



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HECTOR HUGO SILVA MEDRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDO
ROSMARÍNICO E HIDROXICINÂMICOS EM *PLECTRANTHUS
ORNATUS* CULTIVADO *IN VITRO***

Salvador

2015

HECTOR HUGO SILVA MEDRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDO
ROSMARÍNICO E HIDROXICINÂMICOS EM *PLECTRANTHUS
ORNATUS* CULTIVADO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a Juceni Pereira David

Salvador

2015

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Medrado, Hector Hugo Silva

Desenvolvimento de método analítico para determinação da correlação entre os teores de ácido rosmarínico e hidroxicinâmicos em *Plectranthus ornatus* cultivado in vitro. / Hector Hugo Silva Medrado – 2015.

160 f. il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Juceni Pereira David

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2015

1. Plantas medicinais. 2. Antioxidantes. 3 *Plectranthus*. 4. Ácido rosmarínico. 5. Boldo. David, Juceni Pereira. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título

CDD – 615.321

CDU – 547.9

HECTOR HUGO SILVA MEDRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDO
ROSMARÍNICO E HIDROXICINÂMICOS EM *PLECTRANTHUS
ORNATUS* CULTIVADO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 20 de maio de 2015.

Juceni Pereira David – Orientadora _____

Doutora em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Universidade Federal da Bahia

Jorge Mauricio David _____

Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Universidade Federal da Bahia

Hugo Neves Brandão _____

Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil
Universidade Estadual de Feira de Santana

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Ele, que permitiu minha vinda e estadia nesse mundo até o dia de hoje; agradeço pelas graças alcançadas, pelas oportunidades oferecidas, pela coragem e força que me forneceu durante todos esses anos.

À minha família, em especial o meu pai Carlos Medrado e à minha mãe Marineide Medrado, pelo amor, carinho, conselhos e incentivos.

Aos professores Dr. Jorge Mauricio David e Dra. Juceni Pereira David pela orientação, presença, amizade e confiança no meu potencial. Ao amigo e grande instrutor Hugo Neves Brandão pelo companheirismo, conhecimento e paciência.

Aos amigos Gisele, Samantha, João Paulo, José Carlos e Manoel Felipe pela presença constante. Ao grande amigo Ivan Sobrinho por todo o apoio, amizade e companheirismo.

Aos colegas de laboratório do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais, Larissa, Clayton, Bruno, Bel, Paty, Eliezer e Raul.

Aos alunos de iniciação científica que me auxiliaram durante todo o desenvolvimento do projeto, Jota e Isabella.

A todos os professores que nessa jornada contribuíram de fato com meu crescimento pessoal e acadêmico. Presto uma homenagem especial à professora Zênis, que tem sido um modelo de ser humano e profissional.

A uma amiga em especial, Paloma Meira, pelo amor, paciência, cuidado e troca de conhecimentos. Às alunas Bruna, Lorena, Natália e aos colegas do grupo LCTV (Laboratório de Cultura de Tecido Vegetais) pelo apoio no cultivo das plântulas, em especial à professora Moema e a doutoranda Zafira.

Aos meus amigos da graduação, honrosamente apelidados de gases nobres, Marina, Bia, Ana Paula, Mariana, Heiter, Hélio, Bárbara e Lucas.

Às Indústrias Nucleares do Brasil, nas pessoas do Pedro Luís e Renata Carvalho, pelos benefícios concedidos para finalização do trabalho e estrutura para realização dos ensaios de atividade antioxidante.

Aos amigos e funcionários do Instituto de Química.

“Por maior que seja a montanha, ela não pode esconder o sol.”

MEDRADO, Hector Hugo Silva. Desenvolvimento de método analítico para determinação da correlação entre os teores de ácido rosmarínico e ácidos hidroxicinâmicos em *Plectranthus ornatus* cultivado *in vitro*. 144 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Espécies de Lamiaceae, em especial do gênero *Plectranthus*, tem se mostrado como fontes consideráveis de compostos antioxidantes, dentre eles os ácidos hidroxicinâmicos, como por exemplo o ácido rosmarínico. A produção desses metabólitos pode ser aumentada através de cultura de tecidos vegetais, que em alguns casos chega à produção de biomoléculas em escala industrial. Neste trabalho, foi realizado o cultivo de tecidos de *Plectranthus ornatus*, em meio MS, com a adição dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (1, 2 e 4 mg L⁻¹) e 6-benzoaminopurina (2 e 4 mg L⁻¹) objetivando-se a sobreprodução de ácido rosmarínico. A metodologia de análise foi desenvolvida e validada. A partir dos extratos obtidos, foram realizadas análises por CLAE-DAD (gradiente com metanol e ácido acético 0,1%,) e ensaios de sequestro do radical livre DPPH para avaliação da atividade antioxidante. A condição de cultivo que levou à maior produção de ácido rosmarínico fez uso de ácido naftalenoacético e 6-benzoaminopurina na concentração de 1 mg L⁻¹, atingindo o valor de 6,2 g kg⁻¹ material vegetal seco, um aumento equivalente a 96 vezes em relação à planta cultivada *in natura*. O uso apenas de ácido naftalenoacético 1 mg L⁻¹ proporcionou a maior produção de ácido cafeico, alcançado 401 mg kg⁻¹ material vegetal seco. Todos os extratos foram ativos frente à inibição do radical livre DPPH, sendo aqueles proveniente dos cultivos com 2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético e 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético e 6-benzoaminopurina os de menor CE₅₀ (26,0 e 29,8 µg mL⁻¹, respectivamente). O teor de ácido rosmarínico apresentou uma correlação forte (R²> 0,95) do tipo logarítmica com o CE₅₀, indicando que o ácido rosmarínico é o componente principal frente à inibição do DPPH.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico. *Plectranthus ornatus*. Cultivo *in vitro*.

MEDRADO, Hector Hugo Silva. Development of analytical method for determining the correlation between the rosmarinic acid and hydroxycinnamic acids contents in *Plectranthus ornatus* cultivated *in vitro*. 144 pp. ill. 2015. Master Dissertation – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015

ABSTRACT

Lamiaceae species, genus *Plectranthus* in particular, has proven to be significant sources of antioxidants, including the hydroxycinnamic acids, such as rosmarinic acid. The production of these metabolites can be increased by culturing plant tissue, which in some cases reaches the production of biomolecules on an industrial scale. This work was conducted growing *Plectranthus ornatus* tissue, on MS medium with the addition of the growth regulator naphthaleneacetic acid (1, 2 and 4 mg L⁻¹) and 6-benzoaminopurine (2 and 4 mg L⁻¹), aiming overproduction of rosmarinic acid. The analysis methodology was developed and validated. From the obtained extracts, analyzes were performed by HPLC-DAD (gradient with methanol and acetic acid 0.1%) and free radical DPPH scavenging tests to evaluate the antioxidant activity. The cultivation condition that led to the increased production of rosmarinic acid made use of naphthaleneacetic acid and 6-benzoaminopurine at concentration of 1 mg L⁻¹, reaching the value of 6.2 g kg⁻¹ (dry material), an increase equivalent to 96 times regarding plant grown *in nature*. The use of only naphthaleneacetic acid 1 mg L⁻¹ provided the highest yield of caffeic acid, reaching 401 mg kg⁻¹ (dry material). All extracts were active for inhibition of DPPH free radical, conditions being those derived from the culture medium with 2 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid and 1 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid and 6-benzoaminopurine the lowest EC₅₀ (26.0 and 29.8 µg ml⁻¹, respectively). The rosmarinic acid content showed a strong correlation (R²> 0.95) from the logarithmic type with the EC₅₀, indicating that rosmarinic acid is the main component facing the inhibition of DPPH.

Keywords: Rosmarinic acid. *Plectranthus ornatus*. *In vitro* tissue culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de hidrólise da Labiatengerbstoffe	14
Figura 2 - Formação do intermediário 4-coumaroil-CoA a partir da fenilalanina.....	16
Figura 3 - Formação do intermediário ácido 4-hidroxifeniláctico a partir da tirosina.	16
Figura 4 - Etapas finais da biossíntese do ácido rosmarínico.....	17
Figura 5 - Variação do teor de RA (a) com adição de elicitor de fungos do gênero <i>Pythium</i> e de jasmonato de metila (b).....	19
Figura 6 - Biossíntese dos derivados hidroxilados do ácido cinâmico.....	21
Figura 7 - Boldo do Chile (<i>Peumus boldus</i>).....	29
Figura 8 - Falso bolso (<i>Plectranthus barbatus</i>).....	29
Figura 9 - Boldo baiano (<i>Vernonia condensata</i>)	29
Figura 10 - Boldo chinês (<i>Plectranthus ornatus</i>).....	29
Figura 11 - Determinação gráfica do intervalo através do gráfico da razão sinal/concentração versus concentração em escala logarítmica.....	52
Figura 12 - Determinação gráfica do intervalo através do gráfico da curva de sinal versus concentração	52
Figura 13 - Curvas analíticas de padrões preparados em solvente grau analítico e em matriz.	54
Figura 14 - Gráfico das curvas analíticas preparadas a partir de padronização externa (preto) e adição de padrão (marrom)	55
Figura 15 - Gráfico de Padronização Interna.....	56
Figura 16 - Reação de sequestro do radical DPPH por um agente antioxidante.....	67
Figura 17 - Processo de formação do radical ABTS• pelo ânion persulfato ($S_2O_8^{2-}$) e seu posterior sequestro por um agente antioxidante.....	68
Figura 18 - Cromatograma de uma solução padrão contendo ácido rosmarínico e forscolina.....	79
Figura 19 - Cromatograma do extrato metanólico de <i>P. ornatus</i> preparado através de maceração estática.	80
Figura 20 - Cromatogramas sobrepostos das trocas consecutivas de solvente durante a maceração com metanol (preto – primeira troca de solvente; azul – segunda troca de solvente; rosa – terceira troca de solvente; verde – quarta troca de solvente).....	81

Figura 21 - Variação do teor de RA em função do tempo de exposição ao ultrassom	82
Figura 22 - Cromatograma do extrato das folhas de <i>P. ornatus</i> preparado por maceração estática com metanol.....	82
Figura 23 - Espectro no Uv-Vis do padrão de forscolina (a) e do pico com tempo de retenção de 10,3 minutos (b).....	83
Figura 24 - Cromatograma do extrato das folhas de <i>P. ornatus</i> preparado por maceração dinâmica.	84
Figura 25 - Cromatograma do padrão de ácido rosmarínico eluído com água do cartucho C18.....	84
Figura 26 - Cromatograma do padrão de ácido rosmarínico eluído com metanol do cartucho C18.....	85
Figura 27 - Cromatograma do padrão de ácido rosmarínico eluído com acetonitrila do cartucho C ₁₈	85
Figura 28 - Cromatograma do extrato metanólico das folhas de <i>P. ornatus</i> pós tratamento com ureia.	86
Figura 29 - Perfil cromatográfico do extrato das folhas de <i>Salvia officinalis</i> após a adição dos padrões de ácido rosmarínico e rosmarinato de metila.....	87
Figura 30 - Cromatograma do extrato das folhas de <i>P. ornatus</i> após a adição dos padrões de ácido rosmarínico e rosmarinato de metila.....	87
Figura 31 - Cromatograma do extrato das folhas de <i>P. ornatus</i> , preparado por infusão seguida de partição com éter etílico, colhido em Salvador (BA) em Setembro 2010	88
Figura 32 - Cromatograma do extrato dos talos e raízes de <i>P. ornatus</i> , preparado por infusão seguida de partição com éter etílico, colhido em Salvador (BA) em Setembro 2010	88
Figura 33 - Cromatograma do extrato dos talos de <i>P. ornatus</i> , preparado por infusão seguida de partição com éter etílico, colhido em colhido em Brumado (Ba) em Setembro de 2010.....	89
Figura 34 - Cromatograma dos extratos das folhas do espécime de <i>P. ornatus</i> que apresentou uma coeluição com ácido rosmarínico	90
Figura 35 - Espectro no Uv-Vis do pico do RA de uma solução padrão.....	90
Figura 36 - Espectro no Uv-Vis do ombro que coeluiu com RA em um extrato de <i>P. ornatus</i>	91

Figura 37 - Espectro no Uv-Vis do pico com tempo de retenção curto (entre 2 e 3 minutos) em vários extratos de <i>P. ornatus</i>	92
Figura 38 - Estrutura molecular do ácido rosmarínico mostrando em azul o bloco de construção correspondente ao ácido cafeico e em vermelho ao ácido 3,4-dihidroxifenilático.....	92
Figura 39 - Cromatograma dos padrões dos ácidos cinâmicos e seus derivados....	93
Figura 40 - Espectros de UV-Vis do ácido caféico	93
Figura 41 - Espectros de UV-Vis do ácido <i>p</i> -hidroxi-cinâmico (a) e ácido <i>m</i> -hidroxi-cinâmico (b).....	94
Figura 42 - Espectros de UV-Vis do ácido <i>o</i> -hidroxi-cinâmica (a) e ácido rosmarínico (b).....	95
Figura 43 - Curva analítica do ácido caféico (328 nm)	96
Figura 44 - Curva analítica do ácido <i>o</i> -hidroxi-cinâmico (310 nm).....	97
Figura 45 - Curva analítica do ácido <i>m</i> -hidroxi-cinâmico (280 nm).....	97
Figura 46 - Curva analítica do ácido <i>p</i> -hidroxi-cinâmico (278 nm).....	97
Figura 47 - Curva analítica do ácido rosmarínico (330 nm).....	98
Figura 48 - Exemplar de plântula da condição 0	101
Figura 49 - Exemplar de plântula da condição A.1	101
Figura 50 - Exemplar de plântula da condição A.2	101
Figura 51 - Exemplar de plântula da condição A.3	101
Figura 52 - Exemplar de plântula da condição B.2	101
Figura 53 - Exemplar de plântula da condição B.3	101
Figura 54 - Exemplar de plântula da condição C.1	102
Figura 55 - Cromatograma do extrato da matriz.....	102
Figura 56 - Cromatograma do extrato do controle.....	103
Figura 57 - Cromatograma do extrato da condição A.1 (1 mg L ⁻¹ ANA).....	103
Figura 58 - Cromatograma do extrato da condição A.2 (2 mg L ⁻¹ ANA)	103
Figura 59 - Cromatograma do extrato da condição A.3 (4 mg L ⁻¹ ANA)	104
Figura 60 - Cromatograma do extrato da condição B.2 (2 mg L ⁻¹ BAP)	104
Figura 61 - Cromatograma do extrato da condição B.3 (4 mg L ⁻¹ BAP)	104
Figura 62 - Cromatograma do extrato da condição C.1 (1 mg L ⁻¹ ANA e 1 mg L ⁻¹ BAP)	105
Figura 63 - Espectro no UV-Vis do pico que eluiu em 4,2 minutos.....	105

Figura 64 - Sobreposição dos cromatograma dos extratos (ambos a 1 mg mL^{-1}) da matriz (em preto) e do controle cultivado <i>in vitro</i> (em azul).....	107
Figura 65 - Sobreposição dos cromatograma dos extratos (ambos a 1 mg mL^{-1}) do controle (em preto) e da condição A.1 (em azul).....	107
Figura 66 - Percentual de sequestro de radical livre dos extratos da matriz, controle (condição 0) e variando-se a concentração da auxina ANA (A.1, A.2 e A.3)	111
Figura 67 - Percentual de sequestro de radical livre dos extratos da matriz, controle (condição 0) e variando-se a concentração da citocinina BAP (B.2 e B.3)	112
Figura 68 - Percentual de sequestro de radical livre de todos os extratos (matriz, controle, A.1, A.2, A.3, B.2, B.3 e C.1)	113
Figura 69 - Relação entre o teor de ácido rosmarínico e o CE_{50} dos extratos.....	116
Figura 70 - Relação entre o teor de ácido rosmarínico (menores que 190 mg g^{-1}) e o CE_{50} dos extratos	117
Figura 71 - Estruturas de ressonância do radical formado a partir da abstração de H do RA	119
Figura 72 - Ângulos e comprimentos de ligação das diversas estruturas de ressonância do radical formado a partir da abstração de H do RA	120
Figura 73 - Superfícies de contorno do HOMO (a) e LUMO do RA no estado fundamental.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimentos de onda de <i>cutoff</i> de solventes usualmente utilizados como fase móvel em CLAE.....	47
Tabela 2 - Comparação dos detectores utilizados em CLAE.....	46
Tabela 3 - Concentrações de ANA e BAP em diversas condições de cultivo	75
Tabela 4 - Teores de RA encontrados a partir de extratos preparados por maceração com diferentes solventes.....	80
Tabela 5 - Parâmetros de performance do sistema cromatográfico	95
Tabela 6 - Resultados de precisão do método.....	98
Tabela 7 - Parâmetros utilizados na determinação dos LD e LQ do método.....	99
Tabela 8 - Resultados dos testes de recuperação do método	100
Tabela 9 - Teores dos analitos no material vegetal	106
Tabela 10 - Comparativo de rendimentos de ácido rosmarínico através de diversas estratégias de cultivo <i>in vitro</i>	108
Tabela 11 - Valores de CE ₅₀ dos extratos analisados.....	114
Tabela 12 - Teores de RA e CA nos extratos analisados	115
Tabela 13 - CE ₅₀ de extratos de espécies de <i>Plectranthus</i>	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C RMN 13	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-
^1H RMN Hidrogênio	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de
4CL	4-cumárico CoA-ligase
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-Benzoaminopurina
C4H	Ácido cinâmico 4-hidroxilase
CA	Ácido cafeico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CITES	Convention for International Trade in Endangered Species
CLAE (HPLC)	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência acoplada com Detecção de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência acoplada com Espectrometria de Massas
CV	Coeficiente de variação
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de Massas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAS II	Ácido graxo sintase tipo II
FDA	Food and Drug Administration
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia
HPPR	Hidroxifenilpiruvato redutase

IV	Espectrometria no Infra-Vermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LUMO	Orbital molecular vazio de mais baixa energia
<i>m</i> -OH-CIN	Ácido <i>meta</i> -hidroxi-cinâmico
MS	Murashige e Skoog (1962)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<i>o</i> -OH-CIN	Ácido <i>orto</i> -hidroxi-cinâmico
PAL	Fenilalanina ammonia-liase
<i>p</i> -OH-CIN	Ácido <i>para</i> -hidroxi-cinâmico
RA	Ácido rosmarínico
RAS	Ácido rosmarínico sintase
SAM	S-adenosilmetionina
SPE	Extração em Fase Sólida
SRL	Sequestro de Radical Livre
TAL	Tirosina amônia-liase
UV-Vis	Ultra-violeta e visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	7
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3.1. Metabólitos especiais vegetais e a terapêutica	9
3.1.1. Generalidades	9
3.1.2. Metabólitos especiais – Pesquisa e Desenvolvimento	10
3.1.3. Produtos naturais e a indústria farmacêutica	12
3.2. Ácido Rosmarínico	14
3.2.1. Histórico	14
3.2.2. Atividades biológicas	15
3.2.3. Biossíntese	16
3.2.4. Obtenção por biotecnologia	18
3.3. Ácidos Cinâmicos	21
3.3.1. Ocorrência, distribuição no reino vegetal e aspectos biossintéticos	21
3.3.2. Atividades biológicas	22
3.4. O gênero <i>Plectranthus</i>	27
3.4.1. Ocorrência e distribuição	27
3.4.2. Usos etnobotânicos	28
3.4.3. Metabólitos especiais característicos e atividades biológicas relacionadas	30
3.4.4. <i>Plectranthus ornatus</i>	38
3.5. Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência	40
3.5.1. Histórico	40
3.5.2. Instrumentação	45
3.6. Validação de Metodologias Analíticas	49
3.6.1. Seletividade/Especificidade	50
3.6.2. Linearidade	51
3.6.3. Exatidão	56
3.6.4. Precisão	57

3.6.5. Limites de Detecção e Quantificação	60
3.6.6. Robustez	61
3.7. Atividade antioxidante	62
3.7.1. Radicais livres	62
3.7.2. Mecanismo de ação de antioxidantes	64
3.7.3. Métodos para Determinação da Atividade Antioxidante	66
3.8. Biotecnologia vegetal	68
3.8.1. Cultivo <i>in vitro</i> de tecidos vegetais	68
3.8.2. Reguladores de Crescimento Vegetal	69
3.8.3. Cultivo <i>in vitro</i> versus <i>in natura</i>	72
4. METODOLOGIA	73
4.1. Reguladores de Crescimento Vegetal	73
4.1.1. Material <i>in natura</i>	73
4.1.2. Material cultivado <i>in vitro</i>	73
4.2. Preparo dos Extratos	73
4.2.1. Extração por infusão	73
4.2.2. Extração por agitação dinâmica	74
4.2.3. Extração por agitação com ultrassom	74
4.2.4. Pré-purificação dos extratos com SPE	74
4.3. Cultivo <i>in vitro</i>	74
4.4. Determinação dos ácidos cafécico, rosmarínico e hidroxycinâmicos por CLAE-DAD	75
4.5. Determinação da atividade antioxidante	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1. Desenvolvimento do método de análise	78
5.2. Validação da metodologia de análise	93
5.2.1. Seletividade/Especificidade	93
5.2.2. Linearidade	96
5.2.3. Precisão	98
5.2.4. Limite de Detecção e Quantificação	99
5.2.5. Exatidão	100
5.3. Cultivo <i>in vitro</i>	100

5.4. Determinação do ácido rosmarínico, ácido cafeico e dos ácidos hidroxí cinâmicos por CLAE-DAD	102
5.5. Determinação da atividade antioxidante e relação com a concentração de ácido rosmarínico	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
7. REFERÊNCIAS	124

1. INTRODUÇÃO

O reino vegetal pode ser considerado uma das maiores fontes para fornecimento de futuros medicamentos, devido principalmente à maior diversidade de produção dos metabólitos especiais. Medicamentos obtidos a partir de produtos naturais têm se mostrado uma valiosíssima fonte de tratamentos para diversas enfermidades (HARVEY, 2000).

A família Lamiaceae contém vários gêneros do reino vegetal, abrangendo espécies como a sálvia (*Salvia sp.*), o manjerição (*Ocimum sp.*) e a hortelã (*Mentha sp.*). Uma característica marcante dessa família é sua ampla utilização etnobotânica. Diversas espécies de Lamiaceae, como *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum* e *Perilla frutescens*, tem se mostrado como fontes consideráveis de ácidos hidroxicinâmicos, principalmente o ácido rosmarínico (ZGORKA e GLOWNIAK, 2001).

Outro gênero importante desta família é o *Plectranthus*, que tem sido utilizado contra distúrbios dérmicos, digestivos, respiratórios, gênito-urinários, muscular-esqueléticos infecções, febre e dores. Os principais metabólitos encontrados neste gênero são mono, diterpenoides e sesquiterpenoides, fenólicos simples, ácidos cinâmicos e flavonoides.

Todos esses compostos têm exibido atividades biológicas relevantes em estudos biomonitorados, como atividade antioxidante e anticolinesterásica (LUKHOBBA et al., 2006). Os ácidos cinâmicos, dentre eles os isômeros *orto*, *meta* e *para*-hidroxi-cinâmicos e com maior evidência, os ácidos cafeico e rosmarínico possuem atividade antioxidante, como mostram Petersen e Simmonds (2003). Outro estudo aponta o ácido rosmarínico como responsável pela atividade anticolinesterásica dos chás de *Plectranthus barbatus* (FALÉ et al., 2009).

Diversas doenças têm sido associadas ao desequilíbrio de radicais livres presentes no organismo. Quando presente em excesso, essas espécies químicas altamente reativas causam efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas patologias. A busca por fontes de antioxidantes de origem natural tem sido

impulsionada no intuito de restabelecer o equilíbrio oxidativo em seres humanos, animais e alimentos (ALVES et al., 2010).

A busca de novos produtos naturais bioativos tem avançado bastante em função do desenvolvimento de novas técnicas instrumentais de análise e cromatográficas. O isolamento dessas substâncias naturais fornece matéria-prima importante para o preparo de diversos produtos industrializados, a exemplo dos medicamentos (VIAEIRA JÚNIOR, 2005).

A técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) tem se mostrado como uma das mais úteis na separação de misturas complexas de metabólitos especiais, por exemplo, com colunas de fase reversa. Muitas dessas substâncias ativas são produzidas pelos vegetais em quantidades muito pequenas, por isso é importante a combinação com técnicas biotecnológicas para que esses organismos produzam em quantidades comercialmente viáveis os compostos de interesse.

A cultura de células vegetais é uma técnica biotecnológica que consiste na indução e proliferação de células a partir de um fragmento do vegetal na presença de nutrientes e reguladores vegetais. A cultura de células e tecidos pode produzir compostos idênticos ou similares àqueles presentes na planta *in natura*. Em alguns casos, tem se conseguido a produção de biomoléculas via cultura de células em escala industrial. Entretanto, para muitos dos fármacos de interesse a produção é muito baixa ou quase zero em cultura de células vegetais, por isso muitos estudos buscam otimizar os meios de crescimento e produção ou ainda selecionando-se linhagens celulares mais produtoras (LOURENÇO, 2003).

No acompanhamento do desenvolvimento das culturas de plântulas e células, as técnicas cromatográficas tem se mostrado eficientes. Entretanto, a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004).

Aliar as técnicas biotecnológicas para a produção de metabólitos especiais aos ensaios biomonitorados de atividade antioxidante e anticolinesterásico, assim como a determinação dos compostos ativos dos extratos reúne as vertentes mais relevantes da pesquisa de química de produtos naturais e proporciona uma nova fonte confiável de compostos naturais de interesse farmacêutico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver método de cultivo *in vitro* de *Plectranthus ornatus* para promover a sobreprodução de ácido rosmarínico e, método analítico para verificar a correlação entre os teores desse ácido e dos ácidos hidroxicinâmicos com a atividade antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos (ácido *o*-hidroxi-cinâmico, ácido *m*-hidroxi-cinâmico e ácido *p*-hidróxi-cinâmico) ácido cafeico e ácido rosmarínico;
- Realizar o cultivo *in vitro* de plântulas de *Plectranthus ornatus* em diferentes condições de cultivo;
- Determinar os ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico nos extratos de *Plectranthus ornatus* cultivado *in vitro*;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de *Plectranthus ornatus* cultivado *in vitro* através do método de sequestro do radical livre DPPH;
- Comparar os teores dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico entre os espécimes *in natura* e cultivados *in vitro*;
- Comparar as atividades antioxidantes dos espécimes *in natura* e cultivados *in vitro*;
- Comparar os teores dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico nos espécimes *in natura* e cultivados *in vitro*;
- Comparar os teores dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico nos espécimes cultivados *in vitro*, variando-se a concentração de ácido naftalenoacético (ANA);
- Comparar os teores dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico nos espécimes cultivados *in vitro*, variando-se a concentração de benzoaminopurina (BAP);

- Comparar a atividade antioxidante nos espécimes variando-se as condições de cultivo *in vitro*;
- Correlacionar os teores dos ácidos mono-hidroxi-cinâmicos, ácido cafeico e ácido rosmarínico com a atividade antioxidante dos espécimes cultivados *in vitro*.