

CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

**Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero *Lippia*
(Verbenaceae) nativas no Cerrado paulista**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

F979e Funari, Cristiano Soleo de
Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero
Lippia (Verbenaceae) nativas no Cerrado paulista / Cristiano
Soleo de Funari. – Araraquara : [s.n], 2010
197 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Produtos naturais. 2. Antioxidante. 3. Apoptose.
4. Desreplicação. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Formação acadêmica

2006-atual

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista

Título da tese: Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae) nativas no Cerrado paulista

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

2002-2005

Mestrado em Fármaco e Medicamentos

Universidade de São Paulo (USP)

Título da dissertação: Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos de cicatrização

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro

1993-1999

Graduação em Engenharia Química

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Formação acadêmica complementar

06/2010-06/2010

Estágio de doutorando

Universidade de Genebra (Suíça)

Supervisor: Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender

03/2009-01/2010

Estágio de doutorando

Università degli Studi di Salerno (Itália)

Supervisor: Prof. Dr. Cosimo Pizza

05/1995-04/1997

Iniciação Científica em catálise

Universidade Estadual de Campinas

Supervisor: Prof. Dr. Gustavo Paim Valença (FEQ-UNICAMP)

Atuação profissional

2003-2006 – Grupo Centroflora

Coordenou projetos relacionados ao uso racional da biodiversidade brasileira (corantes naturais, desenvolvimento de extratos padronizados por extração supercrítica, etc.) em parcerias com universidades, institutos de pesquisa e outras empresas.

2005/2008 - Ybios S.A.

Conselheiro suplente da empresa, tendo participado da elaboração de seu *Master Plan* enquanto funcionário do Grupo Centroflora.

2000/2001 – BASF Labiana S.A. (Espanha)

Coordenou a elaboração do projeto “Labiana Plant Sciences”, focado no desenvolvimento de produtos como suplementos alimentares, cosmecêuticos e fitoterápicos em parceria com a empresa *ADN Desarrollo y Aplicaciones de Productos Naturales* (Prof. Dr. Josep Allué Creus).

2003 – Natural Labor Análises e Pesquisas Ltda.

Elaborou pré-projeto para a implantação de uma empresa de extratos botânicos padronizados, definindo tecnologias apropriadas, dimensão de equipamentos e espécies para a composição de uma linha.

2000 – EEPG Ana Mesquita Laurini

Professor de Física no ensino médio da rede pública

1999 – Zeneca do Brasil

Estagiou no departamento de engenharia

1999/2004 – Apiário Dra. Abelha

Apicultor amador

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Investigation of south-eastern Brazilian propolis and its influence in skin wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 206-212, 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 178-182, 2005.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, M. B. ; SIQUEIRA, A. D. ; VALENÇA, G. P. ; **FUNARI, C. S.** Estudo da influência de variáveis de processo no tamanho de partículas, dispersão e na área metálica de catalisadores de prata suportada em alumina. In: 9º Congresso Brasileiro de Catálise, 1997, Águas de Lindóia. *Trabalhos Técnicos - 9º Congresso Brasileiro de Catálise, 1997.* v. 1. p. 49-56.

Artigo submetido a periódico científico, em fase de análise

CRISTIANO S. FUNARI, THAIS G. PASSALACQUA, DANIEL RINALDO, MARIA CLAUDIA M. YOUNG, GISELDA DURIGAN, ASSUNTA NAPOLITANO, MICHELA FESTA, ANNA CAPASSO, SONIA PIACENTE, COSIMO PIZZA, DULCE HELENA S. SILVA. Four interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanolic extracts. **Phytochemistry**.

Artigos em elaboração

CRISTIANO S. FUNARI, PHILIPPE EUGSTER, GISELDA DURIGAN, JEAN-LUC WOLFENDER, DULCE HELENA S. SILVA. Ultra-performance/Time-of-flight Mass Spectrometry as a Chemotaxonomic Toll for the Analysis of six Brazilian *Lippia* species. **Phytochemical Analysis**.

CRISTIANO S. FUNARI, THAIS G. PASSALACQUA, ASSUNTA NAPOLITANO, SONIA PIACENTE, COSIMO PIZZA, DULCE HELENA S. SILVA. Chemical and biological studies of *L. lupulina* Cham. (periódico a definir)

CRISTIANO S. FUNARI, DULCE HELENA S. SILVA. Status do conhecimento do gênero *Lippia* no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos/apresentações orais

CRISTIANO SOLEO FUNARI, THAIS GABAN PASSALACQUA, DANIEL RINALDO, MARIA CLAUDIA MARX YOUNG, GISELDA DURIGAN, ASSUNTA NAPOLITANO, MICHELA FESTA, ANNA CAPASSO, SONIA PIACENTE, COSIMO PIZZA, DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA. Four interconverting flavanones glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanolic extracts. In: XIX Congresso Della Società Italo-Latinoamericana de Etnomedicina, 2010, Cagliari. Apresentações orais - : XIX Congresso Della Società Italo-Latinoamericana de Etnomedicina.

FUNARI, C. S. ; MATTIOLI, F. M. ; ZINATO, J. R. ; YOUNG, M. C. M. ; TORRES, L. M. B. ; DURIGAN, G. ; NETTO, L. E. S. ; SAKUGAWA, A. ; SILVA, D. H. S. . Fracionamento biomonitorado de extratos de *Lippia salviaefolia* (Verbenaceae). In: VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP e III Reunião do BIOprospecTA, 2008, Araraquara. Apresentações orais - VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP e III Reunião do BIOprospecTA, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

FUNARI, C. S.; PASSALACQUA, T. G.; RINALDO, D.; YOUNG, M. C. M.; NAPOLITANO, A.; FESTA, M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SILVA, D. H. S. INTERCONVERTING FLAVANONE GLUCOSIDES FROM LIPPIA SALVIAEFOLIA. In: 2010 Joint Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy & the Phytochemical Society of North America, 2010, St Petersburg. Abstracts of the 2010 Joint Annual Meeting of ASP and PSNA, 2010. v. x. p. x-x.

ALVES, R. T.; REGASINI, L. O.; PASSALACQUA, T. G.; RIMOLDI, M. P. A; **FUNARI, C. S.**; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ALBUQUERQUE, S.; ROSA, G. A. da. Screening for trypanosidal and cytotoxic activities of *Lippia* species against trypanosoma cruzi and LLCMK2 cells. XIII Jornadas científicas de la facultad de farmacia – Universidad central de Venezuela Dr. Stephen Tillett.

PASSALACQUA, T. BG. ; REGASINI, L. O. ; AMBROSIO, D. L. ; **FUNARI, C. S.**; CICARELLI, R. M. B. ; BOLZANI, V. S. ; SILVA, D. H. S. . Anti-trypanosomal activity of six *Lippia* species. 2009. 2nd Brazilian Conference on Natural Products-Abstracts, 2009.

SKRZEK, S. C. G.; REGASINI, L. O.; **FUNARI, C. S.**; PEREIRA, C. M. M.; PAULETTI, P. M. ; SILVA, D. H. S. ; BOLZANI, V. S. ; GIACOMELLI, S. R. ; LINARES, C. E. . Caracterização fitogeográfica e sazonal de amostras de própolis do Estado do Rio Grande do Sul através da atividade antioxidante e antimalárica. In: VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP e III Reunião do BIOprospecTA, 2008, Araraquara. VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP e III Reunião do BIOprospecTA, 2008. v. 1.

FUNARI, C. S. ; MATTIOLI, F. M. ; ZINATO, J. R. ; YOUNG, M. C. M. ; SILVA, D. H. S. Lippia salviaefolia fractionation guided by antioxidant assays. In: X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Annals of the X international Congress of Ethnopharmacology, 2008.

MATTIOLI, F. M. ; **FUNARI, C. S.** ; SILVA, D. H. S. . Ensaio de inibição de beta-hematina a partir da espécie Lippia salviaefolia. In: X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Annals of the X International Congress of Ethnopharmacology, 2008.

SKRZEK, S. C. G. ; REGASINI, L. O. ; **FUNARI, C. S.** ; PEREIRA, C. M. M. ; PAULETTI, P. M. ; GIACOMELLI, S. R. ; LINARES, C. E. . Antioxidant activity and synergism of propolis samples form Rio Grande do Sul. In: X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Annals of the X International Congress of Ethnopharmacology, 2008.

FUNARI, C. S. ; BONFIM, D. C. ; SANTOS, L. de A. ; PAULETTI, P. M. ; SILVA, D. H. S. . Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da espécie Lippia salviaefolia (Verbenaceae). In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Trabalhos - 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

FUNARI, C. S. ; PAULETTI, P. M. ; SANTOS, L. de A. ; SILVA, D. H. S. . Search for antioxidant compounds in the species *Lippia salviaefolia* (VERBENACEAE). In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro. 1st Brazilian Conference on Natural Products-Abstracts, 2007. v. 1. p. BPS-100-BPS-100.

NETTO, L. E. S. ; SAKUGAWA, A. ; **FUNARI, C. S.** ; SILVA, D. H. S. . Screening organic hydroperoxide resistance inhibitors from Xylella fastidiosa in the species lippia salviaefolia (VERBENACEAE). In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro. 1st Brazilian Conference on Natural Products-Abstracts, 2007. v. 1. p. BPS-98-BPS-98.

MATTIOLI, F. M. ; **FUNARI, C. S.** ; SILVA, D. H. S. . Estudo químico de espécies do gênero Lippia (verbenaceae) nativas no cerrado paulista. In: 16º Encontro da SBQ Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2007, Franca. Livro de resumos - 16º Encontro da SBQ Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2007. v. 1. p. 160-160.

FUNARI, C. S. ; FERRO, V.O . Identificação de substâncias fenólicas em própolis coletada na Serra do Japi - SP. In: IX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF-USP, 2004, SÃO PAULO. Brazilian Journal of

Pharmaceutical Sciences. São Paulo : Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004. v. 40. p. 74-74.

FUNARI, C. S. ; VALENCA, G. P. Preparação de catalisadores de prata suportada sobre alumina. In: IV Congresso Interno de Iniciação Científica, 1996, Campinas. Livro de Resumos. Campinas : UNICAMP, 1996. v. 1. p. 97-97.

Revisões de artigos submetidos a revistas científicas

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2009; doi:10.1093/ecam/nep077

Journal of African Biotechnology, 2010: manuscript AJB – 10– 827

Supervisão de iniciação científica

No período do doutorado, foram supervisionados os trabalhos de iniciação científica das alunas de graduação Fernanda Mattioli Miranda (IQ-UNESP-Araraquara) e Thais Gaban Passalacqua (UNIP-Araraquara), no Brasil, e de Michela Iorio e Marilena Carrella (UNISA-Fisciano), na Itália.

Outras atividades

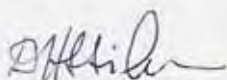
No âmbito do “Programa de Palestra para Alunos do Ensino Médio – Ano IX – CPEU”, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, foram ministradas três palestras intituladas “A importância dos antioxidantes na prevenção de doenças”, em 3 escolas da região de Araraquara (“EEPSG Capitão Henrique Montenegro” – Bocaina-SP; “Escola Técnica de Química” – Luiz Antônio – SP; “ETESG João Ferreira do Amaral” – Jaú – SP)

CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 20 de setembro de 2010.

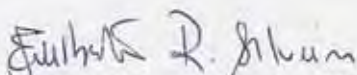
BANCA EXAMINADORA



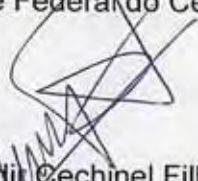
Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza - CE



Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Universidade Federal do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí - SC



Drª Mary Ann Foglio
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas – UNICAMP, Campinas

Dedico este trabalho à minha esposa, Teresa, e aos meus filhos, Joana e Antonio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades e inquietações concedidas.

À Prof^a. Dulce, pela orientação, pelos incentivos e apoio durante todo este trabalho de doutoramento.

Aos Professores do NuBBE (IQ-UNESP), em especial ao Prof. Ian Castro-Gamboa, ao Prof. Alberto Cavalheiro e à Prof^a. Dulce, pelas enriquecedoras conversas sobre o mundo científico e a sua filosofia.

Ao Prof. Cosimo Pizza e à Prof^a. Sonia Piacente, pela acolhimento na Universidade de Salerno e pelos ensinamentos durante a realização de estágio na Itália.

Ao Prof. Jean-Luc Wolfender, pelo acolhimento em seu laboratório, na Universidade de Genebra.

Ao Prof. Wagner Vilegas, pelas análises CLAE-DAD-DC realizadas em seu laboratório (Laboratório de Fitoquímica do IQ-UNESP) e pelas aulas na pós-graduação.

À Prof^a. Lourdes Campaner dos Santos (Laboratório de Fitoquímica do IQ-UNESP), pelas aulas na pós-graduação e pelas enriquecedoras conversas.

Às alunas de Iniciação Científica, Fernanda Matioli Miranda (IQ-UNESP), Thais Gaban Passalacqua (UNIP-Araraquara), Michela Iorio (UNISA-Itália) e Marilena Carrella (UNISA-Itália), pelas inúmeras contribuições a este trabalho.

Às Dr^{as}. Inês Cordeiro (Instituto Botânico de São Paulo), Giselda Durigan (Instituto Florestal – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) e Fátima Salimena (Universidade Federal de Juiz de Fora), pela identificação das plantas aqui estudadas.

Ao Dr. Nivaldo Boralle (IQ-UNESP) e à Dr^a. Milena Masullo (UNISA-Itália), pelos ensinamentos de RMN e pelos experimentos realizados.

À Dr^a. Assunta Napolitano, pelos auxílios durante o estágio na UNISA.

Ao Dr. Alberto Alcício, pelas inúmeras ajudas no dia a dia do trabalho.

Aos professores membros da comissão avaliadora deste trabalho de doutoramento, pelas sugestões e críticas construtivas durante a defesa, realizada no dia 20 de setembro de 2010.

Às funcionárias da biblioteca, guardiãs e zeladoras do tesouro deste Instituto, pelas aulas sobre as bases de dados, ajudas na formatação das referências deste trabalho e disposição em ajudar-nos.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, Célia, Patrícia, Wennia e Sandra, pelas orientações administrativas.

Aos amigos do Instituto de Química, por tornarem o dia a dia agradável e mais rico.

Ao amigo Clenilson Rodrigues, pela amizade, pelas discussões filosóficas sobre PN e pelas consultorias em informática.

Aos meus pais, por me ensinarem a crer na natureza.

Aos meus sogros, por apoiar-nos nestes anos de doutoramento.

À minha esposa Teresa, por sempre me incentivar e me apoiar, no trabalho e na vida.

Aos meus filhos, Joana e Antonio, “bravi bambini”, que me acompanharam e apoiaram neste trabalho e, principalmente, por me ensinarem muito e por me darem a oportunidade de evoluir nesta vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando no exterior (PDEE) concedida.

(Biodiversidade brasileira) “Quem não conhece, não possui”

RESUMO

A criação de um modelo nacional de saúde pautado nas aptidões e carências brasileiras é tida como fundamental para tornar o acesso à saúde pública mais abrangente e de melhor qualidade. O histórico do desenvolvimento mundial de medicamentos, a biodiversidade e os conhecimentos tradicionais associados a esta, e as competências científicas existentes no Brasil evidenciam a importância da bioprospecção. O gênero *Lippia* é amplamente empregado em etnomedicina e é constituído principalmente por espécies aromáticas. As investigações químicas e farmacológicas estão majoritariamente concentradas nos seus óleos essenciais, mas alguns componentes fixos, como flavonóides, fenilpropanóides, naftoquinóides e iridóides glicosilados já foram relatados. O Brasil abriga a maioria das espécies deste gênero, mas diversos problemas taxonômicos dificultam o estabelecimento de dados precisos. O *stress* oxidativo é apontado como ponto central no desenvolvimento de processos degenerativos associados ao envelhecimento e a diversas doenças. Conseqüentemente, terapias antioxidantes estão sendo propostas para o seu tratamento ou prevenção. Este trabalho descreve o fracionamento de extratos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia* guiado por testes antioxidantes que levou ao isolamento de 16 substâncias fenólicas, sendo 4 isômeros interconversíveis inéditos, 2S e 2R-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12a** e **12b**) e 2S e 2R-5,8,3',4'-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**13a** e **13b**), que foram identificadas em mistura por estudos extensivos de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. Foram isoladas também 8 substâncias do extrato de raízes de *L. lupulina*, selecionado com base em estudos iniciais de desreplicação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD). Os extratos e as substâncias isoladas de *L. salviaefolia* foram incubados com células humanas de rim HEK-293 expostas ao agente pro-oxidante hidroperóxido de *t*-butila. A aromanedrina (**6**) e a floretina (**7**) mostraram-se citoprotetoras. Estas foram testadas quanto às suas possíveis atividades tóxicas sobre as células HEK-293 e sobre células de melanomas humanos M14. A floretina (**7**) foi seletiva, induzindo apoptose em M14. Extratos, frações e substâncias isoladas foram testados contra 4 cepas de fungos patógenos, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*. O extrato de folhas de *L. sidoides* foi o mais ativo dos extratos testados e a mistura de isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b** apresentou a menor média de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) contra os fungos testados, mas as atividades mais pronunciadas foram observadas para a asebogenina (**2**) e verbascosídeo (**11**) contra *Cryptococcus neoformans* (CIM = 15,6 μ g/mL). As substâncias interconversíveis **12a**, **12b**, **13a** e **13b** tiveram as suas ocorrências verificadas nos extratos de origem por CLAE acoplada a detector de Dicroísmo Circular e as suas instabilidades a 25 °C, ao abrigo da luz e em pH 2,5 ou 6 foram constatadas, cada uma interconvertendo-se parcialmente nos seus 3 isômeros a partir de no máximo 1,7 horas após o seu isolamento. Descreve, ainda, os estudos comparativos de 15 extratos de 6 espécies do gênero *Lippia* quanto aos seus perfis cromatográficos e à ocorrência das substâncias previamente isoladas de *L. salviaefolia*, por CLAE-DAD e Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-ESI-TOF-MS).

Palavras-chave: *Lippia*. Antioxidante. Apoptose. Antifúngico. Flavonóide. Fenilpropanóide. Lignana. Triterpeno. Furanonaftoquinona. Piceíde. Iridóide. Furanocromona. Desreplicação. UHPLC. UPLC.

ABSTRACT

The creation of a national model of health guided by need and capacity in Brazil is seen as fundamental to making access to public health more comprehensive and of better quality. The historical development of world medicine, the biodiversity and traditional knowledge associated with this, and the scientific expertise available in Brazil highlight the significance of bioprospecting in this country. The genus *Lippia* is widely used in ethnomedicine. Since most of its species are aromatic, the studies on the chemistry and pharmacology of this genus are mainly focused in essential oils, but some fix compounds, such as flavonoids, phenylpropanoids, naphthoquinoids and iridoids glucosides have also been reported. It is estimated that Brazil hosts most of *Lippia* species, but several taxonomical problems related to this species hamper the establishment of accurate data difficult. Oxidative stress has a central role in the development of degenerative processes associated to aging and several diseases, including cancer and inflammation. Consequently, antioxidant therapies are being proposed for their treatment or prevention. This work describes the fractionation procedures of *L. salviaefolia* leaves and stems extracts guided by simple antioxidant assays which led to 16 phenolic compounds, including 4 novel interconverting isomers (2S) and (2R)-3',4',5,6-tetrahydroxyflavanone-7-O- β -glucopyranoside (**12a** and **12b**) and (2S) and (2R)-3',4',5,8-tetrahydroxyflavanone-7-O- β -glucopyranoside (**13a** and **13b**), which were identified in mixture by extensive use of 1D and 2D NMR and MS techniques. Additionally, other 8 compounds were isolated from the extract of roots of *L. lupulina*, which led to its selection for dereplication studies by High Pressure Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector (HPLC-DAD). The bioactivity evaluation of extracts and isolated compounds from *L. salviaefolia* was initiated by their incubation with human embryonic kidney HEK-293 cells exposed to the oxidant agent *tert*-butylhydroperoxide. Aromadendrin (**6**) and phloretin (**7**) showed cytoprotective activity and were assayed in order to checking their toxicities towards HEK-293 and transformed human melanoma M14 cancer cells, Compound **7** selectively induced apoptosis on the latter. Extracts, their fractions and isolated compounds were also tested for their antifungal potential towards human pathogenic fungal strains *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*. The extract of leaves of *L. sidoides* showed best activities among the extracts and the mixture of the isomers **12a**, **12b**, **13a** and **13b** presented the lower Minimum Inhibitory Concentration (MIC) average against the assayed fungi, but the best activities were observed for asebogenin (**2**) and verbascoside (**11**) against *Cryptococcus neoformans* (MIC = 15,6 μ g/mL). The presence of the interconverting flavanones **12a**, **12b**, **13a** and **13b** in the origin extracts was evidenced by HPLC coupled to Circular Dichroism spectrometry and their instability at 25 °C, in the dark and in pH 2,5 or 6 was evidenced. Each one partly interconverted in the other three isomers at maximum 1,7 hours from its collection. In addition, this work describes comparative studies among 15 extracts from different plat parts of 6 *Lippia* species regarding their chromatographic profiles and the occurrence of previously isolated compounds from *L. salviaefolia* extracts by HPLC-DAD and Ultra High Pressure Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-TOF-MS).

Keywords: *Lippia*. Antioxidant. Apoptosis. Antifungal. Flavonoid. Phenylpropanoid. Lignan. Triterpene. naphthoquinone. Piceid. Iridoid. Chromone. Dereplication. UHPLC. UPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Algumas substâncias com atividade antioxidante	37
Figura 3.1 -	Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs)	48
Figura 3.2 -	Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de ramos de <i>L. salviaefolia</i> (EERLs)	52
Figura 3.3 -	Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de raízes de <i>L. lupulina</i> (EERzLs)	54
Figura 3.4 -	Ilustração do seqüestro do radical livre DPPH·	57
Figura 4.1 -	Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H ₂ O 100:13,5:10 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a), com anisaldeído (b) e β -caroteno (c) . Amostras: EEFLs, EERLs e FHex1, FAc1, FBU1 e FAq1 do EEFLs	62
Figura 4.2 -	Cromatogramas CCD em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366 nm (b). Amostras: FHex1, FAc1, FBU1 e FAq1 de duas partições realizadas em duas épocas diferentes com o EEFLs	62
Figura 4.3 -	Atividade seqüestradora do radical livre DPPH· do extrato de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs) e de suas frações de partição obtidas com hexano (FHex1), acetato de etila (FAc1), n-butanol (FBU1) e água (FAq1)	63
Figura 4.4 -	Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366 nm (b) . Amostras entre chaves: A1, A2, A3, A4, A5 e A6 de experimentos realizados em épocas diferentes	64
Figura 4.5 -	Atividade seqüestradora de radicais DPPH· da fração FAc1 e das suas subfrações A1- A6	65
Figura 4.6 -	Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH- H ₂ O 100:13,5:10 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a), 366 nm (b) e com β -caroteno (c). Amostras: FAc1 e as suas subfrações A1-A6	65
Figura 4.7 -	Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H ₂ O 100:13,5:10 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366nm (b). Amostras, da esquerda para a direita: B1 a B17	66
Figura 4.8 -	Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm(a) e 366 nm (b) e com anisaldeído(c). Amostras, da esquerda para a direita: B7 a B17	66
Figura 4.9 -	Cromatograma CCD obtido em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H ₂ O 100:13,5:10 (v/v), revelado com β -caroteno. Amostras, da esquerda para a direita: B4 a B17	67
Figura 4.10 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: Água-MeOH em sistema gradiente) a $\lambda = 254$ nm. Amostras, de cima para baixo: EEFLs, B11, B10, B9 e B8	68

Figura 4.11 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; $\lambda=254$ nm), em escala analítica [F: 1 mL/min.; FM: H ₂ O-MeOH 7:3 (v/v)] (a) e preparativa [F: 15 mL/min, FM: H ₂ O -MeOH 67:33 (v/v)] (b), para a amostra B9	69
Figura 4.12 -	Substâncias isoladas do extrato de folhas de <i>L. salviaefolia</i> que foram testadas frente ao radical livre DPPH.	70
Figura 4.13 -	Atividades seqüestradoras do radical livre DPPH. das substâncias isoladas do extrato etanólico de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs)	71
Figura 4.14 -	Cromatogramas obtidos por CLAE (FE: C18; FM: gradiente H ₂ O-MeOH; $\lambda=254$ nm; F: 1 mL/min.). Amostras, de cima para baixo: extratos etanólicos de folhas e de ramos de <i>L. salviaefolia</i>	73
Figura 4.15 -	Cromatogramas CCD obtidos nos sistemas SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v) (a) ou AcOEt:MeOH:H ₂ O 100:13,5:10 (v/v) (b) para os extratos etanólicos de folhas (1) e de ramos (2) de <i>L. salviaefolia</i> . Da esquerda para a direita de (a) e (b): revelados sob luz UV a $\lambda=254$ nm, com anisaldeído ou com β -caroteno	73
Figura 4.16 -	Cromatograma CCD obtido em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H ₂ O 100:13,5:10 (v/v), revelado com β -caroteno. Amostras: alíquotas 1 a 37 obtidos por CPG da fração FBU2 (do EERLs)	74
Figura 4.17 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: Água-MeOH 65:35 (v/v); $\lambda=274$ nm], em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra G1	75
Figura 4.18 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: H ₂ O-MeOH 65:35 (v/v); $\lambda=274$ nm], em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra G2	76
Figura 4.19 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H ₂ O-MeOH; F: 1 mL/min.; $\lambda=254$ nm). Amostras: extratos etanólicos de folhas (a) e de ramos (b) de <i>L. salviaefolia</i> e de raízes de <i>L. lupulina</i> (c)	78
Figura 4.20 -	Cromatogramas obtidos por CLAE (FE: C18; FM: Água-MeOH 1:1; $\lambda=254$ nm), em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra H2	80
Figura 4.21 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: H ₂ O-MeOH 7:3 (v/v); $\lambda=230$ nm], em escala analítica (F: 0,6 mL/min) (a) e preparativa (F: 12,0 mL/min) (b), para a amostra I1	82
Figura 4.22 -	Substâncias isoladas do extrato etanólicos de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs)	83
Figura 4.23 -	Espectro de UV da substância 1	86
Figura 4.24 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 1 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	86
Figura 4.25 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	87
Figura 4.26 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (500 MHz, CD ₃ OD)	89
Figura 4.27 -	Espectro de UV da substância 2	91
Figura 4.28 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 2 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	92
Figura 4.29 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 7 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	93
Figura 4.30 -	Espectro de UV da substância 4	95

Figura 4.31 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	96
Figura 4.32 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	97
Figura 4.33 -	Substâncias isoladas do extrato etanólico de ramos de <i>L. salviaefolia</i>	98
Figura 4.34 -	Espectro de UV da substância 8	101
Figura 4.35 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 8	102
Figura 4.36 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 9	103
Figura 4.37 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 11	104
Figura 4.38 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 10	107
Figura 4.39 -	Substâncias isoladas do extrato etanólico de raízes de <i>L. lupulina</i>	108
Figura 4.40 -	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 14	110
Figura 4.41 -	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 15	111
Figura 4.42 -	Espectro de UV da substância 16	113
Figura 4.43 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 16	114
Figura 4.44 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 17	115
Figura 4.45 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 18	117
Figura 4.46 -	Espectro de UV da substância 19	120
Figura 4.47 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 19	120
Figura 4.48 -	Espectro de UV da substância 20	122
Figura 4.49 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 20	123
Figura 4.50 -	Espectro de UV da substância 21	126
Figura 4.51 -	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância 21	127
Figura 4.52 -	Isômeros 12a , 12b , 13a e 13b isolados do extrato etanólico de ramos de <i>L. salviaefolia</i> (EERLs), e também presentes no extrato de folhas da mesma espécie (EEFLs)	128
Figura 4.53 -	Espectro de RMN de ^1H da amostra G3 (500 MHz, CD_3OD)	130
Figura 4.54 -	Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H da amostra G3 (500 MHz, CD_3OD)	130
Figura 4.55 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C-18; FM: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 84:16 (v/v); F: 1 mL/min; $\lambda = 280$ nm] para a fração G3 (a) e para a reinjeção do isômero 12a (b), após 20 minutos de sua coleta	131
Figura 4.56 -	Cromatogramas obtidos por CLAE para a fração G3 [FE: C18; FM: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 83:17, com 0.1% TFA (v/v); F: 1 ml/min.], monitorados com detectores de dicroísmo circular (A) e de ultra-violeta (B) ($\lambda = 280$ nm). Espectros de dicroísmo circular, sobrepostos, das bandas capturadas a 62 e 64 min. (C), e a 94 e 102 min. (D)	132
Figura 4.57 -	Correlações observadas nos espectros de gHMBC em CD_3OD e em $\text{DMSO-}d_6$ para a mistura dos isômeros 2S e 2R-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (12a e 12b) e 2S e 2R-5,8,3',4'-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (13a e 13b)	135
Figura 4.58 -	Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 5,28/5,29 ppm (H-2 de 12a/12b) (11,7 T; CD_3OD)	135

Figura 4.59 -	Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 5,37/5,39 ppm (H-2 de 13a/13b) (11,7 T; CD ₃ OD)	136
Figura 4.60 -	Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 6,95 ppm (H-2' de 12a/12b) (11,7 T; CD ₃ OD)	136
Figura 4.61 -	Experimento TOCSY 1D a partir de G3, irradiando-se em 5,28/5,29 ppm (H-2 de 12a/12b) (11,7 T; CD ₃ OD)	137
Figura 4.62 -	Experimento TOCSY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 4,97 ppm (H1" de 12a/12b e 13a/13b) (11,7 T; CD ₃ OD)	137
Figura 4.63 -	Espectro de RMN de ¹³ C, obtido a partir da amostra G3 (500 MHz, CD ₃ OD)	138
Figura 4.64 -	Experimento gCOSY para a amostra G3 (11,7 T; CD ₃ OD)	138
Figura 4.65 -	Mapa de contornos gHMBC em DMSO-d ₆ para a amostra G3 (11,7 T)	139
Figura 4.66 -	Mapa de contornos gHMBC em CD ₃ OD para a amostra G3 (11,7 T)	139
Figura 4.67 -	Interconversões não enzimáticas entre 12a , 12b , 13a e 13b via abertura/reciclagem do anel C	143
Figura 4.68 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-DC [FE: C18; FM: Água-MeOH 83:17 com 0,1% de TFA (v/v); F: 1,0 mL/min; λ=286 nm]. Amostras, de cima para baixo: fração G3, EERLs e EEFLs	145
Figura 4.69 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-DC [FE: C18; FM: Água-MeOH 83:17 com 0,1% de TFA (v/v); F: 1,0 mL/min; λ=286 nm]. Amostras, de cima para baixo: extratos fescos de folhas (a) e de ramos (b) de <i>L. salviaefolia</i> , extraídos em EtOH acidificado com 0,1% de TFA (v/v) (pH ~ 2,5), e de folhas (c) e de ramos (d) extraídos em EtOH (pH ~ 6)	147
Figura 4.70 -	Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm, 1,7 μm; FM: H ₂ O (A) e MeOH (B) 8:2, ambos com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 μL/min.] para a fração G3, e logo após a coleta de cada isômero, 12a , 12b , 13b e 13a por CLAE-DAD empregando-se fase móvel acidificada a pH ~ 2,5	148
Figura 4.71 -	Estudo das estabilidades dos isômeros 12a (a), 12b (b), 13b (c) e 13a (d), mantidos ao abrigo da luz, a 25 °C e em pH ~ 2,5. Cromatogramas UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm, 1,7 μm; FM: H ₂ O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 μL/min.; Tempo de corrida: 12 min.] obtidos em tempos selecionados, após a coleta de cada substância por CLAE-DAD	149
Figura 4.72 -	Estudo das estabilidades dos isômeros 12a (a), 12b (b), 13b (c) e 13a (d), mantidos ao abrigo da luz, a 25 °C e em pH ~ 6. Cromatogramas UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm, 1,7 μm; FM: H ₂ O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 μL/min.; Tempo de corrida: 12 min.] obtidos em tempos selecionados, após a coleta de cada substância por CLAE-DAD	150
Figura 4.73 -	Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm; 1,7 μm; FM: H ₂ O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% TFA (v/v), em 12 min.; F: 420 μL/min.] para a fração G3 (a) e para cada um dos isômeros 12a (b), 12b (c), 13b (d), 13a (e), após 20,8 h de sua coleta, mantidos em meio acidificado (pH ~ 2,5)	152

- Figura 4.74** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), *L. balansae* (EEFLb), *L. velutina* (EEFLv), *L. sidoides* (EEFLsid) e *L. lupulina* (EEFLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV 154
- Figura 4.75** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs), *L. balansae* (EERLb), *L. velutina* (EERLv), *L. sidoides* (EERLs), *L. lupulina* (EERLlup) e de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna* (EEFRLias). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência 155
- Figura 4.76** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de flores de *L. balansae* (EEFILb) e de *L. lupulina* (EEFILlup), e de raízes de *L. sidoides* (EERzLsid) e de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência 156
- Figura 4.77** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, e de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência 158
- Figura 4.78** - Cromatograma obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B), no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* Cham. Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência 159
- Figura 4.79** - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] em análises dos três extratos fracionados no trabalho ora apresentado: extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, e de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência 160

- Figura 4.80** - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS (FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.) para os extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna* (EEFRLas) e de folhas de *L. lupulina* (EEFLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência 164
- Figura 4.81** - Comparação entre cromatogramas obtidos para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), em 5 minutos, por UPLC-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m); FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 450 μ L/min] (a) e em 60 minutos por CLAE-DAD [FE: coluna Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, acoplada a Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, 4 μ m); FM: H₂O (A) e MeOH (B), no gradiente: 30% a 50% de B em 25 min., atingindo 88,9% de B aos 60 minutos; F: 1 mL/min.] (b). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência 166
- Figura 4.82** - Comparação entre cromatogramas obtidos para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), em 60 minutos, por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2.1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] (a) e por CLAE-DAD [FE: Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, acoplada a Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, 4 μ m; FM: H₂O (A) e MeOH (B) no gradiente: 30% de B a 50% em 25 min., atingindo 88,9% de B aos 60 minutos; F: 1 mL/min.] (b). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência 167
- Figura 4.83** - Efeito antioxidante das substâncias aromadendrina (**6**) e fletina (**7**) em células HEK-293. As células pré-tratadas com **6** e **7** (1-20 μ M), por 24 h, foram incubadas com 5 mM DCHF-DA, com ou sem o agente *t*-BOOH a 300 mM, por 30 min. A produção de ERO foi analisada medindo-se a intensidade de fluorescência de DCF-DA. Os resultados estão expressos como valores médios de experimentos realizados em triplicatas (n=3) 170
- Figura 4.84** - Efeito da aromadendrina (**6**) e fletina (**7**) sobre o crescimento de células HEK-293 (A) e M14 (B) em ensaios utilizando MTT. As células foram tratadas com **6** e **7** (1-40 μ M) ou com solvente a 0.1%, por 48 h. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. $p < 0.05$, $p < 0.001$ versus células controle 172
- Figura 4.85** - Efeito das substâncias aromadendrina (**6**) e fletina (**7**) em apoptose de células M14. As células foram com **6** (A) and **7** (B) (1-40 μ M) por 48 h. A análise de apoptose foi realizada pelo método de coloração de iodeto de propídio (IP), usando citometria de fluxo. Os resultados estão mostrados como média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados 172

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Massas de partes de 6 espécies de <i>Lippia</i> extraídas por maceração a frio	43
Tabela 4.1 -	Massas e rendimentos obtidos nos processos de extração vegetal	61
Tabela 4.2 -	Massas e rendimentos das frações de partição dos extratos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de <i>L. salviaefolia</i> e de raízes (EERzLlup) de <i>L. lupulina</i>	61
Tabela 4.3 -	Massas e rendimentos das frações obtidas por CLV a partir da FAc do EEFLs, em três replicatas	64
Tabela 4.4 -	Massas das frações obtidas por Cromatografia Líquida sob Pressão Reduzida a partir da fração A2	66
Tabela 4.5 -	Massas de substâncias e/ou frações obtidas a partir do fracionamento das amostras B10, B13, B16 e C7 por CLV	68
Tabela 4.6 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das substâncias 1, 3 e 5a/5b (11,7 T)	84
Tabela 4.7 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das substâncias 2 e 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 11,7 T)	90
Tabela 4.8 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das substâncias 4 e 6 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 11,7 T)	94
Tabela 4.9 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das substâncias 8, 9 e 11 (CD ₃ OD; 11,7 T)	99
Tabela 4.10 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C e dos experimentos gCOSY, gHSQC e gHMBC da substância 10 (CD ₃ OD; 11,7 T)	105
Tabela 4.11 -	Dados de RMN de ¹³ C das substâncias 14 e 15 (CDCl ₃ ; 11,7 T)	109
Tabela 4.12 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C das substâncias 16 e 17 (CD ₃ OD; 11,7 T)	112
Tabela 4.13 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C, e dos experimentos gCOSY, gHSQC e gHMBC da substância 18 (CD ₃ OD; 11,7 T)	116
Tabela 4.14 -	Dados de RMN de ¹ H, de ¹³ C e dos experimentos gCOSY, gHSQC e gHMBC da substância 19 (CD ₃ OD; 11,7 T)	118
Tabela 4.15 -	Dados de RMN de ¹ H, de ¹³ C e dos experimentos gCOSY, gHSQC e gHMBC da substância 20 (CD ₃ OD; 11,7 T)	121
Tabela 4.16 -	Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C, e dos experimentos gCOSY, gHMBC e NOESY 1D da substância 21 (11,7 T, CD ₃ OD)	124
Tabela 4.17 -	Dados de RMN de 12a e 12b (11,7 T; CD ₃ OD)	128
Tabela 4.18 -	Dados de RMN de 13a e 13b (11,7 T; CD ₃ OD)	129
Tabela 4.19 -	Tempo de retenção (<i>t</i> _R) e λ _{max} das substâncias isoladas do EEFLs e EERLs, obtidos por CLAE-DAD	157
Tabela 4.20 -	Tempos de retenção (<i>t</i> _R) e dados de massas de alta resolução das substâncias fenólicas 1-13 utilizadas como referências	161
Tabela 4.21 -	Ocorrência de algumas substâncias nos extratos etanólicos de espécies do gênero <i>Lippia</i> analisados por UHPLC-ESI-TOF-MS	161
Tabela 4.22 -	Atividade antifúngica de extratos etanólicos de 6 espécies do gênero <i>Lippia</i> [valores expressados em CIM (µg/mL)]	175
Tabela 4.23 -	Atividades antifúngicas dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) de ramos (EERLs) de <i>L. salviaefolia</i> , de raízes de <i>L. lupulina</i> e de suas frações de partição [valores expressados em CIM (µg/mL)]	176

Tabela 4.24 - Atividades antifúngicas de algumas substâncias isoladas dos extratos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia* (**1-13**), e de raízes de *L. lupulina* (**14, 19 e 20**) [valores expressados em CIM ($\mu\text{g/mL}$)] 176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C-18	C-18: Octadecilsilano
CC	Cromatografia Líquida sob Pressão Atmosférica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-DAD-DC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detectores de Arranjo de Diodos e de Dicroísmo Circular
CLAEprep	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Escala Preparativa
CLAEsemiprep	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Escala Semi-preparativa
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
<i>d</i>	Dubleto
DC	Dicroísmo Circular
DCHF-DA	2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
<i>ddd</i>	Duplo Duplo Dubleto
<i>dl</i>	Dubleto Largo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DEPT	<i>Distortionless Enhanced by Polarization Transfer</i>
DPPH·	Radical Livre 2,2-Difenil-1-picrilidrazil
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EEFLb	Extrato Etanólico de Folhas de <i>L. balanseae</i> Briq.
EEFILb	Extrato Etanólico de Flores de <i>L. balanseae</i> Briq.
EEFILLup	Extrato Etanólico de Flores de <i>L. lupulina</i> Cham.
EEFLlup	Extrato Etanólico de Folhas de <i>L. lupulina</i> Cham.
EEFLs	Extrato Etanólico de Folhas <i>Lippia salviaefolia</i> Cham.

EEFLsid	Extrato Etanólico de Folhas <i>Lippia sidoides</i> Cham.
EEFLv	Extrato Etanólico de Folhas <i>Lippia velutina</i>
EEFRLlas	Extrato Etanólico de Folhas e ramos de <i>L. lasiocalycinna</i> Cham.
EERLb	Extrato Etanólico de Ramos de <i>L. balanseae</i> Briq.
EERLlup	Extrato Etanólico de Ramos de <i>L. lupulina</i> Cham.
EERLs	Extrato Etanólico de Ramos de <i>L. salviaefolia</i> Cham.
EERLsid	Extrato Etanólico de Ramos de <i>L. sidoides</i> Cham.
EERLv	Extrato Etanólico de Ramos de <i>L. velutina</i>
EERzLlup	Extrato Etanólico de Raízes de <i>L. lupulina</i>
EERzLsid	Extrato Etanólico de Raízes de <i>L. sidoides</i>
EM	Espectrometria de Massas
ERO	Espécies Reativas de oxigênio
ESI-IT-MS	Espectrometria de Massas – Interface de Ionização por Electrospray - Armadilha de Íons
EtOH	Etanol
F	Fluxo
FAc	Fração Acetato de Etila
FAq	Fração Aquosa
FBu	Fração <i>n</i> -Butanólica
FE	Fase Estacionária
FHex	Fração Hexânica de Partição
FM	Fase Móvel
gCOSY	<i>gradient Correlated Spectroscopy</i>
gHMBC	<i>gradient Heteronuclear Bond Correlation</i>
gHMQC	<i>gradient Heteronuclear Quantum Coherence</i>
gHSQC	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hex	Hexano
HOAc	Ácido Acético
HRESITOFMS	Espectrometria de massas de alta resolução com interface de ionização por electrospray e analisador por tempo de vôo.
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-3-H-brometo de tetrazolium
<i>m/z</i>	Razão Massa-Carga
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>

NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PTFA	Politetrafluoretileno
RDA	Reação de Retro Diels-Alder
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
s/	Singleto largo
T	Tesla
t	Tripleto
tl	Tripleto Largo
t-BOOH	Hidroperóxido de t-butila
TFA	Ácido Trifluoracético
TOCSY ¹	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
t _R	Tempo de Retenção
UHPLC-ESI-TOF-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão-Interface de Ionização por Electrospray-Analisador por Tempo de Vôo-Espectrometria de Massas de Alta Resolução
UV	Luz Ultravioleta
CLV	Cromatografia Líquida Sob Pressão Reduzida
V _m	Volume Morto Estimado

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CHCl_3	Clorofórmio
NH_4OH	Hidróxido de amônio
SiOH	Sílica gel
ϵ	Coefficiente de extinção molar ou absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico, em ppm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	29
1.1 O CONTEXTO PARA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL	29
1.2 A FAMÍLIA Verbenaceae E O GÊNERO <i>Lippia</i>	31
1.2.1 Dados etnobotânicos, farmacológicos e químicos do gênero <i>Lippia</i>	32
1.2.2 A investigação do gênero <i>Lippia</i> no Brasil	32
1.2.2.1 Dados farmacológicos	32
1.2.2.2 Dados químicos	33
1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAIS	39
3.1.1 Amostras	39
3.1.2 Solventes	40
3.1.3 Fases Estacionárias e suportes para cromatografia	40
3.1.4 Reveladores para cromatografia em camada delgada	41
3.1.5 Equipamentos	41
3.2 MÉTODOS	42
3.2.1 Secagem, moagem e extração do material vegetal	42
3.2.2 Análises cromatográficas de extratos e frações	43
3.2.2.1 Análises de extratos e frações por cromatografia em camada delgada	43
3.2.2.2 Estudos comparativos por CLAE-DAD e UHPLC-ESI-TOF-MS	43
3.2.2.3 Estudos da mistura isomérica G3 por CLAE-DAD-DC	45
3.2.2.4 Estudos de interconversões dos isômeros 12/13 por UPLC-ESI-TOF-MS	45
3.2.3 Processos de fracionamento	46
3.2.3.1 Informações gerais	46
3.2.3.2 Fracionamento guiado do extrato de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs)	47
3.2.3.2.1 Extração líquido-líquido de EEFLs	48
3.2.3.2.2 Fracionamento de FAc1 de EEFLs por CLV em fase reversa	49
3.2.3.2.3 Fracionamento de A2 por CLV em fase reversa	50
3.2.3.2.4 Fracionamento de B9 por CLAEprep em fase reversa	50
3.2.3.2.5 Fracionamento de B10 por CLV em fase reversa	50
3.2.3.2.6 Fracionamento de B13 por CLV em fase normal	51
3.2.3.2.7 Fracionamento de B16 por CLV em fase normal	51
3.2.3.2.8 Fracionamento de C7 por CLV em fase normal	51
3.2.3.3 Fracionamento guiado do extrato de ramos de <i>L. salviaefolia</i> (EERLs)	52
3.2.3.3.1 Extração líquido-líquido de EERLs	52
3.2.3.3.2 Fracionamento de FBU2 do EERLs por CPG	52
3.2.3.3.3 Fracionamento de G1 e G2 por CLAEsemiprep em fase reversa	53
3.2.3.3.4 Fracionamento de G3 por CLAEsemiprep em fase reversa	53
3.2.3.4 Fracionamento do extrato de raízes de <i>L. lupulina</i> (EERzLlup)	53
3.2.3.4.1 Extração líquido-líquido de EERzLlup	54
3.2.3.4.2 Fracionamento de FHex3 por MPLC em fase normal	54
3.2.3.4.3 Fracionamento de FAc3 por CC em fase normal	55
3.2.3.4.4 Fracionamento de H2 por CLAEsemiprep em fase reversa	55
3.2.3.4.5 Fracionamento de FBU3 por CPG	55
3.2.3.4.6 Fracionamento de I1 por CLAEprep em fase reversa	55

3.2.4 Testes de atividade	56
3.2.4.1 Testes antioxidantes	56
3.2.4.1.1 Atividade protetora do β -caroteno	56
3.2.4.1.2 Determinação da capacidade de captura do radical livre DPPH.	56
3.2.4.1.3 Estimativa da atividade antioxidante intracelular	57
3.2.4.2 Ensaio antiproliferativo com MTT	58
3.2.4.3 Análise de apoptose	59
3.2.4.4 Teste antifúngico	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 EXTRATOS OBTIDOS	61
4.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE EEFLs, EERLs e EERzLlup	61
4.3 FRACIONAMENTO DE EEFLS GUIADO POR TESTES ANTIOXIDANTES	62
4.3.1 Análise das frações de partição e rendimentos	62
4.3.2 Atividades antioxidantes das frações de partição	63
4.3.3 Fracionamento de FAc de EEFLs por CLV em fase reversa	64
4.3.3.1 Análise das subfrações e rendimentos	64
4.3.3.2 Análises das atividades antioxidantes das subfrações obtidas de FAc1	65
4.3.3.3 Fracionamento de A2 por CLV em fase reversa	66
4.3.3.3.1 Análise das subfrações e rendimentos	66
4.3.3.3.2 Atividades antioxidantes das subfrações B1-B17	67
4.3.3.3.3 Fracionamento de B10, B13, B16 e C7 por CLV	68
4.3.3.3.4 Fracionamento de B9 por CLAEprep	69
4.3.3.3.4 Atividades antioxidantes das substâncias isoladas de A2	70
4.4 FRACIONAMENTO DO EERLs GUIADO POR TESTES ANTIOXIDANTES	72
4.4.1 Análises comparativas entre FBU1 (de EEFLs) e FBU2 (de EERLs)	72
4.4.1.1 Fracionamento de FBU2 por CPG e atividade protetora de β -caroteno	73
4.4.1.1.1 Fracionamento de G1 por CLAEsemiprep	74
4.4.1.1.2 Fracionamento de G2 por CLAEsemiprep	76
4.4.1.1.3 Fracionamento de G3 por CLAEsemiprep	77
4.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EERZLLUP	77
4.5.1 Extração líquido-líquido de EERzLlup	78
4.5.1.1 Fracionamento de FHex3 por CLMP em fase normal	79
4.5.1.1.1 Fracionamento de FAc3 por CC em fase normal	79
4.5.1.1.2 Fracionamento de H2 por CLAEsemiprep em fase reversa	79
4.5.1.1.3 Fracionamento de FBU3 por cromatografia de permeação em gel	80
4.5.1.1.4 Fracionamento de I1 por CLAEPrep em fase reversa	81
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS	82
4.6.1 Substâncias do extrato etanólico de folhas de <i>L. salviaefolia</i> (EEFLs)	83
4.6.1.1 Flavanonas (1 , 3 e 5a/5b)	83
4.6.1.2 Diidrochalconas (2 e 7)	90
4.6.1.3 Flavona (4) e flavanonol (6)	94
4.6.2 Substâncias do extrato etanólico de ramos de <i>L. salviaefolia</i> (EERLs)	98
4.6.2.1 Fenilpropanóides (8 , 9 e 11)	98
4.6.2.2 Epoxilignana (10)	105
4.6.3 Substâncias do extrato etanólico de raízes de <i>L. lupulina</i> (EERzLlup)	108
4.6.3.1 Triterpenos (14 e 15)	109
4.6.3.2 Furanonaftoquinonas (16 e 17)	112
4.6.3.3 Furanocromona (18)	116
4.6.3.4 Isoflavona triglicosilada (19)	117

4.6.3.5 Estilbeno (20)	121
4.6.3.6 Iridóide (21)	124
4.7 ELUCIDAÇÃO E ESTUDOS DOS ISÔMEROS 12a , 12b , 13a e 13b	127
4.7.1 Elucidação estrutural	127
4.7.2 Ocorrência dos isômeros no extrato de origem e em extratos frescos	145
4.7.3 Estudo de interconversões entre isômeros por UHPLC-ESI-TOF-MS	148
4.8 ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE 6 ESPÉCIES DE <i>LIPPIA</i>	153
4.8.1 Análises por CLAE-DAD	153
4.8.2 Análises por UHPLC-ESI-TOF-MS	158
4.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	169
4.9.1 Estimativa da atividade antioxidante intracelular	169
4.9.2 Efeitos das substâncias 6 e 7 na proliferação de células HEK-293 e M14	171
4.9.3 Efeitos das substâncias 6 e 7 em apoptose de células HEK293 e M14	172
4.9.4 Teste antifúngico	174
5. CONCLUSÕES	178
REFERÊNCIAS	182

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 O CONTEXTO PARA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL

A criação de um modelo nacional de saúde, pautado nas aptidões e carências brasileiras, é tida como fundamental para tornar o acesso à saúde pública mais abrangente e de melhor qualidade, bem como para estimular a competitividade brasileira no segmento farmacêutico. A situação em que o país se encontra hoje, de mero pagador de *royalties* para grandes laboratórios estrangeiros, o que se acentuou após a promulgação da legislação sobre propriedade intelectual, em 1996, torna o processo de inclusão no sistema vigente muito oneroso ou, muitas vezes, não atende às suas necessidades específicas (FUNARI; FERRO, 2005; VOGT, 2001).

O desenvolvimento de medicamentos para as ditas doenças negligenciadas, incidentes no Brasil e em outros países em desenvolvimento (LINDOSO; LINDOSO, 2009), tais como tuberculose, malária, mal de chagas, leishmaniose e doença do sono pouco interessa à indústria farmacêutica, pois embora estes países reúnam 80% da população mundial, correspondem a apenas 20% das vendas globais de remédios. Como consequência, entre 1975 e 1999, 15 novos fármacos foram desenvolvidos para o tratamento destas doenças, sendo que no mesmo período surgiram 179 drogas para atender portadores de doenças cardiovasculares, embora ambos os grupos correspondam a 12% do total de enfermos do planeta (ATAS, 2003; MOREL, 2003; RENSLO; MCKERROW, 2006).

Este debate torna-se ainda mais relevante se considerarmos a rica biodiversidade do Brasil, que concentra cerca de 20% de toda a flora mundial (SANT'ANA; ASSAD, 2002) e conta com conhecimentos tradicionais associados a ela. Estes recursos, quando associados a competências científico-tecnológicas, reconhecidamente podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitoterápicos a custos mais baixos, com maior rapidez e com menores efeitos colaterais quando comparados ao desenvolvimento de uma nova molécula sintética (CALIXTO, 2005; CRAGG, GROTHAUS; NEWMAN, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2007), sendo uma estratégia recomendada pela

própria Organização Mundial da Saúde para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos nos países em desenvolvimento (World Health Organization, 2002).

De fato, se considerarmos que 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados provém direta ou indiretamente da biodiversidade (CRAGG; NEWMAN, 2007; YUNES; CALIXTO, 2001) e que 30% das drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (órgão regulador estadunidense), entre 1983 e 1994, foram produtos naturais ou seus derivados, ou, ainda, que entre 1981 e 2002, segundo Cragg e Newman (2007) apenas 39% das 877 pequenas moléculas das novas entidades químicas desenvolvidas podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas em sua origem, nota-se que esta é uma estratégia ainda comum nos países industrializados, muitas vezes a partir de material biológico e conhecimentos tradicionais oriundos dos países em desenvolvimento, sem que haja qualquer partilha de benefícios com estes (LOBO, 2003).

Em classes específicas, como a dos agentes antiinfeciosos (antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários e antivirais) e anticâncer, a participação da natureza é ainda mais pronunciada. Entre 1981 e 2002, perto de 70% dos antiinfeciosos desenvolvidos foram derivados ou inspirados na natureza (CRAGG; NEWMAN, 2007), enquanto que entre 1981 e 2008, 63% dos agentes anticâncer podem ser consideradas desta categoria (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

No processo de padronização de um derivado de planta (extrato, fitomedicamento, etc.), toma-se uma substância (ou mais, ou, ainda, uma classe de substâncias) como referência, de preferência aquela identificada como sendo a responsável pela(s) atividade(s) biológica(s) comprovada(s) para a espécie em questão, garantindo-se teores mínimos desta no produto final, que passa a ser chamada, então, de marcador fitoquímico. Este ponto é um limitante quando se trata do desenvolvimento de fitomedicamentos a partir de plantas brasileiras, já que a disponibilidade de informações científicas desta natureza é baixa e a oferta de padrões fitoquímicos aplicáveis ao controle de qualidade de espécies nacionais e de seus derivados é muito pequena (SIANI, 2003). Como consequência, nota-se uma enorme predominância no mercado brasileiro de medicamentos e fitoterápicos elaborados a partir de espécies européias e asiáticas (CARVALHO et al., 2008).

Fica evidente, então, a importância de programas de bioprospecção no Brasil focados na busca de novos indícios terapêuticos, como um instrumento tanto para a descoberta de alternativas para o tratamento de doenças que assolam a sua população e para a conservação de ecossistemas ameaçados por práticas destrutivas, como para estimular o crescimento de sua economia, inserindo-o de forma competitiva no mercado farmacêutico, que movimentou aproximadamente 750 bilhões de dólares em 2009 (NIERO, 2010).

1.2 A FAMÍLIA Verbenaceae E O GÊNERO *Lippia*

A família Verbenaceae compreende aproximadamente 1035 espécies e 36 gêneros, com ampla distribuição em zonas tropicais e temperadas (BRANDÃO et al., 2007; JUDD et al., 1999). Alguns dos seus gêneros vêm se destacando por seus usos medicinais, como *Lantana*, *Stachytarpheta* e, notadamente, o gênero *Lippia* (PASCUAL et al., 2001; VICCINI et al., 2006).

O gênero *Lippia* reúne aproximadamente 200 taxa e 160 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, muitas das quais são ricas em óleos essenciais (CAVALCANTI et al., 2010; MENDES et al., 2010; VICCINI et al., 2006). Estas espécies estão distribuídas principalmente entre África Tropical, México, América Central, Paraguai, Argentina e Brasil, que conta com aproximadamente 70-75% destas (JUDD et al., 1999; VICCINI et al., 2004; VICCINI et al., 2006). Muitas das espécies brasileiras são endêmicas e estão concentradas na Serra do Espinhaço, Minas Gerais e Goiás, onde crescem entre rochas. Devido às suas características e à atividade humana nestas regiões, como a mineração, por exemplo, estas espécies endêmicas estão em risco de extinção (VICCINI et al., 2006).

Muitos problemas taxonômicos envolvendo alguns dos gêneros da família Verbenaceae têm sido apontados. No gênero *Lippia*, por exemplo, o maior problema está na definição de espécies, com muitas controvérsias com relação ao desmembramento de alguns gêneros, como *Phyla* e *Aloysia*, de *Lippia*. Em muitos casos, esta dificuldade de delimitação é devida à ausência de bons caracteres taxonômicos (VICCINI et al., 2006). Como resultado, muitas plantas vêm sendo classificadas incorretamente, com dificuldades em informações precisas de distribuições geográficas e números de espécies (SALIMENA, 2002). Os esforços no

sentido de resolver estes problemas estão focados principalmente em estudos citogenéticos (BRANDÃO et al., 2007; VICCINI et al., 2004; 2006).

1.2.1 Dados etnobotânicos, farmacológicos e químicos do gênero *Lippia*

O amplo emprego popular de espécies deste gênero ao redor do mundo concentra-se majoritariamente no tratamento de disfunções gastrointestinais ou respiratórias e hipertensão, sendo relatadas somente duas espécies tóxicas (*L. rehmani* H.H.W. Pearson e *L. javanica* N.L. Burm.) (COSTA et al., 2005; PASCUAL et al., 2001). Contrastando com este amplo uso popular, poucos estudos farmacológicos vêm sendo relatados para o gênero *Lippia*, concentrando-se majoritariamente sobre as atividades antimicrobiana, antifúngica, repelente ou larvicida de seus óleos essenciais (PASCUAL et al., 2001). Os estudos químicos também concentram-se quase que exclusivamente em análises de óleos essenciais de espécies de *Lippia*, sendo os componentes mais comumente encontrados: α -pineno, 1,8-cineol, limoneno, cânfora, mircenona, carvona, *p*-cimeno, linalol, α -tujeno, timol, neral, geranial, carvacrol, α e β -ememeno, β -cariofileno (MAIA et al., 2005; ZOGHBI et al., 2002). Os componentes fixos relatados no gênero distribuem-se entre ácidos fenólicos, flavonóides, fenilpropanóides, naftoquinóides, iridóides glicosilados, dentre outros (MENDES et al., 2010; PASCUAL et al., 2001).

1.2.2 A investigação do gênero *Lippia* no Brasil

Embora o gênero *Lippia* esteja espalhado por todo o território brasileiro, os estudos relatados concentram-se em espécies com empregos populares nas região Nordeste do país, onde algumas delas foram incluídas nos programas oficiais de atenção primária de saúde (LORENZI; MATOS, 2002), destacando-se as espécies *L. alba* (Mill.) N.E. Br. e *L. sidoides* Cham. Salvo a exceção para as espécies *L. lupulina* Cham. e *L. alba*, sendo a última comum a todo o território nacional, praticamente não há relatos sobre composição química ou atividades farmacológicas de espécies do gênero *Lippia* nativas no Estado de São Paulo. Dentro do banco de dados eletrônico SinBiota, do programa BIOTA-FAPESP, foram registradas 4 espécies: *L. lupulina* Cham., *L. lasiocalycina* Cham., *L. salviaefolia* e *L. stachyoides* (FAPESP, 2006). DURIGAN et al. (2004) registraram, ainda, a ocorrência de outras duas espécies no cerrado paulista, sendo *L. balansae* Briq. e *L. velutina*.

1.2.2.1 Dados farmacológicos

No cenário científico brasileiro destacam-se as espécies *L. sidoides* Cham. e *L. alba* (Mill.) N.E. Br., muito empregadas na medicina tradicional e incluídas em programas governamentais de atendimento primário à saúde, principalmente na região Nordeste (COSTA et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002; SILVA, M. et al., 2006). A primeira foi incluída recentemente na lista de 71 espécies da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). As infusões de suas partes aéreas são empregadas como anti-sépticos para usos gerais em pele, boca, gengiva, nariz e garganta (BOTELHO et al. 2007a; BOTELHO et al., 2007c; LEMOS et al., 1990; MATOS, 1999). O óleo essencial extraído das mesmas partes demonstrou atividades contra fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas (BARA; VANETTI, 1998; BOTELHO et al., 2007a,b,c; FONTENELLE et al., 2007; GIRÃO et al., 2003; LACOSTE et al., 1996; LEMOS et al., 1990; OLIVEIRA, F. et al., 2006; BOTELHO et al., 2009). Também teve relatadas suas ações citotóxica (COSTA et al., 2001), antiinflamatória (BOTELHO et al., 2009; GIRÃO et al., 2003), larvicida (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004) e acaricida (CAVALCANTI et al., 2010), dentre outras.

A *L. alba* (Mill.) N.E. Br. teve relatadas as suas atividades analgésica (COSTA et al.1989), ansiolítica, sedativa, relaxante muscular e hipotermiante (GAZOLA et al., 2004; VALE et al., 1999; ZÉTOLA et al. 2002), anticonvulsivante (VIANA et al., 2000), antiviral (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al. 2005) e antimicrobiana contra bactérias e fungos (DUARTE et al., 2005; HOLETZ et al., 2002). Contudo, segundo uma recente revisão bibliográfica organizada por Hennebelle et al. (2008), até então havia dados científicos suficientes que respaldavam o seu uso como antiinfeciosa e analgésica, necessitando estudos complementares que comprovassem a sua ação ansiolítica e sedativa.

As espécies *L. microphylla* Cham., *L. gracillis* H. B. K., *L. aff. gracillis* Schauer e *L. origanoides* H.B.K. tiveram atividades anti-sépticas constatadas (LEMOS et al., 1992; OLIVEIRA D. et al., 2006; OLIVEIRA D. et al., 2007; PESSOA et al., 2005; SANTOS et al., 2004; SOUZA et al., 2007).

1.2.2.2 Dados químicos

Análises de óleos essenciais extraídos de partes aéreas de *L. sidoides* Cham. levaram à identificação dos componentes majoritários timol (9,79-80,8%) e carvacrol (1,88-47,7%), além muitos outros monoterpenos e sesquiterpenos minoritários, tais como α -terpineno, p-cimeno, 1,8-cineol e β -cariofileno (CAVALCANTI et al., 2004; LEMOS et al., 1990). Os componentes isolados de extratos polares desta espécie foram os flavonóides quercetina, luteolina, taxifolina e glicoluteolina, a lignana isolaricirresinol, as quinonas lapachenol, tecomaquinona, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, lippsidoquinona, isocatalponol, β -sitosterol e o 6-oxo-3,4,4a,5-tetraidro-3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano e os ácidos palmítico, esteárico, beênico, araquídico e lignocérico (COSTA et al., 2001; COSTA et al., 2002; LEMOS et al. 1999; MACAMBIRA et al., 1986; SANTOS et al., 2005).

Análises dos constituintes voláteis das folhas de *L. alba* (Mill.) N.E. Br. demonstraram haver uma grande variabilidade química nesta espécie, o que levou alguns autores a proporem a divisão em quimiotipos, em função da predominância de um ou mais dos seguintes componentes: linalol, citral, mirceno, γ -terpineno, limoneno, carvona, 1,8-cineol, sabineno, germacreno D, geranial, neral e β -cariofileno, cânfora e estragol (FRIGHETTO et al., 1998; HENNEBELLE et al., 2006b; MATOS et al., 1996; TAVARES et al., 2005; ZOGHBI et al., 1998). Barbosa, Lima e Silveira (2005) identificaram em suas folhas os componentes fixos 5,5'-diidroxí-6,4',6',3''',4'''-pentametoxi-[C₇-O-C₇]-biflavona e 4',4''',5,5''-tetraidroxí-6,6''',3''-trimetoxi-[C₇-O-C₇]-biflavona. Além destes, segundo Hennebelle et al. (2008), outros autores isolaram de folhas desta espécie os iridóides glicosilados geniposídeo, tevesídeo, e shanzhizídeo metil ester, ácido geniposídico, carioptosídeo, 8-epiloganina e mussaenosídeo; os feniletanóides/fenilpropanóides isonuomiosídeo, decafeoilverbascosídeo, verbascosídeo, 2''-acetilverbascosídeo, isoverbascosídeo, calceolariosídeo E, forsitosídeo B e cistanosídeo F; e os flavonóides glicosilados apigenina-7-glucuronídeo, luteolina-7-glicuronídeo, clerodendrina, luteolina-7-diglucuronídeo e 3''-acetilclerodendrina. De extrato de raízes de *L. alba* foram isolados os iridóides glicosilados mussaenosídeo, teviridosídeo e gardosídeo (SENA FILHO et al., 2007).

Investigações a partir de óleo essencial obtido de folhas de *L. microphylla* Cham. evidenciaram a predominância do monoterpeneo 1,8-cineol (36,0-36,4%), além da presença em quantidades acima de 10% de α -pineno, 4-terpineol, α -terpineol e timol (COSTA et al., 2005; LEMOS et al., 1992). Já no óleo essencial de folhas da espécie *L. gracillis* verificou-se a predominância do timol (4,8-30,6%), enquanto que no da espécie denominada *L. aff. gracilis* a substância predominante foi o carvacrol (46,9-54,4%) (LEMOS et al., 1992; MATOS et al., 1999; PESSOA et al., 2005). Análises dos óleos essenciais das espécies amazônicas *L. origanoides* H.B.K. e *L. grandis* Schau foram caracterizadas por elevados teores de carvacrol (33,5-42,9%) e timol (5,1-18,5%), e de timol (19,3 – 69,7%) e 1,8-cineol (22,2 – 56%), respectivamente (MAIA et al., 2003; OLIVEIRA, D. et al., 2006; SANTOS et al., 2004). ZOGHBI et al. (2002) identificaram no óleo essencial da espécie *L. lupulina* Cham. arilpropanóides e sesquiterpenos oxigenados como componentes predominantes. A literatura traz, ainda, relatos sobre a composição de óleos essenciais das espécies *L. glandulosa* Shauer, *L. alnifolia*, *L. aff. aristata* Schau., *L. aristata* Schau., *L. grata* Schau e *L. aff. sidoides* Cham. (CRAVEIRO et al., 1981; MAIA et al., 2005), dentre outros.

1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

É sabido que os radicais livres (*quaisquer compostos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo*) e outras espécies reativas do oxigênio (ERO) são continuamente produzidas em sistemas biológicos e desempenham diferentes papéis, alguns positivos (produção de energia, fagocitose, etc.) e outros negativos, relacionados ao ataque a lipídios da membrana celular, proteínas em tecidos e enzimas, carboidratos e ácidos nucléicos (como o DNA) (AUGUSTO, 2006; PIETTA, 2000). Com a necessidade de combater o excesso de radicais produzidos pelo organismo, os seres vivos desenvolveram sofisticados mecanismos antioxidantes de defesa, divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Estes últimos são constituídos de moléculas produzidas pelo próprio corpo, chamados endógenos; ou de fontes externas, como alimentos, chamados exógenos, que agem como redutores de radicais, seqüestradores de radicais livres, complexantes de metais de transição (catalisadores na formação de ERO) e/ou por

captura de oxigênio singlete ou outras espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; MASELLA et al., 2005).

Contudo, algumas vezes estimulada por fatores externos (injúria físicas, dieta, tabagismo, etc.) ou pelo próprio envelhecimento biológico, pode-se chegar a uma situação de desequilíbrio, chamado *stress* oxidativo, em que a produção de ERO excede a sua eliminação pelos sistemas antioxidantes protetores (GILGUN-SHERKI et al., 2002; PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998), que vem sendo apontado como ponto central no desenvolvimento de processos degenerativos associados ao envelhecimento e a diversas doenças, tais como aterosclerose, Alzheimer, artrite, esclerose múltipla, doenças inflamatórias, auto-imunes e cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer (BERNONVILLE et al., 2010; MASELLA et al., 2005; PIETTA, 2000). Conseqüentemente, terapias antioxidantes estão sendo propostas para o tratamento ou prevenção de muitas disfunções, como danos ao sistema nervoso central, inflamações, isquemia e paralisia cerebrais, aterosclerose, doenças cardiovasculares e câncer (COX; COHEN, 1996; CUZZOCREA et al., 2001; GILGUN-SHERKI et al., 2002; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) e que incluem a ingestão de alimentos ou suplementos alimentares ricos em agentes quimiopreventivos (ARROO et al., 2009).

Neste contexto, a busca por substâncias de origem natural com atividades antioxidantes sobre ERO específicas, com disponibilidades suficientes *in vivo*, dentre outros pré-requisitos, vem se intensificando nos últimos anos por ser considerada uma estratégia interessante no desenvolvimento de novas drogas (HOSTETTSMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Entre os diferentes grupos de metabólitos secundários de plantas que exibem atividade antioxidante, vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e polifenóis, como os flavonóides) estão entre os mais importantes (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAN, 2005; TSAO; DENG, 2004; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). A ação destas substâncias pode ocorrer pelos seguintes mecanismos:

(a) Interferindo em reações em cadeia formadoras de radicais livres, de modo a retardarem a formação de radicais iniciadores. Assim atuam, por exemplo, ceras epicuticulares vegetais, que refletem fisicamente a radiação ultravioleta, evitando a formação de radicais livres, ou os agentes complexantes capazes de desativar íons

metálicos catalisadores de diversos processos oxidativos por meio de quelatação. São exemplos de complexantes os ácidos ascórbico, tartárico e cítrico.

(b) O segundo mecanismo baseia-se na característica de algumas substâncias de reagirem rapidamente com radicais livres de uma cadeia oxidativa, impedindo-a de progredir. Aqui, distinguem-se as substâncias facilmente oxidáveis, que interceptam e desativam os antioxidantes, convertendo-os em componentes pouco reativos, como os flavonóides quercetina e miricetina e o α -tocoferol; e substâncias coloridas que absorvem em comprimentos de onda bio-lesivos, evitando processos de oxidação, como os carotenóides presentes em frutos e raízes comestíveis e diversos flavonóides (canferol, por exemplo), que além de agirem por suas características fenólicas (a propriedade redutora de suas hidroxilas fenólicas permite que ajam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e desativadores de espécies radicalares), também atuam como filtros de radiação devido à presença de ligações duplas conjugadas em seus esqueletos carbônicos (PIETTA, 2000; ZHOU; HAMBURGER, 1996).

Um exemplo de molécula antioxidante natural que atua de forma bimodal é a curcumina: possuindo duas subunidades eletronegativas, a β -dicetona central atua complexando-se com íons metálicos, enquanto o sistema fenólico conjugado atua como um potente seqüestrador de radicais livres (RAMSEWAK et al., 2000).

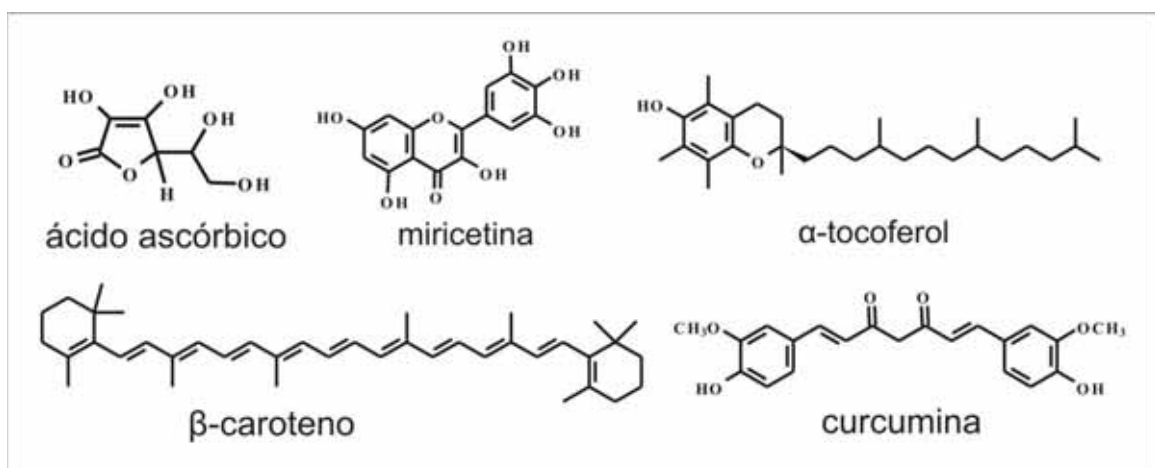


Figura 1.1 - Algumas substâncias com atividade antioxidante

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O projeto tem como objetivo gerar conhecimento científico sobre a biodiversidade do Cerrado paulista, no âmbito do projeto *BioProspecta* (ao qual está vinculado através do projeto temático FAPESP nº 2004/07932-7), contribuindo para o estabelecimento de bases que promovam o uso sustentável da biodiversidade, incluindo o desenvolvimento de novos produtos aplicados à melhora da saúde e do bem estar.

Objetivos específicos:

- Isolar e caracterizar substâncias com potencial antioxidante de *Lippia salviaefolia*, por meio do fracionamento guiado por ensaios antioxidantes preliminares para, então, submetê-las a testes mais específicos dentro de uma rede multidisciplinar de colaboradores;
- A partir de informações e materiais gerados de *L. salviaefolia* (extratos e substâncias de referência), expandir o estudo para outras espécies do gênero por meio de técnicas analíticas, em especial, cromatográficas e espectrométricas, que permitam a comparação de extratos e, assim, gerar conhecimentos relativos aos constituintes químicos não voláteis de espécies de *Lippia* nativas no Cerrado paulista.
- Selecionar extratos para novos estudos de fracionamento e de atividades biológicas, visando a aplicação de condições otimizadas para a obtenção de frações enriquecidas e atrativas para o desenvolvimento de produtos úteis à saúde.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Amostras

Lippia salviaefolia Cham: em 1º de abril de 2006, na Fazenda Campininha, em Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, foram coletadas folhas e ramos de espécie identificada como *Lippia salviaefolia* Cham. pela Dra. Inês Cordeiro (Instituto Botânico de São Paulo). A exsicata foi depositada no “Herbário Maria Eneida P. Kaufmann”, do Instituto Botânico de São Paulo, sob a inscrição *Lima 90*. Em 02 de abril de 2008, na mesma localidade, foram coletadas folhas, flores e ramos da mesma espécie, indetificada pela Dra. Inês Cordeiro, que depositou a exsicata sob a inscrição Nascimento 91. Ainda, uma terceira coleta foi realizada em 11 de março de 2010 e a exsicata preparada foi enviada para Profa. Dr. Fátima Salimena (Universidade Federal de Juiz de Fora), que identificou a espécie como *Lippia salviaefolia* Cham. e depositou-a no “Herbário Leopoldo Krieger” (Universidade Federal de Juiz de Fora), sob a inscrição *CESJ 55806*.

Lippia velutina: em 12 de fevereiro de 2006, na fazenda Campininha, em Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, foram coletadas folhas e ramos da espécie identificada como *Lippia velutina* pela Dra. Inês Cordeiro (Instituto Botânico de São Paulo). A exsicata foi depositada no “Herbário Maria Eneida P. Kaufmann”, do Instituto Botânico de São Paulo, sob inscrição *Brumati T173*.

Lippia balansae Briq.: em 07 de março de 2008, na Rodovia Castelo Branco, Km 303, município de Santa Cruz do Rio Pardo-SP, foram coletadas partes aéreas (ramos, folhas e flores) da espécie identificada como *Lippia balansae* Briq. pela Dra. Giselda Durigan (Instituto Florestal – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). A exsicata foi depositada na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis-SP, sob a inscrição FEA 402.

Lippia lasiocalycinna Cham.: em 15 de maio de 2008, no município de Pratânia-SP, foram coletadas folhas e ramos da espécie identificada como *Lippia lasiocalycinna* Cham. pela Dra. Giselda Durigan (Instituto Florestal – Secretaria do

Meio Ambiente do Estado de São Paulo). A exsicata foi depositada na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis-SP, sob a inscrição FEA 3556.

Lippia lupulina Cham.: em 22 de janeiro de 2009, no município de Iaras-SP, foram coletadas folhas, flores, ramos e raízes da espécie identificada como *Lippia lupulina* Cham. pela Dra. Giselda Durigan (Instituto Florestal – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). A exsicata foi depositada na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis-SP, sob a inscrição FEA 3638.

Lippia sidoides Cham.: em 19 de janeiro de 2009, no município de Iaras-SP, foram coletadas folhas, ramos e raízes da espécie identificada como *Lippia sidoides* Cham. pela Dra. Giselda Durigan (Instituto Florestal – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). A exsicata foi depositada na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis-SP, sob a inscrição FEA 3639.

3.1.2 Solventes

Solventes “grau analítico”: MeOH, EtOH, Hex, AcOEt e *n*-BuOH.

Solventes “grau CLAE-DAD”: MeOH (J.J. Backer) e água ultra-pura Mili-Q.

Solventes deuterados: CDCl₃, CD₃OD e DMSO-*d*₆ (Aldrich e Merck).

3.1.3 Fases Estacionárias e Suportes para Cromatografia

(a) Cromatografia em Camada Delgada: placas de Cromatografia em Camada Delgada de Sílica gel (SiOH) em Alumínio w/UV (Sigma-Aldrich, EUA)

(b) Cromatografia Líquida Sob Pressão Reduzida: SiOH modificada com C-18 (Sorbent Technologies - EUA), *Premium Grade*, 60 Å, 40-63 µm, 450-550 m²/g, 0,65-0,85 mL/g e Gel de Sílica (Acros Organics, EUA) com partículas entre 0,035-0,070 mm.

(c) Cromatografia Líquida em sob Pressão Atmosférica: SiOH (Carlos Erba), com partículas entre 0,06 – 0,20 mm.

(d) Cromatografia Líquida de Média Pressão: SiOH (Carlos Erba) com partículas entre 6-35 μm .

3.1.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada

(a) Anisaldeído: em banho de gelo e sob agitação, 20 mL de HOAc foram adicionados a 1 mL de anisaldeído (Sigma-Aldrich, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 170 mL de MeOH e 10 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi transferida para frasco de vidro âmbar e armazenada em geladeira.

(b) Solução de β -caroteno: 20,0 mg de β -caroteno (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram solubilizados em 100 mL de AcOEt. A solução foi transferida para recipiente de vidro envolto em papel alumínio e utilizada.

3.1.5 Equipamentos

- *Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Pressão (UHPLC):*

(a) Waters Acquity UHPLC system acoplado a espectrômetro de massas Waters Micromass LCT-Premier Time-of-Flight (Milford, MA, USA), equipado com uma interface electrospray (ESI). Utilizado para estudos de comparação dos extratos preparados a partir de partes de seis espécies de *Lippia*.

- *Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência:*

(a) Varian ProStar analítico, equipado com uma bomba ternária mod. 240 e um detector ultravioleta, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3. Utilizado para o desenvolvimento de métodos a serem transpostos para escala preparativa.

(b) Varian StarDynamax preparativo, modelo SD-1, com detector UV/vis Varian modelo 320. Utilizado para o isolamento de substâncias.

(c) Shimadzu analítico equipado com degaseificador DGU-20A₃, duas bombas LC-20AT, um controlador CBM-20A, um injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e forno modelo CTO-20A. Utilizado para análises comparativas entre extratos.

(e) Agilent 1100 series equipado com bomba binária G-1312, injetor manual G-1328A e detector de arranjo de fotodiodos G-1365B. Utilizado para desenvolvimento de métodos em escala analítica e posterior transposição para escala semi-preparativa.

(f) Jasco equipado com bombas de 4 canais PU-2089 plus, injetor automático AS-2055 plus, arranjo de fotodiodos DAD MD-2010 plus (200 a 400 nm) e detector de dicroísmo circular CD-2095 plus (220 to 420 nm). Utilizado para análises CLAE-DAD-DC.

- *Cromatógrafo Líquido de Média Pressão:*

(a) BUCHI composto de duas bombas C-601 e um controlador C-615.

- *Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:*

(a) Varian INOVA-500 (11,7 T),

(b) Bruker DRX-500 (11,7 T)

- *Espectrofotômetro leitor de placas:* Synergy-HTS (Bio-Tek Instruments, INC. EUA)

- *Máquina fotográfica:* Digic 16x (Canon, Japão) acoplada em câmara Reprostar (Camag, Suíça).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Secagem, moagem e extração do material vegetal

Folhas, flores, ramos e raízes das diferentes espécies foram secos em estufa a 40°C e triturados em moinho de facas. Em seguida, foram extraídos por maceração em EtOH, a frio, em três alíquotas na razão 7:2 (v/m), trocadas a cada 24 h. Cada extrato fluido obtido foi, então, concentrado em rotaevaporador a aproximadamente 40 °C e 170 mBar e armazenado em freezer. A Tabela 3.1 mostra as massas de partida para cada extrato.

Tabela 3.1 - Massas de partes de 6 espécies de *Lippia* extraídas por maceração a frio

Espécie	Massa de material seco e moído (g)			
	folhas	flores	ramos	raízes
<i>L. salviaefolia</i> Cham.	2982,0		2625,2	
<i>L. velutina</i>	27,5		52,5	
<i>L. balansae</i>	78,9	83,7	61,3	
<i>L. lasyocaliccina</i>	200,0		180,7	
<i>L. lupulina</i>	15,5	2,2	42,6	158,5
<i>L. sidoides</i>	106,1		233,9	129,9

Para a espécie *L. salviaefolia* Cham., aproximadamente 50 g de folhas frescas e 50 g de ramos coletadas em 2010 (subseção 3.1.1) foram extraídos imediatamente após suas coletas, ao abrigo da luz e com aproximadamente 400 mL of EtOH ou EtOH acidificada com 0,1% (v/v) de TFA. Após 7 dias, os extratos foram analisados por CLAE-DAD-DC (subseção 3.2.2.3).

3.2.2 Análises cromatográficas de extratos e frações

3.2.2.1 Análises de extratos e frações por cromatografia em camada delgada

Para a comparação entre alguns extratos e frações, foram utilizados SiOH como fase estacionária e as seguintes fases móveis: Hex-AcOEt 1:1; AcOEt-MeOH-Água 100:13,5:10 (WAGNER e BLADT, 1996) e *n*-BuOH-HOAc-Água 4:1:5 e 3:1:1 (MARKHAM, 1982). Os cromatogramas foram fotografados sob luz UV em comprimentos de onda (λ) de 254 nm e de 366 nm. Em seguida, foram revelados com anisaldeído e, em alguns casos, fotografados sob luz branca.

3.2.2.2 Estudos comparativos por CLAE-DAD e UHPLC-ESI-TOF-MS

As análises dos extratos de espécies do gênero *Lippia* empregando-se as técnicas acopladas UHPLC-ESI-TOF-MS foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Genebra (Suíça), sob a supervisão do Prof. Jean-Luc Wolfender.

Inicialmente, os extratos etanólicos das diferentes espécies foram comparados por CLAE-DAD utilizando-se como fase estacionária C18 (coluna Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, acoplada a Phenomenex Synergi Hydro-RP; 250 x 4,6 mm; 4 μ M) e como fase móvel gradiente a partir dos solventes água ultra-pura (A) e MeOH (B), iniciando-se com 30% de B, aumentando para 50%

aos 25 minutos, e para 100% aos 70 minutos. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min. As corridas foram observadas na faixa de comprimentos de onda de 190 a 500 nm. As amostras foram preparadas solubilizando-se 10,0 mg de resíduo seco em 1 mL de MeOH, seguidas de filtração em membrana de PTFE (Sartorius AG, Alemanha) com porosidade de 0,20 μm . Os volumes injetados foram de 15 μL . Substâncias isoladas dos extratos etanólicos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia* Cham. (utilizado como extrato de referência) foram utilizadas como referências, a fim de se cruzar os seus dados de tempos de retenção e de espectros de UV com aquelas bandas observadas nos extratos.

Numa segunda etapa, as técnicas acopladas UHPLC-ESI-TOF-MS foram empregadas no estudo comparativo entre extratos das diferentes partes das espécies de *Lippia* disponíveis. Os extratos etanólicos (subseção 3.2.1) foram preparados utilizando-se extração em fase sólida (Waters Sep-Pak C18, Vac 1 cm^3 , 100 mg). Após ativação e condicionamento do cartucho com 1 mL de MeOH e 1 mL H₂O-MeOH 15:85 (v/v), 5,0 mg do extrato foram solubilizados em 500 μL de MeOH-H₂O 85:15 (v/v), carregados no cartucho e eluídos com 1 mL H₂O-MeOH 15:85 (v/v) a fim de se remover clorofilas e outros compostos muito lipofílicos. O eluído foi seco em fluxo de N₂ e finalmente solubilizado em H₂O-MeOH 15:85 (v/v) para se obter soluções a 1 mg/mL. As substâncias fenólicas isoladas dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia* foram preparados da mesma forma que os extratos, à concentração de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (GRATA et al., 2008). As análises foram obtidas em sistema UHPLC-ESI-TOF-MS, tendo-se C-18 como fase estacionária (Waters UPLC Acquity BEH C18 column, 150 x 2,1 mm, 1,7 μm) e como fase móvel os solventes H₂O-ACN acidificados com 0,1% de ácido fórmico (v/v), ao fluxo de 600 $\mu\text{L/min.}$, no seguinte gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., passando a 100% de B aos 52,1 min. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 10°C e a da coluna a 60 °C. As detecções foram obtidas em modo negativo para a faixa de m/z 100–1000, com aquisição de 0,3 s em modo centróide. As condições de ionização por *electrospray* (ESI) foram as seguintes: voltagem do capilar de 2800 V, voltagem do cone de 40 V, temperatura da fonte de 120°C, temperatura de dessolvatação de 330°C, fluxo do gás no cone de 20 L/h, fluxo de dessolvatação do gás de 600 L/h e voltagem do detector MCP de 2400 V.

3.2.2.3 Estudos da mistura isomérica G3 por CLAE-DAD-DC

A amostra G3 (0,1 mg) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada a detectores de Dicroísmo Circular e de Arranjos de Fotodiodos (CLAE-DAD-DC), tendo-se com fase estacionária uma coluna de C18 (Phenomenex Synergi Hydro-RP; 250 x 4,6 mm; 4 μ M) e como fase móvel a mistura dos solventes H₂O-MeOH 83:17 (v/v) acidificados com 0,1% de TFA (v/v), ao fluxo de 1 mL/min. As corridas foram monitoradas a 287 nm. Separação de quatro bandas correspondentes a quatro isômeros foi observada. Assim, o espectro de dicroísmo circular (DC) de cada isômero foi medido capturando-se uma banda por corrida. Para efeitos comparativos, os extratos originais EERLs (0,2 mg) e EEFLs (0,2 mg), e novos extratos preparados com material fresco da mesma espécie foram eluídos no mesmo sistema.

3.2.2.4 Estudos de interconversões dos isômeros 12/13 por UHPLC-ESI-TOF-MS

Os estudos descritos nesta subseção (além daqueles informados em 3.2.2.2) foram realizados no Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Genebra (Suíça), sob a supervisão do Prof. Jean-Luc Wolfender.

Os isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b** foram coletados de G3 utilizando-se CLAE-DAD, nas mesmas condições descritas na subseção precedente (subseção 3.2.2.3) ou utilizando-se H₂O-MeOH 83:17 (v/v) não acidificada como fase móvel. Cada isômero foi analisado imediatamente após a sua coleta e em intervalos de 51 minutos por UHPLC-ESI-TOF-MS. Empregou-se C-18 como fase estacionária (Waters UPLC Acquity BEH C18 column, 150 x 2.1 mm, 1.7 μ m) e os solventes H₂O-MeOH 8:2, acidificados com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e ao fluxo de 420 μ L/min., como fase móvel. As corridas foram de 12 minutos. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 25°C e a da coluna a 40 °C. As detecções foram obtidas em modo negativo para a faixa de *m/z* 100–1000, com aquisição de 0.3 s em modo centróide. As condições de ionização por *electrospray* (ESI) foram as seguintes: voltagem do capilar de 2800 V, voltagem do cone de 40 V, temperatura da fonte de 120°C, temperatura de dessolvatação de 250°C, fluxo do gás no cone de 20 L/h, fluxo de dessolvatação do gás de 600 L/h e voltagem do detector MCP de 2400 V.

3.2.3 Processos de fracionamento

3.2.3.1 Informações gerais

- Desenvolvimento de método para CLV e CC em fase normal a partir de CCD

As fases móveis utilizadas nos experimentos com as técnicas Cromatografia Líquida sob Pressão Reduzida (CLV) e Cromatografia Líquida sob Pressão Atmosférica (CC), empregando-se SiOH como fase estacionária, foram pré-definidas a partir de ensaios com Cromatografia em Camada Delgada em SiOH. A fase móvel inicial foi definida como aquela que eluiu a substância menos retida pela fase estacionária até aprox. $R_f = 0,3$, enquanto que a fase móvel final foi aquela que eluiu a substância mais retida em CCD até aprox. $R_f = 0,2$ (CAVALHEIRO, 2006).

- Razão massa de amostra:massa de fase estacionária em CLV e CC

A razão entre a massa de amostra aplicada e a massa da fase estacionária utilizada em cada experimento foi definida em função do objetivo do experimento: no caso de operações em que o intuito não foi isolar substâncias, mas sim simplificar a amostra dividindo-a em subfrações com faixas menores de polaridades (conceito de extração em fase sólida), utilizou-se relação entre 1:10 a 1:40, enquanto que para aqueles experimentos cujos objetivos eram o isolamento de substâncias, a razão mínima utilizada foi de 1:100.

- Empacotamento de coluna para CLV ou CC (a seco ou em suspensão)

O empacotamento da coluna a seco ou em suspensão (entendido como a suspensão da fase estacionária na fase móvel inicial a ser utilizado) foi definido em função das dimensões médias das partículas da fase estacionária a ser utilizada, visando-se atingir a maior homogeneidade do leito cromatográfico. Para fases estacionárias com granulometria média de partículas inferior 20 μm , o empacotamento em suspensão foi escolhido, enquanto que para partículas maiores as colunas foram empacotadas a seco (CAVALHEIRO, 2006).

- Desenvolvimento de métodos por CLAE-DAD e escalonamentos

O desenvolvimento dos sistemas cromatográficos por CLAE-DAD e as transposições de escala seguiram as premissas preconizadas por Snyder, Glajch e Kirkland (1997) e são resumidamente descritas a seguir:

Desenvolvimento do sistema analítico: foi desenvolvido um sistema em CLAE-DAD, tendo-se como fase estacionária uma coluna C-18 analítica. A força de eluição da fase móvel foi ajustada a partir da mistura dos solventes Água (A) e MeOH (B). Em seguida, a seletividade do sistema foi incrementada variando-se as porcentagens relativas de A e B.

Transposição para escala preparativa ou semi-preparativa: O fator de escalonamento (F) foi calculado pela expressão $F: L_p d_p^2 / L_a D_a^2$, onde L_p e L_a são as dimensões das colunas preparativa e analítica, respectivamente e D_p e D_a são os diâmetros internos das colunas preparativa e analítica, respectivamente. Os valores analíticos de fluxo e carga foram multiplicados pelo fator de escalonamento calculado, mantendo-se inalterada o sistema de fases estabelecido.

3.2.3.2 Fracionamento guiado do extrato de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs)

A Figura 3.1, a seguir, ilustra as etapas de fracionamento executadas a partir do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia*, sendo que o detalhamento dos métodos utilizados estão descritos nas subseções 3.2.3.2.1 a 3.2.3.2.8.

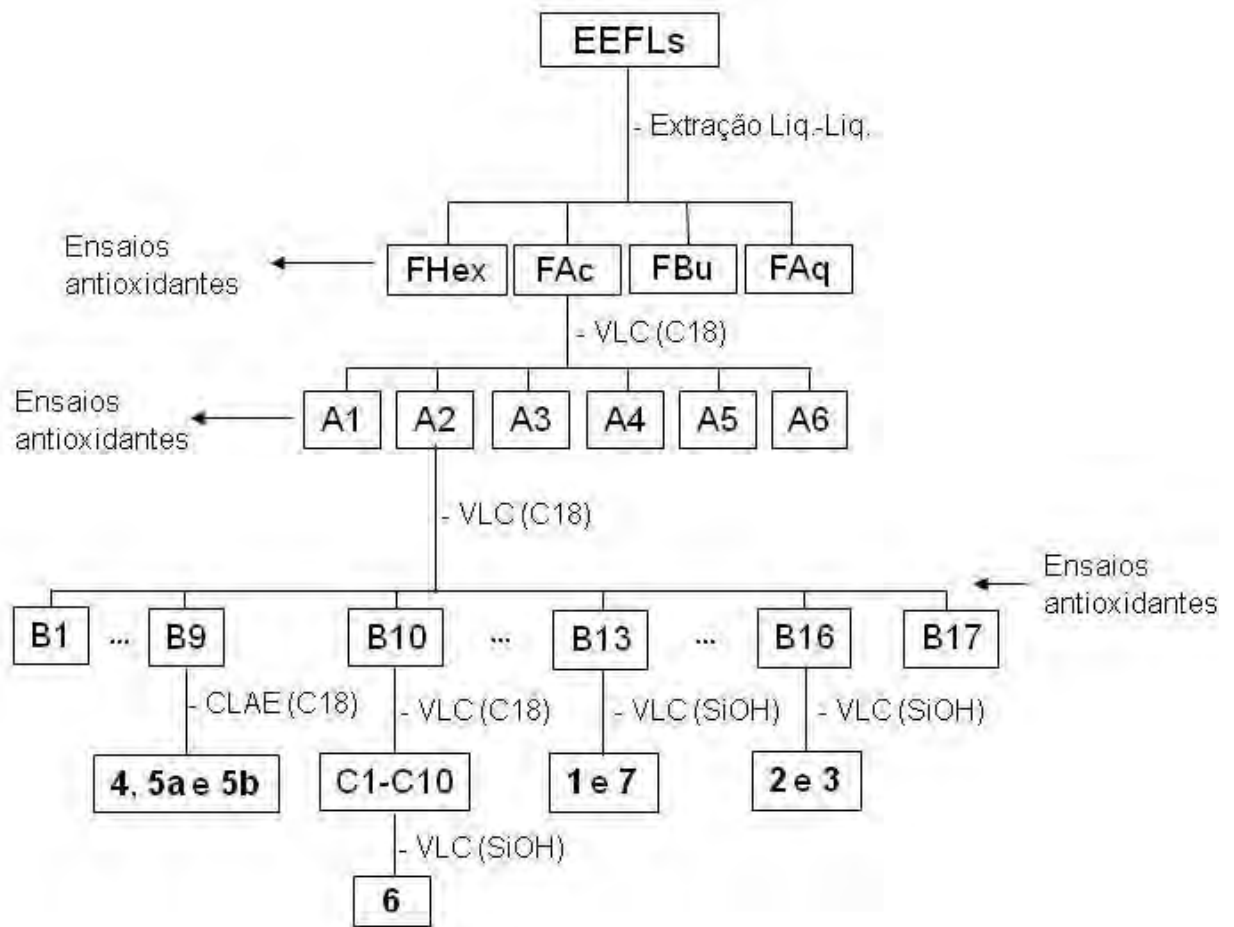


Figura 3.1 - Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs)

3.2.3.2.1 Extração líquido-líquido de EEFLs

O procedimento descrito a seguir seguiu os princípios gerais preconizados por Constantino, Silva e Donate (2004) e Snyder, Kirkland e Glajch (1997).

A massa de 40,0 g de EEFLs foi suspensa em 650 mL de solução MeOH-H₂O 8:2 (v/v). Após completa solubilização do material, a solução resultante foi extraída sucessivamente com cinco alíquotas de 300 mL hexano. As fases superiores, hexânicas, foram concentradas em rota-evaporador a 40 °C e 335 mBar. Em seguida, o resíduo contido no balão foi dissolvido em MeOH e transferido para frasco de vidro pré-aquecido em estufa e pesado. Após evaporação do excesso de solvente em capela, o concentrado foi seco em linha de vácuo até atingir massa constante e intitulado FHex1.

À hidrometanólica foram adicionados 505 mL de água até a proporção MeOH-H₂O 45:55. Em seguida, a solução resultante foi extraída sucessivamente com três alíquotas de 500 mL acetato de etila (AcOEt). As três fases AcOEt, superiores, foram combinadas, concentradas em rota-evaporador a 40 °C e 240 mBar. Em seguida, o resíduo contido no balão foi dissolvido em MeOH e transferido para frasco de vidro pré-aquecido em estufa e pesado. Após evaporação do excesso de solvente em capela, o concentrado foi seco em linha de vácuo até atingir massa constante e intitulado FAc1.

A fase hidrometanólica foi concentrada em rota-evaporador e em seguida diluída em água ultra-pura, obtendo-se aproximadamente 800 mL de solução. Em seguida, foi extraída sucessivamente com três alíquotas de 270 mL de *n*-BuOH. As fases *n*-butanólica e aquosa foram concentradas em rota-evaporador a 40 °C e a 72 mBar. Em seguida, o resíduo contido em cada balão foi dissolvido em MeOH e transferido para frasco de vidro pré-aquecido em estufa e pesado. Após evaporação do excesso de solvente em capela, os concentrados foram secos em linha de vácuo até atingirem massas constantes e intitulados FBu1 e FAq1.

3.2.3.2.2 Fracionamento de FAc1 de EEFLs por CLV em fase reversa

A fase de partição FAc1 do EEFLs foi submetida a CLV, tendo-se 44,8 g de C-18 como fase estacionária (11,3 x 2,6 cm – empacotamento a seco) e o seguinte sistema gradiente, composto pelos solventes água ultra-pura (A) e MeOH (B), como fase móvel: 1:0; 4:1, 3:2, 1:4, 0:1 (v/v). A fase estacionária foi ativada pela passagem de 8 volumes mortos estimados (Vm) de A (aproximadamente 240 mL). Em seguida, foram passados 8 Vm de água ultra-pura (fase móvel inicial). Após a aplicação da amostra seca (3,0 g misturados com aproximadamente o dobro de celite), foram passados 3 Vm de cada solvente ou mistura em ordem decrescente de polaridade (BIDLINGMEYER, 1987). Foram coletadas 6 alíquotas de aproximadamente 75 mL. Após alguns minutos, foi observada a formação de um precipitado branco nas segunda e terceira alíquotas. Após análise dos precipitados das duas alíquotas por CCD, optou-se por juntá-los, tendo sido feito o mesmo com os sobrenadantes. Desta forma, as amostras finais ficaram intituladas: A1, A2 (sobrenadante), A3 (precipitado), A4, A5 e A6. Este procedimento foi repetido com 5,3 e 3,4 g da amostra FAc1.

3.2.3.2.3 Fracionamento de A2 por CLV em fase reversa

A subfração A2, resultante do fracionamento de FAc de EEFLs (subseção anterior), foi submetida à CLV tendo-se 116,9 g de C-18 como fase estacionária (11,0 x 4,5 cm) e os solventes água ultra-pura (A) e MeOH (B) como fase móvel no seguinte sistema escalonado: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50 (v/v). A fase estacionária foi ativada pela passagem de 10 Vm de B (aproximadamente 870 mL) e condicionada com 10 Vm da fase móvel inicial. Foram aplicados 4,4 g de amostra seca (somando-se as massas de 3 replicatas) misturados com aproximadamente a mesma massa de celite. Em seguida, foram passados 2 Vm de cada solvente ou mistura em ordem decrescente de polaridade. Após junções de alíquotas com mesmo perfil cromatográfico (monitoradas por CCD), foram obtidas 17 frações (B1 a B17).

3.2.3.2.4 Fracionamento de B9 por CLAEprep em fase reversa

O desenvolvimento dos sistemas cromatográficos por CLAE e as transposições de escala seguiram as premissas preconizadas por Snyder, Glajch, Kirkland (1997), resumidamente descritas na subseção 3.2.3.1. O fracionamento de B9 (178,9 mg) por CLAE-Prep foi efetuado eluindo-se 3,21 mg da amostra em coluna C18 (Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 21.2 mm), com H₂O-MeOH 67:33 (v/v) ao fluxo de 15 ml/min. As corridas foram monitoradas com detector de UV a $\lambda = 290$ nm. A partir de B9, foram isolados o composto **4** e a mistura epimérica **5a/5b**.

3.2.3.2.5 Fracionamento de B10 por CLV em fase reversa

As condições experimentais descritas a seguir foram definidas a partir da análise dos experimentos anteriores que originaram a amostra B10 (resultante do fracionamento de A2 – subseção 4.2.3.2.3). Assim, B10 foi submetida a CLV tendo-se 65,0 g de C-18 como fase estacionária (25,6 x 2,1 cm – empacotamento a seco) e solução composta de água ultra-pura (A) e MeOH (B) como fase móvel [7:3 (v/v) até a alíquota 49; 65:35 9 (v/v) até alíquota 75; 6:4 (v/v) até alíquota 93 e 1:1 (v/v) até alíquota 121). A fase estacionária foi ativada pela passagem de 10 Vm de B (aproximadamente 443 mL) e condicionada com 10 Vm da fase móvel inicial. Foram

aplicados 302,2 mg de amostra seca (misturados com aproximadamente 350 mg de celite) e foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1/3 do Vm da coluna (aproximadamente 45 mL). Após junções de alíquotas com mesmo perfil cromatográfico (monitoradas por CCD), foram obtidas 10 frações (C1-C10).

3.2.3.2.6 Fracionamento de B13 por CLV em fase normal

Foram utilizados 43,6 g de SiOH (15,2 x 2,6 cm – empacotamento a seco) como fase estacionária e o seguinte gradiente escalonado como fase móvel: Hex-AcOEt 6:4; 59:41; 57:43; 45:55; 29:71; 0:100 (v/v); AcOEt-MeOH 99:1; 97:3; 93:7; 85:15; 69:31; 37:63 (v/v). Após condicionamento da coluna com 10 Vm da fase móvel inicial (aproximadamente 400 mL), foram aplicados 435,0 mg da amostra seca e iniciou-se a passagem de 3 Vm de cada fase. Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1/3 do Vm. Após análises comparativas por CCD, alíquotas foram reunidas nas frações E1-E20, entre elas as substâncias puras **1** e **7**.

3.2.3.2.7 Fracionamento de B16 por CLV em fase normal

Foram utilizados 40,4 g de SiOH (14,6 x 2,5 cm – empacotamento a seco) como fase estacionária e o seguinte gradiente escalonado como fase móvel: Hex-AcOEt 67:33, 66:34, 64:36, 60:40, 52:48, 36:64, 4:96, 0:100 (v/v); AcOEt-MeOH 99:1; 97:3; 93:7; 85:15; 69:31 (v/v). Após condicionamento da coluna com 10 Vm da fase móvel inicial (aproximadamente 360 mL), foram aplicados 427,0 mg de B16 misturados com aproximadamente a mesma massa de celite. Foram passados 3 Vm de cada fase móvel, coletando-se alíquotas de aproximadamente 1/3 do Vm. Após análises comparativas por CCD, as alíquotas foram reunidas nas frações F1 a F8, duas das quais foram identificadas como as substâncias **2** e **3**.

3.2.3.2.8 Fracionamento de C7 por CLV em fase normal

Foram utilizados 55,0 g de SiOH (27,5 x 2,0 cm – empacotamento a seco) como fase estacionária e o seguinte gradiente como fase móvel: Hex-AcOEt 1:1 (v/v) até a alíquota 54; 4:6 (v/v) até alíquota 62; 3:7 (v/v) até alíquota 123; 0:1 (v/v) até alíquota 124). A fase estacionária foi condicionada com a passagem de 10 Vm da fase móvel inicial (aproximadamente 430 mL). Após a aplicação de 98,1 mg de amostra, foi iniciada a coleta de alíquotas com aproximadamente 1/3 do Vm. Após

análises comparativas por CCD, as alíquotas foram reunidas nas frações D1 a D3, sendo uma delas identificada como a substância **6**.

3.2.3.3 Fracionamento guiado do extrato de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs)

A Figura 3.2, a seguir, ilustra as etapas de fracionamento executadas a partir do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia*, sendo que o detalhamento dos métodos utilizados estão descritos nas subseções 3.2.3.3.1 a 3.2.3.3.4.

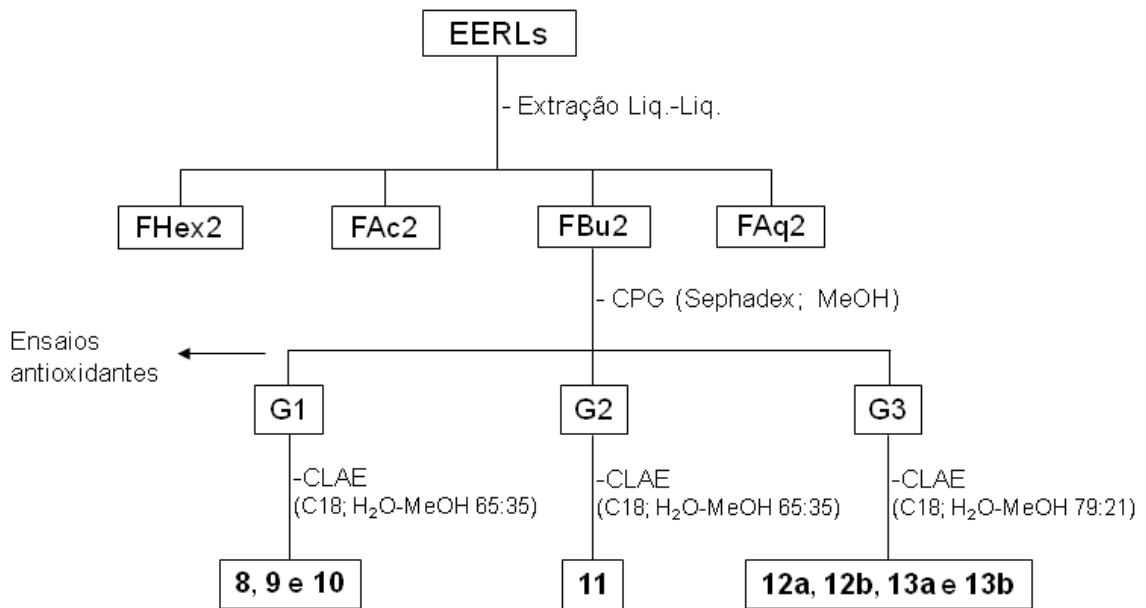


Figura 3.2 - Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs)

3.2.3.3.1 Extração líquido-líquido de EERLs

O mesmo procedimento descrito na subseção 3.2.3.2.1, mantendo-se as proporções entre massa de extrato seco e solventes, foi adotado para a extração de 82,2 g do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs). Foram obtidas as frações FHex2, FAc2, FBu2 e FAq2.

3.2.3.3.2 Fracionamento de FBu2 do EERLs por CPG

A fração *n*-butanolica FBu2 (4.1 mg), obtida a partir do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia*, foi fracionada por Cromatografia de Permeação em Gel (CPG) tendo-se Sephadex LH 20 (180,0 x 3,0 cm) como fase estacionária e MeOH (aprox. 3,0 L) como fase móvel (BIDLINGMEYER, 1987). A primeira alíquota

coletada foi de 300 mL, enquanto que as demais foram de 80 mL. A reunião das alíquotas 16 a 19, 20 a 25 e 30 a 34 originaram 3 frações ativas frente ao β -caroteno (G1-G3).

3.2.3.3.3 Fracionamento de G1 e G2 por CLAEsemiprep em fase reversa

As subfrações G1 (45,0 mg, 50 injeções) e G2 (58,6 mg, 33 injeções) foram fracionadas por CLAE-DAD, utilizando-se C18 como fase estacionária (Waters SYMMETRY, 300 x 7.8 mm) e como fase móvel a mistura de H₂O-MeOH 65:35 (v/v) a 3.0 mL/min. As corridas foram monitoradas a 274, 290 e 330 nm e as substâncias **8**, **9** e **10** foram obtidas de G1, enquanto que **11** foi obtida de G2.

3.2.3.3.4 Fracionamento de G3 por CLAEsemiprep em fase reversa

A subfração G3 (30,0 mg, 30 injeções) de FBU2 (subseção 3.2.3.3.2) foi fracionada por CLAE, utilizando-se como fase estacionária coluna C18 (Waters SYMMETRY, 300 x 7.8 mm) e como fase móvel mistura de H₂O-MeOH 79:21 (v/v) a 3.2 mL/min. As corridas foram monitoradas a 254 e 290 nm e as substâncias **12a**, **12b**, **13a** e **13b** foram isoladas.

3.2.3.4 Fracionamento do extrato de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup)

A Figura 3.3, a seguir, ilustra as etapas de fracionamento realizadas partindo-se do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina*, enquanto que as subseções 3.2.3.4.1 a 3.2.3.4.6 trazem os detalhes de cada operação realizada.

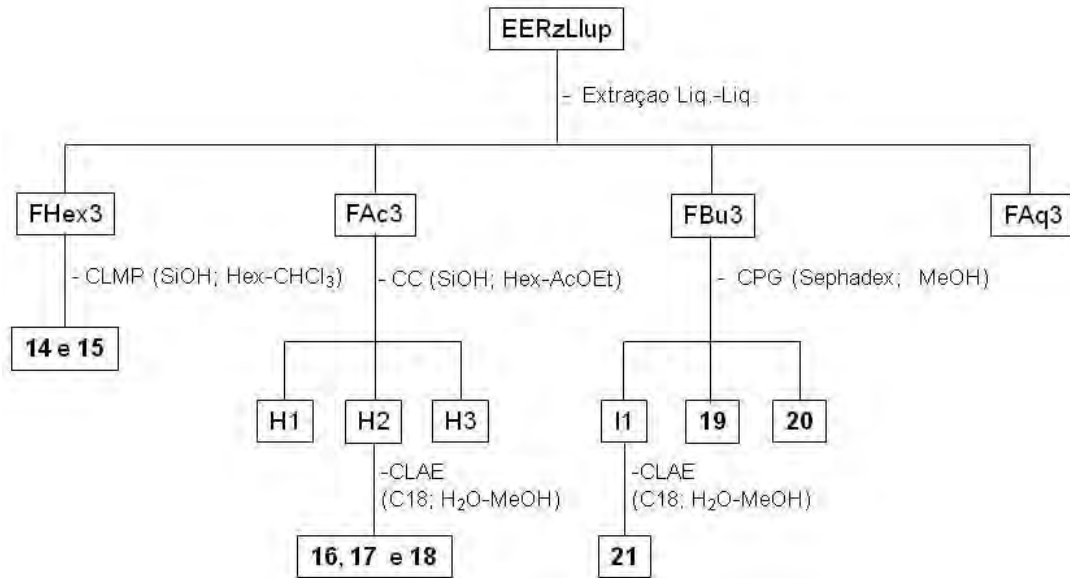


Figura 3.3 - Procedimentos gerais realizados a partir do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLs)

3.2.3.4.1 Extração líquido-líquido de EERzLlup

O mesmo procedimento descrito na subseção 3.2.3.2.1, mantendo-se as proporções entre massa de extrato seco de partida e solventes, foi adotado para a extração de 158,5 g do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Foram obtidas as frações FHex3, FAc3, FBu3 e FAq3.

3.2.3.4.2 Fracionamento de FHex3 por MPLC em fase normal

Foram utilizados 101,5 g de SiOH (39,5 x 2,6 cm – empacotamento em suspensão) como fase estacionária e a mistura dos solventes Hex (A) e CHCl₃ (B) como fase móvel, no seguinte gradiente linear: 20% a 100% de B em 170 minutos. O fluxo utilizado foi de 17 mL/min. Após condicionamento da coluna com aproximadamente 7 Vm da fase móvel inicial (730 mL), foram aplicados 600,0 mg de FHex3 secos, misturados com aproximadamente a mesma massa de celite. Foram coletados alíquotas de 10 mL. Após análises por CCD, a junção das alíquotas 85 a 105 gerou foi identificada como **14**, enquanto que as alíquotas 147-159 foram reunidas e identificadas como a substância **15**.

3.2.3.4.3 Fracionamento de FAc3 por CC em fase normal

Foram utilizados 25,0 g de SiOH (8,0 x 2,6 cm – empacotamento a seco) como fase estacionária e o seguinte gradiente escalonado como fase móvel: Hex-AcOEt 1:0, 1:1, 0:1 (v/v) e MeOH. Após condicionamento da coluna com 10 Vm da fase móvel inicial (aproximadamente 210 mL), foram aplicados 600,0 mg da amostra FAc3, misturados com aproximadamente a mesma massa de celite. A amostra foi eluída com 3 Vm de cada fase móvel e foram coletadas 4 alíquotas de aproximadamente 3 Vm e uma de aproximadamente 10 Vm. Após análises comparativas por CLAE-DAD, as alíquotas 1 e 2, 3 e 4 e 5 originaram frações H1, H2 e H3.

3.2.3.4.4 Fracionamento de H2 por CLAEsemiprep em fase reversa

A amostra H2 (20,0 mg, 20 injeções), obtida de FAc3 (subseção 3.2.3.4.1), foi fracionada por CLAE-DAD utilizando-se como fase estacionária coluna C18 (Waters SYMMETRY, 300 x 7.8 mm) e como fase móvel a mistura de H₂O (A) e MeOH (B) 1:1 (v/v), a 3.0 mL/min. As corridas foram monitoradas a $\lambda = 220$ e 254 nm. Foram isoladas as substâncias **16** ($t_R = 13,4$ min.), **17** ($t_R = 16,9$ min.) e **18** ($t_R = 17,5$ min.).

3.2.3.4.5 Fracionamento de FBU3 por CPG

A fração de partição FBU3, do EERzLlup (625,3 + 354,8 mg), foi fracionada por CPG, tendo-se Sephadex LH 20 como fase estacionária (180,0 x 3,0 cm) e aproximadamente 3,0 L de MeOH como fase móvel. A primeira alíquota coletada foi de 350 mL e as demais de 40 mL. As reuniões das alíquotas 20-22 gerou a fração I1, enquanto que as reuniões das alíquotas 31-34 e 37-41 foram identificadas como as substâncias **19** e **20**, respectivamente.

3.2.3.4.6 Fracionamento de I1 por CLAEprep em fase reversa

A subfração I1 (40,0 mg, 8 injeções) de FBU3 (subseção 3.2.3.4.5) foi fracionada por CLAE-DAD empregando-se como fase estacionária C18 (Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 21.2 mm) e como fase móvel H₂O-MeOH 70:30 (v/v), a 12 mL/min. As corridas foram observadas a 230 nm e a substância **21** foi isolada.

3.2.4 Testes de atividade

3.2.4.1 Testes antioxidantes

Os ensaios antioxidantes descritos a seguir foram utilizados para guiar os processos de fracionamento a partir dos extratos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*.

3.2.4.1.1 Atividade protetora do β -caroteno

As subfrações dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia* foram analisadas por CCD, tendo-se SiOH como fase estacionária e Hex-AcOEt 1:1 (v/v) e AcOEt-MeOH-Água 100:13,5:10 (v/v) como fases móveis (subseção 3.2.2.1). Após secagem do excesso de solvente em capela, a placa cromatográfica foi fotografada sob luz UV a $\lambda = 254$ e 366 nm e, então, revelada com solução de β -caroteno. A placa foi exposta ao sol por aproximadamente 30 minutos. As manchas alaranjadas remanescentes, indicativas da presença de substâncias antioxidantes, tiveram os seus R_f medidos (PRATT e MILLER, 1984; SILVA, D. et al., 2001).

3.2.4.1.2 Determinação da capacidade de captura do radical livre DPPH.

Quando o radical livre DPPH \cdot , em presença de um antioxidante doador de hidrogênio, passa à sua forma reduzida DPPH-H, o seu elétron desemparelhado deixa de estar em conjugação com os grupos arilas. Nesta forma, o DPPH-H sofre um decréscimo da absorvidade molar em $\lambda = 517$ nm e a coloração da solução muda de púrpura para amarela (Figura 3.4). O resultado é observado por uma curva de concentração da amostra antioxidante pela % ΔA (CARDOSO et al., 2004).

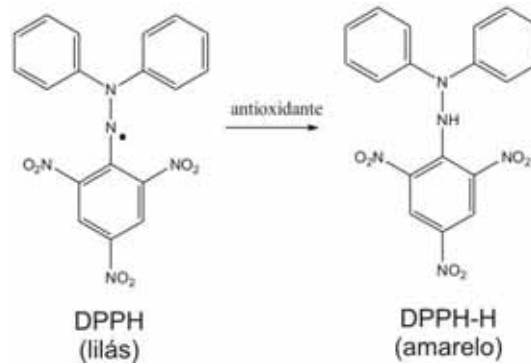


Figura 3.4 - Ilustração do seqüestro do radical livre DPPH·.

Este teste foi baseado nos trabalhos publicados por Son e Lewis (2002) e Cheng, Moore e Yu (2006), com algumas adaptações. O radical livre 2,2-Difenil-1-picrilidrazil (DPPH·), em solução metanólica (101.4 μM , 200 μL), foi adicionado a 100 μL das amostras teste, diluídas em MeOH a 0.2, 0.1, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008 e 0.005 mg/ml e distribuídas em placas multi-well 96. Rutina (controle positivo) e substâncias isoladas foram testadas nas concentrações finais de 33,3; 26,7; 20,0; 13,3; 6,7, 3,3 e 1,7 μM . Cada mistura foi agitada e mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Os decréscimos de absorbâncias do DPPH· a 517 nm foram medidos. MeOH foi usado como branco e DPPH· em MeOH foi usado como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade seqüestradora do radical livre das amostras foram expressadas como % de inibição do DPPH· $[(A \text{ controle} - A \text{ teste})/A \text{ controle}] \times 100$, onde $A \text{ controle}$ é a absorbância do controle (solução de DPPH· sem amostras teste) e $A \text{ teste}$ é a absorbância a amostra teste (solução de DPPH· mais o a amostra).

3.2.4.1.3 Estimativa da atividade antioxidante intracelular

Os ensaios de atividade antioxidante intracelular descrito a seguir, bem como aqueles de citotoxicidade (subseção 3.2.4.2) e de indução de apoptose (subseção 3.2.4.3), foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Salerno (Itália), sob supervisão da Profa. Anna Capasso.

Células embrionárias humanas de rim HEK-293 e células cancerosas de melanomas humanos M14 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM *L*-glutamina, 10% de soro fetal bovino inativado (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (Cambrex Bioscience, Verviers, Bélgica), a 37°C e em

atmosfera com 95% O₂ e 5% CO₂. Após 24 h de tratamento, foram semeadas em poços na concentração de 1x10⁵ células/poço (Falcon, BD Bioscience, Bedford, USA). Ao final do período de incubação, as células foram processadas para análises FACS (LEE et al., 2009; RIGANO et al., 2009).

As influências dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, de suas frações de partição e das substâncias **1-13**, isoladas dos mesmos, sobre a oxidação intracelular de diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) induzida pelo agente oxidante hidroperóxido de *t*-butila (*t*-BOOH), foram avaliadas segundo Rothe e Valet (1990). Células HEK-293 foram incubadas por 2 e 24 h, em presença ou ausência das soluções teste. Ao final do tempo de incubação, as células foram lavadas e ressuspensas (2x10⁵ células/ml) em solução salina balanceada de Hank's (HBSS), contendo 10 µM de DCFH-DA. Transcorridos mais 20 min. de incubação a 37 °C, a intensidade da fluorescência de diclorofluoresceína (DCF) foi monitorada por citometria de fluxo (FL1-H channel). A fim de estimar o potencial antioxidante das soluções testadas, o controle e células tratadas foram expostos a 300 µM de *t*-BOOH, por 30 min. e a 37 °C, após adição de DCFH-DA.

3.2.4.2 Ensaio antiproliferativo com MTT

Células embrionárias humanas de rim HEK-293 e células cancerosas de melanomas humanos M14 (3x 10⁴ células/poço) foram semeadas em placas de 96-cavidades, com 90 µL de meio de cultura, e incubadas a 37° C em atmosfera umidificada e com 5% CO₂. Após 24 h, uma alíquota de 10 µL das substâncias **6** ou **7** (1-40 µM) foi adicionada e as células foram incubadas por 48 h. A viabilidade das mesmas foi monitorada pelo método MTT (MOSMANN, 1983), que consiste em uma análise colorimétrica na qual ocorre a conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-3-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazana, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente em células metabolicamente ativas. Então, 25 µL de MTT (5 mg/ml) foram adicionados e as células foram incubadas por mais 3 h. As células foram lisadas e os cristais azuis escuros dissolvidos em 100 µL de solução contendo 50% (v:v) de N,N-dimetilformamida e 20% (m/v) SDS, com pH ajustado para 4,5. A densidade óptica (DO) de cada célula foi medida com espectrofotômetro de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340) e a leitura das absorbâncias foi tomada

a 620 nm. A viabilidade das células, em resposta ao tratamento, foi expressada como porcentagem do controle tratado com o solvente (DMSO) à concentração final de 0.1%: % células viáveis = (100 x DO das células tratadas) / DO células controle.

3.2.4.3 Análise de apoptose

DNA hipodiplóide foi analisado usando o método de coloração de iodeto de propídio (IP) e por citometria de fluxo (NICOLETTI et al., 1991). As células HEK-293 e M14 foram lavadas em tampão fosfato salino (TFS) e ressuspensas em 500 µl de solução contendo 0.1% de citrato de sódio, 0.1% Triton X-100 e 50 µg/ml de IP (Sigma-Aldrich, Itália). Após incubação a 4° C por 30 min., no escuro, os núcleos celulares foram analisados com citômetro de fluxo (Batom Dickinson FACScan, EUA), usando o programa Cells Quest. Debris celulares foram excluídos aumentando o limiar de dispersão dianteiro, e o conteúdo de DNA do núcleo foi registrado em escala logarítmica. A porcentagem de células na região hipodiplóide foi, então, calculada.

3.2.4.4 Teste antifúngico

Os ensaios antifúngicos foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob a supervisão da Profa. Maria Jose Gianinni, segundo o método de microdiluição em caldo descrito no documento M27-A2 do Instituto de Padrões Laboratoriais Clínicos (NCCLS, 2002). O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina, ácido morfolinopropanosulfônico (MPOS), suplementado com 2% de glicose.

Microorganismos e condições de cultivo: os fungos utilizados neste trabalho foram *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 (cepas originárias do Lab. Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara), cultivados em Agar Sabouraud-dextrose à temperatura ambiente (SCORZONI et al., 2007).

Ensaio antifúngico: extratos, frações de partição e substâncias isoladas foram solubilizados em DMSO e logo dissolvidos em meio de cultura RPMI até a

concentração de 250 µg/mL. A suspensão de células fúngicas foi preparada em salina 0,85% com densidade óptica de 0,5 (McFarland) e, então, diluída na razão 1:100 em RPMI tendo uma densidade fúngica equivalente a 1×10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Esta suspensão foi inoculada sobre as microplacas com as amostras, sendo este inóculo diluído até a concentração de 0,48 µg/mL. As microplacas foram incubadas sob agitação constante a uma temperatura de 37 °C, por 24 h, para *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, e por 48 h para *Cryptococcus neoformans*. Os controles positivos empregados nos ensaios de fungitoxicidade foram anfotericina B e fluconazol. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração capaz de inibir em 100% o crescimento fúngico, sendo analisado por espectrofotometria (SCORZONI et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRATOS OBTIDOS

A Tabela 4.1, a seguir, mostra as massas e os rendimentos obtidos nos processos de extração. Foram notados rendimentos maiores para os extratos de folhas e flores em relação aos extratos de ramos e raízes.

Tabela 4.1 - Massas e rendimentos obtidos nos processos de extração vegetal

Espécie	Massas (g)				Rendimentos (%)			
	Folhas	Ramos	Flores	Raízes	Folhas	Ramos	Flores	Raízes
<i>L. salviaefolia</i>	405,5	93,8	-	-	15,5	3,6	-	-
<i>L. velutina</i>	5,9	2,2	-	-	21,4	4,2	-	4,2
<i>L. balansae</i>	14,3	2,8	17,9	-	18,1	3,9	21,4	-
<i>L. sidooides</i>	33,6	3,6	-	4,9	31,7	1,6	-	3,8
<i>L. lupulina</i>	2,5	2,6	0,3	21,9	16,4	6,2	15,0	13,8
<i>L.lasiocalycinna</i>	13,6	5,0	-	-	7,5	2,5	-	-

4.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE EEFLs, EERLs e EERzLlup

A Tabela 4.2, a seguir, mostra as massas das frações de partição obtidas do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs) (em duas replicatas realizadas em épocas diferentes), do extrato etanólico de ramos da mesma espécie (EERLs) e do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup).

Tabela 4.2 - Massas e rendimentos das frações de partição dos extratos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia* e de raízes (EERzLlup) de *L. lupulina*

Extrato	Fração	Massa obtida (g)	% da massa inicial ¹
EEFLs	FHex1	4,6	8,0
	FAc1	38,3	66,6
	FBu1	3,1	5,4
	FAq1	2,5	4,3
	Total	48,5	84,3
EERLs	FHex2	16,4	20,0
	FAc2	18,7	22,7
	FBu2	10,8	13,1
	FAq2	24,4	29,7
	Total	70,3	85,5
EERzLlup	FHex3	1,6	16,8
	FAc3	0,6	6,3
	FBu3	0,3	3,2
	FAq3	1,2	ND ²
	Precipitado	6,9	72,7
Total	10,6	-	

¹)Referentes a 57,5 g de EEFLs, a 82,2 g de EERLs e a 9,5 g do EERzLlup

²)Não medido

4.3 FRACIONAMENTO DE EEFLs GUIADO POR TESTES ANTIOXIDANTES

Inicialmente, foram comparados por CCD os perfis cromatográficos dos dois extratos disponíveis até então, EEFLs e EERLs, revelando-os em seguida com β -caroteno. Foram observadas similaridades entre os extratos, sobretudo na região até $R_f = 0,5$, com atividades protetoras de β -caroteno em um número maior de bandas do EEFLs em relação ao EERLs, como pode ser visto na Figura 4.1. Assim, o extrato EEFLs foi escolhido para o início os trabalhos de fracionamento.

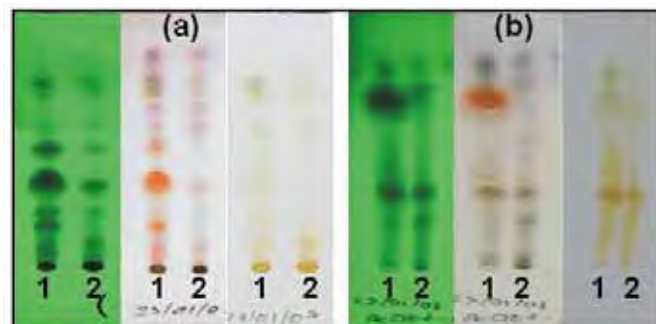


Figura 4.1 - Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v) (a) e SiOH e AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (v/v) (b), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm, com anisaldeído e com β -caroteno . Amostras: EEFLs e EERLs

4.3.1 Análise das frações de partição e rendimentos

A Figura 4.2 mostra os perfis em CCD das frações de partição realizadas em duas épocas diferentes a partir do EEFLs, enquanto que as massas obtidas e rendimentos podem ser consultados na Tabela 4.2.

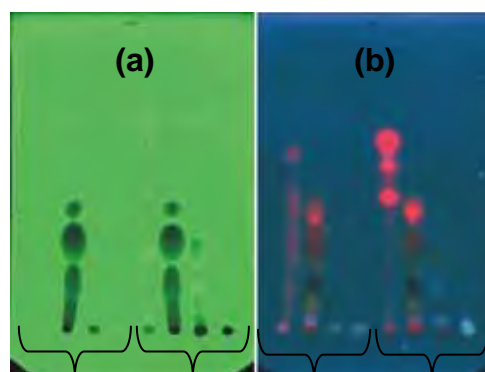


Figura 4.2 - Cromatogramas CCD em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366 nm (b). Amostras entre chaves, da esquerda para a direita: FHex1, FAc1, FBU1 e FAq1 de duas partições realizadas em duas épocas diferentes com o EEFLs

Foi observada grande semelhança (Figura 4.2) entre os perfis das frações de partição do EEFLs realizadas em épocas diferentes, sobretudo no que diz respeito à fração FAc1. Isto permitiu reuni-las para se proceder às subseqüentes etapas de fracionamento, partindo-se de massas maiores.

4.3.2 Atividades antioxidantes das frações de partição

A Figura 4.3, a seguir, mostra o resultado do ensaio que mediu a capacidade relativa do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs) e de suas frações de partição de seqüestrar o radical livre DPPH·.

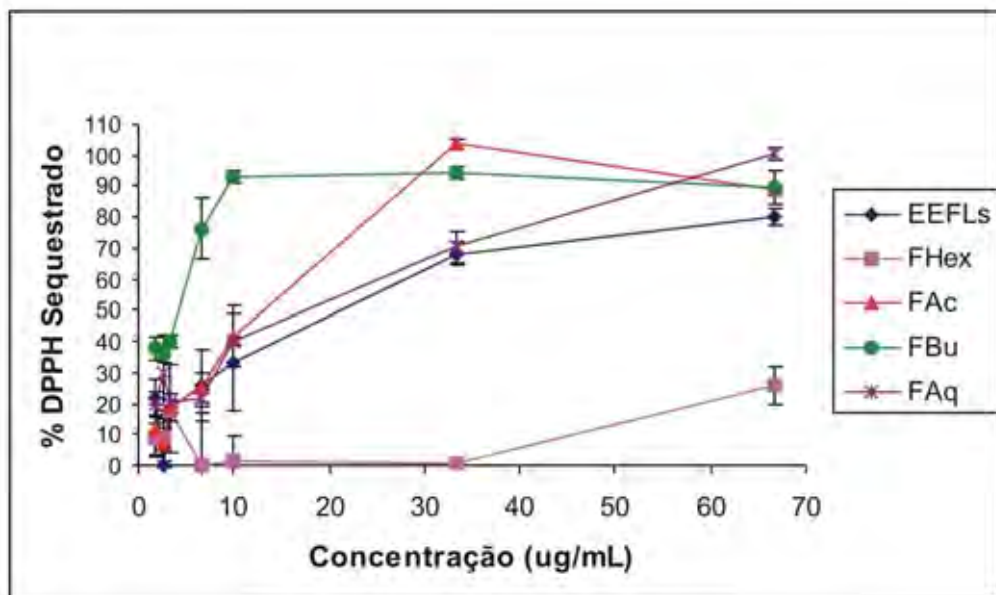


Figura 4.3 - Atividade seqüestradora do radical livre DPPH· do extrato de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs) e de suas frações de partição obtidas com hexano (FHex1), acetato de etila (FAc1), n-butanol (FBu1) e água (FAq1)

Como pode ser observado, as frações de partição FBu1 e FAc1 a 10 µg/ml inibiram 93.0 ± 2.2 e 47.3 ± 0.4 % dos radicais DPPH·, respectivamente, enquanto o extrato bruto que lhes deu origem (EELs) apresentou 33.5 ± 5.7 % de inibição (Figura 4.3). O teste de proteção de β -caroteno (Figura 4.1) mostrou intensas manchas laranjas (indicando proteção do β -caroteno contra a oxidação do ar) em ambas as frações. Assim, FBu1 e FAc1 foram selecionadas para novos processos de fracionamento.

4.3.3 Fracionamento de FAc de EEFLs por CLV em fase reversa

4.3.3.1 Análise das subfrações e rendimentos

A Tabela 4.3 mostra as massas das frações obtidas por CLV a partir de FAc1, que juntamente com FBu1 foram as mais ativas em testes antioxidantes (subseção 4.3.3.1), bem como os rendimentos das operações.

Tabela 4.3 - Massas e rendimentos das frações obtidas por CLV a partir da FAc do EEFLs, em três replicatas¹

Fração	Massa obtida (g)	% da massa inicial
A1	1,5	8,5
A2	4,9	44,5
A3	0,9	5,3
A4	2,4	16,3
A5	0,6	4,5
A6	0,2	1,3
Total	10,5	80,3

¹Referentes a três replicatas, com 3,4; 3,0 g e 5,3 g da FAc, respectivamente

A figura 4.4 mostra os perfis das frações obtidas em três replicatas.

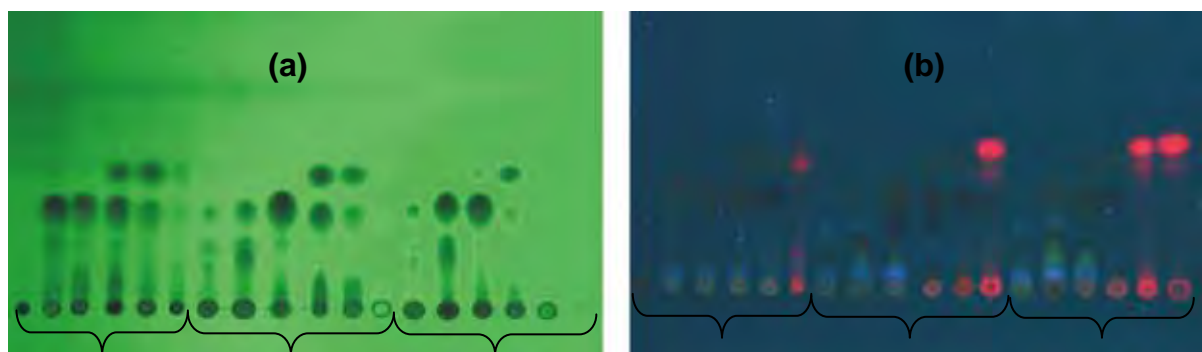


Figura 4.4 - Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366 nm (b). Amostras entre chaves: A1, A2, A3, A4, A5 e A6 de experimentos realizados em épocas diferentes

Nota-se grande semelhança entre as três replicatas realizadas com meses de intervalo. Assim, as frações A2 dos três experimentos foram reunidas a fim de se proceder a novas etapas de fracionamento (já que a fração A2 da primeira replicata foi ativa frente ao β -caroteno e ao radical livre DPPH \cdot - subseção 4.3.3.2), partindo-se de massas maiores. Também mostra a boa reprodutibilidade dos experimentos realizados.

4.3.3.2 Análises das atividades antioxidantes das subfrações obtidas de FAc1

A Figura 4.5 mostra o resultado do ensaio que mediu a capacidade relativa da FAc1 e das suas subfrações obtidas por CLV, de seqüestrar o radical livre DPPH·.

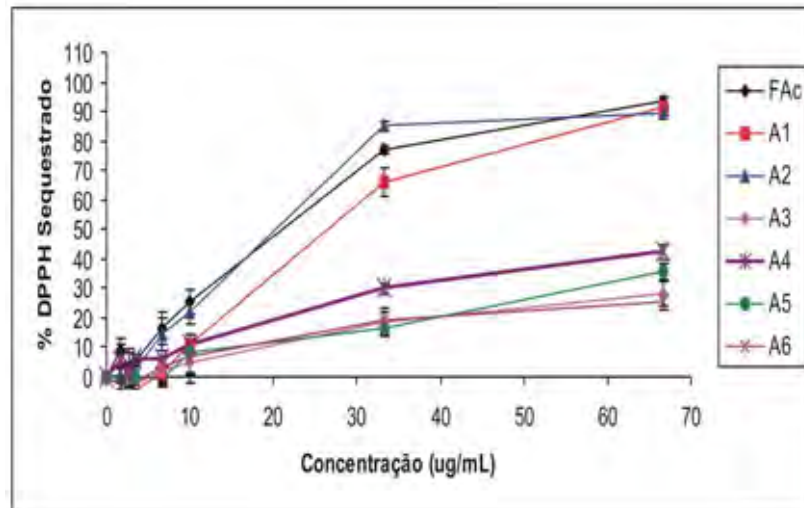


Figura 4.5 - Atividade seqüestradora de radicais DPPH· da fração FAc1 e das suas subfrações A1- A6

Neste ensaio foi possível observar que dentre as subfrações obtidas de FAc1, A2 foi a mais ativa, inibindo $85,1 \pm 1,8$ % de radicais livres DPPH· a $33,3 \mu\text{g/ml}$ (Figura 4.5). Esta mesma fração mostrou exibiu manchas alaranjadas remanescentes no teste frente ao β -carotene, com R_{fs} entre 0,2 e 0,8, como mostra a Figura 4.6, abaixo.

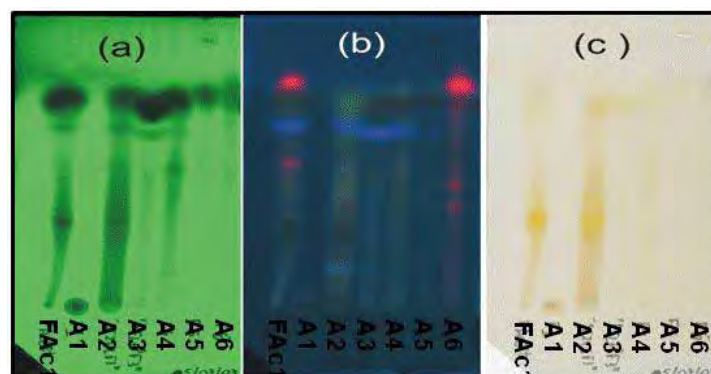


Figura 4.6 - Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a), 366 nm (b) e com β -caroteno (c). Amostras: FAc1 e as suas subfrações A1-A6

4.3.3.3 Fracionamento de A2 por CLV em fase reversa

4.3.3.3.1 Análise das subfrações e rendimentos

A Tabela 4.4, a seguir, mostra as massas e os rendimentos das frações obtidas por CLV a partir da amostra A2, a mais ativa de sua série em testes antioxidantes preliminares, enquanto que as Figuras 4.7 e 4.8 mostram as análises comparativas por CCD.

Tabela 4.4 - Massas das frações obtidas por Cromatografia Líquida sob Pressão Reduzida a partir da fração A2

Fração/substância	Massa obtida (mg)	% da massa inicial ⁽¹⁾
B1-B8	346,5	7,9
B9	178,1	4,1
B10	306,0	7,0
B11-B12	649,1	14,9
B13	442,4	10,1
B14 (substância 1)	678,4	15,5
B15	675,3	15,4
B16	426,9	9,8
B17	24,3	0,5
Total	3726,3	85,4

⁽¹⁾Referente a 4,36g de amostra



Figura 4.7 - Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm (a) e 366nm (b). Amostras, da esquerda para a direita: B1 a B17

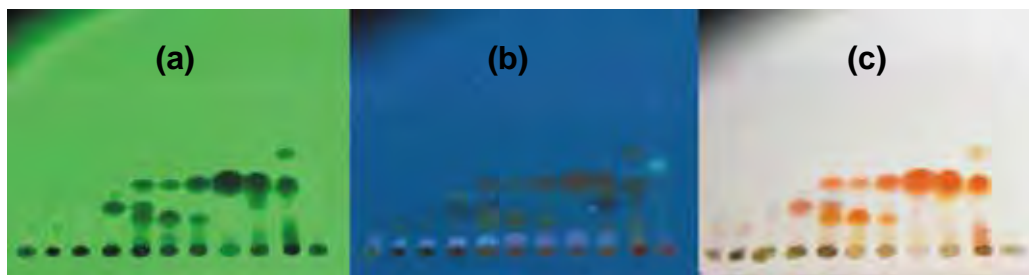


Figura 4.8 - Cromatogramas CCD obtidos em sistema composto por SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v), revelados sob luz UV em $\lambda = 254$ nm(a) e 366 nm (b) e com anisalaldeído(c). Amostras, da esquerda para a direita: B7 a B17

A fração B14 corresponde à substância identificada como 5,7,4'-triidroxiflavanona (**1**), conhecida como naringenina, conformes dados de RMN discutidos na subseção 4.6.1.1. Para esta substância, muito comum em cítricos (GALATI; O'BRIEN, 2004; YODIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004), foram relatadas as atividade inibidora do crescimento de células cancerosas, antimutagênica, quimiopreventiva de câncer de pulmão, efeito vasorelaxante em aorta de ratos, entre outras (BULZOMI et al. 2010; CHANG et al., 2010; EUHOUSER, 2004; GALATI ; O'BRIEN, 2004; GALLUZZO et al., 2010; LÓPEZ-LÁZARO, 2010).

4.3.3.3.2 Atividades antioxidantes das subfrações B1-B17

A Figura 4.9 mostra os perfis em CCD das amostras B1-B17 reveladas com β -caroteno. Foram observadas manchas remanescentes de β -caroteno (indicativo de atividade antioxidante) principalmente nas frações B8, B9, B10 e B11, mas também em menor intensidade nas frações B13 e B16. Como a intensidade da mancha não está somente relacionada com à potência da atividade dos componentes sob esta, mas também às suas quantidades, todas estas amostras foram selecionadas para novas operações de fracionamento. Assim, estas amostras foram analisadas por CLAE-DAD (Figura 4.10) a fim de se definir as novas estratégias para o isolamento de suas substâncias.

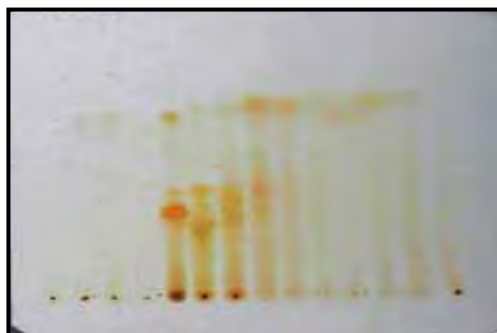


Figura 4.9 - Cromatograma CCD obtido em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (v/v), revelado com β -caroteno. Amostras, da esquerda para a direita: B4 a B17

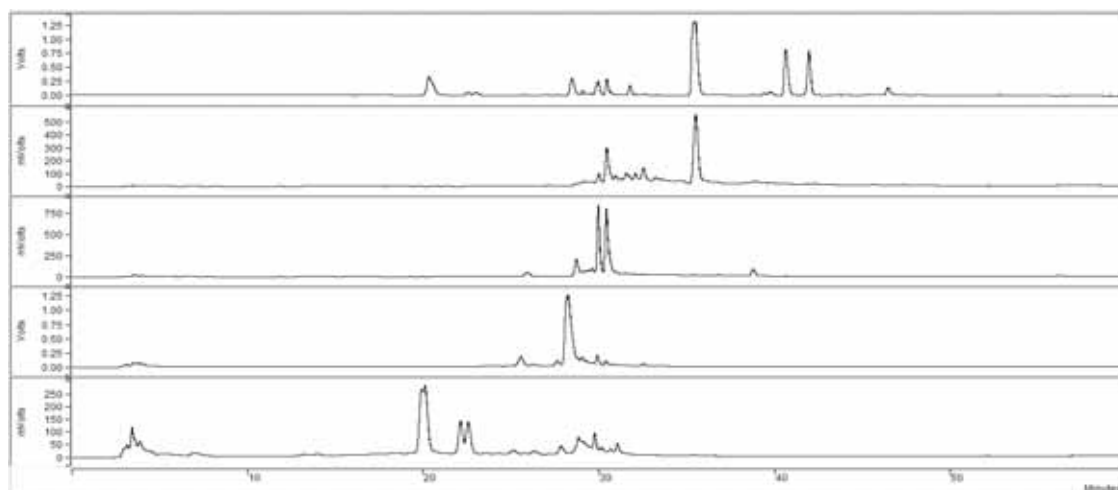


Figura 4.10 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: Água-MeOH em sistema gradiente) a $\lambda = 254$ nm. Amostras, de cima para baixo: EEFLs, B11, B10, B9 e B8

As análises CLAE-DAD (Figura 4.10) mostraram que a etapa de fracionamento a partir de A2 por CLV foi bem sucedida, com a obtenção de frações distintas entre si. Então decidiu-se investir em CLAEprep com as amostras B8 e B9 (pois não demandariam tempos de corridas muito longos), e em CLV para as amostras B10, B11, B13 e B16.

4.3.3.3.3 Fracionamento de B10, B13, B16 e C7 por CLV

A Tabela 4.5 mostra as massas das frações ou substâncias obtidas por CLV das amostras B10, B13, B16 e C7, sendo esta última uma subfração de B10.

Tabela 4.5 - Massas de substâncias e/ou frações obtidas a partir do fracionamento das amostras B10, B13, B16 e C7 por CLV

Fração de origem	Fração/ Substância	Massa obtida (mg)	% da massa inicial ¹
B10	C7	98,1	32,5
	Demais frações	126,6	41,9
B13	Substância 1	238,9	54,0
	Substância 7	52,2	11,8
	Demais frações	278,3	62,9
B16	Substância 3	53,1	12,4
	Substância 2	139,6	32,7
	Demais frações	230,6	54,0
C7	Substância 6	30,0	30,6
	Demais frações	103,5	105,5

⁽¹⁾Referente a 302,2 g de B10, 98,1 mg de C7, 442,4 mg de B13 e 426,9 mg de B16

De B13 foi novamente isolada a naringenina (**1**), mas também a substância 2',4,4',6'-tetraidroxidiidrochalcona (**7**), conhecida como floretina. O fracionamento de B16 levou ao isolamento das substâncias 2',4,6'-trihidroxi-4-metoxidiidrochalcona (**2**) e

5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona (**3**), conhecidas como asebogenina e sacuranetina, respectivamente. Da fração C7 foi isolada a substância 5,7,4'-tetraidroxiflavanonol (**6**), conhecida como aromadendrina. As suas identificações são comentadas nas subseções 4.6.1.1, 4.6.1.2 e 4.6.1.3, respectivamente.

Todas são relatadas aqui pela primeira vez na espécie *L. salvifolia*, sendo que apenas a sacuranetina (**3**) e a naringenina (**1**) já haviam sido identificadas em outras espécies do gênero *Lippia*: *L. dulcis* e *L. graveolens* (DOMÍNGUEZ et al., 1989; ONO et al., 2005), respectivamente.

A floretina (**7**), a chalcona mais abundante em maçãs, vem sendo foco de muitos estudos biológicos devido a suas atividades inibidoras sobre uma gama de células tumorais (CAO et al., 2007; KIM et al., 2009; LÓPEZ-LÁZARO, 2002; PARK et al. 2007; SABZEVARI et al. 2004; WU et al., 2009; YANG et al., 2009).

4.3.3.3.4 Fracionamento de B9 por CLAEprep

O fracionamento de B9 levou ao isolamento da 5,6,3',4'-tetraidroxí-7-O-glicopiranosil-flavona (**4**) (20,0 mg, $t_R = 22$ min.) e da mistura epimérica (2R) e (2S)-eriodictiol-7-O- β -glicopiranosídeo (**5a/5b**) (19,8 mg, $t_R = 18$ min.). A Figura 4.11 mostra cromatogramas obtidos em escalas analítica e preparativa, enquanto que as suas identificações são discutidas nas subseções 4.6.1.3 e 4.6.1.1, respectivamente.

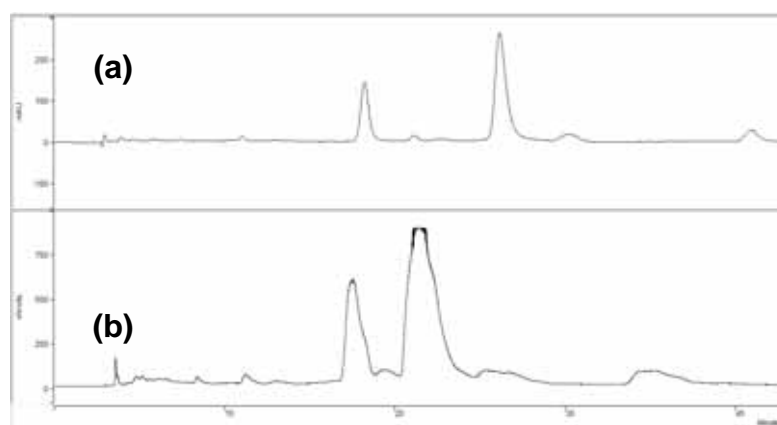


Figura 4.11 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; $\lambda=254$ nm), em escala analítica [F: 1 mL/min.; FM: H₂O-MeOH 7:3 (v/v)] (a) e preparativa [F: 15 mL/min, FM: H₂O -MeOH 67:33 (v/v)] (b), para a amostra B9

Estas substâncias são relatadas aqui pela primeira vez na espécie *L. salviaefolia*, sendo que somente o eriodictiol-7-*O*- β -glicopiranosídeo foi anteriormente identificado no gênero, na espécie *L. graveolens* (LIN et al., 2007).

O eriodictiol-7-*O*- β -glicopiranosídeo, isolado de *Maclura tinctoria*, apresentou atividade antioxidante quando testado em ensaios de Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox e de oxidação de β -caroteno e ácido linoléico, provavelmente devido ao seu grupo catecol (CIOFFI et al., 2003). Quando isolado de *Viscum articulatum* Burm. (*Aspidixia articulata* Burm. f.) (Viscaceae), apresentou atividade sequestradora do radical livre DPPH \cdot (KUO ET AL., 2010). Também apresentou atividade seqüestradora dos radicais hidroxila (HO \cdot) e ânion superóxido (O $_2^{\cdot -}$) (YAO et al. 2006), dentre outras.

4.3.3.3.4 Atividades antioxidantes das substâncias isoladas de A2

As substâncias isoladas do EEFLs (Figura 4.12) tiveram as suas atividades avaliadas frente ao radical livre DPPH \cdot e os resultados são apresentados na Figura 4.13.

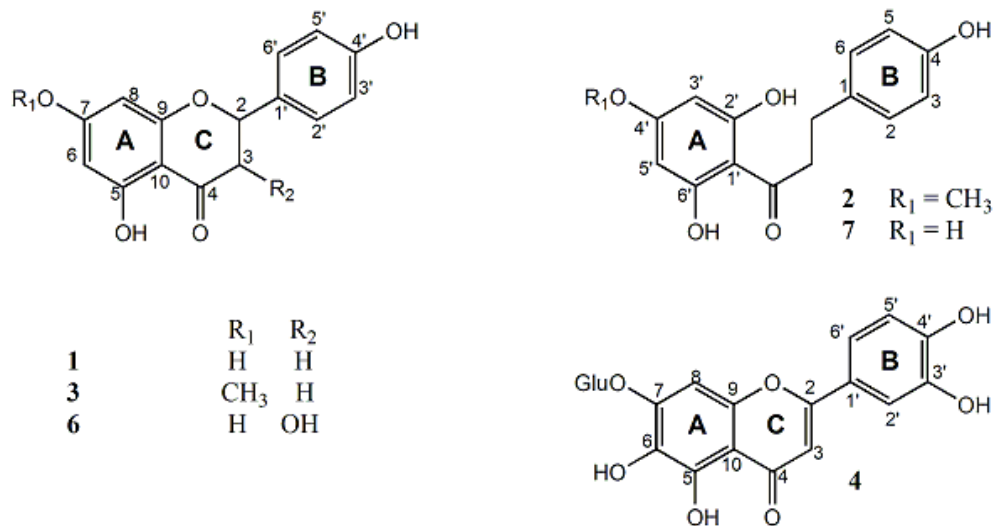


Figura 4.12 - Substâncias isoladas do extrato de folhas de *L. salviaefolia* que foram testadas frente ao radical livre DPPH \cdot .

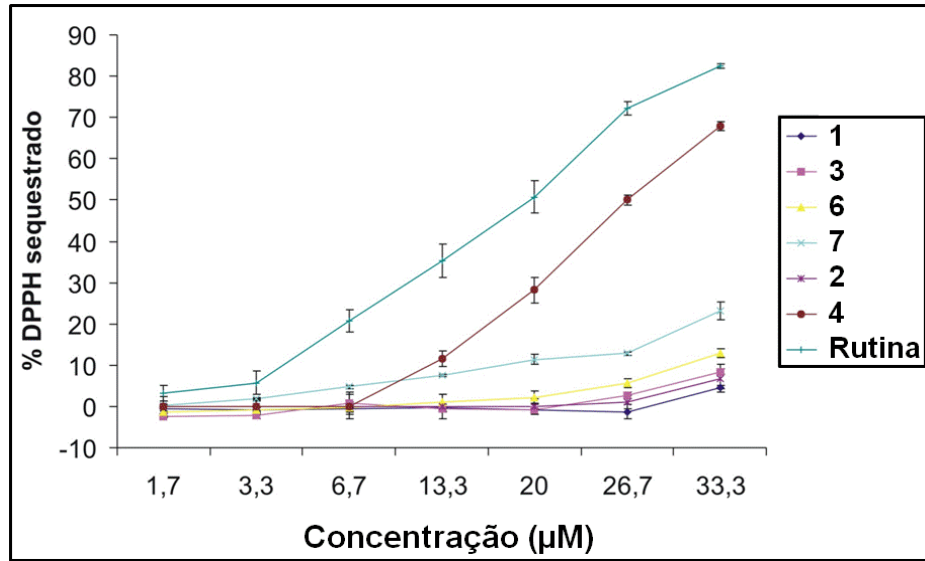


Figura 4.13 - Atividades sequestradoras do radical livre DPPH· das substâncias isoladas do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs)

Como pôde ser observado, dentre as substâncias isoladas, a 6-hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina (**4**) apresentou a maior atividade, seguida da floretina (**7**) e da aromadendrina (**6**). As demais substâncias testadas apresentaram atividades sequestradoras do radical livre DPPH· abaixo de 10%, mesmo na mais alta concentração testada (33,3 μ M). O controle-positivo rutina foi mais ativa em relação a todas as substâncias isoladas. `1

Os resultados estão em acordo com o conhecimento dos mecanismos clássicos das atividades antioxidantes dos flavonóides (BORS et al., 1990; CIOFFI et al., 2003; MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; PIETTA, 2000; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Por exemplo, a rutina (controle-positivo) e a substâncias **4** (6-hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina) possuem o grupo catecol (anel B diidoxilado), insaturação na posição C₂-C₃ e a presença da função 4-oxo no anel C, formando um sistema eletrônico perfeitamente conjugado importante na deslocalização do elétron desemparelhado formado no processo de seqüestro do radical livre DPPH·, estabilizando-o por efeito de ressonância. A substância **6** (floretina) é desprovida do grupo catecol e de insaturação α,β -carbonílica, que são atributos importantes em chalconas para os mecanismos antioxidantes clássicos, mas possui uma hidroxila fenólica a mais (localizada no anel A) em relação às demais substâncias testadas, **1**, **2**, **3** e **6** (Figura 4.12). Hidroxilas fenólicas podem doar um hidrogênio a radicais-livres, estabilizando-os. Ademais, segundo Muschietti e Martino (2007), a di-

hidrochalcona floretina (**7**) mostrou-se uma potente sequestradora do peroxinitrito (ONOO^-) e inibidora de peroxidação lipídica. Ainda segundo os autores, comparação com compostos estruturalmente relacionados estabeleceu que o farmacóforo responsável pela atividade antioxidante da floretina é o 2',6'-diidroxiacetofenona. Contudo, a maior atividade seqüestradora do radical livre DPPH \cdot apresentada pela floretina (**7**) em relação a outra diidrochalcona testada, a asebogenina (**2**), observada aqui, sugere que a hidroxila livre em 4' potencializou a atividade do farmacóforo 2',6'-diidroxiacetofenona, já que esta segunda possui um grupo metoxila na posição 4'.

4.4 FRACIONAMENTO DO EERLS GUIADO POR TESTES ANTIOXIDANTES

4.4.1 Análises comparativas entre FBU1 (de EEFLs) e FBU2 (de EERLs)

As massas obtidas e os rendimentos no processo de extração líquido-líquido do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* podem ser vistos na Tabela 4.2 (subseção 4.2).

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD das frações *n*-butanólicas FBU1 e FBU2, obtidas por extração líquido-líquido dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia* (subseções 3.2.3.2.1 e 3.2.3.3.1) foram comparados, bem como as suas atividades antioxidantes frente ao β -caroteno. Como ambas apresentaram perfis qualitativos e atividades protetoras de β -caroteno similares, mas EERLs apresentou-se mais concentrado nas bandas cromatográficas referentes a substâncias mais polares, ainda não isolados de EEFLs (Figuras 4.14 e 4.15), FBU2 foi selecionada para novas etapas de fracionamento por CPG (substituindo, portanto, o fracionamento de FBU1 e B8, ambas derivadas do EEFLs e que apresentaram atividades antioxidantes – ver subseções 4.3.2 e 4.3.3.3.2).

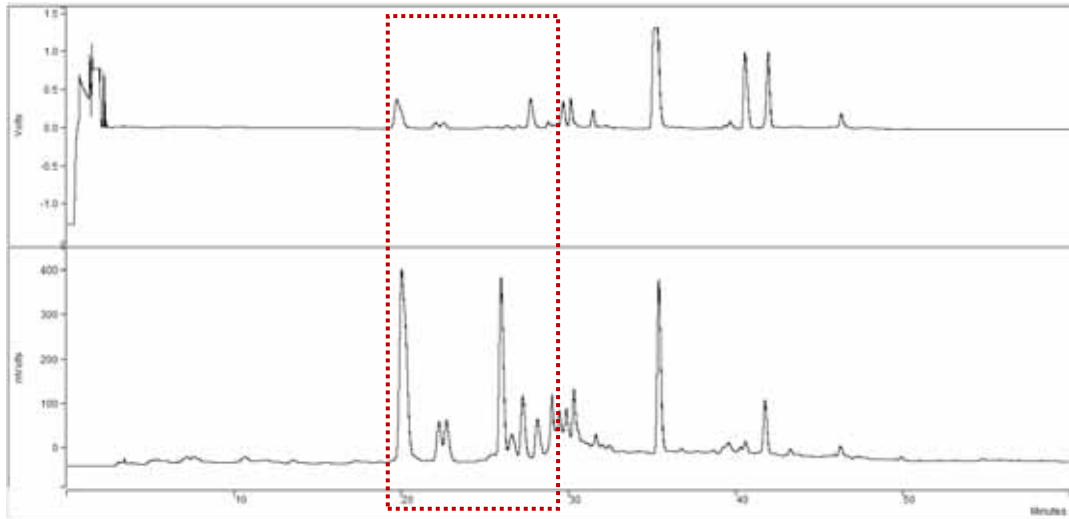


Figura 4.14 - Cromatogramas obtidos por CLAE (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; λ =254 nm; F: 1 mL/min.). Amostras, de cima para baixo: extratos etanólicos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia*

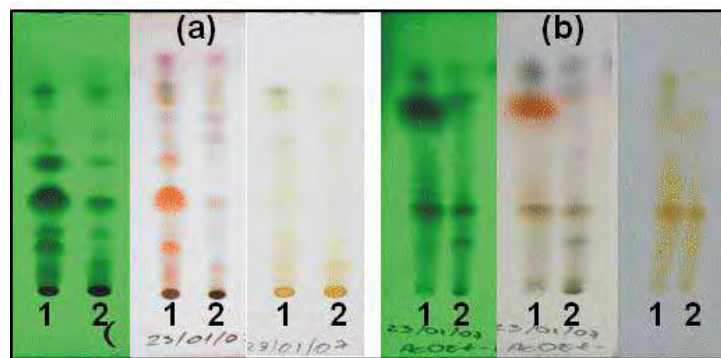


Figura 4.15 - Cromatogramas CCD obtidos nos sistemas SiOH e Hex-AcOEt 1:1 (v/v) (a) ou AcOEt:MeOH:H₂O 100:13,5:10 (v/v) (b) para os extratos etanólicos de folhas (1) e de ramos (2) de *L. salviaefolia*. Da esquerda para a direita de (a) e (b): revelados sob luz UV a λ =254 nm, com anisaldeído ou com β -caroteno

4.4.1.1 Fracionamento de FBU2 por CPG e atividade protetora de β -caroteno

A Figura 4.16 mostra análises comparativas por CCD de alíquotas coletadas em experimento de fracionamento de FBU2 por CPG, com o intuito de se identificar aquelas com atividade protetora de β -caroteno (antioxidantes).



Figura 4.16 - Cromatograma CCD obtido em sistema composto por SiOH e AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (v/v), revelado com β -caroteno. Amostras: alíquotas 1 a 37 obtidos por CPG da fração FBU2 (do EERLs)

Foram observadas manchas remanescentes de β -caroteno nas alíquotas 16 a 25 e 29 a 35 (Figura 4.16). Assim, foram feitas as reuniões das alíquotas 16 a 19, 20 a 25 e 30 a 34, gerando as frações G1, G2 e G3. Estas frações foram submetidas a CLAEsemiprep, como poderá ser visto nas próximas subseções.

4.4.1.1.1 Fracionamento de G1 por CLAEsemiprep

O refractionamento de G1(45 mg, 50 injeções) por CLAEsemiprep (Figura 4.17), levou ao isolamento dos fenilpropanóides forsitósídeo B (**8**) (21,8 mg, $t_R = 12,1$ min) e alissonosídeo (**9**) (4,1 mg, $t_R = 22,5$ min), além da epoxilignana laricirresinol 4'-O- β -glicopiranosídeo (**10**) (4,4 mg, $t_R = 8,2$ min). As suas identificações são discutidas nas subseções 4.6.2.1 e 4.6.2.2, respectivamente.

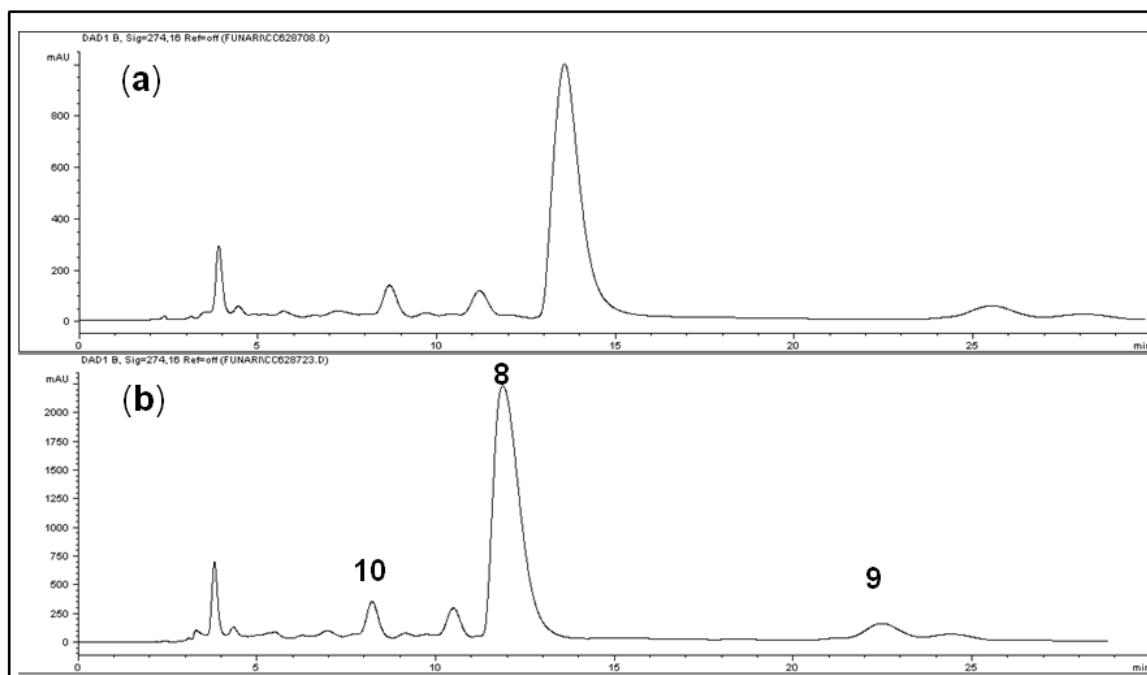


Figura 4.17 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: Água-MeOH 65:35 (v/v); $\lambda=274$ nm], em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra G1

As três substâncias são relatadas aqui pela primeira vez na espécie *L. salviaefolia*, sendo que apenas o fenilpropanóide forsitósídeo B (**8**) já havia sido isolado de espécie pertencente ao gênero *Lippia*: *L. alba* (HENNEBELLE et al., 2006a). O alissonosídeo (**9**) foi isolado de *Lantana canescens* (Verbenaceae) (SENA FILHO et al., 2009), enquanto que a epoxilignana **10** nunca foi isolada de espécies da família Verbenaceae, mas sim de *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) (SHOEB et al., 2004) e *Balanophora polyandra* Griff. (Balanophoraceae) (WANG, ZHANG, YANG, 2006), dentre outras.

O forsitósídeo B e o verbascosídeo, isolados de *Phlomis viscosa* (Lamiaceae), apresentaram atividades sequestradoras do radical livre DPPH \cdot comparáveis ao *dl*- α -tocoferol (controle-positivo), sendo o alissonosídeo menos ativo (ÇALIS, et al., 2005). A epoxilignana laricirresinol 4'-O- β -glicopiranosídeo apresentou fraca atividade neste mesmo tipo de ensaio, quando isolada de *Balanophora polyandra* Griff. (Balanophoraceae) (WANG; ZHANG; YANG, 2006). O forsitósídeo B e O alissonosídeo apresentaram atividades protetoras de células expostas a agentes indutores de oxidação (HEILMANN et al., 2000; MARTIN-NIZARD et al. 2003). O primeiro apresentou também atividade antimicrobiana moderada contra *Proteus*

mirabilis e *Staphylococcus aureus*, incluindo uma cepa meticilina-resistente (DIDRY et al., 1999; ENDO et al., 1982).

4.4.1.1.2 Fracionamento de G2 por CLAEsemiprep

O refractionamento de G2 (58,6 mg, 33 injections), por CLAEsemiprep (Figura 4.18), levou ao isolamento dos fenilpropanóides verbascosídeo (**11**) (19,3 mg, $t_R = 13,6$ min) e forsitosídeo B (**8**), isolado primeiramente de G1. As suas identificações são discutidas na subseção 4.6.2.1.

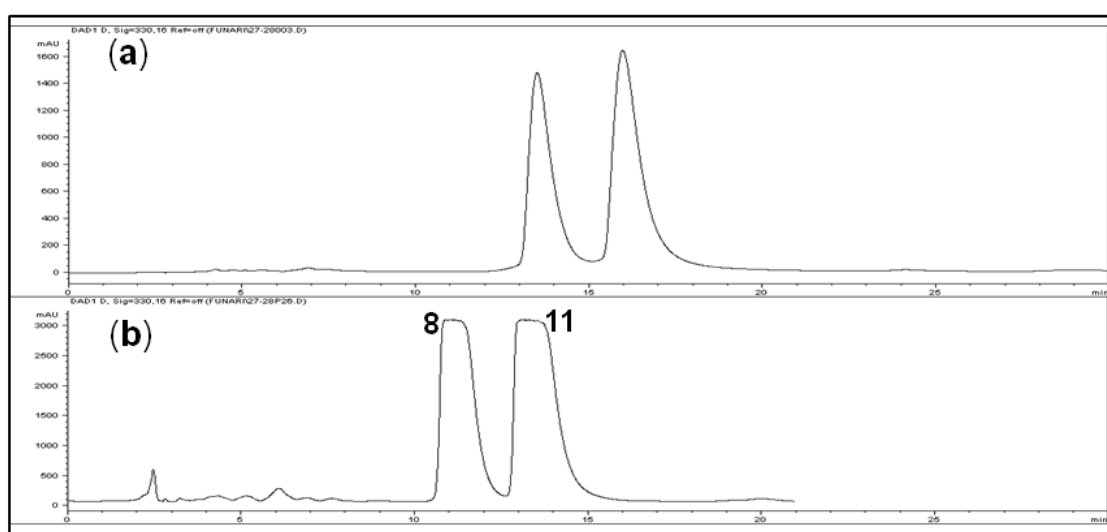


Figura 4.18 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: H₂O-MeOH 65:35 (v/v); $\lambda=274$ nm], em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra G2

O verbascosídeo (**11**) também é relatado aqui pela primeira vez na espécie *L. salviaefolia*. Contudo, já havia sido isolado no gênero das espécies *L. alba* (HENNEBELLE et al., 2006a), de *L. multiflora* (PHAM et al., 1988; TAOUBI et al., 1997), de *L. dulcis* (KANEDA et al. 1992) e de *L. triphylla* (ONO et al., 2008).

Os fenilpropanóides têm sido apontados como agentes antimicrobianos e antioxidantes (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), tendo o verbascosídeo (também chamado de acteosídeo) apresentado atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, imunoregulador, citoprotetora, entre outras (DIDRY et al., 1999; ESPOSITO et al., 2010; FUNES et al., 2010; MARTIN-NIZARD et al. 2003; TAI et al, 2009; WANG et al., 2009; ZHAO et al., 2009), dentre outras.

4.4.1.1.3 Fracionamento de G3 por CLAEsemiprep

A subfração G3 (30,0 mg, 30 injeções) de FBU2 foi fracionada por CLAE-DAD (subseção 3.2.3.3.4), resultando no isolamento das flavanonas glicosiladas inéditas e interconversíveis (2S)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12a**) (6,1 mg, t_R = 31 min.), (2R)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12b**) (2,6 mg, t_R = 35 min.), (2S)-3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**13a**) (1,5 mg, t_R = 57 min.) e (2R)-3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**13b**) (5,9 mg, t_R = 52 min.). A elucidação estrutural destas substâncias, bem como estudos por CLAE-DAD-DC e de interconversões entre elas (por UHPLC-ESI-TOF-MS) são apresentados separadamente na subseção 4.7.

4.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EERZLLUP

A escolha do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup) para isolamento e identificação de substâncias, foi feita com base em estudos de desreplicação por CLAE-DAD. A Figura 4.19, a seguir, mostra o cromatograma obtido para o extrato EERzLlup, além daqueles obtidos para os extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, que já haviam sido fracionados anteriormente.

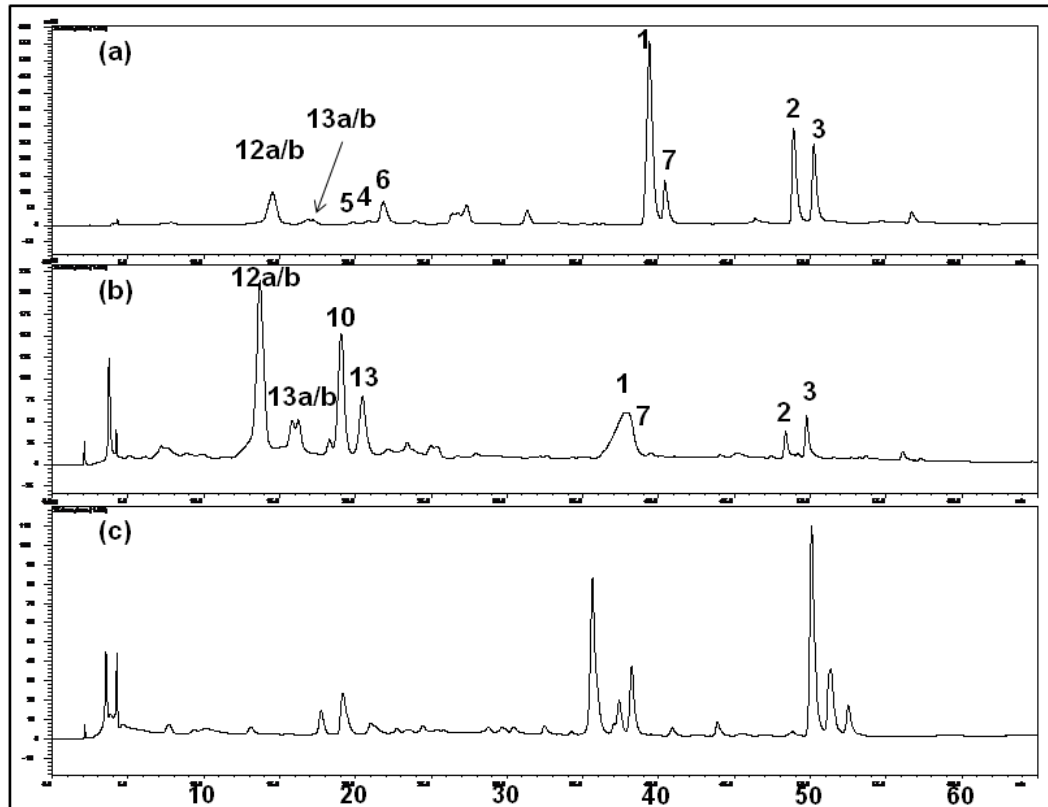


Figura 4.19 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1 mL/min.; λ =254 nm). Amostras: extratos etanólicos de folhas (a) e de ramos (b) de *L. salviaefolia* e de raízes de *L. lupulina* (c)

A comparação por CLAE-DAD do extrato de raízes de *L. lupulina* com os extratos EEFLs e EERLs (Figura 4.19) permitiu observar a diferença do primeiro em relação aos dois extratos de *L. salviaefolia*. As substâncias isoladas dos de EEFLs e EERLs foram utilizadas como referências, tendo-se como parâmetros os seus tempos de retenção e espectros de UV. Por essa técnica, não foi possível observar a ocorrência de nenhuma das substâncias previamente isoladas no extrato de raízes de *L. lupulina*. Posteriormente estes estudos comparativos foram aprofundados por UHPLC-ESI-TOF-MS, como pode ser visto na subseção 4.8, intitulada “Estudos comparativos entre 6 espécies de *Lippia*”.

4.5.1 Extração líquido-líquido de EERzLlup

As massas obtidas e os rendimentos no processo de extração líquido-líquido do extrato etanólico de raízes de *L. salviaefolia* (EERzLlup) podem ser vistos na Tabela 4.2 (subseção 4.2).

4.5.1.1 Fracionamento de FHex3 por CLMP em fase normal

O fracionamento de 600 mg de FHex3 do EERzLlup, por Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) levou ao isolamento dos ácidos oleanônico (**14**) (335,3 mg) e oleanólico (**15**) (8,0 mg). Juntos, ambos os triterpenos representaram 57,2 % da massa inicial de FHex3. As identificações foram feitas com base em seus RMN de ^{13}C , como pode ser visto na subseção 4.6.3.1.

Estes triterpenos (**14** e **15**) são aqui relatados pela primeira vez na espécie *L. lupulina*. O ácido oleanólico (**15**) foi isolado de *Lippia triphylla* (ONO et al., 2008), sendo que o ácido oleanônico (**14**) nunca foi isolado no gênero *Lippia*, mas sim de três espécies englobadas na família Verbenaceae: *Junellia tridens* (Lag.) Mold. (CALDWELL et al., 2000), *Lantana camara* (FATOPE et al., 2002) e *Junellia aspera* (PUNGITORE et al., 2005). Ambos tiveram relatadas algumas atividade biológicas, tais como atividades inseticidas moderadas contra *Sitophilus oryzae* (L.) (PUNGITORE et al., 2005) e tóxicas contra a *M. tuberculosis* H37Rv, sendo **14** mais potente que **15** (CALDWELL et al., 2000; CANTRELL; FRANZBLAU; FISCHER, 2001).

4.5.1.1.1 Fracionamento de FAc3 por CC em fase normal

A junção das 5 alíquotas coletadas no fracionamento de FAc3 por CC foram feitas com base na análise de seus perfis por CLAE-DAD e geraram 3 frações: H1 (21,8 mg), H2 (175,5 mg) e H3 (259,7 mg). O rendimento total da operação foi de 76,2%. Nesta etapa, o objetivo foi simplificar a amostra FAc3 para posteriores trabalhos de isolamento de substâncias por CLAE-DAD.

4.5.1.1.2 Fracionamento de H2 por CLAEsemiprep em fase reversa

H2 (20,0 mg, 20 injeções), obtida de FAc3 (subseção 4.5.1.1.1), foi fracionada por CLAE-DAD. O escalonamento pode ser observada na Figura 4.20.

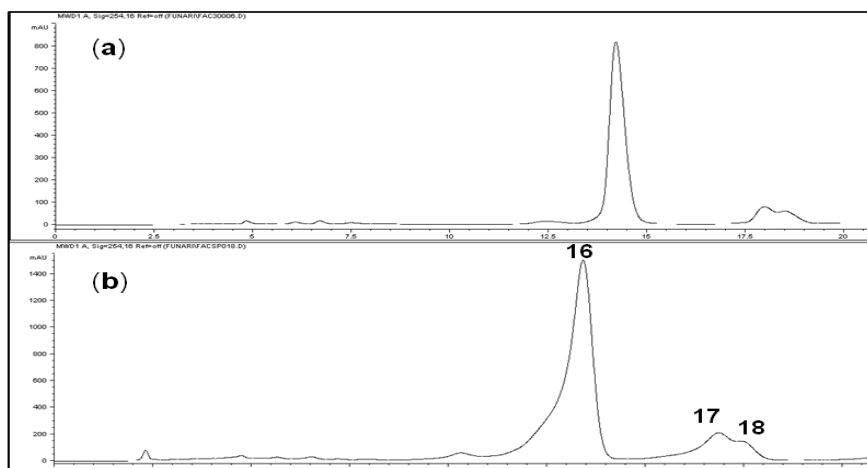


Figura 4.20 - Cromatogramas obtidos por CLAE (FE: C18; FM: Água-MeOH 1:1; $\lambda=254$ nm), em escala analítica (F: 0,9 mL/min) (a) e semi-preparativa (F: 3,0 mL/min) (b), para a amostra H2

Nesta etapa, foram obtidas as furanonaftoquinonas estenocarpoquinona (**16**) (3,4 mg, $t_R = 13,4$ min.), também chamada estenocarpona B, avicequinona E (**17**) (0,3 mg, $t_R = 16,9$ min.) e o furanocromona 1^o-O-glicosilcimifugina (**18**) (5,0 mg, $t_R = 17,5$ min.), todos relatados pela primeira vez na espécie *L. lupulina* e na família Verbenaceae neste trabalho. As suas identificações podem ser vistas nas subseções 4.6.3.2 e 4.6.3.3.

A estenocarpoquinona foi isolada pela primeira vez de *Stenocarpus salignus* (Proteaceae), mas também de *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae) (SCHMEDA-HIRSCHMANN; PAPASTERGIU, 2003), dentre outras. A avicequinona E, isolada pela primeira vez na natureza da espécie *Mendoncia cowanii*, mostrou atividade contra células de câncer de ovário humano A2780, com IC_{50} de 8,8 μ M, enquanto que a estenocarpoquinona apresentou IC_{50} de 50 μ M no mesmo teste (WILLIAMS et al., 2006). Já a 1^o-O-glicosilcimifugina foi isolada de *Ledebouriella seseloides* Wolff (SASAKI, 1982) e é um ingrediente ativo e utilizado no controle de qualidade de *Radix saposhnikoviae*, planta utilizada na medicina tradicional chinesa, tendo apresentado atividades tais como imunoreguladora e anti-aglomeração plaquetária no sangue (LIU; WU; SUN, 2008).

4.5.1.1.3 Fracionamento de FBU3 por Cromatografia de Permeação em Gel

O fracionamento de FBU3 por CPG levou ao isolamento da isoflavona 7-O- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo]-biocchanin A (**19**) (18,5 mg) e do estilbeno (*E*)-resveratrol-3-O- β -glicopiranosídeo, chamado de

piceíde (**20**) (13,5 mg). Ademais, a reunião das alíquotas 20-22 gerou a subfração I1 (40,0 mg).

Ambas as substâncias são relatadas na espécie *L. lupulina* e na família Verbenaceae pela primeira vez no trabalho ora apresentado. Foram encontrados relatos do isolamento da substância **19** unicamente das espécies *Andira inermis* (Fabaceae) (SILVA; VELOZO; PARENTE, 2000) e *Dalbergia sissoo* (Leguminosae) (FARAG et al., 2001), sem avaliações quanto a suas possíveis atividades biológicas.

Não obstante, piceíde (**20**), o derivado de resveratrol mais abundante em sucos de uva (ROMERO-PÉREZ et al., 1999), é muito mais abundante na natureza, tendo sido isolado de *Vitis vinifera* e *Humulus lupulus* L. (JERKOVIC; COLLIN, 2007), dentre outras. É encontrado em alimentos derivados de uva (MORENO-LABANDA et al., 2004), cacau (COUNET; CALLEMIEN; COLLIN, 2006), amendoim (IBERN-GOMEZ et al., 2000), etc., tendo sido relatadas muitas atividades biológicas, como cardioprotetora, vasodilatadora, inibidora de agregação plaquetária e de coagulação, antiinflamória, etc. (HURST et al. 2008), majoritariamente relacionadas a sua potente atividade antioxidante (COUNET; CALLEMIEN; COLLIN, 2006; FABRIS et al. 2008).

4.5.1.1.4 Fracionamento de I1 por CLAEprep em fase reversa

Da subfração I1 (40 mg, 8 injeções), obtida de FBU3, foi purificado o Iridóide glicosilado β -diidroastatosídeo (**21**) (5,0 mg, $t_R=35,1$ min.). A sua identificação é discutida na subseção 4.6.3.6. A Figura 4.21, a seguir, mostra os cromatogramas obtidos em escala analítica e aquele resultante da etapa de escalonamento para CLAEprep.

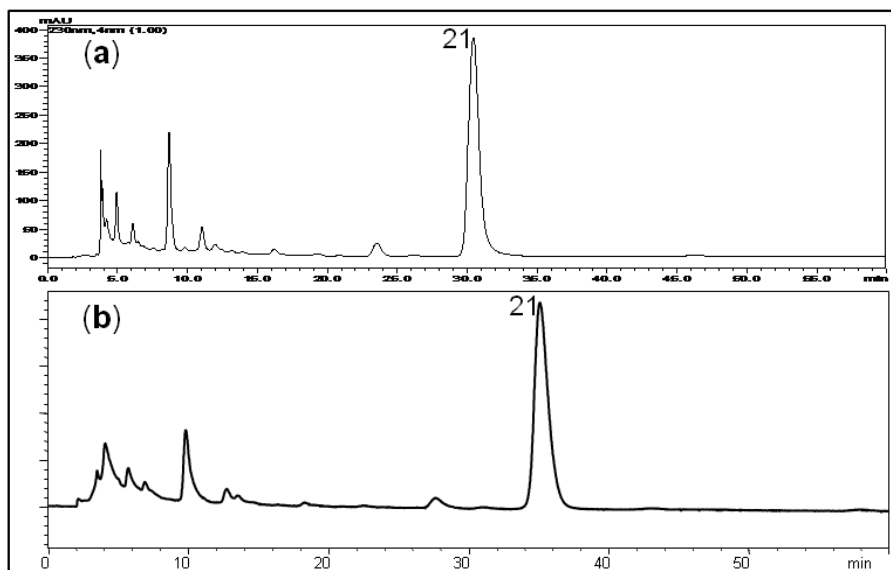


Figura 4.21 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C18; FM: H₂O-MeOH 7:3 (v/v); λ =230 nm], em escala analítica (F: 0,6 mL/min) (a) e preparativa (F: 12,0 mL/min) (b), para a amostra I1

O β -diidroastatosídeo (**21**) é, aqui, relatado pela primeira vez na espécie *L. lupulina* e na família Verbenaceae. Foi isolado anteriormente das espécies *Penstemon nitidus* (BOROS; STERMITZ, 1990; TEBORG E JUNIOR, 1991) e *Penstemon secundiflorus* Benth. (Scrophulariaceae) (KRULL, 1998).

Não foram encontrados dados referentes a testes biológicos para esta substância, embora os iridóides venham sendo muito investigados, apresentando uma gama de atividades, tais como neuroprotetora, antiinflamatória, imunomoduladora, hepato e cardioprotetora, anticâncer, antimicrobiana, hipoglicemiante, antiespasmódica, entre outras (DINDA; DEBNATH; HARIGAYA, 2007; TUNDIS et al., 2008).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

Nesta subseção não serão discutidas as elucidações estruturais das flavanonas interconversíveis **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, que serão apresentadas à parte na subseção 4.7.

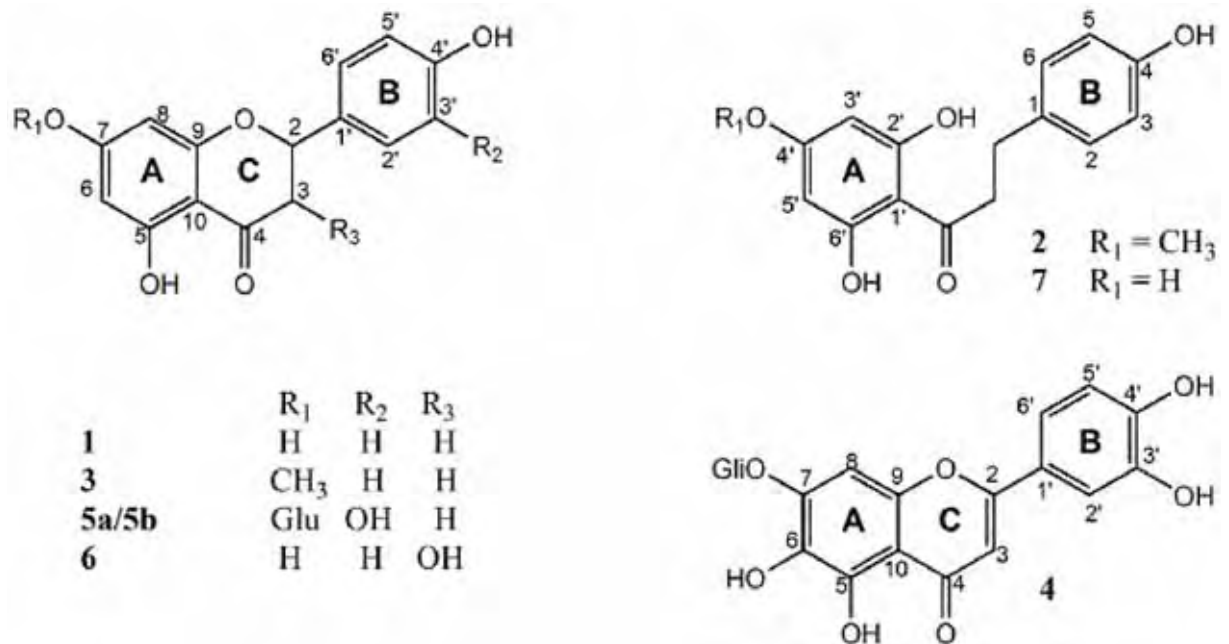
4.6.1 Substâncias isoladas do extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs)

Figura 4.22 - Substâncias isoladas do extrato etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs)

4.6.1.1 Flavanonas (**1**, **3** e **5a/5b**)

A Tabela 4.6, a seguir, traz os dados de RMN de ¹H e de ¹³C das substâncias **1**, **3** e **5a/5b**.

Tabela 4.6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **1**, **3** e **5a/5b** (11,7 T)^a

Posição	1 ^b		3 ^b		5a/5b ^c	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{d}}$
2	78,4	5,42 (dd; 3; 12,5)	78,6	5,48 (dd; 3; 13)	78,7	5,32 (dl; 12,5)
3eq	41,9	2,67 (dd; 3; 17,0)	42,0	2,73 (dd; 3; 17)	42,2	2,75 (dl; 17)
3ax		3,24 (dd; 12,5; 17,0)		3,30 (dd; 13; 17)		3,12 (dd; 12,5; 17)
4	196,3	-	196,9	-	197,1	-
5	163,5	-	163,2	-	162,9	-
6	95,8	5,86 (sl)	94,6	6,08 (d; 2,5)	96,4	6,18 (s)
7	166,7	-	167,4	-	165,2	-
8	95	5,86 (sl)	93,8	6,10 (d; 2,5)	95,4	6,21 (s)
9	162,9	-	162,8	-	162,7	-
10	101,7	-	102,6	-	103,3	-
1'	128,8	-	128,7	-	129,1	-
2'	128,3	7,30 (d; 8,5)	128,3	7,33 (d; 8,5)	114,5	6,92 (s)
3'	115,1	6,78 (d; 8,5)	115,2	6,80 (d; 8,5)	145,3	-
4'	157,7	-	157,7	-	145,9	-
5'	115,1	6,78 (d; 8,5)	115,2	6,80 (d; 8,5)	115,4	6,79 (s)
6'	128,3	7,30 (d; 8,5)	128,3	7,33 (d; 8,5)	118,0	6,79 (s)
1''	-	-	-	-	99,5	4,97 (m)
2''	-	-	-	-	73,0	3,36-3,45 (m)
3''	-	-	-	-	76,3	3,36-3,45 (m)
4''	-	-	-	-	69,5	3,36-3,45 (m)
5''	-	-	-	-	77,1	3,36-3,45 (m)
6''	-	-	-	-	60,6	3,67-3,70 (m)
4'-OH	-	9,6 (s)	-	9,6 (s)	-	-
5-OH	-	12,2 (s)	-	12,2 (s)	-	-
7-OCH ₃	-	-	55,9	3,79 (s)	-	-

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bSolvente: DMSO-*d*₆.

^cSolvente: DMSO-*d*₆ para RMN de ^{13}C e CD₃OD para RMN de ^1H .

^dMultiplicidades e constantes de acoplamentos (*J* em Hz) entre parênteses.

Identificação da substância 1: naringenina

A substância foi isolada como um sólido cristalino branco e o seu espectro de UV (Figura 4.23), obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 289 e 326 nm, condizente com flavanonas (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.24; Tabela 4.6) apresentou dois duplos dubletos, em 2,67 (*J*=3 e 17 Hz) e 3,24 ppm (*J*=12,5 e 17 Hz), e outro em 5,42 (*J*=3 e 12,5 Hz), todos integrando para um hidrogênio, característicos do sistema saturado entre C-2 e C-3 de uma flavanona (Agrawal, 1989). Assim, foram atribuídos a H-3a e H-3b e H-2, respectivamente. Os dubletos em 6,78 e 7,30 ppm (ambos com *J*= 8,5 Hz), cada um integrando para dois hidrogênios, mostraram-se típicos do anel B (aromático) 1',4'-dissubstituído (oxigenado na posição 4') e foram atribuídos a H-3'/H-5' e H-2'/H-6', respectivamente. O singletto largo em 5,86 ppm, integrando para 2 hidrogênios, foi atribuído a H-6 e H-8 do anel A tetrassubstituído (oxigenado nas

posições C-5, C-7 e C-9). O singlete largo em 12,2 ppm foi atribuído ao hidrogênio do grupo fenólico em C-5, envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4. Os dados de acoplamento obtidos pelo mapa de contorno *g*COSY corroboraram as atribuições realizadas.

O espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) evidenciou 13 sinais (Tabela 4.6), destacando-se em intensidade os sinais em 115,1 e 128,8 ppm, correspondentes aos pares de carbonos equivalentes C-3'/C-5' e C-2'/C-6', respectivamente.

O mapa de contornos *g*HMQC mostrou correlação entre os carbonos em 95,0 e 95,8 ppm e um sinal de hidrogênio (singlete) em 5,86 ppm, que foram atribuídos a C-8 e C-6, respectivamente, já que ambos são protegidos por oxigênios nos dois carbonos em posição *orto* e em dois carbonos em posição *para*. O mapa de contornos *g*HMBC mostrou correlação entre o carbono de anel aromático não hidrogenado em 101,7 ppm e um singlete em 5,86 ppm (H-6 e H-8) e outro singlete, largo, em 12,2 ppm (H da hidroxila em C-5) e foi atribuído ao C-10. O sinal de carbono em 162,9 ppm mostrou correlação com o singlete em 5,86 ppm (H-6 e H-8) e foi atribuído ao C-9. Os sinais de carbonos em 163,5 e 166,7 ppm correlacionam-se, respectivamente, com o singlete largo em 12,2 ppm e com o singlete em 5,86 ppm (H-6 e H-8) e foram atribuídos a C-5 e C-7. O sinal de carbono de anel aromático não hidrogenado em 128,3 ppm apresentou correlação com o dublete em 6,78 ppm (H-3' e H-5') e foi atribuído a C-1', enquanto que o carbono em 157,7 ppm, desprotegido pelo oxigênio em *ipso*, apresentou correlações com os dubletos em 6,68 (H-3' e H-5') e 7,30 ppm (H-2' e H-6') e foi atribuído a C-4'.

As atribuições nos levaram a identificar a substância como sendo a 5,7,4'-trihidroflavanona (Figura 4.22), ou naringenina, e os dados de RMN confirmaram aqueles apresentados por Venturella et al. (1980).

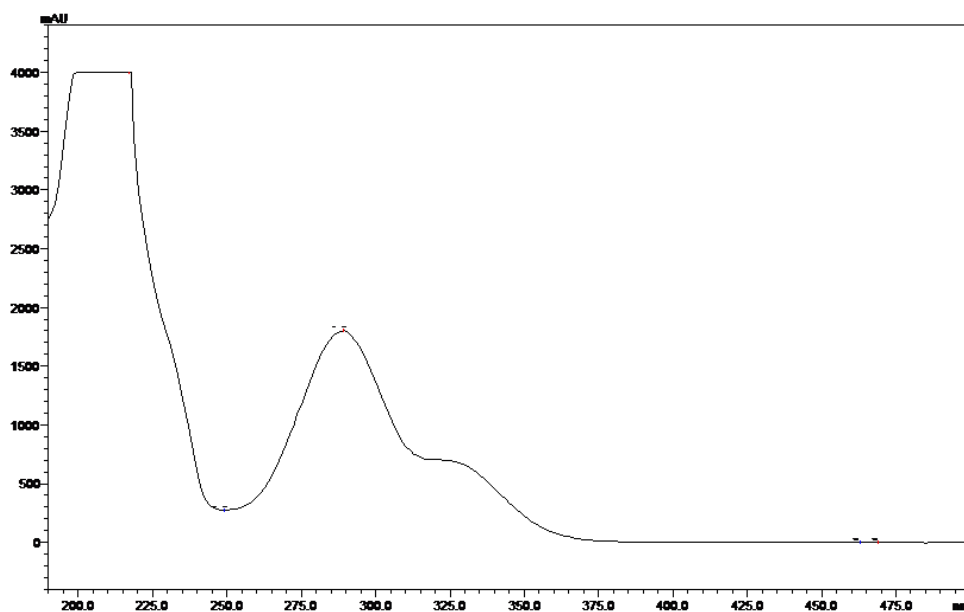


Figura 4.23 - Espectro de UV da substância 1

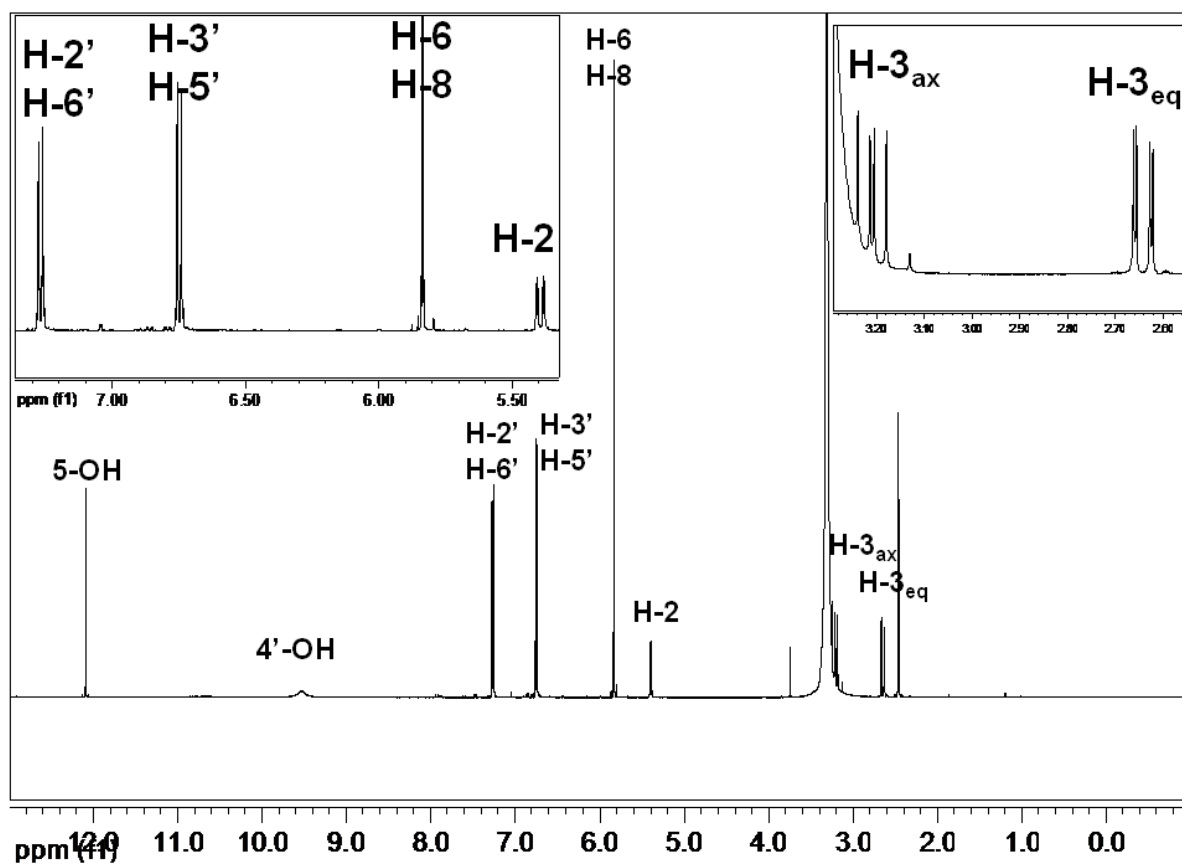


Figura 4.24 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (500 MHz, DMSO-d_6)

Identificação da substância **3**: sacuranetina

A substância **3** foi isolada como um sólido cristalino branco e o seu espectro de UV, obtido por CLAE-DAD, apresentou $\lambda_{\text{max}} = 287$ e 330 nm, condizente com flavanonas (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970) e similar ao observado para a substância **1** (Figura 4.23).

Seus espectros de RMN de ^1H (Figura 4.25) e de ^{13}C foram muito similares aos obtidos nas análises da substância **1** (Tabela 4.6), sendo a principal diferença a ocorrência de um sinal a mais no espectro de RMN de ^{13}C , correspondente ao grupo metoxílico ligado a C-7, posição confirmada pelo experimento NOESY 1D. Os mapas de contorno gCOSY, gHMQC e gHMBC confirmaram as atribuições feitas e a substância foi identificada como 5,4'-diidroxiflavanona (Figura 4.20), ou sacuranetina, anteriormente isoladas por Hurabielle et al. (1982) e Mizuno t. al. (1987).

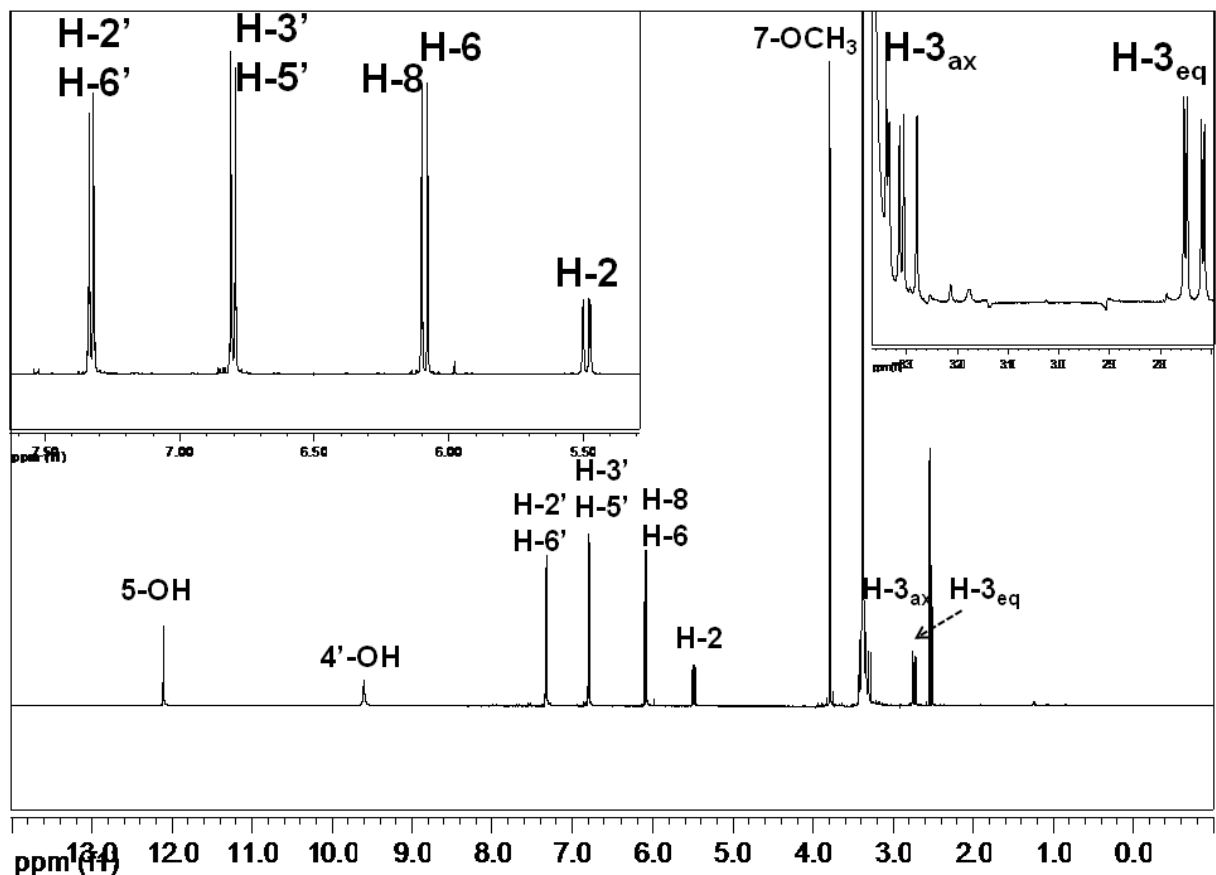


Figura 4.25 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Identificação das substâncias **5a/5b**: (2R) e (2S)-eriodictiol-7-O- β -glicopiranosídeo

A mistura epimérica **5a/5b** foi obtida como um sólido esverdeado e o seu espectro de UV, obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{\max} em 283 e 328 nm, condizente com flavanonas (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970) e similar ao observado para as substâncias 1 e 3 (Figura 4.23).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra **5a/5b** (Figura 4.26) apresentou três sinais característicos do sistema saturado entre C-2 e C-3 de uma flavanona, em 2,75 (dl, $J=17,0$ Hz, H-3a), 3,12 ppm (dd, $J=12,5$ e 17,0 Hz, H-3b) e 5,32 ppm (dl, $J=12,5$ Hz, H-2) (Agrawal, 1989). Quatro sinais de hidrogênios de sistemas aromáticos, sendo três singletos em 6,92 (H-2', H-1), 6,21 (H-8, 1H) e 6,18 (H-6, 1H) ppm e um singlete largo em 6,79 (H-5', H-6') ppm, também foram observados. Ainda, um sinal de hidrogênio anomérico (H-1'') em 4,97 ppm e de outros sinais em 3 – 4 ppm típicos de uma unidade glicosídica (Tabela 4.6).

O mapa de contornos $g\text{HMBC}$ mostrou correlação dos sinais 4,97 (H-1''), 6,21 (H-8) e 6,18 (H-6) ppm com aquele em 165,2 ppm e foi atribuído a C-7, confirmando O-glicosilação nesta posição, com dois hidrogênios, em C-6 e C-8. Permitiu também a definição do anel B, com a presença do grupo catecol, evidenciando uma 5,3',4'-trihidroxi-7-O-glicosídeo-flavanona. Experimento TOCSY 1D, irradiando-se em 4,97 ppm (H-1''), permitiu a definição do açúcar como uma unidade de β -glicose.

O seu espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (Tabela 4.6) apresentou os sinais típicos de flavanona O-glicosilada e do par C-4' (145,9 ppm) e C-3' (145,3 ppm), referente ao grupo catecol no anel B. Sua ampliação mostrou a existencia de alguns sinais duplicados, como o de C-2 (78,7/78,6), C-5 (162,7/162,6 ppm), C-7 (165,3/165,2 ppm), C-1'' (99,5/99,6 ppm), C-3'' (77,0/77,1 ppm), evidenciando tratar-se da mistura epimerica (2R)- and (2S)-eriodictiol-7-O- β -glicopiranosídeo (**5a** e **5b**) e corroborando os dados apresentados por Pan et al. (2008) para a mesma mistura.

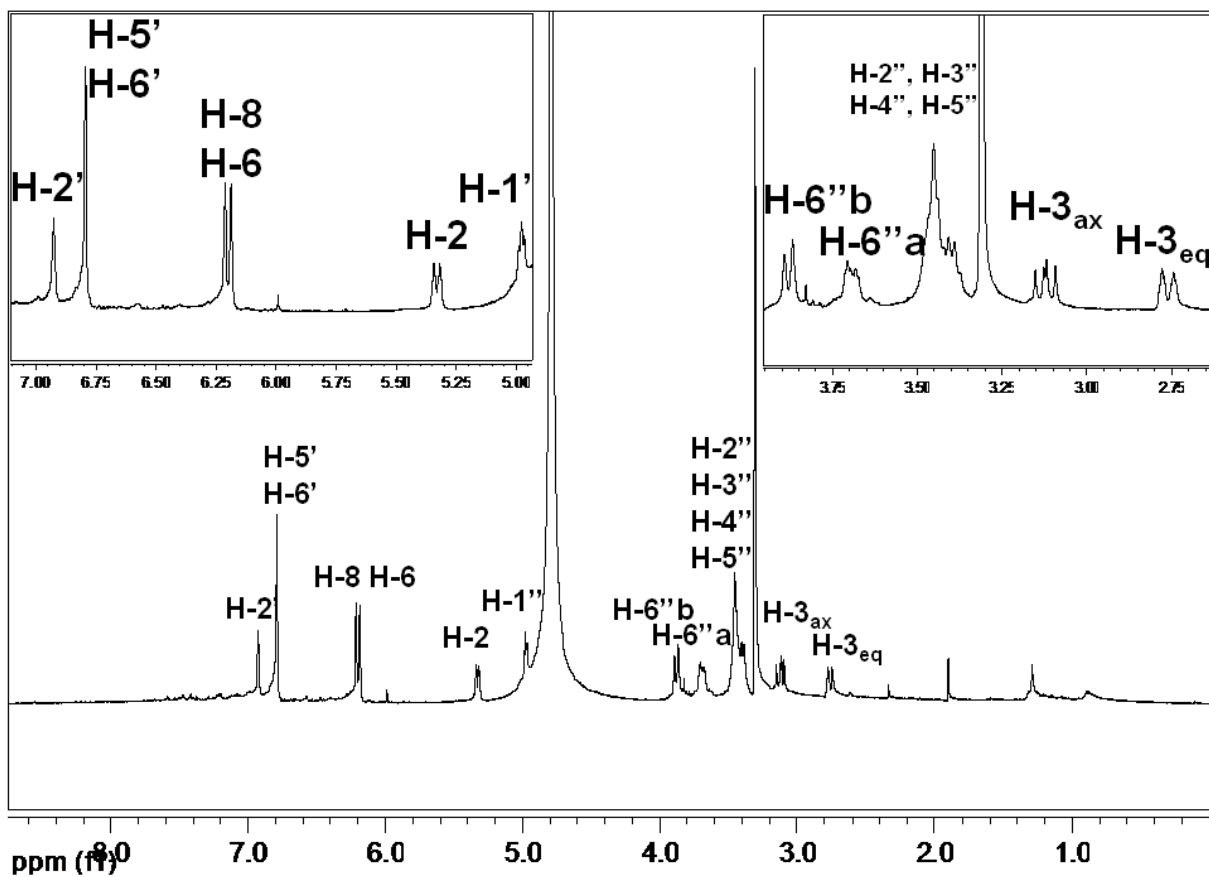


Figura 4.26 - Espectro de RMN de ^1H da substância **5** (500 MHz, CD_3OD)

4.6.1.2 Diidrochalconas (**2** e **7**)

A Tabela 4.7 traz os dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **2** e **7**.

Tabela 4.7 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **2** e **7** (DMSO- d_6 ; 11,7 T)^a

Posição	2		7	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
1'	104,6	-	103,8	-
2'	164,0	-	164,2	-
3'	93,2	5,94 (s)	94,7	5,82 (s)
4'	165,4	-	164,6	-
5'	93,2	5,94 (s)	94,7	5,82 (s)
6'	164,0	-	164,2	-
α	45,5	3,24 (t; 7,8)	45,4	3,22 (t; 7,2)
β	29,3	2,77 (t; 7,8)	29,4	2,77 (t; 7,2)
1	131,5	-	131,6	-
2	129,1	7,01 (d; 8,5)	129,1	7,01 (d; 8,5)
3	115,0	6,65 (d; 8,5)	115,1	6,66 (d; 8,5)
4	155,4	-	155,4	-
5	115,0	6,65 (d; 8,5)	115,1	6,66 (d; 8,5)
6	129,1	7,01 (d; 8,5)	129,1	7,01 (d; 8,5)
C=O	204,8	-	204,2	-
4'-OCH ₃	55,3	3,72 (s)	-	-
4-OH	-	9,15 (s)	-	-
2'-OH	-	12,25 (s)	-	12,25 (s)
6'-OH	-	12,25 (s)	-	12,25 (s)

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

Identificação da substância **2**: asebogenina

Esta substância foi isolada como um sólido cristalino branco e o seu espectro de UV (Figura 4.27), obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 285 e 330 nm, condizente com diidrochalconas (HERMOSO et al., 2003).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (Figura 4.28) apresentou dois tripletos, em 2,77 ($J= 7,8$ Hz, H- β) e 3,24 ppm ($J= 7,8$ Hz, H- α), integrando para dois hidrogênios cada, característico de um sistema saturado nos carbonos das posições α e β de diidrochalconas (AGRAWAL, 1989). Apresentou, ainda, um singleto em 3,72 ppm (7-OCH₃, 3H) de hidrogênios de uma metoxila ligada a anel aromático. Na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos, foram observados um singleto em 5,95 ppm, correspondente a H-6 e H-8 (2H), e dois sinais de hidrogênios em posição *orto* de um anel aromático 1,4-dissubstituído, em 6,65 ($J= 8,5$ Hz, H-3/H-5) e 7,00 ($J= 8,5$ Hz, H-2/H-6). O singleto largo em 12,25 ppm foi atribuído ao hidrogênio do grupo fenólico em C-6', envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolécula com

o oxigênio carbonílico. O singlete largo em 9,15 ppm foi atribuído ao hidrogênio do grupo fenólico do anel aromático B. Os dados de acoplamento obtidos pelo mapa de contorno gCOSY corroboraram as atribuições realizadas.

O espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) evidenciou 12 sinais (Tabela 4.7), como aqueles em 29,3, 45,5 e 204,8 ppm, atribuídos a C- β , C- α e C=O, respectivamente, e típicos de diidrochalconas (AGRAWAL, 1989); o sinal referente ao carbono metoxílico (55,3 ppm) e sinais em 93,2, 115,0, 129,1 e 164,0 ppm, correspondentes aos pares de carbonos equivalentes C-3'/C-5', C-3/C-5, C-2/C-6 e C-2'/C-6', respectivamente.

Análises dos mapas de contornos gCOSY, gHMQC e gHMBC permitiram identificar a substância **2** como 2',4,6'-triidroxi-4'-metoxidiidrochalcona (Figura 4.22), ou asebogenina. Os dados de RMN corroboraram aqueles apresentados por Hermoso et al. (2003).

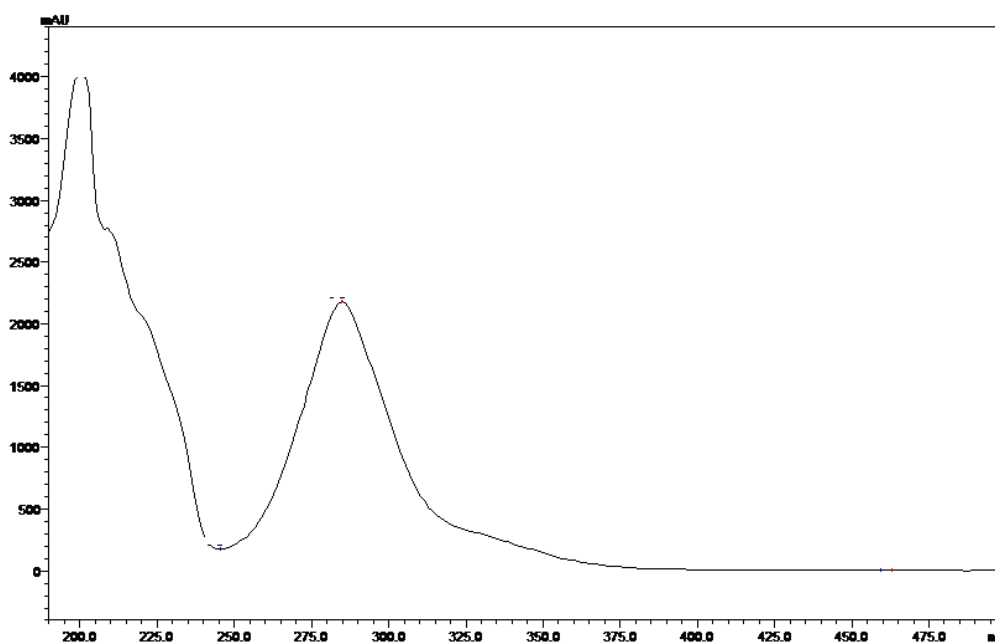


Figura 4.27 - Espectro de UV da substância 2

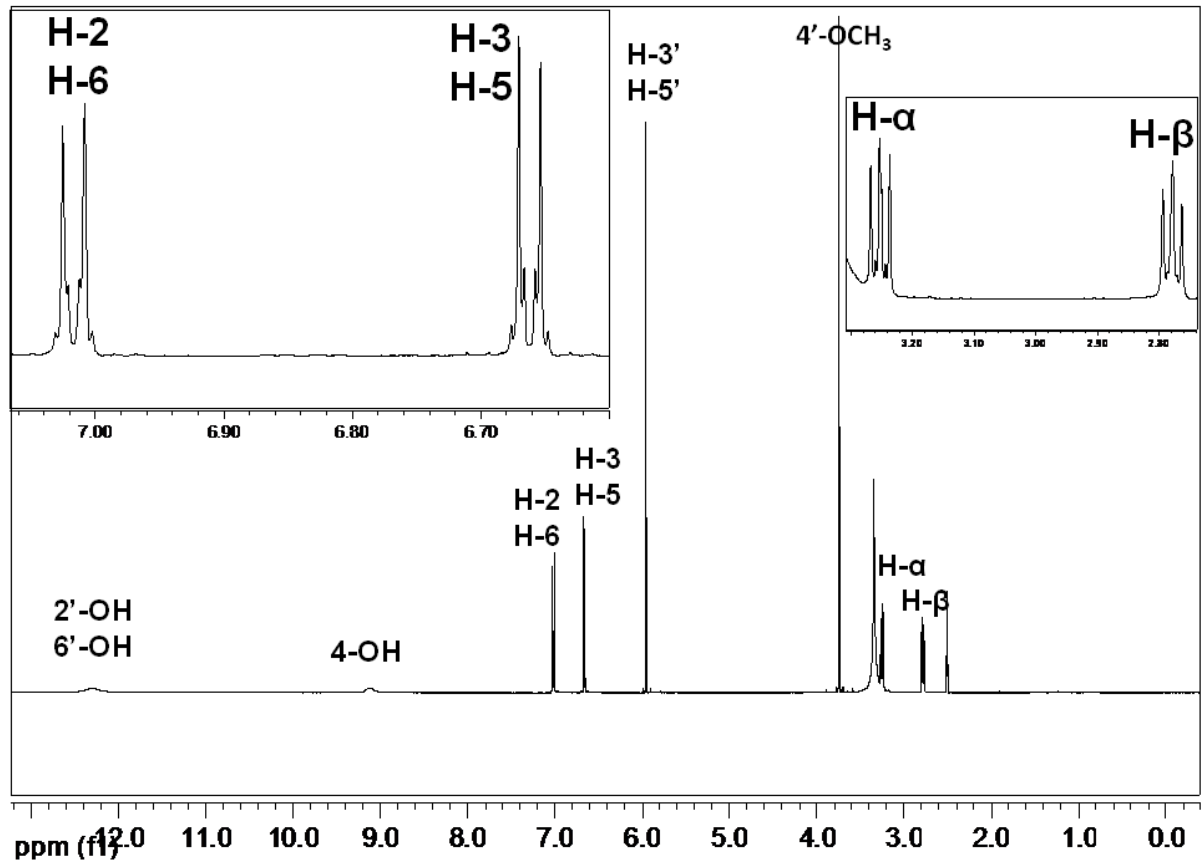


Figura 4.28 - Espectro de RMN de ^1H da substância **2** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Identificação da substância **7**: floretina

A substância **7** foi isolada como um sólido branco cristalino e o seu espectro de UV, obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 286 e 326 nm, condizente com diidrochalconas (HERMOSO et al., 2003), e análogo ao observado para a substância **2** (Figura 4.27).

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 4.29) e de ^{13}C da substância **7** (Tabela 4.7) foram similares aos obtidos nas análises da substância **2** (Tabela 4.7), sendo a sua principal diferença a inexistência do sinal correspondente ao grupo metoxílico ligado ao anel aromático da substância **2**. A substância **7** foi, então, identificada como floretina (Figura 4.22) e os dados de RMN corroboraram aqueles apresentados por Hufford e Oguntimein (1980).

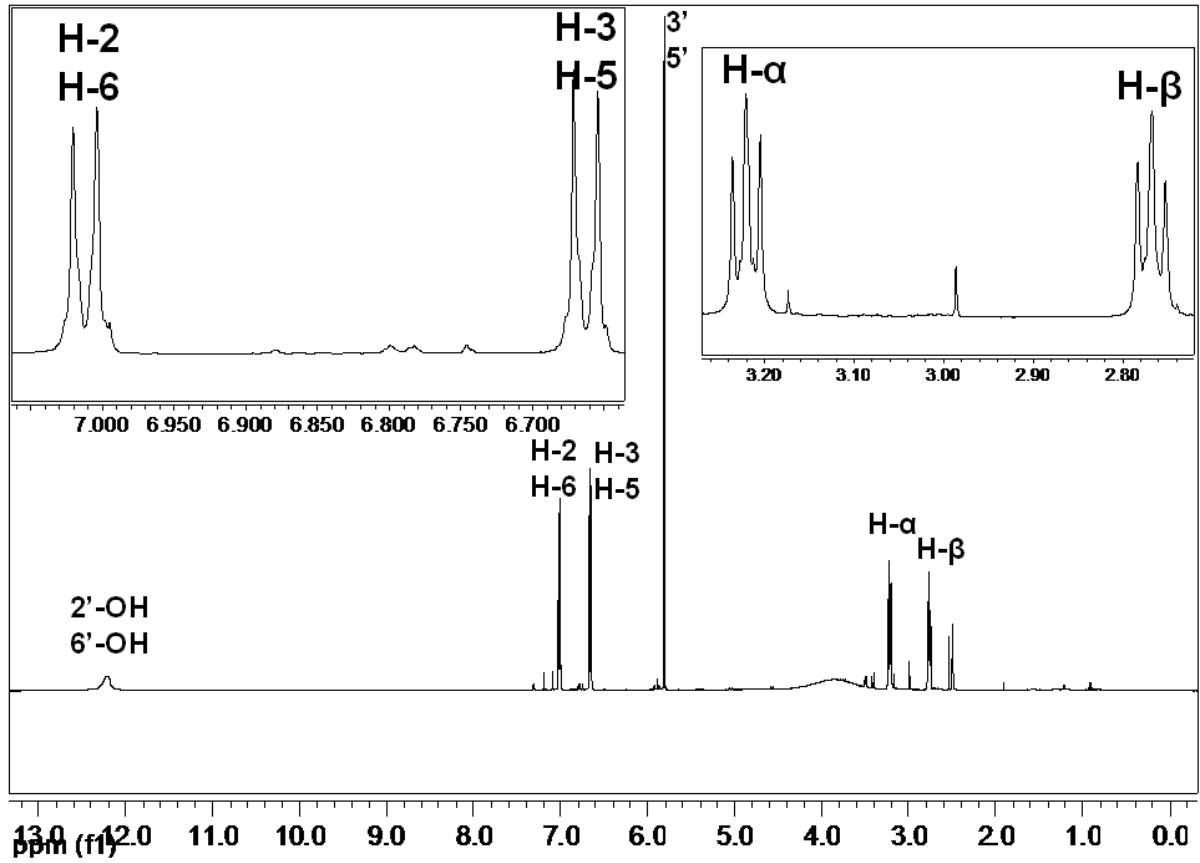


Figura 4.29 - Espectro de RMN de ^1H da substância 7 (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

4.6.1.3 Flavona (**4**) e flavanonol (**6**)**Tabela 4.8** - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **4** e **6** ($\text{DMSO}-d_6$; 11,7 T)^a

Posição	4 ^a		6 ^a	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
2	164,4	-	83,6	5,02 (d; 11,0)
3	102,3	6,66 (s)	72,1	4,55 (d; 11,0)
4	182,2	-	198,4	-
5	146,6	-	164,0	-
6	130,5	-	96,8	5,89 (s)
7	151,3	-	167,7	-
8	94,0	6,95 (s)	95,7	5,84 (s)
9	149,0	-	163,3	-
10	105,8	-	101,1	-
1'	121,0	-	128,2	-
2'	113,2	7,38 (dl; 3,0)	130,1	7,29 (d; 8,5)
3'	146,0	-	115,6	6,77 (d; 8,5)
4'	151,3	-	159,2	-
5'	115,9	6,86 (d; 8,5)	115,6	6,77 (d; 8,5)
6'	119,0	7,40 (dl; 8,5)	130,1	7,29 (d; 8,5)
1''	101,0	5,0 (d; 7,0)	-	-
2''	73,2	3,37 (m)	-	-
3''	75,8	3,37 (m)	-	-
4''	69,7	3,20 (m)	-	-
5''	77,3	3,48 (m)	-	-
6''	60,7	3,52 (m)	-	-
5-OH	-	3,75 (d; 10,5)	-	-
		12,80 (sl)	-	11,90 (sl)

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

Identificação da substância **4**: 6-Hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina

A substância **4** foi isolada como um sólido amarelo e o seu espectro de UV (Figura 4.30), obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 281 e 346 nm, condizente com flavonas (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970).

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.31; Tabela 4.8) apresentou um singlete em 6,66 ppm, típico de hidrogênio olefínico de flavonas ligado ao carbono 3. Dois dubletos, em 6,86 ($J = 8,5$ Hz) e 7,40 ppm ($J = 8,5$ Hz), com constantes de acoplamentos entre hidrogênios em *orto*, foram atribuídos a H-5' e H-6', respectivamente, enquanto que o singlete em 7,38 ppm foi atribuído a H-2', num sistema típico de anel aromático B trissubstituído com hidroxilas ligadas aos carbonos C-3' e C-4' (grupo catecol). Esse espectro evidenciou, ainda, um singlete em 6,95 ppm associado ao anel A, já que não foram observadas correlações no mapa de contorno gCOSY; e um singlete largo em 12,80 ppm, atribuído ao

hidrogênio do grupo fenólico em C-5. Observaram-se, ainda, um dubleto em 5,0 ppm ($J=7,0$ Hz, H-1'') e outros sinais entre 3,75-3,20 ppm, sugerindo a existência de uma unidade de açúcar, possivelmente uma unidade de β -glicose em C-1''.

O seu espectro de RMN de ^{13}C evidenciou 20 sinais (Tabela 4.8), incluindo aqueles em 164,4 e 102,3 ppm, típicos dos carbonos olefínicos C-2 e C-3 de flavonas (AGRAWAL, 1989), e os 6 sinais entre 60,7 e 101,0 ppm, típicos de uma O-glicose, cuja presença foi confirmada pelo experimento TOCSY 1D irradiando-se em 5,0 ppm.

O mapa de contornos $g\text{HMBC}$ mostrou acoplamento entre o sinal em 6,95 ppm e aquele em 105,8 (C-10), evidenciando que o hidrogênio do anel aromático A estaria nas posições 6 ou 8. Experimento NOESY 1D, com irradiação no sinal em 5,0 ppm (H-1''), mostrou correlação espacial com o singlete em 6,95 ppm, sugerindo seu posicionamento em *orto* ao carbono ligado à unidade glicosídica (C-7). As demais atribuições feitas com base nos mapas de contornos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$ e os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C observados (Tabela 4.8) corroboraram os estudos de Lu e Foo (2000), definindo-se a substância **4** como 5,6,3',4'-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavona ou 6-Hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina (Figura 4.22).

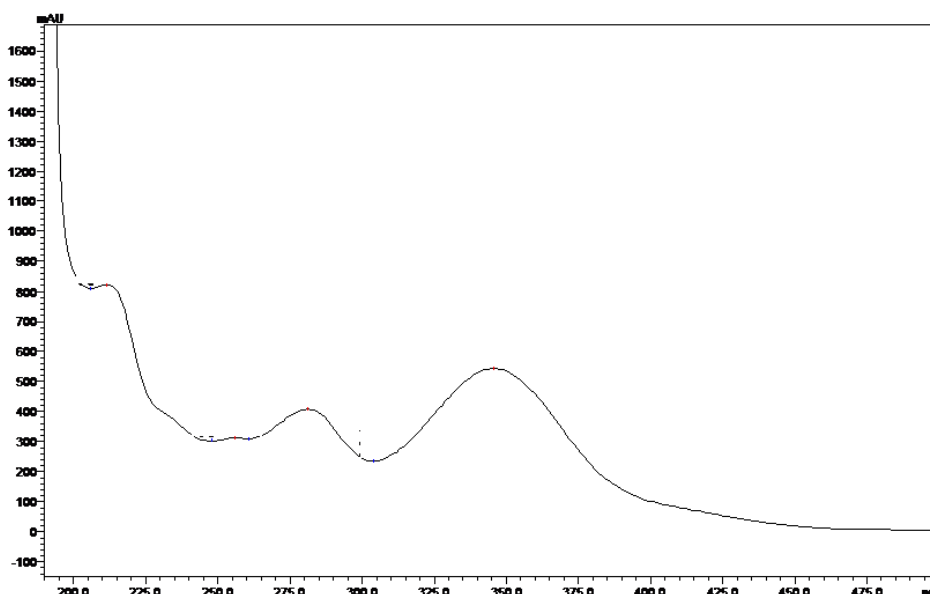


Figura 4.30 - Espectro de UV da substância **4**

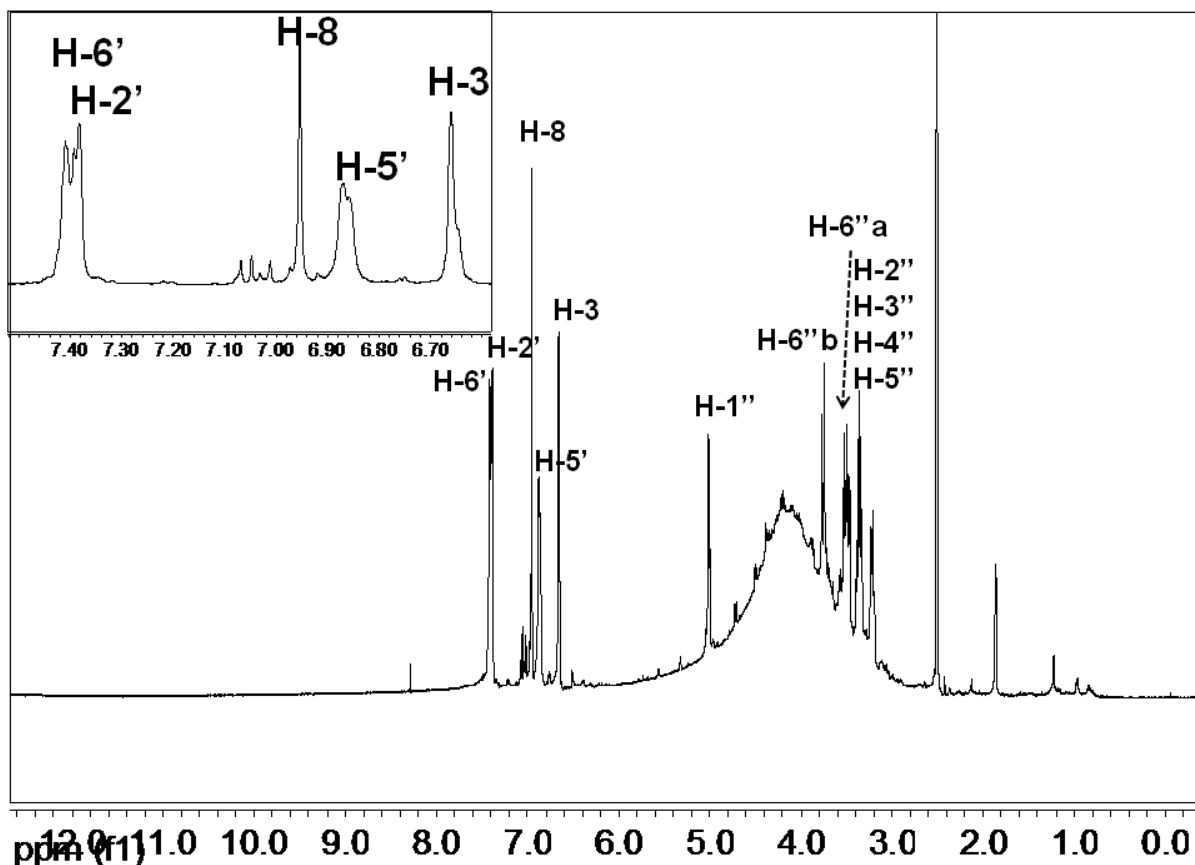


Figura 4.31 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Identificação da substância **6**: aromadendrina

A substância **6** foi isolada como um sólido escuro.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.32, Tabela 4.8) apresentou dois dubletos, em 4,55 ($J = 11,0$ Hz) e 5,02 ppm ($J = 11,0$ Hz), cada um integrando para um hidrogênio, caracterizando um sistema saturado entre C-2 e C-3 de um flavanonol. Assim, foram atribuídos a H-3 e a H-2, respectivamente. A constante de acoplamento observada, de 11,0 Hz, indicou que os hidrogênios H-2 e H-3 estão em posição *antiperiplanar*. Os singletos em 5,01 e 5,89 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A tetrassubstituído (oxigenado nas posições C5, C7 e C-9), respectivamente. Os dubletos em 6,77 e 7,29 ppm ($J = 8,5$ Hz), integrando para dois hidrogênios, típicos do anel B (aromático) 1',4'-dissubstituído (oxigenado em C-4'), foram atribuídos a H-3'/H-5' e H-2'/H-6', respectivamente. O singlete largo em 11,90 ppm foi atribuído ao hidrogênio do grupo fenólico em C-5. Os dados de

acoplamento obtidos pelo mapa de contorno g COSY corroboraram as atribuições realizadas.

O seu espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) evidenciou 13 sinais (Tabela 4.8), com destaques para aqueles em δ_{C} 72,1, 83,6 e 198,4, correspondentes a C-3, C-2 e C4, respectivamente. A inserção de uma hidroxila na posição 3 de uma flavanona desloca em aproximadamente + 30,5 e + 5 ppm (desprotege) os valores de absorção dos carbonos C-3 e C-2, não influenciando o carbono C-4 (Agrawal, 1989). Se compararmos os valores obtidos aqui com aqueles da substância **1**, notamos que estes efeitos foram observados. Assim, configurou-se um sistema típico de substância da subclasse dos flavanonóis. Destacaram-se em intensidade os sinais em 115,6 e 130,1 ppm, correspondentes aos pares de carbonos equivalentes C-3'/C-5' e C-2'/C-6', respectivamente.

Finalmente, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tabela 4.8) foram comparados com os dados da literatura e a substância **6** (Figura 4.22) foi identificada como aromadendrina (JEON et al., 2008).

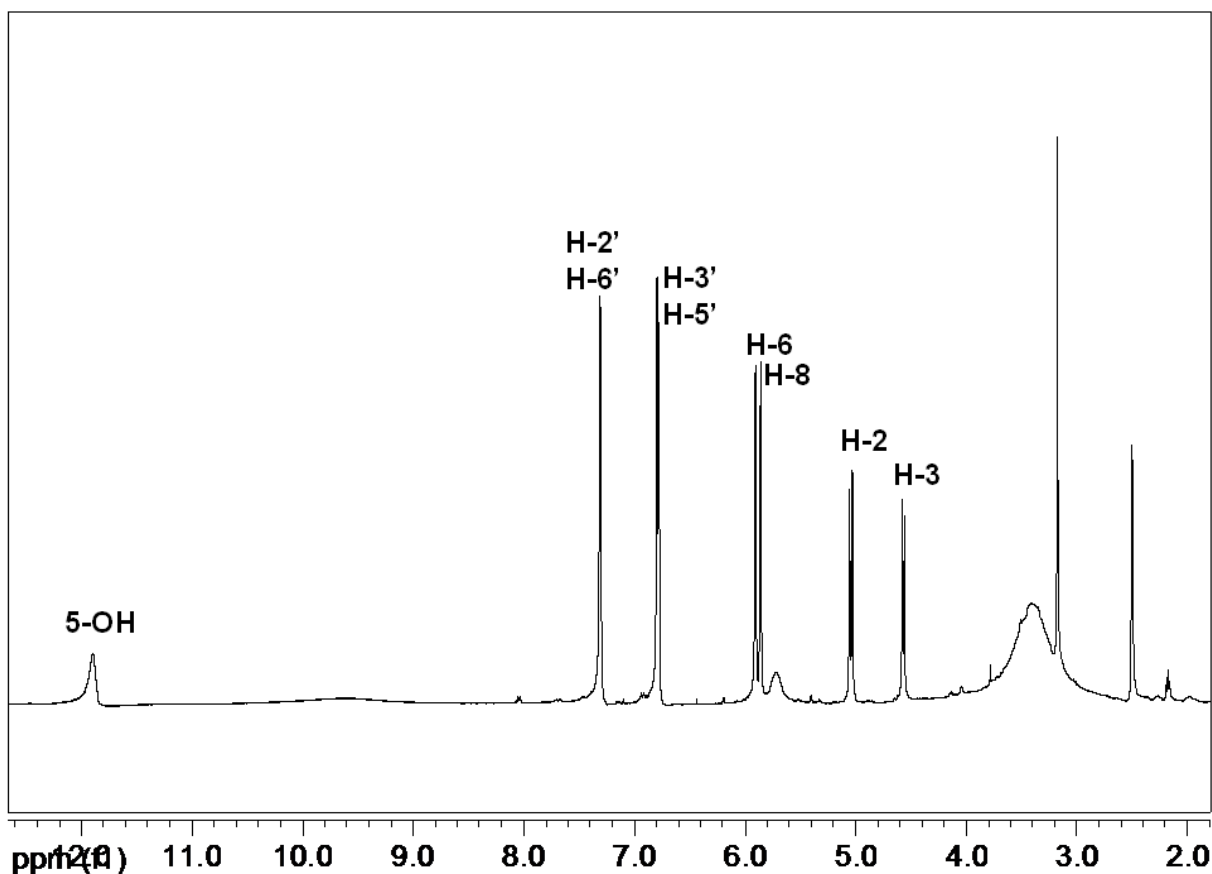


Figura 4.32 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

4.6.2 Substâncias isoladas do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs)

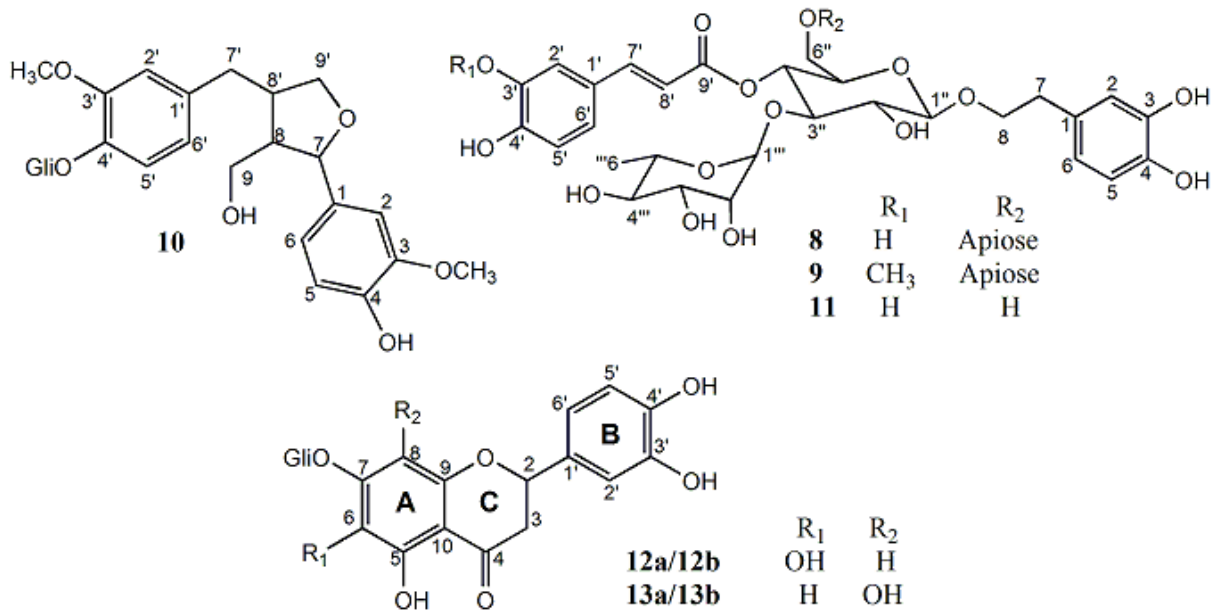


Figura 4.33 - Substâncias isoladas do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia*

A seguir, serão discutidas as identificações estruturais das substâncias **8-11**, enquanto que as elucidações estruturais dos isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b** (Figura 4.33) serão discutidas na subseção 4.7, intitulada “ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDOS DOS ISÔMEROS **12a**, **12b**, **13a** e **13b**”.

4.6.2.1 Fenilpropanóides (**8**, **9** e **11**)

A Tabela 4.9, a seguir, traz os dados de RMN de 1H e de ^{13}C obtidos para as substâncias **8**, **9** e **11**, enquanto que os seus espectros de RMN de 1H podem ser observados nas figuras 4.35, 4.36 e 4.37, respectivamente.

Tabela 4.9 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **8**, **9** e **11** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	8		9		11	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
Aglicona						
1	131,2	-	131,6	-	-	-
2	116,6	6,73 (sl)	116,4	6,72 (s)	116,9	6,71 (s)
3	146,0	-	146,4	-	-	-
4	144,2	-	145,6	-	-	-
5	116,1	6,71 (d; 7,9)	115,8	6,70 (d; 7,3)	116,1	6,71 (d; 8,1)
6	120,9	6,60 (d; 7,9)	121,4	6,60 (d; 7,3)	121,1	6,60 (dd; 1,7; 8,1)
7	36,4	2,82 (dd; 7,3; 10)	36,7	2,83 (m)	36,4	2,83 (m)
		3,74 (m)		3,75 (m)		3,75 dd (m)
8	72,2	4,03 (m)	72,0	4,04 (m)	72,0	4,08 dd (m)
Aglicona						
1'	127,3	-	127,1	-	-	-
2'	114,9	7,09 (s)	111,4	7,23 (sl)	115,0	7,09 (s)
3'	147,1	-	150,0	-	-	-
4'	149,6	-	149,1	-	-	-
5'	116,3	6,81 (d; 8,0)	116,7	6,83 (d; 7,3)	116,4	6,81 (d; 8,1)
6'	123,1	6,99 (d; 8,0)	124,2	7,11 (d; 7,3)	123,1	6,99 (d; 1,7; 8,1)
7'	147,8	7,62 (d; 15,7)	148,6	7,69 (d; 15,9)	147,8	7,62 (d; 15,9)
8'	114,9	6,31 (d; 15,7)	114,8	6,40 (d; 15,9)	114,7	6,30 (d; 15,9)
9'	168,0	-	168,0	-	168,0	-
3'-	-	-	56,1	3,92 (s)	-	-
OCH ₃	-	-	-	-	-	-
Glicose						
1''	104,1	4,40 (d; 7,9)	104,2	4,40 (d; 8,1)	104,1	4,40 (d; 7,9)
2''	75,8	3,41 (t; 9,7)	76,1	3,42 (t; 9,7)	76,2	3,42 (t; 9,4)
3''	81,6	3,82 (t; 9,7)	81,7	3,84 (t; 9,7)	81,6	3,85 (t; 9,4)
4''	70,6	4,96 (t; 9,7)	70,4	4,97 (t; 9,7)	70,3	4,95 (t; 9,4)
5''	74,4	3,70-3,79 (m)	74,8	3,70-3,79 (m)	75,9	3,53-3,50 (m)
6''	68,1	3,49-3,56 (m)	68,6	3,49-3,56 (m)	62,2	3,53-3,60 (m)
		3,70-3,77 (m)		3,70-3,77 (m)		3,62-3,67 (m)
Ramnose						
1'''	102,5	5,21 (sl)	102,6	5,21 (sl)	102,6	5,22 (sl)
2'''	72,2	3,94 (d; 3,7)	72,6	3,93 (d; 5,0)	72,2	3,95 (d; 4,0)
3'''	71,7	3,58-3,61 (m)	72,0	3,58-3,61 (m)	72,0	3,58-3,62 (m)
4'''	73,3	3,32 (t; 9,7)	73,9	3,33 (m)	73,6	3,32 (t; 9,5)
5'''	69,9	3,58-3,61 (m)	71,4	3,58-3,61 (m)	70,1	3,58-3,62 (m)
6'''	18,1	1,10 (d; 5,9)	18,6	1,13 (d; 5,8)	18,3	1,12 (d; 6,25)
Apiose						
1''''	110,6	4,93 (d; 3)	110,7	4,93 (m)	-	-
2''''	77,8	3,9 (sl)	77,9	3,9 (sl)	-	-
3''''	80,2	-	80,5	-	-	-
		3,77 (m)		3,76 (m)	-	-
4''''	74,7	3,95 (m)	75,4	3,95 (m)	-	-
5''''	65,2	3,56-3,62 (m)	65,1	3,56-3,62 (m)	-	-

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de ^{13}C obtidos por gHSQC e gHMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses. As atribuições foram confirmadas por COSY 1D, TOCSY 1D e RMN de ^1H

Identificação da substância 8: forsitósídeo B

A substância **8** foi isolada como um sólido castanho claro e o seu espectro de UV (Figura 4.34), obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{\max} em 220, 250, 288 e 332 nm.

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.35; Tabela 4.9) apresentou sinais característicos de substância aromática. Os sinais em 6,73 (*s*), 6,60 (*d*, 7,9 Hz), 6,71 (*d*, 7,9 Hz) e em 7,09 (*s*), 6,81 (*d*, 8,0 Hz) e 6,99 (*d*, 8,0 Hz), todos integrando para 1H, evidenciaram a presença de dois anéis 1,3,4-trissubstituídos, oxigenados em C-3 e C-4. Dois dubletos, em 6,31 (*d*, 15,7 Hz) e em 7,62 (*d*, 15,7 Hz) ppm, indicaram haver uma ligação dupla dissubstituída com configuração *trans*. Os seus deslocamentos químicos sugeriram um sistema carbonílico α,β -insaturado conjugado a um anel aromático. O mapa de contornos gHMBC mostrou acoplamentos entre estes hidrogênios e os carbonos em 168,0 ppm (carbonila de éster), 127,3 e 123,1 ppm (C-1' e C-6', respectivamente), sugerindo este sistema como uma unidade de ácido cafeico. O duplo dubleto em 2,82 ppm (7,3 e 10,0 Hz, H-7) sugeriu a presença de cadeia lateral de feniletanóide, com dois hidrogênios não equivalentes. Experimento TOCSY 1D, com irradiação em 2,82 ppm, evidenciou dois sinais dos hidrogênios hidroximetilênicos não equivalentes na posição 8 (Figura 4.33), em 3,74 e 4,03 ppm (Tabela 4.9). Os hidrogênios anomérico e metílico de uma unidade de ramnose foram identificados: o primeiro em 5,21 (*s*, 1H) e o segundo em 1,10 ppm (*d*, $J = 5,9$ Hz, 3H). Estes hidrogênios foram irradiados em experimento TOCSY 1D e os sinais observados evidenciaram uma unidade α -ramnopirranose. Outros dois sinais anoméricos foram observados e irradiados em TOCSY 1D: aquele em 4,40 ppm (*d*, $J = 7,9$ Hz, 1H) exibiu correlações para uma β -glicopirranose *tri*-substituída, enquanto que aquele em 5,21 (*d*, $J = 3$ Hz, H-1''') apresentou correlações coerentes com uma β -apiose, o que foi confirmado pelos valores de RMN de ^{13}C observados nos experimentos gHSQC e gHMBC.

O mapa de contornos gHSQC confirmou a presença de 5 carbonos metilênicos (CH_2), sendo dois da apiose (74,7 e 65,2 ppm), um da glicose (68,1 ppm) e dois da porção feniletanóide (em 36,4 e 72,2 ppm). Os pontos de ligação dos substituintes à unidade glicose central foram definidos por meio da análise do mapa de contornos gHMBC. A correlação de H-1'' (anomérico da glicose, 4,40 ppm) com o

carbono em 36,4 ppm (C-8) evidenciou a ligação da unidade feniletanóide em C-1'. Analogamente, as correlações entre o anomérico da ramnose H-1''' (5,21 ppm) e o carbono em 81,6 ppm (C-3''), entre o hidrogênio H-4'' da glicose (4,96 ppm) e o carbono da carbonila da unidade do ácido cafeico (C-9', 168,0 ppm) e entre o anomérico da apiose H-1'''' (4,93 ppm) e o carbono metilênico C-6'' (68,1 ppm) da glicose evidenciaram as ligações das unidades de ramnose, ácido cafeico e apiose em C-3'', C-4'' e C-6'', respectivamente. Assim, a substância **8** foi identificada como forsitosídeo B (Figura 4.33) e os dados de RMN (Tabela 4.11) confirmaram aqueles apresentados por Endo et al. (1982), Çaliş et al. (1992) e Delazar et al. (2005).

O espectro de massas ESI-MS, em modo negativo, apresentou íon pseudo-moléculas $[M-H]^-$ em m/z 755. Portanto, coerente com a fórmula molecular da estrutura proposta ($C_{34}H_{44}O_{19}$).

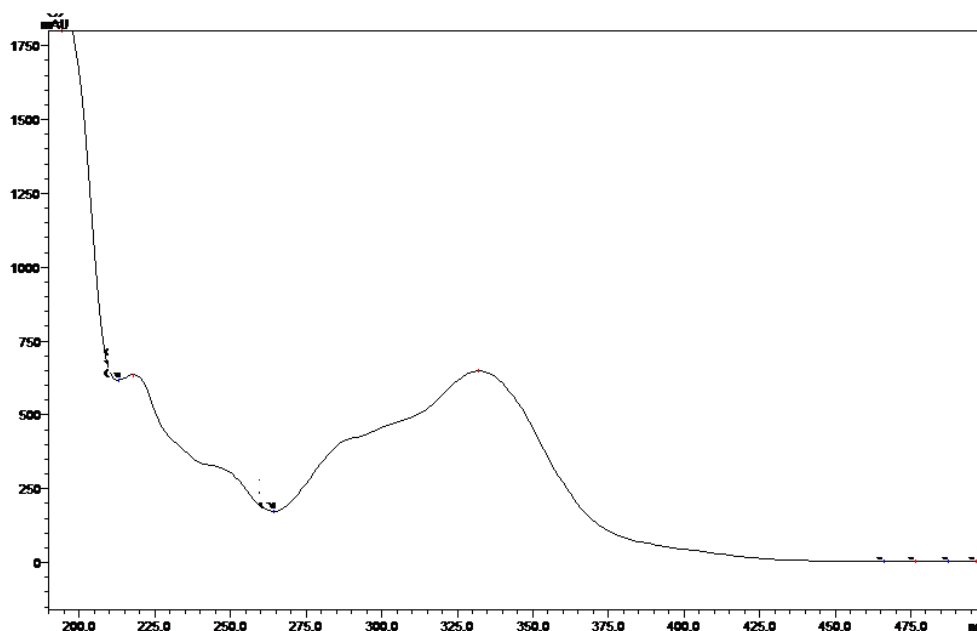


Figura 4.34 - Espectro de UV da substância **8**

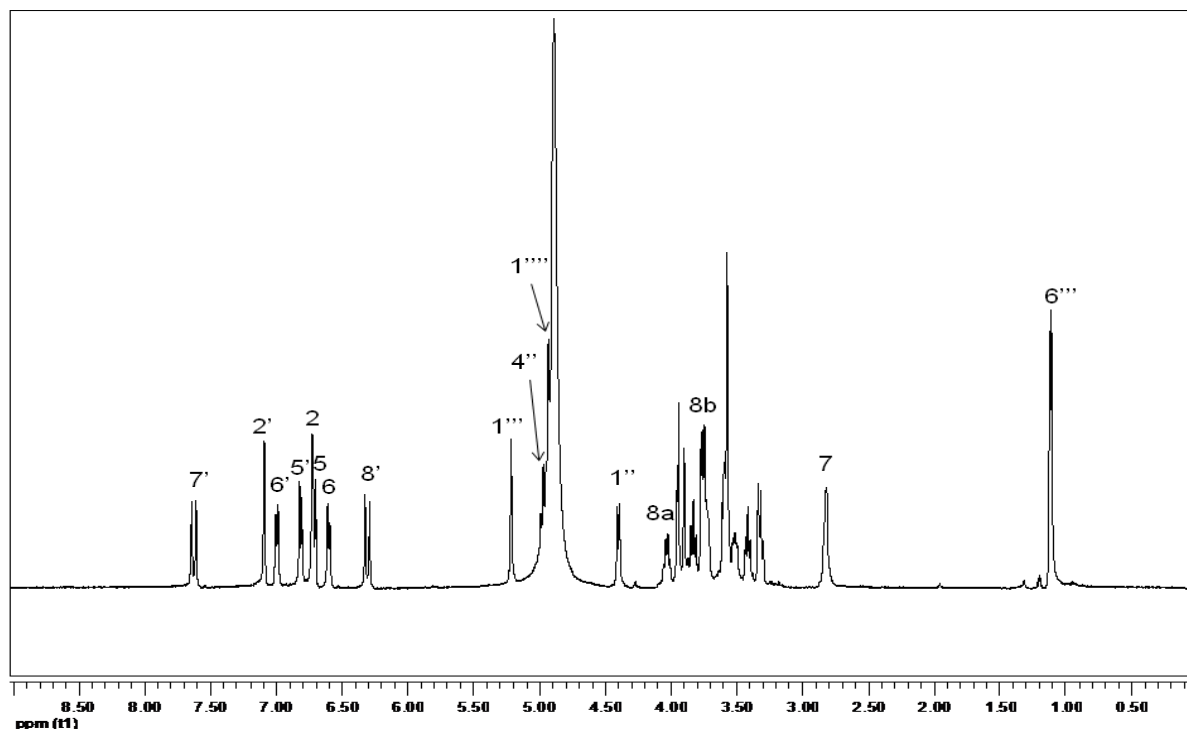


Figura 4.35 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **8**

Identificação da substância **9**: alissonosídeo

A substância **9** foi isolada como um sólido castanho claro e o seu espectro de UV, obtido por CLAE-DAD, mostrou-se similar ao observado para a substância **8** (Figura 4.34).

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.36) também apresentou sinais similares aos observados para a substância **8** (Tabela 4.9), porém com um sinal intenso em 3,92 ppm (*s*, 3H), típico de uma metoxila ligada a um anel aromático. Os acoplamentos observados pelo experimento gHMBC entre os hidrogênios da metoxila, os hidrogênios H-2', H-5' e H-6' e o hidrogênio β -carbonílico em 7,62 ppm (H-7) com os carbonos de um sistema aromático permitiram posicioná-la em C-3', compondo um sistema típico de uma unidade de ácido ferúlico (ANDARY et al., 1982). As demais atribuições seguiram os passos descritos para a substância **8**, e a substância **9** foi identificada como sendo o alissonosídeo (Figura 4.33). Os dados de RMN (Tabela 4.9) corroboraram aqueles apresentados por Çaliş et al. (1992).

Espectro de massas ESI-MS, em modo negativo, apresentou pico base $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 769, coerente com a fórmula molecular da estrutura proposta ($\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$).

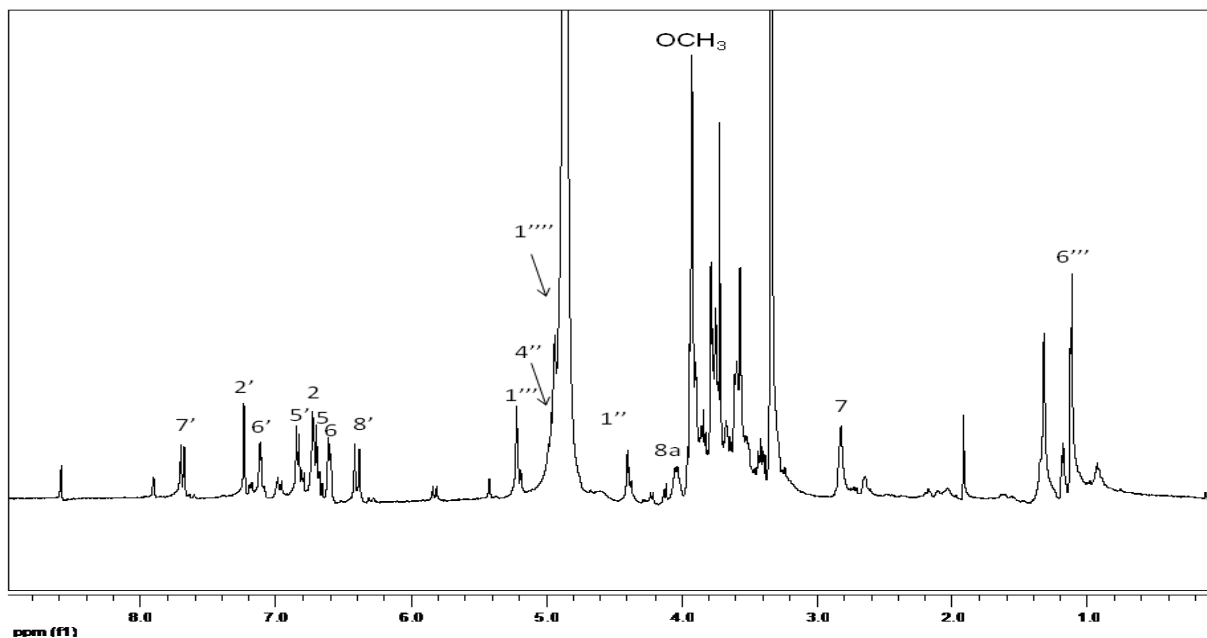


Figura 4.36 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **9**

Identificação da substância **11**: verbascosídeo

A substância **11** foi isolada como um sólido castanho claro e seu espectro de UV, obtido por CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 288 e 332 nm, sendo idêntico àquele observado para a substância **8** (Figura 4.34).

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.37) apresentou absorções semelhantes às observadas para a substância **8** (Tabela 4.9), porém sem o sinal de hidrogênio anomérico em 4,93 ppm e de alguns sinais na região entre 3,00 e 4,00 ppm. A sua identificação completa seguiu os passos descritos para a substância **8**, confirmando-se a ausência da unidade de apiose ligada à glicose central em relação a esta. Assim, a substância **11** foi identificada como verbascosídeo (Figura 4.33) e os dados de RMN (Tabela 4.9) corroboraram aqueles apresentados por Andary et al. (1982) e Wu et al. (2004).

O espectro de massas ESI-MS, em modo negativo, apresentou íon pseudo-moléculas m/z 623 $[\text{M}-\text{H}]^-$, coerente com a fórmula molecular da estrutura proposta ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$).

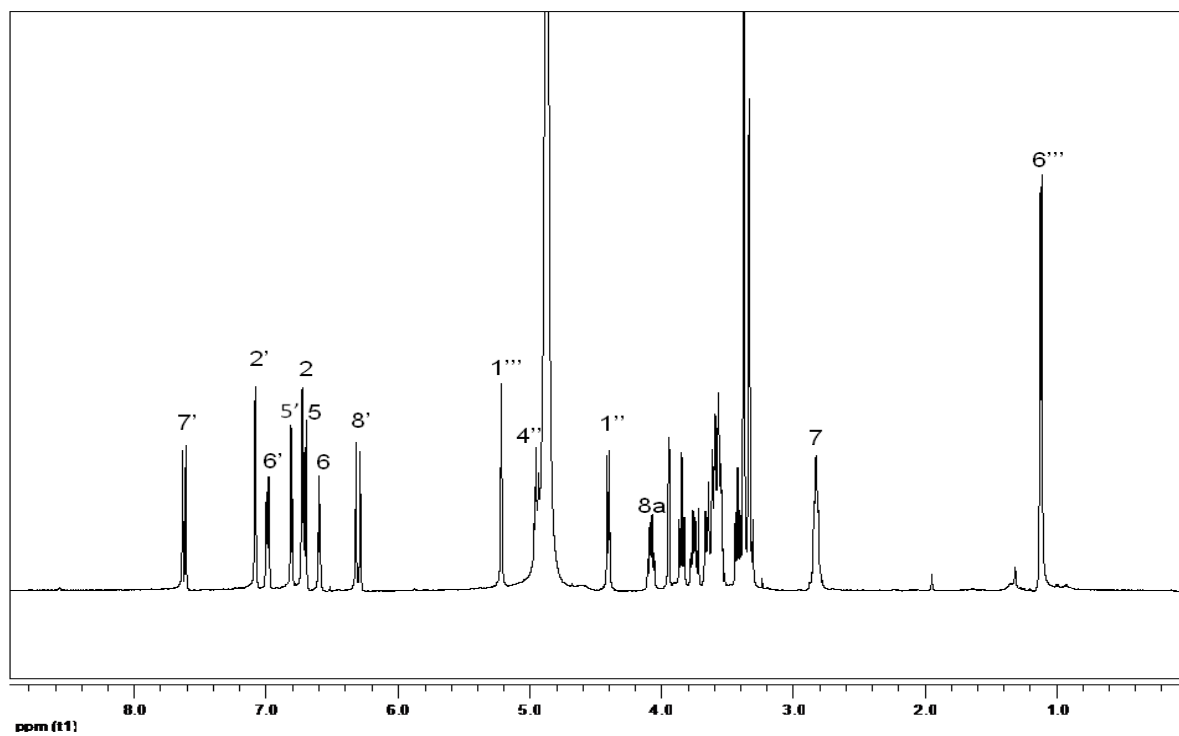


Figura 4.37 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **11**

4.6.2.2 Epoxilignana (10)

Identificação da substância 10: laricirresinol-4'-O-β-glicopiranosídeo

A Tabela 4.10, a seguir, traz valores de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **10**, bem como as correlações obtidas pelos mapas de contornos *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC que levaram à sua identificação.

Tabela 4.10 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e dos experimentos *g*COSY e *g*HMBC da substância **10** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	135,7	-	-	H6, H8, H7, H2
2	110,2	6,94 (sl)	-	H6, H7
3	148,9	-	-	H5, H2, 3-OCH ₃
4	149,4	-	-	H2
5	115,5	6,80 (m)	H6	-
6	119,6	6,79 (m)	H5	H7, H2
7	83,7	4,78 d (6,9 Hz)	H8	H8, H9a, H9b, H9'a, H9'b, H6, H2, H8'
8	54,0	2,41 (m)	H8'; H9a; H9b H7	H7, H7'a, H9'a, H9'b, H9a, H9b
9	60,5	3,67 dd (6,4; 10,8) 3,85-3,91 (m)	H8, H9b; 3,86 H8, H9a	H7, H8
3-OCH ₃	56,2	3,88 s	-	-
1'	137,0	-	-	H5', H8', H2' H7'a, H7'b
2'	114,3	6,93 d (1,5)	-	H7'a, H7'b', H6'
3'	150,7	-	-	H5', H2', H3'-OCH ₃
4'	146,2	-	-	H6', H2', H1'', H5'
5'	117,7	7,13 d (8,2 Hz)	H6'	-
6'	121,6	6,80 (m)	H5'	H7'a, H7'b, H2'
7'	33,0	3,00 dd(4,7; 13,1) 2,58dd (11,4; 13,1)	H8'; H7'b H8'; H-7'a	H2', H6', H9'a, H9'b, H8
8'	43,5	2,78 (m)	H8; H7'b; H7'a; H9'a; H9'b	H9a, H9b, H7, H8, H7'a, H7'b, H9'a
9'	73,7	3,74 (m) 4,02 dd (6,6; 8,1)	H8'; H9'b H8'; H9'a	H7, H7'a, H7'b
3'-OCH ₃	56,2	3,88 s	-	-
Glicose				
1''	102,6	4,88 d (6,9)	H3''; H2''	H2''
2''	74,6	3,49-3,54 (m)	H1''; H3''	H3''
3''	77,6	3,46-3,54 (m)	H4''; H5''	H4'', H2''
4''	71,0	3,41-3,43 (m)	H3''; H5''	H2'', H6''a
5''	78,0	3,41-3,43 (m) 3,67-3,77 (m)	H6''a; H6''b	H6''a, H4''
6''	62,4	3,84-3,92 (m)	H-5''; H6''b H6''a; H5''	-

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de ^{13}C obtidos por *g*HSQC e *g*HMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.38; Tabela 4.10) apresentou quatro sinais de hidrogênios de anéis aromáticos: 7,13 ppm (*dd*, 8,2 Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 6,94 ppm (s, 1H) e 6,79-6,80 ppm (*m*, 3H), indicando dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos, oxigenados nas posições C-3 e C-4. Destacaram-se em intensidade dois singletos quase sobrepostos em 3,88 ppm, típicos de metoxilas ligadas a anéis aromáticos. Apresentou também sinais típicos de um sistema alifático cíclico em 2,41, 2,78, 4,01 e 4,78 ppm, e sinais com deslocamentos típicos de uma glicose terminal, entre 3,30 e 3,92 ppm, excetuando-se o sinal para hidrogênio anomérico, que poderia estar sobreposto pelo sinal da água do solvente deuterado. O mapa de contornos *g*HSQC confirmou a existência do dubleto relativo ao hidrogênio anomérico em 4,88 ppm (*d*, $J = 6,9$ Hz), que acoplou com carbono em 102,6 ppm (Tabela 4.10). Este experimento evidenciou, ainda, oito sinais de hidrogênios metilênicos, incluindo dois hidroximetilênicos da unidade de açúcar, que foi confirmado como sendo uma glicose terminal por experimento TOCSY 1D, irradiando-se em 4,88 ppm (C-1''). O mapa de contornos *g*HMBC mostrou acoplamento entre o carbono em 146,2 (C-4') e o hidrogênio em 4,88 ppm (H-1''), e entre 150,7 (C-3') e 3,88 (3'-OCH₃) ppm, definindo as posições do açúcar e da metoxila no anel A. Para se definir a posição da metoxila no anel B, entretanto, foi necessária a execução do experimento ROESY 2D, que mostrou acoplamento espacial entre os sinais em 3,88 ppm (OCH₃) e em 6,94 ppm (H-2), evidenciando a sua ligação a C-3 (148,9 ppm). Ainda a partir da análise do experimento *g*HMBC, bem como dos acoplamentos observados por experimento *g*COSY (Tabela 4.10), o heterociclo central e o seu padrão de substituição foram estabelecidos e a substância **10** foi identificada como sendo a epoxilignana laricirresinol-4'-O- β -glicopiranosídeo (Figura 4.33). Os dados de RMN (Tabela 4.10) corroboraram aqueles apresentados por Shoeb et al. (2004).

O espectro de massas ESI-MS mostrou íon pseudo-molécula m/z 521 [M-H]⁻, coerente com a fórmula molecular da estrutura proposta (C₂₆H₃₄O₁₁).

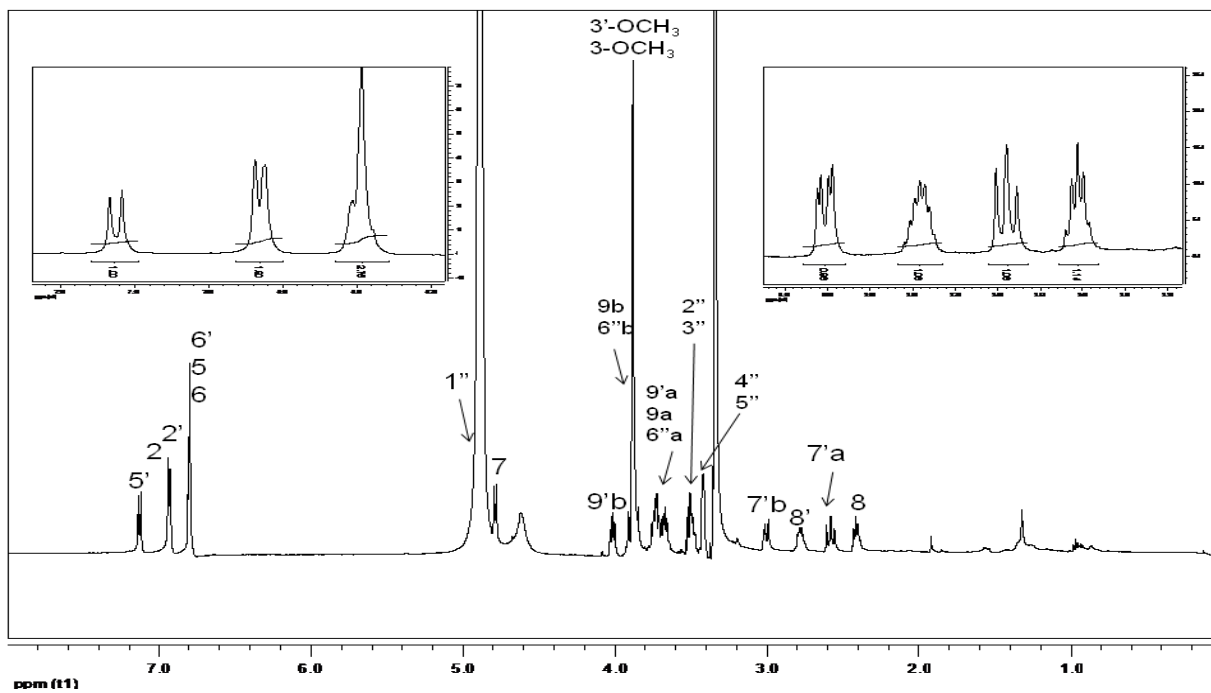


Figura 4.38 - Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 500 MHz) da substância 10

4.6.3 Substâncias isoladas do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup)

A Figura 4.41, a seguir, mostra as 8 substâncias isoladas e identificadas do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup).

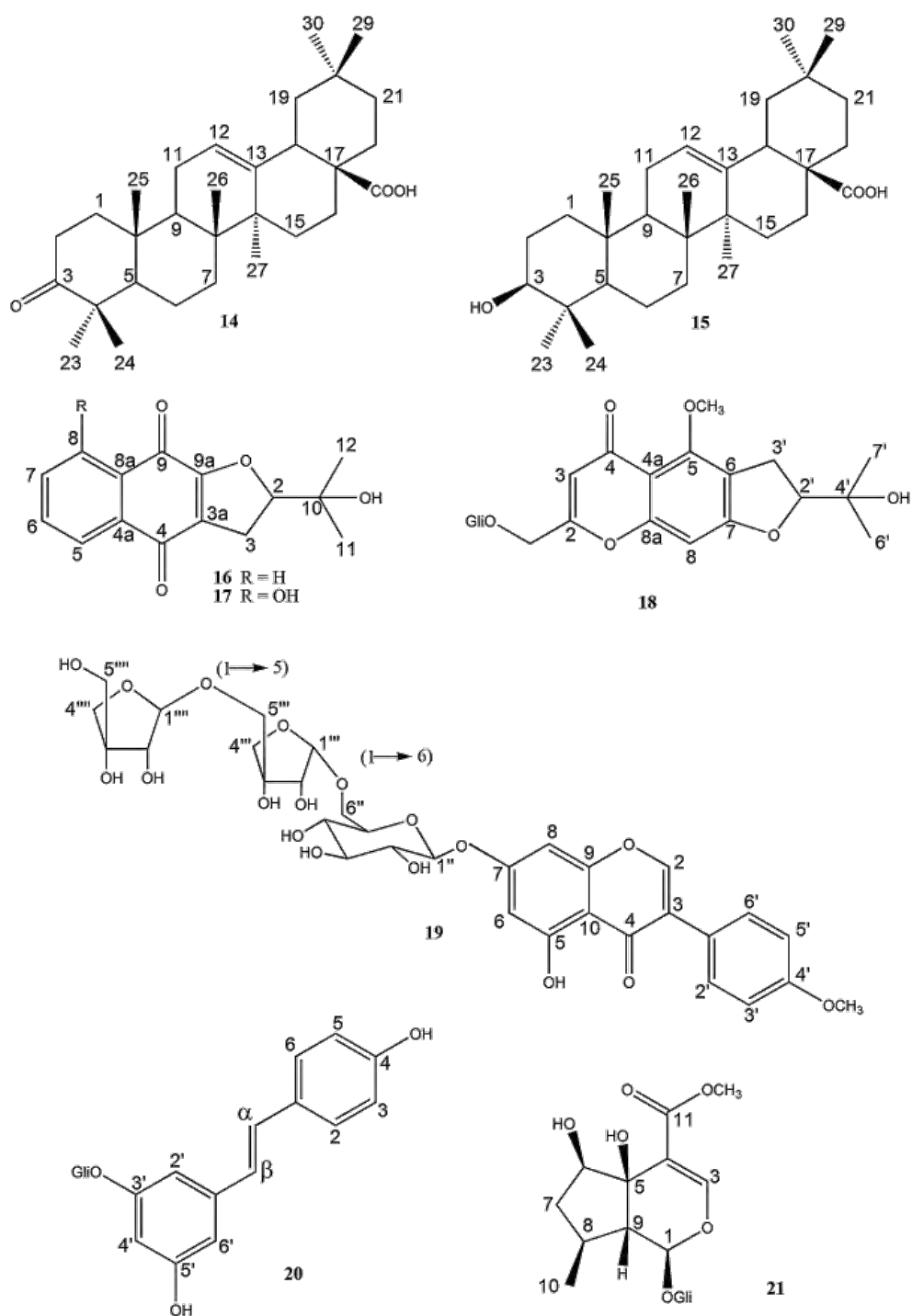


Figura 4.39 - Substâncias isoladas do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina*

4.6.3.1 Triterpenos (**14** e **15**)

A Tabela 4.11, a seguir, mostra os dados de RMN de ^{13}C das substâncias **14** e **15**, enquanto que os seus espectros de RMN de ^1H podem ser observados nas Figuras 4.40 e 4.41, respectivamente.

Tabela 4.11 - Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **14** e **15** (CDCl_3 ; 11,7 T)^a

Posição	14	15
	δ_{C}	δ_{C}
1	39,0	38,4
2	34,0	27,2
3	218,6	79,0
4	47,3	38,7
5	55,1	55,2
6	19,5	18,3
7	32,1	32,6
8	39,1	39,3
9	45,8	47,6
10	36,7	37,1
11	23,4	22,9
12	122,0	122,6
13	143,7	143,6
14	41,7	41,6
15	27,5	27,7
16	22,8	23,4
17	46,4	46,5
18	41,0	41,0
19	45,8	45,9
20	30,5	30,7
21	33,7	33,8
22	32,3	32,4
23	26,3	28,1
24	21,3	15,5
25	14,9	15,3
26	16,7	17,1
27	25,7	25,9
28	182,3	183,0
29	32,9	33,0
30	23,4	23,6

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

Identificação da substância 14: ácido oleanônico

A substância **14** foi isolada na forma de cristais brancos.

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.42) apresentou muitos sinais na região entre 0,68 e 2,46 ppm, típicos de hidrogênios metílicos (CH_3) e metilênicos (CH_2) de núcleos triterpenoidais, destacando-se os 7 singletos de hidrogênios metílicos entre 0,67 e 1,01 ppm, um tripleto em 5,16 ppm (H-12), característico do hidrogênio olefínico, além de um sinal pronunciado em aprox. 3,34 ppm relativo a metanol remanescente na amostra. O seu espectro de RMN de ^{13}C apresentou dois sinais, em 122,0 e 143,7 ppm, que caracterizam os carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente (SILVA, 2007). Também foi observado um sinal em 182,2 ppm, referente a uma carboxila, e um outro em 218,4 ppm, referente a uma carbonila. A comparação dos seus dados de RMN de ^{13}C (Tabela 4.11) com os disponíveis na literatura permitiu a sua identificação como ácido oleanônico (Figura 4.39) (MAHATO e KUNDU, 1994).

O espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, evidenciou um íon m/z 455, correspondente ao íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ e condizente com a estrutura proposta (fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$).

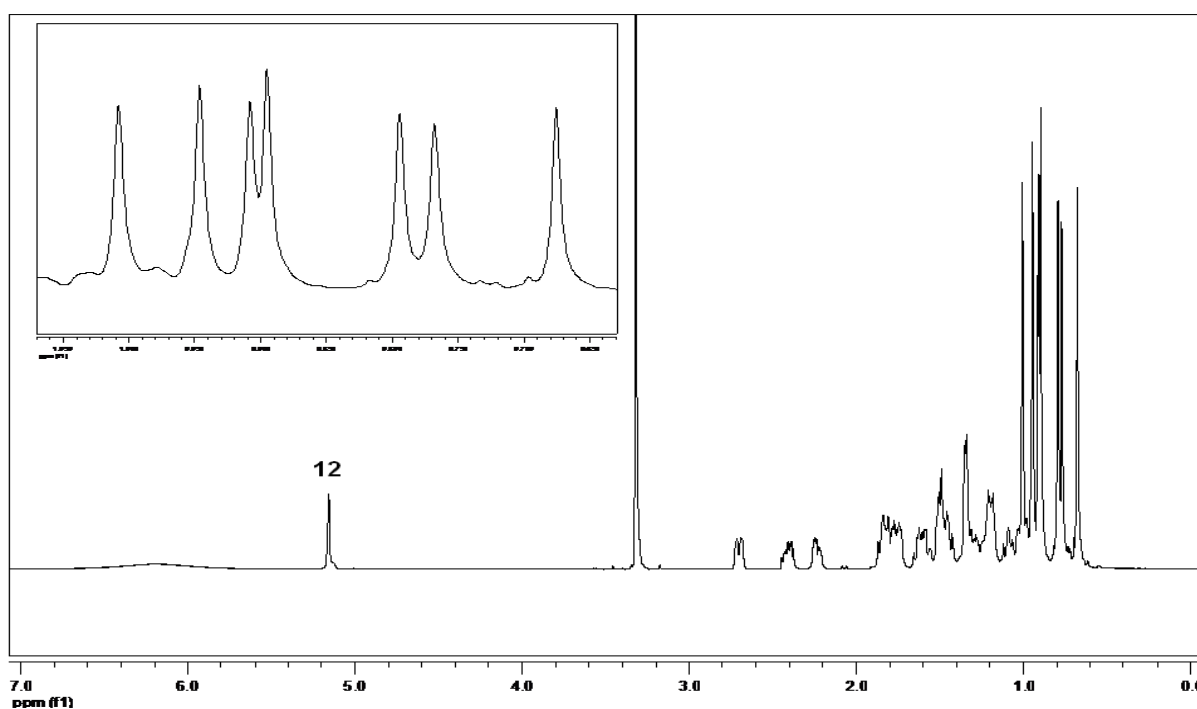


Figura 4.40 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância **14**

Identificação da substância 15: ácido oleanólico

A substância **15** foi isolada na forma de um sólido cristalino branco.

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.43) apresentou muitos sinais na região entre 0,70 e 2,20 ppm, típicos de hidrogênios metílicos (CH_3) e metilênicos (CH_2) de núcleos triterpenoidais (UGAZ, 1994), destacando-se os 7 singletos de hidrogênios metílicos entre 0,75 e 1,13 ppm, um tripleto em 5,28 ppm (H-12), característico do hidrogênio olefínico, um multipletto em 3,22 ppm, característico de hidrogênio oximetínico (H-3), além de um sinal pronunciado em aprox. 3,34 ppm relativo a metanol remanescente na amostra. O seu espectro de RMN de ^{13}C apresentou dois sinais, em 122,6 e 143,6 ppm, que caracterizam os carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente, de triterpenos com esqueleto do tipo oleanano (SILVA, 2007). Também foi observado um sinal em 182,0 ppm, referente a uma carboxila (C-28), e um outro em 70,0 do carbono oximetínico (C-3). A comparação dos seus dados de RMN de ^{13}C (Tabela 4.11) com os disponíveis na literatura permitiu a sua identificação como ácido oleanólico (Figura 4.39) (MAHATO E KUNDU, 1994).

O espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, evidenciou um íon m/z 495, correspondente a $[\text{M}+\text{K}]^+$ e condizente com a estrutura proposta (fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$).

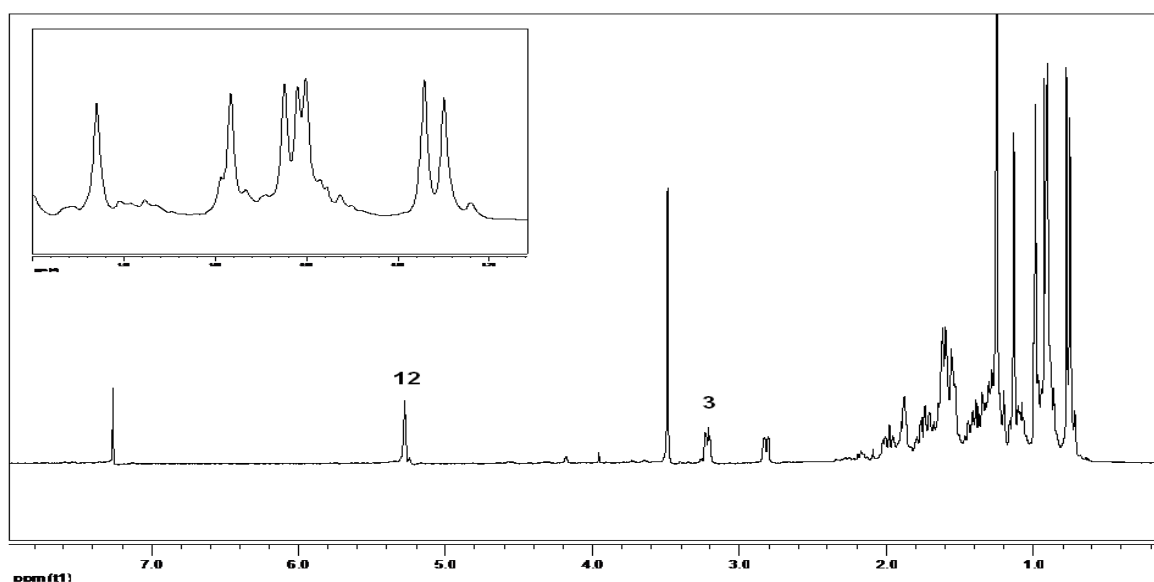


Figura 4.41 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância **15**

4.6.3.2 Furanonaftoquinonas (**16** e **17**)

A Tabela 4.12, a seguir, mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para as substâncias **16** e **17**, enquanto que os seus espectros de RMN de ^1H podem ser observados nas figuras 4.43 e 4.44.

Tabela 4.12 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **16** e **17** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	16		17	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
2	93,1	4,90 (dd; 9,2; 10,5)	93,1	4,91 (m)
3	28,7	3,16 (dd; 10,5; 16,9) 3,20 (dd; 9,2; 16,9)	28,6	3,17 (m)
3a	125,4	-	126,2	-
4	183,3	-	182,6	-
4a	134,1	-	134,6	-
5	126,4	7,06 (dd; 1,5; 7,5)	118,9	7,60 (d; 7,7)
6	134,8	7,81 (ddd; 1,5; 7,5; 8,0)	137,6	7,70 (dd; 7,7; 8,0)
7	133,7	7,77 (ddd; 1,5; 7,5; 8,0)	124,5	7,25 (d; 8,0)
8	126,5	8,09 (dd; 1,5; 7,5)	162,7	-
8a	132,8	-	115,8	-
9	178,6	-	-	-
9a	161,7	-	162,0	-
10	72,0	-	72,0	-
11	25,3	1,28 (s)	25,0	1,29 (s)
12	25,3	1,38 (s)	25,0	1,40 (s)

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de ^{13}C obtidos por gHSQC e gHMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

Identificação da substância **16**: estenocarpoquinona

A substância **16** foi isolada como um sólido amarelo intenso e seu espectro de UV, obtido em corrida CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 248, 254, 292 e 345 nm (Figura 4.42).

O seu espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (Figura 4.43; Tabela 4.12) exibiu dois multipletos em 8,07 e 7,79 ppm, cada um integrando para 2 hidrogênios. Outros dois multipletos em região típica de hidrogênios em sistemas alifáticos cíclicos, um parcialmente encoberto pelo sinal da água do solvente deuterado em 4,90 ppm, e outro em 3,18 ppm, integrando para 2H, sugeriram uma estrutura de diidrofurano (THOMSON, 1987). Ademais, dois singletos típicos de hidrogênios metílicos, em 1,28 e 1,38 ppm, cada um integrando para 3H, foram detectados. O mapa de correlações gCOSY mostrou acoplamento entre os sinais de hidrogênios ligados a sistema aromático, evidenciando também a existência de dois sinais em cada um

dos multipletos observados inicialmente no espectro de RMN de ^1H . Também entre os sinais em 4,90 e 3,18 ppm, indicando comporem o sistema cíclico alifático. A análise do mapa de contornos $g\text{HSQC}$ permitiu observar sinais para carbonos com deslocamentos químicos muito próximos, em 126,4 e 126,5 ppm, correlacionando com dois duplos dubletos em 8,06 e 8,08 ppm (H-5 e H-8, respectivamente). Observou-se também o multipletto em 7,79 ppm (acoplado com carbonos em 133,7 e 134,8 ppm), resultante da sobreposição parcial de dois duplos duplos dubletos, em 7,77 e 7,81 ppm (H-7 e H-6, respectivamente). A análise do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ mostrou sinais de carbonos em 178,6 e 183,3 ppm, sugerindo serem de carbonilas de uma quinona assimétrica. Associando informações obtidas nos mapas de contornos $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ foi possível definir a porção alifática da molécula (Figura 4.39), identificada como a furanonaftoquinona estenocarpona B ou estenocarpoquinona (Figura 4.39). Os dados de RMN (Tabela 4.12) corroboraram aqueles apresentados por Thomson et al. (1987) e Schmeda-Hirschmann e Papastergiou (2003).

O seu espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, exibiu o íon com m/z 281, referente a $[\text{M}+\text{Na}]^+$, coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ da substância **16**.

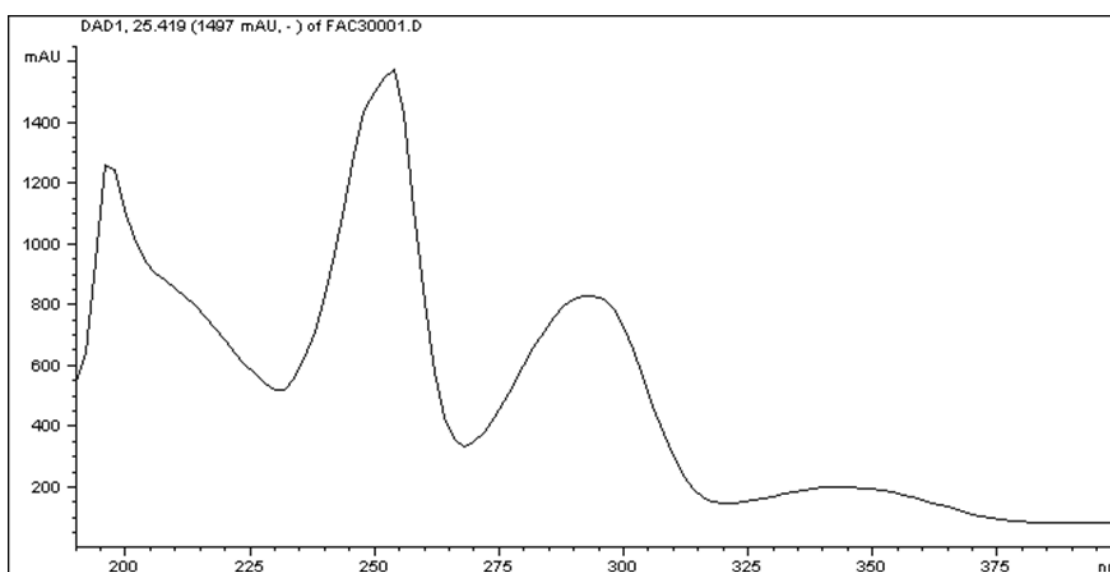


Figura 4.42 - Espectro de UV da substância **16**

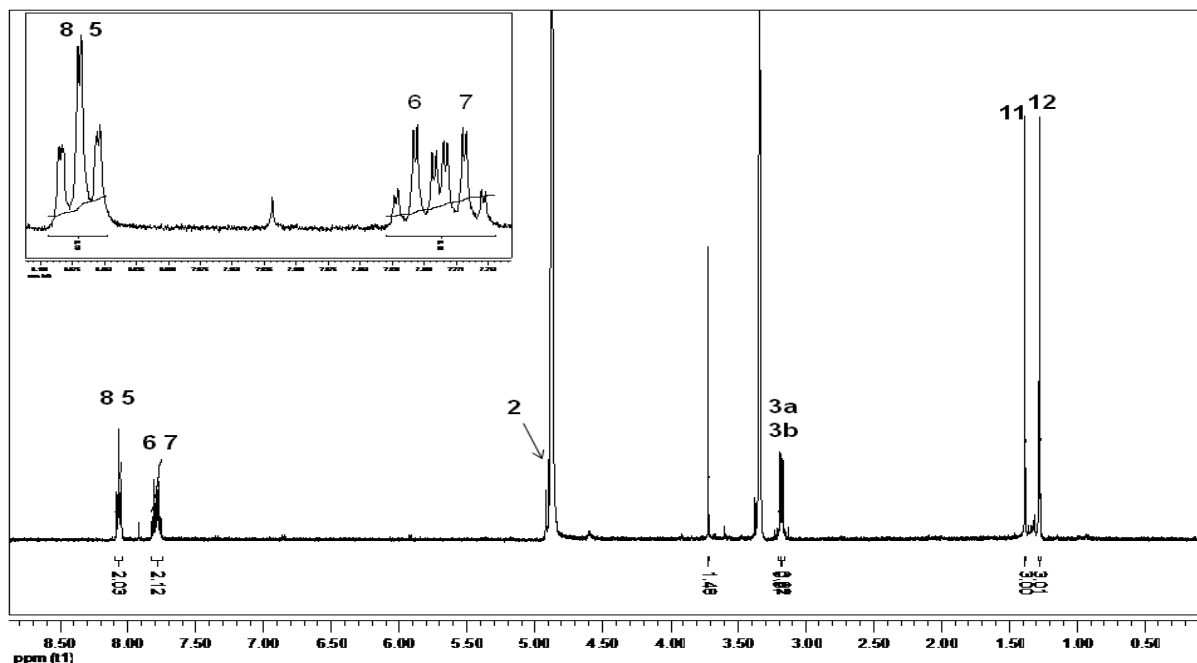


Figura 4.43. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **16**

Identificação da substância **17**: avicequinona E

A substância **17** foi isolada como um sólido amarelo e seu espectro de UV apresentou-se semelhante ao observado para a substância **16** (Figura 4.42).

O seu espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (Figura 4.44; Tabela 4.12) apresentou três sinais característicos de substâncias aromáticas. Os sinais em 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz), 7,60 ppm (d, $J = 7,7$ Hz) e 7,70 (d, $J = 7,7$ e 8,8 Hz), cada um integrando para 1H, indicaram tratar-se de um anel trissubstituído. O mapa de contornos $g\text{COSY}$ confirmou a posição do hidrogênio em 7,70 ppm (H-6) em *orto* tanto em relação ao hidrogênio em 7,25 ppm (H-7) como àquele em 7,60 ppm (H-5). O espectro de RMN de ^1H também apresentou os sinais para hidrogênios alifáticos observados para a substância **16**, indicando tratar-se de uma furanonaftoquinona com um substituinte oxigenado no anel aromático, que poderia estar ligado a C-8 ou a C-5. A análise do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ permitiu a definição da posição da hidroxila em C-8, já que foram observadas correlações tanto do hidrogênio em 7,60 ppm (H-5) quanto daqueles em 3,17 ppm (hidrogênios metilênicos ligados a C-3 no anel furânico), com o carbono carbonílico em 182,6 (C-4, no sistema quinônico). As correlações observadas nos mapas de contornos $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ permitiram identificar a substância **17** como avicequinona E (Figura 4.39). Os dados

de RMN (Tabela 4.12) corroboraram aqueles apresentados por Williams et al. (2006).

O seu espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, exibiu o íon m/z 275, referente a $[M+H]^+$, coerente com a fórmula molecular $C_{15}O_5H_{14}$ da substância **17**.

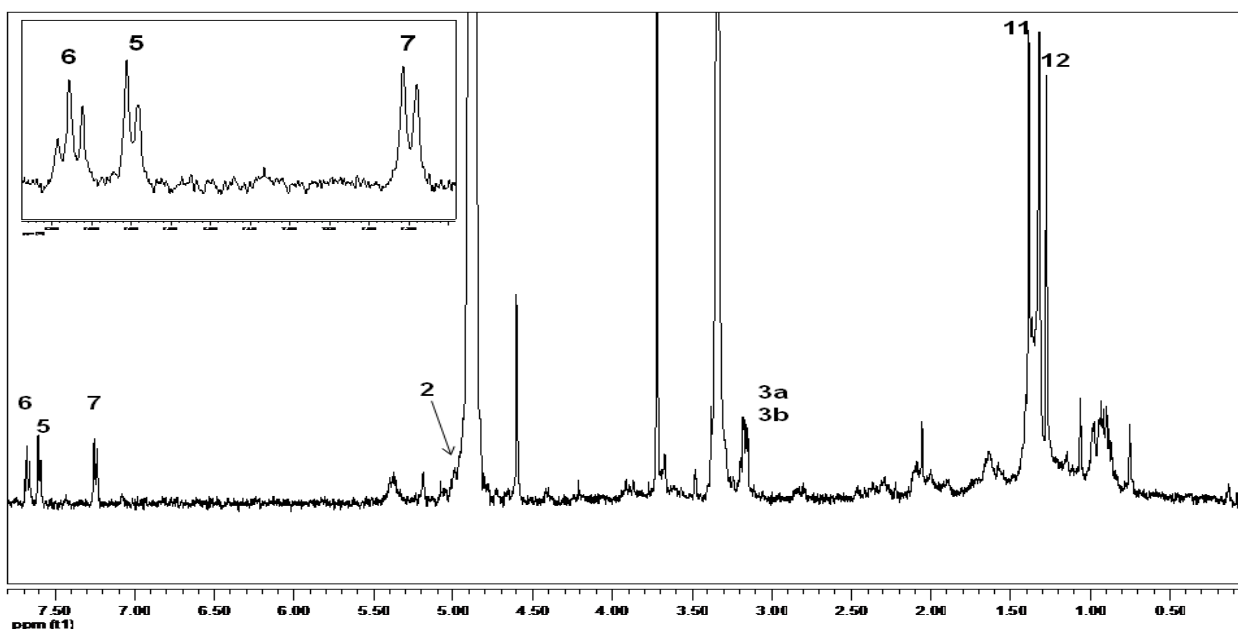


Figura 4.44 - Espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **17**

4.6.3.3 Furanocromona (**18**)Identificação da substância **18**: prim-O-glicosilcimifugina

A Tabela 4.13, a seguir, mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como os dados de correlações $g\text{COSY}$ e $g\text{HMBC}$ obtidos para a substância **18**. O seu espectro de RMN de ^1H pode ser observado na Figura 4.47.

Tabela 4.13 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , e dos experimentos $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ da substância **18** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$g\text{COSY}$	$g\text{HSQC}$	$g\text{HMBC}$
2	164,6	-	-	-	H3, 2-CH ₂
3	110,5	6,41 (s)	-	6,41	2-CH ₂
4	176,5	-	-	-	H3
4a	112,1	-	-	-	H3
5	156,7	-	-	-	5-OCH ₃ , H3'
6	118,2	-	-	-	H3', H8
7	166,6	-	-	-	H8
8	94,1	6,67 (s)	-	6,67	-
8a	160,8	-	-	-	H8
2-CH ₂ -	66,9	4,64 (d; 14,7) 4,79 (d; 14,7)	2-CH ₂ -	4,64; 4,79 (CH ₂)	H3, H1''
2'	92,2	4,79 (m)	H3'	4,79	4'-CH ₃
3'	28,6	3,37 (m)	H2'	3,37 (CH ₂)	-
4'	71,9	-	-	-	H3', 4'-CH ₃
4'-CH ₃	25,3	1,27 (s)	-	1,27	4'-CH ₃
4'-CH ₃	25,3	1,33 (s)	-	1,33	4'-CH ₃
1''	103,9	4,45 (d; 7,5)	H2''	4,45	2-CH ₂ , H2''
2''	74,6	3,27-3,40 (m)	H1''	3,30	H4''
3''	77,7	3,27-3,40 (m)	H2'', H4''	3,40	H5''
4''	71,3	3,27-3,40 (m)	H3'', H5''	3,33	H3''
5''	78,0	3,27-3,40 (m)	H6a''	3,33	H4'', H6''
6''	62,5	3,67 (m) 3,90 (m)	H6a'', H5'' H6b''	3,67; 3,90 (CH ₂)	H5''

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de ^{13}C obtidos por $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

A substância **18** foi isolada como um sólido avermelhado.

O seu espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (Figura 4.45; Tabela 4.13) apresentou um sinal de hidrogênio de sistema aromático em 6,67 (s, 1H) e um outro sinal em 6,41 (s, 1H). Também apresentou um sinal intenso em 3,96 (s, 3H), sugerindo uma metoxila ligada a um anel aromático. Evidenciou, ainda, sinais de hidrogênios alifáticos, incluindo dois singletos metílicos (CH_3) (1,27 e 1,33 ppm, cada um integrando para 3H) e dois multipletos (4,79 e 3,37 ppm) similares aos observados para o sistema diidrofurânico da substância **16**. A análise das

correlações dos mapas de contornos *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC permitiram identificar a substância **18** como o furanocromona prim-O-glicosilcimifugina (Figura 4.39). Os dados de RMN corroboram aqueles apresentados por Sasaki et al. (1982).

O seu espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, exibiu o íon m/z 491, referente a $[M+Na]^+$ e coerente com a estrutura proposta para a substância **18** (fórmula molecular $C_{22}O_{11}H_{28}$).

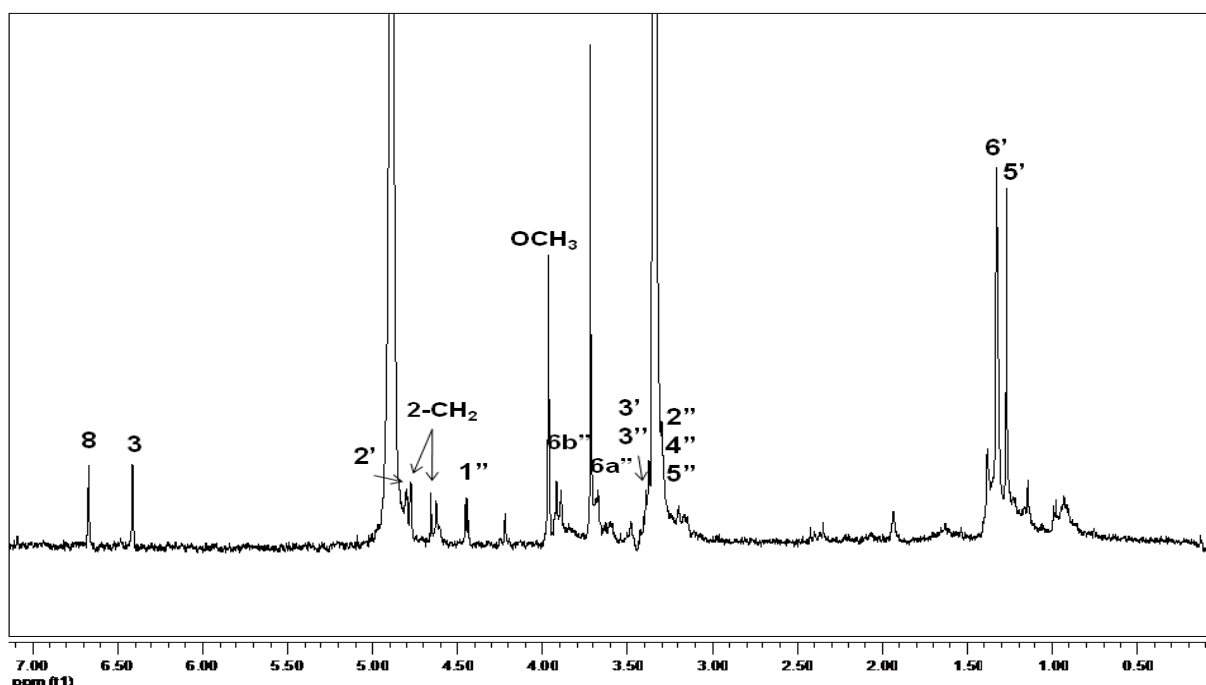


Figura 4.45 - Espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **18**

4.6.3.4 Isoflavona triglicosilada (**19**)

Identificação da substância **19**: triglicosil-biochanin A

A Tabela 4.14, a seguir, mostra os dados de RMN de 1H e de ^{13}C , bem como os dados de correlações *g*COSY e *g*HMBC obtidos para a substância **19**. Os seus espectros de UV e de RMN de 1H podem ser observados nas Figuras 4.46 e 4.47, respectivamente.

Tabela 4.14 - Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e dos experimentos gCOSY, gHSQC e gHMBC da substância **19** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	δ_c	δ_H^b	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Aglicona					
2	155,7	8,20 (s)	-	8,20	-
3	124,5	-	-	-	H2, H2', H6'
4	182,4	-	-	-	H2
5	163,9	-	-	-	H6
6	100,7	6,56 (d; 2,3)	-	6,56	H8
7	164,2	-	-	-	H6, H8, H1''
8	95,4	6,73 (d; 2,3)	-	6,73	H6
9	159,1	-	-	-	H2, H8
10	107,9	-	-	-	H6, H8
1'	124,1	-	-	-	H3', H5'
2'	130,8	7,52 (d; 8,8)	H3'	7,52	H6'
3'	114,6	7,01 (d; 8,8)	H2'	7,01	H2', H5'
4'	161,1	-	-	-	4-OCH ₃ , H2', H6', H3', H5'
5'	114,6	7,01 (d; 8,8)	H6'	7,01	H3', H6'
6'	130,8	7,52 (d; 8,8)	H5'	7,52	H2'
4'-OCH ₃	55,5	3,85 (s)	-	3,85	-
Glicose					
1''	101,3	5,02 (d; 7,0)	H2''	5,02	H2'', H3''
2''	74,1	3,49-3,54 (m)	H1''	3,52	H3''
3''	77,6	3,49-3,54 (m)	H4''	3,52	H2'', H4''
4''	71,3	3,38 (t; 9,2)	H3'', H5''	3,38	H3'', H6'' ^b
5''	76,9	3,72-3,74 (m)	H4''	3,72	H6'' ^a
6''	68,8	3,65 (dd; 7,0; 10,9) 4,09 (d; 10)	H5'', H6b'' H6a''	3,65; 4,09 (CH ₂)	H5'', H1'''
Apiose					
1'''	110,2	5,01 (d; 2,5)	H2'''	5,01	H2''', H4''' ^b , H5''' ^a , H-5''' ^b , H6b''
2'''	78,3	4,00 (d; 2,5)	H1'''	4,00	H-5a'''
3'''	79,6	-	-	-	H4''', H5''' ^a , H5''' ^b
4'''	74,9	3,81 (d; 9,8) 4,08 (d; 9,8)	H4b''' H4a'''	3,81; 4,08 (CH ₂)	H5''' ^a , H5''' ^b , H1'''
5'''	71,5	3,57 (d; 9,8) 3,81 (d; 9,8)	H5b''' H5a'''	3,57; 3,81 (CH ₂)	H4''' ^a , H4''' ^b , H1'''
Apiose					
1''''	110,2	4,99 (d; 2,7)	H2''''	4,99	H4'''' ^a , H4'''' ^b
2''''	77,4	3,95 (d; 2,7)	H1''''	3,95	H4'''' ^a , H5''''
3''''	80,5	-	-	-	H4'''' ^a
4''''	74,8	3,78 (d; 9,8) 3,98 (d; 9,8)	H4b'''' H4a''''	3,78; 3,98 (CH ₂)	H5'''' ^a , H1''''
5''''	65,2	3,59 (m)	-	3,59 (CH ₂)	H4'''' ^a , H4'''' ^b

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

A substância **19** foi isolada como um sólido amorfo castanho e o seu espectro de UV, obtido durante corrida CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 259 e 324 nm (Figura 4.46), condizente com isoflavonas (MABRY; MARKHAN; THOMAS, 1970).

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.47; Tabela 4.14) apresentou um sinal em 8,20 (s, 1H, H-2) e o seu espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 4.14) evidenciou sinais em em 155,7 (C-2) e 124,5 (C-3) ppm, típicos do sistema insaturado entre C-2

e C-3 de uma isoflavona (AGRAWAL, 1989). O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.47) exibiu, ainda, um grupo metoxila em 3,85 ppm (s, 3H), dois sinais para hidrogênios de sistemas aromáticos com acoplamento *meta*, em 6,56 (d, 2,3 Hz, 1H) e 6,73 (d, 2,3 Hz, 1H) ppm, e dois sinais de hidrogênios em posição *orto* de um anel aromático 1,4-dissubstituído em 7,52 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) e 7,01 ppm (d, $J = 8,8$ Hz, 2H). Também foram observados três sinais de hidrogênios anoméricos em 5,02 (d, $J = 7,0$ Hz, H-1''), 5,01 (d, $J = 2,5$ Hz, H-1''') e 4,99 ppm (d, $J = 2,7$ Hz, H-1'''), sugerindo a existência de três unidades de açúcar. O mapa de contornos gHSQC exibiu carbonos em região de açúcares, incluindo 5 carbonos metilênicos e três anoméricos (estes últimos em 101,3; 110,2 e 110,2 ppm, correspondentes a C-1'', C-1''' e C-1'''), dados que sugeriram haver uma unidade de glicose e duas de apiose na substância em questão.

O mapa de correlações gHMBC (Tabela 4.14) mostrou acoplamentos dos hidrogênios em 7,52 (H-2' e H-6') e 3,85 ppm (OCH₃) com o carbono em 161,1 ppm (C-4), determinando a posição da metoxila em C-4'. Ainda, acoplamento do hidrogênio anomérico da glicose (5,02 ppm, H-1'') e dos hidrogênios H-6 (6,73 ppm) e H-8 (6,56 ppm) com o carbono em 164,2 ppm (C-7) indicaram a posição da glicose no anel A. O acoplamento entre o hidrogênio anomérico de uma apiose em 5,01 (H-1''') e o carbono C-6'' da glicose, em 68,8 ppm, evidenciou ligação 1'''→6'' entre estas unidades glicosídicas. Um acoplamento adicional entre o H anomérico da segunda unidade de apiose (4,99 ppm, H-1''') e o carbono em 71,5 ppm (C-5''') evidenciou ligação 1'''→5''' entre as duas unidades de apiose. A desproteção adicional dos carbonos C-6'' (68,8 ppm) e C-5''' (71,5 ppm) e de seus respectivos hidrogênios (observados também por experimentos TOCSY 1D) confirmaram as ligações interglicosídicas citadas. Os valores das constantes de acoplamento dos três hidrogênios anoméricos, bem como os deslocamentos químicos observados para os carbonos anoméricos (Tabela 4.14) evidenciaram configurações β tanto para a glicose como para as duas unidades de apiose e a substância **19** foi, então, identificada como 7-O-[β -apiofuranosil-(1→5)- β -apiofuranosil-(1→6)- β -glicopiranosil]-biochanina A (Figura 4.39). Os dados de RMN (Tabela 4.14) corroboraram aqueles apresentados por Silva, Velozo e Parente (2000) e Farag et al. (2001).

O seu espectro de massas ESI-MS, em modo positivo, exibiu o íon m/z 733, referente a $[M+Na]^+$. Portanto, coerente com a fórmula molecular $C_{32}O_{18}H_{38}$ da substância **19**.

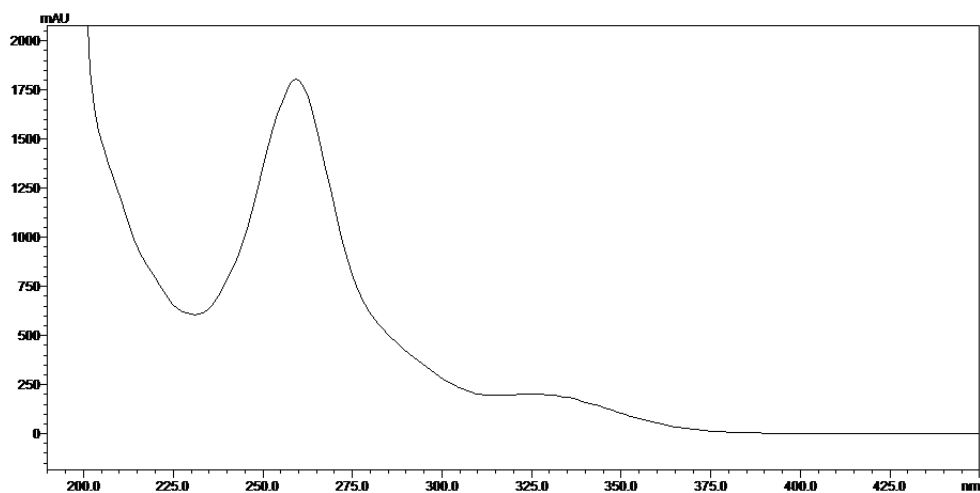


Figura 4.46 - Espectro de UV da substância **19**

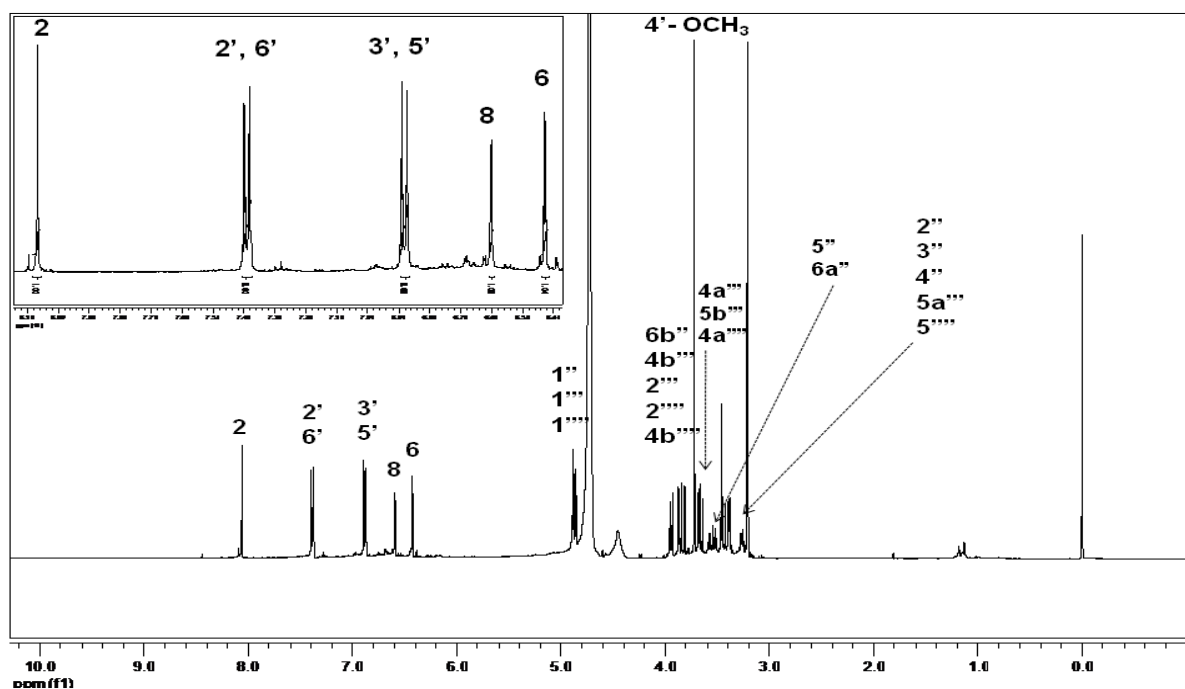


Figura 4.47 - Espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **19**

4.6.3.5 Estilbeno (**20**)Identificação da substância **20**: piceíde

A Tabela 4.15, a seguir, mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como os dados de correlações dos experimentos *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC obtidos para a substância **20**. Os seus espectros de UV e de RMN de ^1H podem ser observados nas Figuras 4.48 e 4.49, respectivamente.

Tabela 4.15 - Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e dos experimentos *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC da substância **20** (CD_3OD ; 11,7 T)^a

Posição	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	<i>g</i> HSQC	<i>g</i> HMBC
1	130,3	-	-	H- β , H-3, H-5, H-2, H-6
2	128,9	7,37 (d; 9,0)	7,37	H- α , H-6
3	116,5	6,78 (d; 9,0)	6,78	H-5, H-2
4	158,5	-	-	H-2, H-6, H-3, H-5
5	116,5	6,78 (d; 9,0)	6,78	H-3, H-6
6	128,9	7,37 (d; 9,0)	7,37	H- α , H-2
α	130,4	7,03 (d; 16,5)	7,03	H-2, H-6
β	126,7	6,85 (d; 16,5)	6,85	H-2', H-6'
1'	141,5	-	-	H- α , H- β
2'	107,1	6,80 (t; 2,0)	6,80	H- β , H-4', H-6'
3'	160,5	-	-	H-1'', H-2'', H-4''
4'	104,2	6,46 (t; 2,0)	6,46	H-2', H-6'
5'	159,6	-	-	H-4', H-6'
6'	108,4	6,66 (t; 2,0)	6,66	H-2', H-4'
1''	102,5	4,91 (d; 7,5)	4,91	H-2'', H-3''
2''	75,0	3,43-3,50 (m)	3,45	H-3'', H-4''
3''	78,1	3,43-3,50 (m)	3,47	H-1''
4''	71,6	3,39 (t; 9,1)	3,39	H-6b'', H-3'', H-5''
5''	78,3	3,43-3,50 (m)	3,47	H-6a'', H-6b'', H-4''
6''	62,6	3,72 (dd; 5,9; 12,1) 3,93 (dd; 2,3; 12,1)	3,72; 3,93 (CH_2)	H-4''

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de RMN de ^{13}C obtidos por experimentos *g*HSQC e *g*HMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (*J* em Hz) entre parênteses.

A substância **20** foi isolada como um sólido castanho e o seu espectro de UV, obtido durante corrida CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 215, 306 e 318 nm (Figura 4.48).

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.49; Tabela 4.15) apresentou dois sinais intensos de hidrogênios de sistemas aromáticos, cada um integrando para dois H, em 6,78 (d, *J* = 9,0 Hz, H-3, H-5) e 7,37 (d, *J* = 9,0 Hz, H-2, H-6) ppm, com acoplamento *orto* em um anel aromático 1,4-dissubstituído, oxigenado na posição C-4, e três outros, com acoplamentos *meta*, em 6,80 (t, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,46 (t, *J* = 2,0 Hz, H-4') e 6,66 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H, H-6') ppm, evidenciando um anel aromático

assimétrico 1', 3', 5'-trissubstituído, oxigenado em C-3' e C-5'. Dois dubletos, em 7,03 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H, H- α) e em 6,85 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H, H- α) ppm, indicaram uma ligação dupla dissustituída com configuração *trans*. Esse espectro também apresentou um sinal para hidrogênio anomérico em 4,91 ppm (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1'') e outros sinais típicos de uma β -glicose terminal ligada a um anel aromático, o que foi confirmado por experimento TOCSY 1D, irradiando-se em 4,91 ppm (H-1'').

As correlações observadas nos mapas de contorno *g*HSQC e *g*HMBC (Tabela 4.15) permitiram identificar a substância **20** (Figura 4.39) como o estilbeno (*E*)-3'-*O*- β -*D*-glicopiranosil-resveratrol, ou piceíde. Os dados de RMN (Tabela 4.17) confirmaram aqueles apresentados por Orsini et al. (1997) e Lu et al. (2009).

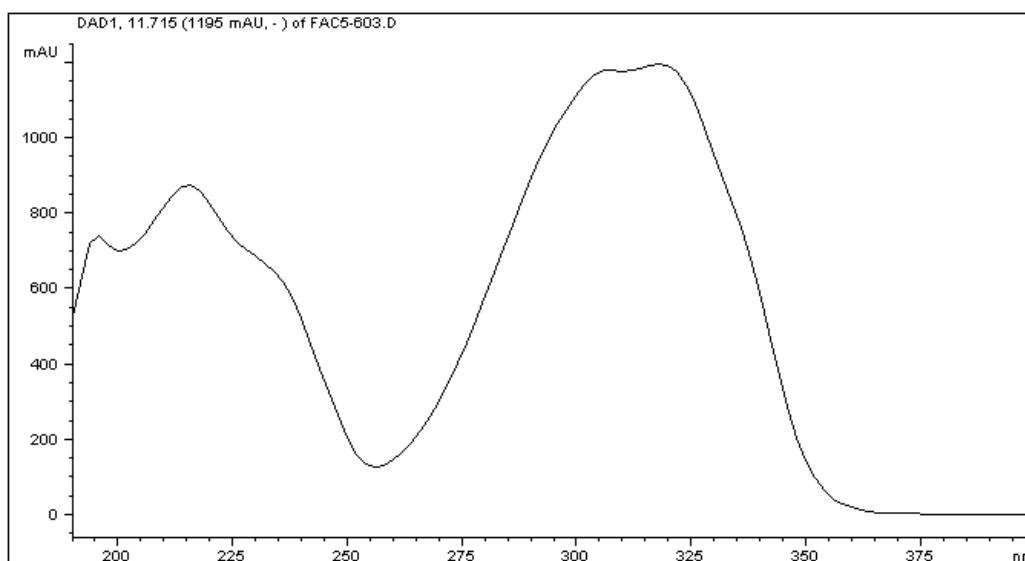


Figura 4.48 - Espectro de UV da substância **20**

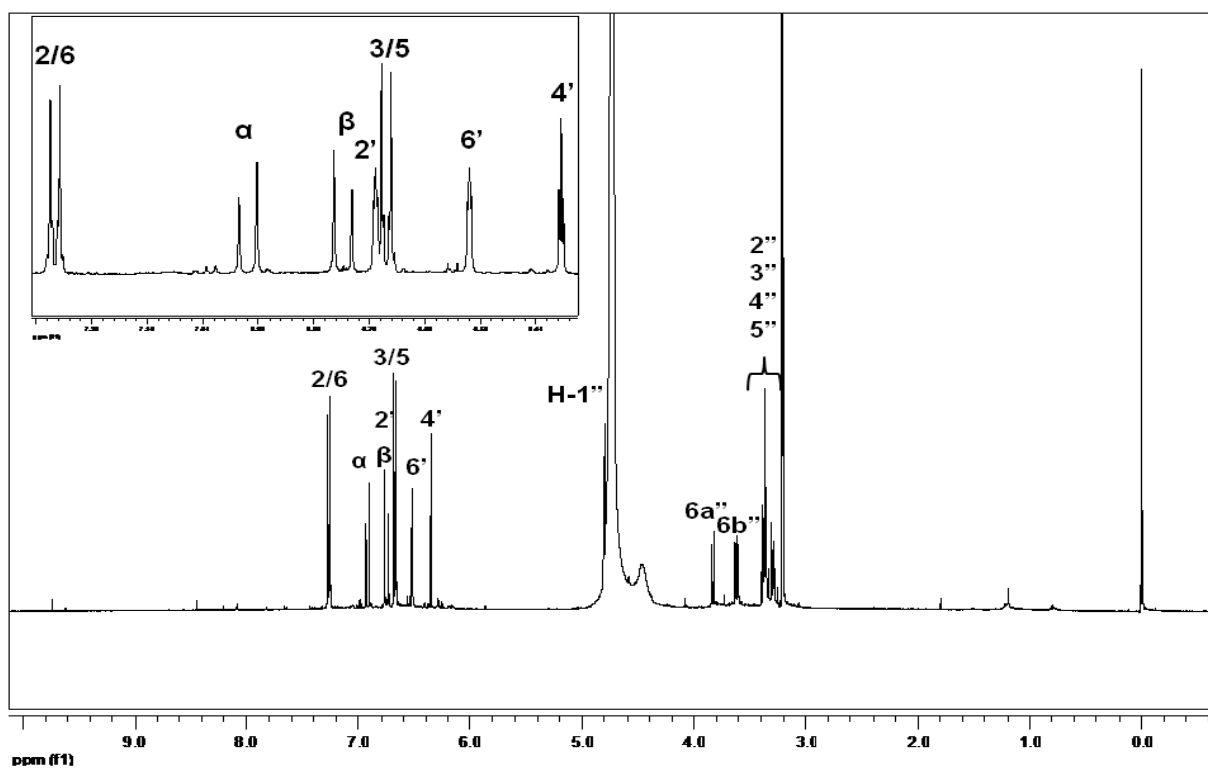


Figura 4.49 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **20**

4.6.3.6 Iridóide (21)

Identificação da substância 21: β -diidroastatosídeo

A Tabela 4.16, a seguir, mostra os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C RMN, bem como os dados de correlações gCOSY, gHMBC e TOCSY 1D obtidos para a substância 21. Os seus espectros de UV e de RMN de ^1H podem ser observados nas Figuras 4.50 e 4.51, respectivamente.

Tabela 4.16 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , e dos experimentos gCOSY, gHMBC e NOESY 1D da substância 21 (11,7 T, CD_3OD)^a

Posição	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	gCOSY	gHMBC	NOESY 1D
1	95,7	5,59 (d; 2,2)	H9	H3, H8, H9	H1', H9, H10, H8
3	154,0	7,41 s	-	H1	H1, H6
4	112,7	-	-	H3, H6, H9	-
5	72,8	-	-	H1, H7a, H7b, H9	-
6	76,8	4,03 (t; 6,2)	H7a, H7b	H8, H9, H7a, H7b	H7b, H1, H3
7	40,4	1,21 (ddd; 6,2; 9,0; 13,2) 2,00 (ddd; 6,2; 7,8; 13,2)	H8, H7b, H6 H7a, H6, H8	H10, H8	H7b, H10, H9 H7a, H-6
8	31,5	1,50 (m)	H9, H10, H7a, H7b	H1, H6, H7a, H7b, H9, H10	H7b, H10, H1, H3, H6
9	55,7	1,94 (dd; 2,2; 10,3)	H1, H8	H6, H7a, H7b, H8, H10	H1, H10, H8
10	19,7	1,04 (d; 6,6)	H-8	H7a, H7b, H9, H8	H1, H9, H8, H7a
11	167,9	-	-	H3, 11-OCH ₃	-
11-OMe	51,5	3,62 (s)	-	-	-
1'	100,0	4,49 (d; 7,9)	H-2'	H1, H2', H3'	H1
2'	74,3	3,10 (dd; 7,9; 9,2)	H1', H3'	H1', H3'	-
3'	77,4	3,18-3,30 (m)	H2'	H2', H1'	-
4'	71,6	3,15-3,24 (m)	H3', H5'	H6'a, H6'b, H3', H5'	-
5'	78,1	3,18-3,30 (m)	H6'a	H6a'', H6b'', H4''	-
6'	62,5	3,57 (dd; 5,7; 12,0) 3,80 (dd; 2,0; 12,0)	H6'b, H5' H6'a	H4', H5'	- -

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores de ^{13}C obtidos por gHSQC e gHMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (J em Hz) entre parênteses.

A substância 21 foi isolada como um sólido branco e seu espectro de UV, obtido durante corrida CLAE-DAD, apresentou λ_{max} em 231 nm (Figura 4.50).

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.51; Tabela 4.16) apresentou sinais característicos de iridóides glicosilados: em 7,41 ppm (s, 1H), referente ao H-3 do núcleo ciclopentanodihidropirano de iridóides carboximetílicos; em 5,50 ppm (dd, $J = 2,2$ Hz, 1H) referente ao hidrogênio oximetínico H-1; e em 4,49 ppm (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio anomérico H-1' de uma β -glicose (o que foi confirmado por experimento TOCSY 1D, que revelou tratar-se de uma glicose terminal). Foram

observados, ainda, um singlete em 3,62 ppm (3H, 11-OCH₃), um dubleto em 1,04 ppm ($J = 6,6$ Hz; 3H; H-10), de uma metila, um tripleto de um hidrogênio oximetínico em 4,02 ($J = 6,2$ Hz; H-6) e sinais de hidrogênios alifáticos em 1,21 (ddd, $J = 6,2$; 9,0; $J = 13,2$ Hz; H-7a); 1,50 (m, H-8); 1,94 (dd, $J = 2,2$; 10,3 Hz; H-9) e 2,0 (ddd, $J = 6,2$; 7,8; 13,2 Hz; H-7b) ppm. Observaram-se também os sinais entre 3,10 e 3,80 ppm, dos H-2 a H-6 de uma unidade glicosídica.

Análises dos mapas de contornos *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC (Tabela 4.16) confirmaram as atribuições indicadas acima e permitiram localizar as duas hidroxilas em C-5 e C-6 e a metila em C-8, restando a definição da estereoquímica da molécula em questão. A biossíntese desta classe de metabólitos envolve a junção *cis* entre os dois ciclos, neste caso com H-9 e os substituintes em C-1 e C-5 em configuração β e, portanto, este centro tem configuração absoluta S (SILVA, 2007). Damtoft et al. (1981) estudaram uma vasta gama de iridóides glicosilados utilizando RMN de ¹H e de ¹³C, com o intuito de estabelecer bases que auxiliassem na análise configuracional destas substâncias. Para a determinação da configuração de C-6 em epímeros 4-metoxicarbonílicos 6-O-substituídos, com fórmulas estruturais planas idênticas à da substância **21** em questão, observaram os efeitos de desproteção em C-3 causado pelo substituinte 6 α -OH em relação ao 6 β -OH (156,7 e 154,8 ppm, respectivamente) e de proteção em C-4 (110,7 e 112,2 ppm, respectivamente). Ainda mais pronunciado é o efeito de desproteção em C-1 (111,3 e 96,0 ppm, respectivamente) causado pelo substituinte 6 α -OH em relação a 6 β -OH. A diferença entre δ C-3 – δ C-4 foi muito menor para o epímero 6 β -OH (42,6 ppm – a diferença observada para a substância **21** é de 41,3 ppm) em relação ao seu par 6 α -OH (50,3 ppm). Os dados de RMN de ¹³C da substância **21** indicaram tratar-se do substituinte 6 β -OH, sendo que os autores consideram suficientes para conclusões a observação de dois, dos três efeitos estudados. Os mesmos autores estudaram o efeito da orientação do grupo metila (C-10) ligado a C-8 para moléculas não substituídas em C-7 ou C-8. Observaram efeitos de desproteção em C-9 (-5,0 a -5,5 ppm) e C-10 (-3,5 a -5,0 ppm) causados pela orientação 8 β -CH₃ em relação ao seu epímero 8 α -CH₃, permitindo a distinção entre as séries analisadas: δ C-10 < 17 ppm para a série 8 α -CH₃ e δ C-10 > 18 ppm para a série 8 β -CH₃. A substância **21** apresentou δ C-10 = 19,7 ppm, portanto, sugerindo orientação 8 β -CH₃. O efeito em C-9 em função da orientação da metila em C-8 pode ser claramente observado pela comparação dos

dados de RMN de ^{13}C do diidroastatosídeo (TEBORG E JUNIOR, 1991; DAMTOFT et al., 1981) e do penstemosídeo (JENSEN et al., 2007).

Experimentos NOESY 1D desenvolvidos com a substância **21** (Tabela 4.16) confirmaram as orientações inferidas segundo as regras propostas por Damtoft et al. (1981). Por exemplo, H-9 (β) mostrou forte correlação espacial com H-10. Este, por sua vez, mostrou interação espacial com H-7a. Na outra face (α), H-8 mostrou interação espacial com sinal em H-7b e H-1, definindo H-7b em α . Outro experimento, irradiando-se em H-6, mostrou forte interação entre este e H-7b, evidenciando estarem na mesma face. Também as constantes de acoplamento calculadas (Tabela 4.16) corroboraram as orientações observadas. Por exemplo, a constante de acoplamento $J_{\text{H9-H8}} = 10,3 \text{ Hz}$ (com H-9 com orientação β) evidenciou um acoplamento *trans* coplanar entre eles (WILLIAMS E FLEMING, 1980), o que implicaria H-8 em posição α e, conseqüentemente, H-10 em β .

Finalmente, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C foram confrontados com a literatura e a substância **21** foi identificada como β -dihidroastatosídeo (Damtoft et al., 1981; BOROS; STERMITZ, 1990; TEBORG; JUNIOR, 1991).

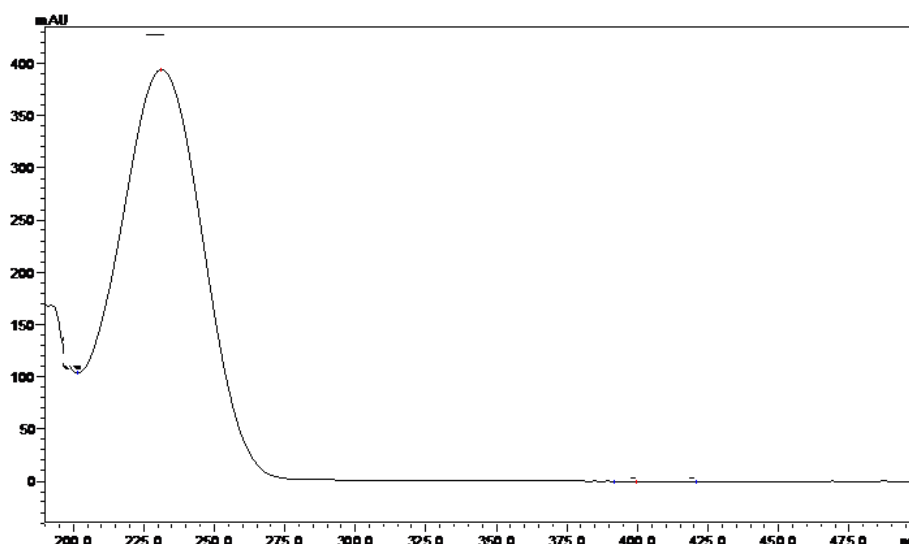


Figura 4.50 - Espectro de UV da substância **21**

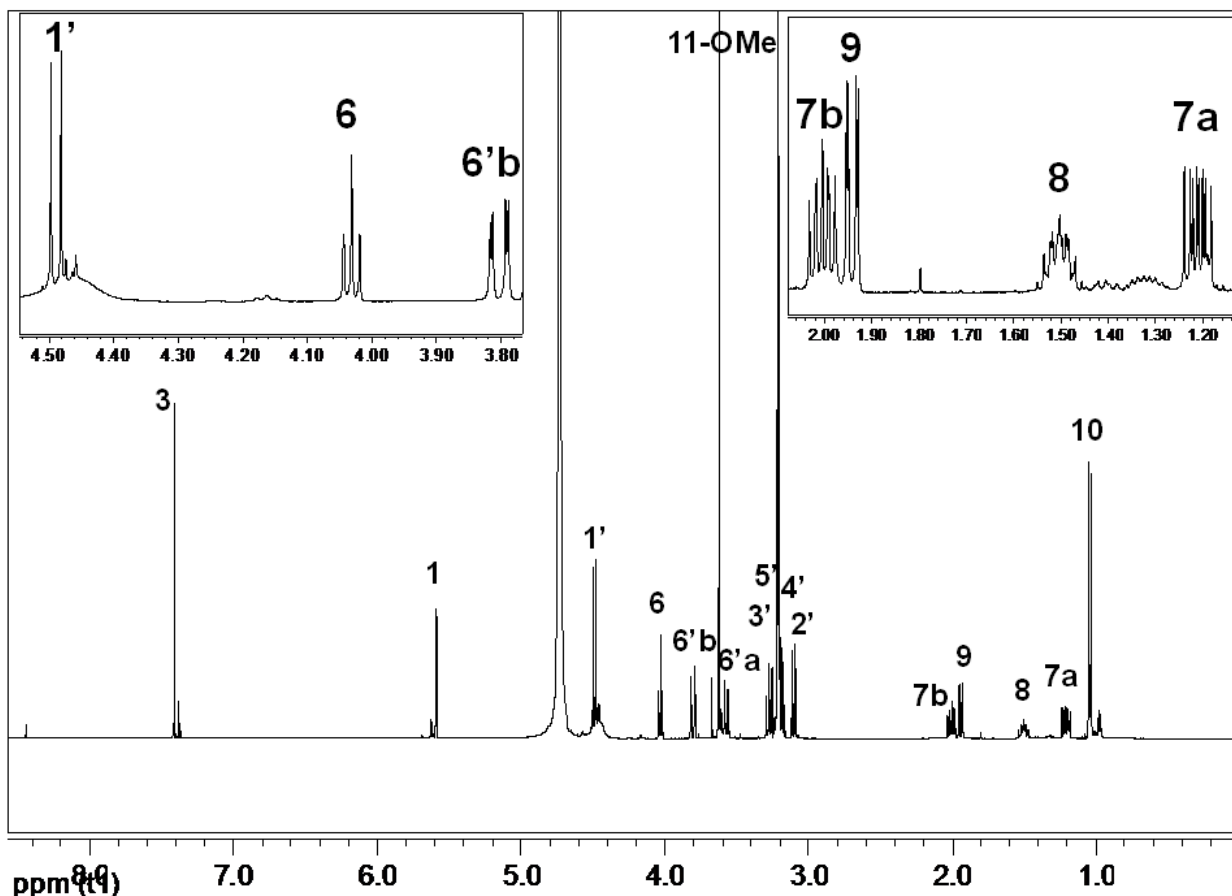


Figura 4.51 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **21**

4.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDOS DOS ISÔMEROS **12a**, **12b**, **13a** e **13b**

4.7.1 Elucidação estrutural

As tabelas 4.17 e 4.18 trazem os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em CD_3OD , bem como as correlações observadas pelo mapa de contornos gHMBC para os isômeros inéditos (2*S*) e (2*R*)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-*O*- β -glicopiranosil-flavanona (**12a** e **12b**), e (2*S*) e (2*R*)-5,8,3',4'-tetraidroxi-7-*O*- β -glicopiranosil-flavanona (**13a** e **13b**) (Figura 4.52). A discussão de como foram elucidados é apresentada em seguida.

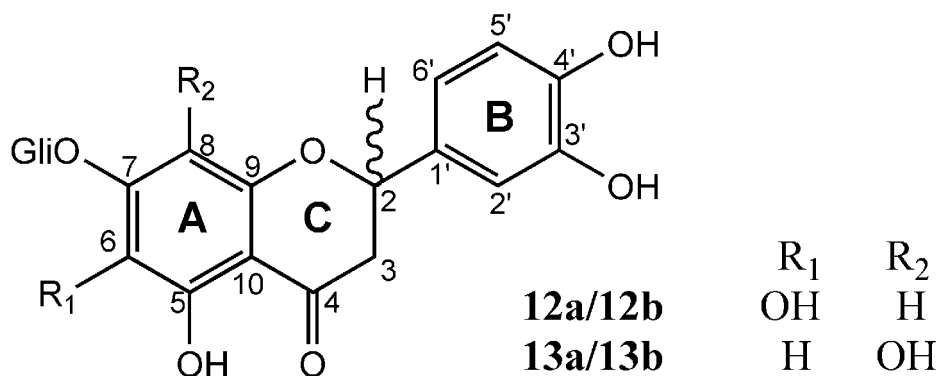


Figura 4.52 - Isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b** isolados do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs), e também presentes no extrato de folhas da mesma espécie (EEFLs)

Tabela 4.17 - Dados de RMN de **12a** e **12b** (11,7 T; CD₃OD)^{a,b,c}

Posição	12a		12b		12a e 12b gHMBC
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	
2	80,8	5,29 (dd; 3,0; 12,8)	80,8	5,28 (dd; 2,9; 13,0)	2', 6', 3 _{ax}
3 _{eq}	44,3	2,77 (dd; 3,0; 17,2)	44,3	2,76 (dd; 2,9; 17,2)	-
3 _{ax}		3,14 (dd; 12,8; 17,2)		3,14 (dd; 13,0; 17,2)	-
4	199,5	-	199,5	-	3 _{ax} , 3 _{eq} , 2
5	150,7	-	150,7	-	8
6	129,2	-	129,1	-	8
7	154,5	-	154,5	-	8, 1''
8	96,1	6,40 (s)	96,1	6,40 (s)	-
9	156,9	-	156,9	-	8
10	105,0	-	105,0	-	3 _{eq} , 8
1'	131,7	-	131,8	-	2', 5', 6', 3 _{ax} , 2
2'	114,8	6,95 (s)	114,9	6,95 (s)	6', 2
3'	146,5	-	146,5	-	2', 5', 6'
4'	146,5	-	146,5	-	2', 5'
5'	116,3	6,81 (d; 8,4)	116,3	6,81 (d; 8,4)	6'
6'	119,3	6,81 (d; 8,4)	119,3	6,81 (d; 8,4)	2', 2
1''	102,3	4,97 (d; 7,4)	102,2	4,97 (d; 7,4)	2'', 3''
2''	74,6	3,55 (m)	74,6	3,55 (m)	3''
3''	77,4	3,53 (m)	77,4	3,53 (m)	2''
4''	71,1	3,44 (m)	71,1	3,44 (m)	3'', 5'', 6''b
5''	78,3	3,48 (m)	78,3	3,48 (m)	4'', 6''a, 6''b
6''	62,3	3,68-3,77 (m)	62,3	3,68-3,77 (m)	4''
		3,88-3,94 (m)		3,88-3,94 (m)	

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bValores extraídos por experimentos de RMN de ¹H e de ¹³C, 1D TOCSY, 1D NOESY, gCOSY, gHSQC, gHMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (*J* em Hz) entre parênteses.

Tabela 4.18 - Dados de RMN de **13a** e **13b** (11,7 T; CD₃OD)^{a,b,c}

Posição	13a / 13b		13a / 13b		13a / 13b
	δ C	δ H	δ H	δ H	gHMBC
2	80,9	5,39 (dd; 3,0; 12,8)	5,37 (dd; 3,0; 13,0)		2', 6', 3 _{ax}
3 _{eq}	44,5	2,85 (dd; 3,0; 17,2)	2,83 (dd; 3,0; 17,2)		-
3 _{ax}		3,19 (dd; 12,8; 17,2)	3,18 (dd; 13,0; 17,2)		-
4	198,8	-	-		3 _{ax} , 3 _{eq} , 2
5	157,1	-	-		6
6	96,9	6,36 (s)	6,36 (s)		-
7	155,3	-	-		6, 1"
8	128,4	-	-		6
9	150,2	-	-		6
10	105,0	-	-		3 _{ax} , 6
1'	131,5	-	-		2, 3 _{ax} , 3 _{eq} , 2', 5', 6'
2'	115,0	7,00 (s)	7,00 (s)		3 _{eq} , 6'
3'	146,7	-	-		2', 5', 6'
4'	147,0	-	-		2', 5'
5'	116,3	6,82 (d; 8,4)	6,82 (d; 8,4)		-
6'	119,6	6,87 (d; 8,4)	6,87 (d; 8,4)		2, 2'
1"	102,3	4,97 (d; 7,5)	4,97 (d; 7,5)		2'', 3''
2"	74,6	3,55 (m)	3,55 (m)		3''
3"	77,4	3,53 (m)	3,53 (m)		2''
4"	71,1	3,44 (m)	3,44 (m)		3'', 5'', 6''b
5"	78,3	3,48 (m)	3,48 (m)		4'', 6''a, 6''b
6"	62,3	3,68-3,77 (m) 3,88-3,94 (m)	3,68-3,77 (m) 3,88-3,94 (m)		4''

^aDeslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^bvalores extraídos por experimentos de RMN de ¹H e de ¹³C, 1D TOCSY, 1D NOESY, gCOSY, gHSQC, gHMBC.

^cMultiplicidades e constantes de acoplamentos (*J* em Hz) entre parênteses.

Após isolamento das substâncias **12a**, **12b**, **13a** e **13b** por CLAE-DAD (subseções 3.2.3.3.4 e 4.4.1.1.3), foram observadas interconversões entre todas elas por meio de experimentos de RMN de ¹H, já que os seus espectros apresentaram os sinais da mistura das quatro substâncias novamente, similares ao espectro obtido para a fração G3, da qual foram isoladas. O espectro de RMN de ¹H de G3 mostrou-se típico de uma mistura de flavanonas glicosiladas, como pode ser observado nas Figuras 4.53 e 4.54. Os sinais sobrepostos em 5,28/5,29 ppm e em 5,37/5,39 ppm (Figura 4.54a), correspondentes aos H-2 das flavanonas, e os multipletos em 2,76-2,85 e 3,14-3,19 ppm (regiões de H-3a e H-3b de flavanonas) (Figura 4.54b) sugeriram uma mistura de dois pares de epímeros de flavanonas glicosiladas.

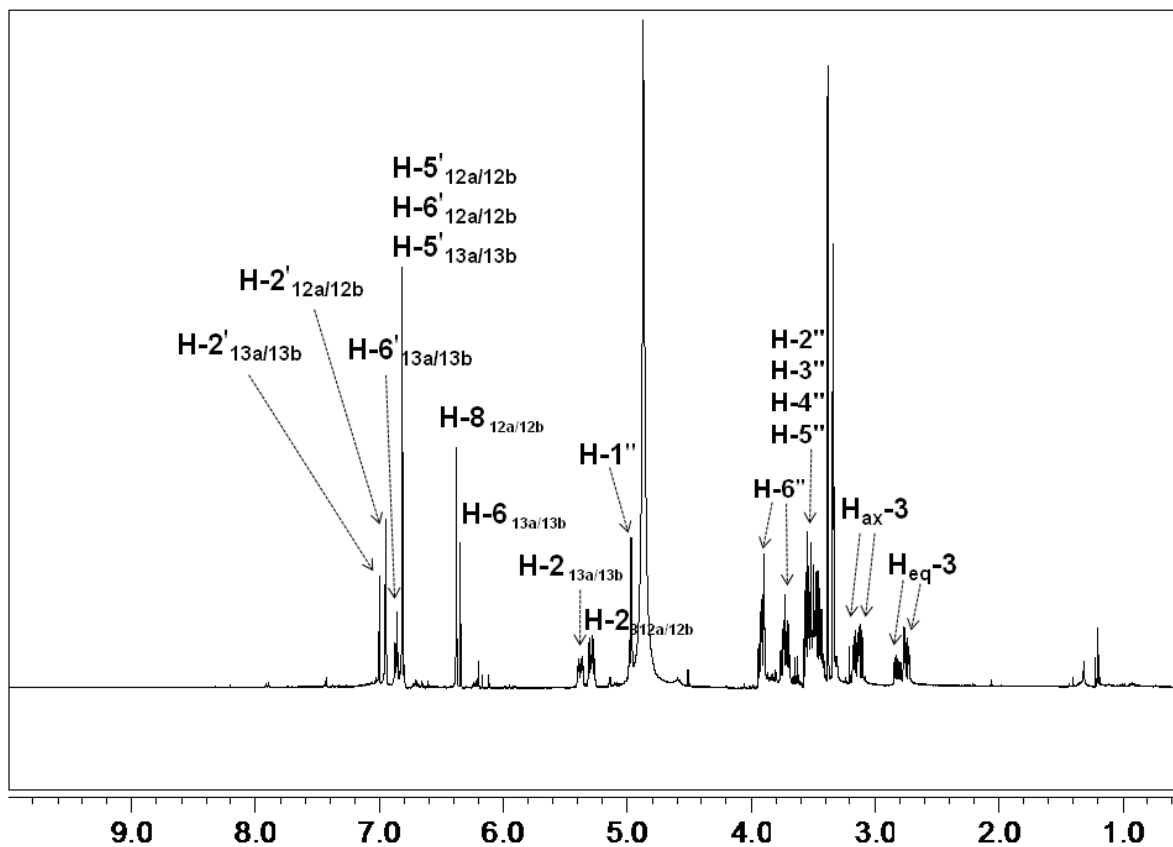


Figura 4.53 - Espectro de RMN de ^1H da amostra G3 (500 MHz, CD_3OD)

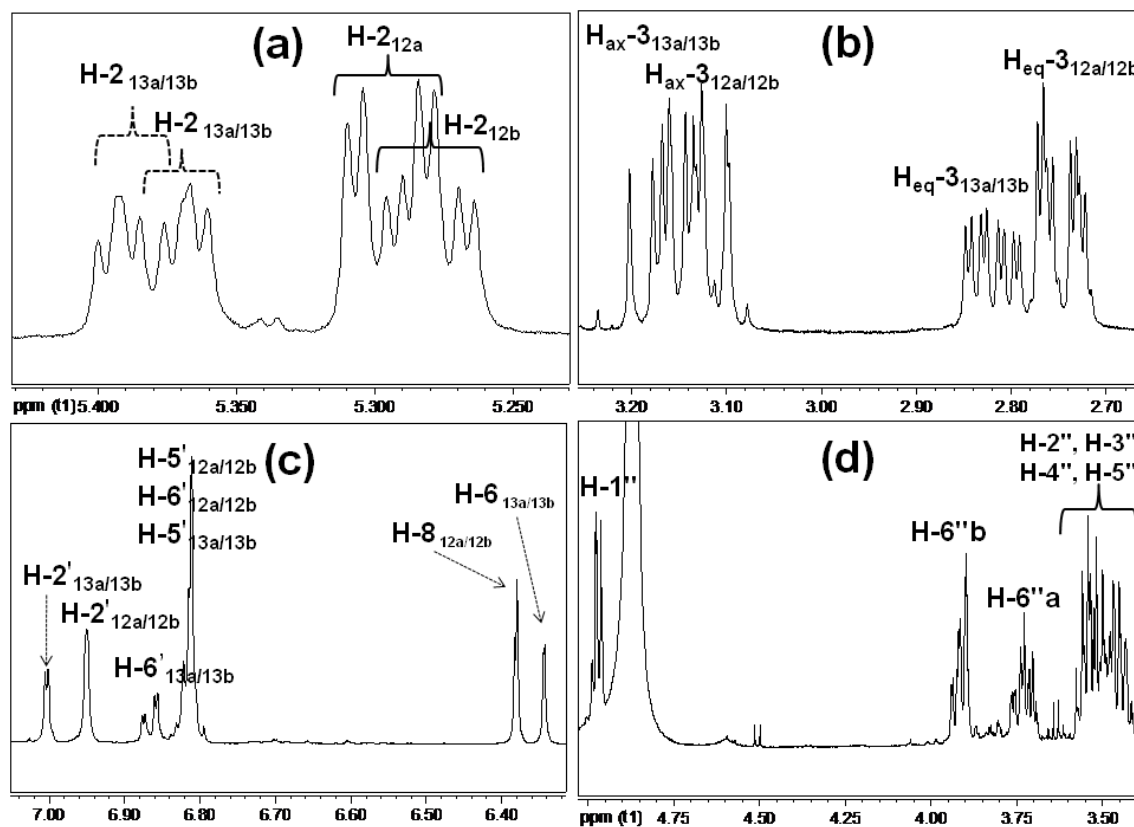


Figura 4.54 - Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H da amostra G3 (500 MHz, CD_3OD)

Então, foram realizadas análises por CLAE-DAD a partir de G3, coletando-se um isômero por corrida e, em seguida, reinjetando-o na mesma condição cromatográfica apenas 20 minutos após a sua coleta, sem prévia concentração e mantendo-o ao abrigo da luz e em freezer. Interconversões iniciais foram observadas para os 4 isômeros, conforme ilustrado na Figura 4.55 para o isômero **12a**.

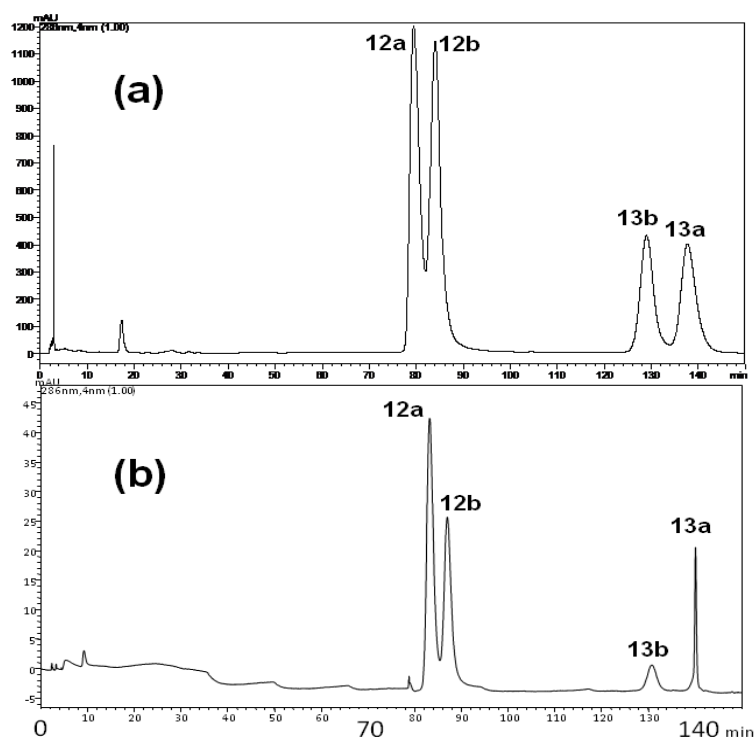


Figura 4.55 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD [FE: C-18; FM: H₂O:MeOH 84:16 (v/v); F: 1 mL/min; λ = 280 nm] para a fração G3 (a) e para a reinjeção do isômero **12a** (b), após 20 minutos de sua coleta

Como estas análises evidenciaram a instabilidade de todos os 4 isômeros isolados, foi adotada a estratégia de identificá-los em mistura. Adicionalmente, análises CLAE-DAD-DC com G3 confirmaram tratar-se de uma mistura de dois pares epiméricos distribuídos em 4 bandas, como pode ser observado pelas Figuras 4.56A e 4.56B, já que cada par de bandas (a 62 e 64 min, e a 94 e 102 min., respectivamente) apresentou espectros de UV idênticos e efeitos Cotton opostos nos espectros de dicroísmo circular (DC) obtidos (Figuras 4.56C e 4.56D). Efeito Cotton positivo em 376 nm (banda $n \rightarrow \pi^*$) e acentuada banda negativa a 294 nm (banda $\pi \rightarrow \pi^*$) estabeleceram a configuração 2S da substância eluída em 62 min. (**12a**), enquanto que efeitos Cotton opostos (Figura 2C) observados para aquela eluída em 64 min. permitiram estabelecer a sua configuração como 2R (**12b**). Efeito

Cotton negativo a 376 e positivo a 294 nm (Figura 2D) definiram a configuração *2R* da substância eluída em 94 min. (**13b**), enquanto que efeitos opostos foram observados para a substância eluída em 102 min., definindo a sua configuração como *2S* (**13a**) (GAFFIELD, 1970; SLADE; FERREIRA; MARAIS., 2005).

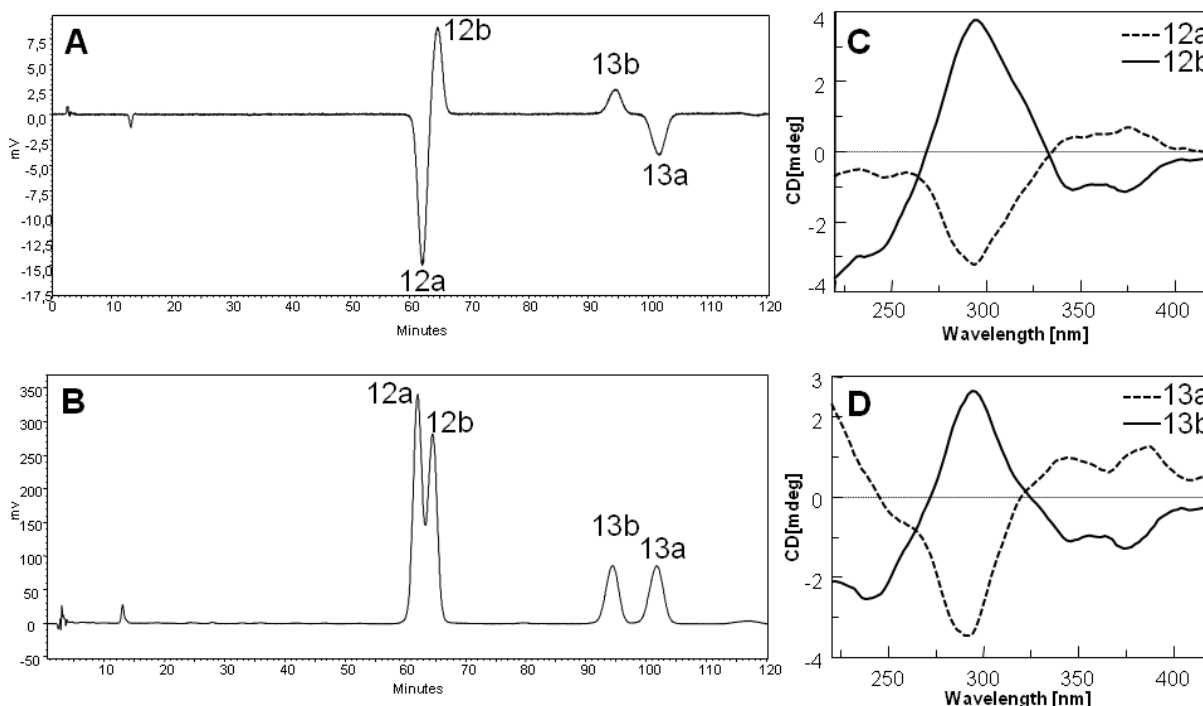


Figura 4.56 - Cromatogramas obtidos por CLAE para a fração G3 [FE: C18; FM: MeOH/H₂O 83:17, com 0.1% TFA (v/v); F: 1 ml/min.], monitorados com detectores de dicroísmo circular (A) e de ultravioleta (B) ($\lambda = 280$ nm). Espectros de dicroísmo circular, sobrepostos, das bandas capturadas a 62 e 64 min. (C), e a 94 e 102 min. (D).

Experimentos seletivos NOESY 1D e TOCSY 1D com a fração rica nestes isômeros (G3) permitiram inicialmente a diferenciação entre os sinais de isômeros constitucionais (**12a/12b** de **13a/13b**) e, em uma segunda etapa, entre epímeros. Experimento 1D NOESY, irradiando-se nos sinais sobrepostos 5,28/5,29 ppm (H-2), mostrou correlação espacial na região de hidrogênios de sistemas aromáticos apenas com os sinais em 6,95 e 6,81 ppm (para ambos, **12a** e **12b**) (Figura 4.58), enquanto que a irradiação em 5,37/5,39 ppm (H-2) evidenciou correlações espaciais apenas com os sinais em 7,00 (H-2') e 6,87 (H-6') ppm (para ambos, **13a** e **13b**) (Figura 4.59). Até este ponto, os sinais duplicados de H-2 para cada par epimérico puderam ser claramente identificados. Adicionalmente, experimentos *g*COSY (Figura 4.64) e TOCSY 1D mostraram correlações que levaram à completa atribuição dos hidrogênios do anel B dos pares epiméricos **12a/12b** e **13a/13b** (Tabelas 4.17 e 4.18).

Como o coeficiente de extinção molar ϵ dos epímeros são iguais (os espectros UV obtidos durante análises CLAE-DAD foram idênticos para cada par epimérico, com λ_{max} em 286, 361 nm para **12a** e **12b** e em 287, 362 nm para **13a** e **13b**), o sinal mais intenso de H-2 no espectro de RMN de ^1H (Figura 5.54A) pôde ser associado à substância que apresentou a mais intensa banda durante análise CLAE-DAD-DC, com $t_{\text{R}} = 62$ minutos (Figura 4.56A e 4.56B), ou seja, ao isômero (2S)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O-glicopiranosilflavanona (**12a**). Para este isômero, a orientação pseudo-equatorial (α) da ligação C2-C1' conduz à conformação favorecida termodinamicamente (CLARK-LEWIS, 1968; GAFFIELD, 1970; SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005). Então, a orientação pseudo-axial de H-2 (5,29 ppm), o qual acopla com os sinais em 2,77 e 3,14 ppm, conforme evidenciado em experimento gCOSY (Figura 4.64), e a sua maior constante de acoplamento ($J_{2,3}$) com o hidrogênio em 3,14 ppm, definiram este sinal como sendo de $\text{H}_{\text{ax-3}}$ (CLARK-LEWIS, 1968; SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005). Portanto, o sinal em 2,77 ppm foi atribuído a $\text{H}_{\text{eq-3}}$ de **12a**. Isto foi confirmado por NOESY 1D irradiando-se em 6,95 ppm (H-2' de **12a** e **12b**), onde observou-se a sua correlação espacial com o sinal em 3,14 ppm ($\text{H}_{\text{ax-3}}$) devido à sua orientação α e proximidade a H-2' (Figura 4.58). O espectro TOCSY 1D (Figura 4.61), obtido pela irradiação dos sinais sobrepostos em 5,28/5,29 ppm (H-2 de **12a** e **12b**), revelou correlações com $\text{H}_{\text{ax-3}}$ e $\text{H}_{\text{eq-3}}$, em concordância com as atribuições indicadas acima. Reciprocamente, as correlações remanescentes deste espectro, somadas àquelas observadas em experimento NOESY 1D (Figura 4.58) irradiando-se em 5,28/5,29 ppm (H-2), que mostraram correlações espaciais mais intensas com o sinal a 2,76 ppm, permitiram a sua atribuição a $\text{H}_{\text{eq-3}}$ da substância **12b**, e, então, do sinal em 3,14 ppm a $\text{H}_{\text{ax-3}}$ da mesma substância. A maior constante de acoplamento ($J_{2,3\text{ax}} = 13,0$ Hz) entre H-2 e $\text{H}_{\text{ax-3}}$ corroborou cada atribuição, já que a ligação C2-C1', em β , assume posição pseudo-equatorial na conformação mais estável de **12b**.

Os mesmos passos descritos para **12a** e **12b** foram seguidos para se atribuir os sinais dos epímeros 3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavona (**13a** e **13b**). O espectro gCOSY (Figura 4.64) evidenciou acoplamento do hidrogênio em 99999 ppm com aqueles em 3,19 e 2,85 ppm, enquanto que aquele em 5,37 ppm acoplou com os sinais em 3,18 e 2,83 ppm. Dois grupos de sinais foram claramente definidos (Tabela 18), mas a razão de aproximadamente 1:1 entre **13a** e **13b** (Fig. 4.56A) não

permitiu as suas associações a cada um em particular. Análises adicionais em espectro TOCSY 1D, obtido pela irradiação nos sinais sobrepostos em 5,37/5,39 ppm (H-2 de ambos, **13a** e **13b**), evidenciaram acoplamentos com os duplos dubletos sobrepostos em 3,16-3,22 e em 2,81-2,87 ppm, correspondentes a H-3a e H-3b, respectivamente. Adicionalmente, o experimento NOESY 1D, com irradiação nos mesmos sinais para H-2, além de acoplamentos com os hidrogênios H-2' e H-6', como mencionado anteriormente, mostrou também correlação espacial com os duplos dubletos em 2,85 e 2,83 ppm, evidenciando suas orientações pseudo-equatoriais (H_{eq-3}) para ambos, **13a** e **13b**. Por outro lado, o experimento NOESY 1D, irradiando-se em 7,00 ppm (H-2' de **13a** e de **13b**), mostrou correlação espacial com os duplos dubletos em 3,18 e 3,19 ppm, que foram atribuídos a H_{ax-3} de ambos os diastereoisômeros. O sinal em 4,97 ppm, em CD_3OD , foi irradiado em experimento TOCSY 1D e o espectro obtido mostrou-se típico de glicoses terminais (Figura 4.62).

Análises dos dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.63 e Tabelas 4.17 e 4.18) indicaram um padrão tetraoxigenado para o anel A das substâncias **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, com uma hidroxila adicional em C-6 ou C-8. Os experimentos *g*HSQC e *g*HMBC em $DMSO-d_6$ (Figura 4.65) e em CD_3OD (Figura 4.66) definiram os padrões de substituição dos anéis A, B (com o grupo catecol) e C de cada par epimérico. A presença de sinais característicos em 11,80 (**12a** e **12b**) e 11,64 ppm (**13a** e **13b**), no espectro de RMN de 1H obtido em $DMSO-d_6$, evidenciou grupos hidroxilas em C-5 para ambos os pares epiméricos, confirmado para **12a** e **12b** pela correlação do sinal de H em 11,80 ppm com o sinal em 149,1 ppm (C-5, em $DMSO-d_6$, ou 150,7 ppm em CD_3OD), pelo experimento *g*HMBC (em $DMSO-d_6$) mostrado na Figura 4.65. No mesmo experimento, a ausência da correlação entre este carbono (C-5) com o sinal de 1H em 6,30 ppm sugeriu a presença de um grupo hidroxila em C-6 e permitiu a atribuição deste sinal a H-8. Adicionalmente, as correlações de H-8 e do hidrogênio anomérico H-1" (4,89 ppm) com C-7 (153,1 ppm) evidenciaram a ligação da unidade glicosídica a C-7 nas flavanonas **12a** e **12b** e definiram o padrão de substituição no anel A (Figura 4.57). Por outro lado, a observação de correlações entre os sinais em 11,64 ppm (OH-5) e 6,30 ppm (H-6) com sinal em 154,9 ppm (C-5); e dos sinais em 6,30 (H-6) e em 4,87 (H-1") com o sinal em 153,1 ppm (C-7) evidenciaram um grupo hidroxila em C-8 e definiram o

padrão de substituição no anel A de **13a** e **13b**. As correlações mais importantes obtidas pelos experimentos gHMBC em DMSO- d_6 e CD₃OD estão representadas na Figura 4.57, a seguir.

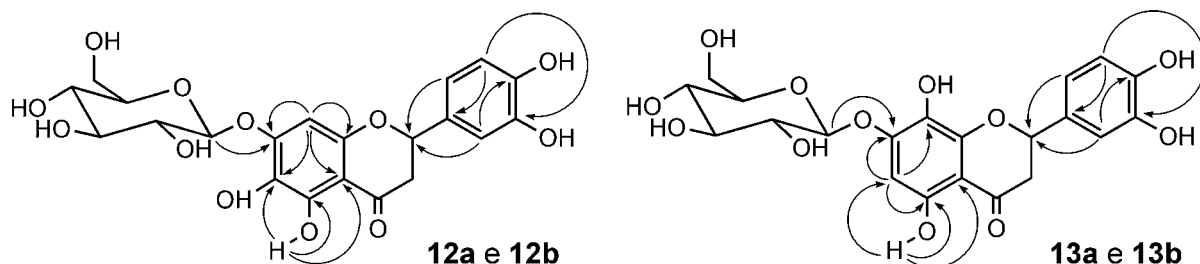


Figura 4.57 - Correlações observadas nos espectros de gHMBC em CD₃OD e em DMSO- d_6 para a mistura dos isômeros 2S e 2R-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O-β-glicopiranosilflavanona (**12a** e **12b**) e 2S e 2R-5,8,3',4'-tetraidroxi-7-O-β-glicopiranosilflavanona (**13a** e **13b**)

Os dados de RMN de ^{13}C para o anel A de **12a** e **12b** estão de acordo com aqueles relatados para a substância (2S)-5,6,7-tridroxi-7-O-β-glicosilpiranosilflavanona (LIU; DIXON; MABRY, 1993).

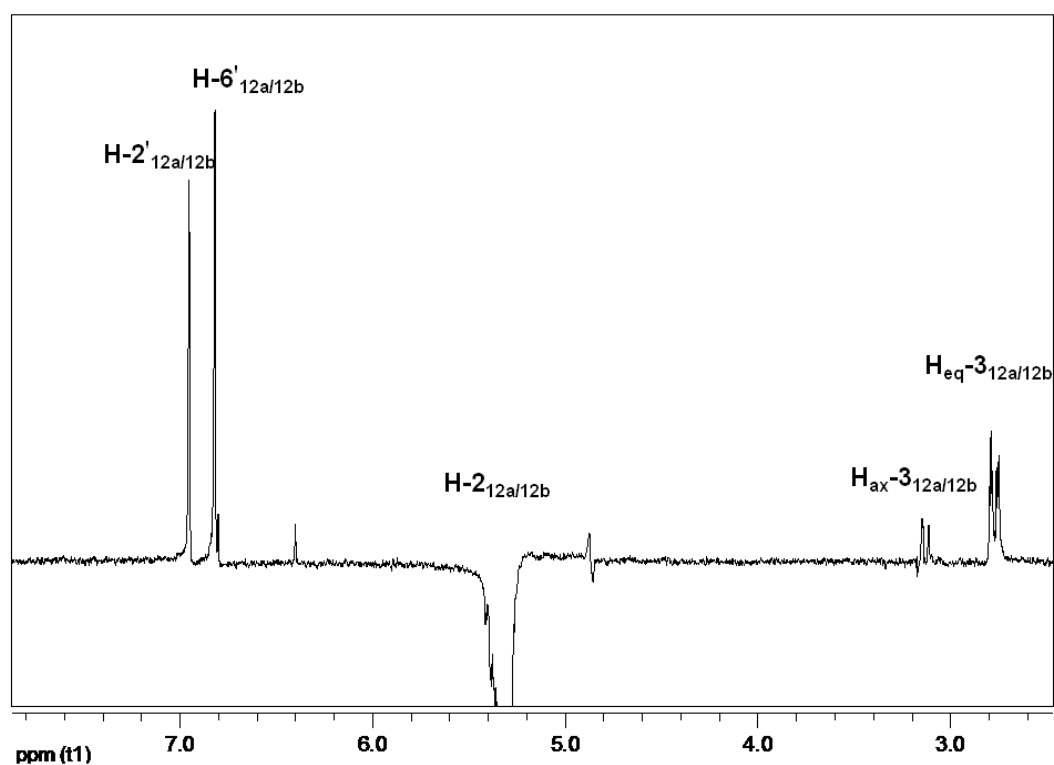


Figura 4.58 - Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 5,28/5,29 ppm (H-2 de **12a/12b**) (11,7 T; CD₃OD)

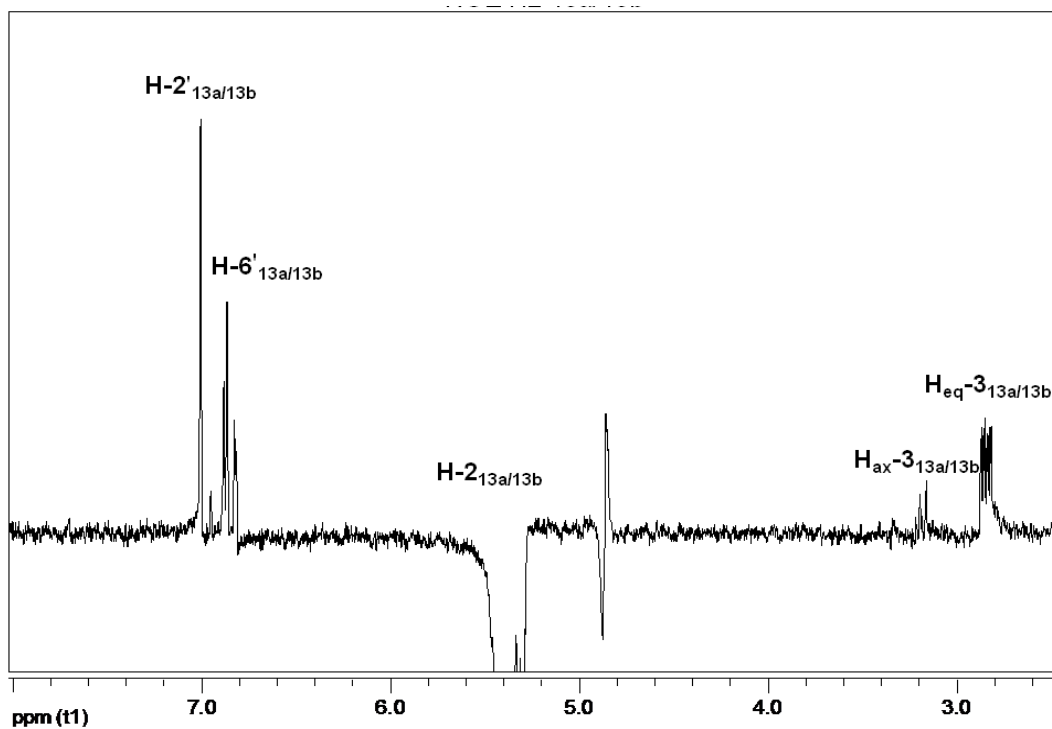


Figura 4.59 - Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 5,37/5,39 ppm (H-2 de **13a/13b**) (11,7 T; CD₃OD)

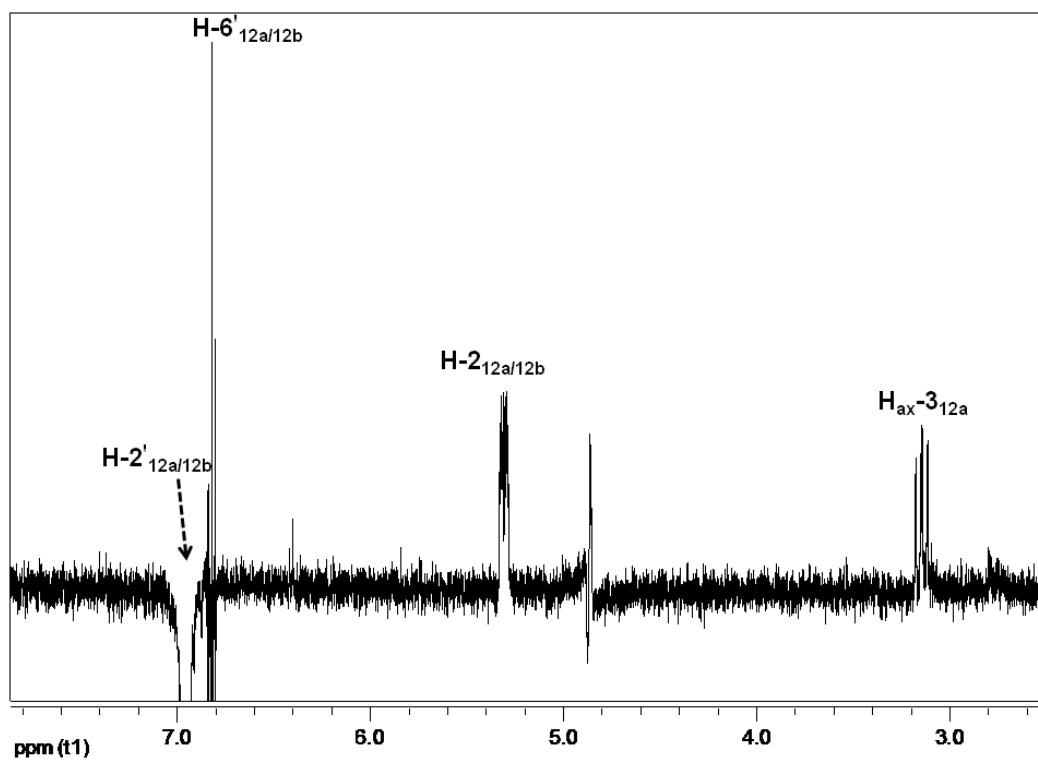


Figura 4.60 - Experimento NOESY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 6,95 ppm (H-2' de **12a/12b**) (11,7 T; CD₃OD)

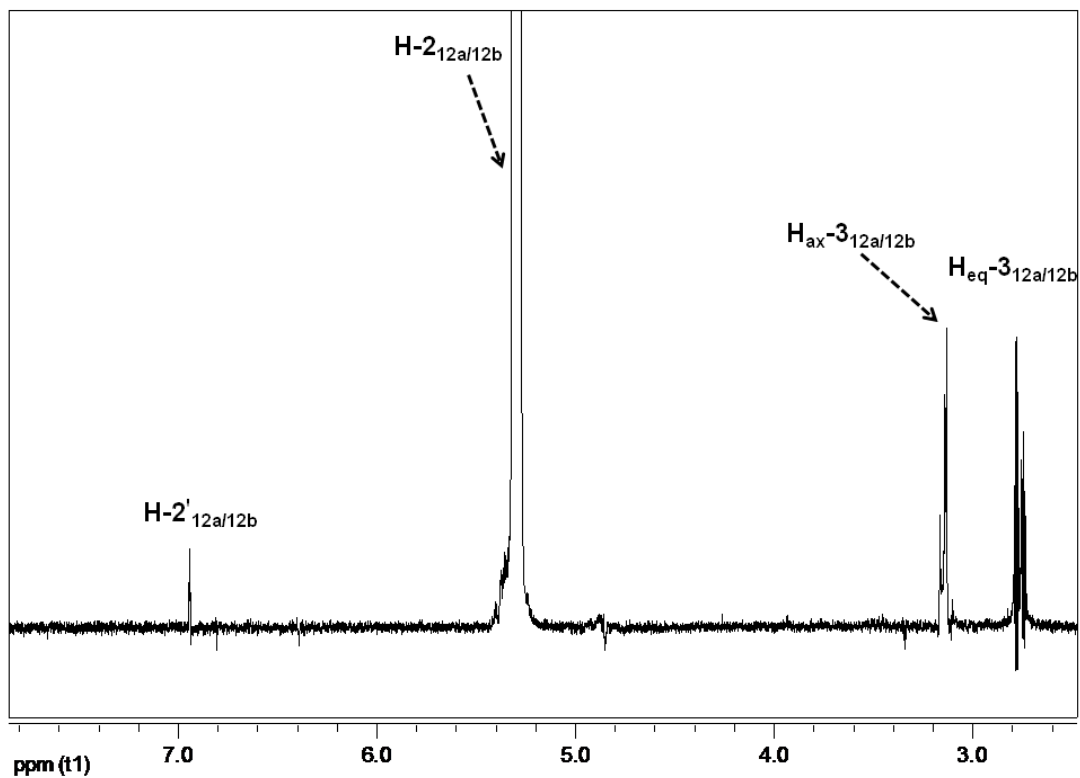


Figura 4.61 - Experimento TOCSY 1D a partir de G3, irradiando-se em 5,28/5,29 ppm (H-2 de 12a/12b) (11,7 T; CD₃OD)

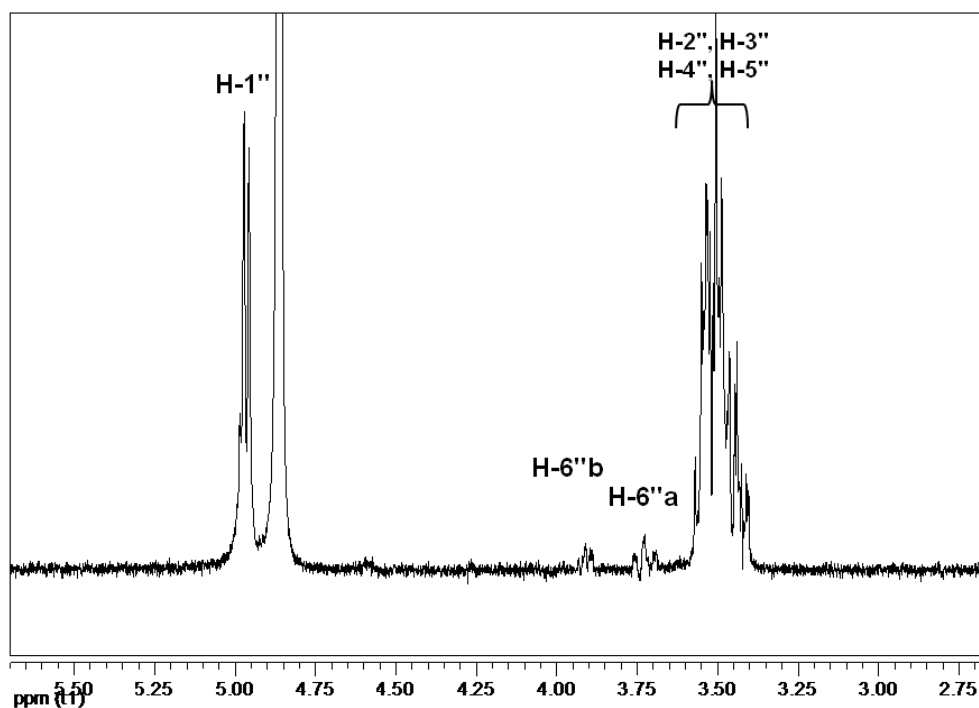


Figura 4.62 - Experimento TOCSY 1D para a amostra G3, irradiando-se em 4,97 ppm (H1'' de 12a/12b e 13a/13b) (11,7 T; CD₃OD)

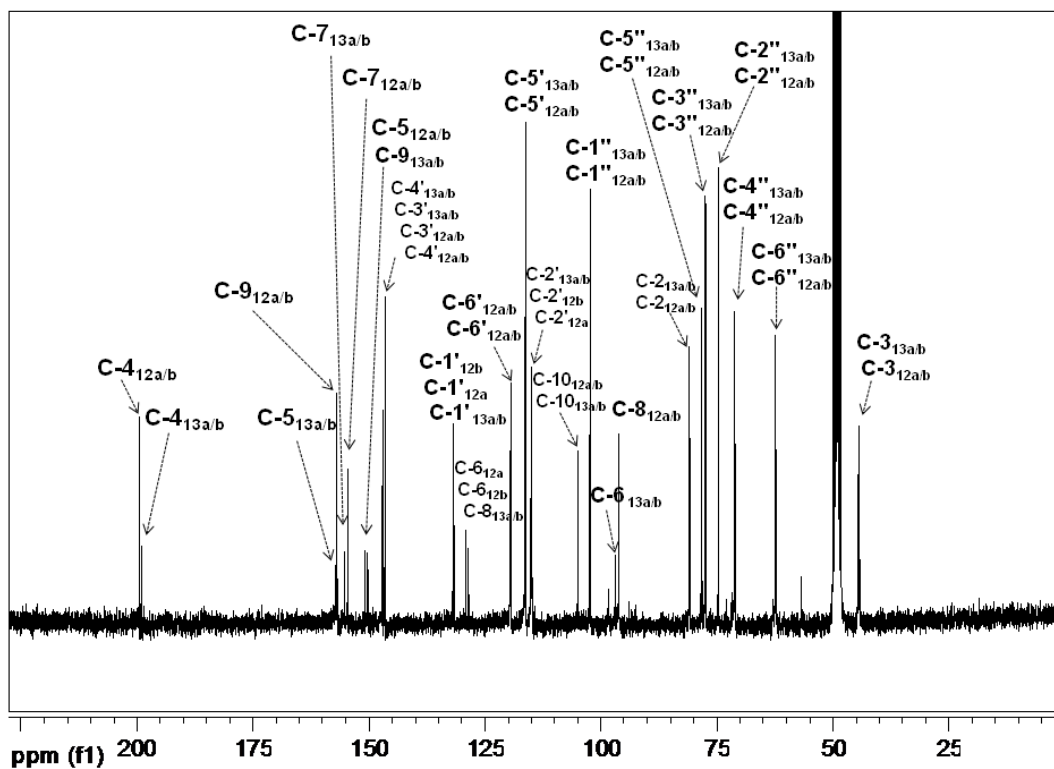


Figura 4.63 - Espectro de RMN de ^{13}C , obtido a partir da amostra G3 (500 MHz, CD_3OD)

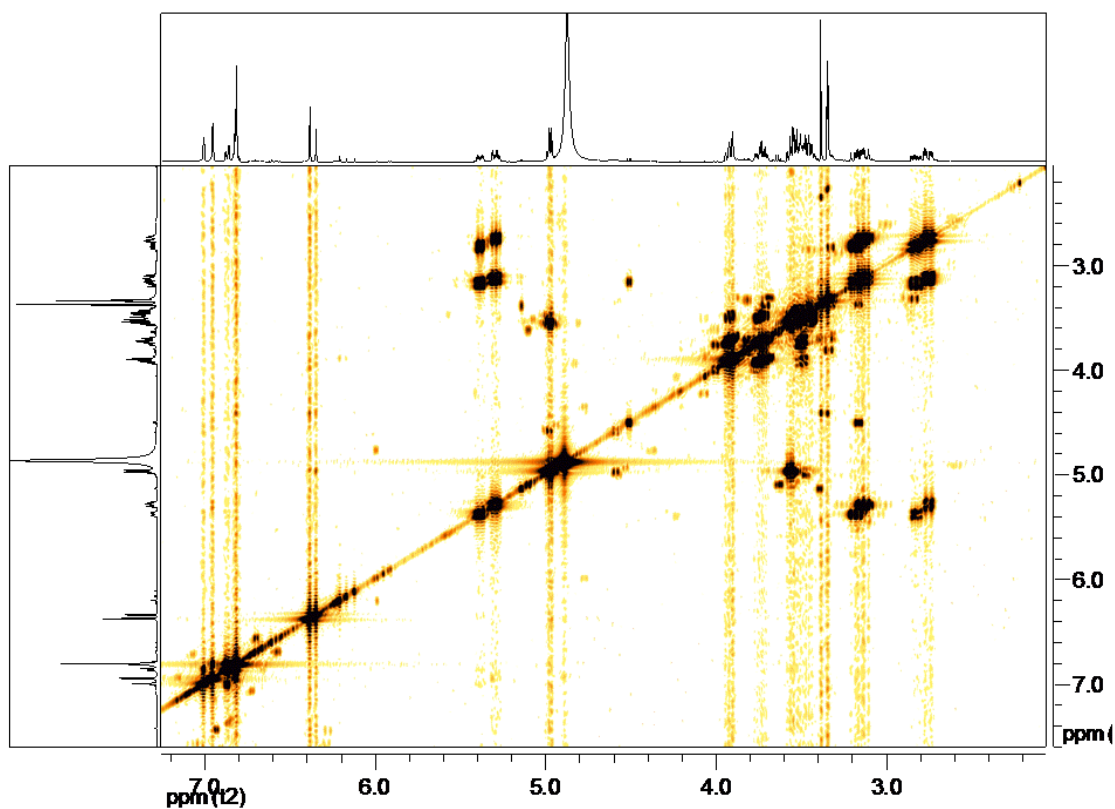


Figura 4.64 - Experimento gCOSY para a amostra G3 (11,7 T; CD_3OD)

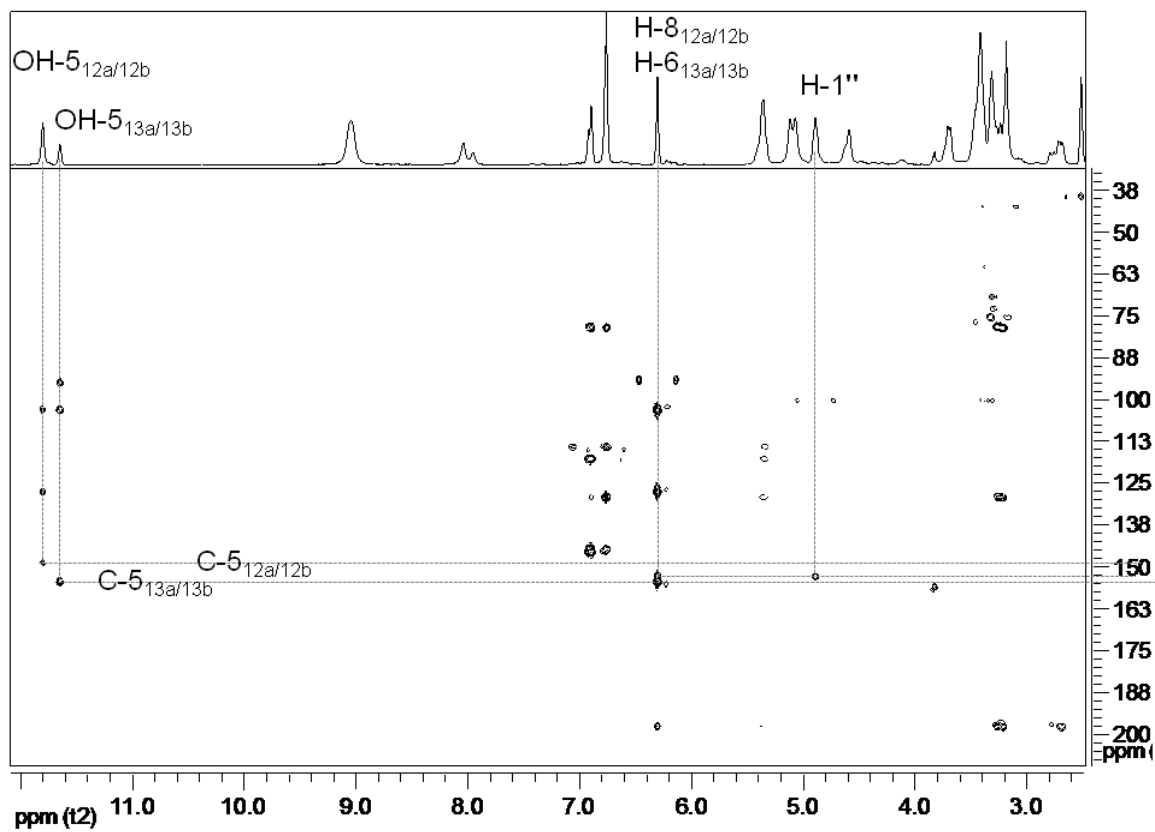


Figura 4.65 - Mapa de contornos gHMBC em DMSO- d_6 para a amostra G3 (11,7 T)

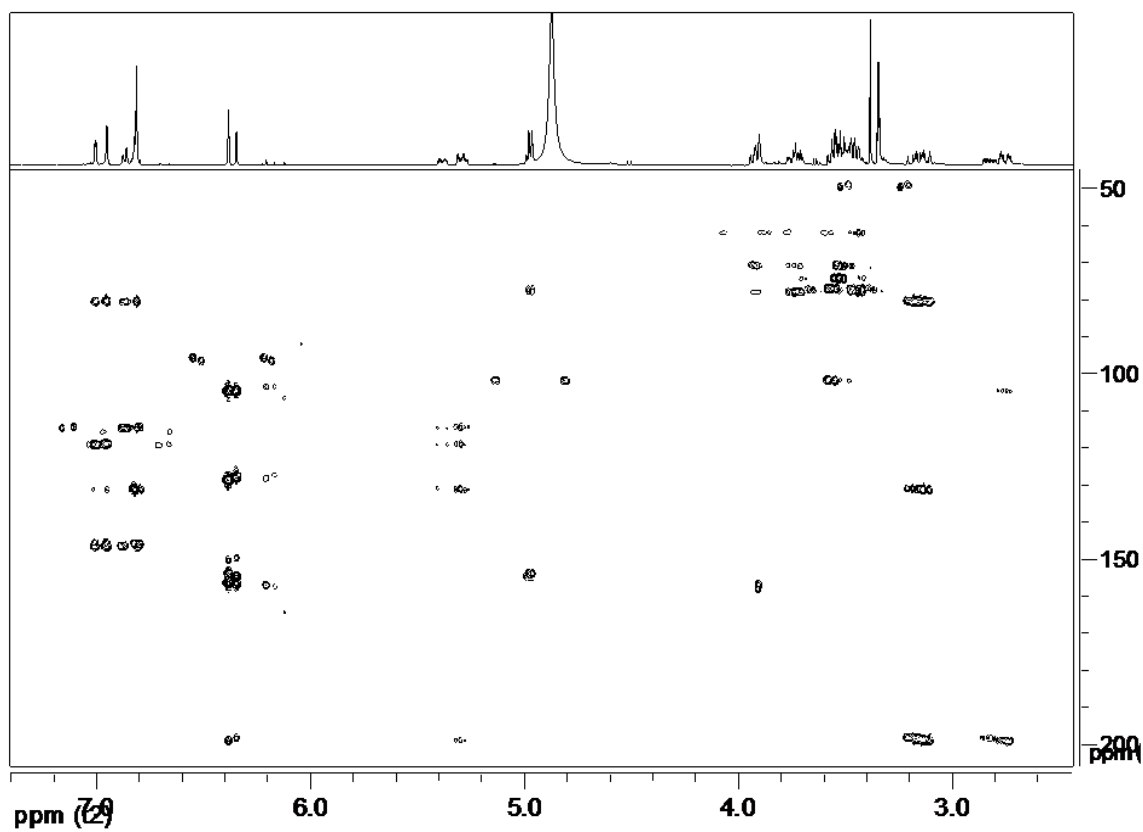


Figura 4.66 - Mapa de contornos gHMBC em CD₃OD para a amostra G3 (11,7 T)

Corroborando os dados de RMN, análises UHPLC-ESI-TOF-MS, em modo negativo, desenvolvidas imediatamente após a coleta de cada banda (Figura 4.70, subseção 4.7.3), permitiram propor a mesma fórmula molecular $C_{21}O_{12}H_{22}$ aos isômeros **12a**, **12b**, **14a** e **13b**, constituintes da amostra G3. Análises dos espectros de massas, em modo negativo, obtidos por ESI-IT-MS em injeção de fluxo, para G3, também estão de acordo com os resultados apresentados, mostrando um pico pronunciado correspondente ao íon m/z 465 $[M-H]^-$. O estudo do padrão de fragmentação ESI-MSⁿ deste íon permitiu confirmar as atribuições realizadas por RMN e contribuiu para a elucidação das moléculas. A observação do espectro ESI-MSMS, em modo negativo, do íon m/z 303 $[(M-H)-162]^-$ evidenciou a perda de uma hexose, enquanto que a análise da fragmentação ESIMS3 deste íon $[(M-H)-162]^-$ trouxe informações sobre a natureza da porção aglicona: o íon m/z 285 gerado é produto da perda de uma molécula de água, enquanto que aquele em m/z 167 diagnosticou uma fragmentação pelo mecanismo ^{1,3}A-Retro-Diels-Alder (RDA). Já o íon menos abundante, com m/z 193, foi associado à perda neutra do anel B como catecol. Para a maioria dos sinais, os espectros de RMN obtidos em CD₃OD mostraram resoluções muito superiores às aquelas obtidas em DMSO-*d*₆. Assim, as Tabelas 4.17 e 4.18 trazem os valores adquiridos em CD₃OD, enquanto que os valores obtidos em DMSO-*d*₆ são apresentados ao final desta subseção, já que foram importantes para as atribuições dos sinais do anel A das substâncias **12a**, **12b**, **13a** e **13b**.

Biogeneticamente, as flavanonas são formadas pela ciclização de chalconas mediada pela enzima chalcona isomerase (CHI) em uma preferência aparente de 100.000:1 para a síntese de isômeros 2S em relação aos isômeros com configuração 2R (JEZ et al., 2000). Um ataque nucleofílico de Michael do grupo 2'-OH à cetona α,β -insaturada da chalcona leva à flavanona 2S. Etapas de glicosilação subsequentes, catalisadas por glicosiltransferases, formam as flavanonas glicosiladas (CACCAMESE; CHILLEMI, 2010). Por outro lado, os recentes avanços nas tecnologias analíticas, usadas para a reavaliação de estruturas de produtos naturais anteriormente descritas, levaram à descoberta de estereoformas naturais (MALTESE et al., 2009). Gaffield et al. (1975) empregaram RMN de ¹H como apoio para medidas de dicroísmo circular, visando estimar a composição isomérica de naringina em toranjas em diferentes estágios de maturação. Este estudo levou os

autores a concluírem que a isoforma 2*S* de naringina em toranjas, a forma principal presente nestas frutas prematuras, sofreu racemização em frutas maduras. Ainda de acordo com os autores, uma possível explicação para a diastereomerização de flavanonas poderia estar na abertura do anel C das mesmas, em condições básicas ou neutras. Caccamese et al. (2003) também encontraram variações nas razões entre naringina 2*S* e 2*R* em função de estágio de maturação de toranjas. Estas conversões poderiam levar à formação das chalconas correspondentes como intermediárias. Como as 2'-OH chalconas são instáveis, estas têm a tendência de rapidamente reciclar a flavanonas de uma forma não estereoespecífica (MILES; MAIN, 1989). Alguns estudos com cítricos revelaram que as flavanonas e as flavanonas 7-*O*-glicosiladas, biossintetizadas de forma estereoespecífica e estocadas nas vesículas dos frutos, durante a maturação sofrem epimerização não enzimática em C-2, via abertura do anel C, levando a um equilíbrio de ambos os estereoisômeros, em diferentes razões e dependendo do grau de maturação da fruta (CACCAMESE et al., 2003; CACCAMESE et al., 2010; GAFFIELD et al., 1975; GELMORETO et al., 2001; MALTESE et al., 2009). Gaffield (1970) relatou a natureza crítica do substituinte na posição 4' por meio de análises de dicroísmo circular de flavanonas glicosiladas e propôs que 4'-hidroxiflavanonas contendo um grupo 7-OH bloqueado deveriam ser muito suscetíveis a racemização. Wistuba et al. (2006) demonstraram a racemização não enzimática em C-2, utilizando eletroforese capilar, para algumas flavanonas e flavanonas glicosiladas quando mantidas a altos pHs e temperaturas. Observaram que todas as flavanonas ou flavanonas 7-*O*-glicosiladas investigadas, e que demonstraram enantiomerização ou epimerização, possuíam um grupo hidroxila ligado a C-4'. Adicionalmente, observaram a maior barreira de epimerização, entre todas as substâncias investigadas, para a neoesperidina, a qual possui um grupo metoxila ligado a C4', e que meios com pHs mais altos diminuem a barreira de epimerização/enantiomerização. Ainda, que o homoeriodictiol, o qual possui uma metoxila adicional em C-3', mostrou menor barreira energética para a racemização em relação à naringenina. No trabalho ora apresentado, descreve-se interconversões isoméricas entre todas as flavanonas 7-*O*-glicosiladas, com grupos hidroxilas em C-3', C-4' , C-5, além de uma hidroxila adicional em C-6 (**12a** e **12b**) ou em C-8 (**13a** e **13b**).

Além da epimerização discutida no parágrafo anterior, em C-2, isomerizações constitucionais, nas quais **12a** ou **12b** interconvertem-se parcialmente em **13a** ou **13b** e vice-versa, foram observadas durante procedimentos analíticos para purificação e elucidação de cada substância. Estas interconversões poderiam também ser resultado da abertura do anel C de **12a**, **12b**, **13a** ou **13b**, já que a ligação σ entre C=O e C1' presente nas chalconas glicosiladas intermediárias poderiam experimentar uma rotação de 180° , seguida de reciclagem do anel C. Assim, como proposta na Figura 4.67, uma reciclagem não-estereoespecífica com ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-2' (partindo-se de **12a** ou **12b**) ou em C-6' (partindo-se de **13a** ou **13b**) à cetona α,β -insaturada da chalcona intermediária poderia levar a ambos (2R e 2S) os isômeros constitucionais, além do epímero de cada flavanona glicosilada. Os trabalhos acessados na literatura relataram interconversões em flavanonas substituídas em 5-OH, mas não substituídas em C-6 ou C-8, levando a chalconas intermediárias com anel B simétricos e, assim, possibilitando a existência de apenas 2 isômeros (epímeros) (CACCAMESE et al., 2003; CACCAMESE et al., 2010; GAFFIELD, 1970; GAFFIELD et al., 1975; GELMORETO et al., 2001; MALTESE et al., 2009; WISTUBA et al., 2006).

Além disso, o grupo hidroxila adicional em C-3' do anel B das flavanonas (catecol) deve ter contribuído para baixar a barreira energética de interconversão, como demonstrado previamente para 4'-hidroxiflavanonas por Wistuba et al. (2006), o que foi evidenciado pela rápida formação dos outros três isômeros a partir da injeção de qualquer um deles, conforme demonstrado nos experimentos por CLAE-DAD (Figura 4.55) e, depois, por UHPLC-ESI-TOF-MS (Figuras 4.71 e 4.72), ainda que mantidos em condições brandas.

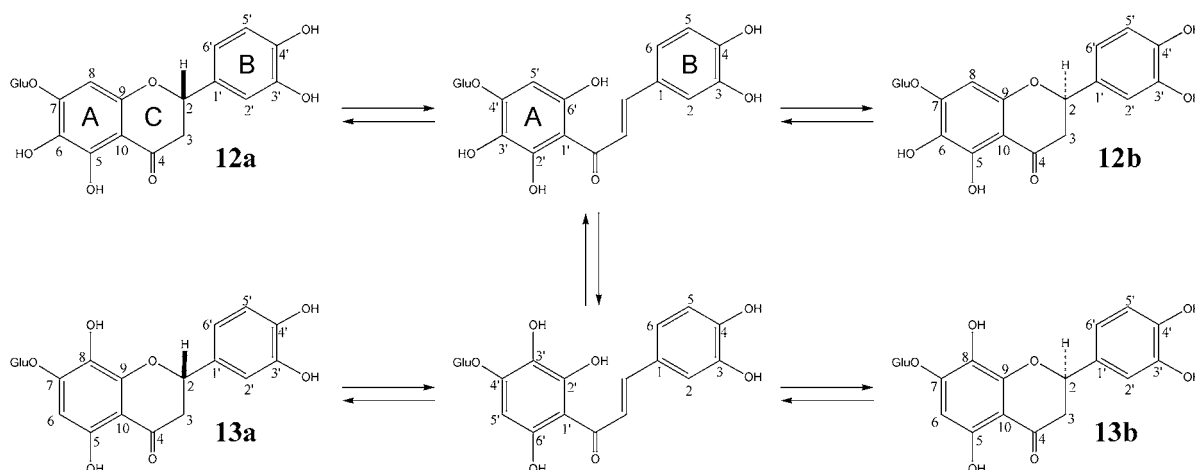


Figura 4.67 - Interconversões não enzimáticas entre **12a**, **12b**, **13a** e **13b** via abertura/reciclagem do anel C

Dados espectrométricos adicionais

Dados dos espectros de dicroísmo circular (DC) e de ultra-violeta (UV) para cada um dos quatro isômeros, **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, foram obtidas por CLAE-DAD-DC e estão informados no texto e/ou na Figura 4.56. As análises por ESI-IT-MS e ESI-IT-MSⁿ foram desenvolvidas a partir da mistura dos isômeros (fração G3). ESI-IT-MS m/z 465 [M-H]⁻ (100); ESI-IT-MS/MS (energia de colisão de 30%) m/z 465 [M-H]⁻ (5), 447 [(M-H)-H₂O]⁻ (28) e 303 [(M-H)-162]⁻ (100); ESI-IT-MS³ de m/z 303: m/z 285 [(M-H)-162-H₂O]⁻ (100), 193 [(M-H)-162-B]⁻ (2), 167 [(M-H)-162-^{1,3}B]⁻ (60).

(2S) e (2R)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O-β-glicopiranosil-flavanona (**12a** e **12b**): HRESITOFMS: m/z 465,1033 [M-H]⁻ e m/z 465,1022 [M-H]⁻ (calculado para C₂₁O₁₂H₂₂ - H 465,1033), respectivamente. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C (11,7 T; CD₃OD): Tabela 4.17; Dados de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, TMS, δ ppm): δ: 2,68 (m, H-3a), 3,22 (m, H-3b), 5,35 (sl, H-2), 6,30 (sl, H-8), 6,75 (sl, H-5' and H-6'), 6,89 (sl, H-2'), 11,80 (sl, OH-5) 4,89 (d, J=7 Hz, H-1''), 3,13-3,42 (m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-3b), 3,44 (m, H-6''a), 3,68 (m, H-6''b); Dados de RMN de ¹³C, extraídos dos experimentos gHMBC e gHSQC (11,7 T; DMSO-*d*₆, TMS, δ ppm) δ: 78,2 (C-2), 42,3 (C-3), 198,0 (C-4), 149,1 (C-5), 127,8 (C-6), 153,1 (C-7), 93,8 (C-8), 154,5 (C-9), 103,3 (C-10), 129,3 (C-1'), 113,7 (C-2'), 144,4 (C-3'), 145,9 (C-4'), 114,6 (C-5'), 117,4 (C-6'), 99,9 (C-1''), 72,8 (C-2''), 76,8 (C-3''), 69,3 (C-4''), 75,1 (C-5''), 60,4 (C-6'').

(2S) e (2R)- 3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**13a** e **13b**): HRESITOFMS: m/z 465,1029 [M-H]⁻ e m/z 465,1023 [M-H]⁻ (calculado para C₂₁O₁₂H₂₂ – H 465,1033), respectivamente. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C (11,7 T, CD₃OD): Tabela 4.18; Dados de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, TMS, δ ppm): δ : 2,76 (m, H-3a), 5,35 (sl, H-2), 6,30 (sl, H-6), 6,75 (sl, H-5' and H-6'), 6,91 (sl, H-2'), 11,64 (sl, OH-5) 4,87 (d, J=7,3 Hz, H-1''), 3,13-3,42 (m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-3b), 3,44 (m, H-6''a), 3,68 (m, H-6''b); Dados de RMN de ¹³C, extraídos dos experimentos gHMBC e gHSQC (11,7 T, DMSO-*d*₆, TMS, δ ppm): δ : 78,2 (C-2), 42,3 (C-3), 198,0 (C-4), 154,9 (C-5), 93,8 (C-6), 153,1 (C-7), 128,3 (C-8), 103,3 (C-10), 129,3 (C-1'), 113,7 (C-2'), 144,4 (C-3'), 145,9 (C-4'), 114,6 (C-5'), 117,4 (C-6'), 99,9 (C-1''), 72,8 (C-2''), 76,8 (C-3''), 69,3 (C-4''), 75,1 (C-5''), 60,4 (C-6'').

4.7.2 Ocorrência dos isômeros no extrato de origem e em extratos frescos

Após evidenciar-se a presença dos quatro isômeros, **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, na fração G3, obtida por CPG a partir da fração *n*-BuOH (FBu2) do extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs) e, ainda, que qualquer um deles se interconverte parcialmente nos demais quando isolado (subseção 4.7.3), resolveu-se checar a ocorrência ou não dos mesmos no extrato original (EERLs), bem como no extrato de folhas da mesma espécie (EEFLs). A Figura 4.68 mostra os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-DC para estes extratos e para a fração rica nos isômeros (G3).

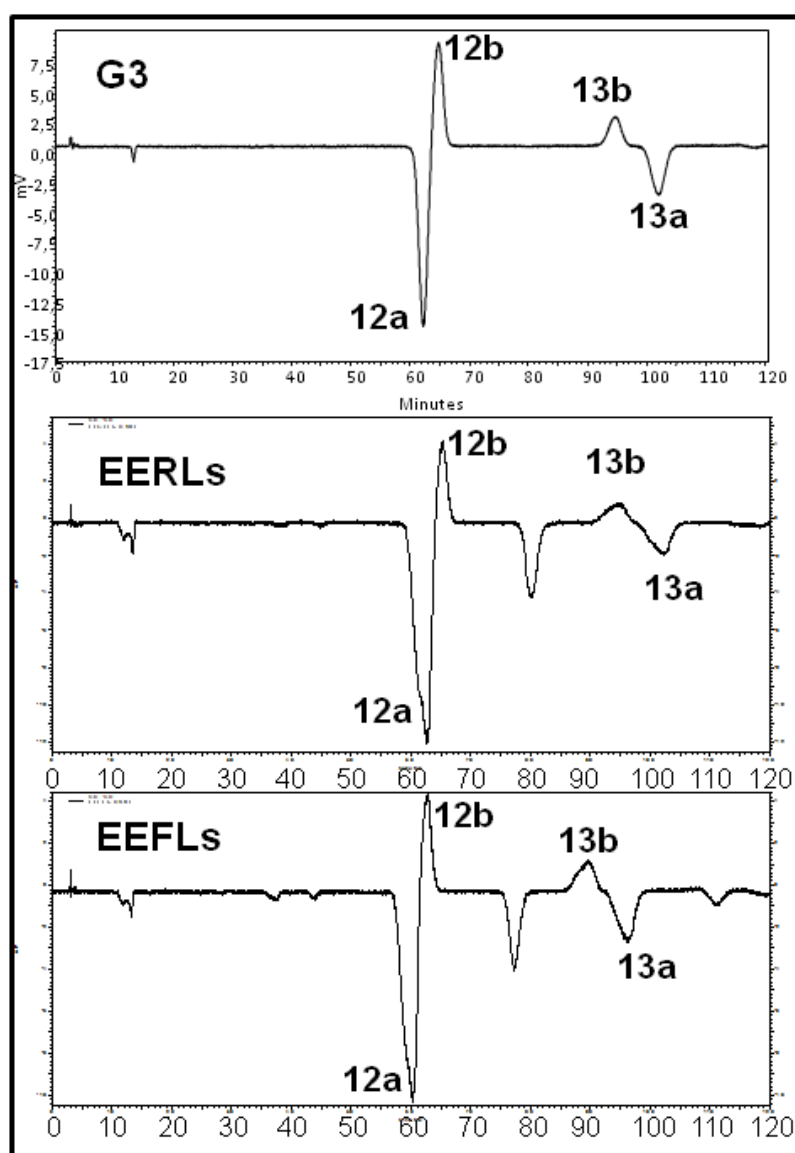


Figura 4.68 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-DC [FE: C18; FM: Água-MeOH 83:17 com 0,1% de TFA (v/v); F: 1,0 mL/min; $\lambda=286$ nm]. Amostras, de cima para baixo: fração G3, EERLs e EEFLs

As análises obtidas por CLAE-DAD-DC (Figura 4.68) a partir dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia* mostraram as mesmas 4 bandas, com efeitos Cotton e tempos de retenção similares aos observados para **12a**, **12b**, **13a** e **13b** (fração G3), evidenciando que as interconversões ocorreram antes dos processos de fracionamentos realizados.

A fim de se verificar se os processos de secagem e moagem do material vegetal, de concentração dos extratos ou, ainda, se o tempo de armazenamento do material vegetal ou extratos concentrados levaram a interconversões a partir de apenas um isômero contido na planta viva, nova coleta de folhas e ramos de *L. salviaefolia* foi realizada. Imediatamente após cada coleta, no próprio campo, cada amostragem foi submersa em etanol, em frasco encapado com papel alumínio e mantido à sombra. Paralelamente, em função de a literatura relatar a racemização de flavanonas ou flavanonas glicosiladas quando mantidas em pHs altos ou sob temperaturas elevadas, conforme discutido na subseção 4.7.1, uma amostragem de folhas e outra de ramos também foram imediatamente submersas em etanol acidificado com 0,1% de TFA (v/v) (pH ~ 2,5). Novas análises CLAE-DAD-DC foram desenvolvidas com os extratos fluidos frescos preparados e as quatro bandas correspondentes a **12a**, **12b**, **13a** e **13b** foram observadas nos em todos eles (Figura 4.69).

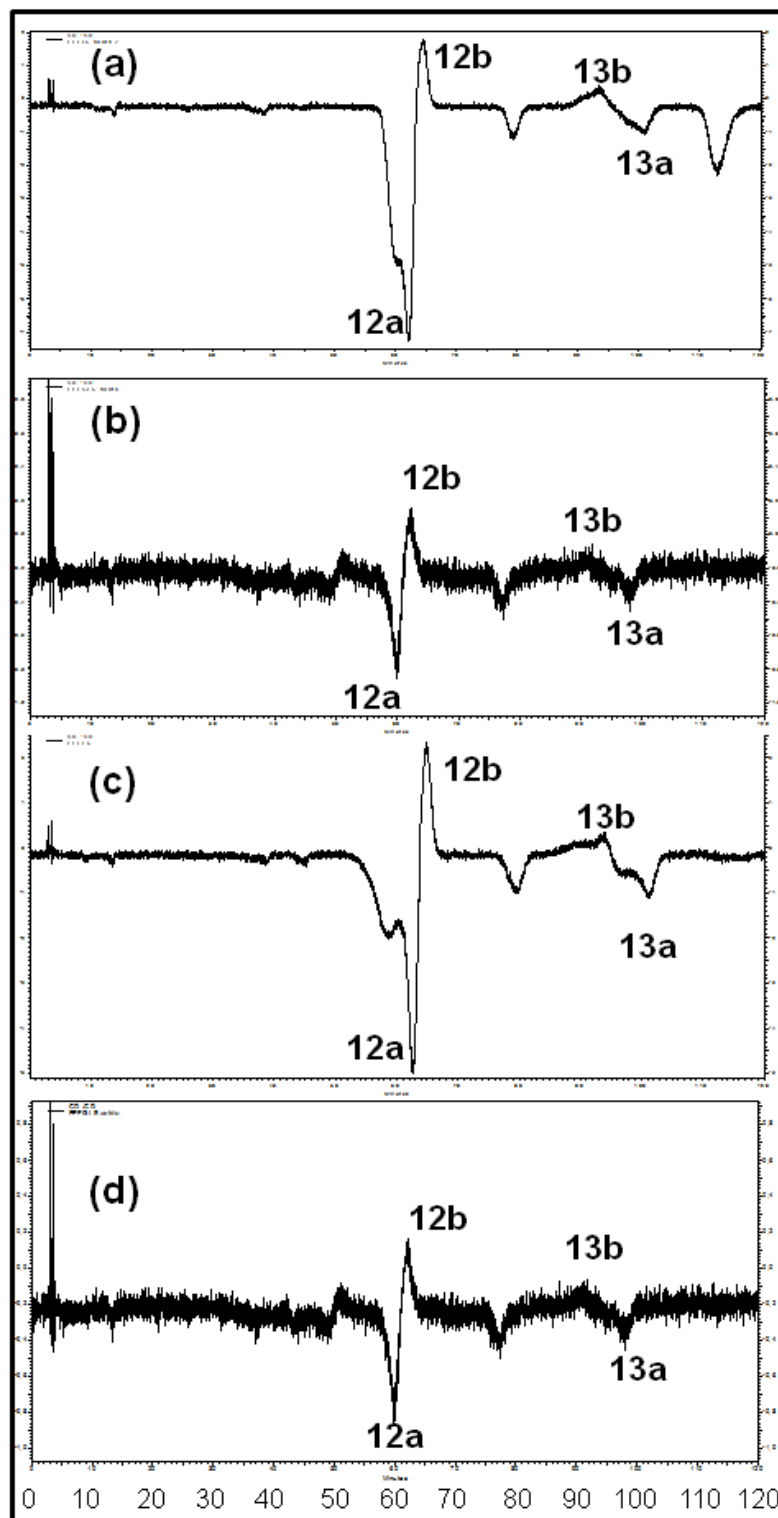


Figura 4.69 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-DC [FE: C18; FM: Água-MeOH 83:17 com 0,1% de TFA (v/v); F: 1,0 mL/min; $\lambda=286$ nm]. Amostras, de cima para baixo: extratos frescos de folhas (a) e de ramos (b) de *L. salviaefolia*, extraídos em EtOH acidificado com 0,1% de TFA (v/v) (pH ~ 2,5), e de folhas (c) e de ramos (d) extraídos em EtOH (pH ~ 6)

4.7.3 Estudo de interconversões entre isômeros por UHPLC-ESI-TOF-MS

Cada um dos quatro isômeros, **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, teve a sua estabilidade, a 25 °C e ao abrigo da luz, monitorada por um período de 24 horas, em meio acidificado com TFA (pH ~ 2,5 - correspondente à fase móvel utilizada na separação por CLAE-DAD) ou não acidificado (pH ~ 6, correspondente à fase móvel não acidificada utilizada num segundo processo de separação por CLAE-DAD) (subseção 3.2.2.4). Após coleta por CLAE-DAD, cada isômero foi imediatamente analisado por UHPLC-ESI-TOF-MS, em corrida de 12 minutos (desenvolvida de modo a separar os isômeros contidos na fração G3), e em intervalos de 51 minutos. A Figura 4.70 mostra os cromatogramas das primeiras análises realizadas com cada isômero, quando mantido em meio acidificado.

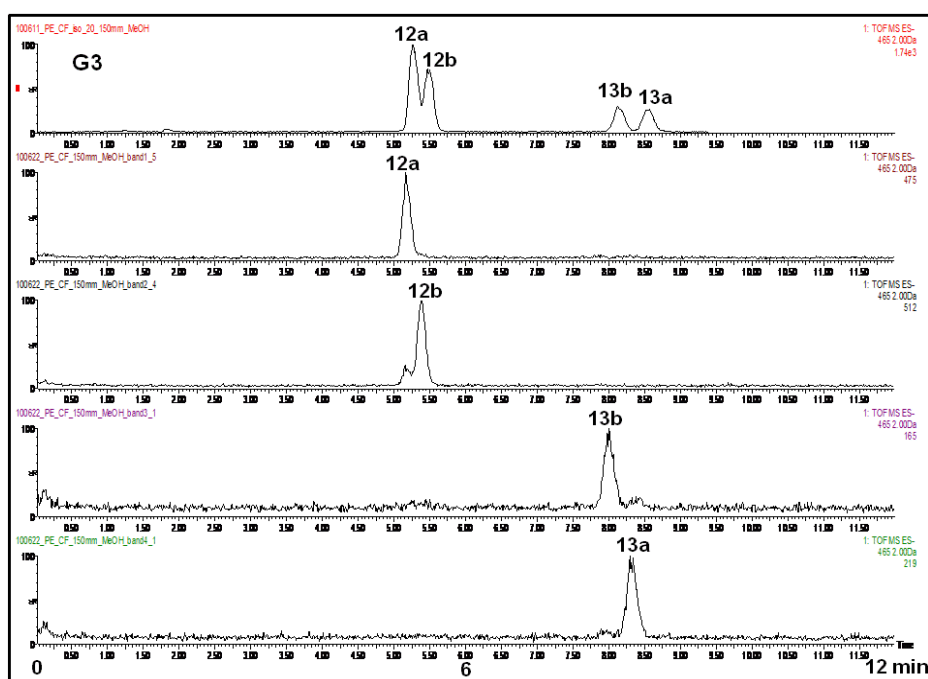


Figura 4.70 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e MeOH (B) 8:2, ambos com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 μ L/min.) para a fração G3, e logo após a coleta de cada isômero, **12a**, **12b**, **13b** e **13a** por CLAE-DAD empregando-se fase móvel acidificada a pH ~ 2,5

As Figuras 4.71 e 4.72, a seguir, mostram as análises obtidas em intervalos selecionados de forma a ilustrar as interconversões ao longo do tempo, em meio acidificado e em meio sem adição de ácido, respectivamente.

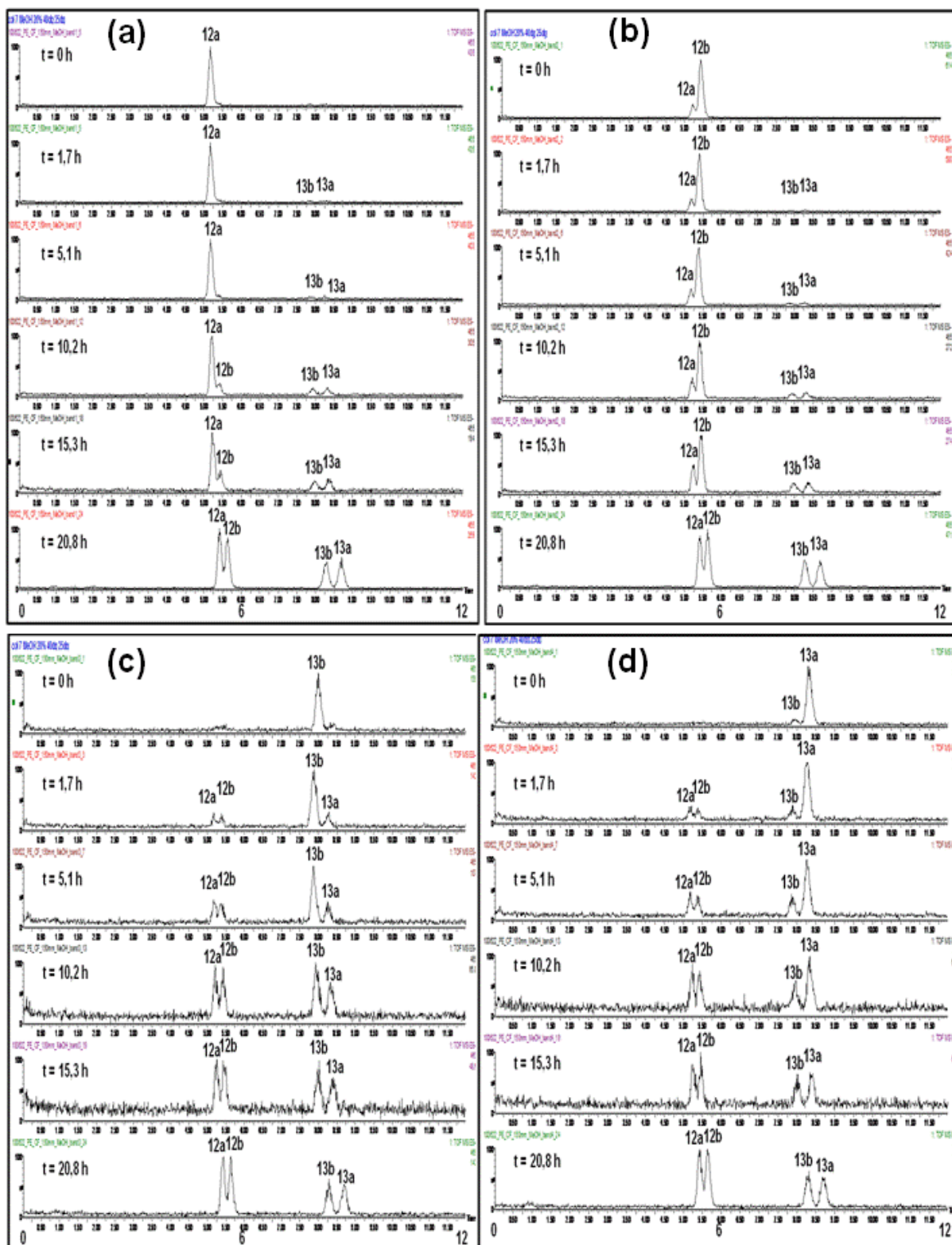


Figura 4.71 - Estudo das estabilidades dos isômeros **12a** (a), **12b** (b), **13b** (c) e **13a** (d), mantidos ao abrigo da luz, a 25 °C e em pH ~ 2,5. Cromatogramas UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2,1 mm, 1,7 µm; FM: H₂O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 µL/min.; Tempo de corrida: 12 min.) obtidos em tempos selecionados, após a coleta de cada substância por CLAE-DAD

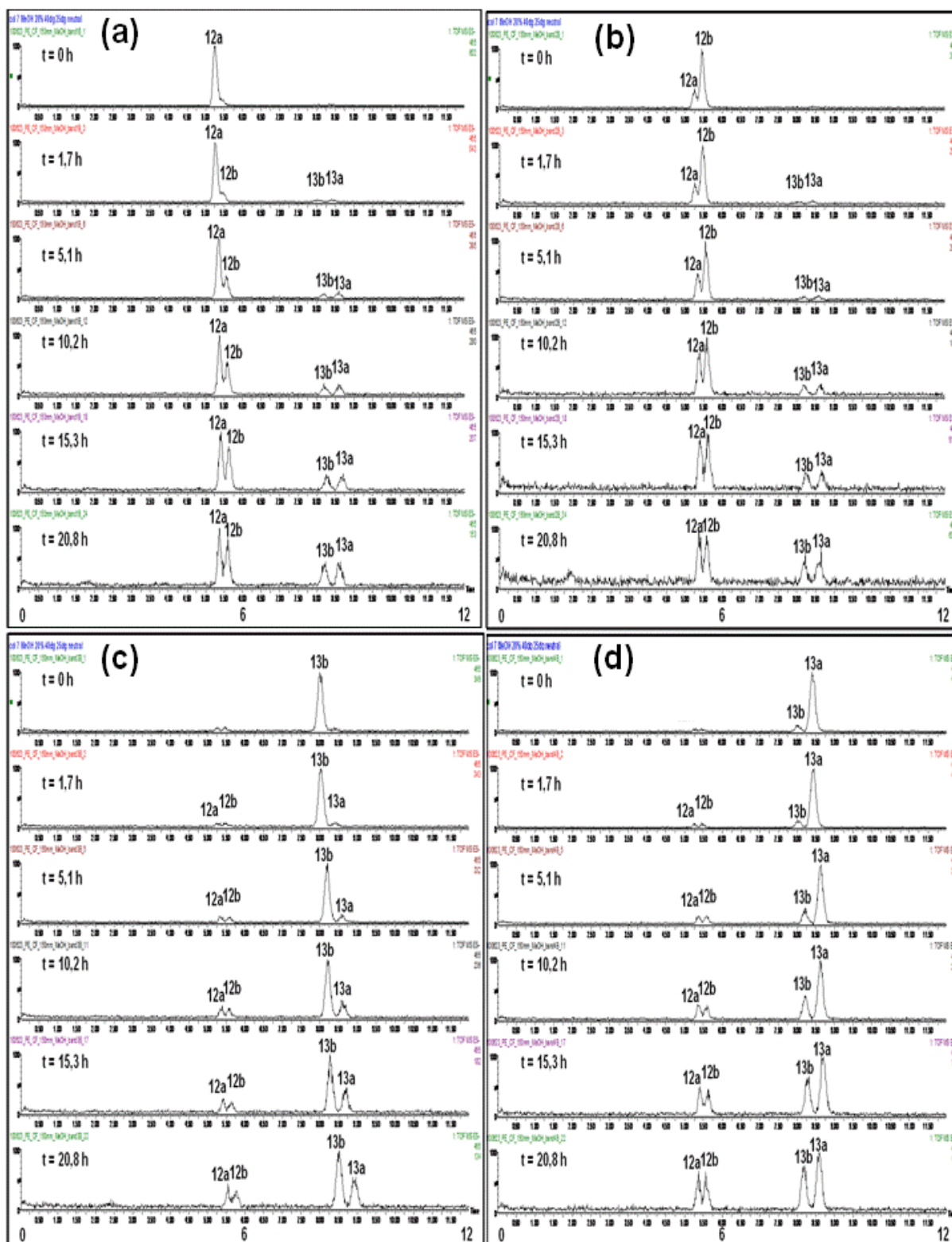


Figura 4.72 - Estudo das estabilidades dos isômeros **12a** (a), **12b** (b), **13b** (c) e **13a** (d), mantidos ao abrigo da luz, a 25 °C e em pH ~ 6. Cromatogramas UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2.1 mm, 1,7 µm; FM: H₂O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% de TFA (v/v); F: 420 µL/min.; Tempo de corrida: 12 min.] obtidos em tempos selecionados, após a coleta de cada substância por CLAE-DAD

Na primeira análise para cada isômero ($t = 0$), em pH $\sim 2,5$ (Figuras 4.70 e 4.71) ou em pH ~ 6 (Figura 4.72), notou-se apenas a presença de uma pequena quantidade do seu par epimérico. Todavia, pode-se tratar de uma contaminação provocada no momento de cada coleta por CLAE-DAD, o que já não seria possível entre isômeros constitucionais, uma vez que as resoluções cromatográficas foram muito maiores entre pares de isômeros desta natureza. Nas análises realizadas 1,7 h após as coletas, já é possível observar a formação de uma pequena quantidade dos isômeros constitucionais de todos os compostos isolados por CLAE-DAD, nos dois pHs analisados (Figura 4.71 e Figura 4.72). Ademais, a interconversão de cada substância em seu respectivo par epimérico (epimerização em C-2), bem como no par de seus isômeros constitucionais, cresceu ao longo do tempo para todas as substâncias, em meio com pH $\sim 2,5$ ou pH ~ 6 . Por exemplo, para a substância **12a** em pH $\sim 2,5$ (Figura 4.71a) ou em pH ~ 6 (Figura 4.72a), nota-se a presença de seu epímero **12b** e de seus isômeros constitucionais, **13a** e **13b**, em pequenas quantidades, 1,7 h após a sua coleta. As porcentagens dos isômeros gerados a partir de **12a** foram aumentando ao longo do tempo. O mesmo foi observado para os outros isômeros: **12b**, **13a**, e **13b**.

A Figura 4.73 mostra os cromatogramas obtidos nas 4 análises realizadas 20,8 h após a coleta de cada isômero, evidenciando proporções relativas semelhantes às observadas na fração G3, da qual foram isolados, sugerindo uma situação de equilíbrio entre eles.

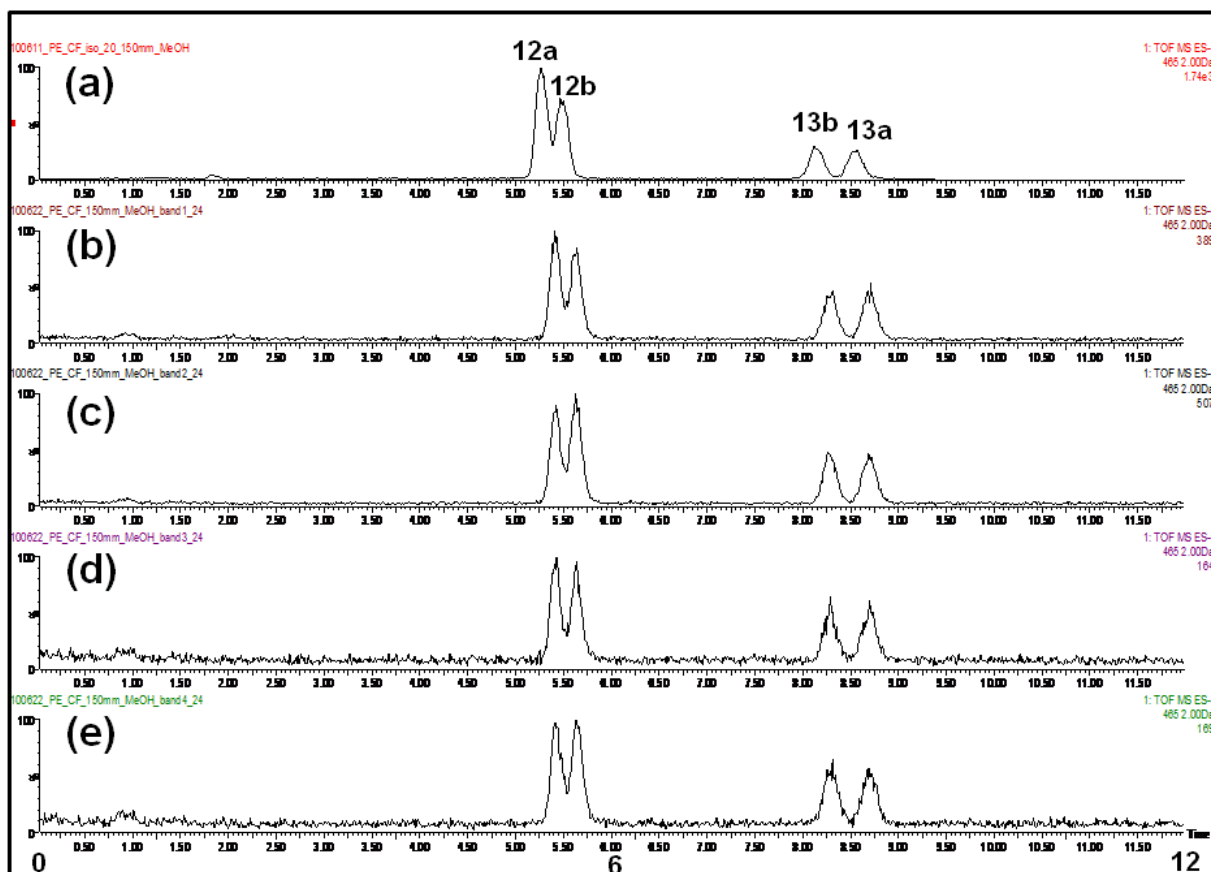


Figura 4.73 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 - 150 x 2.1 mm; 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e MeOH (B) 8:2 com 0,1% TFA (v/v), em 12 min.; F: 420 μ L/min.] para a fração G3 (a) e para cada um dos isômeros **12a** (b), **12b** (c), **13b** (d), **13a** (e), após 20,8 h de sua coleta, mantidos em meio acidificado (pH ~ 2,5)

As análises desenvolvidas por UHPLC-ESI-TOF-MS durante um período de 24 h, a partir de cada um dos isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, mantidos a 25 °C, ao abrigo da luz e em pH ~ 2,5 ou em pH ~ 6, deixaram claro que cada substância, nas condições descritas, interconverte-se parcialmente nos seus 3 isômeros a partir de no máximo 1,7 horas após o seu isolamento. Assim, o pH ~ 2,5 não as estabilizou, sugerindo uma menor barreira energética nas reações de interconversão destas em relação às flavanonas e flavanonas glicosiladas investigadas por outros autores, conforme discutido na subseção 4.7.1.

4.8 ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE 6 ESPÉCIES DE *LIPPIA*

4.8.1 Análises por CLAE-DAD

Inicialmente, os extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *Lippia salviaefolia*, os únicos disponíveis até então, tiveram os seus perfis comparados por CLAE-DAD e CCD, e as suas atividades frente ao β -caroteno observadas, como apresentado na subseção 4.41 (Figuras 4.14 e 4.15).

Numa segunda etapa, já de posse de outras espécies do gênero *Lippia* e com o intuito de selecionar novas amostras a serem fracionadas, evitando-se o reisolamento de substâncias previamente obtidas de *L. salviaefolia*, todos os extratos disponíveis foram analisados por CLAE-DAD, tendo-se os tempos de retenção (t_R) e os espectros de UV das substâncias isoladas dos EEFLs e EERLs como referência (Tabela 4.19). A Figura 4.74, a seguir, mostra os cromatogramas obtidos para os extratos etanólicos de folhas de espécies do gênero *Lippia*, enquanto que as Figura 4.75 e 4.76 trazem os cromatogramas obtidos a partir de ramos, e de flores e raízes, respectivamente.

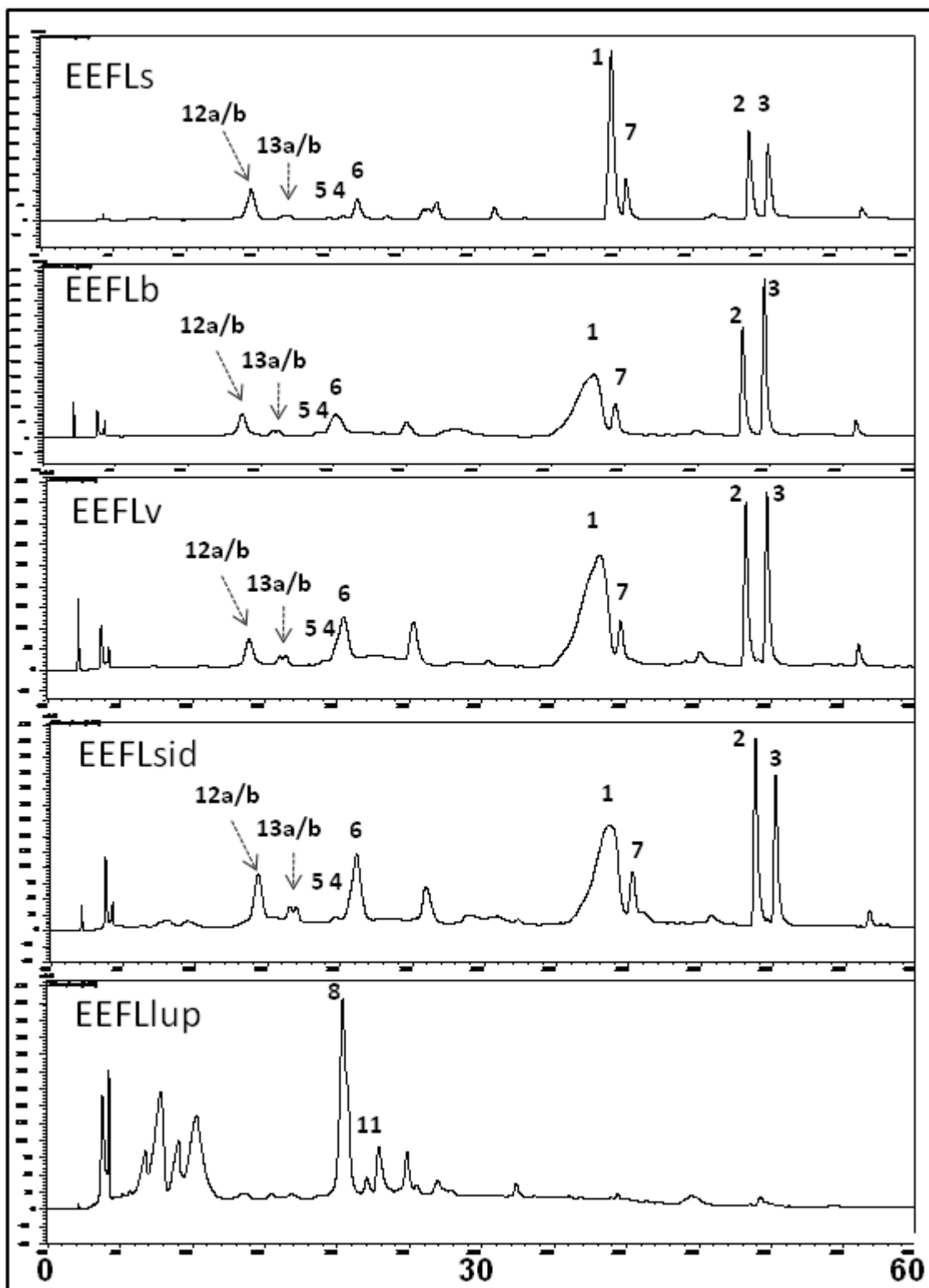


Figura 4.74 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; $\lambda=254$ nm) para os extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), *L. balansae* (EEFLb), *L. velutina* (EEFLv), *L. sidoides* (EEFLsid) e *L. lupulina* (EEFLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência

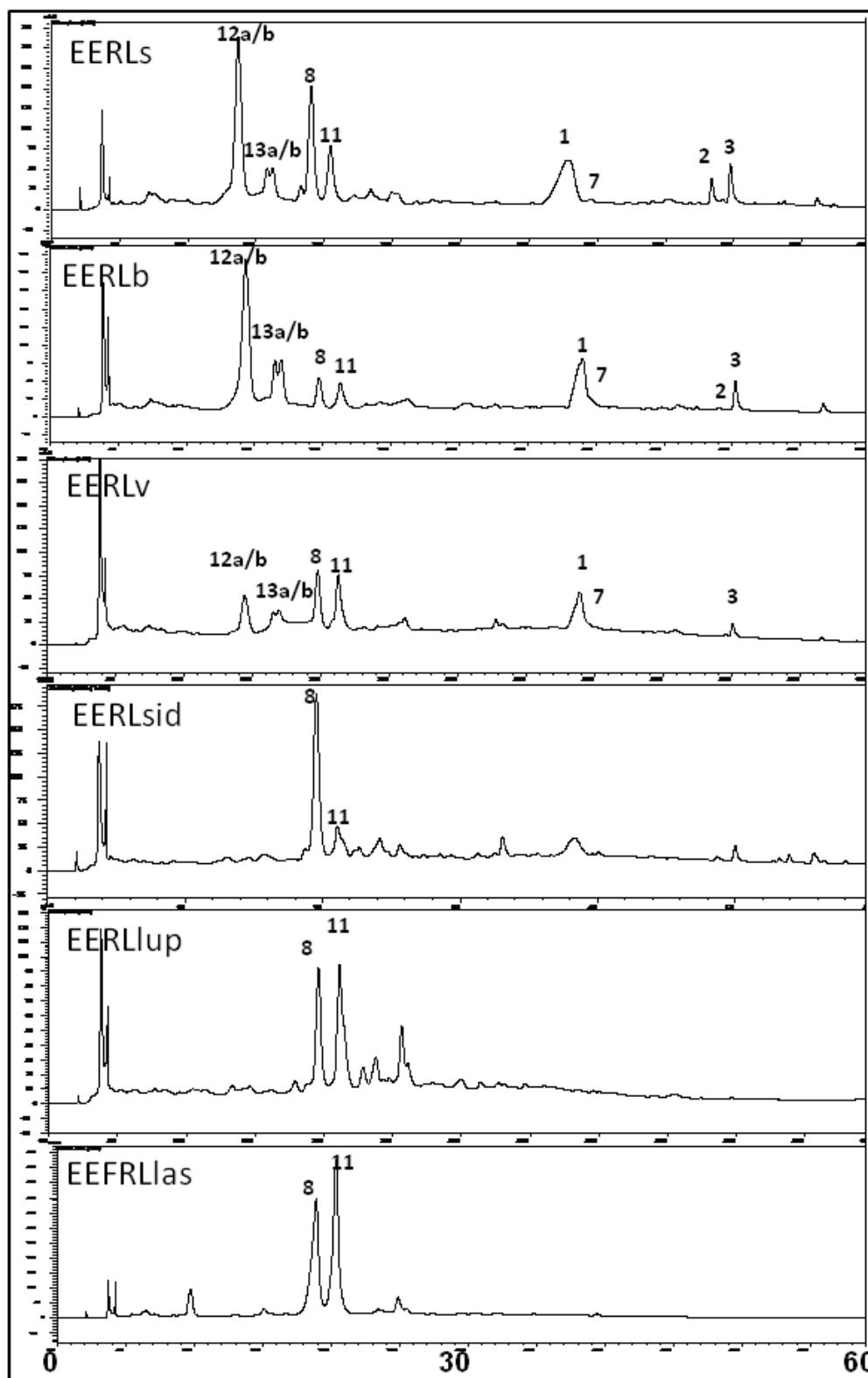


Figura 4.75 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de ramos de *L. salviaefolia* (EERLs), *L. balansae* (EERLb), *L. velutina* (EERLv), *L. sidoides* (EERLs), *L. lupulina* (EERLlup) e de ramos com folhas de *L. lasiocalycina* (EEFRLlas). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência

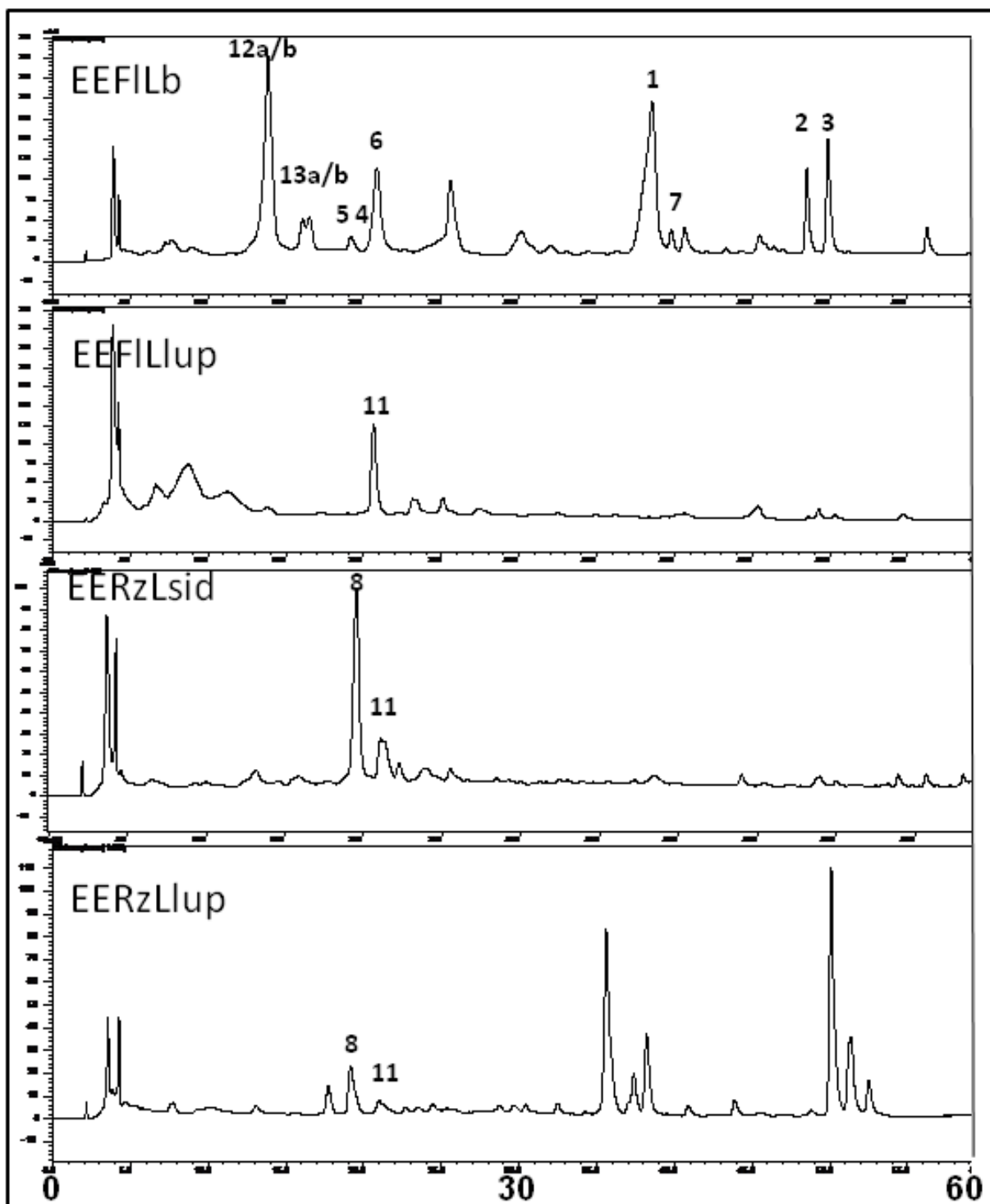


Figura 4.76 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1,0 mL/min.; $\lambda=254$ nm) para os extratos etanólicos de flores de *L. balansae* (EEFILb) e de *L. lupulina* (EEFILlup), e de raízes de *L. sidoides* (EERzLsid) e de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência

Tabela 4.19 - Tempo de retenção (t_R) e λ_{max} das substâncias isoladas do EEFLs e EERLs, obtidos por CLAE-DAD

Substância(s)	Tempo de retenção (min.)	λ_{max} (nm)
1	38,7	289 e 326
2	48,7	285 e 335
3	50,0	287 e 335
4	21,1	281 e 346
5a/5b	19,4	283 e 328
6	21,5	296 e 330
7	39,0	286 e 326
8	19,6	291 e 332
11	21,1	289 e 332
12a/12b	13,7	286 e 329
13a/13b	15,8	286 e 329

A observação da Figura 4.74 nos leva a concluir que há uma acentuada semelhança qualitativa entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), *L. balansae* (EEFLb), *L. velutina* (EEFLv) e de *L. sidoides* (EERLsid). Já entre os extratos de ramos (Figura 4.75), o das três primeiras mostraram-se semelhantes, mas com diferenças significativas destes em relação àqueles de ramos de *L. sidoides* (EERLsid) e de *L. lupulina* (EERLlup), e de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna* (EEFRLlas).

O perfil do extrato etanólico de flores de *L. balansae* (EEFILb) (Figura 4.76) mostra-se semelhante àquele inicialmente observado para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs) (Figura 4.74). Ainda comparando-se as Figuras 4.74 e 4.76, notam-se acentuadas diferenças entre os extrato etanólicos de flores de *L. lupulina* (EEFILlup) e de raízes de *L. sidoides* (EERzLsid) e de *L. lupulina* (EERzLlup) em relação a este último (EEFLs).

Os resultados observados nos permitiram selecionar o extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup) para novos trabalhos de fracionamento e isolamento de substâncias, em virtude da sua diferença de constituição química em relação aos dois extratos previamente estudados (EEFLs e EERLs), como destacado na Figura 4.77, e de sua massa abundante (~ 20 g).

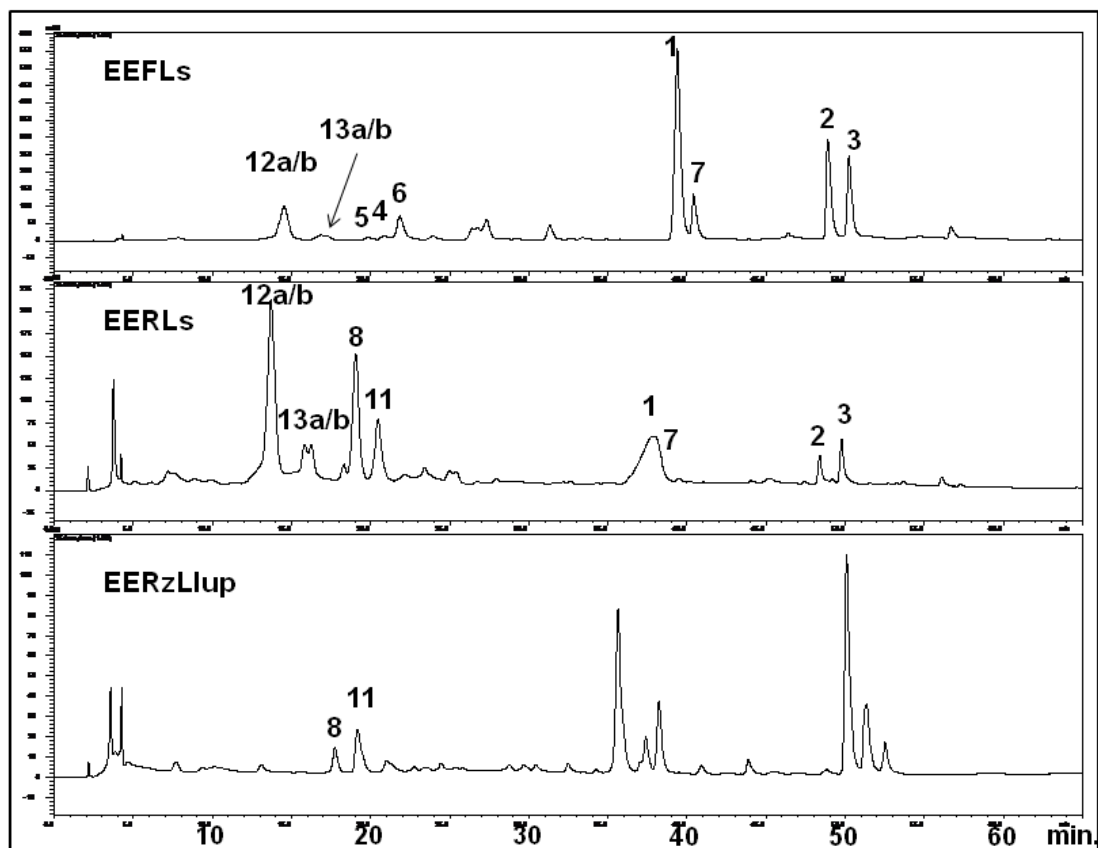


Figura 4.77 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (FE: C18; FM: gradiente H₂O-MeOH; F: 1 mL/min.; λ =254 nm) para os extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, e de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de UV em comparação a substâncias de referência

4.8.2 Análises por UHPLC-ESI-TOF-MS

Complementarmente, as técnicas acopladas Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência-Ionização por Electrospray-Analisador por Tempo de Vôo-Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-ESI-TOF-MS) foram utilizadas no estudo comparativo entre os extratos das seis espécies do gênero *Lippia* disponíveis. Este tipo de estudo, além de servir para a escolha de outros extratos para fracionamentos futuros, em função de suas diferenças ou semelhanças com os extratos já fracionados, é particularmente interessante no gênero *Lippia*, uma vez que muitos problemas taxonômicos vêm sendo relatados neste, com frequentes classificações botânicas incorretas, muitas dificuldades envolvendo informações de distribuição geográfica e número de espécies, etc. (SALIMENA, 2002). Alguns esforços para resolver estas questões recorrentes no gênero *Lippia*

estão focados principalmente em estudos citogenéticos (BRANDÃO et al., 2007; VICINI et al., 2004, VICINI et al., 2006), sem relatos de investigações químicas comparativas entre espécies por UHPLC-ESI-TOF-MS, que podem auxiliar na solução destes problemas taxonômicos, particularmente na reclassificação de espécies.

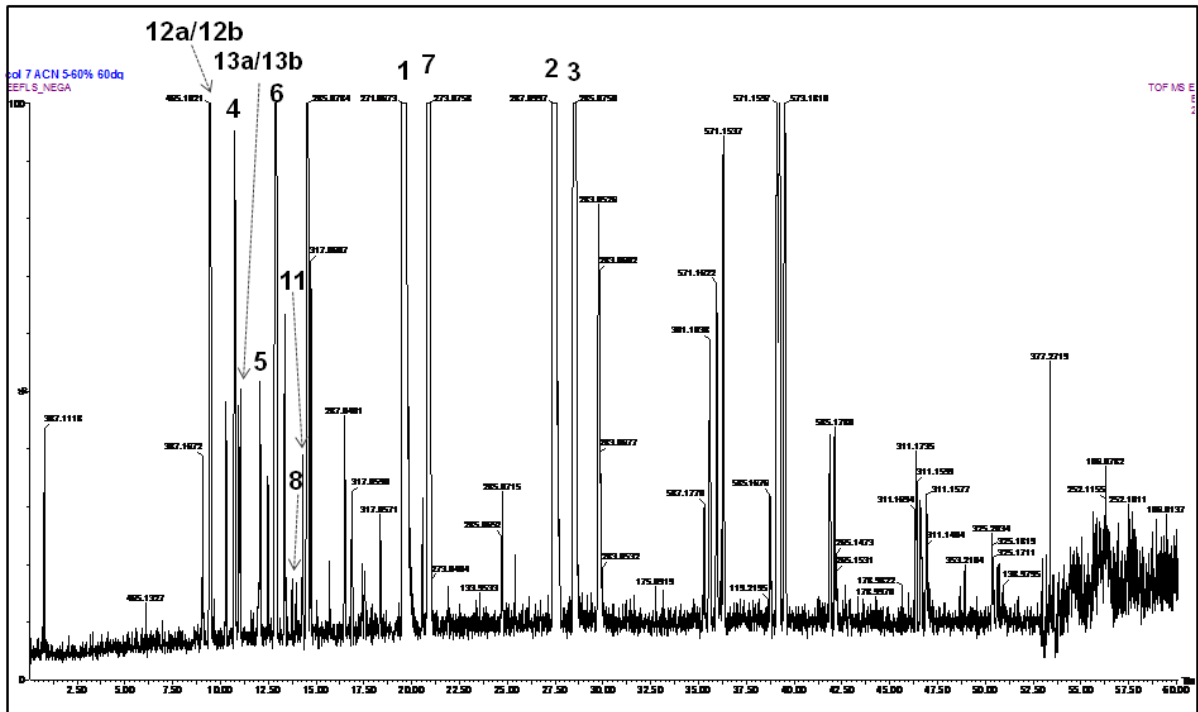


Figura 4.78 - Cromatograma obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B), no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* Cham. Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência

Novamente, os extratos etanólicos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia* e as substâncias (ou misturas isoméricas) isoladas destes foram utilizados como referências. A Figura 4.78, acima, mostra o cromatograma resultante da análise do extrato etanólico de *L. salviaefolia*, sendo que todos os demais extratos disponíveis e substâncias isoladas foram analisados nas mesmas condições. Checou-se a ocorrência das substâncias de referência em todos os extratos e os resultados foram organizados nas Tabelas 4.20 e 4.21. Os cromatogramas UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos que foram fracionados neste trabalho de doutoramento podem ser vistos na Figura 4.79.

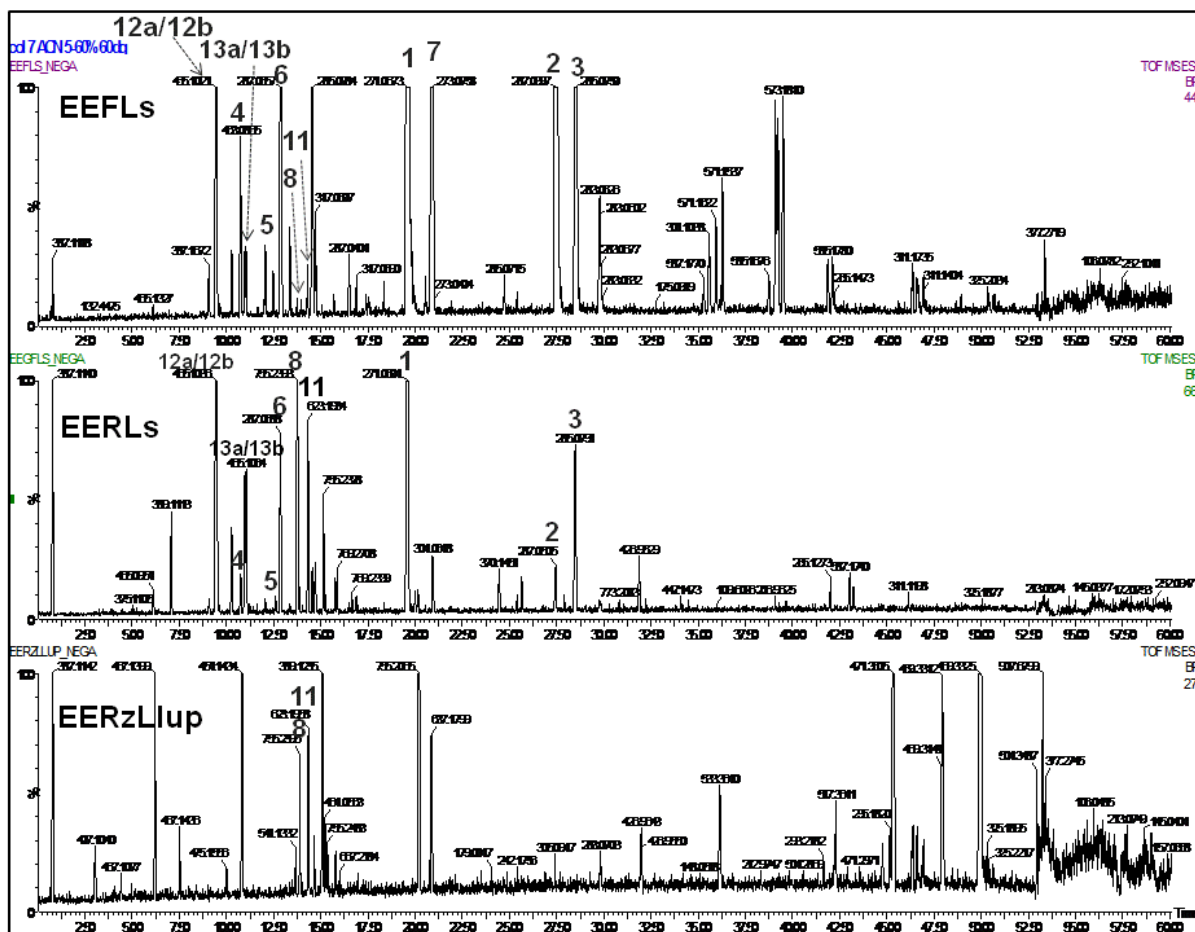


Figura 4.79 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] em análises dos três extratos fracionados no trabalho ora apresentado: extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, e de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência

Tabela 4.20 - Tempos de retenção (t_R) e dados de massas de alta resolução das substâncias fenólicas **1-13** utilizadas como referências

Substância ¹	t_R (min.)	Massa medida [M-H]-	Massa teórica calculada	Exatidão da medida (ppm)	Fórmula molecular
1	19,4	271,0607	271,0606	0,4	C ₁₅ O ₅ H ₁₂
2	27,3	287,1922	287,1919	1,0	C ₁₆ O ₅ H ₁₆
3	28,4	285,0768	285,0763	-1,1	C ₁₆ O ₅ H ₁₄
4	10,6	463,0875	463,0877	-0,4	C ₂₁ O ₁₂ H ₂₀
5	11,9	449,1074	449,1084	-2,2	C ₂₁ O ₁₁ H ₂₂
6	12,7	287,0556	287,0569	-1,3	C ₁₅ O ₆ H ₁₂
7	20,7	273,0772	273,0763	3,3	C ₁₅ O ₅ H ₁₄
8	13,6	755,2399	755,2399	0,0	C ₃₄ O ₁₉ H ₄₄
10	12,4	521,2025	521,2023	0,4	C ₂₆ O ₁₁ H ₃₄
11	14,1	623,1970	623,1976	-1,0	C ₂₉ O ₁₅ H ₃₆
12a/12b	9,3	465,1029	465,1033	-0,9	C ₂₁ O ₁₂ H ₂₂
13a/13b	10,8	465,1028	465,1033	-1,1	C ₂₁ O ₁₂ H ₂₂

¹substâncias: naringenina (**1**); asebogenina (**2**); sacuranetina (**3**); 6-Hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina (**4**); eriodictiol-7-O- β -glicosilpiranosídeo (**5**); aromadendrina (**6**); floretina (**7**); forsitosídeo B (**8**); laricirresinol-4'-O- β -glicopiranosídeo (**10**); verbascosídeo (**11**); 3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12a/12b**); 3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicosilpiranosil-flavanona (**13a/13b**)

Tabela 4.21 - Ocorrência de algumas substâncias nos extratos etanólicos de espécies do gênero *Lippia* analisados por UHPLC-ESI-TOF-MS

t_R (min.)	Massa medida	<i>L. salviaefolia</i>		<i>L. balanceae</i>			<i>L. velutina</i>		<i>L. sidoides</i>			<i>L. las*</i>		<i>L. lupulina</i>		
		folhas	ramos	folhas	ramos	flores	folhas	ramos	folhas	ramos	raízes	folhas + ramos	folhas	ramos	flores	raízes
19,4 (1)	271,0607	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
27,3 (2)	287,1922	+	+	+		+	+	+	+	+	+					
28,4 (3)	285,0768	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
10,6 (4)	463,0875	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
11,9 (5)	449,1074	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
12,7 (6)	287,0556	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
20,7 (7)	273,0772	+		+		+	+		+							
13,6 (8)	755,2399	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
12,4 (10)	521,2025		+		+			+				+				
14,1 (11)	623,1970	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,3 (12a/12b)	465,1029	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
10,8 (13a/13b)	465,1028	+	+	+	+	+	+	+	+	+						

* *Lippia lasiocalycina*

As substâncias naringenina (**1**), asebogenina (**2**), sacuranetina (**3**), 6-hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina (**4**), eriodictiol-7-O- β -glicosilpiranosídeo (**5a/5b**), aromadendrina (**6**), floretina (**7**), forsitosídeo B (**8**), laricirresinol-4'-O- β -glicopiranosídeo (**10**), verbascosídeo (**11**), 3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12a/12b**) e 3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicosilpiranosil-flavanona (**13a/13b**)

foram identificadas pela primeira vez nas espécies *L. salviaefolia*, *L. balanceae* e *L. velutina*. As substâncias **1-8** e **11-13** foram identificadas pela primeira vez em *L. sidoides*, espécie amplamente utilizada em medicina tradicional, especialmente no Nordeste do Brasil, onde infusões de suas partes aéreas são empregadas como anti-sépticos para usos gerais em pele, boca, gengiva, nariz e garganta (BOTELHO et al., 2007a; BOTELHO et al., 2007c; LEMOS et al., 1990; MATOS, 1999; MATOS, 2002). A *Lippia sidoides* foi incluída em programas governamentais de atendimento primário à saúde nesta Região (COSTA et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002; SILVA, M. et al., 2006) e, mais recentemente, na lista de 71 espécies da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Renuisus). Até hoje, os componentes isolados de extratos polares desta espécie foram os flavonóides quercetina, luteolina, taxifolina e glicoluteolina, a lignana isolaricirresinol, as quinonas lapachenol, tecomaquinona, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, lippsidoquinona, isocatalponol, β -sitosterol e o 6-oxo-3,4,4a,5-tetraidro-3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano e os ácidos palmítico, esteárico, beênico, araquídico e lignocérico (COSTA et al., 2001; COSTA et al., 2002; LEMOS et al. 1999; MACAMBIRA et al., 1986; SANTOS et al., 2005). Cabe mencionar que em todos os casos, o material botânico investigado foi coletado no Nordeste do Brasil, ao passo que a amostra estudada por UHPLC-ESI-TOF-MS foi obtida a partir de espécimens nativos no cerrado paulista (subseção 3.1.1).

Dentre as substâncias monitoradas neste estudo (Tabela 4.20), somente cinco delas (**1**, **3**, **5**, **8** e **11**) foram relatadas no gênero *Lippia*: a naringenina (**1**) e o eriodictiol-7-O- β -glicosídeo (**5**) foram identificadas em *L. graveolens* (DOMÍNGUEZ et al., 1989; LIN et al., 2007); a sacuranetina (**3**) foi isolada de *L. dulcis* (ONO et al., 2005); o forsitosídeo (**8**) e o verbascosídeo (**11**) foram isolados de *L. alba* (HENNEBELLE et al., 2006a), tendo este último também sido isolado de *L. multiflora* (PHAM et al., 1988; TAOUBI et al., 1997), *L. dulcis* (KANEDA et al. 1992) e de *L. triphylla* (ONO et al., 2008), e identificado em *L. citriodora* (BILIA et al., 2008). A substância **11** (verbascosídeo) foi detectada em todos os extratos analisados (Tabela 4.21), seguida por outro fenilpropanóide, o forsitosídeo B (**8**), que só não foi detectado nos extratos etanólicos de folhas de *L. velutina* (EEFLv) e de *L. lupulina* (EEFLlup). Os fenilpropanóides são constituintes característicos da ordem Lamiales (DELAZAR et al., 2005), ao qual a família Verbenaceae pertence. No gênero *Lippia*,

estas substâncias vêm sendo relatadas como derivadas do verbascosídeo (BARBOSA et al., 2006).

As análises UHPLC-ESI-TOF-MS confirmaram as semelhanças entre os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), *L. balanceae* (EEFLb), *L. velutina* (EEFLv) e *L. sidoides* (EEFLsid), e as diferenças acentuadas destes em relação àqueles obtidos de folhas de *L. lupulina* (EEFLlup) e de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna* (EEFRLlas) (Figura 4.80). Este último mostrou-se muito concentrado nas substâncias verbascosídeo (**11**) e forsitosídeo B (**8**). Em relação à ocorrência das substâncias utilizadas como referências, poderíamos agrupar os extratos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia*, *L. velutina*, *L. sidoides* e *L. balansae* e, ainda, aquele de flores desta última espécie (Tabela 4.21) (excetuando-se aquele de ramos de *L. sidoides*, agrupamento semelhante seria possível tendo-se como referência somente os isômeros inéditos isolados de *L. salviaefolia*, **12a**, **12b**, **13a** e **13b**). Diferem significativamente em relação a estes os extratos de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna*, de raízes de *L. sidoides* e de folhas, de ramos, de flores e de raízes de *L. lupulina*.

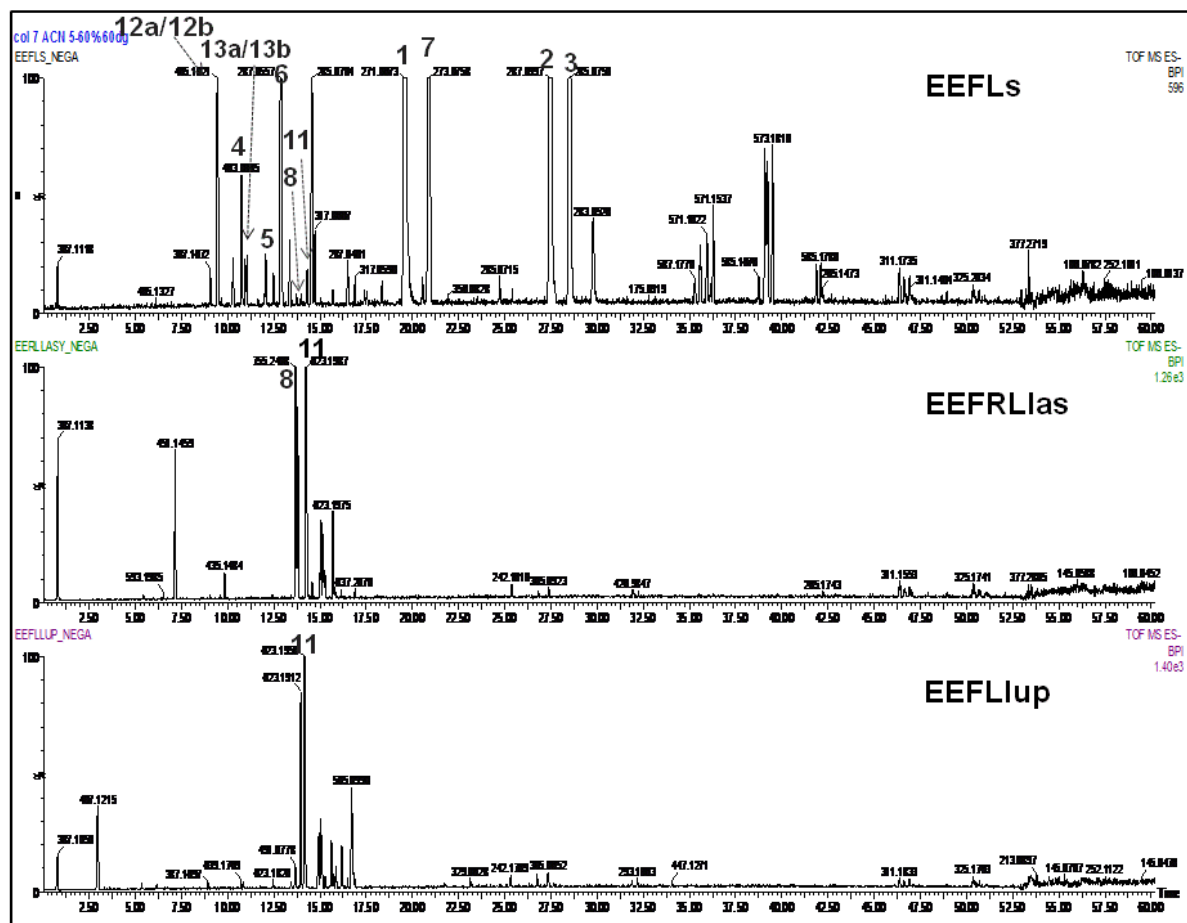


Figura 4.80 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS (FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μm ; FM: H_2O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 $\mu\text{L}/\text{min}$.) para os extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna* (EEFRLias) e de folhas de *L. lupulina* (EEFLlup). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas em comparação a substâncias de referência

A ocorrência de substâncias biologicamente ativas em algumas espécies investigadas, como a floretina (**7**), que vem se mostrando um potencial agente antineoplásico ou quimiopreventivo (CAO et al., 2007; KIM et al., 2009; PARK et al. 2007; PLOCHMANN et al. 2007; SABZEVARI et al. 2004; WU et al., 2009; YANG et al., 2009), o verbascosídeo (**11**), que teve as atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (FUNES et al., 2010), dentre outras, relatadas, e a naringenina (**1**), que vem sendo apontada como um potencial agente quimiopreventivo de cânceres induzidos por hormônios endógenos, além de apresentar outras atividades benéficas associadas a suas propriedades antiestrogênicas e estrogênicas (BULZOMI et al. 2010; GALLUZZO et al., 2010), dentre outras substâncias, em *L. salviaefolia* ou *L. sidoides*, por exemplo, as coloca

como possíveis fontes destas substâncias, que podem ser utilizadas como padrões fitoquímicos para o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos, ou mesmo isoladamente como princípios ativos de futuros medicamentos. O fato de serem espécies arbustivas e de rápido crescimento é uma característica interessante quando pensa-se em domesticação e cultivo para aplicações industriais, essenciais para se garantir a sustentabilidade e padronização de produtos e processos derivados de matérias-primas vegetais (SCHULTZ, HÄNSEL, TYLER, 2000; SIMÕES et al., 2000).

As análises desenvolvidas aplicando-se as técnicas acopladas UHPLC-ESI-TOF-MS permitem comparações mais detalhadas em relação às técnicas CLAE-DAD, como ilustrado na Figura 4.82. Informação compatível à obtida por CLAE-DAD para o EEFLs foi adquirida em corrida UHPLC-ESI-TOF-MS de apenas 5 min. (Figura 4.81), utilizando-se coluna de 50 mm de comprimento (Waters UPLC Acquity BEH C18; 50 x 2,1 mm; 1,7 μ m) que foi empregada para o desenvolvimento do método mais tarde transposto para a realização das análises apresentadas nesta subseção, utilizando-se coluna mais longa (Waters UPLC Acquity BEH C18; 150 x 2,1 mm ; 1,7 μ m) (Figuras 4.79, 4.78 e 4.79 e Tabela 4.21). Considerando-se o desafio da Química contemporânea de substituir ou reduzir o impacto de processos danosos ao meio ambiente e à saúde humana, as análises por UHPLC-ESI-TOF-MS apresentaram um ganho adicional, já que levaram a um consumo reduzido de solvente orgânico (31,2 mL durante cada análise, somados a 10,7 mL consumidos nas etapas de lavagem/reativação e reequilíbrio da coluna) em relação àquelas desenvolvidas pelas técnicas CLAE-DAD (60 mL durante a análise propriamente dita, somados a 20 mL das etapas de lavagem/reativação e reequilíbrio da coluna). Ademais, se consideramos que uma forma indireta de se mensurar o quão ecologicamente mais satisfatória é uma operação em relação a outra pode ser feita comparando-se a quantidade de informações obtidas por ambas em um dado intervalo de tempo (SANDRA et al., 2010), a vantagem da operação de separação-deteção do sistema UHPLC-ESI-TOF-MS amplia-se em relação a CLAE-DAD, como ilustrado na Figura 4.82.

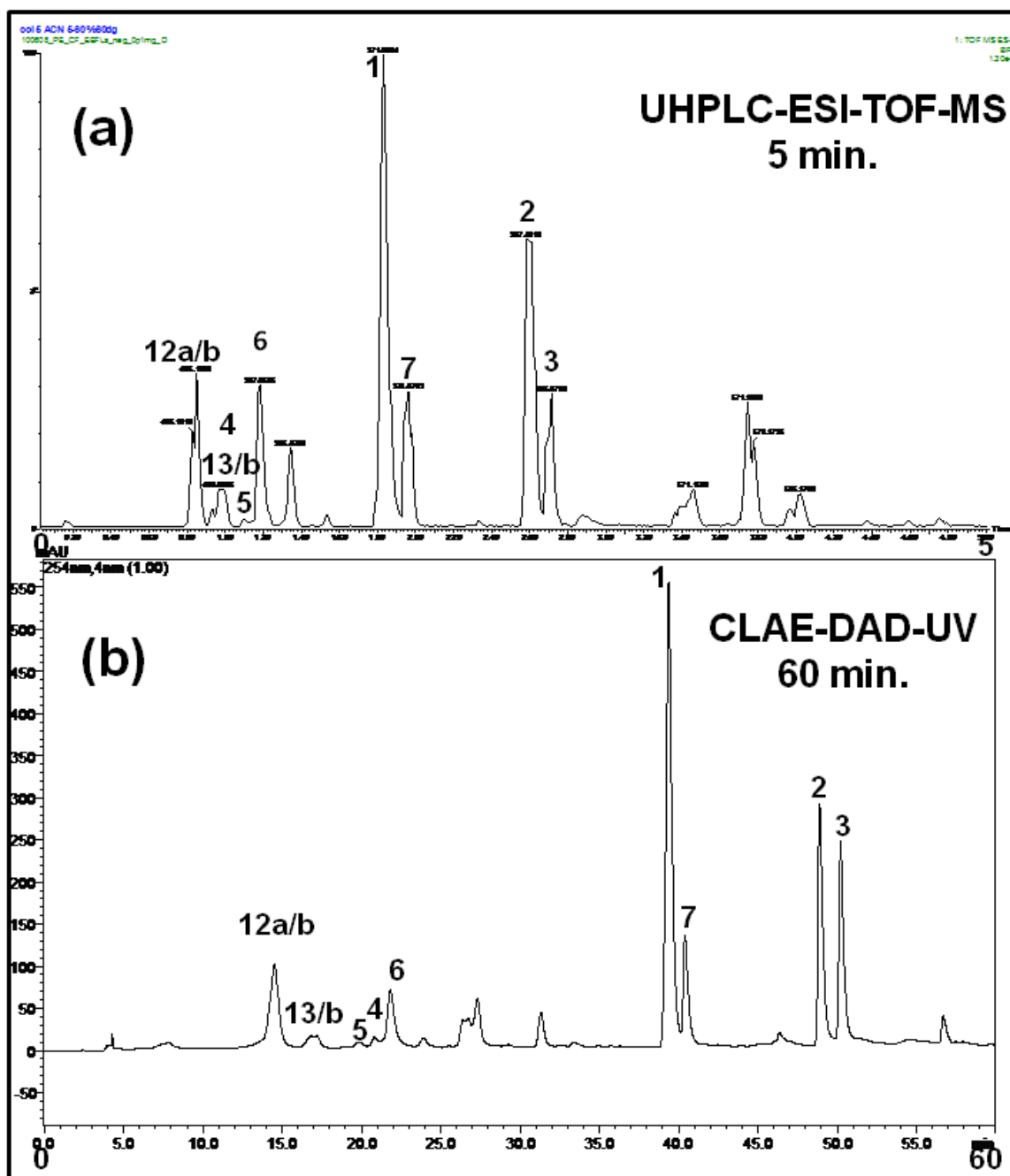


Figura 4.81 - Comparação entre cromatogramas obtidos para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), em 5 minutos, por UPLC-TOF-MS [FE: coluna Waters UPLC Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m); FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 450 μ L/min] (a); e em 60 minutos por CLAE-DAD [FE: coluna Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, acoplada a Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, 4 μ m); FM: H₂O (A) e MeOH (B), no gradiente: 30% a 50% de B em 25 min., atingindo 88,9% de B aos 60 minutos; F: 1 mL/min.] (b). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas de alta resolução em comparação a substâncias de referência

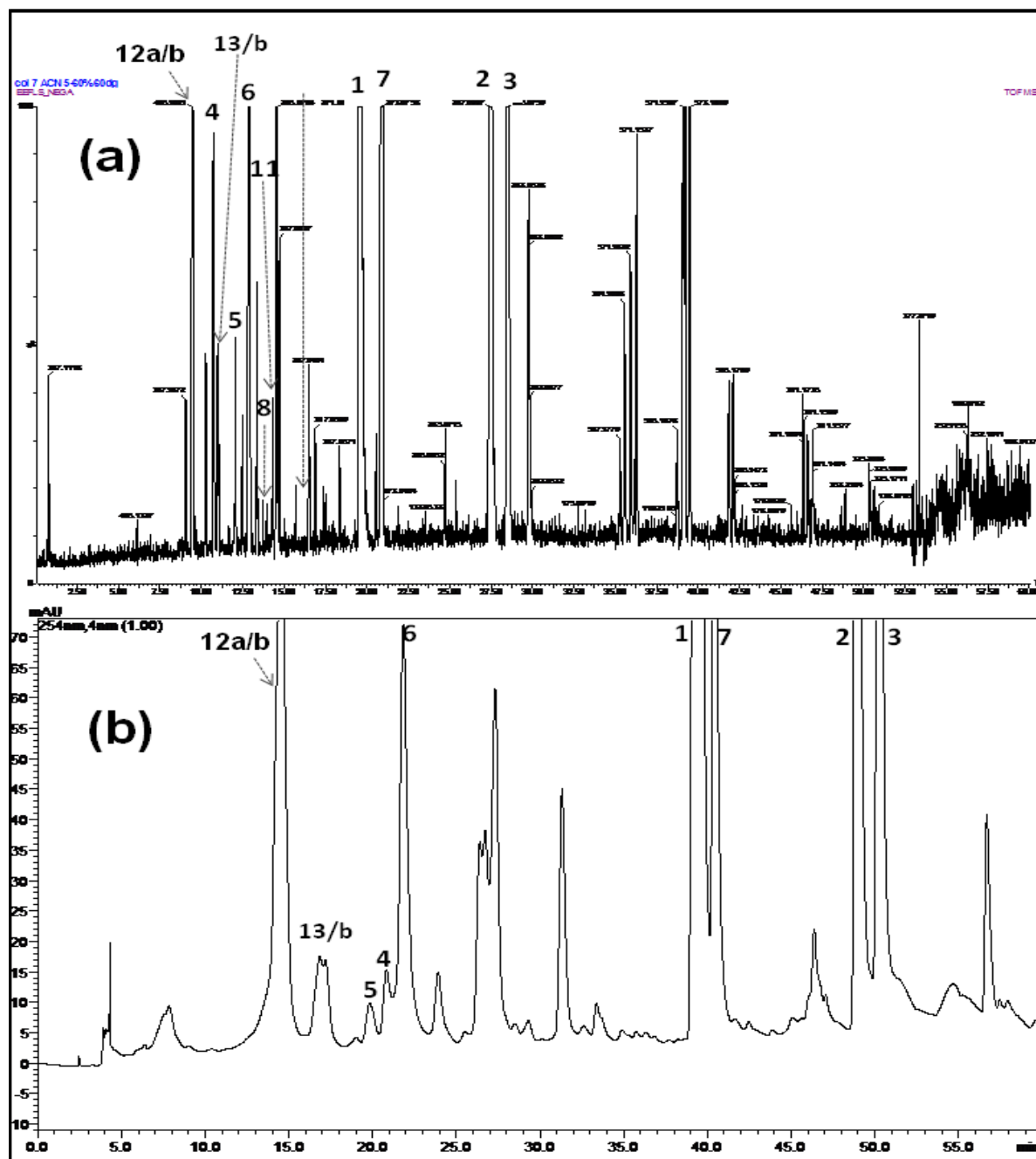


Figura 4.82 - Comparação entre cromatogramas obtidos para o extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs), em 60 minutos, por UHPLC-ESI-TOF-MS [FE: Waters UPLC Acquity BEH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 μ m; FM: H₂O (A) e ACN (B) no gradiente: 5 a 60% de B em 52 min., atingindo 100% de B aos 52.1 min. e permanecendo assim até 60 min.; F: 600 μ L/min.] (a); e por CLAE-DAD [FE: Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, acoplada a Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, 4 μ m; FM: H₂O (A) e MeOH (B) no gradiente: 30% de B a 50% em 25 min., atingindo 88,9% de B aos 60 minutos; F: 1 mL/min.] (b). Substâncias indicadas pelos números 1-13 sobre as bandas cromatográficas, identificadas nos extratos com base em seus t_R e espectros de massas de alta resolução em comparação a substâncias de referência

Tais ganhos provavelmente foram influenciados pela maior eficiência da coluna utilizada nas análises UHPLC-ESI-TOF-MS, que possui diâmetro interno e de partículas menores em relação às colunas usadas em CLAE-DAD. Isso se deve ao fato da eficiência da coluna, calculada em termos de número máximo de pratos teóricos da fase estacionária ($N \sim L/2dp$) é dependente do comprimento da coluna (L) e do diâmetro da partícula utilizada (dp) e independente do diâmetro interno da coluna ou do fluxo (SNYDER, GLAJCH e KIRKLAND, 1997). Cabe mencionar que a maior sensibilidade do detector EM em relação ao DAD-UV, bem como as diferenças de temperatura nas celas das colunas, fixada em 60°C para as análises UHPLC-ESI-TOF-MS, e ambiente (~ 25°C) para àquelas CLAE-DAD, também podem ter influenciado favoravelmente as primeiras, já que o aumento da temperatura vem sendo empregado como um poderosa variável em cromatografia líquida pela sua influência em viscosidade, seletividade, eficiência e detectibilidade (SANDRA, 2010).

4.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.9.1 Estimativa da atividade antioxidante intracelular

Alterações no balanço redox intracelulares implicam em muitos eventos moleculares e celulares. Os extratos EEFLs e EERLs, suas frações de partição e as substâncias isoladas destes tiveram as suas influências sobre células expostas ao agente pro-oxidante hidroperóxido de *t*-butila (*t*-BOOH) ou controle, por 24 horas, com o intuito de se monitorar possíveis alterações nos níveis de ERO intracelulares. Os pré-tratamentos, por 24 h, com as substâncias aromadendrina (**6**) ou floretina (**7**) foram eficientes no combate a elevação de ERO induzido em células embrionárias humanas de rim HEK-293. A substância **7** (1 μ M) protegeu fortemente as células contra danos de ERO induzidos por *t*-BOOH (Figura 4.83). As demais amostras testadas não apresentaram atividades significativas. Tais resultados sugeriram uma potencial atividade das substâncias **6** e **7** para proteger células contra o *stress oxidativo*.

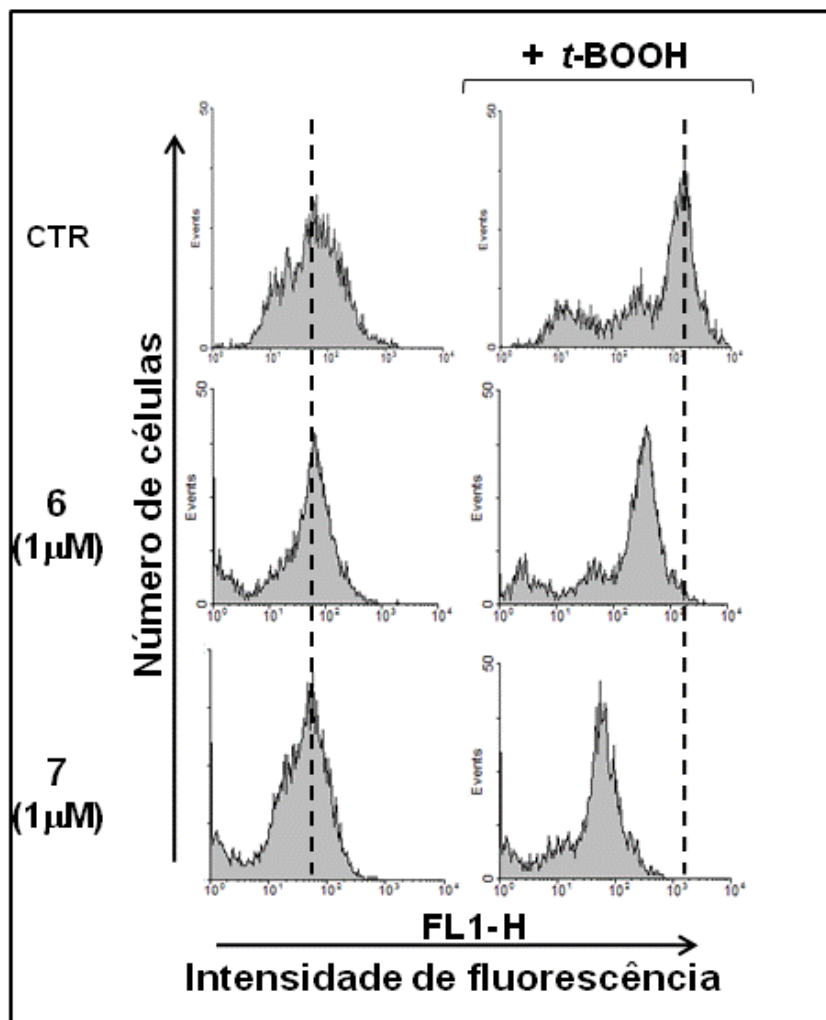


Figura 4.83 - Efeito antioxidante das substâncias aromadendrina (**6**) e floretina (**7**) em células HEK-293. As células pré-tratadas com **6** e **7** (1-20 μM), por 24 h, foram incubadas com 5 mM DCHF-DA, com ou sem o agente pro-oxidante *t*-BOOH a 300 μM , por 30 min. A produção de ERO foi analisada medindo-se a intensidade de fluorescência de DCF-DA com citômetro de fluxo. Os resultados estão expressos como valores médios de experimentos realizados em triplicatas (n=3)

An et al. (2007) avaliaram o efeito citoprotetor de constituintes isolados de *Hovenia lignum* sobre células derivadas do fígado humano G2 e hepatócitos primários de ratos, quando expostas aos agentes *t*-BOOH e tacrina. A floretina (**7**) mostrou-se a mais ativa entre as substâncias isoladas, e mais ativa do que o controle positivo sibilina, protegendo as células contra o stress-oxidativo induzido pelos agentes tacrina e *t*-BOOH e apresentando um efeito hepatoprotetor que, segundo os autores, pode estar relacionado à sua capacidade seqüestradora de radicais-livres. Zhu et al. (2009) testaram 21 polifenóis com relação às suas capacidades em sequestrar acroleína e 4-hidroxi-trans-nonenal em condições fisiológicas simuladas, dois produtos de peroxidação lipídica muito presentes

durante o desenvolvimento de doenças associadas ao *stress-oxidativo* causado por espécies reativas de carbonila, tendo a floreína (**7**) mostrado-se a mais ativa. Kang et al. (2010) testaram 7 flavonóides isolados de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em diferentes ensaios antioxidantes. A aromadendrina (**6**) inibiu fortemente a formação de ERO induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células polimorfonucleares primárias humanas, além de mostrar-se capaz de penetrar em células vermelhas do sangue humano e protegê-las contra danos oxidativos induzidos pelo peróxido gerador de radicais livres dicloreto de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) (AAPH).

4.9.2 Efeitos das substâncias 6 e 7 na proliferação de células HEK-293 e M14

Adicionalmente, foram investigados os efeitos da aromadendrina (**6**) e da floreína (**7**) no crescimento das células HEK-293, a fim de se excluir toxicidade nas concentrações usadas nos estudos antioxidantes. Os seus efeitos sobre as células cancerosas de melanomas humanos transformadas, M14, também foram investigados. Os testes foram realizados *in vitro* empregando-se ensaio com MTT (subseção 3.2.4.2), amplamente empregado para se quantificar viabilidade celular e proliferativa. Células metabolicamente ativas são hábeis em converter o corante amarelo, hidrossolúvel, sal de tetrazolium em sua forma azul escura, não hidrossolúvel, formazana pela quebra redutiva no anel tetrazolium. Os resultados mostrados na Figura 4.84 evidenciam que a substância **6** (1-40 µM), não foi capaz em inibir a proliferação das células HEK-293, enquanto que a substância **7** inibiu significativamente ($p < 0.001$), em concentrações maiores (20-40 µM), ambas as células testadas HEK-293 e M14. Em particular, a viabilidade foi de 31,6 % em células M14 expostas a 40 µM da substância **7**, revelando um potencial antineoplásico contra este tipo de célula tumoral.

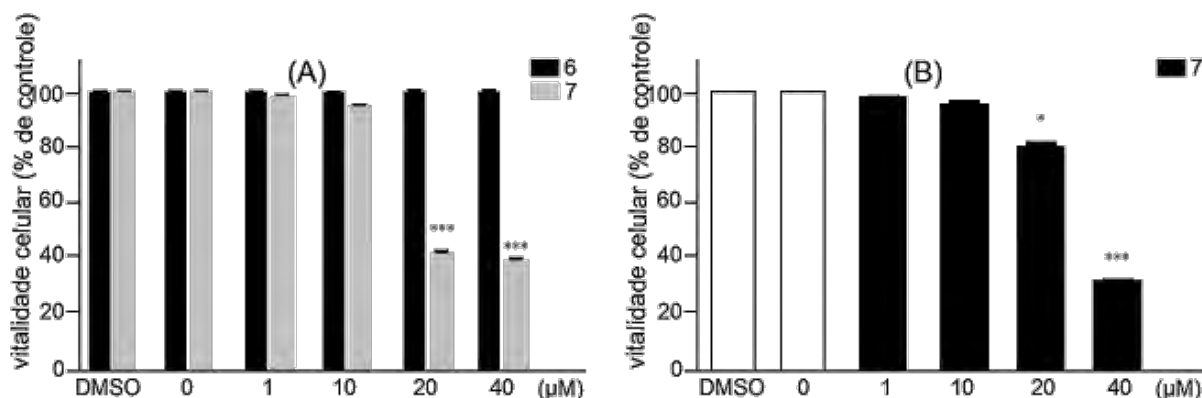


Figura 4.84 - Efeito das substâncias aromadendrina (**6**) e floretina (**7**) sobre o crescimento de células HEK-293 (A) e M14 (B) em ensaios utilizando MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de **6** e **7** (1-40 µM) ou com solvente a 0.1% por 48 h. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. $p < 0.05$, $p < 0.001$ versus células controle

4.9.3 Efeitos das substâncias 6 e 7 em apoptose de células HEK293 e M14

A fim de se checar o mecanismo envolvido nas mortes celulares observadas (subseção 4.9.2), as substâncias aromadendrina (**6**) e floretina (**7**) foram testadas como agentes pro-apoptose, conforme descrito na subseção 3.2.4.3. Células M14 e HEK293 foram incubadas com estas substâncias em diferentes concentrações (1, 10, 20, 40 µM), por 24 e 48 horas. A substância **7** induziu apoptose em células M14 de maneira concentração-dependente, com efeito significativo a 20 µM, após 48 h (Figura 4.85). Contudo, esta substância foi inábil em induzir apoptose em células HEK293, sugerindo uma ação seletiva contra células malignas M14.

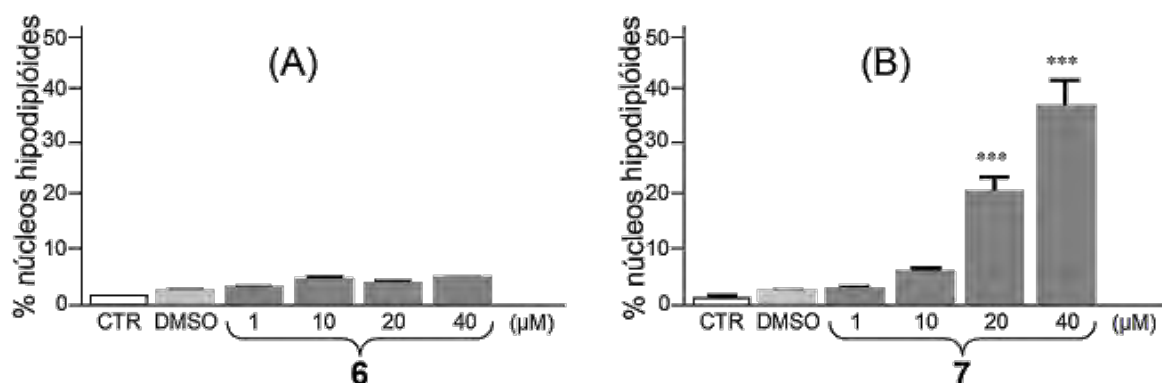


Figura 4.85 - Efeito das substâncias aromadendrina (**6**) e floretina (**7**) em apoptose de células M14. As células foram pré-tratadas com **6** (A) and **7** (B) (1-40 µM) por 48 h. A análise de apoptose foi realizada pelo método de coloração de iodeto de propídio (IP), usando citometria de fluxo. Os resultados estão mostrados como média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. *** $p < 0.001$ versus células controle

Os polifenóis são os principais antioxidantes consumidos durante as refeições por estarem presentes em saladas, legumes e frutas e vêm sendo apontados como agentes quimiopreventivos ou anticâncer em investigações utilizando-se cultura de células ou animais (ARROO et al., 2009; PLOCHMANN et al. 2007). No universo de substâncias testadas, as hidroxichalconas tem se destacado pelas suas eficiências como agentes atitumorais (antimióticas e inibidoras de crescimento celular) *in vitro* (SABZEVARI et al. 2004). A diidrochalcona floretina (7) (a chalcona mais abundante em maçãs) induz apoptose em melanomas B16 por meio da inibição do transporte de glucose através da membrana das células cancerosas, pela inibição da atividade da lipoxigenase e pela promoção da expressão de proteína BAX ou ativação de caspases. Ademais, mostrou baixa toxicidade contra células normais hepatócitos de ratos, sugerindo uma atividade seletiva contra células cancerosas, como epatomas humanos Hep G2 (SABZEVARI et al. 2004). Mais recentemente, Park et al. (2007) demonstraram que a floretina (7) inibe a proliferação de células de câncer de cólon humano HT-29, *in vitro*, de forma dose-dependente, por meio da indução de apoptose. Segundo estes autores, esta atividade pode ser mediada por mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial e ativação das vias de caspases. Cao et al. (2007) demonstraram que a floretina (50 μM) potencializou significativamente a citotoxicidade de daunorubicina sobre células de câncer de cólon SW620 e sobre células de leucemia K562 e K562/Dox (células droga-resistente), inibindo em mais de 60% a absorção de glicose e tornando-as sensíveis ao tratamento quimioterápico sob condição de hipoxia. Forte efeito potencializador de indução de apoptose em células de epatomas humanos Hep G2, pelo agente paclitaxel, foi observado quando administrado em combinação com a floretina (YANG et al., 2009). Wu et al. (2009) demonstraram que o tratamento com floretina a 200 μM induziu apoptose em células epatócitos humanos HepG2, *in vitro*. Adicionalmente, encontraram atividade antitumoral significativa *in vivo* pela administração intraperitoneal de 10 mg/Kg em camundongos inoculados com estas células cancerosas. Kim et al. (2009) investigaram os efeitos da floretina sobre células de câncer de mama transformadas H-Ras MCF10A, *in vitro*, encontrando atividade antiproliferativa dose-dependente e indução de condensações nucleares, indicando que as mortes celulares ocorreram por meio da indução de apoptose.

Jeon et al. (2008) investigaram a influência de substâncias isoladas de cascas de *Salix hulteni* sobre a atividade proliferativa de células de carcinoma de pulmão H1299, empregando o teste com MTT. Segundo os autores, a aromadendrina (**6**) mostrou leve atividade, inibindo as células cancerosas em aproximadamente 30%, a 100 μ M. No mesmo teste, a substância naringenina (**1**) inibiu aproximadamente 40% das células na mesma concentração. Kwak et al. (2009) testaram as atividades antiproliferativas dos constituintes isolados de *Chionanthus retusus* contra as células tumorais humanas A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 e HCT15. A aromadendrina (**6**) mostrou-se citotóxica contra 3 delas, com CI_{50} inferiores a 30 μ g/mL. Também mostrou fraca atividade inibitória de melanogênese (~21%) em células de melanoma B16 4A5, com valor de IC_{50} = 84 μ M (MATSUDA et al. 2009).

4.9.4 Teste antifúngico

Diante de informações de usos tradicionais de espécies do gênero *Lippia* como agentes antimicrobianos (LEMOS et al., 1992; OLIVEIRA D. et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001; PESSOA et al., 2005; SANTOS et al., 2004; SOUZA et al., 2007) e do fato de que a relevância clínica das micoses tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV, pacientes transplantados ou com câncer (CLARCK et al., 2002; HAGE et al., 2002), decidiu-se testar a atividade de extratos, frações e substâncias isoladas frente a fungos patógenos recorrentes em humanos, em colaboração com a Profa. Maria José Gianinni (FCF-UNESP).

Inicialmente, foram testados os extratos etanólicos de 6 espécies do gênero *Lippia*. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 – Resultados do teste de atividade antifúngica de extratos etanólicos de 6 espécies do gênero *Lippia* [valores expressados em CIM ($\mu\text{g/mL}$)]

Extrato/Cepa	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
EEFLsid	250	62,5	250	125
EERLsid	250	250	>250	>250
EERzLsid	>250	250	>250	250
EEFLs	250	250	>250	>250
EERLs	250	125	>250	250
EEFLlup	>250	62,5	>250	250
EEFILlup	>250	250	>250	250
EERLLup	>250	250	>250	>250
EERzLLup	250	>250	>250	>250
EEFLb	250	125	250	250
EEFILb	250	125	>250	>250
EERLb	>250	250	>250	>250
EEFLv	250	125	>250	250
EERLv	>250	250	>250	>250
EEGGLv	>250	125	>250	250
EERFLlas	250	250	>250	>250

Dentre as atividades observadas para os extratos brutos, destacaram-se aquelas obtidas a partir do extrato etanólico de folhas de *L. sidoides* (EEFLsid), com MICs iguais a 250, 62,5, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, respectivamente. Esta espécie é amplamente usada em medicina tradicional, especialmente no Nordeste do Brasil, onde infusões de suas partes aéreas são empregadas como anti-sépticos para usos gerais em pele, boca, gengiva, nariz e garganta (BOTELHO et al., 2007a; BOTELHO et al., 2007c; LEMOS et al., 1990; MATOS, 1999). O óleo essencial de suas partes aéreas demonstrou atividade contra *C. albicans*, com CIM igual a 2,5 mg/ml (BOTELHO et al., 2007a). Outros estudos relataram ações de seu óleos essenciais contra fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas (BARA; VANETTI, 1998; BOTELHO et al., 2007b,c; FONTENELLE et al., 2007; GIRÃO et al., 2003; LACOSTE et al., 1996; LEMOS et al., 1990; OLIVEIRA, F. et al., 2006; OLIVEIRA, R. et al., 2006).

Também foram avaliadas as atividades das frações de partição produzidas durante os procedimentos adotados com os extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, e de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup). Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.23.

Tabela 4.23 – Resultados dos testes de atividade antifúngica dos extratos etanólicos de folhas (EEFLs) e de ramos (EERLs) de *L. salviaefolia*, de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup) e de suas frações de partição [valores expressados em CIM ($\mu\text{g/mL}$)]

Extrato/Fração	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
EEFLs	125	125	125	62,5
FHex1	>250	>250	>250	62,5
FAc1	62,5	31,2	62,5	31,2
FBu1	125	62,5	125	31,2
FAq1	250	125	250	62,5
EERLs	250	250	250	125
FHex2	250	250	>250	250
FAc2	125	125	>250	125
FBu2	250	125	>250	250
FAq2	>250	>250	>250	>250
EERzLlup	>250	>250	>250	>250
FHex3	>250	>250	>250	>250
FAc3	125	125	>250	125
FBu3	62,5	15,6	125	31,2
FAq3	125	62,5	250	62,5

Dentre as frações avaliadas, apenas a acetato de etila (FAc1) do extrato etanólicos de folhas de *L. salviaefolia* (EEFLs) apresentou CIM menor que 125 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas, um incremento de atividade em relação ao extrato que lhe deu origem (Tabela 4.23). Entretanto, entre as substâncias isoladas de FAc1 (1-7) e testadas frente aos fungos, apenas a asebogenina (2) superou em atividade a fração que lhe deu origem, e somente frente ao *Cryptococcus neoformans* (Tabela 4.24).

Tabela 4.24 - Resultados dos testes de atividade antifúngica de algumas substâncias isoladas dos extratos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia* (1-13), e de raízes de *L. lupulina* (14, 19 e 20) [valores expressados em CIM ($\mu\text{g/mL}$)]

Substância/Cepa	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
1	250	250	>250	125
2	>250	250	>250	15,6
3	>250	>250	>250	>250
6	250	250	125	125
7	250	250	125	62,5
8	125	250	125	62,5
9	>250	>250	>250	31,25
11	125	125	125	15,6
12/13	62,5	62,5	62,5	31,2
14	>250	>250	>250	>250
19	125	62,5	125	62,5
20	125	125	125	125
Anfotericina B	2	64	8	4
Fluconazol	2	2	1	0,06

A FBU2, no geral, teve atividades próximas às aquelas observadas para o extrato que lhe deu origem (EERLs), e menores em relação às substâncias **8**, **9**, **11**. Este aumento de atividade ao longo do processo de fracionamento de FBU2 é mais visível em relação à mistura isomérica de **12a,12b**, **13a** e **13b**, como pode ser observado na Tabela 4.24.

Três das frações de partição (FAC3, FBU3 e Faq3) obtidas do extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* (EERzLlup) tiveram atividades maiores em relação a este, notadamente FBU3 (Tabela 4.23). Entretanto, a mesma tendência não foi observada para as substâncias **19** e **20**, que foram igualmente ou menos ativas em relação à fração FBU3 que lhes deu origem.

Em todos os casos, as substâncias puras testadas, extratos e frações tiveram atividades inferiores aos controles positivos anfotericina B e fluconazol, mesmo em termos de concentração molar, mas cabe lembrar que os processos de fracionamento desenvolvidos neste trabalho de doutoramento não foram bioguiados por estes testes antifúngicos. Assim, uma eventual estratégia de fracionamentos de espécies de *Lippia* bioguiados por estes testes poderia levar a substâncias mais ativas em relação às isoladas aqui. As dificuldades em se encontrar terapias eficientes e que substituam os atuais agentes antifúngicos em uso, muitas vezes com efeitos colaterais, como a anfotericina B (REGASINI, 2008), são razões que poderiam motivar este tipo de trabalho.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos e analisados neste trabalho nos permitem concluir, até o momento, que:

- O extrato etanólico de folhas da espécie *L. salviaefolia* Cham. é composto majoritariamente por flavonóides de diferentes subclasses [naringenina (**1**), asebogenina (**2**), sacuranetina (**3**); 6-hidroxi-7-O- β -glicopiranosil-luteolina (**4**); eriodictiol-7-O- β -glicosilpiranosídeo (**5a/5b**); aromadendrina (**6**); floretina (**7**); (2S) e (2R)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-O- β -glicopiranosil-flavanona (**12a/12b**); (2S) e (2R)-3',4',5,8-tetraidroxi-7-O- β -glicosilpiranosil-flavanona (**13a/13b**)], isolados em trabalhos de fracionamento guiados por testes antioxidantes preliminares. Análises por UHPLC-ESI-TOF-MS indicaram ainda a presença dos fenilpropanóides forsitosídeo B (**8**) e verbascosídeo (**11**).
- O extrato etanólico de ramos da espécie *L. salviaefolia* Cham. é composto pelas flavanonas glicosiladas **12a/12b** e **13a/13b**, pelos fenilpropanóides forsitosídeo B (**8**), alissonosídeo (**9**) e verbascosídeo (**11**) e pela epoxilignana laricirresinol 4'-O- β -glicopiranosil (**10**), isolados em processos de fracionamento guiados por testes antioxidantes preliminares. Análises por CLAE-DAD e por UHPLC-ESI-TOF-MS indicaram também a presença dos flavonóides **1-6**.
- O extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* Cham. é composto pelos triterpenos ácido oleanônico (**14**) e ácido oleanólico (**15**), pelas furanonaftoquinonas estenocarpoquinona (**16**) e avicequinona E (**17**), pela furanocromona prim-O-glicosilcimifigina (**18**), pela isoflavona 7-O-[β -apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glicopiranosil]-biochanina A (**19**), pelo estilbeno piceíde (**20**) e pelo iridóide glicosilado β -diidroastatosídeo (**21**). Análises por UHPLC-ESI-TOF-MS indicaram ainda a presença dos fenilpropanóides forsitosídeo B (**8**) e verbascosídeo (**11**).
- Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de folhas de *L. salviaefolia*, *L. balansae*, *L. velutina* e *L. sidoides* e de flores de *L. balansae*, obtidos por CCD, CLAE-DAD e UHPLC-ESI-TOF-MS, são parecidos, com diferenças acentuadas em relação aos extratos de folhas de *L. lupulina* e de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna*. A comparação entre extratos etanólicos de ramos evidenciou

semelhanças entre os extratos de *L. salviaefolia*, *L. balansae* e *L. velutina*, diferenciando-se daqueles de ramos de *L. sidoides*, *L. lupulina* e de ramos com folhas de *L. lasiocalycinna*.

- Outros extratos que diferenciaram-se em relação aos perfis obtidos para os extratos etanólicos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia*, inicialmente analisados, foram os de flores de *L. lupulina*, e de raízes de *L. sidoides* e de *L. lupulina*, sendo este último, dentre todos os citados anteriormente, o que apresentou maior quantidade de bandas proeminentes não identificadas utilizando-se as substâncias de referência isoladas dos extratos de *L. salviaefolia*.

- Em relação à ocorrência das substâncias utilizadas como referências e utilizando-se as técnicas acopladas UHPLC-ESI-TOF-MS, poderiam ser agrupados os extratos de folhas e de ramos de *L. salviaefolia*, *L. velutina*, *L. sidoides* e *L. balansae* e, ainda, aquele de flores desta última espécie. Diferiram significativamente em relação a estes os extratos de folhas e ramos de *L. lasiocalycinna*, de raízes de *L. sidoides* e aqueles de folhas, de ramos, de flores e de raízes de *L. lupulina*.

- A técnica CLAE-DAD foi imprescindível para o trabalho de comparação entre extratos (desreplicação), permitindo a seleção de amostras a serem submetidas a fracionamentos.

- As técnicas hífenadas UHPLC-ESI-TOF-MS permitem análises mais detalhadas dos extratos disponíveis em relação às técnicas CLAE-DAD, num mesmo período de tempo (60 minutos de análise), mostrando-se uma ferramenta muito útil nos estudos comparativos de espécies do gênero *Lippia*. Também permitiram reduzir drasticamente o tempo necessário para se estudar as interconversões entre os isômeros isolados **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, além de permitirem análises mais detalhadas (monitoramento dos isômeros em períodos de tempo menores) e um consumo reduzido de solventes orgânicos.

- As análises desenvolvidas por UHPLC-ESI-TOF-MS durante um período de 24 h, a partir de cada uma das flavanonas isoméricas **12a**, **12b**, **13a** e **13b**, mantidas a 25 °C, ao abrigo da luz e em pH ~ 2,5 ou em pH ~ 6, deixaram claro que cada substância, nas condições descritas, interconverte-se parcialmente nos outros 3

isômeros a partir de no máximo 1,7 horas após o seu isolamento. Assim, o pH ~ 2,5 não as estabilizou.

- As substâncias floretina (**7**) e aromandrendrina (**6**), embora tenham apresentado atividades sequestradoras do radical livre DPPH• inferiores à da substância 6-hidroxi-7-O-β-glicopiranosil-luteolina (**4**), a mais ativa das substâncias testadas isoladas de folhas de *L. salviaefolia*, apresentaram-se como as mais ativas na proteção a células embrionárias humanas de rim HEK-293, expostas ao agente pro-oxidante hidroperóxido de *t*-butila (*t*-BOOH), com destaque para a floretina. Este resultado mostra que o fracionamento guiado por testes antioxidantes preliminares, simples de serem executados em um laboratório de Química, constitui-se uma estratégia eficiente para o isolamento e a seleção de substâncias com potencial antioxidante acentuado quando testadas em bioensaios.

- A substância floretina (**7**) mostrou-se capaz de induzir apoptose em células de melanomas humanos transformados M14, não apresentando a mesma atividade sobre células embrionárias humanas de rim HEK-293.

- Entre as atividades observadas para os extratos brutos em testes contra 4 linhagens de fungos patógenos em humanos, destacaram-se aquelas obtidas a partir do extrato etanólico de folhas de *L. sidoides* (EEFLsid), espécie utilizada popularmente por suas propriedades anti-sépticas. Já entre substâncias, a mistura dos isômeros **12a**, **12b**, **13a** e **13b** apresentou a menor média de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) contra as 4 linhagens de fungos testadas, embora as atividades mais pronunciadas foram observadas para a diidrochalcona asebogenina (**2**) e para o fenilpropanóide verbascosídeo (**11**) contra *Cryptococcus neoformans*, com CIM iguais a 15,6 µg/mL.

Pelo exposto, fica evidente a importância de estudos fitoquímicos planejados de forma a contemplar as atividades de bioprospecção que, neste caso, resultaram em aprofundamento no conhecimento do perfil químico dos extratos de diversas partes da planta para 6 espécies de *Lippia*, em especial para a *Lippia salviaefolia* Cham. Esses avanços, associados à descoberta de bioatividades atrativas de frações semipurificadas ou substâncias puras para eventual desenvolvimento de produtos

úteis à saúde, ganham especial destaque por estarem alicerçados na estratégia de aproveitamento da biodiversidade de maneira sustentável.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- AN, R. et al. Cytoprotective constituent of *Hovenia lignum* on both Hep G2 cells and rat primary hepatocytes. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30, n. 6, p. 674-677, 2007.
- ANDARY, C. et al. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugars esters from orobanche rapum-genistae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1123-1127, 1982.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374-378, 2005.
- ARROO, R. R. J. et al. Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: dietary flavonoids. **Phytochem. Rev.**, v. 8, p. 375-386, 2009.
- ATAS, L. Atenção à pobreza. **Rev. Pesq. Fapesp**, v. 91, 2003. Disponível em: <www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acesso em: 2 dez. 2005.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.
- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 7-8, p. 21-34, 1998.
- BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignments of new [C7-OC7]-biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Magn. Res. Chem.**, v. 43, p. 334-338, 2005.
- BARBOSA, F. G. et al. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 34, p. 819-821, 2006.
- BERNONVILLE, T. D. et al. Dihydrochalcones: implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. **Phytochemistry**, v. 71, p. 443-452, 2010.
- BIDLINGMEYER, B. A. (Ed.). **Preparative liquid chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- BILIA, A. R. et al. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 46, p. 463-470, 2008.
- BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids, an updated review. Part I. **J. Nat. Prod.**, v. 53, n. 5, p. 1055-1147, 1990.

- BORS, W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 343-355, 1990.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 349-356, 2007a.
- BOTELHO, M. A. et al. Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 15, p. 175-180, 2007b.
- BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 471-478, 2007c.
- BOTELHO, M. A. et al. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 1214-1219, 2009.
- BRANDÃO, A. D. et al. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **J. Plant. Res.**, v. 120, p. 317-321, 2007.
- BULZOMI, P. et al. Naringenin and 17 β -estradiol coadministration prevents hormone-induced human cancer cell growth. **IUBMB Life**, v. 62, n. 1, p. 51-60, 2010.
- CACCAMESE, S.; MANNA, L.; SCIVOLI, G. Chiral HPLC separation and CD spectra of the C-2 diastereomers of naringin in grapefruit during maturation. **Chirality**, v. 15, p. 661-667, 2003.
- CACCAMESE, S.; CHILLEMI, R. Racemization at C-2 of naringin in pummel (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 1089-1093, 2010.
- CALDWELL, C. G. et al. Oleanane triterpenes from *Junellia tridens*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1611-1614, 2000.
- ÇALIS, I. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. **Phytochemistry**, v. 3, p. 3624-3626, 1992.
- ÇALIS, I. et al. Secondary metabolites of *Phlomis viscosa* and their biological activities. **Turk. J. Chem.**, v. 29, p. 71-81, 2005.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CANTRELL, C. I.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimucobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, p. 685-694, 2001.

- CAO, X. et al. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, p. 495–505, 2007.
- CARDOSO, C. L. et al. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1882-1885, 2004.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 98, p. 569-571, 2003.
- CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes egypti* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.
- CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of Lippia sidoides essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Techn.**, v. 101, p. 829-832, 2010.
- CAVALHEIRO, A. J. **Teoria e método de separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos**. Araraquara: Instituto de Química/UNESP, 2006. Apostila.
- CHANG, C. L. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquesetinervius*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 271-279, 2010.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAN, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chem.**, v. 92, p. 491-497, 2005.
- CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 7429-7436, 2006.
- CIOFFI, G. et al. Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1061-1064, 2003.
- CLARCK, T. A. et al. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Curr. Opin. Infec. Dis.**, v. 15, p. 569-574, 2002.
- CLARK-LEWIS, J. W. Flavan derivatives. XXI. Nuclear magnetic resonance spectra, configuration, and conformation of flavan derivatives. **Aust. J. Chem.**, v. 21, p. 2059-2075, 1968.
- COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: new sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chem.**, v. 98, p. 649-657, 2006.
- CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J. da; DONATE, P. M. **Fundamentos de química experimental**. São Paulo: Ed. USP, 2004.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery-a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

COSTA, M. et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Part II. **J. Ethnopharmacol.**, v. 27, p. 25-33, 1989.

COSTA, S. M. O. et al. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 792-795, 2001.

COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, p. 66-67, 2002. Supl.

COSTA, S. M. O. et al. Constituents of the essential oil of *Lippia microphylla* Cham. from Northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, p. 378-379, 2005.

COX, D. A.; COHEN, M. J. Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n. 1, p. 3-17, 1996.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos. In. YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2007.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae - genus *Lippia*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 598-601, 1981.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 1, p. 135-159, 2001.

DAMTOFT, S.; JENSEN, R. S.; NIELSEN, B. J. ¹³C and ¹H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2717-2732, 1981.

DELAZAR, A. et al. Antioxidant phenylethanoid glycosides from the rhizomes of *Eremostachys glabra* (Lamiaceae). **Biochem. System. Ecol.**, v. 33, p. 87-90, 2005.

DIDRY, N. et al. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, p. 197-202, 1999.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007.

DOMINGUEZ, X. A. et al. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. **Planta Med.**, v. 55, p. 208-209, 1989.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DURIGAN, G. et al. **Plantas do Cerrado paulista**: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras, 2004.

ENDO, K. et al. Structure of forsythoside B, an antibacterial principle of *Forsythia coreana* stems. **Heterocycles**, v. 19, p. 261-264, 1982.

ESPOSITO, E. et al. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 381, p. 93-105, 2010.

FABRIS, S. et al. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. **Biophys. Chem.**, v. 135, p. 76-83, 2008.

FARAG, S. M. et al. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sissoo*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1263-1268, 2001.

FATOPE, M. O. et al. Larvicidal activity of extracts and triterpenoids from *Lantana camara*. **Pharm. Biol.**, v. 40, p. 564-567, 2002.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **J. Antim. Chemother.**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FRIGHETTO N. et al. *Lippia alba* Mill N.E.Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **J. Essent. Oil Res.**, v. 10, p. 578-580, 1998.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 178-182, 2005.

FUNES, L. et al. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 163, p. 190-199, 2010.

GAFFIELD, W. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of 3-hydroxyflavanones and their lycosides. Determination of aglycone chirality in flavanone glycosides. **Tetrahedron**, v. 26, p. 4093-4108, 1970.

GAFFIELD, W. et al. C-2 stereochemistry of naringin and its relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit. **Bioorg. Chem.** V. 4, p. 259-269, 1975.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GALLUZZO, P. et al. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α -palmitoylation. **Endocrinol.**, v. 149, n. 5, p. 2567-2575, 2010.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 477-480, 2004.

GEISS, F. **Fundamentals of thin layer chromatography**. Heidelberg: Hüethig, 1987.

GEL-MORETO, N.; STREICH, R.; GALENSA, R. Chiral separation of six diastereomeric flavanone-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and analysis of lemon juice. **J. Chromatogr. A**, v. 925, p. 279-289, 2001.

GILGUN-SHERKI, Y. et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

GIRÃO, V. C. C. et al. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham. essential oil in dogs with mild gingival disease. **Prev. Vet. Med.**, v. 59, p. 95-102, 2003.

GRATA, E. et al. UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: a sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. **J. Chromatogr. B**, v. 871, p. 261-270, 2008.

HAGE, C. A. et al. Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. **Eur. J. Med. Res.**, v. 15, p. 236-242, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now ?. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HAN, X. H. et al. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30, p. 13-17, 2007.

HENNEBELLE, T. et al. Phenolics and iridoids of *L. alba*. **Nat. Prod. Comm.**, v. 1, n. 9, p. 727-730, 2006a.

HENNEBELLE, T. et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chem. Biodiversity**, v. 3, p. 1116-1125, 2006b.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HEILMANN, J. et al. Radical scavenger activity of phenylethanoid glucosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationship. **Planta Med.**, v. 66, p. 746-748, 2000.

HERMOSO, A. et al. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 3975-3980, 2003.

- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027-1031, 2002.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003.
- HUFFORD, C. D.; OGUNTMEIN, B. O. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2036-2038, 1980.
- HURABIELLE, M.; EBERLE, J.; PARIS, M. Flavonoids of *Artemisia campestris*, ssp. *Glutinosa*. **Planta Med.**, v. 46, p. 124, 1982.
- HURST, W. J. et al. Survey of the *trans*-resveratrol and *trans*-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 8374-8378, 2008.
- IBERN-GOMEZ, M. et al. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 6352-6354, 2000.
- JELLER, A. H. et al. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheilochlinum cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, p.1977-1982, 2004.
- JENSEN, S. R. et al. Structural revision of some recently published iridoid glucosides. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 29-32, 2007.
- JEON, S. H. et al. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 8, p. 978-982, 2008.
- JERKOVIC, V.; COLLIN. S. Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8754-8758, 2007.
- JEZ, J. M. et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 7, p. 786-791, 2000.
- JUDD, W. S. et al. **Plant systematics – a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.
- KANEDA, N. et al. (+)-4P-hydroxyhernandulcina, new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 8. p. 1130-1141, 1992.
- KANG, J. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chem.**, v. 122, p. 610-617, 2010.
- KIM, X. Phloretin induces apoptosis in H-Ras MCF10A human breast tumor cells through the activation of P53 via JNK and P38 mitogen-activated protein kinase signaling. Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways: **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. 479-483, 2009.

- KRULL, R. E. Iridoid glycoside biosynthesis in penstemon secundiflorus. Another H-5, H-9 trans-iridoid glycoside. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1605-1608, 1998.
- KUO, Y. J. et al. Flavanone and diphenylpropane glycosides and glycosidic acyl esters from *Viscum Articulatum*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 109-114, 2010.
- KWAK, J. H. Cytotoxic phenolic compounds from *Chionanthus retusus* Arch. **Pharm. Res.**, v. 32, n. 12, p. 1681-1687, 2009.
- LACOSTE, E. et al. Antiseptic properties of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Ann. Pharma. Franç.**, v. 54, p. 228-230, 1996.
- LEE, S. et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. **BMB Rep.**, v. 42, p. 265-270, 2009.
- LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytother. Res.**, v. 4, p. 82-84, 1990.
- LEMOS, T. L. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.
- LEMOS, T. L. G. et al. Total assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of tectol and tecomaquinone I. **Magn. Reson. Chem.**, v. 37, p. 908-911, 1999.
- LIN, L. Z. et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **J. Food Comp. Anal.**, v. 20, p. 361-369, 2007.
- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.
- LIU, Q.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J. Additional flavonoids from elicitor-treated cell cultures of cephalocereus senilis. **Phytochemistry**, v. 34, p. 167-170, 1993.
- LIU, R.; WU, S.; SUN, A. Separation and purification of four chromones from *Radix saposhnikovia* by high-speed counter-current chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 19, p. 206-211, 2008.
- LOBO, I. Biopirataria dá prejuízo de US\$ 1 bilhão por ano ao Brasil. **Agência Brasil**, 2003. Disponível em: <<http://www.radiobras.gov.br>>. Acesso em: 11 set. 2003.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. **Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents**, v. 2, p. 691-714, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 263-267, 2000.

LU, L. et al. Screening of complex natural extracts by countercurrent chromatography using a parallel protocol. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 4048-4059, 2009.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACAMBIRA, L. M. A. et al. Naphtoquinoids from *Lippia sidoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 49, p. 310-312, 1986.

MAHATO, S. B.; KUNDO, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAIA, J. G. S. et al. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. **Flav. Frag. J.**, v. 18, p. 417-420, 2003.

MAIA, J. G. S. et al. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, p. 676-680, 2005.

MALTESE, F. et al. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. **Food Chem.**, v. 116, p. 575-579, 2009.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MARTIN-NIZARD, F. et al. Natural phenylpropanoids protected endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. **Planta Med.**, v. 69, p. 207-211, 2003.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 198-206, 2006.

MATOS, F. J. A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 695-698, 1996.

MATOS, F. J. A. et al. Medicinal plants of northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillis* H.B.K. (Verbenaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, p. 666-668, 1999.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas – sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: Ed. UFC, 2002.

MATSUDA, H. et al. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 6048-6053, 2009.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MILES, C. O.; MAIN, L. Kinetics and mechanism of the cyclisation of 2,6-dihydroxychalcone and derivatives. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II**, n. 11, p. 1623-1632, 1989.

MIZUNO, M. et al. Phenolic constituents of *Coptis japonica* Var. Dissecta. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2071-2074, 1987.

MOREL, C. M. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **Eur. Mol. Biol. Org. Reports.**, v. 4, p. S35-S38, 2003.

MORENO-LABANDA, J. F. et al. Determination of piceid and resveratrol in spanish wines deriving from monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 5396-5403, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais, p. 183-207. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M27-A2**: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd ed. Wayne, 2002.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutr. Cancer.**, v. 50, n. 1, p.1-7, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Santos, 2010.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina - Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 103-108, 2006.

- OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. **Food Chem.**, v. 101, p. 236-240, 2007.
- OLIVEIRA, F. P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 510-516, 2006.
- OLIVEIRA, R. A. G. et al. Study of the interference of essential oils on the activity of some antibiotics used clinically. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 77-82, 2006.
- ONO, M. et al. Bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1417-1420, 2005.
- ONO, M. et al. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from aerial parts of *Lippia triphylla*. **J. Nat. Med.**, v. 62, p. 101-106, 2008.
- ORSINI, F. et al. Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside and related compounds. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 1082-1087, 1997.
- PAN, J. et al. Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucreta* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. **J. Chromatogr. A**, v. 1185, p. 117-129, 2008.
- PARK, S. Y. et al. Induction of apoptosis in HT-29 colon cells by phloretin. **J. Med. Food**, v. 10, n. 4, p. 581-586, 2007.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PHAM H. C.; KOFFI, Y.; PHAM H. C. A. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. **Planta Med.**, v. 54, n. 4, p. 294-296, 1988.
- PESSOA, O. D. L. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *gracillis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 712-714, 2005.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4487-4490, 1998.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PLOCHMANN, K. Structure–activity relationships of xavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 460, p. 1-9, 2007.
- PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia-Hipogoea*). **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 61, p. 1064-1067, 1984.

- PUNGITORE, C. R. et al. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **J. Stor. Prod. Res.**, v. 41, p. 433-443, 2005.
- RAMSEWAK, R. S.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Curcumins I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 303-308, 2000.
- REGASINI, L. O. **Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcalóides guanidínicos e análogos**. 2008. 232 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chem. Biol.**, v. 2, n. 12, p. 701-710, 2006.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RIGANO, D. et al. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. **Chem. Biol. Interact.**, v. 15, n. 180, p. 211-219, 2009.
- ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. **J. Leukoc. Biol.**, v. 47, p. 440-448, 1990.
- ROMERO-PÉREZ, A. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 4, p. 1533-1536, 1999.
- SABZEVARI, O. et al. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. **Chem. Biol. Interact.**, v. 148, p. 57-67, 2004.
- SALIMENA, F. R. G. New synonyms and typifications in *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, p. 121-125, 2002.
- SANDRA, P. et al. Green chromatography (Part 1): introduction and liquid chromatography. **LCGC Chromatographyonline.com**, v. 23, n. 5, 2010. Disponível em: <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=667049>>. Acesso em: 6 ago. 2010.
- SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. O contexto brasileiro para a bioprospecção. **Biotec. Ciência Desenvolv.**, v. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 12 dez. 2004.
- SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia organoides* H.B.K. **J. Essent. Oil Res.**, v. 16, p. 504-506, 2004.

SANTOS, A. K. L. et al. Spectral assignments and reference data. Total assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of isocatalpanol and a derivative of tecomaquinone. **Magn. Res. Chem.**, v. 43, p. 582-584, 2005.

SASAKI, H. et al. The constituents of *Ledebouriella seseloides* Wolff. I. Structures of three new chromones. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 3555-3562, 1982.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the paraguayan crude drug "Tayi" Pyta" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). **Z. Naturforsch.**, v. 58, p. 495-501, 2003.

SCHULTZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Rational phytotherapy**. 4th ed. Berlin: Springer, 2000.

SCORZONI, L. et al. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* spp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p. 25-34, 2007.

SENA FILHO, J. G. et al. Distribution of iridoid glycosides in plants from the genus *Lippia* (Verbenaceae): an investigation of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Nat. Prod. Comm.**, v. 2, p. 715-716, 2007.

SENA FILHO, J. G. et al. Phenylethanoid and lignan glycosides from polar extracts of *Lantana*, a genus of verbenaceous plants widely used in traditional herbal therapies. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 1344-1347, 2009.

SHEN, Z.; THEANDER, O. Flavonoid glycosides from needles of *Pinus massoniana*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 155-158, 1985.

SHOEB, M. et al. Epoxylic lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). **Biochem. System. Ecol.**, v. 32, p. 1201-1204, 2004.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos** - plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação, 2003.

SILVA, B. P. da; VELOZO, L. S. M.; PARENTE, J. P. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 663-667, 2000.

SILVA, D. H. S. et al. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**, v. 57, p. 437-442, 2001.

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, N. A. et al. Chemical characterization of essential oil from erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) grown in Ilheus, Bahia State - Brazil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 8, p. 52-55, 2006.

SILVA, V. C. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 2007. 330 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2177-2215, 2005.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical CLAE method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 468-472, 2002.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, p. 245-250, 2007.

TAI, B. H. et al. Total peroxynitrite scavenging capacity of phenylethanoid and flavonoid glycosides from the flowers of *Buddleja officinalis*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 12, p. 1952-1956, 2009.

TAOUBI, K. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*. **Planta Med.**, v. 63, p. 192-193, 1997.

TAVARES, E. S. et al. Kinetin enhanced linalool production by *in vitro* plantlets of *Lippia alba*. **J. Essent. Oil Res.**, v. 16, p. 405-408, 2004.

TAVARES, E. S. et al. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 1-5, 2005.

TEBORG, D.; JUNIOR, P. Iridoid glucosides from *Penstemon nitidus*. **Planta Med.**, v. 57, n. 2, p. 184-186, 1991.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – a literature review. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 471-485, 1996.

THOMSON, R. H. **Natural occurring quinines III: recent advances**. 3rd ed. London: Chapman and Hall, 1987.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J. Chromatogr. B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

TUNDIS, R. et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 8, p. 399-420, 2008.

UGAZ, O. L. de. **Investigación fitoquímica**: metodos en el estudio de productos naturales. Lima: Pontificia Universidad Catolica del Peru, 1994.

VENTURELLA, P. et al. Aurapin, a new dihydroflavonol glycoside and other flavonoids from *Acinosalpinus*. **Heterocycles**, v. 14, p. 1979-1982, 1980.

VALE, T. G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **J. Ethnopharmacol.**, v. 167, p. 127-133, 1999.

VIANA, G. S. B. et al. Anticonvulsant activity os essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.

VICCINI, L. F. et al. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. **Plant Syst. Evol.**, v. 246, p. 1-8, 2004.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant System. Evol.**, v. 256, p. 171-178, 2006.

VOGT, C. Fármacos e medicamentos: urgências. **Comciência**, v. 25, 2001.
Disponível em: <www.comciencia.br>. Acesso em: 15 maio 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

WANG, H. et al. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. **Brain Res.**, v. 1283 , p. 139-147, 2009.

WANG, K.; ZHANG, Y. J.; YANG, C. New phenolic constituents from *Balanophora polyandra* with radical-scavenging activity. **Chem. Biod.**, v. 3, p. 1317-1324, 2006.

WISTUBA, D. et al. Stereoisomeric separation of flavanones and flavanone-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and determination of interconversion barriers. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 3424-3433, 2006.

WILLIAMS, D.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 3rd ed. London: MacGraw-Hill, 1980.

WILLIAMS, R. B. et al. Two new cytotoxic naphthoquinones from *Mendoncia cowanii* from rainforest of Madagascar. **Planta Med.**, v. 72, p. 564-566, 2006.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO police perspectives on medicines**. Geneva, 2002.

- WU, C. et al. *In vitro* and *in vivo* study of phloretin induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transfer. **Int. J. Cancer.**, v. 124, p. 2210-2219, 2009.
- WU, J. et al. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. **Magn. Reson. Chem.**, v. 42, p. 659-662, 2004.
- YANG, K. C. et al. Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human Hep G2 cells. **Mol. Carcinog.**, v. 48, p. 420-431, 2009.
- YAO, H. et al. Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of *Viscum coloratum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 1, p. 133-135, 2006.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In. YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2007.
- YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, n. 11, p. 1683-1693, 2004.
- ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melissa). **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 207-215, 2002.
- ZHAO, J. et al. Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by bacillus calmette-guerin plus lipopolysaccharide. **Planta Med.**, v. 75, p. 1463-1469, 2009.
- ZHOU, S.; HAMBURGER, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis evaluation and optimization of eletrospray and heated nebulizer interfaces. **J. Chromatogr. A**, v. 755, p. 189-204, 1996.
- ZHU, Q. Natural polyphenols as direct trapping agents of lipid peroxidation-derived acrolein and 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 1721-1727, 2009.
- ZOGHBI, M. G. B. et al. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. growing wild in the Brazilian Amazon. **Flav. Frag. J.**, v. 13, p. 47-48, 1998.
- ZOGHBI, M. G. B. et al. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. **Flav. Frag. J.**, v. 17, p. 29-31, 2002.