



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MACIA CLEANE SOARES DE ALMEIDA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DE  
*Lippia sidoides*

FORTALEZA

2011

MACIA CLEANE SOARES DE ALMEIDA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DE  
*Lippia sidoides*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos

FORTALEZA

2011

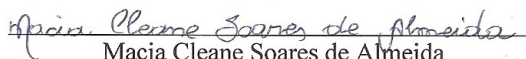
A445e Almeida, Macia Cleane Soares de  
Estudo fitoquímico e avaliação antioxidante de *Lippia sidoides* /  
Macia Cleane Soares de Almeida. – 2011.  
121 f. : il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Área de concentração: Química Orgânica  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2011.

1. Química vegetal 2. Verbenaceae I. Lemos, Telma Leda Gomes de  
(orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-  
Graduação em Química III. Título

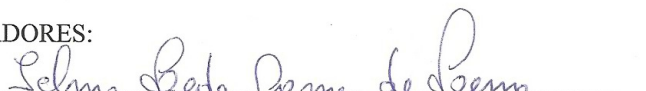
CDD 547

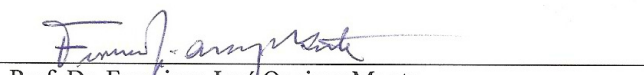
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

  
Macia Cleane Soares de Almeida

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/04/2011

EXAMINADORES:

  
Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção  
Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia - IFCE

Aos meus pais, Francisco e Penha, pelo  
imenso amor e apoio de sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a vida.

Aos meus pais que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Ao meu esposo, Márcio Henrique, pelo amor e companheirismo. Aos meus irmãos, Márcio e Flávio, e a toda minha família.

À Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela orientação, dedicação e paciência que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos Professores Francisco José Queiroz Monte e João Carlos da Costa Assunção, membros da banca examinadora, pelo aceite e indispensável contribuição a este trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Química que contribuíram para a minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho pela valiosa contribuição na elucidação das estruturas.

Aos colegas da turma de Mestrado: Paulo, Karísia, Vanessa, Patrícia, João Paulo e Leôncio, pelas horas dedicadas aos estudos.

Aos colegas do laboratório: Ayla, Bertini, Leonardo Alcântara, Leonardo Carvalho, Leila, Juliana, Felipe, Gregório, Patrícia, Anderson, André, Aline e Karina.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

"O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano."

(Isaac Newton)

## RESUMO

Este trabalho descreve a reinvestigação fitoquímica da espécie *Lippia sidoides*, pertencente à família Verbenaceae, visando o isolamento e a elucidação estrutural de novos ou conhecidos metabólitos secundários. O estudo químico realizado com o extrato etanólico das raízes e das folhas da espécie possibilitou o isolamento de três e a caracterização de sete constituintes. Do extrato etanólico das raízes foi isolada a naftoquinona tecomaquinona I e, do extrato etanólico das folhas foram isolados o monoterpene 5-hidroximetil-2-isopropilfenol, a flavanona naringenina, a mistura de flavonóides eriodictiol e hispidulina, e a mistura de di-hidrochalconas 3-hidroxfloridizina e floridizina. A mistura de di-hidrochalconas foi submetida à reação de acetilação com anidrido acético/piridina, resultando na acetilação de todas as hidroxilas. A determinação estrutural das substâncias foi realizada através de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e comparação com dados registrados na literatura. A atividade antioxidante das substâncias isoladas e do extrato etanólico das folhas foi avaliada pelo método de inibição de radicais livres (DPPH), observando-se uma significativa atividade, principalmente do extrato etanólico das folhas, da mistura de flavonóides e da mistura de di-hidrochalconas.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*. Verbenaceae. Atividade antioxidante.



## ABSTRACT

This work describes the phytochemical reinvestigation of the specie *Lippia sidoides*, belonging to the family Verbenaceae, aiming at the isolation and structural elucidation of secondary metabolites new or known. Chemical studies conducted with the ethanolic extract of the roots and leaves of the species allowed the isolation of tree and characterization of seven constituents. Of the ethanolic extract of the roots was isolated the naphthoquinone tecomaquinone I, and the ethanolic extract of the leaves was isolated the monoterpene 5-hydroxymethyl-2-isopropylphenol, the flavanone naringenin, the mixture of flavonoids eriodictyol and hispidulin, and the mixture of dihydrochalcones 3-hydroxyphloridzin and phloridzin. The mixture of dihydrochalcones was subjected to reaction acetylation with acetic anhydride/pyridine, resulting in the acetylation of all hydroxyl. Structure determination of the substances was performed by spectrometric techniques such as infrared (IR), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance of hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon-13 ( $^{13}\text{C}$  NMR) including two-dimensional techniques (COSY, HSQC and HMBC) and comparison with data reported in the literature. The antioxidant activity of the substances isolated and of the ethanolic extract of the leaves was evaluated by method the inhibition of free radicals (DPPH), observing a significant activity, especially of the ethanolic extract of the leaves, of the mixture of flavonoids and the mixture of dihydrochalcones.

**Keywords:** *Lippia sidoides*. Verbenaceae. Antioxidant activities.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> – Estruturas do Timol e do Carvacrol .....	1
<b>Fig. 2</b> – Fotografia de <i>L. sidoides</i> . Planta inteira – A; flores – B; folhas –C	5
<b>Fig. 3</b> – Estruturas dos constituintes químicos registrados na espécie <i>L. sidoides</i> .....	8
<b>Fig. 4</b> – Espectro na região do infravermelho de LSR-1 .....	15
<b>Fig. 5</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSR-1 .....	16
<b>Fig. 6</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSR-1 ....	17
<b>Fig. 7</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSR-1 .....	18
<b>Fig. 8</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSR-1 .....	19
<b>Fig. 9</b> – Espectro de massas de LSR-1 .....	20
<b>Fig. 10</b> – Espectro na região do infravermelho de LSF-1 .....	23
<b>Fig. 11</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-1 .....	24
<b>Fig. 12</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-1 .....	25
<b>Fig. 13</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-1 ...	26
<b>Fig. 14</b> – Espectro de massas de LSF-1 .....	27
<b>Fig. 15</b> – Espectro na região do infravermelho de LSF-2 .....	32
<b>Fig. 16</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-2 .....	33
<b>Fig. 17</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-2 .....	34
<b>Fig. 18</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-2 .	35
<b>Fig. 19</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H COSY [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-2 .....	36
<b>Fig. 20</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-2	36
<b>Fig. 21</b> – Espectro de massas de LSF-2 .....	37
<b>Fig. 22</b> – Espectro na região do infravermelho de LSF-3 .....	43
<b>Fig. 23</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .....	44
<b>Fig. 24</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .....	45
<b>Fig. 25</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .	46
<b>Fig. 26</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H COSY [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .....	47
<b>Fig. 27</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3	47
<b>Fig. 28</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC [500 MHz,	

CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .....	48
<b>Fig. 29</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3	48
<b>Fig. 30</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-3 .....	49
<b>Fig. 31</b> – Espectro na região do infravermelho de LSF-4 .....	60
<b>Fig. 32</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4 .....	61
<b>Fig. 33</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4	62
<b>Fig. 34</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4	63
<b>Fig. 35</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4 .....	64
<b>Fig. 36</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [125 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4 .	65
<b>Fig. 37</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4	66
<b>Fig. 38</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4 .....	66
<b>Fig. 39</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD] de LSF-4	67
<b>Fig. 40</b> – Espectro de massas de alta resolução (modo negativo) de LSF- 4 .....	68
<b>Fig. 41</b> – Espectro na região do infravermelho de LSF-4-Ac .....	69
<b>Fig. 42</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-4-Ac .....	70
<b>Fig. 43</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD [125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-4-Ac .....	71
<b>Fig. 44</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ] de LSF-4- Ac .....	72
<b>Fig. 45</b> – Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) de LSF- 4-Ac .....	73
<b>Fig. 46</b> – Estruturas do DPPH, Trolox e Vitamina-C .....	79

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1** – Rota esquemática do isolamento da substância LSR-1, obtida a partir do extrato etanólico das raízes de *L. sidoides* ..... 81
- Fluxograma 2** – Rota esquemática do isolamento das substâncias LSF-1, LSF-2, LSF-3 e LSF-4, obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *L. sidoides* ..... 85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tab. 1</b> – Constituintes químicos registrados na espécie <i>L. sidoides</i> .....	7
<b>Tab. 2</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSR-1	13
<b>Tab. 3</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-1 .....	21
<b>Tab. 4</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSF-1	23
<b>Tab. 5</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-2 .....	28
<b>Tab. 6</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-2 .....	31
<b>Tab. 7</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-3A .....	38
<b>Tab. 8</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-3B .....	39
<b>Tab. 9</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-3A e LSF-3B.....	41
<b>Tab. 10</b> – Correlações a longa distância de LSF-3A e LSF-3B .....	42
<b>Tab. 11</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-4A .....	50
<b>Tab. 12</b> – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT $135^\circ$ de LSF-4B .....	51
<b>Tab. 13</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-4A e LSF-4B .....	56
<b>Tab. 14</b> – Correlações a longa distância de LSF-4A e LSF-4B .....	57
<b>Tab. 15</b> – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSF-4A-Ac e LSF-4B-Ac .....	58

<b>Tab. 16</b> – Resultado do teste da atividade antioxidante .....	74
<b>Tab. 17</b> – Dados referentes aos extratos obtidos de <i>L. sidoides</i> .....	79
<b>Tab. 18</b> – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EERLS ..	80
<b>Tab. 19</b> – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFLS ..	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COSY	Correlation Spectroscopy
CPD	Composite Pulse Decoupling
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massas
EM-IES	Espectrômetro de Massa com Ionização por <i>Electrospray</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS .....</b>	<b>3</b>
2.1 – Considerações Botânicas Sobre a Família Verbenaceae .....	3
2.2 – Considerações Botânicas Sobre o Gênero <i>Lippia</i> .....	3
2.3 – Considerações Botânicas Sobre a Espécie <i>L. sidoides</i> .....	4
<b>CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>11</b>
4.1 – Determinação Estrutural dos Metabólitos Secundários Isolados de <i>L. sidoides</i> .....	11
4.1.1 – Determinação Estrutural LSR-1 .....	11
4.1.2 – Determinação Estrutural LSF-1 .....	21
4.1.3 – Determinação Estrutural LSF-2 .....	28
4.1.4 – Determinação Estrutural LSF-3 .....	38
4.1.5 – Determinação Estrutural LSF-4 .....	50
4.2. Atividade Antioxidante .....	74
<b>CAPÍTULO 5 – PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>75</b>
5.1 – Material Vegetal .....	75
5.2 – Métodos Cromatográficos .....	75
5.2.1 – Cromatografia em Coluna (CC) .....	75
5.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	75
5.3 – Métodos Espectrométricos .....	76
5.3.1 – Espectrometria no Infravermelho (IV) .....	76
5.3.2 – Espectrometria de Massas (EM) .....	76
5.3.3 – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ....	77
5.4 – Métodos Físicos .....	78
5.4.1 – Ponto de Fusão .....	78
5.4.2 – Rotação Ótica .....	78
5.5 – Atividade Antioxidante: Método de Seqüestro do Radical DPPH .....	78
5.6 – Estudo dos Metabólitos Secundários de <i>L. sidoides</i> .....	79



5.6.1 – Preparação dos Extratos .....	79
5.7 – Fracionamento Cromatográfico de EERLS .....	79
5.7.1 – Fracionamento Cromatográfico de EERD .....	80
5.7.2 – Fracionamento Cromatográfico de F4 e Isolamento de LSR-1 .....	80
5.8 – Fracionamento Cromatográfico de EEFLS .....	82
5.8.1 – Fracionamento Cromatográfico de EEFA .....	82
5.8.2 – Fracionamento Cromatográfico de F28-38 e Isolamento de LSF-1 .....	82
5.8.3 – Fracionamento Cromatográfico de F39-45 e Isolamento de LSF-2 .....	83
5.8.4 – Fracionamento Cromatográfico de F48-76 e Isolamento de LSF-3 .....	83
5.8.5 – Fracionamento Cromatográfico de F110-121 e Isolamento de LSF-4 .....	83
5.8.6 – Obtenção do Derivado de LSF-4 .....	84
5.8.6.1 – Reação de Acetilação de LSF-4 .....	84
<b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

# Capítulo 1

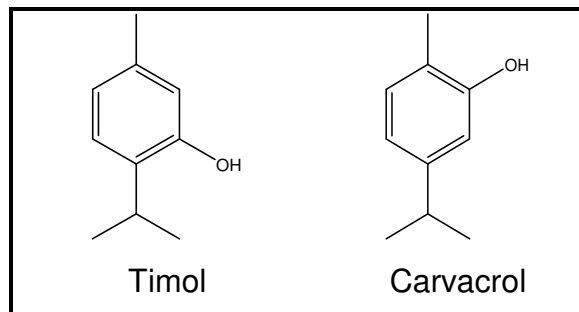
## *Introdução*



## 1 – INTRODUÇÃO

*Lippia sidoides*, também conhecida como alecrim-pimenta, alecrim-do-nordeste, alecrim-bravo e estrepa cavalo (Santos, 2004), trata-se de uma espécie presente na vegetação da caatinga no Nordeste, sendo mais encontrada no seu habitat natural entre os municípios de Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE (Matos *et al.*, 2004).

A exemplo de outras plantas do gênero, *L. sidoides* tem uso comprovado na medicinal popular, principalmente como anti-séptico e antimicrobiano (Costa *et al.*, 2002). Suas preparações têm aplicação local em gargarejos, lavagens de pele, couro cabeludo, mucosa e também como desodorante íntimo ativo contra vários tipos de agentes infecciosos (Matos *et al.*, 2004). Auxilia ainda no tratamento de acne e odores desagradáveis (Matos, 2002). A eficácia desta planta foi demonstrada principalmente pelo óleo essencial das folhas, que contém dois compostos fenólicos isoméricos, timol e carvacrol (Fig. 1), como principais constituintes (Morais *et al.*, 2009).



**Figura 1** – Estruturas do Timol e do Carvacrol

Diversas atividades são relatadas para o óleo essencial de *L. sidoides*, tais como: antimicrobiana contra fungos e bactérias (Lemos *et al.*, 1990), larvicida contra o *Aedes aegypti* (Carvalho *et al.*, 2003), antioxidante, anti-inflamatória (Monteiro *et al.*, 2007), antigengivite (Rodrigues *et al.*, 2009), entre outras.

Estudos anteriores realizados com esta espécie relatam a presença de vários tipos de substâncias, destacando-se os flavonóides e as quinonas. No entanto, também foram isoladas outras classes de metabólicos secundários,

como triterpenos, lignanas, esteróides livres e glicosilados e ácidos orgânicos (Morais *et al.*, 2009; Costa, 2001).

Apesar de existirem trabalhos na literatura acerca da composição química de *L. sidoides*, justifica-se uma reinvestigação fitoquímica da espécie por esta ser uma das plantas selecionadas pelo Governo do Estado do Ceará (Costa *et al.*, 2002) e pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para produção de fitoterápicos (Brasil, 2010).

O presente trabalho relata o isolamento e a determinação estrutural dos metabólicos secundários do extrato etanólico das raízes e folhas de *L. sidoides*, bem como a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas e das substâncias isoladas frente ao radical DPPH.

A prospecção química do extrato etanólico das raízes e folhas de *L. sidoides* resultou no isolamento de uma naftoquinona, um monoterpene, uma flavanona, uma mistura de flavonóides e uma mistura de di-hidrochalconas. No isolamento das substâncias foram utilizados métodos cromatográficos tradicionais, como cromatografia gravitacional sobre gel de sílica.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo técnicas bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC.

Este trabalho é apresentado em seis capítulos seguido das referências bibliográficas e anexos. Os capítulos estão dispostos da seguinte forma: Capítulo 1 – Introdução; Capítulo 2 – Considerações Botânicas; Capítulo 3 – Levantamento Bibliográfico; Capítulo 4 – Resultados e Discussão; Capítulo 5 – Parte Experimental e Capítulo 6 – Conclusões. Todas as referências bibliográficas utilizadas estão dispostas no final do trabalho e foram citadas conforme as normas para apresentação de trabalhos acadêmicos da UFC.

## Capítulo 2

### *Considerações Botânicas*



## **2 – CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS**

### **2.1 – Considerações Botânicas Sobre a Família Verbenaceae**

A família Verbenaceae possui cerca de 175 gêneros e 2800 espécies difundidas nos trópicos e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (Barroso, 1991). No Brasil ocorrem aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies.

As espécies de Verbenaceae têm seu potencial econômico amplamente explorado, tanto ornamental quanto terapêutico. Neste último caso em virtude do alto teor de óleos essenciais (Santos *et al.*, 2009).

Segundo Barroso, G. M. a família Verbenaceae é descrita como:

“Ervas perenes, com ou sem xilopódio, subarbustos, arbustos, lianas ou árvores, com folhas opostas, verticiladas ou, raramente, alternadas, sem estípulas, simples ou compostas de três a sete folíolos. Flores com cálice curto ou longo, tubuloso, campanulado ou cilíndrico, com ou sem estrias, de bordo 5-denteado, com dentes iguais entre si, ou um deles mais curto do que os demais, de bordo truncado, bilobado ou com quatro a cinco lobos mais ou menos profundos. Corola infundibuliforme ou hipocrateriforme, com tubo reto ou curvo, cilíndrico ou mais ou menos dilatado na porção mediana ou alargado na fauce, com limbo dividido em quatro a cinco lobos mais ou menos iguais entre si, de ápice obtuso, arredondado ou emarginado, ou bilabiado, com o lábio anterior trilobado e o posterior reduzido. O fruto pode ser uma drupa ou um esquizocarpo com cálice persistente. Semente sem endosperma, com embrião reto, eixo radícula-hipocótilo cilíndrico e cotilédones mais ou menos carnosos ou crassos, lisos” (Barroso, 1991).

### **2.2 – Considerações Botânicas Sobre o Gênero *Lippia***

O gênero *Lippia* inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídas na América do Sul, América Central e África

(Pascual *et al.*, 2001). Espécies deste gênero destacam-se pelo aroma forte e agradável e seu aspecto atrativo no período de floração.

As diversas espécies deste gênero apresentam as seguintes características:

“Apresentam-se quanto ao porte, desde ervas eréctas, procumbentes ou reptantes, até subarbustos perenes ou anuais. Muito frequentemente glândulas puntiformes segregadoras de óleo aromático se dispõem, com maior ou menor densidade sobre a superfície das folhas, independente da presença de pêlos. As folhas são opostas ou verticiladas, simples com a margem crenada ou serrada. As folhas têm corola alva até rubescente, são pequenas ou até muito exíguas e estão reunidas em inflorescências, ora em capítulos hemisféricos ou subangulosos ou tetrágonos, ora em espigas laxas ou racemos flácidos, com brácteas imbricadas, variáveis na sua forma, tamanho e textura. O fruto é uma cápsula biloca, envolvida total ou parcialmente pelo cálice aderente, bivalvo ou íntegro podendo também apresentar-se nua, sendo geralmente muito pequena” (Schauer, 1851).

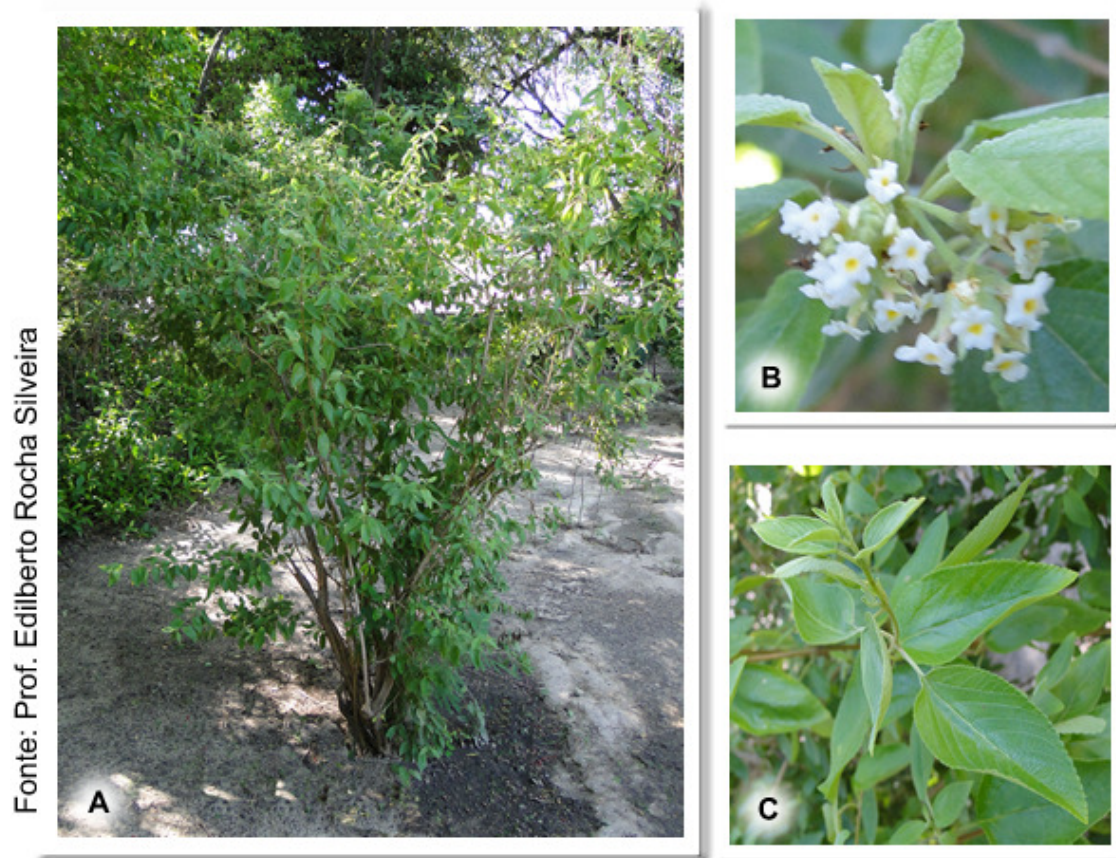
### **2.3 – Considerações Botânicas Sobre a Espécie *L. sidoides***

*L. sidoides* apresenta-se como um grande arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, que mede de 2 a 3 m de altura, típico de vegetação da região semi-árida do Nordeste.

Possui folhas picantes, simples, pecioladas, de 2 a 3 cm de comprimento e são muito aromáticas devido as glândulas puntiformes produtoras de óleo aromático que se encontram sobre a sua superfície. São revestidas de pêlos em ambas as faces, pouco visíveis ao olho nu, mas com sensibilidade ao tato.

As flores são pequenas, esbranquiçadas, variando de 1 a 2 mm, dispostas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas. Seus frutos do tipo aquênio são relativamente pequenos, cujas sementes raramente germinam. É multiplicada

pelo processo de estaquia, usando-se preferencialmente os ramos mais finos (Lorenzi *et al.*, 2002). A Figura 2 apresenta foto da planta (A) e detalhes das inflorescências (B) e folhas (C).



**Figura 2** – Fotografia de *L. sidoides*. Planta inteira – A; flores – B; folhas – C



## Capítulo 3

### *Levantamento Bibliográfico*



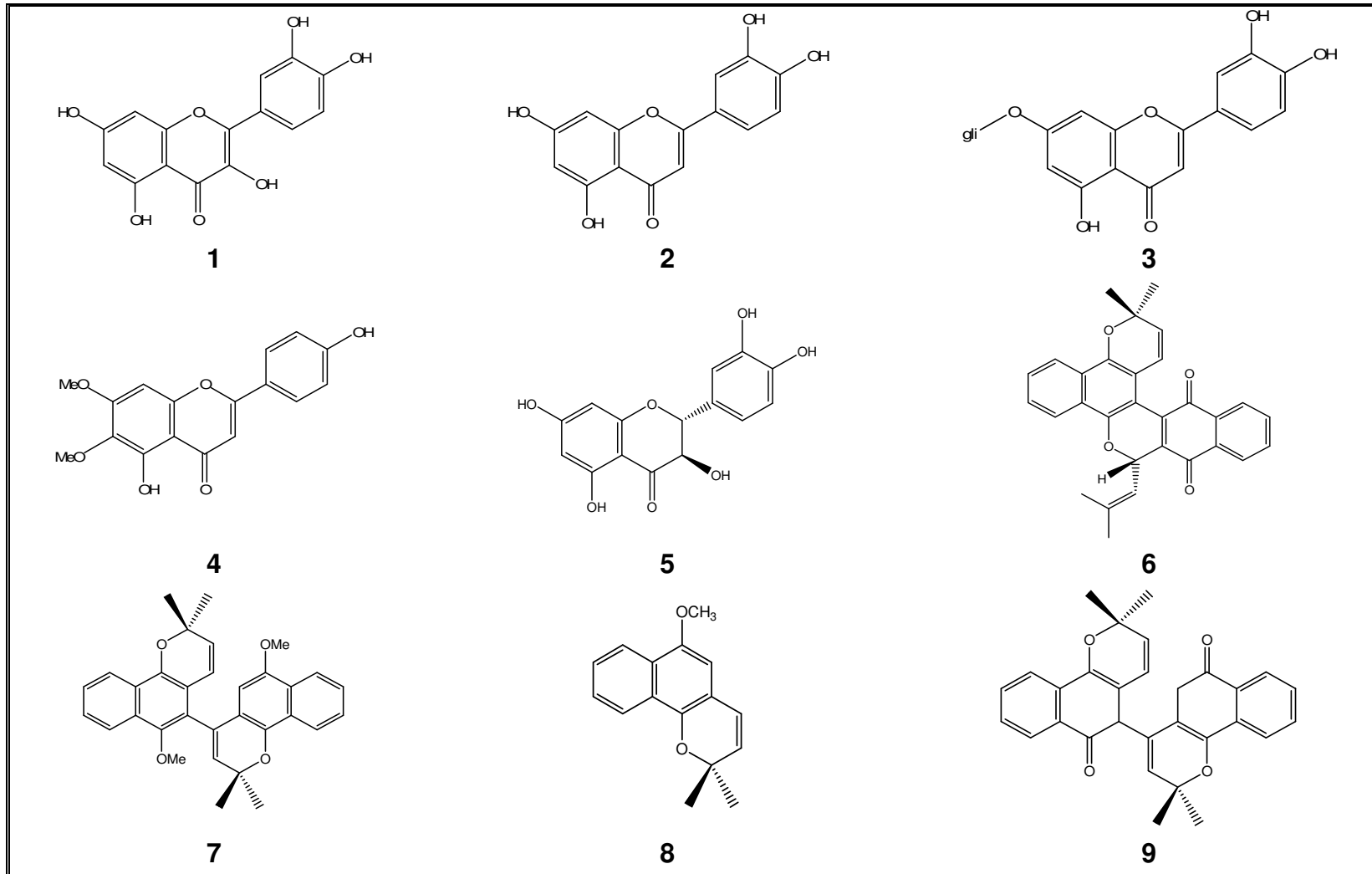
### 3 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

De acordo com pesquisa bibliográfica, observou-se que na espécie *Lippia sidoides* os flavonóides e as quinonas encontram-se como principais constituintes dentre os metabólitos secundários, sendo que também foi registrada a presença de outros constituintes como triterpenos, lignanas, esteróides livres e glicosilados e ácidos orgânicos (Morais *et al.*, 2009; Costa, 2001). A maioria dos trabalhos sobre atividade biológica desta espécie está relacionada ao seu óleo essencial, praticamente nenhum relaciona as atividades dos outros metabólitos secundários. Atividade citotóxica de duas quinonas, tectol e lippsidoquinona, foi registrada por Costa *et al.* (2001).

Na Tabela 1 encontra-se o nome popular dos metabólitos secundários já isolados e identificados desta espécie e as suas estruturas são apresentadas na Figura 3.

**Tabela 1** – Constituintes químicos registrados na espécie *L. sidoides*

<b>Classe</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Referência</b>
Flavonóide	Quercetina	<b>1</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Flavonóide	Luteolina	<b>2</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Flavonóide	Glucoluteolina	<b>3</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Flavonóide	Cirsimaritina	<b>4</b>	Pascual <i>et al.</i> , 2001
Flavonóide	Taxifolina	<b>5</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Quinona	Tecomaquinona	<b>6</b>	Costa <i>et al.</i> , 2001
Quinona	Éter dimetiltecol	<b>7</b>	Costa, 2001
Quinona	Lapachenol	<b>8</b>	Pascual <i>et al.</i> , 2001
Quinona	Deidro-tecol	<b>9</b>	Costa, 2001
Quinona	Lippisidoquinona	<b>10</b>	Costa <i>et al.</i> , 2001
Quinona	6-oxo-3,4,4a,5-tetraidro-3-hidroxi- 2,2-dimetilnafto-1,2-pirano	<b>11</b>	Macambira <i>et al.</i> , 1986
Quinona	Deidro- $\alpha$ -lapachona	<b>12</b>	Costa, 2001
Quinona	Tectol	<b>13</b>	Costa <i>et al.</i> , 2001
Quinona	Tectol acetilado	<b>14</b>	Costa <i>et al.</i> , 2001
Quinona	Isocatalponol	<b>15</b>	Macambira <i>et al.</i> , 1986
Quinona	Lapachol	<b>16</b>	Costa, 2001
Quinona	Tectoquinona	<b>17</b>	Costa <i>et al.</i> , 2001
Monoterpeno	Carvacrol	<b>18</b>	Macambira, 1985
Esteróide	$\beta$ -sitosterol	<b>19</b>	Costa, 2001
Esteróide	Glicosídeo do $\beta$ -sitosterol	<b>20</b>	Costa, 2001
Glicosilado			
Triterpeno	Ácido 3-O-acetiloleanólico	<b>21</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Lignana	Isolariciresinol	<b>22</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Éster aromático	3,4-dihidroxibenzoato de metila	<b>23</b>	Costa <i>et al.</i> , 2002
Ácido orgânico aromático	Ácido vanílico	<b>24</b>	Costa, 2001



**Figura 3** – Estruturas dos constituintes químicos registrados na espécie *L. sidoides*

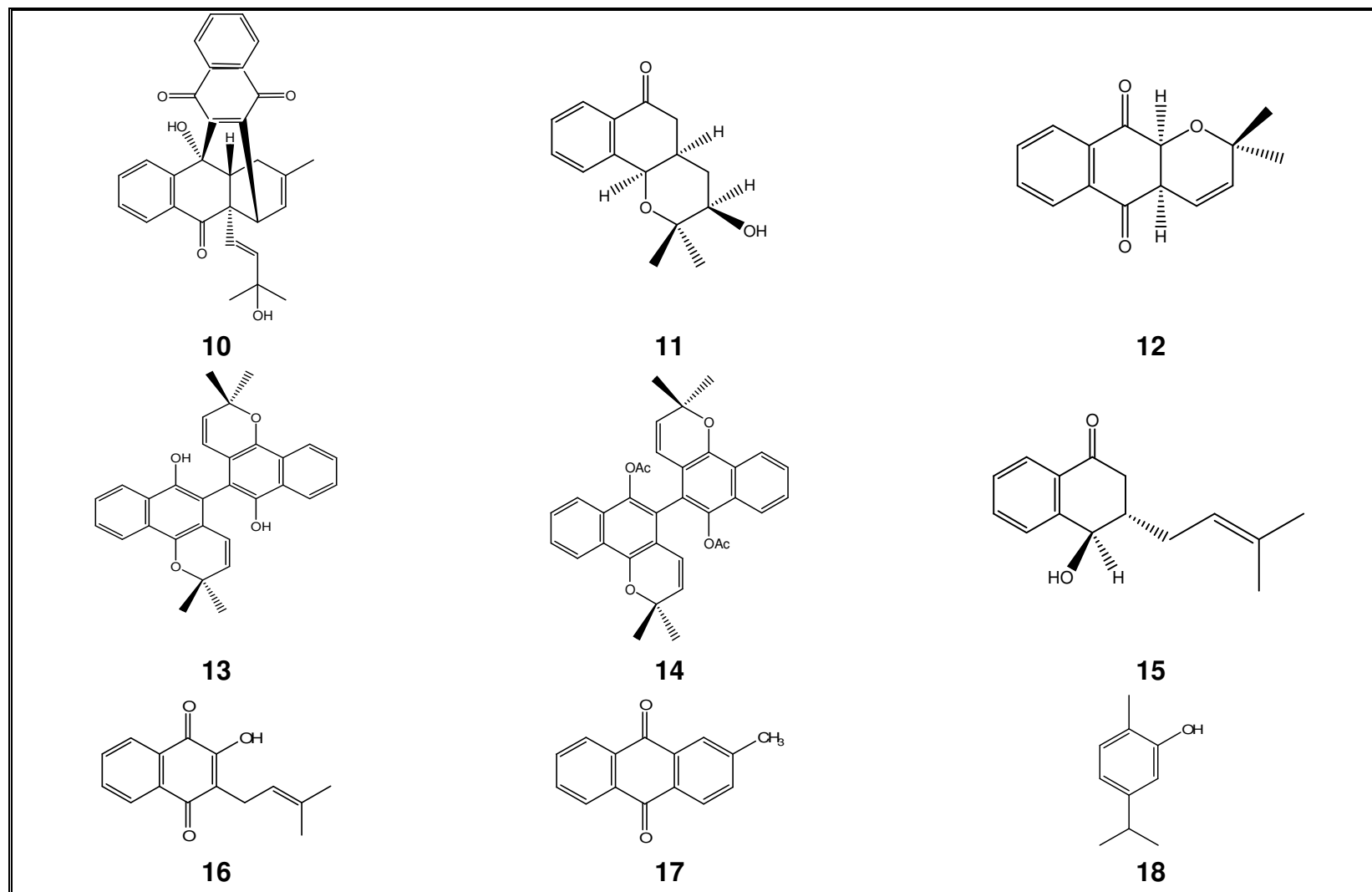


Figura 3 – Estruturas dos constituintes químicos registrados na espécie *L. sidoides*

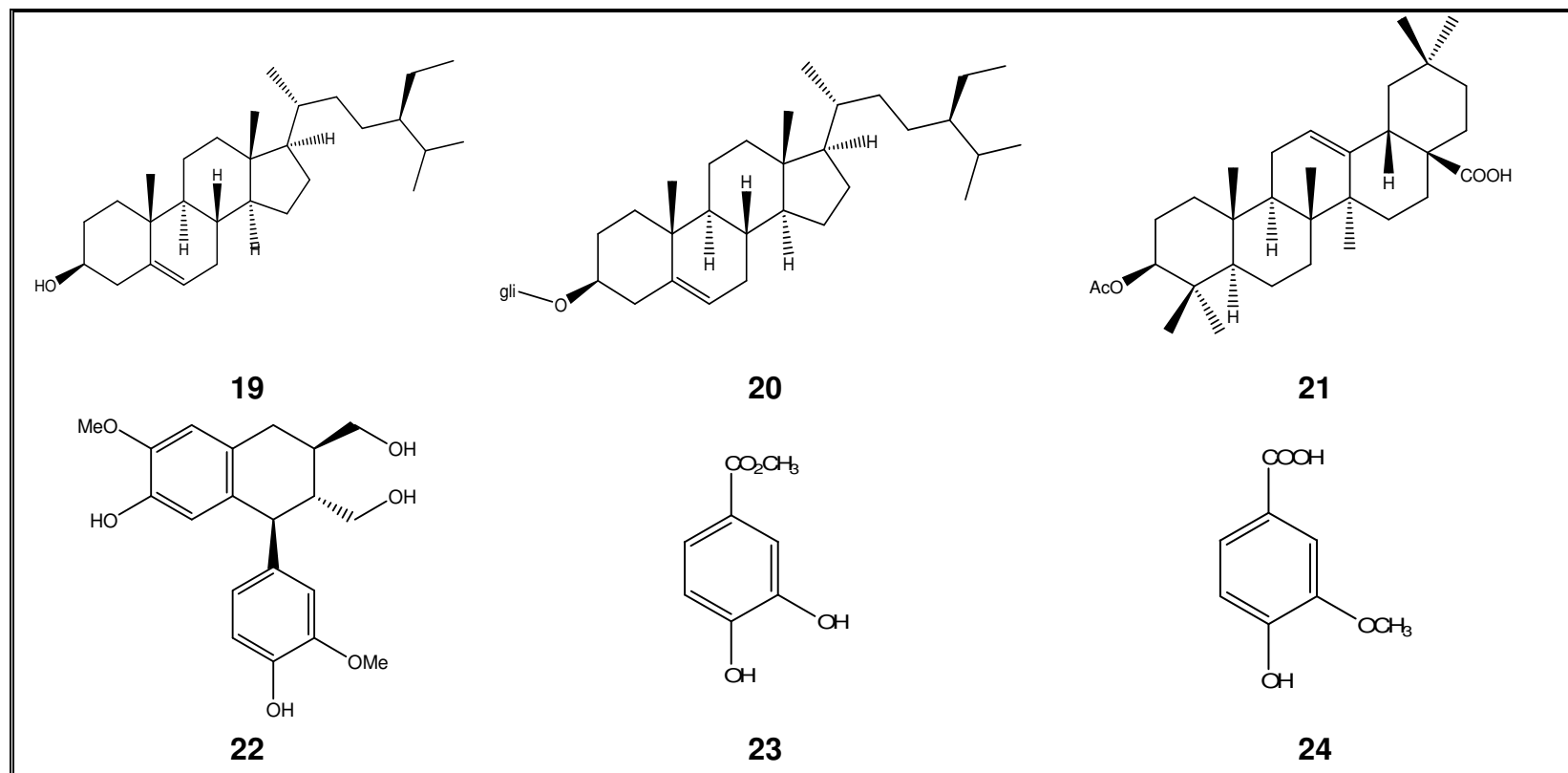


Figura 3 – Estruturas dos constituintes químicos registrados na espécie *L. sidoides*

## Capítulo 4

### *Resultados e Discussão*



## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Determinação Estrutural dos Metabólitos Secundários Isolados de *L. sidoides*

#### 4.1.1 – Determinação Estrutural LSR-1

O tratamento cromatográfico da fração diclorometano (EERD) do extrato etanólico das raízes (EERLS) de *L. sidoides* forneceu 15,0 mg de um sólido amorfo verde, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão na faixa de 188-189 °C e rotação ótica  $[\alpha]_D^{20} = -15,2^\circ$  ( $c$  0,00105,  $\text{CHCl}_3$ ), que foi denominado LSR-1.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 4, pág. 15) apresentou banda de absorção em  $1653\text{ cm}^{-1}$ , referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada; absorções de deformação axial de ligação C–H em  $2969$  e  $2922\text{ cm}^{-1}$ ; bandas em  $1594$  e  $1548\text{ cm}^{-1}$ , compatíveis com ligação C=C de aromático, além de absorções de deformação axial de ligação C–O em  $1247$  e  $1038\text{ cm}^{-1}$  e absorções de deformação axial de ligação C–C em  $1279\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 7, pág. 18) mostrou vinte e nove sinais para 30 átomos de carbono, sendo seis na região de carbonos  $\text{sp}^3$ , dos quais dois são de carbonos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  76,0 e 68,1), e vinte e três na região de carbonos  $\text{sp}^2$ , dos quais dois são de carbonos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  143,7 e 148,2) e dois carbonílicos ( $\delta_{\text{C}}$  182,4 e 183,7). Após análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 8, pág. 19), verificou-se a presença de onze carbonos metínicos (CH), um  $\text{sp}^3$  e dez  $\text{sp}^2$ , quatro carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ) e quatorze carbonos não hidrogenados (C), um  $\text{sp}^3$  e treze  $\text{sp}^2$ .

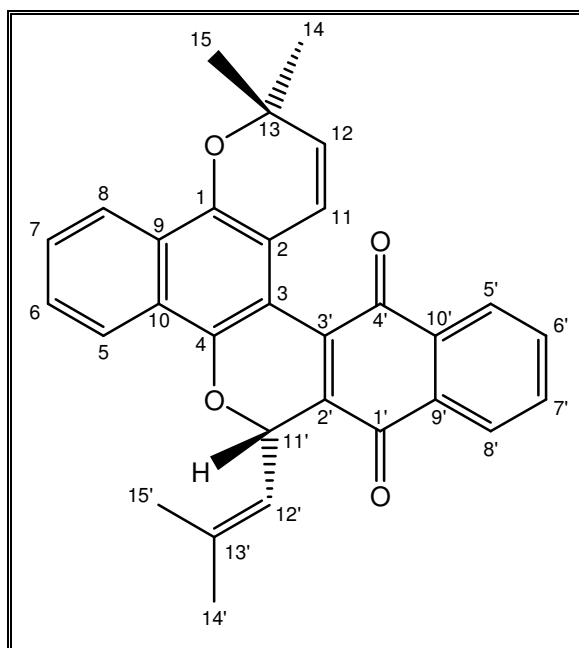
O espectro de massas (Fig. 9, pág. 20) obtido apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  448 Daltons. Este dado possibilitou confirmar a fórmula molecular do composto,  $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_4$ , com IDH=19.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figs. 5 e 6, págs. 16 e 17) revelou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  8,22 (dl,  $J=8,1$  Hz, H-8), 8,18 (dl,  $J=8,1$  Hz, H-5), 7,56 (dt,  $J=8,1$  Hz, H-7) e 7,48 (dt,  $J=8,1$  Hz, H-6), indicando a presença de anel aromático *orto* substituído. Apresentou ainda sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,46 (dl,  $J=9,3$  Hz, H-12'), 5,60 (d,  $J=9,7$  Hz, H-12) e 6,17 (d,  $J=9,7$  Hz, H-11), característicos de hidrogênios olefínicos, além de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,58 (s, H-14), 1,62 (s, H-15), 1,65 (s, H-14') e 2,06 (s, H-15') de hidrogênios metílicos.

A presença de duas carbonilas de cetonas conjugadas sugere um sistema *p*-benzoquinônico, e os demais sinais de carbono atribuí-se a um anel aromático que tem sua confirmação no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelos sinais  $\delta_{\text{H}}$  8,08-8,16 (m, H-5' e H-8'),  $\delta_{\text{H}}$  7,71-7,79 (m, H-6' e H-7').

Com base nos dados obtidos e comparação com dados espectrais registrados na literatura (Lemos *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2010) (Tabela 2), concluiu-se que a substância LSR-1 trata-se de um raro pigmento verde natural conhecido como tecomaquinona I, já isolado anteriormente da espécie *L. sidoides*.



LSR-1

Tabela 2 – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSR-1

C	LSR-1		Literatura* ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	143,7	-	143,5	-
2	112,9	-	112,7	-
3	111,5	-	111,3	-
4	148,2	-	148,0	-
5	123,3	8,18 (dl, $J=8,1$ )	123,1	8,15 (d, $J=8,3$ )
6	126,6	7,48 (dt, $J=8,1$ e 2,6)	126,4	7,45 (t, $J=8,3$ )
7	128,2	7,56 (dt, $J=8,1$ e 2,6)	128,0	7,53 (t, $J=8,3$ )
8	122,5	8,22 (dl, $J=8,1$ )	122,3	8,18 (d, $J=8,3$ )
9	127,9	-	127,7	-
10	126,0	-	125,8	-
11	124,1	6,17 (d, $J=9,7$ )	123,9	6,13 (d, $J=9,6$ )
12	125,4	5,60 (d, $J=9,7$ )	125,2	5,56 (d, $J=9,6$ )
13	76,0	-	75,8	-
14	25,6	1,58 (s)	25,4	1,59 (s)
15	28,9	1,62 (s)	28,7	1,62 (s)
1'	183,7	-	183,5	-

---

2'	136,7	-	137,7	-
3'	135,9	-	136,6	-
4'	182,4	-	182,2	-
5'	126,9	8,08-8,16 (m)	126,7	8,10
6'	133,7	7,71-7,79 (m)	133,5	7,62
7'	133,7	7,71-7,79 (m)	133,5	7,68
8'	126,1	8,08-8,16 (m)	125,9	8,09
9'	133,4	-	133,2	-
10'	132,2	-	132,0	-
11'	68,1	6,44 (d, $J=9,3$ )	67,9	6,40 (d, $J=9,3$ )
12'	117,8	5,46 (dl, $J=9,3$ )	117,6	5,43 (d, $J=9,3$ )
13'	142,1	-	141,9	-
14'	26,2	1,65 (s)	26,0	1,55 (s)
15'	19,1	2,06 (s)	18,9	2,03 (s)

---

Deslocamentos químicos ( $\delta_C$  e  $\delta_H$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz

\*Lemos *et al.*, 1999

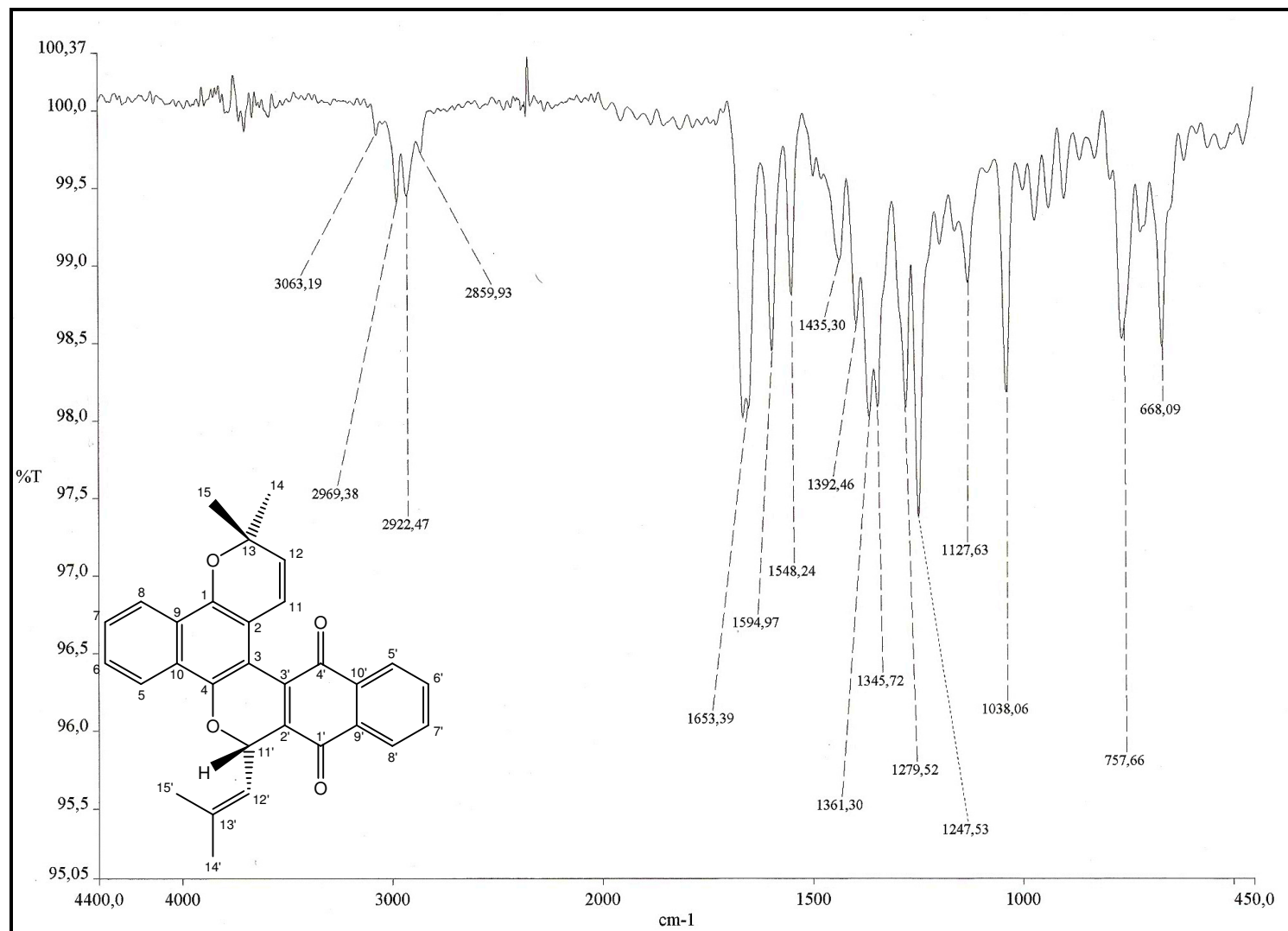


Figura 4 – Espectro na região do infravermelho de LSR-1

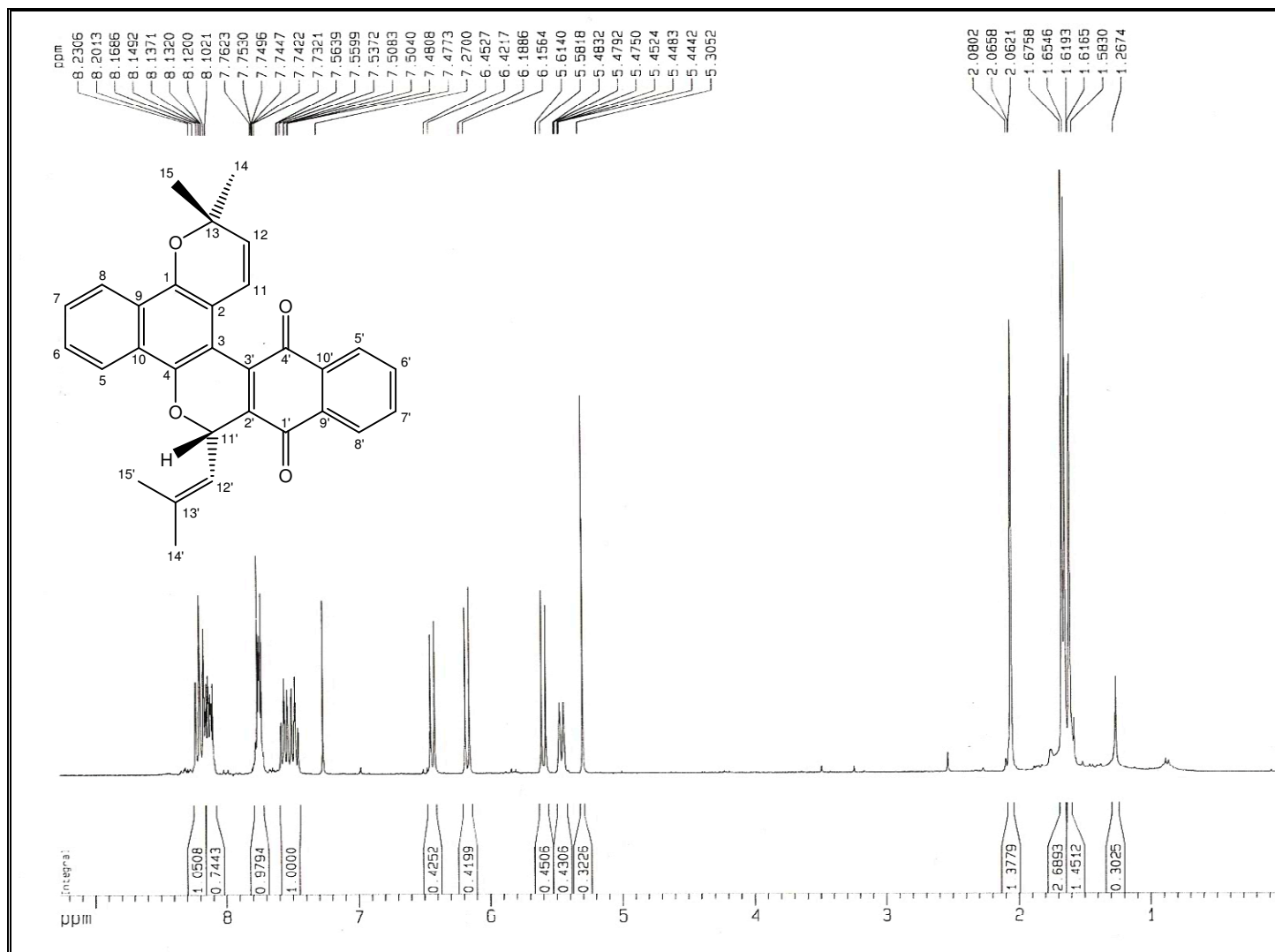


Figura 5 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSR-1

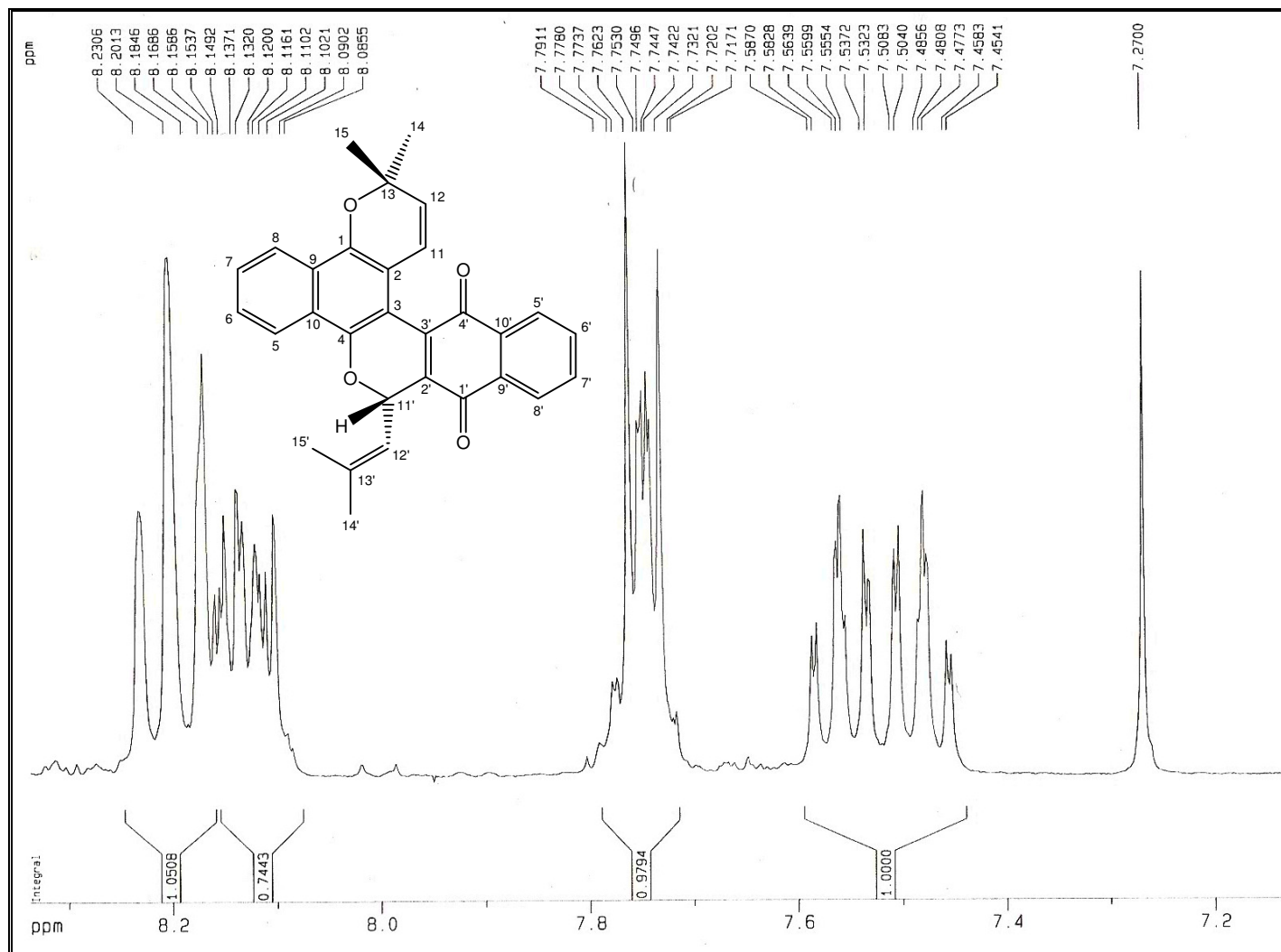


Figura 6 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSR-1

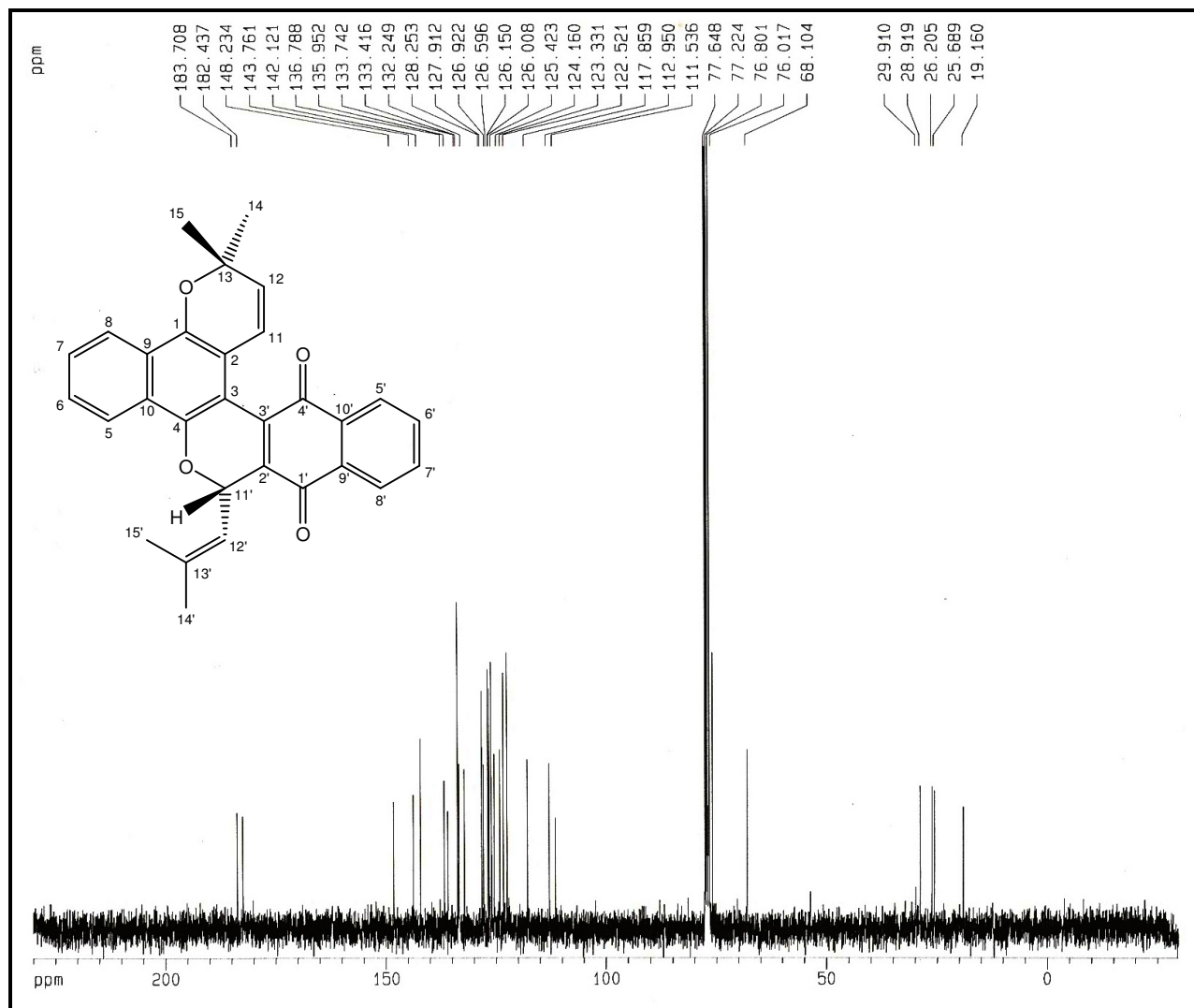


Figura 7 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSR-1

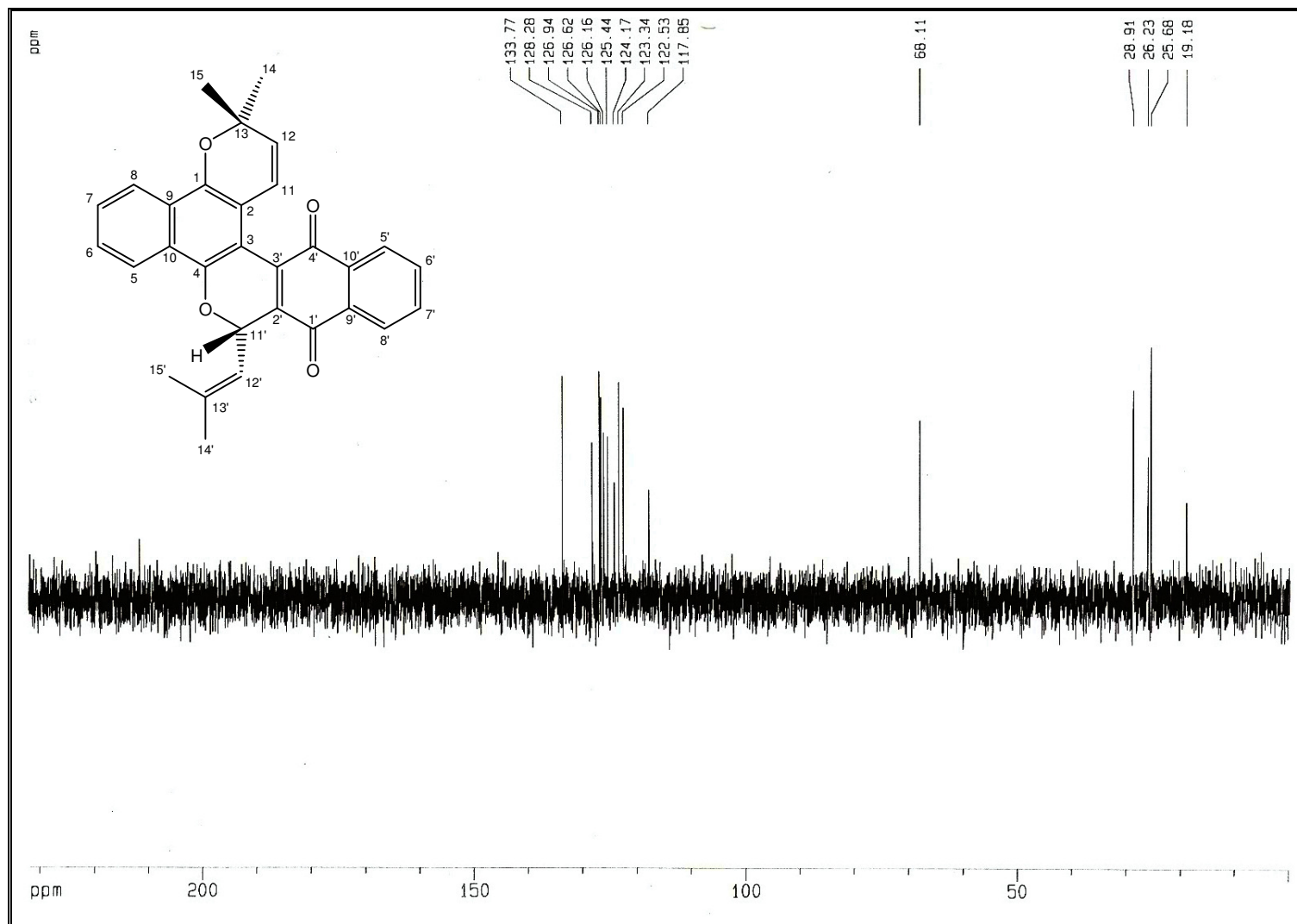


Figura 8 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] de LSR-1



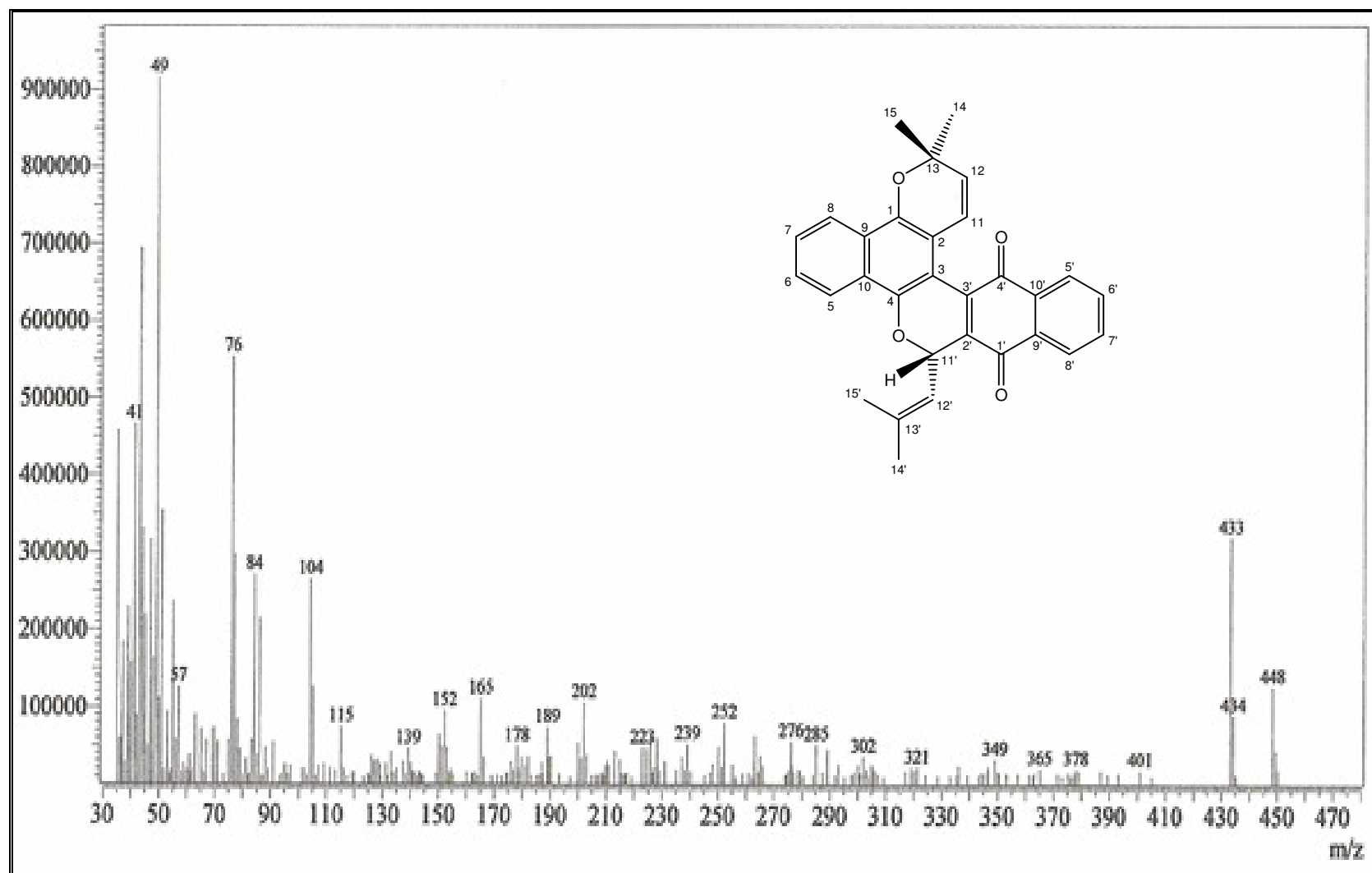


Figura 9 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de LSR-1

#### 4.1.2 – Determinação Estrutural LSF-1

O tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (EEFA) do extrato etanólico das folhas (EEFLS) de *L. sidoides* forneceu 11,0 mg de uma resina verde, solúvel em clorofórmio, que foi denominado LSF-1.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 10, pág. 23) exibiu uma banda de absorção em  $3384\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação O–H; bandas em  $2942$  e  $2903\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de ligação C–H; em  $1605$  e  $1442\text{ cm}^{-1}$ , bandas compatíveis com ligação C=C de aromático, além de absorções em  $1250$  e  $1307\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a deformações axial de ligações C–O e C–C, respectivamente.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 12, pág. 25) revelou um total de nove linhas espectrais para dez átomos de carbono, das quais três estão na região de carbonos  $\text{sp}^3$ , sendo um carbono oxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  65,3), e seis estão na região de carbonos  $\text{sp}^2$ , incluindo um carbono oxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  153,4). Análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 13, pág. 26), registrou a presença de quatro carbonos metínicos (CH), um  $\text{sp}^3$  e três  $\text{sp}^2$ , um carbono metilênico ( $\text{CH}_2$ )  $\text{sp}^3$ , dois carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ) e três carbonos não hidrogenados (C)  $\text{sp}^2$ , conforme dispostos na Tabela 3.

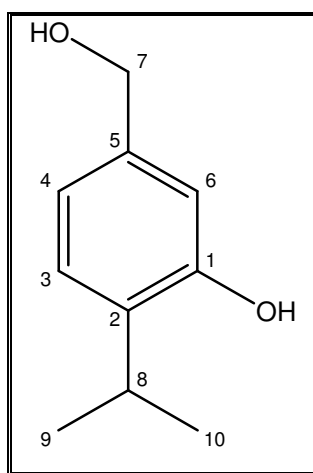
**Tabela 3** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  de LSF-1

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>Fórmula molecular</b>
134,45 (C=C)	27,16 (C–C)	65,27 (C – OH)	22,78	
139,69 (C=C)	114,28 (C=C)		22,78	
153,46 (C–OH)	119,59 (C=C)			
	126,84 (C=C)			
<b>C<sub>3</sub>HO</b>	<b>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub></b>

O espectro de massas (Fig. 14, pág. 27) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  166 Daltons. Este dado permitiu confirmar a fórmula molecular sugerida para o composto,  $C_{10}H_{14}O_2$ , com IDH=4.

O espectro de RMN  $^1H$  [500 MHz,  $CDCl_3$ ] (Fig. 11, pág. 24) exibiu sinais em  $\delta_H$  6,82 (sl, H-6), 6,85 (d,  $J=7,7$  Hz, H-4) e 7,17 (d,  $J=7,7$  Hz, H-3), indicando a presença de um anel aromático tri-substituído. Revelou ainda um sinal em  $\delta_H$  4,60 (s, H-7), característico de hidrogênio metilênico carbinólico, além de um dubleto em  $\delta_H$  1,24 (6H) e um septeto em  $\delta_H$  3,23 (1H), correspondente a um grupo isopropila,  $-CH(CH_3)_2$ .

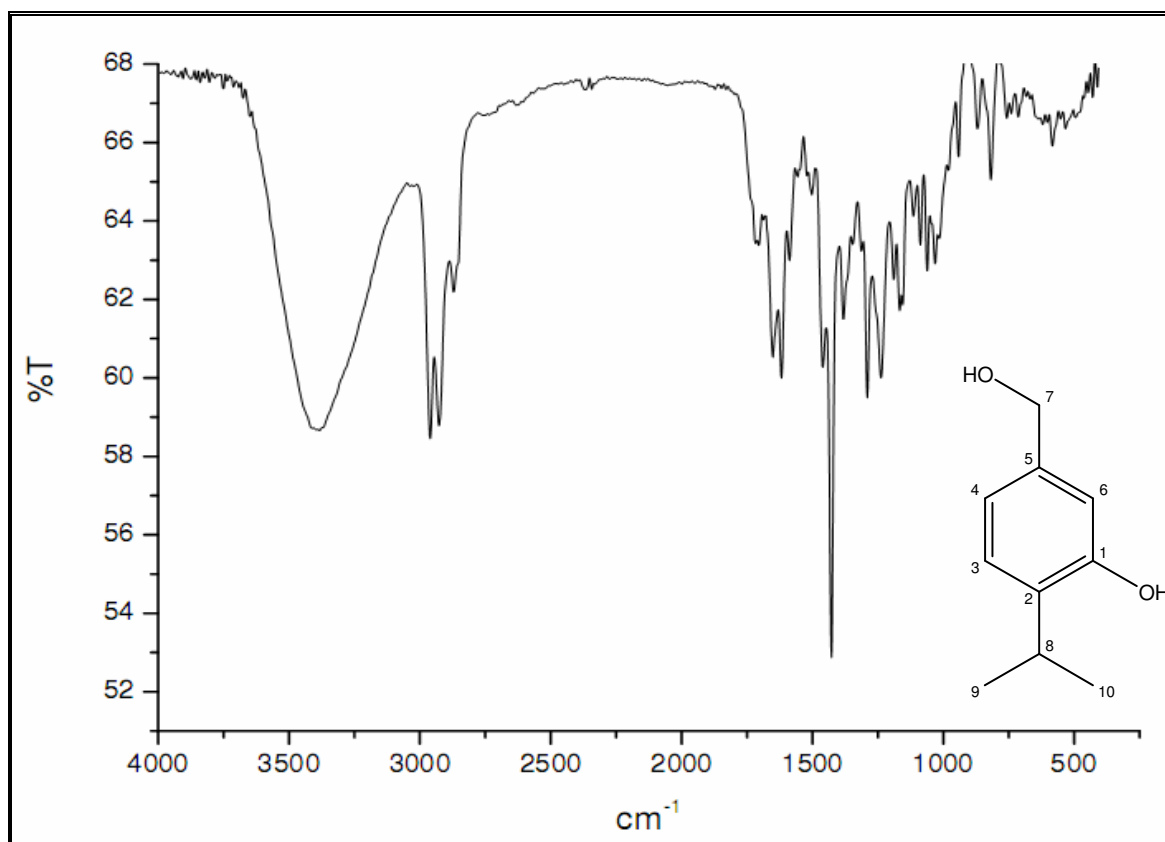
Com base nas informações discutidas e nos dados descritos na Tabela 4, chegou-se a conclusão de que a substância LSF-1 se trata de um monoterpene derivado do timol, caracterizado como 5-hidroximetil-2-isopropilfenol, que já foi isolado da espécie *Eupatorium fortunei* (Jiang *et al.*, 2006), e está sendo reportado pela primeira vez no gênero *Lippia*.



LSF-1

**Tabela 4** – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSF-1

<i>LSF-1</i>		
<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	153,4	-
2	134,4	-
3	126,8	7,17 (d, $J=7,7$ )
4	119,6	6,85 (d, $J=7,7$ )
5	139,7	-
6	114,3	6,82 (sl)
7	65,3	4,60 (s)
8	27,2	3,23 (sep, $J=6,8$ )
9	22,8	1,24 (d, $J=6,8$ )
10	22,8	1,24 (d, $J=6,8$ )

Deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{C}}$  e  $\delta_{\text{H}}$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz**Figura 10** – Espectro na região do infravermelho de LSF-1

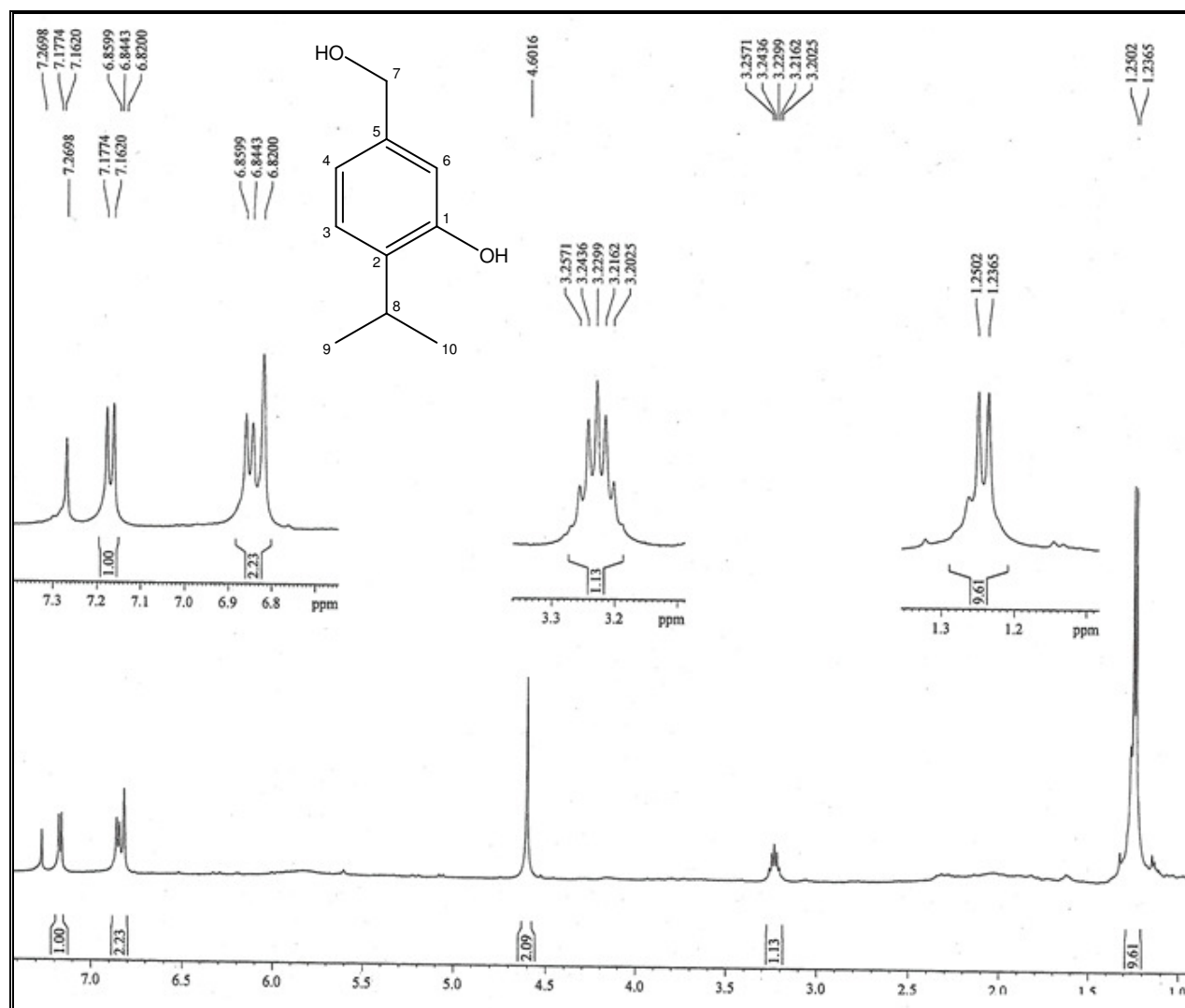


Figura 11 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-1

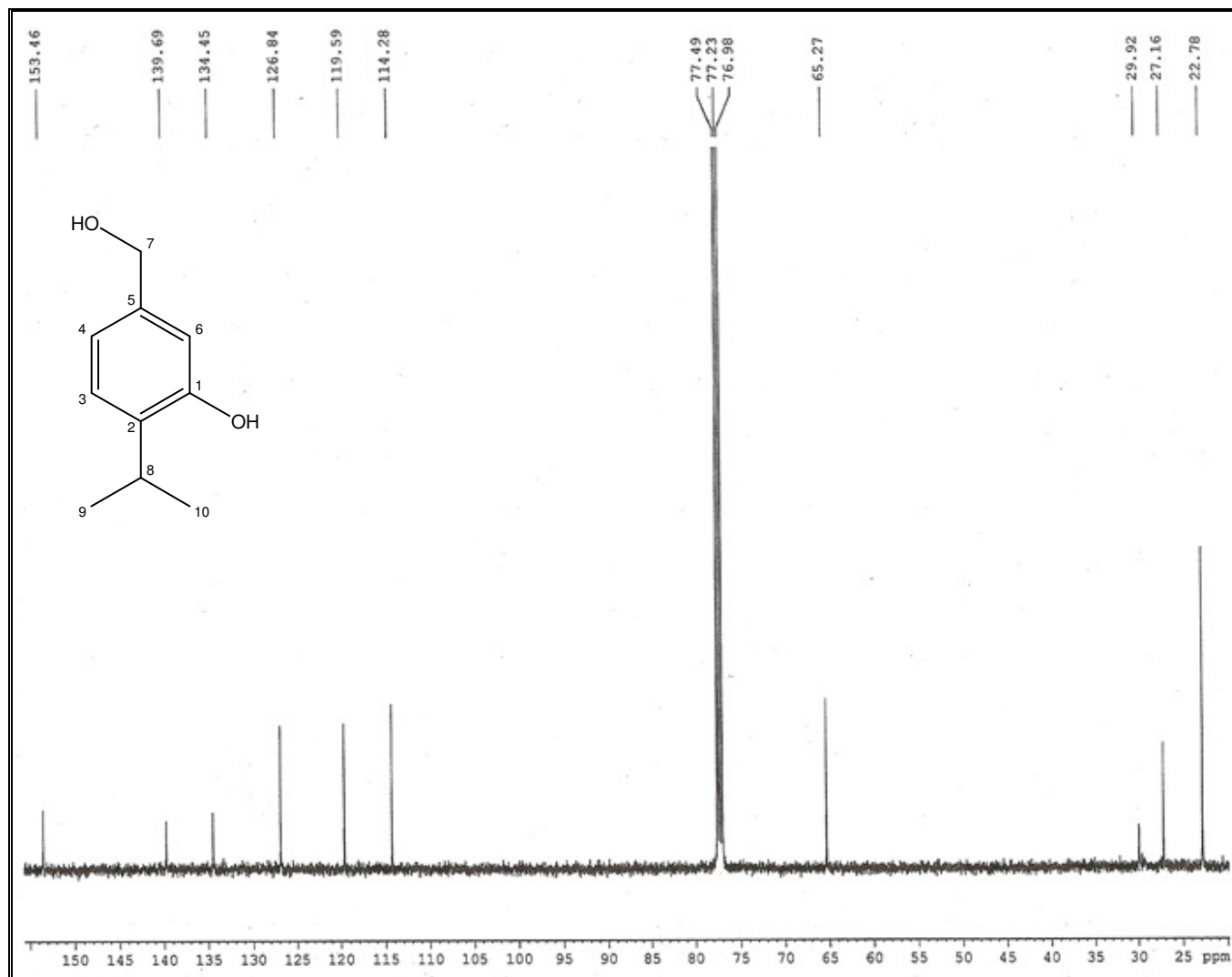


Figura 12 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-1

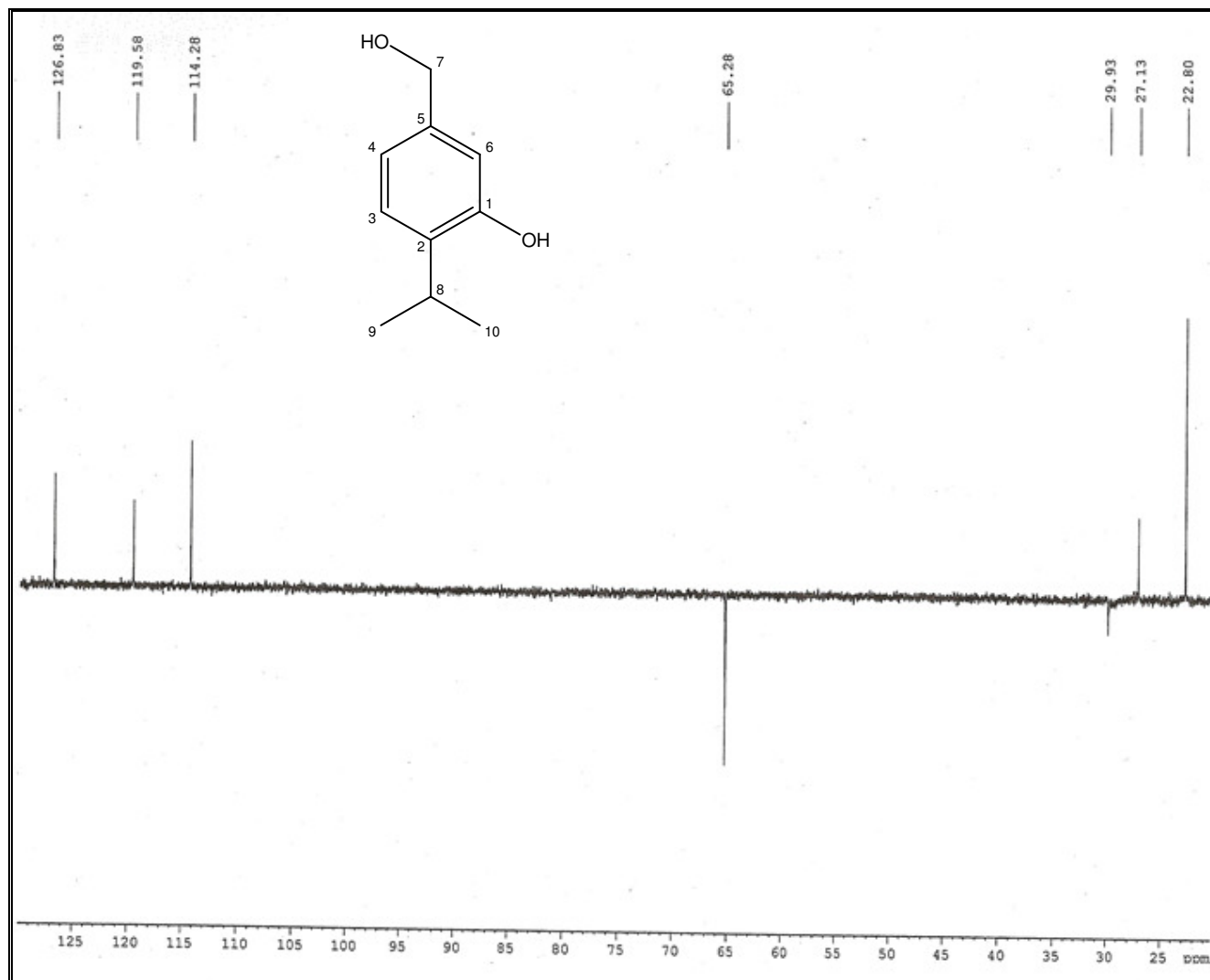
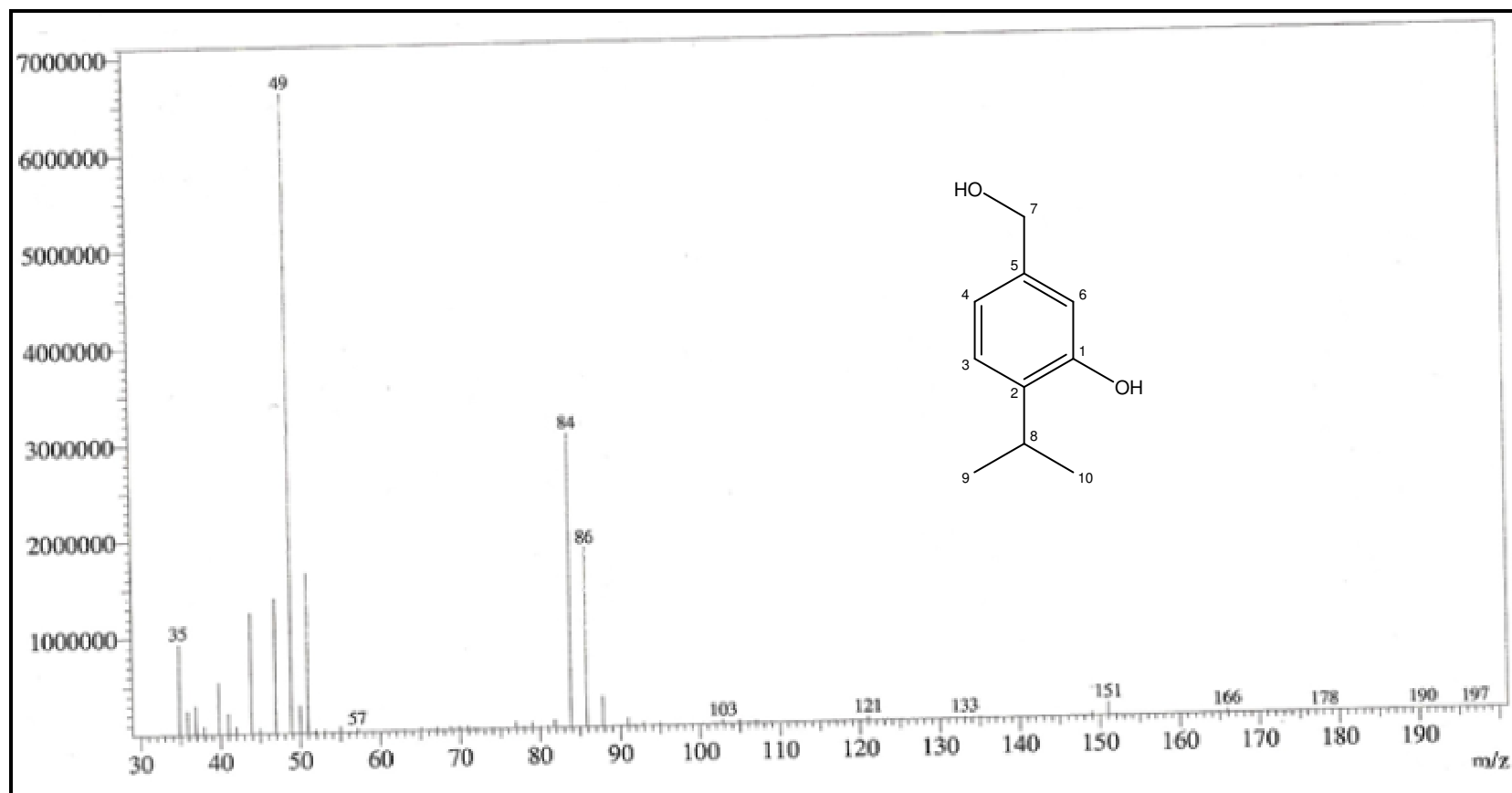


Figura 13 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-1



**Figura 14** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de LSF-1



### 4.1.3 – Determinação Estrutural LSF-2

O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (EEFA) do extrato etanólico das folhas (EEFLS) de *L. sidoides* forneceu 27,0 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 229-231 °C e rotação ótica  $[\alpha]_D^{20} = -10,9^\circ$  (c 0,0011, MeOH), que foi denominado LSF-2.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 15, pág. 32) revelou uma forte banda de absorção em  $3134\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de ligação O–H; uma absorção em  $1632\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial de ligação C=O de carbonila conjugada; absorções referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático em  $1603$  e  $1519\text{ cm}^{-1}$ , assim como absorções de deformação axial de ligação C–O em  $1082$ ,  $1158$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$  e absorções de deformação axial de ligação C–C em  $1312\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] (Fig. 17, pág. 34) registrou um total de treze linhas espectrais para 15 átomos de carbono, sendo duas na região de carbonos  $\text{sp}^3$ , incluindo um carbono oxigenado ( $\delta_{\text{C}} 80,6$ ), e as demais na região de carbonos  $\text{sp}^2$ , quatro carbonos oxigenados ( $\delta_{\text{C}} 159,1$ ;  $165,0$ ;  $165,6$  e  $168,4$ ) e um carbonílico ( $\delta_{\text{C}} 197,9$ ). Após análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 18, pág. 35), verificou-se a presença de cinco carbonos metínicos (CH), um  $\text{sp}^3$  e quatro  $\text{sp}^2$ , um carbono metilênico ( $\text{CH}_2$ )  $\text{sp}^3$  e sete carbonos não hidrogenados (C)  $\text{sp}^2$ , conforme dispostos na Tabela 5.

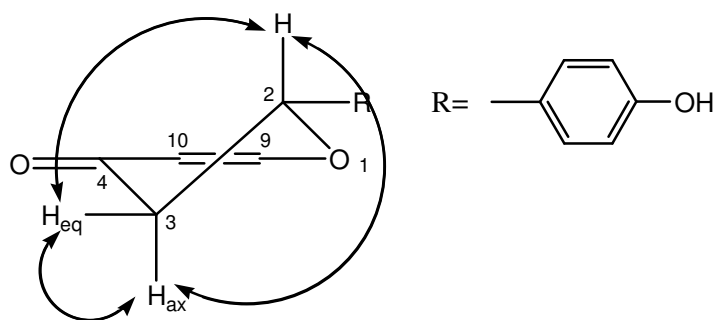
**Tabela 5** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  de LSF-2

C	CH	CH <sub>2</sub>	Fórmula molecular
103,50 (C=C)	80,60 (C–O)	44,16	
131,22 (C=C)	96,31 (C=C)		

159,15 (C–OH)	97,19 (C=C)		
165,02 (C–O)	116,47 (C=C)		
165,60 (C–OH)	116,47 (C=C)		
168,46 (C–OH)	129,17 (C=C)		
197,92 (C=O)	129,17 (C=C)		
<b><math>C_7H_3O_4</math></b>	<b><math>C_7H_7O</math></b>	<b><math>CH_2</math></b>	<b><math>C_{15}H_{12}O_5</math></b>

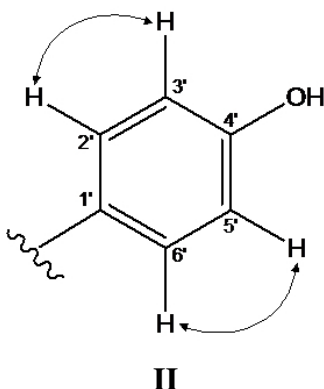
O espectro de massas (Fig. 21, pág. 37) revelou o pico do íon molecular em  $m/z$  272 Daltons, confirmando a fórmula molecular do composto,  $C_{15}H_{12}O_5$ , com IDH=10.

O espectro de RMN  $^1H$  [500 MHz,  $CD_3OD$ ] (Fig. 16, pág. 33) apresentou um conjunto de sinais em  $\delta_H$  5,88 (d,  $J=2,1$  Hz, H-8), 5,89 (d,  $J=2,1$  Hz, H-6), 6,81 (d,  $J=8,5$  Hz, H-3' e H-5') e 7,30 (d,  $J=8,5$  Hz, H-2' e H-6'), atribuídos a hidrogênios aromáticos, sugerindo a presença de dois anéis aromáticos. Apresentou ainda sinais na região de hidrogênios alifáticos,  $\delta_H$  5,31 (dd,  $J=13,0$  e 2,9 Hz, H-2), 3,09 (dd,  $J=17,1$  e 13,0 Hz, H-3ax) e 2,68 (dd,  $J=17,1$  e 2,9 Hz, H-3eq), que podem caracterizar o esqueleto de uma flavanona. Uma flavanona apresenta um anel heterocíclico em conformação preferencial de meia cadeira, que justifica claramente as constantes de acoplamento observadas:  $J=17,1$  Hz (acoplamento geminal H-3ax/H-3eq),  $J=13,0$  Hz (acoplamento axial-axial H-2/H-3ax) e  $J=2,9$  Hz (acoplamento axial-equatorial H-2/H-3eq) (subestrutura I).



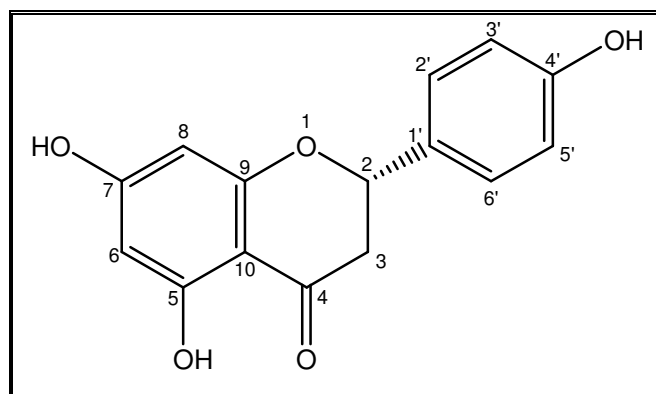
I

O espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY (Fig. 19, pág. 36) mostrou acoplamento *orto* entre os sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,81 (d,  $J=8,5$  Hz, H-3' e H-5') com  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (d,  $J=8,5$  Hz, H-2' e H-6') (subestrutura II). Através deste experimento foi possível confirmar o acoplamento geminal envolvendo os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,68 (dd,  $J=17,1$  e 2,9 Hz, H-3eq) com  $\delta_{\text{H}}$  3,09 (dd,  $J=17,1$  e 13,0 Hz, H-3ax), além dos acoplamentos axial-axial em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 (dd,  $J=13,0$  e 2,9 Hz, H-2) com 3,09 (dd,  $J=17,1$  e 13,0 Hz, H-3ax) e axial-equatorial em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 (dd,  $J=13,0$  e 2,9 Hz, H-2) com  $\delta_{\text{H}}$  2,68 (dd,  $J=17,1$  e 2,9 Hz, H-3eq) (subestrutura I). Desta forma o padrão de substituição dos anéis foi determinado e confirmado através de dados descritos na literatura (Almeida *et al.*, 2005).



O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Fig. 20, pág. 36) permitiu correlacionar, a uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ), os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 6). Os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  5,31; 5,89; 5,88; 7,30 e 6,81 estão correlacionados com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  80,6; 97,1; 96,3; 129,1 e 116,4, respectivamente, e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,09 e 2,67 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  44,1.

Baseando-se em todas as informações espectrais obtidas e em dados da literatura (Almeida *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2010) (Tabela 6), verificou-se que LSF-2 trata-se da flavanona naringenina, que está sendo reportada pela primeira vez na espécie *L. sidoides*.



LSF-2

**Tabela 6** – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-2

C	HSQC LSF-2		Literatura* ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	80,6	5,31 (dd, $J=13,0$ e $2,9$ )	80,0	5,45 (dd, $J=12,8$ e $3,0$ )
3	44,1	3,09 (dd, $J=17,1$ e $13,0$ ) 2,68 (dd, $J=17,1$ e $2,9$ )	43,5	3,17 (dd, $J=17,1$ e $12,8$ ) 2,72 (dd, $J=17,1$ e $3,0$ )
4	197,9	-	197,3	-
5	165,6	-	165,3	-
6	97,1	5,89 (d, $J=2,1$ )	96,9	5,95 (s)
7	168,4	-	167,4	-
8	96,3	5,88 (d, $J=2,1$ )	95,9	5,95 (s)
9	165,0	-	164,4	-
10	103,5	-	103,3	-
1'	131,2	-	130,8	-
2'/6'	129,1	7,30 (d, $J=8,5$ )	129,0	7,37 (d, $J=11,3$ )
3'/5'	116,4	6,81 (d, $J=8,5$ )	116,2	6,88 (d, $J=11,3$ )
4'	159,1	-	158,7	-

Deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{C}}$  e  $\delta_{\text{H}}$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz\*Almeida *et al.*, 2005

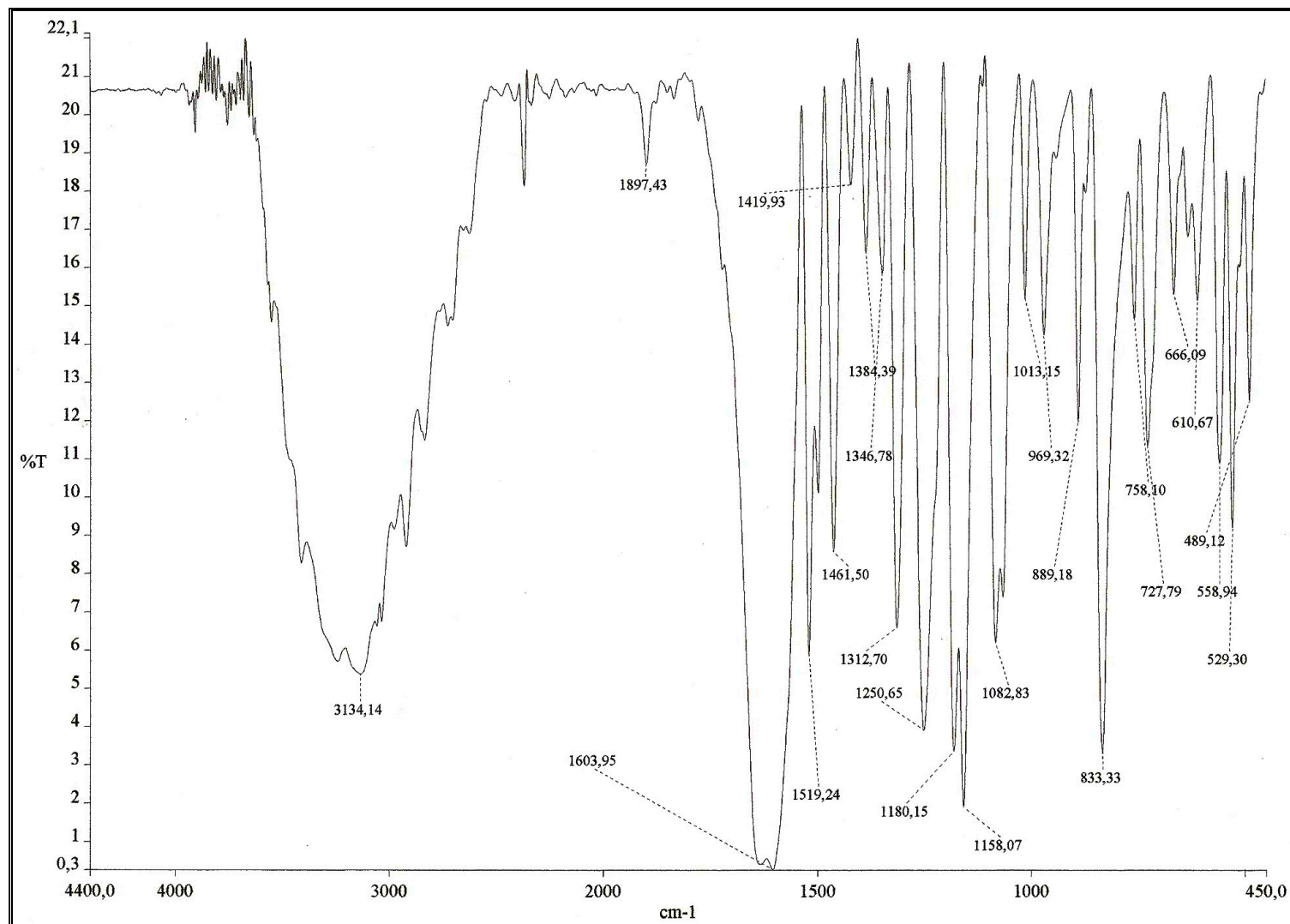


Figura 15 – Espectro na região do infravermelho de LSF-2

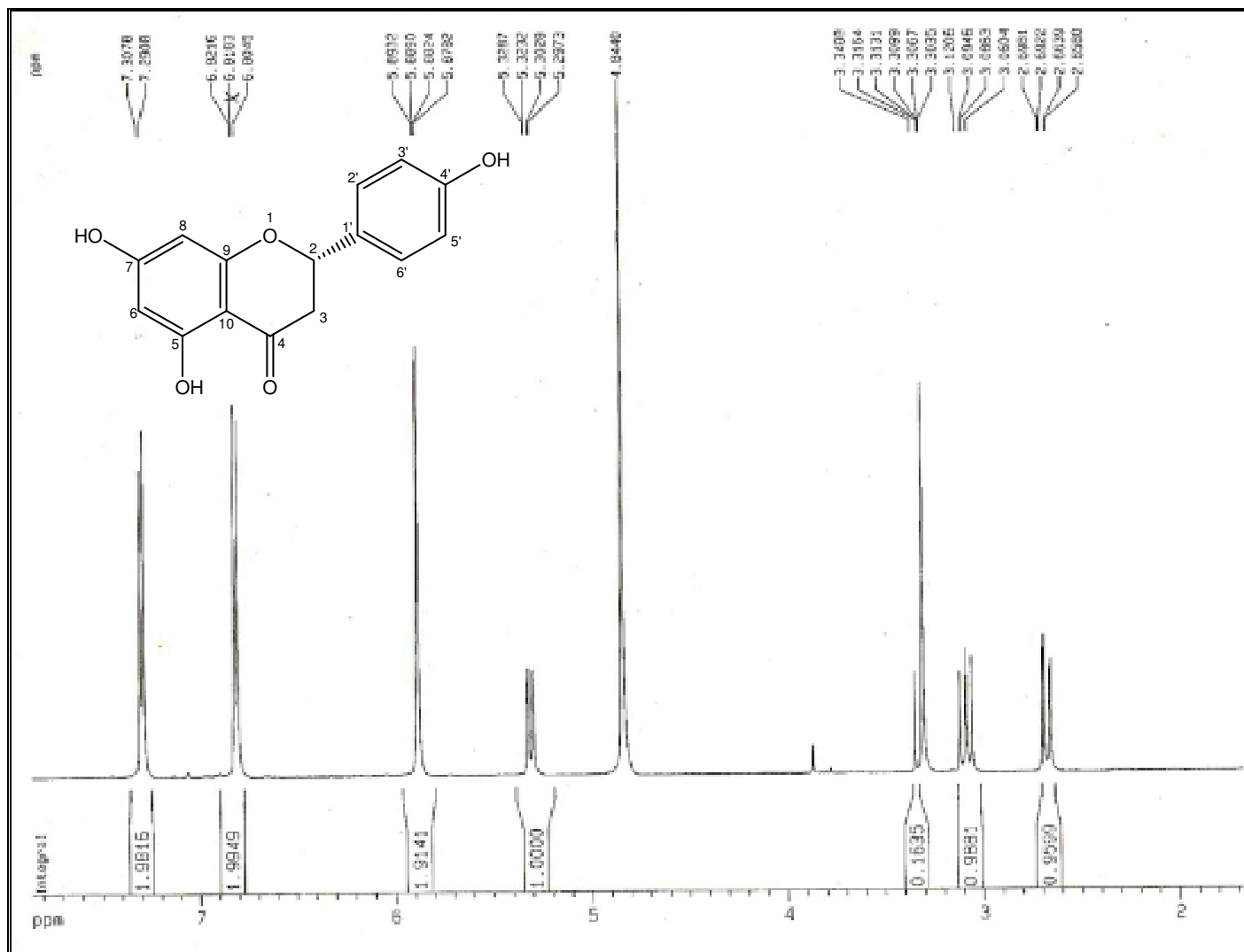


Figura 16 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-2

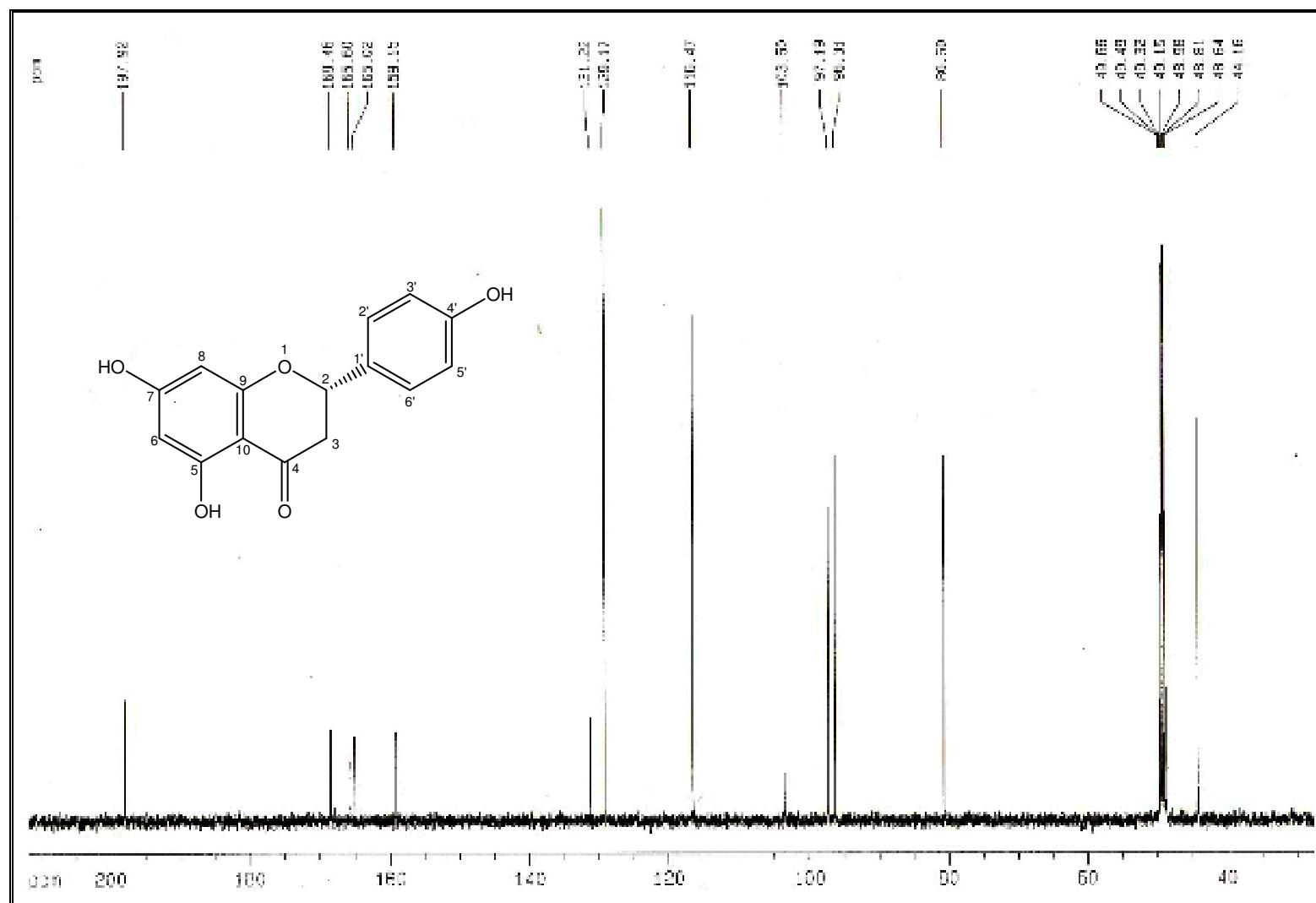


Figura 17 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-2

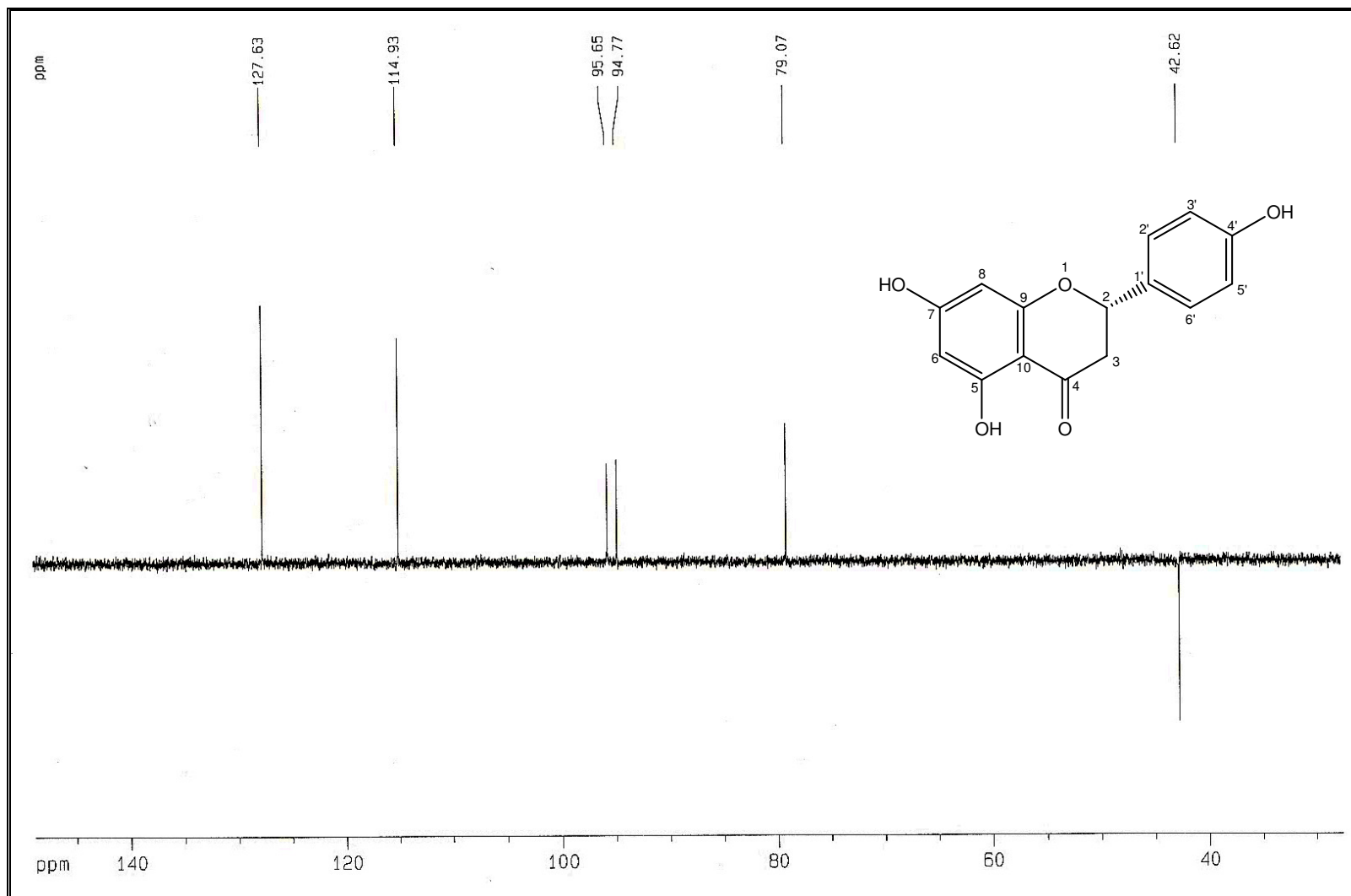


Figura 18 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [125 MHz, CD<sub>3</sub>OD] de LSF-2



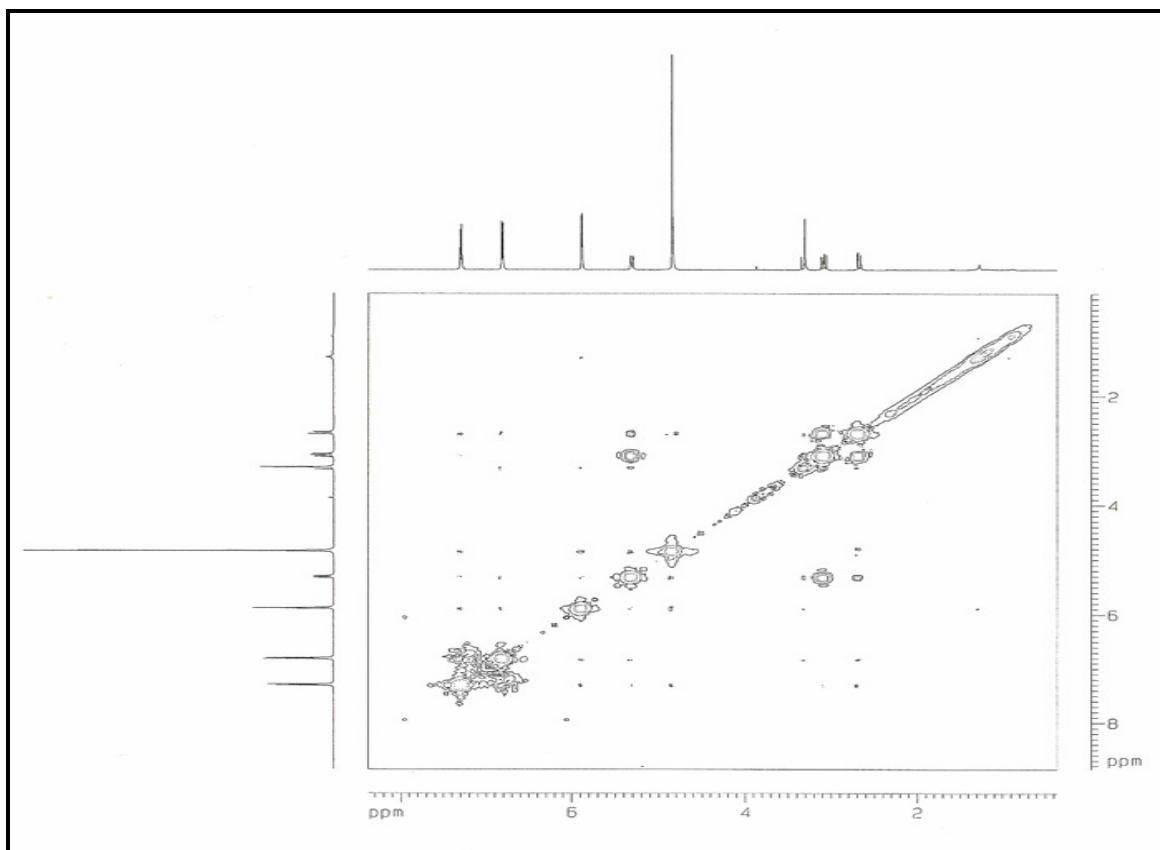


Figura 19 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-2

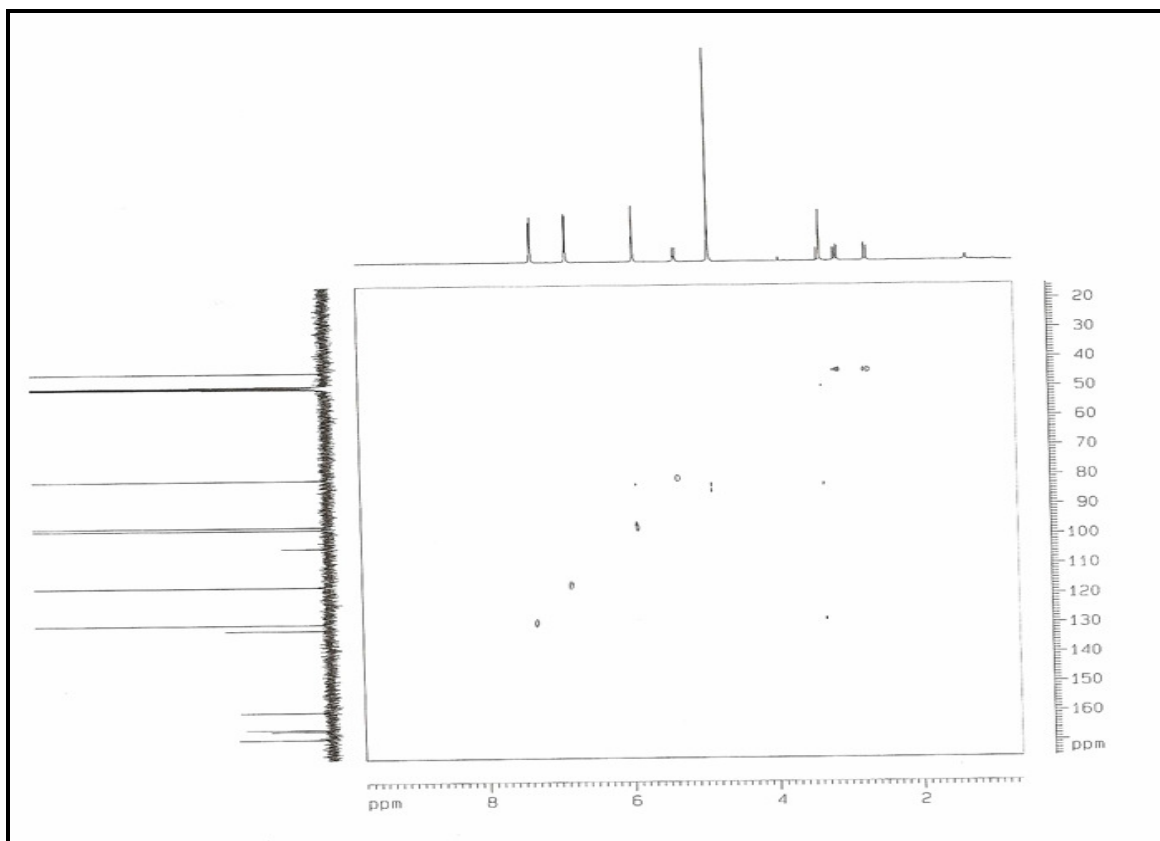


Figura 20 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-2

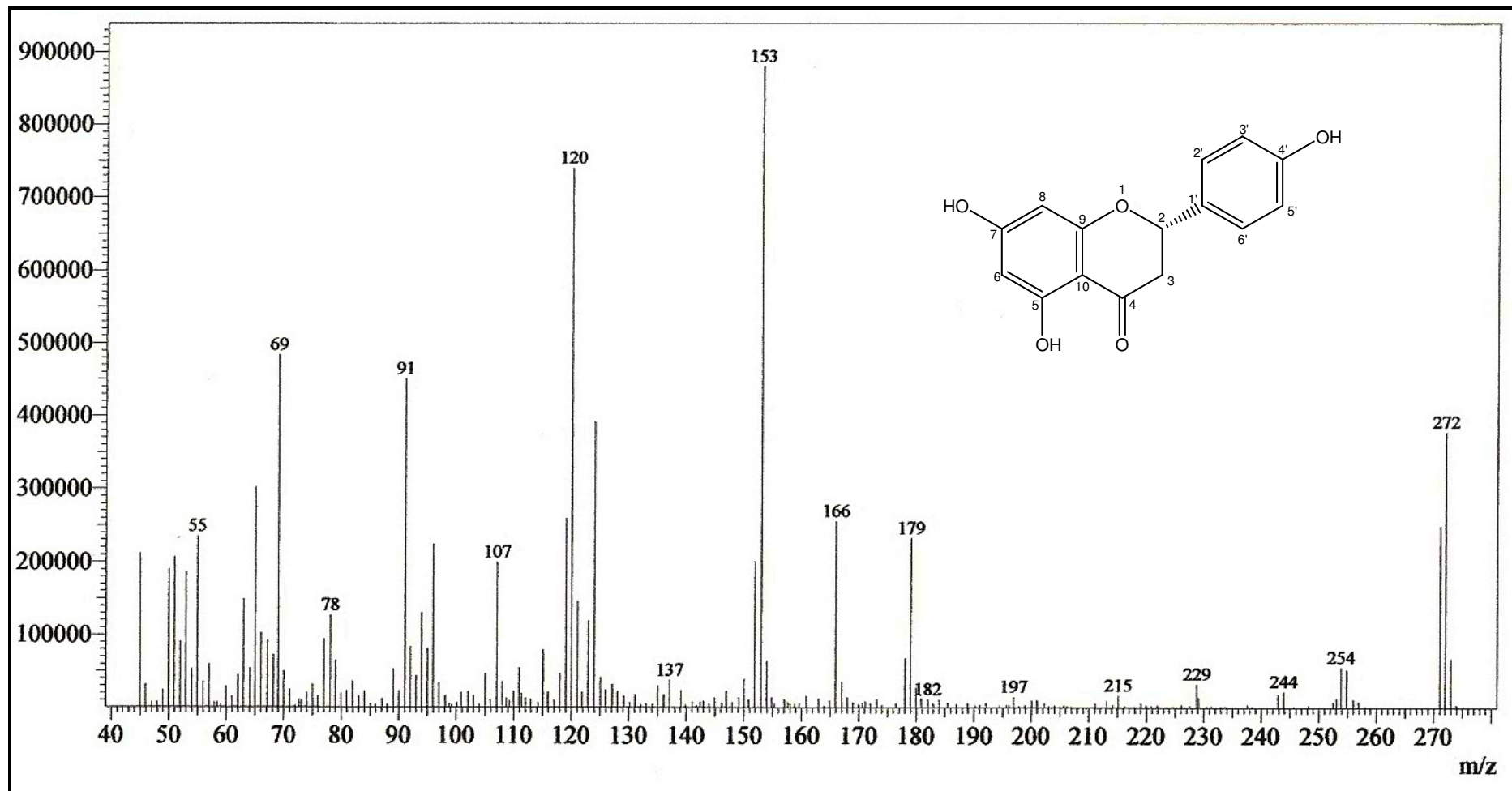


Figura 21 – Espectro de massas (IE, 70eV) de LSF-2

#### 4.1.4 – Determinação Estrutural LSF-3

Do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (EEFA) do extrato etanólico das folhas (EEFLS) de *L. sidoides* foi possível isolar 22,0 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em metanol, que foi denominado LSF-3.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 22, pág. 43) apresentou banda de absorção em  $3368\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação O–H; uma banda em  $1639\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila conjugada; absorções em  $1606$  e  $1459\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático, além de absorções de deformação axial de ligação C–O em  $1086$ ,  $1159$  e  $1252\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] (Fig. 24, pág. 45) exibiu uma série de sinais característicos de um sistema flavonoídico, muitos dos quais apareceram em duplicata, levando a crer que LSF-3 tratava-se de uma mistura de compostos. Entre os sinais de carbonos foram observados o de uma metoxila ( $\delta_{\text{C}} 61,0$ ), um carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado ( $\delta_{\text{C}} 80,5$ ), um carbono  $\text{sp}^3$  não oxigenado ( $\delta_{\text{C}} 44,1$ ) e treze carbonos  $\text{sp}^2$  oxigenados, incluindo duas carbonilas ( $\delta_{\text{C}} 197,8$  e  $184,2$ ). Análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 25, pág. 46), permitiu construir as Tabelas 7 e 8, conforme descritas a seguir.

**Tabela 7** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  de LSF-3A

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>Fórmula molecular</b>
106,00 (C=C)	80,58 (C–O)	44,19	
131,90 (C=C)	96,30 (C=C)		
146,61 (C–OH)	97,17 (C=C)		
146,99 (C–OH)	114,84 (C=C)		
165,53 (C–O)	116,39 (C=C)		

166,36 (C–OH)	119,39 (C=C)		
168,43 (C–OH)			
197,85 (C=O)			
<b><math>C_8H_4O_5</math></b>	<b><math>C_6H_6O</math></b>	<b><math>CH_2</math></b>	<b><math>C_{15}H_{12}O_6</math></b>

**Tabela 8** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}C$ -CPD e DEPT 135° de LSF-3B

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>Fórmula molecular</b>
106,00 (C=C)	95,42 (C=C)	61,08 (C–O)	
123,32 (C=C)	103,46 (C=C)		
132,00 (C–O)	117,09 (C=C)		
154,00 (C–OH)	117,09 (C=C)		
154,66 (C–O)	129,50 (C=C)		
158,74 (C–OH)	129,50 (C=C)		
162,77 (C–OH)			
164,93 (C–O)			
184,29 (C=O)			
<b><math>C_9H_3O_5</math></b>	<b><math>C_6H_6</math></b>	<b><math>CH_3O</math></b>	<b><math>C_{16}H_{12}O_6</math></b>

O espectro de RMN  $^1H$  [500 MHz,  $CD_3OD$ ] (Fig. 23, pág. 44) mostrou sinais em  $\delta_H$  5,85-7,74 referentes a hidrogênios aromáticos. Apresentou sinais na região de hidrogênios alifáticos em  $\delta_H$  5,23 (dd,  $J=12,7$  e  $3,0$  Hz, H-2),  $\delta_H$  3,03 (dd,  $J=17,1$  e  $12,7$  Hz, H-3ax) e  $\delta_H$  2,66 (dd,  $J=17,1$  e  $3,0$  Hz, H-3eq), característicos de uma flavanona. Apresentou também um singleto em  $\delta_H$  6,47 (H-3), característico de uma flavona, devido a presença do hidrogênio olefínico em C-3, e um singleto em  $\delta_H$  3,86 (MeO-6), com integração para três hidrogênios, referente ao grupamento metoxílico.

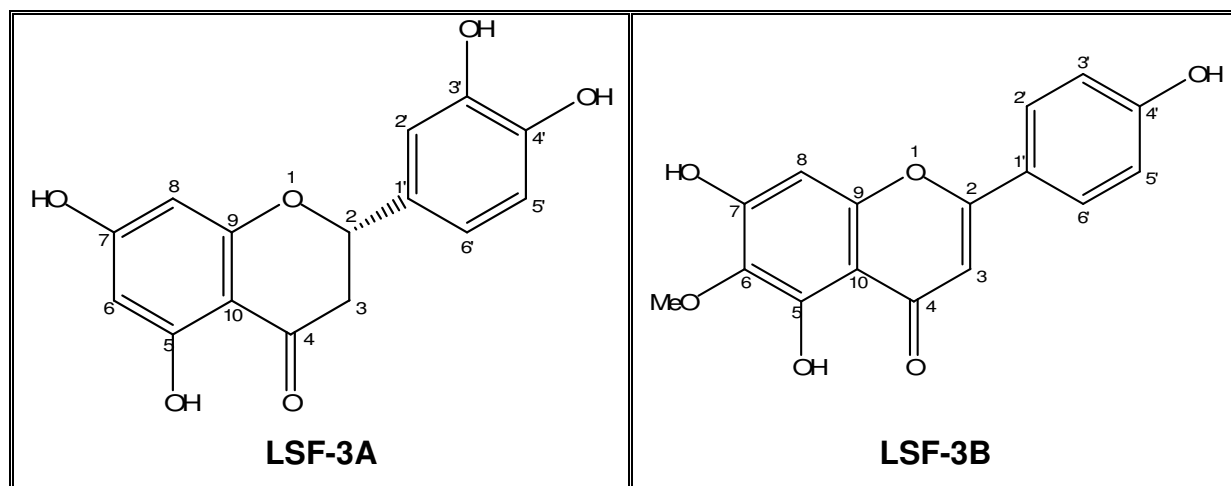
O espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1H - ^1H$  COSY (Fig. 26, pág. 47) de LSF-3, assim como o de LSF-2, mostrou acoplamento geminal entre os átomos de hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2,66 (dd,  $J=17,1$  e  $3,0$  Hz, H-

3eq) com  $\delta_H$  3,03 (dd,  $J=17,1$  e  $12,7$  Hz, H-3ax), acoplamento axial-axial em  $\delta_H$  5,23 (dd,  $J=12,7$  e  $3,0$  Hz, H-2) com 3,03 (dd,  $J=17,1$  e  $12,7$  Hz, H-3ax) e acoplamento axial-equatorial em  $\delta_H$  5,23 (dd,  $J=12,7$  e  $3,0$  Hz, H-2) com  $\delta_H$  2,66 (dd,  $J=17,1$  e  $3,0$  Hz, H-3eq). Mostrou também acoplamento *orto* entre os sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  6,87 (d,  $J=8,6$  Hz, H-3' e H-5') com  $\delta_H$  7,74 (d,  $J=8,6$  Hz, H-2' e H-6').

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Figs. 27 e 28, págs. 47 e 48) foi fundamental na correlação dos sinais de hidrogênios com seus carbonos correspondentes na mistura (Tabela 9). Neste experimento, foram observadas as correlações dos sinais de hidrogênios em  $\delta_H$  5,23; 5,85; 5,87; 6,90; 7,74; 6,87 e 3,86 com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  80,5; 97,1; 96,3; 114,8; 129,5; 117,0 e 61,0, respectivamente. Os carbonos em  $\delta_C$  116,3 e 119,3 estão correlacionados com os hidrogênios em  $\delta_H$  6,78, e  $\delta_C$  103,4 e 95,4 com os hidrogênios  $\delta_H$  6,47. Já os hidrogênios em  $\delta_H$  3,03 e 2,66 estão correlacionados com o carbono em  $\delta_C$  44,1.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Figs. 29 e 30, págs. 48 e 49) possibilitou correlacionar os sinais de hidrogênios e carbonos a duas ( $^2J_{CH}$ ) e a três ligações ( $^3J_{CH}$ ). Os dados obtidos encontram-se listados na Tabela 10.

Com base na discussão exposta e através da análise comparativa com dados descritos na literatura (Agrawal *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2010) (Tabela 9), chegou-se à conclusão que LSF-3 trata-se de uma mistura de flavonóides, eriodictiol (LSF-3A) e hispidulina (LSF-3B), nas proporções de 59,4% e 40,6%, respectivamente. As percentagens aproximadas dos dois componentes da mistura foram calculadas através da integração dos sinais de hidrogênios H-2 ( $\delta_H$  5,23) e H-2'/6' ( $\delta_H$  7,74). Os flavonóides eriodictiol e hispidulina estão sendo reportados pela primeira vez na espécie *L. sidoides*.



**Tabela 9** – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-3A e LSF-3B

C	HSQC LSF-3A		Lit.* (( $\text{CD}_3$ ) $_2\text{CO}$ )	HSQC LSF-3B		Lit.**( $\text{CDCl}_3$ + ( $\text{CD}_3$ ) $_2\text{SO}$ )
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
2	80,5	5,23 (dd, $J=12,7$ e $3,0$ )	78,3	164,9	-	163,7
3	44,1	3,03 (dd, $J=17,1$ e $12,7$ ) 2,66 (dd, $J=17,1$ e $3,0$ )	42,2	103,4	6,47 (s)	102,3
4	197,8	-	196,2	184,2	-	182,0
5	166,3	-	163,4	154,0	-	152,7
6	97,1	5,85 (d, $J=2,0$ )	95,7	132,0	-	131,3
7	168,4	-	166,6	158,7	-	157,2
8	96,3	5,87 (d, $J=2,0$ )	94,8	95,4	6,47 (s)	94,2
9	165,5	-	162,8	154,6	-	152,3
10	106,0	-	101,7	106,0	-	104,0
1'	131,9	-	129,4	123,3	-	121,2
2'	114,8	6,90 (s)	114,2	129,5	7,74 (d, $J=8,6$ )	128,4
3'	146,9	-	145,1	117,0	6,87 (d, $J=8,6$ )	115,9
4'	146,6	-	145,6	162,7	-	161,1
5'	116,3	6,78 (m)	115,3	117,0	6,87 (d, $J=8,6$ )	115,9
6'	119,3	6,78 (m)	117,8	129,5	7,74 (d, $J=8,6$ )	128,4
MeO-6	-	-	-	61,0	3,86 (s)	59,9

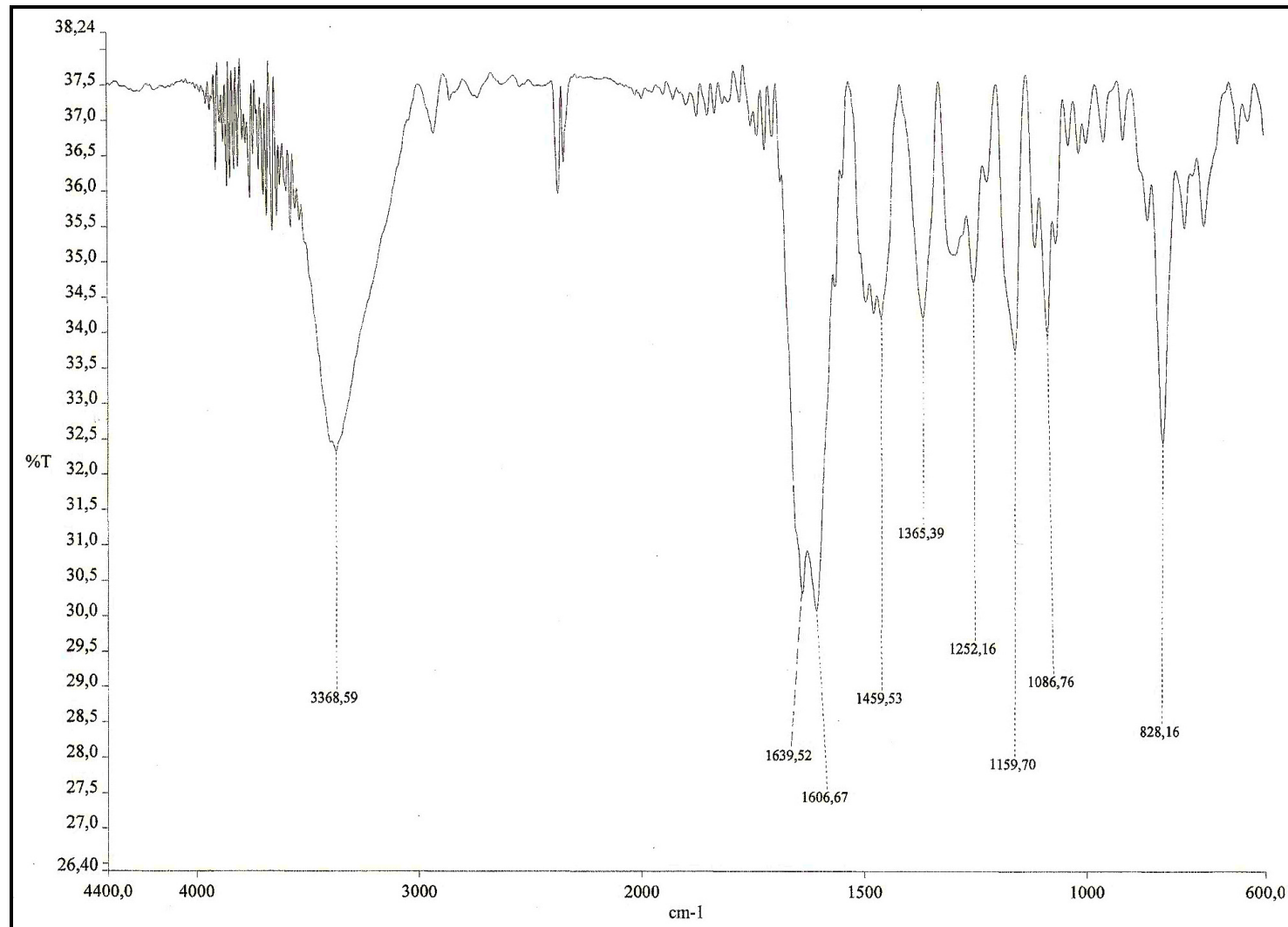
Deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{C}}$  e  $\delta_{\text{H}}$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz

\*Agrawal *et al.*, 1989

\*\*Oliveira *et al.*, 2001

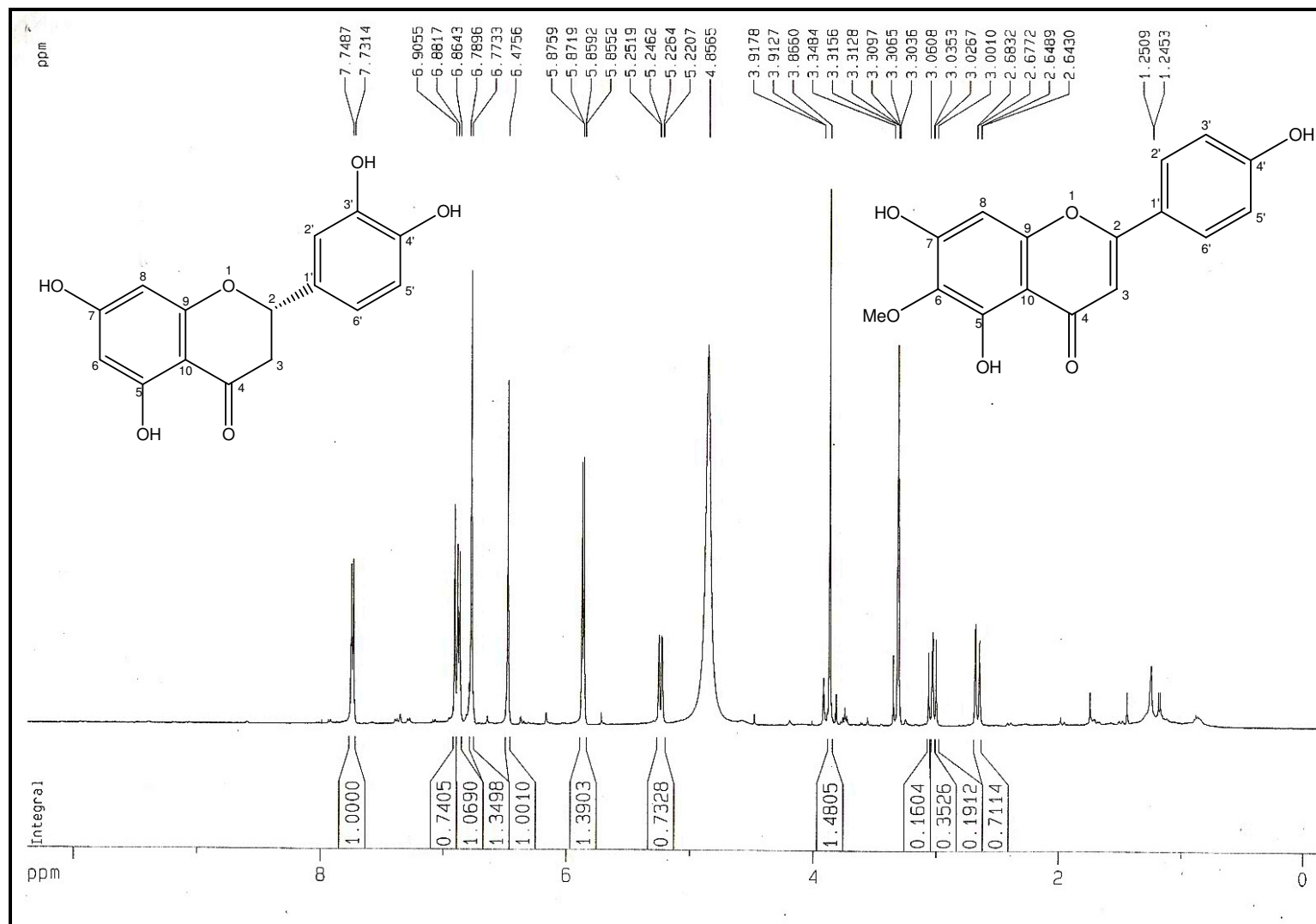
Tabela 10 – Correlações a longa distância de LSF-3A e LSF-3B

C	HSQC LSF-3A		HMBC LSF-3A		HSQC LSF-3B		HMBC LSF-3B	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	80,5	5,23 (dd, $J=12,7$ e $3,0$ )	H-3ax	H-2', H-6'	164,9	-	H-3	H-2', H-6'
3	44,1	3,03 (dd, $J=17,1$ e $12,7$ ) 2,66 (dd, $J=17,1$ e $3,0$ )	-	-	103,4	6,47 (s)	-	-
4	197,8	-	H-3ax, H-3eq	H-2	184,2	-	H-3	-
5	166,3	-	H-6	-	154,0	-	-	-
6	97,1	5,85 (d, $J=2,0$ )	-	H-8	132,0	-	-	H-8, MeO-6
7	168,4	-	H-6, H-8	-	158,7	-	H-8	-
8	96,3	5,87 (d, $J=2,0$ )	-	H-6	95,4	6,47 (s)	-	-
9	165,5	-	H-8	-	154,6	-	H-8	-
10	106,0	-	-	H-6, H-8	106,0	-	-	H-8
1'	131,9	-	H-6'	H-5'	123,3	-	-	H-3, H-3', H-5'
2'	114,8	6,90 (s)	-	H-2, H-6'	129,5	7,74 (d, $J=8,6$ )	-	-
3'	146,9	-	H-2'	H-5'	117,0	6,87 (d, $J=8,6$ )	-	-
4'	146,6	-	H-5'	H-2', H-6'	162,7	-	H-3', H-5'	H-2', H-6'
5'	116,3	6,78 (m)	-	H-2, H-2'	117,0	6,87 (d, $J=8,6$ )	-	-
6'	119,3	6,78 (m)	-	-	129,5	7,74 (d, $J=8,6$ )	-	-
MeO-6	-	-	-	-	61,0	3,86 (s)	-	-



**Figura 22** – Espectro na região do infravermelho de LSF-3



Figura 23 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3

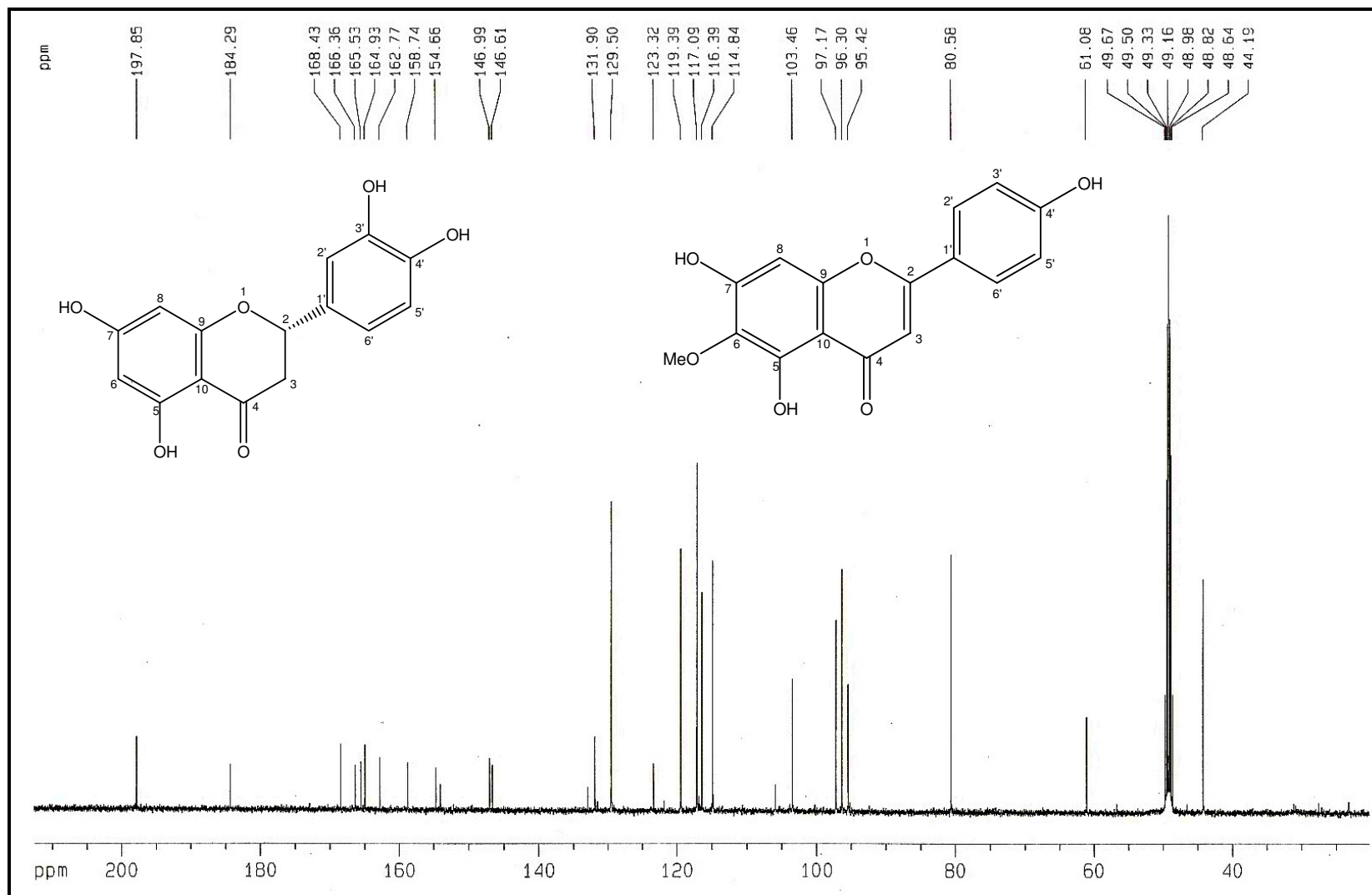


Figura 24 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3

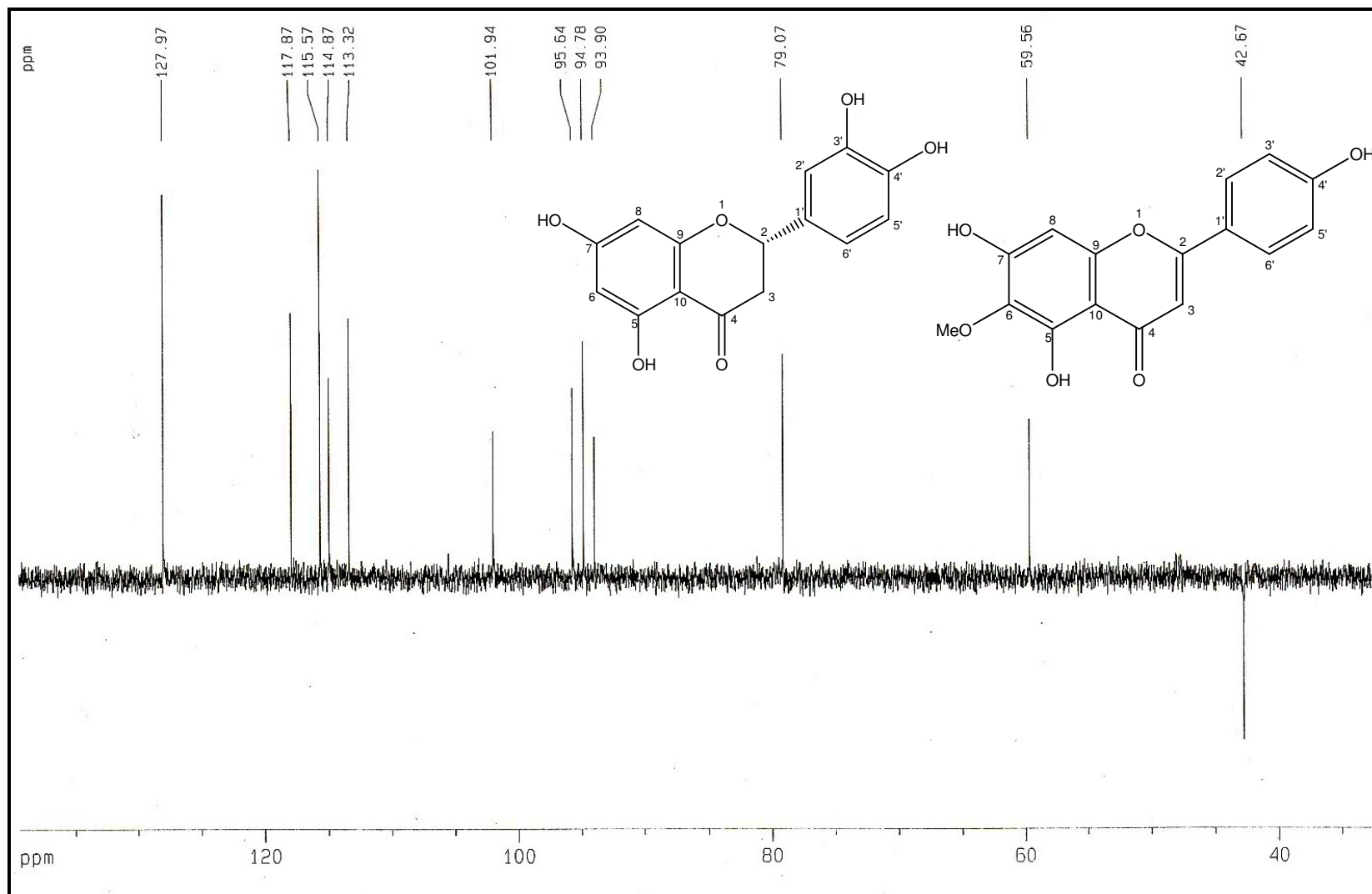


Figura 25 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3

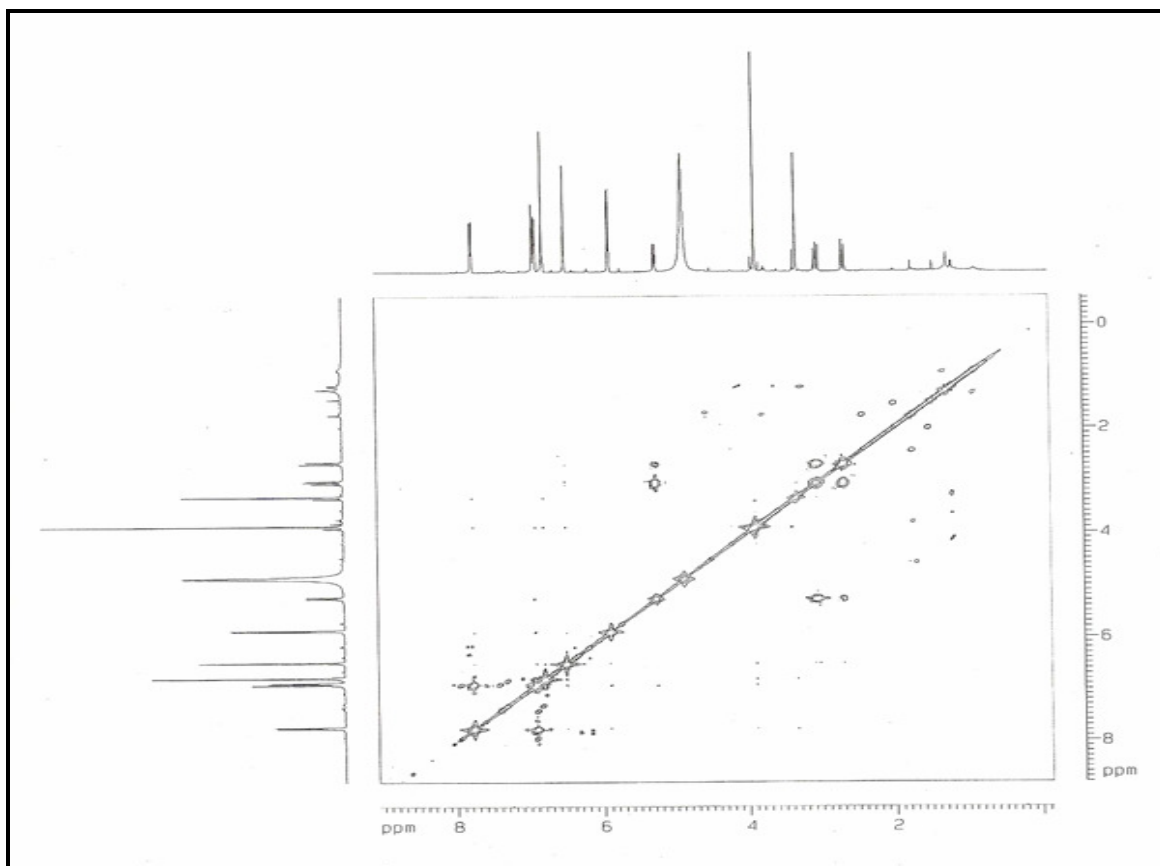


Figura 26 – Espectro de RMN  $^1\text{H}, ^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3

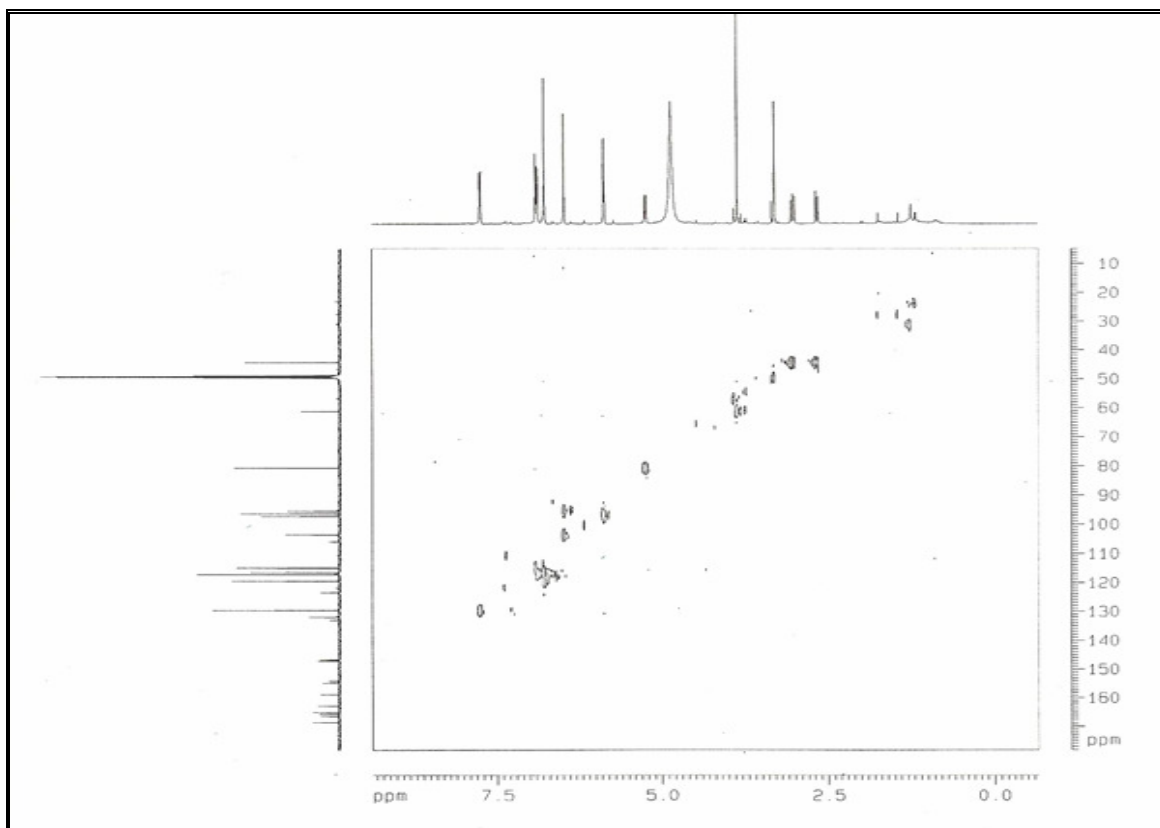
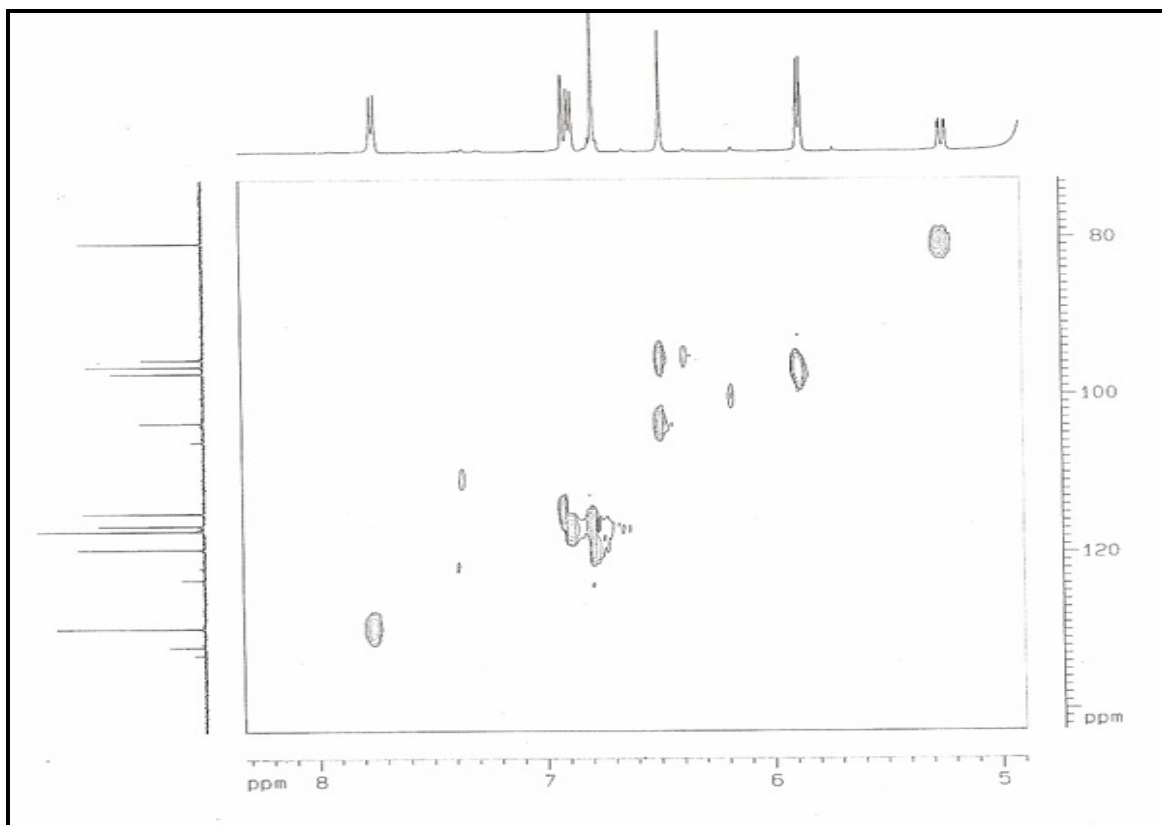
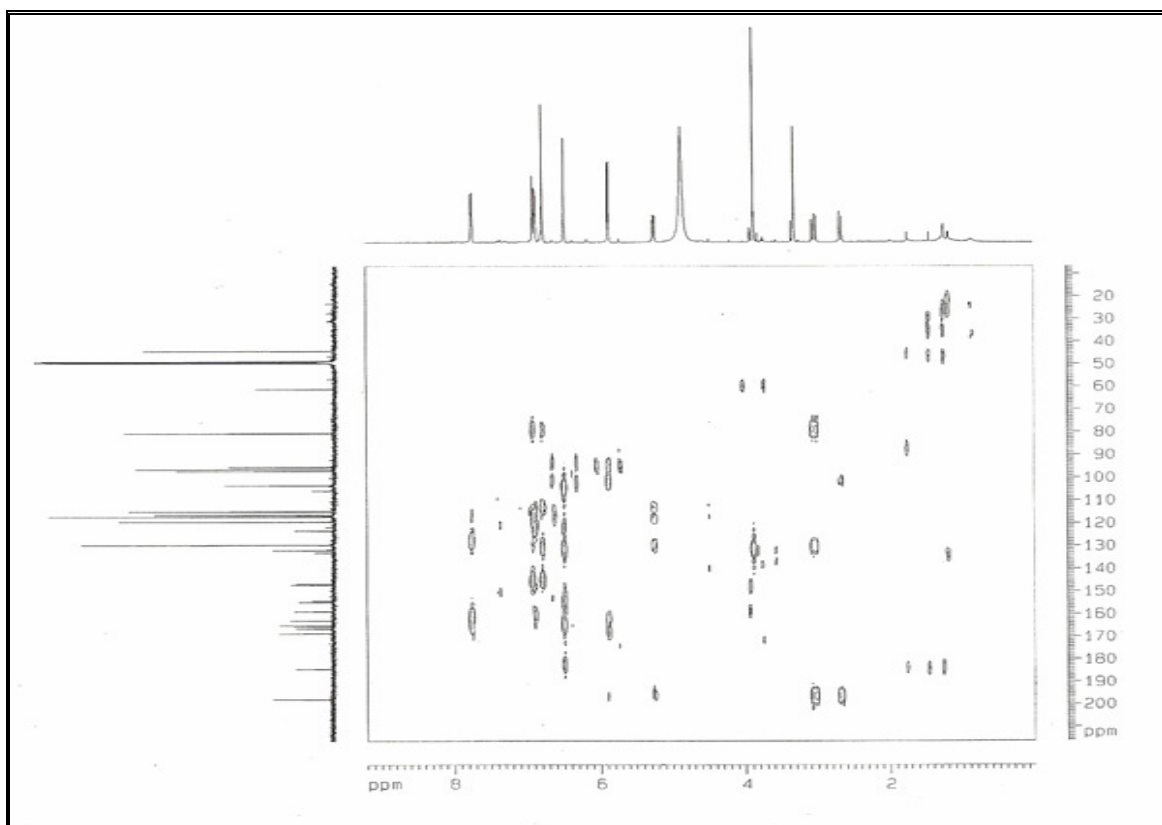


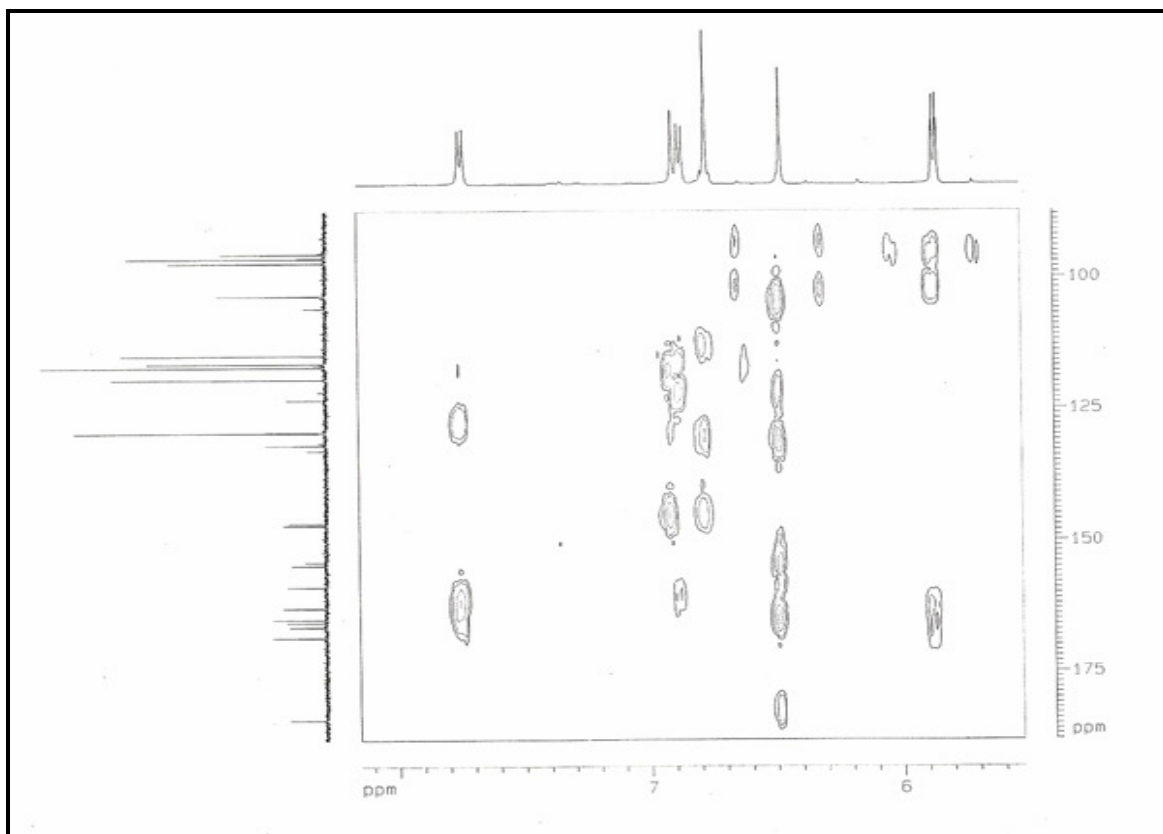
Figura 27 – Espectro de RMN  $^1\text{H}, ^{13}\text{C} - \text{HSQC}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3



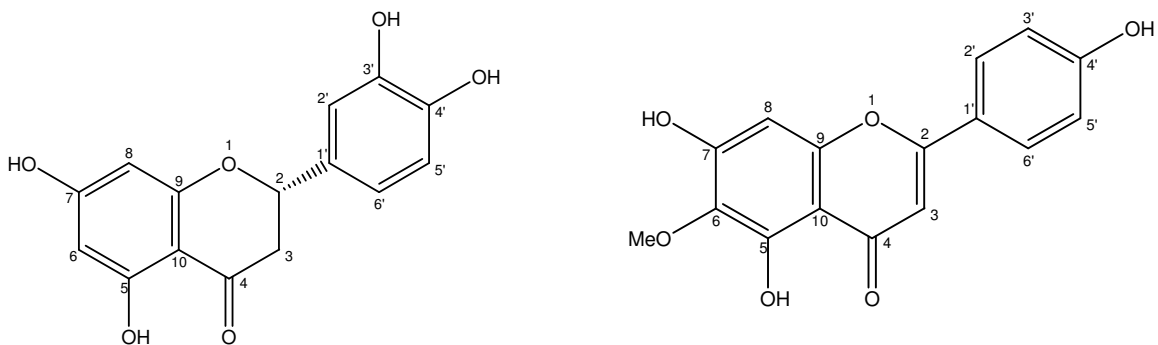
**Figura 28** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3



**Figura 29** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3



**Figura 30** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-3



#### 4.1.5 – Determinação Estrutural LSF-4

Do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (EEFA) do extrato etanólico das folhas (EEFLS) de *L. sidoides* foi possível isolar 157,4 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em metanol, que foi denominado LSF-4.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 31, pág. 60) exibiu uma banda de absorção em  $3411\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação O–H; uma absorção em  $1631\text{ cm}^{-1}$ , relacionada à deformação axial de ligação C=O de carbonila conjugada e uma banda em  $2926\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de ligação C–H. Apresentou também absorções referentes à deformação axial de ligação C=C de anel aromático em  $1517$  e  $1453\text{ cm}^{-1}$ , além de absorções em  $1074$ ,  $1200$  e  $1261\text{ cm}^{-1}$ , características de deformação axial de ligação C–O.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] (Fig. 35, pág. 64) apresentou sinais característicos de um sistema flavonoídico, muitos duplicados, sugerindo que LSF-4 tratava-se de uma mistura de compostos de estruturas semelhantes. Entre os sinais foram observados sete de carbonos  $\text{sp}^2$  oxigenados, dos quais uma carbonila ( $\delta_{\text{C}}$  206,8), além de sinais característicos de uma unidade de monossacarídeo com absorções em  $\delta_{\text{C}}$  102,1; 74,8; 78,3; 71,2; 78,4 e 62,4, típico de uma unidade  $\beta$ -D-glicopiranosila. Análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 36, pág. 65), levando em consideração a intensidade dos sinais, permitiu construir as Tabelas 11 e 12, conforme descritas a seguir.

**Tabela 11** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e DEPT  $135^\circ$  de LSF-4A

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>Fórmula molecular</b>
106,96 (C=C)	71,23 (C–OH)	31,18	
134,88 (C=C)	74,81 (C–OH)	46,97	

144,36 (C–OH)	78,33 (C–OH)	62,45 (C–OH)	
146,09 (C–OH)	78,48 (C–O)		
162,38 (C–O)	95,62 (C=C)		
164,65 (C–OH)	97,10 (C=C)		
167,60 (C–OH)	102,16 (C–O)		
206,80 (C=O)	116,49 (C=C)		
	116,81 (C=C)		
	120,92 (C=C)		
<b><i>C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub></i></b>	<b><i>C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub></i></b>	<b><i>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O</i></b>	<b><i>C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub></i></b>

**Tabela 12** – Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN <sup>13</sup>C-CPD e DEPT 135° de LSF-4B

<b><i>C</i></b>	<b><i>CH</i></b>	<b><i>CH<sub>2</sub></i></b>	<b><i>Fórmula molecular</i></b>
106,96 (C=C)	71,23 (C–OH)	30,94	
134,04 (C=C)	74,81 (C–OH)	46,97	
156,00 (C–OH)	78,33 (C–OH)	62,45 (C–OH)	
162,38 (C–O)	78,48 (C–O)		
164,65 (C–OH)	95,62 (C=C)		
167,60 (C–OH)	97,10 (C=C)		
206,80 (C=O)	102,16 (C–O)		
	116,26 (C=C)		
	116,26 (C=C)		
	130,51 (C=C)		
	130,51 (C=C)		
<b><i>C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>O<sub>4</sub></i></b>	<b><i>C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub></i></b>	<b><i>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O</i></b>	<b><i>C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub></i></b>

O espectro de RMN <sup>1</sup>H [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD] (Figs. 32-34, págs. 61-63) revelou sinais atribuídos a hidrogênios alifáticos em  $\delta_H$  2,82 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H-7),  $\delta_H$  2,87 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H-7) e 3,46 (m, 2H-8), compatíveis com dois grupos CH<sub>2</sub> ligados entre si e sendo um deles alfa à carbonila, além de sinais na região de anel aromático, compreendidos entre  $\delta_H$  5,80-6,90, sugerindo tratar-se do esqueleto básico Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-Ph, característico de di-hidrochalconas. Os

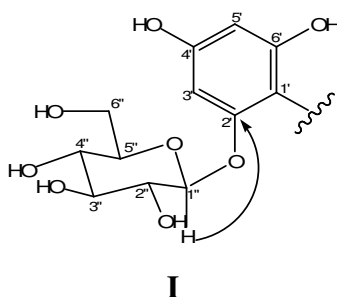


sinais em  $\delta_H$  6,03 (d,  $J=2,1$  Hz, H-3') e 5,80 (d,  $J=2,1$  Hz, H-5') indicam a presença de dois hidrogênios *meta* posicionados em um grupo fenila tetrasubstituído. E a presença de sinais na região de hidrogênios característicos de açúcares em  $\delta_H$  3,38-3,50, em  $\delta_H$  4,88 (d,  $J=7,1$  Hz, H-1'') atribuído ao hidrogênio anomérico e, em  $\delta_H$  3,91 (d,  $J=12,3$  Hz, H-6'') e 3,73 (dd,  $J=12,3$  e 5,2, H-6'') atribuído ao grupo metileno, confirmam a presença de uma unidade de glicose na molécula.

A análise do espectro de RMN  $^1H$  (Figs. 32-34, págs. 61-63) da mistura permitiu reconhecer os sinais correspondentes ao componente LSF-4A em  $\delta_H$  6,54 (d,  $J=1,7$  Hz, H-2), 6,51 (d,  $J=8,0$  Hz, H-5) e 6,40 (dd,  $J=8,0$  e 1,7 Hz, H-6), atribuído a um grupo fenila tri-substituído, com dois destes hidrogênios acoplados em *orto*. Já em LSF-4B os prótons do grupo arila apareceram em  $\delta_H$  6,90 (d,  $J=8,4$  Hz, H-2/H-6) e  $\delta_H$  6,63 (dl,  $J=8,4$  Hz, H-3/H-5), revelando um sistema aromático *para*-disubstituído na molécula.

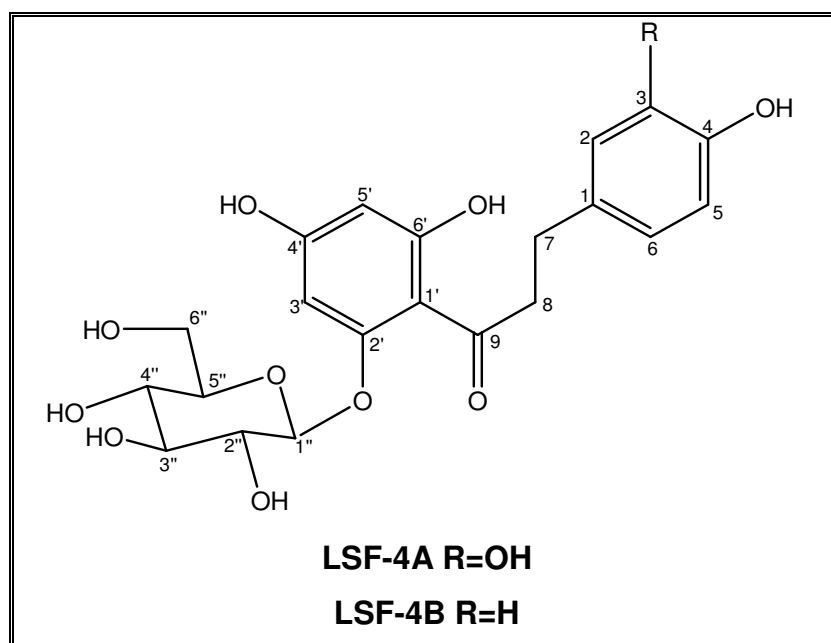
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Figs. 37 e 38, pág. 66) permitiu correlacionar os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 13). Neste experimento foram observadas correlações dos sinais de carbono em  $\delta_C$  116,4; 116,8; 120,9; 130,5 e 116,2 com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  6,54; 6,51; 6,40; 6,90 e 6,63, respectivamente, confirmando a idéia de uma mistura.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 39, pág. 67) permitiu correlacionar, a três ligações ( $^3J_{CH}$ ), o hidrogênio em  $\delta_H$  4,88 (H-1'') com o carbono em  $\delta_C$  162,3 (C-2'), definindo a localização da unidade glicosídica no anel A (C-2') (subestrutura I) (Tabela 14).



Estes dados, juntamente com os picos dos íons moleculares em  $m/z$  451,1270 ( $[M - H]^-$ ) e  $m/z$  435,1314 ( $[M - H]^-$ ), revelados pelo espectro de massas de alta resolução (modo negativo) (Fig. 40, pág. 68), permitiram confirmar a fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_{11}$  e  $C_{21}H_{24}O_{10}$  para LSF-4A e LSF-4B, respectivamente.

Através das informações discutidas e comparação com dados da literatura (Lu *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2010) (Tabela 13), pôde-se concluir que LSF-4 trata-se de uma mistura de di-hidrochalconas, 3-hidroxisfloridizina (LSF-4A) e floridizina (LSF-4B), nas proporções de 67% e 33%, respectivamente. As percentagens aproximadas dos dois componentes da mistura foram calculadas através da integração dos sinais de hidrogênios H-6 ( $\delta_H$  6,40) e H-2/6 ( $\delta_H$  6,90). A di-hidrochalcona 3-hidroxisfloridizina está sendo reportada pela primeira vez no gênero *Lippia*, enquanto que floridizina está sendo reportada pela primeira vez na espécie *L. sidoides*.



Para comprovação final, a mistura LSF-4A/LSF-4B foi submetida à reação de acetilação usando anidrido acético/piridina, obtendo-se os derivados acetilados LSF-4A-Ac/LSF-4B-Ac, respectivamente, com 85,9% de rendimento.

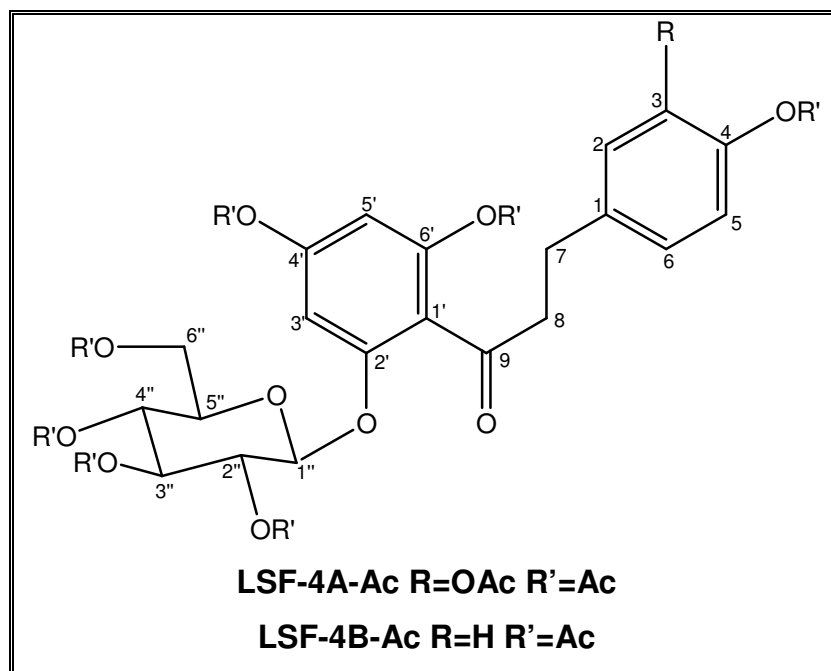
O espectro de absorção na região do infravermelho de LSF-4A-Ac/LSF-4B-Ac (Fig. 41, pág. 69) revelou o desaparecimento da banda de absorção em  $3411\text{ cm}^{-1}$ , referente aos grupos hidroxilas existentes em LSF-4A/LSF-4B. Mostrou ainda o surgimento da carbonila através da absorção intensa em  $1750\text{ cm}^{-1}$ , confirmando, desta forma, a acetilação dos grupos hidroxilas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 43, pág. 71) registrou a presença de absorções em  $\delta_{\text{C}}$  168,0-171,2, referente a carbonos  $\text{sp}^2$  de carbonilas. Análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 44, pág. 72) permitiu reconhecer a presença de absorções correspondente a metilas em  $\delta_{\text{C}}$  20,5-21,1.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 42, pág. 70) de LSF-4A-Ac/LSF-4B-Ac, quando comparado com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] (Fig. 32, pág. 61) de LSF-4A/LSF-4B, revelou absorções adicionais em  $\delta_{\text{H}}$  1,96-2,25, referente as metilas dos grupamentos acetila.

O espectro de massas de alta resolução (modo positivo) (Fig. 45, pág. 73) dos derivados acetilados revelou os picos dos íons moleculares em  $m/z$  811,1991 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , calc.: 811,2061) para LSF-4A-Ac e  $m/z$  753,1958 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , calc.: 753,2007) para LSF-4B-Ac, comprovando a estrutura proposta para LSF-4A/LSF-4B.

Dados adicionais destes derivados acetilados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 15) corroboraram para a completa caracterização das estruturas como sendo: 2'-O- $\beta$ -D-2'',3'',4'',6''-tetra-O-acetilglicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-O-acetildi-hidrochalcona (LSF-4A-Ac) e 2'-O- $\beta$ -D-2'',3'',4'',6''-tetra-O-acetilglicopiranosil-4,4',6'-tri-O-acetildi-hidrochalcona (LSF-4B-Ac) (Almeida *et al.*, 2010).



**Tabela 13** – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de LSF-4A e LSF-4B

C	HSQC LSF-4A		Lit.*	HSQC LSF-4B		Lit.*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	(( $\text{CD}_3$ ) $_2\text{SO}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	(( $\text{CD}_3$ ) $_2\text{SO}$ )
1	134,8	-	132,5	134,0	-	131,5
2	116,4	6,54 (d, $J=1,7$ )	115,5	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )	129,1
3	146,0	-	143,2	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )	114,9
4	144,3	-	145,0	156,0	-	155,2
5	116,8	6,51 (d, $J=8,0$ )	116,0	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )	114,9
6	120,9	6,40 (dd, $J=8,0$ e $1,7$ )	119,0	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )	129,1
7	31,1	2,82 (t, $J=7,5$ )	29,3	30,9	2,87 (t, $J=7,5$ )	28,9
8	46,9	3,46 (m)	45,0	46,9	3,46 (m)	44,9
9	206,8	-	204,9	206,8	-	204,6
1'	106,9	-	105,3	106,9	-	105,1
2'	162,3	-	160,9	162,3	-	160,8
3'	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )	95,4	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )	94,3
4'	164,6	-	165,5	164,6	-	165,3
5'	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )	96,9	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )	96,8
6'	167,6	-	164,5	167,6	-	164,4
1''	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )	100,9	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )	100,7
2''	74,8	3,38-3,50 (m)	73,3	74,8	3,38-3,50 (m)	73,1
3''	78,3	3,38-3,50 (m)	76,8	78,3	3,38-3,50 (m)	76,6
4''	71,2	3,38-3,50 (m)	69,6	71,2	3,38-3,50 (m)	69,4
5''	78,4	3,38-3,50 (m)	77,4	78,4	3,38-3,50 (m)	77,2
6''	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ )	60,7	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ )	60,5
		3,73 (dd, $J=12,3$ e $5,2$ )			3,73 (dd, $J=12,3$ e $5,2$ )	

Deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{C}}$  e  $\delta_{\text{H}}$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz

\*Lu *et al.*, 1997

Tabela 14 – Correlações a longa distância de LSF-4A e LSF-4B

C	HSQC LSF-4A		HSQC LSF-4B		HMBC LSF-4A/LSF-4B	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	134,8	-	134,0	-	2H-7	H-5, 2H-8
2	116,4	6,54 (d, $J=1,7$ )	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )	-	H-6, 2H-7
3	146,0	-	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )	H-2	H-5
4	144,3	-	156,0	-	H-5	H-6
5	116,8	6,51 (d, $J=8,0$ )	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )	-	-
6	120,9	6,40 (dd, $J=8,0$ e $1,7$ )	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )	-	H-2, 2H-7
7	31,1	2,82 (t, $J=7,5$ )	30,9	2,87 (t, $J=7,5$ )	2H-8	-
8	46,9	3,46 (m)	46,9	3,46 (m)	2H-7	-
9	206,8	-	206,8	-	2H-8	2H-7
1'	106,9	-	106,9	-	-	H-3', H-5'
2'	162,3	-	162,3	-	-	H-1''
3'	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )	-	H-5'
4'	164,6	-	164,6	-	H-3', H-5'	-
5'	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )	-	H-3'
6'	167,6	-	167,6	-	H-5'	-
1''	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )	H-2''	-
2''	74,8	3,38-3,50 (m)	74,8	3,38-3,50 (m)	H-3''	-
3''	78,3	3,38-3,50 (m)	78,3	3,38-3,50 (m)	H-2'', H-4''	-
4''	71,2	3,38-3,50 (m)	71,2	3,38-3,50 (m)	H-3'', H-5''	-
5''	78,4	3,38-3,50 (m)	78,4	3,38-3,50 (m)	2H-6''	-
6''	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ )	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ )	H-5''	-
		3,73 (dd, $J=12,3$ e $5,2$ )		3,73 (dd, $J=12,3$ e $5,2$ )		

**Tabela 15** – Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de LSF-4A-Ac e LSF-4B-Ac

<b>C</b>	<b>HSQC LSF-4A-Ac</b>		<b>HSQC LSF-4B-Ac</b>		<b>HSQC LSF-4A</b>		<b>HSQC LSF-4B</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	140,4	-	142,5	-	134,8	-	134,0	-
2	123,3	7,05 (dl, $J=2,0$ )	129,6	7,27 (d, $J=8,5$ )	116,4	6,54 (d, $J=1,7$ )	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )
3	142,0	-	121,6	6,96 (d, $J=8,5$ )	146,0	-	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )
4	140,0	-	149,1	-	144,3	-	156,0	-
5	123,6	7,07 (dl, $J=8,5$ )	121,6	6,96 (d, $J=8,5$ )	116,8	6,51 (d, $J=8,0$ )	116,2	6,63 (dl, $J=8,4$ )
6	126,8	7,11 (dd, $J=8,5$ e $2,0$ )	129,6	7,27 (d, $J=8,5$ )	120,9	6,40 (dd, $J=8,0$ e $1,7$ )	130,5	6,90 (d, $J=8,4$ )
7	28,8	2,90 (m)	28,9	2,90 (m)	31,1	2,82 (t, $J=7,5$ )	30,9	2,87 (t, $J=7,5$ )
8	45,6	3,13 (m)	45,9	3,13 (m)	46,9	3,46 (m)	46,9	3,46 (m)
9	200,2	-	200,4	-	206,8	-	206,8	-
1'	123,1	-	123,1	-	106,9	-	106,9	-
2'	154,4	-	154,4	-	162,3	-	162,3	-
3'	107,0	6,68 (d, $J=2,0$ )	107,0	6,68 (d, $J=2,0$ )	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )	95,6	6,03 (d, $J=2,1$ )
4'	152,1	-	152,1	-	164,6	-	164,6	-
5'	111,8	6,78 (d, $J=2,0$ )	111,8	6,78 (d, $J=2,0$ )	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )	97,1	5,80 (d, $J=2,1$ )
6'	148,0	-	148,0	-	167,6	-	167,6	-
1''	99,5	5,01 (d, $J=7,0$ )	99,5	5,01 (d, $J=7,0$ )	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )	102,1	4,88 (d, $J=7,1$ )
2''	70,6	5,12-5,27 (m)	71,0	5,12-5,27 (m)	74,8	3,38-3,50 (m)	74,8	3,38-3,50 (m)

3"	72,5	5,12-5,27 (m)	72,5	5,12-5,27 (m)	78,3	3,38-3,50 (m)	78,3	3,38-3,50 (m)
4"	68,3	5,12-5,27 (m)	68,3	5,12-5,27 (m)	71,2	3,38-3,50 (m)	71,2	3,38-3,50 (m)
5"	72,7	3,88 (m)	72,7	3,88 (m)	78,4	3,38-3,50 (m)	78,4	3,38-3,50 (m)
6"	62,0	4,23 (dd, $J=12,0$ e 5,5) 4,17 (dt, $J=12,0$ )	60,5	4,23 (dd, $J=12,0$ e 5,5) 4,17 (dt, $J=12,0$ )	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ ) 3,73 (dd, $J=12,3$ e 5,2)	62,4	3,91 (d, $J=12,3$ ) 3,73 (dd, $J=12,3$ e 5,2)
AcO	168,0-171,2	-	168,0-171,2	-	-	-	-	-
Ac	20,5-21,1	1,96-2,25	20,5-21,1	1,96-2,25	-	-	-	-

Deslocamentos químicos ( $\delta_C$  e  $\delta_H$ ) em ppm e constante de acoplamento ( $J$ ) em Hz



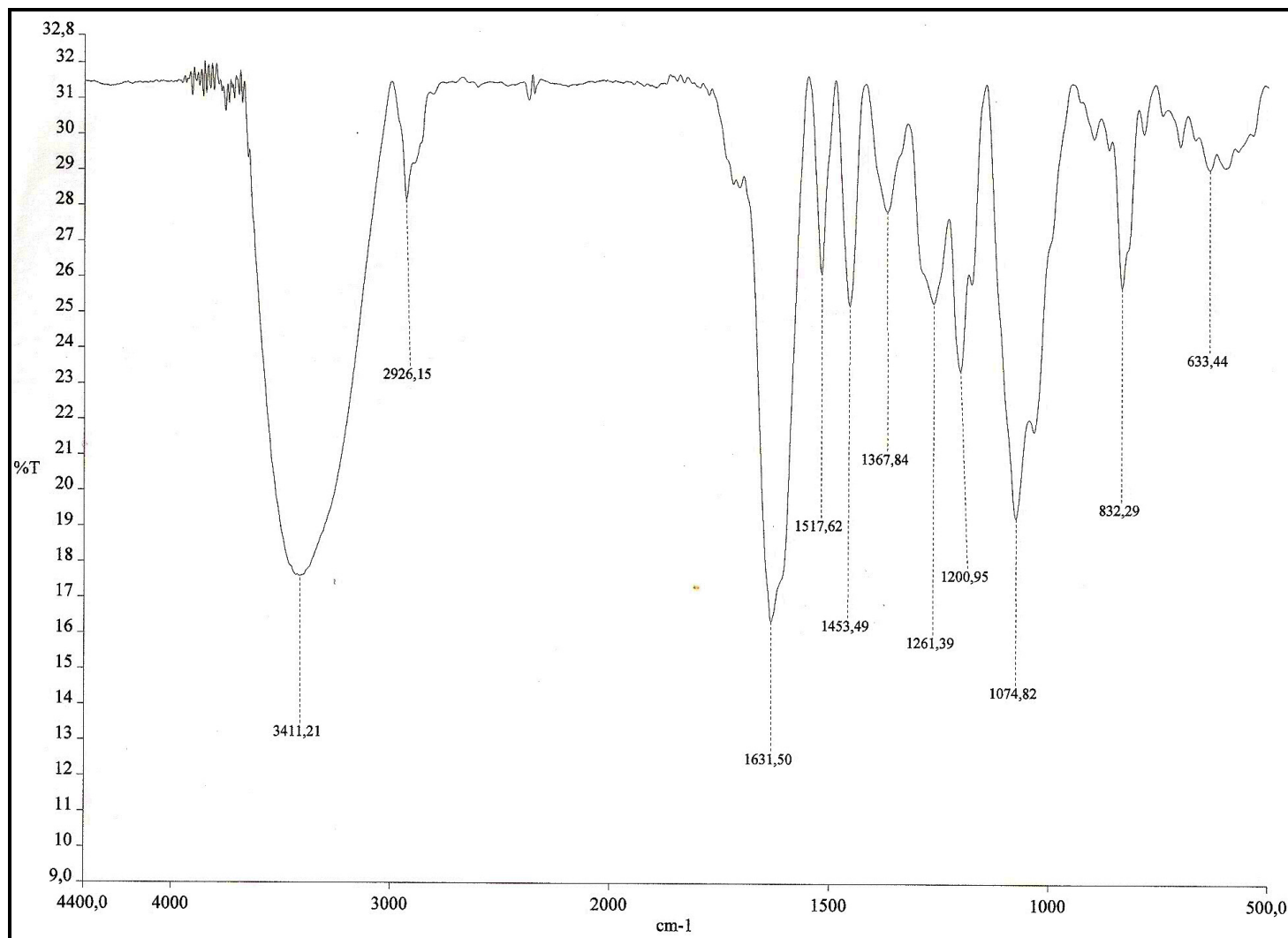


Figura 31 – Espectro na região do infravermelho de LSF-4

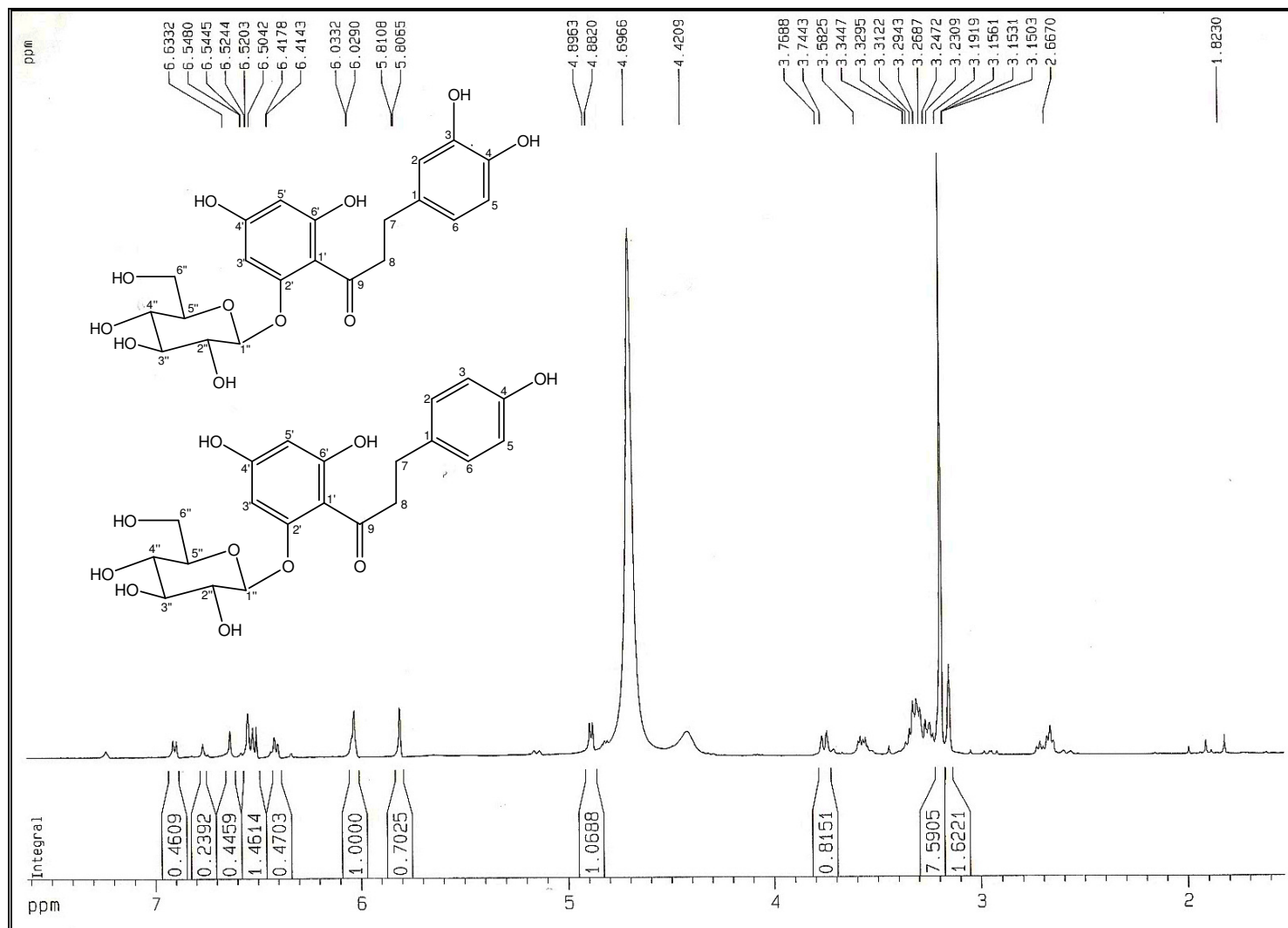


Figura 32 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4

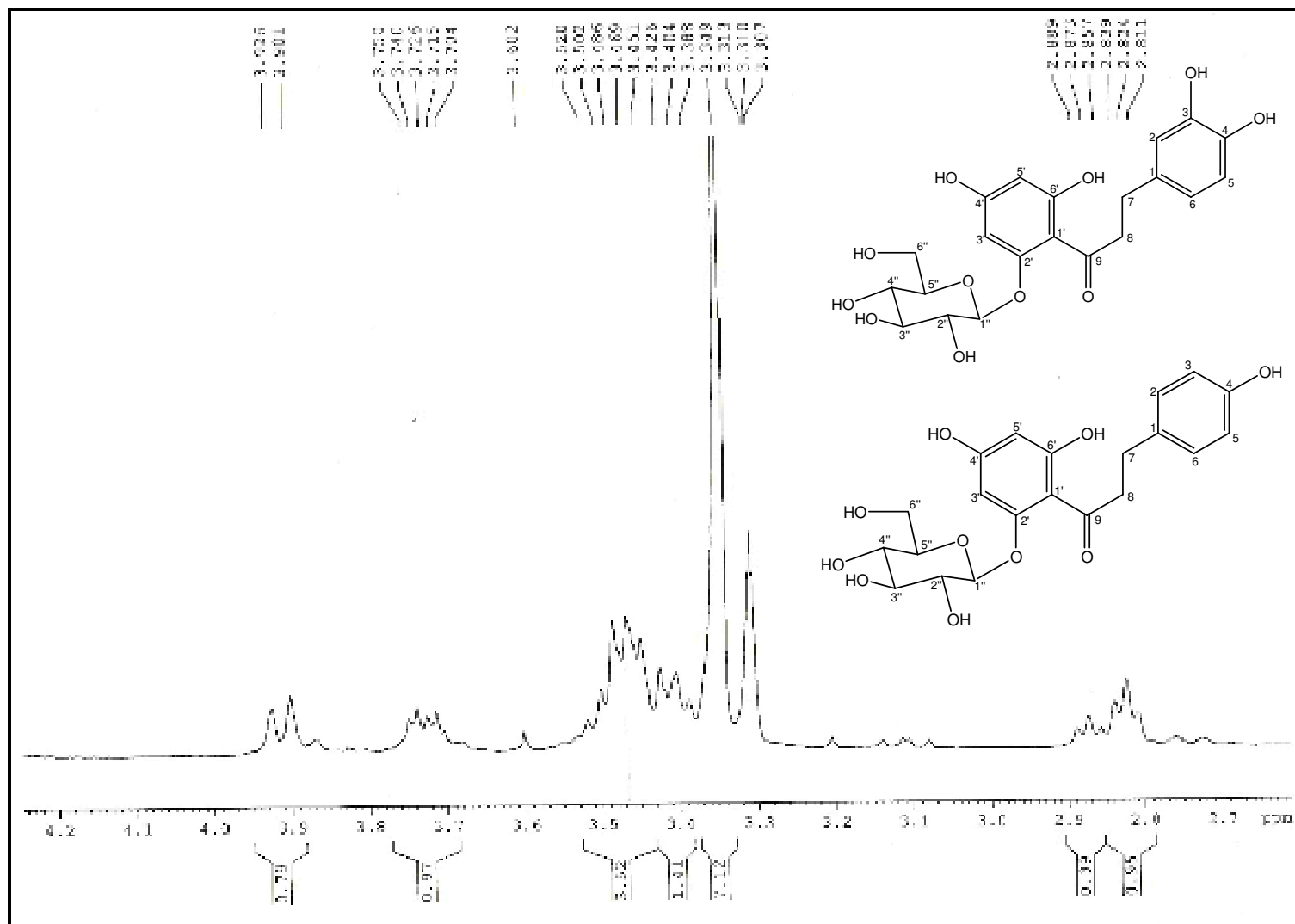


Figura 33 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4

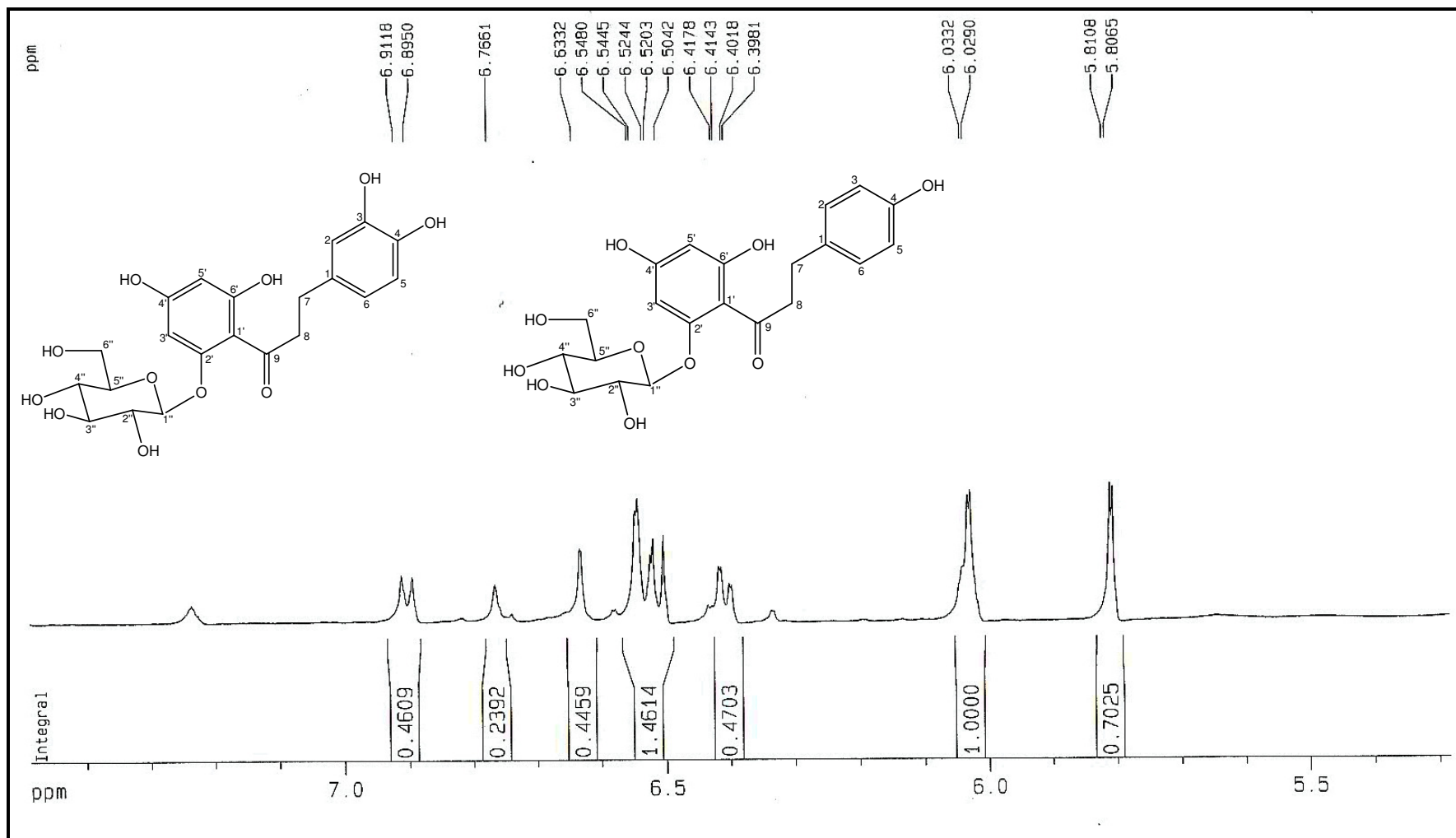


Figura 34 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4

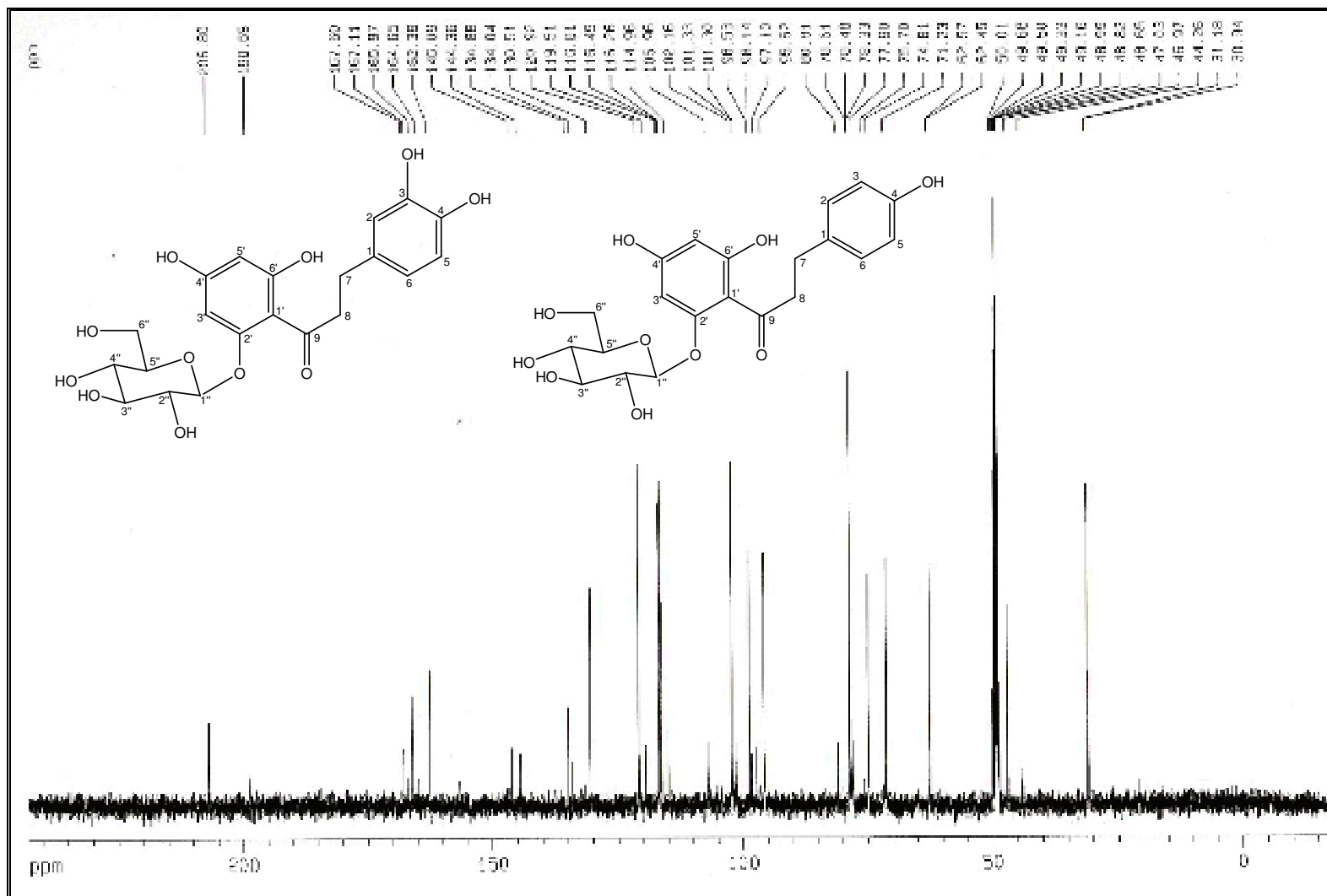


Figura 35 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4

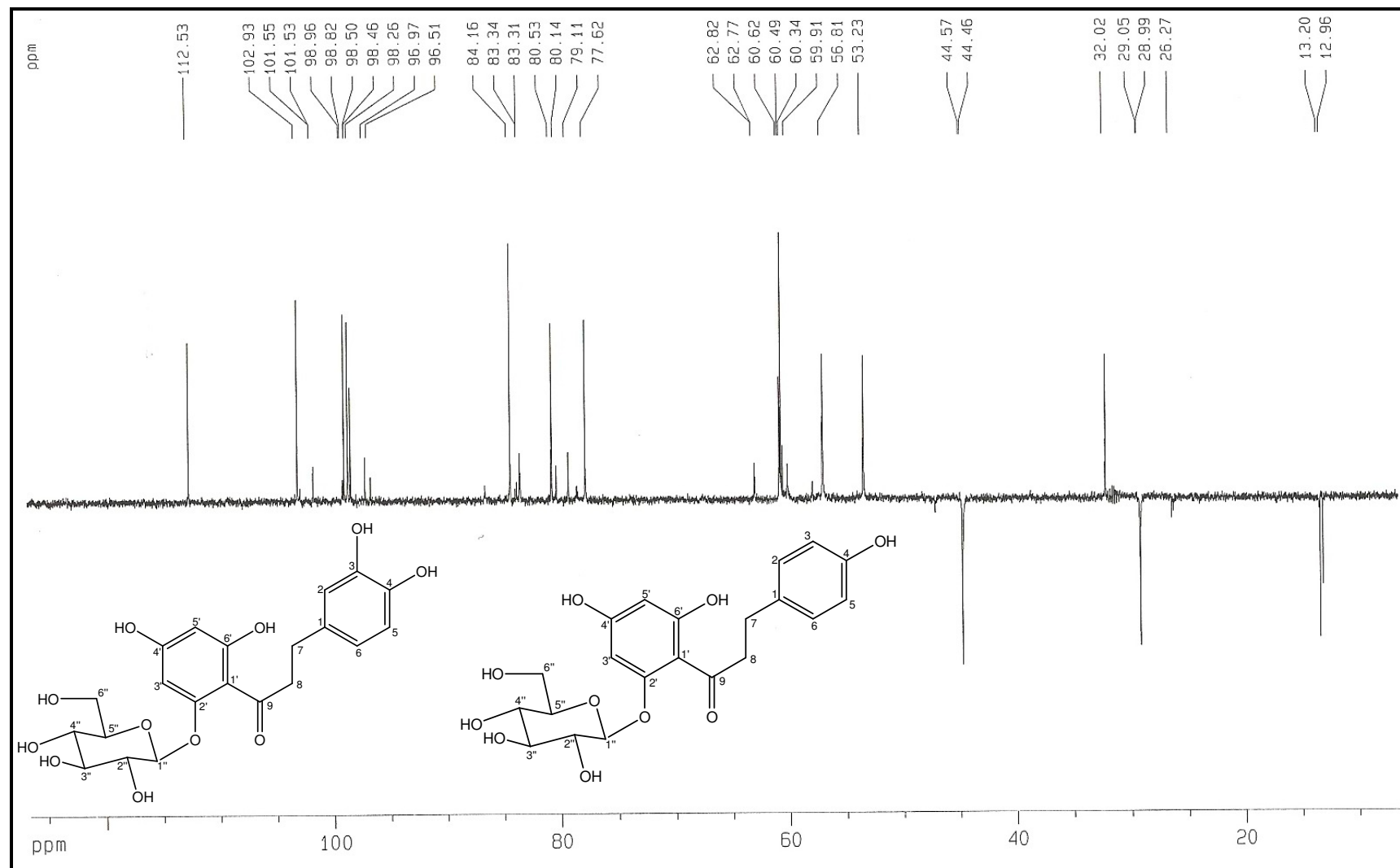
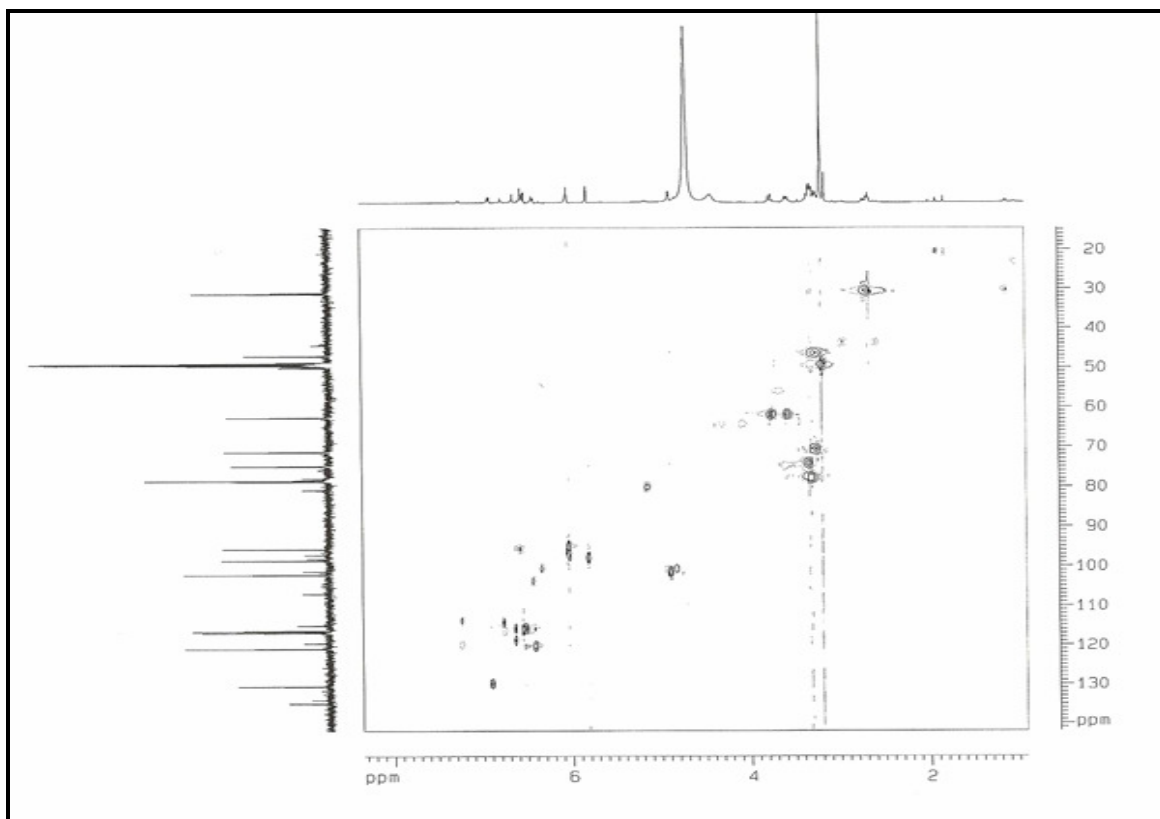
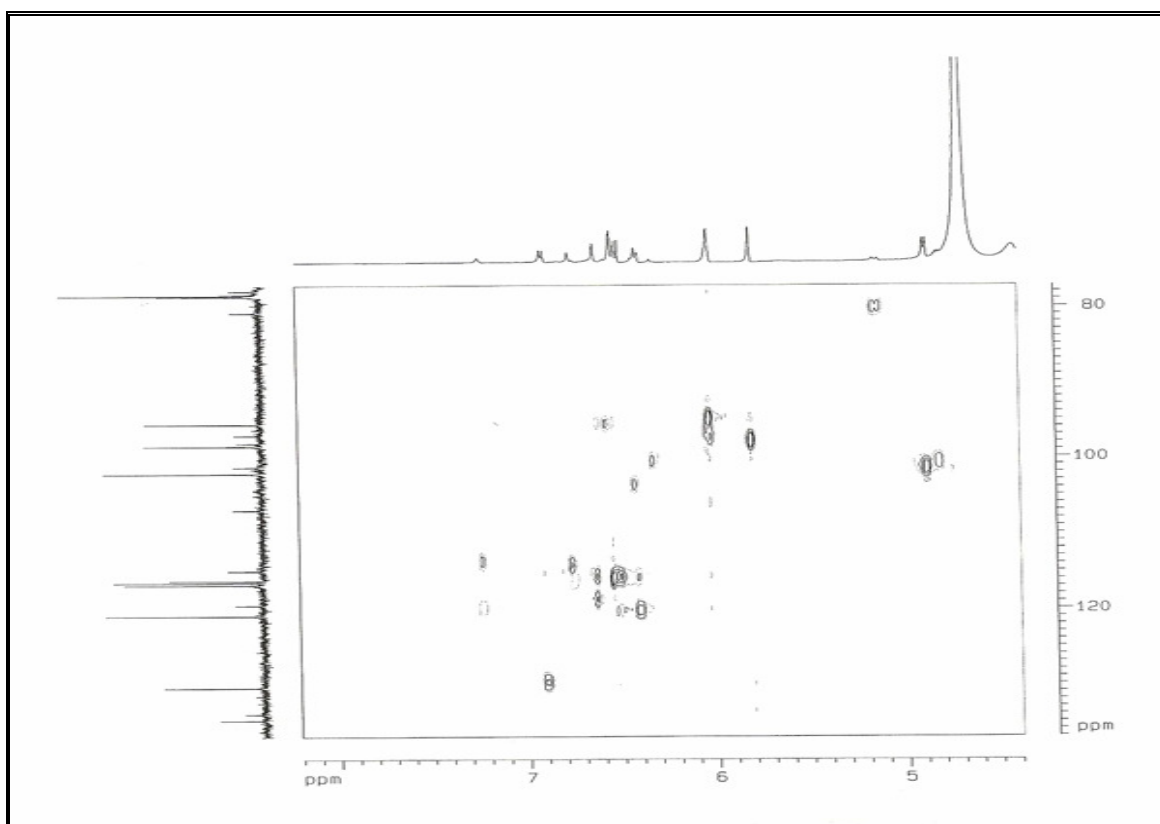


Figura 36 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4



**Figura 37** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4



**Figura 38** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4

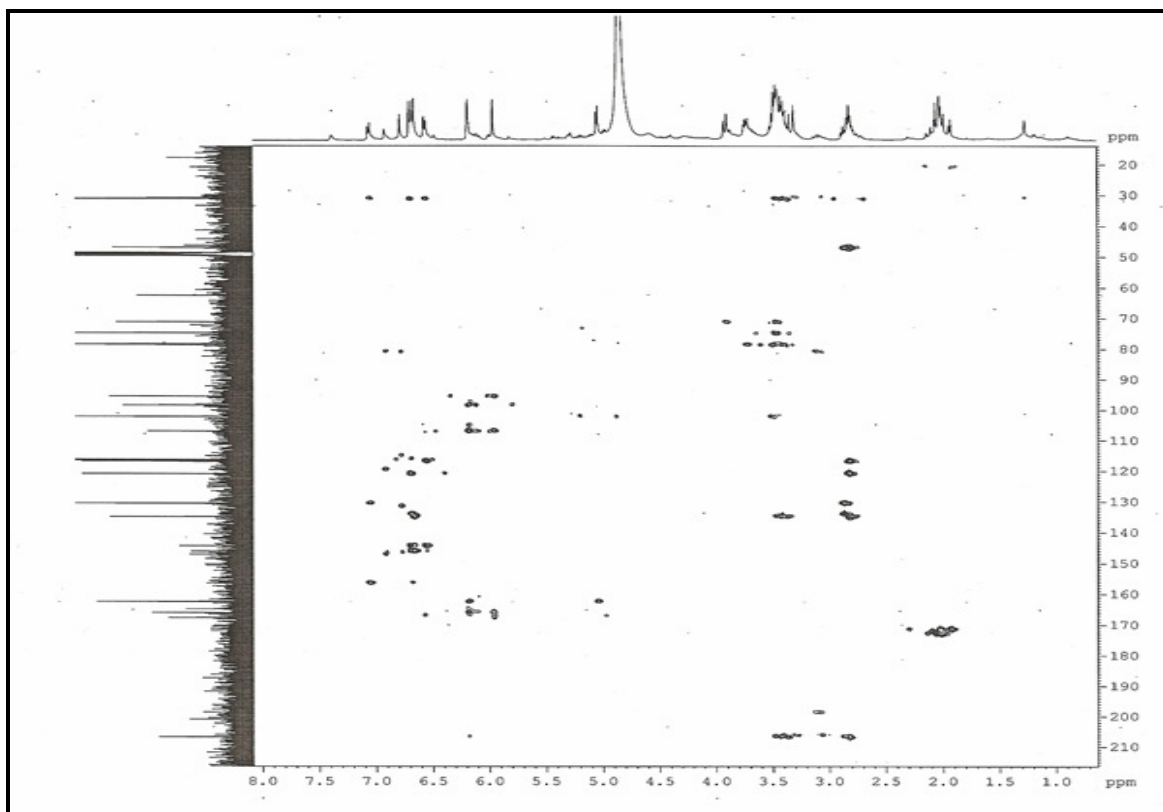
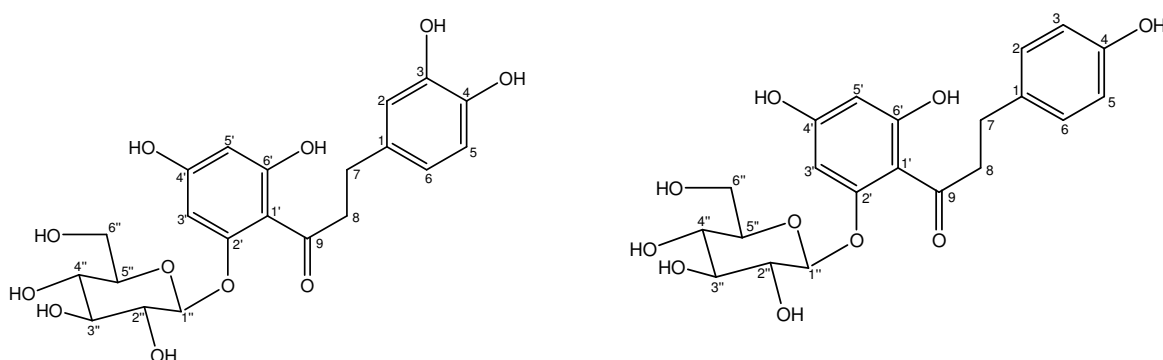


Figura 39 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de LSF-4





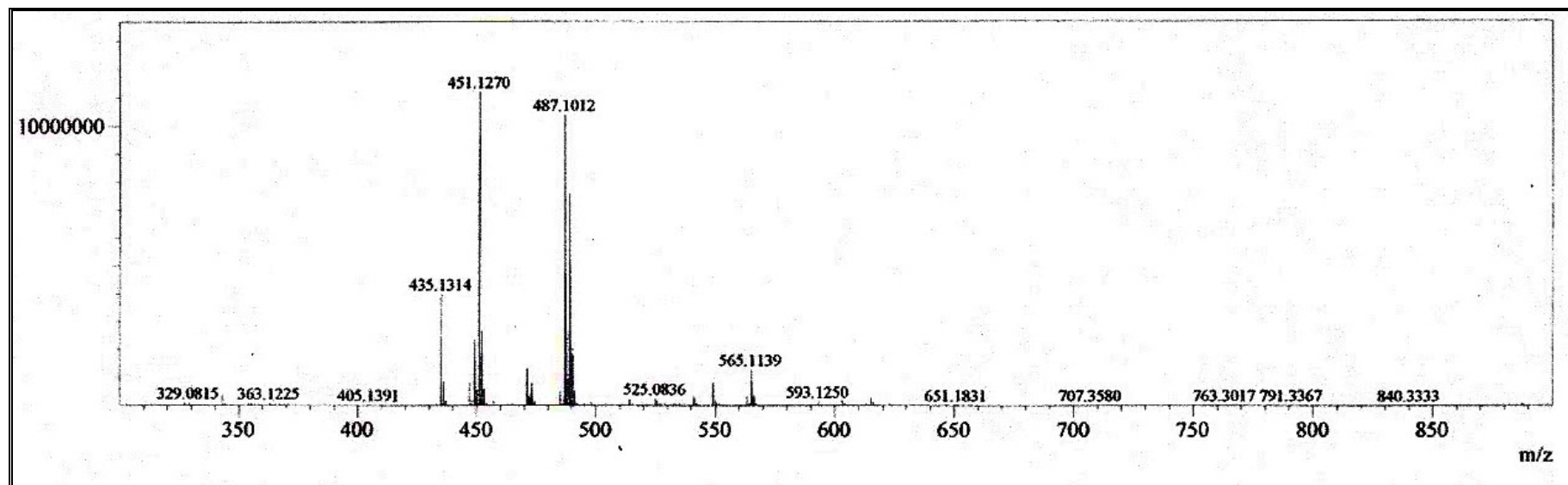
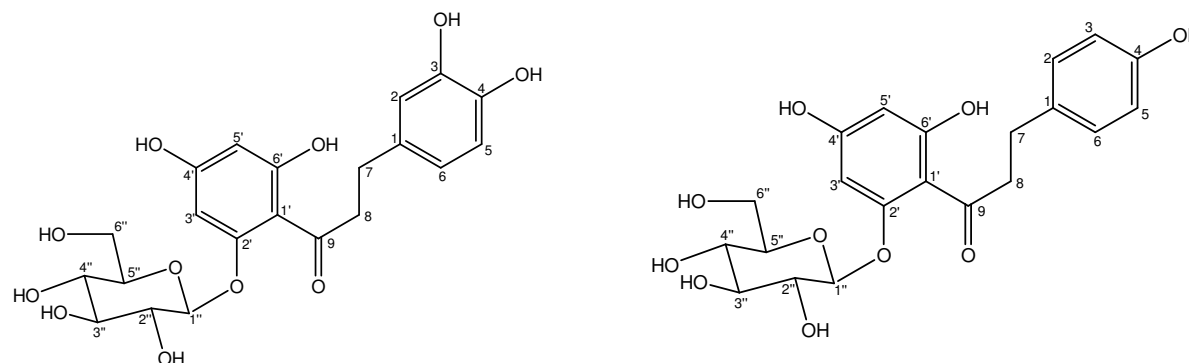


Figura 40 – Espectro de massas de alta resolução (modo negativo) de LSF-4



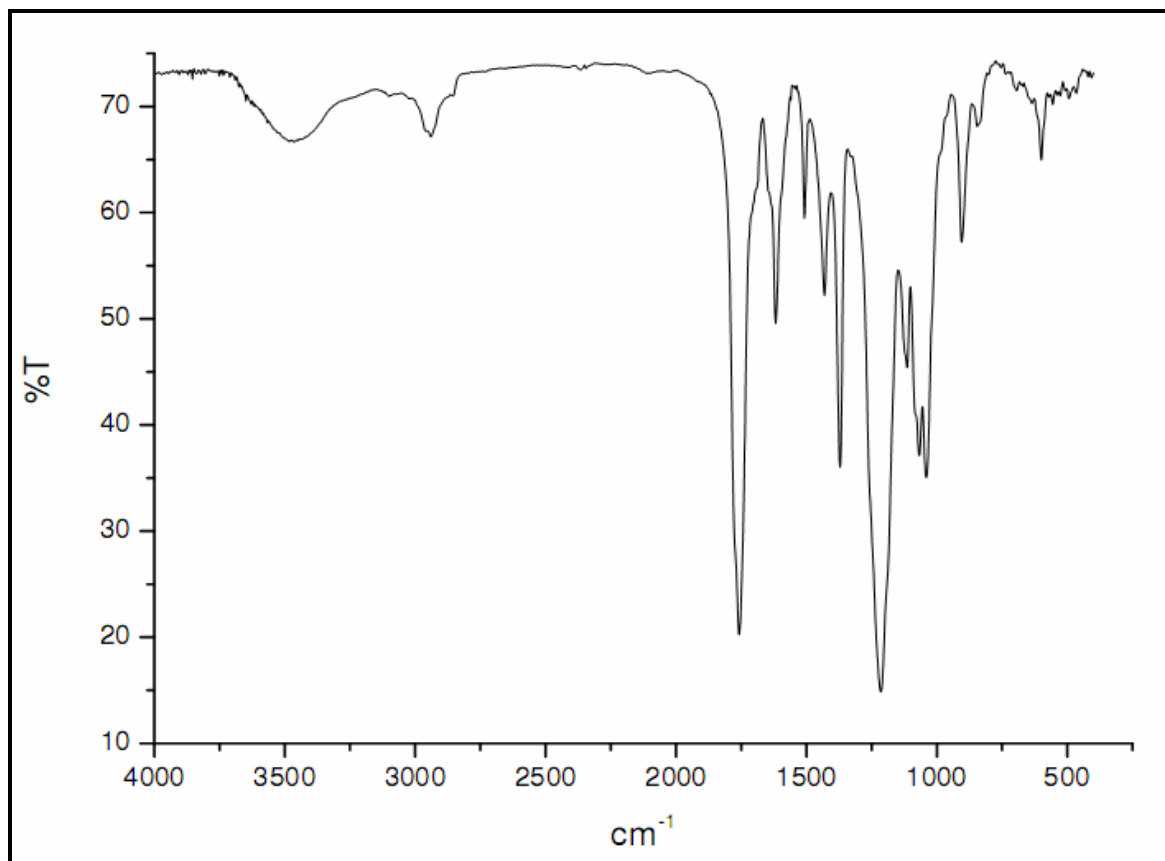
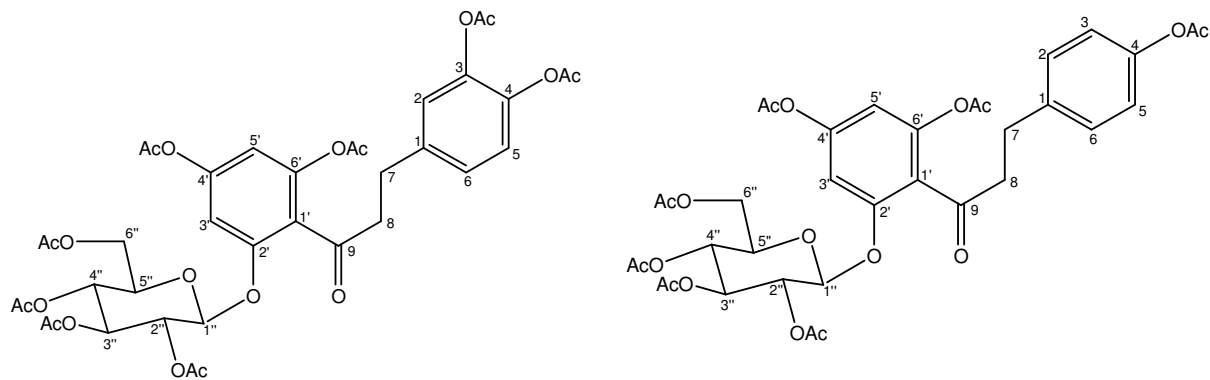


Figura 41 – Espectro na região do infravermelho de LSF-4-Ac



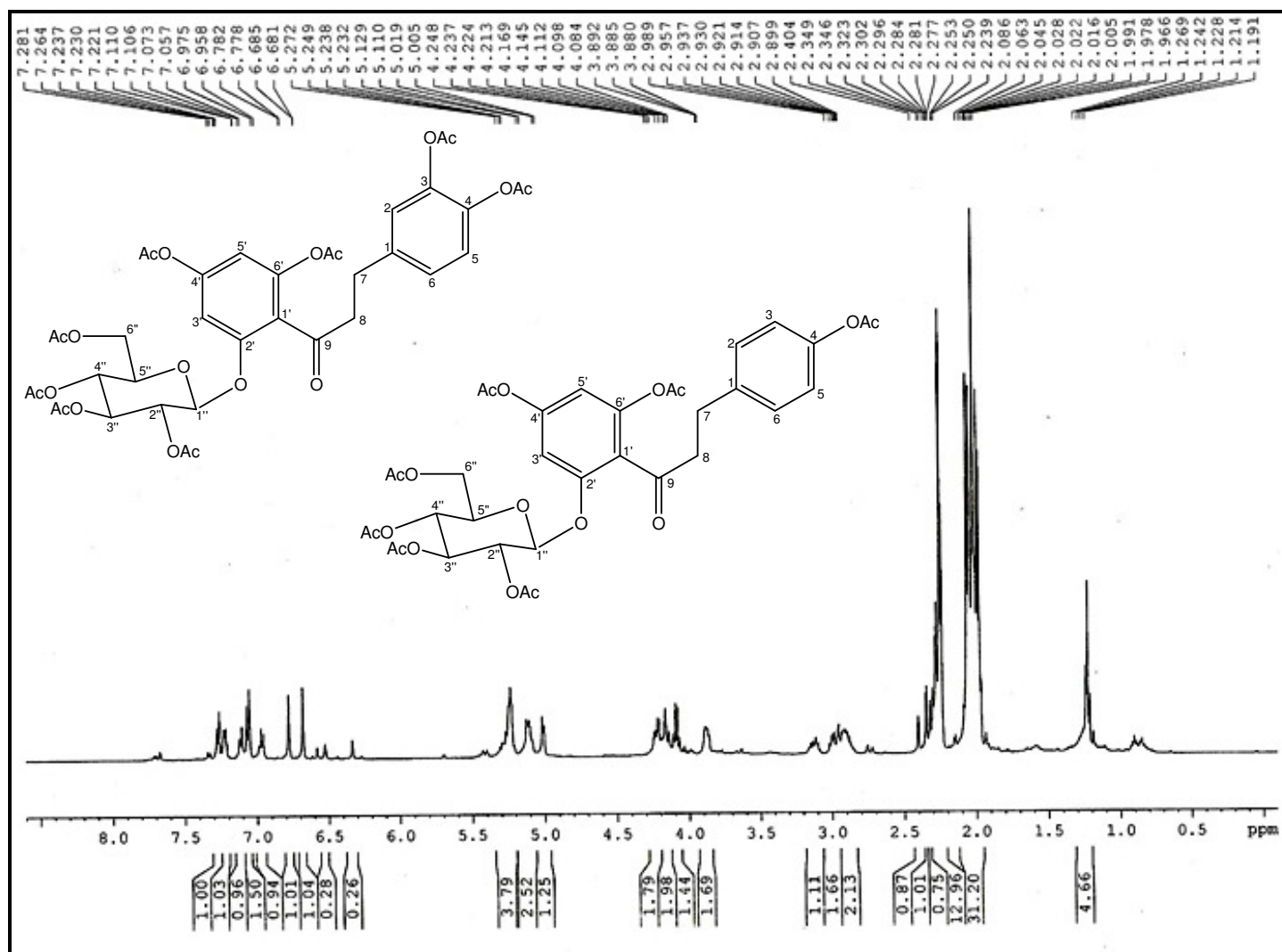


Figura 42 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-4-Ac

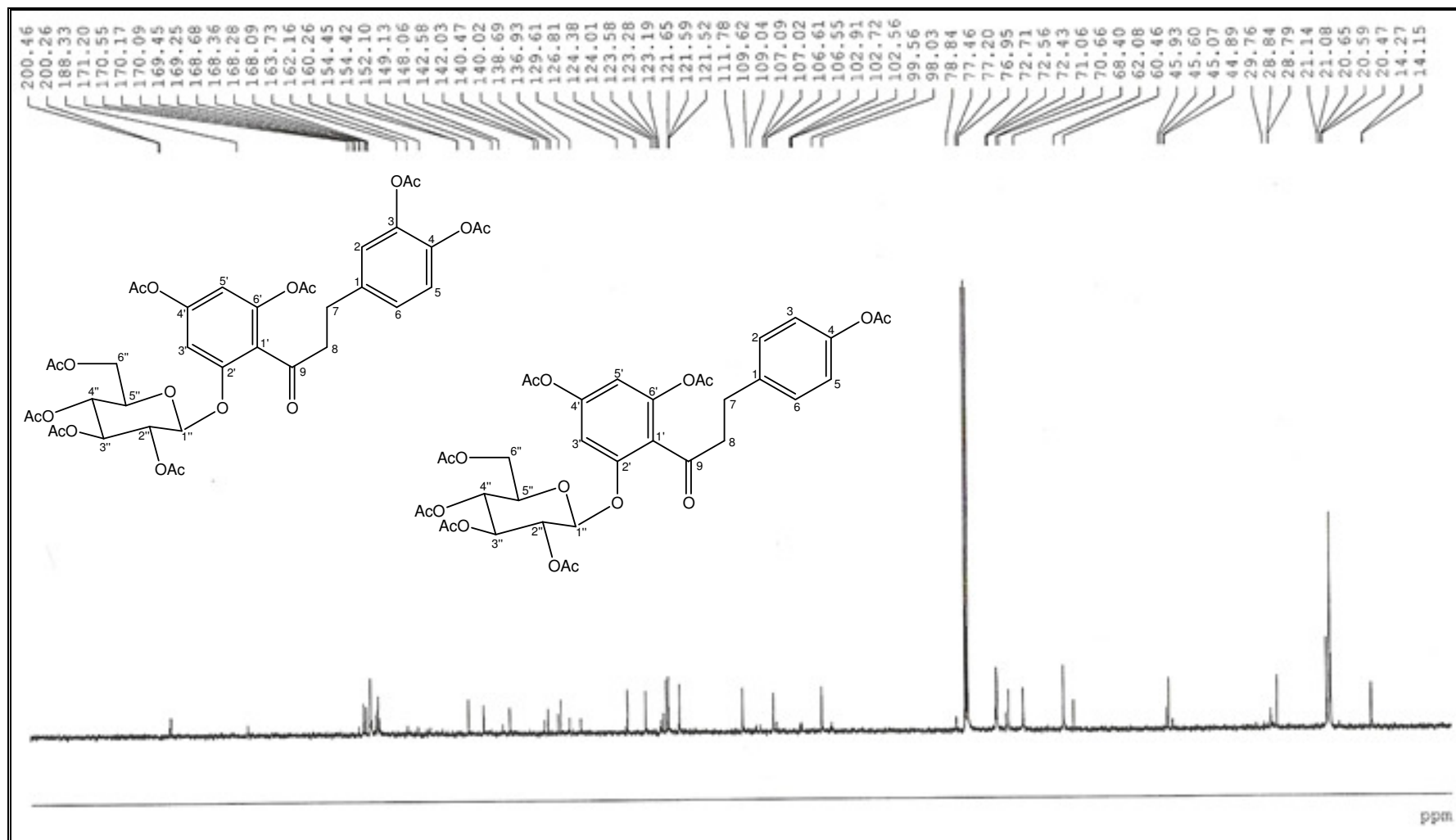


Figura 43 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-4-Ac

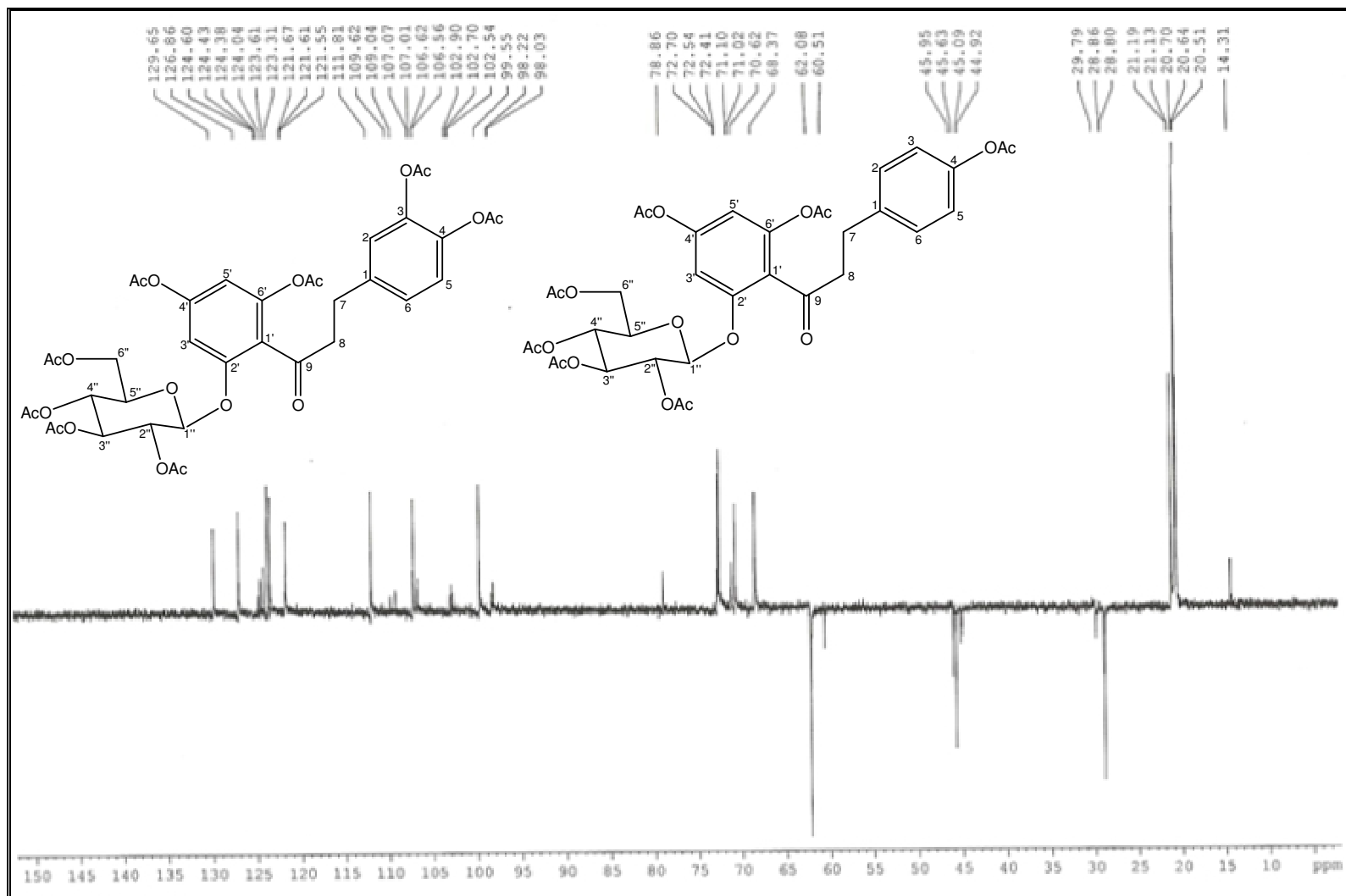
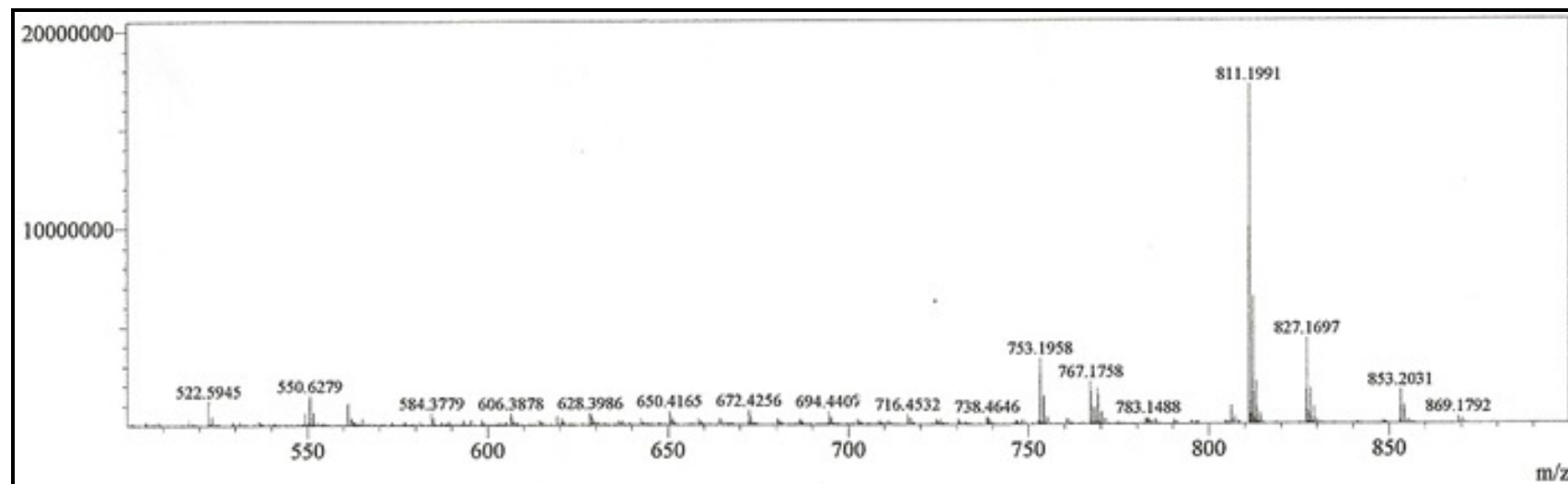
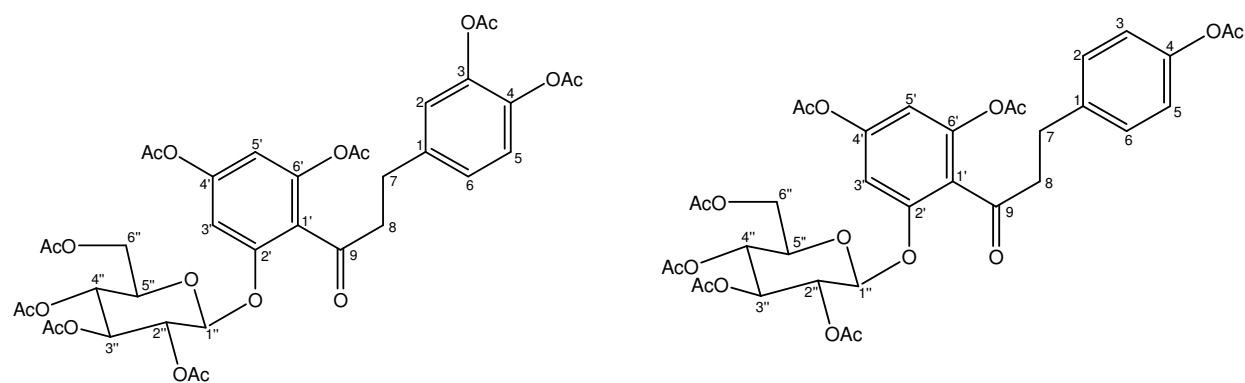


Figura 44 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] de LSF-4-Ac



**Figura 45** – Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) de LSF-4-Ac



## 4.2. Atividade Antioxidante

O extrato etanólico das folhas (EEFLS) e as substâncias isoladas (LSR-1, LSF-1, LSF-2, LSF-3A/LSF-3B e LSF-4A/LSF-4B) foram submetidos ao teste de atividade antioxidante utilizando o método do sequestro do radical DPPH (Hegazi *et al.*, 2002). Através dessa metodologia foi observada atividade significativa na concentração de 1 mg/mL para o extrato etanólico das folhas (EEFLS), para a mistura de flavonóides (LSF-3A/LSF-3B) e para a mistura de di-hidrochalconas (LSF-4A/LSF-4B) com inibição de 99,9% de radicais. A Tabela 16 mostra os resultados obtidos no ensaio antioxidante, juntamente com os valores de IC<sub>50</sub> (concentração da substância que inibe 50% do radical DPPH). Os dados mostram que dentre as substâncias testadas, a que se revelou mais ativa foi a mistura de di-hidrochalconas com IC<sub>50</sub> de  $2,50 \times 10^{-3}$  mg/mL, resultado superior ao padrão Trolox. A alta atividade antioxidante encontrada para o extrato etanólico das folhas de *L. sidoides* pode ser atribuída à presença de substâncias flavonoídicas, o que justifica em parte o uso desta espécie na medicina popular.

**Tabela 16** – Resultado do teste da atividade antioxidante

<b>Substâncias</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>		<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
	<b>1,0</b>	<b>0,1</b>	
EEFLS	99,9%	99,5%	$1,63 \times 10^{-2} \pm 1,5 \times 10^{-3*}$
LSR-1	NA	NA	NA
LSF-1	NA	NA	NA
LSF-2	64,7%	25,2%	$0,72 \pm 0,11^*$
LSF-3A/LSF-3B	99,9%	99,6%	$1,62 \times 10^{-2} \pm 1,4 \times 10^{-3*}$
LSF-4A/LSF-4B	99,9%	99,8%	$2,50 \times 10^{-3} \pm 2,6 \times 10^{-4*}$
Trolox	99,9%	99,8%	$2,6 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-4*}$
Vitamina-C	99,8%	92,8%	$4,3 \times 10^{-2} \pm 1,9 \times 10^{-2*}$

NA – não apresentou atividade

\*Desvio padrão

# Capítulo 5

## *Parte Experimental*





## **5 – PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 – Material Vegetal**

O trabalho de pesquisa realizado teve como objetivo o estudo químico da espécie vegetal *Lippia sidoides*, onde foram utilizadas as seguintes partes da planta: raízes e folhas. As raízes foram coletadas no município de Apodi-RN, e as folhas, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará (UFC). As exsiccatas devidamente determinadas encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia (UFC), onde foram identificadas pelo professor Afrânio Gomes Fernandes e registrada sob o número 25149.

### **5.2 – Métodos Cromatográficos**

#### **5.2.1 – Cromatografia em Coluna (CC)**

As cromatografias de adsorção em coluna foram executadas utilizando gel de sílica 60, com granulometria de 70-230 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de gel de sílica empregada.

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em proporções crescente de polaridade. Os solventes utilizados nos procedimentos eram de qualidade P. A. ou destilado.

#### **5.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Nas cromatografias em camada delgada (CCD), foram usadas placas de vidro com dimensões de 10 x 5 cm, revestidas em uma das faces por gel de

sílica 60 G da marca VETEC, código 1094, e cromatoplasmas de gel de sílica 60, 2-25  $\mu\text{m}$ , com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (Merck).

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas foram realizadas pela pulverização com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), seguido de aquecimento com soprador térmico.

Os extratos e as frações resultantes das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Fisaton – modelo 801.

### 5.3 – Métodos Espectrométricos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREN/UFC).

#### 5.3.1 – Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e filme de cloreto de sódio (NaCl) para análise das amostras.

#### 5.3.2 – Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massa modelo QP5050A da SHIMADZU, operando em impacto eletrônico de 70 eV.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização por *electronspray* (EM-IES), modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34) da SHIMADZU.

### 5.3.3 – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono-13.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio ( $\delta_{\text{H}}$ , 7,27) e metanol ( $\delta_{\text{H}}$ , 4,87; 3,31) e para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio ( $\delta_{\text{C}}$ , 77,23) e metanol ( $\delta_{\text{C}}$ , 49,15).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), dt (dubleto triplo), t (tripleto), sep (septeto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° ( $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  com amplitudes em oposição aos  $\text{CH}_2$ ). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro da técnica DEPT 135° pelos sinais do espectro da técnica BB. Segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

## 5.4 – Métodos Físicos

### 5.4.1 – Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em equipamento da Microquímica, modelo MQAPF 302. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 1 °C/min e os valores obtidos não foram corrigidos.

### 5.4.2 – Rotação Ótica

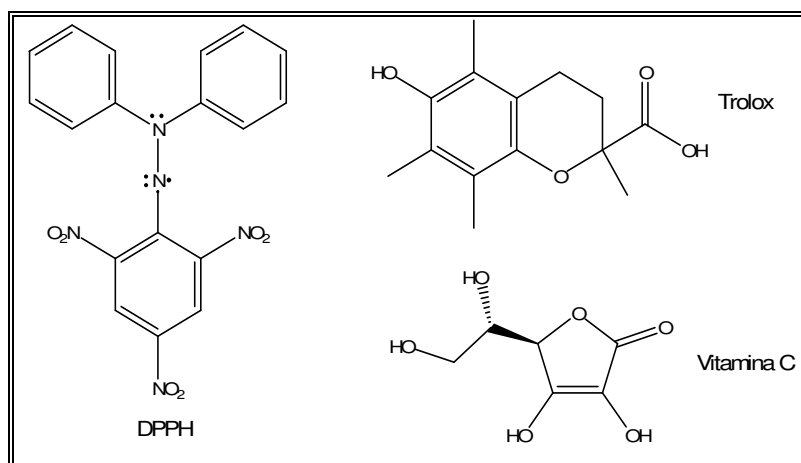
As rotações óticas foram obtidas em polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 a temperatura de 20 °C e concentração de g/mL de solvente.

## 5.5 – Atividade Antioxidante: Método de Seqüestro do Radical DPPH

A metodologia utilizada no teste de atividade antioxidante foi a do seqüestro de radicais livres, semelhante a descrita por Hegazi *et al.*, (2002), onde o radical utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (Fig. 46, pág. 79) na concentração de 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Soluções em concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 1,0 mg/mL foram preparadas pela dissolução das amostras em metanol, e 1,0 mL de cada solução foi misturada a outra solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Foram realizadas medidas de absorvância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, após 30 min. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra.

Percentagem de inibição =  $(1 - \text{Abs. da amostra}/\text{Abs. do DPPH}) \times 100$

Os resultados mostrados na Tabela 16 (pág. 74) representam a média aritmética de 3 leituras. Como padrões positivos de referência utilizaram-se Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e Vitaminc (ácido ascórbico) (Fig. 46, pág. 79).



**Figura 46** – Estruturas do DPPH, Trolox e Vitamina-C

## 5.6 – Estudo dos Metabólitos Secundários de *L. sidoides*

### 5.6.1 – Preparação dos Extratos

Raízes (2,0 kg) e folhas (208,5 g) foram secos a temperatura ambiente, triturados e submetidos à extração com etanol a frio. Em seguida, foram concentrados sob pressão reduzida, fornecendo os respectivos extratos (Tabela 17).

**Tabela 17** – Dados referentes aos extratos obtidos de *L. sidoides*

<i>Extrato</i>	<i>Sigla</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
Etanólico das raízes	EERLS	56,0 g	2,8%
Etanólico das folhas	EEFLS	36,8 g	17,6%

### 5.7 – Fracionamento Cromatográfico de EERLS

O extrato EERLS (56,0 g) foi adsorvido em gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e submetido à coluna filtrante, utilizando como eluentes: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH, puros, nesta ordem de polaridade. As frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida e os pesos obtidos estão descritos na Tabela 18.

**Tabela 18** – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EERLS

<i>Eluente</i>	<i>Fração</i>	<i>Peso (g)</i>
Hexano	EERH	1,2 g
Diclorometano	EERD	14,5 g
Acetato de etila	EERA	8,2 g
Metanol	EERM	22,0 g
<b>Total</b>		<b>45,9 g</b>
<b>Rendimento (%)</b>		<b>82,0%</b>

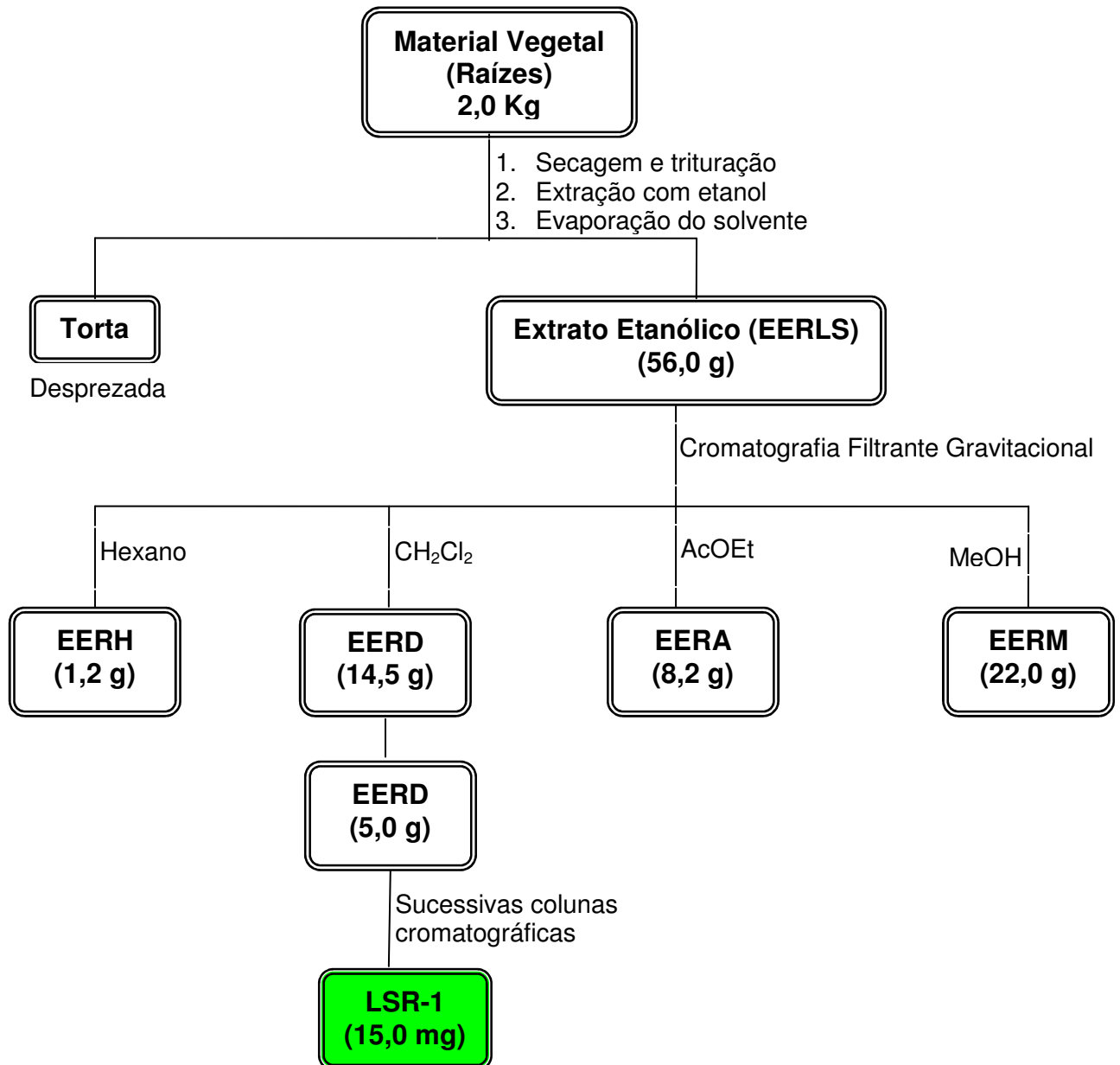
### 5.7.1 – Fracionamento Cromatográfico de EERD

Parte da fração EERD (5,0 g), obtida do fracionamento cromatográfico do extrato EERLS, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas um total de 19 frações, reunidas depois de concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD. A fração F4 foi recromatografada para o isolamento da substância LSR-1.

### 5.7.2 – Fracionamento Cromatográfico de F4 e Isolamento de LSR-1

A fração F4 (231,3 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre gel de sílica para fracionamento cromatográfico. Os solventes empregados na eluição das frações foram: hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, aumentando gradativamente a polaridade, resultando em 60 frações. As frações F11-17 foram reunidas, após análise em CCD, obtendo-se 61,0 mg de material, que foi posteriormente submetido a tratamento cromatográfico. Os solventes utilizados na eluição foram os mesmos da coluna anterior, sendo coletadas 58 frações. Após análise em CCD, as frações F3-12 foram reunidas, resultando em 15,0 mg de sólido amorfo verde, solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e com ponto de fusão na faixa de 188-189 °C, codificado de LSR-1.

**Fluxograma 1** – Rota esquemática do isolamento da substância LSR-1, obtida a partir do extrato etanólico das raízes de *L. sidoides*



## 5.8 – Fracionamento Cromatográfico de EEFLS

Parte do extrato EEFLS (36,0 g) foi adsorvido em gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e submetido a fracionamento cromatográfico em funil de Buchner utilizando como eluentes hexano, AcOEt e MeOH, puros, nesta ordem de polaridade. As frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida e os pesos obtidos estão descritos na Tabela 19.

**Tabela 19** – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFLS

<i><b>Eluente</b></i>	<i><b>Fração</b></i>	<i><b>Peso (g)</b></i>
Hexano	EEFH	0,9 g
Acetato de etila	EEFA	5,4 g
Metanol	EEFM	19,7 g
<b>Total</b>		<b>26,0 g</b>
<b>Rendimento (%)</b>		<b>72,2%</b>

### 5.8.1 – Fracionamento Cromatográfico de EEFA

Parte da fração EEFA (2,0 g), obtida do fracionamento cromatográfico do extrato EEFLS, foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 157 frações que foram concentradas sob pressão reduzida e reunidas após análise em CCD. As frações F28-38, F39-45, F48-76 e F110-121 foram recromatografadas para o isolamento das substâncias LSF-1, LSF-2, LSF-3 e LSF-4, respectivamente.

### 5.8.2 – Fracionamento Cromatográfico de F28-38 e Isolamento de LSF-1

A fração F28-38 (112,6 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica. A eluição foi realizada com o uso dos solventes: hexano, AcOEt e MeOH



puros ou em misturas binárias, em escala crescente de polaridade, obtendo-se 62 frações. Após análise em CCD, as frações F17-20 foram reunidas, resultando em 11,0 mg de uma resina verde, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , codificada de LSF-1.

### **5.8.3 – Fracionamento Cromatográfico de F39-45 e Isolamento de LSF-2**

A fração F39-45 (105,0 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre gel de sílica para tratamento cromatográfico. Os solventes usados na eluição durante o fracionamento foram:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias, aumentando gradativamente a polaridade, obtendo-se 71 frações. Após análise em CCD, as frações F23-31 foram reunidas, resultando em 27,0 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em MeOH e com ponto de fusão na faixa de 229-231 °C, codificado de LSF-2.

### **5.8.4 – Fracionamento Cromatográfico de F48-76 e Isolamento de LSF-3**

A fração F48-76 (280,0 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada com o uso dos solventes: hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias, em escala crescente de polaridade, obtendo-se 136 frações. As frações F41-44 foram reunidas, após análise por CCD, resultando em 22,0 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em MeOH, codificado de LSF-3.

### **5.8.5 – Fracionamento Cromatográfico de F110-121 e Isolamento de LSF-4**

A fração F110-121 (437,8 mg) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica. Os solventes empregados na eluição das frações foram: hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 99 frações. As frações F32-41 foram reunidas, após comparação

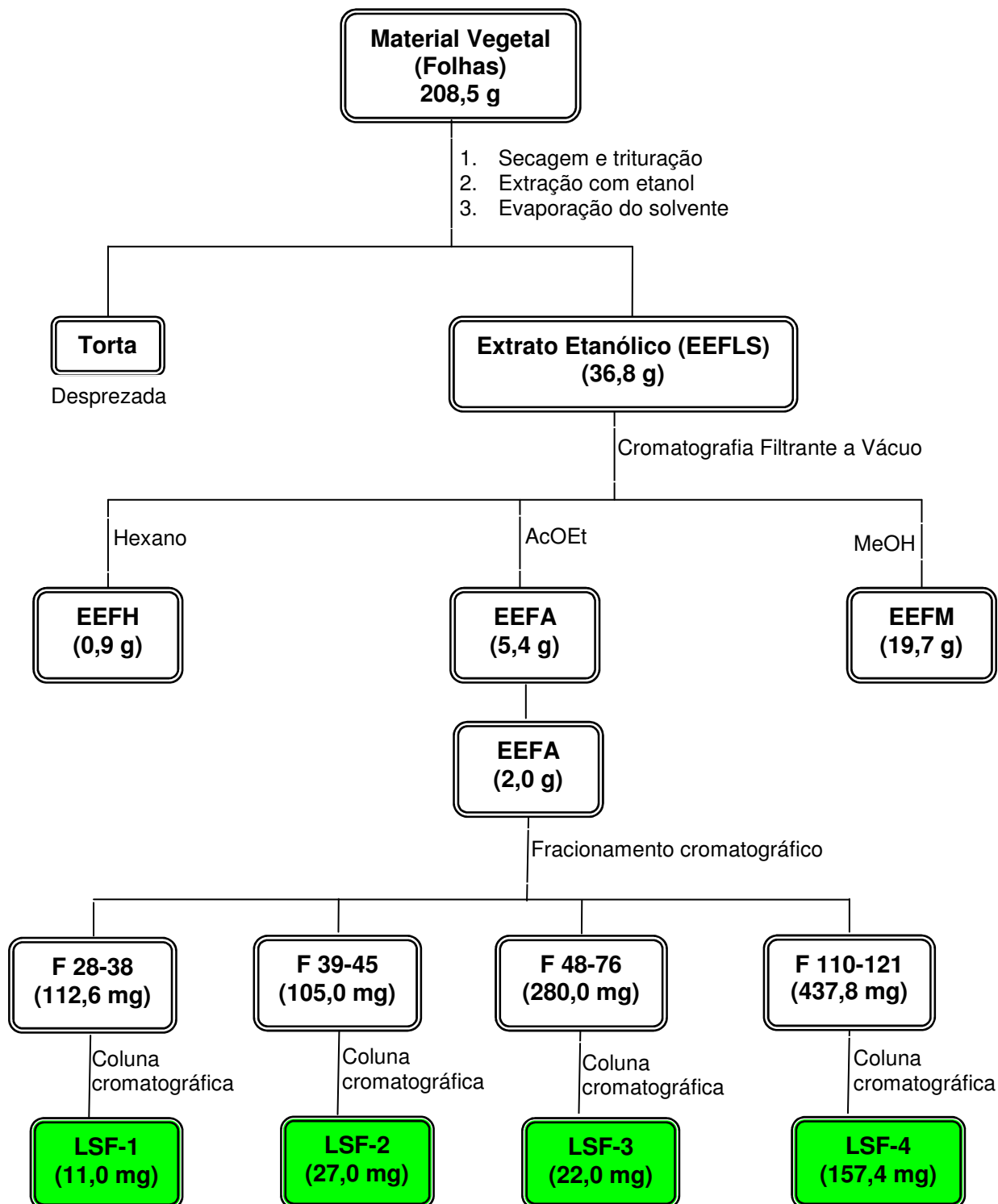
em CCD, obtendo-se 157,4 mg de um sólido amorfo amarelado, solúvel em MeOH, codificado de LSF-4.

### **5.8.6 – Obtenção do Derivado de LSF-4**

#### **5.8.6.1 – Reação de Acetilação de LSF-4**

Cerca de 50,0 mg de LSF-4 foi dissolvida em anidrido acético/piridina (2,0/1,0 mL) em um balão de fundo redondo de 50 mL. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado com solução saturada de sulfato de cobre para eliminação da piridina residual, e extraído com acetato de etila (2 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada para a retirada de sulfato de cobre, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica empregando gel de sílica como adsorvente e acetato de etila como eluente, obtendo-se 73,0 mg (85,9%) do derivado acetilado, denominado LSF-4-Ac.

**Fluxograma 2** – Rota esquemática do isolamento das substâncias LSF-1, LSF-2 e LSF-3, obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *L. sidoides*



## Capítulo 6

### *Conclusões*



## 6 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico desenvolvido neste trabalho abordando a espécie *Lippia sidoides* permitiu verificar que a planta é rica em flavonóides, conforme foi relatado na pesquisa bibliográfica.

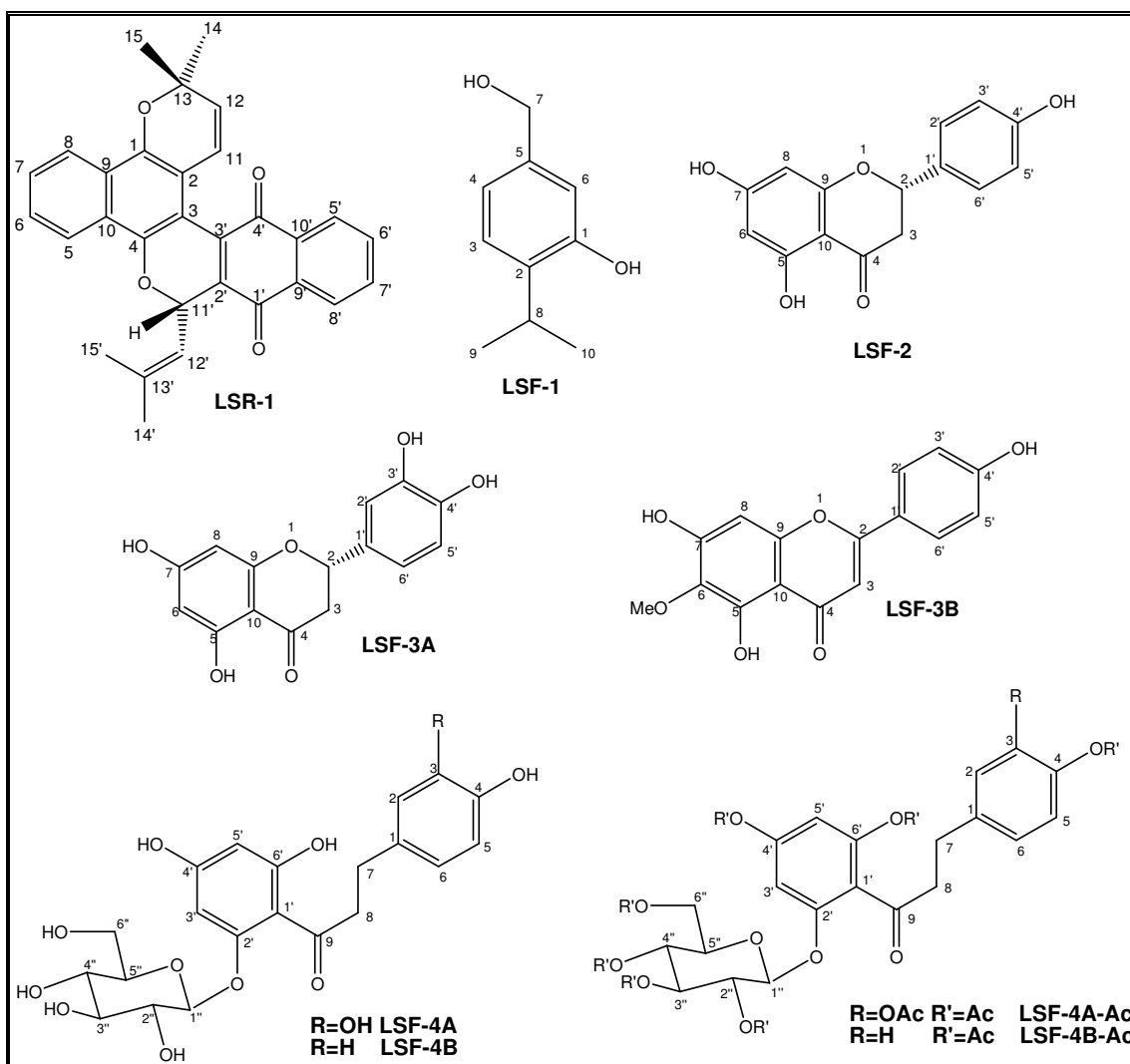
O estudo do extrato etanólico das raízes resultou no isolamento e caracterização da naftoquinona tecomaquinona I (LSR-1) e, o estudo do extrato etanólico das folhas possibilitou o isolamento e identificação do monoterpene 5-hidroximetil-2-isopropilfenol (LSF-1), da flavanona naringenina (LSF-2), da mistura de flavonóides eriodictiol (LSF-3A) e hispidulina (LSF-3B), e da mistura de di-hidrochalconas 3-hidroxifloridizina (LSF-4A) e floridizina (LSF-4B). Das substâncias isoladas e caracterizadas, duas estão sendo reportadas pela primeira vez no gênero *Lippia* (5-hidroximetil-2-isopropilfenol e 3-hidroxifloridizina), quatro são inéditas na espécie *Lippia sidoides* (naringenina, eriodictiol, hispidulina e floridizina) e uma já foi isolada anteriormente da espécie (tecomaquinona I).

A mistura de di-hidrochalconas, acetilada com anidrido acético/piridina, forneceu o produto esperado com rendimento de 85,9% e acetilação de todas as hidroxilas, comprovando a estrutura proposta para LSF-4A/LSF-4B.

O extrato etanólico das folhas, a mistura de flavonóides (LSF-3A/LSF-3B) e a mistura de di-hidrochalconas (LSF-4A/LSF-4B) apresentaram significativa atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, enquanto que a naftoquinona LSR-1 e o monoterpene LSF-1 não apresentaram atividade. A alta atividade antioxidante encontrada para o extrato etanólico das folhas de *L. sidoides* pode ser atribuída à presença de substâncias flavonoídicas, o que justifica em parte o uso desta espécie na medicina popular. Das substâncias testadas, a que se revelou mais ativa foi a mistura de di-hidrochalconas (LSF-4A/LSF-4B), com IC<sub>50</sub> de  $2,50 \times 10^{-3}$  mg/mL, semelhante a dos padrões testados.

Os resultados apresentados neste trabalho motivam a continuação do estudo fitoquímico de *L. sidoides*, na busca de novos compostos com atividade farmacológica, visto que o óleo essencial desta espécie possui inúmeras propriedades medicinais.

O trabalho de pesquisa realizado resultou em um trabalho publicado na revista Química Nova com o seguinte título “Flavonóides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes”.



## *Referências Bibliográficas*



---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. AGRAWAL, P. K. ed. Elsevier: Amsterdam, 1989. 564 p.

ALMEIDA, S. C. X.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (willdenow) sprengel. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2005.

ALMEIDA, M. C. S.; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. 326p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2010.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

COSTA, S. M. O. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil *Lippia sidoides* Cham.** 2001. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia*



*sidoides* and cytotoxic activity. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, p. 66–67, 2002. Suplemento.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 395-402, 2002.

JIANG, HAI-XIA; LI, Y.; PAN, J.; GAO, K. Terpenoids from *Eupatorium fortunei* TURCZ. **Helv. Chim. Acta**, v. 89, p. 558-566, 2006.

LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Total assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of tectol and tecomaquinone I. **Magn. Reson. Chem.**, v. 37, p. 908–911, 1999.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Brazilian Plants. **Phytother. Res.**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chem.**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

MACAMBIRA, L. M. A. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste – *Lippia sidoides***. 1985. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1985.

---

MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 49, n. 2, p. 310-312, 1986.

MATOS, F. J. de A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4.ed. Fortaleza: UFC, 2002. 267p.

MATOS, F. J. de A.; SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 2004. 445p.

MONTEIRO, M. V. B.; LEITE, A. K. R. de M.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

MORAIS, S. M.; COSTA, S. M. de O.; LEMOS, T. L. G. In: AMANI S. AWAAD, J. N. GOVIL and V. K. SINGH (Org.). Recent Progress in Medicinal Chemistry - Ethomedicina - Source & Mechanism - II. **The Traditional Uses, Chemical Constituents and Biological Activities of *Lippia sidoides* Cham., A Review**. Texas: Studium Press LLC, 2009. cap. 18, p. 373-391.

OLIVEIRA, B. H.; NAKASHIMA, T.; Filho, J. D. de S.; Frehse, F. L. HPLC Analysis of Flavonoids in *Eupatorium littorale*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 2, p. 243-246, 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201-214, 2001.

RODRIGUES, I. S. C.; TAVARES, V. N.; PEREIRA, S. L. da S.; COSTA, F. N. Antiplatelet and antigingivitis effect of *Lippia sidoides*. A double-blind clinical

study in humans. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 17, n. 5, p. 404-407, 2009.

SANTOS, A. K. L. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Lippia sidoides* (Cham) e *Himatanthus drasticus* (Mart) Plumel.** 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SANTOS, J. S.; MELO, J. I. M.; ABREU, M. C.; SALES, M. F. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SCHAUER, J. C. In: MARTIUS, C.F.P. (Ed.). Flora Brasiliensis. **Verbenaceae.** 1851. v. 9, p. 165-308.

# *Anexos*



## FLAVONOIDES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS DE *Lippia sidoides* E SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

Macia Cleane S. de Almeida, Leonardo A. Alves, Luciana Gregório da S. Souza, Luciana L. Machado, Marcos C. de Matos, Maria Conceição F. de Oliveira e Telma L. G. Lemos\*

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60021-970 Fortaleza - CE, Brasil

Raimundo Braz-Filho

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro / Universidade Estadual do Norte Fluminense / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-603 Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil

Recebido em 5/1/10; aceito em 11/6/10; publicado na web em 22/9/10

FLAVONOIDS AND OTHER SUBSTANCES FROM *Lippia sidoides* AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITIES. The chemical investigation of the ethanol extracts of stems, roots and leaves of *Lippia sidoides* led to the isolation of: steroid  $\beta$ -sitosterol, naphthoquinone tecomaquinone, monoterpene carvacrol, flavonoid 4',5,7-trihydroxyflavanone (naringenin), 3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone and 4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavone flavonoids mixture, and 3,4,4',6'-tetrahydroxydihydrochalcone-2'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside and 4,4',6'-trihydroxydihydrochalcone-2'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside dihydrochalcones mixture. Their structures were characterized on the basis of spectral data, mainly  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (1D and 2D) and mass spectra. The ethanol extract and isolated compounds were evaluated for their antioxidative properties using the method of inhibition of free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Keywords: *Lippia*; Verbenaceae; chalcones.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae), possui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, que são naturais da América do Sul e Central.<sup>1</sup> Espécies deste gênero destacam-se pelo aroma forte e agradável e seu aspecto atrativo no período de floração. A espécie *Lippia sidoides* é conhecida popularmente como alecrim-pimenta e é encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Estudos anteriores realizados com esta espécie relataram a presença de flavonoides, quinonas, triterpenos, lignanas, esteroides livres e glicosilados e ácidos orgânicos.<sup>2</sup> A exemplo de outras plantas do gênero, a referida espécie tem uso comprovado na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano.<sup>2</sup> As folhas e flores constituem a parte medicinal desta planta. Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como constituintes principais, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida.<sup>3</sup> O chá ou a tintura diluída desta espécie é também usado no tratamento de problemas de pele.<sup>4</sup> Apesar de existirem vários trabalhos na literatura<sup>5</sup> acerca da sua composição química, o presente trabalho constitui uma reinvestigação fitoquímica da espécie por esta ser uma das plantas selecionadas pelo Governo do Estado do Ceará<sup>2</sup> e pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para produção de fitoterápico,<sup>6</sup> além de permitir avaliação comparativa dos perfis fitoquímicos da planta cultivada e daquela coletada no seu habitat natural.

Neste trabalho registra-se o resultado obtido do estudo fitoquímico dos talos, das raízes e das folhas da espécie *L. sidoides*, descrevendo-se o isolamento e a identificação da naftoquinona tecomaquinona (**1**), do flavonoide 4',5,7-tri-hidroxiflavanona (**2**, naringenina), da mistura de flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroxiflavanona (**3**) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (**4**), e da mistura de di-hidrochalconas 2'-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**5**) e 2'-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-

hidrochalcona (**6**), além do  $\beta$ -sitosterol e do carvacrol. Ensaios de atividade antioxidante foram realizados com o extrato etanólico das folhas (LSFE) e os compostos isolados, empregando-se o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila).<sup>7</sup>

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento da Microquímica, modelo MQAPF 302. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 4 °C/min e os valores obtidos não foram corrigidos.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de KBr e filme de NaCl para análise das amostras.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni (1D) e bidimensionais (2D), foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e DRX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), e de 75 e 125 MHz para carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), respectivamente. Na dissolução das amostras utilizou-se como solvente  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro Shimadzu, modelo QP5050A e em espectrômetro Shimadzu, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com fonte de ionização por electrospray.

A determinação da rotação óptica foi realizada em um polarímetro 341 da Perkin Elmer, a temperatura de 20 °C.

Nas cromatografias de adsorção em coluna (CC) foram utilizadas gel de sílica 60 (63-200  $\mu\text{m}$ ). Os tamanhos das colunas (comprimento e diâmetro) variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes empregados. Para a eluição das amostras foram usados os seguintes solventes de qualidade P.A. (Synth): hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em gradiente de polaridade crescente. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se gel de sílica

\*e-mail: tlemos@dqi.ufc.br

60 G sobre suporte de vidro e gel de sílica 60 F<sub>254</sub> sobre poliéster. As revelações das substâncias foram realizadas pela aspersão em solução ácida de vanilina, seguida de aquecimento com soprador térmico.

### Material vegetal

A espécie estudada, *Lippia sidoides*, foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsiccata de número 25149 encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia (UFC).

### Extração e isolamento dos constituintes químicos

Talos (551,0 g), raízes (2,0 kg) e folhas (208,5 g) foram separados, secos, submetidos à extração com etanol a temperatura ambiente e, em seguida, foram concentrados sob pressão reduzida, fornecendo respectivamente: LSTE (27,7 g), LSRE (56,0 g) e LSFE (36,8 g).

LSTE (18,0 g) foi adsorvido em gel de sílica e submetido a fracionamento cromatográfico em funil de vidro sinterizado utilizando como eluentes hexano, diclorometano e metanol puros em ordem crescente de polaridade, fornecendo as respectivas frações (432,0 mg, 691,0 mg, 4,6 g) após destilação do solvente sob pressão reduzida. A fração diclorometano (691,0 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica, usando-se eluentes puros e misturas binárias de hexano/diclorometano (0-100%, v/v), diclorometano/acetato de etila (0-100%, v/v) e acetato de etila/metanol (0-100%, v/v). As frações obtidas foram analisadas em CCD usando como eluentes hexano/diclorometano (3/7), hexano/acetato de etila (9/1; 8/2; 7/3; 5/5), diclorometano (100%) e diclorometano/acetato de etila (9/1; 8/2), as quais foram reunidas de acordo com suas similaridades, resultando no isolamento do esteroide  $\beta$ -sitosterol (40,0 mg).

LSRE (56,0 g) foi adsorvido em gel de sílica e submetido a fracionamento cromatográfico em funil de vidro sinterizado utilizando como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros em ordem crescente de polaridade, fornecendo as respectivas frações (1,2g; 14,5g; 8,2g; 22,0g) após destilação do solvente sob pressão reduzida. Parte da fração diclorometano (5,0 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica, usando-se eluentes puros e misturas binárias de hexano/acetato de etila (0-100%, v/v) e acetato de etila/metanol (0-100%, v/v). Foram coletadas um total de 19 frações que, após análise por CCD em hexano/acetato de etila (8/2; 5/5; 2/8), acetato de etila (100%) e acetato de etila/metanol (8/2; 5/5; 2/8), foram reunidas em 9 frações (F1 a F9). A fração F4 eluída com hexano/acetato de etila 6/4 foi submetida a sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica, resultando no isolamento de **1** (15,0 mg).

LSFE (36,8 g) também foi adsorvido em gel de sílica e submetido a fracionamento cromatográfico em funil de vidro sinterizado utilizando como eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros em ordem crescente de polaridade, fornecendo as respectivas frações (883,0 mg; 5,4 g; 19,7 g) após destilação do solvente sob pressão reduzida. Parte da fração acetato de etila (2,0 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica, usando-se eluentes puros e misturas binárias de hexano/acetato de etila (0-100%, v/v) e acetato de etila/metanol (0-100%, v/v). Foram obtidas 157 frações que, após análise em CCD em hexano (100%), hexano/acetato de etila (9/1; 7/3), diclorometano/acetato de etila (8/2), acetato de etila (100%) e acetato de etila/metanol (9/1), foram reunidas em 20 frações (F1 a F20). As frações F2–F14 eluídas com hexano/acetato de etila (9/1; 8/2; 7/3; 6/4; 5/5; 4/6; 3/7; 2/8; 1/9), acetato de etila (100%) e acetato de etila/metanol (9/1) foram recromatografadas em gel de sílica, usando-se eluentes puros e misturas binárias de hexano/diclorometano (0-100%, v/v), diclorometano/acetato de etila (0-100%, v/v) e acetato

de etila/metanol (0-100%, v/v), levando ao isolamento do monoterpeno carvacrol (60,0 mg), de **2** (27,0 mg), da mistura (22,0 mg) **3/4** (59% / 41%), e da mistura (157,0 mg) **5/6** (67% / 33%).

### Acetilação de 5/6

A mistura **5/6** (50,0 mg) foi dissolvida em anidrido acético/ piridina (2,0/1,0 mL) e mantida sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. Após adição de sulfato de cobre e extração com acetato de etila (2 x 10 mL), a fase orgânica foi lavada com água, tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. Os produtos **5a/6a**, provenientes da mistura **5/6**, foram purificados em coluna cromatográfica empregando gel de sílica como adsorvente e acetato de etila como eluente, obtendo-se 73,0 mg (85,9%) do derivado acetilado.

### Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método de sequestro de radical DPPH e comparação com padrões positivos, usando a metodologia proposta por Hegazy e El-Hady.<sup>7</sup> Amostras do extrato etanólico das folhas (LSFE) e das substâncias isoladas (**1**, **2**, **3/4** e **5/6**) nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 1,0 mg/mL foram dissolvidas em metanol e 1,0 mL de cada amostra foi adicionada a uma solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60  $\mu$ M. Foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, após 30 min. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra.

Os resultados mostrados na Tabela 2 representam a média aritmética de 3 leituras. Como padrões positivos de referência utilizaram-se Trolox e Vitamínica-C, adquiridos da Sigma Aldrich.

### Tecomaquinona (1)

Sólido amorfo verde; solubilidade: clorofórmio; Rf = 0,5 (hexano/diclorometano 1/1); p.f. 188-189 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -15,2° (c 0,00105, CHCl<sub>3</sub>); IV (filme de NaCl),  $\nu_{Max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2969; 2922; 1653; 1594; 1548; 1247; RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C: de acordo com a literatura.<sup>5</sup>

### Naringenina (2)

Sólido amarelo; solubilidade: metanol; Rf = 0,43 (diclorometano/acetato de etila 4/1); p.f. 229-231 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -10,9° (c 0,0011, MeOH); IV (pastilha de KBr),  $\nu_{Max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3134; 1603; 1519; 1461; 1312; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) –  $\delta_H$  (H, multiplicidade, J em Hz, integração): 7,29 (H-2', 6'; d; 8,5; 2H); 6,81 (H-3', 5'; d; 8,5; 2H); 5,88 (H-6; d; 2,1; 1H); 5,87 (H-8; d; 2,1; 1H); 5,31 (H-2; dd; 12,9 e 2,7; 1H); 3,09 (H-3 axial; dd; 17,1 e 12,9; 1H); 2,67 (H-3 equatorial; dd; 17,1 e 2,7; 1H); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) –  $\delta_C$ : 197,9 (C-4); 168,5 (C-7); 165,6 (C-5); 165,0 (C-9); 159,2 (C-4'); 131,2 (C-1'); 129,2 (C-2', 6'); 116,5 (C-3', 5'); 103,5 (C-10); 97,2 (C-6); 96,3 (C-8); 80,6 (C-2); 44,2 (C-3).

### 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavanona (3) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (4)

Sólido amarelo; solubilidade: metanol; Rf = 0,43 (diclorometano/acetato de etila 3/2); IV (pastilha de KBr),  $\nu_{Max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3368; 1639; 1606; 1459; 1365; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) –  $\delta_H$  (H, multiplicidade, J em Hz, integração): **3**: 6,90 (H-2'; s; 1H); 6,77

(H-6'; m; 1H); 6,77 (H-5'; m; 1H); 5,87 (H-8; d; 2,4; 1H); 5,85 (H-6; d; 2,4; 1H); 5,23 (H-2; dd; 12,7 e 3,0; 1H); 3,03 (H-3; dd; 17,0 e 12,7; 1H); 2,66 (H-3; dd; 17,0 e 3,0; 1H); **4**: 7,74 (H-2'; d; 8,6; 1H); 7,74 (H-6'; d; 8,6; 1H); 6,87 (H-3'; d; 6,8; 1H); 6,87 (H-5'; d; 8,6; 1H); 6,47 (H-3; s; 1H); 6,47 (H-8; s; 1H); 3,89 (MeO-6; s; 3H); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) – δ<sub>C</sub>: **3**: 197,9 (C-4); 168,5 (C-7); 166,4 (C-5); 165,5 (C-9); 147,0 (C-3'); 146,6 (C-4'); 131,9 (C-1'); 119,4 (C-6'); 117,0 (C-5'); 114,5 (C-2'); 106,0 (C-10); 97,2 (C-6); 96,3 (C-8); 80,6 (C-2); 44,2 (C-3); **4**: 184,2 (C-4); 164,9 (C-2); 162,8 (C-4'); 158,7 (C-7); 154,7 (C-9); 154,0 (C-5); 132,0 (C-6); 129,5 (C-2'); 129,5 (C-6'); 123,7 (C-1'); 117,1 (C-3'); 117,1 (C-5'); 106,0 (C-10); 101,5 (C-3); 95,4 (C-8); 59,6 (MeO-6).

### 2'-O-β-D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**5**) e 2'-O-β-D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**6**)

Sólido amarelo; solubilidade: metanol; Rf = 0,69 (acetato de etila/metanol 4/1); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -77,7 ° (c 0,001, MeOH); IV (pastilha de KBr), ν<sub>Max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3411; 2926; 1631; 1517; 1453; 1367; EM m/z: 5: 451,1270 [M - H] (calc.: 451,1240), 6: 435,1314 [M - H] (calc.: 435,1291); RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C: Tabela 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato etanólico dos talos de *L. sidoides* resultou no isolamento e identificação do esteroide β-sistosterol.<sup>8</sup> Do extrato etanólico das raízes foi isolada e identificada a naftoquinona tecomaquinona (**1**),<sup>5</sup> e do extrato etanólico das folhas foram isolados e identificados o monoterpene carvacrol,<sup>9</sup> o flavonoide naringenina (4',5,7-tri-hidroxi-flavanona, **2**),<sup>10</sup> a mistura de 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavanona (**3**)<sup>11</sup> e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxi-flavanona (**4**)<sup>11</sup> e a mistura de 2'-O-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**5**)<sup>12</sup> e 2'-O-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**6**)<sup>13</sup> (Figura 1). Estes compostos foram identificados por métodos espectrométricos, tais como IV, EM e, principalmente RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D). A confirmação destas estruturas baseou-se na análise comparativa com valores descritos na literatura.<sup>5,8-12</sup>

O espectro na região do IV [ν<sub>Max</sub> cm<sup>-1</sup> (KBr)] de **5/6** revelou bandas de absorção em 3411 (OH), 1631 (C=O), 1517 e 1453 (C=C<sub>arom.</sub>). O espectro de RMN <sup>1</sup>H revelou sinais de hidrogênios

alifáticos em δ<sub>H</sub> 2,82 (t, J=7,8 Hz, 2H) e 3,47 (t, J=7,8 Hz, 2H), compatíveis com dois grupos CH<sub>2</sub> ligados entre si e sendo um deles alfa à carbonila, além de sinais de anel aromático, compreendidos entre δ<sub>H</sub> 5,96-7,06, sugerindo tratar-se do esqueleto básico Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-Ph, característico de di-hidrochalconas. Os sinais em δ<sub>H</sub> 6,19 (d, J=2,1 Hz, 1H) e 5,96 (d, J=2,1 Hz, 1H) indicaram a presença de dois hidrogênios *meta* posicionados em um grupo fenila tetrassubstituído. A análise comparativa dos espectros de RMN <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H} e RMN <sup>13</sup>C-DEPT-135° mostrou sinais característicos de uma unidade de monossacarídeo com absorções em δ<sub>C</sub> 102,0 (CH-1''), 74,7 (CH-2''), 78,4 (CH-3''), 71,1 (CH-4''), 78,4 (CH-5'') e 62,4 (CH<sub>2</sub>-6''), típico de uma unidade β-D-glicopiranosila. O acoplamento heteronuclear a longa distância de H-1'' (δ<sub>H</sub> 5,02) com C-2' (δ<sub>C</sub> 162,78, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>) revelado pelo espectro de HMBC permitiu definir a localização desta unidade glicosídica no anel A (C-2'). A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura permitiu reconhecer os sinais correspondentes ao componente **5** (Tabela 1) em δ<sub>H</sub> 6,70 (d, J=1,7 Hz, H-2), 6,69 (d, J=8,0 Hz, H-5) e 6,56 (dd, J=8,0; 1,7 Hz, H-6), indicando a presença de um grupo fenila trissubstituído, estando dois destes hidrogênios acoplados em *orto*; já os sinais dos átomos de hidrogênio deste grupo arila em **6** apareceram em δ<sub>H</sub> 7,06 (d, J=8,3 Hz, H-2/H-6) e δ<sub>H</sub> 6,67 (d, J=8,3 Hz, H-3/H-5), compatíveis com um sistema aromático *para*-dissubstituído (típico sistema AA'BB') na molécula. Estes dados, juntamente com os picos dos íons moleculares em m/z 451,1270 ([M - H]<sup>-</sup>, **5**, calc.: 451,1240) e m/z 435,1314 ([M - H]<sup>-</sup>, **6**, calc.: 435,1291) revelados pelo espectro de massas de alta resolução (modo negativo) permitiram deduzir a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub> e C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub> para **5** e **6**, respectivamente. Assim, todos estes dados e os resultados adicionais fornecidos pelos espectros de RMN <sup>13</sup>C ({<sup>1</sup>H} e DEPT-135°) e pelas experiências 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC e HMBC), resumidos na Tabela 1, foram usados para deduzir as estruturas dos componentes da mistura como 2'-O-β-D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**5**) e 2'-O-β-D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**6**). Os dados da Tabela 1 permitiram também estabelecer a correlação inequívoca dos deslocamentos dos átomos de hidrogênio e carbono das duas di-hidrochalconas (**5** e **6**).

O flavonoide **5** já foi descrito na espécie *Malus*<sup>12</sup> e o flavonoide **6** nas espécies *Symplocos lancifolia*,<sup>14</sup> *S. spicata*<sup>14</sup> e *Lithophragma affine*.<sup>14</sup> Dentre as substâncias naturais isoladas, os flavonoides (**2** - **6**) estão sendo registradas pela primeira vez na espécie *L. sidoides*.

A mistura contendo **5** e **6** foi submetida à reação de acetilação usando anidrido acético/piridina, obtendo-se os derivados acetilados **5a** e **6a**, respectivamente. Os derivados acetilados **5a/6a** comprovaram a estrutura proposta com m/z 811,1991 ([M + Na]<sup>+</sup>, calc.: 811,2061) para **5a** e m/z 753,1958 ([M + Na]<sup>+</sup>, calc.: 753,2007) para **6a**. Dados adicionais destes acetilados obtidos por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 1) colaboraram para a completa caracterização das estruturas como sendo: 2'-O-β-D-2'',3'',4'',6''-tetra-O-acetilglicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-O-acetil-di-hidrochalcona (**5a**) e 2'-O-β-D-2'',3'',4'',6''-tetra-O-acetilglicopiranosil-4,4',6'-tri-O-acetil-di-hidrochalcona (**6a**).

O extrato etanólico das folhas e as substâncias isoladas foram submetidos ao teste de atividade antioxidante utilizando o método do sequestro do radical DPPH.<sup>7</sup> Através dessa metodologia foi observada atividade significativa na concentração de 1 mg/mL para o extrato etanólico (LSFE), para a mistura de flavonoides **3/4** e para a mistura de di-hidrochalconas **5/6** com inibição de 99,9% de radicais. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no ensaio antioxidante, juntamente com os valores de IC<sub>50</sub>. Os dados mostram que dentre as substâncias testadas, a que se revelou mais ativa foi a mistura de di-hidrochalconas com IC<sub>50</sub> de 2,50 x 10<sup>-3</sup> mg/mL, resultado superior ao padrão Trolox. A alta atividade antioxidante

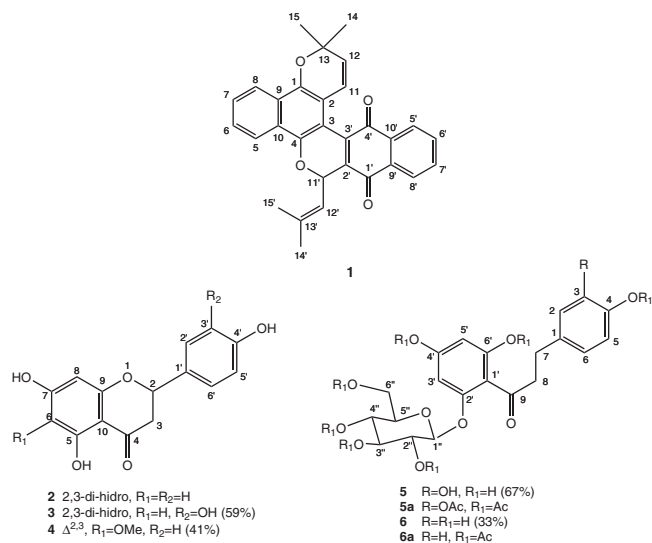


Figura 1. Substâncias isoladas de *Lippia sidoides* e derivadas acetilados **5a** e **6a**

**Tabela 1.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **5/6** (CD<sub>3</sub>OD) e **5a/6a** (CDCl<sub>3</sub>), e de correlação heteronuclear HMQC e HMBC. Deslocamentos químicos em δ<sub>C</sub> e δ<sub>H</sub> (ppm) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz\*

C	HSQC 5		HSQC 6		HMBC 5/6		HSQC 5a		HSQC 6a	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	<sup>2</sup> J <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> J <sub>CH</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	134,87		134,03		2H-7	H-5; 3H-8	140,47		142,58	
2	116,67	6,70 (d, 1,7)	130,38	7,06 (d, 8,3)		H-6; 2H-7	123,32	7,05 (d, 2,0)	129,65	7,27 (d, 8,5)
3	146,09		116,12	6,67 (d, 8,3)	H-2	H-5	142,03		121,61	6,96 (d, 8,5)
4	144,36		156,00		H-5	H-6	140,02		149,13	
5	116,82	6,69 (d, 8,0)	116,12	6,67 (d, 8,3)			123,81	7,06 (d, 8,5)	121,61	6,96 (d, 8,5)
6	120,78	6,56 (dd, 8,0; 1,7)	130,38	7,06 (d, 8,3)		H-2; 2H-7	126,86	7,11 (dd, 8,5; 2,0)	129,65	7,27 (d, 8,5)
7	31,05	2,82 (t, 7,8)	31,05	2,82 (t, 7,8)	2H-8		28,74	2,90 (m)	28,84	2,90 (m)
8	46,85	3,47 (t, 7,8)	46,85	3,47 (t, 7,8)	2H-7		45,63	3,13 (m) 2,98 (m)	45,93	3,13 (m) 2,98 (m)
9	206,79		206,79		2H-8	3H-7	200,26		200,46	
1'	106,95		106,95			H-3'; H-5'	123,19			
2'	162,78		162,78			H-1''	154,48			
3'	95,48	6,19 (d, 2,1)	95,48	6,19 (d, 2,1)		H-5'	107,09	6,68 (d, 1,6)	107,09	6,68 (d, 1,6)
4'	164,64		164,64		H-3'; H-5'		152,11			
5'	97,99	5,96 (d, 2,1)	97,99	5,96 (d, 2,1)		H-3'	111,78	6,77 (d, 1,6)	111,78	6,77 (d, 1,6)
6'	167,59		167,59		H-5'		148,06			
1''	102,02	5,02 (d, 7,1)	102,02	5,02 (d, 7,1)	H-2''		98,53	5,01 (d, 7,0)		5,01 (d, 7,0)
2''	74,67	3,50 (m)	74,67	3,50 (m)	H-3''		70,62	5,25	71,06	5,25
3''	78,38	3,45 (m)	78,38	3,45 (m)	H-2''; H-4''		72,54	5,27	72,56	5,27
4''	71,09	3,40 (m)	71,09	3,40 (m)	H-3''; H-5''		68,37	5,12 (m)		5,12 (m)
5''	78,43	3,35 (m)	78,43	3,35 (m)	H-5''		72,70	3,88 (m)	72,71	3,88 (m)
6''	62,43	3,91 (d, 12,2) 3,73 (dd, 12,2; 5,3)	62,43	3,91 (d, 12,2) 3,73 (dd, 12,2; 5,3)			62,08	4,23 (dd, 12,0; 5,5) 4,15 (dt, 12,0)	60,46	4,23 (dd, 12,0; 5,5) 4,15 (dt, 12,0)
Ac							21,19-20,51	2,25-1,96	21,19-20,51	2,25-1,96

\* O número de átomos de hidrogênio foi deduzido com base na análise comparativa dos espectros de RMN <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C-DEPT.

**Tabela 2.** Resultado do teste da atividade antioxidante com extrato e substâncias usando o método do sequestro de radical DPPH

Substâncias	Concentração (mg/mL)		IC <sub>50</sub> (mg/mL)
	1,0	0,1	
Trolox	99,9%	99,8%	2,6 X 10 <sup>-3</sup>
Vit-C	99,8%	92,8%	4,3 X 10 <sup>-2</sup>
LSFE	99,9%	99,5%	1,63 X 10 <sup>-2</sup>
<b>1</b>	NA	NA	NA
<b>2</b>	64,7%	25,2%	0,72
<b>3/4</b>	99,9%	99,6%	1,62 X 10 <sup>-2</sup>
<b>5/6</b>	99,9%	99,8%	2,50 x 10 <sup>-3</sup>

LSFE – Extrato EtOH das folhas; **1** – tecomaquinona; **2** – naringenina; **3/4** – mistura de flavonoides; **5/6** – mistura de di-hidrochalconas; NA – não apresentou atividade.

encontrada para o extrato de *L. sidoides* pode ser atribuída à presença de substâncias flavonoidicas, o que justifica em parte o uso desta espécie na medicina popular.

## CONCLUSÃO

Estudo fitoquímico da espécie *Lippia sidoides* cultivada no Horto de Plantas Mediciniais-UFC resultou no isolamento e identificação de 6 compostos, dos quais 3 são inéditos na espécie [o

flavonoide naringenina (**2**), a mistura de flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavanona (**3**) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (**4**) e a mistura de di-hidrochalconas 2'-O-β-D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**5**) e 2'-O-β-D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**6**)] e os outros já foram reportados [a naftoquinona tecomaquinona (**1**), o monoterpene carvacrol e o esteroide β-sitosterol].

O estudo apresentou alguns constituintes químicos diferentes daqueles já registrados. Este fato pode estar relacionado a diferentes locais de coleta, um no habitat natural e outro de planta cultivada. Extratos, flavonoides e outros constituintes apresentaram significativa atividade antioxidante, semelhante a padrões, no ensaio de inibição de radicais usando DPPH. Este representa o primeiro registro desta atividade em substâncias isoladas desta espécie.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Às instituições de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, PRONEX e FUNCAP pelos auxílios financeiros, ao CENAUREMN-UFC pelos espectros RMN, Programa de Pós-graduação em Química - UFC e FA-PERJ pela Bolsa de Pesquisador Visitante Emérito concedida a R. B. F.



## REFERÊNCIAS

1. Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201.
2. Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Assunção, J. C. C.; Braz-Filho, R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*, 66.
3. Costa, A. S.; Arrigoni-Blank, M. F.; Blank, A. F.; Mendonça, A. B.; Amancio, V. F.; Ledo, A. S.; *Hortic. Bras.* **2007**, *25*, 68; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Clark, A. M.; McChesney, J. D.; *Phytother. Res.* **1990**, *4*, 82; Fontenelle, R. O. S.; Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Kerntopf, M. R.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Tome, A. R.; Queiroz, M. G. R.; Nascimento, N. R. E.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. E. G.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 934; Monteiro, M. V. B.; Leite, A. K. R. D. M.; Bertini, L. M.; Morais, S. M.; Nunes-Pinheiro, D. C. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 378; Carvalho, A. F. U.; Melo, V. M. M.; Craveiro, A. A.; Machado, M. I. L.; Bantim, M. B.; Rabelo, E. F.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 569.
4. Matos, F. J. A.; Sousa, M. P.; Matos, M. E. O.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*, 2ª ed., Edições UFC: Fortaleza, 2004.
5. Santos, A. K. L.; Assunção, J. C. C.; Fonseca, A. M.; Pessoa, O. D. L.; Monte, F. J. Q.; Lemos, T. L. G.; Braz-Filho, R.; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 582; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R.; *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 908; Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Pessoa, C.; Braz-Filho, R.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 792; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Clark, A. M.; McChesney, J. D.; *Phytother. Res.* **1990**, *4*, 82.
6. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>, acessada em Setembro 2010.
7. Hegazi, A. G.; Hady, F. K. A.; *Z. Naturforsch. C: J. Biosci.* **2002**, *57*, 395.
8. Macari, P. T. A.; Emerenciano, V. P.; Ferreira, Z. M. G. S.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 260.
9. Macambira, L. M. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 1985.
10. Niwa, M.; Otsuji, S.; Tatematsu, H.; Liu, G. Q.; Chen, X. F.; Hirata, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3249.
11. Agrawal, P. K.; Thakur, R. S.; Bansal, M. C. Em *Carbon-13 NMR of Flavonoids*; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier: Amsterdam, 1989.
12. Lu, Y.; Foo, L. Y.; *Food Chem.* **1997**, *59*, 187.
13. Bernonville, T. D.; Guyot, S.; Paulin, J.; Gaucher, M.; Loufrani, L.; Henrion, D.; Derbré, S.; Guilet, D.; Richomme, P.; Dat, J. F.; Brisset, M.; *Phytochemistry* **2010**, *71*, 443; Hilt, P.; Schieber, A.; Yildirim, C.; Arnold, G.; Klaiber, I.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Carle, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2896.
14. Harborne, J. B.; *The Flavonoids: advances in research since 1980*, Chapman and Hall: London, 1988.

## Dihidrochalconas isoladas de *Lippia sidoides* e atividade antioxidante

Macia Cleane Soares de Almeida<sup>1</sup> (PG), Leonardo Alcântara Alves<sup>1</sup> (PG), Luciana Gregório da S. Souza<sup>1</sup> (PG), Luciana Lucas Machado<sup>1</sup> (PQ), Raimundo Braz-Filho<sup>2</sup> (PQ), Telma Leda Gomes de Lemos<sup>1</sup> (PQ)\*

<sup>1</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará

\*tlemos@dqoi.ufc.br

<sup>2</sup> Pesquisador Visitante Emérito – FAPERJ/UENF/UFRRJ Campos dos Goytacazes - RJ

Palavras Chave: *Lippia sidoides*, dihidrochalconas, DPPH.

### Introdução

A espécie *Lippia sidoides* (Verbenaceae) é conhecida popularmente como alecrim-pimenta e é encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte.<sup>1</sup> Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como constituintes principais, os quais apresentam propriedades anti-séptica, antimicrobiana, larvicida, antioxidante.<sup>2</sup> Em virtude destas propriedades, este vegetal faz parte das plantas selecionadas pelo Governo do Estado do Ceará e pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para produção de fitoterápico. O objetivo deste trabalho é relatar o isolamento de constituintes desta espécie, bem como reportar a atividade antioxidante pelo processo de inibição de radical (DPPH)<sup>3</sup> do extrato etanólico das folhas e das substâncias isoladas.

### Resultados e Discussão

O extrato etanólico das folhas (37,0 g) foi adsorvido em gel de sílica e submetido a fracionamento cromatográfico utilizando como eluentes hexano, AcOEt e MeOH puros ou em ordem crescente de polaridade, fornecendo as respectivas frações após evaporação do solvente. A fração AcOEt (2,0 g) foi submetida a sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica possibilitando o isolamento da mistura de dihidrochalconas (157,0 mg), as quais foram identificadas como 2'-O-β-D-glicopiranosil-3',4,4',6'-tetrahidroxidihidrochalcona (**1**) e 2'-O-β-D-glicopiranosil-4,4',6'-trihidroxidihidrochalcona (**2**) (Figura 1). A elucidação estrutural das substâncias foi realizada através de métodos espectrométricos, tais como IV, EM e, principalmente RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D), além de comparação com valores da literatura. O extrato etanólico e as dihidrochalconas isoladas foram submetidos à teste de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), comparado com padrões Trolox e Vitamina C. O extrato EtOH e as substâncias apresentaram significativa atividade de inibição de radical DPPH, cujos resultados encontram-se na Tabela 1. A mistura **1/2** apresentou atividade antioxidante semelhante ao Trolox, o que pode justificar parcialmente o uso da *Lippia* na medicina popular.

Figura 1. Dihidrochalconas isoladas de *L. sidoides*.

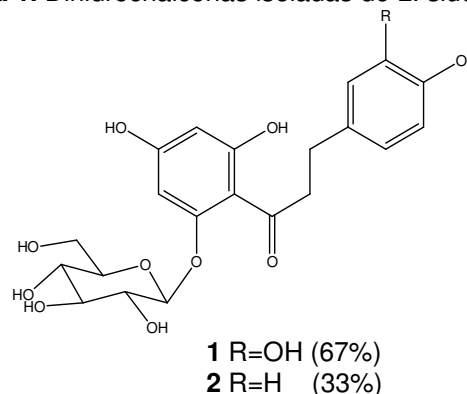


Tabela 1. Determinação da atividade antioxidante do extrato e dihidrochalconas usando radical livre DPPH.

Amostras	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Extrato EtOH	1,63x10 <sup>-2</sup>
Dihidrochalconas	2,50 x 10 <sup>-3</sup>
Trolox	2,6x10 <sup>-3</sup>
Vitamina C	4,3x10 <sup>-2</sup>

### Conclusões

O estudo fitoquímico das folhas da espécie *Lippia sidoides* levou ao isolamento e identificação da mistura de dihidrochalconas **1/2**, que estão sendo reportadas pela primeira vez na espécie, sendo **1** inédita na literatura. O extrato etanólico das folhas e a mistura de dihidrochalconas apresentaram significativa atividade antioxidante, com valores semelhantes aos padrões.

### Agradecimentos

CAPES, CNPq, Funcap e Pronex.

<sup>1</sup> Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Assunção, J. C. C.; Braz-Filho, R. Rev. Bras. Farmacogn. **2002**, 12, 66.

<sup>2</sup> Costa, A. S.; Arrigoni-Blank, M. F.; Blank, A. F.; Mendonça, A. B.; Amancio, V. F.; Ledo, A. S. Hort. Bras. **2007**, 25, 68.

<sup>3</sup> Hegazi, A. G.; Hady, F. K. A. Z. Naturforsch **2002**, 57c, 395.

## Flavonóides das folhas de *Lippia sidoides* e Atividade Antioxidante

Macia Cleane Soares de Almeida<sup>1</sup> (IC), Leonardo Alcântara Alves<sup>1</sup> (PG), Luciana Lucas Machado<sup>1</sup> (PG), Raimundo Braz-Filho<sup>2</sup> (PQ), Telma Leda Gomes de Lemos<sup>1</sup> (PQ)\*

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará

\*tlemos@dqi.ufc.br

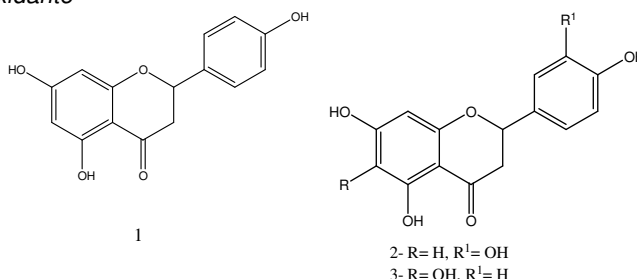
Palavras Chave: *Lippia sidoides*, flavonóides, atividade antioxidante

### Introdução

*Lippia sidoides* é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, popularmente conhecida como "alecrim pimenta". Caracteriza-se por ser um arbusto, ereto, bastante ramificado e quebradiço, medindo aproximadamente de 2-3 m de altura<sup>1</sup>. Comum na vegetação da caatinga compreendida entre os municípios de Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE<sup>2</sup>. Trata-se de uma planta aromática largamente usada na medicina popular, principalmente por suas propriedades antimicrobianas e antisséptica<sup>3</sup>. O objetivo deste trabalho é relatar o isolamento de constituintes desta espécie, bem como reportar a atividade antioxidante pelo processo de inibição de radical (DPPH) do extrato etanólico das partes aéreas e das substâncias isoladas.

### Resultados e Discussão

O extrato etanólico das folhas, foi submetido a sucessivas cromatografias em gel de sílica, possibilitando-se o isolamento e identificação do monoterpene carvacrol, do flavonóide narigenina **1**, além de uma mistura de dois flavonóides identificados como 2,3-di-hidro-5,7-di-hidroxi-2(3,4-dihidroxifenil)croman-4-ona (taxifolina) **2** e 5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6-metoxi-4H-cromen-4-ona **3**. O extrato etanólico das raízes, após cromatografia sucessivas em sílica gel resultou no isolamento e identificação da naftoquinona tecomaquinona, previamente reportada nesta espécie. A elucidação estrutural das substâncias foi realizada através de análises espectrométricas de Ressonância Magnética uni (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e bidimensional possibilitando atribuição inequívoca dos sinais de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, por Infravermelho (IV), e ainda por comparação com dados da literatura. O extrato etanólico e os flavonóides isolados foram submetidos à teste de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), usando como padrões Trolox e Vitamina C. O extrato e as substâncias apresentaram significativa atividade de inibição de radical DPPH com IC<sub>50</sub> (mg/mL) com 0,72 para narigenina e 1,62x10<sup>-2</sup> da mistura de flavonóides 2 e 3, que estão mostrados na Tab. 1.



**Tabela 1.** Determinação da atividade antioxidante do extrato e dos flavonóides usando radical livre DPPH

Amostras	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Trolox	2,6x10 <sup>-3</sup>
Vitamina C	4,3x10 <sup>-2</sup>
Extrato	1,63x10 <sup>-2</sup>
Narigenina	0,72
2 e 3	1,62x10 <sup>-2</sup>

### Conclusões

O estudo fitoquímico das folhas da espécie *Lippia sidoides* levou ao isolamento e a identificação dos flavonóides narigenina, e da mistura 2 e 3, que estão sendo reportados pela primeira vez na espécie. O extrato etanólico das folhas e mistura dos flavonóides apresentaram significativa atividade antioxidante, enquanto a narigenina apresentou moderada atividade de inibição.

### Agradecimentos

UFC e CNPq.

<sup>1</sup> COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. "Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro". Horticultura Brasileira, vol. 25, n. 1, p. 68 - 72, jan. - mar., (2007).

<sup>2</sup> MATOS, F. J. A. (1998). Farmácias Vivas. Edições UFC, CE. 219p.

<sup>3</sup> COSTA, S. M. C.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. "Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae". Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 12, p. 66 - 67, (2002).