

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lippia  
origanoides* KUNTH (VERBENACEAE)**

**SILVANNE DA SILVA SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO-2017**

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lippia  
origanoides* KUNTH (VERBENACEAE)

**Silvanne da Silva Santos**  
Licenciada em Química  
Universidade Estadual da Bahia, 2014

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias.

**Orientadora:** Profa. Dra. Franceli da Silva  
**Coorientadora:** Profa. Dra. Caline Ferraz

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO-2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237e

Santos, Silvanne da Silva.

Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Lippia origanoides* kunth (verbenaceae) / Silvanne da Silva Santos. \_ Cruz das Almas, BA, 2017.

119f.; il.

Orientadora: Franceli da Silva.

Coorientadora: Caline Gomes Ferraz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.

1.Plantas medicinais – Farmacologia. 2.Plantas medicinais – Extratos vegetais/uso terapêutico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. II.Título.

CDD: 615.532

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE)**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
Silvanne da Silva Santos**

Realizada em 17 de Agosto de 2017

Profa. Dra. Franceli da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Interno (Orientadora)

Profa. Dra. Cintia Armond  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB  
Examinador Interno

Prof. Dr. José Alberto Pereira  
Instituto Politécnico de Bragança / IPB  
Examinador Externo

Dedico...

À minha mãe Elionai (*In Memoriam*) por  
todo amor a mim concedido.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado.

À minha orientadora Dra Franceli, pela compreensão, momentos de discussões e ensinamentos, apoio, conselhos e por contribuir no meu crescimento profissional. A coorientadora, Dra Caline Gomes Ferraz, pelo auxílio, dedicação e atenção, e a Dra Rozimar de Campos Pereira por todo o apoio, motivação e contribuições.

Aos funcionários do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) Dr. Mauricio Luis Sforça e Dra Silvana Aparecida Rocco pela disponibilidade e colaboração na realização da análise espectroscópica, RMN de  $^1\text{H}$ . Ao Professor Dr. Frederico Guaré Cruz da Universidade Federal da Bahia (UFBA) pela oportunidade e disponibilidade de estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

À Dra Simone Teles, pela amizade, ensinamentos na condução do trabalho.

À equipe do Laboratório de Fitoquímica (GEPLAM) da UFRB, em especial Mariane, Rosimar, Jamile e Sara, pelo apoio na realização das análises.

Ao Técnico Fabricio Miranda da UFRB pelo auxílio na realização das análises no (HPLC).

À minha família, por ser à base da minha persistência e motivação e compreender a ausência, acreditando no meu potencial. À minha mãe (Elionai) (*in memoriam*) pelos ensinamentos e carinho e aos meus irmãos (João, Silvinho, Carlinhos) que apoiaram as minhas decisões e também me fizeram acreditar na possibilidade de crescer profissionalmente. Aos meus sobrinhos (Poliana e Davi) por tornarem os dias mais alegres.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e me motivaram com palavras positivas.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Lippia organoides</i> KUNTH (VERBENACEAE).....</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Compostos fenólicos e atividade antioxidante de <i>Lippia organoides</i> KUNTH (VERBENACEAE).....</b>	<b>89</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>111</b>

## **ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE)**

Autora: Silvanne Da Silva Santos

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

**RESUMO:** A espécie *Lippia origanoides* Kunth conhecida popularmente como “alecrim-pimenta”, possui potencial terapêutico é usada em medicina tradicional no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias. O objetivo deste trabalho foi estudar os constituintes químicos e avaliar a atividade antioxidante dos extratos de caule e folhas de *L. origanoides*. O perfil químico foi obtido de técnicas cromatográficas de fracionamento, separação e purificação: cromatografia de coluna, cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O isolamento dos constituintes químicos foi realizado utilizando-se métodos cromatográficos e a identificação dos compostos foi feita através de análise espectroscópica, tais como, RMN de <sup>1</sup>H. Foram isolados e identificados do extrato de caule e folha de *Lippia origanoides* onze compostos da classe dos terpenos, sendo um monoterpreno e seu derivado (carvacrol e carvacrol metilado) três esteroides tetracíclico ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitostetona), cinco triterpeno pentacíclico (friedelina, lupeol,  $\beta$ - amirina, friedelinol, betulinaldeído) e éster metílico, -9,12- octadecadienoato de metila. A atividade antioxidante foi mensurada frente aos radicais livres DPPH e ABTS, além da determinação do teor total de fenólicos. O extrato de acetato de etila folha apresentou maior teor total de fenólicos: ácidos hidroxicinâmicos (195,36 $\pm$ 1,95), flavonoides (261,79 $\pm$ 1.25) e fenóis (375,63 $\pm$ 1,43). Os resultados do ensaio DPPH revelaram que o extrato de acetato de etila da folha apresentou menor CE<sub>50</sub>. Já no método ABTS, o extrato metanólico folha apresentou menor CE<sub>50</sub>, todavia não diferiu estaticamente dos outros extratos.

**Palavras chave:** Triagem fitoquímica, atividade antioxidante, constituintes químicos.



## PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIPPIA ORIGANOIDES KUNTH (VERBENACEAE)

Author: Silvanne Da Silva Santos

Advisor: Franceli da Silva

**ABSTRACT:** The species *Lippia origanoides* Kunth has therapeutic potential, popularly known as rosemary-pepper and used in traditional medicine in the treatment of gastrointestinal and respiratory diseases. The objective of this work was to study the chemical constituents and evaluate the antioxidant activity of *L. origanoides* stem and leaf extracts. The chemical profile was obtained from chromatographic techniques of fractionation, separation and purification: column chromatography, comparative thin layer chromatography (CCDC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Isolation of the chemical constituents was performed using chromatographic methods and the structural elucidation of the compounds was done by spectroscopic analyzes, such as,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, uni and bidimensional experiments. Eleven compounds of the terpene class were isolated and identified from the stem and leaf extract of *Lippia origanoides*, two monoterpenes (carvacrol and methylated carvacrol), two tetracyclic steroids ( $\beta$ -Sitosterol and stigmasterol), six pentacyclic triterpene (Friedelina, Lupeol,  $\beta$  Amirin, friedelinol, betulinaldehyde and  $\gamma$ -sitostetone) and methyl ester, methyl 9-octadecadienoate. The antioxidant activity was measured against free radicals DPPH and ABTS, in addition to the quantification of phenolic compounds content. The extract of ethyl acetate leaf presented higher content of total phenolic compounds: hydroxamic acids ( $195.36 \pm 1.95$ ), flavonoids ( $261.79 \pm 1.25$ ) and phenols ( $375.63 \pm 1.43$ ). The results of the DPPH assay revealed that the ethyl acetate extract from the leaf showed lower EC<sub>50</sub>. In the ABTS method, the leaf methanolic extract had a lower EC<sub>50</sub>, but did not differ statically from the other extracts.

**Key words:** Phytochemical screening, antioxidant activity, chemical constituents.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Plantas medicinais

No Brasil, os recursos vegetais encontram-se distribuídos em biomas com características diversas de clima e solo, como a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, o Cerrado, o Pantanal e a Caatinga (BRITO, BRITO, 1993), sendo incipientes os estudos químicos e farmacológicos. Dentre estes biomas, a caatinga (exclusivamente Brasileiro) apresenta uma variedade de espécies vegetais com constituintes químicos, principalmente compostos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes, antibacteriana e vasodilatadora (MOURA, 2013; BETANCURT et al., 2016).

Segundo a ANVISA, plantas medicinais são todas as espécies vegetais que nos seus órgãos apresentam grupos químicos com ação terapêutica. O uso de espécies medicinais encontra-se cada vez mais disseminado pela comunidade, devido ao potencial medicinal na prevenção e tratamento de diversas doenças, no entanto, as propriedades farmacológicas estão relacionadas à composição química dos metabólitos secundários (MARIANI et al., 2017).

As espécies medicinais produzem ativos com grande diversidade estrutural, que são extraídos por diversas técnicas e posteriormente utilizados na indústria farmacológica devido às inúmeras propriedades biológicas, citotóxica, antitumoral, antiparasitária, inseticida e antimalarial. Sendo assim, o mercado de plantas proporciona aos países subdesenvolvidos e desenvolvidos lucros satisfatórios.

A utilização de espécies vegetais com propriedades medicinais representa uma alternativa eficaz no tratamento de doenças, pois, apresenta atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2013), antiviral (SANNA et al., 2015), anti-inflamatória (JEONG et al., 2015), analgésica e broncodilatadora (SOUZA et al., 2015; FRANCISCONI, 2015), onde , as estimativas apontam que metade do medicamento existente no mercado provém de fontes naturais (CALIXTO, 2003; NEWMAN et al., 2007).

Com base no exposto, as plantas medicinais apresentam diversos fins terapêuticos, ocasionados pela variedade de moléculas biologicamente ativas que apresentam potencial farmacológico e servem de modelo para síntese de novas substâncias ativas.

## **Metabolismo secundário**

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade cerca de 20% do total de espécies do planeta. Esse patrimônio genético tem valor econômico-estratégico no desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN et al., 2007; ZHU et al., 2011), entretanto, a grande variedade de metabólitos secundários existentes nas espécies vegetais acarreta um número diversificado de compostos químicos com potencial farmacológico (KINGSTON, 2011).

De acordo com a literatura, existem dois tipos de metabólitos originados de processos biossintéticos: primários e secundários (especializado). Os primários macromoléculas - hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas, lipídios, peptídeos e glicídeos são grupos químicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de todas as espécies vegetais, essenciais nos processos de respiração e fotossíntese, todavia, os secundários são os responsáveis pelas atividades biológicas e adaptação das espécies vegetais aos seus ambientes, presentes em concentrações baixas (SIMÕES, 2009;TAIZ et al., 2013).

Os metabólitos secundários (micromoléculas) são os constituintes químicos das espécies vegetais, responsáveis pelas propriedades medicinais. A classe de compostos químicos a que pertence está relacionado à estrutura química e as vias biossintéticas (KABERA et al., 2014; TAIZ et al., 2013), sendo sintetizados para preservação dos vegetais (SIMÕES,2003). Desta forma, o metabolismo é conjunto das transformações das moléculas orgânicas ocorridas por meio de reações enzimáticas que proporciona energia as espécies vegetais (PEREIRA et al., 2012), onde espécies iguais possuem metabólitos diferentes (SILVA, 2016).

Os metabólitos secundários que sofrem variação a depender da espécie, não se encontram de maneira semelhante nas flores, folhas, raízes, sementes, frutos e casca (ANDERSON et al., 2010), entretanto, o teor e a composição modificam de acordo as variações ambientais, idade, genética, horário de colheita, dentre outros fatores. Sendo exemplos de classes de substâncias: os alcaloides, saponinas, cumarinas, ácidos fenólicos, flavonoides, óleos essenciais, quinonas, taninos e terpenos (CARDOSO et al., 2010).

Os alcaloides, saponinas, cumarinas e taninos (sabor adstringente, encontrados em frutos verdes) apresentam funções de defesa nas espécies vegetais. Os taninos, por exemplo, protegem as plantas contra o ataque de

herbívoros, bactérias, fungos, vírus e insetos, preservando o fruto até o desenvolvimento da semente, enquanto, os flavonoides protegem as espécies vegetais contra os raios ultravioletas e possuem atividades antioxidantes (BARREIROS, 2016). Os metabólitos secundários oriundos de espécies vegetais têm apresentado uma atividade biológica contra bactérias que são resistentes a fármacos (MIRANDA et al., 2015).

Sendo assim, o isolamento, identificação e determinação estrutural de moléculas bioativas presentes em espécies vegetais com potencial terapêutico vêm despertando o interesse da comunidade científica. Através da utilização dos princípios ativos é produzida uma quantidade significativa de fármacos com baixa toxicidade e efeitos colaterais mínimos.

### **Técnicas de extração de constituintes metabólicos**

A extração consiste na separação de misturas complexas dos constituintes metabólicos presentes nas espécies vegetais. A extração dos compostos bioativos presentes nas espécies medicinais representa uma tarefa desafiadora para os pesquisadores (TIWARI et al., 2011). As técnicas de extração representam a etapa onde os constituintes químicos são extraídos com auxílio de solventes que apresentam polaridade crescente, listados na Tabela 01.

Tabela 01. Solventes utilizados na extração de substâncias

<b>Solvente</b>	<b>Tipos de substâncias extraídas</b>
Éter de petróleo, hexano:	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas;
Tolueno, diclorometano, clorofórmio:	Bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos;
Acetato de etila, n-butanol:	Flavonóides e cumarinas simples;
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral;
Misturas hidroalcoólicas, água:	Saponinas, taninos; Flavonóides
Água acidificada:	Alcalóides;
Água alcalinizada:	Saponinas;

Fonte: Simões et al., 2003

Diante disso, a extração representa um método de obtenção de ativos, utilizando solventes orgânicos relacionados com a solubilidade da espécie vegetal e característica físico-química do grupo químico (CARVALHO et al., 2015). Sendo a percolação (método de extração a frio), decocção, Soxhlet (método de extração a quente), arraste com vapor, maceração, infusão, capacetes de pressão e fluidos supercríticos, técnicas de extração de princípios ativos (THOMA et al., 2001).

Na percolação o solvente flui em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal. Na decocção o material vegetal é mantido em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição, utilizada com restrição em ativos que alteram suas estruturas químicas devido ao aquecimento. No aparelho de Soxhlet extrai substâncias com solventes voláteis. Neste procedimento de extração, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, possibilitando uma extração altamente eficiente, além da utilização reduzida de solvente (SKOOG, 2009). A maceração é realizada num recipiente fechado, onde o material vegetal é armazenado com solvente durante dias ou horas, posteriormente, sendo renovado o líquido extrator. (SIMOES et al., 2009).

Portanto, quando executamos uma única extração utilizamos solvente polar (metanol e etanol), mais de uma extração solvente apolar (hexano, éter de petróleo) e solvente de polaridade moderada (clorofórmio) (MACIEI et al., 2002). Sucessivas técnicas de extração têm corroborado na obtenção de extratos com composição e funcionalidades diferentes, além do rendimento do extrato.

### **Extrato bruto de espécies vegetais**

Os extratos brutos são preparações concentradas de plantas, obtidos pela estabilização, secagem ou moagem e adição de um solvente (GIORDANI et al., 2015; SANTOS et al., 2013). Apresenta aspecto oleoso, viscoso, sendo preparado com a utilização dos solventes orgânicos com diferentes polaridades: acetato de etila, acetona, água, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, éter de petróleo, hexano, metanol, metiletilcetona, *n* – butanol e *n* – propanol. Os metabólitos presentes nos extratos apresentam interação intermolecular com a fase móvel e fase estacionária. (SKOOG et al., 2002).

A partir do extrato bruto, obtêm-se frações por meio da técnica de cromatografia de coluna sílica gel, utilizando uma fase móvel e estacionária, essas

frações são responsáveis por diversos compostos químicos isolados. O extrato bruto de espécies vegetais representa uma alternativa promissora ao controle de fitopatógeno, que pode ser utilizado em substituição aos produtos sintéticos que causam dano ao homem e meio ambiente (SANTOS et al., 2013).

O uso de extratos constitui alternativas terapêuticas, onde o conhecimento pela população da ação farmacológica dos princípios ativos é essencial (SIRQUEIRA et al., 2014). Todavia, o uso de espécies medicinais e uma possível interação medicamentosa devem ser alertados à população. Os extratos são utilizados na proteção das plantas, atuando como: inseticidas, fungicidas, herbicidas e nematicidas (SANTOS et al., 2013).

Diante disso, os extratos metanólicos e acetato de etila, da *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) apresentaram atividade antimicrobiana para: *Klebsiela pneumonia* (ATCC 10031), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), por conseguinte, o extrato metanólico obtido das folhas da espécie de *L. origanoides* também apresentou atividade antimicrobiana (fungos e bactérias) (PINTO et al., 2013).

Sendo assim, os extratos de espécies vegetais apresentam atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-neoplásica. Os extratos obtidos de produtos vegetais possuem moléculas bioativas com diferentes estruturas utilizadas na síntese de fármacos.

### **Atividade antioxidante dos extratos**

Segundo a ANVISA (1961), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de oxidação, impedindo o efeito negativo dos radicais livres. Estes responsáveis pelas doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer. Os antioxidantes são classificados como, primários, sinergistas, removedores de oxigênio e mistos (BAYLEY, 1996).

Os antioxidantes primários removem ou inativam os radicais livres produtos de várias reações como, por exemplo, os compostos fenólicos. Os sinergistas possuem maior atividade antioxidante quando associados aos antioxidantes primários. Os antioxidantes removedores de oxigênio (ácido ascórbico, seus isômeros e derivados) são substâncias que capturam o oxigênio presente no meio.

Os antioxidantes mistos são originados de espécies vegetais (flavonoides) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Desta forma, as espécies vegetais produzem compostos antioxidantes (flavanoides, fenóis), utilizados pelos indivíduos para evitar o processo de oxidação originada por espécies reativas de oxigênio. A utilização de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos é uma alternativa promissora para evitar diversos tipos de doenças crônicas provocada pelos radicais livres (câncer, catarata, derrame, cardíacas, diabetes, parkinson e alzheimer) que acometem à população (PEREIRA et al., 2012; NERYS et al., 2017).

A atividade antioxidante do extrato é determinada através de métodos (DPPH e ABTS) que sequestram os radicais livres. A determinação quantitativa dos métodos baseia-se na variação da absorbância obtida por uma perda da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presente na amostra de extrato. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em metanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução metanólica transparente. A formação do ABTS é ocasionada por uma reação química, eletroquímica e enzimática (NIKI, 2010; SHARMA et al., 2009).

De acordo com registros literários, os extratos podem apresentar atividade antioxidante: alta quando CE50 for menor que 50 µg/ml; moderadamente ativos quando CE50 estiver entre 50 e 100 µg/ml, ligeiramente ativos CE50 entre 100 e 200 µg/ml e inativos CE50 acima de 200 µg/ml. Portanto, algumas espécies vegetais possuem compostos químicos (compostos fenólicos) responsáveis pelas atividades antioxidantes que previnem o estresse oxidativo, evitando um grande número de doenças crônicas e envelhecimento precoce (REYNERTSON et al., 2005; GARMUS et al., 2015).

### **Métodos de separação de constituintes químicos**

Através dos métodos cromatográficos é possível a separação e isolamento de substâncias ativas que apresentam atividades biológicas. O método usado na separação dos constituintes químicos das espécies vegetais é a cromatografia (SKOOG, 1992).A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), a cromatografia em coluna aberta (CC), cromatografia gasosa (CG), cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia com fluido supercrítico (CFS) são técnicas cromatográficas analíticas utilizadas na separação, purificação, isolamento, identificação e quantificação de espécies químicas semelhantes de misturas complexas, onde ocorre a transferência do analito na fase móvel e estacionária (PACHECO et al., 2015).

A cromatografia é extremamente versátil e com grande aplicabilidade (SKOOG, 2009). Com a utilização da técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) é possível obter-se o perfil cromatográfico (constituintes químicos) presentes nas amostras (NASCIMENTO, 2015).

A CCDC é utilizada na separação dos componentes de uma mistura complexa de um vegetal, por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente (sílica), retido na placa de vidro. O fenômeno de adsorção é responsável pelo processo de separação (EWING, 1972).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consiste na separação dos constituintes químicos da amostra, distribuídos na fase móvel e estacionária (SKOOG, 2002; AQUINO et al., 2004), assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria foram utilizadas na identificação de metabólito secundário (flavonoide) do extrato hidroalcoólico de *Lippia origanoides*. A presença da narigenina com propriedade antioxidante confirmou o potencial biológico (COELHO, 2015).

A Cromatografia gasosa (CG) é utilizada na separação de substância volátil, onde a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de gás de arraste (fase móvel). As substâncias que são carregadas pelo gás de arraste interagem de forma distinta com a fase estacionária (coluna cromatográfica), possibilitando a separação, identificação, quantificação dos constituintes químicos. A identificação e quantificação dão-se pela presença de padrões existentes (EWING, 1972). A ressonância magnética nuclear (RMN) constitui uma técnica de identificação de substâncias presentes no extrato vegetal.

De acordo com a literatura, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), corroborado pela cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, permite a identificação dos constituintes pela comparação dos espectros obtidos com os já disponíveis, juntamente com o cálculo de índice de retenção, índice de kovats tabelado e calculado e quantificação de



substâncias com baixo peso molecular (óleos voláteis) (PAWLISZYN,1997; GROB et al., 2004; LIN et al., 2013; LENZ, 2011).

As análises cromatográficas do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae) permitiram a identificação do carvacrol (39,80%), *p*-cimeno (19,59%), *y* terpeno (18,08%) e timol (4,53%), como constituintes majoritários. A identificação dos constituintes químicos é determinada pela comparação dos índices de retenção, em relação ao dos *n* – alcanos C8-C25 e comparação com uma biblioteca de espectros de massas. (MOURA, 2011; TEIXEIRA, 2013).

A separação dos constituintes químicos presentes no material vegetal depende da polaridade dos mesmos e fases (móvel e estacionária). O processo de interação dos compostos químicos com a fase estacionária está associado a interações intermoleculares, dentre as quais se destacam as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido instantâneo (SKOOG, 1992).

O perfil cromatográfico permite elucidar os metabolitos secundários e identificação prévia de substâncias (OLIVEIRA, 2016). De acordo com (UGAZ, 1988), existem reveladores utilizados na análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC) listados na tabela 2.

Tabela 2: Reativos para cromatografia em camada delgada.

<b>Reativos</b>	<b>Metabólitos</b>
Anisaldeído sulfúrico	Esteróides, terpenóides, etc
Vanilina sulfúrica	Esteróides, terpenóides, flavonóides
Sulfato de cério (IV)	Triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos
Cloreto férrico	Fenóis e flavonóides
Cloreto de alumínio	Flavonóides
Ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	Catequinas, esteróides, etc.
Tiocianato de cobalto (II)	Alcalóides e aminas
Reagente de Dragendorf	Alcalóides
Hidróxido de potássio em 10% etanol	Cumarinas, antronas, antraquinona
Ácido sulfúrico	Reativo universal
Permanganato de potássio + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Reativo universal

Fonte: Simões et al., 2003

## **Fracionamento e isolamento de substâncias ativas**

Os extratos brutos de espécies vegetais são submetidos ao fracionamento, isolamento e purificação de substâncias. Os processos de fracionamento dos extratos vegetais são úteis para o isolamento de substâncias ativas. A partição, por exemplo, etapa inicial do fracionamento constitui numa técnica de extração líquido – líquido na qual se utiliza solventes orgânicos de polaridade crescente para extrair os compostos presentes no extrato. A partição implica em uma dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis, para ocorrer à separação dos componentes da mistura (SIMÕES et al, 2009).

O fracionamento cromatográfico permite o isolamento de substâncias por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando gradiente de eluição. As estruturas das substâncias isoladas são elucidadas por métodos espectrométricos (Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , massas e infravermelho).

Com isso, o isolamento, identificação e avaliação biológica de produtos naturais ainda se constituem em uma das alternativas para a descoberta de moléculas com potencial farmacológico (MONTANARI et al., 2002; KINGSTON, 2011).

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

- Analisar a constituição química e atividade antioxidante do caule e folha de *Lippia origanoides*.

#### **Objetivos específicos**

- ✓ Estudar a composição química, em termos de metabólitos secundários da espécie *Lippia origanoides* presentes nos extratos;
- ✓ Elucidar a constituição química fonte de substâncias bioativas de espécies do gênero;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de caule e folha;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. E.; CHANG, C. J.; MC LAUGHLIN, J. L. Bioactive components of *Allamanda schottii*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p.307-308, 2010.

AQUINO, F.W.B.; AMORIM, A.G.N.; PRATA, L.F.; NASCIMENTO, R.F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.32-38, 2004.

BAYLEY, A. E. ; Bailey's **Industrial Oil and Fat Products**. John Wiley:New York,5-ed.,v.3,1996.

BARREIROS, M. L.BARREIROS, Marizeth Libório. Flavonóides e terpenóides de três espécies do gênero *Erythroxylum* e suas atividades biológicas. 2016.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S.; MARQUES, L. M. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonóides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.1, p. 35-40, 2010.

CARVALHO, J. C. S.; GARCIA, P. S. P.; VIGNOL, S. R.; PEDRIALI, C. A. CARVALHO, Juliana Cajado Souza et al. Estudo do impacto da utilização de ativos vegetais em fotoprotetores. **InterfaceEHS**, v. 10, n. 2, 2015.

COELHO, A. G.; NETO, J. S. L.; MOURA, A. K., DE SOUSA, T. O.; MORAIS, I. C., CARVALHO, G. D.; ARCANJO, D. D COELHO, Angélica G. et al. Optimization and standardization of extraction method from *Lippia organoides* HBK: Focus on

potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 124-130, 2015.

EWING, G.W., **Métodos Instrumentais de Análise Química**, Volume II, Ed. Edgard Blücher LTDA, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os antioxidantes, Revista-fi. 16-30. 2009

FRANCISCONI, L. S. **Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; CABRAL, F. A. GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; CABRAL, F. A. GARMUS, TÁBATA T. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M. B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 175-185, 2015.

GROB, R.L.; BARRY, E.F. *Modern Practice Of Gas Chromatography*. Wiley. 4 Ed, 2004.

KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, XKABERA, JUSTIN N. ET AL. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.

KINGSTON, D.G.I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation, **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

LENZ, G.F. Determinação do índice de Kovats para mistura de alcoóis utilizando software simulador de cromatografia gasosa. In: **Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**, v.3, p. 1-5,2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MARIANI, N. A. P.; RANGEL, K. S.; SOUZA, E. N.; DA SILVA, D. C. F.; MEIRA, E. F., PADILHA, A. S.;A, F. D. M. Efeitos do extrato de *Eugenia uniflora* sobre parâmetros metabólicos e perfil lipídico de ratos hipertensos. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 375, 2017.

MIRANDA, J.; ROCHA, J.; ARAÚJO, K.; QUELEMES, P.; MAYO, S.; ANDRADE, I. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1142-1149, 2015.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2002.

MOURA, F. M. L. D Efeito antimicrobiano e antiaderente in vitro de plantas da caatinga frente a micro-organismos patogênicos de interesse na área de alimentos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 72 p., 2013.

NASCIMENTO, M. C. B.; DOS SANTOS GAMA, C. Q.NASCIMENTO, S.B. ET AL. estudo fitoquímico do marujá -amarelo (*passiflora edulis* sims forma *flavicarpa* o. deg. - passifloraceae) e perfil cromatográfico de sucos de maracujá. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.7, n. 1,2015.

NERYS, Leylianne de Cássia Rodrigues et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Syzygium malaccense* E *Syzygium cumini*. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 81-82, 2017.

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

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical **Biology & Medicine**, New York, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, Jonatas Rafael et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 208, 2013.

OLIVEIRA, F.R.A.M. **Ensaio pré-clínicos com um derivado semissintético do carvacrol: insumos para o desenvolvimento de novos fitofármacos**. Tese de estrado, 2016.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. New York: Wiley – VHC, 1997.

PEREIRA, R. J., DAS GRAÇAS CARDOSO, M.. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PINTO, C. D. P.; RODRIGUES, V. D.; PINTO, F. D. P.; PINTO, R. D. P.; UETANABARO, A. P. T.; PINHEIRO, C. S. R.; LUCHESE, A. M. PINTO, CRISTIANA DA PURIFICAÇÃO ET AL. Antimicrobial activity of Lippia species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v., 2013

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. *Ethnobotany Research & Applications*, Honolulu, v. 3, p. 25-35, 2005.

SANNA, G. et al. Antiviral properties from plants of the Mediterranean flora. **Natural product research**, v. 29, n. 22, p. 2065-2070, 2015.

SANTOS, P. G.; SIANI, A. C. Consolidação dos grupos de pesquisa em plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 438-449, 2013.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry, Barking**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A.. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** ,v.20,n.1,2016.

SILVA, A. D. Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral. 2016.

SIMÕES, C.M.O.; SCHEKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2a edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed.da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2009.

SIRQUEIRA, F.B.; JUNIOR, A. E. P.; LACERDA, A. G.; DAMASCENO, M. E. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “programa saúde da família no município de Jjuvenília, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v 1, n. 2, p.: 39 – 45, 2014.

SKOOG, D.A., **Principles of Instrumental Analysis**, 4th ed., 1992.

SKOOG; H. N. **Princípios de análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOUZA, Geórgia V; Simas AS; Bastos-Pereira AL; Frois GR, Ribas JL, Verdan MH. Antinociceptive activity of the ethanolic extract, fractions, and aggregatin D isolated from *Sinningia aggregata* tubers. **Plosone**, v. 10, n. 2, p. 0117501, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

THOMA, M.;; VINATORU, M.;; PANIWNYK, L.;; MASON, T.J., Investigation of the Effects of Ultrasound on Vegetal Tissues During Solvent Extraction, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 137-142, 2001.

TIWARI, Prashant et al. Phytochemical screening and extraction: a review. **Internationale pharmaceutica sciencia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

JEONG, Sunyoung et al. The Effect of Polyphenols Isolated from *Cynanchi wilfordii* Radix with Anti-inflammatory, Antioxidant, and Anti-bacterial Activity. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 151-158, 2015.

ZHU, F.; QIN, C.; TAO, L.; LIU, X., SHI, Z.; MA, X.;TAN, C.. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **PNAS**, v. 108, n. 31, p 12943-12948, 2011.



## CAPÍTULO I

### CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Lippia origanoides* (VERBENACEAE)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo escrito segundo as normas do Comitê Editorial do periódico científico Revista Brasileira de Farmacognosia

## CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Lippia origanoides* (VERBENACEAE)

Autora: Silvanne da Silva Santos

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

**RESUMO:** No presente trabalho foi descrito o isolamento de metabólitos secundários do caule e folha da espécie *Lippia origanoides* Kunth (1818) pertencente à família Verbenaceae conhecida popularmente como “alecrim-pimenta”. A grande variedade de metabólitos secundários existentes acarreta um número diversificado de compostos químicos. Os metabólitos secundários (Terpenos, Compostos fenólicos e Alcaloides) possuem moléculas com diversas atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antiviral atribuindo às espécies medicinais potenciais terapêuticos. Os caules e folhas foram submetidos a extrações com hexano e metanol. O fracionamento do extrato metanólico do caule e folha permitiram o isolamento de substâncias. Desta forma, o objetivo neste trabalho propôs demonstrar a constituição química obtida do fracionamento, isolamento, purificação e identificação dos extratos das partes aéreas (folha e caule) de *Lippia origanoides* utilizando-se das técnicas cromatográficas: cromatografia em coluna de sílica gel, cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e analítica: espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ). Como resultado do isolamento e identificação de substâncias do extrato hexânico do caule: friedelina, friedelinol e betulinaldéido e extrato hexânico da folha, carvacrol metilado. As frações do fracionamento do extrato de diclorometano do caule originaram: carvacrol (monoterpeno), friedelinol, Lupeol,  $\beta$  amirina, (triterpenos),  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol,  $\beta$ -sitostetona (esteróides) e Éster metílico 9,12-octadecadienoato de metila (Linoleato de metila). As frações do fracionamento do extrato diclorometano folha: Éster metílico 9,12-octadecadienoato de metila (Linoleato de metila), carvacrol, friedelina. O fracionamento do extrato hexânico folha: carvacrol e carvacrol metilado. Sendo

assim, a espécie *Lippia origanoides* é uma espécie promissora de moléculas bioativas com atividades biológicas.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários, isolamento, constituição química.

## ISOLATED CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Lippia origanoides* (VERBENACEAE)

Author: Silvanne da Silva Santos

Advisor: Franceli da Silva

**ABSTRACT:** The present study describes the isolation of secondary metabolites of the stem and leaf of the species *Lippia origanoides* Kunth (1818) belonging to the Verbenaceae family popularly known as "rosemary-pepper". The wide variety of secondary metabolites present a diverse number of chemical compounds. Secondary metabolites (Terpenes, Phenolic Compounds and Alkaloids) have molecules with diverse biological activities, such as, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-oxidant, antitumor and antiviral, attributing therapeutic potential to medicinal species. The stems and leaves were extracted with hexane and methanol. The fractionation of the methanolic extract of the stem and leaf allowed the isolation of substances. Thus, the objective of this work was to demonstrate the chemical constitution obtained from the fractionation, isolation, purification and identification of the extracts of the aerial parts (leaf and stem) of *Lippia origanoides* using chromatographic techniques: column chromatography, high liquid chromatography efficiency analysis with diode array detector (CLAE-DAD), comparative thin layer chromatography (CCDC) and analytical: Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR). As a result of the isolation and identification of substances from the hexane extract stem: Friedelina, friedelinol and betulinaldehyde and hexane leaf extract, methylated carvacrol. The fractions of the fractionation of the dichloromethane extract from the stem gave rise to Carvacrol (monoterpene), Friedelinol, Lupeol,  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -sitostetona (triterpenes)  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (steroids) and methyl ester 9,12-octadecadienoate. Methyl). The fractionation fractions of the dichloromethane extract sheet: methyl ester 9,12-octadecadienoate methyl (methyl linoleate), Carvacrol, Friedelina. The fractionation of the hexane leaf extract: Carvacrol and methylated Carvacrol. Thus, *Lippia origanoides* species is a promising kind of bioactive molecules for drug development.

**Key words:** Verbenacea, biological activities, chemical constitution.

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga pela humanidade, representando uma alternativa terapêutica nas diversas enfermidades que acometem à população. A busca de substâncias que apresentem atividades biológicas tem despertado o interesse da comunidade científica, devido à presença de compostos ativos (OLIVEIRA et al., 2014).

O Brasil, rico em biodiversidade e detentor de cerca de 20% da flora mundial, ainda pouco explorada, apresenta diversas espécies medicinais que possuem metabólitos secundários como alcaloides, terpenóides e compostos fenólicos constituídos de uma variedade de ativos químicos responsáveis pelas propriedades terapêuticas (SILVA et al., 2015).

A espécie *Lippia origanoides* Kunth, pertencente ao gênero *Lippia* e conhecida popularmente no nordeste como “alecrim-pimenta” e norte “salva-de-marajó” e “Alecrim d’Angola”, é um arbusto aromático medicinal de ciclo de vida perene de até 3m de altura. Nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), América do Sul (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e África do Sul é utilizada como condimentos e no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias, apresentando importância etnofarmacológica (PILAU et al., 2001; PARRA et al., 2007).

As plantas medicinais com propriedades aromáticas possuem potencial terapêutico relacionado à presença de moléculas bioativas, dentre estas, podem ser citados os monoterpênicos (timol, carvacrol,  $p$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno, 1,8-cineol, limoneno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$  Cariofileno, citral) constituintes químicos voláteis encontrados nos óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010; BETANCOURT et al., 2012).

A composição química do óleo essencial das folhas desta espécie já foram identificadas apresentando timol e carvacrol como constituintes majoritários e marcadores químicos (TELES et al., 2014; SOUZA, 2015), entretanto a constituição química dos extratos de folhas e caule não se tem conhecimento. Os marcadores químicos ativos são classes de substâncias ou substâncias de referências que apresentam concentrações mínimas nos extratos e

fitomedicamentos, responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas dentre estes, temos o citral (calminativa, espasmolítica) e limoneno ação analgésica existentes no óleo essencial (FUNARI, 2016).

Os metabólitos secundários presentes no gênero *Lippia* são os flavonoides, terpenoides /esteróides, fenóis livres, taninos condensados, saponinas, alcaloides, iridoides e seus glicosídeos, fenilpropanoides e naftoquinoides que são fontes de moléculas bioativas tais como, antimicrobiana (QUEIROZ et al., 2014; BARRETO et al., 2014; SERRANZI et al., 2015) antioxidante (TELES et al.,2014; SERRANZI et al., 2015) antiviral, bactericida, alelopática e anti-inflamatória (PILAU et al., 2011; RIVERO-CRUZ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; GOMES et al., 2012; MARCO et al., 2012; STASHENKO et al., 2013; VERAS et al., 2013); tripanocidas e citotóxicas (BORGES et al.,2012); acaricida (CAVALCANTI et al., 2010; GOMES et al., 2012); anti-malarial (VÁSQUEZ et al., 2014); conservante (HERNANDES et al., 2017).

Com base no exposto, neste trabalho propôs realizar a constituição química das frações isoladas e purificadas dos extratos de caule e folha de *L. origanoides*.

### **Aspectos gerais da Família Verbenaceae**

De acordo com dados registrados na literatura, a família (Verbenaceae) incluída na ordem Lamiales é constituída por 175 gêneros e 2.800 espécies amplamente distribuída nos trópicos (terras baixas) e subtropicos na América do Sul, América central, África Tropical, Índia, zonas temperadas do hemisfério sul e norte (PASCUAL et al., 2001).

No Brasil, encontram-se diversos gêneros (17) e espécies (250) pertencentes à família Verbenaceae nos biomas exclusivamente brasileiro cerrado e caatinga, na qual a polinização é realizada por insetos e aves, todavia a dispersão é feita por animais e ventos (LIMA, 2006; OLIVEIRA, 2013).

Existe uma variedade de metabolitos secundários presentes na família Verbenaceae (Tabela 01), responsáveis pelas atividades biológicas das espécies (Tabela 04). A presença de monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides

e fenilpropanoides confere ao gênero *Lippia* potencial bioativo (GOMES et al., 2011).

### **O Gênero *Lippia***

O gênero *Lippia* segundo maior da família Verbenaceae (O'LEARY et al., 2012) é amplamente distribuído no continente americano, Brasil, México, Paraguai e Argentina apresentam uma grande variedade de espécies deste gênero (SALIMENA, 2002). Dentre as espécies presentes no Brasil, 35 são encontradas na região do semiárido, Serra do Espinhaço, Minas Gerais e Goiás (GIULIETTI et al., 2006).

Atualmente são descritos 200 taxa e 160 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores deste gênero (VICCINI et al., 2006;CAVALCANTI et al., 2010; MENDES et al., 2010), com as seguintes características, folhas decussadas indumento glandular, florescências parciais capituliformes ou espiciformes, congestas, axilares, brácteas membranáceas ou cartáceas, verdes ou coloridas, amarelas, róseas ou vináceas, ultrapassando ou não o comprimento das flores, flores sésseis, cálice comprimido, alado, induplicado, membranáceo, inconspícuo, persistente no fruto; corola hipocraterimorfa, alva, rósea, magenta, lilás ou amarelas, tubo reto ou curvo, limbo lobado, lábio superior ou adaxial lobado, lábio inferior ou abaxial único, lobos laterais; estames; ovário monocarpelar, bilocular, ovulado, estigma lateral. Fruto dividido na maturidade em dois mericarpos (TRONCOSO, 1974).

Pesquisas relacionadas ao gênero *Lippia* abrangem um maior percentual de constituintes químicos referentes aos óleos essenciais, tendo poucos relatos de atividade farmacológica, assim, são necessários estudos científicos que avaliem as propriedades medicinais dos extratos oriundos de espécies vegetais, fontes de substâncias bioativas (PASCUAL, 2001). Todavia, os extratos de *L. organoides* foram eficientes contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, constituindo uma alternativa no controle de bactérias (PINHO et al., 2012).

A *Lippia alba*, *Lippia organoides* e *Lippia sidoides* oriundas do cerrado brasileiro apresentaram atividade contra a bactéria, *Aeromonas hydrophila*, resistente à antibióticos que ataca viveiros de peixes, (MAJOLO et al., 2016),

onde a utilização de óleos e extratos de espécies medicinais constituem uma alternativa viável contra os microorganismos.

### ***Lippia origanoides***

*Lippia origanoides* Kunth. (Figura 1) pertencente à família Verbenaceae, arbusto medicinal, nativa do semiárido nordestino e do norte de Minas Gerais, utilizada na medicina popular no tratamento de doenças gastroentéricas e respiratória (VICUÑA et.al., 2010; COELHO et.al., 2015), sendo que na região Norte do Brasil é utilizada como condimento em substituição ao orégano.

**A****B****C****D**

**Figura 1.** Planta de *Lippia origanoides* (A;B); folha (C); caule (D).  
Fonte: Santos, (2017).



A *L. origanoides* conhecida popularmente como alecrim -de- pimenta, alecrim-de-angola, salva-de-Marajó, alecrim-de-tabuleiro, orégano do monte, possui inflorescências, aroma forte e altura de até 3m (MATOS, 1996), apresenta potencial terapêutico (atividade antimicrobiana), estando na relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (QUEIROZ et al., 2014).

O estudo quimiotaxonômico permite a comparação dos constituintes químicos das diversas espécies de *Lippia* (OLIVEIRA et al., 2013), a variação na composição química do óleo essencial desta espécie possibilita diferentes quimiotipos, apresentando timol e carvacrol monoterpenos oxigenados como marcadores químicos (SOUZA, 2015). A partir do gênero *Lippia* foram isolados 56 flavonoides sendo que 45 flavonas e 11 derivados de flavonona. Além destes, temos os alcaloides, taninos, fenilpropanoides, iridoides glicolisados, naftoquinoides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, lignanas, esteroides livres, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos como constituintes químicos já relatados no gênero *Lippia* espalhado em todo território brasileiro (GOMES et al., 2011).

As condições climáticas, solo e sazonalidade do local são fatores que podem influenciar no percentual dos constituintes químicos das espécies de *Lippia* (MORÃO et al., 2016; SARRAZIN et al., 2015), além da idade da espécie, secagem (teor de umidade) no momento da colheita e fatores genéticos (OSPINA et al., 2016).

Todavia, em estudo realizado com a espécie *Lippia origanoides* com folhas secas e hastes finas coletadas no município de Santarém Pará, demonstrou que a variação sazonal não foi um fator que influenciou na composição e rendimento do óleo essencial extraído e no potencial microbiano da espécie (SARRAZIN et al., 2015).

O óleo essencial da espécie *Lippia origanoides* obtido da folha por hidrodestilação, coletada no cerrado brasileiro, apresentou atividade antifúngica contra os fungos, *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor*, confirmando a presença de um ativo químico (timol), tanto no óleo quanto no extrato confere as espécies potencial biológico (MEDEIROS et al., 2016).

O potencial ativo do óleo essencial obtido de folhas da espécie *Lippia origanoides*, cultivada na Amazônia, contra infestações parasitárias

(*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*) em brânquias de peixes, comprovou ação anti-parasitária dos constituintes químicos presentes no óleo essencial (SOARES et al., 2017). Este estudo demonstra que além dos óleos essenciais é possível o uso de extratos em trabalhos posteriores.

Esta espécie apresenta atividades anti-séptica, antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, analgésica, anestésica e anti-tumoral (OLIVEIRA D. et al., 2007), propriedade repelente contra *Sitophilus zeamais* (NERIO et al., 2009), efeito inibitório na replicação do vírus da febre amarela in vitro (MENESES et al., 2009), atividade antiprotozoária contra *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (ESCOBAR et al., 2010).

A presença de moléculas bioativas que confere essas atividades biológicas à espécie permite a utilização dos seus constituintes químicos originados de óleos e extratos na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (RIBEIRO et al., 2014), sendo uma alternativa viável na substituição dos aditivos químicos utilizados como conservantes na indústria.

### **Metabólitos secundários isolados nas espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae)**

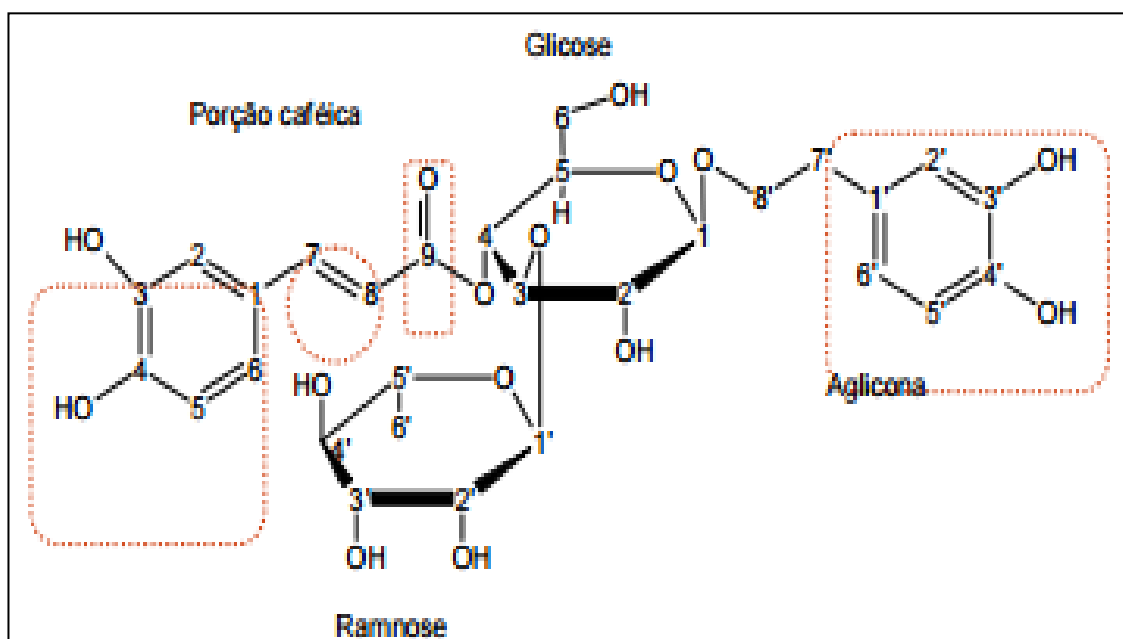
Existem diversos dados químicos na literatura a respeito da composição de óleos essenciais de espécies de *Lippia*, os constituintes químicos comumente encontrados na espécie de *L. organoides* são: Timol, Carvacrol, Cinemato de metilo,  $\alpha$ -pineno os quais contribuem para o valor terapêutico da espécie vegetal (RIBEIRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

Os constituintes majoritários: timol e carvacrol comum ao gênero *Lippia* atribuem às espécies atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (GOMES et al., 2011); antigenotóxica, anti-protozoária e anti-parasitária (SOARES et al., 2017), além de anti-inflamatória, anti-séptica e antioxidante já relatado em trabalhos anteriores.

Desta forma, estudos são feitos visando conhecer os componentes majoritários dos metabólitos secundários obtidos das folhas, contudo há poucos registros na literatura sobre a composição química do caule, embora, o extrato do caule de *L. organoides* que apresentou potencial redutor pode ser uma alternativa

de uso do produto como antioxidante natural, além de resultar no melhor aproveitamento da planta.

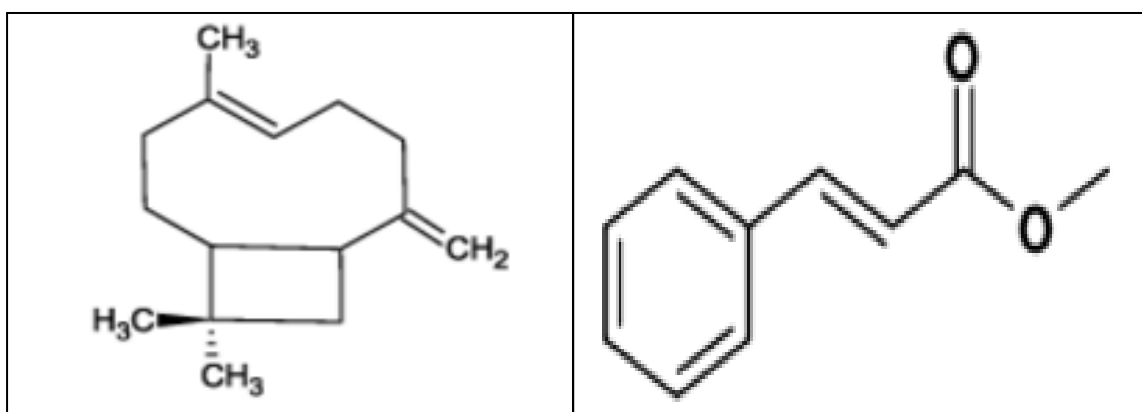
A partir do gênero *Lippia* foram isolados 56 flavonoides (45 flavonas e 11 derivados de flavona), dentre estes temos, o constituinte químico verbascosídeo (Figura 02), isolado do extrato etanólico da folha de *Lippia alba* que possui atividade antioxidante e anti-inflamatória devido a presença de hidroxilas livres (GOMES et al., 2011).



**Figura 02:** Estrutura química do verbascosídeo ([2-(3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo])

disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

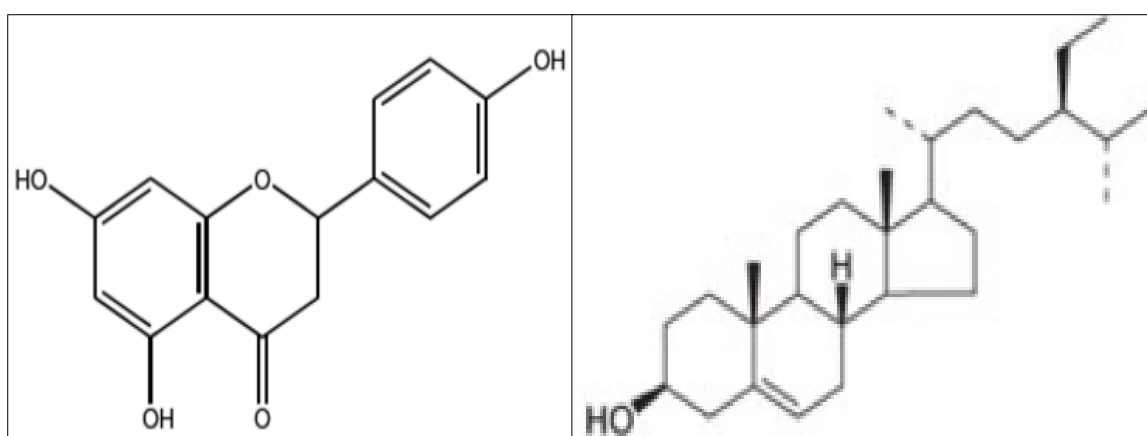
O composto majoritário extraído das folhas dos óleos essenciais da espécie *Lippia thymoides* foi o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (Figura 03) que possui 15 carbonos, atividades biológicas (antimicrobiana, anestésica) e esqueleto carbonico cíclico (SILVA, 2012). O constituinte químico isolado das folhas do óleo essencial de *Lippia origanoides* foi methyl cinnamate (Figura 04) (PEREIRA et al., 2016).



**Figura 03:** Estrutura química do  $\beta$  Cariofileno. (SILVA, 2012).

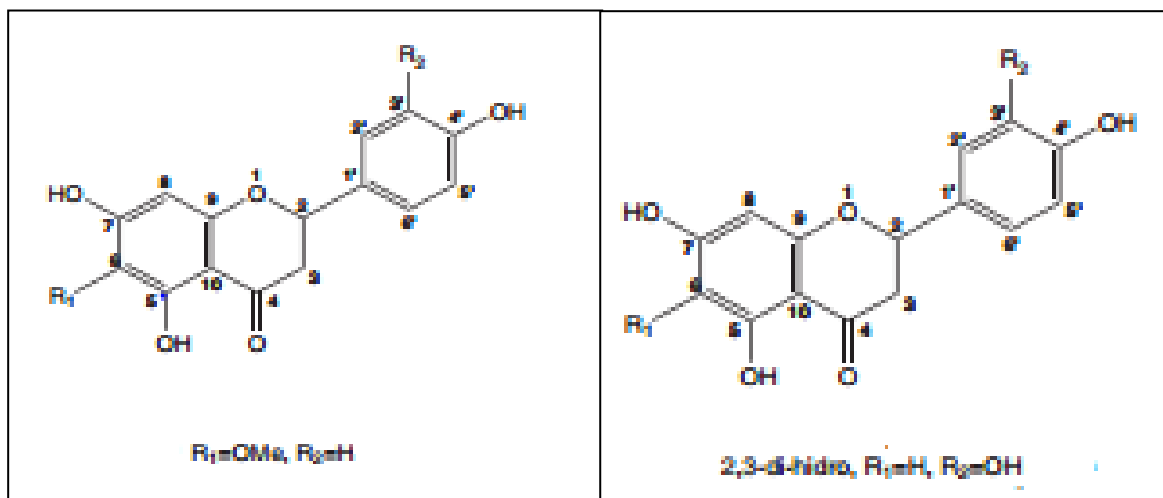
**Figura 04:** Estrutura química do methyl cinnamate. (PEREIRA, 2016).

Analisando a constituição química dos talos, raízes e folhas dos extratos de etanol da espécie *Lippia sidoides* pode-se constatar através do isolamento e identificação estrutural a presença de esteroides  $\beta$ -sitosterol (Figura 06), flavanoide naringenina (Figura 05), mistura de flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroflavanona (Figura 07) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (Figura 08), e mistura de di-hidrochalconas 2'-O-b-D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona e 2'-O-b-D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona e monoterpenos carvacrol (ALMEIDA, 2010).



**Figura 05:** Flavanoide naringenina.  
**Fonte:** ALMEIDA, 2010.

**Figura 06:** Esteroides  $\beta$ sitosterol  
**Fonte:** ALMEIDA, 2010.



**Figura 07:** 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavanona

**Figura 08:** 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona

Os iridóides glicosilados mussaenosídeo, teviridosídeo e gardosídeo foram isolados dos extratos de raízes de *L. alba* (SENA FILHO, 2007), contudo, as análises realizadas com diversos óleos essenciais oriundos da Amazônia com a espécie *L. origanoides* constatou a presença de teores de carvacrol (33,5-42,9%) e timol (5,1-18,5%), (MAIA et al., 2003; OLIVEIRA, D. et al., 2006; SANTOS et al., 2004). O timol e carvacrol são dois compostos fenólicos isoméricos que possuem atividade antioxidante como demonstrado na literatura (NEVES, 2009).

Vários autores descreveram classes de compostos químicos presentes em diferentes espécies do gênero *Lippia* conforme mostra a tabela 1. Na tabela 2 temos as substâncias isoladas destas classes de compostos químicos com as respectivas estruturas das substâncias (Figura 09) e na tabela 3 encontram-se as substâncias isoladas e estruturas do gênero *Lippia* (Figura 10). Os constituintes químicos e atividades biológicas das espécies da família Verbenaceae são demonstrados na tabela 04.

Tabela 1. Classes de substâncias identificadas em diferentes espécies do gênero *Lippia*.

<b>Espécies do gênero</b>	<b>Classe de substância</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Lippia alba</i></b>	Monoterpenos ; flavanoides; Taninos; Saponinas; Iridóides triterpenicos; Resinas; Mucilagem; Triterpenoides; Esteroides; Fenóis livres	Matos et al.,1998; Cardoso, 2014
<b><i>Lippia grandis</i></b>	Monoterpenos	Sarrazin et al., 2012
<b><i>Lippia graveolens</i></b>	Flavanoides/ Flavonas; Iridóides;	Gomes et al., 2011; Vásquez, 2012
<b><i>Lippia origanoides</i></b>	Monoterpenos; Diterpenos	Ribeiro et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Sugai, 2016
<b><i>Lippia rígida</i></b>	Flavanóides	Matos et al.,1998; Cardoso, 2014;
<b><i>Lippia sidoides</i></b>	Terpenos; Naftoquinonas/Quinona; Flavanoides; Esteroides; Alcaloides; Taninos hidrolisáveis e condensados; Antocianinas e Antocianidinas; Flavanois; Xantonas; Chalconas e Auronas; Catequinas; Flavanonas; Saponinas; Cumarinas; Ácidos orgânicos; Lignanás	Costa et al., 2002; Almeida et al.,2010; Pascual et al.,2001; Farias et al.,2012
<b><i>Lippia thymoides</i></b>	Monoterpenos; Sesquiterpenos	Castro et al., 2005

Tabela 2. Substâncias químicas isoladas das espécies do gênero *Lippia*.

<b>Espécie</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Lippia alba</i>	Citral (neral e geranial); carvona; 6-metil-hept-5-en-2-ona; sabineno, <i>p</i> -cimeno; limoneno; $\beta$ mirreno; linalol; $\gamma$ -terpineno; iso-dihidrocarveol; trans-Carveol; elemol; Guaiol; Geraniol;	Ceará; Pará	Matos et al., 1996; Barbosa, 2008
<i>Lippia gracilis</i>	Timol; Carvacrol; Lapachenol; fridelinona; Acetato de epifriedelanil; ácido 3-Acetil oleanólico; Lantandeno-A; $\beta$ sitosterol e estigmasterol; Tecomaquinona; Quercetina; Hispidulina; 3-metil-quercetina	Sergipe; Ceará	Costa et al., 2016; Lima, 2006
<i>Lippia graveolens</i>	Sakuranetina; Pinocebrina; Naringenina; Taxifolina; Quercetina		Gomes et al., 2011
<i>Lippia microphylla</i>	Furanonanaftoquinonas (6-metoxinafto(2,3-b) furan-4,9quinona); 7 metoxinafto (2,3-b)		Santos et al., 2003
<i>Lippia rigida</i>	Sakuranetina; Pinocebrina; Naringenina; 7 metoxiaromadrendrina; Genkwanin; Taxifolina; Kampeferol; Quercetina; Rhamnocitrina	Muncugê-BA	Oliveira et al., 2013
<i>Lippia sidoides</i>	Ácido 3-O-acetilleoanólico; 3,4-di-hidroxibenzoato de metilo; Lapachenol; Tecomaquinona; Tectoquinona; Lippisidoquinona; Quercetina; Luteolina; Taxifolina; Hispidulina; Naftoquinonas (Lapachenol, Isocatalpanol; Catalpanol; Tectona); Tectol; Diaciltectol; Lippisidoquinona; Naringenina	Mossoró-RN; Ceará	Lemos et al., 2007; Pascual et al., 2001 Almeida et al., 2010

### 1.1.5. Estrutura química das substâncias já isoladas das espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae)

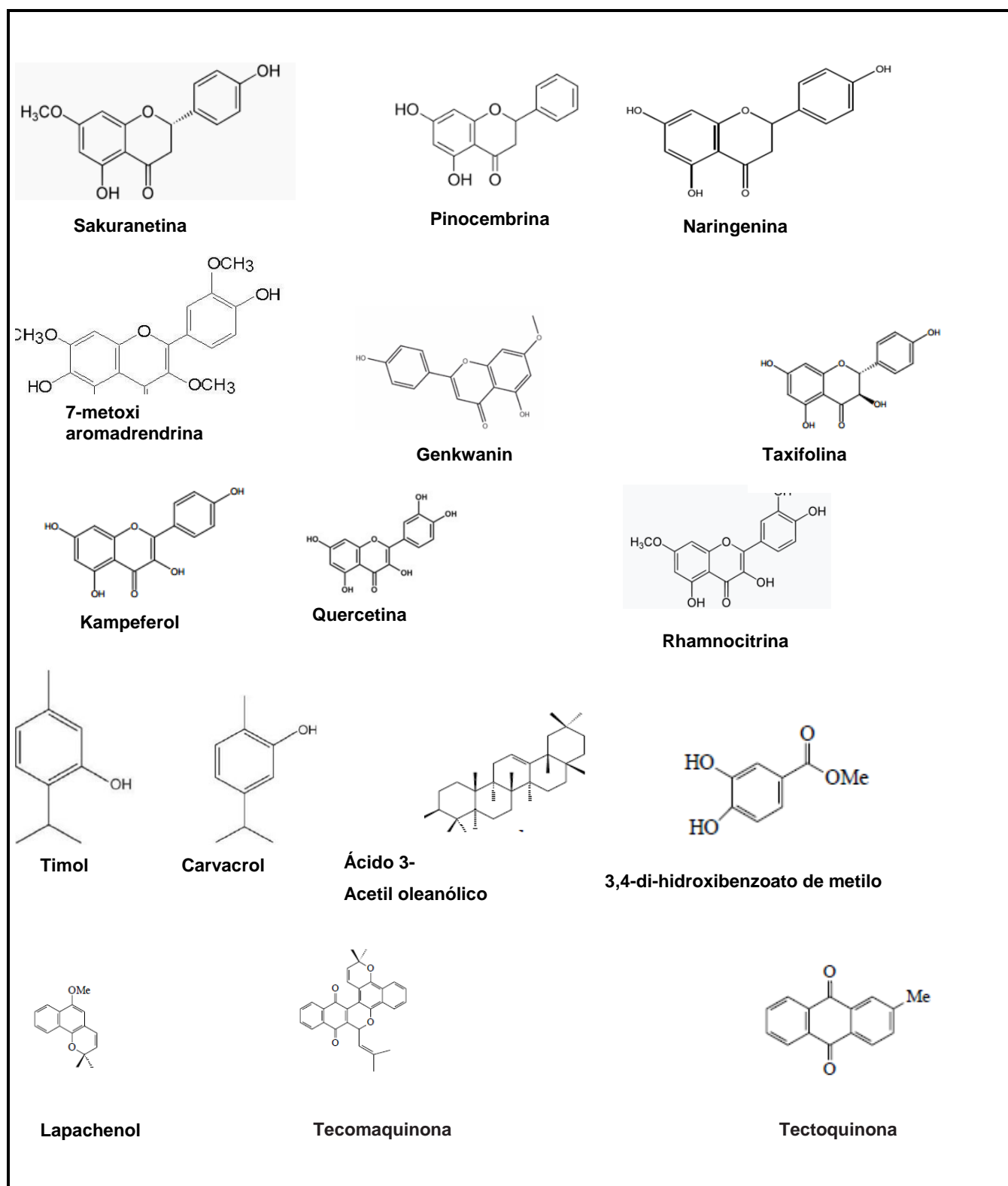
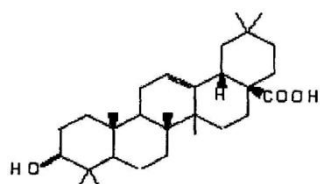


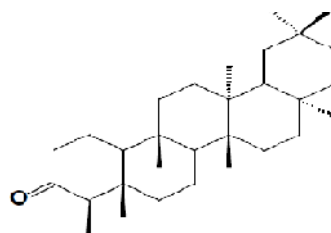
Figura 09: Estruturas dos constituintes químicos registrados no gênero *Lippia*.

continua

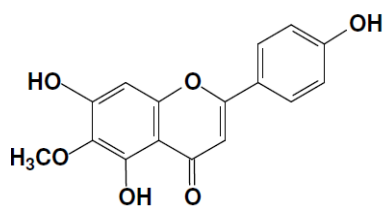




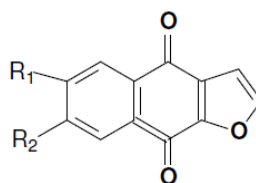
Friedelinona



Lantandeno-A

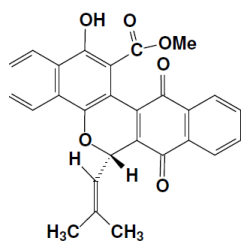


Hispidulina

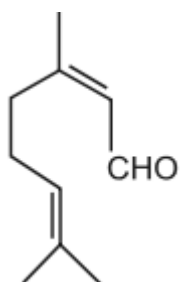

 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$ 
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ 

6-metoxinafto (2,3-b) furan-4,9quinona)

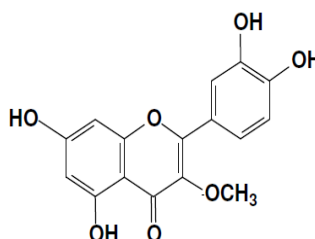
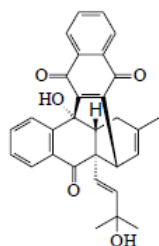
7 metoxinafto(2,3-b)



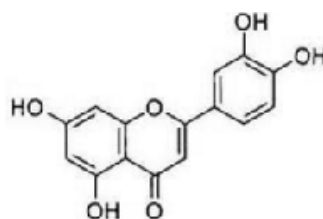
Microfila quinona



Citral

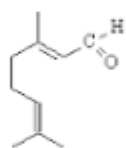
3-Metil  
querceti

Lippisidoquinona

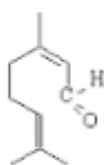


Luteolina

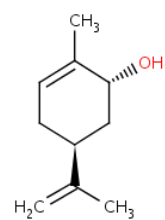
continua



Geranial



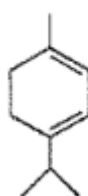
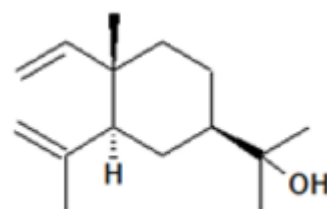
Neral



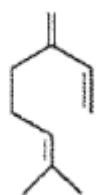
Trans-carveol



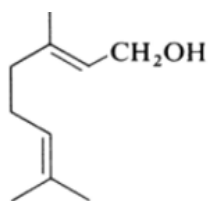
Limonene

 $\gamma$ -terpinene

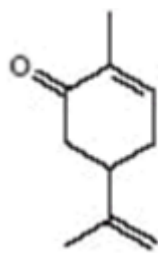
Elemol



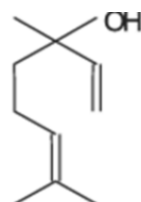
Mirceno



Geraniol



Carvone



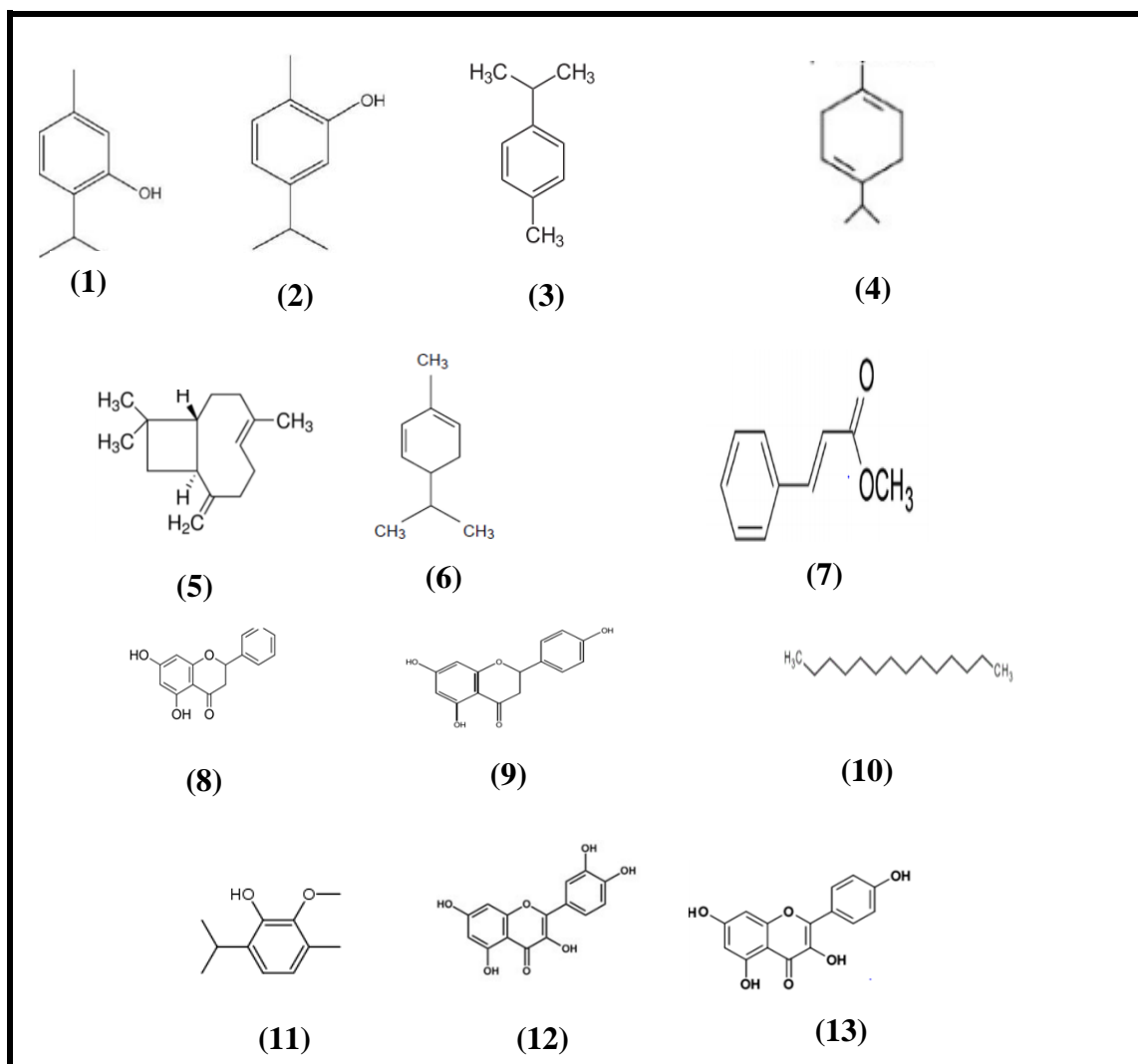
Linalol

**Substâncias isoladas da espécie *Lippia origanoides* (Verbenaceae)**

Na tabela 2 encontram-se as substâncias isoladas da espécie *Lippia origanoides* e suas estruturas são identificadas na tabela 03.

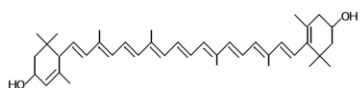
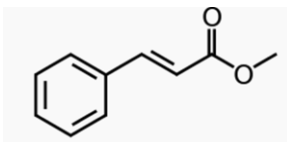
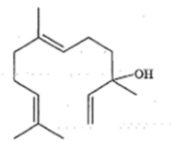
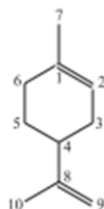
Tabela 3 Substâncias e estruturas isoladas do gênero *Lippia*.

Classe	Substâncias	Estrutura	Localidade	Referência
Monoterpeno/Sequisterpeno	Timol; Carvacrol; $\rho$ -Cimeno	1;2;3	Alto da Patía Colômbia)	Arango et al., (2012)
Monoterpeno/Sequisterpeno	Carvacrol; $\rho$ Cimeno; $\gamma$ -Terpineno	2;3;4	Santander e Piedecuesta (Colômbia)	Escobar et al., (2010)
Monoterpeno/Sequisterpeno	<i>P</i> - Cimeno; Trans- $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -Felandreno	3;5;6	Santander e Jórdan Sube (Colômbia)	Escobar et al., (2010)
Monoterpeno/Sequisterpeno	Carvacrol; $\rho$ cimeno; timol (E)-Cinamato de metilo;	2;3;1 7	Oriximiná PA (Brasil) Rio de Janeiro (Brasil)	Oliveira et al.,(2007) Pereira et.al.,(2016)
Monoterpeno	$\rho$ -Methoxytymol	11	Rio Amazonas	Sarrazin et al., (2015)
Monoterpeno	$\rho$ -Cimeno	3	Norte do Pará	Stashenko et al.,(2007)
Monoterpeno	Limoneno	17		Ribeiro et al.,(2014)
Flavanoide	Pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona)	8	Colômbia	Stashenko et al., (2010; 2011)
Flavanoide	Narigenina	9	Oriximiná PA (Brasil)	Oliveira et al.,(2007)
Flavanoide	Quercetina; Kampeferol	12;13	Colômbia	Vásquez et al.,(2012)
Flavanoide	Luteolina;	14	Colômbia	Stashenko et al.,(2013)
Fenilpropanóides/ Terpeno	(E) -Metilcinamato (E) -Nerolidol.	15;16	Norte do Pará	Ribeiro et al.,(2014)
Hidrocarboneto	n-Tetradecano	10	Santander (Colômbia)	Vicunã et al.,(2010)



**Figura 10:** Estruturas dos constituintes químicos registrados na espécie *L. organoides*

*continua.*

**(14)****(15)****(16)****(17)***continua*

**Tabela 4:** Constituintes químicos e atividades biológicas das espécies da família Verbenaceae.

<b>Espécies</b>	<b>Constituintes Químicos</b>	<b>Atividades biológicas</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Lippia alba</i></b>	Citral (Neral e Geniral); Limoneno	Ansiolítica; Espasmolítica; Analgésica; Antitumoral; Antibacteriana; Inibição da enzima acetilcolinase; Antifúngica; Antiulcerogênica; Miorrelaxante	Cardoso, 2016; Escobar et al.,2010; Oliveira et al.,2006; Morais et al.,2007; Costa et al.,2001; Pascual et al., 2001
<b><i>Lippia rigida</i></b>	$\alpha$ -Humuleno; $\beta$ -Cariofileno	Larvicida; Citotóxica; Inibição da enzima	Oliveira et al.,2013
<b><i>Lippia gracilis</i></b>	Furanonaftoquinonas; Timol; Carvacrol; Derivados metilados e acetilados; Timol	Antifúngica; Antibacteriana; Antiinflamatória; Anti- tumoral; Larvicida ( <i>Aedes aegypti</i> ); moluscida ( <i>Biomphalaria glabrata</i> ); Anti-séptico; Anti-tumoral; Antimicrobiana, Antioxidante; Anti-séptico; Anti- tumoral	Wagner et al.,1989 Lima, 2006; Pessoa et al.,2006
<b><i>Lippia microphylla</i></b>	Furanonaftoquinonas	Antifúngica; Antibacteriana; Antiinflamatória; Anti- tumoral; Antifúngica	Wagner et al.,1989
<b><i>Lippia organoides</i></b>	Timol; Carvacrol; <i>p</i> -Cimeno; $\gamma$ - Terpineno; Limoneno	Antioxidante; acaricida, Inseticida; Bactericida; Antifúngica; Analgésico; Antiinflamatória; Antipirético; Anti-tumoral	Teixeira et al., 2011; Escobar et al., 2010; Pinho et al., 2012
<b><i>Lippia sidoides</i></b>	Timol; Carvacrol;1,8-Cinelol; Quercetina; Limoneno	Anti-séptico; Antibacteriana ( <i>Salmonella</i> ) Inseticida; Anti-tumoral; Inibição da enzima acetilcolinase	Reis,2013; Lima et al.,2011;Costa et al.,2001;Liberato et al.,2011; Pessoa et al.,2006
<b><i>Lippia thymoides</i></b>	Limoneno; 1,8-cinelol; Timol; $\beta$ Cariofileno	Antimicrobiana; Anti-séptico; Antinociceptivo; Espasmolítica; Inseticida	Castro et al.,2005; Silva et al.,2012

## Triterpenos

Os triterpenos originados de espécies vegetais são moléculas estruturalmente complexas, constituídas por trinta átomos de carbono (seis unidades isoprenicas (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), pertencentes a classe dos terpenos e com diversas aplicações medicinais (OLIVEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

Além disso, os triterpenos apresentam caráter olefínico, alifáticos que possui uma, duas ou três ligações duplas acompanhados de diversos grupos funcionais: hidroxilas (-OH), cetonas (=O), aldeídos (-OAC), ácidos carboxílicos (-COOR), onde os sítios reativos (ligações duplas e grupos funcionais) são responsáveis pelas diversas atividades biológicas. (SILVA et al., 1992; SANTOS, 2016).

Os triterpenos que apresentam no C<sub>3</sub> apenas um grupo funcional são pentacíclicos ou tetracíclicos. O lupeol, β amirina e fridelina, ambos triterpenos pentacíclicos, são amplamente distribuídos no reino vegetal (GUTIÉRREZ et al., 2017; MOREIRA et al., 2009). Além destes, temos o aldeído betulínico, betulina, ácido betulínico, uvaol, ácido ursólico e ácido oleanólico (NICULAU et al., 2016).

Desta forma, os triterpenos pentacíclicos possuem dois sistemas de anéis (1) e (2) (Figura 11), responsáveis pela bioatividade das moléculas (FURTADO et al., 2017). O primeiro pertencente as famílias: (Oleano, ursano e friedelano) e o segundo (lupano e hopano) que contém quatro anéis de seis membros e um de cinco membros (MOREIRA et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2017). Os triterpenos tetracíclicos apresentam três anéis de seis membros e um anel de cinco membros (OLIVEIRA et al., 2016).



**Figura 11** – Esqueleto pentacíclico dos triterpenos.

Fonte: SOUZA, 2016

Os compostos triterpênicos oriundos de espécies vegetais apresentam diversas atividades biológicas entre as quais, anti-câncer, anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antidiurético, analgésico, giardicida, inibidores de acetilcolinesterase, antiproliferativa, proapoptótica, antipirética, antidiabética, hepatoprotetiva, antimicrobiana, alelopática, gastroprotetora, antidiabéticos, cardio- protetora, aterosclerose e leishmanicida (BANDEIRA et al., 2007; MARTUCCIELLO et al., 2007; ANTONISAMY et al., 2015; QIAO et al., 2011; MANKANI et al., 2006; MIRANDA et al., 2013; DE LIMA et al., 2017; BRAQUEHAIS et al., 2016; SALVADOR et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2017; GIMÉNEZ et al., 2015; LOU et al., 2012; LOZANO et al., 2014; SHAIK et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2015; SILVA et al., 2015), entretanto, podem ser utilizados como protótipos de diversos medicamentos (OLIVEIRA et al., 2016).

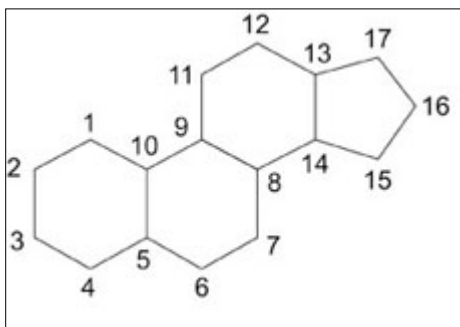
Sendo assim, a diversidade de moléculas triterpênicas existente nas espécies vegetais e suas propriedades terapêuticas já elucidadas, possibilitam o interesse dos pesquisadores pelo isolamento, identificação e modificação estrutural desses compostos bioativos.

## **Esteroides**

Os esteróides são lipídios insaponificáveis e triterpenos modificados que possuem quatro anéis aromáticos tetracíclico (CARERI et al., 2001; NICULAU et al., 2016), extraídos de espécies vegetais, insolúveis em água, solúveis em gordura e álcoois, utilizados na redução dos níveis de colesterol (HARPER, 2002; SULTAN et al., 2013).

Todos os esteroides apresentam na sua estrutura química básica 17 átomos de carbono nomeado de ciclopentanoperidrofenantreno: núcleo cíclico semelhante ao fenantreno ligados ao anel ciclo pentano (Figura 12), (HARPER, 2002). Os esteroides que são álcoois possuem um esqueleto que contem de 27 a 29 átomos de carbono com estrutura química semelhante ao colesterol (AMINA et al., 2017). Os fitoesteróides são encontrados na forma pura, esterificada e conjugada (glicosídeos) (CARERI et al., 2001).





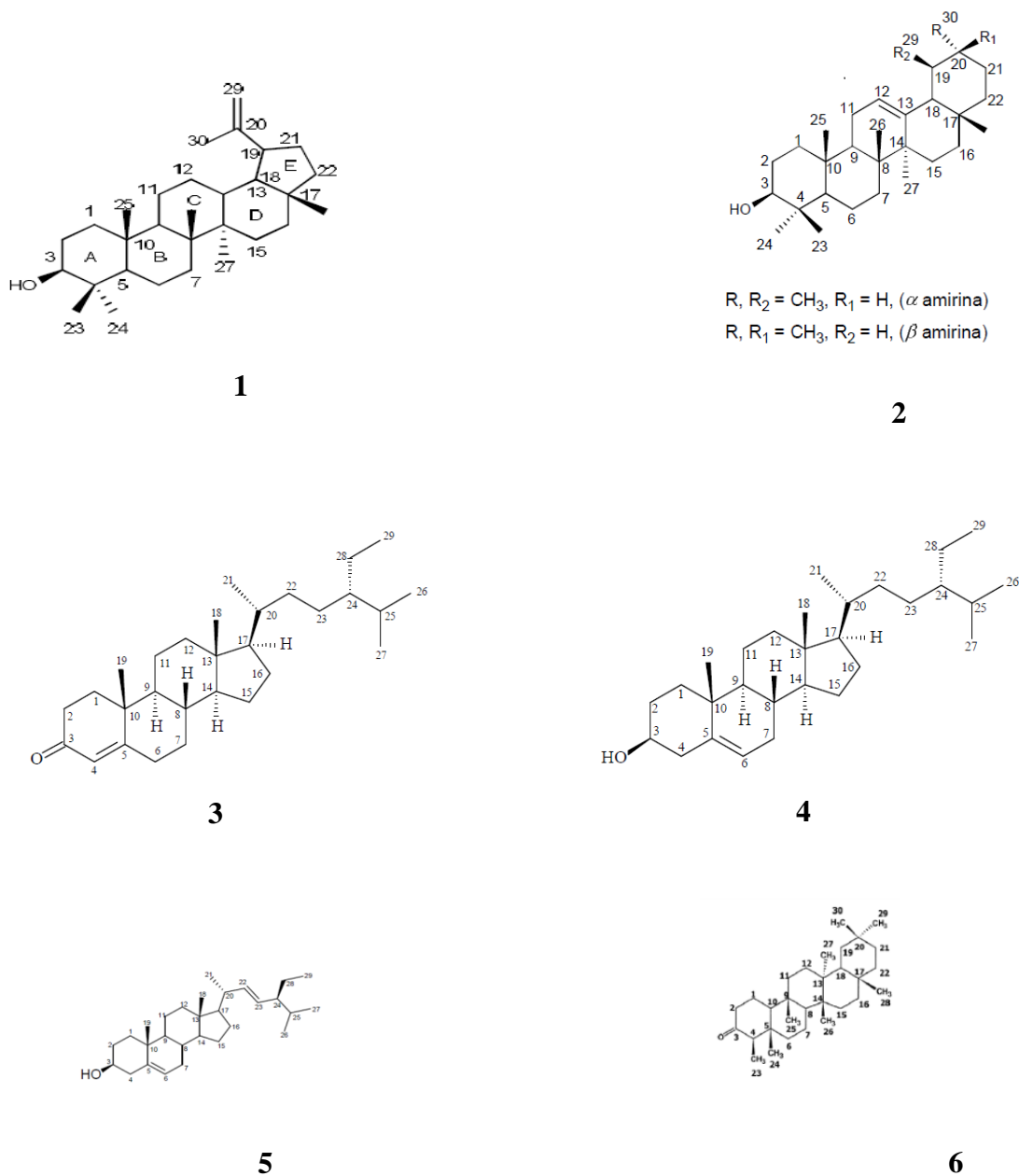
**Figura 12:** Sistema de anéis dos esteroides

(disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Os esteroides originados de espécies vegetais apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antiviral, larvicida, antitumoral e antimalárica (BRAQUEHAIS, 2016; COSTA et al., 2017; SULTAN, 2013).

### **Triterpenos e Esteroides com atividades Biológicas**

Os triterpenos e esteroides são metabólitos secundários que possuem moléculas bioativas, sendo compostos apolares presentes em diversas espécies vegetais (BRAQUEHAIS et al., 2016; SILVA et al., 2015). Entre os triterpenos que apresentam atividades biológicas promissoras podem-se destacar: o lupeol (1),  $\beta$  amirina (2) e friedelina (6). Além de esteroides como, o  $\beta$ -sitosterol (4) e o estigmasterol (5) e  $\beta$ -sitostetona (3) inibidores do HIV-1, agentes anti-câncer (Figura 13).



**Figura 13.** Triterpenos e Esteroides com atividades biológicas: 1- Lupeol; 2-  $\beta$ -Amirina; 3-  $\beta$ -Sitostetona; 4-  $\beta$ -Sitosterol; 5- Estigmasterol; 6- Friedelina (disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### **Lupeol (lup-20(29)-en-3-ol)**

O lupeol (1) pertence a classe dos triterpenos compostos químicos que possuem trinta carbonos na sua estrutura e fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ . Apresenta um sistema pentacíclico lipofílico e, como sítios reativos, a dupla no C29-C20 e OH no C3. A presença da OH atribui a molécula característica hidrofílica responsável pelas propriedades biológicas.

De acordo com os registros literários, a substância aparece com maior frequência em diversas famílias de vegetais, entretanto já foi relatado sua ocorrência em fungos, animais e frutas (morango, manga) (GALLO et al., 2009; WANG et al., 2016; RAUTH et al., 2016), apresentando propriedades biológicas: anticancerígenas, antiprotozoária, anti-inflamatória, agentes antitumoral, vírus da Herpes simples e quimiopreventivos (HATA et al., 2002; GALLO et al., 2009; SILVEIRA et al., 2010; RAUTH et al., 2016).

O fracionamento cromatográfico realizado com o extrato hexânico obtido das inflorescências de *Chresta scapigera* (Asteraceae) permitiu o isolamento do lupeol ativo contra formas amastigotas de *Leishmania Amazonensis* spp e inativo contra formas trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* (SCHINOR et al., 2007), portanto, o fracionamento permite concentrar a parte mais ativa da molécula favorecendo a bioatividade (RODRIGUES et al., 2017).

### **$\beta$ Amirina ( $\beta$ : (3 $\beta$ )-Olean-12-en-3-ol)**

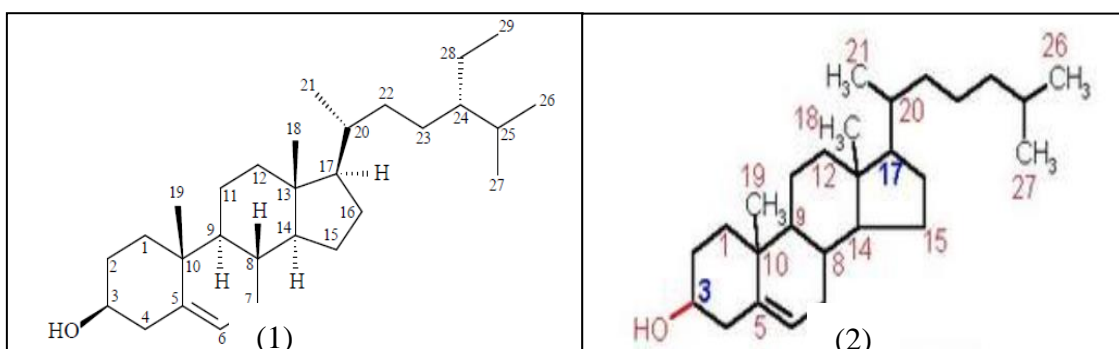
A  $\beta$  amirina (2) é um triterpeno pentacíclico isomérico de posição que apresenta fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$  e diferencia-se da  $\alpha$  amirina pela posição das metilas e hidrogênios ligados no C19 e C20, sendo assim, ambas as substâncias apresentam estruturas químicas diferentes.

A  $\beta$  amirina (2) possui duas metilas ( $CH_3$ ) ligada ao C20 e um átomo de hidrogênio ligado ao C19, atribuindo atividades biológicas, antiinflamatória, inibição da protease para HIV-1 e antiprotozoária (MATOS et al., 1999; SCHINOR et al., 2007).

### Mistura de $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

O  $\beta$ -Sitosterol e estigmasterol são misturas de esteroides tetracíclicos oriundos dos esqueletos ciclopentanoperidrofenantrênico encontrados em diversas famílias do reino vegetal. Ambas substâncias lipossolúveis, diferenciam-se pela ligação dupla existente no C22 e C23 na molécula do estigmasterol.

A ligação dupla e o grupo hidrófilo existente constituem os sítios reativos do  $\beta$ -Sitosterol e estigmasterol, entretanto, as estruturas bastante semelhantes são devido ao fato de possuírem a mesma rota biossintética, sendo ambos isolados na mesma planta como mistura (SANTOS, 2016), todavia, a molécula  $\beta$ -Sitosterol (1) estruturalmente assemelha-se ao colesterol (2), diferenciando-se apenas pelo radical etil no C24. FIGURA 14 (AMINA et al., 2017)



**Figura 14.** Esteroides: 1-  $\beta$ -Sitosterol; 2-Colesterol (disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Os fitoesteroides ( $\beta$ -Sitosterol e estigmasterol) reduzem os níveis de colesterol na corrente sanguínea devido a capacidade de seus ésteres diminuir a absorção no intestino de colesterol LDL, além de atividade citotóxica inibindo duas linhagens de células cancerígenas, próstata e cólon, prevenção e cura de doenças neurodegenerativas, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, efeito na indução da apoptose, antidiabético, anti-bacterianas, anti-fúngica e efeitos neutralizante sobre veneno de víbora e cobra (ATANASOV et al., 2015; AMINA et al., 2017; PARK et al., 2007; SHI et al., 2013, RADICA et al., 2013; KIPRONO et al., 2000; GOMES et al., 2007).

Sendo assim, O  $\beta$ -Sitosterol e estigmasterol são moléculas promissoras, devido as suas inúmeras propriedades biológicas demonstradas acima, além de ser extraída de espécies vegetais.

### **Friedelina**

É uma molécula triterpênica pentacíclica cetônica biologicamente ativa, sintetizada após a ciclização de oxidosqualeno a partir da enzima friedelina sintase (SOUZA et al., 2016), diante disso, os triterpenos são originados da ciclização do 2-3 oxidosqualeno catalisados por oxidosqualeno ciclase (OSCs) (SOUZA et al., 2016).

Em relação às atividades biológicas destacam-se: antimicrobiana (bactérias Gram-positiva e Gram-negativa), antifúngica (*Candida* ssp, *Aspergillus niger*), vasodilatadoras, anti-histamínicas, anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas, gastroprotetiva, antioxidantes, anticâncer e alelopática (KUETE et al., 2007; DURAI PANDIYAN et al., 2010; ANTONISAMY et al., 2015; ANTONISAMY et al., 2016; SUNIL et al., 2013; SANGSUWON et al., 2013).

### **Material e métodos**

#### **Coleta e preparação dos extratos**

A espécie *Lippia organoides* foi coletada no dia 24 de agosto de 2014, no município de Feira de Santana-BA, localizado a 234 metros de altitude, latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste. Apresenta pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26°C. Segundo a classificação de Köppen o clima local é do tipo BSh, semiárido quente. A identificação foi feita pela Dra. Tânia dos Santos Silva, a exsicata está depositada no Herbário da UEFS (HUEFS) com voucher número 83.373.

As plantas foram coletadas cinco centímetros acima do solo, entre 7:00 e 8:00 horas da manhã, acondicionadas em sacos e conduzidas ao Laboratório de Fitoquímica da UFRB, município de Cruz das Almas-BA.

O preparo dos extratos vegetais foi realizado no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Os

ensaios em cromatografia de camada delgada comparativa foram realizados parte no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e parte no Laboratório de Fitoquímica da UFRB. A análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO).

As folhas e caules foram separados e triturados utilizando o moinho de facas tipo Willey, Star FT50, Fortinox. Os reagentes utilizados nos procedimentos cromatográficos e na preparação dos extratos foram das marcas MERCK®, VETEC® e QUIMEX®, todos de grau analítico; a água foi purificada por um Milli-Qplus, sendo utilizado um filtro de membrana 0,45 mm nas frações dos extratos.

As concentrações dos extratos de algumas frações foram realizadas sob pressão reduzida utilizando evaporador rotativo modelo TE -211 Tecnal; Outras frações contidas em frascos de volume 10,0 mL foram deixados na capela para evaporação do solvente.

Nas separações cromatográficas em coluna foi utilizada sílica gel 60 (70- 230 mesh (0,063 – 210  $\mu\text{m}$ ), Merck®. Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi utilizado gel de sílica HF254+366, Merck®. As cromatoplasmas para CCDC foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica em água destilada sobre placas de vidro por meio de um espalhador mecânico (Heidelberg), obtendo-se placas com espessuras de 0,50 mm (comparativas). Depois de secar ao ar livre, todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufas a 100 °C por um período de aproximadamente uma hora. Como reveladores, foram utilizadas irradiações da luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 a 366 nm e vapores de iodo.

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

A separação dos constituintes químicos, isolamento e purificação das frações obtidas foi realizada em aparelho cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se o cromatógrafo Agilent Technologies®, modelo 1260-infinity, detector de arranjo de diodo, modelo 1260 DAD-VL, injetor automático 1260-ALS e sistema de integração computadorizado com software LC open LAB CDS.

As colunas analíticas utilizadas para o desenvolvimento do método foi analítica e preparativa mantida a 26 °C. Os eluentes foram ajustados com água a pH 3,2, ácido acético, acetonitrila e metanol. A fim de obter uma separação otimizada. Os melhores resultados foram obtidos na preparativa e esta coluna foi escolhida para a quantificação dos extratos. O detector de matriz de diodos acoplado ao sistema de HPLC determinou a pureza dos picos comparando os espectros UV de cada pico com os de referências autênticas amostras quando possível.

### **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de $^1\text{H}$ )**

O extrato hexânico da folha e caule e as frações obtidas foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$ . As análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em São Paulo.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em espectrofotômetro Varian Gemini 2000 operando a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e Bruker operando a 600 MHz para  $^1\text{H}$ . Foram utilizados os solventes  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{C}_6\text{D}_6$  e os deslocamentos químicos foram medidos em ppm tendo como referência interna o TMS. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de Hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas do solvente deuterado utilizado: benzeno ( $\delta$  7,16), clorofórmio e metanol. As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros de RMN foram clorofórmio, metanol e benzeno deuterados.

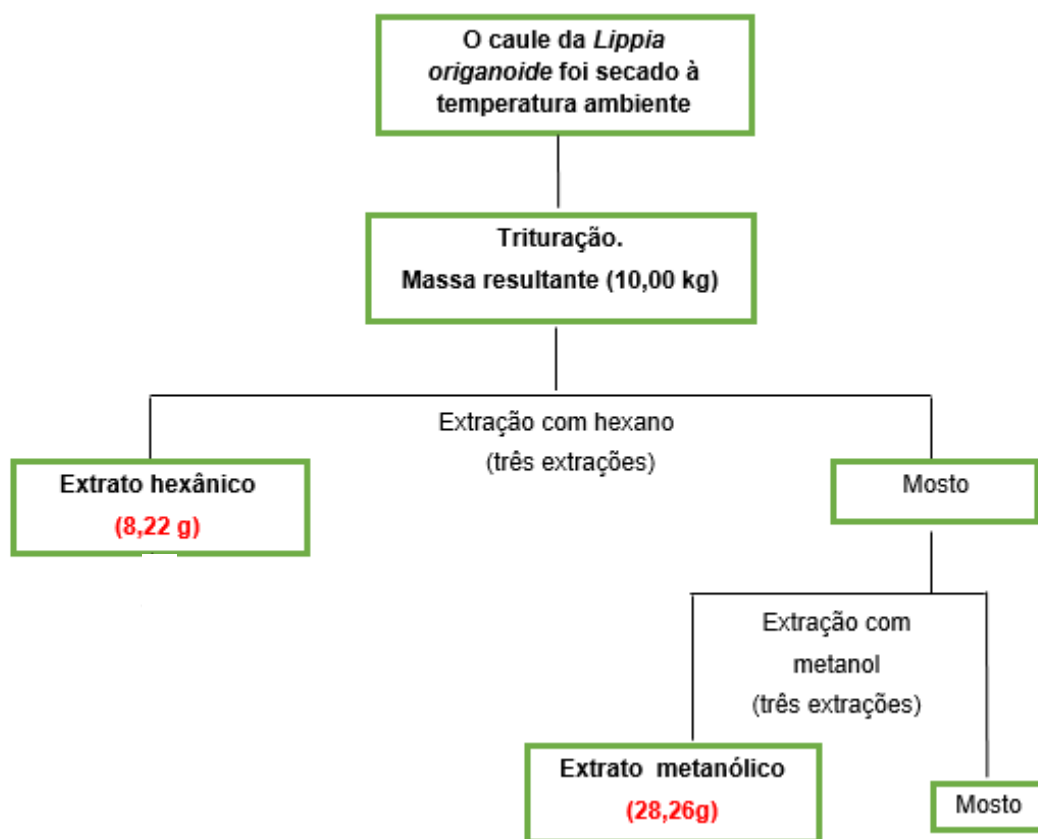
### **Obtenção dos extratos orgânicos**

#### **Obtenção do extrato hexânico do caule de *Lippia origanoides***

O material vegetal coletado foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas. Do caule triturado obteve-se 10 Kg de material vegetal triturado. Esta foi colocada em contato com o solvente orgânico (hexano) e

após um período que variou entre 48 e 72 horas, a solução resultante foi filtrada e, posteriormente, foi destilada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida na temperatura de aproximadamente 35°C. Esse mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes, obtendo-se ao final 8,22 g de extrato hexânico seco (Fig. 15). Os extratos obtidos nas três extrações foram agrupados e o material sólido foi então, extraído com metanol (Fig. 15).

Foram feitas análises de RMN de  $^1\text{H}$  com os dois extratos (Fig. 16 e Fig. 17), e de posse dos espectros foi escolhido o extrato metanólico para ser estudado.

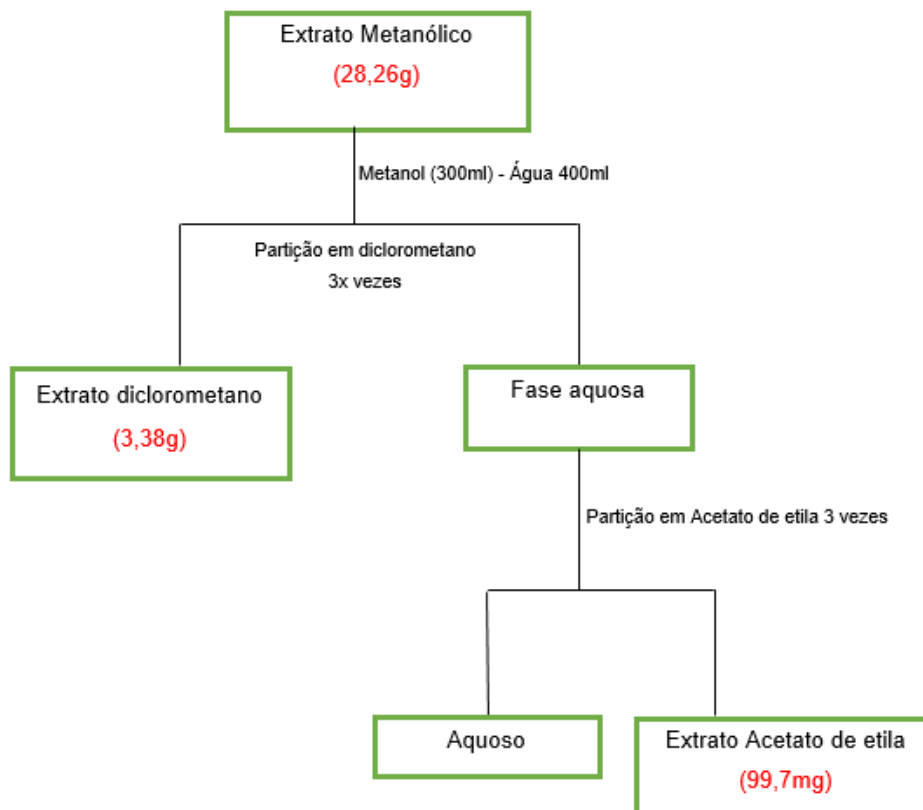


**Figura 15** - Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico e metanólico do caule

Ao extrato metanólico bruto (28,26g) adicionou-se 400 mL de água, 300 mL de metanol. Esta mistura foi submetida à partição (líquido-líquido) no funil de separação por três vezes sucessivas, utilizando 100 mL de diclorometano e 100 mL acetato de etila. Após eliminação do solvente, em evaporador rotatório, modelo TE -211 Tecnal; sob pressão reduzida à



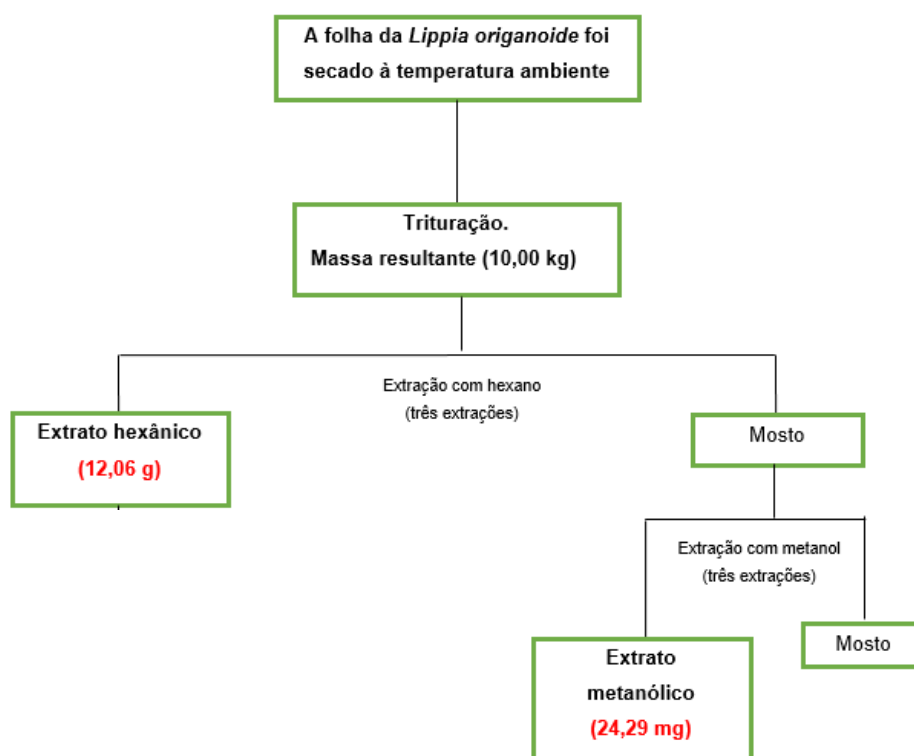
aproximadamente 35 °C obteve-se os extratos: diclorometano (3,38 g) e acetato de etila (99,7 mg) (Fig. 16).



**Figura 16** – Procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos diclorometano e acetato de etila do caule de *L. origanoides*.

### Obtenção do extrato hexânico e metanólico da folha de *Lippia origanoides*

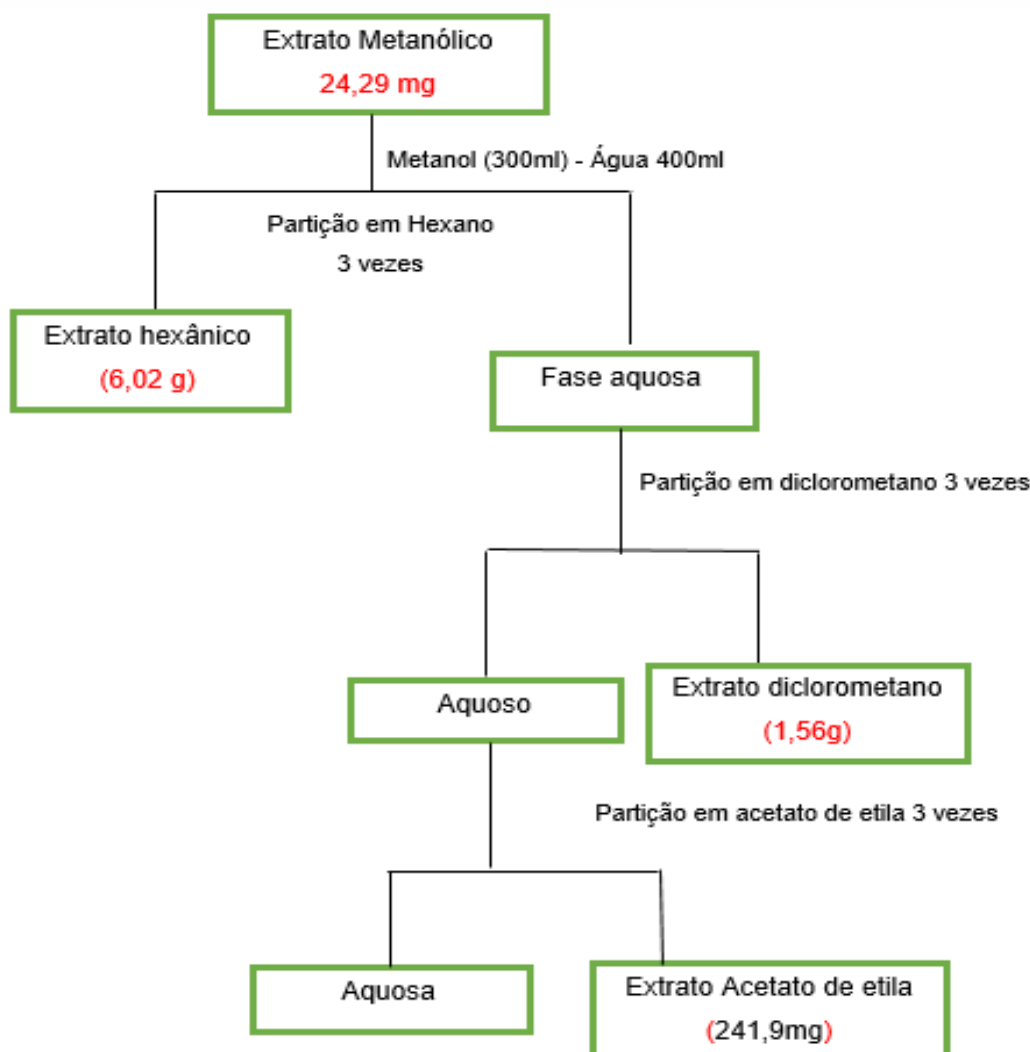
Já as folhas do espécimen estudado, foram divididas em pequenos fragmentos e depois de seco à temperatura ambiente, foram moídas em um moinho de facas obtendo-se (8 kg) de material vegetal triturado. Foi utilizado o mesmo procedimento realizado no caule para obtenção dos extratos hexânico e metanólico da folha (Fig. 17). Foram feitas análises de RMN de  $^1\text{H}$  com os extratos hexânico e metanólico, e de posse dos espectros foi escolhido o extrato metanólico para ser estudado.



**Figura 17-** Procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos da folha de *L. origanoides*.

O extrato metanólico da folha foi solubilizado em uma mistura contendo 300 mL de água e 400 mL de metanol. Logo após, a mistura foi submetida à partição (líquido-líquido) em um funil de separação por três vezes sucessivas com diferentes solventes orgânicos na respectiva ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila. Após eliminação do solvente, em evaporador

rotatório, sob pressão reduzida à aproximadamente 35 °C obteve-se as frações: Hexânica (6,02g) diclorometânica (1,56g) e em acetato de etila (241,9mg) (Figura 24). Foram feitas análises de RMN de  $^1\text{H}$  com os extratos hexânico e diclorometano respectivamente.



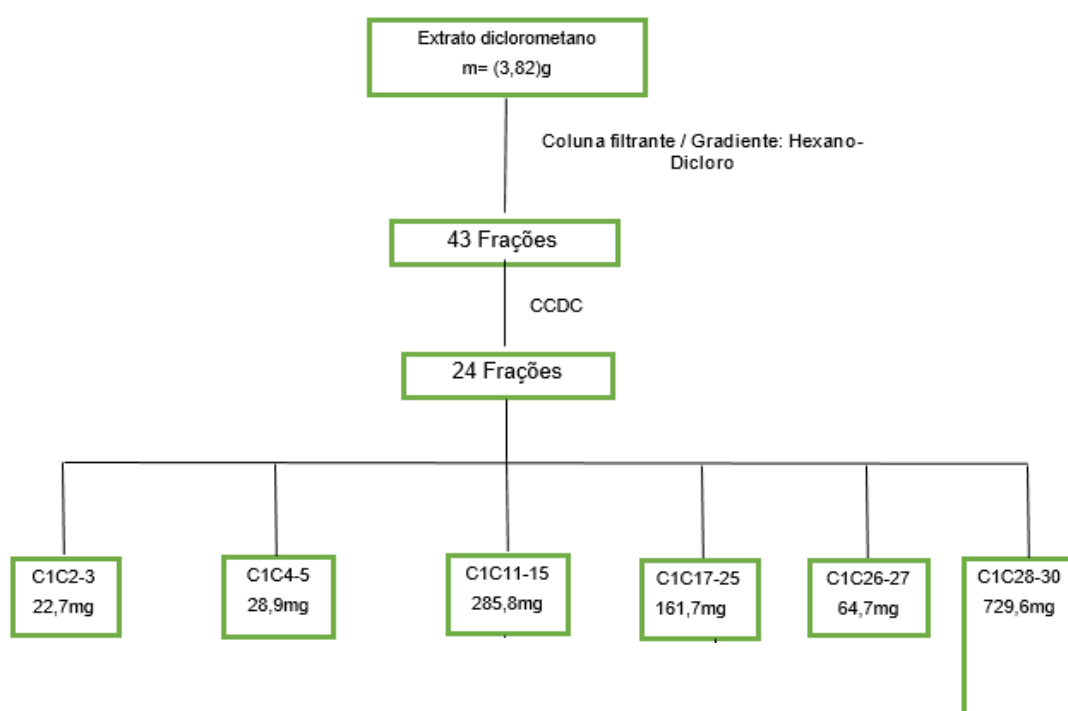
**Figura 18** - Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico, diclorometano e acetato de etila da folha

### **Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano do caule de *L. origanoides***

Após a obtenção dos extratos vegetais, o extrato diclorometânico caule (3,82g) foi submetido a uma coluna cromatográfica, empacotada a seco com sílica gel 60 (230-400mesh (0,063 – 210  $\mu\text{m}$ ), Merck®. como fase

estacionária. Inicialmente, utilizou-se como fase móvel n-hexano puro; em seguida, a mistura de hexano/DCM 1:1 (v/v), DCM, acetato de etila e por último metanol, obtendo-se 43 frações de aproximadamente 250 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura constante de 40°C e depois procedeu-se a análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Após análise dos resultados obtidos por irradiações da luz UV ( $\lambda$  254 e 366) e vapores de  $I_2$ , as frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante entre si foram agrupadas em 24 frações (Figura 27).

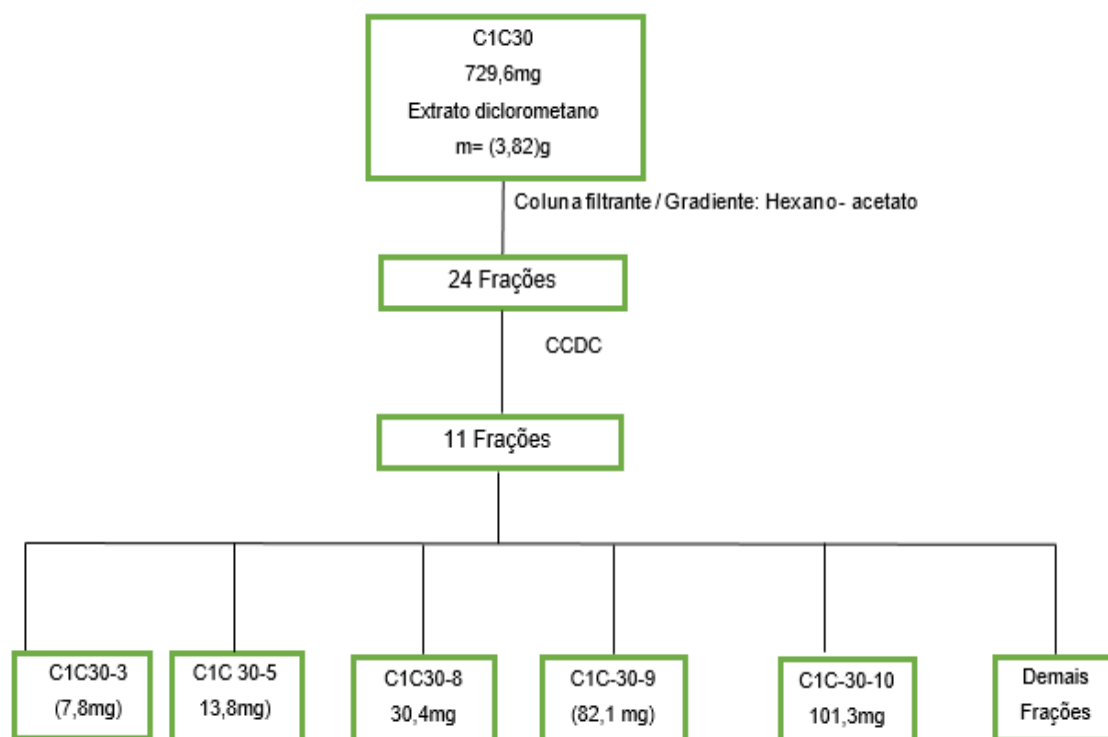


**Figura 19:** Fluxograma frações obtidas do extrato diclorometano do caule de *L. origanoides*

### Purificação da fração C1C(30)

A fração C1C30, por ter maior massa (729,6mg), foi fracionada através de cromatografia em coluna filtrante de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando como fase móvel o sistema hexano/acetato em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 24 frações, de aproximadamente 200 mL, que após

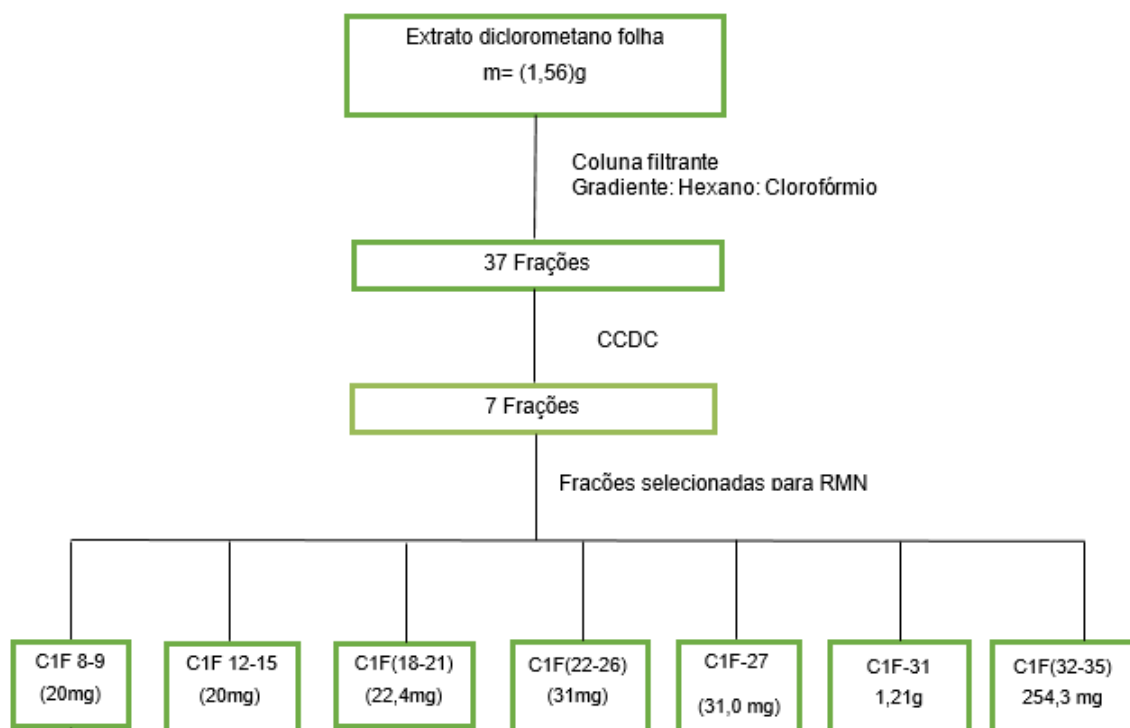
evaporação do solvente, foram analisadas em CCDC, posteriormente reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, reunidas em 11 frações para o caule (Figura 20).



**Figura 20:** Fluxograma frações obtidas da fração C1C(30) extrato diclorometano do caule de *L. origanoides*

### Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano da folha

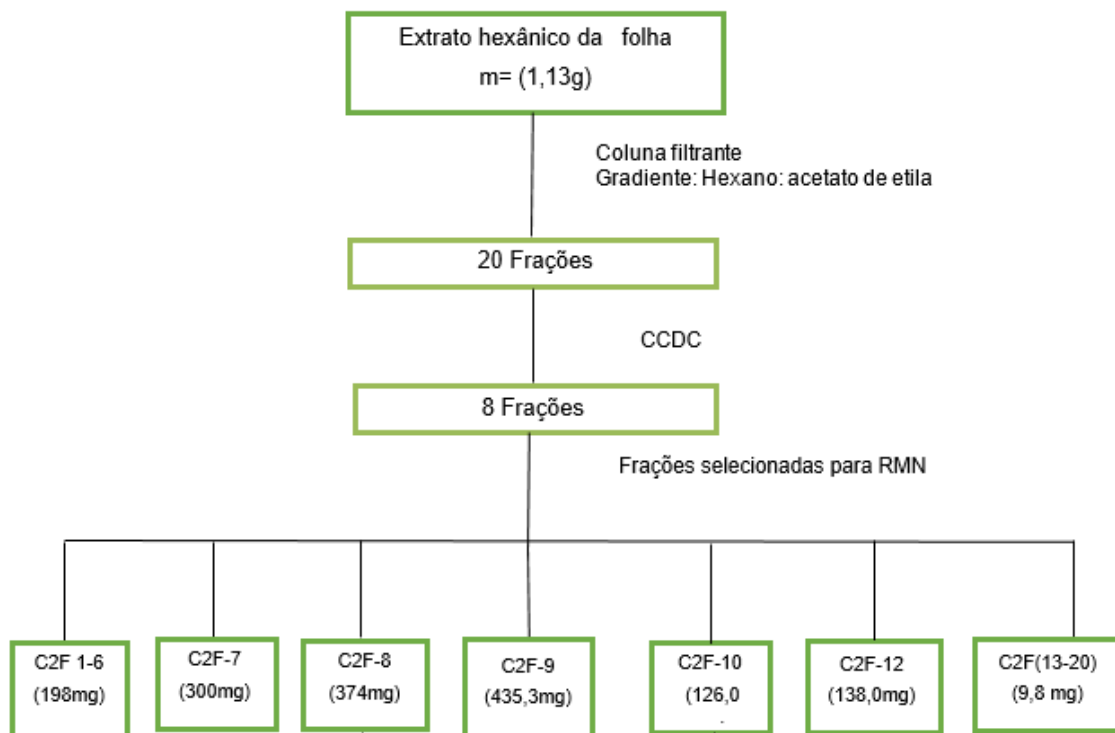
O extrato diclorometano da folha (1,56g) foi submetido a uma coluna filtrante tendo como fase estacionária a sílica gel 60 (230-400 mesh), e como fase móvel o eluente hexano/diclorometano em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 37 frações do extrato da folha, em volume de 250 mL que foram concentradas sob pressão reduzida por meio da rota evaporação em temperatura constante de 40°C e posteriormente analisadas em CCDC, e reunidas, em grupos de 7 frações para a folha (Figura 21).



**Figura 21:** Fluxograma frações obtidas do extrato diclorometano das folhas de *L. origanoides*.

O extrato hexânico da folha (1,13g) foi submetido a uma coluna filtrante tendo como fase estacionária a sílica gel 60 (230-400 mesh), e como fase móvel o eluente hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 20 frações do extrato da folha, em volume de 250 mL que foram concentradas sob pressão reduzida por meio da rotaevaporação em temperatura constante de 40°C e posteriormente analisadas em cromatografia

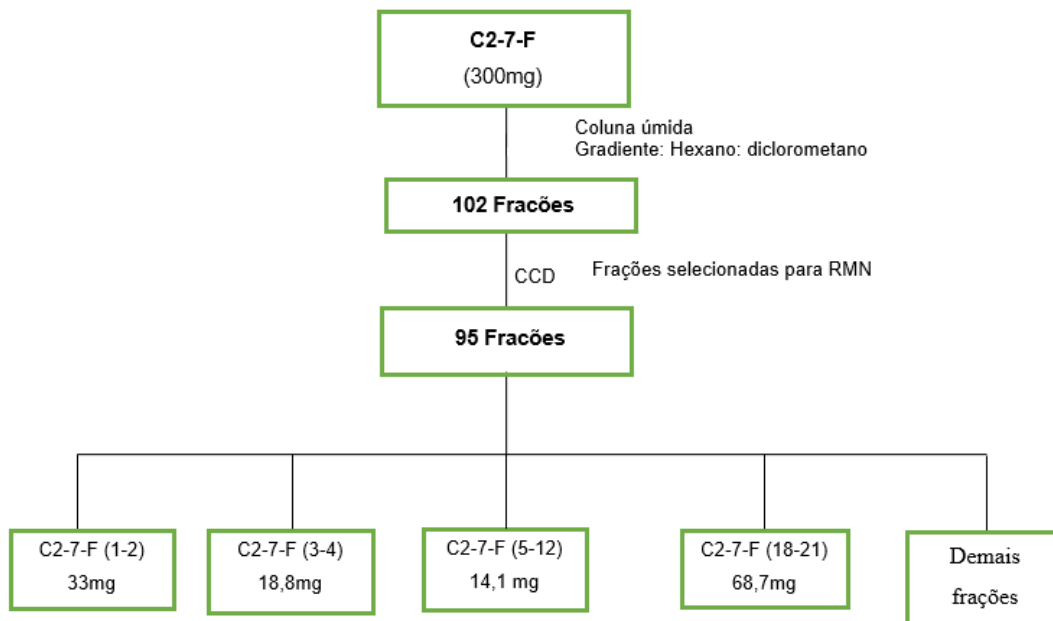
de camada delgada comparativa (CCDC), e revelada com o iodo ressublimado (revelador químico) e luz ultravioleta (físico) com 254nm e 365 nm, reunidas em grupos de 8 frações (Figura 22).



**Figura 22: Fluxograma** das frações obtidas do extrato hexânico da folha de *L*

### **Purificação da fração C2-F -7**

A fração C2-F-7, (300mg), foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando como adsorvente sílica gel 60 (70-230mesh), eluída com gradientes de misturas de hexano/diclorometano em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 102 frações, de aproximadamente 20 mL (cada uma) que após evaporação do solvente foram analisadas em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, sendo reunidas em 95 frações (Figura 23).

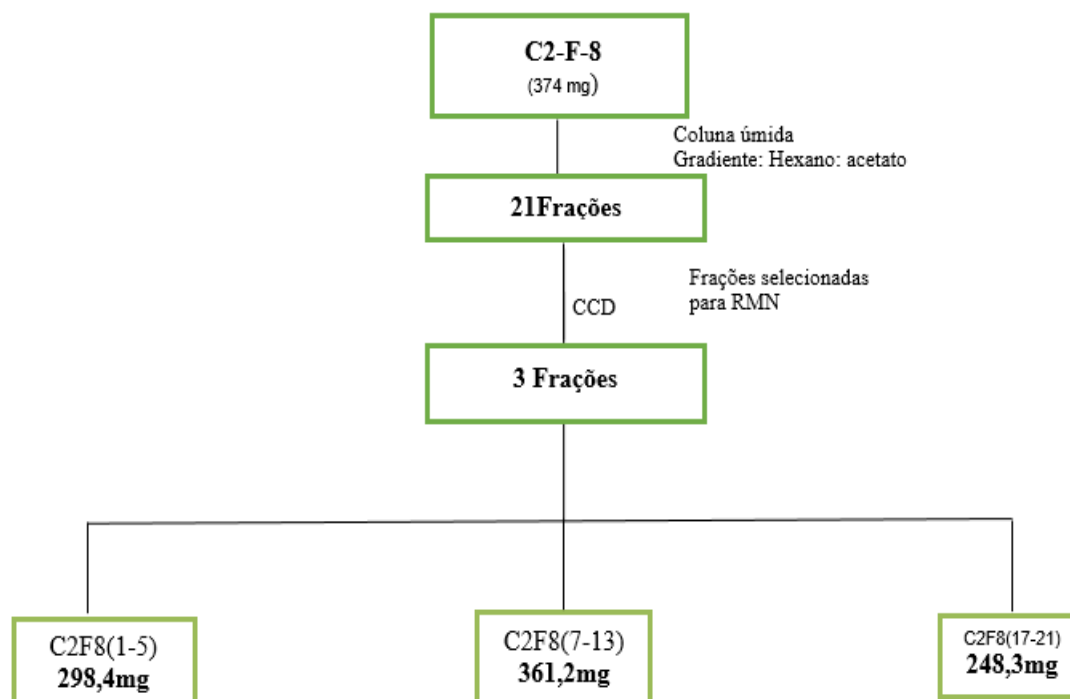


**Figura23:** Fluxograma das frações obtidas da fração CFH2.7 da folha de *L origanoides*

### Purificação da fração C2-F-8

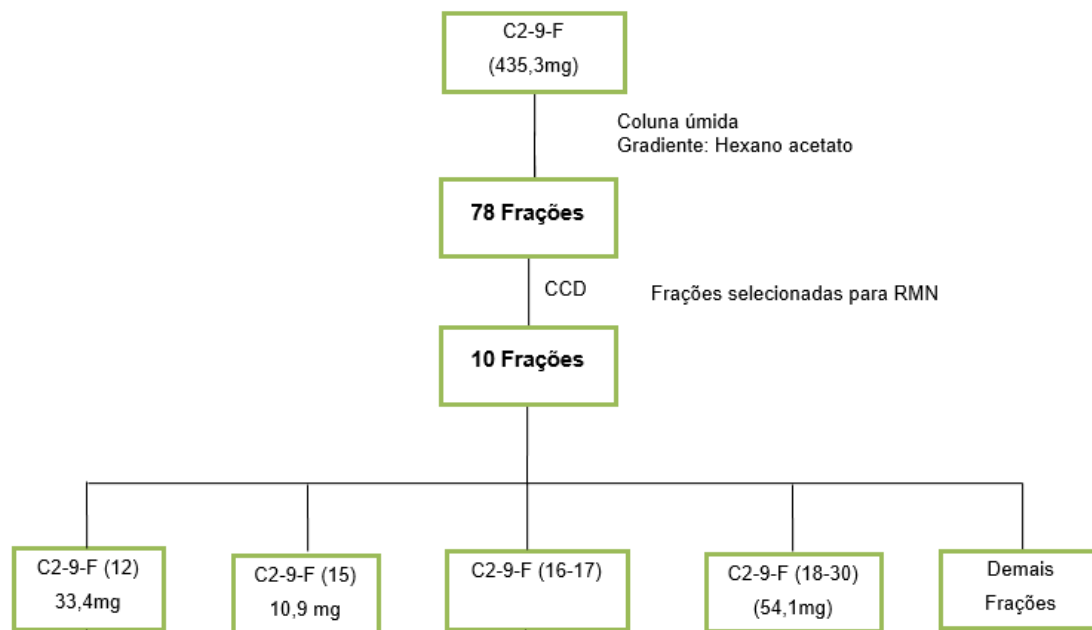
A fração C2-8-F, (374 mg), foi selecionada para novo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel empregando-se como fase estacionária sílica gel 60 (70-230mesh), eluída inicialmente com hexano. A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato até a adição de acetato puro e, por último, metanol. Foram obtidas 21 frações, de aproximadamente 20 mL (cada uma) que após evaporação do solvente, estas frações foram analisadas por CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, sendo reunidas em 3 frações (Figura 24).





**Figura24:** Fluxograma das frações obtidas da fração C2-F-8 da folha de *L. origanoides*

A fração C2-F-9, (435,3mg), foi selecionada para novo fracionamento em coluna cromatográfica aberta empregando-se como fase estacionária sílica gel 60 (70-230mesh), eluída inicialmente com hexano. A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato até a adição de acetato puro e, por último, metanol. Foram obtidas 78 frações, de aproximadamente 20 mL (cada uma) que após evaporação do solvente, estas frações foram analisadas por CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, sendo reunidas em 10 frações (Figura 25).



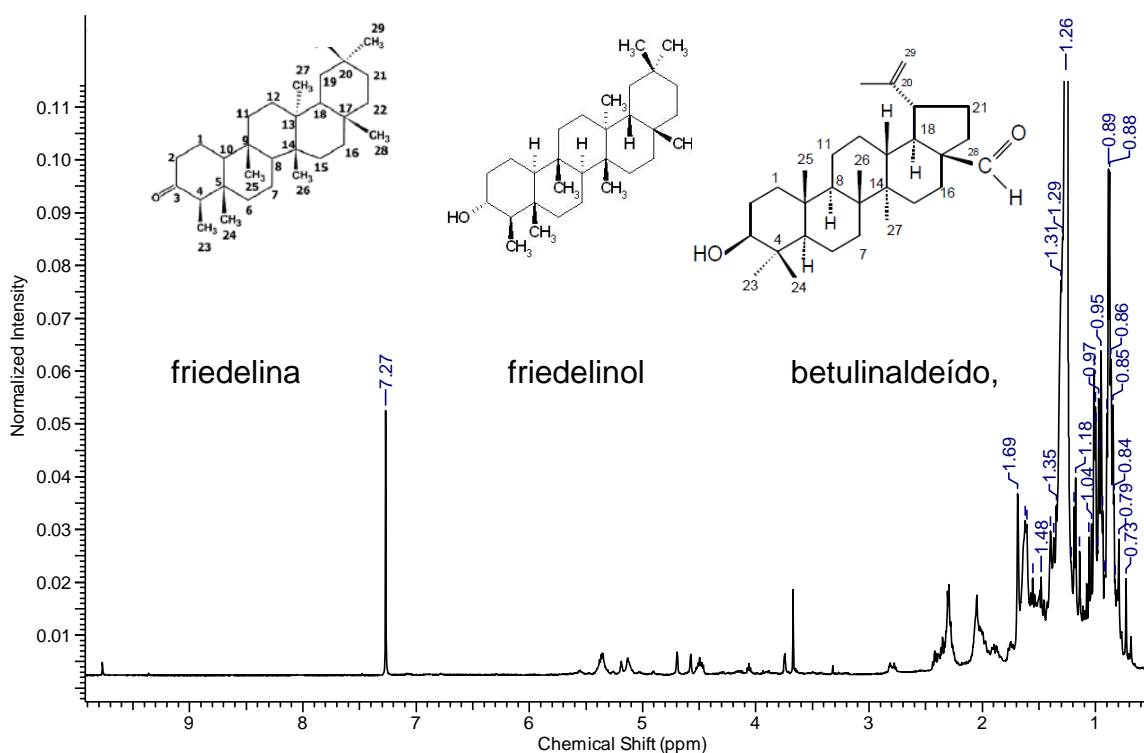
**Figura25:** Fluxograma das frações obtidas da fração C2-9-F da folha de *L. organoides*

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Estudo do extrato hexânico caule

A triagem fitoquímica preliminar realizada no extrato hexânico do caule de *Lippia origanoides* demonstrou a presença de esteróides e triterpenoides. Essas classes de compostos químicos encontram-se em espécies vegetais (KABERA et al., 2014), e são responsáveis por diversas propriedades biológicas.

Através da análise espectroscópica de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 26) do extrato hexânico e comparação com dados disponíveis na literatura foi possível identificar as moléculas como, friedelina, friedelinol e betulinaldeído, triterpenos pentacíclicos que possuem trinta átomos de carbono.



**Figura 26** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico do caule [600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)].

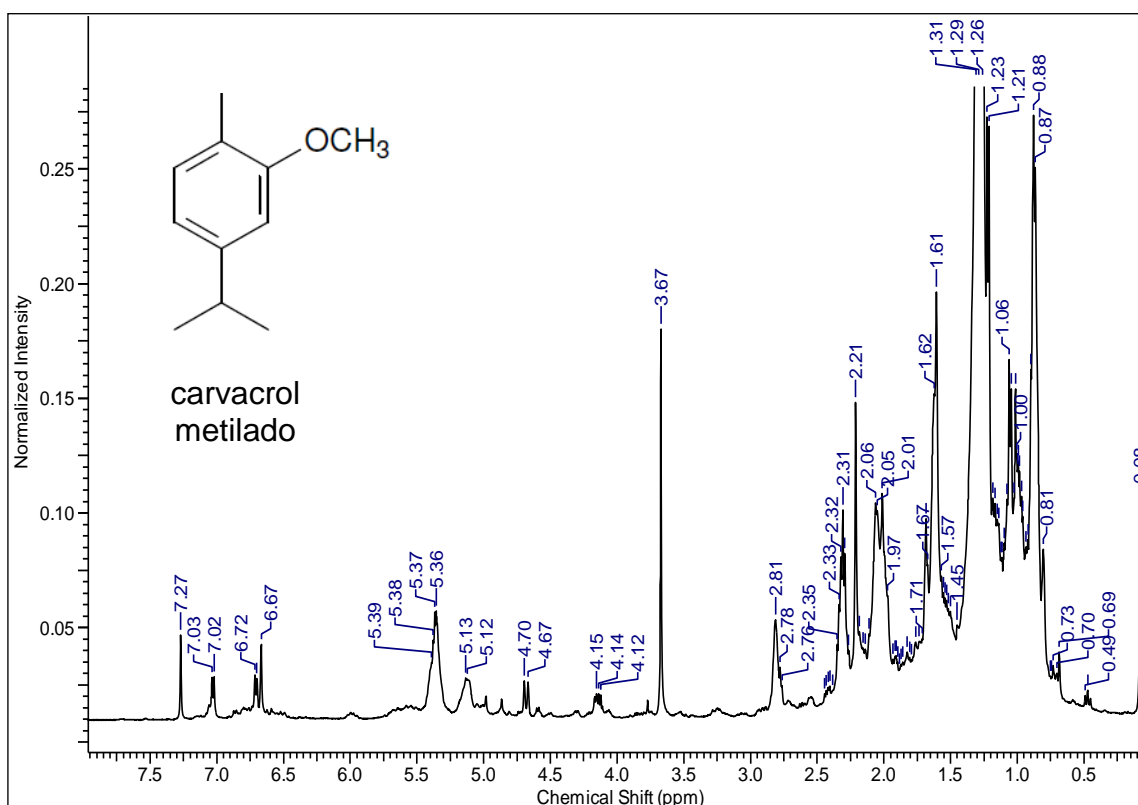
A molécula Friedelina apresentou as seguintes atividades tais como anti-*Mycobacterium tuberculosis* (NASSER et al., 2014), antimicrobiana (bactéria Gram positiva e negativa) antifúngica (*Candida* spp.; *Aspergillus*

*niger*), vasodilatadora (KUETE et al., 2007) e gastoprotetiva (ANTONISAMY et al., 2015).

Segundo GALLO & SARACHINE (2009) a molécula betulina aldeído possui atividade antitumoral como metástase, melanoma em rato, câncer de mama e leucemia humano.

### Estudo do extrato hexânico folha

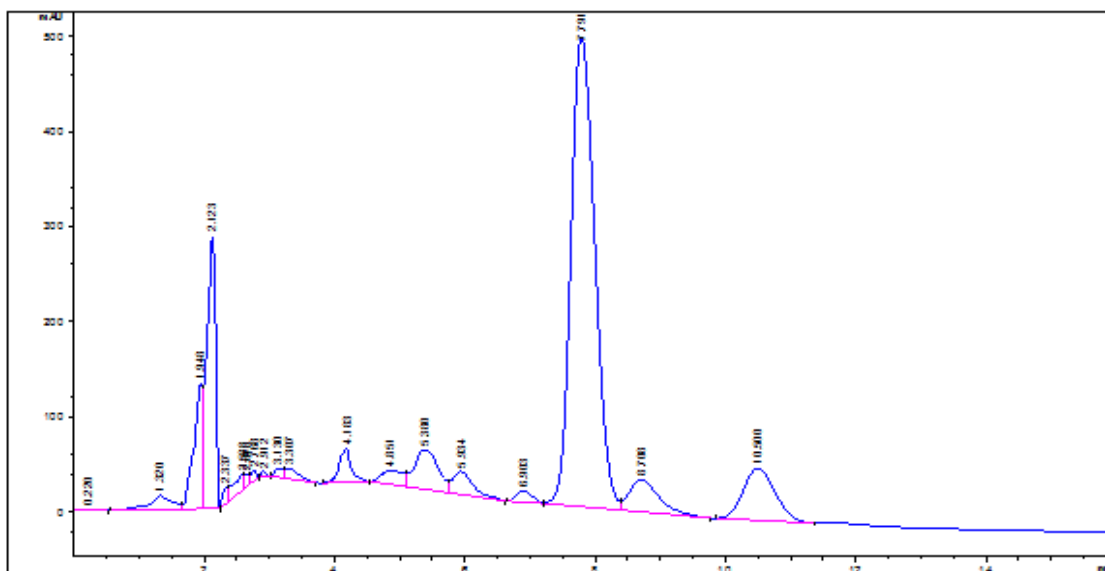
A triagem fitoquímica preliminar do extrato hexânico da folha de *Lippia organoides* identificou a presença de triterpenoides, grupo químico dos terpenos. A análise do extrato bruto hexânico por técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 35) e comparação com dados disponíveis na literatura permitiu identificar o carvacrol metilado derivado do carvacrol. O primeiro apresenta função éter, enquanto o segundo possui grupo fenólico na sua estrutura. O carvacrol metilado apresenta atividade larvicida (*Aedes aegypti*), moluscida (*Biomphalaria glabrata*) (LIMA, 2006).



**Figura 27** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico da folha [600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ].

### Estudo da fração C1C(11-15)

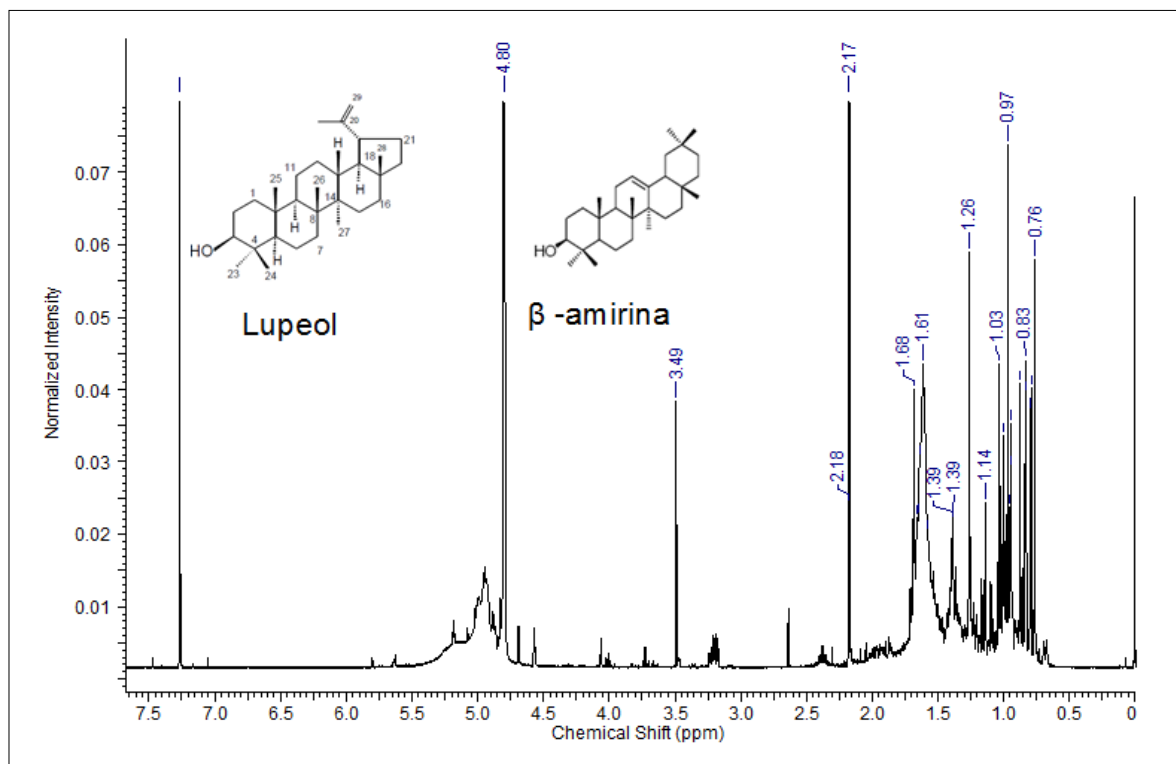
A partir da observação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e da CCDC, a fração (C1C(11-15)) obtida a partir do extrato diclorometano do caule foi reunida e escolhida para análise. A amostra (C1C(11-15)) foi analisada em CLAE no sistema isocrático acetronitrila/água (65:35) Figura ( 28).



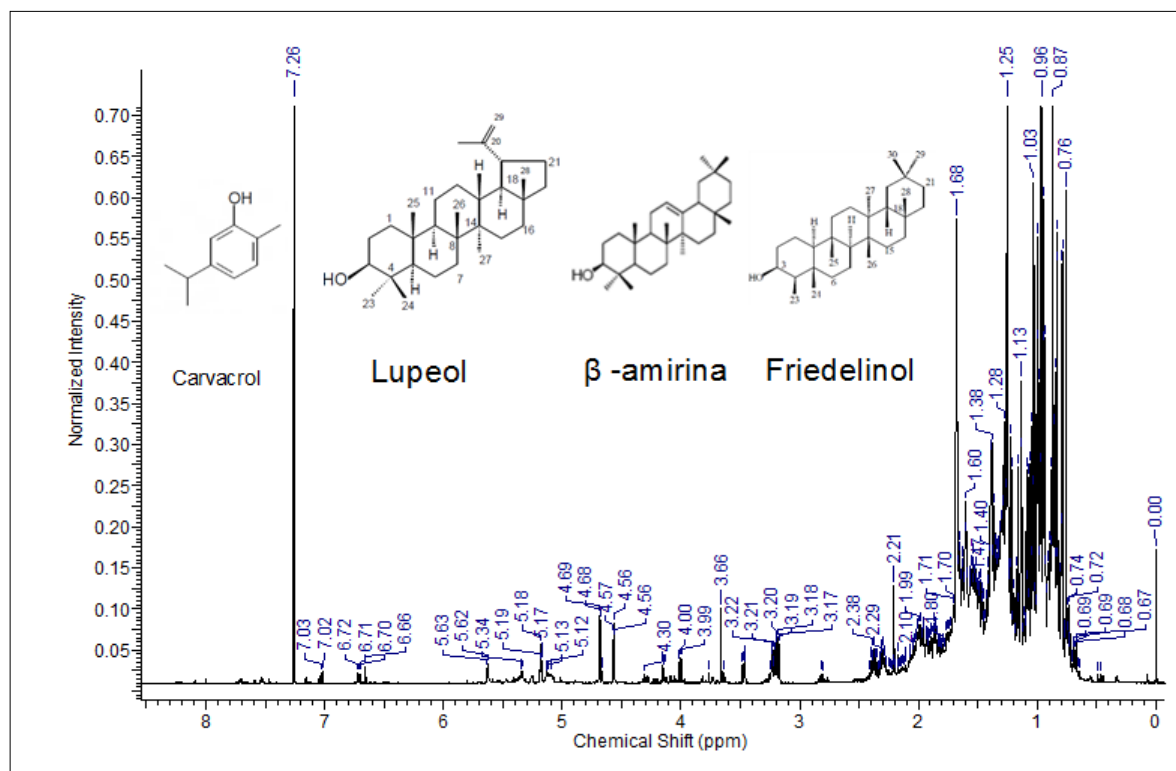
**Figura 28:** Cromatograma da fração C1C-11-15 obtido da CLAE

A fração C1C (11-15) 285,8 mg era constituída por um material oleoso, viscoso de cor amarela alaranjada em mistura com um sólido branco cristalino em formas de agulhas solúvel em acetato de etila. Esta fração foi submetida a uma separação no HPLC e posteriormente analisada no RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29). Deste procedimento foi obtido as substâncias lupeol e  $\beta$  - amirina triterpenoides pentacíclico. Uma parte da alicota que não foi submetida ao HPLC foi analisada no RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 30), originando as moléculas: lupeol,  $\beta$ -amirina, carvacrol (monoterpenos) e friedelinol.

Segundo GALLO & SARACHINE (2009) a molécula lupeol possui atividade antiprotozoária (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma cruzi* (SCHINOR et al., 2007), *Leishmania* antiinflamatória; antitumoral (metástase melanoma, melanoma primário, câncer de ovário humano, carcinoma pancreático humano, câncer de próstata e antiparasitária in vitro contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* (ESCOBAR et al., 2010).



**Figura 29** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1C( 11-15) do caule [600MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ ]



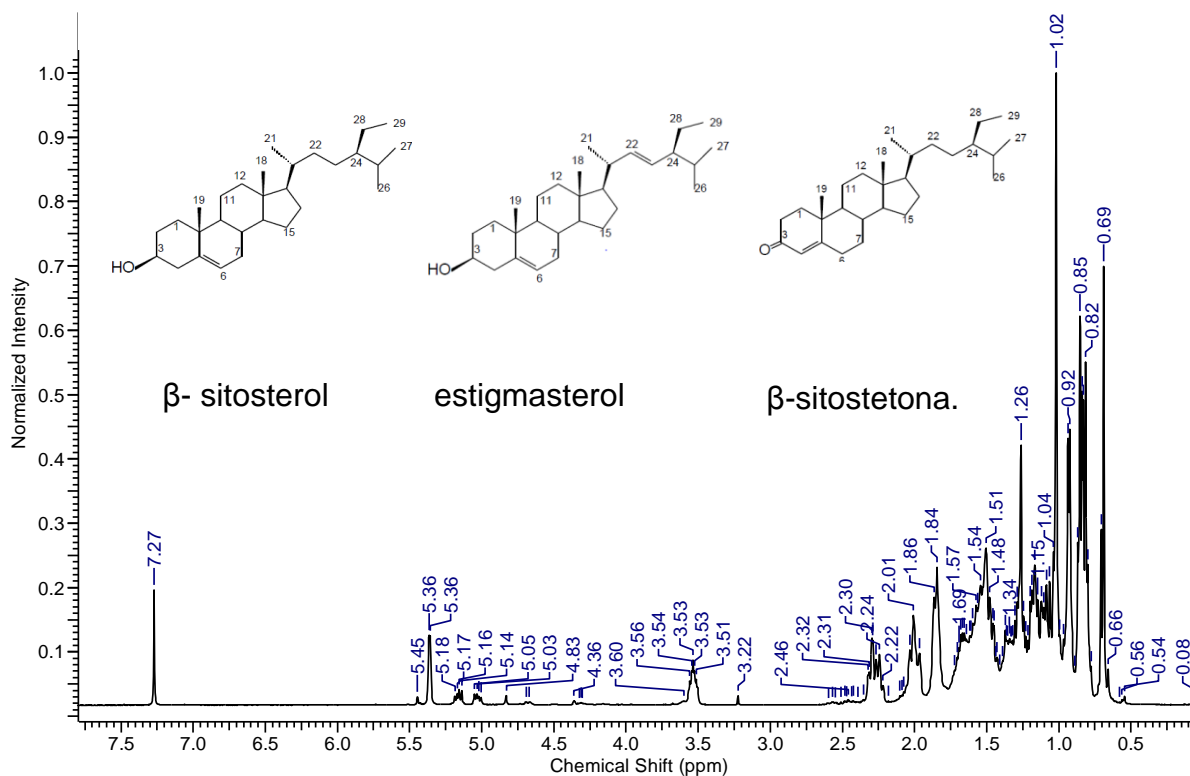
**Figura 30** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do da fração C1C(11-15) sem HPLC do caule [600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

### **Estudo da fração C1C (24)**

A fração C1C(24) 44,4 mg obtida do extrato diclorometano do caule de *L.origanoides* era constituída por um sólido cristalino branco, solúvel em clorofórmio. Esta fração foi submetida a uma separação no HPLC e posteriormente analisada no RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39). A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  permitiu identificar a mistura esteroidal  $\beta$ - sitosterol e estigmasterol e  $\beta$ -sitostetona.

As moléculas triterpênicas (Esteróides) apresentam caráter pouco polar ou moderadamente polar sendo extraídas em frações hexânicas (apolar), acetato de etila e acetona (polar) (CUELLAR et al., 2014), então, o fracionamento do extrato diclorometano do caule de *L. organoides* extraiu mistura de esteróides por se tratar de um solvente moderadamente polar.

Sendo assim, estudos apontaram a presença de mistura de esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol na família Verbenacea em raízes e folhas de *Lippia affinis gracillis* H.B.K, além de triterpenos:  $\alpha$ -amirina, ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico na espécie *Aloysia gratissima* (VANDRESEN et al., 2010).



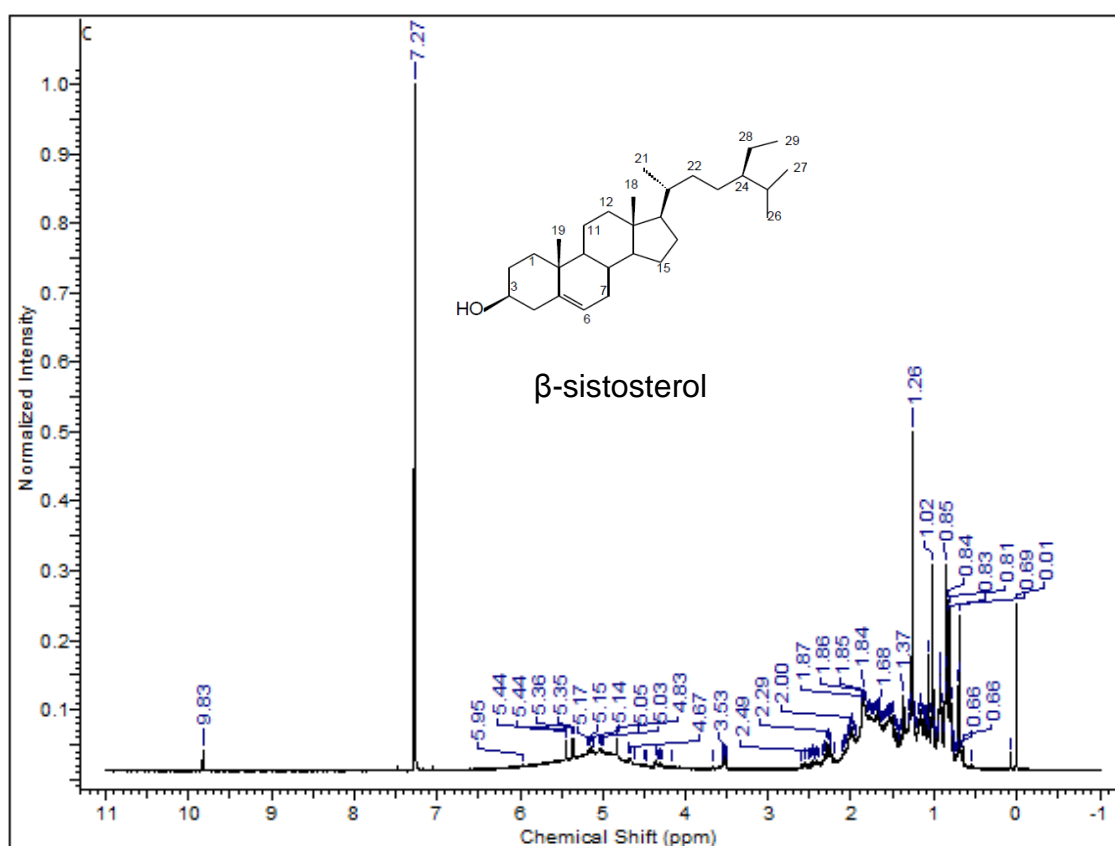
**Figura 39** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1C24 do caule [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

O  $\beta$ - sitosterol apresenta atividade citotóxica inibindo duas linhagens de células cancerígenas, próstata e cólon do útero, efeitos neutralizantes sobre veneno de víbora e cobra, reduzem os níveis de colesterol na corrente sanguínea devido à capacidade de seus ésteres diminuir a absorção no intestino de colesterol LDL (PARK et al., 2007; GOMES et al., 2007; AMINA et al., 2017).



### Estudo da fração C1C (16-25)

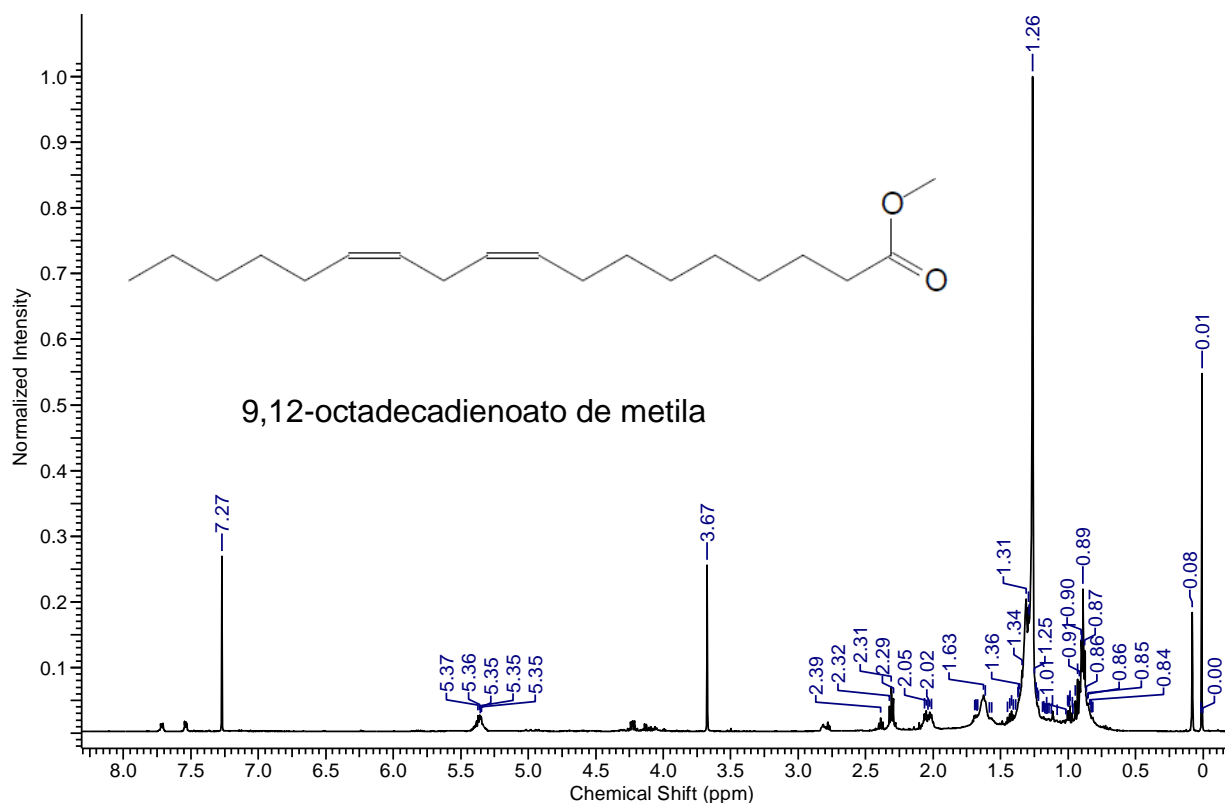
A fração C1C(16-25-2-óleo) foi originada após separação no HPLC da fração C1C(16-25) observando-se a formação de precipitados amorfos com coloração amarela. Estes foram lavados com metanol para retirada de impurezas e colocados em um béquer onde foi deixado na capela para secagem do solvente adquirindo assim uma alicota oleosa. Em seguida, a amostra resultante foi submetida à análise espectrométrica de RMN  $^1\text{H}$ (Figura 40). Deste procedimento foi obtido a substância  $\beta$ -Sistosterol mistura de esteroide com diversas atividades biológicas.



**Figura 40** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1C(16-25) do caule [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ].

### Estudo da fração C1C (30- 5)

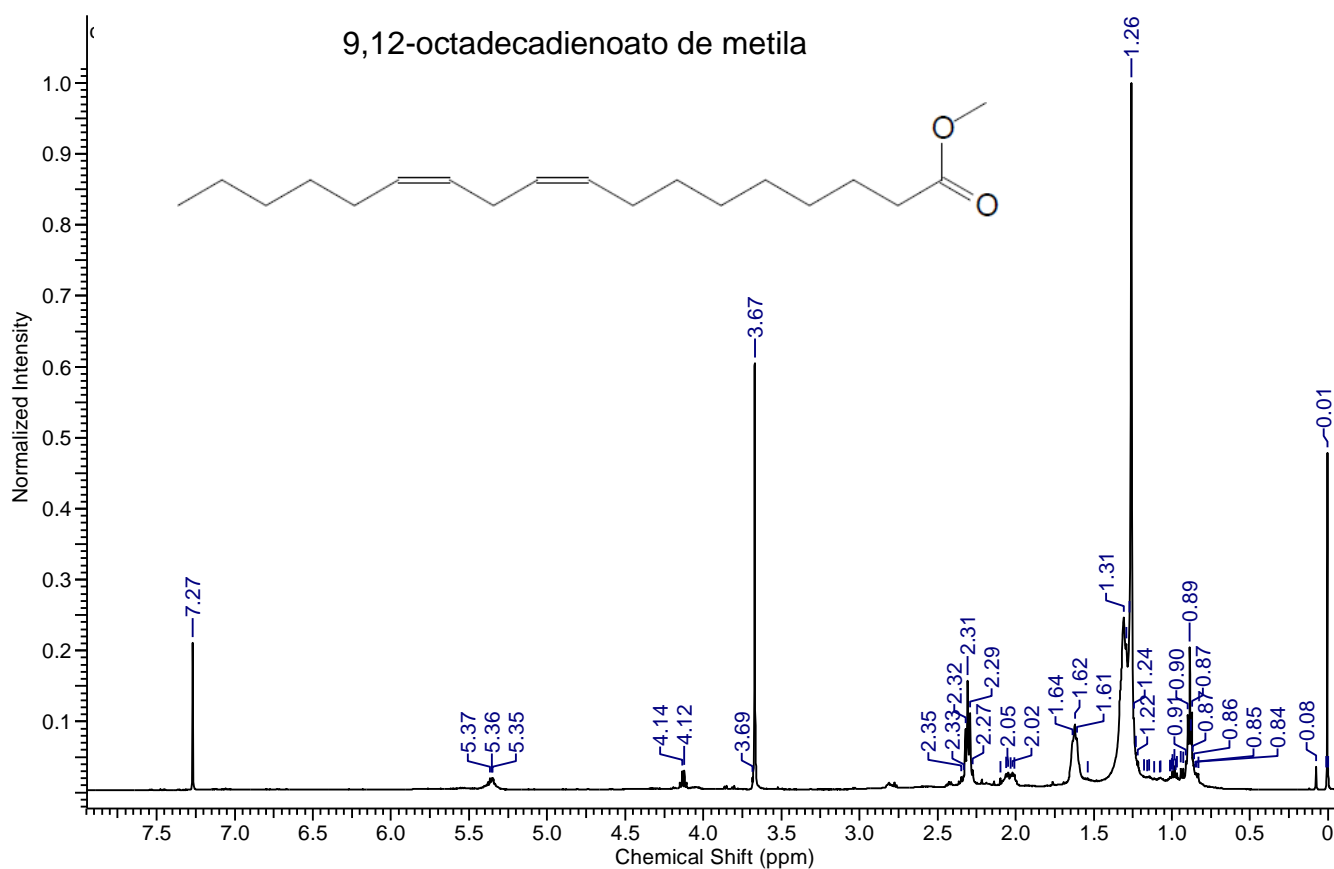
A fração obtida C1C30-5(13,8 mg) foi purificada no HPLC e analisada no RMN de  $^1\text{H}$ (Figura 41), confirmando a substância Éster metílico, 9,12-octadecadienoato de metila(Linoleato de metila).



**Figura 41** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1C(30-5) do caule [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

### Estudo da fração C1F(8-9)

A fração obtida C1F(8-9) (20mg) obtida do extrato diclorometânico da folha de *L.origanoides* foi purificada no HPLC e identificada via análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ (Figura 42) e comparação com dados da literatura, confirmando a molécula: 9,12-octadecadienoato de metila (Linoleato de metila-Éster metílico). Este um derivado de ácido graxo (COSTA et al .,2008).



**Figura 42** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1F(8-9) da folha [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

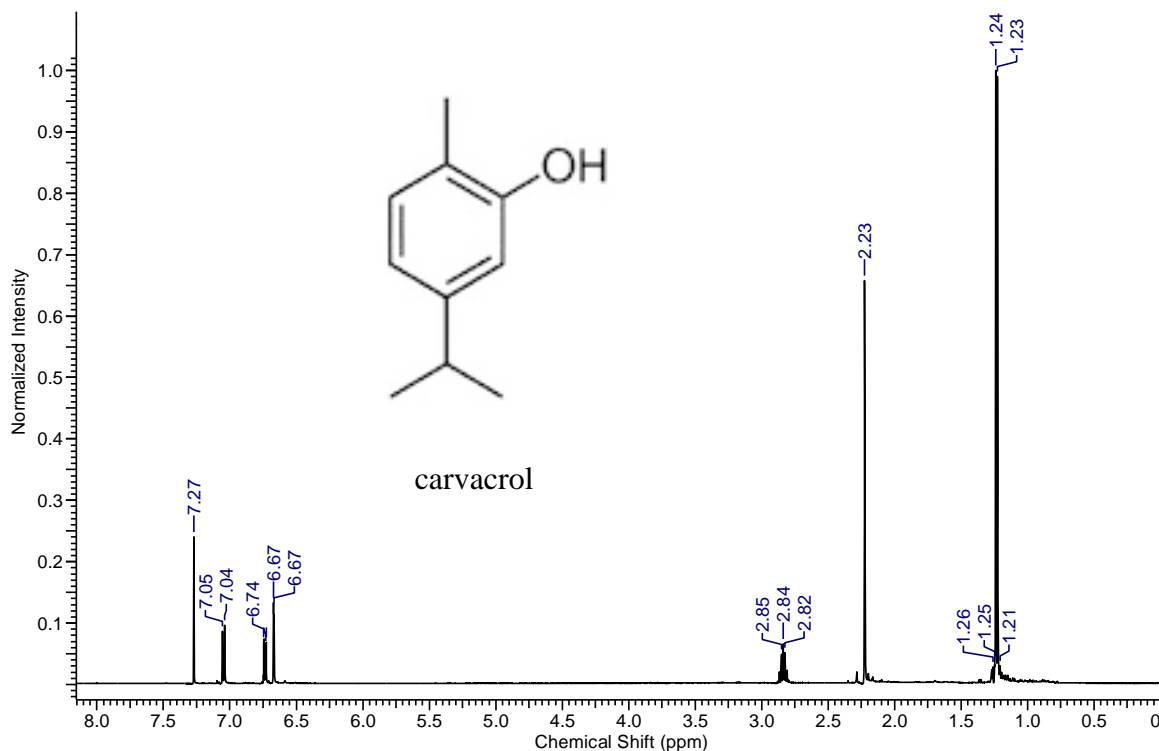
### Estudo da fração C1F(12-15)

A análise da fração C1F(12-15) por técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$ (Figura 43) e comparação com dados disponíveis na literatura permitiu identificar o carvacrol. As espécies vegetais que apresentam este constituinte químico como majoritário possuem atividade biológica, antimicrobiana (PEREIRA et al.,2016; SARRAZIN et al.,2015;ANDRADE et al.,2014 ), antioxidante (TELES et.al., 2014) e antiviral (MENESES et al.,2012).

O carvacrol é um monoterprenoide ( $\text{C}_{10}$ ) constituído de duas unidades de isopreno ( $\text{C}_5\text{H}_8$ ) que possui baixo peso molecular, sendo assim, bastante volátil. Constituinte químico dos óleos essenciais de diversas espécies medicinais (OLIVEIRA et al., 2016).

O óleo essencial são misturas de inúmeros compostos químicos orgânicos voláteis, produzido nos tricomas glandulares, apresentando o timol e

carvacrol como marcadores químicos, ambos com propriedades anti-séptica, anti-inflamatória e antioxidante, todavia a presença de favonoides como constituinte químico confere a espécie atividade antioxidante (SOUZA, 2015).



**Figura 43** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1F(12-15) da folha [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

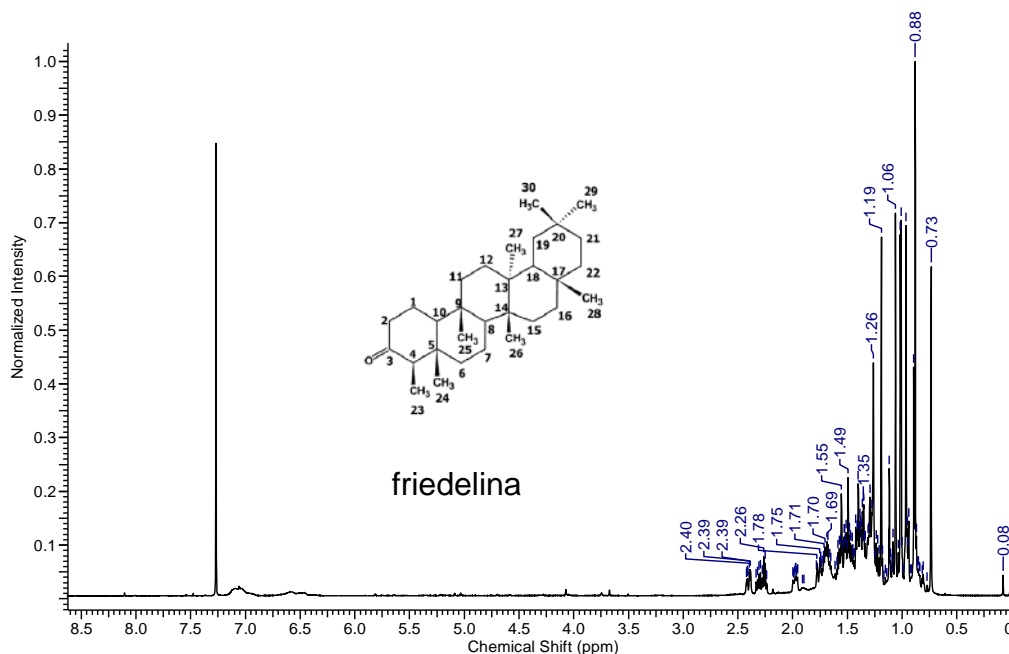
### Estudo da fração C1F(18-21)

A fração obtida C1F(18-21)(22,4 mg) obtida do extrato diclorometânico da folha de *L.origanoides* era constituída por um sólido branco cristalino em forma de agulhas. Foi purificada no HPLC e identificada via análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ (Figura 44) e comparação com dados da literatura, confirmando a molécula Friedelina ou friedelan-3-ona.

O triterpeno pentacíclico cetônico friedelina foi isolado de muitas espécies vegetais, tais como, *Sacoglottis uchi* (Humiraceae), casca do caule, *Piranhea atrifoliata* (Picrodendraceae) folha, *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) cascas, (ABREU et al.,2013; JEFFREYS et al., 2016; NASSER et al.,2014); apresentando atividades tais como, citotoxicidade contra as linhas celulares tumorais humanas; antileishmania ; antiulcerogênica gástrica;

*AntiMycobacterium tuberculosis* (MOSSI et al., 2004; SURENDRA; COREY et al., 2009; SANTOS-TORRES et al., 2004; NASSER et al., 2014).

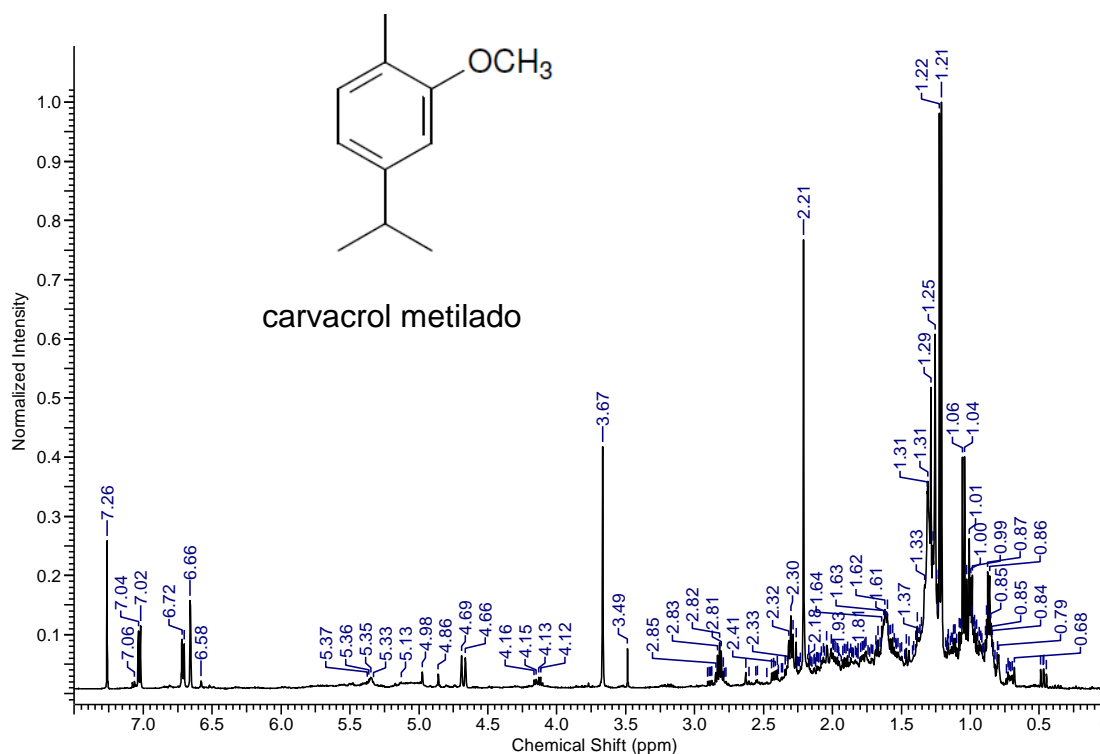
Neste sentido, muitos compostos isolados de espécies vegetais possuem propriedades biológicas promissoras no tratamento de diversas doenças que acometem a população, sendo um recurso terapêutico complementar e protótipos para serem utilizados na indústria farmacêutica.



**Figura 44** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1F(18-21) da folha [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

### Estudo da fração C2F(8(7-13))

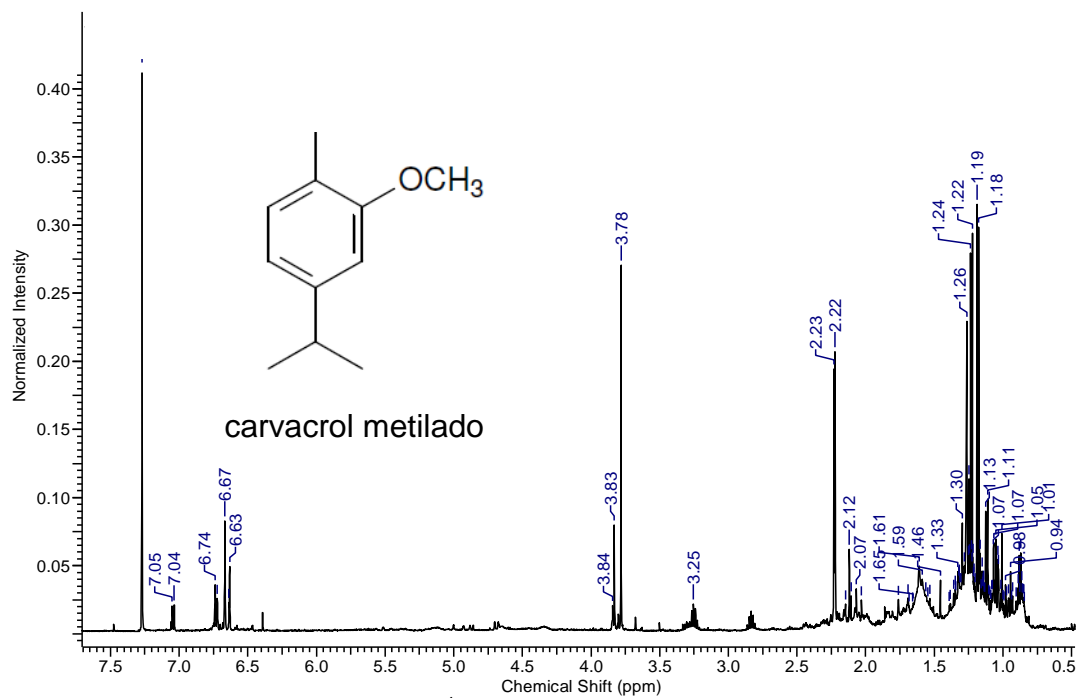
A análise da fração C2F(8(7-13)) por técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 45) e comparação com dados disponíveis na literatura permitiu identificar o carvacrol metilado.



**Figura 45** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C2F(8(7-13)) da folha [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

### Estudo da fração C2F(9(16-17))

A análise da fração C2F(9(16-17)) por técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 46) e comparação com dados disponíveis na literatura permitiu identificar o Carvacrol metilado (derivado do carvacrol). O óleo essencial obtido das folhas e talhos de *Lippia gracillis* teve como componente majoritário o carvacrol que foi modificado através de reações químicas dando origem ao carvacrol metilado que apresentou atividade larvicida (*Aedes aegypti*), moluscida (*Biomphalaria glabrata*), antimicrobiana e antioxidante inferior ao carvacrol, demonstrando a relação dos grupos fenólicos com as atividades biológicas (LIMA, 2006).



**Figura 46** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração C2F(8(7-13)) da folha [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]

## CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *Lippia origanoides* permitiu isolar e identificar alguns de seus constituintes químicos, cinco triterpenos pentacíclicos, friedelina, friedelinol, betulinaldéido, lupeol e  $\beta$  amirina, também se isolaram dois monoterpenos, carvacrol e carvacrol metilado, e três esteroides,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol,  $\beta$ -sitostetona e um éster metílico 9,12-octadecadienoato de metila (Linoleato de metila), confirmando a composição rica em terpenos e esteroide característica do gênero. Os constituintes químicos do caule e folha foram identificados por método espectroscópico, RMN de<sup>1</sup>H.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, V. G. D. C; Corrêa, G. M., Lagos, I. A. D. S., Silva, R. R., & Alcântara, A. F. D. C 2013. Pentacyclic triterpenes and steroids from the stem bark of uchi (*Sacoglottis uchi*, Humiriaceae). *Acta Amazonica* 4: 525-528.

Almeida, M. C. S.; Alves, L. A.; Souza, L. G. S.; Machado, L. L.; DE Mattos, M. C.; DE Oliveira, M. C. F.; Lemos T. L. G.; Braz-Filho 2010. *Revista Quimica Nova* 33: 1877.

Amina, M., Amina, T., Al-musayeib, N., Zabin, S. A., Hassan, M. S., & Khil, M. S 2017. Encapsulation of  $\beta$ -Sitosterol in Polyurethane by Sol–Gel Electrospinning *Applied biochemistry and biotechnology* 2: 624-634.

Andrade, V. A.; Almeida, A. C. ; Souza, D. S.; Colen, K. G.F.; Macêdo, A.A.; Martins, E. R.; Fonseca, F.S.A.; Santos, R. L 2014. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 34: 1153-1161.

Arango B, O. S. C. A. R.; Pantoja D, D. I. A. N. A.; SantaCruz CH, L. O. R. E. N. A. Arango, Oscar et al 2012. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia organoides* HBK) del Alto Patía. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10: 79-86.

Antonisamy, P; Duraipandiyan, V., Aravinthan, A., AL-Dhabi, N. A., Ignacimuthu, S., Choi, K. C; Kim, J. H 2015. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. *Eur. Journal of Pharmacol* 750:167–175.

Antonisamy, P; Duraipandiyan, V; Ignacimuthu, S. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models 2016. *Journal Pharmacy and Pharmacological* 63: 1070–1077.

Atanasov, A. G; Waltenberger, B; Pferschy-Wenzig, E. M; Linder, T; Wawrosch, C; Uhrin, P; Rollinger, J. M 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*. In press

Bandeira, Paulo N.; Lemos Telma L. G.; Costa, Sônia M. O.; Santos, Hécio S 2007. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 204-208.

Barbosa, C. S; Maia, F; Santos, D. Q; Terrones, M. G. H 2008. Potencial herbicida do extrato diclorometanólico de folha de lixeira (*Curatella americana* L.). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Uberlândia. Anais Uberlândia: UFU, 340-345.

Betancourt, L.; Phandanavong, V.; Patiño, R.; Ariza-Nieto, C.; Afanador-Téllez, G 2012. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 59: 21-31.

BRAQUEHAIS, I; VASCONCELOS, F; RIBEIRO, A; DA SILVA, A. R. A; FRANCA, M; DE LIMA, D. R; MAGALHÃES, F 2016. Toxicological, antibacterial, and phytochemical preliminary study of the ethanolic extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão-bravo, Euphorbiaceae) leaves, collected in Tauá, Ceará, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 18: 582-587.

Borges, A. M. *et al.* Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). , 2012. *Revista brasileira de plantas medicinais Botucatu* 14: 656-664.

Cardoso, R S. Desenvolvimento de técnicas farmacêuticas para obtenção da droga vegetal a partir das folhas de erva-cidreira (*Lippia alba* (mill.) n.e. brown) quimiotipo. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

Careri, M., Elviri, L 2001. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. Journal of chromatography A 935: 249-257.

Castro, Paulo. R. C. Klugue, Ricardo. A. Peres, Lázaro. E. P 2005 Manual de Fisiologia Vegetal (Teoria e Prática). Editora Agronômica Ceres, Piracicaba, 650.

Cavalcanti, S. C. H.; Niculau, E. D. S.; Blank, A. F.; Câmara, C. A. G.; Araújo, I. N.; Alves, P. B 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Bioresource Technology, 101:829-832.

Coelho, A. G.; Neto, J. S. L.; Moura, A. K., De Sousa, T. O.; Morais, I. C., Carvalho, G. D.; Arcanjo, D. D Coelho, Angélica G. et al 2015 Optimization and standardization of extraction method from *Lippia organoides* HBK: Focus on potential anti-hypertensive applications. Industrial Crops and Products 78: 124-130.

Costa, J. S. B 2008 Óleos de soja Geneticamente Modificada: Caracterização Nutricional e Detecção de ADN. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Costa, P. S.; Souza, E. B. D.; Brito, E. H. S. D.; Fontenelle, R. O. D. S 2017. Antimicrobial activity and therapeutic potential of the genus *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). Hoehnea 44: 158-171.

Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Assunção, J. C. C.; Braz-Filho, R 2002. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham. Verbenaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 12: 66-67.

Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Pessoa, C.; Montenegro, R. C.; Braz-Filho, R 2001. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. Journal of natural products, 64: 792-795.

Costa-júnior, L. M.; Miller, R. J.; Alves, P. B.; Blank, A. F.; Li, A. Y.; De León, A. A. P 2016."Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Veterinary Parasitology* 228: 60-64.

Cuellar, Y. P. G.; Nuñez, A. D.; Castillo, L. L. O.; Vanegas, J. B.; Osorio, J. C. C.; Rodríguez, J. I. M. 2016. Estudio fitoquímico preliminar y de actividad antimicrobiana de la especie *Lippia alba* originaria del Piedemonte Amazónico. *Momentos de Ciencia* 11.

Duraipandiyan, V.; Gnanasekar, M.; Ignacimuthu, S 2010. Antifungal activity of triterpenoid isolated from *Azima tetraantha* leaves. *Folia Histochem Cytobiol* 48: 311–313.

Escobar, P.; Leal, S. M.; Herrera, L. V.; Martinez, J. R.; Stashenko, E 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105: 184-190.

Farias, E. M. F. G.; Ximenes, R. M.; Magalhães, L. P. M.; De Andrade Chiappeta, A.; Albuquerque, J. F. C 2012. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. *Jornal Herbal Medicina* 2: 63-67.

Funari, C. S.; Almeida, L. D.; Passalacqua, T. G.; Martinez, I.; Ambrosio, D. L.; Cicarelli, R. M. B 2016. Graminha, M. A. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity. *Acta Amazonica* 46: 411-416.

Furtado, N. A., Pirson, L.; Edelberg, H.; M Miranda, L.; Loira-Pastoriza, C.; PREAT, V.; André, C. M 2017. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* 22: 400.

GALLO, M. B. C.; Sarachine, M. J 2009. Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3: 46.

Giménez, E.; Juan, M. E.; Calvo-Melià, S.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V.; Planas, J. M 2015. Pentacyclic triterpene in *Olea europaea* L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1410: 68-75.

Giulietti, A. M.; Conceicao, A.; Queiroz, L. P 2006. Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semiárido brasileiro. Recife: Associação das Plantas do Nordeste 488.

Gomes, A.; Saha, A.; Chatterjee, I.; Chakravarty, A 2007. Viper and cobra venom neutralization by  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine* 14 (9): 637–643.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S 2011. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química* 36: 64-67.

Gomes, G. A.; Monteiro, C. M. O.; Senra, T. O. S.; Zeringota, V.; Calmon, F.; Matos, R. S.; Daemon, E.; Gois, R. W. S.; Santiago, G. M. P.; Carvalho, M. G 2012. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 111: 2423-2430.

Gutiérrez, S. D.; Kuri, S. A.; Martín-Herrera, D 2017. The bioguided fractionation and pharmacological activity of an endemic *Salix canariensis* species. *Acta Pharmaceutica* 67: 265-273.

Harper et al. 2002. *Bioquímica*. Editora Atheneu: São Paulo, 2002. 9ª ed. Harper et al. *Bioquímica*. Editora Atheneu: São Paulo 9ª ed.

Hata K, Hori K, Takahashi S (2002) Differentiation and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *J Nat Prod* 65: 645–648.

Hernandes, C; Pina, E. S.; talebcontini, S.H ;Bertoni,B.W.;Cestari,I. M.; Espanha, L. G.;Pereira, A. M. S 2017.*Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. Journal of Applied Microbiology.

Jeffreys, M. F.; Nunez, C. V 2016.Triterpenes of leaves from *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). Acta Amazonica 46: 189-194.

Kiprono, P. C.; Kaberia, F.; Keriko, J. M.; Karanja, J. N 2000. The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of  $\beta$ -sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Zeitschrift für Naturforschung C, 55(5–6), 485–488.

Kuete, V.; Nguemeving, J. R.; Beng, V. P.; Azebaze, A. G. B.; Etoa, F. X., Meyer, M.; Nkengfack, A. E 2007.Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae).Jornal Ethnopharmacol109: 372–379.

Lemos T. L. G.; Monte F. J. Q.; Santos A. K. L.; Fonseca A. M, Santos H. S.; OLIVEIRA M. F 2007.Quinones from plants of northeastern Brazil: Structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. Nat Prod Res 21: 529-50.

Lima, M. C. L.; 2006. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Lippia affinis gracillis*. Tese (Doutorado em Química Orgânica - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Lima, R. K.; Cardoso, M. D. G.; Moraes, J. C.; Carvalho, S. M., Rodrigues, V. G.; Guimarães, L. G. L 2011. Chemical composition and fumigant effect of essentialoil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.)(Coleoptera: Tenebrionidae). Ciência e Agrotecnologia 35: 664-671.

Lima, T. C. D.; Cardoso, M. V.; Modesto, T.; DE Brito Oliveira, A. L.; DA Silva, M. N.; Monteiro, M. C. 2017.Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de

Stryphnodendron adstringens utilizada na Amazônia. Revista Fitos Eletrônica 10: 329-338.

Lou-Bonafonte, J. M.; Arnal, C.; Navarro, M. A.; Osada 2012. J. Efficacy OF Bioactive Compounds From Extra Virgin Olive Oil To Modulate Atherosclerosis Development. Molecular Nutrition & Food Research 56: 1043-1057.

Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M.; Juan, M. E.; 2014. Planas, J. M.. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives a promising nutraceutical. Molecules 19: 11538-11559.

Maia, J. G. S.; Taveira, F. S. N.; Andrade, E. H. A.; DA Silva, M. H. L.; Zoghbi, M. D. G. B 2003. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. Flav. Frag. J 18: 417-420.

Majolo, C.; Rocha, S. I. B.; Chagas, E. C.; Chaves, F. C. M.; BIZZO, H. R 2016. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research 2380-2387.

Mankani, K. L.; Krishna, V.; Manjunatha, B. K.; Vidya, S. M.; Singh, S. D.; Manohara, Y. N.; Kuppast, I. J 2006. Hepatoprotective Effects of the Triterpenes Isolated from the Stem Bark of *Diospyros cordifolia* Roxb. Journal of Natural Remedies.

Marco, C. A.; Teixeira, E.; Simplicio, A.; Oliveira, C.; Costa, J.; Feitosa, 2012. J. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Chilean Journal of Agricultural Research 72: 157- 160.

Martucciello, S.; Balestrieri, M. L.; Felice, F.; Estevam, C. S.; Matos 2007. F. J. A. Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, p.365.

Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W., 1996. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. J. Essent. Oil Res. 8: 695–698.

Medeiros, F. C.; Gouveia, F. N.; Bizzo, H. R.; Vieira, R. F.; Del Menezzi, C. H., 2016. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 87-93.

Mendes, S. S.; Bomfim, R. R.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; Blank, A. F., Estevam, C. S.; Thomazzi, S. M 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Jornal Ethnopharmacol* 129: 391-397.

Meneses, R.; Ocazonez, R. E.; Martínez, J. R.; Stashenko, E. E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2009.

Miranda G. S.; Santana G. S.; Machado B. B; Coelho F. P.; Carvalho C. A 2013. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 15(1): 11-104.

Morais, S.M.; Braz-Filho, R.(Org.). *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: Eduece, 2007.

Moreira, B. O. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl. (Anacardiaceae). 2009. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, p.119 2009.

Mossi, A. J.; Cansian, R. L.; Carvalho, Z.A.; Dariva, C.; Oliveira, V.J.; Mazutti, M.; Filho, I.N.; Echeverrigaray, S. 2004.Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO<sub>2</sub>. *Fitoterapia* 75: 168-178.

Nasser, A. L. M.; Pavan, F. R.; Boralle, N.; Zocolo, G. J.; Santos, L. C. D.; Marchi, M. R. R.; Vilegas, W 2014. Esteroides e Triterpenos de espécies de *Qualea*—Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 34: 513-517.



Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. E.; 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais motschulsky* (coleoptera). *Journal of stored products research* 45: 212-214.

Neves, D. P., Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato. Fortaleza, 2009. 94p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará.

Niculau, E. S.; Freitas, S. D. L.; SÁ, I. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G 2016. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM. *Revista Virtual de Química* 8: 204-230.

O'LEARY, N., D, S. S., S, F., M, M.E., 2012. *Jornal Botanico Linnean Society* 170-197.

Oliveira, D.R. Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade de Oriximina´ (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o Gênero *Lippia*. Tese. Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, p. 111. 2004.

Oliveira, D. R.; Leitao, G. G.; Santos, S. S.; Bizzo, H. R.; Lopes, D.; Alviano, C. S.; Leitao, S. G 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina - Brazil. *Journal of Ethnopharmacol* 108: 103-108.

Oliveira, D. R.; Leitão, G. G.; Bizzo, H. R.; Lopes, D.; Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; Leitão, S. G 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry* 101: 236–240.

Oliveira, F. C; Barbosa, F. G; Mafezoli, J; Maria DA Conceição, F., Neto, M. A; Guedes, M. L. 2013. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 51: 328-330.

Oliveira DR, Leitão GG, Fernandes PD, Leitão SG 2014. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Revista Brasileira Farmacognosia* 206–214.

Oliveira, N.T. Almeida S. S. M 2016. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida Aublet* (Apocynaceae), Revista biota Amazonia 6: 20-25.

Ospina, J. D.; Orozco, Manuel S. S; Correa.; C R. B 2016.Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth. Acta Agronómica 65: 170.

Park, C.; Moon, D.-O.; Rhu, C. H.; Choi, B. T.; Lee, W. H.; Kim, G.-Y.; Choi, Y. H 2007. Betasitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. Biological and Pharmaceutical Bulletin 30(7): 1317–1323.

Parra, E.T.; Rodriguez, N.L. 2007. Plasticidad fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia organoides* (Verbenaceae) em resposta a la disponibilidad de luz. Acta Biologica Colombiana 12: 91–102.

Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; Villar, 2001.A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology Lausanne 76: 201-214.

PEREIRA, W. H., BIZZO, H. R., GAMA, P. E., ALVIANO, C. S., SALIMENA, F. R. G., ALVIANO, D. S., & LEITÃO, S. G. 2016. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia organoides* Kunth. Journal of Essential Oil Research 1-8.

Pessoa,C.;Costalotufu,L.V.; Leyva,A.; Moraes,M.E.A.; Moraes,M.O 2006.Anticancer potential of Northeast Brazilian plants Lead Molecules Nat.Prod 2: 197-211.

Pilau, M. R.; Alves, S. H.; Weiblen, R.; Arenhart, S.; Cueto, A. P.; Lovato, L. T 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican 99 oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. Brazilian Journal of Microbiology 42: 1616-1624.

Pinho, L.; Silva Souza, P. N.; Macedo Sobrinho, E.; Almeida, A. C.; & Ronie Martins, E 2012. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. Ciência, Rural Santa Maria 42: 326-331.

Qiao, S.; Shi, R.; Liu, M. A.; Zhawng, C.; Yang, W.; Shi, X.; Jiang, X.; Wang, C.; Qiao, W 2011. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in *Herba Scutellariae barbatae* and its confused plants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry 129: 1297-1304.

Queiroz, M. R. A., Almeida, A. C., Andrade, V. A., Lima, T. S., Martins, E. R., Figueiredo, L. S., Careli, R. T 2014. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais Campinas 16: 737-743.

Rauth, S.; Ray, S.; Bhattacharyya, S.; Mehrotra, D. G.; Alam, N., Mondal, G.; MURMU, N 2016. Lupeol evokes anticancer effects in oral squamous cell carcinoma by inhibiting oncogenic EGFR pathway. Molecular and cellular biochemistry 417: 97-110.

Ribeiro, A. F.; Andrade, E. H. A.; Salimena, F. R. G.; Maia, J. G. S 2014. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. Biochemical Systematics and Ecology 55: 249-259.

Rivero-cruz, I.; Duarte, G.; Navarrete, A.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. Journal of Food Science 76: 309-317.

Rodrigues, I. S. C.; Oliveira, D. B.; Menezes, P. C. B.; Costa, F. N.; Carlos, M. X.; Silva Pereira, S. L 2013. Effect of *Lippia sidoides* in mouthrinses on de novo plaque formation: A double-blind clinical study in humans. *Indian Journal of Dental Research* 24: 533.

Rodrigues, P. M.; Gomes, J. V. D.; Jamal, C. M.; Neto, Á. C.; Santos, M. L.; FAGG, C. W.; Silveira 2017. Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). *Food and Chemical Toxicology*.

Rodriguez-Rodriguez, R 2015. Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem* 22: 1414–1425.

Salimena, Fátima Regina G. et al. 2002. Two new species of *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) from South America. *Hickenia* 3: 145-149.

Salvador, J. A.; Moreira, V. M.; Goncalves, B. M.; Leal, A. S.; Jing, Y 2012. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Natural Product Reports* 29: 1463-1479.

Sangsuwon, C.; Jiratchariyakul, W.; U-Pratya, Y.; Kummalue, T 2013. Antiproliferative Effect and the Isolated Compounds of *Pouzolzia indica*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1-8.

Santos, F. J.; Lopes, J. A. D.; Cito, A. G. L.; Oliveira, E. H.; DE Lima, S. G.; Reis, F. D. A. 2004. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res* 16: 504-506.

Santos-Torres E.C.; Lopes, D.; Oliveira, R.R.; Carauta, C.A.; Falcão, B.; Kaplan, M.A.C.; Bergmann-Rossi, B 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* 11: 114-120.

Santos, M. Á. S. Síntese de ésteres derivados de triterpenos e esteroides com potencial atividade biológica. 2016.

Sarrazin, S. L. F.; DA Silva, L. A.; Oliveira, R. B.; Raposo, J. D. A.; DA Silva, J. K. R.; Salimena, F. R. G.; Mourão, R. H. V 2015. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids in health and disease* 14: 1.

Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Pral, E. M. F.; Alfieri, S. C.; Albuquerque, S.; Dias, D. A 2007. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43: 295-300.

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

Serrazin, S. L. F.; Oliveira, R. B.; Barata, L. E. S.; Mourão, R. H. V 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry* 1474-1478.

Serrazin, S.L.; DA Silva, L. A.; DE Assunção, A.P.; Oliveira, R.B.; Calao, V.Y.; DA Silva, R.; Stashenko, E.E.; Maia, J.G.; Mourão, R.H 2015. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules*.2: 1860-71.

Shaik, A.H.; Rasool, S.N.; Abdul Kareem, M.; Krushna, G. S.; Akhtar, P. M.; Devi, K 2012. L. Maslinic acid protects against stisoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J. Med. Food* 15: 741–746.

Shanmugapriya, K.; Saravana, P. S.; Payal, H. A. R. S. H. A.; Mohammed, S. P.; Binnie, W. i. l. i. a. m. Sshanmugapriya, K. et al. 2011. Antioxidant activity, total phenolic and flavanoid contents of *Artocarpus heterophyllus* and *Manilkara zapota* seeds and its reduction potential. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 3: 1-5.

Shi, C.; Wu, F.; Zhu, X.; Xu, J 2013. Incorporation of  $\beta$ -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 $\beta$  signaling. Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects, 1830: 2538-2544.

Silva, M.; Bittner, M.; Hoeneisen, J.; Becerra, J.; Campis, V.; Gonzalez, F.; Cespedes, C.; Marambio, O. Quimica de los Triterpenos; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos: Washington, D.C., 1992.

Silva, F. S. Estudo fotoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* mart. & schauer (verbenaceae) Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

Silva, A. A. de S.; Alexandre, J. De B.; Vieira, L. G.; Rodrigues, S. P.; Falcão, M. J. C.; DE Moraes, S. M 2015. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada 36: 189-194.

Silveira, C. V.; Trevisan, M. T. S.; Rios, J. B.; Erben, G.; Haubner, R.; Pfundstein, B.; Owen, R 2010. W Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart. Food and chemical toxicology 48: 1597-1606.

Soares, B. V.; Cardoso, A. C. F.; Campos, R. R.; Gonçalves, B. B.; Santos, G. G.; Chaves, F. C. M.; Tavares-Dias, M 2017. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. Aquaculture 469: 72-78.

Soares, B. V.; Tavares-Dias. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazonia* 3: 109-123.

Sousa-Silva, A. A.; Alexandre, J. B.; Vieira, L. G.; Rodrigues, S. P.; Falcão, M. J. C.; & Morais, S. M. 2015. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L.(araticum panã). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 36: 1- 6.

Souza, D. S.; Almeida, A. C.; Andrade, V. A.; Marcelo, N. A.; Azevedo, I. L.; Martins, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. 2015. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte 67: 940-944.

Souza-Moreira, T. M.; Alves, T. B.; Pinheiro, K. A.; Felipe, L. G.; DE Lima, G. M.; Watanabe, T. F.; Guido, R. V. 2016. Friedelin Synthase from *Maytenus ilicifolia*: Leucine 482 Plays an Essential Role in the Production of the Most Rearranged Pentacyclic Triterpene. *Scientific Reports* 6.

Stashenko, Elena et al. 2007. Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *lippia organoides* hbk, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica* 1: 325-328.

Stashenko, E. E.; Martínez, J. R.; Ruíz, C. A.; Arias, G.; Durán, C.; Salgar, W.; Cala, M. 2010. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil and principal component analysis. *Journal of separation science*. 33: 93-103.

E.E. Stashenko, R.M. Jairo, P.C. Mónica, C.D. Diego, C. Deyanira, 2013. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants, *Journal of Separation Science* 36: 192–202.

SULTAN, A.; RAZA, A.R. 2013. Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites.

Sunil, C., Duraipandiyar, V., Ignacimuthu, S. & Al-Dhabi, N. A 2013. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. Leaves. Food Chem 860–865.

Surendra, K.; Corey, E.J 2009. A Short Enantioselective Total Synthesis of the Fundamental Pentacyclic Triterpene Lupeol. Journal Of The American Chemical Society 131: 13928-13929.

Teles, S.; Pereira, J.A.; Oliveira, L. M.; Malheiro, R.; Machado, S.S.; Lucchese, A.M.; Silva, F 2014. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia organoides* H.B.K. Industrial Crops and Products 59: 169–176.

Troncoso, N. S. Los generos de Verbenaceas de Sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Sur de Brasil). Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1974.

Vandresen, F.; Schmitt, E.; Kato, L.; Oliveira, C. M. A. D.; Amado, C. A. B.; Silva, C. C. D 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e anti-dematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. Brazilian Journal of Pharmacognosy 20: 317–321.

Vásquez Carreño, D. R. El orégano de monte (*Lippia organoides*) del Alto Patía: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de Colombia, 2012.

Vásquez, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N.; 2014. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica 44 (4): 457–472.



Veras, H. N. H.; Araruna, M. K. A.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M.; Kerntopf, M. R.; Botelho, M. A.; Menezes, I. R. A 2013. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. *Phytotherapy research* 27: 179-185.

Viccini, L. F.; Pierre, P. M. O.; Praça, M. M.; DA Costa, D. S.; DA Costa Romanel, E.; DE Sousa, S. M.; Salimena, F. G 2006. Chromosome numbers in genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant System Evol* 256: 171-178.

Wang, W. H., Chuang, H. Y.; Chen, C. H.; Chen, W. K.; Hwang, J. J 2016. Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 79: 231-240.

## CAPÍTULO II

### **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE) <sup>1</sup>**

---

1 Artigo escrito segundo as normas do Comitê Editorial do periódico científico Industrial Crops and Products

## **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE) <sup>1</sup>**

Autora: Silvanne da Silva Santos

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

**RESUMO:** O gênero *Lippia* é utilizado na medicina popular, devido suas atividades biológicas e terapêuticas. Por isso, diferentes espécies vêm sendo testadas, devido ao potencial bioativo, para o tratamento de diferentes doenças. Encontrada na Caatinga e Cerrado brasileiro *Lippia origanoides* Kunth apresenta moléculas biotivas ainda não estudadas. Este trabalho teve por objetivo quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante dos extratos do caule e folha desta espécie. Extratos hexânico e metanólico foram obtidos de partes distintas (caule e folha), particionados em solvente orgânico na obtenção das frações hexano, acetato de etila, e aquosa. Os extratos foram quantificados em relação aos compostos fenólicos (fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis). A atividade antioxidante foi determinada por meio de dois ensaios químicos: captura dos radicais 2,2-diphenylpicrylhydrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazoli-na-6-ácido sulfônico)-ABTS. O teor de fenóis totais variou entre 66,49 e 375,63 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonóis 27,71 e 261,79 mg EQ g<sup>-1</sup> e ácido hidroxicinâmico 32,22 e 195,36 mg EAC g<sup>-1</sup> nos extratos de caule e folha. A capacidade de sequestrar radicais livres foi verificada em todos os extratos analisados, sendo a maior atividade antioxidante observada no extrato de acetato de etila da folha pelo método DPPH, com CE<sub>50</sub> inferior a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos na atividade antioxidante foram correlacionados ao teor de fenóis totais, flavonóis e ácido hidroxicinâmico dos extratos. Os extratos da folha e do caule apresentam potencial antioxidante, sendo, portanto, uma espécie potencial para os estudos relacionados aos antioxidantes de natureza não sintética.

**Palavras-chave:** Verbenaceae, atividade antioxidante, compostos fenólico.

## PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIPPIA ORIGANOIDES KUNTH (VERBENACEAE)

Author: Silvanne Da Silva Santos

Advisor: Franceli da Silva

**ABSTRACT:** Several Verbenaceae of the genus *Lippia* are used in folk medicine due to their biological and therapeutic activities. Therefore, different species of these plants have been tested, due to the bioactive potential, for the treatment of different diseases. Found in Caatinga and Brazilian Cerrado *Lippia organoides* Kunth. may present bioactive molecules not yet studied. This work aims the phytochemical study and antioxidant activity (DPPH and ABTS) of stem and leaf extracts of this species. Hexane and methanolic extracts were obtained from distinct parts (stem and leaf), partitioned in organic solvent to obtain fractions hexane, ethyl acetate, dichloromethane and aqueous. Quantitative determination of phenolic groups was performed using colorimetric methods. The antioxidant activity was quantified by the free radical sequestration methods DPPH and ABTS with concentrations ranging from 0.5 to 3.0 mg mL<sup>-1</sup>. The total phenol content ranged from 66.49 to 375 mg EAG g<sup>-1</sup> and flavanoids 27.71 and 261.79 mg EQ g<sup>-1</sup> in stem and leaf extracts. For the methods tested, ethyl acetate extract presented higher antioxidant activity, with EC<sub>50</sub> less than 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. The results obtained in the antioxidant activity were correlated to the total phenol content, flavanoids and hydroxynamic acid of the extracts. It was concluded that the ethyl acetate extract of the leaf and methanolic of the leaf and stem presented higher antioxidant potential, responsible for the inhibition of free radicals.

**Key words:** Verbenacea, antioxidant activity, phenolic groups.

## INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as espécies medicinais são utilizadas no tratamento de diversas doenças. O uso de fitofármacos é uma prática recorrente pela população, contudo, a busca por moléculas bioativas (antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, antiviral e antioxidante), tem sido bastante promissor para a humanidade (OLIVEIRA et al.,2013).

Na medicina tradicional a espécie *Lippia origanoides* possui fins terapêuticos, tais como, antimicrobiana (BARRETO et al.,2014; SARRANZI et al., 2015) antioxidante (TELES et al.,2014; SARRANZI et al., 2015) antiviral, bactericida, alelopática, anti-inflamatória (PILAU et al., 2011; RIVERO-CRUZ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; GOMES et al., 2012; MARCO et al., 2012; STASHENKO et al., 2013; VERAS et al., 2013); tripanocidas e citotóxicas (BORGES et al.,2012).

Dentre os grupos químicos que confere propriedades bioativas nas plantas, temos os compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante, prevenindo o surgimento de doenças degenerativas como, câncer, alzheimer e aterosclerose, ocasionadas pelo stress oxidativo (excesso de radicais livres) que atinge as biomoléculas, sendo assim, a atividade antioxidante atribuída aos compostos fenólicos está relacionada à propriedade redutora e estrutura química das moléculas (SOUSA et al., 2015).

Os compostos fenólicos oriundos de fontes naturais, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis são capazes de inibir a ação dos radicais livres no organismo humano (CUNHA et al., 2016). Desta forma, a busca de moléculas com potencial antioxidante é de suma importância para prevenir doenças associadas aos radicais livres em sistemas biológicos. Neste sentido, as plantas medicinais e aromáticas podem ser uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica e de alimentos para a inserção dos produtos naturais no mercado, livre de substâncias sintéticas.

Em vista do interesse econômico relativo aos componentes aromáticos das plantas medicinais, e o potencial de *Lippia origanoides*, o presente trabalho objetivou quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante, nos extratos de caule e folha de *L. origanoides*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e identificação do material vegetal**

*Lippia origanoide* Kunth foi coletada da área de cultivo do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) em agosto de 2014, no município de Feira de Santana, Bahia. A identificação da espécie foi realizada pela Dra. Tânia dos Santos Silva e a exsicata foi depositada no Herbário da UEFS (HUEFS) com voucher número 83.373. Esta unidade situa-se a 234 metros de altitude, na latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste, apresentando pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26°C. Segundo a classificação de Köppen o clima local é do tipo BSh, semiárido quente.

As plantas foram coletadas cinco centímetros acima do solo, entre 7 e 8 horas da manhã acondicionadas em sacos e conduzidas ao Laboratório de Fitoquímica da UFRB, município de Cruz das Almas-BA.

### **Preparação dos extratos brutos *L. origanoides***

O caule do espécimen a ser estudado, foi dividido em pequenos fragmentos e depois de seco na estufa numa temperatura de 35 ° C foi moído em um moinho de facas obtendo-se uma serragem (10 kg), que foi colocada em um recipiente de vidro e em seguida adicionada hexano e deixado por três dias, filtrou-se, o solvente foi colocado em um evaporador rotativo e a serragem foi adicionada novamente hexano. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Os extratos obtidos nas três extrações foram agrupados e o material sólido foi então, extraído com metanol.

Ao extrato metanólico bruto (28,26g) adicionou-se 400 mL de água, 300 mL de metanol. Esta mistura foi submetida à partição (líquido-líquido) no funil de separação por três vezes sucessivas, utilizando 100 mL de diclorometano e 100 mL acetato de etila. Após eliminação do solvente, em evaporador rotatório, modelo TE - 211 Tecnal; sob pressão reduzida à aproximadamente 35 °C obteve-se os extratos: diclorometano (3,38 g) e acetato de etila (99,7 mg).

Já as folhas do espécimen estudado, foram divididas em pequenos fragmentos e depois de seco à temperatura ambiente, foi moído em um moinho de facas obtendo-se uma serragem (8 kg). Foi utilizado o mesmo procedimento realizado no caule para obtenção dos extratos hexânico e metanólico da folha.

O extrato metanólico da folha foi solubilizado em uma mistura contendo 300 mL de água e 400 mL de metanol. Logo após, a mistura foi submetida à partição (líquido-líquido) em um funil de separação por três vezes sucessivas com diferentes solventes orgânicos na respectiva ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila. Após eliminação do solvente, em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à aproximadamente 35 °C obteve-se as frações: Hexânica (6,02g) diclorometânica (1,56g) e em acetato de etila (241,9mg).

### **Análise dos grupos fenólicos**

O fenol total, o derivado de ácido hidroxicinâmico e o teor de flavonóis foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Boulanouar, Abdelaziz, Aazza, Gago e Miguel (2013). Um mililitro do extrato metanólico ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi diluído em 1 mL de etanol aquoso (95% v / v) contendo 0,1% de ácido clorídrico e 8 mL de ácido clorídrico a 2%. A absorvância foi medida a 280 nm para determinar fenóis totais, 320 nm para determinar derivados de ácido hidroxicinâmico e 360 nm para determinar o teor de flavonóis (Espectrofotômetro UV-Vísivel Global Trade Technology- Modelo UV 5100). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE)  $\text{g}^{-1}$  de extrato para fenóis totais, equivalentes de ácido cafeico (CAE)  $\text{g}^{-1}$  de extrato para derivados de ácido hidroxicinâmico e quercetina (QE)  $\text{g}^{-1}$  de extrato para flavanóis.

### **Determinação da atividade antioxidante**

#### **Atividade sequestrante do radical livre DPPH**

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de inibição de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil livre) descrita por (BONDET et al., 1997). Neste método, o potencial antioxidante do extrato foi observado na remoção do radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) DPPH, através do monitoramento por meio do espectrofotômetro em 517 nm. O ensaio baseia-se na capacidade que o radical estável (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) DPPH possui de capturar um hidrogênio presente na substância antioxidante.

Para execução do método preparou-se primeiramente uma solução metanólica de DPPH a 0,0024% e separou-se 3mL de metanol para ser utilizado como branco e DPPH como controle. Foi empregado como controle do DPPH a reação de 300 µL de metanol com 2,7 mL de DPPH. Para análise da atividade antioxidante das amostras, 2,7 mL de DPPH foram adicionados a 300 µL de cada concentração previamente preparada variando de (0,01 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup>) do extrato diluído em metanol.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro U2M, Químis em comprimento de onda de 517 nm. A leitura da absorvância dos tubos contendo DPPH ocorreu 60 minutos após o início da reação, durante este período as amostras foram colocadas em ambiente escuro à temperatura ambiente, para obtenção de valores estáveis da absorvância.

Para cada concentração ensaiada em triplicata foi calculada a média e o desvio padrão das absorvâncias medidas, utilizando o programa Excel 2010. Com a média das absorvâncias foi calculado a porcentagem de inibição do radical DPPH (que corresponde à quantidade de DPPH sequestrado) conforme a seguinte equação:

% de efeito de eliminação =  $[(ADPPH-AS)/ADPPH] \times 100$ , onde:

As é a absorvância da solução com a amostra e ADPPH é a absorvância da solução de DPPH.

Foram traçados gráficos correlacionando-se a % de DPPH sequestrado e as concentrações testadas de cada extrato, com objetivo de calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE<sub>50</sub>).

### **Atividade sequestrante do radical livre ABTS**

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada pelo método do radical ABTS 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)-ABTS, conforme metodologia Sánchez et al (2007). Nesta técnica, o ABTS+ (7mM) foi enriquecido com K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas.

A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma absorvância a  $\lambda = 734$  nm de  $0,70 \pm 0,02$ . A reação realizou-se diretamente na cubeta de quartzo, com a adição de 2 mL de ABTS+ (Branco) e de 100 µL de



amostra ou padrão. Foram utilizados 2 mL de ABTS+ (Branco) e de 100  $\mu$ L de amostra ou padrão.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro U2M, Químis, em um comprimento de onda de 734 nm. A leitura da absorvância das amostras foi realizada 6 minutos após a adição da ABTS.

### **Análise estatística**

As amostras foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey com significância de 5%, utilizando o programa SISVAR. Para a análise da correlação dos compostos fenólicos encontrados nos extratos vegetais com os métodos DPPH e ABTS utilizados para determinar a atividade antioxidante foi realizada uma análise de regressão utilizando EXCEL da Microsoft Corporation.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação do teor dos grupos fenólicos

Os teores de compostos fenólicos dos extratos de caule e folha de *Lippia origanoides* foram apresentados na Tabela 1 e Tabela 2. Foram utilizados neste estudo o ácido gálico, ácido cafeíco e quercetina como equivalentes químicos de fenóis, ácido hidroxicinâmico e flavonóis, respectivamente.

**Tabela 1.** Derivados de Ácido hidroxicinâmico (mg EAC g<sup>-1</sup>), Flavonóis (mg EQ g<sup>-1</sup>) e Fenóis totais (mg EAG g<sup>-1</sup>) dos extratos do caule de *L. origanoides*.

Extratos	Derivados de Ácido hidroxicinâmico	Flavonóis	Fenóis totais
EMC	58,37±0,52a	35,19±0,46c	116,93±0,81c
EHC	32,22±0,34d	25,26±0,68d	66,49±1,76d
EACC	55,14±0,35b	151,79±1,63a	200,97±0,91a
EAQC	36,79±1,62c	101,12 ±1,42b	128,55±0,15b

EMC- extrato metanólico do caule; EHC- extrato hexânico do caule; EACC- Extrato de acetato de etila do caule; EAQC- Extrato aquoso do caule. Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Entre os extratos analisados, o extrato metanólico e acetato de etila caule apresentou o maior teor de compostos fenólicos sendo estatisticamente diferente dos demais extratos. O extrato de acetato de etila caule apresentou maior teor de flavonóis e fenóis. Enquanto o extrato metanólico maior teor de derivados de ácido hidroxicinâmico (Tabela 1).

**Tabela 2.** Derivados de hidroxicinâmico (mg EAC g<sup>-1</sup>), Flavonóis (mg EQ g<sup>-1</sup>) e Fenóis totais (mg EAG g<sup>-1</sup>) dos extratos da folha de *L. origanoides*.

Extratos	Derivados de Ácido hidroxicinâmico	Flavonóis	Fenóis totais
EMF	116,24±1.63b	100,97±1.24b	283,11±3.85b
EHF	60,01±0.53c	50,27±1.37c	140,94±0.46c
EACF	195,36±1.95a	261,79±1.25a	375,63±1.43a
EAQF	39,82±1.29d	27,71 ±1.69d	92,79±0.18d

EMF- extrato metanólico da folha; EHF- extrato hexânico da folha;EACF- Extrato de acetato de etila da folha; EAQF- Extrato aquoso da folha. Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Com base na Tabela 2, entre os extratos analisados, o extrato de acetato de etila folha apresentou o maior teor de compostos fenólicos sendo estatisticamente diferente dos demais extratos. O extrato de acetato de etila folha apresentou maior teor de ácido hidroxicinâmico, flavonóis e fenóis totais.

Quando o conteúdo fenólico total e de flavanóis de *L. origanoides* são comparados com os dados disponíveis para a mesma família e para o mesmo gênero, verifica-se que essa espécie apresenta maiores teores. Em trabalho realizado com *Lippia alba* os autores observaram um teor de flavonoides de (15,42 mg CE / g) (CHISTÉ et al.,2013). Para *Lippia sidoides* Cham verificou-se um teor de fenóis totais e flavonoides de 230,5 ± 0.1, 280 ± 2, respectivamente no extrato de etanol de folhas obtido a alta pressão (GARMUS et al.,2015).

Pesquisas realizadas com quatro espécies de *Lippia* (*javanica*, *scaberrima*, *rehmannii* e *wilsii*) originadas do sul da África apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 14,8; 8,7; 12,5; 14,5 mg g<sup>-1</sup> respectivamente, (SHIKANGA et al., 2010). Valores inferiores em comparação aos encontrados nos extratos de caule e folha de *Lippia origanoides*.

O teor de compostos fenólicos totais apresentado pela espécie *Lippia grandis* variou de 505,0±5,7 mg GAEg<sup>-1</sup> para 761,4 mg GAE g<sup>-1</sup>, (DAMASCENO et al., 2011). Valores superiores em relação ao teor fenólico encontrado na espécie *Lippia origanoides*.

As variações de fenóis totais nas espécies vegetais estão relacionadas a diversos fatores como estado do material durante a extração, natureza do solvente utilizado, parte aérea analisada, origem geográfica da planta e resposta aos níveis de estresse (AICHI et al., 2016).

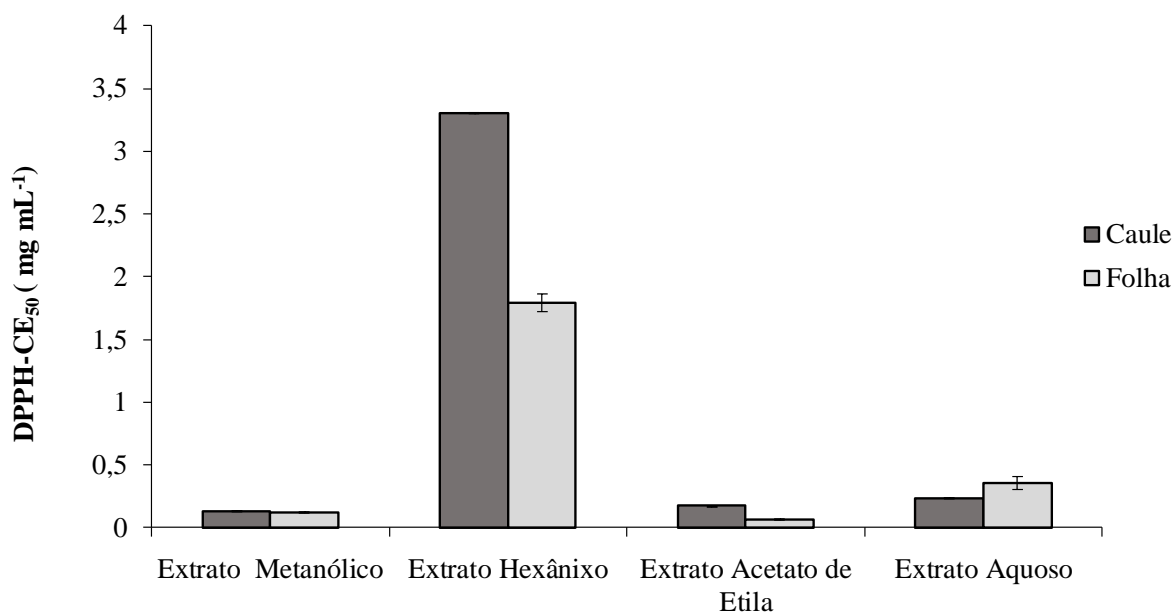
De acordo com a literatura, espécies vegetais que possuem fenóis e flavanoides como constituintes químicos apresentam propriedades antioxidantes e anti-mutagênicas. Estes compostos químicos removem os radicais livres devido à presença de rearranjos da hidroxila na sua estrutura química (SOUZA et al., 2016).

### **Atividade sequestrante do radical livre DPPH e ABTS**

A atividade antioxidante dos extratos obtidos da folha e caule de *L.origanoides* foi avaliada pelos métodos DPPH e ABTS. Ambos quantificam a capacidade da substância com propriedade antioxidante em capturar os radicais livres, é necessário realizar dois métodos diferentes para comprovar a atividade antioxidante da espécie vegetal, pois a composição do extrato influencia no resultado obtido (IQBAL et al., 2015).

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através da sua capacidade de sequestrar o radical DPPH e a determinação quantitativa do método baseou-se na variação da absorvância obtida por uma perda da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presente na amostra de extrato. A determinação do  $CE_{50}$  para cada extrato é dada pela equação da reta. E a atividade antioxidante mensurada pelo valor de  $CE_{50}$  calculado (Figura 1).

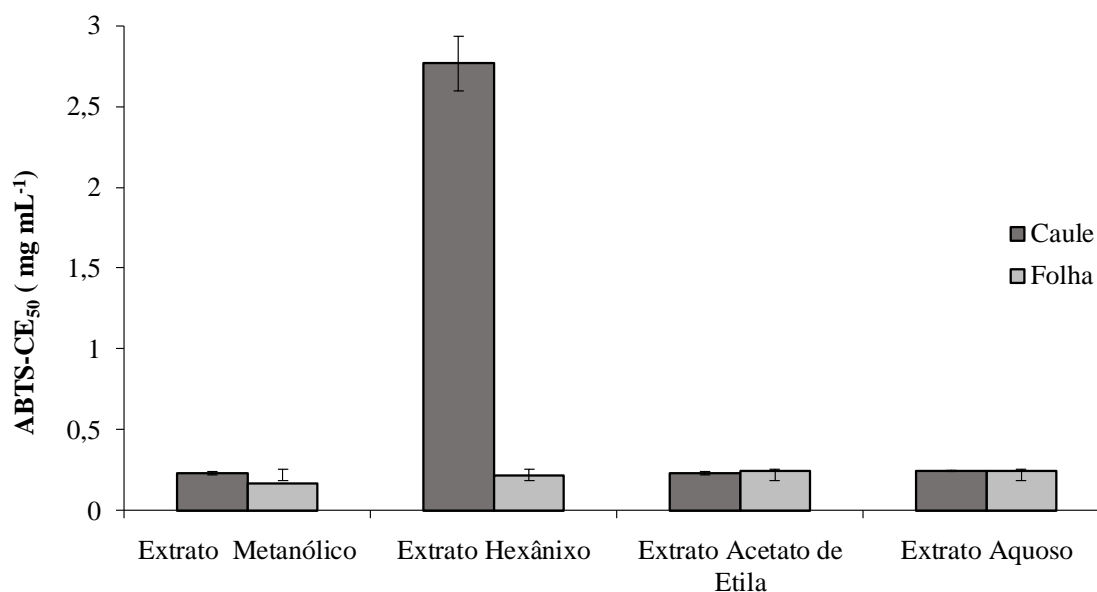
O presente estudo indica que, para os dois métodos testados os extratos apresentaram atividades antioxidantes, sendo necessários menos de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  da concentração do produto para inibir 50% dos radicais livres



**Figura 1:** Valores médios de  $CE_{50}$  do método DPPH, obtidos dos extratos da folha e do caule de *L. origanoides*.

A concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% os radicais DPPH ( $CE_{50}$ ) variou de 0,12 para 3,3  $mg mL^{-1}$  (Figura 1). Verificou-se que a atividade de eliminação de radicais livres dos extratos de folha e caule de *Lippia origanoides* em radicais DPPH apresentou  $CE_{50}$  de 0,12 e 0,13  $mg mL^{-1}$  para metanol, 1,80 e 3,30  $mg mL^{-1}$  para hexano, 0,065 e 0,2  $mg mL^{-1}$  para acetato de etila, 0,35 e 0,23  $mg mL^{-1}$  para a fração aquosa, respectivamente (Figura 1). O extrato de acetato de etila da folha apresentou menor valor médio  $CE_{50}$ , sendo portanto o extrato com maior atividade antioxidante.

Em trabalho realizado com a espécie *Lippia sidoides* Cham foi encontrado uma  $CE_{50}$  de 10  $\mu g mL^{-1}$  demonstrando uma alta atividade antioxidante do extrato alcoólico e presença de compostos fenólicos (GARMUS et al.,2015). *Lippia (javanica, scaberrima, rehmannii e wilsii)* originadas do sul da África apresentaram uma  $CE_{50}$  de 358, 525, 720 e 1,150  $\mu g mL^{-1}$ , respectivamente (SHIKANGA et al.,2010). A atividade antioxidante apresentada pela espécie de *Lippia grandis* utilizando o método DPPH variou entre  $CE_{50}$  9,0 e 130,5  $\mu g mL^{-1}$  (DAMASCENO et al.,2011).



**Figura 2:** Valores médios de  $CE_{50}$  do método ABTS, obtidos dos extratos da folha e do caule de *L. origanoides*.

Registros literários apontam os compostos químicos majoritários como os possíveis responsáveis pelas propriedades antioxidantes dos extratos, todavia, em alguns casos, esse comportamento é resultante do sinergismo deste com os demais componentes presentes na substância.

Para o método ABTS o extrato hexânico caule apresentou menor atividade ( $CE_{50}$  2,76 mg mL<sup>-1</sup>) quando comparado aos demais (Figura 2). Os extratos metanólicos, acetato de etila e aquoso obtiveram valores de  $CE_{50}$  entre 0,16 a 0,24 mg mL<sup>-1</sup>, apresentando maior atividade antioxidante. Tais resultados justificam-se devido os compostos fenólicos (polares) que possuem propriedades antioxidantes terem maior afinidade química com solventes polares.

Em estudo realizado para avaliar a atividade antioxidante do óleo extraído de folhas de *Lippia origanoides* originadas no sudoeste da Colômbia utilizando o método ABTS a concentração efetiva foi de  $CE_{50}$  0,33 mg mL<sup>-1</sup> (ARANGO et al., 2012). Comparando-se a  $CE_{50}$  obtida pelo extrato da folha e caule de *L. origanoides* do Brasil confirma a aproximação dos dados obtidos para mesma espécie, demonstrando a presença de compostos fenólicos nos extratos. A atividade antioxidante verificada pela espécie de *Lippia grandis* utilizando o método ABTS apresentou valores mais elevados, de 131,1 a 336,0 mgTE g (DAMASCENO et al., 2011).

Os resultados obtidos por meio dos ensaios químicos de antioxidante confirmam a capacidade de eliminação dos radicais de hidroxila desta espécie, indicando bom desempenho para doar hidrogênio. Essas propriedades devem-se em parte as estruturas químicas e propriedades redutoras dos compostos fenólicos presente nos extratos de *L. origanoides*.

Vários estudos têm correlacionado a presença dos compostos fenólicos com o potencial antioxidante. No trabalho realizado por Calixto Júnior et al. (2016) com extrato etanólico de *Prockia crucis*, os autores relacionaram o potencial antioxidante da espécie com a presença de compostos fenólicos. Da mesma forma, Asgarpanah (2012) observou em *Salix aegyptiaca* L. (Salicaceae) grande quantidade de fenóis e flavonoides, indicando que estes grupos foram responsáveis pela atividade antioxidante. Moraes et al. (2013), observaram que em *Malpighia glabra* e *Lippia alba*, houve uma correlação direta entre a atividade antiradical e antiacetilcolinesterase com conteúdo fenólico.

Na Tabela 2 é possível observar que a atividade antioxidante dos extratos está parcialmente relacionada com compostos fenólicos presentes nos extratos. Os flavanóis e os derivados de ácidos hidroxicinâmicos não foram correlacionados com a atividade antioxidante pelo método ABTS. Contudo, foi correlacionado com os fenóis totais. Houve correlação significativa entre os flavonóis, derivados de ácido hidroxicinâmico, bem como fenóis totais para o método DPPH.

**Tabela 2.** Correlação de Pearson (r) entre os compostos fenólicos dos extratos de folha e caule de *L. origanoides* e atividade antioxidante.

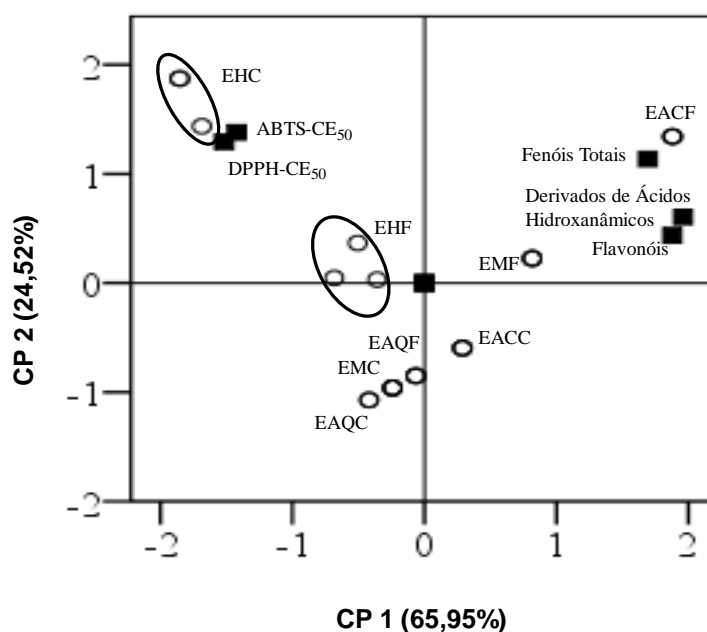
	Flavonóis	Derivados de Ácido hidroxanâmico	Fenóis Totais
DPPH CE <sub>50</sub>	-0,472*	-0,390*	-0,509*
ABTS CE <sub>50</sub>	-0,319 <sup>ns</sup>	-0,293 <sup>ns</sup>	-0,405*

n.s- não significativo; \*P ≤ 0.05

É possível observar que os valores de r em todas as correlações apresentaram valores negativos, o que indica que quanto maior for o teor de um determinado composto fenólico, menor será a CE<sub>50</sub>, indicando uma maior atividade antioxidante.

Os extratos possuem compostos bioativos responsáveis pela eliminação de radicais livres que provocam diversos danos a células e tecidos. A utilização de ativos oriundos de espécies vegetais constitui uma alternativa de prevenção de diversas doenças.

Na figura 3 é apresentada a análise dos componentes principais realizada a fim de resumir os dados obtidos do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos obtidos do caule e folha de *Lippia origanoides*.



**Figura 3.** Análise dos Componentes Principais – ACP obtidos dos compostos fenólicos e atividade antioxidante (valores de CE<sub>50</sub> -DPPH e ABTS) dos extratos de folha e caule da *L. origanoides*. ACP explica 90,47% da variância total dos dados. EMC- extrato metanólico do caule; EMF- extrato metanólico da folha; EHC- extrato hexânico do caule; EHF- extrato hexânico da folha; EACC- Extrato de acetato de etila do caule; EACF- Extrato de acetato de etila da folha; EAQC- Extrato aquoso do caule; EAQF- Extrato aquoso da folha.

Com a aplicação desta técnica quimiométrica, com o uso de apenas dois componentes principais, foi possível explicar 90,47% da variabilidade observada nos dados (65,95% na primeira dimensão e 24,52% na segunda dimensão). As amostras foram reunidas em quatro grupos principais. O primeiro grupo representado pelo extrato hexânico (caule), apresentaram CE<sub>50</sub> elevado nos métodos DPPH E ABTS, conseqüentemente menor atividade antioxidante. O segundo grupo elucidado pelo extrato de acetato de etila e extrato metanol folha demonstraram elevados teores de compostos fenólicos. No terceiro grupo verificado pelo extrato metanólico caule,



extrato aquoso (caule e folha) a  $CE_{50}$  demonstrou baixo valores que corresponde maior atividade antioxidante. O quarto grupo do extrato de acetato de etila caule teve menor teor de compostos fenólicos.

Dessa forma, os extratos que apresentaram um maior teor de compostos fenólicos, obtiveram uma  $CE_{50}$  menor e conseqüentemente maior atividade antioxidante (MALHEIRO et.al,2014).

Com os dados obtidos do teor total de fenóis, flavonóis e derivados de ácido hidroxicinâmico e atividade antioxidante dos extratos de caule e folha de *Lippia origanoides* confirma as propriedades bioativas da espécie.

## CONCLUSÃO

Os tipos de solventes influenciam o teor dos grupos fenólicos presentes nas folhas e caule de *L. oridanooides*, sendo o acetato de etila o extrator que apresenta provavelmente substâncias mais eficazes para inibição dos radicais livres. Com isso, a presença dos fenólicos justifica a atividade antioxidante para essa espécie medicinal, além de apontá-las como potenciais alvos de estudos que visem a identificação de outras atividades.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHI-YOUSFI, H.; MEDDEB, E.; ROUISSI, W; HAMROUNI, L.; ROUZ, S.; REJEB, M. N.; GHRABI-GAMMAR, Z., AICHI-YOUSFI, Haifa et al. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of six Tunisian species of genus *Capparis*–Capparaceae. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 218-226, 2016.

ARANGO B, O. S. C. A. R.; PANTOJA D, D. I. A. N. A.; SANTACRUZ CH, L. O. R. E. N. A. ARANGO, OSCAR et al. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* HBK) del Alto Patía. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 79-86, 2012.

ASGARPANA, L.J. Phytopharmacology and medicinal properties of *Salix aegyptiaca*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7145-7150, 2012.

BARRETO, H. M.; DE LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; DE ALMEIDA MOURÃO, R.; DOS SANTOS, B. H. C.; LOPES, J. A. D. BARRETO, Humberto Medeiros et al. Effect of *Lippia origanoides* HBK essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 560-564, 2014.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BOULANOUAR, B., ABDELAZIZ, G., AAZZA, S., GAGO, C., MIGUEL, M.G. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod*, v.46, p. 85–96, 2013.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M. G.; ALVES, J. A., LUCENA, E. M. P. BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum*

gratissimum L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, 2012.

CALIXTO JÚNIOR, J.T.; MORAIS, S.M.; GOMEZ, C.C.M.; ROLON, M.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; OLIVEIRA, C.D.M.; TINTINO, S.R.; COUTINHO, H.D.M. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from Brazilian Northeast "Cerrado". **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p. 434-440, 2016.

CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. CHISTÉ, Renan Campos et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food research international**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.

CUNHA, Amanda Lima et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DAMASCENO, E. I. T.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A., SOUSA, P. J. C.; MAIA, J. G. S. DAMASCENO, Evelyn Ivana T. et al. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 0-0, 2011.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; CABRAL, F. A. GARMUS, TÁBATA T. ET AL. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentornitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and

engorged females of *Rhipicephalus microplus*(Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, p.2423-2430, 2012.

IQBAL, ERUM.; SALIM, KAMARIAH ABU.; LIM, LINDA B.L. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 3, p. 224-232, 2015.

MALHEIRO, R.; MENDES, P.; FERNANDES, F.; RODRIGUES, N.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. MALHEIRO, R.; MENDES, P.; FERNANDES, F.; RODRIGUES, N.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. MALHEIRO, RICARDO ET AL. Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. **Food e Function**, v. 5, n. 12, p. 3132-3142, 2014.

MARCO, C. A.; TEIXEIRA, E.; SIMPLÍCIO, A.; OLIVEIRA, C.; COSTA, J.; FEITOSA, J. Chemical composition and allelopathyc acticity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, n.1, p 157- 160, 2012.

MORAIS, S.M.; LIMA, K.S.B. ; SIQUEIRA, S.M.C. ; CAVALCANTI, E.S.B. ; SOUZA, M.S.T.; MENEZES, J.E.S.A. ; TREVISAN, M.T.S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p.575-582, 2013.

OLIVEIRA, F. C; BARBOSA, F. G; MAFEZOLI, J; MARIA DA CONCEIÇÃO, F., NETO, M. A; GUEDES, M. L.. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 328-330, 2013.

PILAU, M. R.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, R.; ARENHART, S.; CUETO, A. P.; LOVATO, L. T.. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican 99 oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42,p 1616-1624. 2011.

RIVERO-CRUZ, I. ; DUARTE, G.; NAVARRETE, A.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. **Journal of Food Science**, v.76 n.2, p.309-317, 2011.

RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M.. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v.33.n 2,p 141-144,2011.

SARRAZIN, S. L. F.; DA SILVA, L. A.; OLIVEIRA, R. B.; RAPOSO, J. D. A.; DA SILVA, J. K. R.; SALIMENA, F. R. G.;MOURÃO, R. H. V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.

SHIKANGA, E. A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. South African *Lippia herbal* infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 567-571, 2010.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO , B.E.;; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity. **J. Chromatografia** v. 1025, p. 93-103, 2013;

SOUSA-SILVA, A. A.; ALEXANDRE, J. B.; VIEIRA, L. G.; RODRIGUES, S. P.; FALCÃO, M. J. C.; & MORAIS, S. M..Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinestarásica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L.(araticum panã). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015.

SOUZA, Thaís Pezza; SILVA, Ana Caroline Zanatta; SANTOS, Lourdes Campaner. QM. Estudo fitoquímico, determinação do teor de fenóis e flavonoides totais e avaliação do potencial antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, 2016.

TELES, S.; PEREIRA, J.A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S.S.; LUCCHESI, A.M.; SILVA, F. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. **Industrial Crops and Products**. v. 59, p. 169–176, 2014.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectiva deste trabalho, pretende-se utilizar as substâncias isoladas em testes biológicos *in vitro*. Estes ensaios serão realizados em colaboração com o laboratório nacional de biociências (LNBIO).

As moléculas ativas presente em *Lippia origanoides* possuem grande possibilidade de inibir a ação da enzima oxidase alternativa (AOXp) que induz resistência do fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da doença vassoura-de-bruxa-do-cacaueiro aos fungicidas.

A partir do isolamento de moléculas ativas é possível sintetizá-las e modificá-las potencializando sua atividade no tratamento de diversas doenças que acometem a população.