



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**ACSA OLIVEIRA MAGALHÃES**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM  
AÇÃO ESPASMOLÍTICA DE FOLHAS DE *Lippia thymoides*  
MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)**

**ACSA OLIVEIRA MAGALHÃES**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM  
AÇÃO ESPASMOLÍTICA DE FOLHAS DE *Lippia thymoides*  
MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica Maria Lucchese

Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Feira de Santana - BA  
2018

## BANCA EXAMINADORA



**Dr.<sup>a</sup> Darizy Flavia Silva Amorim de Vasconcelos**  
(Universidade Federal da Bahia)



**Dr. Clayton Queiroz Alves**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



**Dra. Angélica Maria Lucchese**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA**  
**2018**

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

M164i Magalhães, Acsa Oliveira

Isolamento e identificação de substâncias com ação  
espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER  
/ Acsa Oliveira Magalhães. – 2018.

123 f.: il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese

Co-orientador: Fabrício Souza Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

1. *Lippia thymoides* – Alecrim-do-campo 2. Fitoquímica – Plantas.  
I. Lucchese, Angélica Maria, orient. II. Silva, Fabrício Souza, coorient.  
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.949.1

Tatiane Souza Santos - Bibliotecária CRB5/1634

*Ao meu filho Davi*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por estar presente em minha vida me dando força para nunca desistir.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e compreensão em toda fase e realização deste trabalho, em especial ao meu filho Davi.

À Uefs, principalmente ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e seus docentes, em especial à minha orientadora e coorientador, pela generosidade.

À CAPES e FAPESB pelo financiamento da pesquisa.

Ao pessoal da Univasf (LAFEX e CAFMA) pela colaboração desta pesquisa, em especial a professora Edigênia Cavalcante, Mariana Brito e Ana Paula, pela dedicação.

Aos professores titulares da banca examinadora defesa dissertação que contribuíram para a melhoria do trabalho.

E aos integrantes do LAPRON, principalmente Aline, Edna, Horácio, Ingrid, Jade, Naara, Joseane e Taris pela amizade e companheirismo, que tornou essa jornada muito mais leve, muito obrigada!

## RESUMO

*Lippia thymoides*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou alecrim-do-mato, pertence à família Verbenaceae. É encontrada nos estados de Minas Gerais e Bahia, sendo utilizada como medicinal pela população em problemas do sistema respiratório. Esse trabalho objetivou isolar, identificar e investigar a ação espasmolítica *in vitro* de compostos da fração em diclorometano das folhas de *L. thymoides*. As folhas foram coletadas em Feira de Santana (Bahia) e após moagem foram submetidas a maceração em metanol. O fracionamento do extrato bruto (LTB) foi realizado por partição líquido-líquido para obtenção das frações em hexano, diclorometano (LTD) e acetato de etila. A fração em diclorometano foi subfracionada por cromatografia em coluna. As substâncias isoladas (um triterpeno, a mistura de dois fitoesteróis e seis flavonoides) foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparadas com a literatura para elucidação. LTB, LTD e as substâncias isoladas foram testadas em traqueia isolada de *Cavia porcellus*. Foram isolados a 3,5-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona; 7,4'-dimetilaromadendrina; rhamnocitrina; eupalitina; mistura de hispidulina e jaceosidina;  $\alpha$ -amirina; e a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. A mistura de flavonas [( $\text{CE}_{50}$  = 15,19  $\mu\text{g/mL}$  (12,86 – 17,93)] foi a mais efetiva na atividade espasmolítica, alcançando o  $\text{E}_{\text{máx}}$  de 100% na concentração de 81  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados demonstraram que a espécie é promissora para a obtenção de compostos com potente ação relaxante sobre o músculo liso de traqueia isolada de cobaia.

**Palavras-chave:** Fitoquímica. Flavonoides. Triterpenos. Fitoesteróis. Músculo liso.

## ABSTRACT

*Lippia thymoides*, commonly known as “alecrim-do-campo” or “alecrim-do-mato”, belongs to the Verbenaceae family. This specie is found in the states of Bahia and Minas Gerais being used in folk medicine by their population. The aim of this work was to isolate and identify compounds of dichloromethane fraction from *L. thymoides* leaves and to evaluate their *in vitro* spasmolytic activity. The leaves were collected at the Feira de Santana (Bahia), grinded and extracted with methanol. The crude extract (LTB) fractionation was performed using liquid-liquid partition to obtain the hexane, dichloromethane (LTD) and ethyl acetate fractions. Dichloromethane fraction was sub fractioned by column chromatography. Isolated compounds (one triterpene, a mix of two phytosterols and six flavonoids) were analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C RMN and compared with literature data for structure elucidation. 3,5-dihydroxy-7,4'-methoxyflavolol; 7,4'-dimitylaromadendrin; rhamnocitrin; eupalitin; mixture of hispidulin and jaceosidin;  $\alpha$ -amirin; and the mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were isolated. The spasmolytic activity of LTB, LTD and isolated compounds was tested in *Cavia porcellus* removed trachea. The mix of flavones [(CE<sub>50</sub> = 15,19  $\mu$ g/mL (12,86 – 17,93)] showed the highest spasmolytic activity reaching the E<sub>max</sub> of 100% at a concentration of 81  $\mu$ g/mL. The results demonstrate that *L. thymoides* is a potential source of bioactive compounds with strong action relaxing on the smooth muscle of trachea isolated from guinea pig.

**Keywords:** Phytochemicals. Flavonoids. Triterpenes. Phytosterols. Smooth muscle.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Distribuição do gênero <i>Lippia</i> no mundo	22
<b>Figura 2:</b> <i>Lippia thymoides</i>	26
<b>Figura 3:</b> Mecanismo da contração muscular lisa	30
<b>Figura 4:</b> Mecanismo do relaxamento do músculo liso	31
<b>Figura 5:</b> Monoterpenos com ação espasmolítica	34
<b>Figura 6:</b> Sesquiterpenos com ação espasmolítica	35
<b>Figura 7:</b> Di e triterpenos com ação espasmolítica	36
<b>Figura 8:</b> Flavonoides com ação espasmolítica	38
<b>Figura 9:</b> Lignana, alcaloides e esteroide com ação espasmolítica	40
<b>Figura 10:</b> Exsicata e ficha de identificação de <i>Lippia thymoides</i>	43
<b>Figura 11:</b> Processo para obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de <i>L. thymoides</i>	44
<b>Figura 12:</b> Perfil cromatográfico em CCD da fração Diclorometano das folhas de <i>L. thymoides</i>	45
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir do extrato metabólico bruto (LTB) das folhas de <i>L. thymoides</i>	47
<b>Figura 14:</b> Esquema simplificado do equipamento e dos aparelhos utilizados nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i>	53
<b>Figura 15:</b> substância LT1-C4 (3,5-di-hidroxi-7,4'-metoxiflavona) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de <i>L. thymoides</i>	54

<b>Figura 16:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>LT1-C4</b> [400 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	55
<b>Figura 17:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra <b>LT1-C4</b> [100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	56
<b>Figura 18:</b> Espectro de HSQC do composto <b>LT1-C4</b>	57
<b>Figura 19:</b> Expansão do espectro de HSQC do composto <b>LT1-C4</b>	57
<b>Figura 20:</b> Espectro de HMBC do composto <b>LT1-C4</b>	58
<b>Figura 21:</b> Expansão da região de $\delta$ 8,5 a 5,9 do espectro de HMBC do composto <b>LT1-C4</b> e correlações assinaladas	58
<b>Figura 22:</b> Estrutura da substância <b>LT5-C5</b> (rhamnocitrina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de <i>L. thymoides</i>	60
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>LT5-C5</b> [400 MHz, DMSO, $\delta$ (ppm)]	61
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra <b>LT5-C5</b> [100,62 MHz, DMSO, $\delta$ (ppm)]	62
<b>Figura 25:</b> Expansão do espectro de HSQC do composto <b>LT5-C5</b>	63
<b>Figura 26:</b> Espectro de HMQC do composto <b>LT5-C5</b>	64
<b>Figura 27:</b> Expansão da região de $\delta$ 8,5 a 5,9 do espectro de HMBC do composto <b>LT5-C5</b> e correlações assinaladas	64
<b>Figura 28:</b> Estrutura da substância <b>LT5-C6</b> (5,7-dihidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de <i>L. thymoides</i>	65
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>LT5-C6</b> (2) [400 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	66
<b>Figura 30:</b> Expansão do região de $\delta$ 8,0 a $\delta$ 6,0 do espectro de RMN de $^1\text{H}$	66

da amostra **LT5-C6** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

**Figura 31:** Expansão da região de δ 6,4 a δ 7,6 do espectro COSY **LT5-C6** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 67

**Figura 32:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da amostra **LT5-C6** [100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 68

**Figura 33:** Espectro de HSQC do composto **LT5-C6** 69

**Figura 34:** Espectro de HMBC do composto **LT5-C6** 69

**Figura 35:** Expansão do espectro de HMBC do composto **LT5-C6** e correlações assinaladas 70

**Figura 36:** Expansão do espectro de HMBC do composto **LT5-C6** e correlações assinaladas 70

**Figura 37:** Estrutura das duas flavonas presentes em LT5-C9 isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*. **I-** hispidulina e **II-** jaceosidina 73

**Figura 38:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 74

**Figura 39:** Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C na região entre δ 147 e δ 183 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 74

**Figura 40:** Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C na região entre δ 146 e δ 165 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 75

**Figura 41:** Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C na região entre δ 92 e δ 132 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 75

**Figura 42:** Espectro de DEPT 135 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 76

**Figura 43:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **LT5-C9** [400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ (ppm)] 81

<b>Figura 44:</b> Expansão da região de $\delta$ 6,4 a $\delta$ 7,6 do espectro COSY de <b>LT5-C9</b>	81
<b>Figura 45:</b> Expansão do espectro de HSQC de <b>LT5-C9</b> e atribuições assinaladas para flavona I (FI) e flavona II (FII)	82
<b>Figura 46:</b> Espectro de HMBC de <b>LT5-C9</b>	82
<b>Figura 47:</b> Expansão do espectro de HMBC de <b>LT5-C9</b> e correlações assinaladas para flavona I (FI) e flavona II (FII)	83
<b>Figura 48:</b> Expansão do espectro de HMBC da amostra <b>LT5-C9</b> e correlações assinaladas	83
<b>Figura 49:</b> Estrutura da substância <b>LT1-C12</b> (7,4'-dimetilaromadendrina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de <i>L. thymoides</i>	84
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>LT1-C12</b> [400 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	84
<b>Figura 51:</b> Expansão do espectro de COSY da amostra <b>LT1-C12</b> [400 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	85
<b>Figura 52:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra <b>LT1-C12</b> [100 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	86
<b>Figura 53:</b> Expansão do espectro de HSQC do composto <b>LT1-C12</b>	87
<b>Figura 54:</b> Expansão da região de $\delta$ 7,6 a 5,8 do espectro de HMBC do composto <b>LT1-C12</b> e correlações assinaladas	87
<b>Figura 55:</b> Estruturas das substâncias presentes em S3-C13 isoladas da fração LTD obtida a partir das folhas de <i>L. thymoides</i> . <b>A</b> -estigmasterol; <b>B</b> - $\beta$ -sitosterol	89
<b>Figura 56:</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>S3-C13</b> [400 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]	90
<b>Figura 57:</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <b>S3-C13</b> [400	90

MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

- Figura 58:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **S3-C13** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 91
- Figura 59:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da amostra **S3-C13** [100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 92
- Figura 60:** Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da amostra **S3-C13** [100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 92
- Figura 61:** Estrutura da substância **LT6-C15** (α-amirina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides* 95
- Figura 62:** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **LT6-C15** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 96
- Figura 63:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **LT6-C15** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 96
- Figura 64:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **LT6-C15** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 97
- Figura 65:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra **LT6-C15** [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 97
- Figura 66:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da amostra **LT6-C15** [100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] 98
- Figura 67:** Espectro de DEPT 135 de **LT6-C15** 98
- Figura 68:** Efeito relaxante de *L. thymoides* em músculo liso traqueal em contrações induzidas por carbacol 101
- Figura 69:** 3,6-dimetil galetina 103
- Figura 70:** Compostos isolados da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides* 104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Gradiente de eluição aplicado à fração diclorometano das folhas de <i>L. thymoides</i> na cromatografia líquida	46
<b>Tabela 2:</b> Frações reunidas (CC), após análise em CCD, obtidas por cromatografia em sílica gel 60 a partir da fração em diclorometano	46
<b>Tabela 3:</b> Gradiente de eluição aplicado a G2 na cromatografia líquida	48
<b>Tabela 4:</b> Grupos de frações reunidas de F2	48
<b>Tabela 5:</b> Grupos de frações reunidas de F5	49
<b>Tabela 6:</b> Gradiente de eluição aplicado a F8 na cromatografia líquida	49
<b>Tabela 7:</b> Grupos de frações reunidas de F8	50
<b>Tabela 8:</b> Rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto (LTB) das folhas de <i>L. thymoides</i>	54
<b>Tabela 9:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT-C4</b> [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	59
<b>Tabela 10:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT5-C5</b> [400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	65
<b>Tabela 11:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT5-C6</b> [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	72
<b>Tabela 12:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da flavona I de <b>LT5-C9</b> [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)] e comparação com a literatura	78
<b>Tabela 13:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT5-C9</b> [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	80

<b>Tabela 14:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT1-C12</b> [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	88
<b>Tabela 15:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>S3-C13</b> [100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	94
<b>Tabela 16:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ de <b>S3-C13</b> [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	94
<b>Tabela 17:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ de <b>LT6-C15</b> [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)]	99
<b>Tabela 18:</b> Efeito espasmolítico do extrato e frações das folhas de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol 1 $\mu\text{M}$ em traqueia isolada de cobaia	100

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**AMPc** - Monofosfato Cíclico de Adenosina

**CaM** - Proteína Calmadolina

**CCh** - Carbacol

**COSY** – do inglês *Correlation Spectroscopy*

**d** - Duplete

**DAG** - Diacilglicerol

**dd** - Duplo Duplete

**ddd** - Duplo duplo duplete

**DEPT-135°** - do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* –  
ângulo 135°

**DHP** - Didropiridina

**DMSO** - Sulfóxido de Dimetilo

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**EAG** – Equivalente de Ácido Gálico

**EM** - Espectrometria de Massas

**EQ** - Equivalentes de Quercentina

**GDP** - Difosfato de Guanisina



**GPCR** - Receptor do tipo acoplado a proteína G

**GTP** - Trifostato de Guanasina

**HMBC** – do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

**HMQC** – do inglês *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

**HPLC**- do inglês *High performance Liquid Chromatography*

**HSQC** - Heteronuclear Single Quantum Coherence

**IP<sub>3</sub>** - Inositol 1,4,5-trisfosfato

**IP<sub>3</sub>R** - Receptor de Inositol Trifosfato do Retículo Sarcoplasmático

**J** - Constante de acoplamento escalar

**LT1-C12** - 7,4'-dimetilaromadendrina

**LT1-C4** - 3,5-di-hidroxi-7,4'-metoxiflavona

**LT5-C5** – Ramnocitrina

**LT5-C6** – eupalitina

**LT5-C9** - mistura de hispidulina e jaceosidina

**LT6-C15** -  $\alpha$ -amirina

**LTA** – Fração em Acetato de Etila

**LTD** – Fração em Diclorometano

**LTH** – Fração em Hexano

**m** - Multipleteo

**M<sub>3</sub>** - Receptor Muscarínico

**MAPKs** - regulador de proteínas cinases ativadas por mitógeno

**MLC** - Cadeia leve de Miosina

**MLCK** - Cinase de Cadeia Leve de Miosina

**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E2

**PIP<sub>2</sub>** - Inositol 4,5-bifosfato

**PKC** - Proteína Cinase C

**PLC** – Enzima Fosfolipase C

**dq** - Duplo quarteto

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**ROCC** - do inglês *Receptor-Operated Calcium Channels*

**RyR** - Receptores de Rianodina

**s** - Simpleto

**S3-C13** - Mistura de estigmasterol com β-sitosterol

**sl** - simpleto largo

**SOCC** - do inglês *Store-Operated Calcium Channels*

**t** – tripleto

**td** - tripleto duplo

**VOCC** - do inglês *Voltage-Operated Calcium Channels*

**δ** - Deslocamento Químico

**φ** - Diâmetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
2.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	21
2.2 FAMÍLIA VERBENACEAE (GÊNERO <i>LIPPIA</i> )	21
<b>2.2.1 <i>Lippia thymoides</i></b>	<b>25</b>
2.3. METABÓLITOS VEGETAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS	27
2.4. MÚSCULO LISO E ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA	28
<b>2.4.1 Potencial espasmolítico de substâncias isoladas de planta</b>	<b>32</b>
3. METODOLOGIA	41
3.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS	41
3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	43
3.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO BRUTO	44
3.4 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS FRAÇÕES	44
3.5 PURIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO	45
<b>3.5.1 Fracionamento Cromatográfico de F2</b>	<b>48</b>
<b>3.5.2 Fracionamento Cromatográfico de F5</b>	<b>48</b>
<b>3.5.3 Fracionamento Cromatográfico de F8.</b>	<b>49</b>
3.6 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	50
3.7 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA	51
<b>3.7.1 Animais</b>	<b>51</b>
<b>3.7.2 Avaliação da atividade espasmolítica em traqueia isolada de cobaia</b>	<b>51</b>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	54
4.2 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Lippia thymoides</i>	54

<b>4.2.1 Elucidação Estrutural da substância LT1-C4</b>	<b>54</b>
<b>4.2.2 Elucidação Estrutural da substância LT5-C5</b>	<b>60</b>
<b>4.2.3 Elucidação Estrutural da substância LT5-C6</b>	<b>65</b>
<b>4.2.4 Elucidação Estrutural da substância LT5-C9</b>	<b>72</b>
<b>4.2.5 Elucidação Estrutural da substância LT1-C12</b>	<b>83</b>
<b>4.2.6 Elucidação Estrutural da substância S3-C13</b>	<b>88</b>
<b>4.2.7 Elucidação Estrutural da substância LT6-C15</b>	<b>95</b>
<b>4.3 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA in vitro DE <i>L. thymoides</i></b>	<b>99</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira possui a maior biodiversidade do planeta, que pode auxiliar no tratamento e prevenção de várias doenças. Se no passado contava-se apenas com o conhecimento empírico, hoje, a população dispõe de pesquisas científicas que comprovam as propriedades medicinais de várias plantas, atestando, por vezes, sua eficiência (BRASIL, 2006).

A grande biodiversidade e o alto grau de endemismo observado no bioma caatinga justificam o enorme potencial dessa vegetação no isolamento de novos compostos terapêuticos. A importância de utilizar este patrimônio natural deve ser enfatizada na comunidade científica, pois menos de 10% dos extratos biologicamente ativos têm sido quimicamente investigados (MARQUES et al., 2016).

No Brasil, as plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) são empregadas na medicina tradicional no tratamento de enfermidades diversas, como ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória, antipirética, efeito antisséptico, no combate à sarna e no tratamento da tosse e bronquite (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). Em estudos farmacológicos foram comprovadas as atividades antimalárica, antiviral e citostática de algumas espécies (PASCUAL et al., 2001).

A investigação de compostos ativos com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas possuem uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: asma, arritmias cardíacas, angina do peito, disfunção erétil, diarreias, espasmos tanto renais como intestinais e uterinos (CORREIA, 2013).

Há relatos de que a espécie *Lippia thymoides* é utilizada em feridas, no tratamento de bronquite, reumatismo e febre (FUNCH et al., 2004). Estudos fitoquímicos e farmacológicos *in vitro* de *L. thymoides* foram realizados por Silva (2012), testando tanto os óleos essenciais quanto os extratos e frações das folhas e caule, sobre diversos tipos de músculos lisos. Dentre as amostras analisadas, a fração em diclorometano oriunda do extrato metanólico da folha foi a que apresentou um maior potencial espasmolítico.

Nesse sentido, é notória a necessidade de isolar e identificar os possíveis constituintes ativos da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas, a qual foi a mais ativa para a ação testada, em estudos anteriores (SILVA, 2012). Em síntese, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar compostos obtidos da fração diclorometano das folhas de *L. thymoides*, a fim de avaliar sua provável ação espasmolítica *in vitro*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

O Brasil é um país com a maior biodiversidade do planeta, com uma biota estimada 20% do número total de espécies da Terra eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (BRASIL, 2018). Porém, pouco dessa biodiversidade foi devidamente conhecida quanto à composição química e aplicabilidade, portanto, é de suma importância a realização de estudos científicos, para que ocorra uma ampliação dos conhecimentos a respeito das propriedades farmacológicas, terapêuticas e cosméticas de sua flora (GUERRA; NODARI, 2001).

Muitos fármacos são obtidos diretamente de produtos naturais, por meio de processos extrativos, em geral a partir do cultivo de plantas que os originaram, como, por exemplo artemisinina, cafeína, morfina, digoxina, atropina, entre outros (PINTO et al., 2002). Além disso, os produtos vegetais também contribuem na busca e identificação de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

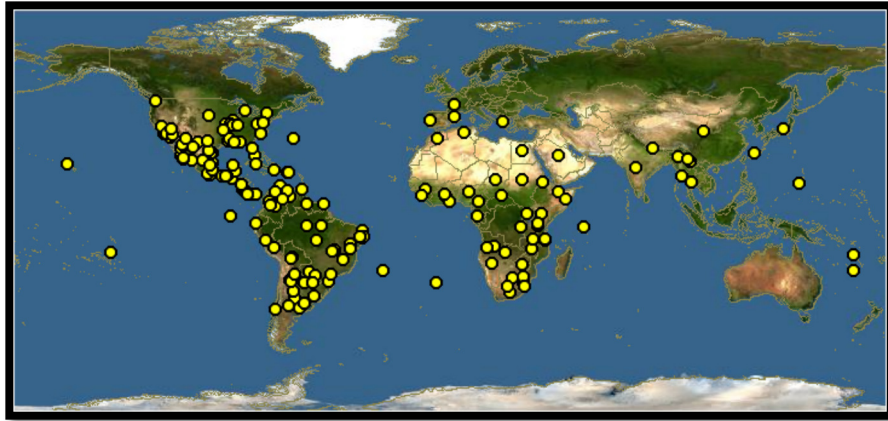
Assim, partindo do pressuposto de que a forma farmacêutica é desenvolvida por um ou mais elementos/ingredientes ativos, autores pela atividade farmacológica, e por adjuvantes, substâncias que possibilitam a obtenção, a administração e a manutenção do atributo ao medicamento, deve-se considerar a colaboração dos produtos naturais como provedores de insumos para essas categorias de matérias-primas farmacêuticas (VIEGAS JR; BOLZANII; BARREIRO, 2006).

### 2.2. FAMÍLIA VERBENACEAE (GÊNERO *LIPPIA*)

Abrangendo aproximadamente 31 gêneros e 920 espécies, com 16 gêneros encontrados no Brasil, a família Verbenaceae se distribui sobretudo na África, América do Sul tropical e subtropical, com centro de origem na Ásia Central, Japão, Ilhas Indianas, assim como, em menor proporção na Ásia Menor, Europa e América do Norte (BERRY, 2018).

O maior gênero da família é o *Verbena*, com cerca de 250 espécies, seguido de *Lippia* com 200 espécies (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). O gênero *Lippia* encontra-se principalmente na África, América Central, América do Norte, América do Sul e Austrália

(Figura 1), mas são o México e o Brasil que possuem a maior diversidade de espécies (PASCUAL et al., 2001).



**Figura 1:** Distribuição do gênero *Lippia* no mundo  
**Fonte:** DISCOVER LIFE, 2018

Os principais constituintes presentes nos óleos essenciais da família Verbenaceae, de plantas sul-americanas, são mono e sesquiterpenos, como timol,  $\beta$ -cariofileno, citral, 1,8-cineol, carvona e limoneno. Tais componentes podem explicar a ação antimicrobiana e seu efeito sinérgico com antibióticos, pois esses compostos aumentam a permeabilidade das membranas bacterianas, provocando-lhes lise celular (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

No Brasil, há registro de 82 espécies de *Lippia*, distribuídas em todas as regiões do país. Porém, a maioria está localizada nos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, principalmente no Cerrado e na Caatinga (FLORA DO BRASIL, 2018).

Segundo Gomes e seus colaboradores (2011) as espécies de *Lippia* são largamente utilizadas pela medicina popular: contra bronquite, tosse, resfriados e relaxante muscular. Dentre as espécies estudadas, a *L. alba* (Mill.) é a que possui o maior número de citações (SANTOS et al., 2015).

A espécie *L. salicifolia* Andersson, endêmica da ilha de Floreana, nativa do Equador (Galápagos), é a única do gênero que se encontra na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN *Red List*), descrita como espécie vulnerável (MAUCHAMP et al., 1998). Porém, quatro espécies do gênero *Lippia* (*L. duartei* Moldenke, *L. gardneriana* Schauer, *L. grandiflora* Mart. & Schauer, *L. macedoi* Moldenke) foram reunidas na Lista Vermelha da Flora do Brasil/Plantas raras do Cerrado, todas endêmicas do Brasil, encontram-se ameaçadas devido à intensa urbanização em expansão (MARTINELLI; MESSINA; SANTOS FILHO, 2014).

Existem poucos estudos em relação à composição química dos extratos obtidos das espécies de *Lippia*, já com relação aos seus óleos essenciais, é descrita, frequentemente, a presença de monoterpenos como limoneno, *p*-cimeno, linalol, cânfora e o sesquiterpeno, cariofileno. O óleo essencial da *L. dulcis* demonstrou atividades anticolinérgicas e anti-histaminérgicas, confirmando o uso tradicional da planta no tratamento de broncoespasmo, na América Central e na Europa (GORNEMANN et al., 2008). Ensaios demonstraram que o óleo essencial de *L. sidoides* possui atividade antimicrobiana frente a microrganismos presentes na gengiva e placas dentárias, bem como atividade antifúngica do seu extrato etanólico bruto contra cepas resistentes de *Candida* spp. isoladas de secreções vaginais (FARIAS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Uma formulação de gel combinado também demonstrou que *Myracrodruon urundeuva* (5%) e *L. sidoides* (0,5%) possui atividade protetora do osso alveolar na periodontite induzida em ratos (FREIRES et al., 2018). Os componentes terpenicos comumente encontrados podem explicar a ação antimicrobiana comumente descrita para este gênero (PINTO et al., 2013) e seu efeito sinérgico com antibióticos, como na modulação da resistência bacteriana pelo óleo essencial de *L. gracilis* (BITU et al., 2014), pois esses metabólitos aumentam a permeabilidade das membranas bacterianas, provocando-lhes lise celular (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018).

Os compostos fenólicos são a segunda classe de metabólitos mais citada para este gênero, mas ainda com poucos estudos em comparação aos óleos essenciais. Relatos de isolamento de flavonoides, em especial de flavonas, iridoides e naftoquinonas são os mais frequentes, e tais compostos são geralmente relacionados com atividade antimicrobiana, repelente e larvicida (PASCUAL et al., 2001; GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

Conhecida popularmente como orégano mexicano, a *L. graveolens* H.B.K é uma espécie utilizada como especiaria nos Estados Unidos e México. Do extrato metanólico das suas folhas foram isolados 10 iridoides e derivados: loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosídeo, ácido logânico, ácido 8-epi-logânico, carioptosídeo, carioptosídico, lippiosida I e II (RASTRELLI et al., 1998). Flavonoides foram também identificados nos extratos por LC/DAD/ESI/MS, tais como: luteolina-7-*O*-glicosídeo, apigenina 7-*O*-glicosídeo, floridzina, taxifolina, eriodictiol, escutelareína, luteolina, quercetina, naringenina, pinocembrina, galangina, 6-hidroxluteolina, dois 6-*O*-glicosídeos de 6-hidroxluteolina, três hexosídeos de penta-hidroxi-flavanona, 7-*O*-hexosídeo de escutelareína, 3-hidroxi-floretina hexosídeo e três flavonas (LIN et al., 2007).

A partir das partes aéreas de *L. triphylla* (L'Her) O. Kuntze, espécie bastante utilizada no Peru como especiaria, foram extraídos 25 compostos, sendo três fenilpropanoides



glicosilados, sete flavonoides, cinco feniletanoides glicosilados, cinco lignanas, dois sesquiterpenos e três triterpenos (ONO et al., 2007).

Das raízes de *L. lupulina* Cham, foram isolados e identificados triterpenos (ácido oleanônico e ácido oleanólico); quinonas (estenocarpoquinona e avicequinona E), cromonas (prim-*O*-glicosilcimifigina), flavonoides (7-*O*-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 5)- $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glicopiranosil]-biochanina A), o estilbeno piceíde e o iridoide glicosilado  $\beta$ -dihidroastatosídeo (FURANI, 2010). Já no extrato etanólico de folhas da espécie *L. salviaefolia* Cham., por exemplo, são os flavonoides de diferentes subclasses que se destacaram, como a naringenina; asebogenina; sacuranetina; 6-hidroxi-7-*O*- $\beta$ -glicopiranosil luteolina; eriodictiol-7-*O*- $\beta$ -glicosilpiranosídeo; aromadendrina; floretina; (2*S*) e (2*R*)-3',4',5,6-tetraidroxi-7-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-flavanona; (2*S*) e (2*R*)-3',4',5,8-tetraidroxi-7-*O*- $\beta$ -glicosilpiranosil-flavanona (FURANI, 2010).

Em *L. alba*, *L. organoides*, *L. micromera*, *L. americana*, *L. graveolens* e *L. citriodora* a presença de ácido carnósico, ácido ursólico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina e pinocembrina foi relatada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) (STASHENKO et al., 2013).

Existe uma escassez de trabalhos publicados ou detalhados de suas atividades farmacológicas, associados a identificação ou isolamento químico. A investigação fitoquímica de *L. javanica* levou ao isolamento e identificação de oito compostos (4-etilnonacosano, epóxido de (*E*)-2(3)-tagetenona, mircenona, piperitenona, apigenina, circimaritina, 6-metoxiluteolina 4'-metil éter e 6-metoxiluteolina 3',4',7-trimetil éter). Essas substâncias apresentaram atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* e inibição da transcriptase reversa do HIV-1 (MUJOVO et al., 2008).

Substâncias foram isoladas em processos de fracionamento guiados por testes antioxidantes do extrato etanólico de ramos da espécie *L. salviaefolia* Cham, sendo identificadas: flavanonas glicosiladas, os fenilpropanoides forsitosídeo B, alissonosídeo e verbascosídeo e a epoxilignana laricirresinol 4'-*O*- $\beta$ -glicopiranosil (FURANI, 2010).

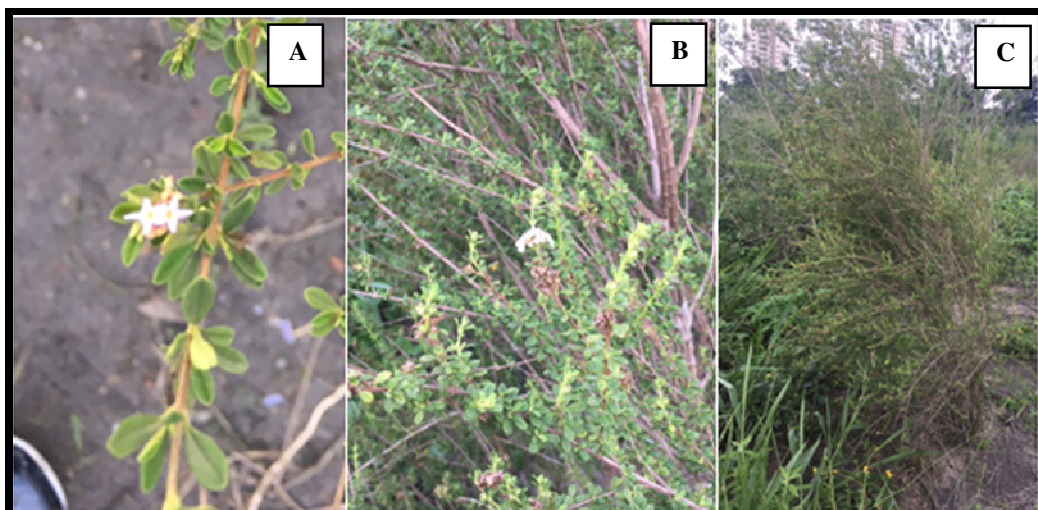
Estudos fitoquímicos, monitorados por testes de atividade antioxidante, foram também realizados para isolar substâncias do extrato etanólico das partes aéreas de *L. salviaefolia* Cham., resultando em quinze compostos isolados e identificados: quatro flavanonas glicosiladas, oito flavonoides e três fenilpropanoides glicosilados. Além disso, os extratos brutos, suas frações ativas e os compostos isolados, inibiram o crescimento de células cancerígenas (FUNARI et al., 2011).

Da espécie *L. sidoides*, foi relatado o isolamento e a identificação de seis substâncias: flavonoide naringenina; a mistura de flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroxiflavanona e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona; mistura de di-hidrochalconas 2'-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona e 2'-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona; a naftoquinona tecomaquinona; o monoterpene carvacrol e o esteroide  $\beta$ -sitosterol. Devido a presença de flavonoides e outros constituintes no extrato, foi descrita uma atividade antioxidante por sequestro de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (ALMEIDA et al., 2010). O extrato etanólico bruto de *L. sidoides* também demonstrou atividade contra quatro linhagens de fungos patogênicos em humanos, sendo a espécie utilizada popularmente com finalidade anti-séptica (FURANI, 2010).

O extrato bruto e frações das partes aéreas de *L. nodiflora* apresentaram uma expressiva atividade antioxidante, dessa maneira, a fração mais ativa passou por purificação, resultando na identificação de uma flavona, a 5-hidroxi-3'4'7-trimetoxiflavona (SUDHA; SRINIVASA, 2014).

### **2.2.1 *Lippia thymoides***

*Lippia thymoides* é nativa e endêmica do Brasil, sua ocorrência foi confirmada no sudeste (Minas Gerais) e nordeste (Bahia), sobretudo nas áreas de vegetação da Caatinga e Cerrado do Brasil (SALIMENA; MULGURA, 2018). É um arbusto de 0,5 a 1,5 m de altura (Figura 2), conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou alecrim-do-mato, a qual é utilizada pela população contra gripe, tosse, cansaço, nariz entupido, febre, reumatismo, digestivo, assim como nos banhos e no candomblé (SILVA; OLIVEIRA; SILVA, 2010; ALMEIDA, 2011; GOMES; BANDEIRA, 2012).



**Figura 2:** *Lippia thymoides*. A – Detalhe das flores, B – Detalhe dos ramos e C – Arbusto na Unidade Experimental Horto Florestal (UEFS)

A *L. thymoides* apresenta quatro sinônimos botânicos descritos na literatura: *L. micromera* var. *tonsilis* Moldenke, *L. satureiaefolia* Mart. & Schauer, *L. thymoides* var. *mucronulata* Moldenke; *L. thymoides* var. *tonsilis* Moldenke (SALIMENA; MULGURA, 2018).

O estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *L. thymoides*, coletadas numa população presente no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana - Bahia, apresentou o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (17,22-26,27%) como constituinte majoritário, seguido por borneol (4,45-7,36%), cânfora (3,22-8,61%), canfeno (2,64-5,66%) e germacreno D (4,72-6,18%). Ensaios *in vitro*, demonstraram a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos, ação antinociceptiva, além de relaxamento da aorta e musculatura uterina de cobaias (SILVA et al., 2015a). Entretanto, no que se refere a outros metabólitos, apenas o isolamento de um iridoide glicosilado (theviridosídeo) foi relatado para *L. thymoides* (POSER et al., 1997).

Com relação a ensaios biológicos, os extratos metanólicos do caule e folhas e suas respectivas frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) apresentaram atividade frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, sendo que a fração que apresentou um maior espectro de atividade foi a em diclorometano, oriunda do extrato metanólico das folhas (SILVA et al., 2015b). Atividade antipirética e espasmolítica também foram relatadas para esses extratos e frações, com destaque para o efeito espasmolítico em traqueia de cobaias da fração em diclorometano das folhas (SILVA, 2012).

A atividade *in vitro* espasmolítica e antidiarreicas *in vivo* do óleo essencial demonstraram que o efeito antidiarreico provavelmente está relacionado à inibição da

contração do músculo liso, podendo haver correlação com a concentração do composto  $\beta$ -cariofileno (MENEZES et al., 2018).

### 2.3. METABÓLITOS VEGETAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS

O metabolismo de plantas é caracterizado por uma rede de reações, coordenada por enzimas e co-enzimas responsáveis pelos processos de síntese e degradação das substâncias que se distribuem nas diversas espécies do Reino Vegetal. Os metabólitos são então produzidos em resposta a fatores externos como: competição por nutrientes, presença de predadores, atração de polinizadores e dispersores de sementes, além de alterações edafoclimáticas (ATANASOV et al., 2015).

Assim, tem-se os metabólitos primários, os quais são considerados essenciais ao desenvolvimento estrutural da planta a exemplo dos carboidratos, proteínas e lipídeos e os metabólitos secundários ou especiais, que apresentam várias funções ecológicas na planta e ao longo dos anos, se apresentaram como uma fonte valiosa no tratamento ou na prevenção de doenças (SIMÕES et al., 2017).

Os fitoesteróis (esteroides de plantas) de ocorrência comum nos vegetais podem ser encontrados na maioria das espécies, principalmente nas plantas superiores. Nos vegetais participa da composição das membranas celulares e no transporte intracelular, além disso, apresenta atividades farmacológicas, destacando-se as ações: antiviral, anti-inflamatória, na diminuição do colesterol total e na arteriosclerose (EPINDOLA, 2006; DROZDOVA, 2007; CUI, 2008). O  $\beta$ -sitosterol é um tipo de fitoesterol que apresenta diversas propriedades biológicas, a exemplo do potencial alelopático. Do ponto de vista farmacológico destacam-se as ações antiviral e anti-inflamatória e a atividade contra alguns tipos de células cancerígenas (MISHARIN, 2008).

Um dos grupos de metabólitos secundários são os flavonoides, que se apresentam como uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição e encontrados nas plantas, principalmente, na forma de glicosídeos. Diversas funções são atribuídas a esses constituintes, dentre elas podem-se citar: proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de polinizadores; proteção contra a radiação ultravioleta devido às suas propriedades antioxidantes e agentes alelopáticos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

Muitas plantas com propriedades medicinais são ricas em flavonoides, assim como os mesmos estão presentes em medicamentos utilizados em todo o mundo. Assim, apresentam importância no tratamento de distúrbios circulatórios, como antiedematosos, como hipolipidêmicos, em casos de acidente vascular cerebral e, em especial, como antioxidantes (SIMÕES, 2017).

Outros compostos com importantes atividades biológica e farmacológica são os triterpenoides, os quais se caracterizam pela presença de uma estrutura constituída por seis unidades isoprênicas, apresentando estrutura do tipo  $C_{30}$ , policíclica, e em sua maioria hidroxilados na posição C-3, podendo ser divididos em três grupos:  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina e lupeol. Apresentam diversas funções nos vegetais a exemplo da defesa contra patógenos e predadores, assim como comprovada atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, analgésica, cardiovascular, antitumoral e anti-HIV (DEWICK, 2002; VECHIA, 2009).

A partir de uma avaliação das drogas regulamentadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre os anos de 1981 e 2010 constatou-se que 34% das substâncias aprovadas pela organização nesse período foram obtidas diretamente de produtos naturais ou de seus derivados (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012). Diante do exposto, é evidente que os metabólitos vegetais a exemplo dos fitosteroides, flavonoides e triterpenos são uma importante fonte para a descoberta de novos medicamentos, sendo de extrema importância a obtenção de informações sobre a sua composição química, assim como a avaliação das suas atividades farmacológicas (HARVEY et al., 2015).

#### 2.4. MÚSCULO LISO E ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA

A importância em investigar atividade sobre o músculo liso dá-se ao fato de que compostos que possuem atividade espasmolítica, tem uma vasta aplicabilidade terapêutica, pois diversas doenças como asma, dispepsia, cólicas intestinais e uterina, diarreia e disfunção erétil estão correlacionadas ao músculo liso (KIM et al., 2008).

O músculo liso encontra-se nas paredes de vários órgãos do corpo, dentre eles: os vasos sanguíneos, intestinos, estômago, vias aéreas, bexiga e útero (PAULUHN; MOHR, 2005).

Diferentemente do músculo cardíaco e esquelético, as células musculares lisas não possuem o padrão de bandas estriadas. Elas recebem inervação neural do sistema nervoso

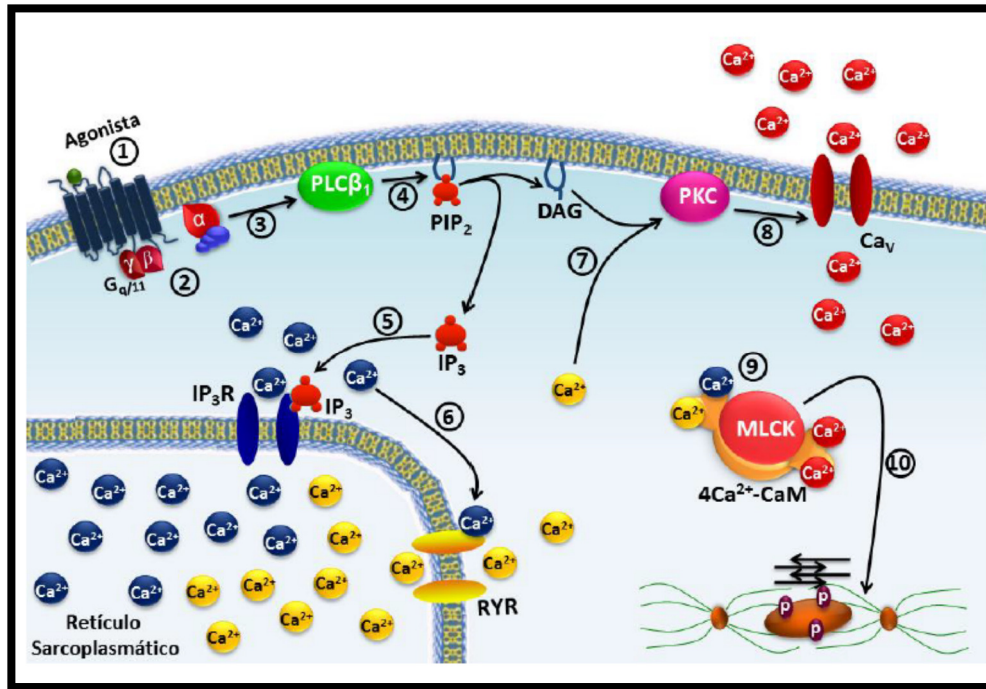
autônomo (WEBB, 2003). É controlada por hormônios, mediadores autócrinos e parácrinos e outros sinais químicos (KARAKI et al., 1997).

Os agonistas mais estudados que provocam contração do músculo liso quando possuem receptores excitatórios são a ocitocina, norepinefrina, acetilcolina, angiotensina, serotonina, endotelina, epinefrina, vasopressina e histamina (MELO; PALHARES; FERREIRA, 2007).

A contração e relaxamento do músculo liso é inerente, respectivamente, com aumento e diminuição da concentração de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no citoplasma, esse cálcio é oriundo tanto do meio intracelular quanto do meio extracelular (PAIVA; FARIAS, 2006). Para que o fluxo aconteça é necessário a transmissão do estímulo originado na membrana plasmática para os receptores que proporcionam a contração do músculo liso, ou seja, o acoplamento excitação–contrações que pode ocorrer por dois principais mecanismos: eletromecânico (potencial transmembrana) e farmacomecânico (agonistas se liga aos receptores) (ANDRADE et al., 2016).

O mecanismo eletromecânico se inicia quando ocorre à entrada de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) na membrana plasmática alterando o gradiente eletroquímico, desencadeando uma despolarização, ativando canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim permite a difusão de cálcio extracelular para o interior da célula, obedecendo o gradiente de concentração (PAIVA; FARIAS, 2006).

O mecanismo farmacomecânico não necessita que ocorra despolarização celular, porém requer uma interação de agonistas com seus receptores acoplados à proteína G da membrana (Figura 3). As proteínas G é composta por três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ), quando ativada a subunidade  $\alpha$  é deslocada e ativa as fosfolipases celulares. Estas enzimas hidrolizam o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato presente na membrana, liberando o inositol 1,4,5 trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) e o diacilglicerol (DAG), que agem em diferentes sítios (SANDERSON et al., 2008). O  $\text{IP}_3$  se liga ao receptor  $\text{IP}_3\text{R}$  no RS liberando  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares dando início a contração. O DAG ativa a proteína cinase C (PKC), responsável pelo aumento da despolarização dos canais transmembranais de cálcio e de potássio (PAIVA; FARIAS, 2006). O aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  aumenta a afinidade pela calmodulina (CaM) formando o complexo 4  $\text{Ca}^{2+}$  - CaM essa combinação ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC), obtendo a capacidade de se fixar ao filamento de actina e promover a contração muscular (PAIVA; FARIAS, 2006; ALVES; QUEIROZ; MEDEIROS, 2012).



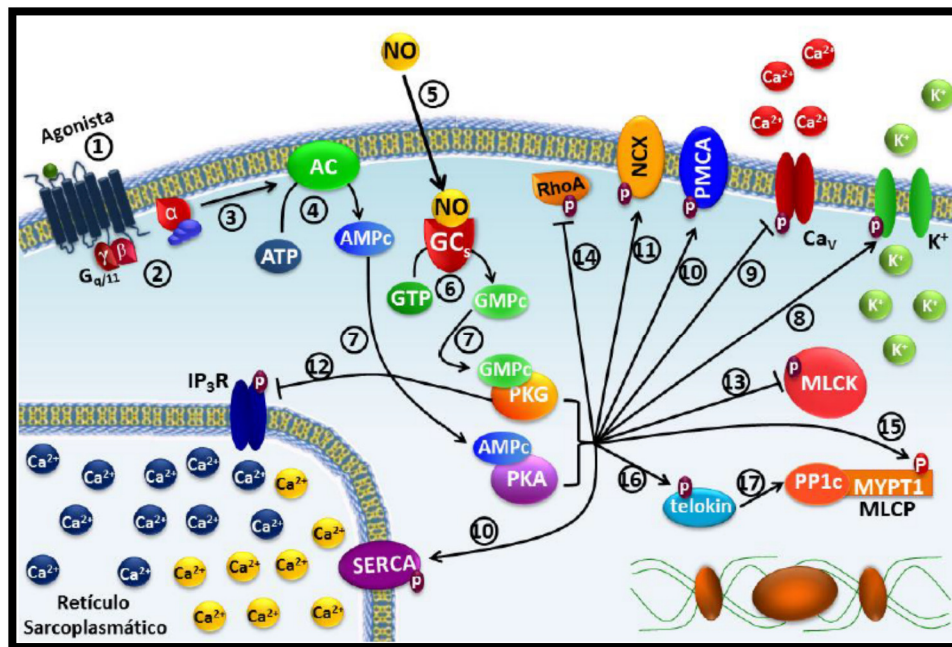
**Figura 3:** Mecanismo da contração muscular lisa. Em: 1- O agonista se liga ao receptor do tipo acoplado a proteína G (GPCR) presente na membrana plasmática; 2- As proteínas  $G_{q/11}$  troca difosfato de guanosina (GDP) por trifostato de guanosina (GTP) na sua subunidade  $\alpha$  (não aparece na figura); 3- A subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima fosfolipase C ( $PLC\beta_1$ ); 4- A  $PLC\beta_1$  cliva o lipídio de membrana 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol ( $PIP_2$ ) em 1,4,5- trifostato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG); 5- O  $IP_3$  migra pelo citoplasma e ativa o  $IP_3R$  presente na membrana do Retículo Sarcoplasmático, liberando o  $Ca^{2+}$  dos estoques; 6- O  $Ca^{2+}$  que foi liberado ativa o  $RyR$ , fazendo com que mais  $Ca^{2+}$  seja liberado para o citoplasma; 7- O  $Ca^{2+}$  é liberado juntamente com o DAG e ativam a proteína quinase C (PKC); 8- A PKC ativada fosforila os  $Ca_v1$  promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos mesmos; 9- O aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  aumenta a afinidade pela calmodulina (CaM) formando o complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM e ativando a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK); 10- A MLCK ativada fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) e esta, se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso

**Fonte:** CORREIA, 2013

Por conseguinte, a redução da concentração de  $Ca^{2+}$  inibiria a união cálcio/calmodulina, assim como a ativação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), que desfosforila a MLC. Esta reação é lenta, por isso as contrações do músculo liso são mais sustentadas e se dissipam mais lentamente em relação ao músculo estriado (PAIVA; FARIAS, 2006; ALVES; QUEIROZ; MEDEIROS, 2012).

A redução do  $Ca^{2+}$  citosólico pode acontecer por diversos mecanismos de remoção diretamente da membrana do citoplasma e a do RS (Figura 4). Assim o agonista se liga ao seu receptor acoplado a proteína presente na membrana plasmática, transformando GDP em GTP, presente na sua subunidade  $\alpha$ , tornando-a ativa. A subunidade  $\alpha$ -GTP ativa a AC (ciclase de adenilil) convertendo o ATP em AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). O NO (óxido nítrico) concebido dos nervos e células musculares lisas, ativam a GCs (ciclase guanil solúvel). A GCs converte o GTP em GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) que junto com

AMPc ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG que iram fosforilar diversos substratos : canais de  $K^+$ , inibem os  $C_{av}$ , inibe a RhoA (pequena proteína G ligante de GTP), aumentam a atividade da SERCA e da PMCA ( $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática), ativam do trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  e fosforilam o  $IP_3R$ . Todos esses processos diminuem a  $[Ca^{2+}]_c$  fazendo com que ocorra a inibição a MLCK, diminuindo a afinidade pelo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ . Além de ativar a MYPT1 (subunidade 1 condutora da fosfatase de miosina) e o teokin que ativa a MLCP que consequentemente faz com que aconteça o relaxamento do músculo liso (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; HIROTA; HELLI; JANSSEN, 2007; CORREIA, 2013).



**Figura 4:** 1- O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR (receptor acoplado a proteína G) na membrana plasmática; 2- A proteína Gs troca GDP por GTP (trifosfato de guanosina) na sua subunidade  $\alpha$  (não mostra na figura) tornando-se ativa; 3- A subunidade  $\alpha$ -GTP ativa a AC; 4- A AC (ciclase de adenilil) converte o ATP em AMPc (monofosfato cíclico de adenosina); 5- O NO (óxido nítrico) gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da GCs (ciclase guanil solúvel); 6- A GCs converte o GTP em GMPc; 7- Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos; 8- Ativam os canais de  $K^+$ ; 9- Inibem os  $Ca_v$ ; 10- Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA ( $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática); 11- Ativam do trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$ ; 12- Fosforilização do  $IP_3R$  (receptor  $IP_3$ ) pela PKG (proteína cinase dependente de GMPc), mas não pela PKA (proteína cinase dependente de AMPc); 13- Inibem a MLCK (cinase da cadeia leve de miosina) reduzindo sua afinidade pelo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ ; 14- Inibe a RhoA (pequena proteína G ligante de GTP); 15- Ativam a MYPT1 (subunidade 1 condutora da fosfatase de miosina); 16- Ativam o teokin; 17- O telokin ativa a MLCP (fosfatase da cadeia leve de miosina)

Fonte: CORREIA, 2013



Diversas espécies vegetais são conhecidas por apresentar efeito relaxante em músculo liso traqueal, dentre elas, destacam-se: *Achillea wilhelmsii* K.Koch; *Achillea millefolium* L.; *Adhatoda vasica* Nees; *Bacopa monnieri* (L.) Wettst; *Bunium persicum* (Boiss.); *Capparis spinosa* L.; *Carum copticum* L.; *Crocus sativus* L.; *Cuminum cyminum* L.; *Ephedra sinica* Stapf.; *Ferula assa-foetida* L.; *Foeniculum vulgare* Mill.; *Hydrastis canadensis* L.; *Limonia acidissima* Groff.; *Nigella sativa* L.; *Ocimum basilicum* L.; *Pimpinella anisum* L.; *Portulaca oleracea* L.; *Rosa damascena* Herrm.; *Rosmarinus officinalis* L.; *Sarcococca saligna* Mull.Arg.; *Satureja hortensis* L.; *Syzygium cumini* (L.) Skeels.; *Thymus vulgaris* L. e *Zataria multiflora* Boiss (SHAKERI; BOSKABADY, 2015).

Algumas espécies de *Lippia* também apresentaram eficácia em relaxar distintos músculos lisos. Como o óleo essencial de *L. dulcis* que induziu o relaxamento em segmentos brônquicos de suínos, dotados de receptores muscarínicos M<sub>3</sub> e histamínicos H<sub>1</sub> (GORNEMANN et al., 2008). *L. graveolens* demonstrou um efeito antiespasmódico, usando modelos *in vivo* (trânsito gastrointestinal de ratos) e *in vitro* (íleo isolado de cobaia) (RIVERO-CRUZ et al., 2011). *L. alba* induziu vasorelaxamento na artéria mesentérica de ratos (MAYNARD et al., 2011). Atividades espasmolítica e antitussígena em traqueia isolada de cobaia foram atribuídas ao óleo essencial de *L. origanoides* (MENEZES, 2017). Para a *L. thymoides*, há relatos de que seu óleo essencial apresentou atividade espasmolítica e antidiarreica *in vivo* em cobaia. Foi demonstrado também que o efeito antidiarreico estaria relacionado com a inibição da contração do músculo liso (MENEZES et al., 2018).

#### 2.4.1 Potencial espasmolítico de substâncias isoladas de plantas

Uma variedade de substâncias isoladas de plantas medicinais vem manifestando importante atividade espasmolítica, com destaque, principalmente, para aquelas oriundas das classes dos terpenos e flavonoides, além de alcaloides, lignanas e esteroides.

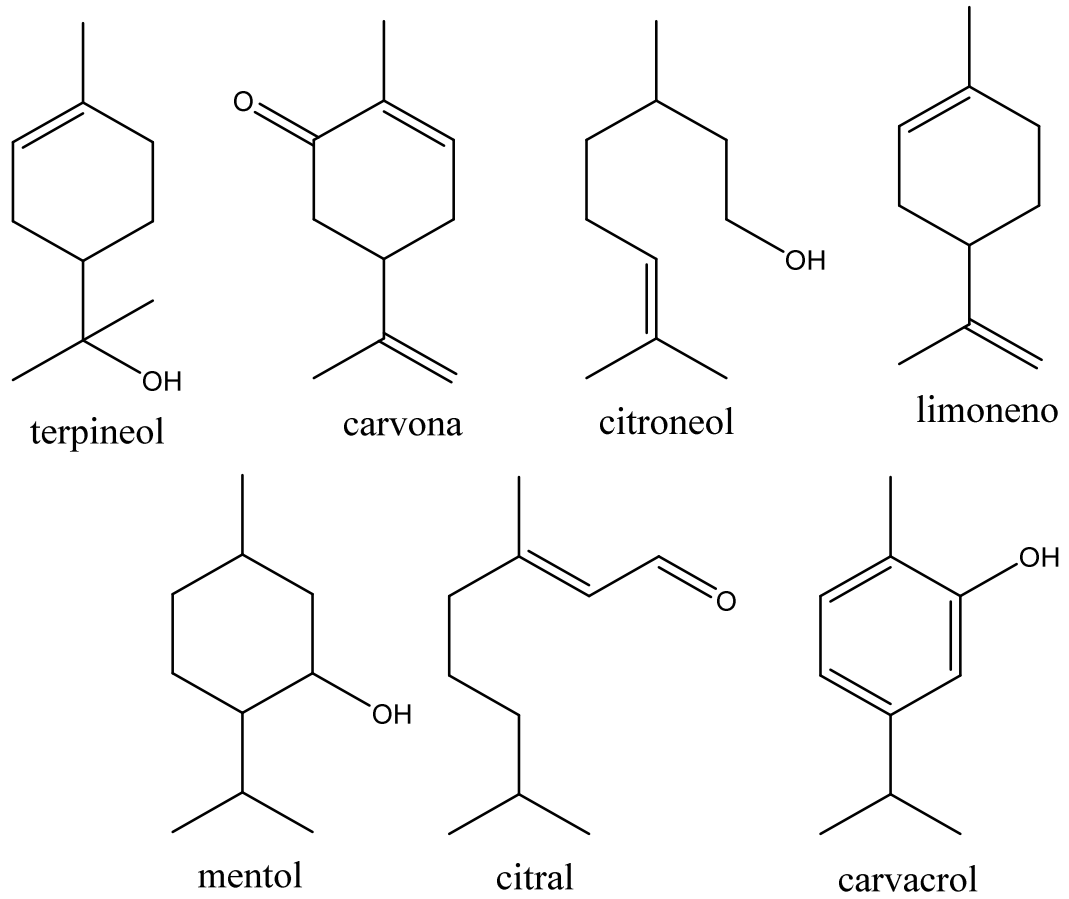
Dentre os monoterpenos (Figura 5), o  $\alpha$ -terpineol se destacou por suas propriedades relaxantes no músculo liso. Em um estudo realizado por Silva e colaboradores (2016), foram avaliados os efeitos dessa substância na motilidade intestinal de ratos, a dose de 50 mg/kg da substância isolada foi administrada por gavagem (v.o.), e possibilitou o retardo no esvaziamento gástrico. Os autores detectaram a propriedade do  $\alpha$ -terpineol em reduzir as contrações induzidas pela carbamilcolina (agonista muscarínico), de maneira dose

dependente. Tal efeito relaxante não foi afetado pela presença de substâncias como a atropina (antagonista muscarínico).

Em um experimento *in vitro* utilizando a porção distal do cólon humano pré contraído com atropina, o mentol (0,1 a 30 mM), de forma dose dependente, foi capaz de inibir a contratilidade do músculo liso gastrointestinal através do bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Após ensaios de mecanismo de ação, os autores concluíram que esse monoterpene atua frente aos canais voltagem-dependentes, uma vez que a administração de nifedipina na dose de 3 nM reduziu a ação inibitória do mentol (AMATO; LIOTTA; MULÈ, 2014).

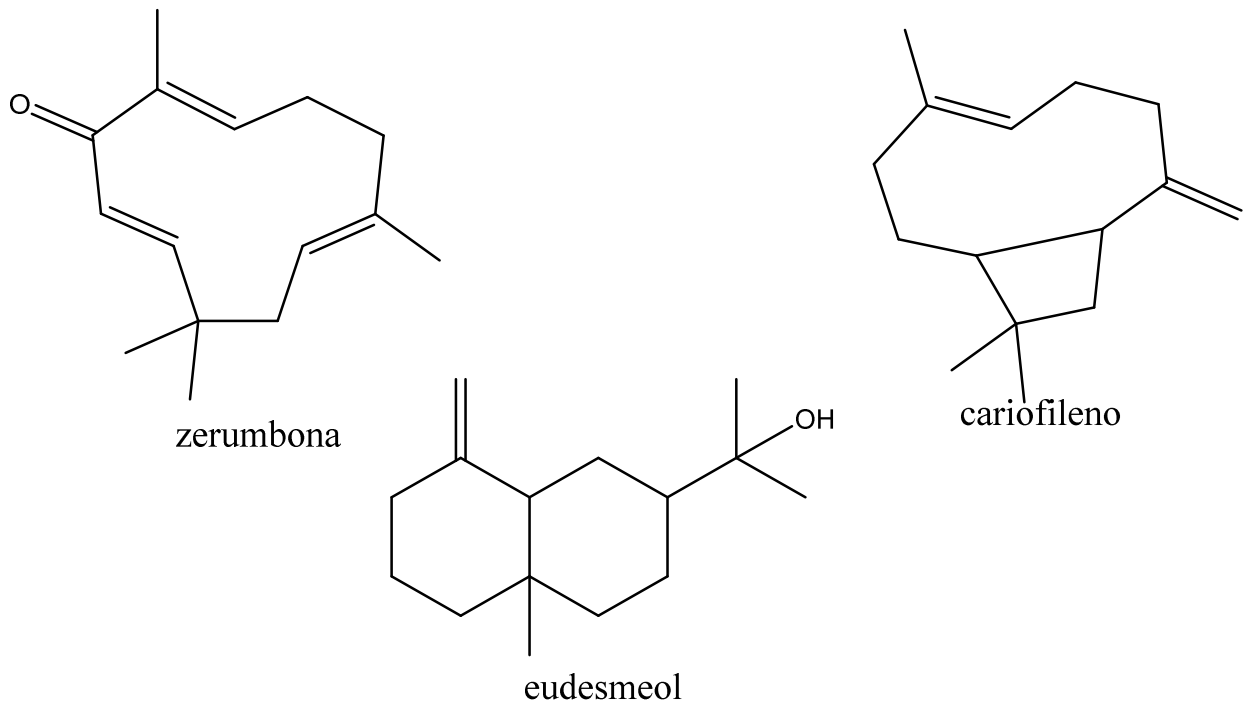
O *L*-mentol a 0,8%, administrado intraluminalmente, preveniu o espasmo clônico durante o exame colonoscópico em humanos (YOSHIDA et al., 2014); já a carvona foi capaz de reduzir significativamente as contrações induzidas tanto por carbacol quanto pela histamina, em íleo de cobaia, sendo cem vezes mais potente do que o verapamil, um reconhecido bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOUZA et al., 2013).

Ainda com relação à atividade espasmolítica dos monoterpenos, a carvona e o limoneno demonstraram ação expressiva em traqueia de cobaias e no músculo liso da aorta de ratos (SOUSA et al., 2015); o carvacrol (BOSKABADY et al., 2012) e o  $\beta$ -citronelol (VASCONCELOS et al., 2016) atuaram inibindo os espaços dos anéis traqueais ao agirem nos receptores de histamina. O citral, nas doses entre 0,061 e 15,6 mM, reduziram as contrações ileiais espontâneas induzidas, previamente, por acetilcolina e cloreto de potássio (KCl); os autores atribuíram tal atividade espasmolítica à ação antagônica aos íons cálcio (DEVI; SIM; ISMAIL, 2011).



**Figura 5:** Monoterpenos com ação espasmolítica

Os sesquiterpenos (Figura 6) caracterizam-se pela presença de quinze átomos de carbono, são comuns em óleos essenciais e apresentam uma gama ampla de atividades farmacológicas. A zerumbona, por exemplo, isolada do rizoma de *Zingiber zerumbet* Sm., exibiu atividade vasorelaxante *in vitro* em anéis de aorta de ratos previamente contraídos pela fenilefrina (FUSI et al., 2015). O  $\beta$ -eudesmol, isolado de *Atractylodes lancea*, foi testado em concentrações que variaram de 25 a 100 mg/Kg aumentando o esvaziamento gástrico e inibindo a motilidade gastrointestinal em camundongos tratados com dopamina, atropina e pela 5-HT (KIMURA; SUMIYOSHI, 2012). O  $\beta$ -cariofileno produziu relaxamento dose dependente no músculo liso do íleo de ratos, a pré-contracção foi feita com KCl, acetilcolina,  $\text{CaCl}_2$  e bário, tal efeito foi semelhante à ação do verapamil (LEONHARDT et al., 2010).

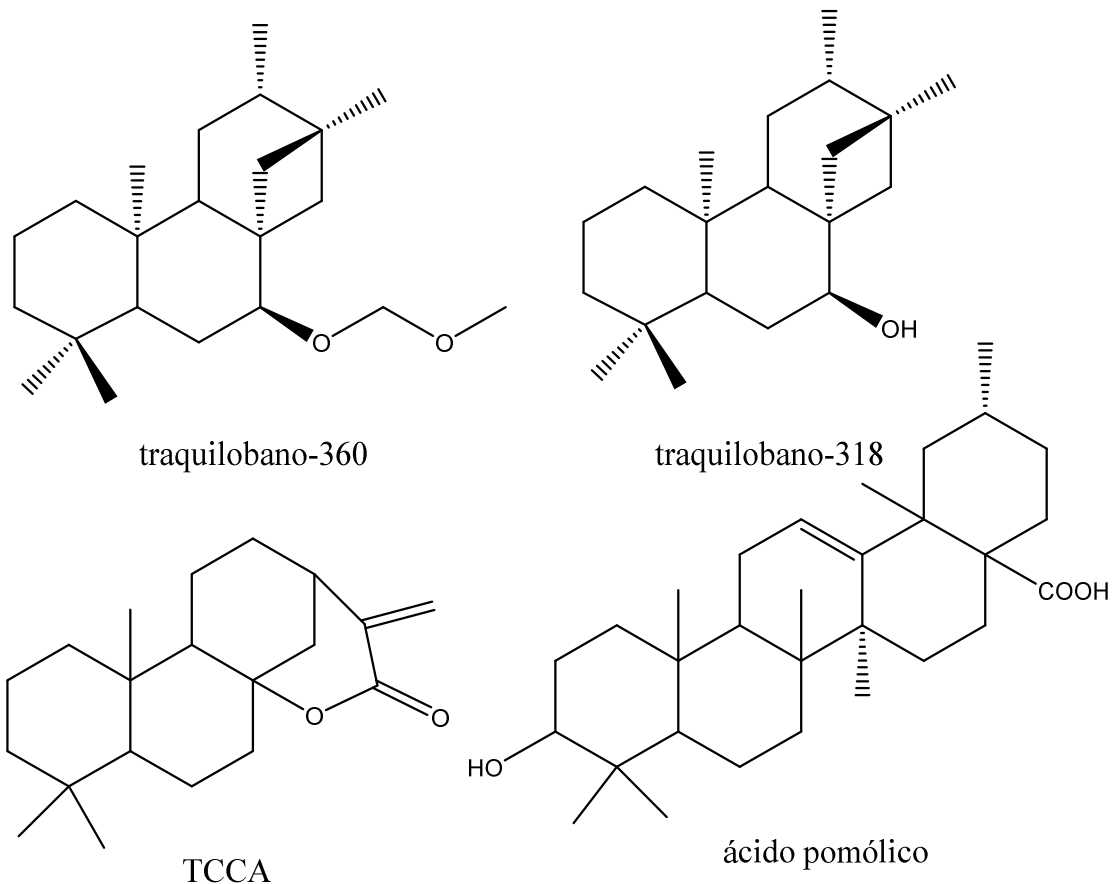


**Figura 6:** Sesquiterpenos com ação espasmolítica

Entre os diterpenos (Figura 7) destaca-se o ácido rel-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradeca-hidro-1,4a-dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (TCCA), isolado de *Croton argirophylloides*, por sua ação antiespasmódica em preparações traqueiais de ratos submetidas à contração por prévia estimulação elétrica ou pela ação de íons  $K^+$  e acetilcolina. A atividade espasmolítica se deu através de vários mecanismos, a exemplo do bloqueio de VOCCs ou ROCCs e bloqueio da liberação de  $Ca^{2+}$  induzida por  $IP_3$  do retículo sarcoplasmático (AGUIAR et al., 2012).

Outros diterpenos com ação antiespasmódica são o ácido ent-7a-acetoxiltraciloban-18-oico (traquilobano-360) e o ácido ent-7a-hidroxitra-quilobob-18-oico (traquilobano-318), ambos obtidos de *Xylopija langsdorfiana*, que foram capazes de induzir a atividade espasmolítica em íleo de cobaia pré-contraído com carbacol, histamina e KCl, sendo a segunda substância quinze vezes mais potente do que a primeira (SANTOS et al., 2012b).

Já no estudo realizado por Estrada e colaboradores (2011) com o triterpeno ácido pomólico, isolado de *Licania pittieri*, foi observada a atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos submetidos à contração prévia por noradrenalina, os autores atribuíram sua ação hipotensora à ativação direta dos receptores purinérgicos endoteliais através da via de sinalização NO-GMPc.



**Figura 7:** Di e triterpenos com ação espasmolítica

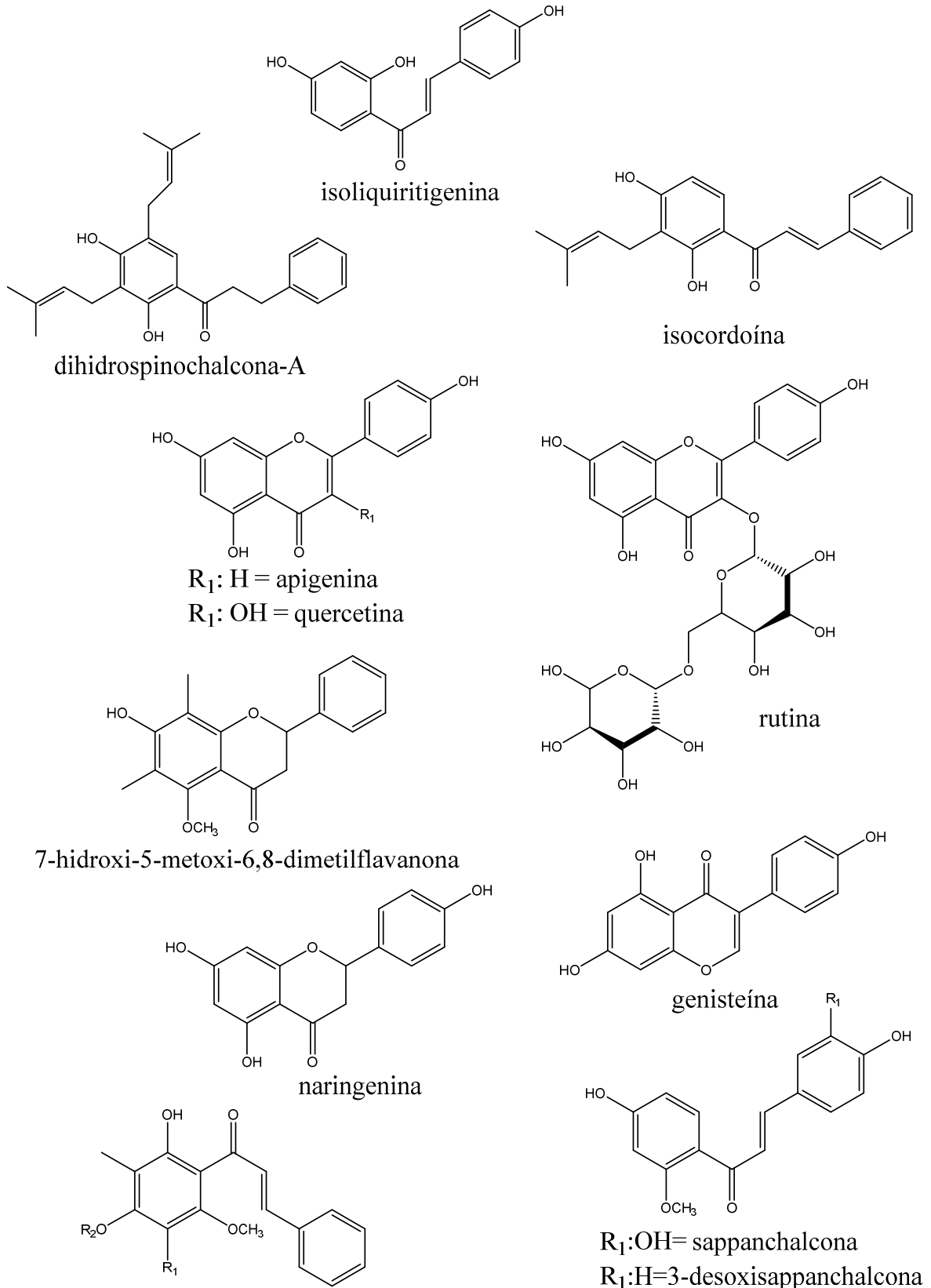
Os flavonoides (Figura 8) também têm demonstrado diferentes padrões de resposta em músculo liso, como a quercetina (1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e a rutina (100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) isoladas da *Tagetes erecta* L., as quais demonstraram efeito relaxante dose dependente nos tecidos de cobaia pré-contraídos com KCl, sendo a primeira mais potente do que a segunda (VENTURA-MARTÍNEZ et al., 2018). A naringenina, quercetina, apigenina e a genisteína, administradas nas concentrações de 10 a 300  $\mu\text{mol/L}$ , foram capazes de inibir o peristaltismo em intestinos de cobaia *in vitro* de forma dose dependente (GHARZOULI; HOLZER, 2004).

As substâncias, 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-3'-metilchalcona; 2',4'-di-hidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona; 2',4'-di-hidroxi-6'-metoxi-3'-metilchalcona e 7-hidroxi-5-metoxi-6,8-dimetilflavanona, isoladas do extrato hexano de *Syzygium samarangense* e administradas nas doses de 1 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram atividade espasmolítica dose dependente no jejuno de coelhos e os autores destacaram que não houve diferença significativa entre esses flavonoides e o padrão espasmolítico verapamil (AMOR et al., 2005).

Da *Haematoxylum campechianum* foram isoladas duas chalconas conhecidas como sappanchalcona e 3-desoxisappanchalcona que demonstraram atividade espasmolítica *in vitro* em íleo de cobaia previamente contraído por estimulação elétrica. Os resultados revelaram que a substâncias exibiram ação semelhante à do padrão papaverina (ESCOBAR-RAMOS et al., 2017); as chalconas dihidrospinochalcona-A e isocordoína, isoladas de *Lonchocarpus xuul*, suscitou um efeito relaxante em aorta isolada de ratos pré-contraída com noradrenalina, sua ação vasorelaxante se deu através da abertura dos canais de potássio AVILA-VILLARREAL et al., 2013).

A isoliquiritigenina, isolada de *Glycyrrhiza glabra*, apresentou efeito espasmogênico dependente da concentração e sensível à atropina em fundo de estômago isolado de ratos; além de um efeito espasmolítico em jejuno isolado de coelhos, íleo de cobaias e em fundo de estômago de rato atropinizado. Os autores concluíram que esse flavonoide foi capaz de desempenhar ações tanto espasmogênica (através da ativação de receptores muscarínicos) quanto espasmolítica (pelo bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ) na regulação da motilidade gastrointestinal (CHEN et al., 2009).

Shi e seus colaboradores (2012), estudando a mesma substância (0,5 a 1000  $\mu\text{M}$ ) também isolada de *G. glabra*, detectaram uma redução na contração de úteros isolados de ratas; foram usados no experimento ocitocina, acetilcolina e KCl como agonistas, os resultados indicaram que a atividade relaxante da musculatura se deu pelo bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L voltagem dependente, e que a dose de 1 mM da isoliquiritigenina se mostrou mais potente do que o padrão verapamil.



$R_1: H / R_2: CH_3 =$  2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-3'-metilchalcona

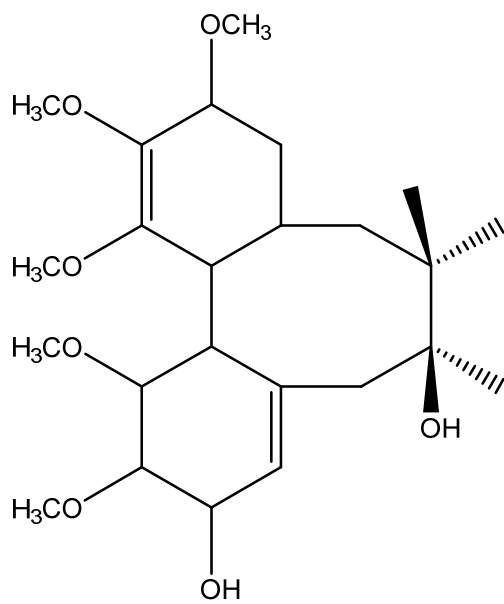
$R_1: H / R_2: H =$  2',4'-di-hidroxi-6'-dimetoxi-3',5'-metilchalcona

$R_1: CH / R_2: H =$  2',4'-di-hidroxi-,6'-metoxi-3', 5'-dimetilchalcona

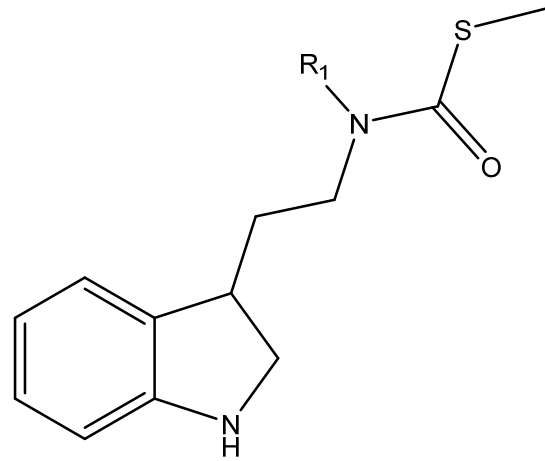
**gura 8:** Flavonoides com ação espasmolítica

Outras classes (Figura 9) de metabólitos secundários também são detentoras de agentes com ação espasmolítica, a exemplo de alcaloides indólicos como o *N*-desmetilglitpetelotina e a gliteletelotina, isolados das folhas de *Glycosmis petelotii*, os quais exibiram atividade vasorelaxante em anéis da aorta de ratos previamente contraídos por fenilefrina, os resultados apontaram que o relaxamento se deu pela inibição da liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  (CUONG et al., 2014). De forma semelhante, a lignana schisandrina, isolada de *Schisandra chinensis* e testada nas dose de 0,5 a 10  $\mu\text{M}$  provocou relaxamento em cólon isolado de ratos. Ensaio realizados para elucidar o mecanismo de ação indicaram que a schisandrina atua por intermédio de transmissores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos (YANG et al., 2011); e esteroide natural como o dehidroeffusol (nas doses de 30 a 90  $\mu\text{M}$ ), isolado de *Juncus effusus*, foi capaz de antagonizar a atividade espasmogênica em jejuno isolado de rato, submetido à prévia contração por pilocarpina, histamina ou KCl (DI et al., 2014).



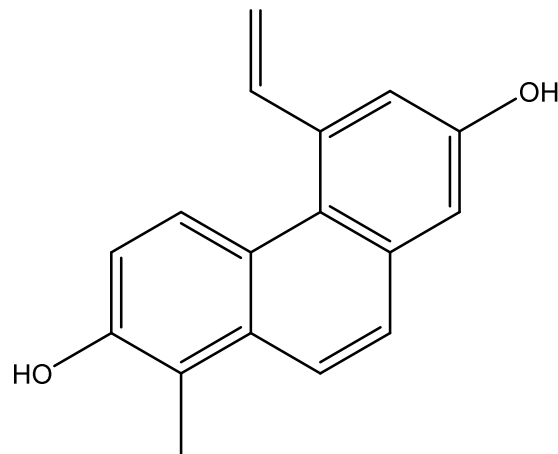


schisandrina



R<sub>1</sub>: H= *N*-desmetilglitpelotina

R<sub>1</sub>: CH<sub>3</sub>=gliteletotina



dehidroeffusol

**Figura 9:** Lignana, alcaloides e esteroide com ação espasmolítica

Diante do exposto nota-se a importância das plantas medicinais frente a ação espasmolítica, e em se tratando de *L. thymoides*, cujos resultados anteriores se mostrou promissor, porém nenhum estudo foi feito com substâncias isoladas dessa espécie. Sendo assim, isolar e identificar substâncias com ação relaxante no músculo liso é de grande interesse farmacêutico, já que são potenciais candidatas a protótipo para tornarem-se novos fármacos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS

Os equipamentos listados a seguir foram utilizados na execução e análise dos experimentos:

- Amplificador (EFF-321A Insight<sup>®</sup>)
- Balança analítica (ALC-210.4 Acculab<sup>®</sup>)
- Balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup> Modelo AY220)
- Banho de aquecimento (Fisatom<sup>®</sup> Modelo 550)
- Banho de órgãos (EFF-321 Insight<sup>®</sup>)
- Banho de refrigeração (Quimis<sup>®</sup> Modelo Q-214U2)
- Banho maria (Biopar<sup>®</sup> Modelo BMA01)
- Banho Maria (NT236 Novatecnica<sup>®</sup>)
- Capela de exaustão (Engetherm)
- Computador (HP Compaq Pro 6305 SFF<sup>®</sup>)
- Cuba de ultrassom (Cristófoli<sup>®</sup>)
- Destilador de água (Tecnal<sup>®</sup> Modelo TE-1782)
- Espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu<sup>®</sup>)
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Bruker<sup>®</sup> Avance DRX 400)
- Estufa com circulação de ar (Marconi<sup>®</sup> Modelo MA 035)
- Lavadora ultrassônica (Ultronique<sup>®</sup> Modelo Q13/37A)
- Lavadora ultrassônica (Unique<sup>®</sup> Modelo USC-3300)
- Moinho de facas (Marconi<sup>®</sup> Modelo 340)
- Rotaevaporador (Buchi<sup>®</sup> Modelo Syncore)
- Softwares Windaq 32<sup>®</sup> (DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA)
- Software *UV PROB* 2.43
- Transdutor de força isométrico (TRI201 Panlab<sup>®</sup>)
- Vortex (Biomixer<sup>®</sup> QL-901)

Foram utilizados os seguintes reagentes, soluções e substâncias de referência no desenvolvimento deste trabalho:

- Acetato de etila (Neon<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup>)

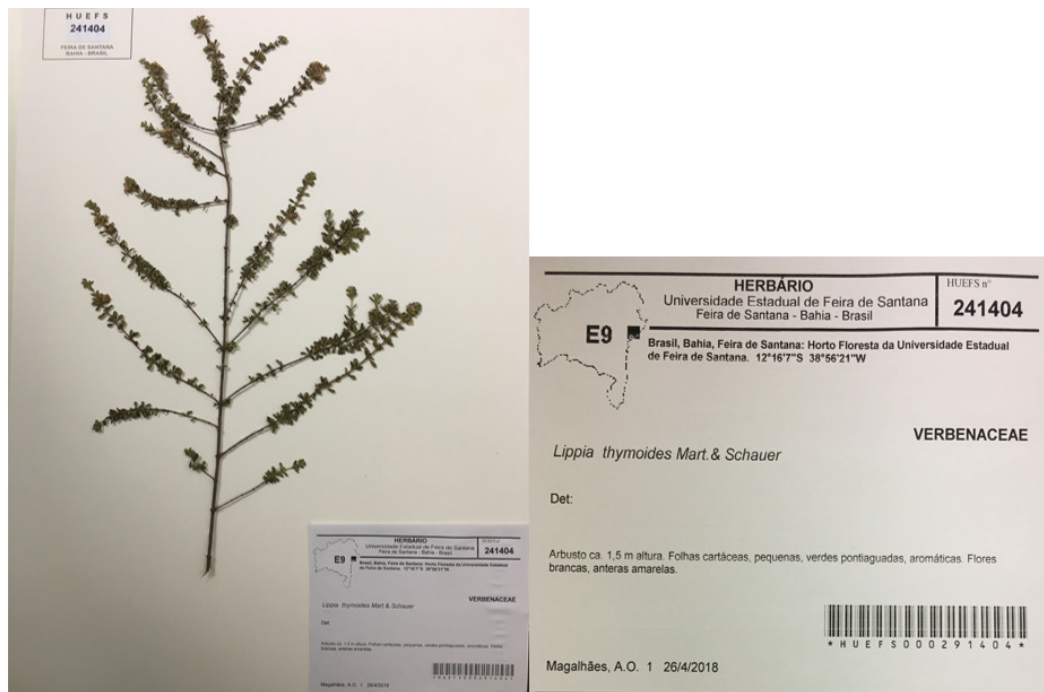
- Acetona (Neon<sup>®</sup>)
- Ácido acético (QM<sup>®</sup>)
- Ácido ascórbico (Vetec<sup>®</sup>)
- Ácido ascórbico P.A. (Vetec<sup>®</sup>- Sigma-Aldrich)
- Ácido gálico (Sigma<sup>®</sup>)
- AlCl<sub>3</sub> (Synth<sup>®</sup>)
- Anisaldeído (Vetec<sup>®</sup>)
- Bicarbonato de sódio (Merck<sup>®</sup>)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Isofar<sup>®</sup>)
- Carbacol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Isofar<sup>®</sup>)
- Cloreto de potássio (KCl) (Dinâmica<sup>®</sup>)
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril (Kabipac<sup>®</sup>)
- Cloreto férrico P.A. (Reagen<sup>®</sup>)
- Cremophor EL (Fluka-Biochemika<sup>®</sup>)
- Diclorometano (Synth<sup>®</sup>)
- Diclorometano (Vetec<sup>®</sup>)
- Diphenylboryloxyethylamina (Aldrich<sup>®</sup>)
- DMSO-d<sub>6</sub> (Isotec<sup>®</sup>)
- DPPH (Sigma<sup>®</sup>)
- Fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O) (Isofar<sup>®</sup>)
- Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Synth<sup>®</sup>)
- Hexano (Vetec<sup>®</sup>)
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Proquímios<sup>®</sup>)
- Metanol (Dinâmica<sup>®</sup> e Nox<sup>®</sup>)
- Metanol grau espectroscópico (Vetec<sup>®</sup>)
- Mistura Carbogênica (White Martins<sup>®</sup>)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Vetec<sup>®</sup>)
- Poliethylenoglicol Etanolico (Bio Basic INC<sup>®</sup>)
- Quercetina tri-hidratada (Aldrich<sup>®</sup>)
- Reagente Follin-Ciocalteau (Dinâmica<sup>®</sup>)
- Sephadex (Sigma-Adrich<sup>®</sup>)
- Sílica gel 0,060-0,200 mm (ACRÕS<sup>®</sup>)
- Sílica preparativa (Merck<sup>®</sup>)

- Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Proquímios<sup>®</sup>)
- TLC sílica gel F<sub>254</sub> (Merck<sup>®</sup>)
- Trolox (Aldrich<sup>®</sup>)

### 3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *L. thymoides* foram coletadas no mês de novembro de 2015, na Unidade Experimental Horto Florestal (UNEHF), que se encontra a uma latitude de 12°16'07" Sul; longitude de 38°56'21" Oeste, elevação de 234 metros, na região do semiárido em Feira de Santana-BA.

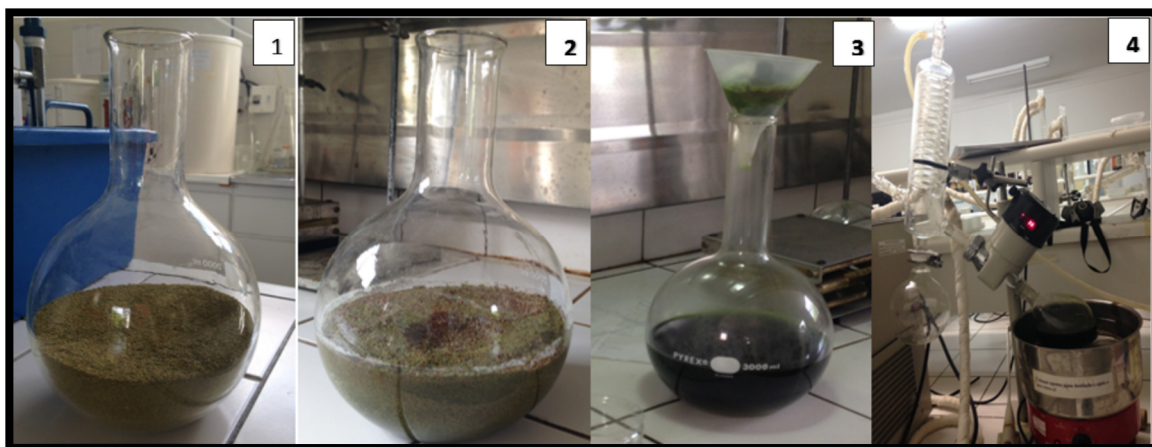
O material fértil foi herborizado para a confecção da exsicata e em seguida, depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), sob número de registro 241404 (Figura 10). A identificação taxonômica foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Regina dos Santos Silva.



**Figura 10:** Exsicata e ficha de identificação de *Lippia thymoides*

### 3.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Para a obtenção do extrato metanólico bruto (LTB) de *L. thymoides*, as folhas foram secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, para estabilização do material, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas. O material pulverizado (2.936,4 g) foi submetido à extração, cinco vezes consecutivas, por maceração assistida por ultrassom com metanol, em recipientes de vidro. Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão conforme ilustrado na Figura 11.



**Figura 11:** Processo para obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de *L. thymoides*. 1 - material vegetal triturado, 2- primeira adição do solvente (metanol), 3- filtração do líquido extrativo, 4 - concentração do extrato

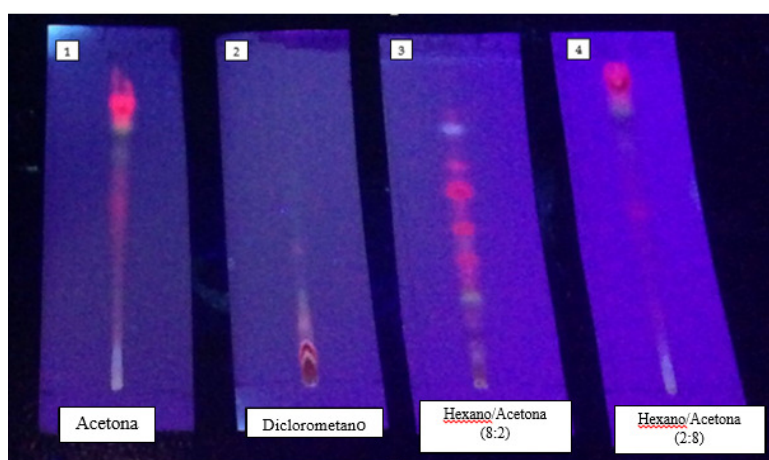
### 3.4 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS FRAÇÕES

A primeira etapa para o isolamento dos metabólitos especiais consiste no fracionamento por partição, o qual visa separar os compostos considerando sua solubilidade e seu coeficiente de partição em diferentes solventes. Para esse procedimento a escolha dos solventes ocorreu baseada no grau de polaridade de cada um (hexano, diclorometano e acetato de etila) (SIMÕES et al., 2017). Assim o extrato metanólico foi ressuspensão em metanol/água (8:2) e submetido, sucessivamente, à partição por hexano (metanol/água (8:2)), diclorometano (metanol/água (7:3)) e acetato de etila (metanol/água (6:4)). As frações obtidas foram

concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão. A massa bruta das frações em hexano (LTH), diclorometano (LTD) e acetato de etila (LTA), foram calculadas em relação ao LTB inicial.

### 3.5 PURIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO

Antes de passar pelo processo de purificação, realizou-se uma análise em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em sílica (TLC sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck®), com diferentes sistemas de solventes (acetona, diclorometano e hexano/acetona (8:2 e 2:8)) a fim de prever quais sistemas de eluentes serviriam para obter uma melhor separação das substâncias, sendo que o sistema hexano/acetona (8:2) foi o mais eficiente na separação das substâncias (Figura 12).



**Figura 12:** Perfil cromatográfico em CCD da fração Diclorometano das folhas de *L. thymoides* eluídas em 1-Acetona, 2-Diclorometano, 3-Hexano/Acetona 8:2 e 4-Hexano/Acetona 2:8

Após a seleção do sistema de eluentes em CCD, a fração diclorometânica (LTD) (20 g) foi submetida à primeira Cromatografia em Coluna (CC), utilizando sílica gel 60 (<0,063 nm) como fase estacionária, na proporção 1:10 (amostra/adsorvente) e eluentes (fase móvel) de polaridade crescente (hexano/acetona), além de metanol, como demonstrado na Tabela 1. Foram obtidas 97 frações de 100 mL cada, sendo essas concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C.

Nas frações 28-36, enquanto estava sendo evaporado o solvente, notou-se a presença de um precipitado amarelo claro, assim, eles foram cuidadosamente separados das frações e analisados em CCD, sendo posteriormente, nomeada de LT1-C4. Depois de secar as frações 49-52, formaram-se cristais em formato de agulhas, que foram lavados com solvente hexano, obtendo-se agulhas amarelas, posteriormente denominadas LT1-C12.

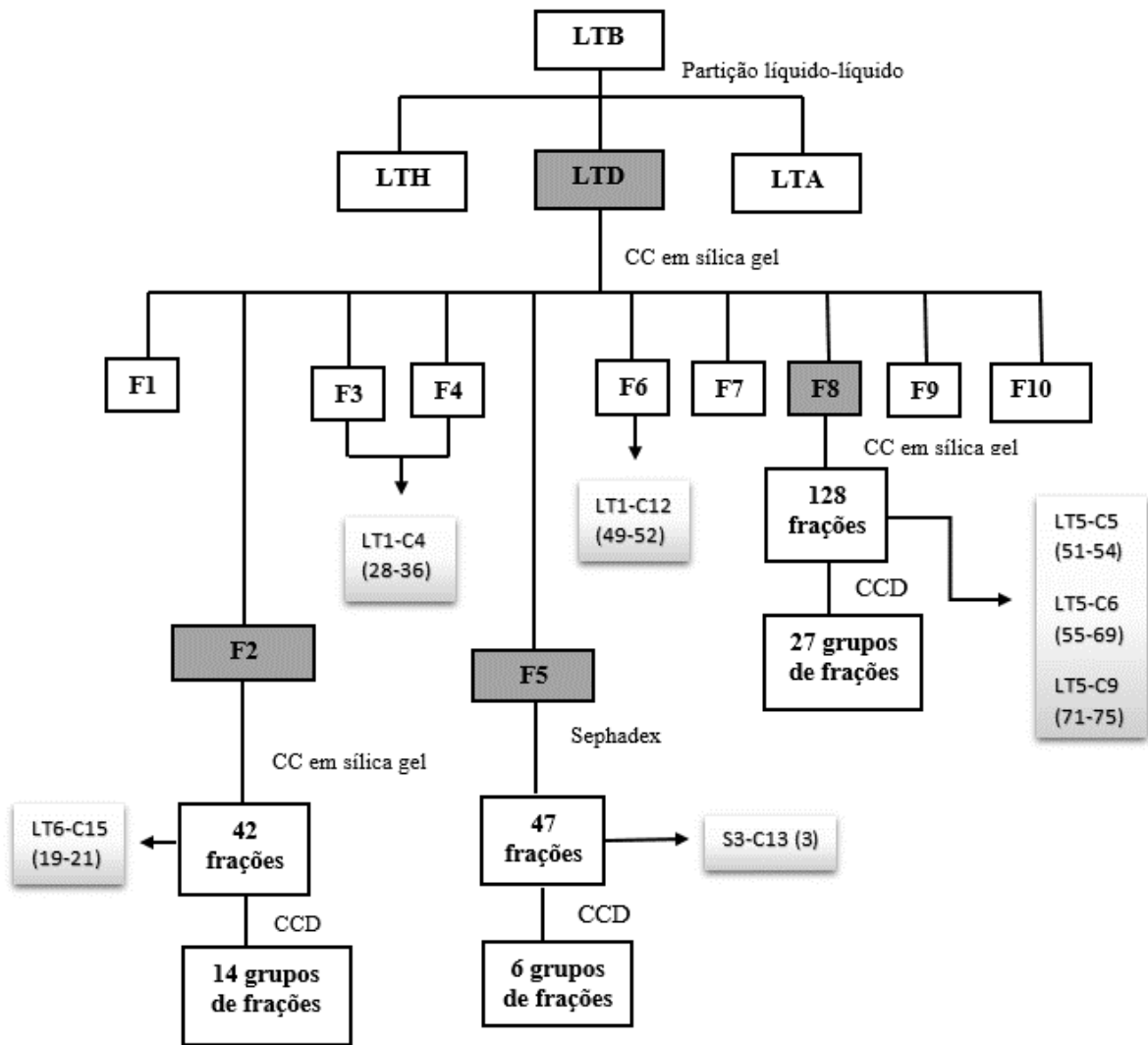
Depois de terem sido analisadas por CCD, utilizando como reveladores anisaldeído, NP/PEG e luz ultravioleta foram reunidas em 10 grupos (Tabela 2). O método de escolha para dar continuidade à purificação dos grupos das frações foi de acordo com análise em CCD, as frações que possibilitassem uma melhor separação e que obtivessem uma quantidade razoável de massa foram selecionadas. Assim os grupos F2, F5 e F8 foram os utilizados para a continuidade do processo de purificação. A representação esquemática do processo de isolamento e purificação das substâncias estão descritos na Figura 13.

**Tabela 1:** Gradiente de eluição aplicado à fração diclorometano das folhas de *L. thymoides* na cromatografia líquida

Eluentes (%)	Frações	Volume eluído (mL)	Eluente (%)	Frações	Volume eluído (mL)
Hexano (100)	1-6	500	Hexano:Acetona (75:25)	46-50	200
Hexano:Acetona (99:1)	7-8	200	Hexano:Acetona (70:30)	51-54	500
Hexano:Acetona (98:2)	9-11	200	Hexano:Acetona (65:35)	55-57	300
Hexano:Acetona (97:3)	12-15	300	Hexano:Acetona (60:40)	58	100
Hexano:Acetona (96:4)	16-19	400	Hexano:Acetona (55:45)	59-62	300
Hexano:Acetona (95:5)	20-26	800	Hexano:Acetona (1:1)	63-65	300
Hexano:Acetona (94:6)	27-29	300	Hexano:Acetona (40:60)	66-68	300
Hexano:Acetona (93:7)	30-32	300	Hexano:Acetona (30:70)	69-70	200
Hexano:Acetona (92:8)	33-35	300	Hexano:Acetona (20:80)	71-73	200
Hexano:Acetona (91:9)	36	100	Hexano:Acetona (10:90)	74-77	300
Hexano:Acetona (90:10)	37-41	300	Acetona (100)	78-84	600
Hexano:Acetona (85:15)	42-43	200	Metanol (100)	85-97	900
Hexano:Acetona (80:20)	44-45	200	----	----	----

**Tabela 2:** Frações reunidas (CC), após análise em CCD, obtidas por cromatografia em sílica gel 60 a partir da fração diclorometânica

Grupos das frações	Frações	Massa (g)
F1	1-20	0,515
F2	21-25	2,450
F3	26-27	0,534
F4	28-30	0,586
F5	31-38	0,811
F6	39-52	2,080
F7	53-57	1,304
F8	58-63	3,702
F9	64-71	1,908
F10	72-95	6,040



**Figura 13:** Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir do extrato metabólico bruto (LTB) da folha de *L. thymoides*, sendo: LTH – Fração Hexânica; LTD- Fração Diclorometano; LTA- Fração Acetato de etila; F-grupos de frações; CC- Cromatografia em Coluna; CCD- Cromatografia em Camada Delgada e as substâncias isoladas/misturas - LT5-C6; LT5-C5; LT5-C9; LT1-C4, LT1-C12, LT6-C15 e S3-C3



### 3.5.1 Fracionamento Cromatográfico de F2

Com o objetivo de isolar substâncias presentes em F2 (2,34 g), esse grupo foi submetido a um novo fracionamento em CC de sílica gel (<0,063 nm), na proporção 1:60 (amostra:adsorvente). Foi utilizada eluição gradiente com hexano/acetona com polaridade crescente, seguido de metanol, resultando na obtenção de 42 frações com 100 mL cada (Tabela 3). Estas foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C. Após secas notou-se a presença de um sólido branco nas frações 19-21, as quais foram lavadas com acetona, para uma melhor purificação. Tal substância, após ser analisada por CCD, foi nomeada de LT-C15. As demais frações foram reunidas, após comparação por CCD, em 14 grupos, denominados F2-1 a F2-14 (Tabela 4).

**Tabela 3:** Gradiente de eluição aplicado a G2 na cromatografia líquida

Eluentes (%)	Frações	Volume eluído (mL)	Eluentes (%)	Frações	Volume eluído (mL)
Hexano (100)	---	690	Hexano: Acetona (80:20)	34	100
Hexano: Acetona (99:1)	1-12	1.600	Hexano: Acetona (70:30)	35	100
Hexano: Acetona (98:2)	13-15	200	Hexano: Acetona (60:40)	36	100
Hexano: Acetona (97:3)	16-17	200	Hexano: Acetona (50:50)	37	100
Hexano: Acetona (96:4)	18-25	700	Hexano: Acetona (40:60)	38	100
Hexano: Acetona (95:5)	26-29	300	Hexano: Acetona (20:80)	39	100
Hexano: Acetona (90:10)	30-31	200	Acetona (100)	40	100
Hexano: Acetona (85:15)	32-33	200	Metanol (100)	41-42	250

**Tabela 4:** Grupos de frações reunidas de F2

Grupos	Frações	Massa (g)
F2-1	1-6	0,010
F2-2	7-11	0,895
F2-3	12-15	0,139
F2-4	16-18	0,087
F2-5	19-21	0,126
F2-6	22-24	0,247
F2-7	25-27	0,399
F2-8	28-31	0,051
F2-9	32-33	0,029
F2-10	34	0,038
F2-11	35	0,033
F2-12	36	0,029
F2-13	37-38	0,110
F2-14	39-42	0,066

### 3.5.2 Fracionamento Cromatográfico de F5

O grupo F5 (0,811 g) foi submetido a um novo fracionamento em Cromatografia por exclusão (Sephadex LH-20, diclorometano), resultando na obtenção de 47 frações de 20 mL

cada (Tabela 5). A fração F5-3 apresentou um sólido branco, sendo este, lavado com metanol. A substância obtida, após análise em CCD, foi nomeada de S3-C3.

**Tabela 5:** Grupos de frações reunidas de F5

Grupos	Frações	Massa (g)
F5-1	1	0,004
F5-2	2	0,103
F5-3	3	0,073
F5-4	4	0,018
F5-5	5-10	0,051
F5-6	11-14	0,005
F5-7	15-24	0,011
F5-8	25-34	0,004
F5-9	35-45	0,006
F5-10	46-47	0,019

### 3.5.3 Fracionamento Cromatográfico de F8

Com o objetivo de isolar substâncias presentes em F8 (3,702 g), esse grupo foi submetido a um novo fracionamento em CC de sílica gel (<0,063 nm), na proporção 1:60 (amostra:adsorvente). Foi utilizada eluição gradiente com hexano/acetona com polaridade crescente, seguido de metanol, resultando na obtenção de 128 frações. (Tabela 6).

**Tabela 6:** Gradiente de eluição aplicado a F8 na cromatografia líquida

Eluente (%)	Frações	Volume eluído (mL)	Eluente (%)	Frações	Volume eluído (mL)
Hexano (100)	----	200	Hexano:Acetona (70:30)	66-74	600
Hexano:Acetona (99:1)	----	200	Hexano:Acetona (68:32)	75-77	300
Hexano:Acetona (98:2)	----	200	Hexano:Acetona (65:35)	78-90	1100
Hexano:Acetona (97:3)	1-10	1200	Hexano:Acetona (60:40)	91-96	400
Hexano:Acetona (96:4)	11	100	Hexano:Acetona (55:45)	97-100	400
Hexano:Acetona (95:5)	12-13	200	Hexano:Acetona (50:50)	101-108	600
Hexano:Acetona (92:8)	14-15	200	Hexano:Acetona (45:65)	109-110	200
Hexano:Acetona (90:10)	16-18	300	Hexano:Acetona (40:60)	111-113	300
Hexano:Acetona (87:13)	19-21	300	Hexano:Acetona (35:65)	114-115	300
Hexano:Acetona (85:15)	22-31	1000	Hexano:Acetona (30:70)	116-118	200
Hexano:Acetona (80:20)	32-43	900	Hexano:Acetona (20:80)	119-120	300
Hexano:Acetona (78:22)	44-49	500	Hexano:Acetona (10:90)	121-122	300
Hexano:Acetona (75:25)	50-61	1200	Acetona (100)	123-124	200
Hexano:Acetona (73:27)	62-65	300	Metanol (100)	125-128	300
Hexano:Acetona (70:30)	66-74	600	----	----	----

As 128 frações foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C. Notou-se a presença de sólido com coloração amarelo nas

frações 51-69 e 71-75, os quais foram lavados com acetona para uma melhor purificação. Após análise em CCD, notou-se que o Fator de Retenção (Rf) eram distintos. Assim, reuniram-se as substâncias das frações 51-54, 55-69 e 71-75, em separado, sendo essas, nomeadas de LT5-C5, LT5-C6 e LT5-C9, respectivamente. As demais frações, após secas, foram analisadas em CCD possibilitando a reunião em 27 grupos de frações, denominados F8-1 a F8-27 (Tabela 7).

**Tabela 7:** Grupos de frações reunidas de F8

<b>Grupos</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>
F8-1	1-8	0,021
F8-2	9-13	0,020
F8-3	14-22	0,040
F8-4	23-28	0,048
F8-5	29-35	0,036
F8-6	36-37	0,003
F8-7	38-42	0,034
F8-8	43-45	0,037
F8-9	46-48	0,122
F8-10	49-51	0,157
F8-11	52-54	0,238
F8-12	55-69	0,945
F8-13	70-76	0,315
F8-14	77-80	0,107
F8-15	81-83	0,074
F8-16	84-89	0,093
F8-17	90-94	0,037
F8-18	95-98	0,028
F8-19	99-102	0,054
F8-20	103-107	0,089
F8-21	108-110	0,050
F8-22	111-113	0,030
F8-23	114-121	0,125
F8-24	122-124	0,058
F8-25	125-126	0,179
F8-26	127	0,066
F8-27	128	0,001

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foi utilizada a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensional, além da comparação dos dados com a literatura.

As análises por RMN foram realizadas em parceria com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, da Universidade Federal do Vale São Francisco (Univasf), sendo que os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C COSY, DEPT, HMBC e HMQC foram registrados em espectrômetro de RMN Bruker (Avance, DRX 400), operando 400 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN de <sup>13</sup>C.

As substâncias LT5-C5e LT5-C9 foram solubilizadas com DMSO-d6 (procedência Isotech) e as substâncias LT1-C4, LT5-C6, LT5-C7, LT1-C12, LT6-C15 e S3-C3 foram dissolvidas com CDCl<sub>3</sub>.

### 3.7 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA

#### 3.7.1 Animais

O trabalho foi previamente submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIVASF (CEUA-UNIVASF), obtendo parecer favorável (APÊNDICE A). Para o ensaio de avaliação atividade espasmolítica *in vitro* em traqueia isolada, foram utilizadas cobaias (*Caviaporcellus*) de ambos os sexos com 400 a 500 g. Todos os animais foram providos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Vale do São Francisco, acomodados em caixas apropriadas, com ciclo claro escuro de 12 horas, água e ração *ad libitum*.

#### 3.7.2 Avaliação da atividade espasmolítica em traqueia isolada de cobaia

O LTB, LTD e as substâncias isoladas e misturas (LT5-C5; LT5-C6; LT5-C9; LT1-C4, LT1-C12, LT6-C15 e S3-C3) das folhas de *L. Thymoides* foram dissolvidas em Cremophor EL 3% em água destilada, na concentração de 10 mg/mL. O agonista carbacol (CCh) utilizado foi dissolvido em conformidade com a orientação do fabricante e conservado em soluções estoque a - 20 °C, sendo realizada, a diluição necessária, em água destilada no instante do experimento.

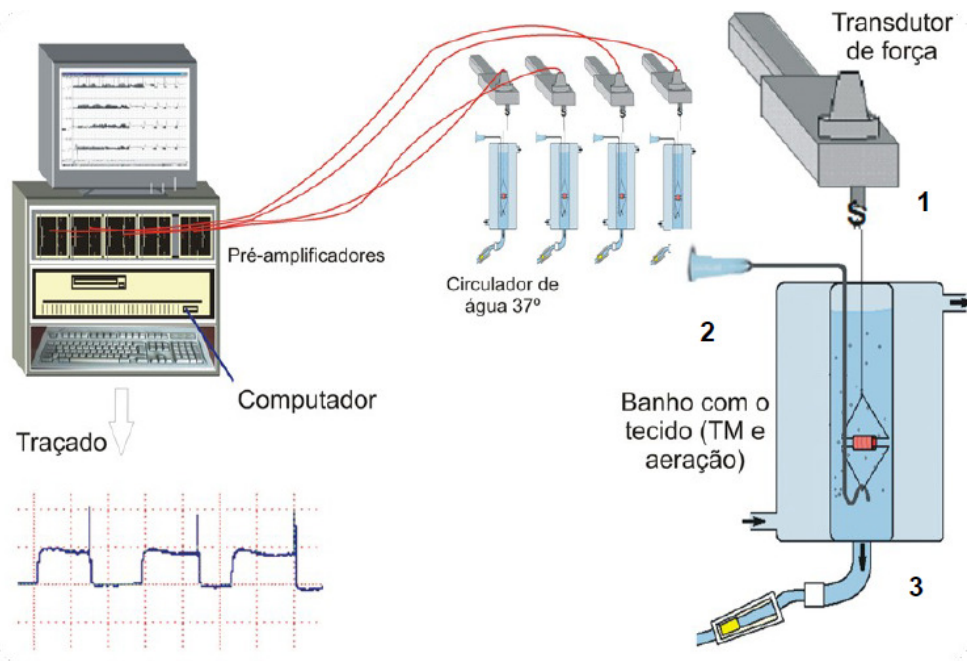
As cobaias foram eutanasiadas por deslocamento cervical, sendo o tórax aberto para a remoção da traqueia. Logo após a retirada, a traqueia foi acomodada em uma placa de Petri com solução nutritiva de Krebs (NaCl 118,0 mM; KCl 4,55 mM; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5,70 mM;

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,10 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,52 mM;  $\text{NaHCO}_3$  25,0 mM e Glicose 11,00 mM) aerada com mistura carbogênica (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ), para a remoção de todo o tecido conjuntivo e adiposo. Deste modo, fracionou-se a traqueia em fragmentos com 3-4 anéis cartilagosos, nos quais, foram inseridos com auxílio de hastes de aço inoxidável à transdutores de força modelo TRI201 (Panlabs.l.u., Barcelona, Espanha), por meio de linhas de algodão, sendo suspensos individualmente em cubas de vidro contendo 10 mL de solução de Krebs no banho de órgãos (Figura 14) modelo EFF-321 (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Os tecidos ficaram em repouso por 60 minutos, para sua estabilização, sob uma tensão de 1 g a 37 °C e aeração ininterrupta com mistura carbogênica (95%  $\text{CO}_2$  e 5%  $\text{O}_2$ ), fazendo troca da solução de Krebs a cada 15 minutos. A seguir, realizou-se a primeira contração incitada pela adição à cuba de 1  $\mu\text{M}$  de CCh, com propósito de verificar a viabilidade do tecido. Após atingir a contração máxima, a solução nutritiva foi substituída e o tecido foi estabilizado por mais 30 minutos, com a troca da solução feita a cada 15 minutos. As contrações isométricas foram registradas através de transdutores de força conectados a um amplificador (Insight®) interface 4 canais, que por sua vez estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador executando o programa WinDaq (DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA).

Após a estabilização do tecido, realizou-se uma segunda contração com 1  $\mu\text{M}$  de CCh e no decorrer do componente tônico dessa, foram adicionados individualmente o LTB, LTD e as substâncias isoladas de *L. thymoides*, de maneira cumulativa em concentrações crescentes (1 a 729  $\mu\text{g/mL}$ ). Os relaxamentos foram expressos como a porcentagem reversa da tensão máxima alcançada pela adição de CCh à cuba, onde o relaxamento máximo foi alcançado quando a tensão registrada foi reduzida aos níveis basais.

Para cada protocolo experimental, foram empregados um n de 5 animais e os dados obtidos dos registros foram convertidos em curvas concentração-resposta e estas ajustadas por regressão não-linear no *software Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA)*, para obtenção do valor de  $\text{CE}_{50}$  (concentração da amostra que é capaz de causar 50% de seu efeito máximo) tendo como parâmetro de potência relativa de uma amostra, e o  $\text{E}_{\text{max}}$  (valor médio, em porcentagem, do efeito máximo obtido pela amostra em relação ao maior valor possível num dado tecido) servindo como parâmetro de eficácia relativa de duas amostras. Os dados foram expressos como média da  $\text{CE}_{50}$  e intervalo de confiança de 95% e média do  $\text{E}_{\text{max}} \pm$  erro padrão da média (SEM).



**Figura 14:** Esquema simplificado do equipamento e dos aparelhos utilizados nos experimentos de contratilidade *in vitro*. 1) transdutor de força 2) Haste fixa na qual se acopla o triângulo metálico com a traqueia e ponto de saída da aeração 3) Cuba para banho de tecido com circulação de água a 37°C

Fonte: AGUIAR, 2009

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Após ser concentrado em evaporador rotatório e seco em capela de exaustão, foram obtidas 354,54 g de extrato metanólico bruto, correspondendo a 12,07% de rendimento. As massas brutas em gramas e os rendimentos de cada uma das frações estão reunidos na Tabela 8.

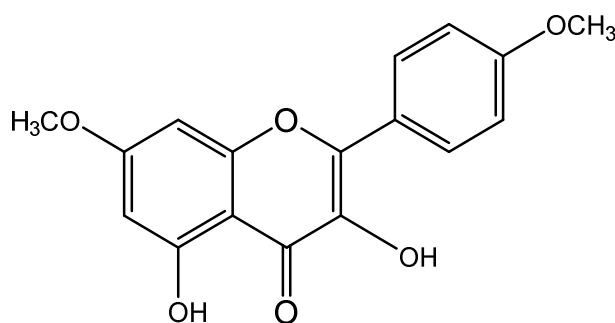
**Tabela 8:** Rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto (LTB) das folhas de *L. thymoides*

Frações	Massa Bruta (g)	Rendimento (%)
Hexano (LTH)	17,84	5,4
Diclorometano (LTD)	50	15,1
Acetato de Etila (LTA)	97,83	29,56

### 4.2 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Lippia thymoides*

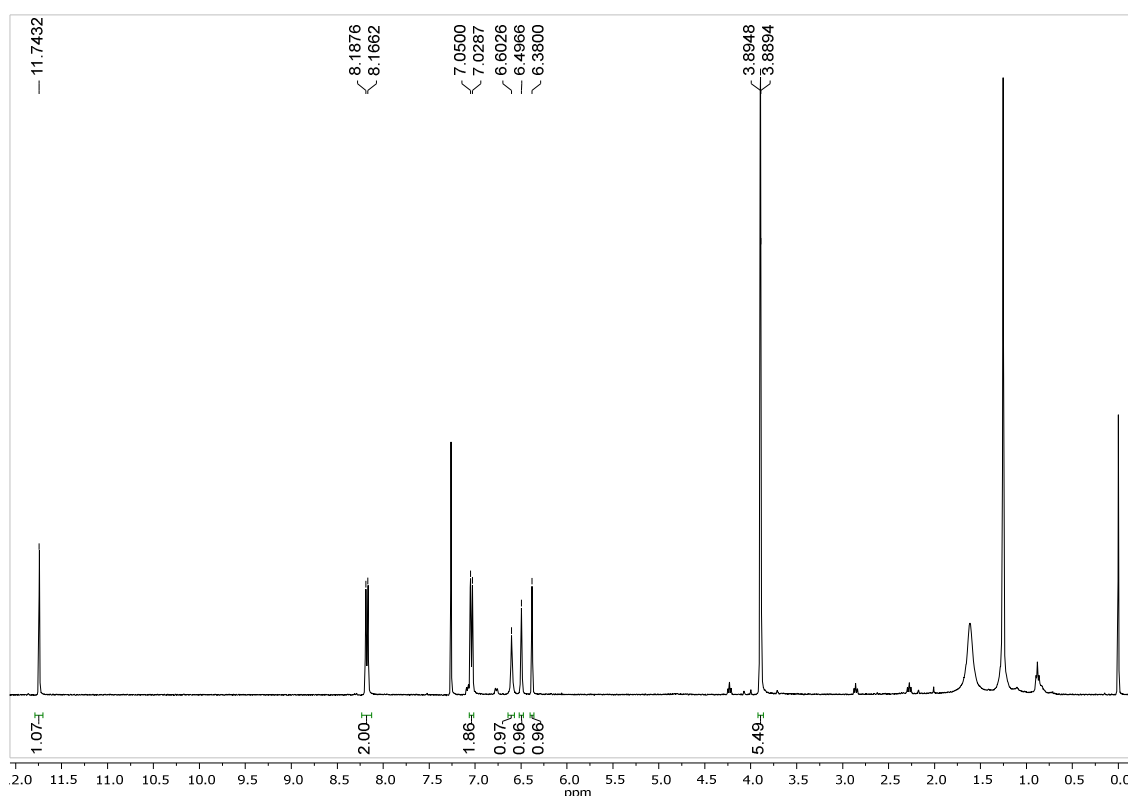
#### 4.2.1 Elucidação Estrutural da substância LT1-C4

As frações F3 e F4 apresentaram um precipitado com coloração verde. Após recristalização com hexano, foi obtido um pó de coloração amarela solúvel em acetona, que foi denominado de **LT1-C4** (30,5 mg) (Figura 15). Este sólido foi analisado em CCD, revelado com o reagente NP-PEG e lido a 35 nm, composto apresentando-se como uma mancha de coloração verde fluorescente, característico da classe dos flavonoides.



**Figura 15:** Estrutura da substância LT1-C4 (3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 16) foi possível verificar a presença de sinais de hidrogênios aromáticos: dois dupletos em  $\delta$  8,18 (2H) e  $\delta$  7,04 (2H), com constante de acoplamento característica de sistemas com relação orto ( $J = 9,0$  Hz) e dois dupletos em  $\delta$  6,38 (1H) e  $\delta$  6,50 (1H), com constante de acoplamento ( $J = 2,2$  Hz) que evidenciou um padrão de substituição meta. Em flavonoides, os hidrogênios do anel B aparecem como sinais na região entre 6,7 e 7,9 ppm, sendo mais desblindados que os hidrogênios do anel A. Se o anel B é *para* dissubstituído com oxigenação em C-4', um padrão típico de dois dubletos é observado, e os hidrogênios em C-3' e 5' aparecem em campo mais alto do que os em C-2' e 6'. Em caso de um padrão de oxigenação nas posições 5 e 7 do anel A, os hidrogênios dos carbonos 6 e 8 aparecem como dupletos na região de 6-6,5 ppm e o sinal correspondente a H-6 é mais protegido que o de H-8 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Dessa forma, os sinais em  $\delta$  8,18 (2H) e  $\delta$  7,04 (2H) são característicos do anel B e foram atribuídos aos pares de hidrogênio H-2'/H-6 e H-3'/H-5', bem como os sinais em  $\delta$  6,38 (1H) e  $\delta$  6,50 (1H) aos hidrogênios H-6 e H-8 no anel A. O espectro ainda apresentou dois simpletos em  $\delta$  3,90 e  $\delta$  3,89, que integraram para seis hidrogênios sugerindo a presença de duas metoxilas, além de um simpleto em  $\delta$  6,60 (1H). O sinal em  $\delta$  11,74 é típico de um hidroxila quelada indicando a presença de uma hidroxila na posição 5.



**Figura 16:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT1-C4** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) mostrou a presença de 15 sinais, sendo que dois mais intensos em  $\delta$  135,85 e  $\delta$  123,77, correspondendo cada um a dois carbonos, totalizando assim 17 carbonos, dos quais 15 correspondendo ao núcleo flavonoídico e dois aos carbonos metoxílicos. Os sinais referentes aos carbonos das metoxilas apareceram em  $\delta$  56,07 e  $\delta$  55,65, indicando que se tratavam de metoxilas localizadas em posições sem substituintes em *orto*, compatível com as posições 4', 5 ou 7. Para metoxilas estericamente impedidas, como na posição 3, espera-se que o sinal apareça mais desblindado, em torno de  $\delta$  60 (SILVA, 2009). O valor de deslocamento da carbonila em  $\delta$  175,36 indicou a presença de um flavonol, pois esta classe de flavonoides, em geral, apresenta carbonilas na região de  $\delta$  172,0 a  $\delta$  177,0 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

No espectro de HSQC (Figuras 18 e 19) foi possível identificar cinco sinais e assinalar as correlações dos hidrogênios diretamente ligados aos carbonos do anel A e do anel B: CH-6 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,3/98,11); CH-8 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,42/92,40), CH-3',5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,05/114,39), CH-2',6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  8,18/129,60). A posição das metoxilas nos carbonos 7 e 4' foi confirmada pelas correlações a duas e três ligações do espectro de HMBC (Figuras 20 e 21): MeO-7/C-7,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,89/165,88); H-8/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,43/165,88) e H-6/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,31/165,88); MeO-4'/C-4',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,90/161,32); H-3',5'/C-4',  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,04/161,31) e H-2',6'/C-4',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  8,18/161,31). Nesta mesma expansão de HMBC também foi observada as correlações a longa distância da hidroxila da posição 3, confirmando sua atribuição: 3-OH/C4 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,60/175,36); 3-OH/C2 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,60/145,91); 3-OH/C3 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,60/135,85).

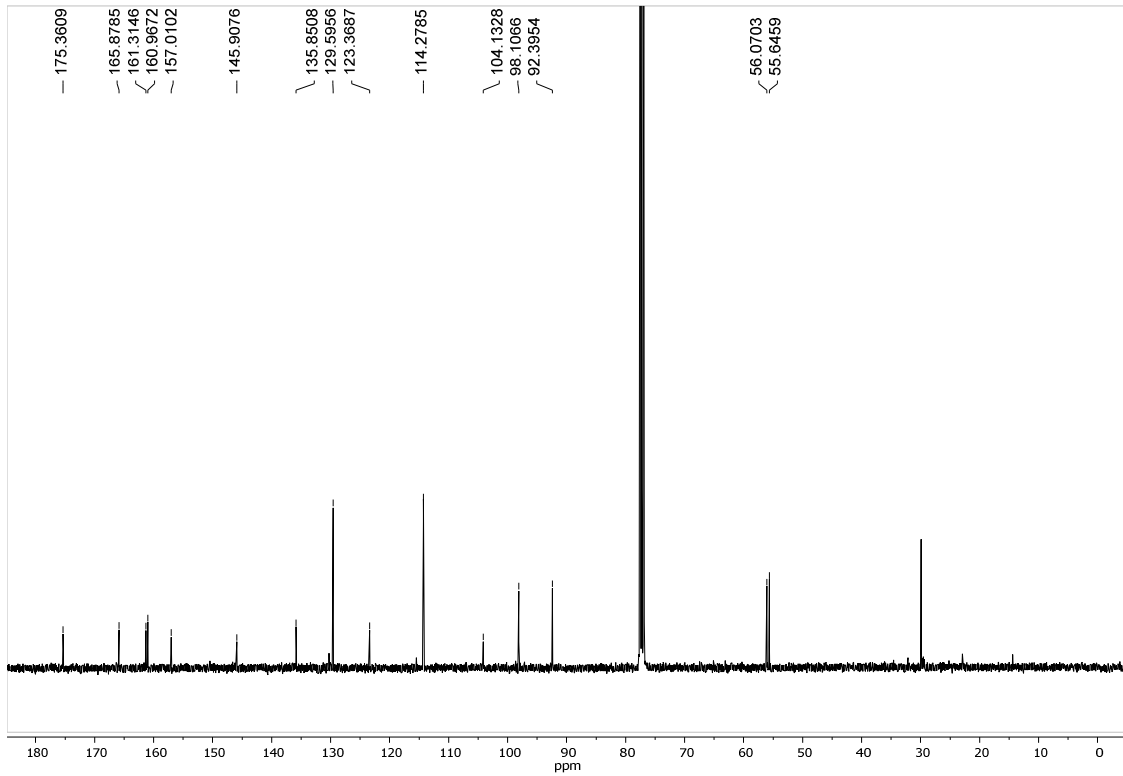


Figura 17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra LT1-C4 [100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

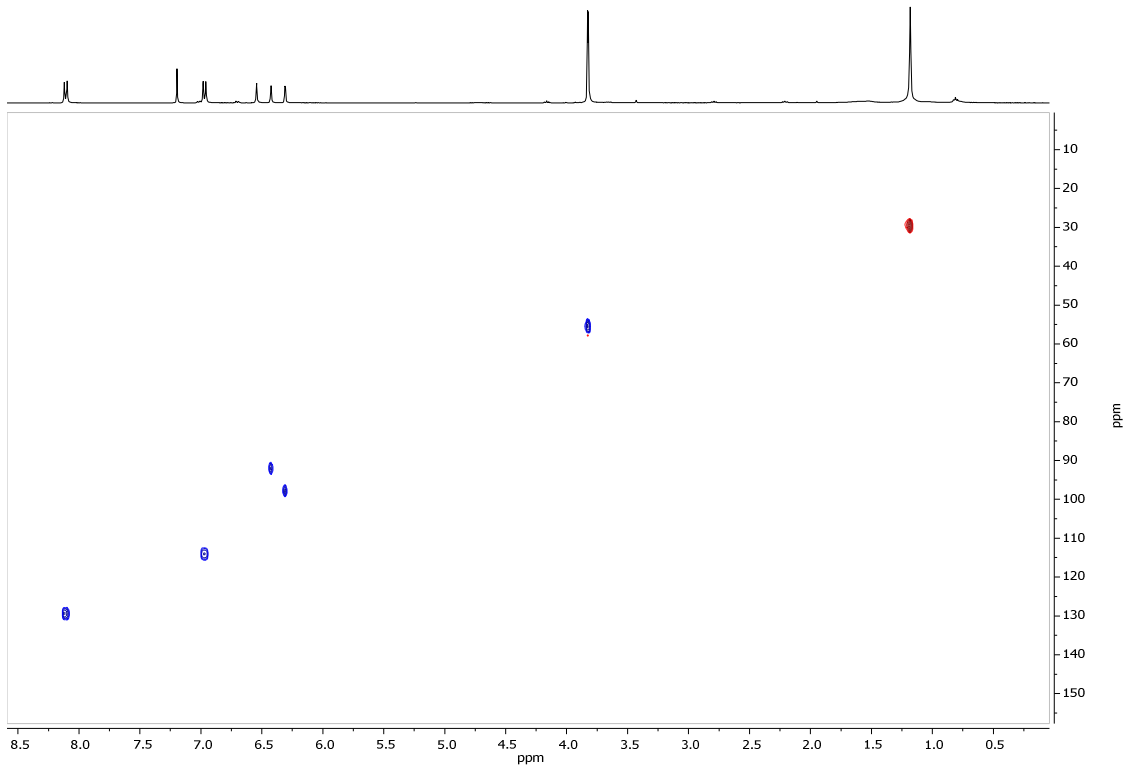
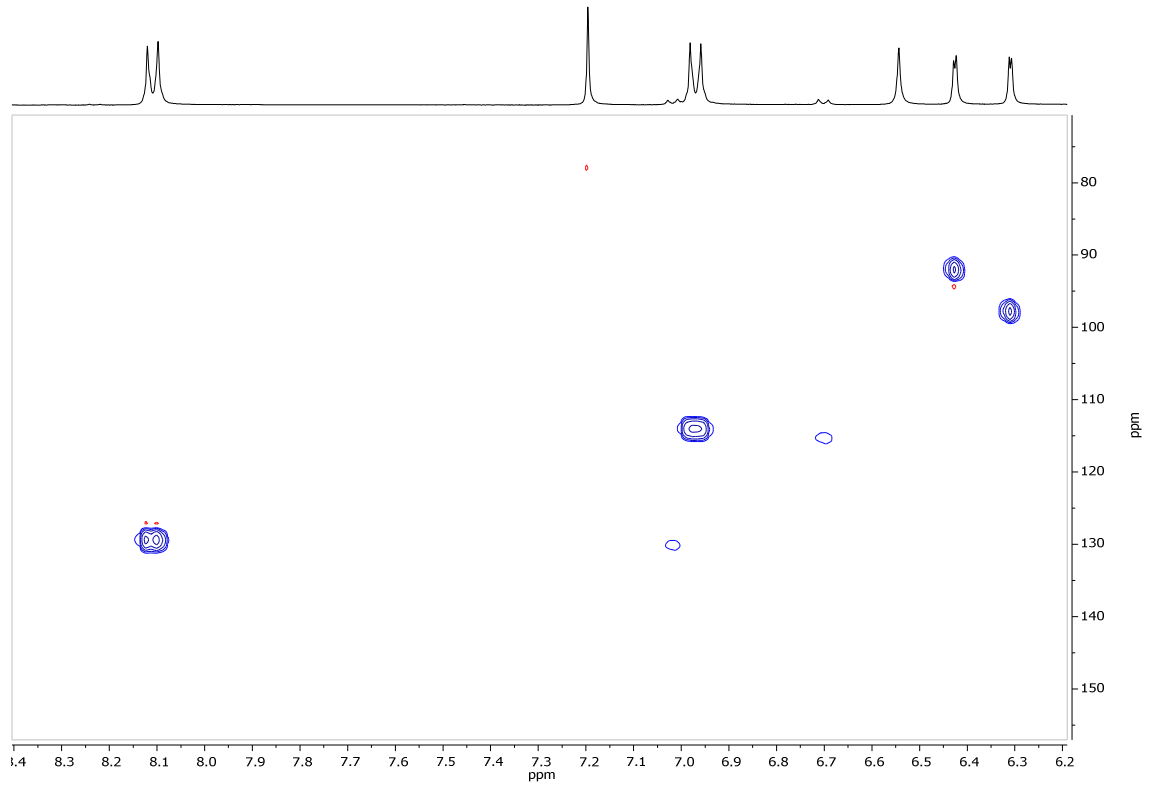
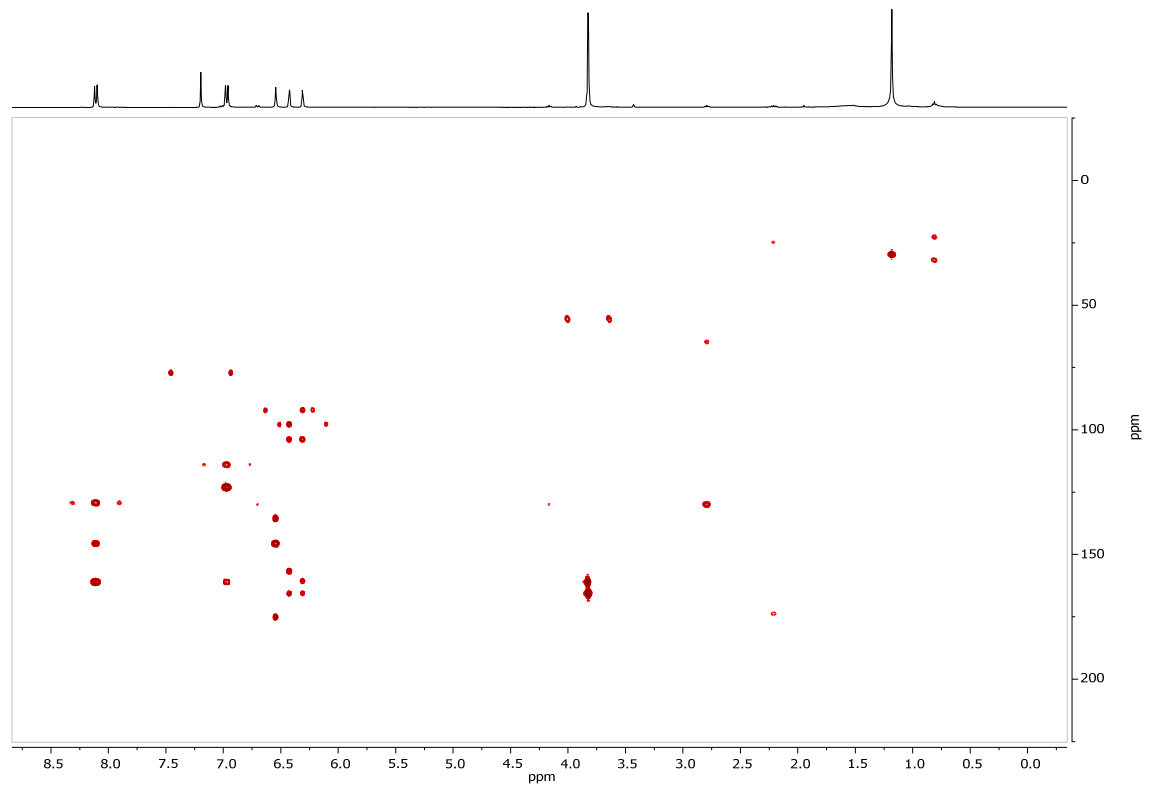


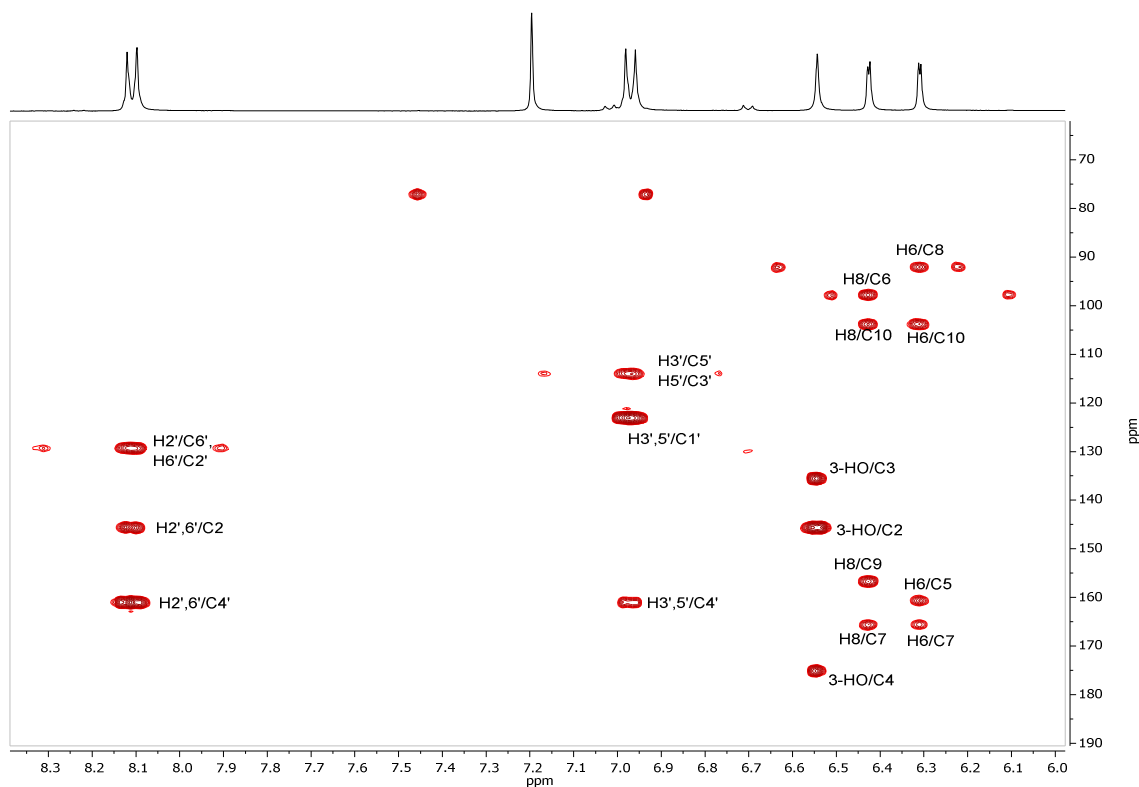
Figura 18: Espectro de HSQC do composto LT1-C4



**Figura 19:** Expansão do espectro de HSQC do composto LT1-C4



**Figura 20:** Espectro de HMBC do composto LT1-C4



**Figura 21:** Expansão da região de  $\delta$  8,5 a 5,9 do espectro de HMBC do composto **LT1-C4** e correlações assinaladas

Considerando os dados espectrométricos e a comparação com a literatura (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997) a substância pode ser identificada como 3,5-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona e os dados de atribuição por RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como da literatura, estão reunidos na Tabela 9. Esta substância foi anteriormente isolada de *Betula exilis* (POKHILO; DENISENKO; UVAROVA, 1985); *Aniba* sp. (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997); *Alpinia flabellata* (KIKUZAKI et al., 2001); *Wendita calysina* (PICCINELLI et al., 2004); *Polygala japonica* (LI et al., 2006); *Zingiber mekongense* (CHAREONKLA et al., 2011); *Betula pendula* (VEDERNIKOV; ROSHCHIN, 2012); *Dodonaea angustifolia* (OMOSA et al., 2014) e *Artemisia sphaerocephala* (SUN et al., 2016). Porém nenhum relato no gênero *Lippia*.

Análises *in silico* realizadas por Goettert e seus colaboradores (2010) verificaram que o 3,5-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona é um potente inibidor de p38 $\alpha$ , um regulador de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que controlam importantes funções celulares, como expressão gênica e apoptose (ZHANG; SHEN; LIN, 2007). Também foi relatada atividade anti-HIV-1 (CHAREONKLA et al., 2011).

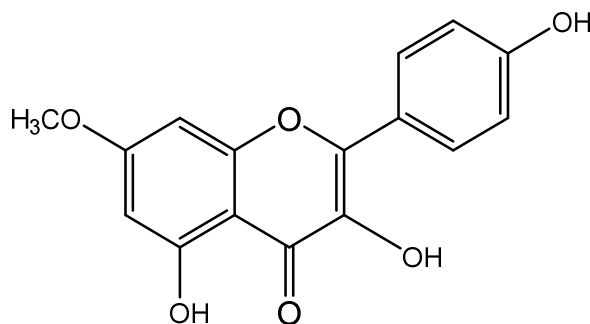
**Tabela 9:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **LT1-C4** [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit.) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>1</sup>
2	-	-	145,91	145,7
3	-	-	135,85	135,6
4	-	-	175,36	175,1
5	-	-	160,97	160,8
6	6,38 (1H, d, J = 2,2 Hz)	6,35 (d, J = 2,1 Hz)	98,11	97,9
7	-	-	165,88	165,7
8	6,50 (1H, d, J = 2,2 Hz)	6,46 (d, J = 2,1 Hz)	92,40	92,2
9	-	-	157,01	156,8
10	-	-	104,13	103,9
1'	-	-	123,37	123,1
2'	8,18 (2H, d, J= 9,0 Hz)	8,14 (d, J = 9,0 Hz)	129,60	128,8
3'	7,04 (2H, d, J= 9,0 Hz)	7,0 (d, J = 9,0 Hz)	114,79	114,0
4'	-	-	161,31	161,1
5'	7,04 (2H, d, J= 9,0 Hz))	7,0 (d, J = 9,0 Hz)	114,79	114,0
6'	8,18 (2H, d, J= 9,0 Hz)	8,14 (Q J = 9,0 Hz)	129,60	128,8
7-OCH <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	3,87 (s)	55,65*	55,4
4'-OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	3,87 (s)	56,07*	55,8
3-OH	6,60 (1H, s)	6,58 (s)	-	-
5-OH	11,74 (1H, s)	11,7 (s)	-	-

\*Dados podem estar trocados. nd = não detectado. Lit = literatura. <sup>1</sup> ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997

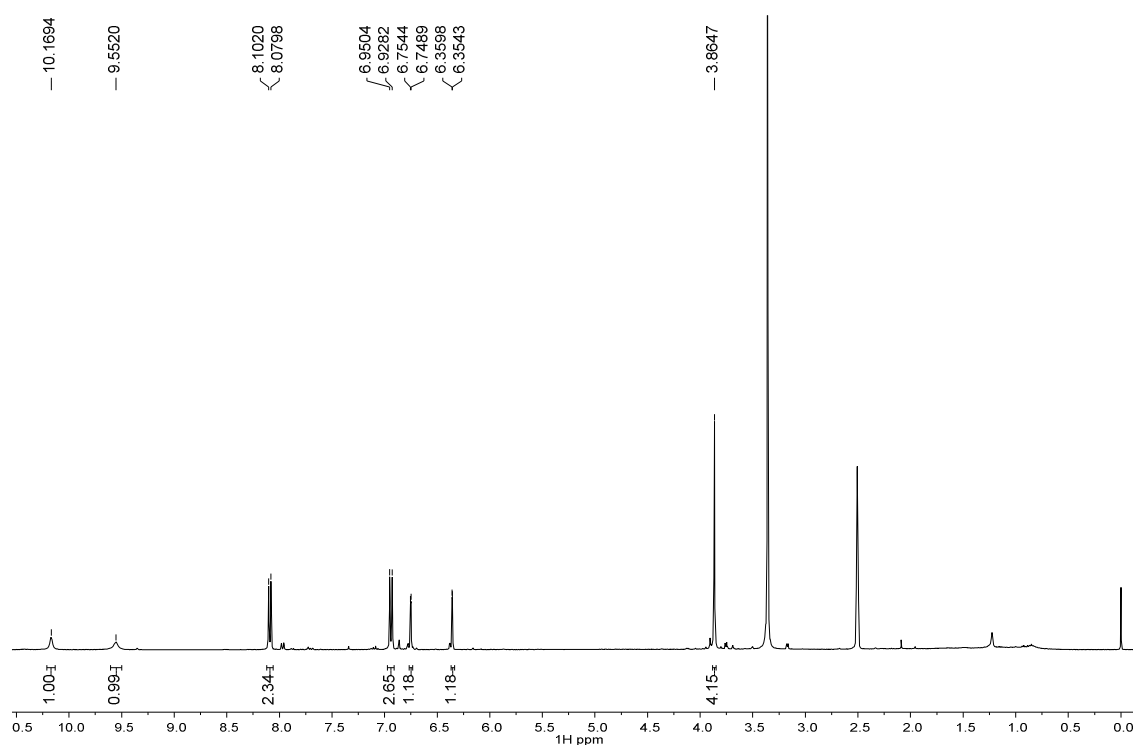
#### 4.2.2 Elucidação Estrutural da substância LT5-C5

A fração F8-11 apresentou um precipitado com coloração verde. Após uma recristalização com acetona foi obtido um sólido de coloração amarela pouco solúvel em metanol, que foi denominado de **LT5-C5** (17 mg) (Figura 22). Após CCD e revelação com o reagente NP-PEG e leitura a 365 nm, esta substância apresentou-se como uma mancha de coloração verde fluorescente, sugerindo ser um flavonoide.



**Figura 22:** Estrutura da substância **LT5-C5** (rhamnocitrina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*

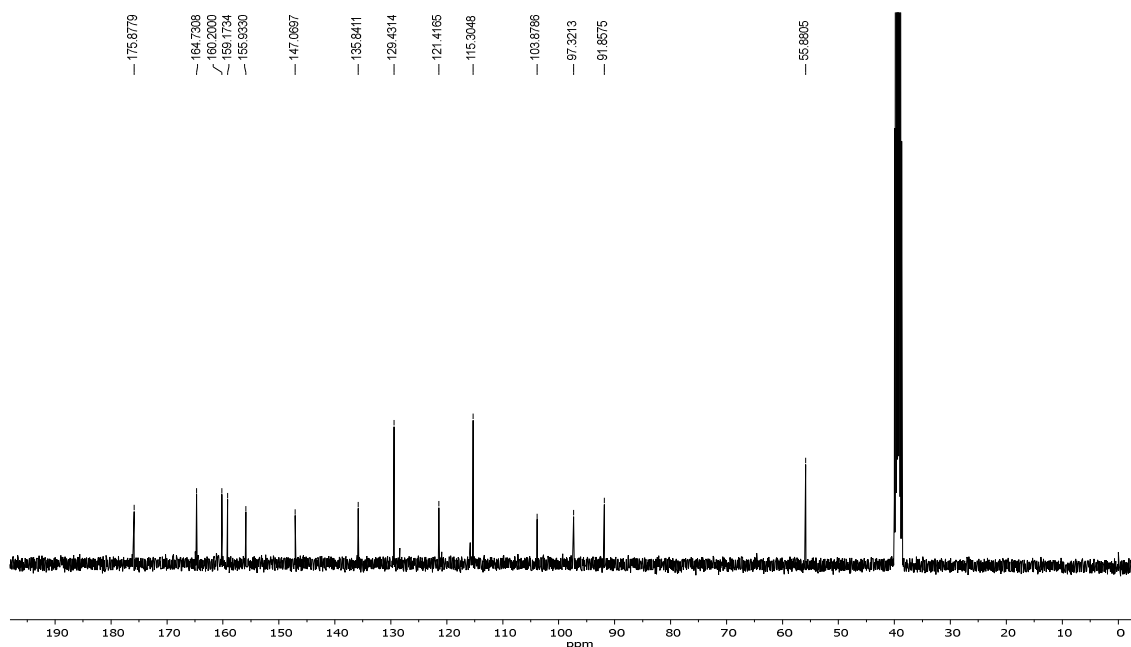
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de LT5-C5 apresentaram um padrão semelhante aos obtidos para **LT1-C4**. O espectro de RMN $^1\text{H}$  (Figura 23) exibiu quatro sinais de hidrogênios aromáticos, com dois dupletos em  $\delta$  6,36 (1H,  $J = 2,2$  Hz) e  $\delta$  6,75 (1H,  $J = 2,2$  Hz), evidenciando o padrão de substituição *meta* no anel A de flavonoides, correspondendo aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, pois em geral o sinal de H-6 aparece em campo mais alto que o de H-8 em flavonoides 5,7-dissubstituídos no anel A (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Os outros dois dupletos mais desblindados, em  $\delta$  8,09 (2H,  $J = 8,9$  Hz) e  $\delta$  6,94 (2H,  $J = 8,9$  Hz) são característicos de sistema aromático *para* dissubstituído, com interação spin-spin em *orto*, relativos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B. O espectro ainda apresentou um simpleto em  $\delta$  3,75 (3H), relativo a uma metoxila, e dois simpletos alargados, típicos de hidrogênios de hidroxilas, em  $\delta$  10,17 (1H) e 9,55 (1H).



**Figura 23:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT5-C5** [400 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)]

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24) foi possível observar 14 sinais (dois mais intensos), que correspondem a 15 carbonos do núcleo flavonoídico e a um carbono de metoxila em  $\delta$  55,88. Este valor indica que não há substituintes em *orto* a esta metoxila (SILVA, 2009), sugerindo assim sua localização na posição 4', 5 ou 7. O valor de

deslocamento da carbonila em  $\delta$  175,89 é típico de flavonóis que, em geral, apresentam carbonilas na região de  $\delta$  172,0 a  $\delta$  177,0 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

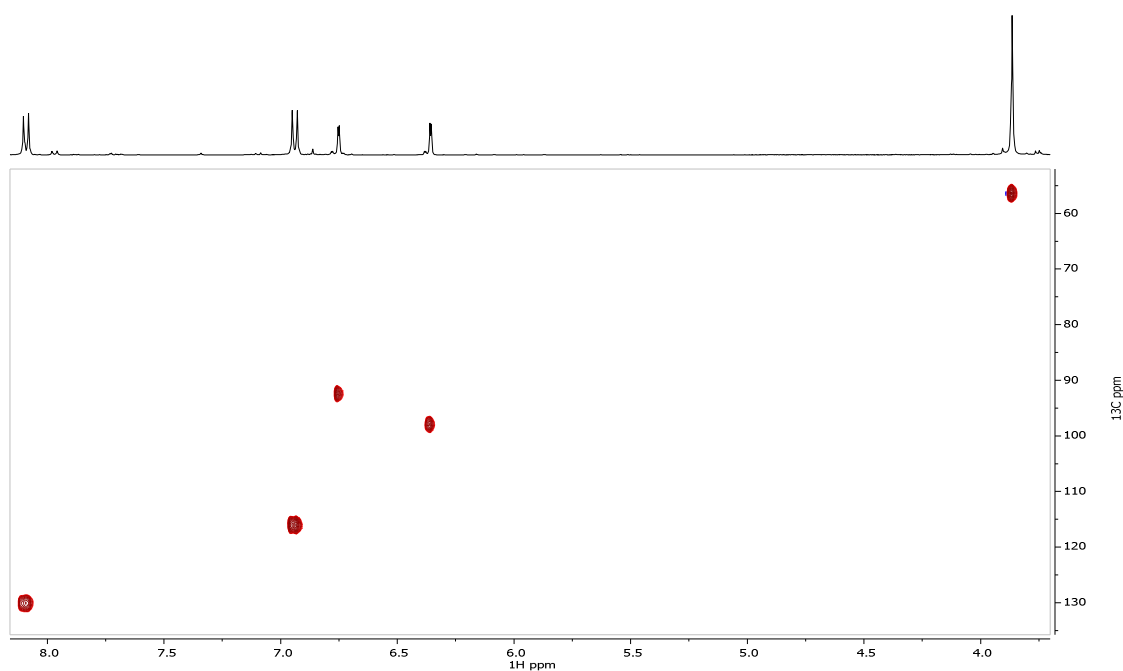


**Figura 24:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra **LT5-C5** [100,62 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)]

Através do espectro de HSQC (Figura 25) foi possível correlacionar os hidrogênios diretamente ligados aos carbonos do anel A e do anel B: CH-6 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,36/97,32); CH-8 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,75/93,32), CH-3',5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,94/115,31), CH-2',6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  8,09/129,43), bem como do carbono da metoxila ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,73/55,88). A posição desta metoxila no carbono 7 foi confirmada pelas correlações a duas e três ligações do espectro de HMBC (Figuras 26 e 27): MeO-7/C-7,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,75/164,73); H-8/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,75/164,73) e H-6/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,36/164,73). Outras correlações a duas e três ligações no espectro de HMBC possibilitaram a atribuição dos valores de deslocamento dos carbonos C-1', C-4', C-2, C-5, C-9 e C-10, tais como: H-3',5'/C-4',  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,94/159,17); H-2',6'/C-4',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  8,09/159,17) e H-2',6'/C-6, C-2,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  8,09/147,07).

Considerando os dados espectrométricos e a comparação com a literatura, a substância pode ser identificada como 3,5,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona. Esta substância é também conhecida como 7-O-metil-kaempferol ou rhamnocitrina e os dados de atribuição por RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  estão reunidos na Tabela 10. Esse composto foi previamente isolado na *Ammi visnaga* (HARBORNE; KING, 1976), *Syzygium aromaticum* (CAI; WU, 1996), *Polygonum stagninum* (DATTA et al., 2002), *Alomia myriadenia* (SCIO et al., 2003),

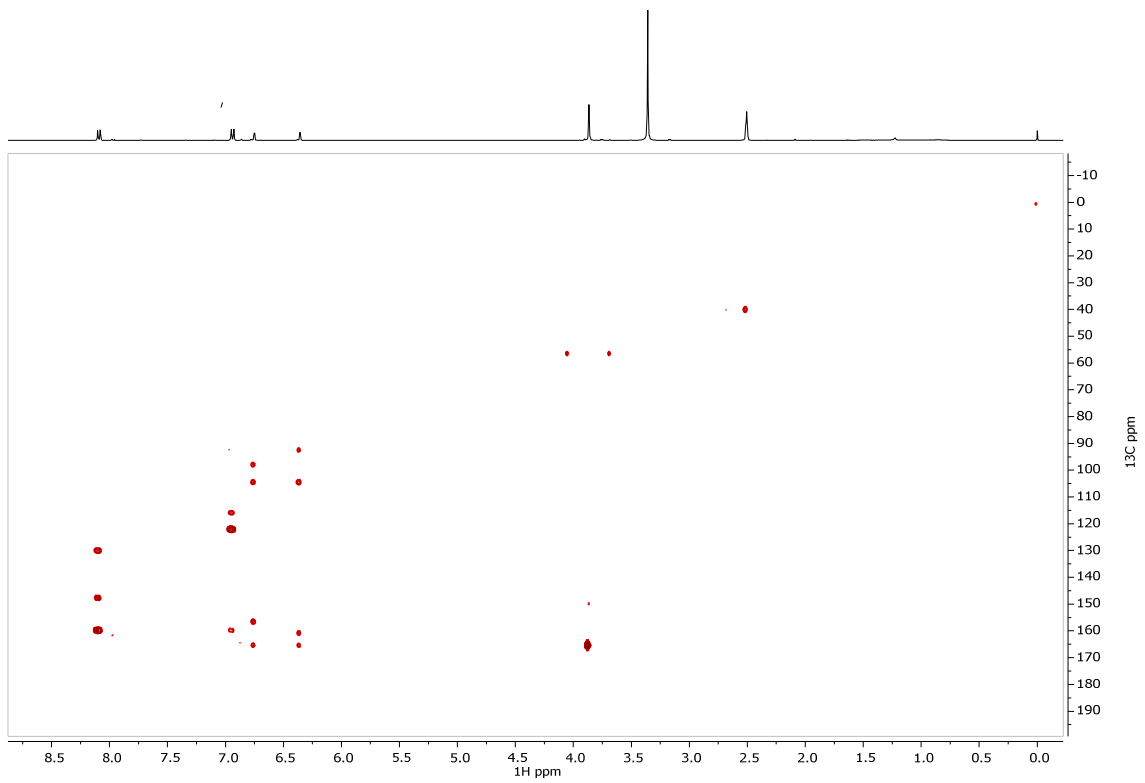
*Combretum erythrophyllum* (MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004), *Populus davidiana* (ZHANG et al., 2006), *Phyllanthus urinaria* (FANG et al., 2008), *Oxytropis falcata* (JIANG et al., 2009), *Nervilia fordii* (ZHOU et al., 2009), *Oxytropis ochrocephala* (LI et al., 2012), *Astragalus chinensis* (HU et al., 2017), *Tamarix balansae* (BENMERACHE et al., 2017) e *Eucalyptus citriodora* (TU et al., 2007; LEE; HUNG; CHEN, 2017). Existe apenas um relato de isolamento da rhamnocitrina em *Lippia*, para a espécie *L. rigida* (OLIVEIRA et al., 2013) e uma identificação por CLAE em *L. organoides* (LEITÃO et al., 2017).



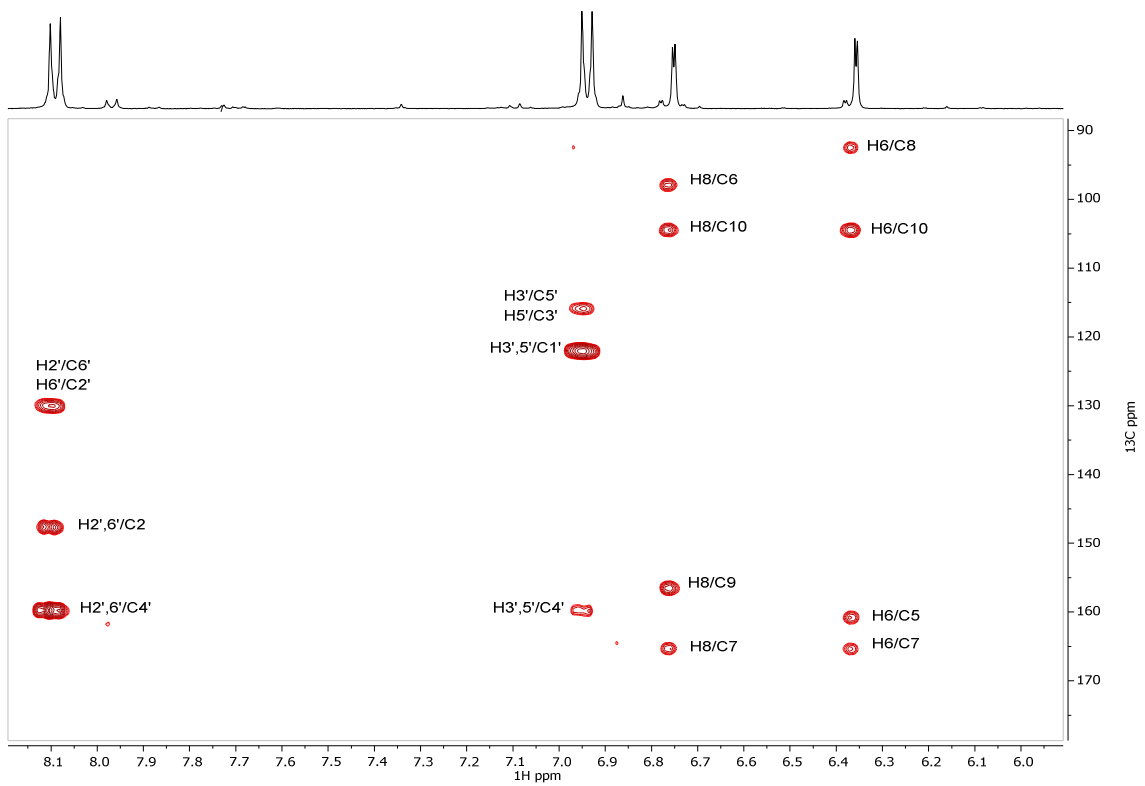
**Figura 25:** Expansão do espectro de HSQC do composto LT5-C5

Estudos com rhamnocitrina revelaram sua atividade antibacteriana (JIANG et al., 2009), prevenção de aterosclerose (TU et al., 2007), ações contra células tumorais (HU et al., 2017), efeito protetor no dano oxidativo no feocromocitoma em ratos (HONG et al., 2009), antioxidante e anti-inflamatório (MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004; ZHANG et al., 2006; FANG et al., 2008).





**Figura 26:** Espectro de HMQC do composto **LT5-C5**



**Figura 27:** Expansão da região de  $\delta$  8,5 a 5,9 do espectro de HMBC do composto **LT5-C5** e correlações assinaladas

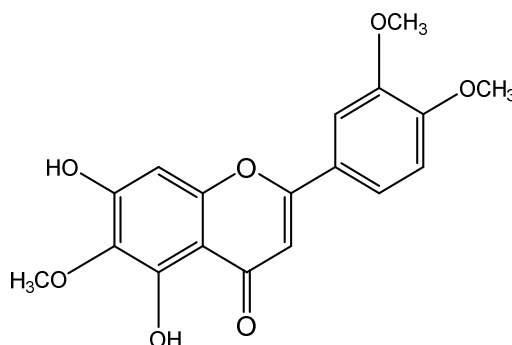
**Tabela 10:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **LT5-C5** [400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit.) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>1</sup>
2	-	-	147,07	147,2
3	-	-	135,84	136,2
4	-	-	175,89	176,0
5	-	-	160,20	160,4
6	6,36 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)	6,25 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	97,32	97,4
7	-	-	164,73	164,7
8	6,75 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)	6,60 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	91,86	92,0
9	-	-	155,93	156,2
10	-	-	103,88	104,0
1'	-	-	121,42	121,6
2'	8,09 (2H, d, $J = 8,9$ Hz)	8,05 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	129,43	129,6
3'	6,94 (2H, d, $J = 8,9$ Hz)	6,92 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	115,31	115,5
4'	-	10,18 (1H, s)	159,17	159,3
5'	6,94 (2H, d, $J = 8,9$ Hz)	6,92 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	115,31	115,5
6'	8,09 (2H, d, $J = 8,9$ Hz)	8,05 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	129,43	129,6
7-OCH <sub>3</sub>	3,75 (3H, s)	3,80 (3H, s)	55,88	56,0
4'-OH	10,15 (1 H, sl)	10,18 (1H, s)	-	-
3-OH	9,55(1 H, sl)	9,45 (1H, s)	-	-
5-OH	-nd	12,43 (1H, s)	-	-

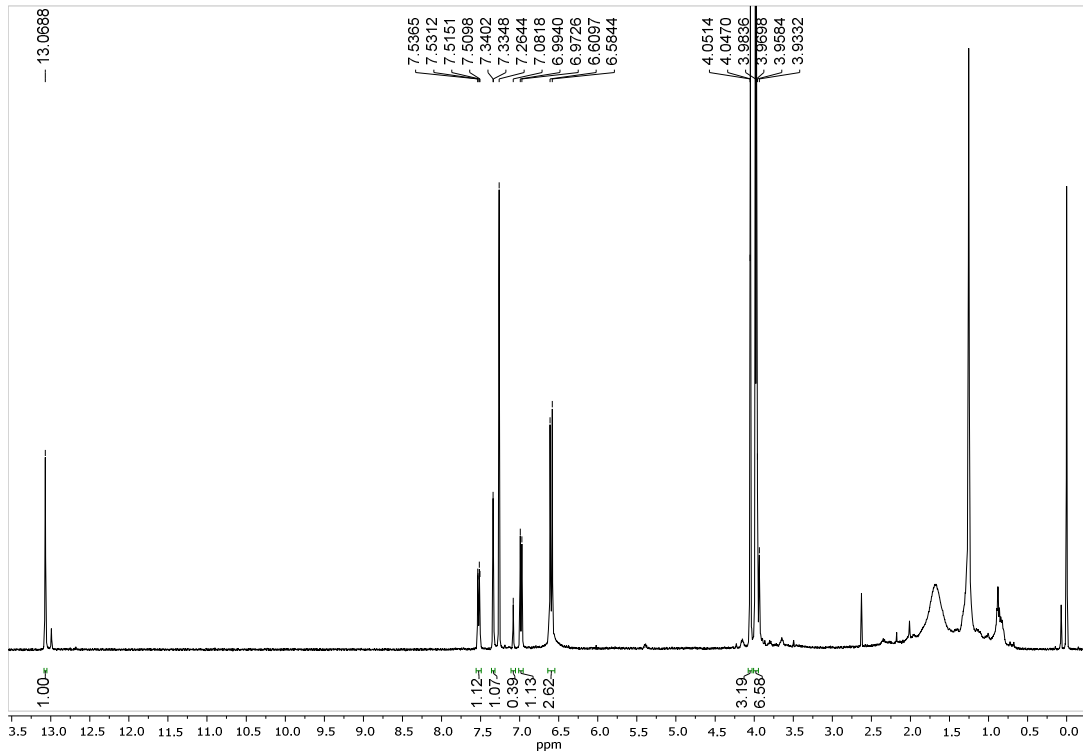
nd = não detectado; Lit = literatura. <sup>1</sup>TU et al., 2007

#### 4.2.3 Elucidação Estrutural da substância LT5-C6

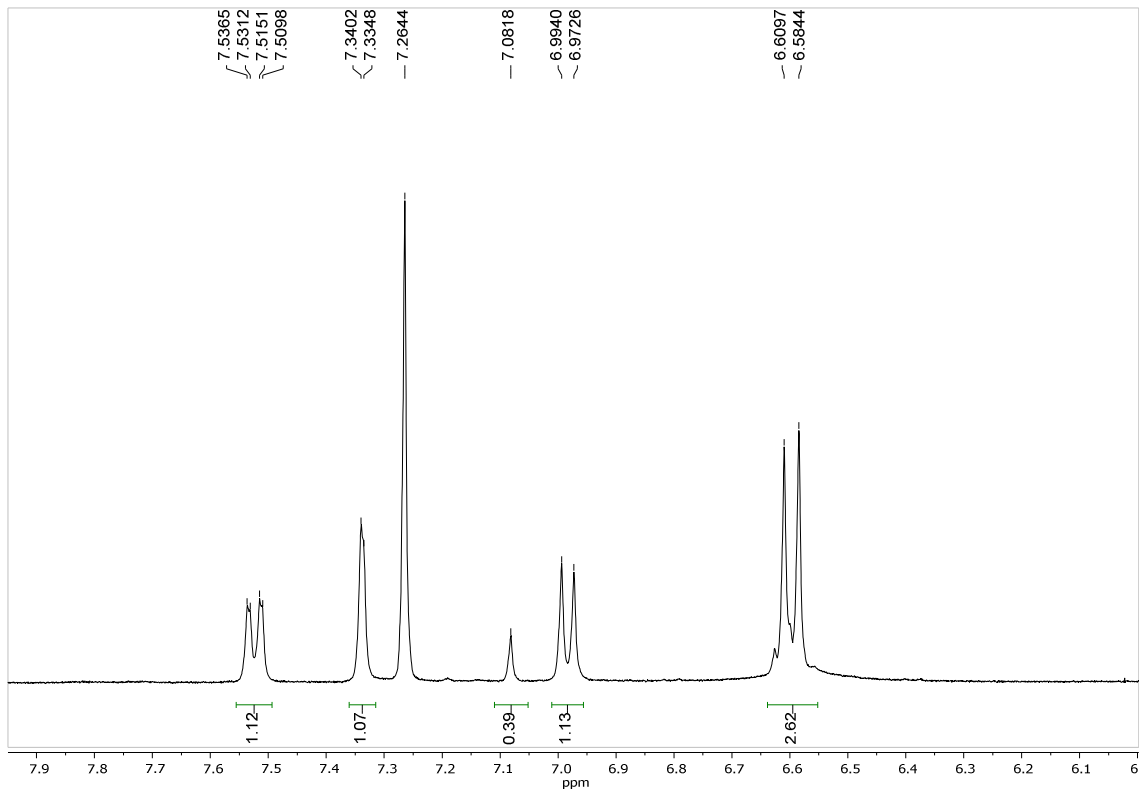
A fração F8-12 apresentou um precipitado com coloração verde, que foi recristalizado em acetona. Após este processo, foi obtido um sólido de coloração amarela pouco solúvel em metanol, codificado como **LT5-C6** (178 mg) (Figura 28). Esta amostra foi analisada por cromatografia em camada delgada, e após revelação com o reagente NP-PEG e leitura a 365 nm, deu origem a uma mancha de coloração amarelo fluorescente, indicando a presença de flavonoides.



**Figura 28:** Estrutura da substância LT5-C6 (5,7-diidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*

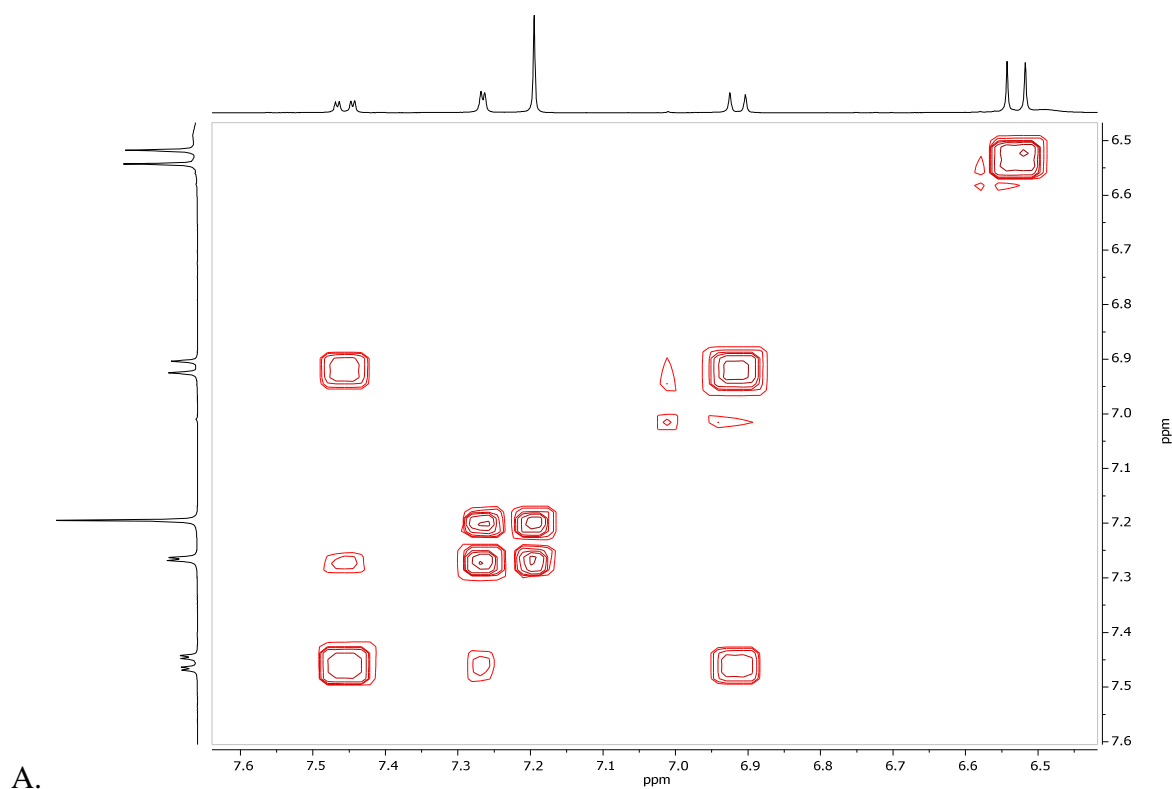


**Figura 29:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT5-C6** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 30:** Expansão do região de  $\delta$  8,0 a  $\delta$  6,0 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT5-C6** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

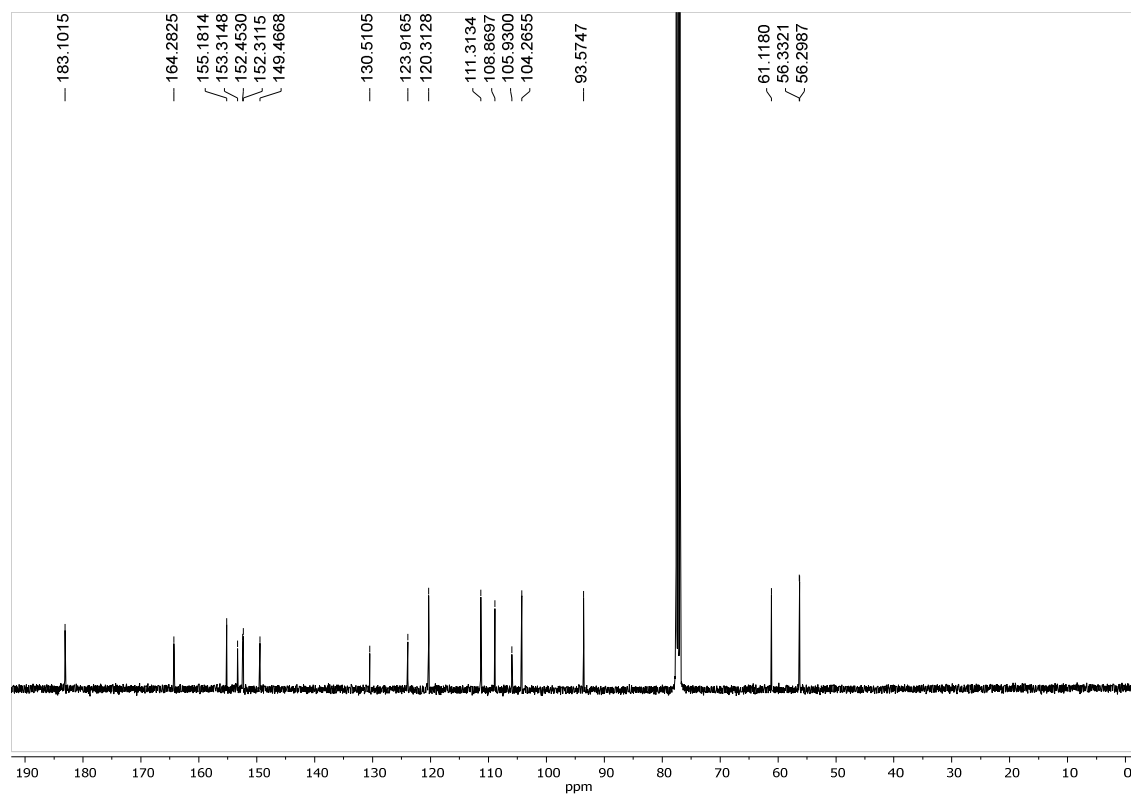
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29 e 30) foi possível verificar a presença de sinais de hidrogênios ligados a anel aromático na região de  $\delta$  7,52 a  $\delta$  6,58. O duplo duplete em  $\delta$  7,52 (1H,  $J = 2,2$  e  $8,5$  Hz) e um duplete em  $\delta$  7,34 (1H,  $J = 2,1$  Hz) em *meta*, através de suas constantes de acoplamento, foram associados a hidrogênios com relação *orto* e *meta*, e o duplete em  $\delta$  6,98 (1H,  $J = 8,5$  Hz) a hidrogênio com relação *orto*. O espectro COSY também confirma estes acoplamentos (Figura 29) e estes sinais foram relacionados aos hidrogênios do anel B de flavonoides, sugerindo assim um padrão de oxigenação nas posições 3' e 4' (MABRY MARKHAM; THOMAS, 1970; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Os dois simpletos em campo mais alto,  $\delta$  6,61 (1H) e  $\delta$  6,58 (1H), podem estar relacionados a hidrogênios do anel A ou C. Foram também observados três simpletos em região de metilas ligadas a oxigênio em  $\delta$  4,05 (3H),  $\delta$  3,98 (3H) e  $\delta$  3,97 (3H). O sinal em  $\delta$  13,07 corresponde a uma hidroxila fenólica quelada, que foi posicionada no carbono 5 do anel



**Figura 31:** Expansão da região de  $\delta$  6,4 a  $\delta$  7,6 do espectro COSY LT5-C6 [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

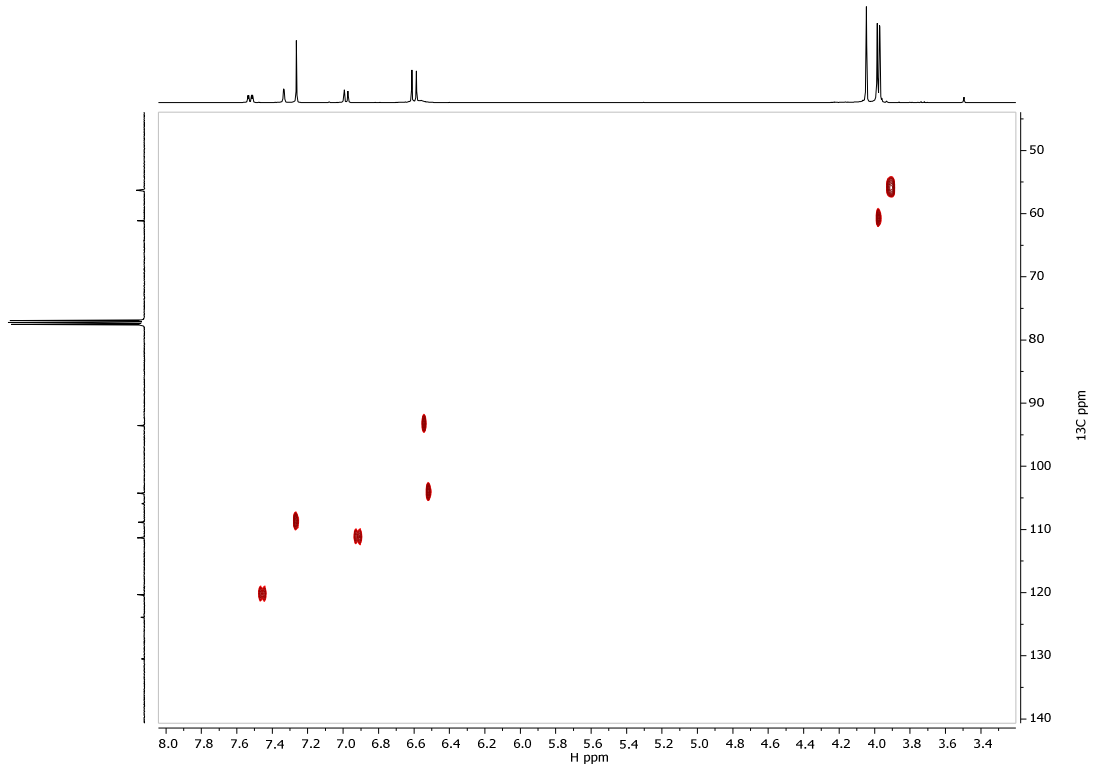
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) mostrou a presença de 18 sinais, dos quais 15 correspondendo ao núcleo flavonoídico e três aos carbonos metoxílicos ( $\delta$  61,12;  $\delta$  56,31 e  $\delta$  56,27). O valor de deslocamento da carbonila em  $\delta$  183,12 indica a presença de uma flavona, pois esta classe de flavonoides, em geral, apresenta carbonilas na região de  $\delta$  176,3 a  $\delta$  184,0 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). São também observados valores de deslocamento

nas regiões de  $\delta$  160,5-165,0 ( $\delta$  164,28) e  $\delta$  103,0-111,8 ( $\delta$  104,27), característicos de carbonos 2 e 3 do anel C de flavonas. O valor de uma metoxila em  $\delta$  61,12 é indicativo de dois substituintes em *orto* a esta metoxila (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

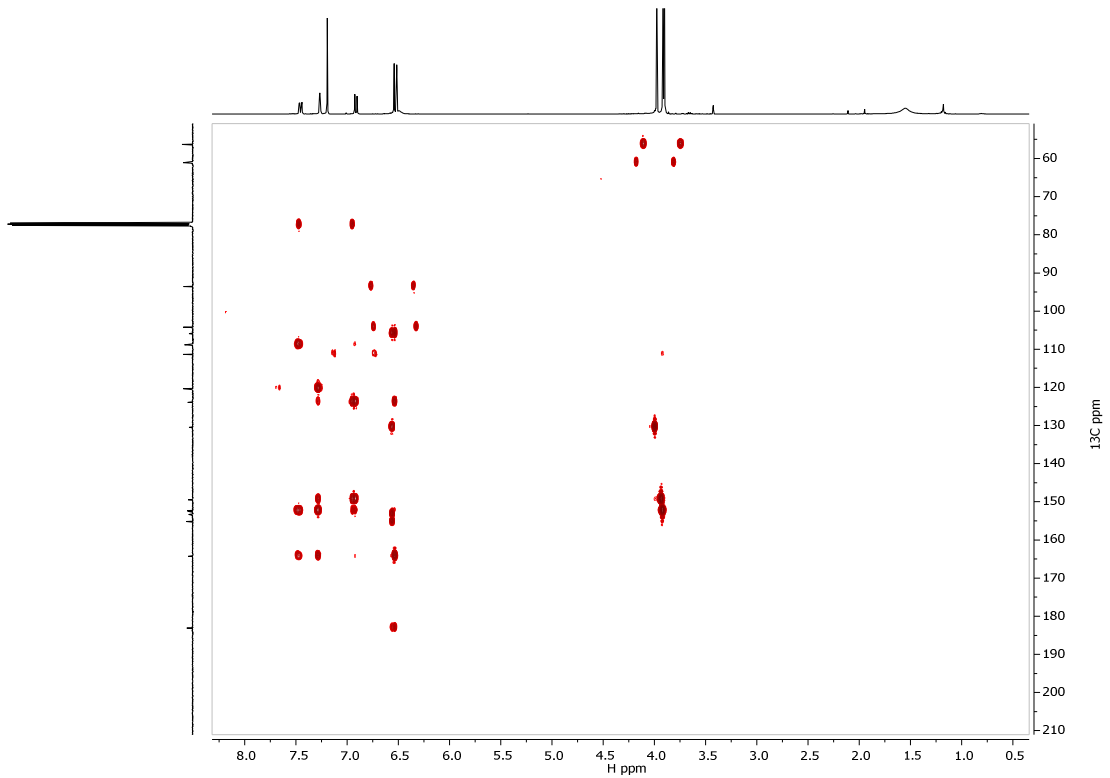


**Figura 32:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra LT5-C6 [100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

No espectro de HSQC (Figura 33) foi possível identificar sete sinais e assinalar as correlações dos hidrogênios diretamente ligados aos carbonos do anel B: CH-2' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,34/108,86), CH-5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,98/111,31) e CH-6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,52/120,31). A posição das metoxilas nos carbonos 6, 3' e 4' foi confirmada pelas correlações a duas, três e quatro ligações no espectro de HMBC (figuras 32-34): MeO-6/C-6,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  4,05/130,51); H-8/C-6,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,61/130,51) e H-8/C-4,  $^4\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,54/183,10); MeO-3'/C-3',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,93/149,47); H-2'/C-3',  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,26/149,47) e MeO-4'/C-4' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,97/152,45); H-5'/C-4',  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,98/152,45), H-6'/C-4',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,52/152,45). A atribuição de H-3 também pode ser confirmada pelas correlações nesta mesma expansão, em especial de: H-3/C-4,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,58/183,10) e H-3/C-2,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,58/164,28) e H-3/C-1',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,58/123,32).



**Figura 33:** Espectro de HSQC do composto LT5-C6



**Figura 34:** Espectro de HMBC do composto LT5-C6

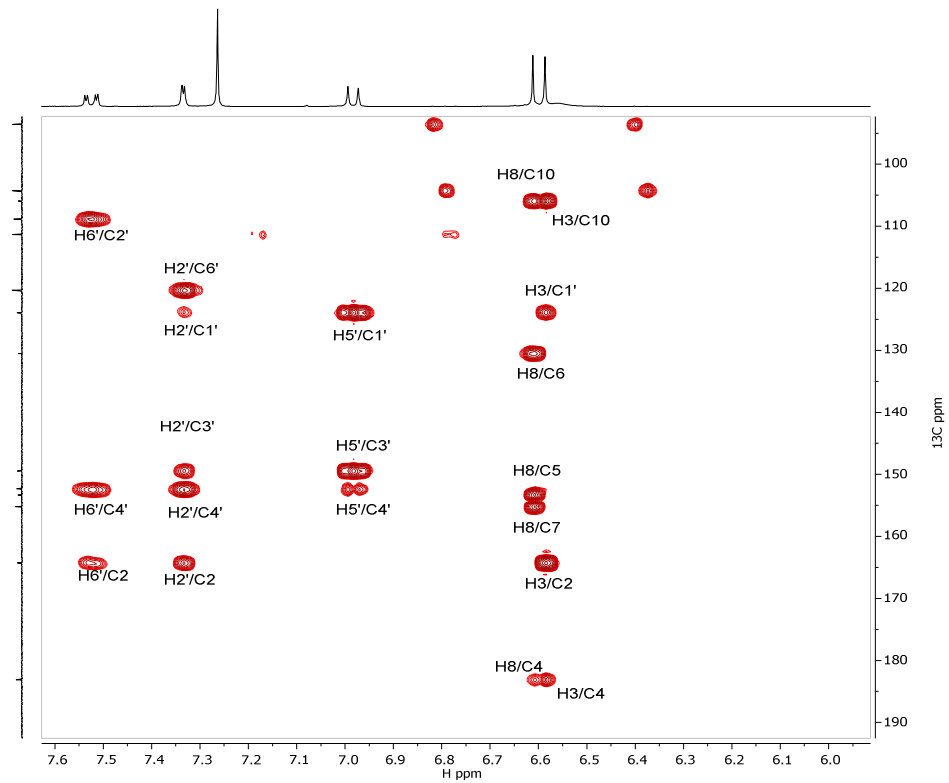


Figura 35: Expansão do espectro de HMBC do composto **LT5-C6** e correlações assinaladas

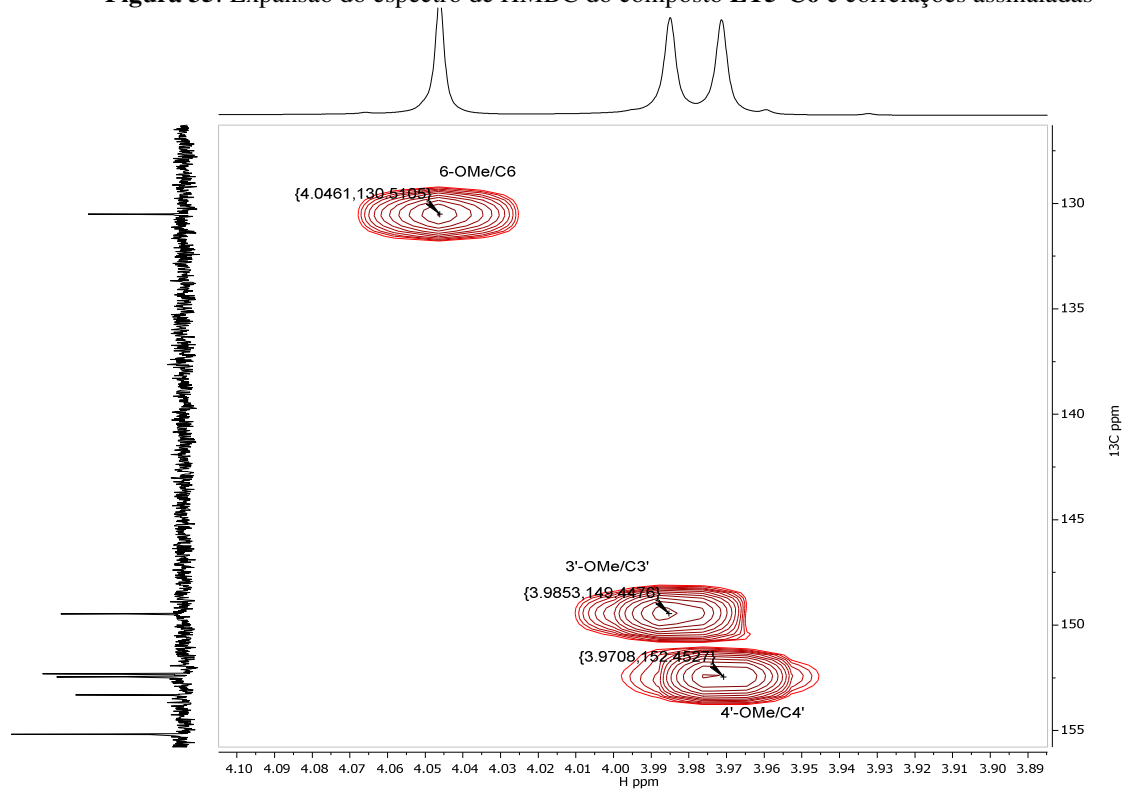


Figura 36: Expansão do espectro de HMBC do composto **LT5-C6** e correlações assinaladas

A elucidação estrutural da **LT5-C6** foi realizada levando em consideração os dados espectrométricos, dessa forma a referida substância foi identificada como 5,7-dihidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona, também conhecida como eupatilina. Os dados de atribuição por

RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como da literatura (NAKASUGI et al., 2000) estão reunidos na Tabela 11.

A eupatilina foi anteriormente isolada principalmente no gênero da *Artemisia*, como na *A. asiática* (PARK et al., 2015), *A. selengensis* (KIM et al., 2015a), *A. campestris* L. (METOUI et al., 2017), e *A. argyi* (HUANG et al., 2017), porém também foi encontrada na *Flos Chrysanthemi* Indici (TANG, GAO, YAO, 2009), *Centaurea arenaria* (CSAPI et al., 2010), *Tanacetum chiliophyllum* var. (POLATOĞLU et al., 2013), *Gnaphalium affine* (LIN et al., 2014), *Crossostephium chinense* (UEHARA et al., 2014), *Chrysanthemum morifolium* (WEI et al., 2015), *Tanacetum vulgare* var. (UEHARA; AKIYAMA; IWASHINA, 2015), *Stachys glutinosa* (RUIU et al., 2015), *Centaurea diluta* Ait. (ZATER et al., 2016), dentre outras. Em relação ao gênero *Lippia* não há nenhum relato de isolamento da eupatilina.

Esta substância demonstrou distintas atividades farmacológicas, dentre elas, pode-se destacar o melhoramento da função de ilhotas pancreática isoladas de camundongos (KIM et al., 2015b). Efeito anti-adipogênico, reduzindo o acúmulo lipídico intracelular e suprimindo o nível de expressão dos principais reguladores adipogênicos em adipócitos de maneira dependente da concentração. Estes resultados sugere que a eupatilina tem potencial como uma nova terapia anti-obesidade (KIM et al., 2018).

Kim e colaboradores (2015c) investigaram o efeito anti-artrítico da eupatilina em camundongos com artrite induzida por colágeno. Os autores chegaram a resultados significantes na diminuição da expressão de citocinas inflamatórias e diferenciação de osteoclastos, logo, sugeriram que essa substância é uma forte candidata como um agente anti-inflamatório. Este efeito anti-artrítico também foi utilizada no tratamento de gota (LIN et al., 2014).

Estudos apresentaram ação protetora em diversos órgãos, como atividade neuroprotetora em camundongos com isquemia cerebral focal transitória (SAPKOTA et al., 2017); ação cardioprotetora contra lesão miocárdica (QIAO; XU; YANG, 2017) e manifestou efeito renoprotetor (JEONG et al., 2015; PARK et al., 2015).

Vários relatos têm mostrado a importância da eupatilina em tratamentos contra o câncer, como por exemplo, estudos que apontaram a prevenção da apoptose em células epiteliais pigmentares em retina humana (DU; CHEN; XING, 2017); quimiopreventivo em câncer de pele (LI et al., 2016) e inibição do crescimento em distintas células cancerígenas (CHO et al., 2011; LI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHONG et al., 2016; WANG et al., 2018). Relacionado a tratamentos dérmicos, a eupatilina se mostrou promissora em terapias



de dermatite atópica e prevenção no envelhecimento da pele (JUNG et al., 2017; LEE et al., 2017; JUNG et al., 2018).

Além do exposto, este composto possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-superóxido-dismutase, anti-xantina-oxidase, citotóxica, osteoporose (JOO et al., 2015; YU et al., 2015; SONG et al., 2018; WEI et al., 2015; ZATER et al., 2016; METOUI et al., 2017; KIM et al., 2015) dentre outras.

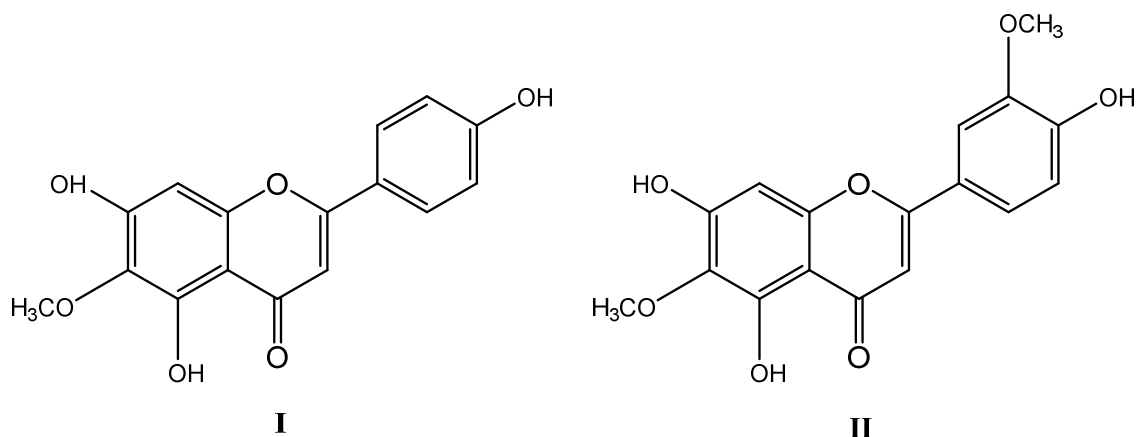
**Tabela 11:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **LT5-C6** [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit.) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>1</sup>
2	-	-	164,28	163,2
3	6,58 (1H, s)	6,72 (s)	104,27	103,3
4	-	-	183,10	182,0
5	-	-	153,31	152,6
6	-	-	130,51	131,3
7	-	-	155,18	157,3
8	6,61 (1H, s)	7,01 (s)	93,57	94,3
9	-	-	152,31 <sup>#</sup>	152,3
10	-	-	105,51	104,0
1'	-	-	123,92	122,9
2'	7,34 (1 H, d, $J = 2,1$ Hz)	7,64 (d, $J = 2,25$ Hz)	108,87	109,5
3'	-	-	149,47	149,0
4'	-	-	152,45 <sup>#</sup>	152,1
5'	6,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	7,11 (d, $J = 8,5$ Hz)	111,31	111,7
6'	7,52 (1H, dd, $J = 8,5, 2,1$ Hz)	7,76 (dd, $J = 8,5$ e 2,25 Hz)	120,31	119,9
3'-OCH <sub>3</sub>	3,98 (3H, s)*	3,94 (s)	56,31*	55,8*
4'-OCH <sub>3</sub>	3,97 (3H, s)*	3,85 (s)	56,27*	55,7*
5-OH	13,07 (1H, s)	12,95 (s)	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	4,05 (3H, s)	3,97 (s)	-	-
7-OH	Nd	nd	61,12	59,8
8-OH	Nd	nd	-	-

<sup>1</sup>Espectros obtidos em  $\text{DMSO-d}_6$  (NAKASUGI et al, 2000), nd = não detectado. \*,<sup>#</sup>Dados podem estar trocados

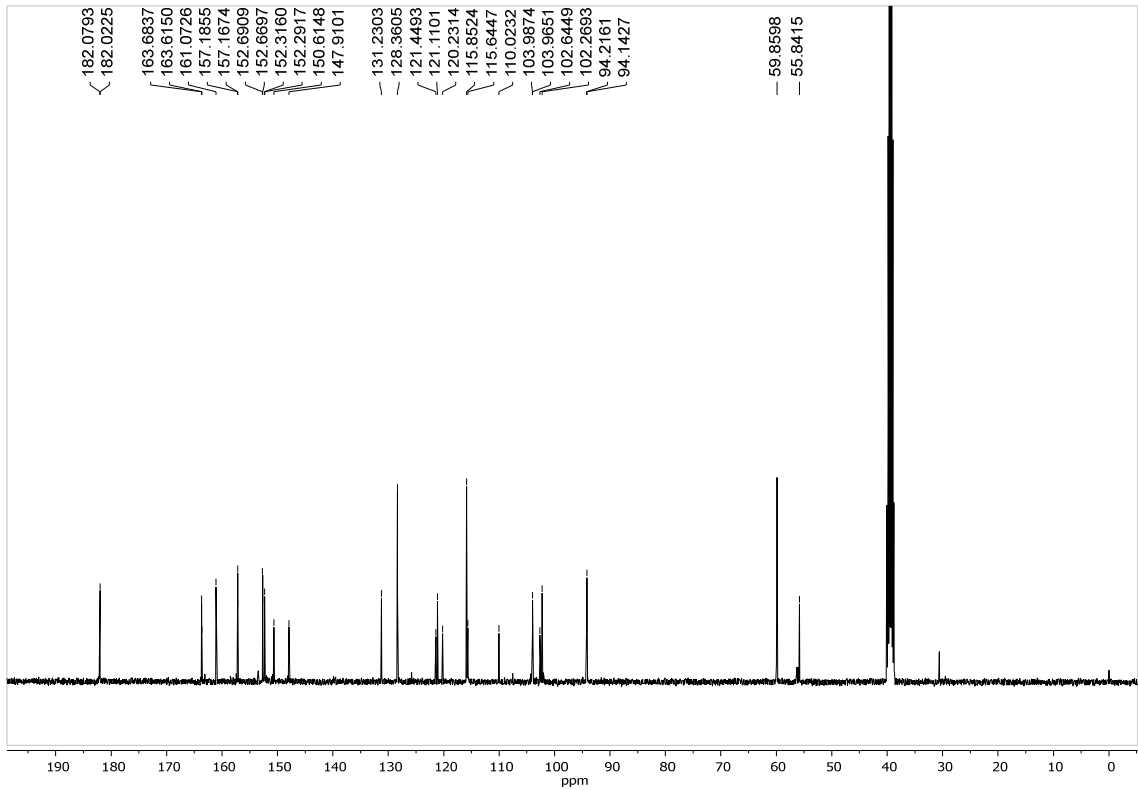
#### 4.2.4 Elucidação Estrutural da substância LT5-C9

A fração F8-13 apresentou um sólido com coloração verde, que foi purificado por recristalização com acetona. A partir desse processo, foi obtido um sólido amorfo de amarelo pouco solúvel em metanol, que foi denominado de LT5-C9 (87 mg) (Figura 37). Após ser eluído em cromatografia em camada delgada, borrifado com o reagente NP-PEG e lido a 365 nm, este sólido revelou como uma mancha de coloração verde fluorescente, indicando a presença de flavonoide.

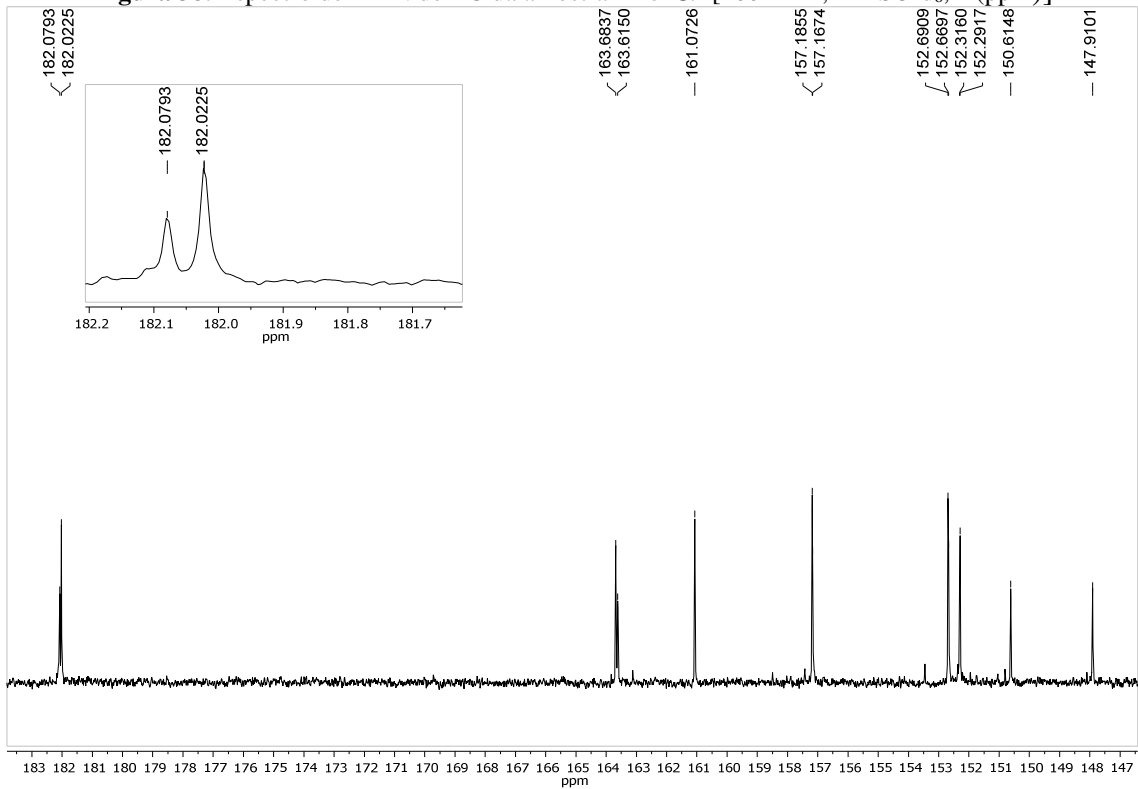


**Figura 37:** Estrutura das duas flavonas presentes em LT5-C9 isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*. **I**- hispidulina e **II**-jaceosidina

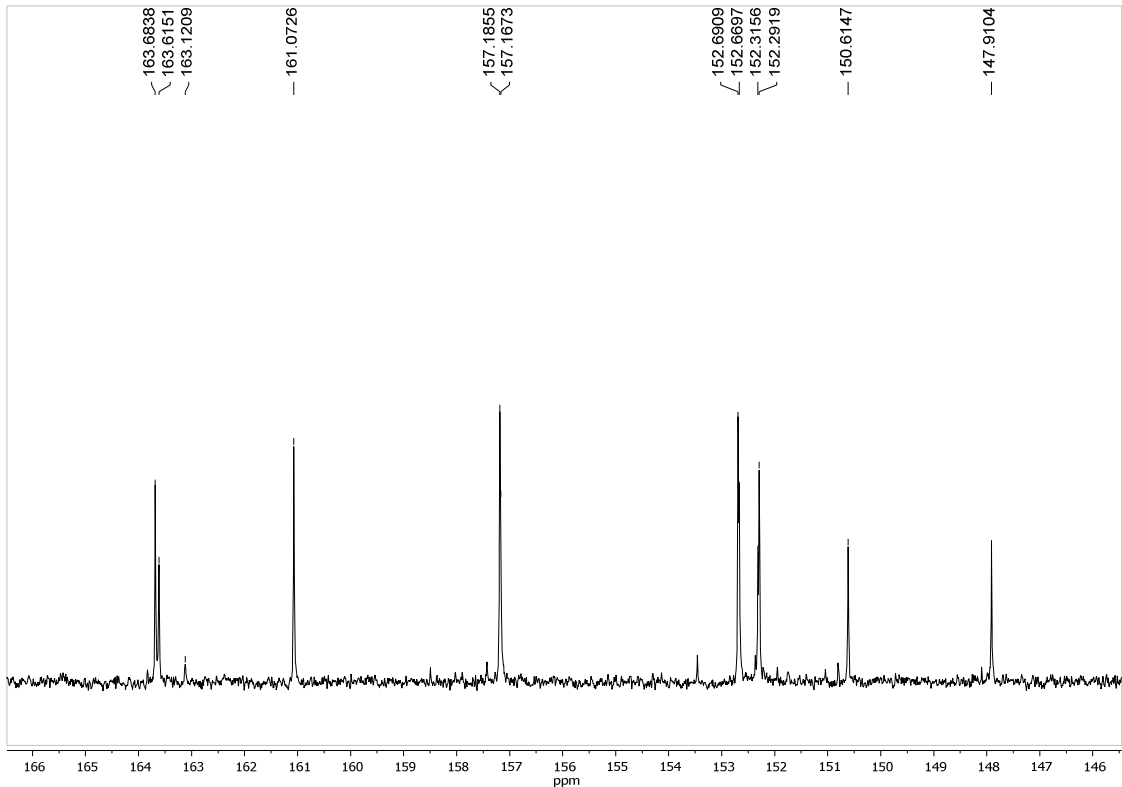
Entretanto pelos seus espectros de RMN identificou-se que se trata de uma mistura de duas flavonas, como evidenciado pelo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , com dois sinais correspondentes a carbonilas em  $\delta$  182,02 e  $\delta$  182,08, com intensidades diferentes (Figuras 38 e 39). Foram também observados valores de deslocamento nas regiões de  $\delta$  160,5-165,0 ( $\delta$  163,68 e  $\delta$  163,62) típicos de carbonos 2 do anel C de flavonas, além de sinais entre  $\delta$  103,0-111,8 ( $\delta$  102,27 e  $\delta$  102,65) que podem ser atribuídos ao carbono 3 do mesmo anel. A grande maioria dos carbonos encontrou-se em valores próximos de deslocamento (Figuras 40 e 41), identificando-se 30 átomos de carbono, dos quais 15 mais intensos ( $\delta$  182,02; 163,68; 161,07; 157,19; 152,69; 152,29; 131,23; 128,36 (2C); 121,11; 115,85 (2C); 103,97; 102,27 e 94,14), confirmando a presença de dois núcleos flavonoídicos distintos. Os sinais em  $\delta$  59,87,  $\delta$  59,86 e  $\delta$  55,84 indicaram a presença de metoxilas, as duas primeiras estericamente impedidas. Pelo espectro de DEPT 135 (Figura 42) identificaram-se os carbonos ligados a hidrogênio de cada substância, sendo que para a flavona I (FI) os seguintes valores de  $\delta$  foram verificados: 128,36; 115, 85; 102,27 e 94,14, dos quais os dois primeiros de maior intensidade. Já para a flavona II (FII), com sinais menos intensos, observou-se uma variação maior nestes valores (120,23; 115,64; 110,02; 102,65 e 94,22), sugerindo assim um padrão de substituição distinto da flavona I, em um dos anéis.



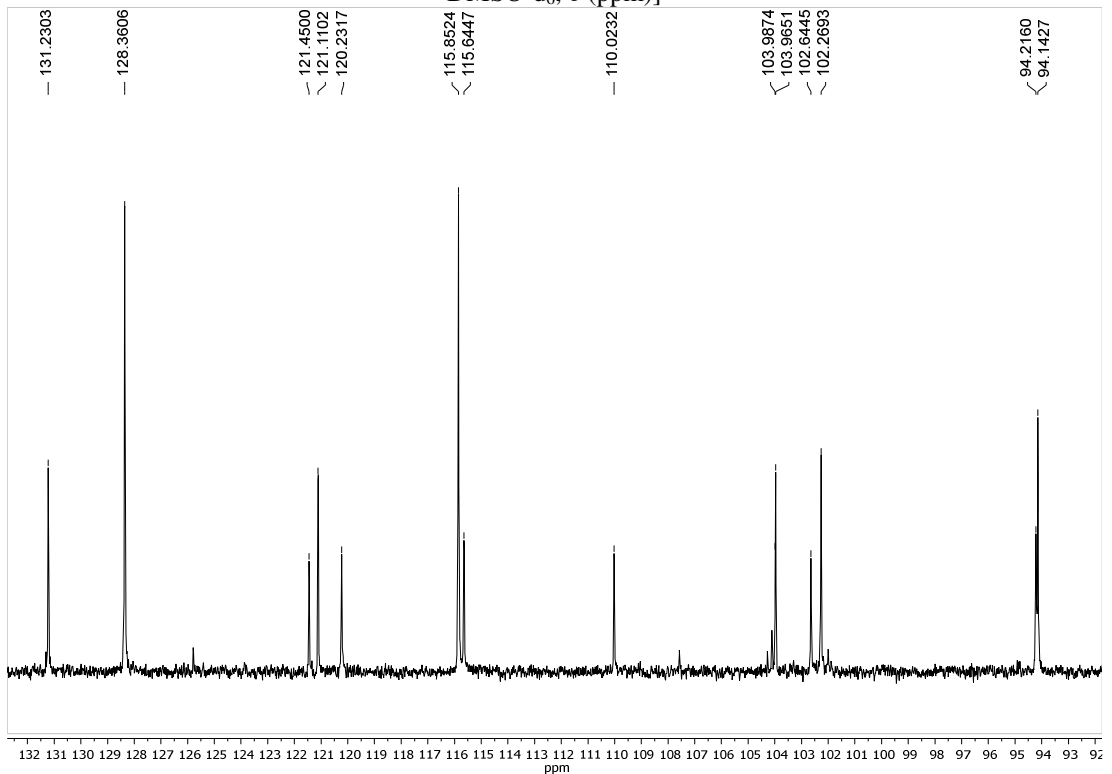
**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra **LT5-C9** [100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  (ppm)]



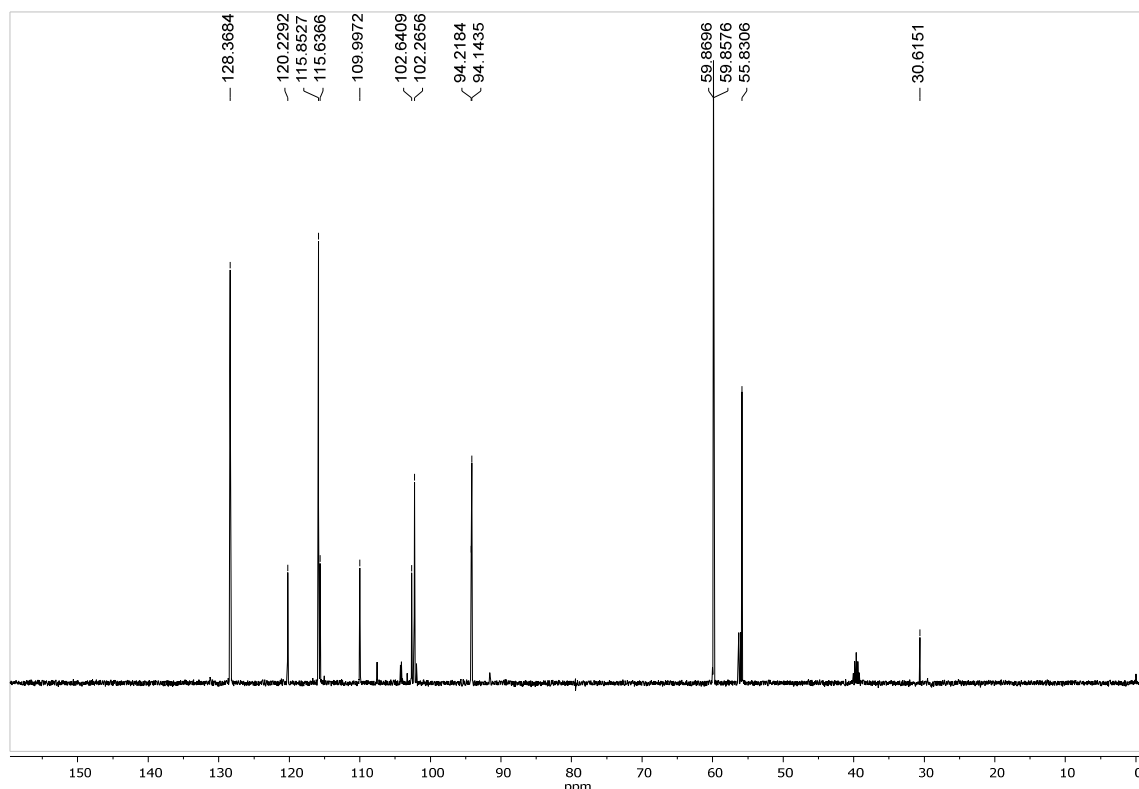
**Figura 39:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na região entre  $\delta$  147 e  $\delta$  183 da amostra **LT5-C9** [100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 40:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na região entre  $\delta$  146 e  $\delta$  165 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 41:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na região entre  $\delta$  92 e  $\delta$  132 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 42:** Espectro de DEPT 135 da amostra **LT5-C9** [100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm)]

Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 43) verificaram-se sinais distintos na região correspondente ao anel B indicando um padrão de oxigenação diferenciado entre as flavonas I e II. A flavona I apresentou dois duplos dupletos que acoplam entre si com  $J = 2,1$  e  $8,8$  Hz, em  $\delta$  7,93 (2H) e  $\delta$  6,92, característico de anel B *p*-dissubstituído, e este acoplamento pode ser confirmado pelas correlações no espectro de COSY (Figura 44), indicado assim que se referem a H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente. O simpleto em  $\delta$  6,78 (1H) foi associado ao hidrogênio da posição 3, valor típico para flavonas, que pode variar entre  $\delta$  6,0 e  $\delta$  8,0 (AGRAWAL; BANSAL, 1989). As correlações entre carbono e hidrogênio no HSQC (Figura 44) permitiram atribuir os carbonos metínicos dos anéis C e B: CH-3 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,78/102,27), CH-2',6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,93/128,36), CH-3',5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,92/115,85), confirmando a presença de um substituinte em 4'. Pela análise da região de carbonos ligados a oxigênios nos espectros de HSQC e HMBC verificou-se também a presença de metoxilas, e suas correlações a uma ligação ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,90/55,84 e  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,75/59,86) e a três ligações ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,90/131,23 e  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,76/147,91), as quais permitiram a identificação dos carbonos ligados a estes oxigênios. Os sinais referentes a H-2'/H-6' no HMBC sugeriram que o substituinte em C-4' não se trata de metoxila, pela ausência dos valores de  $\delta$  131,23 e  $\delta$  147,91 nas correlações a longa distância observadas:  $\delta\text{H}-2',\text{H}-6'/\delta\text{C}-4'$  7,93/163,68;  $\delta\text{H}-2',\text{H}-6'/\delta\text{C}-3',5'$  7,93/115,85 e H-2',H-6'/ $\delta\text{C}-6',2'$  7,93/128,36. O simpleto em  $\delta$  6,59 (1H) indicou que há apenas um hidrogênio no anel

( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/94,14), bem como o simpleto em  $\delta$  13,08 (1H) sugeriu a presença de uma hidroxila quelada no carbono 5 do anel A. Estas observações somada ao fato de que a metoxila estericamente impedida está no anel B, levou a proposição de um padrão de oxigenação nos carbonos 5,6 e 7, com a metoxila em C-6. As correlações no HMBC de H-8 a duas, três e quatro ligações ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/182,4;  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/131,23;  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/157,19;  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/152,60;  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,59/103,97) confirmaram a substituição sugerida. As demais correlações a longa distância, como de H-3 ( $\delta\text{H}-3/\delta\text{C}-4$  6,78/182,02,  $\delta\text{H}-3/\delta\text{C}-2$  6,78/163,08,  $\delta\text{H}-3/\delta\text{C}-1'$  6,78/121,11 e  $\delta\text{H}-3/\delta\text{C}-10$  6,78/103,97) e a comparação com dados de literatura (Tabela 12) auxiliaram na identificação da flavona I como a 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona, também conhecida como 6-metoxiapigenina ou hispidulina.

A hispidulina já foi isolada de uma variedade de espécies, tais como *Scoparia dulcis* (OSEI-SAFO et al., 2009), *Artemisia herba-alba* (MOUFID; EDDOUKS, 2012), *Salvia plebeia* (REN et al., 2014), *Centipeda minina* (CAO; LI, 2014), *Tanacetum vulgare* var. (UEHARA; AKIYAMA; IWASHINA, 2015) entre outras. No gênero *Lippia* foi descrita para *L. nodiflora* (TOMAS-BARBERÁN et al., 1987), *L. citriodora* (VALENTAO et al., 1999); *L. triphylla* (ONO et al., 2008), *L. sidoides* (ALMEIDA et al., 2010) e *L. graveolens* (BOWER et al., 2014).

Estudos na última década revelaram que a hispidulina apresenta uma grande variedade de ação farmacológica, dentre elas, destaca-se seu efeito neuroprotetor, pois melhorou a função cognitiva e a memória de pacientes idosos (HUANG; HUANG; NING, 2018) e foi efetivo em desfechos neurológicos, diminuindo o edema cerebral, mostrando ser útil contra lesão de isquemia (AN et al., 2018).

Apresentou capacidade protetora em modelos de lesões celular renal, induzida por glicose alta, a hispidulina ativou a autofagia (processo de regeneração natural) e inibiu a apoptose, mostrando ser promissora no tratamento de nefropatia diabética (WU et al., 2018).

Uma gama de ensaios demonstraram que a hispidulina é um poderoso agente que exibe efeitos antitumorais em uma ampla variedade de células cancerígenas, por exemplo, através da inibição do crescimento, indução de apoptose e parada do ciclo celular (HAN et al., 2018b; GAO et al., 2017; LIU et al., 2018). Devido sua baixa toxicidade em tecidos saudáveis, estudos sugeriram que a hispidulina pode servir como um agente terapêutico seguro para suprimir a metástase do câncer (XIE et al., 2015). Dentre outras atividades terapêuticas, este composto destacou-se também com ação antimicrobiana (ALGÉIBY et al., 2018).

**Tabela 12:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da flavona I de **LT5-C9** [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)] e comparação com a literatura

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit.) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>1</sup>
2	-	-	163,68	163,8
3	6,78 (1 H, s)	6,75 (1H, s)	102,27	102,4
4	-	-	182,04	182,1
5	-	-	152,69	152,8
6	-	-	131,23	131,4
7	-	-	157,19	157,3
8	6,59 (1 H, s)	6,57 (1H, s)	94,14	94,2
9	-	-	152,29	152,4
10	-	-	103,97	104,0
1'	-	-	121,11	121,2
2'	7,93 (2H, dd, J = 2,1 e 8,8 Hz)	7,90 (2H, d, J=8,8 Hz)	128,36	128,4
3'	6,92 (2H, d, J = 2,1 e 8,8 Hz)	6,90 (2H, d, J=8,8 Hz)	115,85	115,9
4'	-	-	161,07	161,2
5'	6,92 (2H, d, J = 2,1 e 8,8 Hz)	6,90 (2H, d, J=8,8 Hz)	115,85	115,9
6'	7,93 (2H, d, J = 2,1 e 8,8 Hz)	7,90 (2H, d, J=8,8 Hz)	128,36	128,4
5-OH	13,08 (1 H, s)	13,05 (1 H, s)	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	3,75 (3H, s)	3,73 (3H, s)	59,86	59,9
7-OH	Nd	-	-	-
4'-OH	Nd	-	-	-

<sup>1</sup>Espectros obtidos em DMSO- $d_6$  (HASE et al, 1995)

Os sinais dos anéis A e C da flavona II (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9 e C-10) apresentaram uma similaridade aos da flavona I, indicando o mesmo padrão de substituição (Tabela 12). O duplete em  $\delta$  6,95 ( $J = 6,2$  Hz) foi identificado como hidrogênio com relação *orto* no anel B, sendo atribuído a posição 5', o duplete em  $\delta$  7,56 ( $J = 2,1$  Hz) e o duplo duplete em  $\delta$  7,57 ( $J = 2,1$  e 6,2 Hz) correspondem, respectivamente, a H-2' e H-6', indicando que o anel B está 3',4'-dioxigenado. Pelo HSQC (Figura 46) foi possível fazer a atribuição dos carbonos metínicos no anel B: C-2' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,56/110,02), C-5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,95/115,06) e C-6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,57/120,23). Nos espectros de HMBC (Figuras 46, 47 e 48) os acoplamentos a longa distância de H-2' ( $^2\text{J}$   $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,56/147,90) e de H-5' ( $^3\text{J}$   $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,95/147,90) com o carbono ( $\delta$  147,91) ligado a metoxila desimpedida ( $\delta$  147,91), localizaram esta metoxila no anel B. Flavonoides com padrão de oxigenação 3'-OCH<sub>3</sub>, 4'-OH apresentam deslocamentos

médios em RMN de  $^{13}\text{C}$  para o anel B de  $\delta$  120,9 (C1');  $\delta$  111,8 (C-2');  $\delta$  147,4 (C-3');  $\delta$  149,8 (C-4');  $\delta$  115,7 (C-5') e  $\delta$  122,2 (C-6'), próximos aos observados, sugerindo o posicionamento da metoxila no carbono 3' (ROITMAN; JAMES, 1985). Assim pelos dados espectrométricos e comparação com a literatura foi possível sugerir que a flavona II corresponde a 5,7,4'-tri-hidroxi-5,3'-dimetoxiflavona e sua atribuição está apresentada na Tabela 13.

Esta flavona também conhecida como jaceosidina, foi isolada anteriormente de *Artemisia princeps* (MIN et al., 2009), *Centaurea nicaeensis* (HAMOUD et al., 2012), *Tanacetum chiliophyllum* var. (POLATOĞLU et al., 2013), *Artemisia asiatica* (HADJÚ et al., 2014), *Crossostephium chinense* (UEHARA et al., 2014), *Tanacetum vulgare* var. (UEHARA; AKIYAMA; IWASHINA, 2015) *Centaurea diluta* (ZATER et al., 2016), *Artemisia argyi* (HUANG et al., 2017), entre outras espécies. No gênero *Lippia*, foi isolada na *L. nodiflora* (TOMAS-BARBERÁN et al., 1987), *L. citriodora* (VALENTAO et al., 1999) e *L. triphylla* (ONO et al., 2008).

A jaceosidina vem apresentando distintas aplicabilidade farmacológica na última década, principalmente um grande potencial quimioterápico, pois aumentou a apoptose e inibiu o crescimento de diversas células tumorais e parada do ciclo celular (WOO; KWON, 2016; YUAN et al., 2016; HAN et al., 2018a);

Mostrou possuir um grande potencial em prevenir e/ou melhorar trombose, por exemplo, estimulou a angiogênese promovendo crescimento de vasos sanguíneos (LEE et al., 2014) e diminuiu significativamente a agregação plaquetária (RYU et al., 2013; MARSH et al., 2017).

Suprimiu efetivamente os níveis de glicose no sangue, melhorou a tolerância à glicose, reduziu o peso corporal, reduziu o acúmulo de lipídios, suprimiu a expressão de genes lipogênicos no fígado e melhorou a lesão hepática em camundongos (ANAYA-EUGÊNIO et al., 2014; OUYANG et al., 2017).

Diversos autores destacaram também que a jaceosidina é um potente agente antimicrobiano (ZATER et al., 2016; KUMAR et al., 2016; ALLISON et al., 2017; ALGÉIBY et al., 2018), além de outras atividades neuroprotector (MARSH et al., 2017) e atividade anti-neuroinflamatória (NAM et al., 2013).

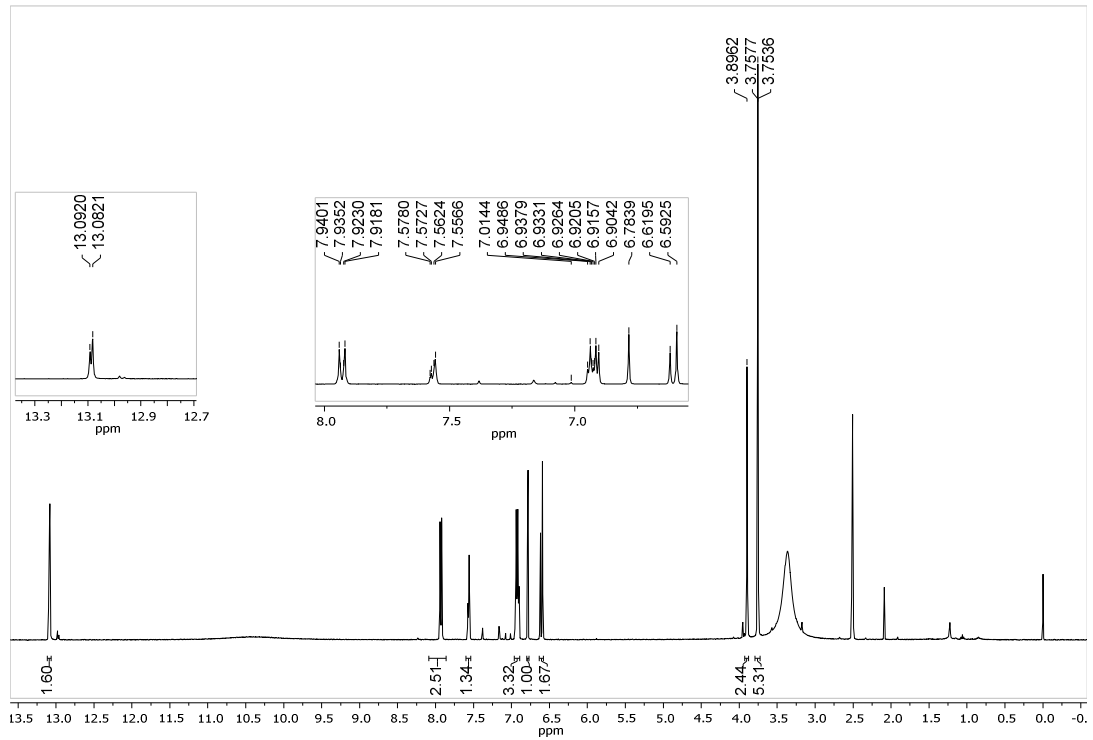
Cabe ressaltar que estas duas flavonas, hispidulina e jaceosidina, estão presentes nesta mistura em uma relação de 1,9:1 (FI: FII), conforme verificado pelas relações entre as integrações relativas referente aos hidrogênios H-2'/H-6' dos respectivos anéis.



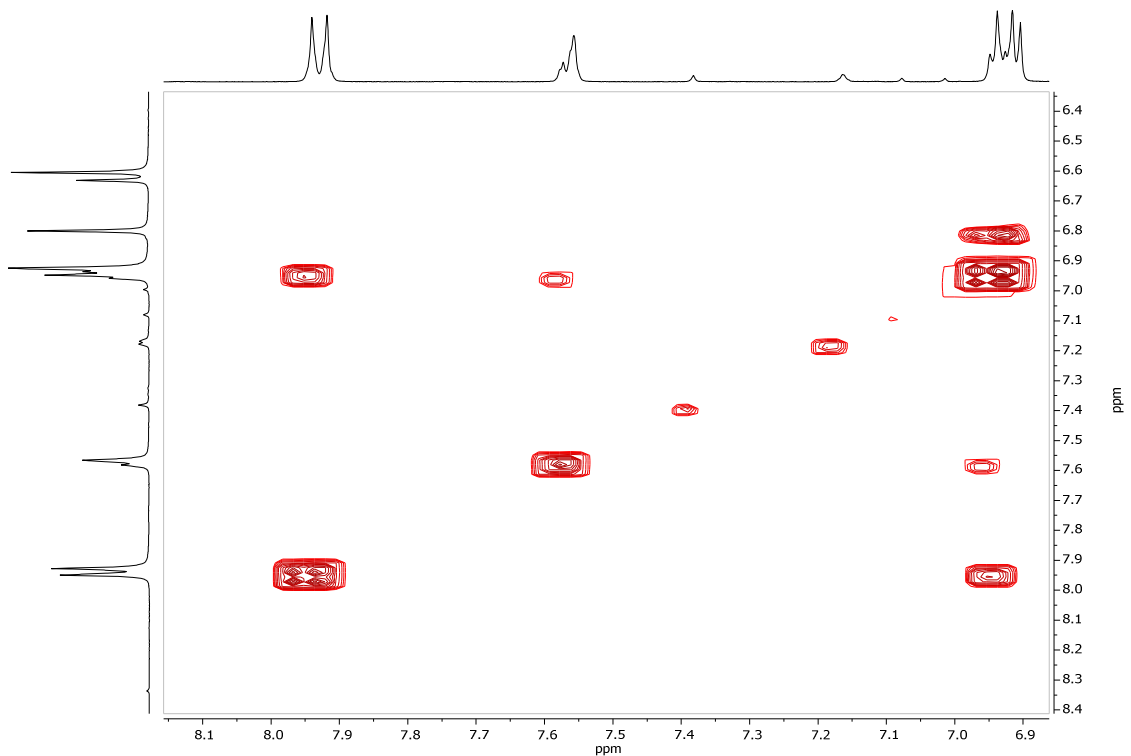
**Tabela 13:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da flavona II de **LT5-C9** [400, MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit) <sup>1</sup>
2	-	-	163,62	163,7
3	6,90 (1H, s)	6,94 (s)	102,65	102,7
4	-	-	182,08	182,1
5	-	-	152,67	152,6
6	-	-	131,23	131,6
7	-	-	157,17	157,3
8	6,62 (1 H, s)	6,60 (1 H, s)	94,14	94,2
9	-	-	152,32	152,3
10	-	-	103,99	104,0
1'	-	-	121,45	121,5
2'	7,56 (1H, d, J = 2,1 Hz)	7,63 (d, J = 2,0 Hz)	110,02	110,3
3'	-	-	147,91	148,0
4'	-	-	150,61	150,7
5'	6,95 (1H, d, J = 6,2 Hz)	7,02 (d, J = 9,0 Hz)	115,06	115,7
6'	7,57 (1H, dd, J =2,1 e 6,2 Hz)	7,63 (dd, J = 9,0 e 2,0 Hz)	120,23	120,3
5-OH	13,09 (1 H, s)	13,04 (s)	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	3,75 (3H, s)	3,85 (s)	59,86	59,8
7-OH	Nd	nd	-	-
3'-OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	3,98 (s)	55,84	55,9
4'-OH	Nd	nd	-	-

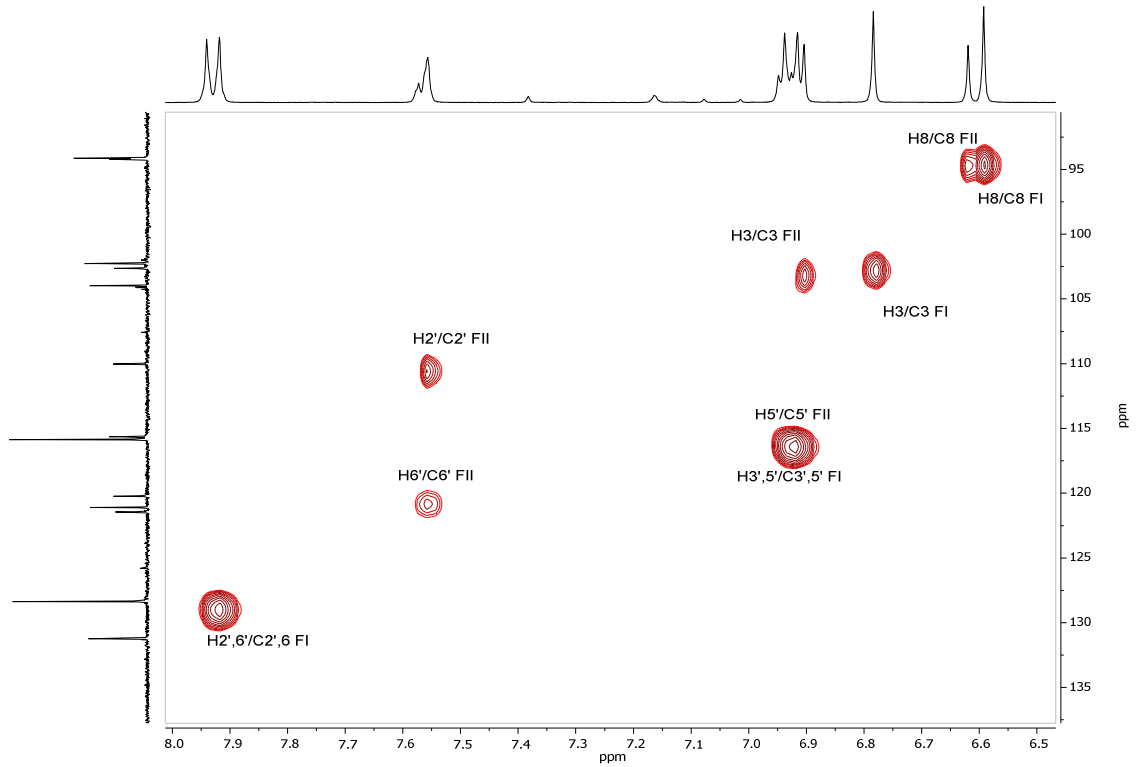
<sup>1</sup>Espectros obtidos em DMSO- $d_6$  (NAKASUGI et al, 2000)



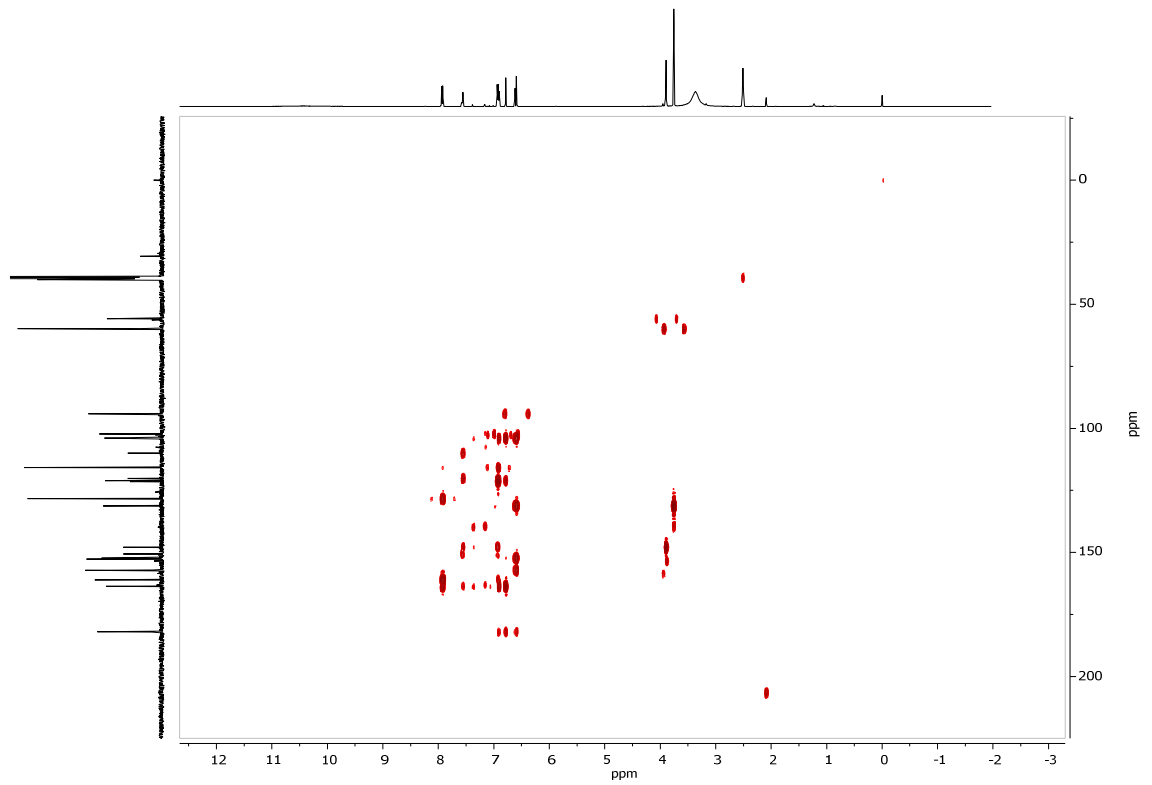
**Figura 43:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT5-C9** [400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  (ppm)]



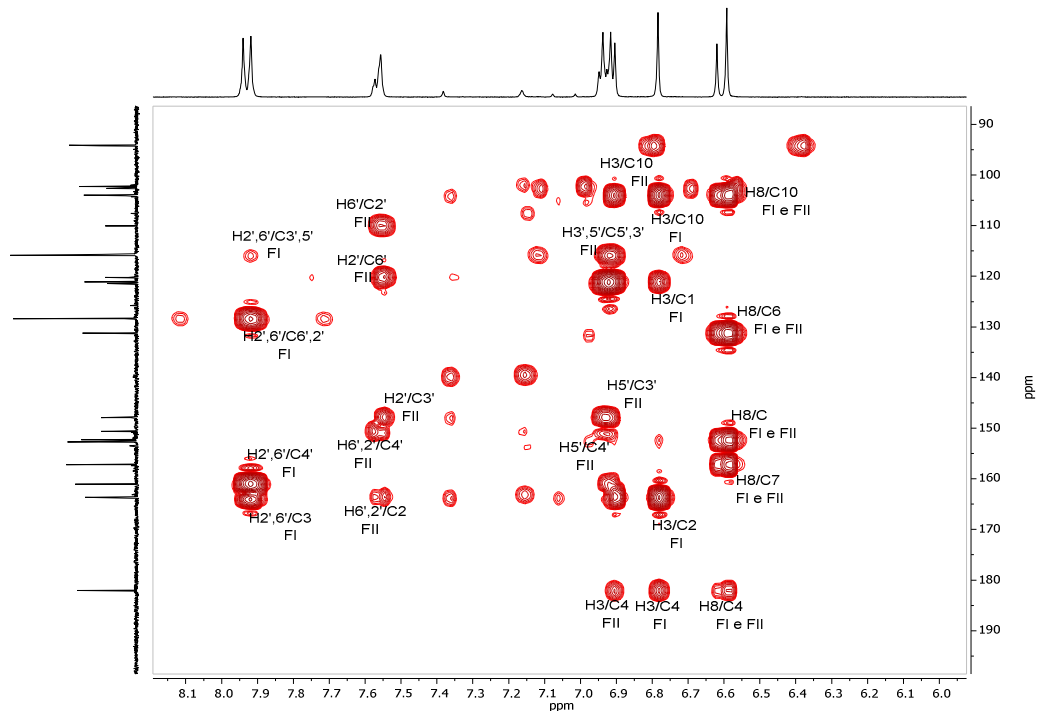
**Figura 44:** Expansão da região de  $\delta$  6,4 a  $\delta$  7,6 do espectro COSY de **LT5-C9**



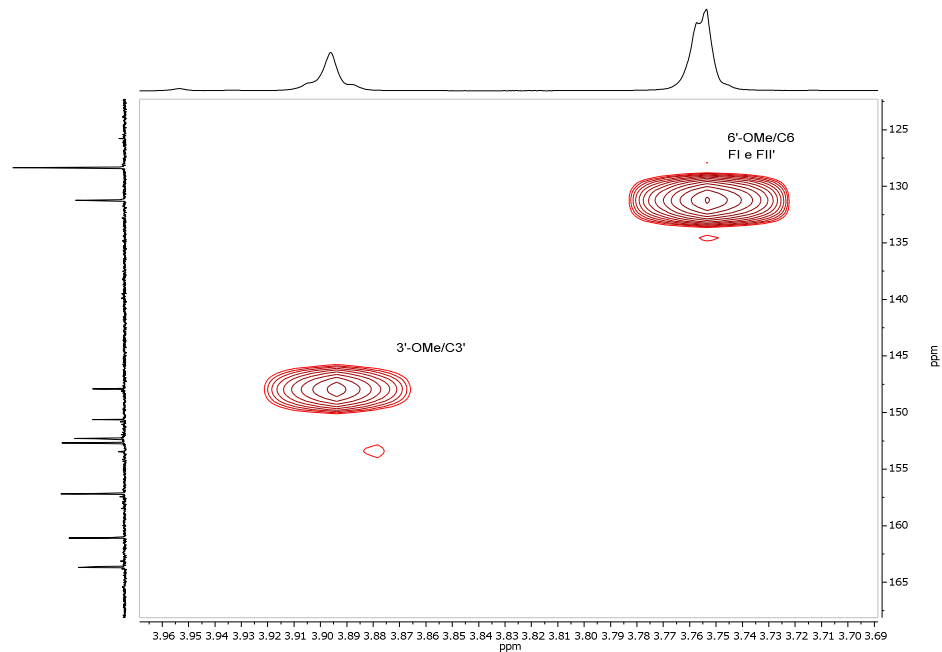
**Figura 45:** Expansão do espectro de HSQC de LT5-C9 e atribuições assinaladas para flavona I (FI) e flavona II (FII)



**Figura 46:** Espectro de HMBC de LT5-C9



**Figura 47:** Expansão espectro de HMBC de **LT5-C9** e correlações assinaladas para flavona I (FI) e flavona II (FII)

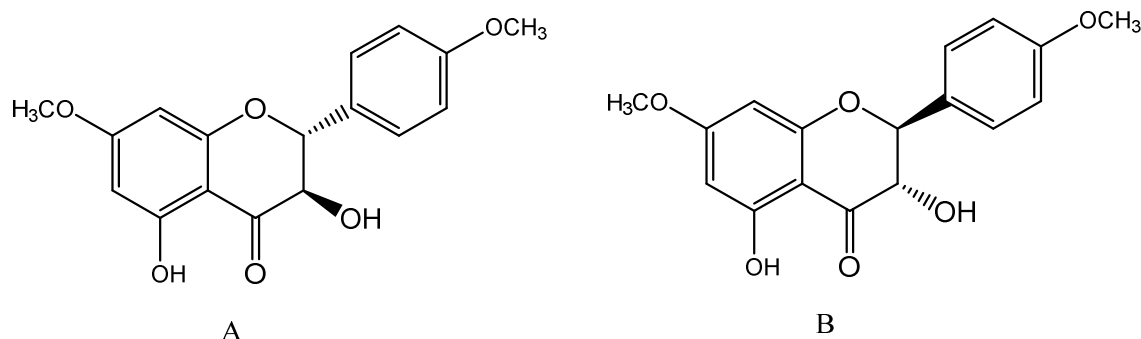


**Figura 48:** Expansão do espectro de HMBC da amostra **LT5-C9** e correlações assinaladas

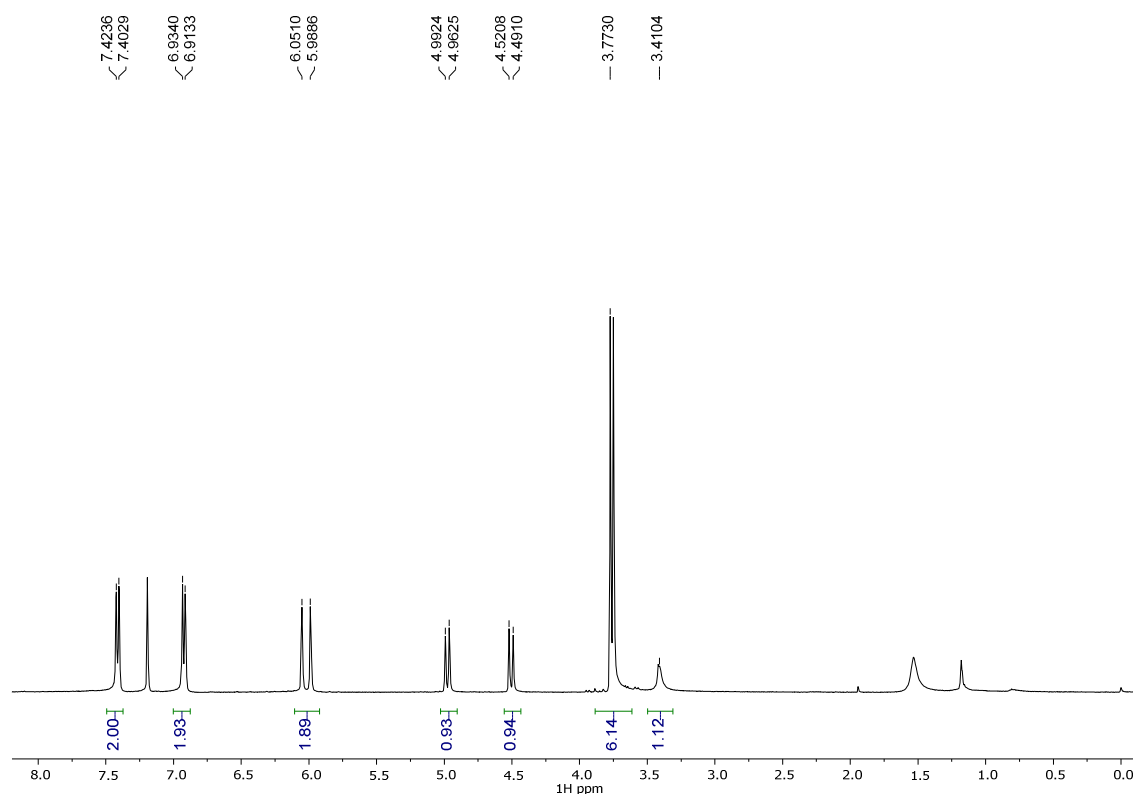
#### 4.2.5 Elucidação Estrutural da substância **LT1-C12**

A fração F6 apresentou um sólido em formato de agulhas com coloração verde, que foi purificado por recristalização em metanol. A partir desse procedimento, foi obtida a substância **LT1-C12** (38 mg) (Figura 49), que foi isolada como agulhas amarelas, sendo

solúvel em acetona. Após análise por cromatografia em camada delgada e revelação com o reagente NP-PEG e leitura em 365 nm, apresentou-se como uma mancha de coloração verde fluorescente, indicando um flavonoide.



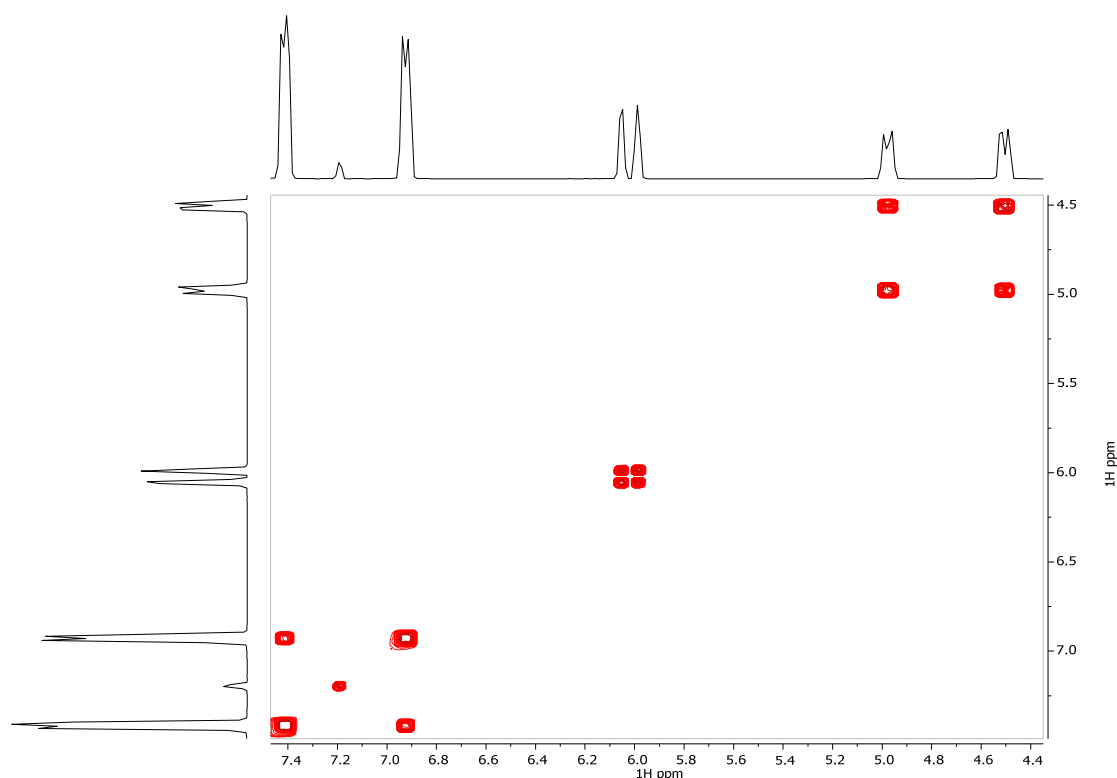
**Figura 49:** Estrutura da substância **LT1-C12** (7,4'-dimetilaromadendrina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*.



**Figura 50:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT1-C12** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

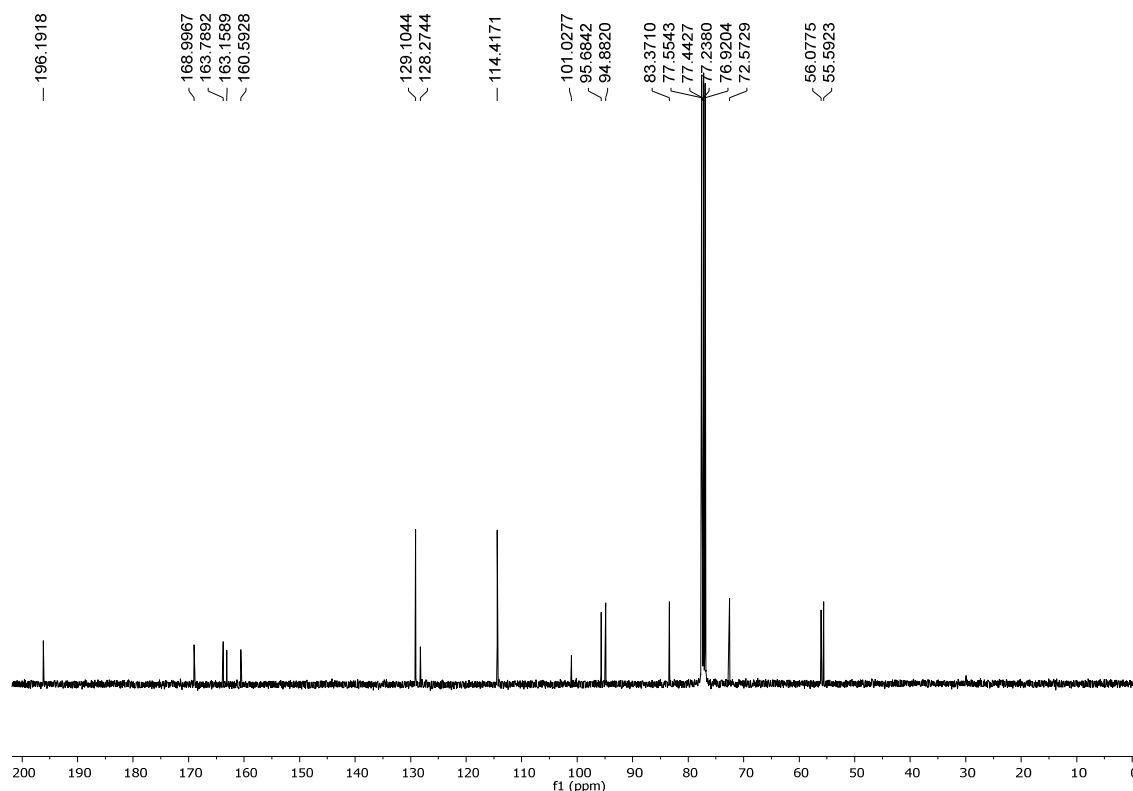
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 50) demonstrou a presença de sinais de sistema aromático *para* dissustituído, com dois dupletos ( $\delta 7,41$  e  $\delta 6,92$ ) correspondendo, respectivamente, aos dois pares de átomos de hidrogênio  $\text{H}2'/\text{H}6'$  e  $\text{H}3'/\text{H}5'$  que acoplam através de interação spin-spin em *orto* ( $J = 8,3$  Hz), sugerindo assim o padrão de substituição no anel B. Também na região aromática verificou-se a presença de dois simpletos alargados ( $\delta 5,99$  e  $\delta 6,05$ ), que integram para um hidrogênio cada, indicando a presença de substituintes

no anel A nas posições 5 e 7. Foram verificados sinais de hidrogênios alifáticos ligados a oxigênio, com dupletos em  $\delta$  4,98 (H-2) e  $\delta$  4,51 (H-3) que acoplam entre si ( $J = 12$  Hz), que indicaram um flavanonol, com relação diaxial entre os substituintes dos carbonos C-2 e C-3. Os acoplamentos entre os hidrogênios H2'/H6' e H3'/H5' do anel B, bem como entre os hidrogênios H2 e H3 do anel C, foram corroborados pelo espectro de COSY (Figura 50). Os simples em  $\delta$  3,75 (3H) e  $\delta$  3,77 (3H) são relativos a duas metoxilas, que podem estar nas posições 3, 5, 7 ou 4'.



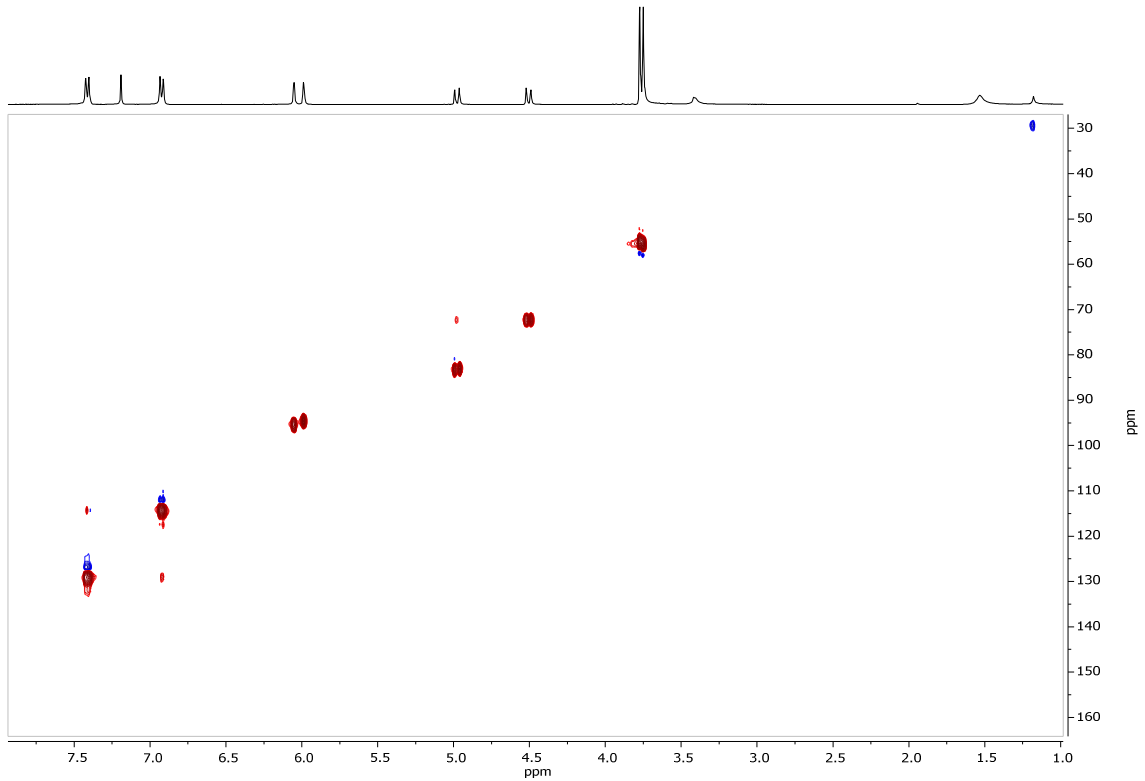
**Figura 51:** Expansão do espectro de COSY da amostra **LT1-C12** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 52) demonstrou a presença de 17 carbonos, sendo 15 do esqueleto de flavonoides e dois carbonos das metilas ligadas a oxigênio. Os dois sinais intensos em  $\delta$  129,10 e  $\delta$  114,42, relativos aos carbonos metínicos C-2'/C-6' e C-3'/C-5' também confirmaram a substituição em 4' no anel B. Pelos valores de deslocamento dos carbonos das metoxilas em  $\delta$  56,08 e  $\delta$  55,59 no espectro de  $^{13}\text{C}$  foi possível afirmar que não estão localizadas na posição 3, pois carbonos metoxílicos em sistemas aromáticos com impedimento estérico aparecem próximos a  $\delta$  60 (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). O valor de deslocamento da carbonila em  $\delta$  196,19 também é característico de um núcleo do tipo flavanona, que apresenta carbonilas na região de  $\delta$  188,6 a  $\delta$  194,6 (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

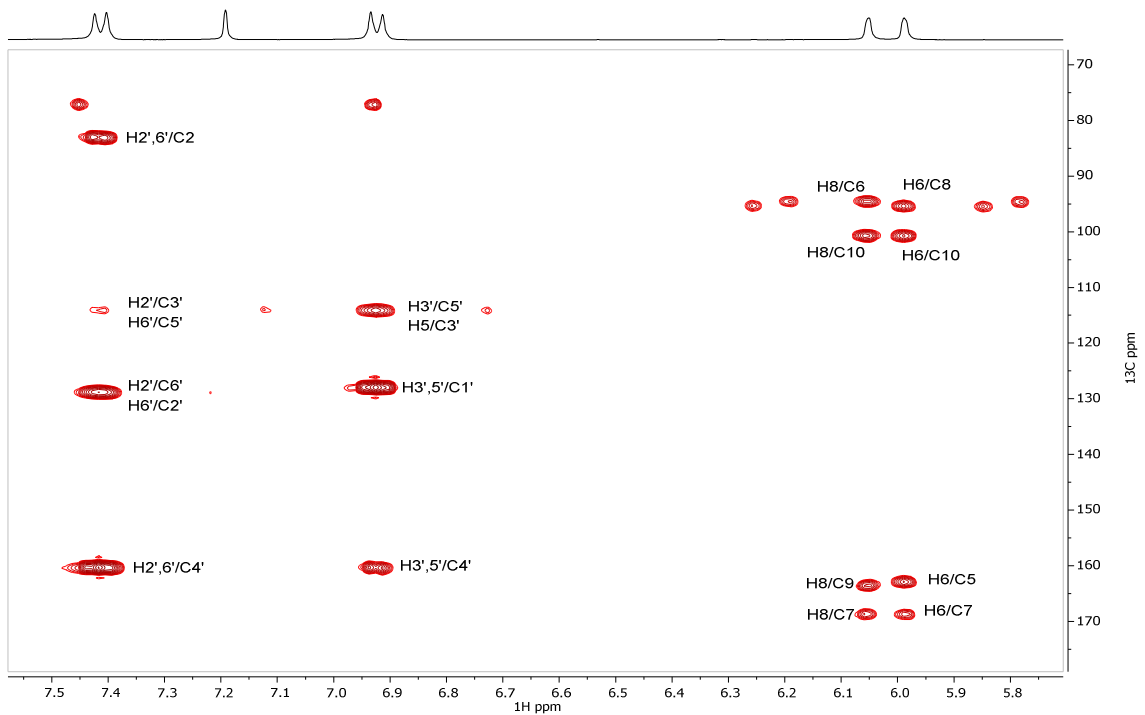


**Figura 52:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra **LT1-C12** [100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

Pelo mapa de contornos do espectro de HSQC (Figura 53) foi possível fazer a atribuição inequívoca dos carbonos metínicos: CH-2 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  4,98/83,37), CH-3 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  4,51/72,57), CH-6 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  5,99/94,88), CH-8 ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,05/95,68), CH-3'/5' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,92/114,42) e CH-2'/6' ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,41/129,10), além dos metoxílicos:  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,75/55,59 e  $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,77/56,08. A posição destas metoxilas nos carbonos 7 e 4' é confirmada pelas correlações a duas e três ligações do espectro de HMBC (Figura 54): MeO-7/C-7,  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  3,75/169,00); H-6/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  5,99/169,00); H-8/C-7,  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,05/169,00) e MeO-4'/C-4',  $^3\text{J}$  (3,77/160,59); H-3',5'/C-4',  $^2\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  6,92/160,59); H-2',6'/C-4',  $^3\text{J}$  ( $\delta\text{H}/\delta\text{C}$  7,41/160,59). Outras correlações observadas, como, por exemplo, do H-6 ( $\delta$  5,99) através de duas ligações ( $^2\text{J}$ ) com os carbonos C-5 ( $\delta$  163,16) e C-7 ( $\delta$  169,01) e de três ligações ( $^3\text{J}$ ) com C-8 ( $\delta$  95,68) e C-10 ( $\delta\text{C}$  101,03) corroboraram com a atribuição da Tabela 14.



**Figura 53:** Expansão do espectro de HSQC do composto **LT1-C12**



**Figura 54:** Expansão da região de  $\delta$  7,6 a 5,8 do espectro de HMBC do composto **LT1-C12** e correlações assinaladas



**Tabela 14:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **LT1-C12** [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

Posição	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$ (lit.) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>2</sup>
2	4,98 (1H, d, J = 12 Hz)	5,07 (d, J = 11,9 Hz)	83,37	83,0
3	4,51 (1H, d, J = 12 Hz)	4,59 (d, J = 11,9 Hz)	72,57	71,7
4	-	-	196,19	198,6
5	-	-	163,16	163,2
6	5,99 (1H, sl)	6,08 (d, J = 1,8 Hz)	94,88	95,1
7	-	-	169,00	167,7
8	6,05 (1H, sl)	6,15 (d, J = 2,3 Hz)	95,68	94,1
9	-	-	163,79	162,0
10	-	-	101,03	101,6
1'	-	-	128,27	129,6
2'	7,41 (2H, d, J = 8,3 Hz)	7,51 (d, J = 8,6 Hz)	129,10	129,3
3'	6,92 (2H, d, J = 8,3 Hz)	7,02 (d, J = 8,6 Hz)	114,42	113,8
4'	-	-	160,59	159,7
5'	6,92 (2H, d, J = 8,3 Hz)	7,02 (d, J = 8,6 Hz)	114,42	113,8
6'	7,41 (2H, d, J = 8,3 Hz)	7,51 (d, J = 8,6 Hz)	129,11	129,3
7-OCH <sub>3</sub>	3,75 (3H, s)	3,87 (s)	55,59	55,3
4'-OCH <sub>3</sub>	3,77 (3 H, s)	3,84 (s)	56,08	56,1
3-OH	3,41 (1H, s)	3,48 (s)	-	-
5-OH	nd	11,22 (s)	-	-

nd=não detectado. Lit=literatura. <sup>1</sup>FAINI et al., 2011; <sup>2</sup>ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997

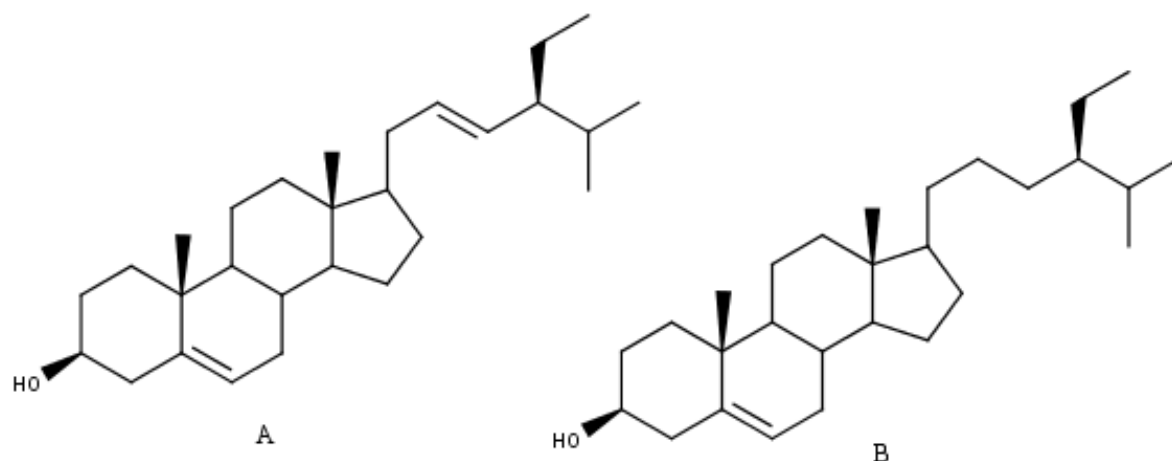
Os dados espectrométricos e confronto com a literatura (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997; FAINI et al., 2011) corroboraram que a LT1-C12 é a substância 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona (7,4'-dimetilaromadendrina). A orientação do grupo fenílico em C-2 é usualmente em  $\alpha$  nas flavanonas (RAHMAN, 2002), o que levaria a uma orientação do grupo hidroxila em  $\beta$  devido a constante de acoplamento e representado pela estrutura A, na Figura 48, entretanto esta configuração absoluta deve ser futuramente determinada.

A 7,4'-dimetilaromadendrina foi anteriormente isolada de *Cephalanthus spathelliferus* (LIMA, POLONSKY, 1973), *Podocarpus neriifolius* (RIZVI, RAHMAN, 1974), *Cephalanthus glabratus* (JORGE et al., 2006), *Haplopappus remyanus* (FAINI et al., 2011) e *Aletris spicata* (LI et al., 2014). Porém não foi encontrado nenhum relato no gênero *Lippia*.

#### 4.2.6 Elucidação Estrutural da substância S3-C13

A fração F5-3 apresentou uma substância sólida com coloração verde. A análise em CCD revelou a existência de impurezas, assim, realizou-se uma recristalização com metanol.

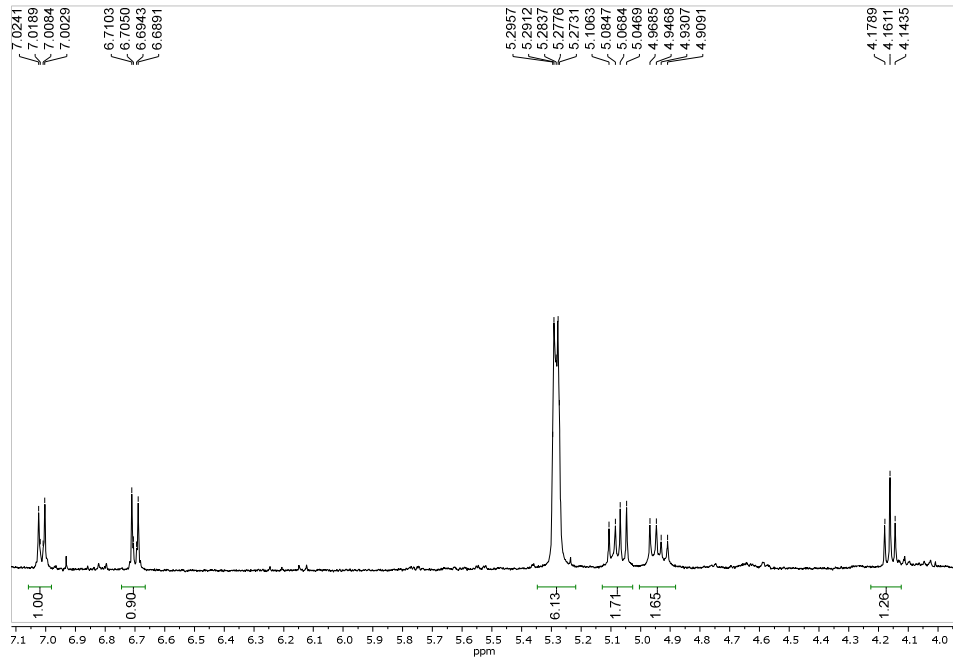
A partir desse processo, foi obtido um pó de coloração branca e solúvel em clorofórmio, que posteriormente foi denominado de S3-C13 (35,6 mg) (Figura 55). Em análise por CCD, utilizando revelador químico (anisaldeído), a substâncias S3-C13 apresentou uma coloração laranja fluorescente lido em 254 nm e lilás na luz visível, indicando ser da classe de terpenos ou esteroides.



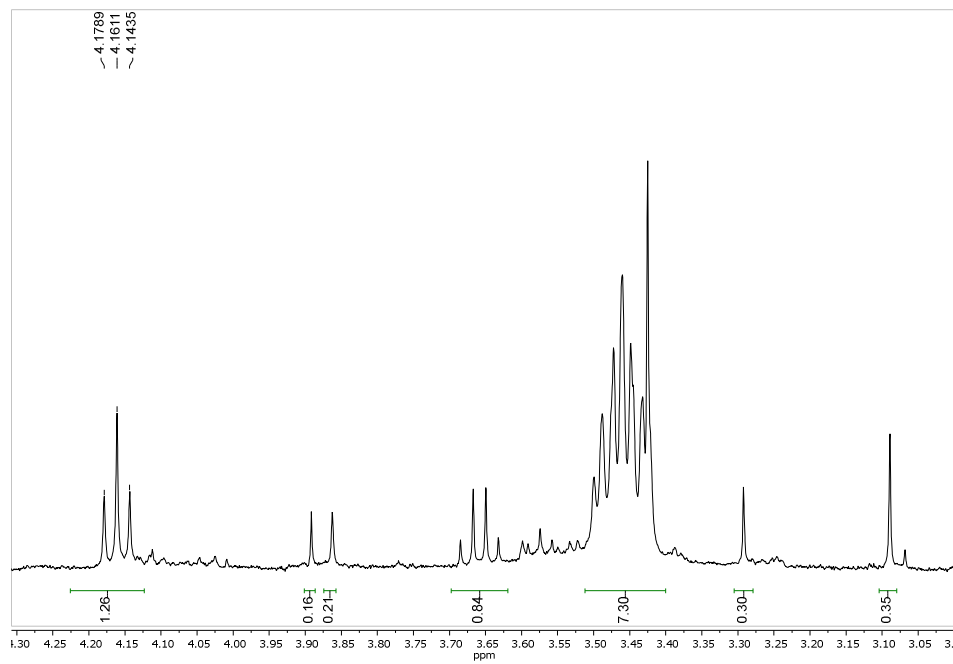
**Figura 55:** Estruturas das substâncias presentes em S3-C13 isoladas da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*. **A-**estigmasterol; **B-**  $\beta$ -sitosterol

Após a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 56-58) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 59, 60), além de comparação com a literatura (GOIS, 2010), apresentada nas Tabelas 15 e 16, foi possível sugerir que na mistura de compostos em S3-C13 estão presentes: o  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colestan5-eno-3 $\beta$ -ol) e o estigmasterol (24 $\alpha$ -etil-colestan5,22-dieno-3 $\beta$ -ol), entre outras substâncias.

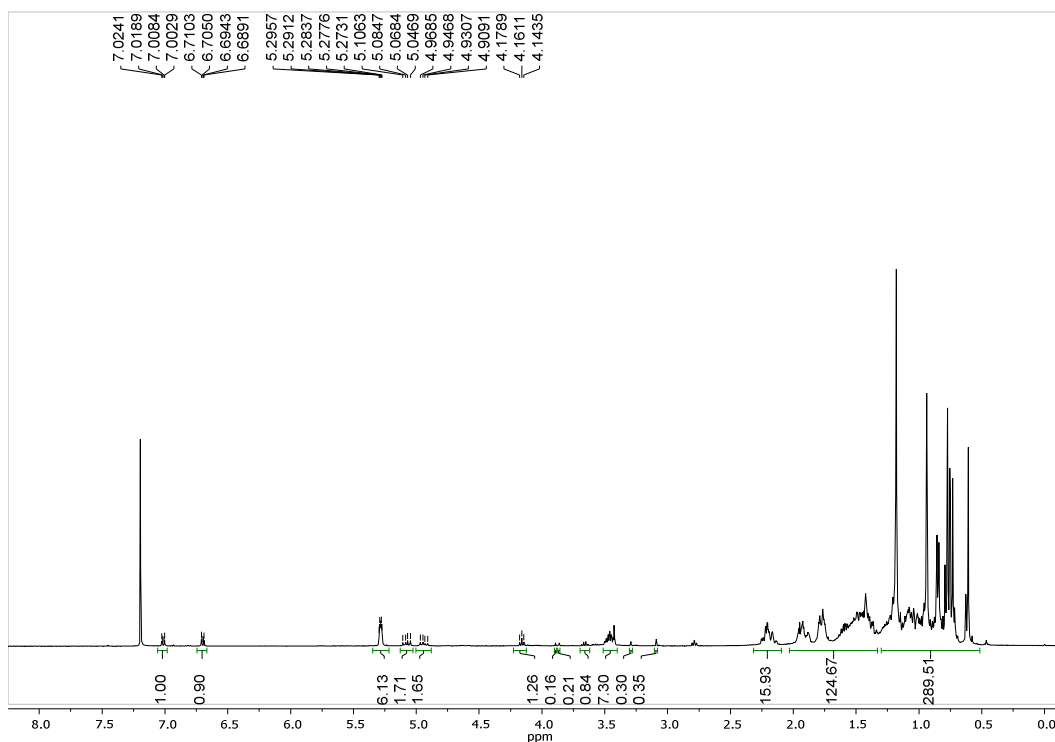
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 56-58) apresentou sinais em região de hidrogênios olefínicos, um duplete em  $\delta$  5,28 (H-6), presente em estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, bem como duplos dupletos em  $\delta$  4,94 (H-23) e 5,08 (H-22), do estigmasterol, (DEEKNANKUL; POTDUANG, 2003; FORGO; KÖVÉR, 2004). Um multiplete em  $\delta$  3,45 se refere ao hidrogênio oximetínico (H-3) (Figura 57), pois como o C-3 encontra-se ligado a um oxigênio o H-3 sofre um efeito de desblindagem. Foram verificados também uma série de sinais na região  $\delta$  0,50 a 2,3 que apontaram para a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de triterpenos e esteroides (Figura 58).



**Figura 56:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra S3-C13 [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

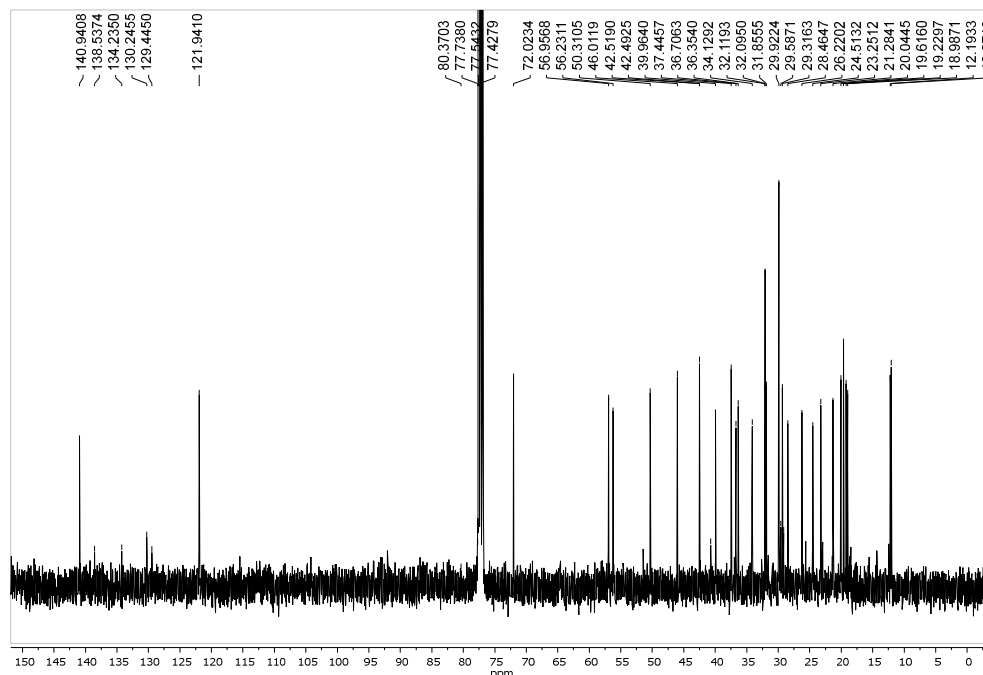


**Figura 57:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra S3-C13 [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]

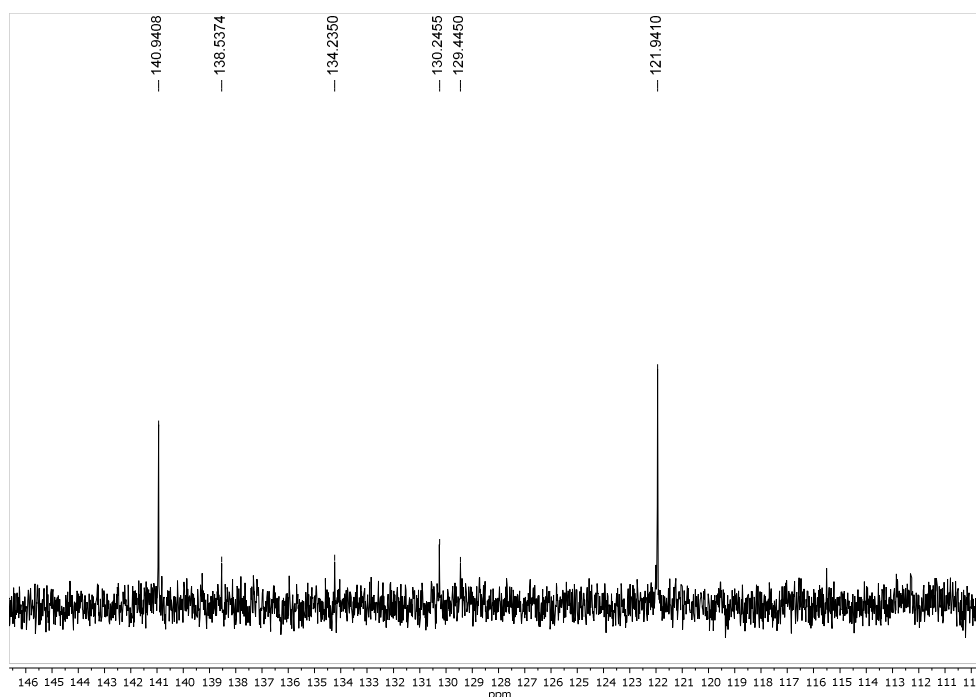


**Figura 58:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **S3-C13** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) apresentou mais de 30 carbonos (Figura 59), uma característica da combinação de substâncias. Na região mais desblindada (de carbonos  $\text{sp}^2$ ) apareceram os sinais  $\delta$  129,44; 121,95; 138,45 e 140,95 (Figura 60) das duas ligações duplas entre o C-5 e C-6 ( $\delta$  121,95 e 140,95), um atributo característico do  $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol. Outros dois sinais detectados referentes à insaturação C-7 e C-8 ( $\delta$  129,44 e 138,45) são encontrado apenas no estigmasterol (DE-EKNANKUL, POTDUANG, 2003; FORGO, KÖVÉR, 2004) Por esse motivo, os sinais  $\delta$  129,44 e  $\delta$  138,45 nos espectros são menos intensos em comparação aos em  $\delta$ 121,95; e 140,95 (DE-EKNANKUL; POTDUANG, 2003). Foi constatado ainda um sinal em  $\delta$  72,03 atribuído ao carbono C-3.



**Figura 59:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra **S3-C13** [100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 60:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra **S3-C13** [100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

O percentual relativo de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol na mistura foi calculado através dos valores da integração (intensidade relativa: 6,13) dos sinais olefínicos de H-6 (estigmasterol +  $\beta$ -sitosterol) e da integração (intensidade relativa: 3,32) de H-22/H-23 (estigmasterol) (GOULART et al., 1993). Metade do valor correspondente a H-22/H-23 ( $3,32/2 = 1,66$ ) foi considerado como correspondente a um hidrogênio do estigmasterol e

subtraído de 6,13. O resultado desta subtração (4,47) corresponde a um hidrogênio do  $\beta$ -sitosterol. A partir destes valores individuais em relação ao total da integração de H-6 pode-se calcular o percentual relativo  $\beta$ -sitosterol (73%) e estigmasterol (27%) na mistura.

Esses fitoesteróis estão distribuídos em todas as partes das plantas, e apresentam um acréscimo da proporção de estigmasterol em relação ao  $\beta$ -sitosterol a partir da raiz ao talo, logo, a incidência de luz é determinante na bioconversão do  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005).

O  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram anteriormente isolados em algumas espécies de *Lippia*: *L. nodiflora* (FORESTIERI et al., 1996; SIDDIQUI et al., 2009) *L. sidoides* (ALMEIDA et al., 2010) *L. citriodora* (SHARMA, 2018) e *L. affinis gracilis* (AKHATAR, SWAMY, 2018).

Estudos na última década demonstraram que  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol foram promissores no tratamento de pacientes com verrugas anogenitais (STEFANAKI et al., 2014), diminuíram a hiperglicemia em camundongos e humanos (OKAHARA et al., 2016), apresentaram ação anti-inflamatória (GELMINI et al., 2016) e foram capazes de reduzir o colesterol LDL, por inibição da absorção intestinal do colesterol (RAS et al., 2016).

**Tabela 15:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S3-C13** [100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)].

C	$\beta$ -sitosterol		Estigmasterol	
	S3-C13 $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	<sup>#</sup> Lit. $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	S3-C13 $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	<sup>#</sup> Lit. $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$
1	37,44	37,47	37,44	37,47
2	32,09	32,13	32,09	32,13
3	72,03	72,04	72,03	72,04
4	42,49	42,50	42,49	42,50
5	140,95	140,97	140,95	140,97
6	121,95	121,95	121,95	121,95
7	32,09	32,13	32,09	32,13
8	32,09	32,13	32,09	32,13
9	50,31	50,34	50,31	50,34
10	36,35	36,36	36,71	36,36
11	20,04	20,04	20,04	20,14
12	39,97	39,89	39,97	39,9
13	42,49	42,50	42,49	42,50
14	56,96	57,08	56,96	57,08
15	24,51	24,58	24,51	24,58
16	28,46	28,47	29,32	29,14
17	56,23	56,26	56,23	56,26
18	12,07	12,08	12,19	12,19
19	19,61	19,62	19,61	19,62
20	36,35	36,36	39,97	40,72
21	18,99	18,99	20,04	20,04
22	34,13	34,15	138,45	138,54
23	26,22	26,27	129,44	129,49
24	46,01	46,04	50,31	50,34
25	29,32	29,35	29,32	32,13
26	19,61	19,62	20,04	20,04
27	19,23	19,24	19,23	19,24
28	23,25	22,91	24,51	25,63
29	12,19	12,26	12,19	12,26

#GOIS, 2010

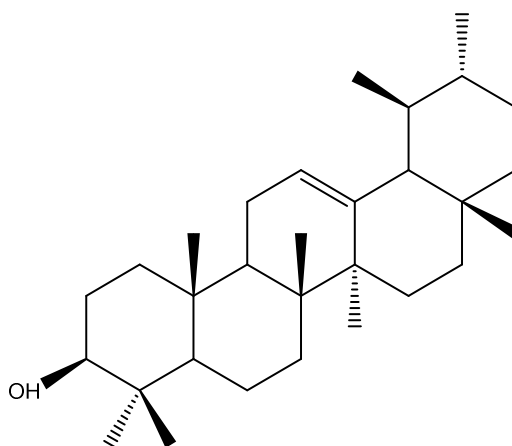
**Tabela 16:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **S3-C13** [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)].

C	Estigmasterol		$\beta$ -sitosterol	
	<sup>#</sup> Lit. $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	S3-C13 $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	<sup>#</sup> Lit. $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	S3-C13 $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$
3	3,52 (m)	3,45 (m)	3,52 (m)	3,45 (m)
6	5,36 (d, $J = 5,1$ Hz)	5,29 (d, $J = 5,6$ Hz)	5,36 (d, $J = 5,1$ Hz)	5,29 (d, $J + 5,6$ Hz)
2	5,16 (dd, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz)	5,15 (dd, $J = 8,4$ e $14,9$ Hz)	-	
2	5,02 (dd, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz)	4,99 (dd, $J = 8,4$ e $14,9$ Hz)	-	
3				
1	-			
8				

#SANTOS, 2013

#### 4.2.7 Elucidação Estrutural da substância LT6-C15

A fração F2-5 apresentou um precipitado de coloração branca, sendo recristalizado com acetona. Obteve-se um pó amorfo de coloração branca e solúvel em hexano, sendo denominado de LT6-C15 (42 mg) (Figura 61). Pela análise em CCD, a substância LT6-C15 não apresentou nenhuma coloração na luz visível, nem na ultravioleta a 365 nm; somente ao ser revelada com anisaldeído, a mesma apresentou uma coloração lilás, indicando ser um terpeno ou esteroide.

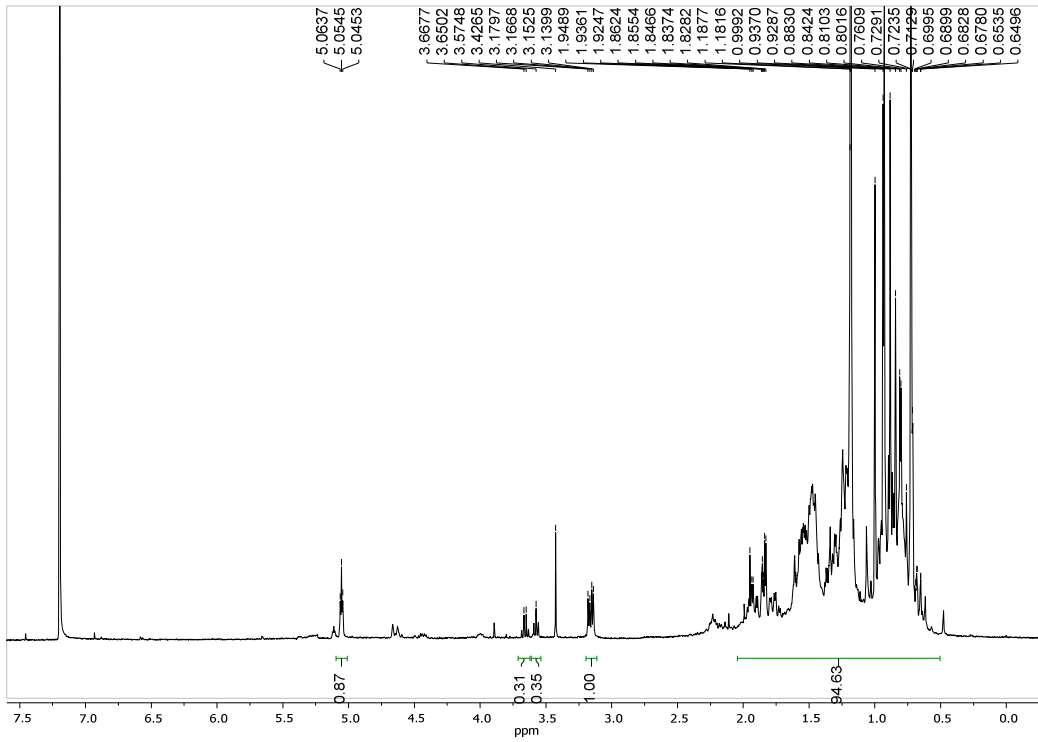


**Figura 61:** Estrutura da substância LT6-C15 ( $\alpha$ -amirina) isolada da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*

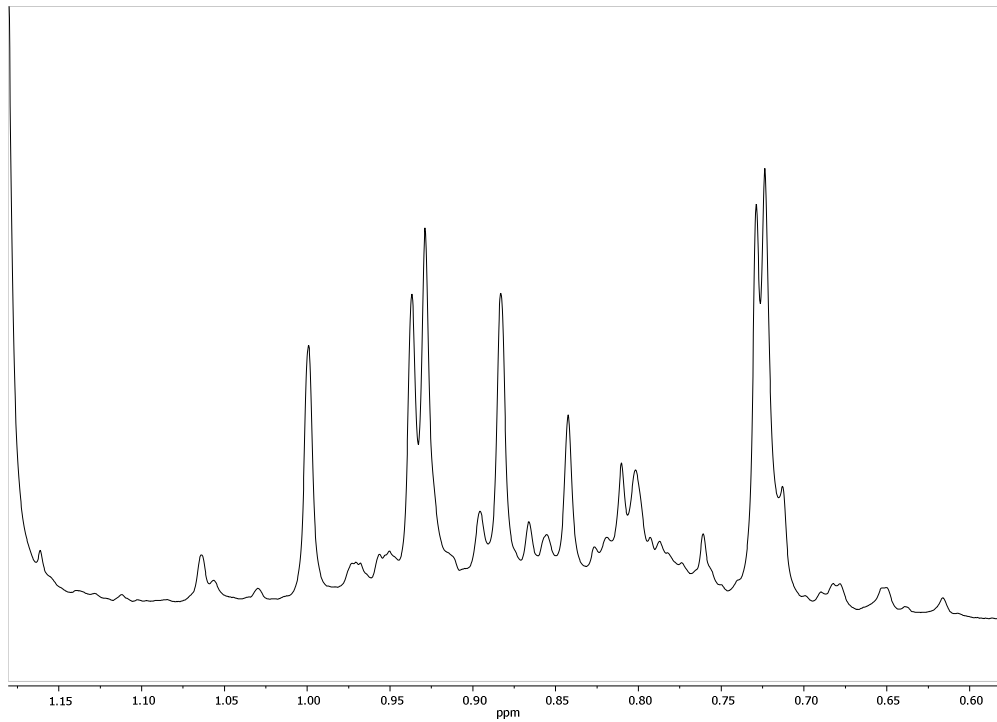
Após análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparação com a literatura (GUIMARÃES; SIANI, 2007), pode-se sugerir que na LT6-C15 a  $\alpha$ -amirina estava presente como substância majoritária (Figura 61 a 63 e Tabela 17).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (Figura 62) pode ser observados na região mais blindada, entre  $\delta$  0,60 a 2,3 (Figura 63), sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de triterpenos pentacíclicos; o duplo duplete na região  $\delta$  3,15 que corresponde ao hidrogênio oximetínico (H-3) (Figura 64); o tripleto em  $\delta$  5,06 (Figura 65), correspondentes à ligação CH de olefinas (H-12).

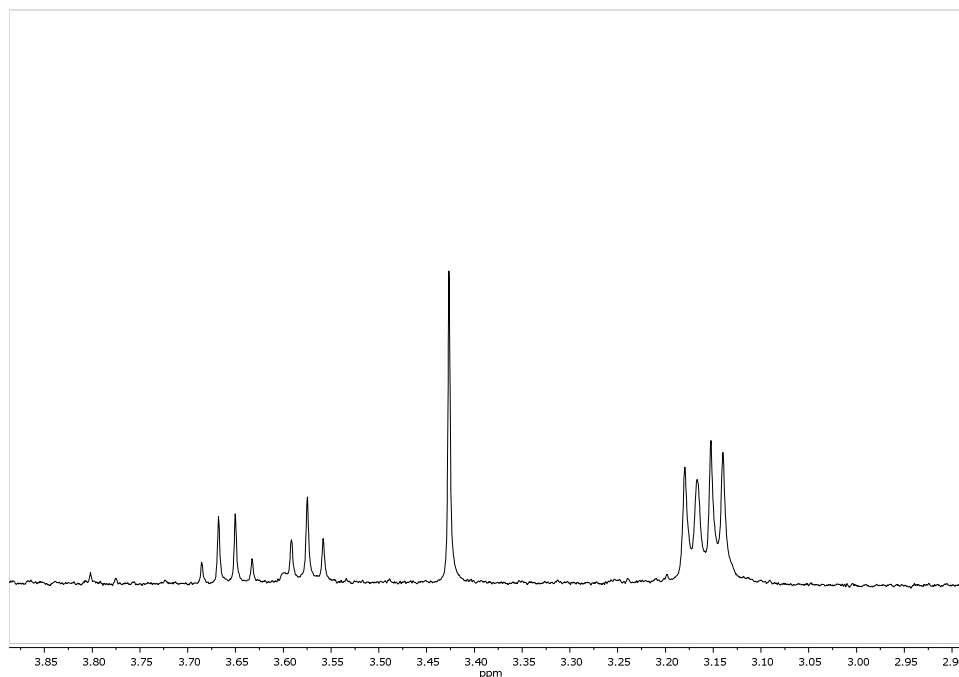




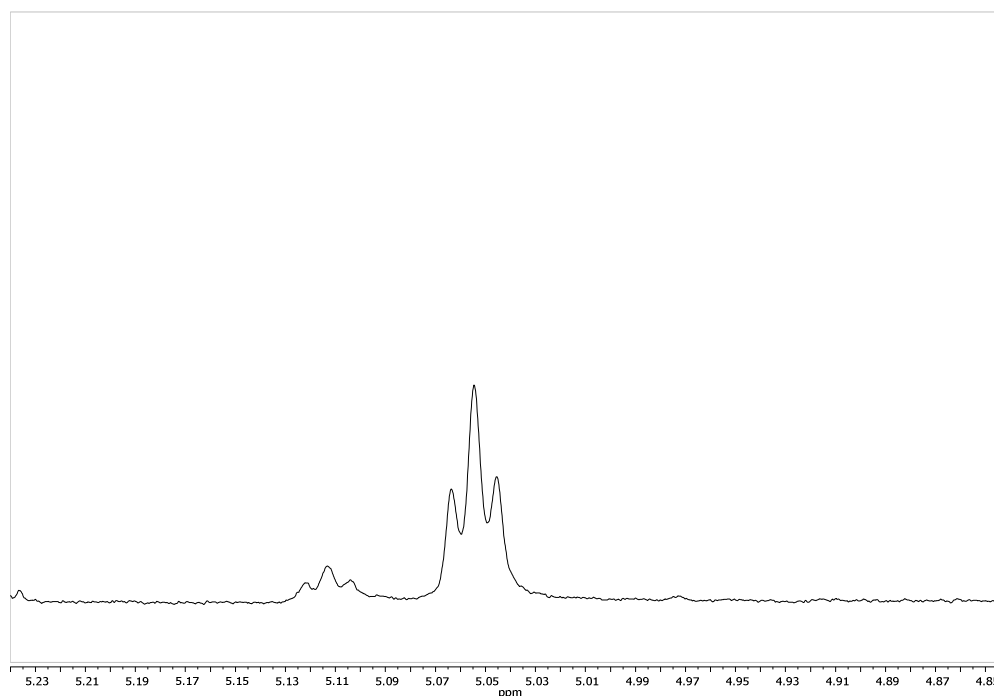
**Figura 62:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT6-C15** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].



**Figura 63:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT6-C15** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].



**Figura 64:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT6-C15** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 65:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra **LT6-C15** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 66-67) foram observados 30 sinais do esqueleto carbônico, dos quais destacam-se os do carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  124,6 e 139,9 referentes à ligação dupla dos carbonos C-12 e C-13, típico de uma substância triterpênica de esqueleto ursen-12-eno. O sinal em  $\delta$  72,02 corresponde ao carbono oximetínico em C-3.

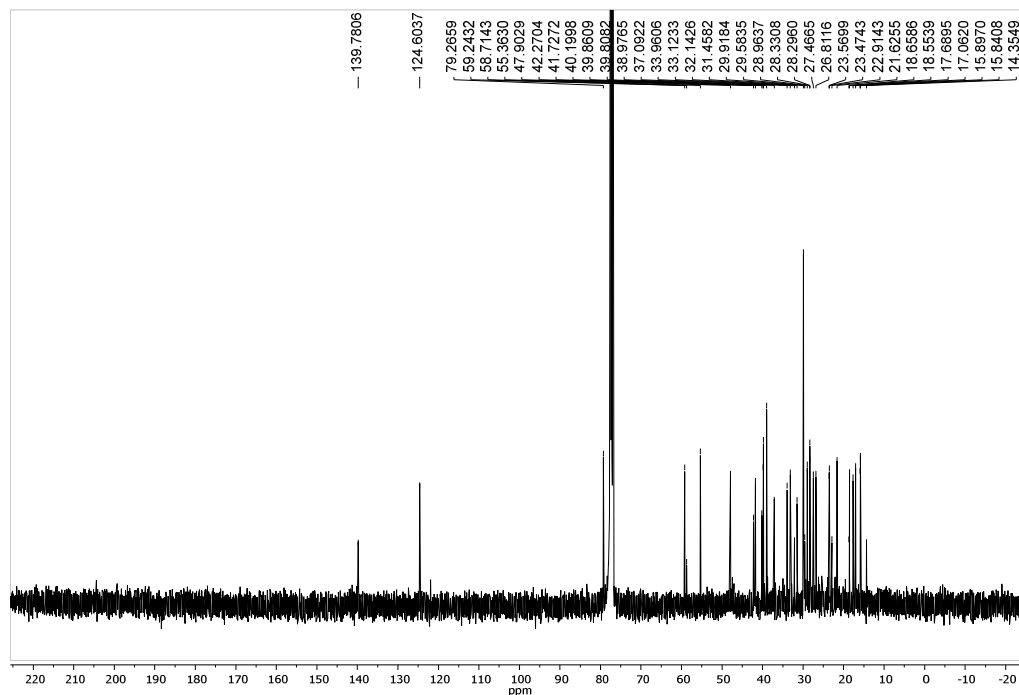


Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra LT6-C15 [100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

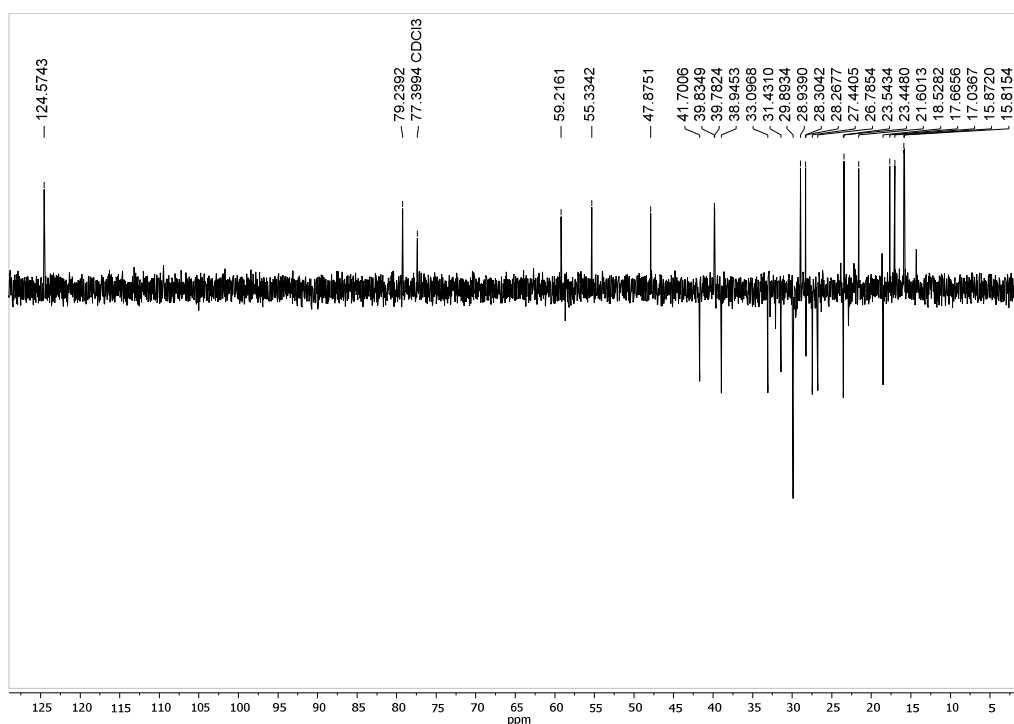


Figura 67: Espectro de DEPT 135 de LT6-C15

A  $\alpha$ -amirina foi anteriormente isolada na família Verbenaceae (*Callicarpa farinosa*) (CHUNG, CHUNG, NAVARATNAM, 2014), porém não há relatos de isolamento no gênero *Lippia*. Pesquisas nos últimos anos apontam que a  $\alpha$ -amirina tem sido estudada para atividades gastro, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antipruriginosa, anti-demência, antinociceptiva, ansiolítica e antidepressiva, hipoglicemiante e hipolipemiante (OTUKI et al.,

2005; JUNIOR et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007; MELO et al., 2011; OKOYE et al., 2014; MATOS et al., 2013; CHERNG, 2014; BISKUP et al., 2012; SANTOS et al., 2012; GELMIN et al., 2015).

**Tabela 17:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **LT6-C15** [400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)]

C	#LIT. $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	LT6-C15 $\delta$ (ppm) RMN $^1\text{H}$	#LIT. $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$	LT6-C15 $\delta$ (ppm) RMN $^{13}\text{C}$
1	-	-	38,7	37,4
2	-	-	28,7	28,46
3	3,16 (1H, dd, $J = 11,2$ e $5,1$ Hz)	3,15 (dd, $J = 11,0$ e $5,4$ Hz)	79,6	72,02
4	-	-	38,7	39,96
5	0,67 (1H, d, $J = 11,6$ Hz)	0,65 (d, $J =$ )	55,1	56,23
6	-	-	18,4	18,99
7	-	-	32,2	32,11
8	-	-	40,0	42,49
9	-	-	47,7	46,01
10	-	-	36,9	36,7
11	-	-	23,3	23,25
12	5,06 (1H, t, $J = 3,2$ Hz)	5,05 (1 H, t, $J = 3,8$ Hz))	124,4	121,94
13	-	-	139,5	140,94
14	-	-	42,0	42,52
15	1,94 (1H, dt, $J = 13,5$ e $4,5$ Hz)	-	27,2	26,22
16	1,76 (1H, dt, $J = 13,5$ e $5,0$ Hz)	-	26,6	24,51
17	-	-	33,7	34,12
18	-	-	59,0	56,96
19	-	-	39,6	39,96
20	-	-	39,6	39,96
21	-	-	31,2	31,86
22	1,85 (1H, dt, $J = 7,0$ e $3,0$ Hz)	-	41,5	42,52
23	0,93 (3H, s)	-	28,1	29,32
24	-	-	15,6	12,07
25	-	-	15,6	12,19
26	0,89 (3H, s)	0,89 (s)	16,8	18,99
27	1,01 (3H, s)	1,0 (s)	23,2	23,25
28	0,94 (3H, s)	0,92 (d)	28,1	21,28
29	-	-	17,4	19,23
30	0,73 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	0,73 (d, $J = 2,2$ Hz)	21,4	20,04

#DIAZ et al., 2018

#### 4.3 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *in vitro* DE *L. thymoides*

Devido ao uso de *L. thymoides* na medicina popular para o tratamento de bronquite e acatando a um dos objetivos pretendido, foram realizados experimentos de atividade espasmolítica *in vitro* em traqueia isolada de cobaia do extrato bruto, fração diclorometânica e

das substâncias isoladas e misturas da *L. thymoides*. Assim, foi possível comparar o efeito espasmolítico entre eles sobre as contrações tônicas induzidas por CCh 1  $\mu\text{M}$  em anéis de traqueia isolados de cobaia.

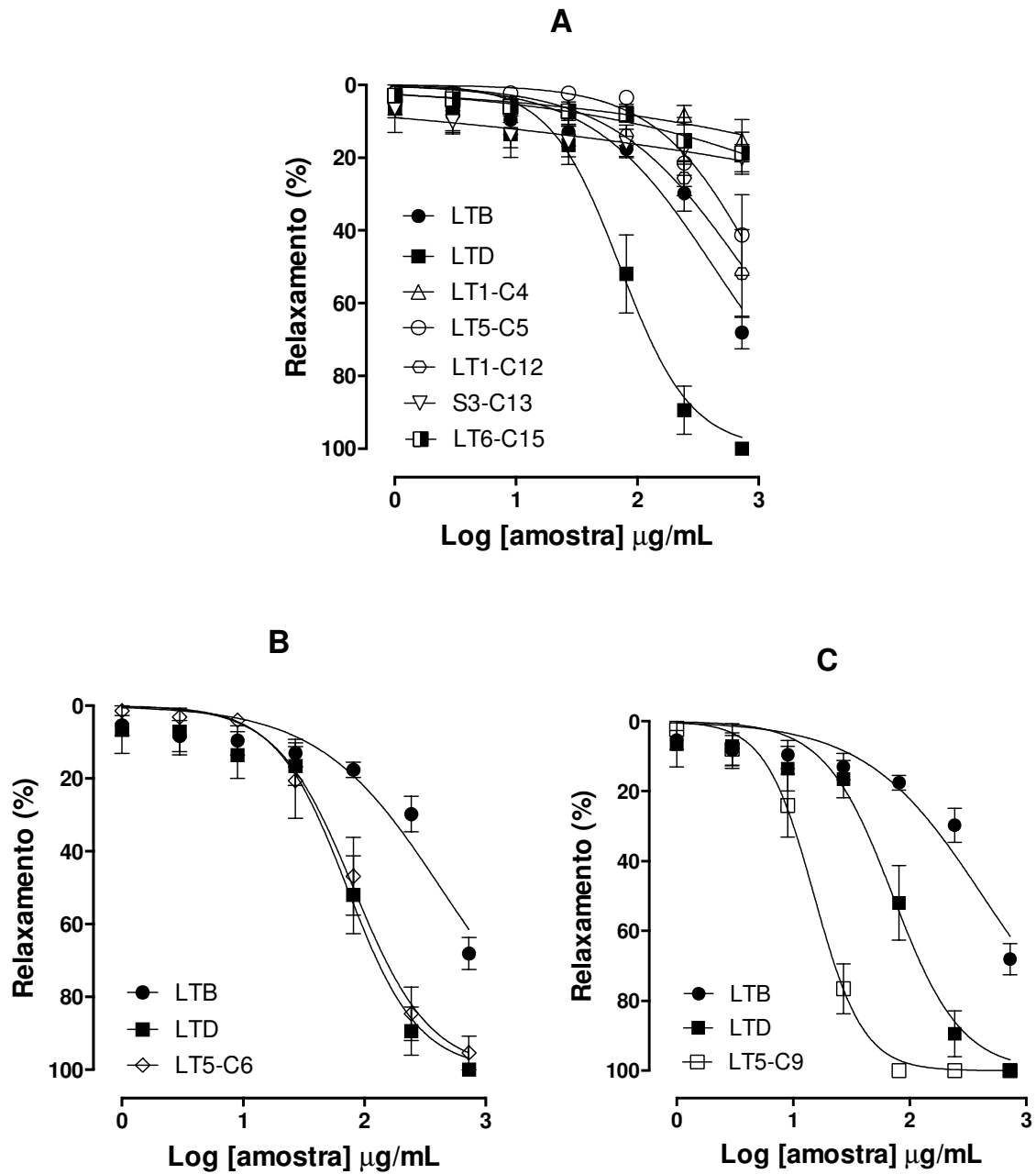
O CCh foi escolhido por ser o agonista utilizado na contração do músculo liso, pois ele ativa os receptores  $M_3$  acoplados à proteína  $G_q$  encontrados nas fibras musculares lisas das vias aéreas, que ativa a PLC para a geração de  $IP_3$ , que, por sua vez, ativa os  $IP_3R$  no retículo sarcoplasmático e libera o  $Ca^{+2}$  dos estoques intracelulares (MEURS et al., 1989; JANSSEN et al., 2001).

A LTB, LTD e as substâncias isoladas e misturas induziram o relaxamento do músculo liso traqueal, de maneira dependente da concentração (Figura 68). Confrontando os valores de  $E_{\text{máx}}$  (Tabela 18) nota-se que somente a fração LTD ( $CE_{50} = 71,99 \mu\text{g/mL}$  (54,38-95,32)) e a substância LT5-C9 ( $CE_{50} = 15,19 \mu\text{g/mL}$  (12,86-17,93)) conseguiram reduzir a contração induzida por CCh aos valores basais. O  $E_{\text{máx}}$  na concentração de 729  $\mu\text{g/mL}$ , destacaram-se as amostras LT5-C6 ( $95,42 \pm 4,58 \%$ ); LTB ( $68,04 \pm 4,307\%$ ); LT1-C12 ( $51,91 \pm 12,03 \%$ ) e LT5-C5 ( $41,25 \pm 11,01\%$ ) no efeito relaxante. Vale ressaltar que após a remoção das amostras da traqueia foi contraída novamente com CCh, para averiguar sua reversibilidade do efeito, assim, o órgão apresentou-se viável depois do uso de todas as amostras.

**Tabela 18:** Efeito espasmolítico do extrato e frações das folhas de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas com carbachol 1  $\mu\text{M}$  em traqueia isolada de cobaia

GRUPOS		$CE_{50}$ (intervalo de confiança) $\mu\text{g/mL}$	$E_{\text{máx}}$ (média $\pm$ e.p.m.) $\mu\text{g/mL}$
Extratos	LTB	424,80 (314,50 - 574,00)	$68,04 \pm 4,307$
	LTD	71,99 (54,38 - 95,32) <sup>a</sup>	$100 \pm 0$
Substâncias Isoladas/Misturas	LT1-C4	>729 <sup>*#</sup>	$15,33 \pm 5,759$
	LT5-C5	>729 <sup>*#</sup>	$41,25 \pm 11,01$
	LT5-C6	81,11 (61,82 - 106,40) <sup>#</sup>	$95,42 \pm 4,58$
	LT5-C9	15,19 (12,86 - 17,93) <sup>**</sup>	$100 \pm 0$
	LT1-C12	>729 <sup>*</sup>	$51,91 \pm 12,03$
	S3-C13	>729 <sup>*#</sup>	$20,15 \pm 3,703$
	LT6-C15	>729 <sup>*#</sup>	$18,73 \pm 5,731$

Os dados estão apresentados como  $CE_{50}$  (dose necessária para produzir 50% da resposta máxima) e intervalo de confiança ( $n = 5$ ). LTB (extrato metanólico bruto); LTD (fração diclorometano) e as substâncias isoladas/misturas LT1-C4; LT5-C5; LT5-C6; LT5-C9; LT1-C12, S3-C13 e LT6-C15 de *L. thymoides*. Diferença entre os grupos foram calculados com teste t-student não pareado. <sup>a</sup>( $p < 0,05$  entre LTB e LTD); <sup>\*</sup>( $p < 0,05$  entre LTD e substâncias isoladas); <sup>#</sup>( $p < 0,05$  entre LTB e substâncias isoladas)



**Figura 68:** Efeito relaxante de *L. thymoides* em músculo liso traqueal em contrações induzidas por carbacol. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 5$ ). LTB (extrato metanólico bruto); LTD (fração diclorometano) e as substâncias isoladas e mistura LT1-C4, LT5-C5, LT1-C12, S3-C13 e LT6-C15 (A) LT5-C6 (B) LT5-C9 (C) de *L. thymoides*

Por meio da análise estatística, observou-se que LTD foi mais potente do que LTB (Tabela 19) a 5% de significância. Esse resultado já era esperado, pois estudos realizados por Silva (2012) comparando o extrato metanólico bruto e frações de hexano, diclorometano e acetato de etila, demonstraram que a fração diclorometano foi a única que reduziu a contração induzida por CCh aos valores basais, alcançados também o  $E_{m\acute{a}x}$  de 100%.

A LTD e LT5-C6 não diferiram estatisticamente entre si (Figura 68 (B)), apesar da LTD relaxar 100% os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh, na concentração de 729  $\mu\text{g/mL}$  e a LT5-C6 alcançar apenas ~95% de relaxamento. A LT1-C12 (Figura 6 (A)) também não expressou diferença significativa em relação a LTB.

Dentre as amostras analisadas, a LT5-C9 foi a mais potente, devido à sua capacidade em reduzir a contração induzida por CCh aos valores basais, alcançando o  $E_{\text{máx}}$  de 100% na concentração de 81  $\mu\text{g/mL}$ . Este resultado foi superior a LTD que só alcançou seu  $E_{\text{máx}}$  de 100% na concentração de 729  $\mu\text{g/mL}$ .

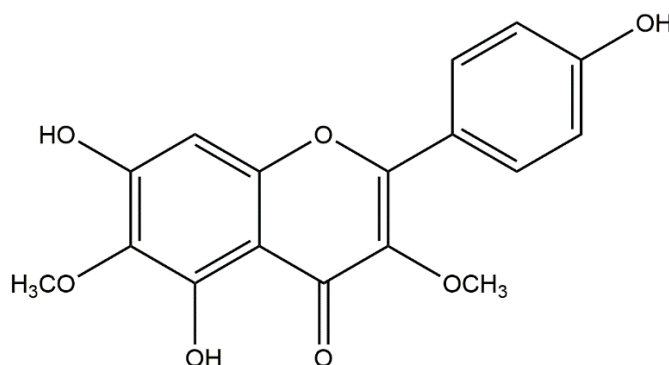
Não foram encontrados relatos na literatura sobre ação espasmolítica da jaceosidina, no entanto a hispidulina vem demonstrando ação sobre diversos músculo liso. A hispidulina (10 mM) apresentou um efeito relaxante leve ( $34,6 \pm 7,4\%$ ) sobre o íleo de cobaia, pré-contraído por histamina (SÁNDOR et al., 2018). Esta flavona foi retratada como principal princípio ativo do extrato bruto da *Clerodendrum petasites* na ação relaxante no músculo liso traquial de cobaia (HAZEKAMP; VERPOORTE; PANTHONG, 2001).

Abdalla e seus colaboradores (1988) estudaram a ação relaxante da hispidulina e demonstraram que essa flavona era capaz de induzir o relaxamento, dependente da concentração, em traqueia, artéria e íleo, ambos isolados de cobaia. Além disso essa flavona deslocou para a direita as curvas de concentração-resposta tanto da acetilcolina quanto do  $\text{CaCl}_2$ . Foram analisadas também a possibilidade do efeito da hispidulina no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em compartimento extracelular (utilizando uma solução despolarizante livre de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e intracelular (expostas a uma solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , contendo EGTA). Segundo os autores este conjunto de experimentos sugeriram que a hispidulina inibe indiretamente tanto o influxo do compartimento extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto a liberação intracelular. Isso, no entanto, não governa a possibilidade de que hispidulina entre na célula e dispute com  $\text{Ca}^{2+}$  para ligar-se a proteína (i.e. calmodulina), inibindo assim o desenvolvimento da força contrátil.

A eupalitina (LT5-C6), também foi estudada por Choo e seus colaboradores (2017), que avaliaram a implicação dessa flavona frente ao corpo cavernoso de coelhos e os possíveis mecanismos subjacentes de seu efeito em células do músculo liso do corpo cavernoso de humano. O efeito relaxante foi avaliado pela adição cumulativa ( $10^{-5} \text{ M} \sim 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) e o agonista utilizado foi a fenilefrina. Esse composto relaxou efetivamente as tiras do corpo cavernoso de coelho de um modo dependente da concentração. Nas células do corpo cavernoso em humano a aplicação extracelular de eupatilina ( $10^{-4} \text{ M}$ ) provocou o relaxamento através de vias independentes do NO, ativação dos canais de potássio

dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$  (BKca) e inibição da RhoA / Rho-quinase (ROK). Demonstrando que a inibição da via da ROK é um candidato para tratamento de disfunção erétil.

O flavonoide 3,6-dimetil galetina (Figura 69) demonstrou capacidade espasmolítica em íleo de cobaia, traqueia de cobaia e em aorta de ratos (MACÊDO et al., 2011), posteriormente, Vasconcelos e seus colaboradores (2015) relataram que 3,6-dimetil galetina produz um efeito relaxante em íleo de cobaia, cujo mecanismo de ação envolve no antagonismo pseudo-irreversível não competitivo em receptores histaminérgicos, bem como a modulação positiva  $\text{K}_V$  e  $\text{K}_{ATP}$ , que leva à atenuação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e bloqueio de  $\text{Ca}_v1$ , levando a uma redução nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

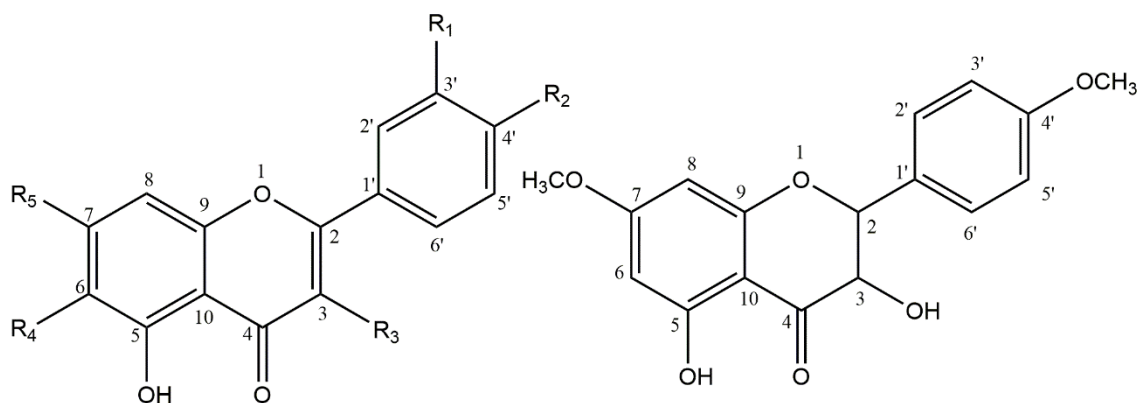


**Figura 69:** 3,6-dimetil galetina

Apesar de não conhecer o alvo, observando as estruturas elucidadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional, nota-se que há diferenças estruturais entre os flavonoides. Como pode ser observado na Figura 70, as flavonas LT5-C6 e LT5-C9 foram as amostras que apresentaram melhor atividade espasmolítica, diferindo das demais pela ausência da hidroxila na posição C-3, o que caracteriza a subclasse das flavonas, e a presença de hidroxila na posição C-7 e metoxila na posição C-6. A 3,6-dimetil galetina também possui uma estrutura semelhante a LT5-C6 e LT5-C9 diferindo apenas pela presença de uma metoxila na posição C-3 se comparada a hispidulina. Sugerindo assim, que a relação estrutura-atividade encontrasse predominante da presença de hidroxila na posição C-7 e metoxila na posição C-6, já que a 3,6-dimetil galetina também possui um grande potencial espasmolítico (MACÊDO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2015).

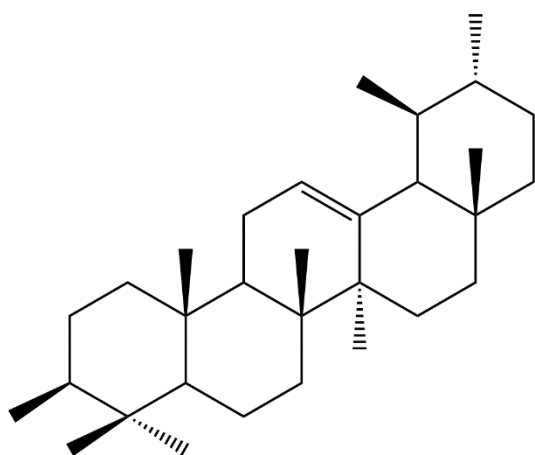
Faz-se necessário a separação das substâncias presentes em LT5-C9 para uma melhor avaliação, assim como também realizar novos testes para identificar quais receptores essas substâncias atuam provocando o relaxamento do músculo liso, para só assim afirmar uma real relação de estrutura atividade.



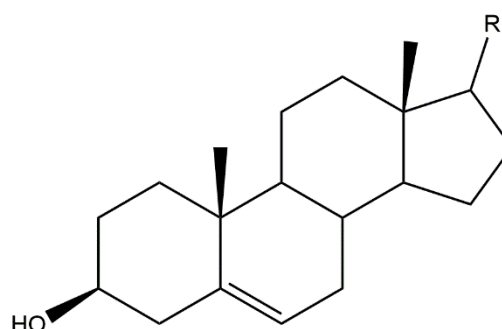


LT1-C4 - R<sub>1</sub>: H; R<sub>2</sub>: OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>:OH; R<sub>4</sub>: H; R<sub>5</sub>:OCH<sub>3</sub>  
 LT5-C5 - R<sub>1</sub>: H; R<sub>2</sub>:OH; R<sub>3</sub>:OH; R<sub>4</sub>: OH; R<sub>5</sub>:OCH<sub>3</sub>  
 LT5-C6 - R<sub>1</sub>: OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>:OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>:H; R<sub>4</sub>: OCH<sub>3</sub>;R<sub>5</sub>:OH  
 LT5-C9-I - R<sub>1</sub>: H; R<sub>2</sub>:OH; R<sub>3</sub>:H; R<sub>4</sub>: OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>:OH  
 LT5-C9-II - R<sub>1</sub>: OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>:OH; R<sub>3</sub>:H; R<sub>4</sub>: OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>:OH

LT1-C12

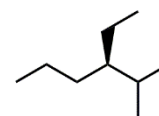
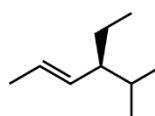


LT6-C15



S3-C13-A - R:

S3-C13-B - R:



**Figura 70:** Compostos isolados da fração LTD obtida a partir das folhas de *L. thymoides*. LT1-C4 = 3,5-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona; LT5-C5 = rhamnocitrina; LT5-C6 = 5,7-diidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona; LT5-C9 = mistura de I- hispidulina e II-jaceosidina; LT1-C12 = 7,4'-dimetilaromadendrina; S3-C13 = mistura de A-estigmasterol e B-  $\beta$ -sitosterol e LT6-C15 =  $\alpha$ -amirina

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribuiu para um melhor conhecimento químico e farmacológico da espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae). O estudo fitoquímico da fração em diclorometano de *L. thymoides* levou ao isolamento de substâncias de algumas classes: flavonoides (3,5-di-hidroxi-7,4'-metoxiflavona; 7,4'-dimetilaromadendrina; rhamnocitrina; eupalitina; além de uma mistura de jaceosidina e hispidulina), triterpeno ( $\alpha$ -amirina) e dois fitoesteróis em mistura ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol). Dentre essas substâncias, a eupatilina, 3,5-di-hidroxi-7,4'-metoxiflavona, 7,4'-dimetilaromadendrina e  $\alpha$ -amirina, não foram relatadas no gênero *Lippia*.

A avaliação do potencial espasmolítico do extrato bruto, frações e substâncias isoladas e/ou em misturas de *L. thymoides* em traqueia isolada de cobaia mostrou que LT5-C9 (mistura de jaceosidina e hispidulina) foi a mais potente, alcançando o  $E_{m\acute{a}x}$  de 100% na concentração de 81  $\mu\text{g/mL}$ , indicando a necessidade da separação destas flavonas para testes futuros.

Diante destes resultados, nota-se que a *L. thymoides* é uma planta medicinal com potencial farmacológico, sendo uma fonte de substâncias bioativas candidatas a se tornarem protótipos de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, S. et al. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *inula viscosa*, on isolated guineapig smooth muscle. **Gen. Pharmac.** v. 19, n. 4, p. 559-563, 1988.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. **Bansal MC. Flavonoids.** In: Agrawal PK (ed.) Carbon-13 NMR of flavonoids, 1989.
- AGUIAR, L. A. et al. Antispasmodic effects of a new kaurene diterpene isolated from *Croton argyrophylloides* on rat airway smooth muscle. **J Pharm Pharmacol.** n. 64, p. 1155-1164, 2012.
- AGUIAR, L. A. **Inibição da contratilidade do músculo liso traqueal de ratos por um diterpeno caurano isolado de *Croton argyrophylloides*.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.
- AKHTAR, M. S.; SWAMY, M. K. Anticancer plants: Properties and Application. **Springer Nature Singapore**, 2018. 581p.
- ALGREIBY, A. A. et al Antibacterial compounds from the *Australian native* plant *Eremophila glabra*. **Fitoterapia.** n. 126, p. 45-52, 2018.
- ALI, N. Brine shrimp cytotoxicity of crude methanol extract and antispasmodic activity of  $\alpha$ -amyrin acetate from *Tylophora hirsuta* wall. **BMC Complement Altern Med.** n. 17, p. 1-7, 2013.
- ALI, S. A.; MEITEI, K.V. On the action and mechanism of withaferin-A from *Withania somnifera*, a novel and potent melanin dispersing agent in frog melanophores. **J Recept Signal Transduct Res.** n. 31, p. 359-366, 2011.
- ALLISON, B. J. et al. Antibacterial activity of fractions of three medicinal plant extracts of Chumash and *in vitro* inhibition of the enoyl reductase enzyme by the flavonoid jaceosidine. **Nat Prod Res.** n. 31, p. 707-712, 2017.
- ALMEIDA, M. C. S. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, n. 33, p. 1877-1881, 2010.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais.** 3. ed. Salvador: EDUFBA, p. 221. 2011.
- ALVES, M. A. S. G.; QUEIROZ, T. M; MEDEIROS, I. A. Fisiologia peniana e disfunção erétil: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 439-444, 2012.
- AMATO, A.; LIOTTA, R.; MULÈ, F. Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: analysis of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol.** n. 5, p. 295-301, 2014.
- AMOR, E. C. et al. Spasmolytic Flavonoids from *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry. **Zeitschrift für Naturforschung.** v. 60, p. 1-2, 2005.

AN, P. et al. Hispidulin Protects Against Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats. **J Mol Neurosci.** n. 65, p. 203-212, 2018.

ANDRADE, D. M. L. et al. Efeito Vasodilatador Independente do Endotélio Induzido pela Jabuticaba (*M. cauliflora*) em Artérias Isoladas. **Arq Bras Cardiol.** v. 107, n. 3, p. 223-229, 2016.

ANAYA-EUGÊNIO, G. D. et al. Hypoglycemic properties of some preparations and compounds of *Artemisia ludoviciana* Nutt. **J Ethnopharmacol.** n. 155, p. 416-25, 2014.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances.** v. 33, p. 1582-1614, 2015.

AVILA-VILLARREAL, A. L. Efeitos anti-hipertensivos e vasorelaxantes da dihidrospinoacetona-A isolada de *Lonchocarpus xuul* Lundell pela produção de NO: abordagens computacional e *ex vivo*. **Fitomedicina.** n. 20, p. 1241-6, 2013.

AVILA-VILLARREAL, G. et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-A isolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production: computational and *ex vivo* approaches. **Phytomedicine.** n. 15, p. 1241-1246, 2013.

BARNES, P. J. Biochemical Basis of Asthma Therapy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 38, p. 32899–32905, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BENMERACHE, A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Tamarix balansae* J. Gay aerial parts. **Natural Product Research**, v. 31, n. 24, p. 2828–2835, 2017.

BERAIR, R.; HOLLINS, F.; BRIGHTLING, C. Airway smooth muscle hypercontractility in asthma. **Journal of Allergy**, v. 2013, [s.i.], p. 1-7, 2013.

BERRY, P. E. Lamiales ordem de planta. **Encyclopaedia Britannica**, 2018. Disponível em: <<https://www.britannica.com/plant/Lamiales>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

BISKUP, E. et al. Triterpenoid  $\alpha$ -amyirin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. **Acta Biochimica Polonica**, v.59, n. 2, p. 255-260, 2012.

BLANCO, A. M. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 1-28, 2013.

BOSKABADY, M. H. et al. Inhibitory effect of *Zataria multiflora* Boiss and carvacrol on histamine (H<sub>1</sub>) receptors of guinea-pig tracheal chains. **Fundam Clin Pharmacol.** n. 26, p. 609-620, 2012.

- BOWER, A. M. et al. Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. **J Agric Food Chem**, n. 62, p. 6147-6158, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente, 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 14 set. 2018.
- CAI, L.; WU, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. **J. Nat. Prod.** n. 59, p. 987-990, 1996.
- CAO, J.; LI, G. Chemical constituents of *Centipeda mínima*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. n. 37, p. 2301-2303, 2012.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 11, p. 1-23, 2011.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- CHAREONKLA, A. et al. A new diarylheptanoid from the rhizomes of *Zingiber mekongense*. **Fitoterapia**. n. 82, p. 534-538, 2011.
- CHEN, G. et al. Isoliquiritigenin, a Flavonoid from Licorice, plays a Dual Role in regulating Gastrointestinal Motility in vitro and in vivo. **Phytotherapy research**. n. 23, p. 498-506, 2009.
- CHO, J. H. et al. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. **Food Chem Toxicol**. v. 8, n. 49, p. 1737-44, 2011.
- CHOO, S. H. et al. Effects of eupletiline on contractility of cavernous smooth muscle through nitric oxide independent pathways. **Andrology**. n. 5, p. 1016-1022, 2017.
- CHUNG, P. Y.; CHUNG, L. Y.; NAVARATNAM, P. Potential targets by pentacyclic triterpenoids from *Callicarpa farinosa* against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, n. 94, p. 48-54, 2014.
- CORREIA, A. C. C. **Estudo comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopiya langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopiya frutescens* Aubl.** 2013. 186f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2013.
- CSAPI, B. et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. **Phytother Res**. v. 11, n. 24, p. 1664-9, 2010.
- CUI, J.; HUANG, L. A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-onesteroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp.sponges. **Steroids**, v. 73, 252-256, 2008.

CUONG, N. M. et al. Vascular L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocking activity of sulfur-containing indole alkaloids from *Glycosmis petelotii*. **J Nat Prod.** n. 25, p. 1586-1593, 2014.

DATTA, B. K. et al. Flavonoids from *Polygonum stagninum* (Polygonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology.** n. 30, p. 693-696, 2002.

DE-EKNANKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry.** n. 62, p. 389-398, 2003.

DEVI, R. C.; SIM, S. M.; ISMAIL, R. Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum. **J Smooth Muscle Res.** n. 47, p. 143-145, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 2.ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2002. 507p.

DI, F. et al. Effects of dehydroeffusol on spasmogen-induced contractile responses of rat intestinal smooth muscles. **Planta Med.** n. 80, p. 978-983, 2014.

DIAS, D. A., URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites,** v. 2, p. 303–333, 2012.

DIAZ, K. et al. Research Article Isolation and Identification of Compounds from Bioactive Extracts of *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. (Dandelion) as a Potential Source of Antibacterial Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** v. 2018, p. 1-8, 2018.

DISCOVER LIFE. *Lippia*, 2019. Disponível em <<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Lippia>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

DROZDOVA, F. V. et al. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry,** v. 33, p. 326–333, 2007.

DU, L.; CHEN, J.; XING, Y. Q. Eupatilin prevents  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress and apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. **Biomed Pharmacother.** n. 85, p. 136-140, 2017.

ESPINDOLA, J. A. A. et al. Floresta e ambiente. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. **Floram.** v. 13, p. 53-60, 2006.

ERTEL, E. A. et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels, **Neuron,** v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000.

ESCOBAR-RAMOS, E. A. et al. Homoisoflavonóides e Chalcones isolados de *Haematoxylum campechianum* L., com atividade espasmolítica. **Moléculas.** n. 22, 2017.

ESTRADA, O. et al. Pomolic acid of *Licania pittieri* elicits endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings. **Phytomedicine.** n. 15, p. 464-469, 2011.

- ETO, M.; KITAZAWA, T. Diversity and plasticity in signaling pathways that regulate smooth muscle responsiveness: paradigms and paradoxes for the myosin phosphatase, the master regulator of smooth muscle contraction. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 53, n. 0, p. 1-19, 2017.
- FABRI, R. L.M. et al. Identification of Antioxidant and Antimicrobial Compounds of *Lippia* Species by Bioautography. **Journal of medicinal food**, n. 14, p. 840–846, 2011.
- FAINI, F. et al. Chemistry and Bioactivity of *Haplopappus remyanus* (“bailahuen”), a Chilean Medicinal. **Plant. J. Braz. Chem. Soc.** v. 22, n. 12, p. 2344-2349, 2011.
- FANG, S. H. et al. Anti-oxidant and inflammatory mediator’s growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 116, p. 333-340, 2008.
- FARIAS, E. M. F. G. et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida pecies*. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 63-67, 2012.
- FLORA DO BRASIL. *Lippia* in **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018. Disponível em:  
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15170>>. Acesso em: 30 Mar. 2018.
- FORESTIERI, A. M. et al. Antiinflammatory, Analgesic and Antipyretic Activity in Rodents of Plant Extracts used in African Medicine. **Phytotherapy research**, v. 10, p. 100-106, 1996.
- FORGO, P; KÖVÉR, K. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**. n. 9, p.43-50, 2004.
- FREIRES, I. A. et al. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. **Archives of Oral Biology**. Elsevier Ltd, v. 87, p. 196-20, 2018. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996917304028?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 abr. 2018.
- FUNARI, C.S. et al. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. **Phytochemistry**. Elsevier Ltd, v. 72, p. 2052-206, 2011.
- FUNCH, L. S. et al. **Plantas úteis: Chapada Diamantina**. São Carlos: Rima, 2004.
- FURANI, C. S. **Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae) nativas no Cerrado paulista**. 2010. 197f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2010.
- FUSI, F. et al. et al. n Vitro Vasoactivity of Zerumbone from *Zingiber zerumbet*. **Planta Med.** n. 81, p. 298-304, 2015.
- GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açáí (*Euterpe precatória* Mart., Arecaceae). **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 610-613, 2005.

GAMARRA-ROJAS, C. F. L. et al. **Cheklis das plantas do Nordeste**. Disponível em <<http://www.cnip.org.br/bdpm/checklistNE.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2015.

GAO, H. et al. **Hispidulin** mediates apoptosis in human renal cell carcinoma by inducing ceramide accumulation. **Acta Pharmacol Sin.** n. 38, p. 1618-1631, 2017.

GELMINI, F. et al. Unsaponifiable Fraction of Unripe Fruits of *Olea europaea*: An Interesting Source of Anti-inflammatory Constituents. **Planta Med.** n. 82, p. 273-278, 2016.

GHARZOULI, K.; HOLZER P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. **Pharmacology.** n. 1. p. 5-14, 2004.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMES, T.B.; BANDEIRA, F.P.S.F. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n. 4, p. 796-809, 2012.

GORNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier Ireland Ltd. v. 117, p. 166–169, 2008.

GOULART, M. O. F. et al. Fitoconstituintes Químicos Isolados de *Jatropha Elliptica*. Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Carbono e Hidrogênio dos Diterpenos Jatrolonas A e B. **Química Nova**, n. 16, p. 95-100, 1993.

GUERRA, M. P.; NADARI, R. O. 2001. **Biodiversidade: aspectos biológicos geográficos legais e éticos**. In: SIMOES, C. M.O et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed. Universidad, p. 13-40, 2001.

GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C. Triterpenos das folhas das folhas de *Protium strumosum*. **Revista Fitos**, v. 3, n. 01, p. 67-76, 2007.

HAJDÚ, A. M. et al. Xanthine Oxidase-Inhibitory Activity and Antioxidant Properties of the Methanol Extract and Flavonoids of *Artemisia Asiatica* Zsuzsanna. **Rec. Nat. Prod.** 8:3 (2014) 299-302

HAMMOUD L. et al. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. walliana M. Nat Prod Res. n. 26, p. 203-208, 2012.

HAN, H.Y. et al. The flavonoid jaceosidine of *Artemisia princeps* induces apoptotic cell death and inhibits the Akt pathway in oral cancer cells. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2018, p. 1-8, 2018a.

HAN, M. et al. Hispidulin inhibits growth of hepatocellular carcinoma and metastasis through AMPK and ERK-mediated signaling of PPAR $\gamma$ . **Farmacêutico Biomed.** n. 103, p. 272-283, 2018b.

HAN, S. et al. Isolation and Identification of Polymethoxyflavones from the *Hybrid Citrus*, Hallabong. **Journal of Agricultural Food Chemistry.** n. 58, p. 9488-949, 2010.



HARBONE, J. B., MABRY, T. J., **The Flavonoids**: advances in research, Chapman and Hall, New York, p. 21-24, 1982.

HARVEY, A. L., et al. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 14, p. 111-129, 2015.

HASE, T. et al. Revised structure for hortensin, a flavone from *Millingtonia hortensis*. **Phytochemistry**, n. 40. P, 287-290, 1995.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R.; PANTHONG, A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 78. p. 45-49, 2001.

HIROTA, S.; HELLI, P.; JANSSEN, L. J. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> handling in airway smooth muscle. **Eur Respir J**. v. 30, n. 1, p. 114-133, 2007.

HONG, F. et al. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, p. 135-146, 2011.

HONG, J. T. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 237, p. 59-68, 2009.

HU, T. et al. Identification of bioactives from *Astragalus chinensis* L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. **J Food Sci Technol**, 2017.

HUANG, L.; HUANG, K.; NING, H. Hispidulin prevents memory dysfunction induced by sevoflurane in elderly rats. **Farmacêutico Biomed**. n. 97, p. 412-422, 2018.

JANSSEN, L. J. et al. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1142-1151, 2001.

JIANG, H. et al. Screening for fractions of *Oxytropis falcata* Bunge with antibacterial activity. **Natural Product Research**. v. 23, n. 10, p. 953-959, 2009.

JOO, M. et al. Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on TNBS-induced Colitis of Rats. **Korean J Physiol Pharmacol**. v. 1, n. 19, p. 43-50, 2015

JORGE, T. C. M. et al. Alkaloids from *Cephalanthus glabratus* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. n. 34, p. 436-437, 2006.

JUNG, Y. et al. Eupatilin with PPAR $\alpha$  agonistic effects inhibits TNF $\alpha$ -induced MMP signaling in HaCaT cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 1, n. 493, p. 220-226, 2017.

JUNG, Y. et al. Eupatilin, an activator of PPAR $\alpha$ , inhibits the development of oxazolone-induced atopic dermatitis symptoms in Balb/c mice. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 2, n. 496, p. 508-514, 2018.

KARAKI. H. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157 - 230, 1997.

- KIKUZAKI, H. et al. Phenylbutanoid dimers from the leaves of *Alpinia flabellata*. n. 56, p.109-114, 2001.
- KIM, A. R. et al. Chemical constituents on the aerial parts of *Artemisia selengensis* and their IL-6 inhibitory activity. **Arch Pharm Res.** n. 38, p. 1059-65, 2015.
- KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.
- KIM, J. et al. Eupatilin ameliorates collagen induced arthritis. **J Korean Med Sci.** v. 3, n. 30, p. 233-9, 2015.
- KIM, J. S. et al. A eupatilina inibe a adipogênese através da supressão da atividade do PPAR $\gamma$  em células 3T3-L1. **Farmacêutico Biomed.** n. 103, p. 135-139, 2018.
- KIM, J. Y. et al. 5,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone attenuates ischemic damage and apoptosis in mouse islets. **Transplant Proc.** n. 47, p. 1073-1078, 2015.
- KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M. Effects of an *Atractylodes lancea* rhizome extract and a volatile component  $\beta$ -eudesmol on gastrointestinal motility in mice. **J Ethnopharmacol.** n. 141, p. 530-536, 2012.
- KUMAR, R. et al. Semi-synthetic spectral assignments and NMR of flavonoid and chalcone derivatives. **Magn Reson Chem.** n. 54. p. 880-886, 2016.
- LEE, H.M. et al. Protective Effect of Eupatilin Pretreatment Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. **Transplant Proc.** v. 6, n. 48, p. 1226-33, 2016.
- LEE, J. H. et al. Topical Application of Eupatilin Ameliorates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. **Ann Dermatol.** v. 1, n. 29, p. 61-68, 2017.
- LEE, S. W.; HUNG, W. J.; CHENA, Z. T. A new flavonol from the kino of *Eucalyptus citriodora*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 1, p. 37-42, 2017.
- LEE, T. H. et al. Jaceosidin, a natural flavone, promotes angiogenesis via the activation of the VEGFR2 / FAK / PI3K / AKF / NF- $\kappa$ B signaling pathways in endothelial cells. **Exp Biol Med.** n. 239, p. 1325-34, 2014.
- LEITÃO, S. G. et al. Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia origanoides*. **Journal of Chromatography.** n. 1520, p. 83-90, 2017.
- LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent  $\beta$ -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundam Clin Pharmacol.** n. 24, p. 749-758, 2010.
- LI, F. et al. Eupatilin inhibits EGF-induced JB6 cell transformation by targeting PI3K. **Int J Oncol.** v. 3, n. 49, p. 1148-54, 2016.
- LI, L. Z. et al. Flavonoids and other constituents from *Aletris spicata* and their chemotaxonomic significance. **Natural Product Research**, v. 28, n. 15, p. 1214-1217, 2014.

- LI, T. Z. et al. New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala Japonica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 5, p. 401–409, 2006.
- LI, X. et al. A new flavonol from *Oxytropis ochrocephala* Bunge. **Natural Product Research**. p. 1-4. 2012.
- LI, Y. Y. et al. Application of eupatilin in the treatment of osteosarcoma. **Oncol Lett**. v. 4, n. 10, p. 2505-2510, 2015.
- LIMA, O. R.; POLONSKY, J. Les constituants flavonopdes de *cephalanthus spathelliferus*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 913-916, 1973.
- LIMA-JÚNIOR, R.C.P. et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene,  $\alpha,\beta$ -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK<sub>1</sub>-receptors, and K<sup>+</sup> ATP channels. **Inflammation Research**, v.56, p.487-494, 2007.
- LIN, L. et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 361–369, 2006.
- LIN, L.; MUKHOPADHYAY, S.; ROBBINS, R. J.; HARNLY, J. M. **J Food Comp Anal**. 2007.
- LIN. W. Q. et al. Inhibition of xanthine oxidase activity by *gnaphalium affine* extract. **Chin Med Sci J**. v. 4, n. 29, p. 225-30, 2014.
- LIU, K. et al. Hispidulin suppresses cell growth and metastasis by targeting PIM1 through JAK2/STAT3 signaling in colorectal cancer. **Cancer Sci**. n. 109, p. 1369-1381. 2018.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B.; **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer-Verlag: Berlin,1970.
- MACÊDO, C. L. et al. Spasmolytic effect of galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **J Smooth Muscle Res**. v. 47, n. 6 183, p. 123-134, 2011.
- MARQUES, T. S. et al. Determinação do perfil fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de extrato da espécie *Scleronema micranthum* da família Bombacaceae. **Revista Fitos**, v. 4, n. 10, p. 375-547, 2016. |
- MARSH, D.T et al. As relações estrutura-atividade para interações de flavona com  $\beta$  amilóide revelam um novo efeito antiagregatório e neuroprotetor de 2', 3', 4'-tri-hidroxi-flavona (2-D08). **Bioorg Med Chem**. n. 25, p. 3827-3834, 2017.
- MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; SANTOS FILHO, L. **Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro : CNCFlora, 2014. 320 p.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF J. N. *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. n. 93, p. 207-212, 2004.

MATOS, I.B. et al. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**, v. 54, p 482-492, 2013.

MAUCHAMP, A. et al. *Lippia salicifolia*. **A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN**, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T30452A9551218.en>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

MAYNARD, L. G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian Journal of Pharmacology**. v.43. p. 694-698, 2011.

MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene  $\alpha$ -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, n. 559, p. 227-235, 2007.

MELO, C.M. et al. Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, p. 673-681, 2011.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, U. P.; PALHARES, M. S.; FERREIRA, C. Óleo adinâmico en equinos: fisiopatología y tratamiento. **Arq. Ciênc. Vet. Zool**. Unipar, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 49-58, 2007.

MENEZES, P. M. N. **ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA E ANTITUSSÍGENA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* (VERBENACEAE)**. 2017. f146. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido, Subárea de Fisiologia e Farmacologia) Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2017.

MENEZES, P. M.N. et al. Spasmolytic and antidiarrheal activities of *Lippia thymoides* (Verbenaceae) essential oil. **Natural Product Research**, v. 4, p. 1-3, 2018.

METOUÏ, R. et al. Bioactive flavones of *Tunisian campestris artemisia* L. **Mol Biol Cell**. n. 63 p. 86-91, 2017.

MEURS, H. et al. Muscarinic receptors in human airway smooth muscle are coupled to phosphoinositide metabolism. **European Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 369-371, 1989.

MIN, S.W. et al. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice **Journal of Ethnopharmacology**. v. 125, n. 3, p. 497-500, 2009.

- MISHARIN, A. Y. et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1460–1473, 2008.
- MOUFID, A.; EDDOUKS, M. *Artemisia herba alba*: a popular plant with potential medicinal properties. **Pak J Biol Sci**, n. 15, p. 1152-1159, 2012.
- MUJOVO, S. F. et al. Bioactive compounds from *Lippia javanica* and *Hoslundia opposita*. **Natural Product Research**. v. 22, n. 12, p. 1047–1054, 2008.
- MUKHERJEE, S. et al. Ca<sup>2+</sup> oscillations, Ca<sup>2+</sup> sensitization, and contraction activated by protein kinase C in small airway smooth muscle. **The Journal of General physiology**, v. 141, n. 2, p. 165-178, 2013.
- MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Actividades biológicas de los flavonoides naturales. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. (Coord.). **Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Univali: Itajaí, 2014.
- NAKASUGI, T.; NAKASHIMA, M.; KOMAI, K Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.). **J. Agric. Food Chem**. v. 48, n. 8, p. 3256- 3266, 2000.
- NAM, Y. et al. Jaceosidine natural flavone is an inhibitor of neuroinflammation. **Phyther Res**. n. 27, p. 404-411, 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod**. v. 75, p. 311–335, 2012.
- OKAHARA, F. et al. Triterpene alcohols and sterols from rice bran reduce postprandial hyperglycemia in rodents and humans. **Mol. Nutr. Food Res**. n. 00, p. 1-11, 2016.
- OKOYE, N.N et al. Beta-amyrin and alfa-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical Biology**, v.52, n.11, p. 1478-86, 2014.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.
- OLIVEIRA, F. C. et al. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. n. 5, p. 328–330, 2013.
- OLIVEIRA, G.T. et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research** v. 32, p. 723-731, 2018.
- OMOSA, L. K. et al. Antimicrobial flavonoids and diterpenoids from *Dodonaea angustifolia*. **South African Journal of Botany**. n. 91, p. 58–62, 2014.
- ONO, M. et al. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. **J Nat Med**. v. 62, p. 101-106, 2007.

ONO, M. et al. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n. 1, p. 101, 2008.

OSEI-SAFO, D. et al. Hispidulin and other constituents of *Scoparia dulcis* Linn. **Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 2, 2009.

OTUKI, M.F. et al. Topical anti-inflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v.507, n.1-3, p.253-259, 2005.

OUYANG, Z. et al. A natural compound of jaceosidin improves endoplasmic reticulum stress and insulin resistance through the positive regulation of SERCA2b. **Pharmacist Biomed.** n. 89, p. 1286-1296, 2017.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev Bras Hipertens**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PARK, J. Y. et al. Protective Effect of *Artemisia asiatica* Extract and Its Active Compound Eupatilin against Cisplatin-Induced Renal Damage. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PAULUHN, J.; MOHR, U. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 56, p. 203-234, 2005.

PEREIRA, S. L. S. et al. Clinical effect of a gel containing *Lippias idoides* on plaque and gingivitis control. **European Journal of Dentistry**, v. 7, p. 28-34, 2013.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; BAI, Y.; SANDERSON, M. J. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced  $Ca^{2+}$  oscillations. **The Journal of General Physiology**, v. 135, n. 3, p. 247-259, 2010.

PÉRTILE, R. **Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils**, 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

PESSOA, C. et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Lead Molecules from Natural Products**. p. 197-211, 2006.

PICCINELLI, A. L. et al. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Wendita calysina* Leaves (Burrito), a Folk Paraguayan Tea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. n. 52, p. 5863-5868, 2004.

PINTO, A. C. et al. PRODUTOS NATURAIS: ATUALIDADE, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POKHILO, N. D; DENISENKO, V. A; UVAROVA, N. I. Triterpenoids and flavonoids from the female catkins of *Betula exilis*. Translated from. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, n. 1, p. 125-126, 1985.

POLATOĞLU, K. et al. Chemistry and biological activities of *Tanacetum chiliophyllum* var. oligocephalum extracts. **J AOAC** v. 6, n. 96, p. 1222-7, 2013.

POSER, G. L. V. et al. T. Iridoid glucosides substitution patterns in Verbenaceae and their taxonomic implication. **Plant Systematics and Evolution**. v. 205, n. 3/4, p. 265-287, 1997.

PUTNEY, J. W.; RIBEIRO, C. M. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 8-9, p. 1272-1286, 2000.

QIAO, Z.; XU, Y.W.; YANG, J. Eupatilin inhibits the apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway following hypoxia/reoxygenation injury. **Biomed Pharmacother**. n. 82, p. 373-8, 2016.

QUEIROZ, G. S. **ANÁLISE DE ESTEROIDES EM EXTRATOS VEGETAIS E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO PRELIMINAR DE *Brunfelsia uniflora***. Relatório apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina,

RAHMAN, M. M.; GRAY, A.I. Biological activity of five antibacterial flavonoids from. **Phytochemistry** 2002, 59, 73.

RATHEE, J. S. et al. Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. **Food Chemistry**, 2006.

REN, D.B. et al. Separation of nine compounds from *Salvia plebeia* R.Br. using two-step high-speed counter-current chromatography with different elution modes. **J Sep Sci**, n. 37, p. 2118-2125, 2014.

RIVERO-CRUZ, I. et al. Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. **Journal of Food Science**. v. 76, n. 2, p. 309-317, 2011.

ROITMAN, J.N.; JAMES, L.F. Chemistry of toxic range plants highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia macrocephala*. **Phytochemistry**. v. 24, n. 4, p. 835-848, 1985.

ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J. G. S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 45. n. 6, p. 1263-1269, 1997.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 156-170, 2011.

RUIU, S. et al. Methoxyflavones from *Stachys glutinosa* with binding affinity to opioid receptors: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. **J Nat Prod**. n. 23, p. 69-76, 2015.

RYU, R. et al. Anticoagulant and antiplatelet activity of *Artemisia princeps* Pampanini and its bioactive components. **Anterior Nutr Food Sci**. n.18, p. 181-187, 2013.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. F. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, p. 119-120, 2009.

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. *Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21457>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

SANDERSON, M. J. Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Contractility by Ca<sup>2+</sup> Signaling and Sensitivity. **Proceedings of the american thoracic society**, v. 5, p. 23-31, 2008.

SÁNDOR, Z. et al. Evidence Supports Tradition: The *in vitro* Effects of Roman Chamomile on Smooth Muscles. **Original research**. p. 1-11, 2018.

SANTOS, A. C. B. et al. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.17, n.4, supl. II, p. 980-991, 2015.

SANTOS, F. A. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in health and disease**, v.11, p.98, 2012.

SANTOS, M.H.F. **ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) E *Eugenia malaccensis* L. (MYRTACEAE)**. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Química). Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, 2013.

SANTOS, R. F. et al. Spasmolytic activity of trachylobanes ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid and ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid isolated from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Eur J Pharmacol**. n. 678, p. 39-47, 2012.

SAPKOTA, A. et al. Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. **PLoS One**. v. 2, n. 12, 2017.

SCIO, E. et al. Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. **Phytochemistry**. n. 64, p. 1125–1131, 2003.

SHAKERI, F.; BOSKABADY, M. H. A review of the relaxant effect of various medicinal plants on tracheal smooth muscle, their possible mechanism(s) and potency. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 1-56, 2015.

SHARMA, V. A mini review on medicinally important plant *Lippia nodiflora*. **Asian J. Research Chem**. n. 11, p.176-178, 2018.

SHI, Y. et al. Uterine analgesic and relaxant effects of isoliquiritigenina, a flavone of *Glycyrrhiza glabra*. **Phytother Res**. n. 26, p. 1410-7, 2012.

SIDDIQUI, B. S. Steroidal constituents from the aerial parts of *Lippia nodiflora* Linn. **Natural Product Research**. v. 23, n. 5, p. 436-441, 2009.



SILVA, F. O; OLIVEIRA, I. R; SILVA, M. G. V. CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS DE *Senna spectabilis* (DC) IRWIN & BARNEBY var. *excelsa* (Schrad.) IRWIN & BARNEBY. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874-1876, 2010.

SILVA, F. S. **Estudos fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides***. 2012. 142f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2012.

SILVA, F. S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology**, p. 4-6, 2015b.

SILVA, F. S. et al. Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015a.

SILVA, M. T. et al.  $\alpha$ -Terpineol Induces Gastric Retention of Liquids by Inhibiting Vagal Parasympathetic Pathways in Rats. **Planta Med.** n. 82, p. 1329-1334, 2016.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Spectroscopy study on structural elucidation of flavonoids from *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SONG, E. H. et al. Eupatilin suppresses the allergic inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**. n. 42, p. 1-8. doi: 10.1016/j.phymed.2017.08.027. Epub 2017 Sep 21. 2018

SOUSA, D. P. et al. Spasmolytic Activity of Carvone and Limonene Enantiomers. **Nat Prod Commun**. n. 10, p. 1893-1896, 2015.

SOUZA, F. V. et al. (-)-Carvone: antispasmodic effect and mode of action. **Fitoterapia**. n. 85, p. 20-24, 2013.

SOUZA, P. et al. Diuretic effect of extracts, fractions and two compounds  $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone from *Rubus rosaefolius* Sm. (Rosaceae) leaves in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. n. 390, p. 351-360, 2017.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.

STASHENKO, E. E. et al. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **J Sep Sci**. n.36, p. 192-202, 2013.

STEFANAK, C. et al. A randomized trial of efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvant to cryotherapy in the treatment of anogenital warts. **J Dermatolog Treat**, p. 1-4, 2014.

- SUDHA, A.; SRINIVASA, P. Bioassay-guided isolation and antioxidant evaluation of flavonoid compound from aerial parts of *Lippia nodiflora* L. **BioMed Research International**. v. 2014, p.1-10, 2014.
- SUN, M. et al. Phytochemical investigation of the seeds of *Artemisia sphaerocephala*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 52, n. 2, 2016.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. HARBONE, J. B. SELF, R. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*. **Phytochemistry**. n. 26, 1987.
- TU, Y. et al. Antiatherogenic Effects of Kaempferol and Rhamnocitrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 55, p. 9969–9976, 2007.
- UEHARA, A. et al. Further characterization of foliar flavonoids in *Crossostephium chinense* and their geographic variation. **Nat Prod Commun**. v. 2, n. 9, p. 163-4, 2014.
- UEHARA, A.; AKIYAMA, S.; IWASHINA, T. Foliar flavonoids from *Tanacetum vulgare* var. boreale and their geographical variation. **Nat Prod Commun**. n. 10, p. 403-405, 2015.
- VALENTAO P. et al. Analysis of vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 47, p. 4579-4582, 1999.
- VASCONCELOS, L. H. C. et al. Flavonoid galeatin 3,6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K<sub>p</sub> channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration. **Article in European journal of pharmacology**. p. 1-9, 2015.
- VASCONCELOS, T. B. et al. β-Citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. **Braz J Med Biol Res**. n. 49, p. 1-9, 2016.
- VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B. Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1245-1252, 2009.
- VEDERNIKOV, N; ROSHCHIN, V. I. Extractive Compounds of Betulaceae Family Birch Buds (*Betula pendula* Roth.): IV. Composition of Sesquiterpene Diols, Triols, and Flavonoids. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. v. 38, n. 7, p. 753–761, 2012.
- VENTURA-MARTÍNEZ, R. V. et al. Spasmolytic effect of aqueous extract of *Tagetes erecta* L. flowers is mediated through calcium channel blockade on the guinea-pig ileum. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 103, p. 1552-1556, 2018.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANII, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**. v.29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- WANG, X. et al. Eupatilin inhibits the proliferation of human esophageal cancer TE1 cells by targeting the Akt-GSK3β and MAPK/ERK signaling cascades. **Oncol Rep**. v. 6, n. 39, p. 2942-2950, 2018.
- WANG, Y. et al. Anticancer effect of eupatilin on glioma cells through inhibition of the Notch-1 signaling pathway. **Mol Med Rep**. v. 2, n. 13, p. 1141-6, 2016.

- WAYMAN, G. A. et al. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. **Cell Calcium**, v. 50, p. 1-8, 2011.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, 2003.
- WEI, Q. et al. [Chemical Constituents from Leaves of "Chuju" *Chrysanthemum morifolium* and Their Antioxidant Activities *in vitro*]. **Zhong Yao Cai**. n. 38, p. 305-310, 2015.
- WOO, S.M.; KWON, T. K. Jaceosidine induces apoptosis through activation of Bax and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP expression in human renal carcinoma Caki cells. **Chem Biol Interact**. n. 260, p. 168-175, 2016.
- WU, F. et al. Hispidulin alleviates high-glucose-induced podocyte injury by regulating protective autophagy. **Biomed Pharmacother**. n. 104, p. 307-314, 2018.
- XIE, J. et al. Hispidulin prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. **Sou J Cancer Res**. n. 5, p. 1047-1061, 2015.
- YANG, J. et al. Inhibitory effect of schisandrin on spontaneous contraction of isolated rat colon. **Phytomedicine**. n. 15, p. 998-1005, 2011.
- YOSHIDA, N. et al. Prevention of colonic spasm using L-menthol in colonoscopic examination. **Int J Colorectal Dis**. n. 29, p. 579-583, 2014.
- YU, K. et al. Eupatilin protects against tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Int J Clin Exp Med**. v. 12, n. 8, p. 2191-7, 2015.
- YUAN, H. et al. Flavonoids of *Artemisia sacrorum* Ledeb. and its cytotoxic activities against human cancer cell lines. **Exp Ther Med**. n.12, p. 1873-1878, 2016.
- ZAMORA, C. M. P; TORRES, C. A; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. **Molecules**, p. 1-21, 2018.
- ZATER, H. et al. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. **Asian Pac J Trop Med**. n. 9. p. 554-61, 2016.
- ZHANG, J; SHEN, B; LIN, A. **Trends Pharmacol. Sci**. n. 28, p. 286 –295, 2007.
- ZHANG, X. et al. Anti-inflammatory Activity of Flavonoids from *Populus davidiana*. **Archives Pharmacol Research**. v. 29, n. 12, p. 1102-1110, 2006.
- ZHONG, W. F. et al. Eupatilin induces human renal cancer cell apoptosis via ROS-mediated MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. **Oncol Lett**. v. 4, n. 12, p. 2894-2899, 2016.
- ZHOU, G. X. An acetyl flavonol from *Nervilia fordii* (Hance) Schl. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 11, n. 6, p. 498–502, 2009.

**APÊNDICE- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA IN VITRO DE LIPPIA THYMOIDES MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)", sob a responsabilidade de FABRÍCIO SOUZA SILVA, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

We certify that the Research "INVESTIGATION OF THE IN VITRO SPASMOLYTIC ACTIVITY OF LIPPIA THYMOIDES MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)", under the responsibility of FABRÍCIO SOUZA SILVA, is agree with Ethics Committee in Animal Use of Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Petrolina, 02 de outubro de 2012.

Profa. Dra. Keila Moreira Batista  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
UNIVASF