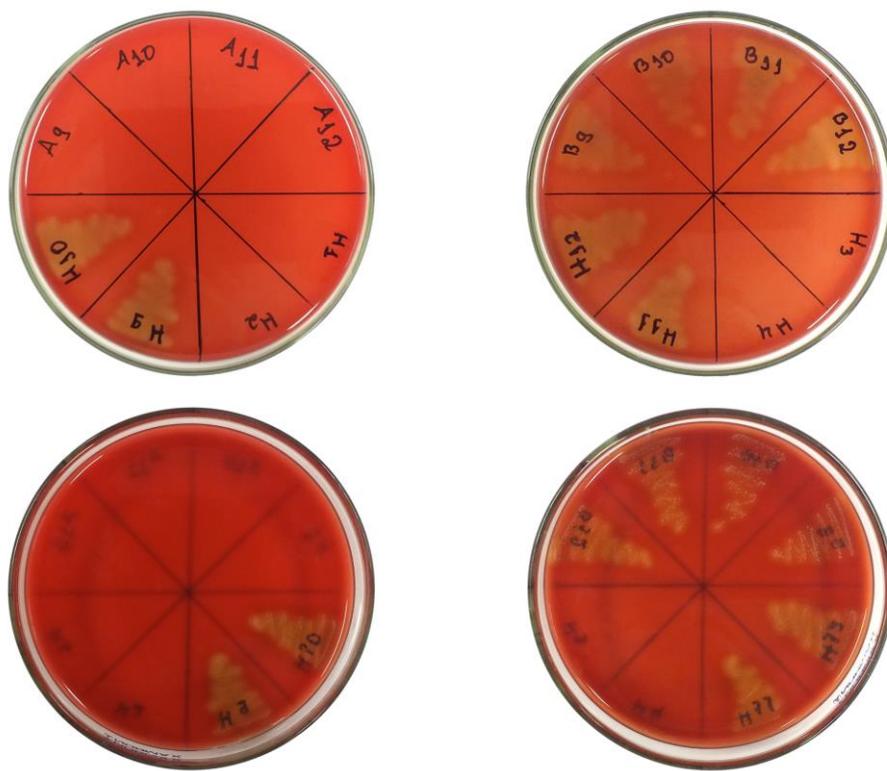


### 9.6.3.2 Concentração bactericida mínima (CBM)

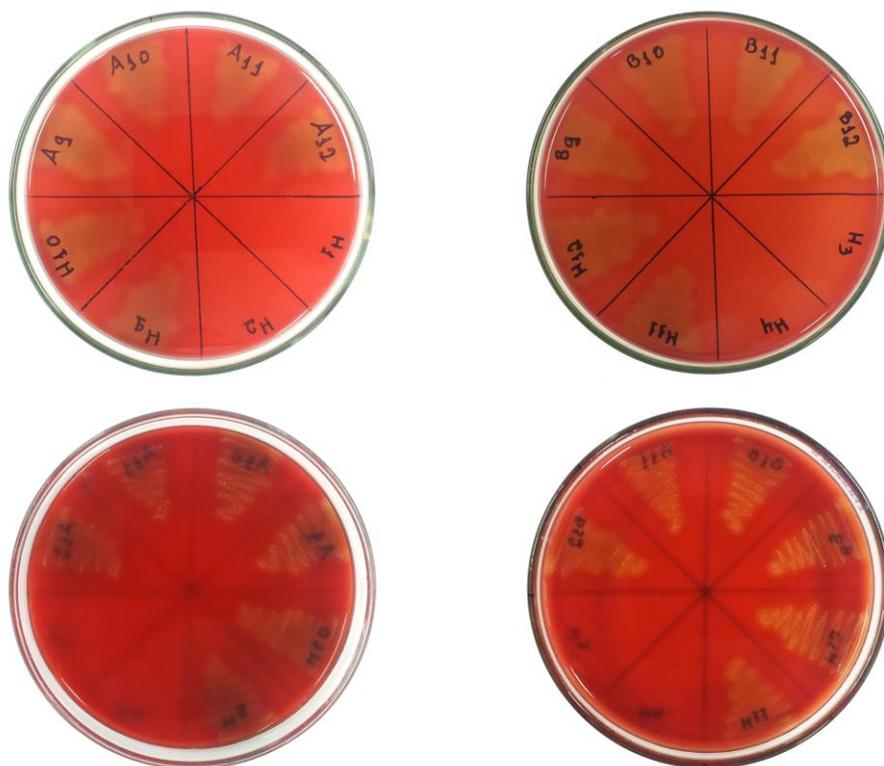
Nos ensaios envolvendo pectinolido E e G, os meios dos poços que não houve crescimento bacteriano foram semeados na superfície do ágar sangue em placas de Petri. As substâncias apresentaram CIM de 256 µg/mL, entretanto, apenas o pectinolido G foi bactericida nessa concentração (Figura 65). Logo, o pectinolido G apresentou CBM de 256 µg/mL.

**Figura 65** – Avaliação da CBM das hyptolactonas: pectinolido G (A) e pectinolido E (B), isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes* por semeio na superfície do ágar sangue em placas de Petri.

A)



B)



**Nota:** Pectinolido G/Pectinolido E (concentrações): 256 (A9-A12) e 128 µg/mL (B9-B12). Controle positivo de inibição (oxacilina 0,4 µg/mL): H1-H4. Controle negativo de inibição (suspensão bacteriana): H9-H12.

Como foi demonstrado anteriormente na Figura 58 (página 197), os pectinólidos G e Q são estereoisômeros com mudança apenas na isomeria *E* e *Z* da ligação entre seus carbonos C-5 e C-1'. Dentre os estereoisômeros, apenas para o pectinólido G (isômero *Z*) foi possível determinar a CIM frente a *S. pyogenes* nas concentrações avaliadas, apesar do pectinólido Q (isômero *E*) ter uma inibição do crescimento microbiano ( $42,4\% \pm 2,17$ ) na concentração de 256 µg/mL. Percebe-se que a forma com que os átomos dessas estruturas químicas estão organizados no espaço, por simples mudança de conformação, influenciou na atividade antibacteriana. Na Tabela 5 são demonstrados os resultados da avaliação da atividade antibacteriana frente a *S. pyogenes*, obtidos neste estudo.

**Tabela 5** – Resultados da avaliação da CIM (microdiluição em caldo) e CBM (semeio em ágar sangue) das frações enriquecidas em hyptólido e pectinólidos (FEHP) e substâncias isoladas de *H. pectinata* frente a *S. pyogenes*.

Analitos	Concentrações (µg/mL)	
	CIM	CBM
<u>FEHP das inflorescências</u>	64	512
↪ Hyptólido	> 256	> 256
↪ Pectinólido G	256	256
↪ Pectinólido Q	> 256	> 256
<u>FEHP das folhas</u>	64	256
↪ Pectinólido E	256	> 256

**Fonte:** Próprio autor.

**Notas:** Controle positivo de inibição: oxacilina 0,4 µg/mL. ↪ Substância(s) obtida(s) da FEHP sobreposta.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que as FEHP, tanto das folhas como das inflorescências, apresentaram potenciais como agentes antibacterianos frente a *S. pyogenes* com CIM de 64 µg/mL. A partir destas frações foram obtidos o hyptólido, pectinólidos G e Q (inflorescências), e o pectinólido E (folhas), entretanto, apenas os pectinólido E e G apresentam-se como agentes antibacterianos, com CIM de 256 µg/mL. Como essas substâncias inibiram o crescimento de *S. pyogenes* em concentrações mais elevadas que as FEHP, podemos supor que em cada fração existem outras substâncias que isoladamente contribuem para a maior atividade antibacteriana ou até mesmo, o efeito sinérgico das substâncias.

## 10 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a PLL, associada aos métodos cromatográficos clássicos (CLC e CCDA) e automatizados (CLAE-UV), foram fundamentais para a obtenção das FEHP das inflorescências e folhas de *H. pectinata*. Apesar da pouca utilização do UV-Vis na elucidação de estruturas químicas, foi possível obter informações a respeito das estruturas químicas das substâncias isoladas a partir dos espectros de absorção de UV, associados aos cromatogramas. As FEHP foram submetidas ao isolamento de metabólitos secundários da classe das hyptolactonas por CLAE em modo semipreparativo, que apesar da perda de resolução por alargamento dos picos cromatográficos, foi possível isolar as substâncias de interesse: hyptolido, pectinolidos E e G, e a inédita, pectinolido Q. As FEHP e as substâncias isoladas foram avaliadas frente a *S. pyogenes*, sendo a primeira vez que as substâncias das classes das hyptolactonas têm seus efeitos antimicrobianos avaliados frente a essa espécie. As FEHP e duas das hyptolactonas isoladas (pectinolido E e G) inibiram o crescimento de *S. pyogenes* em baixas concentrações. Além disso, as FEHP e o pectinolido G foram bactericidas em baixas concentrações, o que torna essas frações e substâncias, potenciais agentes antimicrobianos. As evidências geradas neste estudo, aliadas aos resultados existentes de efeito antitumoral e antibacteriano dessas substâncias e de outras hyptolactonas bioativas presentes na revisão sistemática, possibilitam ao hyptolido e os pectinolidos uma maior ampliação de suas potencialidades, havendo chances a se tornarem protótipos a fármacos que devem ser comprovadas a partir de novos estudos.

## REFERÊNCIAS

- [1] Somro A, Akram M, Ibrahim Khan M, Asif HM, Sami A, Ali Shah SM, *et al.* Pharyngitis and sore throat: a review. *African J Biotechnol* 2011;10:6190–7. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2663>.
- [2] Wiesner PJ, Tronca E, Bonin P, Pedersen AHB, Holmes KK. Clinical spectrum of pharyngeal gonococcal infection. *N Engl J Med* 1973;288:181–5. <https://doi.org/10.1056/NEJM197301252880404>.
- [3] Strömberg A, Schwan A, Cars O. Throat carrier rates of beta-hemolytic streptococci among healthy adults and children. *Scand J Infect Dis* 1988;20:411–7. <https://doi.org/10.3109/00365548809032477>.
- [4] dos Santos VP. Estreptococcias. *J Pediatría* 1999;75:103–14. <https://doi.org/10.2223/JPED.377>.
- [5] de Carvalho HT, Fioretto JR, Ribeiro CF, Laraia IO, Carpi MF. Diagnosis and treatment of streptococcal toxic shock syndrome in the pediatric intensive care unit: case report. *Rev Bras Ter Intensiva* 2019;31:586–91. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190068>.
- [6] Tanaka II, Iwamoto AH, Person OC. Amigdalite aguda letal causada por *Streptococcus pyogenes*. *O Mundo da Saúde* 2009;33:114–7. <https://doi.org/10.15343/0104-7809.200933.1.16>.
- [7] Scalabrin R, Buss GD, Iamaguchi KCS, Cardoso CL, Garcia LB. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003;69:814–8. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992003000600014>.
- [8] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:470–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.470>.
- [9] Pereda-Miranda R, Hernández L, Villavicencio MJ, Novelo M, Ibarra P, Chai H, *et al.* Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *J Nat Prod* 1993;56:583–93. <https://doi.org/10.1021/np50094a019>.
- [10] Machado FL da S, Kaiser CR, Costa SS, Gestinari LM, Soares AR. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev Bras Farmacogn* 2010;20:441–52. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300024>.
- [11] Stamp N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q Rev Biol* 2003;78:23–55. <https://doi.org/10.1086/367580>.
- [12] The NCBI taxonomy database. *Mesosphaerum pectinatum*; 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=986232>. Acesso em: 24 fev. 2022.
- [13] Malan K, Pelissier Y, Marion C, Blaise A, Bessiere JM. The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Med* 1988;54:531–2. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962540>.

- [14] Bispo MD, Mourão RHV, Franzotti EM, Bomfim KBR, Arrigoni-Blank M de F, Moreno MPN, *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2001;76:81–6. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00172-6).
- [15] Raymundo LJRP, Guilhon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti SCH, *et al.* Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *J Ethnopharmacol* 2011;134:725–32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.027>.
- [16] Santana FR, Luna-Dulcey L, Antunes VU, Tormena CF, Cominetti MR, Duarte MC, *et al.* Evaluation of the cytotoxicity on breast cancer cell of extracts and compounds isolated from *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Nat Prod Res* 2019;34:102–9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1628747>.
- [17] Boalino DM, Connolly JD, McLean S, Reynolds WF, Tinto WF.  $\alpha$ -Pyrone and a 2(5*H*)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry* 2003;64:1303–7. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.017>.
- [18] Fragoso-Serrano M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med* 2005;71:278–80. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837831>.
- [19] Martínez-Fructuoso L, Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Fragoso-Serrano M, Cerda-García-Rojas CM, da Silva AS, *et al.* Structure elucidation, conformation, and configuration of cytotoxic 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones from *Hyptis* species and their molecular docking to  $\alpha$ -tubulin. *J Nat Prod* 2019;82:520–31. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00908>.
- [20] Martínez-Fructuoso L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, da Silva AS, Leitão SG. Dihydro-furanones from *Hyptis* species: chemical correlations and DFT-NMR/ECD calculations for stereochemical assignments. *Phytochemistry* 2020;179:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112481>.
- [21] Davies-Coleman MT, Rivett DEA. Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones;1989:1–35. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9002-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9002-9_1).
- [22] Gao H, Li G, Peng XP, Lou HX. Fupyrone A and B, two new  $\alpha$ -pyrones from an endophytic fungus, *Fusarium* sp. F20. *Nat Prod Res* 2020;34:335–40. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1531405>.
- [23] Guo ZY, Lu LW, Bao SS, Liu CX, Deng ZS, Cao F, *et al.* Xylariaopyrones A–D, four new antimicrobial  $\alpha$ -pyrone derivatives from endophytic fungus *Xylariales* sp. *Phytochem Lett* 2018;28:98–103. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.09.014>.
- [24] Zhao T, Xu LL, Zhang Y, Lin ZH, Xia T, Yang DF, *et al.* Three new  $\alpha$ -pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Penicillium ochrochloronthe* and their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. *J Asian Nat Prod Res* 2019;21:851–8. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1495197>.
- [25] Birch AJ, Butler DN. The structure of hyptolide. *J Chem Soc* 1964:4167–8. <https://doi.org/10.1039/jr9640004167>.

- [26] Achmad S, Høyer T, Kjær A, Makmur L, Norrestam R. Molecular and crystal structure of hyptolide, a naturally occurring  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone. *Acta Chem Scand* 1987;41b:599–609. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.41b-0599>.
- [27] Usui T, Watanabe H, Nakayama H, Tada Y, Kanoh N, Kondoh M, *et al.* The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of  $\alpha$ -tubulin. *Chem Biol* 2004;11:799–806. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.028>.
- [28] Yang J, Wang Y, Wang T, Jiang J, Botting CH, Liu H, *et al.* Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of  $\alpha$ -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 2016;7:1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms12103>.
- [29] Prota AE, Setter J, Waight AB, Bargsten K, Murga J, Diaz JF, *et al.* Pironetin binds covalently to  $\alpha$ Cys316 and perturbs a major loop and helix of  $\alpha$ -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol* 2016;428:2981–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.023>.
- [30] Mendoza-Espinoza JA, López-Vallejo F, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R, Cerda-García-Rojas CM. Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of hypurticin, a highly flexible polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one. *J Nat Prod* 2009;72:700–8. <https://doi.org/10.1021/np800447k>.
- [31] Bambang C, Meiny S, Nur Dina A, Wahyudi W, Damar Nurwahyu B. Synthesis and antibacterial activity of epoxide from hyptolide (*Hyptis pectinata* (L.) Poit) against gram-positive and gram-negative bacteria. *J Appl Pharm Sci* 2020;10:13-22. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.101202>.
- [32] Kobayashi S, Tsuchiya K, Harada T, Nishide M, Kurokawa T, Nakagawa T, *et al.* Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK 10958. I. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1994;47:697–702. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.697>.
- [33] Kobayashi S, Tsuchiya K, Kurokawa T, Nakagawa T, Shimada N, Iitaka Y. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. II. Structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* 1994;47:703–7. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.703>.
- [34] Yasui K, Tamura Y, Nakatani T, Horibe I, Kawada K, Koizumi K, *et al.* Chemical modification of PA-48153C, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces prunicolor* PA-48153. *J Antibiot (Tokyo)* 1996;49:173–80. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.173>.
- [35] Yoshida M, Matsui Y, Ikarashi Y, Usui T, Osada H, Wakasugi H. Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res* 2007;27:729–36.
- [36] Clayden J, Greeves N, Warren S. *Organic Chemistry*. Oxford, England: Oxford University Press; 2012:508.
- [37] Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting

- systematic reviews. *BMJ* 2021;1-9. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.
- [38] Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;1-36. <https://doi.org/10.1136/bmj.n160>.
- [39] Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, *et al.* Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. *N Engl J Med* 1996;335:547–54. <https://doi.org/10.1056/NEJM199608223350803>.
- [40] Atik FA, Dias AR, Pomerantzeff PMA, Barbero-Marcial M, Stolf NAG, Jatene AD. Immediate and long term evolution of valve replacement in children less than 12 years old. *Arq Bras Cardiol* 1999;73: 424-8. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X1999001100002>.
- [41] Machado OVO, Patrocínio MCA, Medeiros MS, Bandeira T de JPG. Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas. Fortaleza - CE, Brasil: EdUnichristus; 2019:16-21.
- [42] Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Plantas medicinais e fitoterápicos. 4ed. São Paulo: Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos; 2019:12-14.
- [43] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 1-34. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf). Acesso em: 24 fev. 2022.
- [44] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 1-63. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html). Acesso em: 24 fev. 2022.
- [45] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 1-19. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/int0005\\_11\\_12\\_2008.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/int0005_11_12_2008.html). Acesso em: 24 fev. 2022.
- [46] Filho VC, Zanchett CCC. Fitoterapia avançada: uma abordagem química, biológica e nutricional. 1ed. Porto Alegre - RS, Brasil: Artmed Editora; 2020: 16-18.
- [47] Couto HGS de A, Barbosa AAT, Nizio DA de C, Nogueira PC de L, Arrigoni-Blank M de F, Pinto JAO, *et al.* Antibacterial activity of *Lippia alba*, *Myrcia lundiana* and *Ocimum basilicum* essential oils against six food-spoiling pathogenic microorganisms. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat* 2021;20:260–9. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.20>.
- [48] Nascimento P, Alviano W, Nascimento A, Santos P, Arrigoni-Blank M, de Jesus R, *et al.* *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-

- Streptococcus mutans* activity. Oral Dis 2008;14:485–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x>.
- [49] Raja RR. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. Res J Med Plant 2012;6:203–13.  
<https://doi.org/10.3923/rjmp.2012.203.213>.
- [50] Falcão DQ, Boylan F. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Rev Bras Farm 2003;84:69–74.
- [51] Bridi H, Meirelles G de C, von Poser GL. Subtribe Hyptidinae (Lamiaceae): a promising source of bioactive metabolites. J Ethnopharmacol 2021;264:1-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113225>.
- [52] Panahi Y, Taghizadeh M, Marzony ET, Sahebkar A. Rosemary oil vs minoxidil 2% for the treatment of androgenetic alopecia: a randomized comparative trial. Skinmed 2015;13:15–21.
- [53] Harley RM. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. Rodriguésia 2012;63:129–44.  
<https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100010>.
- [54] Harley RM. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. (Labiatae) and its allies. Bot J Linn Soc 1988;98:87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1988.tb01697.x>.
- [55] Harley F, Santos EP, Santos JS, Pastore JFRF. Lamiaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. Jard Botânico do Rio Janeiro; 2015.  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8183>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- [56] Alonso-Castro AJ, Maldonado-Miranda JJ, Zarate-Martinez A, Jacobo-Salcedo MDR, Fernández-Galicia C, Figueroa-Zuñiga LA, *et al.* Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. J Ethnopharmacol 2012;143:292–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.035>.
- [57] Heinrich M, Rimpler H, Barrera NA. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. J Ethnopharmacol 1992;36:63–80.  
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90062-V](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90062-V).
- [58] Barbosa PPP, Ramos CP. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. Phyther Res 1992;6:114–5.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.2650060214>.
- [59] Barbosa CV, Aquino PGV, Ribeiro-Júnior KAL, Moura FBP, Alexandre-Moreira MS, Sant’Ana AEG, *et al.* Cytotoxic and antitumor activities of *Hyptis pectinata* (sambacaitá) extract. Pharmacologyonline 2012;3:70–4.
- [60] Falcao RA, do Nascimento PLA, de Souza SA, da Silva TMG, de Queiroz AC, da Matta CBB, *et al.* Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Evidence-Based Complement Altern Med 2013;2013:1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/460613>.
- [61] de Queiroz AC, Dias T de LMF, da Matta CBB, Silva LHAC, de Araújo-Júnior

- JX, de Araújo GB, *et al.* Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in Northeastern Brazil. Evidence-Based Complement Altern Med 2014;2014:1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/478290>.
- [62] Suzery M, Cahyono B, Amalina ND. Antiproliferative and apoptosis effect of hyptolide from *Hyptis pectinata* (L.) Poit on human breast cancer cells. J Appl Pharm Sci 2020;10:1–6. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.102001>.
- [63] Martínez M. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México; 1989:1-508.
- [64] Santos PO, Costa M de JC, Alves JAB, Nascimento PFC, de Melo DLFM, Barbosa Jr. AM, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Quim Nova 2008;31:1648–52. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700009>.
- [65] Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol 1992;35:275–83. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90025-M](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90025-M).
- [66] Gorter K. Hyptolide, a bitter principle of *Hyptis pectinata*, Poit. Bull du Jard Bot Buitenzorg 1920;1:327–37.
- [67] Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1027–31. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.
- [68] Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2005;100:80–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>.
- [69] Suffness M. Assays related to cancer drug discovery. Methods plant Biochem assays bioactivity 1990;6:71–133.
- [70] Lu GH, Wang FP, Pezzuto JM, Tam TCM, Williams ID, Che CT. 10-*epi*-Olguine from *Rabdosia ternifolia*. J Nat Prod 1997;60:425–7. <https://doi.org/10.1021/np960689e>.
- [71] Carmona D, Sáez J, Granados H, Pérez E, Blair S, Angulo A, *et al.* Antiprotozoal 6-substituted-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Raimondia* cf. *Monoica*. Nat Prod Res 2003;17:275–80. <https://doi.org/10.1080/1057563031000065062>.
- [72] Priestap HA, Bonafede JD, Rúveda EA. Argentilactone, a novel 5-hydroxyacid lactone from *Aristolochia argentina*. Phytochemistry 1977;16:1579–82. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)84027-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)84027-2).
- [73] Drewes SE, Sehlapelo BM, Horn MM, Scott-Shaw R, Sandor P. 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones and two bicyclic tetrahydro- $\alpha$ -pyrone derivatives from *Cryptocarya latifolia*. Phytochemistry 1995;38:1427–30. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00828-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00828-H).
- [74] Ludere MT, van Ree T, Vleggaar R. Isolation and relative stereochemistry of lippialactone, a new antimalarial compound from *Lippia javanica*. Fitoterapia

- 2013;86:188–92. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.03.009>.
- [75] Koshino H, Yoshihara T, Okuno M, Sakamura S, Tajimi A, Shimanuki T. Gamahonolides A, B, and gamahorin, novel antifungal compounds from stromata of *Epichloë typhina* on *Phleum pratense*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992;56:1096–9. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1096>.
- [76] de Vivar AR, Vidales P, Pérez AL. An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. *Phytochemistry* 1991;30:2417–8. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83668-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83668-B).
- [77] Prado RS, Bailão AM, Silva LC, de Oliveira CMA, Marques MF, Silva LP, *et al.* Proteomic profile response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal argentilactone. *Front Microbiol* 2015;6:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00616>.
- [78] Pereda-Miranda R, García M, Delgado G. Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* 1990;29:2971–4. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)87117-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)87117-D).
- [79] Yang WW, Lu LW, Zhang XQ, Bao SS, Cao F, Guo ZY, *et al.* Xylariaopyrones E–I, five new  $\alpha$ -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Xylariales* sp. (HM-1). *Nat Prod Res* 2020:1–9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1826480>.
- [80] Peters M, Godfrey C, McInerney P, Soares CB, Khalil H, Parker D. Methodology for JBI scoping reviews. *Joanna Briggs Inst. Rev. Man.* 2015, Joanna Briggs Institute 2015:1–24.
- [81] Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 2016;5:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.
- [82] Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 2014;14:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
- [83] Higgins JPT, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD, *et al.* The Cochrane Collaboration’s tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* 2011;343:1–9. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5928>.
- [84] Cohen J. A Coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960;20:37–46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>.
- [85] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159–74. <https://doi.org/10.2307/2529310>.
- [86] McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica* 2012:276–82. <https://doi.org/10.11613/BM.2012.031>.
- [87] da Silva AS, Martínez-Fructuoso L, Simas RC, Leitão GG, Fragoso-Serrano M, Barros YS, *et al.* Distribution of 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones by electrospray ionization ion trap mass spectrometry in different aerial parts of *Hyptis monticola*. *Phytochemistry* 2021;185:1–8.

- <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112706>.
- [88] Davies-Coleman MT, English RB, Rivett DEA. Synrotolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Syncolostemon rotundifolius*. *Phytochemistry* 1987;26:1497–9. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81843-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81843-9).
- [89] Almtorp GT, Hazell AC, Torssell KBG. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* 1991;30:2753–6. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85137-O](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85137-O).
- [90] Davies-Coleman MT, Rivett DEA. An  $\alpha$ -pyrone from *Syncolostemon densiflorus*. *Phytochemistry* 1994;35:1590–2. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86901-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86901-0).
- [91] Davies-Coleman MT, Rivett DEA. Structure of the 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone, umuravumbolide. *Phytochemistry* 1995;38:791–2. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)93874-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)93874-F).
- [92] Drewes SE, Horn MM, Wijewardene CS.  $\alpha$ -Pyrone from *Cryptocarya latifolia*—A structural isomer of umuravumbolide. *Phytochemistry* 1996;41:333–4. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)81093-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)81093-4).
- [93] Davies-Coleman MT, Rivett DEA. 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Syncolostemon parviflorus*. *Phytochemistry* 1996;41:1085–92. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00703-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00703-2).
- [94] Collett LA, Davies-Coleman MT, Rivett DEA. 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Syncolostemon argenteus*. *Phytochemistry* 1998;48:651–6. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01075-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01075-3).
- [95] Suárez-Ortiz GA, Cerda-García-Rojas CM, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R. Complementarity of DFT calculations, NMR anisotropy, and ECD for the configurational analysis of brevipolides K-O from *Hyptis brevipes*. *J Nat Prod* 2017;80:181–9. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00953>.
- [96] Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Cerda-García-Rojas CM, Davies-Coleman MT, Rivett DEA. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* 2001;57:47–53. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00987-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00987-X).
- [97] de Oliveira CMA, Silva M do RR, Kato L, da Silva CC, Ferreira HD, Souza LKH. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). *J Braz Chem Soc* 2004;15:756–9. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000500023>.
- [98] Deng Y, Balunas MJ, Kim JA, Lantvit DD, Chin YW, Chai H, *et al.* Bioactive 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. *J Nat Prod* 2009;72:1165–9. <https://doi.org/10.1021/np9001724>.
- [99] Suárez-Ortiz GA, Cerda-García-Rojas CM, Hernández-Rojas A, Pereda-Miranda R. Absolute configuration and conformational analysis of brevipolides, bioactive 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis brevipes*. *J Nat Prod* 2013;76:72–8. <https://doi.org/10.1021/np300740h>.

- [100] Costa VC de O, Tavares JF, Silva AB, Duarte MC, Agra M de F, Barbosa-Filho JM, *et al.* Hyptenolide, a new  $\alpha$ -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochem Lett* 2014;8:32–7. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.01.009>.
- [101] Rahman MM, Gibbons S. Antibacterial constituents of *Neohyptis paniculata*. *Fitoterapia* 2015;105:269–72. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.012>.
- [102] de Fátima Â, Marquissolo C, de Albuquerque S, Carraro-Abrahão AA, Pilli RA. Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 2006;41:1210–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.05.010>.
- [103] Yamauchi S, Isozaki Y, Nishimura H, Tsuda T, Nishiwaki H, Shuto Y. Total Syntheses of (–)- and (+)-boronolide and their plant growth-inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012;76:1708–14. <https://doi.org/10.1271/bbb.120317>.
- [104] Sheng YH, Leu WJ, Chen CN, Hsu JL, Liu YT, Hsu LC, *et al.* The (+)-brevipolide H displays anticancer activity against human castration-resistant prostate cancer: the role of oxidative stress and Akt/mTOR/p70S6K-Dependent pathways in G1 checkpoint arrest and apoptosis. *Molecules* 2020;25:1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules25122929>.
- [105] Saeed M, Ilg T, Schick M, Abbas M, Voelter W. Total synthesis and anti-leishmanial activity of *R*-(–)-argentilactone. *Tetrahedron Lett* 2001;42:7401–3. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01559-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01559-3).
- [106] Falomir E, Murga J, Ruiz P, Carda M, Marco JA, Pereda-Miranda R, *et al.* Stereoselective synthesis and determination of the cytotoxic properties of spicigerolide and three of its stereoisomers. *J Org Chem* 2003;68:5672–6. <https://doi.org/10.1021/jo034470y>.
- [107] de Fatima Â, Kohn LK, Antônio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. Enantioselective syntheses of (*R*)- and (*S*)-argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* 2004;12:5437–42. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.044>.
- [108] Sabitha G, Reddy DV, Reddy SSS, Yadav JS, Kumar CG, Sujitha P. Total synthesis of desacetylumuravumbolide, umuravumbolide and their biological evaluation. *RSC Adv* 2012;2:7241–7. <https://doi.org/10.1039/c2ra20830j>.
- [109] Sabitha G, Rao AS, Sandeep A, Latha BM, Reddy DV. Total synthesis of (–)-synrotolide and the evaluation of its antiproliferative activity. *Tetrahedron: Asymmetry* 2014;25:856–9. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2014.04.010>.
- [110] Priestap HA, van Baren CM, Lira PDL, Coussio JD, Bandoni AL. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* 2003;63:221–5. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00751-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00751-3).
- [111] Alemany A, Márquez C, Pascual C, Valverde S, Martínez-Ripoll M, Fayos J, *et al.* New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. *Tetrahedron Lett* 1979;20:3583–6. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95469-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95469-3).

- [112] Alemany A, Márquez C, Pascual C, Valverde S, Perales A, Fayos J, *et al.* New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of olguine. *Tetrahedron Lett* 1979;20:3579–82. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95468-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95468-1).
- [113] Puyvelde LV, Dube S, Uwimana E, Uwera C, Dommissie RA, Esmans EL, *et al.* New  $\alpha$ -pyrones from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* 1979;18:1215–8. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80138-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80138-7).
- [114] Puyvelde LV, de Kimpe N, Dubé S, Chagnon-Dubé M, Boily Y, Borremans F, *et al.* 1',2'-Dideacetylboronolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* 1981;20:2753–5. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85280-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85280-6).
- [115] Davies-Coleman MT, Rivett DEA. Stereochemical studies on boronolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Tetradenia barberae*. *Phytochemistry* 1987;26:3047–50. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84590-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84590-2).
- [116] Aycard JP, Kini F, Kam B, Gaydou EM, Faure R. Isolation and identification of spicigera lactone: complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments using two-dimensional NMR experiments. *J Nat Prod* 1993;56:1171–3. <https://doi.org/10.1021/np50097a024>.
- [117] Waechter A, Ferreira M, Fournet A, de Arias A, Nakayama H, Torres S, *et al.* Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argentilactone isolated from *Annona haematantha*. *Planta Med* 1997;63:433–5. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957728>.
- [118] Hegde VR, Pu H, Patel M, Das PR, Strizki J, Gullo VP, *et al.* Three new compounds from the plant *Lippia alva* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5). *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:5339–42. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.021>.
- [119] Araújo FS, Coelho LM, Silva L do C, Neto BR da S, Parente-Rocha JA, Bailão AM, *et al.* Effects of argentilactone on the transcriptional profile, cell wall and oxidative stress of *Paracoccidioides* spp. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004309>.
- [120] Silva L do C, Tauhata SBF, Baeza LC, de Oliveira CMA, Kato L, Borges CL, *et al.* Argentilactone molecular targets in *Paracoccidioides brasiliensis* identified by chemoproteomics. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:1–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.00737-18>.
- [121] do Prado RS, Alves RJ, de Oliveira CMA, Kato L, da Silva RA, Quintino GO, *et al.* Inhibition of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 Isocitrate Lyase by the natural compound argentilactone and its semi-synthetic derivatives. *PLoS One* 2014;9:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094832>.
- [122] Bouzbouz S, de Lemos E, Cossy J, Saez J, Franck X, Figadère B. Natural (5'-oxoheptene-1'E,3'E-dienyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one: total synthesis and revision of its absolute configuration. *Tetrahedron Lett* 2004;45:2615–7. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.143>.
- [123] Collett LA, Davies-Coleman MT, Rivett DEA, Drewes SE, Horn MM. Absolute configuration of  $\alpha$ -pyrones from *Cryptocarya latifolia* and *Syncolostemon*

- densiflorus*. *Phytochemistry* 1997;44:935–8. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00643-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00643-7).
- [124] Muhlhausler BS, Bloomfield FH, Gillman MW. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials. *PLoS Biol* 2013;11:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001481>.
- [125] Kilkeny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, *et al.* Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One* 2009;4:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007824>.
- [126] Sears JE, Boger DL. Total synthesis of vinblastine, related natural products, and key analogues and development of inspired methodology suitable for the systematic study of their structure–function properties. *Acc Chem Res* 2015;48:653–62. <https://doi.org/10.1021/ar500400w>.
- [127] Chandrasekhar M, Chandra KL, Singh VK. Total synthesis of (+)-boronolide, (+)-deacetylboronolide, and (+)-dideacetylboronolide. *J Org Chem* 2003;68:4039–45. <https://doi.org/10.1021/jo0269058>.
- [128] Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1201–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000794>.
- [129] Krishna PR, Nomula R, Kunde R. First total synthesis of lippialactone and its C9 epimer. *Synthesis (Stuttg)* 2013;46:307–12. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340314>.
- [130] García-Fortanet J, Murga J, Carda M, Marco Ventura JA. Stereoselective synthesis of the published structure of synargentolide A and of one of its stereoisomers. *Arkivoc* 2005:175–88. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.0006.918>.
- [131] Prasad KR, Gutala P. Total synthesis and determination of the absolute configuration of 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone natural product synargentolide B. *J Org Chem* 2013;78:3313–22. <https://doi.org/10.1021/jo400083v>.
- [132] Bañuelos-Hernández AE, Mendoza-Espinoza JA, Pereda-Miranda R, Cerda-García-Rojas CM. Studies of (–)-pironetin binding to  $\alpha$ -tubulin: conformation, docking, and molecular dynamics. *J Org Chem* 2014;79:3752–64. <https://doi.org/10.1021/jo500420j>.
- [133] Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JTM, Fojo T, *et al.* Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant  $\beta$ -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 1997;272:17118–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17118>.
- [134] Kaiser CR. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Quim Nova* 2000;23:231–6. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000200014>.
- [135] Kan Y, Fujita T, Sakamoto B, Hokama Y, Nagai H. Kahalalide K: a new cyclic

- depsipeptide from the hawaiian green alga *Bryopsis* species. *J Nat Prod* 1999;62:1169–72. <https://doi.org/10.1021/np990053y>.
- [136] Kapur GS, Chopra A, Sarpal AS. Estimation of total aromatic content of Vacuum Gas Oil (VGO) fractions (370–560 °C) by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Energy & Fuels* 2005;19:1065–71. <https://doi.org/10.1021/ef040069i>.
- [137] Gangadhar KN, Rodrigues MJ, Pereira H, Gaspar H, Malcata FX, Barreira L, *et al.* Anti-hepatocellular carcinoma (HepG2) activities of monoterpene hydroxy lactones isolated from the marine microalga *Tisochrysis Lutea*. *Mar Drugs* 2020;18:1–10. <https://doi.org/10.3390/md18110567>.
- [138] Santos O, Weckx LLM, Pignatari ACC, Pignatari SSN. Detection of group A beta-hemolytic *Streptococcus* employing three different detection methods: culture, rapid antigen detecting test, and molecular assay. *Brazilian J Infect Dis* 2003;7:297–300. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702003000500003>.
- [139] Zomorodian K, Rahimi MJ, Safaei A, Bazargani A, Motamadi M, Kharazi M, *et al.* Analysis of beta-hemolysis in human blood agars by *Streptococcus pyogenes*. *J Microbiol Methods* 2011;85:233–4. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.009>.
- [140] Trainor VC, Udy RK, Bremer PJ, Cook GM. Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiol Lett* 1999;176:421–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13692.x>.
- [141] Giovanetti E, Brenciani A, Morroni G, Tiberi E, Pasquaroli S, Mingoia M, *et al.* Transduction of the *Streptococcus pyogenes* bacteriophage Φm46.1, carrying resistance genes *mef(A)* and *tet(O)*, to other *Streptococcus* species. *Front Microbiol* 2015;5:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00746>.
- [142] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008;3:163–75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- [143] 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]. vol. 23. Wayne - PA, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
- [144] Andrade MN. Inibição de biofilmes bacterianos comuns em indústrias de alimentos utilizando extratos de *Zingiber officinale* Roscoe. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2021.
- [145] Machado OVO, Patrocínio MCA, Medeiros MS, Bandeira T de JPG. Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas. Fortaleza - CE, Brasil: EdUnichristus; 2019:40.
- [146] Wang Y, Yan M, Ma R, Ma S. Synthesis and antibacterial activity of novel 4-bromo-1*H*-indazole derivatives as FtsZ inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 2015;348:266–74. <https://doi.org/10.1002/ardp.201400412>.
- [147] Sugimoto A, Maeda A, Itto K, Arimoto H. Deciphering the mode of action of

- cell wall-inhibiting antibiotics using metabolic labeling of growing peptidoglycan in *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep* 2017;7:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01267-5>.
- [148] Naseer M, Kamboh AA, Sohoo AB, Burrero R. *In vitro* antimicrobial efficacy of some plant extracts against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* isolated from buffalo mastitic milk. *Buffalo Bull* 2021;40:31–44.
- [149] Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol* 2006;55:857–60. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46513-0>.
- [150] Al-Dahmash ND, Al-Ansari MM, Al-Otibi FO, Singh AJAR. Frankincense, an aromatic medicinal exudate of *Boswellia carterii* used to mediate silver nanoparticle synthesis: evaluation of bacterial molecular inhibition and its pathway. *J Drug Deliv Sci Technol* 2021;61:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102337>.
- [151] Guerin TF, Mondido M, McClenn B, Peasley B. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:340–5. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00916.x>.
- [152] Mahmoud AM, Comhaire FH, Vermeulen L, Andreou E. Andrology: comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen, and various sperm parameters. *Hum Reprod* 1994;9:1688–93. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138775>.
- [153] Bueno C, Villegas ML, Bertolotti SG, Previtali CM, Neumann MG, Encinas M V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. *Photophysics and photochemical reaction. Photochem Photobiol* 2002;76:385–90. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760385TESIOR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2).
- [154] Chen JL, Steele TWJ, Stuckey DC. Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion. *Environ Sci Technol* 2015;49:13463–71. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03050>.
- [155] Buegers R, Rosentritt M, Handel G. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to provisional fixed prosthodontic material. *J Prosthet Dent* 2007;98:461–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(07\)60146-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(07)60146-2).
- [156] Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, *et al.* The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol* 2009;54:595–601. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.03.004>.
- [157] Kong C, Yehye WA, Rahman NA, Tan MW, Nathan S. Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:1–17.
- [158] Bruice PY. Química orgânica - Tradução da 4ª edição norte-americana, Volume 1. São Paulo - SP, Brasil: Pearson Prentice Hall; 2006:317–22.

- [159] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo - SP, Brasil: Cengage Learning; 2010:365–73.
- [160] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo - SP, Brasil: Cengage Learning; 2010:373–81.
- [161] Bruice PY. Química orgânica - Tradução da 4ª edição norte-americana, Volume 1. São Paulo - SP, Brasil: Pearson Prentice Hall; 2006:320.
- [162] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo - SP, Brasil: Cengage Learning; 2010:374.
- [163] Lanças FM. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). *Sci Chromatogr* 2012;4:13–19. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.002>.
- [164] da Silva JA, Becceneri AB, Mutti HS, Martin ACBM, da Silva MF das GF, Fernandes JB, *et al.* Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. *J Chromatogr B* 2012;903:157–62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.013>.
- [165] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo - SP, Brasil: Cengage Learning; 2010:237.
- [166] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo - SP, Brasil: Cengage Learning; 2010:219–33.
- [167] Ribeiro MG, Filho AS de C, Listoni FJP. Dimetilsulfóxido - DMSO no teste de sensibilidade microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. *Ciência Rural* 2001;31:889–92. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500026>.
- [168] Pottz GE, Rampey JH, Benjamin F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms: preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 1967;141:261–72. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34888.x>.