



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BARBATUSINA EXTRAÍDA DA ESPÉCIE *PLECTRANTHUS GRANDIS* (CRAMER) WILLENSE E DERIVADO

Júdsen C. P. Mota¹; Anabella E. Teles²; Ana L. S. L. Ribeiro³; Sara M. L. Ramos⁴; Roberto L. Albuquerque⁵; Leandro B. Lima⁶

¹Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN

²Universidade Estadual do Ceará - UECE

³Universidade Estadual do Ceará - UECE

⁴Universidade Estadual do Ceará - UECE

⁵Universidade Estadual do Ceará - UECE

⁶Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN

Palavras-Chave: OXIB, Diterpeno, Microrganismos.

1. Introdução

A utilização de plantas medicinais, no Brasil, no tratamento de doenças e sintomas diversos, remonta a tempos antigos dos povos nativos, com costumes e conhecimentos partilhados ao longo dos séculos pelas gerações (Mota, 2023). O conhecimento popular das propriedades medicinais das plantas colabora para a divulgação e incentivo à pesquisa de compostos naturais com propriedades terapêuticas, permitindo a descoberta de novos compostos, além do aprimoramento de compostos já conhecidos, por derivados de substâncias naturais (Pinheiro, 2016; Porras *et al.*, 2021).

Dentre algumas plantas muito utilizadas no tratamento de enfermidades estão as plantas pertencentes ao gênero *Plectranthus*, que compreende uma diversidade de cerca de 300 espécies de plantas que suprem interesses diversos, como gastronômicos e medicinais (Pinheiro, 2016; Lukhoba; Simmonds; Paton., 2006). Esse gênero apresenta uma composição química diversa, que está associada a sua atividade terapêutica, destacando-se os diterpenos, que caracterizam a principal classe de metabólitos secundários presentes no gênero (Albuquerque *et al.*, 2007). A barbatusina é um diterpeno presente na composição química das espécies *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus grandis* e possui atividades gastroprotetora e antitumoral comprovadas (Albuquerque *et al.*, 2007; Lima, 2013; Pinheiro, 2016).

A espécie *Plectranthus grandis* (Cramer) Willense recebe diversos nomes populares no Brasil, como boldo grande, falsa malva santa e boldo mexicano, sendo estruturalmente parecida com a espécie *Plectranthus Barbatus*, popularmente chamada de malva santa. As diferenças sutis entre as duas espécies, no que diz respeito às suas respectivas morfologias, se limitam aos seus tamanhos, sendo a *P. Grandis* morfologicamente maior em suas partes aéreas e suas folhagens (Lima, 2013). Uma característica de destaque da *P. Grandis* é a sua capacidade de desenvolver-se em diversos climas e ambientes, até mesmo em regiões mais áridas, como o sertão central.

Atualmente as pesquisas por novos compostos naturais com propriedades medicinais e os aprimoramentos por derivados de compostos químicos já conhecidos tornou-se uma necessidade da sociedade e uma preocupação constante dos pesquisadores, ocasionadas pelo surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes a ação dos medicamentos (Ciorba *et al.*, 2015), fator que corrobora para a pesquisa de novas substâncias com atividades terapêuticas. Diante disso, o presente trabalho relata o isolamento da barbatusina, a determinação da sua estrutura química e avalia a atividade antimicrobiana. Relata também o derivado oxima da

barbatusina (OXIB), sua estrutura e avalia o potencial antimicrobiano, além de comparar os resultados obtidos para os dois compostos.

2. Material e Métodos

2.1 Isolamento da Barbatusina

2.1.1 Coleta e Fracionamento do Material Botânico

O material botânico (6 kg), foi coletado no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (HPM/FJAM-UFC). As folhas secas foram trituradas e extraídas com EtOH em temperatura ambiente por 15 dias. Após a destilação sob pressão reduzida, obteve-se o extrato etanólico (58,5 g), que foi dissolvido em 400 mL de uma solução de H₂O/MetOH (40:60 v/v). Este extrato foi então submetido a extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol) em um funil de separação de 1000 mL. Os processos de extração, isolamento e síntese da barbatusina e seu derivado estão representados no Fluxograma 1.

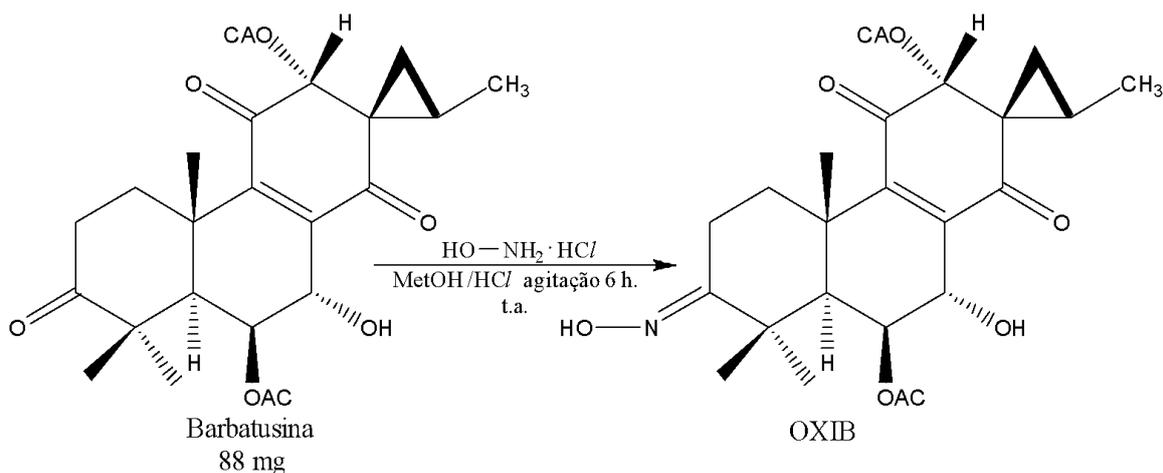
2.1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a CCD, foram usadas cromatoplasacas de gel de sílica 60 (Φ mm 0,002 – 0,0250) sobre folha de alumínio da VETEC. As substâncias foram eluídas com diclorometano, acetato de etila ou misturas desses solventes (8:2 v/v), e reveladas por exposição à radiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 nm e 365 nm). Também foram usadas revelações com solução de vanilina (5,0g) e ácido perclórico (100 mL) em etanol (100 mL), seguidas de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora, além de exposição a vapores de iodo em câmara saturada.

2.1.3 Síntese do derivado da Barbatusina (OXIB)

Em balão de fundo redondo foi adicionado barbatusina (88 mg; 0,02 mmol), cloridrato de hidroxilamina (312 mg; 4,9 mmol), MetOH (11 mL) e 0,2 mL de HCl concentrado a 25°C, após 6 h de agitação adicionou-se 20 mL de H₂O gelada e feito extração com diclorometano (3x de 25 mL) (Lima, 2013). O esquema reacional da síntese da oxima da barbatusina (OXIB) é representado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema reacional da síntese de OXIB.



Fonte: Autoria própria.

2.2 Determinação estrutural

2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no CENAUREMN/UFC, utilizando espectrômetros Bruker (Avance DRX-500), que operam a 500 MHz para hidrogênio. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

2.3 Avaliação do potencial antimicrobiano da Barbatusina

O ensaio antimicrobiano foi realizado pelo método de microdiluição, conforme o protocolo M27-A3 do CLSI (2008). Colônias foram suspensas em meio Sabouraud Dextrose e diluídas a $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Prepararam-se as substâncias em DMSO 5% nas concentrações desejadas. Foram adicionadas 50 μL de leveduras a poços de placas de 96 poços, junto com 50 μL de barbatusina (50 a 0,008 $\mu\text{g/mL}$). O controle negativo utilizou DMSO 5%. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e a leitura feita a 600 nm. O ensaio antibacteriano seguiu o mesmo protocolo, usando meio Mueller-Hinton Broth.

3. Resultados e Discussão

3.1 Fracionamento do extrato etanólico

As folhas de *P. grandis*, após secura apresentou teor de umidade de 88%, obtendo-se 58,5 g de Extrato Etanólico de *Plectranthus grandis* (EEPG) de coloração verde-escura, após evaporação do solvente em evaporador rotativo. O fracionamento do EEPG (Tabela 1), ocorreu com ordem de polaridade crescente de solventes, através de partição líquido – líquido, proporcionando frações de coloração verde-escura, com as massas para cada fração.

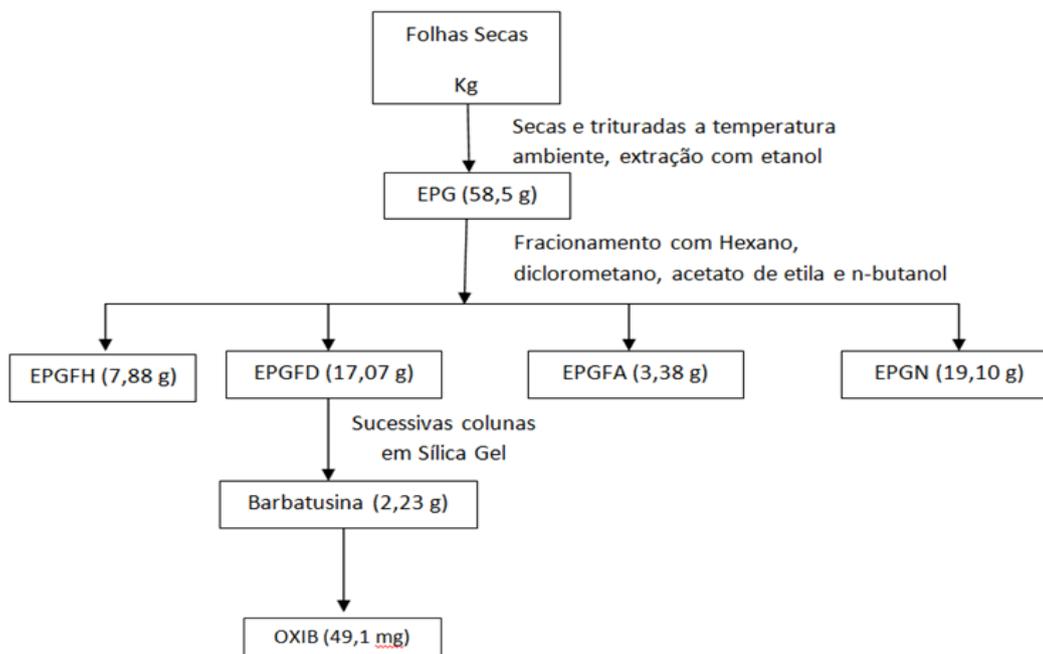
Tabela 1 - Fracionamento do EEPG por partição líquido – líquido.

Solventes	Fração	Massa (g)
Hexano	EPGFH	7,88
Diclorometano	EPGFD	17,07
Acetato de etila	EPGFA	3,38
N-butanol	EPGFN	19,1
Total		47,43 g
Rendimento		81,1%

Fonte: Autoria própria.

O fracionamento do extrato de EEPG, mostrou que o Extrato de *Plectranthus grandis* Fração N-butanol (EPGFN) apresenta maior massa, seguido do Extrato de *Plectranthus grandis* Fração Diclorometano (EPGFD) e Extrato de *Plectranthus grandis* Fração Hexano (EPGFH). O Extrato de *Plectranthus grandis* Fração Acetato de Etila (EPGFA), apresentou a menor massa, entre as frações. Corroborando com Silva et al., (2017) que reporta que a barbatusina constitui aproximadamente, 15 % da fração de diclorometano. A extração, isolamento e síntese, executados para a obtenção da barbatusina e seu derivado, estão descritos no Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Extração, isolamento e síntese, executados para a obtenção da barbatusina e derivado.

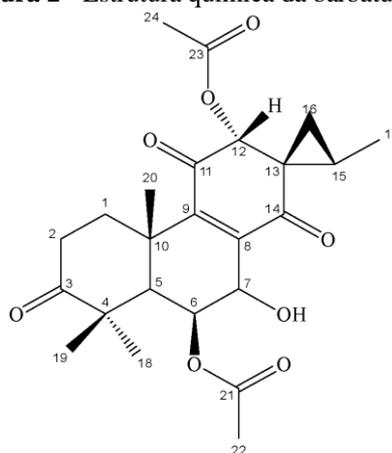


Fonte: Autoria própria.

A barbatusina foi isolada a partir da fração EPGFD, por cromatografia em coluna, obtendo-se 2,3 g da substância, apresentou-se como um sólido cristalino levemente amarelado, solúvel em clorofórmio. Assemelhando-se às características descritas por Albuquerque (2004), que reportou pela primeira vez, o isolamento do diterpo a partir de *P. grandis* e *P. ornatos*, e Lima (2013), que isolou a substância usando o mesmo protocolo.

Pelo fato de já conhecermos as características da barbatusina e sua estrutura (Figura 2), a pesquisa prosseguiu sem a necessidade dos dados de RMN da substância, além do mais, sua oxima correspondente foi sintetizada e caracterizada por RMN, que corrobora para firma que realmente tinha barbatusina.

Figura 2 - Estrutura química da barbatusina.



Fórmula molecular: $C_{24}H_{30}O_8$
Massa molecular: 446,19 g/mol

Fonte: Autoria própria.

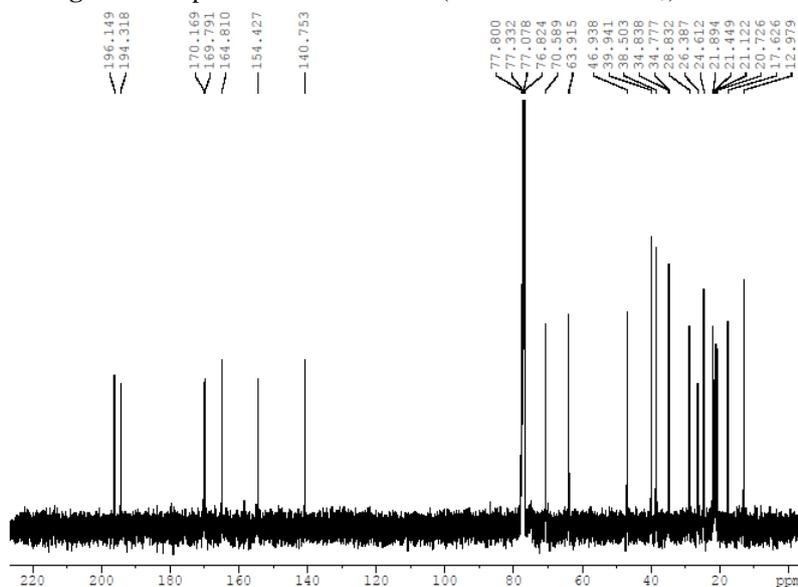
3.2 Obtenção do derivado OXIB por condensação carbonílica da barbatusina

A reação da barbatusina com cloridrato de hidroxilamina ($\text{OHNH}_2 \cdot \text{HCl}$), deu origem a oxima da barbatusina (OXIB) com 54,0 % de rendimento, que se apresentou como um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio. A OXIB foi originada pelo ataque do nucleófilo na carbonila (C-3) da barbatusina, denotando que essa carbonila tem caráter mais eletrofílico. O produto obtido foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C .

3.3 Determinação estrutural de OXIB

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz em CDCl_3) de OXIB (Figura 7), exibe 24 sinais, os sinais em δ_{C} 196,149; δ_{C} 194,318; δ_{C} 170,169; δ_{C} 169,791; δ_{C} 164,810; δ_{C} 154,427 e δ_{C} 140,753 correspondem à carbonilas cetônicas conjugadas, carbonilas de éster, carbono de oxima e sinais de duplas ligações, de acordo com os deslocamentos químicos. Os sinais observados em δ_{C} 77,800; δ_{C} 70,589 e δ_{C} 63,915 são correspondentes de carbonos sp^3 oxigenados e os sinais entre δ_{C} 12,979 e δ_{C} 46,938 são de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e não hidrogenados.

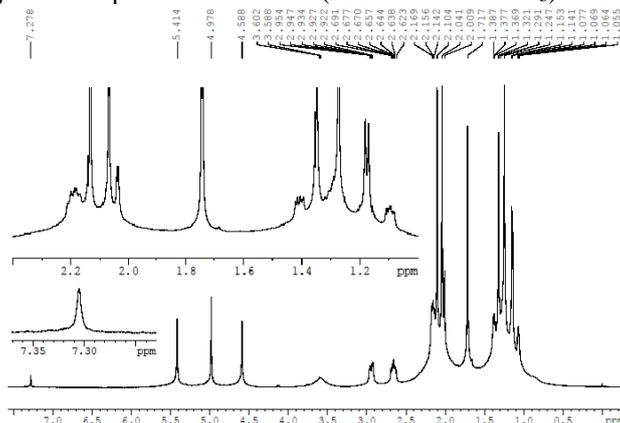
Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz em CDCl_3) de OXIB.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz em CDCl_3) de OXIB (Figura 8), apresenta três singletos na região de δ_{H} 5,4 - 4,6, correspondente de hidrogênio ligado a carbono oxigenado; dois singletos em δ_{H} 2,1 e δ_{H} 2,0 referentes aos hidrogênios das metilas dos grupos acetilas 12 e 6, respectivamente; os grupos metilas C-20, C-18 e C-19 estão em δ_{H} 1,74; 1,34 e 1,27; respectivamente, além da metila C-17 em δ_{H} 1,16.

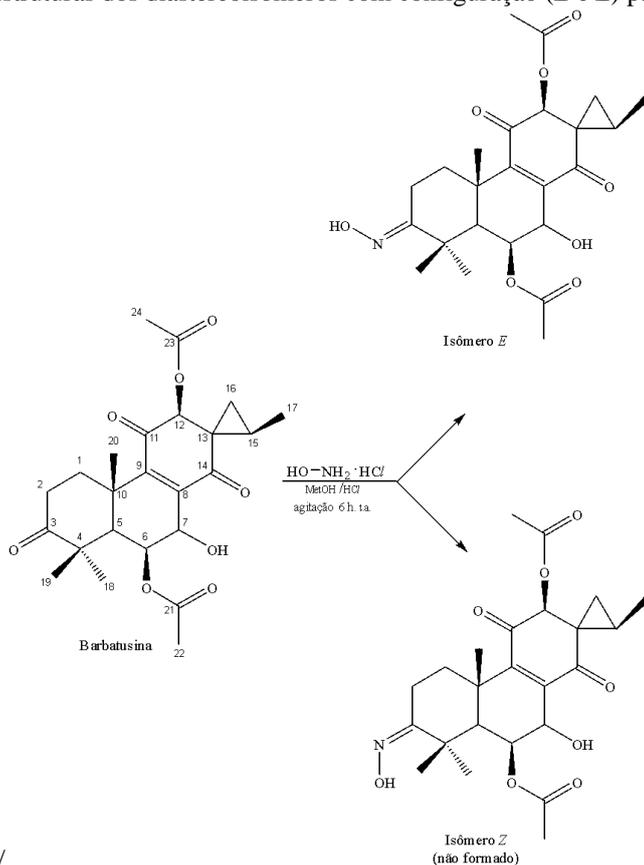
Figura 8 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz em CDCl_3) de OXIB.



Fonte: Autoria própria.

Nesse tipo de reação é possível obter uma mistura de diastereoisômeros (Figura 9), devido à ligação ($\text{C}=\text{N}$). O espectro de RMN de ^1H de OXIB (Figura 8), apresentou um singlete em 7,278 ppm para o hidrogênio da hidroxilamina ligada (HO-N) denotando que apenas o isômero *E* foi produzido, pois este possui menor impedimento estérico, sendo termodinamicamente mais estável (Lopes *et al.*, 2013).

Figura 9 - Estruturas dos diastereoisômeros com configuração (*E* e *Z*) para OXIB.



////

Fonte: Autoria própria.

A análise comparativa entre os dados obtidos com os espectros de RMN ^{13}C (Figura 7) e RMN ^1H (Figura 8) para OXIB com dados da literatura (Lima, 2013), pode ser verificada na Tabela 2, corroborando com a formação da substância.

Tabela 2- Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C com valores da literatura (LIMA, 2013).

C	OXIB		LITERATURA	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	17,62	2,20 (m)	17,76	2,92 (m)
		1,69 (m)		2,66 (m)
2	34,83	2,66 (m)	35,03	2,16 (m)
		2,72 (m)		1,25 (m)
3	164,81		164,97	
4	39,94		40,11	
5	46,94	2,00 (s)	47,19	2,00 (s)
6	70,59	5,44 (s, 5,01 Hz)	70,70	5,42 (s)
7	63,92	4,62 (d, 2,2 Hz)	64,23	4,59 (s)
8	140,75		140,93	
9	154,43		154,61	
10	38,50		38,69	
11	194,32		194,45	
12	77,80	5,03 (d, 4,8 Hz)	77,96	4,99 (s)
13	34,77		34,99	
14	196,15		196,34	
15	21,89	2,13 (d)	22,05	2,10 (m)
16	26,39	1,40 (dd)	26,44	1,38 (dd)
		1,09 (dd)		1,06 (m)
17	12,98	1,15 (d)	13,14	1,15 (d)
18	28,83	1,32 (s)	29,03	1,32 (s)
19	24,61	1,27 (s)	24,77	1,25 (s)
20	21,12	1,71 (s)	21,28	1,71 (s)
21	170,17		170,25	
22	21,44	2,04 (s)	21,60	2,04 (s)
23	169,79		169,90	
24	20,73	2,96 (s)	20,88	2,92 (s)

Fonte: Autoria própria.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana da barbatusina

A atividade antimicrobiana das substâncias foi aferida contra a inibição do crescimento de bactérias *P. mirabilis*, e leveduras de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, evidenciando o potencial antimicrobiano da barbatusina (Tabela 3), que apresentou atividade inibitória para todos os micro-organismos. É possível observar que a reação na carbonila (C-3) da barbatusina, inativou a atividade antibacteriana para as cepas de *P. mirabilis* (Tabela 3), evidenciado no ensaio com o derivado OXIB, que não apresentou atividade, indicando que essa carbonila é crucial para o combate a estes micro-organismos.

O derivado OXIB, produto da condensação entre a carbonila (C-3) com hidroxilamina, apresentou ser inativo contra as leveduras de *C. albicans*, entretanto, exibiu considerável redução na concentração de inibição das leveduras de *C. krusei*, (% inibição $\mu\text{g/mL}$ = 11) evidenciando que o grupo hidroxilamina (NH_2OH), introduzido na molécula de barbatusina, potencializou a inibição dessas leveduras, em comparação com a barbatusina (% inibição $\mu\text{g/mL}$ = 32). Para as leveduras de *C. parapsilosis*, o derivado OXIB não apresentou alteração significativa.

Para as cepas de *C. tropicalis*, as substâncias apresentaram igual concentração de inibição (% inibição $\mu\text{g/mL}$ = 29), indicando que a modificação estrutural não inativou nem potencializou a inibição do crescimento desses micro-organismos. Os dados obtidos com a atividade antimicrobiana, elucidam o potencial antimicrobiano da barbatusina e antifúngico de OXIB inibiram, inclusive, as leveduras de *C. krusei*, naturalmente resistente ao antifúngico padrão fluconazol (Orozco, 2011; Cachiba *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana da barbatusina, OXIB.

Microrganismos	% Inibição	
	Barbatusina	OXIB
Bactéria	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. mirabilis</i>	47	NI
Levedura		
<i>C. albicans</i>	10	NI
<i>C. krusei</i>	32	11
<i>C. parapsilosis</i>	33	34
<i>C. tropicalis</i>	29	29

*NI: Inibição não observada.

Fonte: Autoria própria.

4. Conclusões

A barbatusina foi extraída, isolada e seu derivado foi sintetizado. Os dois compostos tiveram suas estruturas analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), ressonância



magnética nuclear (RMN) de Hidrogênio-1 e Carbono-13 e nível de absorção no ultravioleta e visível, permitindo a determinação de suas estruturas químicas.

A análise do potencial antimicrobiano de ambos os compostos demonstrou as propriedades antimicrobianas da barbatusina, que apresentou inibição para todos os microrganismos testados. O OXIB, por sua vez, não apresentou inibição para a bactéria *P. mirabilis* e nem para a levedura *C. albicans*, mas apresentou resultados satisfatórios especialmente para a levedura *C. krusei*, que demonstrou ser o microrganismo mais susceptível à inibição pelo derivado, e demonstrou uma capacidade de inibição para essa levedura superior a da barbatusina (% inibição $\mu\text{g/mL}$ = 11 para o OXIB em comparação com % inibição $\mu\text{g/mL}$ = 32 da barbatusina). Nos demais microrganismos a barbatusina demonstrou um potencial superior ao do OXIB.

5. Referências

- ALBUQUERQUE, R. L.; KERNTOPF, M. R.; SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos do tipo abietano isolado de *Plectranthus barbatus* Adrews. **Química Nova**, v. 8, n. 30, p. 1882-1886, 2007.
- ALBUQUERQUE R.L.; SILVA M.G.V.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A.; MORAIS, S.M.; STONE, N. J. Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north eastern Brazil. **Flav. Frag. J**, 2(1), 24-26, 2007;
- CACHIBA, T. H., CARVALHO, B. D., CARVALHO, D. T., CUSINATO, M., PRADO, C. G., DIAS, A. L. T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-Acilidrazônicos. **Quim. Nova**, 35, 1566, 2012.
- CIORBA, V. O. D. A. VERONESI, L. PASQUARELLA, C. and SIGNORELLI, C. Antibiotic Resistance as a Major Public Health Concern: Epidemiology and Economic Impact. **Ann. Ig.** 27, 562–579, 2015.
- CORTES, M. S.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Títulações espectrofotométricas de sistemas ácido-base utilizando extrato de flores contendo antocianinas. **Quim. Nova**, 30 (4), 1014-1019, 2007.
- LIMA, L. B. D. E. **Contribuição para a padronização química de espécies do gênero plectranthus : derivatização e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos.** Tese (Doutorado em Química) - Programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 121, 2013.
- LOPES, A.B.; MIGUEZ, E.; KÜMMERLE, A.E.; RUMJANEK, V.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of *N*-acylhydrazone Derivatives. **Molecules**, 18, 11683-11704, 2013.
- MOTA, C., A., R. **Avaliação dos dados de cultivo de plantas medicinais com base no acervo científico do professor Francisco José de Abreu Matos.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.
- OROZCO, A. S. **Antimicrob. Agents Chemother.** 55, 2645,2011.
- PINHEIRO, E. B. F. **Estudo Químico, Biológico e In Silico de Plectranthus Grandis (Cramer) Willense.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 175 f. 2016.
- PORRAS, G., CHASSAGNE, F., LYLES, J. T., MARQUEZ, L., DETTWEILER, M., SALAM, A. M. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. **Chem. Rev.** 121, 3495–3560, 2021.



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA

SILVA, M. G. DE V., LIMA, L. B., OLIVEIRA, M. DA C. F. DE, MATTOS, M. C. DE, & MAFEZOLI, J.
Quantification of Barbatusin and 3 β -Hydroxy-3-deoxybarbatusin in *Plectranthus* Species by HPLC-DAD.
International Journal of Analytical Chemistry, 2397131, 2017.