

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de**

*Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ROBERTO PÉRTILE**

**FLORIANÓPOLIS, 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba*  
(Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre em Farmácia.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marení Rocha  
Farias**

**ROBERTO PÉRTILE**

**FLORIANÓPOLIS**

**2007**

*“Aquilo que é tido por uma geração como o ápice do conhecimento,  
com frequência, é considerado como absurdo pela próxima,  
e aquilo que em um século é considerado como superstição  
pode constituir o fundamento da ciência no século seguinte.”*

Filipe Aureolo Teofrasto Bombastd de Hohenheim,

PARACELSO (1493 – 1541)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que auxiliaram neste trabalho:

- à minha família pelo incentivo;
- à Mariana, por tudo;
- aos amigos, que sempre estarão comigo, onde quer que estejam;
- à Profa. Marení Farias e ao Prof. Eloir Schenkel pelo auxílio e treinamento científico durante esta dissertação;
- ao Prof. Jorge Palermo, do Depto de Química Orgânica, da Universidade de Buenos Aires, pela realização de verdadeiras obras-primas, que foram os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, por seu apoio e disponibilidade;
- ao Prof. Norberto Pepporine Lopes, do Depto de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela realização dos espectros de massa;
- ao Prof. Flávio Reginatto pela prontidão em ajudar sempre quando necessário;
- à Samanta, por ter trabalhado e colaborado na realização deste trabalho;
- ao Dr. César Simionato, Shirley e Ana, instrutores do horto de Plantas Medicinais do Hospital Universitário, UFSC, pelos ensinamentos sobre plantas medicinais e pelo resgate da sabedoria popular;
- à Hortência, agente de saúde, e a todos os moradores da Costa da Lagoa, Florianópolis – SC, por gentilmente terem possibilitado que se realizasse a coleta de *L. alba* e por todos seus ensinamentos;
- aos amigos e colegas de Laboratório: Andressa, Claudinha, Rodrigo, Profa. Cláudia Simões, Solange, Karen, Maria Isabel, Silvana, Cíntia, Clara, Flora, Leopoldo, Melissa, Teca e tantos outros, por terem sempre me ensinado!

## RESUMO

Estudos etnobotânicos têm demonstrado que a espécie *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils, família Verbenaceae, é uma das plantas mais utilizadas no Brasil, principalmente na forma de infuso. Popularmente, esta planta é conhecida como melissa, erva cidreira, erva cidreira de arbusto, entre outros. Na medicina popular é utilizada em problemas digestivos e como calmante. Esta dissertação dá sequência a uma série de trabalhos realizados anteriormente com *L. alba*, visando isolar e identificar substâncias oriundas da fração n-butanólica, para a qual foram relatadas atividades sedativa e anticonvulsivante. Assim, o objetivo deste trabalho é dar continuidade ao isolamento de saponinas, rever a elucidação estrutural da saponina LA3 realizada por Correa (2005), elucidar a estrutura da substância LA4. Partindo-se de um extrato hidroalcoólico das folhas do material vegetal, seguido de partição com solventes de polaridade crescente, utilizou-se a fração n-butanólica para o estudo. Após purificação das subfrações, foi possível isolar as substâncias: verbascosídeo, LA3, LA4 e uma pró-sapogenina. O verbascosídeo e a substância LA3 foram caracterizados por CCD e/ou UV. A pró-sapogenina foi obtida a partir da fração n-butanólica, submetida à cromatografia em coluna hidrostática, cromatografia líquida de alta eficiência e, finalmente, a uma hidrólise alcalina. A pró-sapogenina foi identificada como o ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-16a,23-diidróxi-olean-12-en-28-óico por meio de espectrometria de RMN mono e bidimensionais, além de uma hidrólise ácida. A substância LA4 foi obtida por meio de uma seqüência de cromatografias em colunas hidrostáticas e foi identificada como o éster glicosídico 28-O-a-L-ramnopiranosil-(1? 3)-β-D-xilopiranosil-(1? 4)-a-L-ramnopiranosil-(1? 3)-a-L-arabinopiranosídeo do ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-16-a,23-diidróxi-olean-12-en-28-óico. A estrutura da saponina LA4 foi elucidada por RMN mono e bidimensionais e espectrometria de massas. Desta forma, a espécie *L. alba* se mostrou fonte de glicosídeos, sobre os quais há poucos trabalhos na literatura, além de derivados do ácido caféico, tipo verbascosídeo.

Palavras-chave: *Lippia alba*, estudo fitoquímico, fração n-butanólica, saponinas, Verbenaceae.

## ABSTRACT

Ethnopharmacological studies have demonstrated that *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils, Verbenaceae, is one of the most widely utilized plants in Brazil, mainly in infusion form. In folk medicine it is used in the treatment of digestive disorders and as a calmant. This dissertation seeks to continue a series of experiments previously conducted with *L. alba*, and aims to isolate and identify substances deriving from the n-butanolic fraction, to which sedative and anticonvulsivant activities were related. Therefore, the objects of this work are: to continue to isolate *L. alba* saponins, to check the structural elucidation of saponin LA3 done by Correa (2005), and to elucidate the structure of the LA4 saponin. Starting with the hydroalcoholic extract from the leaves of the vegetal material, followed by partition with a higher polarity solvent, the n-butanolic fraction was used for the study. After the purification of the subfractions, the substances verbascoside, LA3, LA4 and a prosapogenin were isolated. Verbascoside and the substance LA3 were characterized via thin layer chromatography (TLC) and/or ultraviolet (UV) spectroscopy. The prosapogenin was obtained by the submission of the n-butanolic fraction to a hydrostatic chromatography column, then to high-performance liquid chromatography (HPLC) and finally to alkaline hydrolysis. The prosapogenin was identified as the 3-O-β-D-glucopyranosyl-16a,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid and was elucidated by mono- and bidimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, together with acid hydrolysis. The LA4 saponin was obtained by a sequence of hydrostatic chromatographic columns and was identified as 3-O-β-D-glucopyranosyl-28-O-(a-L-rhamnopyranosyl-(1? 3)-β-D-xylopyranosyl-(1? 4)-a-L-rhamnopyranosyl-(1? 3)-a-L-arabinopyranosyl)-16a,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid. Its structural elucidation was carried out by mono- and bidimensional NMR and mass spectrometry. Thus, the *L. alba* species is a source of glycosides and also of caffeic acid verbascoside-type derivatives.

**Key words:** *Lippia alba*, phytochemical study, n-butanolic fraction, saponins, Verbenaceae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lippia alba</i> (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. ....	21
Figura 2. Estruturas de substâncias já isoladas em <i>L. alba</i> . ....	25
Figura 3. Biossíntese das saponinas triterpênicas e esteroidais. ....	27
Figura 4. Estrutura dos esqueletos $\beta$ -amirina (oleanano), $\alpha$ -amirina (ursano) e lupeol. ....	28
Figura 5. Esquema do fracionamento e obtenção da fração n-BuOH. ....	34
Figura 6. Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir da fração n-BuOH ....	35
Figura 7. Comparação cromatográfica entre os óleos voláteis de <i>L. alba</i> , <i>C. nardus</i> e <i>C. citratus</i> . ....	43
Figura 8. Comparação cromatográfica das subfrações oriundas da coluna 1 com a saponina LA3 isolada por Correa (2005) e as frações n-BuOH obtidas das folhas secas de <i>L. alba</i> . ....	46
Figura 9. Comparação cromatográfica das subfrações oriundas da coluna 3 com o verbascosídeo e a fração n-BuOH obtidos das folhas secas de <i>L. alba</i> . ....	47
Figura 10. Espectro de UV do verbascosídeo em solução de MeOH. ....	48
Figura 11. Estrutura proposta para a pró-sapogenina de <i>Lippia alba</i> . ....	53
Figura 12. Ampliação 1/3 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz. ....	54
Figura 13. Ampliação 2/3 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz. ....	54
Figura 14. Ampliação 3/3 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz. ....	55
Figura 15. Experimento de DEPT 135° da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz. ....	55
Figura 16. Ampliação 1/2 do espectro de RMN $^1\text{H}$ da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz. ....	56
Figura 17. Ampliação 2/2 do espectro de RMN $^1\text{H}$ da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz. ....	56
Figura 18. Experimento de HSQC da pró-sapogenina em MeOD (500 – 125 MHz). ....	57
Figura 19. Ampliação do experimento de HSQC da pró-sapogenina em MeOD (500 – 125 MHz). ....	57
Figura 20. Ampliação 1/2 do experimento COSY da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz. ....	58

Figura 21. Ampliação 2/2 do experimento COSY da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz. Detalhe para a intercorrelação dos H da glicose.....	59
Figura 22. Ampliação do experimento de HBMC em MeOD (500 – 125 MHz).....	60
Figura 23. Cromatografia em camada delgada da fração F6f hidrolisada, da fração F6f e do padrão de glicose. ....	62
Figura 24. Espectro de massa por ESI. ....	63
Figura 25. Ampliação 1/3 do espectro de RMN <sup>13</sup> C totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	64
Figura 26. Ampliação 2/3 do espectro de RMN <sup>13</sup> C totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	64
Figura 27. Ampliação 3/3 do espectro de RMN <sup>13</sup> C totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	65
Figura 28. Experimento de DEPT 135° da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	65
Figura 29. Ampliação 1/2 do experimento de DEPT 90° da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	66
Figura 30. Ampliação 2/2 do experimento de DEPT 90° da substância LA4 em MeOD a 100 MHz. ....	66
Figura 31. Ampliação 1/4 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. ....	67
Figura 32. Ampliação 2/4 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. ....	67
Figura 33. Ampliação 3/4 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. ....	68
Figura 34. Ampliação 4/4 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. ....	68
Figura 35. Experimento COSY completo da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. ....	69
Figura 36. Ampliação 1/2 do experimento COSY da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. Detalhe para os H anoméricos. ....	69
Figura 37. Ampliação 2/2 do experimento COSY da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. Detalhe para a determinação da sequência dos açúcares. ....	1
Figura 38. Ampliação 1/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Detalhe para a ligação do C-28 com o H-1 da arabinose. ....	74
Figura 39. Ampliação 2/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Detalhe para a ligação do ara C-3 com o H-1 da ramnose I. ....	74

Figura 40. Ampliação 3/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Detalhe para a ligação do ram I C-4 com o xil H-1 e C-3 com gli H-1. ....	75
Figura 41. Ampliação 4/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Detalhe para a ligação do xil C-3 com o ram II H-1. ....	75
Figura 42. Ampliação 5/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Detalhe para determinação do C-3, ram 1 C-4 e xil C-3. ....	76
Figura 43. Atribuições dos espectros HMBC para os hidrogênios anoméricos dos açúcares da cadeia ligada ao C-28. ....	77
Figura 44. Curva de Karplus. Demonstra a relação do ângulo entre dois hidrogênios vizinhos (eixo X) com a constante de acoplamento (eixo Y). . . . .	78
Figura 45. Estrutura da saponina LA4. ....	79
Figura 46. Equilíbrio ${}^4C_1$ e ${}^1C_4$ para $\alpha$ -L-arabinose. ....	82
Figura 47. Ampliação do experimento COSY da saponina LA3 em MeOD a 400 MHz. Detalhe para o acoplamento W entre o hidrogênio 3 da arabinose e o hidrogênio 5a da arabinose. ....	83
Figura 48. Comparação das estruturas das saponinas LA3 e LA4. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perda por dessecação das folhas secas e moídas de <i>L. alba</i> após 7 dias.....	41
Tabela 2. Teor de óleo volátil de folhas frescas de <i>L. alba</i> . .....	42
Tabela 3. Análise granulométrica por tamisação das folhas cominuidas de <i>L. alba</i> . .....	44
Tabela 4. Caracterização dos íons no espectro massa por impacto eletrônico da mistura de saponinas LA3 e LA4 obtidas das folhas de <i>L. alba</i> . .....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substituições comumente encontradas para agliconas olean-12-eno. ....	29
Quadro 2. Subfrações resultantes da coluna cromatográfica 1. ....	36
Quadro 3. Frações reunidas da coluna 2. ....	37
Quadro 4. Frações reunidas da coluna 2. ....	37
Quadro 5. Frações reunidas da coluna 4. ....	38
Quadro 6. Frações reunidas da coluna 5. ....	39
Quadro 7. Caracterização dos carbonos da pró-sapogenina a partir do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ totalmente desacoplado. ....	49
Quadro 8. Valores espectroscópicos de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ , DEPT e COSY da glicose da pró-sapogenina. ....	53
Quadro 9. Valores espectroscópicos de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ e DEPT da aglicona da pró-sapogenina. ....	52
Quadro 10. Comparação dos valores de descolamento do $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ da pró-sapogenina com a substância LA4. ....	71
Quadro 11. Valores espectroscópicos de DEPT, $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ e COSY dos monossacarídeos da substância LA4. ....	72
Quadro 12. Comparação dos dados de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ das saponinas LA3 e LA4. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila

CCD – cromatografia em camada delgada

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - diclorometano

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COSY – two-dimensional <sup>1</sup>H correlation spectroscopy

DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer

EB – extrato bruto

EtOH – etanol

Fração n-BuOH – fração n-butanólica

H<sub>2</sub>O - água

HMBC – <sup>1</sup>H-detected heteronuclear multiple-bond spectroscopy

isoprOH – isopropanol

MeOH – metanol

MeOD – metanol deuterado

NOE – nuclear Overhauser enhancement

RCT – relayed coherence transfer

RMN – ressonância magnética nuclear

ROESY – 2-D NOE in a rotating frame

UV – ultravioleta

# SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
3.1 A espécie <i>Lippia alba</i> .....	19
3.1.1 Classificação botânica .....	19
3.1.2 Nomes populares .....	20
3.1.3 Descrição botânica .....	20
3.1.4 Usos populares .....	21
3.1.5 Constituintes químicos .....	22
3.1.6 Atividades farmacológicas .....	25
3.2 Saponinas com o núcleo oleanólico .....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1 Procedimentos gerais .....	31
4.2 Coleta e preparação do material vegetal utilizado para o isolamento de substâncias .....	31
4.2.1 Coleta .....	31
4.2.2 Secagem e moagem .....	31
4.2.3 Caracterização do material vegetal .....	31
4.2.3.1 Determinação da perda por dessecação .....	32
4.2.3.2 Determinação do teor de óleo volátil .....	32
4.2.3.3 Caracterização cromatográfica do quimiotipo de <i>Lippia alba</i> .....	32
4.2.3.4 Determinação de cinzas totais .....	33
4.2.3.5 Determinação da granulometria da droga vegetal .....	33
4.3 Preparação da solução extrativa .....	33
4.4 Fracionamento dos extratos .....	34
4.5 Isolamento e purificação dos constituintes da fração n-BuOH .....	35
4.5.1 Isolamento do verbascosídeo .....	36
4.5.1.1 Coluna 2 – Purificação do verbascosídeo .....	36
4.5.1.2 Coluna 3 – Isolamento do verbascosídeo .....	37

4.5.2	Isolamento das substâncias LA3, LA4, LA5 e LA6 .....	37
4.5.2.1	Coluna 4 .....	37
4.5.2.2	Hidrólise ácida da fração F6f.....	38
4.5.3	Isolamento da pró-sapogenina e da LA7 .....	39
4.5.3.1	Coluna 5 .....	39
4.5.3.2	Obtenção da pró-sapogenina através da hidrólise básica .....	39
4.6	Caracterização e elucidação das substâncias isoladas .....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1	Caracterização do material vegetal de <i>L. alba</i> utilizado para isolamento de substâncias .....	41
5.1.1	Determinação da perda por dessecação .....	41
5.1.2	Determinação do teor de óleo volátil .....	41
5.1.3	Caracterização cromatográfica do quimiotipo de <i>Lippia alba</i> estudada .....	42
5.1.4	Determinação de cinzas totais .....	43
5.1.5	Determinação da granulometria da droga vegetal .....	44
5.2	Determinação do rendimento da extração e do fracionamento da fração n-BuOH das folhas secas de <i>L. alba</i> .....	45
5.3	Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração n-BuOH de <i>L. alba</i> .....	45
5.3.1	Isolamento e caracterização do verbascosídeo .....	47
5.3.2	Isolamento e elucidação estrutural da pró-sapogenina .....	48
5.3.3	Elucidação estrutural da saponina LA4 e revisão das atribuições da saponina LA3 isoladas das folhas secas de <i>L. alba</i> .....	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85
7	CONCLUSÕES .....	87
8	REFERÊNCIAS .....	88

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação refere-se à pesquisa desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Fármaco e Medicamentos, Linha de Pesquisa Investigação de Produtos Naturais com Potencial Atividade Biológica.

A espécie *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils tem sido estudada já há alguns anos na Universidade Federal de Santa Catarina em relação a seus aspectos fitoquímicos, tecnológicos e biológicos. A cada trabalho desenvolvido, tem-se diferentes abordagens de estudo e novas perspectivas levantadas. A presente dissertação dá continuidade ao trabalho realizado por Correa (2005), descrevendo o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias polares de *L. alba*. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mareni Rocha Farias, em colaboração com o Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel. A elucidação estrutural foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Jorge Alejandro Palermo, da Universidade de Buenos Aires e do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

# 1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam uma ampla variedade e complexidade de substâncias químicas que são responsáveis por diversos efeitos biológicos (GUERRA; NODARI, 2003; GOTTLIEB; BORIN, 2003). A pesquisa destes compostos é tida como uma rica fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos, sejam eles na forma de substância isolada (fármaco) ou na forma de extratos (fitoterápico) (ELISABETSKY, 1991; SCHENKEL; GOSSMANN; PETROVICK, 2003).

Muitos estudos sobre plantas medicinais atualmente seguem os conceitos da etnofarmacologia, os quais tratam da busca e comprovação científica (estudos químicos e farmacológicos) dos processos curativos empregados na medicina popular ou tradicional (ELISABETSKY, 1991; ELISABETSKY; DE SOUZA, 2003).

O estudo científico das plantas busca desenvolver medicamentos que apresentem eficácia, segurança e qualidade. Quando o medicamento apresenta o efeito farmacológico esperado e necessário, diz-se que é eficaz. Já a segurança está relacionada à ausência de toxicidade e de contaminantes. A qualidade se refere ao cumprimento de critérios característicos para cada matéria-prima vegetal em vista do uso (FARIAS, 2003; SONAGLIO *et al.*, 2003). O conhecimento dos constituintes químicos vegetais permite o desenvolvimento de metodologias que possibilitem avaliar a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos em cada uma destas etapas. A constância da composição do material vegetal é essencial para a qualidade do produto e está diretamente relacionada com a sua eficácia e segurança no emprego terapêutico (SONAGLIO *et al.*, 2003).

Assim, a identificação de substâncias químicas ativas e o desenvolvimento de metodologias analíticas para o doseamento destes compostos são etapas determinantes para a garantia da qualidade do medicamento (FALKENBERG; DOS SANTOS; SIMÕES, 2003).

Estudos etnobotânicos têm demonstrado que a espécie *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils é uma das plantas mais utilizadas medicinalmente no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2006; MING, 1996; PAGLIARINI, 1995; CÓRDOVA; DEMÉTRIO, 1994). A infusão de *L. alba* é consumida devido ao seu sabor e aroma agradável, principalmente nas zonas rurais. Trata-se da espécie mais citada em levantamentos realizados sobre plantas medicinais usadas pelas comunidades da Costa da Lagoa (CÓRDOVA; DEMÉTRIO, 1994) e do Ribeirão da Ilha (PAGLIARINI, 1995), ambas localizadas no

município de Florianópolis (SC). Na medicina popular é utilizada especialmente em problemas digestivos, como calmante e para tosse (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 1996a; MATOS, 1996b), sendo uma das principais plantas brasileiras com utilização como sedativo/tranqüilizante (KLÜEGER *et al.*, 1997).

Os estudos sobre *L. alba* ainda são insuficientes para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, apesar de ser uma planta com utilização popular bastante difundida em todo o Brasil. Muitos trabalhos têm sido publicados acerca dos constituintes e da atividade farmacológica do óleo volátil, entretanto, pouco se têm estudado sobre as frações polares (PASCUAL *et al.*, 2001). Dessa forma, esse trabalho busca analisar as frações polares, por meio da identificação e da elucidação estrutural de compostos polares majoritários, dando continuidade aos trabalhos realizados por Correa (2005).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Isolar, purificar e elucidar constituintes polares das folhas de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Revisar a elucidação estrutural da saponina LA3, realizada por Correa (2005);
2. Isolar, purificar e elucidar a estrutura de constituintes polares presentes na fração n-butanólica do extrato hidroetanólico das folhas de *L. alba*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste ítem é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre a espécie *L. alba*, bem como sobre saponinas derivadas do ácido oleanólico, como suporte teórico do trabalho. Estudos mais aprofundados, principalmente sobre saponinas e espectroscopia, foram realizados utilizando as referências Hostettmann e Marston (1995), Liu (1995), Pascual e colaboradores (2001), Schenkel, Gosmann e Athayde (2003) e Tan, Zhou e Zhao (1999).

#### 3.1 A espécie *Lippia alba*

##### 3.1.1 Classificação botânica

A espécie *L. alba* (Mill.) N. E. Br ex Britt & Wilson, pertencente à família Verbenaceae, ocorre principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais. Esta espécie é nativa das Américas, ocorrendo nas Antilhas, do México à América do Sul, e no Brasil, em todas as regiões (CORRÊA, 1992; GOMES *et al.*, 1993; GUPTA, 1995; TUCKER; MACIARELLO, 1999).

Existem várias sinonímias descritas para *Lippia alba*: *Lantana alba* Mill., *Lantana canescens* Hort., *Lantana geminata* (H.B.K.) Spreng., *Lantana geminata* Spreng., *Lantana lippoides* Hook. & Arn., *Lippia geminata* (H.B.K.) Spreng., *L. geminata microphylla* Griseb., *L. glabiflora* Kuntze, *L. lantanoides* Coult., *L. lavandulacea* Wild., *L. lippoides* Hook & Arn., *L. mollissima* Desf., *L. asperifolia* A. Rich., *L. citrata* Cham., *L. crenata* Sessé & Moc., *L. havannensis* Turcz., *L. panamensis* Turcz., *L. trifolia* Sessé & Moc., *Phyla geminata* H.B.K., *Verbena globiflora* L'Herz., *V. lippoides* Hook. & Arn., *V. odorata* (Pers.) Steud., *Zapania globiflora* (L'Her) Willd., *Z. lantanoides* Lam., *Z. odorata* Pers. e *Z. odoratissima* Scop. (GUPTA, 1995; PASCUAL *et al.*, 2001). Esta diversidade de sinonímias gera algumas confusões nos dados científicos publicados (SOARES, 2001).

*L. alba* é sujeita a variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas (CORRÊA, 1992; MATOS, 1996b). Porém estas variações não ocorrem, necessariamente, de modo simultâneo. Por exemplo, variações fitoquímicas podem ocorrer entre amostras de diferentes localidades, sem que haja mudanças morfológicas significativas que sugiram tratar-se de outra espécie ou variedade. A diversidade observada tem sido atribuída, em alguns casos, à variabilidade da espécie e em outros, à influência do clima e do solo sobre as plantas analisadas (MATOS, 1996b).

Como resultado de várias análises morfológicas e químicas, bem como de estudos circadianos e sazonais do óleo volátil das folhas de *L. alba*, foi descrita a existência de três quimiotipos para esta espécie, primeiramente por Matos (1996b) e confirmadas por Tavares e colaboradores (2005). São eles:

- quimiotipo I: caracterizado por teores significativamente elevados de mirceno e citral (neral e geranial);
- quimiotipo II: caracterizado por altos teores de limoneno e citral;
- quimiotipo III, caracterizado por um alto teor de limoneno e carvona, combinada com a ausência de citral.

### 3.1.2 Nomes populares

Os principais nomes populares de *L. alba* são erva cidreira e melissa, os quais não são exclusivos para esta espécie, pois também são atribuídos às espécies *Melissa officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, todas elas com aroma que lembra o limão (PIO CORRÊA, 1969; MENTZ; BORDIGNON, 2003). Além disso, esta espécie também é conhecida como: chá-de-tabuleiro, cidrila, erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem, cidreira-brava, falsa-melissa, erva-cidreira-brasileira, erva-cidreira-do-campo, cidreira-carmelitana, salva, salva-do-brasil, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-brava e sálvia (LORENZI; MATOS, 2002).

### 3.1.3 Descrição botânica

Trata-se uma planta perene, arbusto ou subarbusto, com até 2 m de altura, com um forte odor de limão, lima ou menta, densamente pubescente. As folhas são opostas ou alternadas, ovadas ou ovado-oblongas, de 2-7 cm de comprimento e de margens serradas. As inflorescências são axilares, solitárias ou raras vezes em pares. As flores geralmente aromatzadas, a corola é hipocrateriforme, de cor violácea, algumas vezes branca ou amarelada na superfície interna (GOMES *et al.*, 1993; GUPTA, 1995). O detalhe das partes aéreas de *L. alba* é apresentado na Figura 1.



Figura 1. *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. Fonte: Correa (2005).

### 3.1.4 Usos populares

A utilização da espécie *L. alba* na medicina popular é bastante ampla. Uma extensa lista de usos é encontrada na literatura. As partes da planta utilizadas são as folhas, as quais podem ser utilizadas de diversas maneiras: na forma de chá (CORRÊA, 1992; GUPTA, 1995) compressas, macerados (CORRÊA, 1992); extrato alcoólico (GUPTA, 1995); xarope (KLÜEGER *et al.*, 1996; KLÜEGER *et al.*, 1997); decocção (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e tintura (GOMES *et al.*, 1993). O uso mais freqüente é interno, via oral, sendo também citada a inalação ou na forma de banho (CORRÊA, 1992; KLÜEGER *et al.*, 1996).

*L. alba* é empregada no tratamento de problemas gastrointestinais (AGRA; BARBOSA FILHO, 1990; VALE *et al.*, 1999; PASCUAL *et al.*, 2001), contra gastrite e como carminativa (HEINRICH; RIMPLER; BARRERA, 1992). É utilizada ainda como analgésico, antipirético, antiinflamatório (VALE *et al.*, 1999), como espasmolítico, febrífugo, sudorífico, antisséptico, (GUPTA, 1995), em doenças respiratórias (CÁCERES *et al.*, 1991), destacando a sua ação sedativa (VALE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Externamente, esta espécie é utilizada para o tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, ferimentos e

úlceras (GIRÓN *et al.*, 1991). As raízes são usadas no Nordeste em afecções hepáticas e como aperitivo (CORRÊA, 1992).

### 3.1.5 Constituintes químicos

No que se refere aos constituintes químicos do óleo volátil, muitos estudos fitoquímicos já foram realizados e, no Brasil, já foram encontrados três quimiotipos desta espécie (MATOS, 1996b). Entretanto, no que se refere aos constituintes fixos, pouco se tem pesquisado, ficando as pesquisas principalmente no âmbito da triagem fitoquímica (PASCUAL *et al.*, 2001).

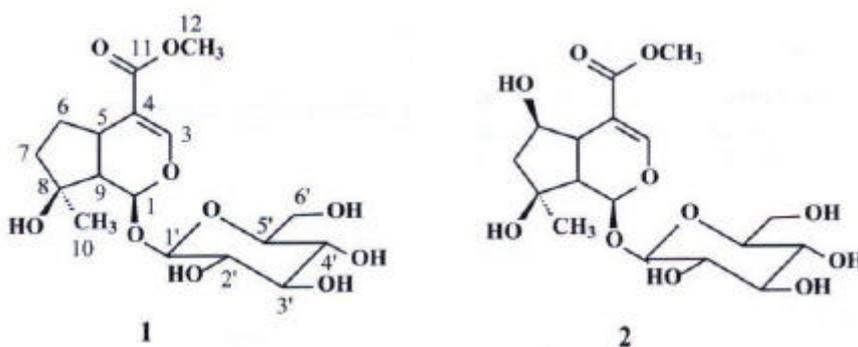
Extensas revisões sobre os constituintes químicos, tanto para a espécie *L. alba*, quanto para o gênero *Lippia* foram realizadas por Soares (2001) e por Pascual e colaboradores (2001). Na presente dissertação são apresentadas as estruturas de substâncias isoladas desde então (Figura 2).

Silveira e Pessoa (2005) e Barbosa, Lima e Silveira (2005) relataram compostos de diferentes classes metabólicas isolados e identificados das folhas de *L. alba*. São eles: dois heterosídeos iridoídicos, mussaenosídeo [1] e o éster metílico do shanzhisídeo [2]; três heterosídeos fenilpropanoídicos  $\beta$ -(3,4-diidroxifenil)etil-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(6'-*O*-cafeoil)-glicopiranosídeo (isoverbascosídeo) [3],  $\beta$ -(3,4-diidroxifenil)etil-*O*- $\alpha$ -D-apio- $\beta$ -D-(6'-*O*-cafeoil)-glicopiranosídeo [4] e  $\beta$ -(3,4-diidroxifenil)etil-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo [5]; duas novas biflavonas, 4',4,5,5''-tetrahidróxi-6,6'',3''-trimetóxi-[C<sub>7</sub>-O-C<sub>7</sub>'']-biflavona [6] e (5,5''-diidróxi-6,4',6'',3''',4'''-pentametóxi-[C<sub>7</sub>-O-C<sub>7</sub>'']-biflavona [7]; um sesquiterpeno 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diidróxi-4(15)-eudesmeno [8]; além de um monoterpeneo lactônico [9], duas  $\gamma$ -lactonas hidroxiladas [10 e 11], um derivado do ácido salicílico [12]; o salicilato de sódio [13], além da mistura de fitoesteróides sitosterol [14] e estigmasterol na forma glicosilada [15].

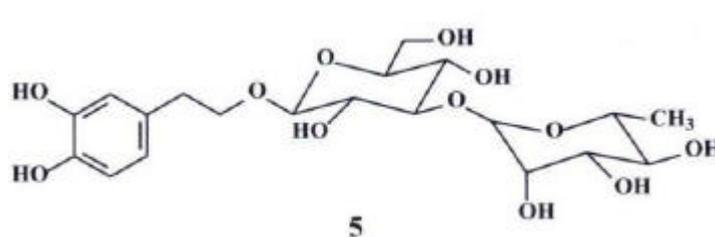
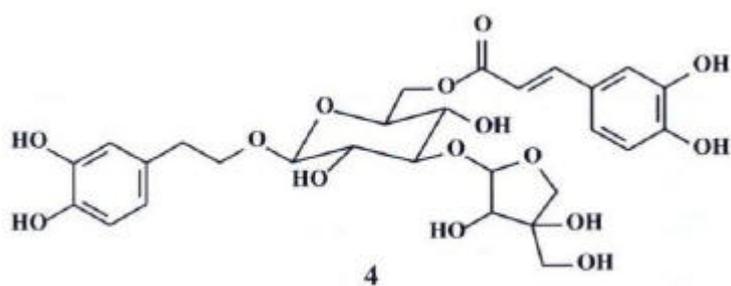
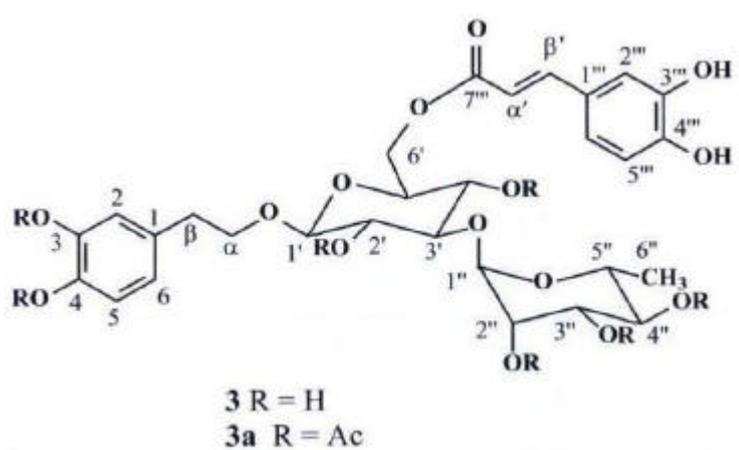
O mesmo grupo publicou outro trabalho relatando o isolamento e a elucidação estrutural de dois glicosídeos do núcleo feniletanoídico – isonuomiosídeo [16] e decafeoilverbascosídeo [17] - além de um iridóide, o éster metílico do shanzhisídeo, já relatado anteriormente (BARBOSA *et al.*, 2006).

Também há o relato do isolamento e elucidação estrutural de uma saponina bidesmosídica com aglicona do tipo olean-12-eno: ácido 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 23 triidroxiolean-12-en-28-óico [18], denominada de LA3 (CORREA, 2005), para a qual foram revistas, neste trabalho, as atribuições dos valores de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

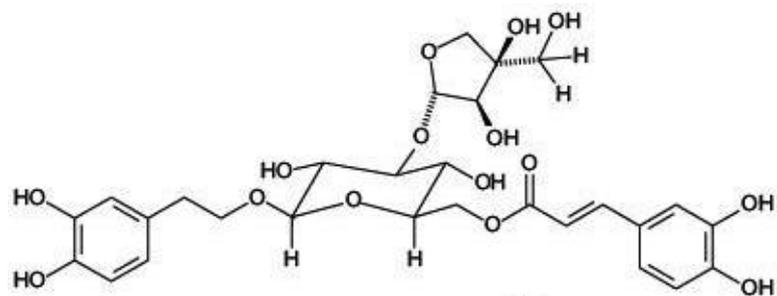
Heterosídeos iridoídicos



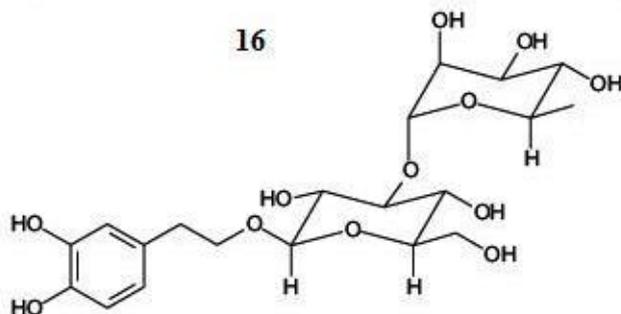
Heterosídeos fenilpropanóidicos



Heterosídeos feniletanoídeos

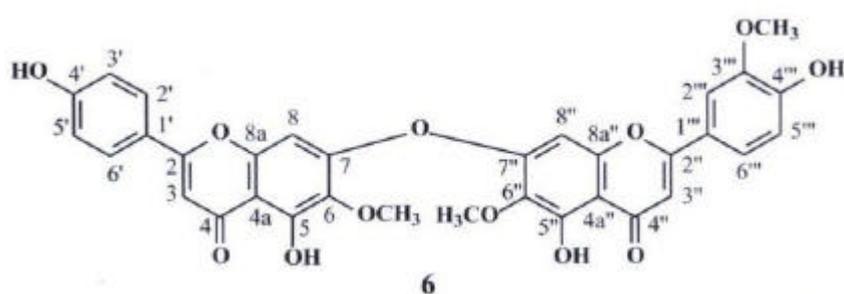


16

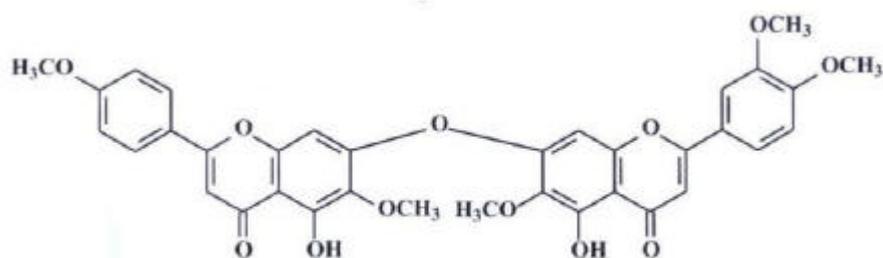


17

Biflavonas

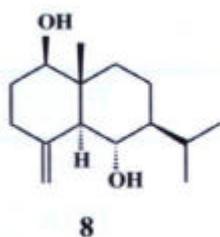


6



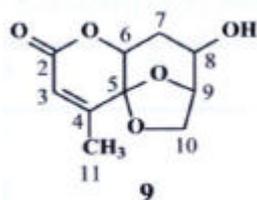
7

Sesquiterpeno



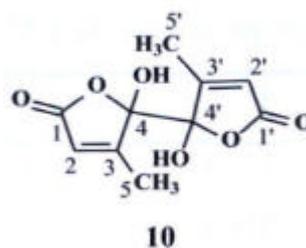
8

Monoterpeno

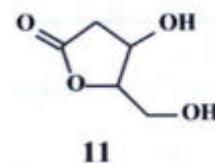


9

?-Lactonas



10



11

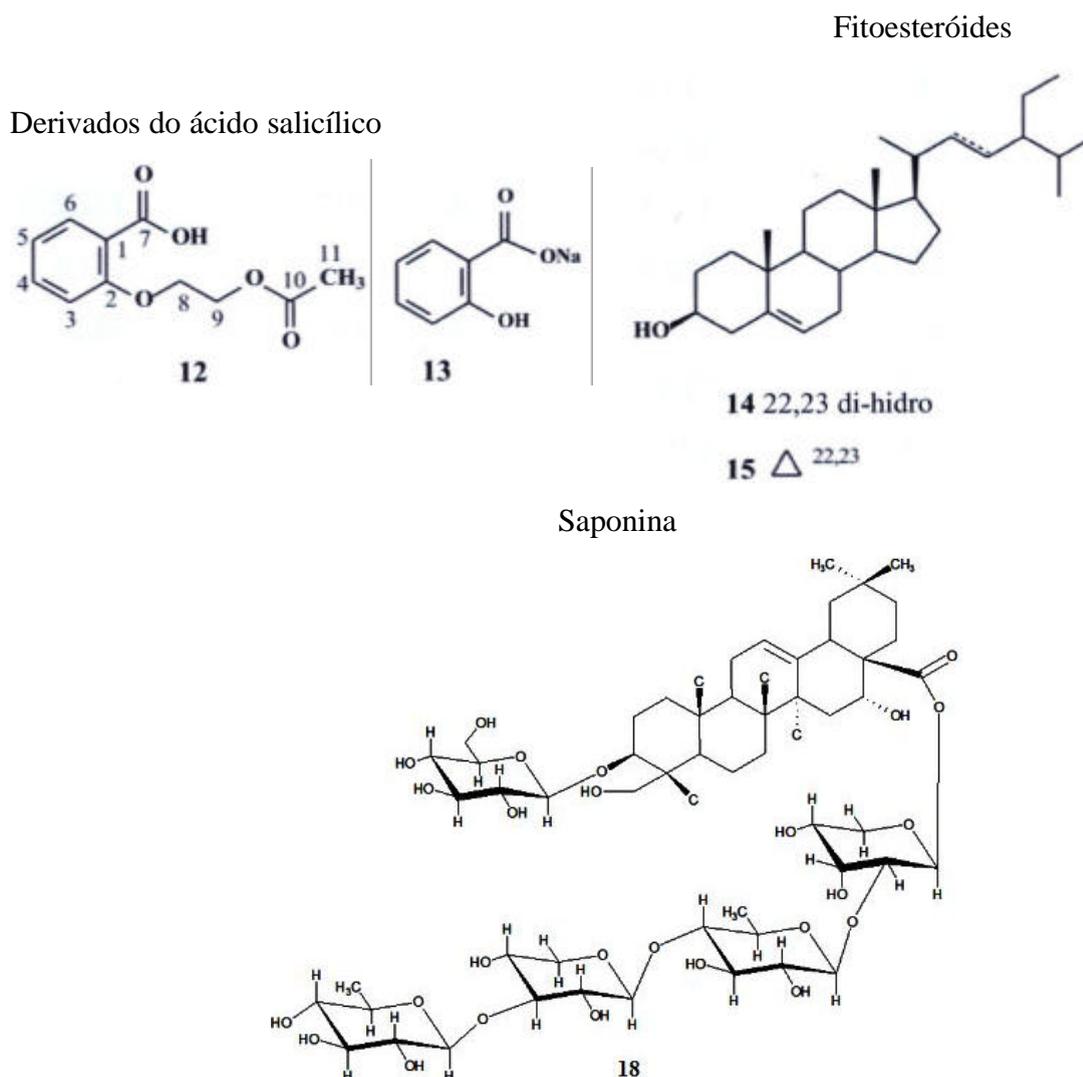


Figura 2. Estruturas de substâncias já isoladas em *L. alba*. Fonte: adaptado de Silveira e Pessoa (2005), Barbosa e col. (2006), Correa (2005).

### 3.1.6 Atividades farmacológicas

Poucos estudos farmacológicos foram realizados, não obstante o amplo uso popular (PASCUAL *et al.*, 2001). Cáceres e colaboradores (1991) demonstraram a atividade antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* para o extrato hidroetanólico a 88% das folhas no ensaio do halo de inibição. Já o óleo volátil apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *M. smegmatis*) e contra fungos (*S. cerevisiae*, *C. neoformans* e *A. flavus*) (LEMOS *et al.*, 1990). A fração n-BuOH de *L. alba* apresentou atividade antiviral contra os vírus HSV-1, cepa 29R/resistente a aciclovir e a fração AcOEt, atividade antipoliiovírus (ANDRIGHETTI-FROHNER *et al.*, 2005).

O extrato hidroetanólico a 80% apresentou atividade sedativa e miorelaxante em camundongos Swiss no teste do sono induzido por barbitúrico (ZÉTOLA *et al.*, 2002). Além disso, a fração n-BuOH de folhas de *L. alba* reduz a letalidade durante as convulsões experimentais induzidas por pentilenotetrazol e produz um efeito hipotérmico em camundongos (MARQUES DE CARVALHO, 2006). O verbascosídeo, constituinte majoritário da fração butanólica, reduziu a letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol, apresentou um efeito hipotérmico e sedativo em camundongos; também interagiu com o diazepam de forma sinérgica promovendo um efeito sedativo/miorelaxante em camundongos (MARQUES DE CARVALHO, 2006).

### 3.2 Saponinas com o núcleo oleanólico

A definição clássica de saponinas indica que são substâncias que geralmente apresentam propriedades detergente e emulsificante, formação de espuma estável, apresentam atividade hemolítica, um sabor amargo e são tóxicas para os peixes (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995, SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2003). Caracterizam-se quimicamente como compostos de alto peso molecular que apresentam uma porção lipofílica – denominada aglicona – e uma porção hidrofílica – formada pelos açúcares (LIU, 1995). As saponinas são metabólicos secundários freqüentemente encontrados em plantas e os dados indicam que estão presentes em cerca de 80 famílias e 231 gêneros (ZHOU, 1988 apud TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

A aglicona ou porção não glicosilada da molécula é chamada de genina ou sapogenina. Dependendo do tipo de genina presente na molécula, as saponinas podem ser divididas em triterpênicas e esteroidais, e estas, subdivididas em esteroidais neutras e básicas ou alcaloidais (compostos nitrogenados). As saponinas também são classificadas quanto às cadeias de açúcares ligadas na aglicona. Quando conjugadas a uma cadeia de açúcar, as saponinas são chamadas de monodesmosídicas e quando ligadas a duas cadeias, são denominadas saponinas bidesmosídicas, a maioria com ligação éter na hidroxila em C-3 e outra com ligação éster, geralmente em C-28 (saponinas triterpênicas) ou C-26 (saponinas derivadas do furostanol). Uma grande variedade de açúcares pode estar ligado à sapogenina, sendo que as ligações interglicosídicas podem ser  $\alpha$  ou  $\beta$  e os monossacarídeos podem ocorrer na forma de piranose ou furanose (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2003).

Tanto as saponinas triterpênicas quanto os esteroidais são biossintetizadas a partir de unidades de pirofosfato de isopentenila, dando origem ao óxido de esqualeno. A partir deste

ponto, a rota biossintética se divide para a formação das saponinas esteroidais e triterpênicas, como demonstrado na Figura 3.

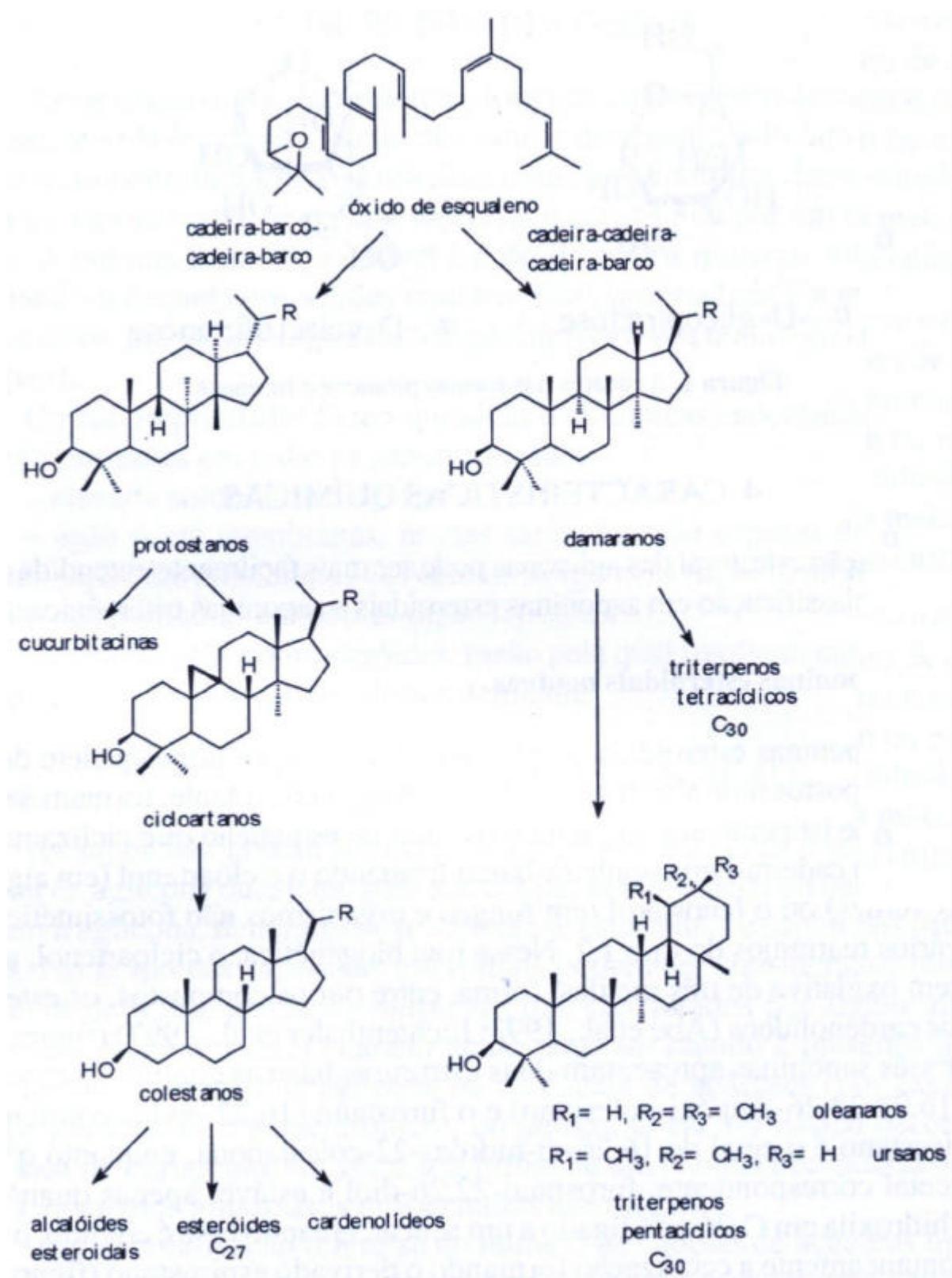


Figura 3. Biossíntese das saponinas triterpênicas e esteroidais. Fonte: Schenkel, Gosmann e Athayde (2003).

As saponinas triterpênicas, mais comumente encontradas na natureza e geralmente com 30 átomos de carbono, no processo de ciclização do óxido de esqualeno, adquirem uma conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco e, conforme o arranjo, vai dar origem aos triterpenos tetracíclicos ou pentacíclicos.

Por outro lado, nas saponinas esteroidais neutras, que apresentam geralmente 27 átomos de carbono, o óxido de esqualeno cicliza na conformação cadeira-barco-cadeira-barco, que após uma série de rearranjos do tipo 1,2, forma o cicloartenol (em algas e plantas verdes) ou o lanosterol (em fungos e organismos não fotossintéticos) (SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2003). O cicloartenol, após clivagem oxidativa de três metilas, vai dar origem aos esteróides e aos cardenólídeos (ABE *et al.*, 1993). A conformação espacial das saponinas esteroidais pode ser *cis* ou *trans* para fusão dos anéis A/B, mas é certamente *trans* para a fusão dos anéis B/C e C/D e *cis* para D/E.

As agliconas mais comumente encontradas para as saponinas triterpênicas pentacíclicas classificam-se conforme o esqueleto em:  $\beta$ -amirina (oleanano),  $\alpha$ -amirina (ursano) ou lupeol. O esqueleto do tipo  $\beta$ -amirina apresenta duas metilas no C-20, enquanto o esqueleto do tipo  $\alpha$ -amirina apresenta uma metila em C-20 e outra em C-19. A conformação das  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina é *trans* para os anéis A/B, B/C e C/D e *cis* para D/E. Por outro lado, as saponinas com o núcleo lupeol (lupano) apresentam a conformação *trans* entre os anéis D/E, e o anel E possui cinco carbonos e não seis como nas amirinas (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995, SCHENKEL; GOSMANN, ATHAYDE, 2003) (Figura 4).

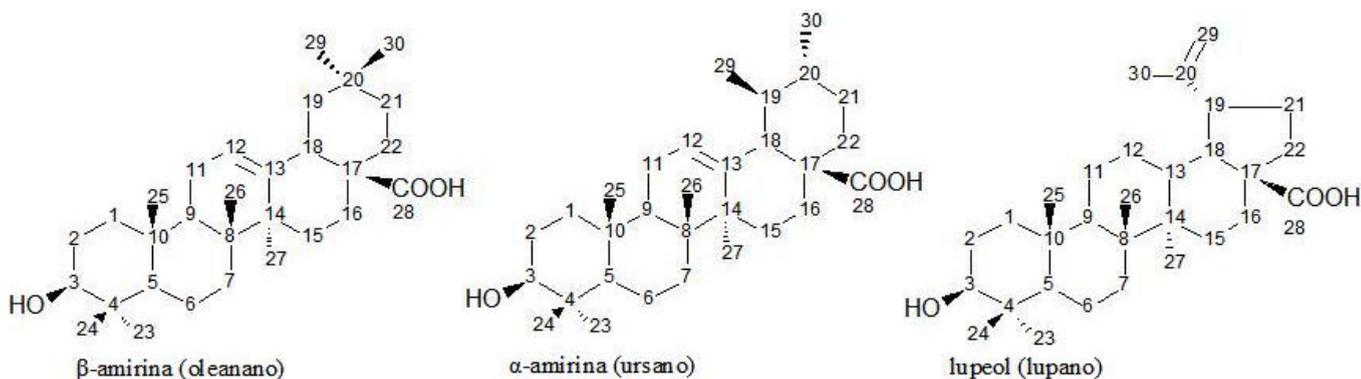


Figura 4. Estrutura dos esqueletos  $\beta$ -amirina (oleanano),  $\alpha$ -amirina (ursano) e lupeol.

As saponinas do tipo oleanano, derivadas do ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidróxi-olean-12-en-28-óico), têm como elementos principais: a insaturação no C-12 (13); a funcionalização do grupamento metila nos C-28, C-23 e/ou C-30 e poliidroxilação. As saponinas bidesmosídicas mais comumente encontradas para os derivados do ácido oleanólico são aquelas substituídas nas posições 3 e 28.

Até o ano de 1999, foram isoladas 192 saponinas 3,28-*O*-bidesmosídicas derivadas do ácido oleanólico originadas de 19 famílias botânicas, apresentando atividades farmacológicas das mais variadas. As famílias são: Amaranthaceae, Apiaceae, Aquifoliaceae, Araliaceae, Asteraceae, Basellaceae, Campanulaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Nyctaginaceae, Olacaceae, Portulacaceae, Rosaceae, Sabiaceae, Sapindaceae, Sapotaceae (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

De acordo com as substituições na aglicona, as saponinas podem ser caracterizadas em diversos grupos. No Quadro 1 são apresentadas as substituições mais comuns e o nome do grupo formado.

Quadro 1. Substituições comumente encontradas para agliconas do tipo olean-12-eno.

		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	Baiogenina	OH	H	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2	Ácido bredemólico	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
3	Ácido echinocístico	H	H	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
4	Ácido gipsogênico	H	H	H	H	H	COOH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
5	Gipsogenina	H	H	H	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
6	2β-OH Gipsogenina	OH	H	H	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
7	Hederagenina	H	H	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
8	Ilexapogenina A	H	H	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
9	Ácido machaerínico	H	H	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
10	Ácido medicagênico	OH	H	H	H	H	COOH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
11	Ácido oleanólico	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
12	Ácido 2β-OH oleanólico	OH	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

13	Ácido protobásico	OH	OH	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
14	Ácido 16a-OH protobásico	OH	OH	OH	H	H	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
15	Ácido quilaico	H	H	OH	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
16	Ácido siaresinólico	H	H	H	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
17	Ácido espatódico	H	H	H	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
18	Metil espergulagenato	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>
19	Ácido zanhico	OH	H	OH	H	H	COOH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Fonte: adaptado de Tan, Zhou e Zhao (1999).

A elucidação destes compostos inclui as seguintes etapas: a determinação estrutural da aglicona (1); a determinação da cadeia de açúcares em C-3 (2); a determinação da cadeia de açúcares em C-28 (3); determinação da localização dos grupos acila (4) (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

As estratégias de elucidação estrutural de saponinas foram variando com o passar do tempo. Nas décadas de 1960 e 1970, os métodos químicos foram muito utilizados; nos anos de 1980, paralelamente às metodologias químicas, foram empregadas metodologias espectroscópicas; e, por fim, a partir dos anos de 1990, a predominância das técnicas espectroscópicas como infravermelho (IV), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais, espectrometria de massas (EM) e outras trouxeram grande contribuição para a elucidação estrutural desses compostos (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes empregados para análise fitoquímica foram de procedências variadas: Nuclear®, Merck® e Reagen® de grau de pureza PA ou de grau UV/HPLC, este somente quando da realização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e para a obtenção dos espectros UV. A água utilizada foi destilada no laboratório. O etanol empregado nas macerações foi de origem comercial (92,8 INPM).

### 4.2 Coleta e preparação do material vegetal utilizado para o isolamento de substâncias

#### 4.2.1 Coleta

A matéria-prima vegetal utilizada foram as folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. provenientes de cultivo doméstico, coletada na Costa da Lagoa, no município de Florianópolis, SC, em 19 de abril de 2005, entre às 9:00 h e 13:00 h. Foram coletados ramos com folhas e flores. A amostra para exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina e encontra-se sob o código alfanumérico FLOR 31267.

#### 4.2.2 Secagem e moagem

A matéria-prima vegetal foi seca à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 7 dias. Depois de secas, as folhas foram separadas dos ramos e das flores. As folhas com indícios visuais de ataque por pragas foram descartadas. Em seguida, as folhas selecionadas foram moídas em moinho de facas e pesadas, perfazendo um total de 290 g de droga moída.

#### 4.2.3 Caracterização do material vegetal

Para a caracterização do material vegetal foram realizados os seguintes ensaios: determinação de perda por dessecação e do teor de óleo volátil, caracterização cromatográfica do quimiotipo de *L. alba*, determinação de cinzas totais e da granulometria da droga vegetal. Estes ensaios têm por objetivo fornecer informações pertinentes às condições do material vegetal utilizado quando comparado aos parâmetros preconizados pelos compêndios oficiais.

#### 4.2.3.1 *Determinação da perda por dessecação*

Em pesa-filtros previamente tarados, pesou-se exatamente 1,000 g da droga moída, colocou-se em estufa a 100-105 °C por 2 horas. Deixou-se esfriar em dessecador e pesou-se a seguir. Os pesa-filtros foram recolocados em estufa por mais 30 min, e este procedimento foi repetido até peso constante, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não excedesse 5 mg. O ensaio foi realizado em triplicata (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

#### 4.2.3.2 *Determinação do teor de óleo volátil*

Como não há monografia específica de *L. alba*, a metodologia utilizada foi adaptada a partir da monografia de *Melissa officinalis* da Deutsches Arzneibuch (DAB) 9 (1986). A monografia preconiza a utilização de 50 g para cada ensaio, entretanto, foram utilizados apenas 20 g por extração, em função do tamanho do balão utilizado (500 mL) e do volume de água utilizado.

O método empregado para a determinação do teor de óleo volátil foi a destilação por arraste de vapor d'água empregando o aparelho de Clevenger. Um balão de fundo redondo de 500 mL, com 250 mL de água e alguns fragmentos de porcelana porosa foi adaptado ao condensador. Ligou-se a manta e quando a água começou a evaporar, regulou-se o fluxo para 2 a 3 mL/min. Desligou-se o aquecimento, deixando esfriar a água por 10 min. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, introduziu-se cerca de 0,5 mL de xilol. Deixou-se estabilizar por mais 10 min e mediu-se o volume no tubo graduado do próprio aparelho. Adicionou-se 20 g de folhas frescas e rasuradas no balão de fundo redondo e retomou-se o aquecimento. A partir da ebulição da água, deixou-se destilando por 2 h. Em seguida, a manta de aquecimento foi desligada, deixando-se esfriar por 10 min. O volume do óleo volátil foi mensurado no tubo graduado. Subtraiu-se da leitura o volume de xilol determinado anteriormente. A diferença representa a quantidade de óleo volátil contida na amostra. O resultado foi expresso em mililitros de óleo volátil por 100 g de planta fresca. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.2.3.3 *Caracterização cromatográfica do quimiotipo de *Lippia alba**

Visando a caracterização dos constituintes majoritários do óleo volátil e, por conseguinte, caracterização do quimiotipo, realizou-se uma cromatografia em camada delgada, utilizando-se como marcador o citral. Aplicou-se o óleo volátil extraído da planta

fresca, além de óleos voláteis adquiridos comercialmente com composição majoritária de citronelal (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) WMF® e citral (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) WMF®.

A fase móvel empregada foi tolueno : acetato de etila (93:7). A placa foi revelada borrifando-se uma solução de vanilina etanólica a 1%, seguida da aspersão de uma solução de ácido sulfúrico etanólico a 10 %. Em seguida a placa foi aquecida e observada a luz visível.

#### **4.2.3.4 Determinação de cinzas totais**

Em cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados, pesou-se cerca de 3,0 g de folhas secas e moídas de *Lippia alba*. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadinho e levadas à mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente até uma temperatura de 600° C, por 2 h. Os cadinhos foram retirados da mufla, deixados para esfriar em dessecador e pesados, retornando à mufla, por mais 30 min. Este processo se repetiu até peso constante (BORGES, 2005).

#### **4.2.3.5 Determinação da granulometria da droga vegetal**

A granulometria da droga vegetal foi determinada pelo processo de tamisação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Colocou-se 100 g da droga vegetal sobre o tamis de malha 14 (abertura 1,40 mm), provido de tampa e recipiente para a coleta de pó. Agitou-se o tamis em movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais por 20 min. O pó remanescente no tamis foi pesado e a fração recolhida foi colocada noutro tamis. O processo foi repetido para os tamises de malha 25 (abertura 710 µm), malha 35 (abertura 500 µm), malha 80 (abertura 180 µm) e, por fim, foi pesado o pó remanescente (<180 µm).

Considerou-se para a análise granulométrica os parâmetros: classe granulométrica (CG, mm); diâmetro granulométrico médio ( $\overline{DG}$ , mm), fração retida (FR, %); fração retida acumulada (FRA, %); e fração de passagem (FP, %).

### **4.3 Preparação da solução extrativa**

A solução extrativa foi preparada pelo método de maceração, seguindo a proporção 1:20 (farmacógeno: líquido extrator), utilizando-se como líquido extrator álcool etílico comercial (92,8° INPM). A mistura foi deixada em maceração por 7 dias, ao abrigo da luz, sob agitação periódica. Então foi filtrada, o marco prensado e novamente filtrado, obtendo-se

parte de solução extrativa. O marco depois de submetido à remaceração com o mesmo líquido extrator e pelo mesmo período, foi filtrado. As soluções extrativas obtidas foram então reunidas.

#### 4.4 Fracionamento dos extratos

A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório até a completa eliminação do líquido extrator. Obtiveram-se 27,6 g de extrato bruto (EB), que foi ressuspense em 900 mL de água (com auxílio de ultrassom, por 25 min) e então submetido à partição com solventes de polaridade crescente: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH) previamente saturado com água. Foram realizadas 8 extrações sucessivas com 200 mL de diclorometano, 3 extrações com 200 mL de acetato de etila e 3 extrações com 200 mL de n-butanol. A fração n-BuOH foi concentrada em evaporador rotatório, calculando-se o rendimento em relação à planta seca (Figura 5).

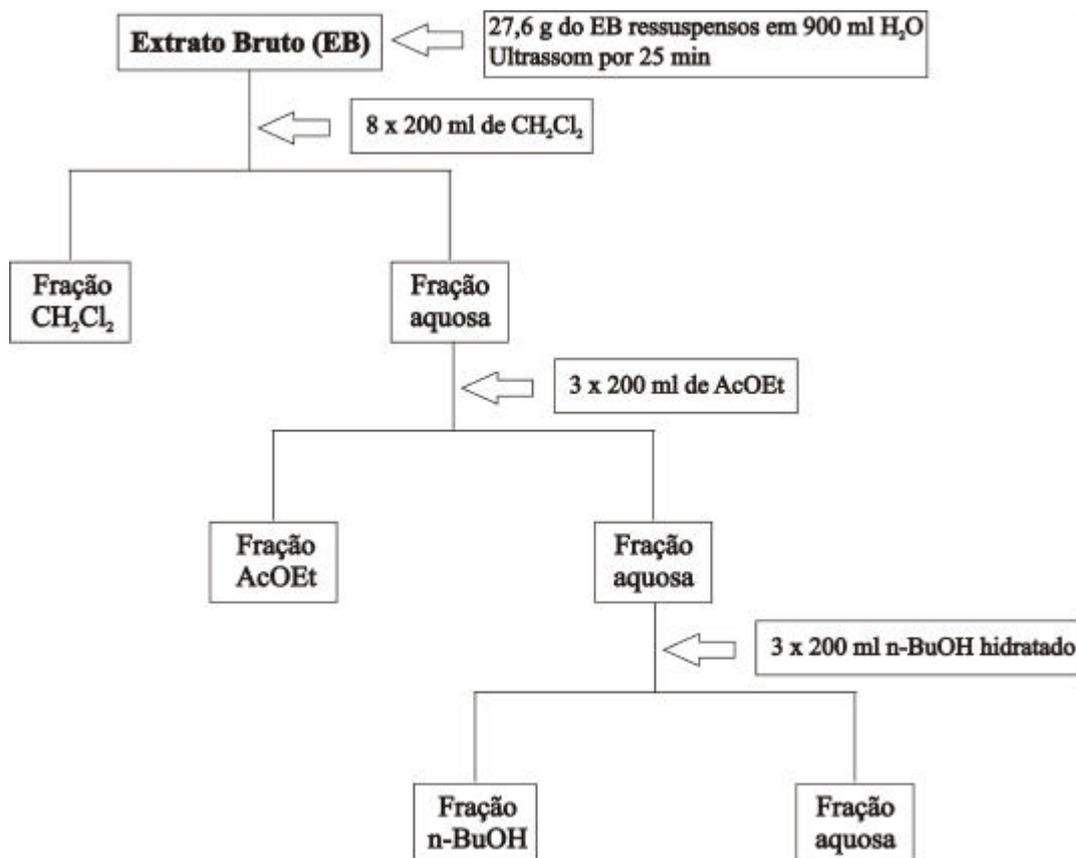


Figura 5. Esquema do fracionamento e obtenção da fração n-BuOH.

## 4.5 Isolamento e purificação dos constituintes da fração n-BuOH

A fração n-BuOH foi concentrada em evaporador rotatório a uma temperatura entre 40 – 45° C, até completa eliminação do solvente. Procedeu-se então a sua análise e fracionamento através de procedimentos cromatográficos.

Para o isolamento das substâncias da fração n-butanólica, partiu-se dos sistemas cromatográficos utilizados por Correa (2005) para esta mesma fração. Também foram utilizadas e testadas outras metodologias como: cromatografia em coluna com Sephadex® LH20, cromatografia flash com adsorvente Amberlite® XAD, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna preparativa ODS.

A Figura 6 apresenta de forma resumida o processo de isolamento e purificação das 07 substâncias obtidas a partir da fração n-BuOH.

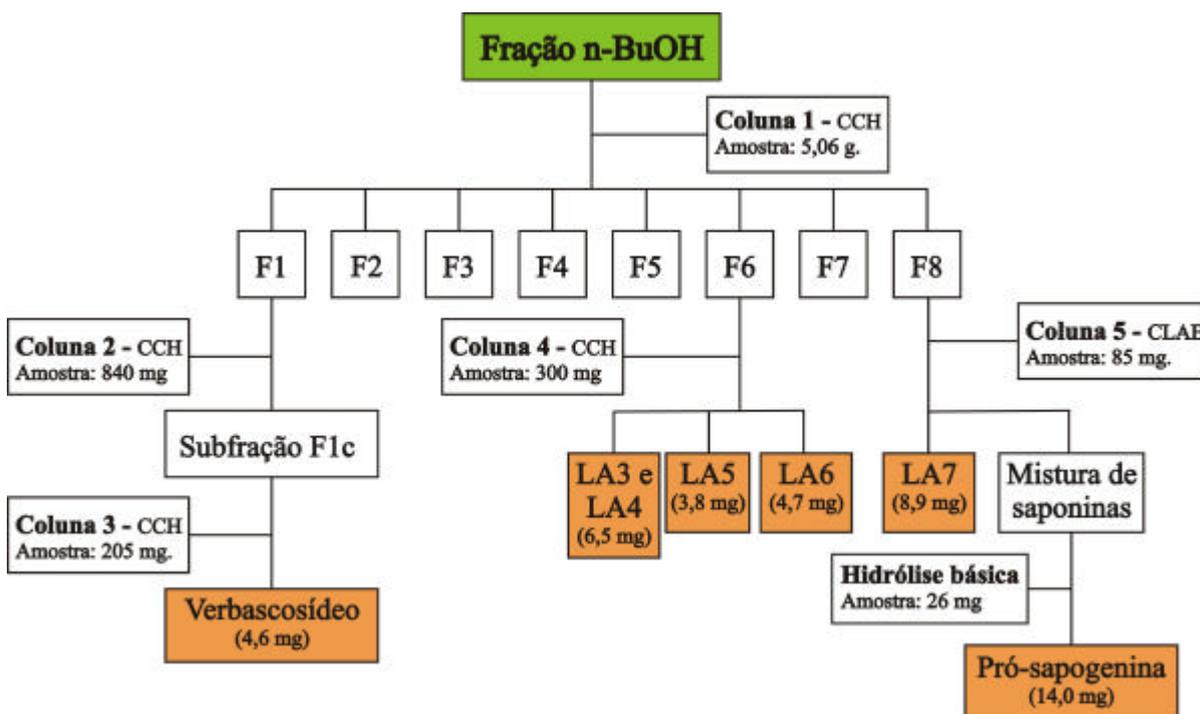


Figura 6. Representação esquemática do processo de isolamento e purificação de substâncias a partir da fração n-BuOH. CCH: Cromatografia em Coluna Hidrostática; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A fração n-BuOH foi submetida à separação em coluna hidrostática (coluna 1) nas seguintes condições:

- Amostra: 5,06 g da fração n-BuOH pulverizada;
- Coluna: hidrostática 70 x 5 cm;

- Sílica: 400 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,20 mm);
- Eluente: fase orgânica do sistema isocrático de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2, v/v).

Foram coletadas 119 subfrações, as quais foram monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo eluente da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 8 subfrações, conforme o Quadro 2. Em todas as CCD de frações obtidas nos procedimentos de isolamento, o reagente de detecção utilizado foi o mesmo descrito no item 4.2.3.3.

Quadro 2. Subfrações resultantes da coluna cromatográfica 1.

	Subfrações reunidas	Quantidade (g)	Substâncias caracterizadas
F1	C1 – 01 – 09	1,12 (seco)	Verbascosídeo
F2	C1 – 10 – 16	1,63 (seco)	Verbascosídeo e saponinas
F3	C1 – 17 – 28	0,94 (úmido)	Verbascosídeo e saponinas
F4	C1 – 29 – 37	0,60 (úmido)	Saponinas
F5	C1 – 38 – 48	0,53 (úmido)	Saponinas
F6	C1 – 49 – 58	0,30 (úmido)	Saponinas
F7	C1 – 59 – 79	0,34 (seco)	Saponinas
F8	C1 – 80 – 119	0,40 (úmido)	Saponinas

#### 4.5.1 Isolamento do verbascosídeo

##### 4.5.1.1 Coluna 2 – Purificação do verbascosídeo

A fração F1 foi submetida à cromatografia em coluna hidrostática nas condições abaixo descritas, possibilitando a purificação do verbascosídeo.

- Amostra: 840 mg fração F1 da coluna 1;
- Coluna: hidrostática 60 x 2 cm;
- Sílica: 90 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,20 mm);
- Eluente: fase orgânica do sistema isocrático AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O (10: 1: 2: 5, v/v);
- Fluxo: 1,3 mL/ min.

Foram coletadas 38 subfrações, as quais foram monitoradas através de CCD, utilizando-se o mesmo eluente da coluna. Reunindo-se subfrações semelhantes, a coluna resultou em 6 subfrações, conforme o Quadro 3.

Quadro 3. Frações reunidas da coluna 2.

	Subfrações reunidas	Quantidade (mg)	Substâncias caracterizadas
F1a	F1 – 01 – 08	-	-
F1b	F1 – 09 – 13	-	-
F1c	F1 – 14 – 25	513,4	Verbascosídeo e substâncias similares
F1d	F1 – 26 – 33	16,7	Verbascosídeo e substâncias similares
F1e	F1 – 34 – 38	9,0	-
F1f	F1-Lavagem MeOH	85,3	-

#### 4.5.1.2 Coluna 3 – Isolamento do verbascosídeo

A subfração F1c foi submetida à cromatografia em coluna hidrostática nas condições abaixo descritas, possibilitando o isolamento e a caracterização do verbascosídeo.

- Amostra: 205 mg da fração F1c;
- Coluna: hidrostática;
- Sílica: 45 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,20 mm);
- Eluente: gradiente da fase orgânica do sistema isocrático AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O, nas proporções 15: 1: 2: 5, v/v até a subfração 52, depois passou-se a proporção 13: 1: 2: 5, v/v até a subfração 73 e terminou-se a coluna na proporção 10: 1: 2: 5, v/v.
- Fluxo: ~ 1,8 mL/ min.

Foram coletadas 88 subfrações, as quais foram monitoradas através de CCD, utilizando-se os mesmos eluentes da coluna. Reunindo-se subfrações semelhantes, a coluna resultou em 5 subfrações, conforme o Quadro 4.

Quadro 4. Frações reunidas da coluna 2.

	Subfrações reunidas	Quantidade (mg)	Substâncias caracterizadas
C1	F1c – 01 – 12	-	Impurezas
C2	F1c – 13 – 18	-	Impurezas
C3	F1c – 20 – 32	97,7	Verbascosídeo e substâncias similares.
C4	F1c – 33 – 42	<b>4,6</b>	<b>Verbascosídeo</b>
C5	F1c – 43 – 88	-	Impurezas

## 4.5.2 Isolamento das substâncias LA3, LA4, LA5 e LA6

### 4.5.2.1 Coluna 4

A fração F6 foi submetida à separação em coluna hidrostática, possibilitando o isolamento das substâncias LA3, LA4, LA5 e LA6.

As condições empregadas foram as seguintes:

- Amostra: 300 mg fração F6 da coluna 1;
- Coluna: hidrostática;
- Sílica: 40 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,20 mm);
- Eluente: gradiente do sistema AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O em diferentes proporções: 6,5: 1: 2: 5 (v/v – fase orgânica) até a subfração 40 e 4,5:1:2:5 (v/v – fase orgânica) até o fim da eluição.

Foram coletadas 91 subfrações, as quais foram monitoradas através de CCD, utilizando-se os mesmos eluentes da coluna. Reunindo-se frações semelhantes, a coluna resultou em 12 subfrações, conforme o Quadro 5.

Quadro 5. Frações reunidas da coluna 4.

	Subfrações reunidas	Quantidade (mg)	Substâncias caracterizadas
F6a	F6 – 1 – 27	-	sem amostra.
F6b	F6 – 28 – 32	-	LA3 e LA4 impuras
<b>F6c</b>	<b>F6 – 33 – 38</b>	<b>6,5</b>	<b>LA3 e LA4</b>
F6d	F6 – 39 – 42	-	LA3 e LA4 impura
<b>F6e</b>	<b>F6 – 43 – 60</b>	<b>3,8</b>	<b>Substância pura (LA5)</b>
F6f	F6 – 61 – 64	13,0 mg	LA5 impura
F6g	F6 – 65 – 71	24,2 mg	LA6 impura
<b>F6h</b>	<b>F6 – 72 – 76</b>	<b>4,7 mg</b>	<b>Substância pura (LA6)</b>
F6i	F6 – 77 – 81	7,8 mg	LA6 impura
F6j	F6 – 82 – 85	10,7 mg	LA6 impura
F6k	F6 – 86 – 90	5,2 mg	LA6 impura
F6l	F6 – 91	3,7 mg	LA6 impura

#### 4.5.2.2 Hidrólise ácida da fração F6f

Toda a fração F6f foi submetida à hidrólise ácida. Adicionou-se à amostra 50 mL de HCl 10% e submeteu-se ao refluxo por 1h 30min. A amostra foi levada à secura em evaporador rotatório e analisada por cromatografia em camada delgada. A CCD foi realizada em gel de sílica 60 F254, em eluente composto por AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O (10: 1: 2: 5 v/v – fase orgânica) e detecção em vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

### 4.5.3 Isolamento da pró-sapogenina e de LA7

#### 4.5.3.1 Coluna 5

A fração F8 foi submetida à CLAE, possibilitando o isolamento da substância LA7. As impurezas foram reunidas e submetidas à hidrólise básica, possibilitando a obtenção da pró-sapogenina. As condições empregadas na CLAE foram:

- Amostra: 85 mg da fração F8 da coluna 1, solubilizada em 1,2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (2:10);
- Fase fixa: coluna preparativa ODS (Shimadzu®);
- Fase móvel: acetonitrila: água (40: 60, v/v). Deaeração: sob vácuo e ultrassom por 15 min;
- Fluxo: 5 mL/ min;
- Detector: UV em 210 nm.

As principais frações são apresentadas no Quadro 6.

Quadro 6. Frações reunidas da coluna 5.

	Tempo de Retenção (T <sub>R</sub> )	Quantidade (mg)	Análise
<b>F8a</b>	<b>12,7'</b>	<b>8,9</b>	<b>Substância pura (LA7)</b>
F8b	19'	0,8	Quantidade insuficiente para análise.
F8c	20'	1,6	Quantidade insuficiente para análise.
F8d	20,5'	0,9	Quantidade insuficiente para análise.
F8e	27,5'	1,0	Amostra impura.
F8f	29,6'	1,7	Amostra impura.
F8g	Junção dos demais picos	26,0	Mistura de saponinas.

A fração F8a, denominada de LA7, foi enviada para análise espectroscópica e os resultados estão sendo esperados.

#### 4.5.3.2 Obtenção da pró-sapogenina através da hidrólise básica

A reunião dos picos impuros ou em pouca quantidade obtidas a partir das frações da CLAE da fração F8 originou a fração F8g, a qual foi submetida à hidrólise básica. Acrescentou-se à amostra 50 mL de NaOH 1 N e deixou-se a solução em repouso por 16 h. Ajustou-se o pH da solução para 5 com HCl 10%. Realizou-se uma partição líquido – líquido três vezes com 40 mL de AcOEt. A fase orgânica foi concentrada, originando a pró-sapogenina (14 mg).

#### 4.6 Caracterização e elucidação das substâncias isoladas

O verbascosídeo foi caracterizado por comparação cromatográfica com amostra autêntica identificada por Correa (2005) e por análise de UV.

As substâncias LA3 e LA4 também foram comparadas com as substâncias isoladas por Correa (2005). Vale ressaltar que em CCD, estas substâncias aparecem somente como uma mancha, entretanto, quando submetidas à CLAE, dois picos foram observados.

Realizou-se a elucidação estrutural da substância LA4 com base em espectroscopia de RMN mono e bidimensional. A elucidação estrutural da LA3 já fora realizada por Correa (2005). Entretanto, verificaram-se algumas inconsistências, assim, as atribuições foram revistas e corrigidas.

As substâncias LA5, LA6 e LA7 foram encaminhadas para a realização dos espectros.

As análises espectroscópicas no ultravioleta (UV) foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da UFSC, em aparelho Perkin Elmer – Lambda 10. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em equipamentos de 400 e 500 MHz em parceria com o Prof. Jorge Palermo da Universidade de Buenos Aires (UBA). Já os espectros de massas foram realizados pelo Professor Dr. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os espectros de massa foram obtidos em aparelho UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA, pelo método de ionização por electrospray em modo positivo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do material vegetal de *L. alba* utilizado para isolamento de substâncias

#### 5.1.1 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação permite uma correlação com o teor de umidade do material vegetal, que pode interferir tanto na conservação do material quanto na sua extração. Um alto teor de umidade em matérias-primas vegetais acelera o processo de deterioração da mesma, degradando seus constituintes químicos e possibilitando a proliferação microbiana (FARIAS, 2003). Os teores de umidade preconizados pelas farmacopéias estão na faixa de 8 a 14 % para as diferentes espécies de drogas vegetais.

O material vegetal utilizado apresentou  $10,2 \pm 0,3\%$  de perda por dessecação, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Perda por dessecação das folhas secas e moídas de *L. alba* após 7 dias

Verificação	Perda por dessecação (%)
1	10,5
2	10,1
3	10,0
$\bar{x} + s$ (CV)	$10,2 \pm 0,3$ % (2,94%)

Soares (2001) apresentou, para um tempo de secagem ao ar livre de 5 dias, um teor de perda por dessecação de  $11,02 \pm 0,31$  %, semelhante ao teor de  $11,01 \pm 0,007$ , encontrado por Correa (2005) para o mesmo tempo de secagem. Desta forma, pode-se considerar que um prazo de 5 dias de secagem é o suficiente para atingir um teor de umidade considerado ideal pelas farmacopéias, que é entre 8 e 14%. Entretanto, quando a secagem perdurou por 7 dias, a matéria-prima vegetal apresentou um teor ainda menor de umidade, de  $10,2 \pm 0,3$  %.

#### 5.1.2 Determinação do teor de óleo volátil

A determinação do teor de óleo volátil é um dos parâmetros quantitativos de avaliação da qualidade de matéria-primas vegetais preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2000).

O processo utilizado para a determinação do óleo volátil foi a destilação por arraste de vapor d'água (aparelho de Clevenger), que se fundamenta na tensão de vapor mais elevada do óleo em relação à água.

O teor de óleo volátil encontrado em folhas frescas de *L. alba* foi de 0,15 mL para 20 g, equivalendo a 0,75%  $\pm$  0,00 (v/m) de óleo volátil e os resultados são apresentados na Tabela 2. Este rendimento encontra-se dentro da faixa dos valores já relatados na literatura para a espécie *L. alba*, os quais variam de 0,24 a 1,58% (SOARES, 2001).

Tabela 2. Teor de óleo volátil de folhas frescas de *L. alba*.

Amostras	Xilol (mL)	Xillol + O.V. (mL)	Óleo volátil (mL)	Teor na planta fresca (mL/100 g)
1	0,52	0,67	0,15	0,75%
2	0,53	0,68	0,15	0,75%
3	0,50	0,65	0,15	0,75%
TOTAL ( $\bar{x}$ )			0,15	0,75%

Soares (2001) relatou um teor de óleo volátil de 0,33%  $\pm$  0,05 (v/m) (CV=13,90%; n = 3) para uma coleta de *L. alba* realizada no mesmo local, Costa da Lagoa, Florianópolis, no período matutino, no mês de maio de 2000. Segundo a literatura, o período de maior teor de óleo volátil ocorre fora do período de floração, que, em estudo realizado em Caxias do Sul – RS, é de dezembro a março, período em que a espécie encontra-se em fase de crescimento vegetativo (TAVARES *et al.*, 2005). O teor de óleo volátil sofre influências do clima, solo, época do ano, presença de parasitas, etc.

### 5.1.3 Caracterização cromatográfica do quimiotipo de *Lippia alba* estudada

A caracterização cromatográfica do quimiotipo é indispensável para a espécie *L. alba*. Segundo Matos (1996a), há 3 quimiotipos: um caracterizado por teores significativos de citral (neral + geranial) (quimiotipo I), outro com alto teor de limoneno (quimiotipo II), e o último caracterizado por um alto teor de carvona (quimiotipo III).

A Figura 7 apresenta a comparação do óleo volátil de *L. alba* com os óleos voláteis adquiridos comercialmente de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, conhecido popularmente como citronela, o qual apresenta como componente majoritário o citronelal ( $R_f \sim 0,7$ ) e o óleo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, de nome popular erva-cidreira ou capim-limão, o qual tem como composto predominante o citral ( $R_f \sim 0,5$ ). O revelador vanilina-ácido sulfúrico é ideal para a detecção dos componentes do óleo volátil (terpenóides e fenilpropanóides).

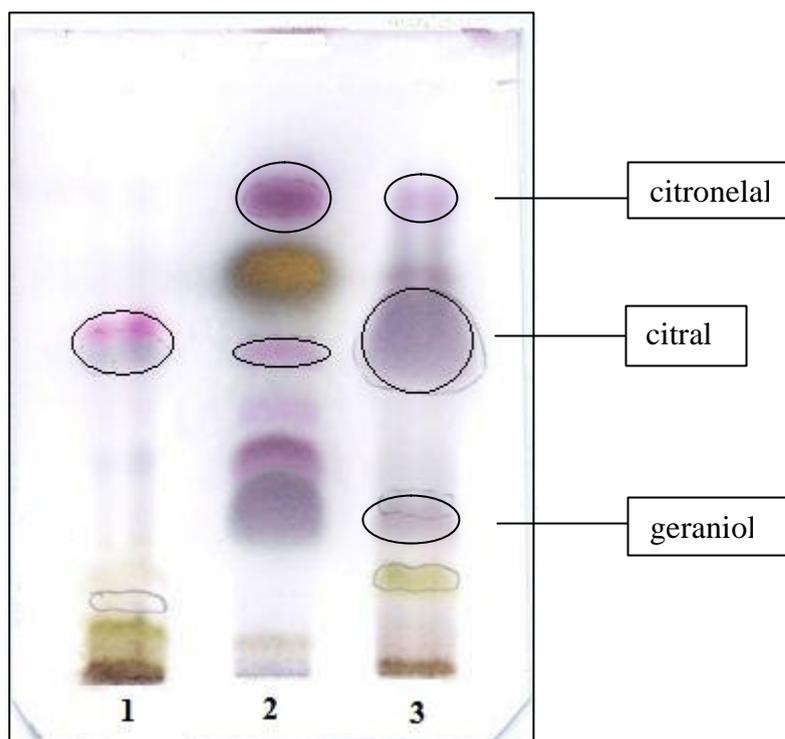


Figura 7. Comparação cromatográfica entre os óleos voláteis de *L. alba*, *C. nardus* e *C. citratus*.

Eluente: tolueno : acetato de etila (93:7).

Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®).

Deteção: vanilina sulfúrica seguida de aquecimento / visível.

Amostras: 1- óleo volátil de *L. alba*.

2 – óleo volátil de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.

3 – óleo volátil de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.

A CCD indica que o óleo volátil de *Lippia alba* apresenta como mancha bastante intensa o citral ( $R_f \sim 0,5$ ). Não foram encontradas manchas características para a carvona (substância de maior  $R_f$  que o citral e menor que o citronelal, com coloração vermelha-violácea). Faltam dados e padrões para a caracterização do quimiotipo de *L. alba*.

#### 5.1.4 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes (WHO, 1998). Através do método de cinzas totais, quantifica-se o total de material inorgânico residual após a incineração. Isto inclui as “cinzas fisiológicas”, derivadas do próprio tecido vegetal da planta, e as “cinzas não

fisiológicas”, resíduo de materiais estranhos, como, por exemplo, areia e terra aderidos à superfície da planta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

O teor de cinzas totais obtido para as folhas secas de *L. alba* foi de  $11,4\% \pm 0,1$  (CV = 0,9%, m/m). O valor encontrado para cinzas totais está dentro do limite de no máximo 12% estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (1996).

### 5.1.5 Determinação da granulometria da droga vegetal

A determinação da granulometria da droga vegetal permite a relação com um parâmetro da eficiência da extração. Partículas muito finas impedem a absorção do líquido extrator e diminuem a eficiência da extração. Já partículas de alta granulometria não apresentam grande superfície de contato, também diminuindo a eficiência.

A Tabela 3 apresenta a distribuição granulométrica das folhas de *L. alba*, secas ao ar livre e cominuídas em moinho de facas.

Análise granulométrica por tamisação das folhas cominuídas de *L. alba*.

CG (mm)	$\overline{DG}$ (mm)	FR (%)	FRA (%)	FP (%)
>1,40	-	65,8	65,8	34,2
1,40 † 0,71	0,42	19,3	85,1	14,9
0,71 † 0,50	0,60	3,2	88,3	11,7
0,50 † 0,18	0,34	8,4	96,7	3,3
< 0,18 (coletor)	0,09	3,3	100	0

Na cominuição realizada por Soares (2001) por meio de um aparelho liquidificador, percebeu-se que a maior quantidade de fração retida (FR), 54,91%, foi encontrada para a classe granulométrica (CG) 2,00 mm até 0,84 mm. Se for considerada a porcentagem da fração retida acumulada (FRA) de partículas de tamanho superior a 0,84 mm, chega-se a um total de 68,42%, um valor próximo à FRA para partículas maiores que 0,71 mm, que é de 85,1%.

Estas características granulométricas possuem significado tecnológico limitado, e servem como parâmetro de caracterização da matéria-prima vegetal estudada, a qual pode ter influenciado o rendimento da extração.

## **5.2 Determinação do rendimento da extração e do fracionamento da fração n-BuOH das folhas secas de *L. alba***

Partindo-se de uma quantidade conhecida de droga vegetal (290 g), utilizada no processo de maceração/ remaceração, foi possível calcular o rendimento do extrato bruto concentrado. Foram obtidos 27,6 g deste extrato, ou seja, 9,5 % de rendimento em relação à quantidade de droga moída. Em seguida, o extrato bruto foi ressuspenso em 900 mL de água e submetido à partição, conforme a Figura 5 (item 4.4). Concentrando-se a fração n-BuOH até a secura, foram obtidos 5,06 g desta fração, representando 1,7 % de rendimento em relação à droga moída.

Os valores de rendimentos são semelhantes aos valores encontrados na literatura para a mesma matéria-prima vegetal e nas mesmas condições de extração. Correa (2005) obteve um rendimento de 10,6 % de extrato bruto concentrado em relação à quantidade de droga moída e um rendimento 1,4 % da fração n-BuOH em relação à droga moída.

## **5.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração n-BuOH de *L. alba***

A fração n-BuOH foi escolhida para o estudo devido à atividade biológica encontrada para esta fração, como atividade anticonvulsivante (no modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol) (SOARES, 2001) e alterações na atividade locomotora no modelo de campo aberto (KLÜEGER *et al.*, 1997), além da perspectiva de isolamento e elucidção estrutural de novas saponinas (CORREA, 2005).

A separação em coluna cromatográfica da fração n-butanólica propiciou a obtenção de 8 subfrações, as quais foram denominadas de F1 a F8, que posteriormente foram submetidas a novos processos de separação para o isolamento de substâncias.

A Figura 8 apresenta a análise cromatográfica em camada delgada da fração n-butanólica e subfrações, bem como a comparação com o padrão da saponina LA3 e a fração n-BuOH utilizada por Correa (2005).

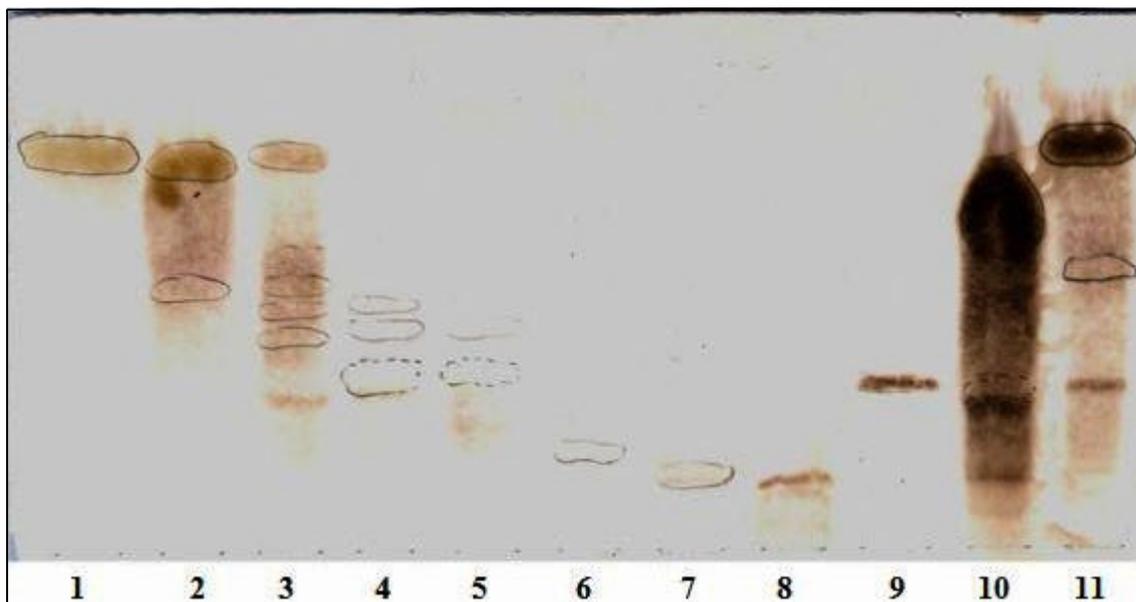


Figura 8. Comparação cromatográfica das subfrações oriundas da coluna 1 com a saponina LA3 isolada por Correa (2005) e as frações n-BuOH obtidas das folhas secas de *L. alba*.

Eluente: fase orgânica do sistema AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O/ ác. acético (7: 1: 2: 5: 0,2, v/v).

Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®).

Deteção: vanilina sulfúrica seguida de aquecimento / visível.

Amostras: 1- Subfração 1 (F1).  
2 - Subfração 2 (F2).  
3 - Subfração 3 (F3).  
4 - Subfração 4 (F4).  
5 - Subfração 5 (F5).  
6 - Subfração 6 (F6).  
7 - Subfração 7 (F7).  
8 - Subfração 8 (F8).  
9 - Saponina LA3 (CORREA, 2005).  
10 - Fração n-BuOH utilizada por Correa (2005).  
11 - Fração n-BuOH.

### 5.3.1 Isolamento e caracterização do verbascosídeo

A subfração F1 da coluna 1 foi escolhida para o isolamento do verbascosídeo em função da quantidade de amostra disponível (1,12 g). A separação em coluna desta fração propiciou a obtenção de 6 subfrações, as quais foram denominadas de F1a a F1f. A subfração majoritária da coluna 2, a F1c (513,4 mg), foi submetida a uma nova coluna e propiciou o isolamento do verbascosídeo (4,6 mg). Este foi caracterizado por cromatografia em camada delgada comparando com a substância de referência isolada e identificada por Correa (2005) e por meio de espectrofotometria de ultravioleta. (Figuras 9 e 10).

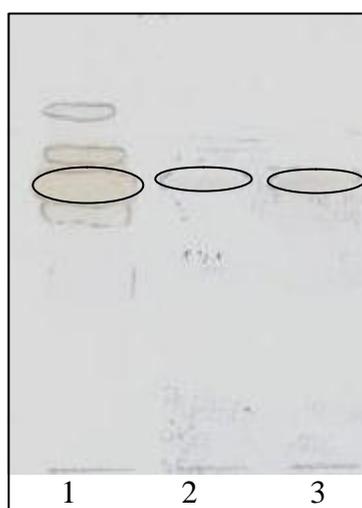


Figura 9. Comparação cromatográfica das subfrações oriundas da coluna 3 com o verbascosídeo e a fração n-BuOH obtidos das folhas secas de *L. alba*.

Eluente: fase orgânica do sistema isocrático de AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O (10: 1: 2: 5 v/v).

Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®).

Deteção: vanilina sulfúrica seguida de aquecimento / visível.

Amostras: 1- Fração n-BuOH.

2 – Verbascosídeo identificado por Correa (2005).

3 – Verbascosídeo isolado (4,6 mg).

As principais bandas de absorção no espectro de ultravioleta (Figura 10), utilizando-se como solvente MeOH, são: banda II, aproximadamente 220 nm; banda IIa, aproximadamente 245 nm; banda I, 291 nm e banda Ia, 332 nm, que indicam se tratar do verbascosídeo, quando comparados com os dados apresentados por Correa (2005).

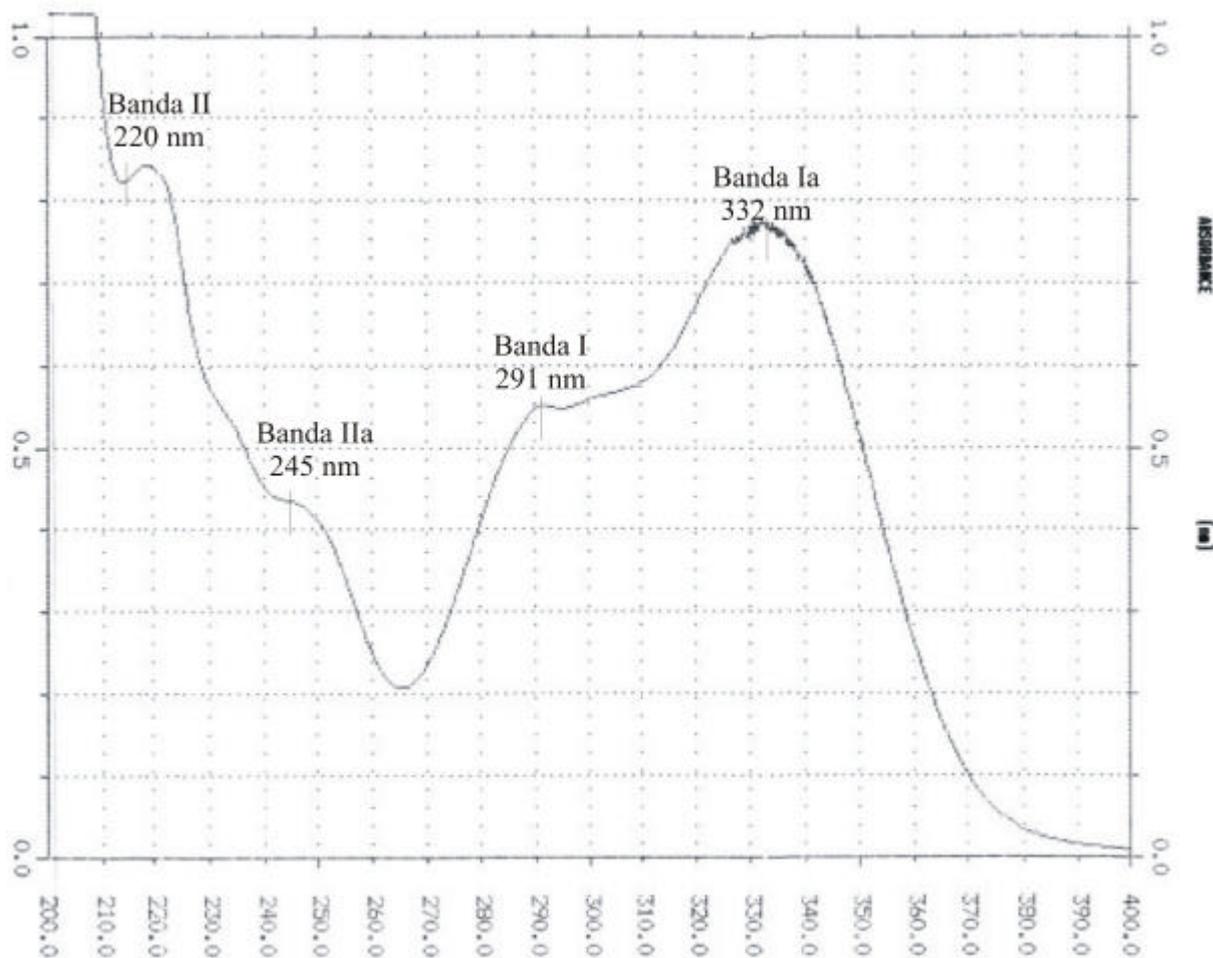


Figura 10. Espectro de UV do verbascosídeo em solução de MeOH.

Um dado interessante de se ressaltar é que foi possível observar em CCD substâncias semelhantes ao verbascosídeo, diferentemente da amostra trabalhada por Correa (2005). Supõe-se ser o isoverbascosídeo ( $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)etil-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(6'-*O*-cafeoil)-glicopiranosídeo) e outros derivados do ácido caféico, já que estes compostos já foram isolados e identificados para a espécie *L. alba* (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

### 5.3.2 Isolamento e elucidação estrutural da pró-sapogenina

A pró-sapogenina foi obtida a partir da hidrólise alcalina da fração F8g composta pela mistura de saponinas, conforme descrito no item 4.5.4.2. Apesar da mistura de saponinas apresentar diferentes manchas em CCD, depois da hidrólise alcalina, foi obtida uma única pró-sapogenina em CCD. A pró-sapogenina apresenta-se em CCD (AcOEt: MeOH: isoprOH: H<sub>2</sub>O 9: 1: 2: 5 – fase orgânica) como uma mancha com extinção de fluorescência, quando

visualizada sob luz UV em 254 nm que adquire coloração marrom após a revelação com vanilina sulfúrica em Rf ~ 0,7. Não foi observada fluorescência sob luz UV 365 nm.

Toda a amostra (14 mg) foi utilizada para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN). A identificação e elucidação estrutural da pró-sapogenina foi realizada após a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e pelos experimentos de DEPT 135, HSQC, HMBC e ROESY.

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  possibilitaram determinar o número de carbonos e seus deslocamentos químicos. A determinação de carbonos primários, secundários, terciários e quaternários se deu pelo DEPT 135. Os espectros de HSQC permitiram o estabelecimento da correlação dos carbonos com seus respectivos hidrogênios. Os hidrogênios vizinhos foram determinados a partir da análise dos experimentos COSY (H-H). Pelos experimentos de correlação foram observadas as conectividades entre os hidrogênios e carbonos a longa distância (HMBC) e a proximidade espacial entre hidrogênios (ROESY).

Nas Figuras 12, 13 e 14 podem ser observados os espectros totalmente desacoplados de RMN  $^{13}\text{C}$  da pró-sapogenina. Nos experimentos de DEPT (Figura 15) com polarização a  $135^\circ$ , os sinais correspondentes às metilas ( $-\text{CH}_3$ ) aparecem na região de blindagem e voltados para cima, os sinais de carbono terciários ( $-\text{CH}<$ ) também aparecem em campo voltados para cima, mas na região de desblindagem, os sinais de carbonos secundários ( $-\text{CH}_2-$ ) estão voltados para baixo e os sinais dos carbonos quaternários (Cq) não aparecem, sendo que os Cq foram determinados por comparação com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado mostra a existência de 36 átomos de carbono para a estrutura da pró-sapogenina, os quais puderam ser caracterizados pelo experimento de DEPT 135 e o próprio espectro de  $^{13}\text{C}$  conforme descrito no Quadro 7.

Quadro 7. Caracterização dos carbonos da pró-sapogenina a partir do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado.

Carbono	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	CH	Cq
S = 36	6	11	11	8

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresenta em  $\delta$  181,28 um sinal característico de carbonila de ácido carboxílico livre, visto que a glicosilação do C-28 tem um deslocamento de 2,9-4,3 ppm para a região de blindagem, como por exemplo, valores de  $\delta$  179,9-181,0 para 175,6-177,6 (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999). Os sinais em  $\delta$  123,43 e  $\delta$  145,20 são característicos da

presença de uma dupla ligação trissubstituída. Além disso, o sinal em  $\delta$  105,76, indica a presença de um açúcar, sendo este sinal atribuído ao carbono anomérico (Figura 12).

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e dos experimentos de DEPT sugere tratar-se de um triterpeno pentacíclico glicosilado, com uma ligação dupla e um grupamento ácido carboxílico, sendo 3 carbonos de aglicona ligados diretamente a oxigênio, o que indica a presença de 2 grupos hidroxila.

O espectro de  $^1\text{H}$  apresenta um triplete em  $\delta$  5,29, típico de H-12, confirmado pelos sinais em  $\delta$  123,43, correspondente ao C-12 e em  $\delta$  145,20, correspondente ao C-13, ambos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12 e 16). Estes valores de deslocamento neste tipo de estrutura caracterizam a presença de um esqueleto do tipo olean-12-eno (COREA *et al.*, 2004).

O sinal em  $\delta$  4,45 no espectro de  $^1\text{H}$  correlacionado aos sinais em  $\delta$  1,35 e  $\delta$  1,85, no espectro COSY, é característico da presença de uma hidroxila em C-16. O sinal em  $\delta$  75,33 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , correlacionado através do HSQC é atribuído ao C-16, conforme as Figura 20 (COREA *et al.*, 2004).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 17) mostrou a existência de seis sinais simples correspondentes às metilas ( $\delta$  0,70;  $\delta$  0,79;  $\delta$  0,87;  $\delta$  0,96;  $\delta$  0,98;  $\delta$  1,38) todos atribuídos à aglicona.

O sinal em  $\delta$  3,63 correlacionado ao sinal em  $\delta$  83,51 no experimento de HSQC, indica a presença de uma hidroxila substituída em C-3 (OH-C3). A glicosilação neste carbono causa um deslocamento para região de blindagem de um ordem de 8,8-12,8 ppm em relação à hidroxila livre, como por exemplo de  $\delta$  71,6-78,4 para 81,8-90,5 (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

O sinal observado em  $\delta$  4,39, atribuído ao próton anomérico, correlacionado com o sinal de carbono em  $\delta$  105,76 (Figura 18), indica a presença de um açúcar, identificado como glicose pelos experimentos de COSY. A posição de ligação da glicose foi confirmada pela correlação apresentada no experimento de HMBC entre o hidrogênio anomérico da glicose ( $\delta$  4,39) e o C-3 ( $\delta$  83,51), conforme apresentado na Figura 22.

Uma análise detalhada dos valores de deslocamento dos C-3, C-5 e C-6, bem como dos valores dos C-23 e C-24 é de grande valor diagnóstico na definição da conformação da hidroxila ligada ao C-3, bem como do carbono portador do grupamento  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . As posições

dos C-5 e C-6 são afetadas pela configuração da hidroxila em C-3 e pela presença do grupamento hidroxila em C-23 ou C-24. No caso da configuração 3- $\beta$ -OH (equatorial), a mais comum em triterpenos, devido ao grupamento  $\beta$ -hidroximetila em C-4-axial, ou seja, em C-24, os valores de C-5 e C-6 são deslocados para região de blindagem em comparação aos sinais observados para estes mesmos carbonos quando o grupamento hidroximetila está em posição  $\alpha$ -equatorial, ou seja, no C-23 (SIDDIQUI *et al.*, 1990 apud ATHAYDE, 1993).

A presença de um grupo -CH<sub>2</sub>OH é evidenciada no espectro de RMN <sup>13</sup>C pelo sinal característico em  $\delta$  64,97 de um carbono secundário ligado a um grupamento hidroxila (Figura 13). Esta substituição foi localizada no C-4 ( $\delta$  43,88) da aglicona (portador do C-23), pois nas saponinas derivadas do ácido oleanólico (ou ursólico), quando este carbono encontra-se substituído por um grupo -CH<sub>2</sub>OH, no lugar de um grupo CH<sub>3</sub>, o deslocamento químico do do C-23 passa de 28,0-28,1 para 64,4-64,5; a posição C-4 sofre um deslocamento para região de desblindagem de cerca de 2,9-4,3 ppm e os C-3, C-5 e C-24 para a região de blindagem na ordem de 3,0-8,0 ppm (TAN; ZHOU, ZHAO, 1999).

A informação sobre a posição da hidroxila foi obtida ainda, analisando-se o sinal de uma metila em  $\delta$  13,42 deslocado para a região de blindagem em relação ao usualmente encontrado para derivados dos ácidos oleanólico e ursólico (cerca de  $\delta$  15,7 e  $\delta$  16,7). Esta metila deslocada para a região de blindagem pode ser atribuída à metila em posição  $\beta$  ao C-4, ou seja, ao C-24, já que o deslocamento esperado para uma metila em posição  $\alpha$  ao C-4, ou seja, o C-23, seria de cerca de 10 ppm para a região de desblindagem (ATHAYDE, 1993).

Dessa forma, confirma-se que o grupamento 4-hidroximetila, cujo deslocamento é de  $\delta$  64,97 está na posição  $\alpha$ , correspondendo ao C-23 (Figura 13). A colocação da hidroximetila nesta posição, por compressão estérica afeta a posição do C-5, causando um deslocamento do mesmo para a região de blindagem (SIDDIQUI *et al.*, 1990 apud ATHAYDE, 1993). Na pró-sapogenina o C-5 aparece em  $\delta$  48,33, enquanto que nas agliconas dos ácidos oleanólico e ursólico sem substituintes hidroxila em C-4, este valor é cerca de  $\delta$  55

Os experimentos COSY e HMBC foram decisivos para a definição da seqüência dos carbonos da aglicona e da glicose. O Quadro 8 mostra o deslocamento dos prótons e carbonos da aglicona. A Figura 21 e o Quadro 9 apresentam as correlações H-H COSY da glicose.

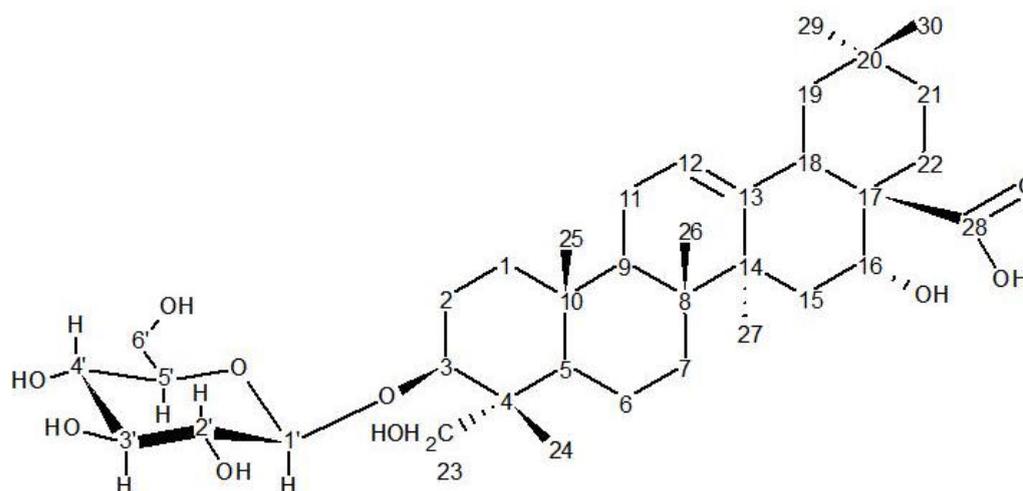
Assim, a pró-sapogenina foi identificada como o ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-16-*a*,23-diidróxi-olean-12-en-28-óico. A estrutura proposta para a pró-sapogenina é apresentada na Figura 11.

Quadro 8. Dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e DEPT da aglicona da pró-sapogenina.

Carbono	DEPT	$d_{\text{C}}$	$d_{\text{H}}$ multiplicidade
1	CH <sub>2</sub>	39,59	0,982 m; 1,62 m
2	CH <sub>2</sub>	26,35	1,74 m; 1,95 dd
3	O-CH	83,51	3,63 m
4	Cq	43,88	-
5	CH	48,33	1,23 m
6	CH <sub>2</sub>	18,90	1,37 m; 1,48 m
7	CH <sub>2</sub>	33,77	1,28 m; 1,64 m
8	Cq	40,65	-
9	CH	48,16	1,69 m
10	Cq	37,72	--
11	CH <sub>2</sub>	24,52	1,90 m; 1,90 m
12	CH	123,43	5,29 t
13	Cq	145,20	-
14	Cq	42,75	-
15	CH <sub>2</sub>	36,24	1,35 m; 1,85 m
16	O-CH	75,33	4,45
17	Cq	49,64	-
18	CH	42,14	3,00 dd
19	CH <sub>2</sub>	47,73	1,02 m; 2,28 t
20	Cq	31,41	-
21	CH <sub>2</sub>	36,59	1,14 m; 1,93 m
22	CH <sub>2</sub>	32,72	1,76 m; 1,90 m
23	O-CH <sub>2</sub>	64,97	3,275 m; 3,62 m
24	CH <sub>3</sub>	13,42	0,70 s
25	CH <sub>3</sub>	16,55	0,983 s
26	CH <sub>3</sub>	17,85	0,79 s
27	CH <sub>3</sub>	27,33	1,38 s
28	COOH	181,28	--
29	CH <sub>3</sub>	33,43	0,87 s
30	CH <sub>3</sub>	24,94	0,963 s

Quadro 9. Dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , DEPT e COSY da glicose da pró-sapogenina.

3-O-Gli	DEPT	$d_{\text{C}}$	$d_{\text{H}}$ multiplicidade	COSY
1	CH	105,76	H1 - 4,39 d ( $J = 8,1$ Hz)	H2
2	CH	75,68	H2 - 3,16 t	H1; H3
3	CH	78,39	H3 - 3,34 dd	H2; H4
4	CH	71,60	H4 - 3,275 m	H3; H5
5	CH	77,75	H5 - 3,27 m	H4; H6a; H6b
6	$\text{CH}_2$	62,77	H6a - 3,67 m; H6b - 3,83 dd	H5; H6b H5; H6a

Figura 11. Estrutura proposta para a pró-sapogenina de *Lippia alba*.

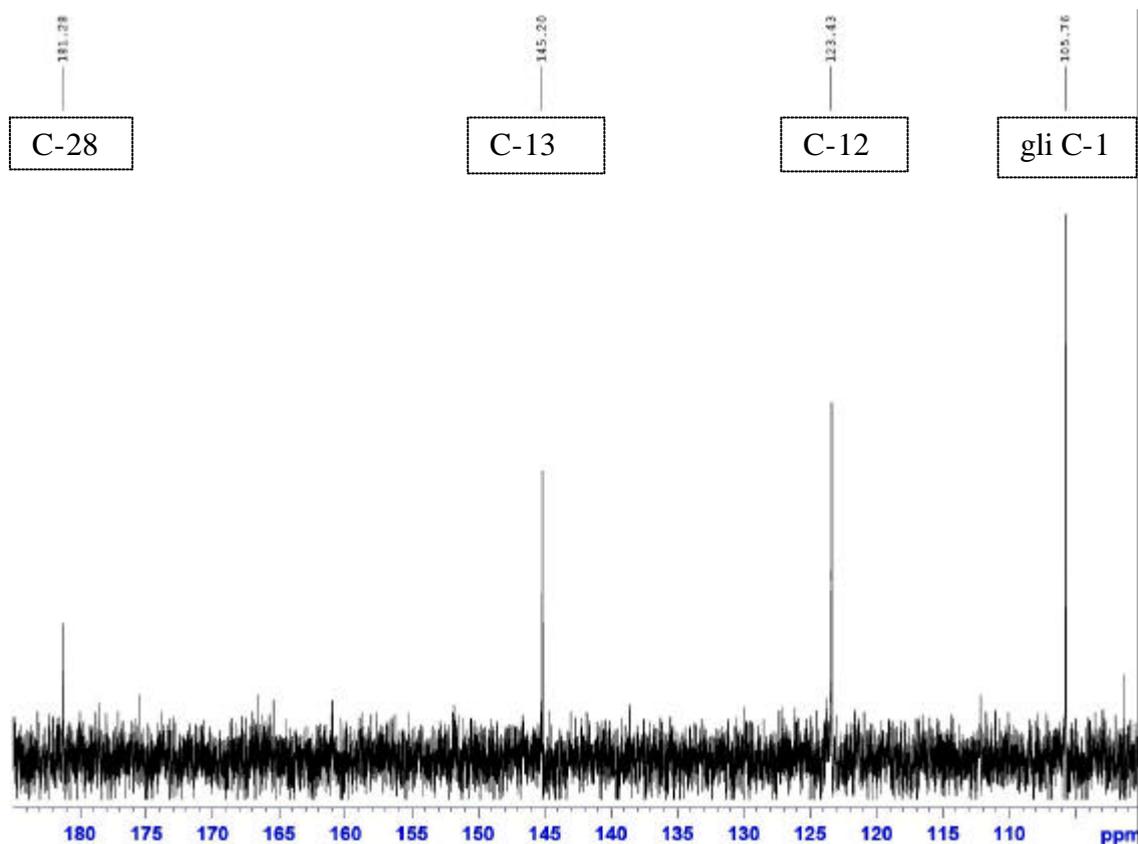


Figura 12. Ampliação 1/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz.

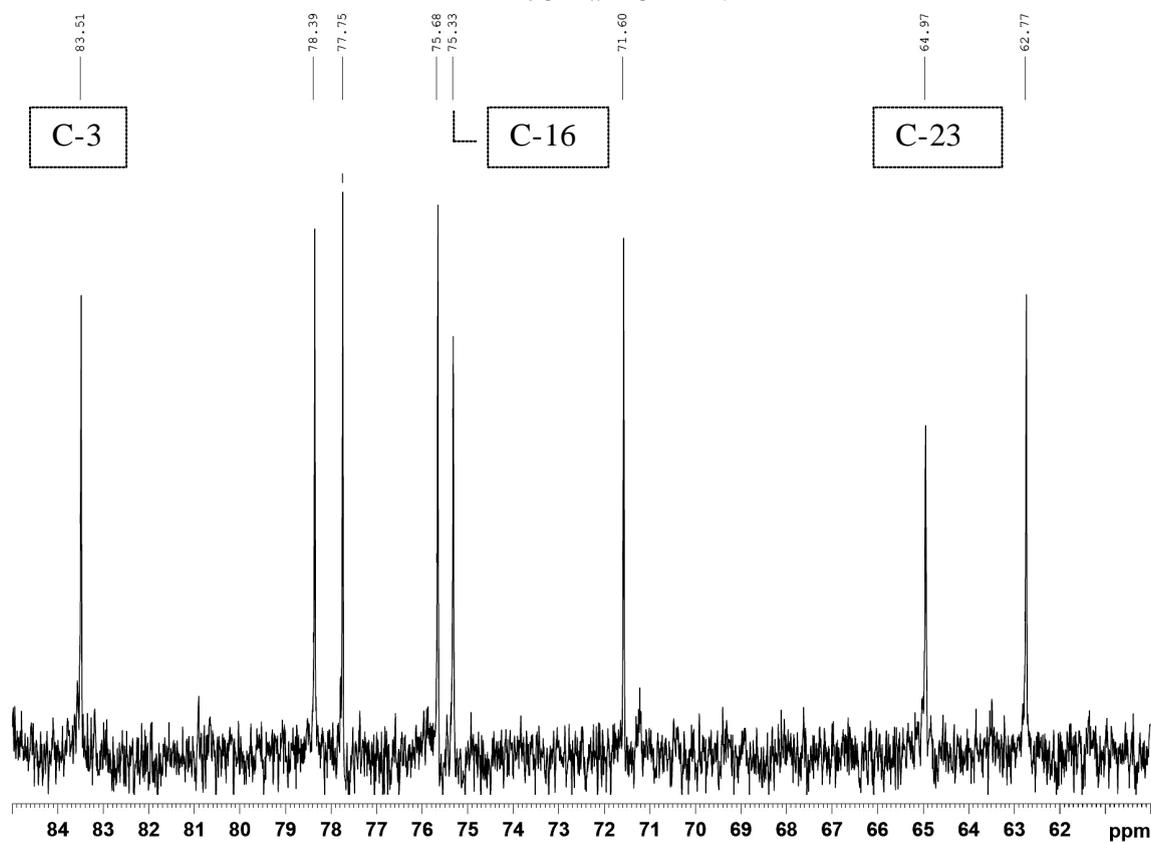


Figura 13. Ampliação 2/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz, destacando os carbonos ligados a oxigênio da aglicona.

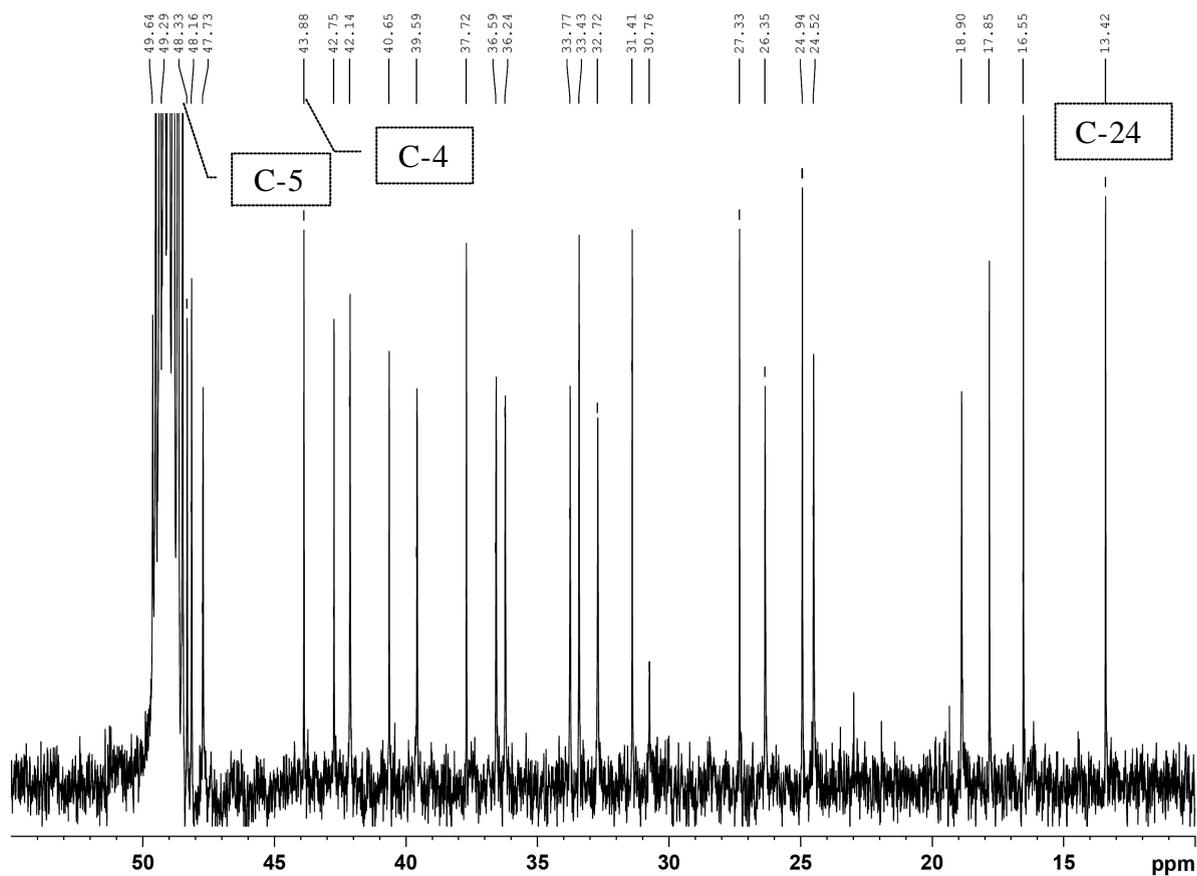


Figura 14. Ampliação 3/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz, destacando para os carbonos C-3, C-4 e C-24 da aglicona.

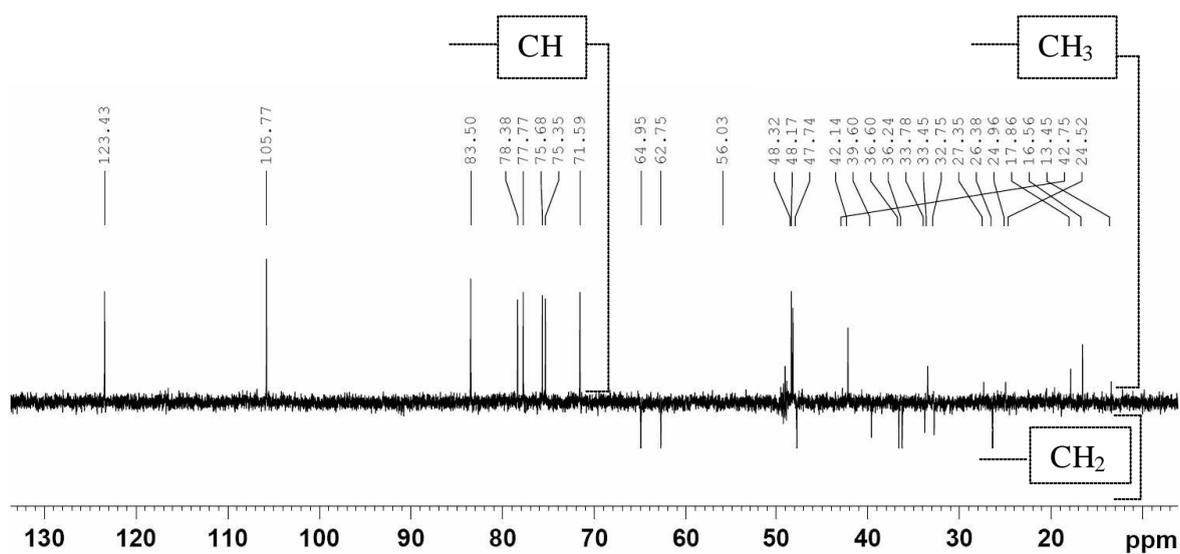


Figura 15. Experimento de DEPT  $135^\circ$  da pró-sapogenina em MeOD a 125 MHz.

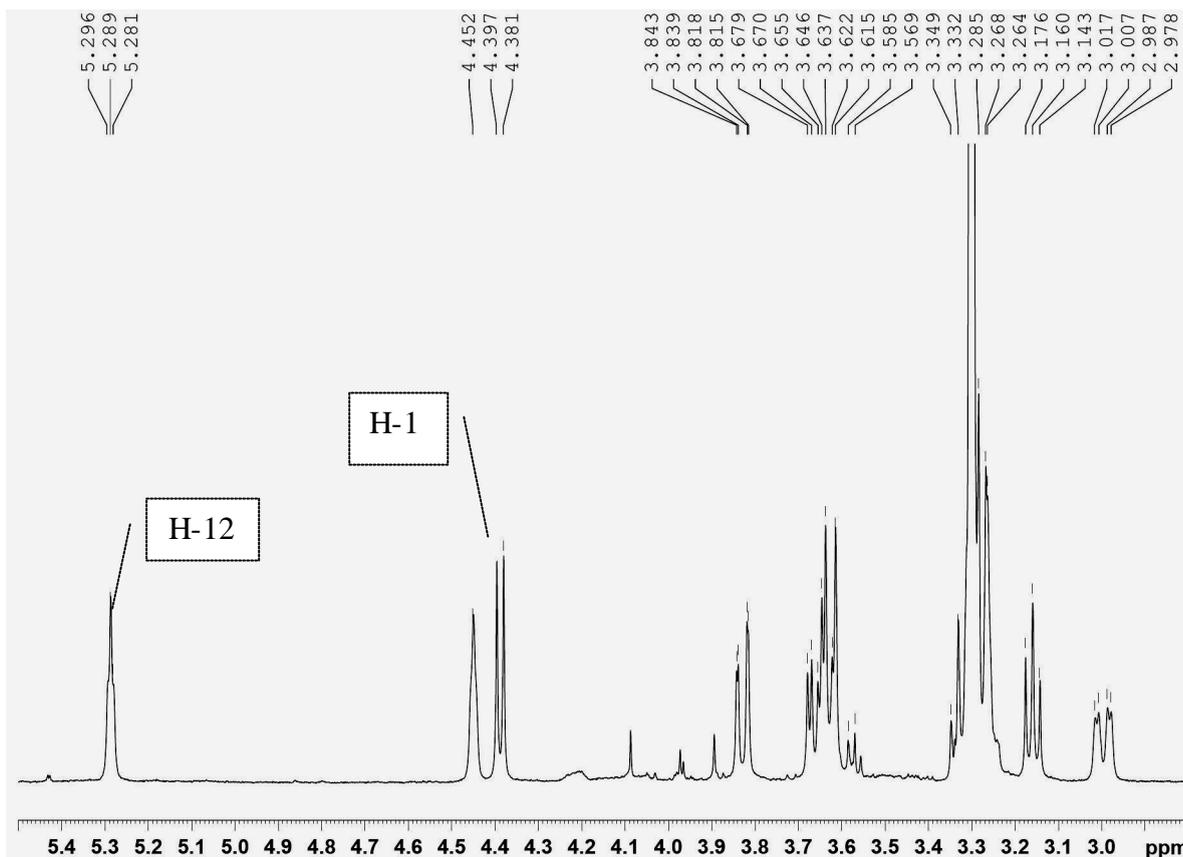


Figura 16. Ampliação 1/2 do espectro de RMN <sup>1</sup>H da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz, com destaque para os hidrogênios olefínico (H-12) e anomérico (H-1).

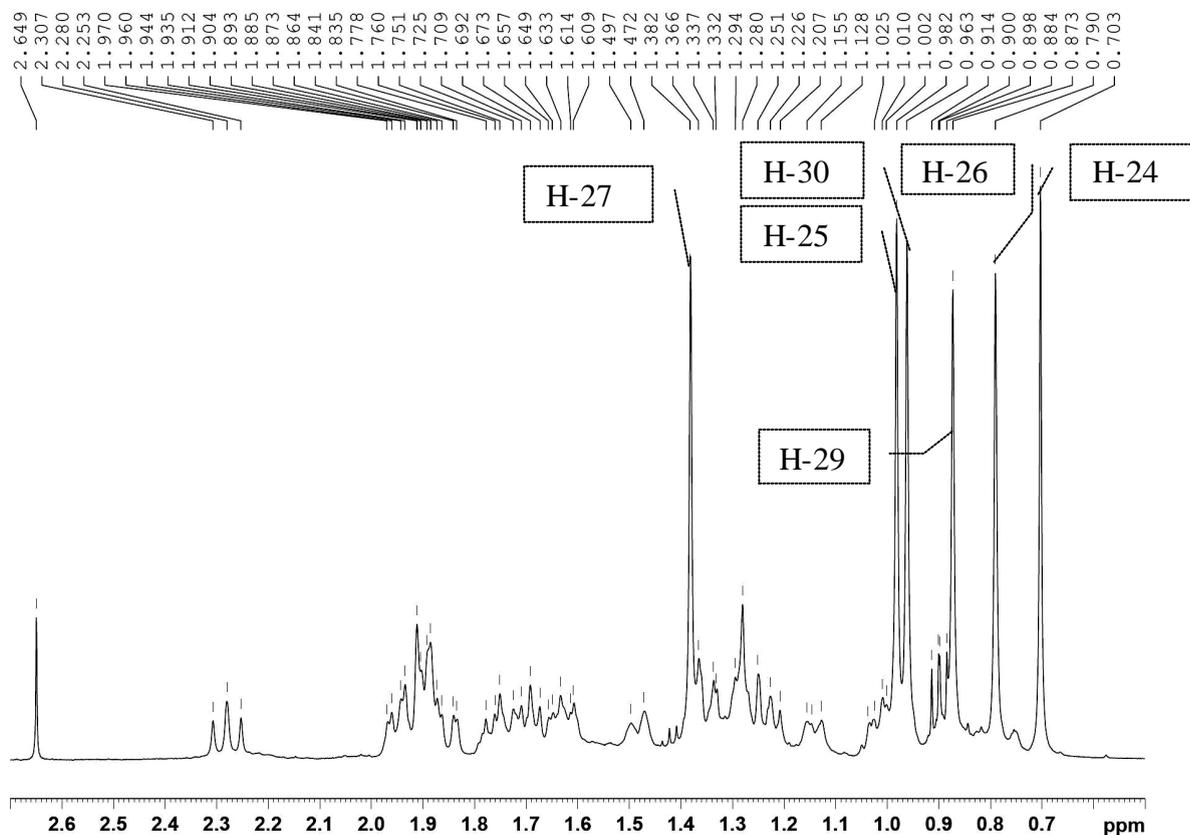


Figura 17. Ampliação 2/2 do espectro de RMN <sup>1</sup>H da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz, com destaque para os sinais das metilas.

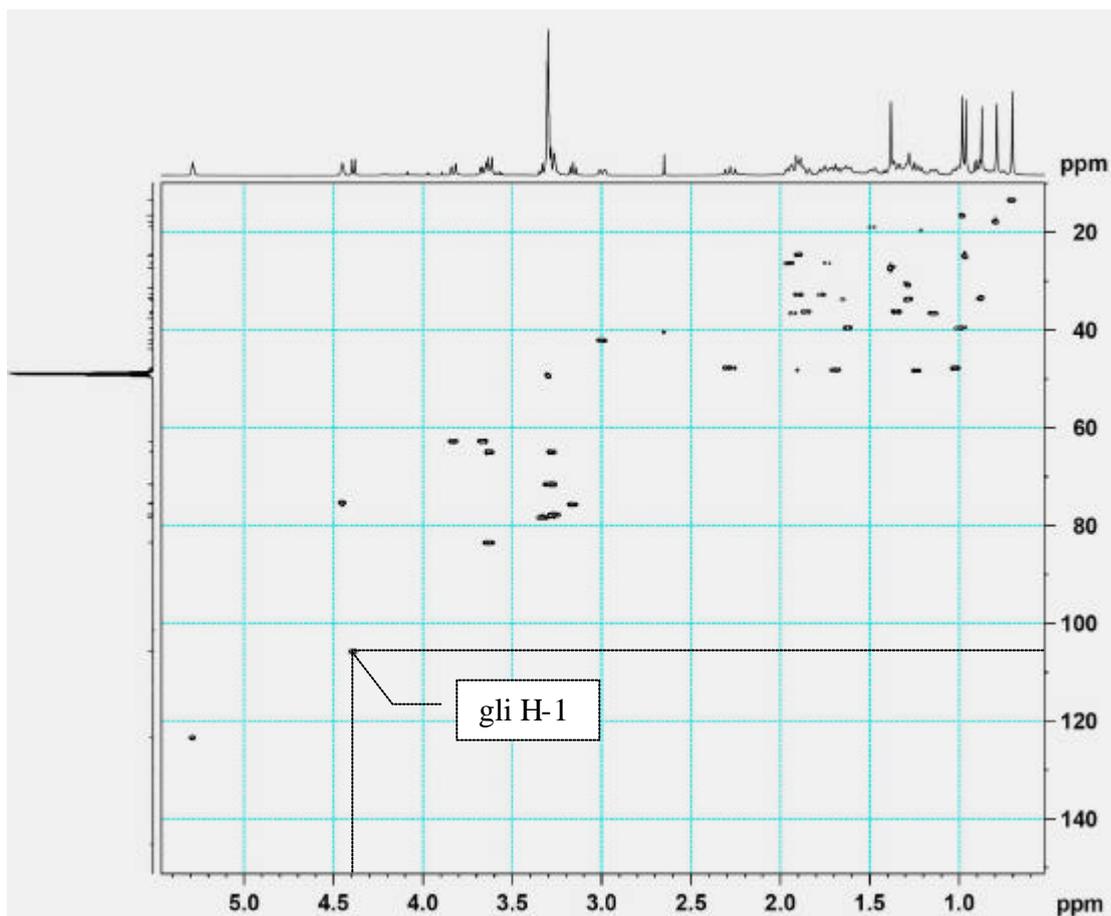


Figura 18. Experimento de HSQC da pró-sapogenina em MeOD (500 – 125 MHz).

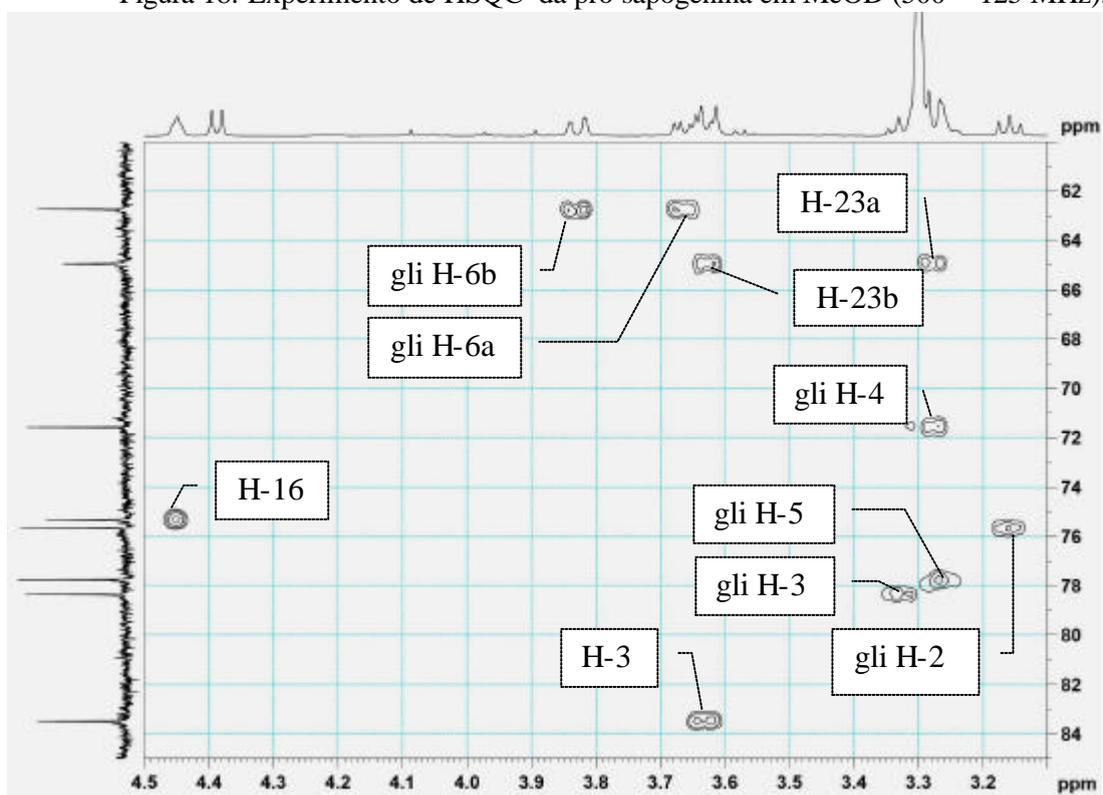


Figura 19. Ampliação do experimento de HSQC da pró-sapogenina em MeOD (500 – 125 MHz).

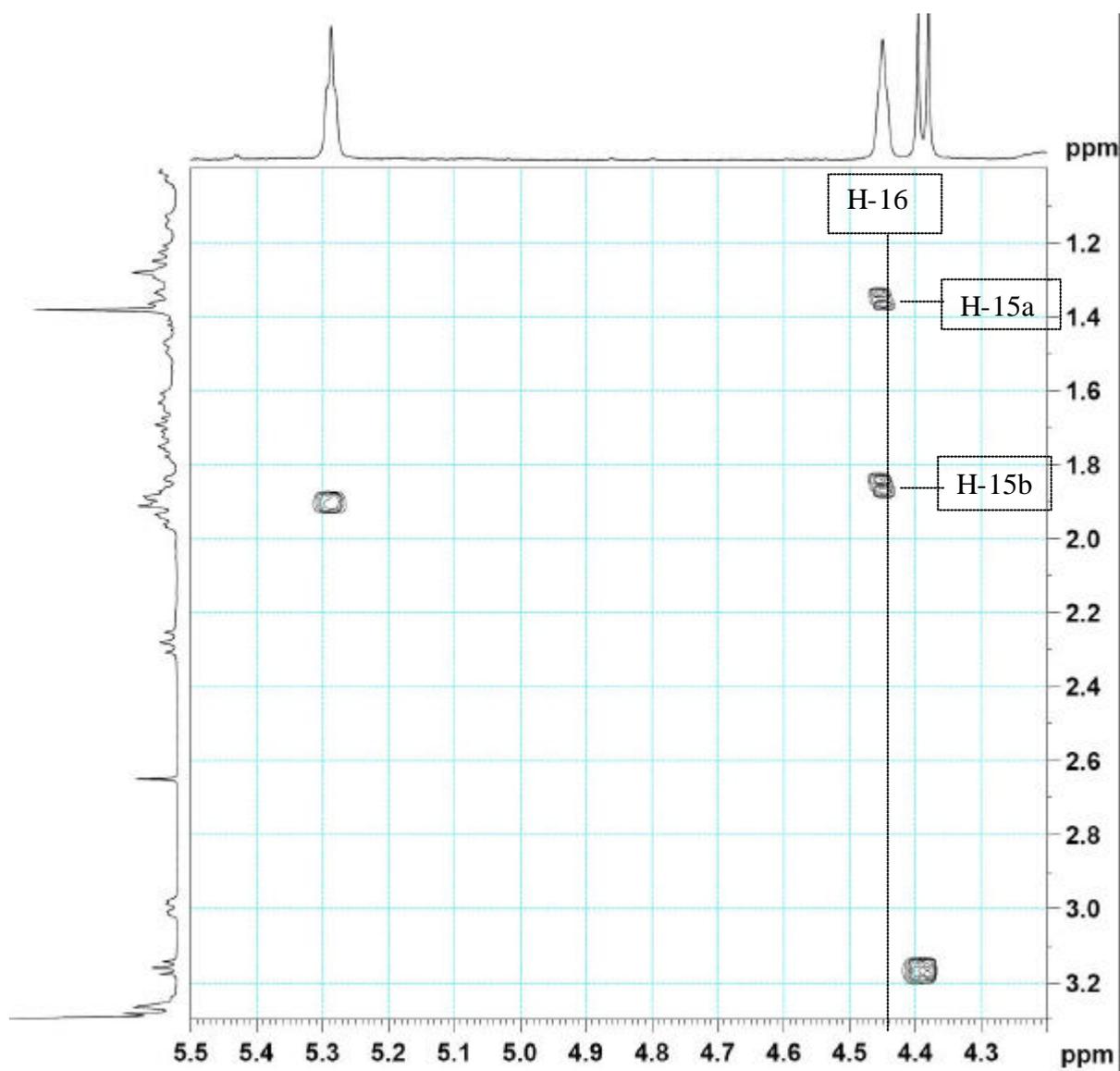


Figura 20. Ampliação 1/2 do experimento COSY da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz.

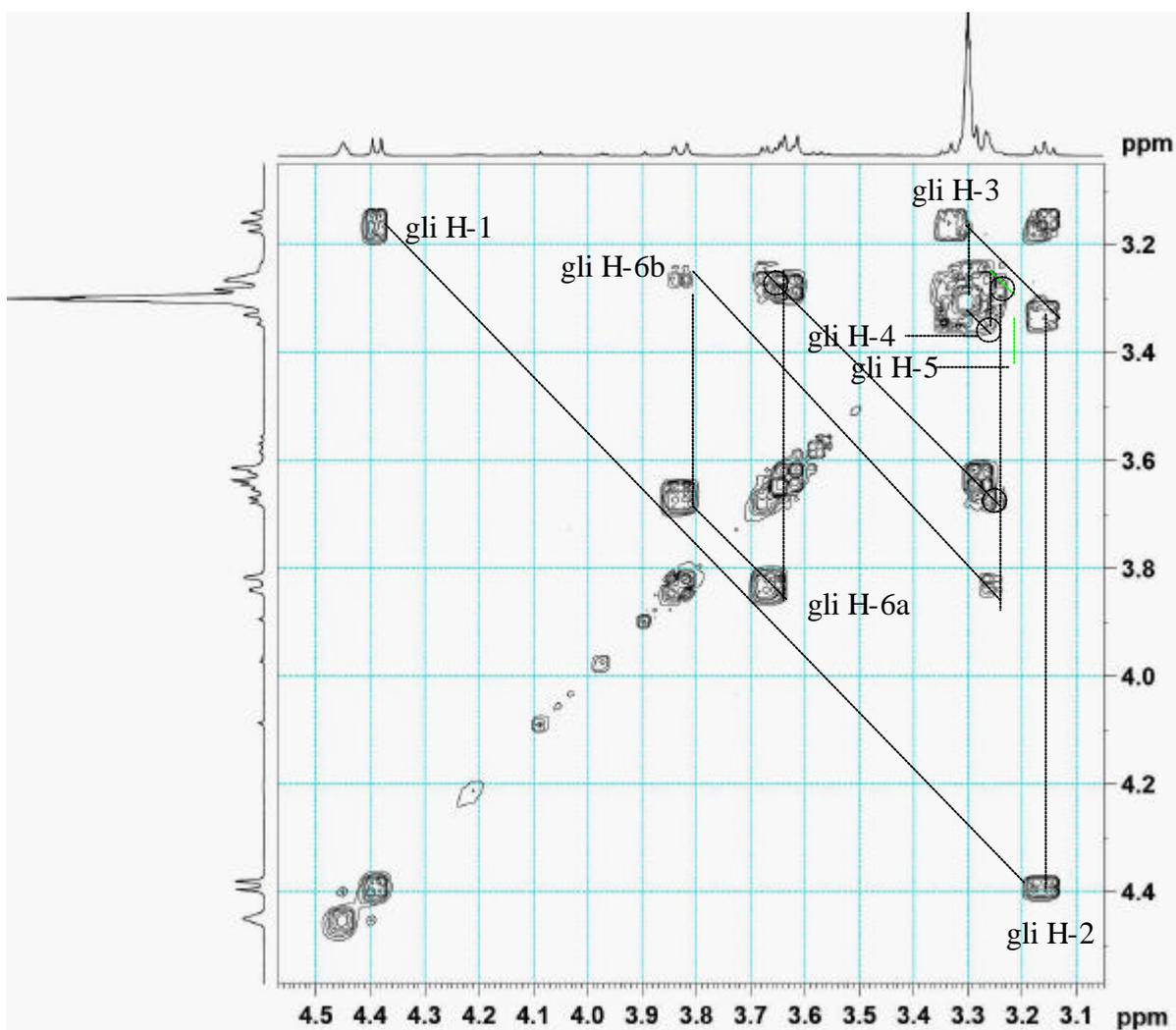


Figura 21. Ampliação 2/2 do experimento COSY da pró-sapogenina em MeOD a 500 MHz. Destaque para a intercorrelação dos H da glicose.

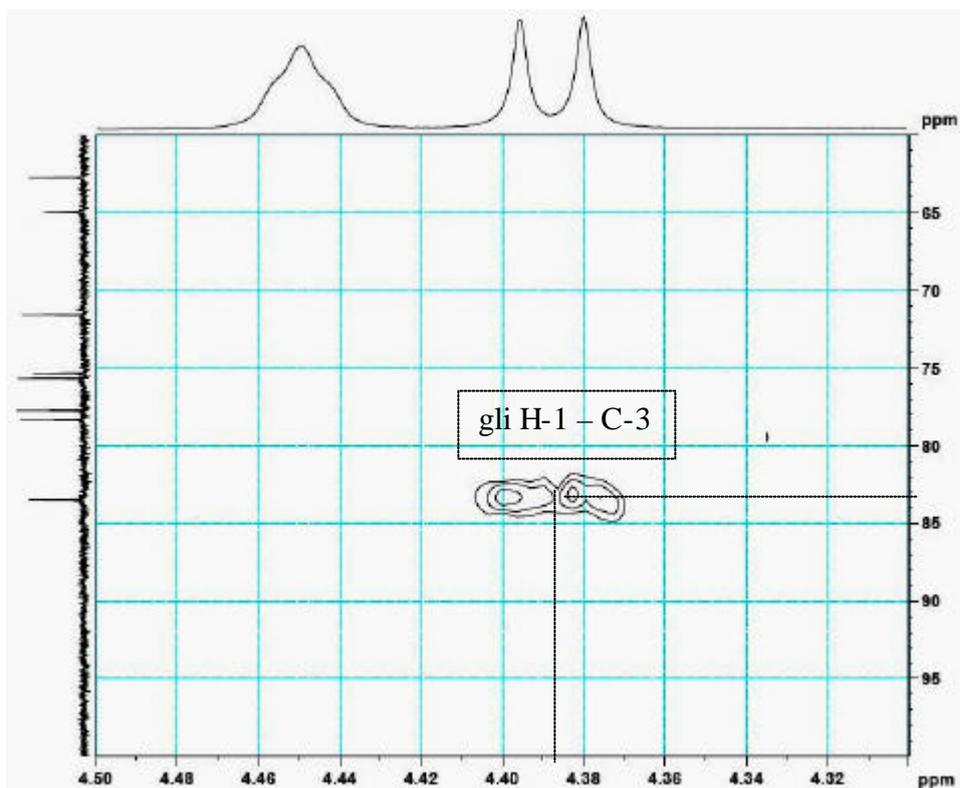


Figura 22. Ampliação do experimento de HBMC em MeOD (500 – 125 MHz), evidenciando a correlação entre o hidrogênio anomérico da glicose e o carbono da posição 3 da aglicona da pró-sapogenina.

### 5.3.3 Elucidação estrutural da saponina LA4 e revisão das atribuições da saponina LA3 isoladas das folhas secas de *L. alba*

As saponinas LA3 e LA4 apresentam em cromatografia em camada delgada um comportamento idêntico (AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O/ ác. acético 7: 1: 2: 5: 0,2, v/v), tendo sido purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A hidrólise ácida, seguida da análise por CCD com padrão de açúcar, possibilitou a confirmação da presença de glicose na molécula (Figura 23), previamente identificada através dos experimentos de COSY e HMBC.

O espectro de massa por impacto eletrônico em modo positivo foi obtido a partir da mistura das saponinas LA3 e LA4 isoladas das folhas de *L. alba* (Figura 24). Apresenta 2 picos principais e 7 picos secundários. Devido à alcalinidade das saponinas e, portanto, sua alta afinidade por cátions, foi observado que muitos picos apresentam a adição de sódio à molécula ( $[M + Na]^+$ ).

O pico base de m/z 1229 corresponde a  $[M + Na]^+$ . Assim, a massa molecular da amostra é de 1206, que corresponde a uma molécula C<sub>58</sub>H<sub>94</sub>O<sub>26</sub>. O pico m/z 1050 representa a perda de uma molécula de glicose (M-179), corroborando com os dados que apontam para a presença de uma molécula de glicose isolada na molécula em C-3.

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C de LA4 mostraram a presença de 58 sinais atribuídos aos carbonos, caracterizando segundo os espectros DEPT, a presença de 8 metilas, 13 metilenos, 29 metinos e 8 átomos de carbonos quaternários (Figuras 25-30). Os espectros de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e os experimentos de COSY indicam a mesma estrutura parcial da pró-sapogenina (Quadro 10). As maiores diferenças estão nos sinais do C-28 (d 177,09) e a presença de mais quatro sinais atribuídos a carbonos anoméricos (Figura 25). O deslocamento para a região de desblindagem de cerca de d 4 ppm do C-28 é atribuída à esterificação nesse carbono (TAN; ZHOU; ZHAO, 1999).

Os sinais em d 95,46, d 101,30, d 102,56 e d 107,54 são atribuídos aos carbonos anoméricos ligados, respectivamente, aos prótons anoméricos em d 5,43 (d,  $J = 5,2$  Hz), d 5,28 (d,  $J = 1,6$  Hz), d 5,13 (d,  $J = 1,6$  Hz) e d 4,48 (d,  $J = 7,7$  Hz), segundo os dados apontados nos espectros HSQC (Figura 31, Quadro 11).

Os experimentos bidimensionais HMBC, COSY e RCT foram utilizados para determinar as atribuições seqüenciais de cada monossacarídeo, iniciando-se pelo próton

anomérico (Figuras 35-42) (BURGER *et al.*, 1998; ESKANDER *et al.*, 2006; LAVAUD *et al.*, 1995; SAHU *et al.*, 1995; SAHU *et al.*, 1997).

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e dos experimentos COSY (Figuras 31-37) revelou a presença de uma  $\beta$ -D-xilose ( $J_{\text{H-1, H-2}} = 7,7$  Hz), de uma  $\alpha$ -L-arabinose ( $J_{\text{H-1, H-2}} = 5,2$  Hz) (ISHII *et al.*, 1981) e duas  $\alpha$ -ramnosos (ambas com  $J_{\text{H-1, H-2}} = 1,6$  Hz).

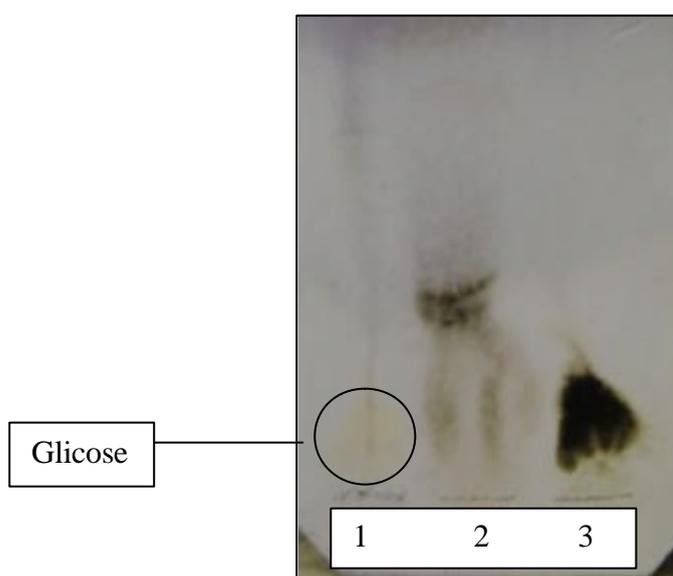


Figura 23. Cromatografia em camada delgada da fração F6f hidrolisada, da fração F6f e do padrão de glicose.

Eluente: AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H<sub>2</sub>O (10: 1: 2: 5 v/v – fase orgânica)

Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®).

Deteção: vanilina sulfúrica seguida de aquecimento / visível.

Amostras: 1- Fração F6f hidrolisada.  
2 – Fração F6f.  
3 – Padrão de glicose.

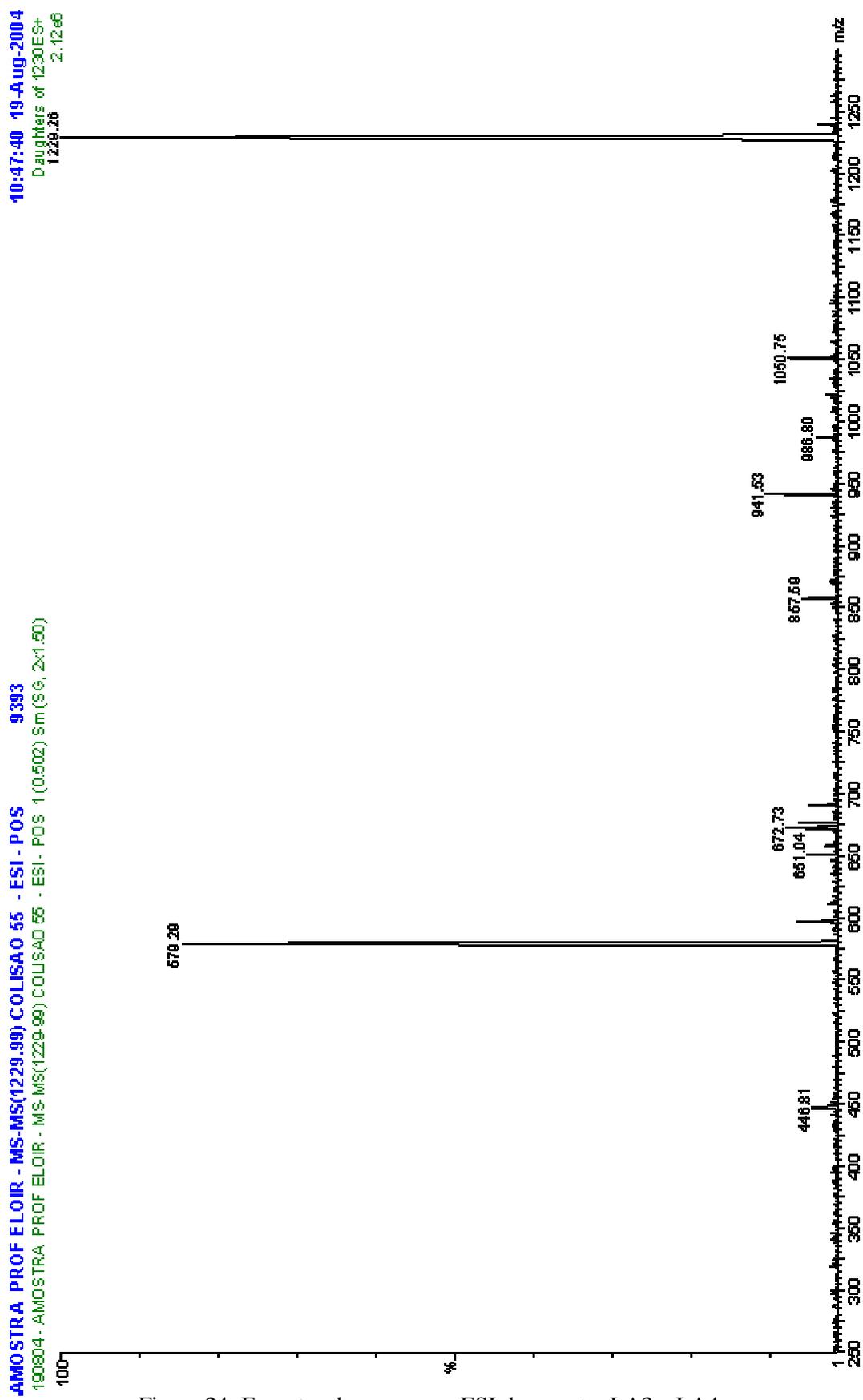


Figura 24. Espectro de massa por ESI da amostra LA3 e LA4.

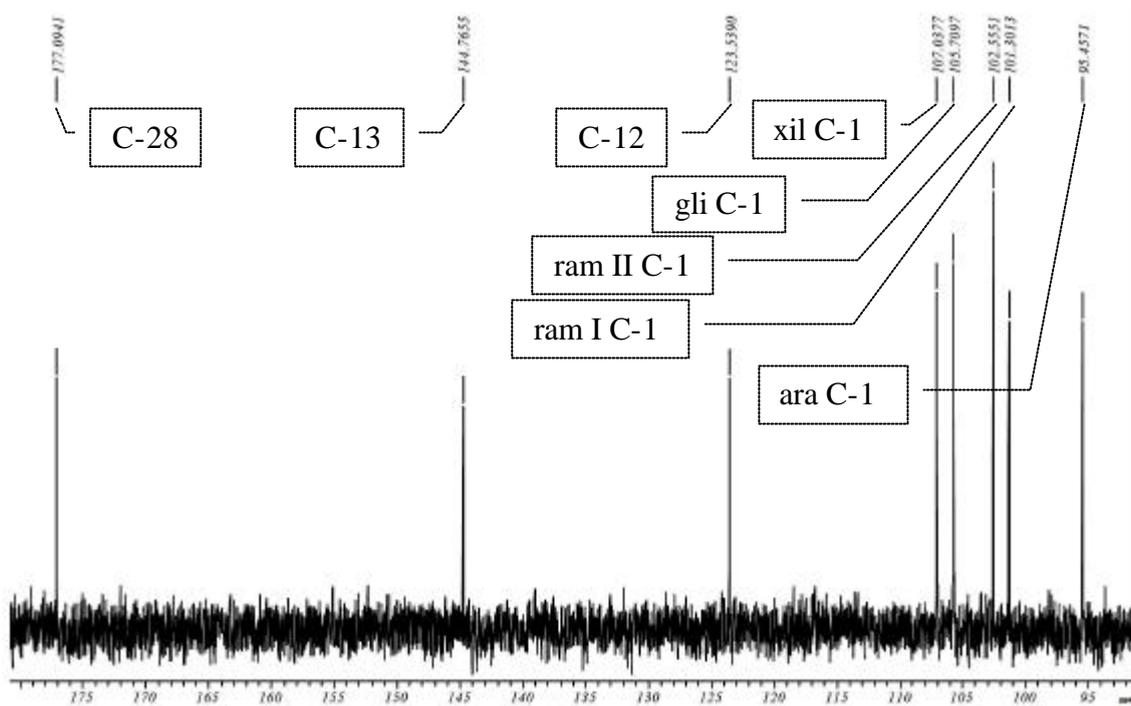


Figura 25. Ampliação 1/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz.

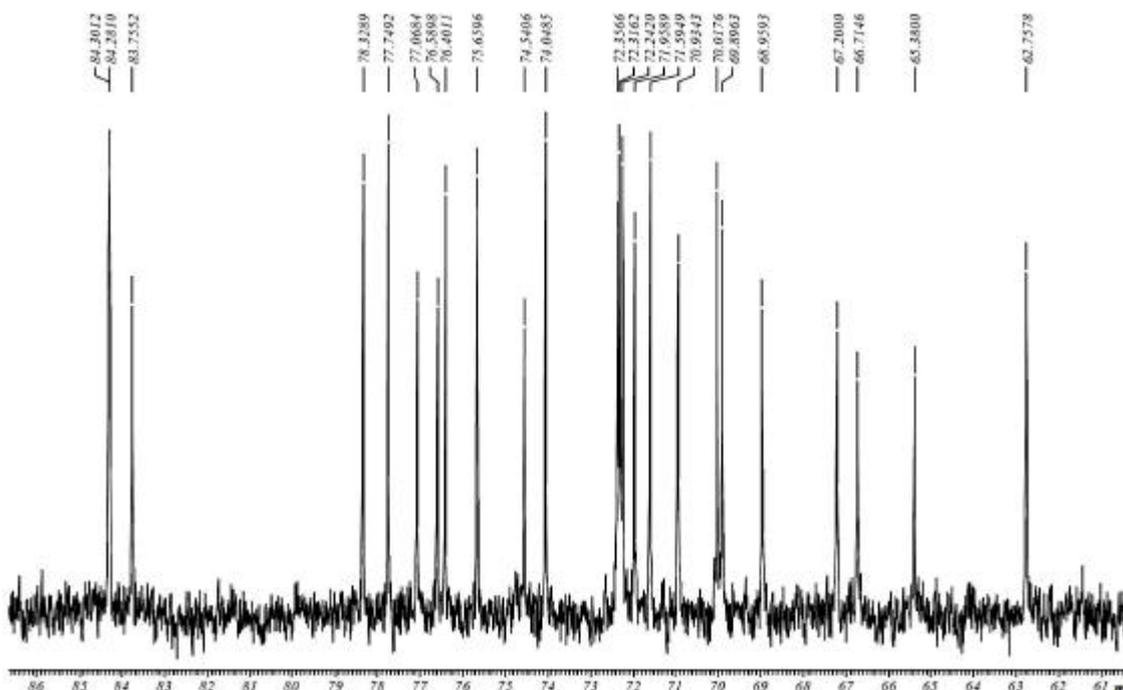


Figura 26. Ampliação 2/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz.

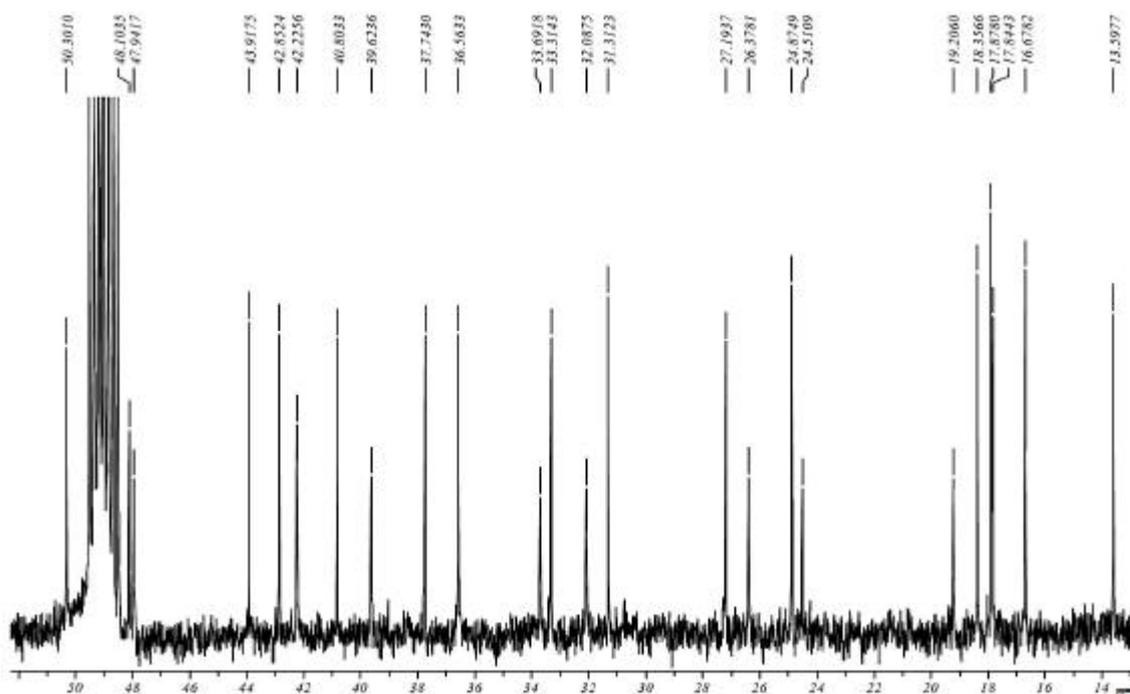


Figura 27. Ampliação 3/3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância LA4 em MeOD a 100 MHz.

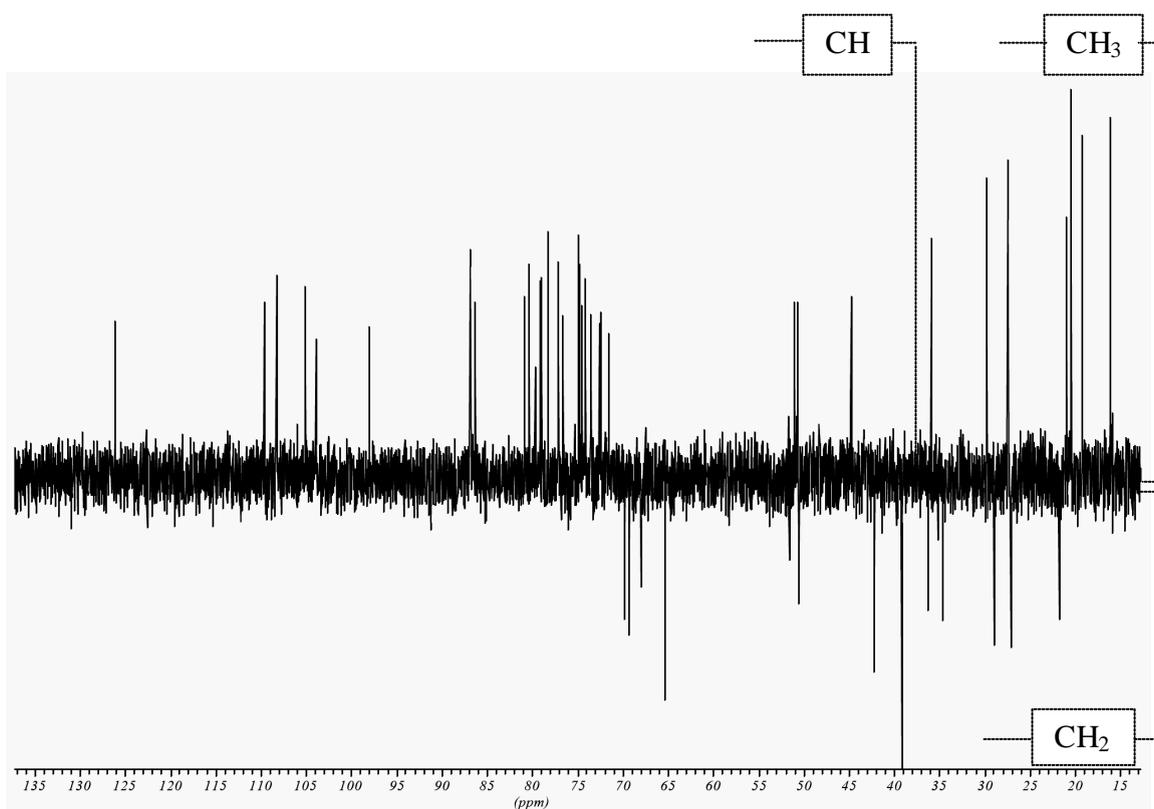


Figura 28. Experimento de DEPT  $135^\circ$  da substância LA4 em MeOD a 100 MHz.

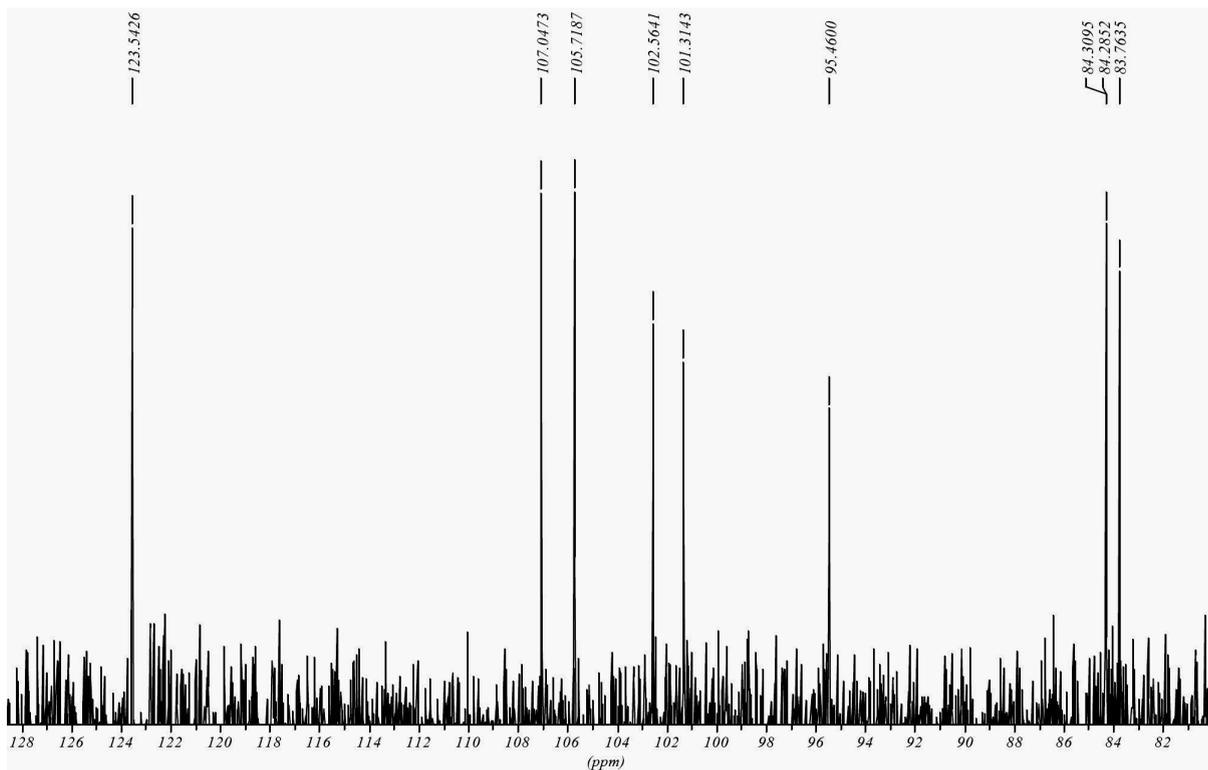


Figura 29. Ampliação 1/2 do experimento de DEPT 90° da substância LA4 em MeOD a 100 MHz, evidenciando o carbono olefínico e os carbonos anoméricos.

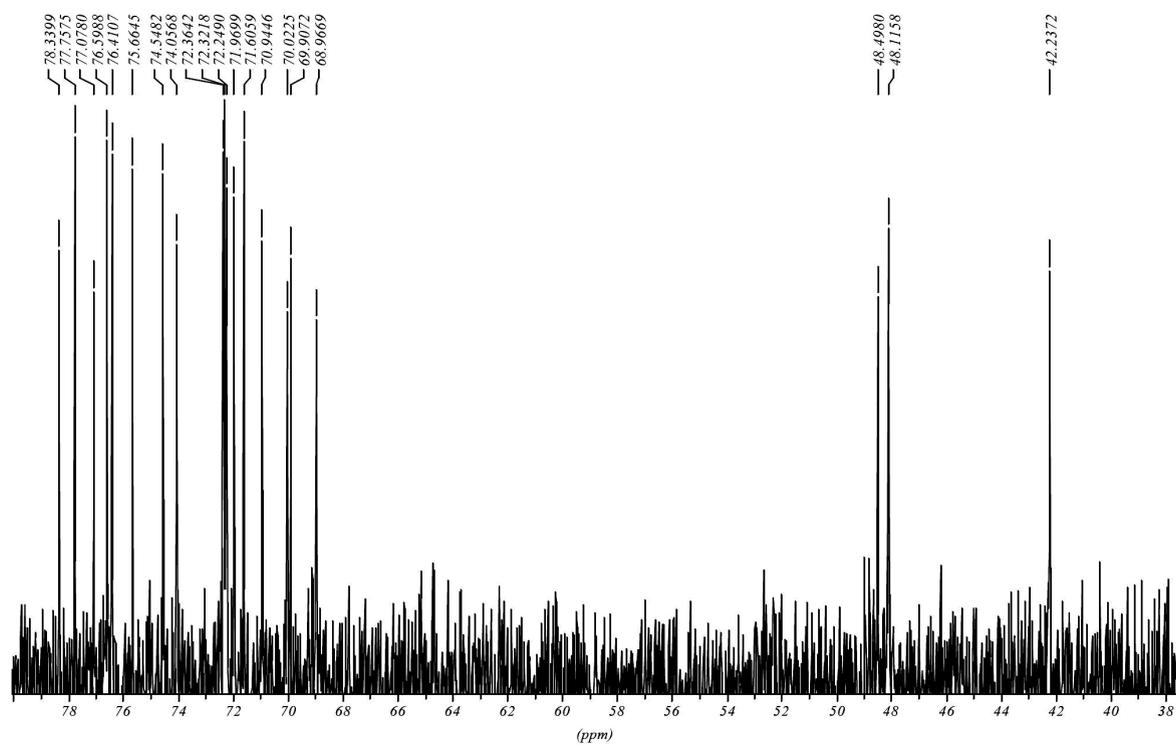


Figura 30. Ampliação 2/2 do experimento de DEPT 90° da substância LA4 em MeOD a 100 MHz.

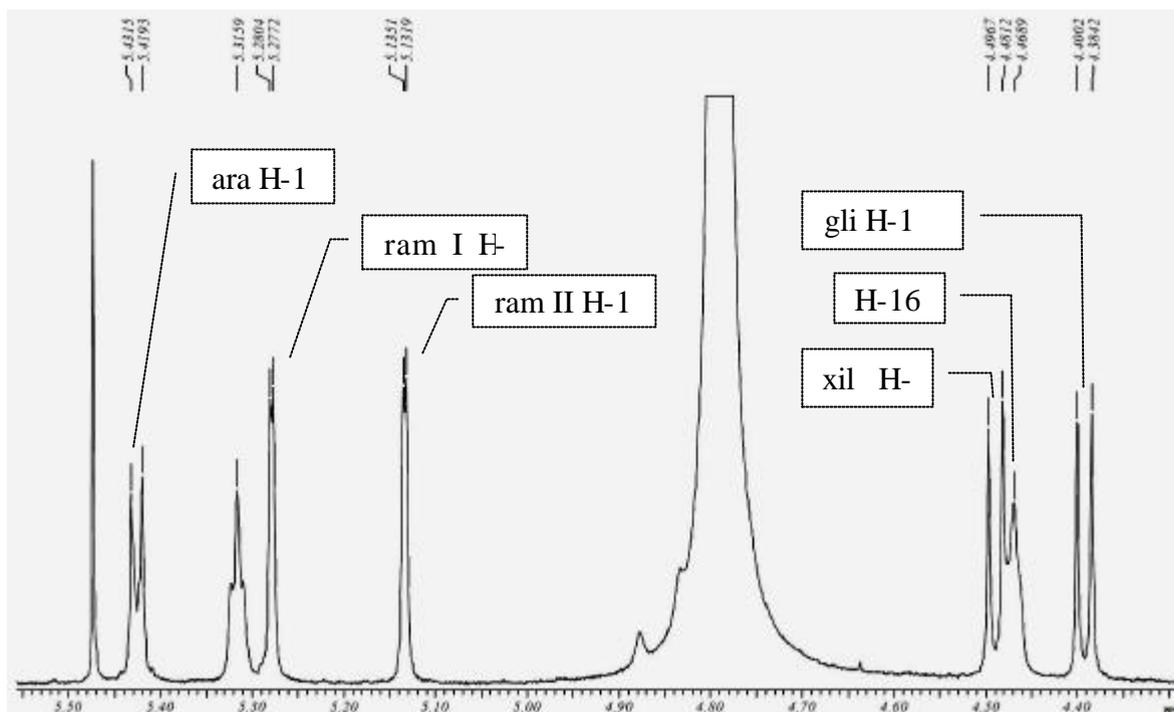


Figura 31. Ampliação 1/4 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância LA4 em MeOD a 400 MHz.

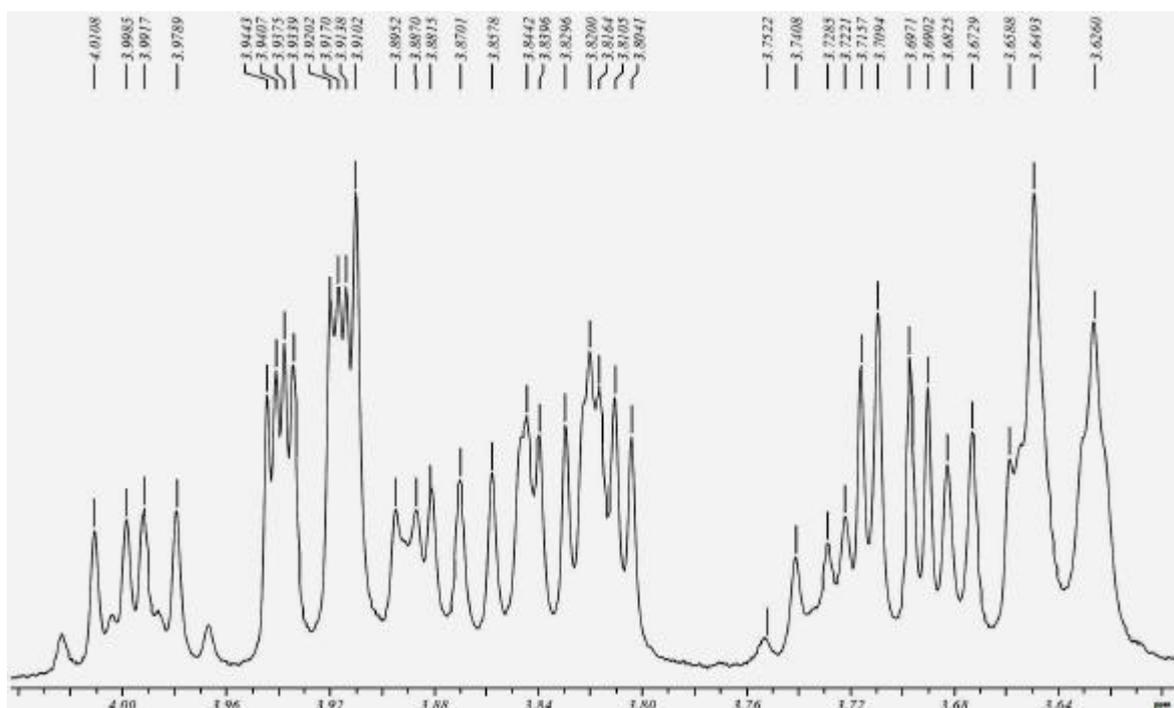


Figura 32. Ampliação 2/4 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância LA4 em MeOD a 400 MHz.

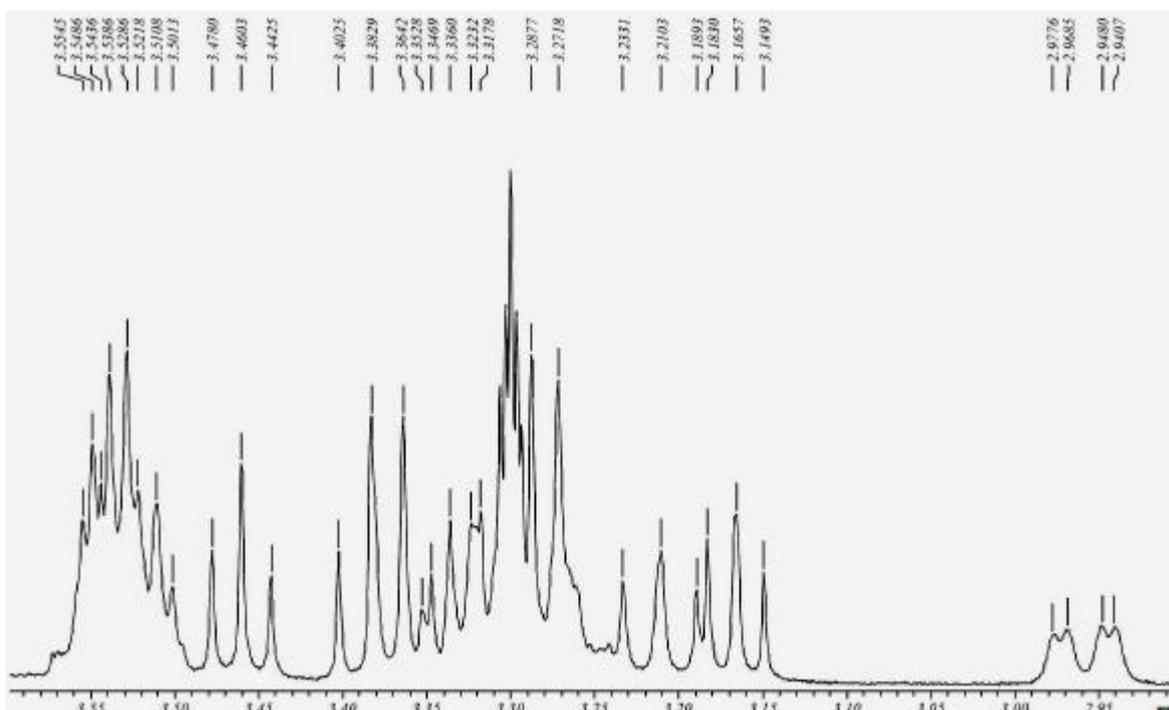


Figura 33. Ampliação 3/4 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância LA4 em MeOD a 400 MHz.

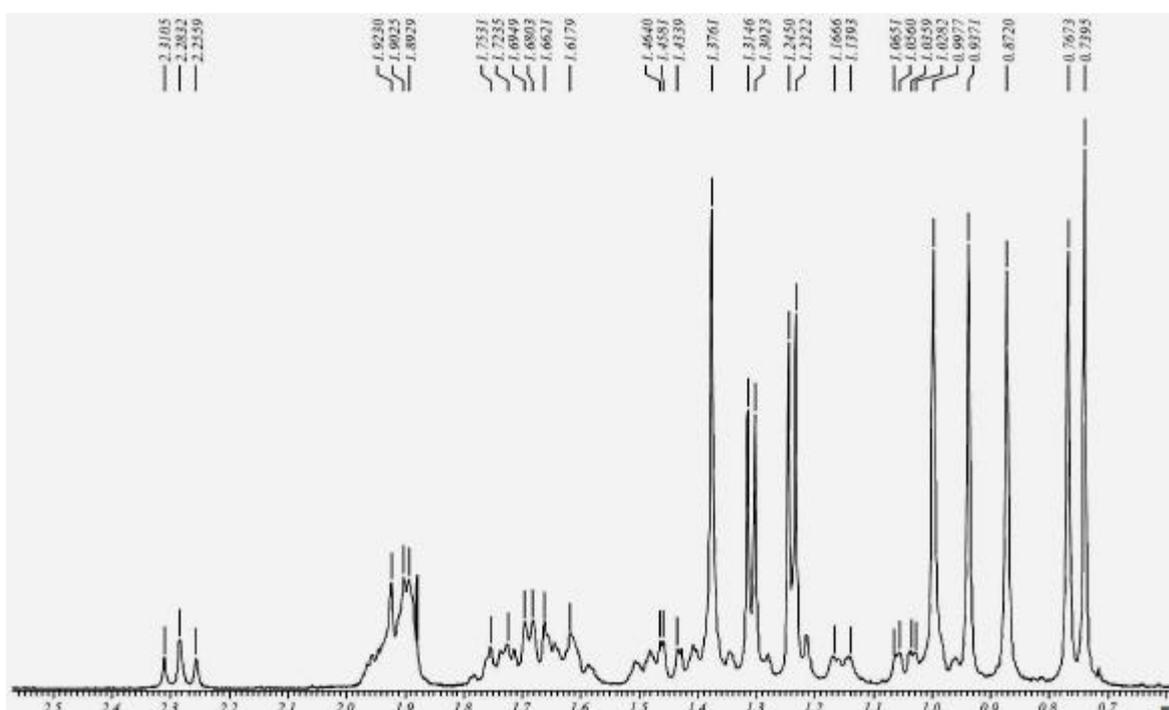


Figura 34. Ampliação 4/4 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância LA4 em MeOD a 400 MHz.

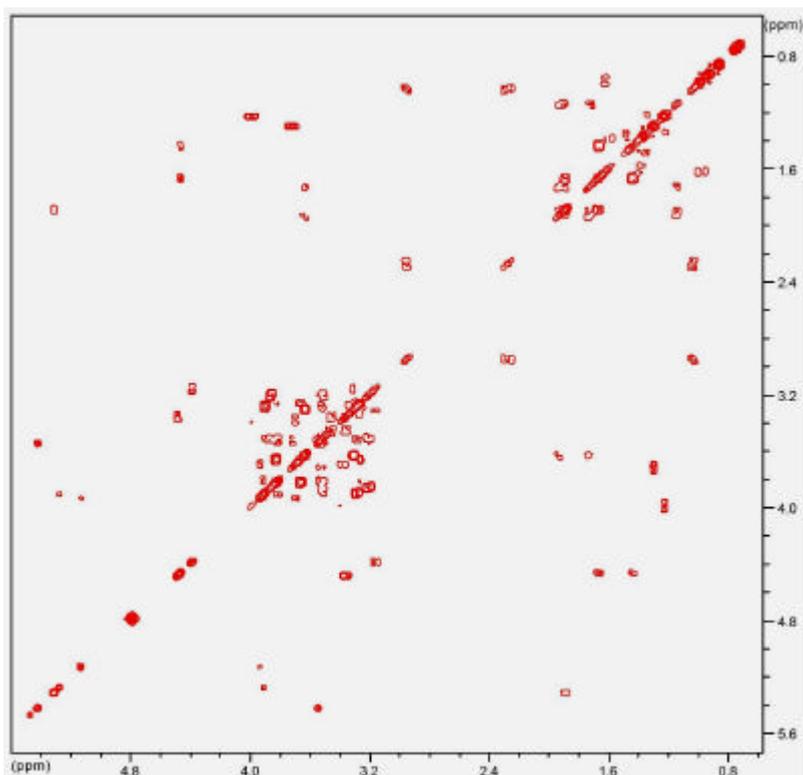


Figura 35. Experimento COSY completo da substância LA4 em MeOD a 400 MHz.

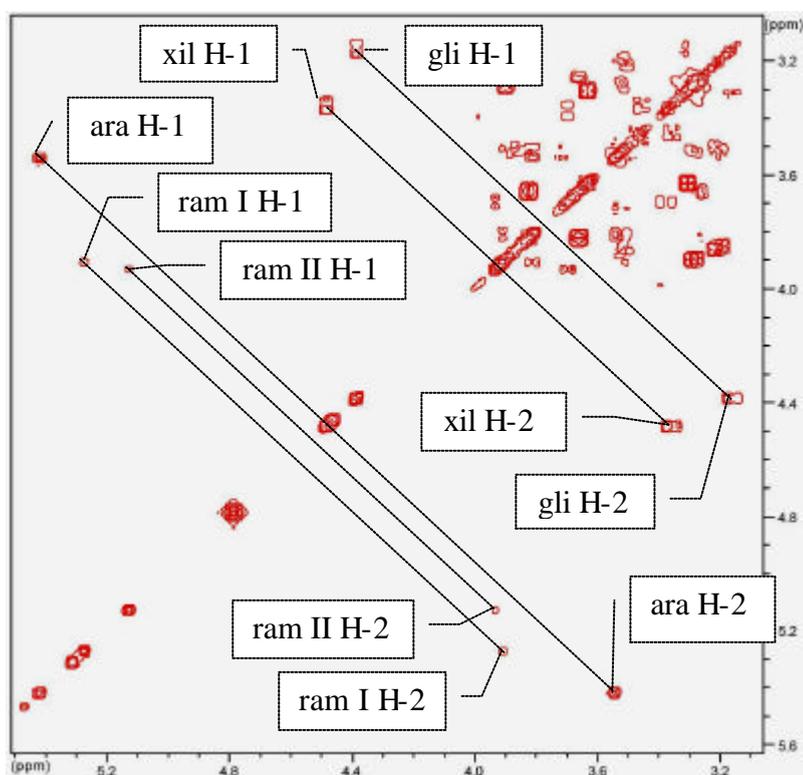


Figura 36. Ampliação 1/2 do experimento COSY da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. Destaque para os H anoméricos e para os hidrogênios da posição 2.

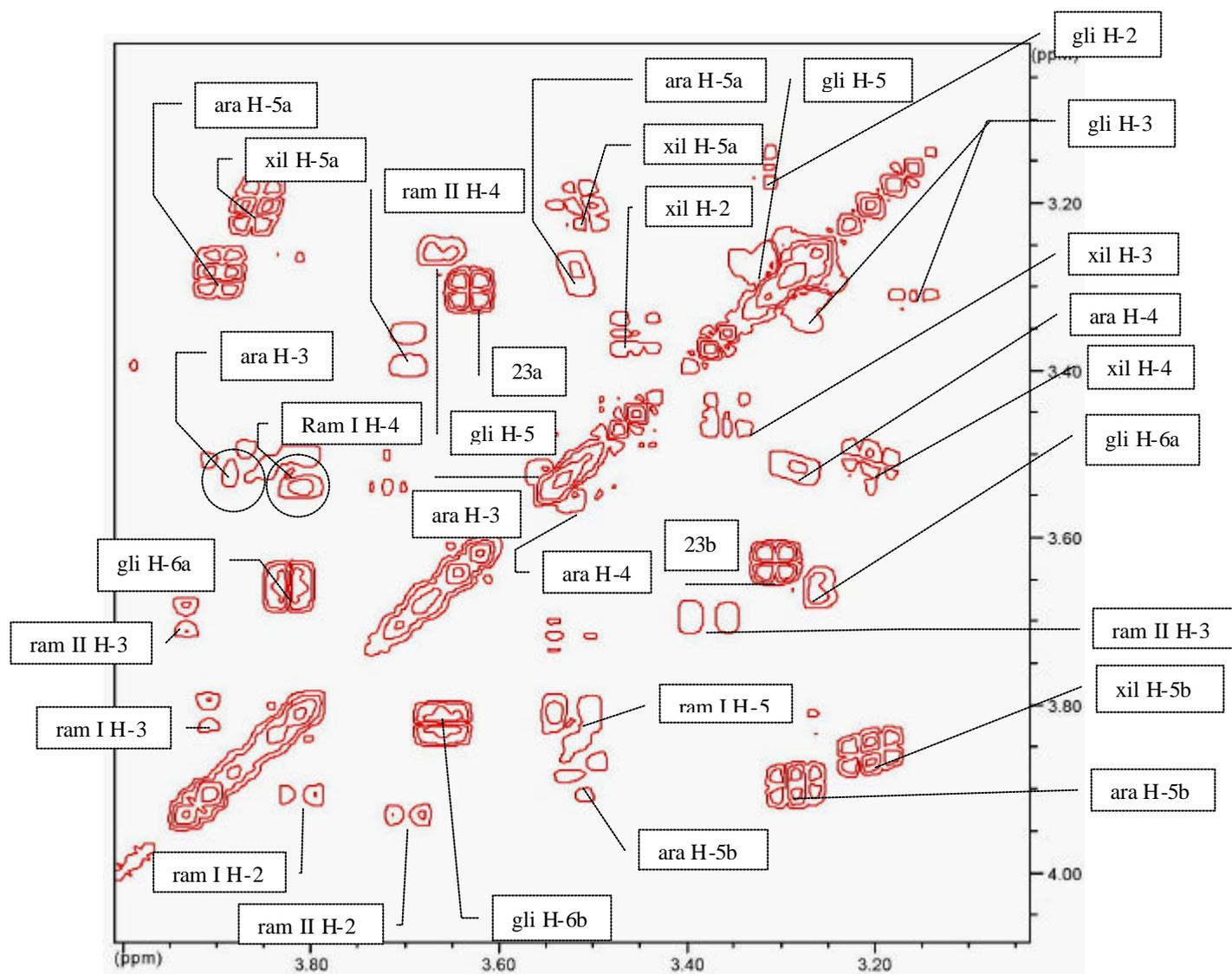


Figura 37. Ampliação 2/2 do experimento COSY da substância LA4 em MeOD a 400 MHz. Destaque para a determinação da sequência dos açúcares.

Quadro 10. Comparação dos valores de descolamento do  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da pró-sapogenina com a substância LA4.

Carbono	DEPT	Pró-sapogenina		LA4	
		$d_C$	$d_H$ multiplicidade	$d_C$	$d_H$ multiplicidade
1	CH <sub>2</sub>	39,59	0,982 m; 1,62 m	39,62	0,96 m; 1,62 m
2	CH <sub>2</sub>	26,35	1,74 m; 1,95 dd	26,38	1,75 m; 1,93 m
3	O-CH	83,51	3,63 m	83,76	3,66 t
4	Cq	43,88	-	43,92	-
5	CH	48,33	1,23 m	48,50	1,2 d
6	CH <sub>2</sub>	18,90	1,37 m; 1,48 m	19,21	-
7	CH <sub>2</sub>	33,77	1,28 m; 1,64 m	33,69	1,48 m; 1,58 m
8	Cq	40,65	-	40,80	-
9	CH	48,16	1,69 m	48,10	1,67 m
10	Cq	37,72	--	37,74	-
11	CH <sub>2</sub>	24,52	1,90 m; 1,90 m	24,51	1,90 m; 1,90 m
12	CH	123,43	5,29 t	123,54	5,32 t
13	Cq	145,20	-	144,76	-
14	Cq	42,75	-	42,85	-
15	CH <sub>2</sub>	36,24	1,35 m; 1,85 m	36,56	1,47 m; 1,67 m
16	O-CH	75,33	4,45 s	74,54	4,46 t
17	Cq	49,64	-	50,30	-
18	CH	42,14	3,00 dd	42,22	2,96 dd
19	CH <sub>2</sub>	47,73	1,02 m; 2,28 t	47,94	1,05 dd; 2,28 t
20	Cq	31,41	-	31,31	-
21	CH <sub>2</sub>	36,59	1,14 m; 1,93 m	36,56	1,16 m; 1,93 m
22	CH <sub>2</sub>	32,72	1,76 m; 1,90 m	32,09	1,89 m; 1,92 m
23	O-CH <sub>2</sub>	64,97	3,275 m; 3,62 m	65,38	3,305 m; 3,64 dd
24	CH <sub>3</sub>	13,42	0,70 s	13,60	0,739 s
25	CH <sub>3</sub>	16,55	0,983 s	16,68	0,997 s
26	CH <sub>3</sub>	17,85	0,79 s	17,84	0,767 s
27	CH <sub>3</sub>	27,33	1,38 s	27,19	1,35 s
28	COOH	181,28	--	177,09	-
29	CH <sub>3</sub>	33,43	0,87 s	33,31	0,87 s
30	CH <sub>3</sub>	24,94	0,963 s	24,87	0,937 s
3-O-Glicose					
1	CH	105,76	4,39 d ( $J = 8,1$ Hz)	105,71	4,39 d ( $J = 8,0$ Hz)
2	CH	75,68	3,16 t	75,66	3,165 d
3	CH	78,39	3,34 dd	78,33	3,33 m
4	CH	71,60	3,275 m	71,59	3,287 m
5	CH	77,75	3,27 m	77,75	3,265 m
6	CH <sub>2</sub>	62,77	3,67 m; 3,83 dd	62,72	3,68 m; 3,82 m

Quadro 11. Dados espectroscópicos de DEPT,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e COSY dos monossacarídeos da substância LA4.

Carbono	DEPT	$d_{\text{C}}$	$d_{\text{H}}$ mult. ( $J = \text{Hz}$ )	COSY
Arabinose				
1	CH	95,46	A1 - 5,43 d (5,2)	A2
2	CH	77,07	A2 - 3,54 dd	A1; A3
3	CH	76,59	A3 - 3,557 m	A2; A4
4	CH	70,93	A4 - 3,52 m	A3; A5a; A5b
5	$\text{CH}_2$	66,71	A5a - 3,28 d	A4
			A5b - 3,91 m	A4
Ramnose I (')				
1	CH	101,30	R'1 - 5,28 d (1,6)	R'2
2	CH	71,92	R'2 - 3,91 m	R'1; R'3
3	CH	72,36	R'3 3,82 dd	R'2
4	CH	84,30	R'4 - 3,52 m	-
5	CH	68,96	R'5 - 3,71 d	R'6
6	$\text{CH}_3$	18,36	R'6 - 1,31 d	R'5
Xilose				
1	CH	107,04	X1 - 4,48 d (7,7)	X2
2	CH	76,40	X2 - 3,37 dd	X1; X3
3	CH	84,28	X3 - 3,45 m	X2
4	CH	69,90	X4 - 3,52 m	X5a
5	$\text{CH}_2$	67,20	X5a - 3,21 d	X4; X5b
			X5b - 3,86 m	X5a
Ramnose II (")				
1	CH	102,56	R''1 - 5,13 d (1,6)	R''2
2	CH	72,32	R''2 - 3,95 dd	R''1; R''3
3	CH	72,24	R''3 - 3,71 d	R''2; R''4
4	CH	74,05	R''4 - 3,37 d	R''3
5	CH	70,02	R''5 - 4,00 m	R''6
6	$\text{CH}_3$	17,89	R''6 - 1,23 d	R''5

Para determinar a sequência de ligação dos açúcares, foram utilizados os dados obtidos dos espectros HMBC, que apontam as ligações C-H a longa distância (Figuras 38-42). Nestes experimentos pode ser observado um acoplamento entre H-A1 (próton anomérico da arabinose) (d 5,43) com o C-28 (d 177,09) (Figura 38). O C-3 da arabinose (d 76,59) está acoplado com o hidrogênio anomérico da ramnose I R'1 (d 5,28) (Figura 39). O C-4 da ramnose R' (d 84,30) mostrou acoplamento com o hidrogênio anomérico da xilose X1 (d

4,48) (Figura 40). Por fim, nos espectros HMBC foi observado um acoplamento entre o C-3 da xilose (d 84,28) e o hidrogênio anomérico da ramnose II R<sup>1</sup> (d 5,13) (Figura 41).

Estes dados apontam para uma cadeia glicosídica formada por uma ramnose terminal – xilose – ramnose – arabinose – pró-sapogenina. O espectro de massas confirma este dado devido ao fragmento m/z 672, o qual representa a perda de um fragmento composto por uma cadeia tetraglicosídica (ram – xil – ram – ara). Além disso, o pico m/z 579 indica a perda da pró-sapogenina mais a adição de um próton, restando a cadeia de açúcares, a qual, perde mais um fragmento neutro correspondendo a arabinose, resultando no pico m/z 446. Os dados da espectrometria de massas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 3. Caracterização dos íons no espectro de massas por impacto eletrônico da mistura de saponinas LA3 e LA4 obtidas das folhas de *L. alba*.

M = C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>26</sub> , massa molecular 1206.		
Íon	m/z	Intensidade relativa (%)
(M+Na) <sup>+</sup>	1229	100
([M+Na] – Gli) <sup>+</sup>	1050	6,6
([M+Na] – X <sub>2</sub> )	672	6,6
([M+Na] – [X <sub>1</sub> +H]) <sup>+</sup>	579	84,4
([M+Na] – [X <sub>1</sub> +H] – [Ara+H]) <sup>+</sup>	446	3,3

Legenda: X1 = pró-sapogenina, X2 = tetraglicosídeo constituído de ram – xil – ram – ara.

A seqüência de açúcares (ram – xil – ram – ara) está em concordância com a saponina apresentada anteriormente por Correa (2005). Essa seqüência de açúcares é descrita na literatura, principalmente para as saponinas isoladas do gênero *Mimusops* (BURGER *et al.*, 1998; ESKANDER *et al.*, 2006; LAVAUD *et al.*, 1995; SAHU *et al.*, 1995; SAHU *et al.*, 1997).

O padrão de ligação comumente descrito para estes glicosídeos é: a-L-ramnopiranosil-(1 → 3)-β-D-xilopiranosil-(1 → 4)-a-L-ramnopiranosil(1 → 2)- a-L-arabinopiranosil. Entretanto, na LA4 a ligação do C-1 da ramnose I se dá no C-3 da arabinose, ou seja, a-L-ramnopiranosil(1 → 3)- a-L-arabinopiranosil. Este tipo de ligação 1 → 3 é nova para esta seqüência de açúcares (Ara-Ram). A Figura 43 apresenta a cadeia de açúcares, com as correlações apresentadas pelo HMBC para os hidrogênios anoméricos.

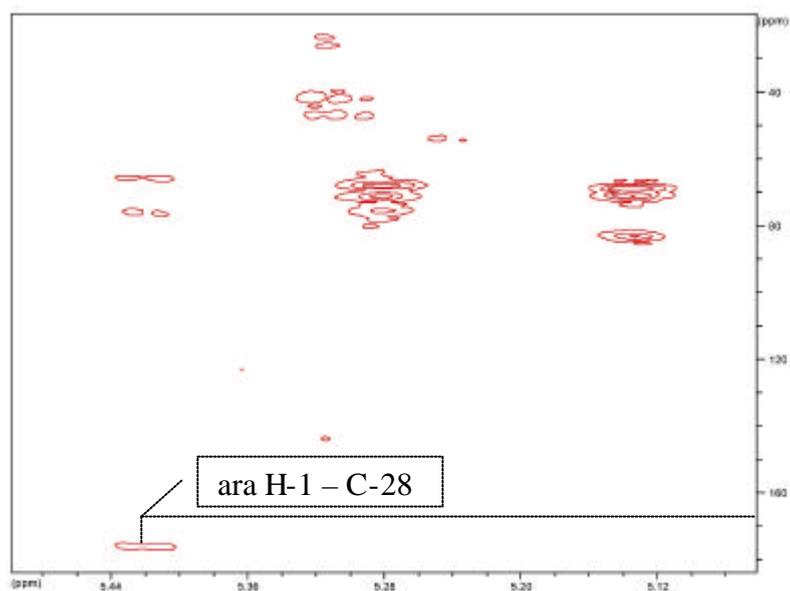


Figura 38. Ampliação 1/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz).  
Destaque para o acoplamento entre o C-28 (d 177,09) e o H anomérico da arabinose (d 5,43)  
evidenciando a ligação deste açúcar ao C-28.

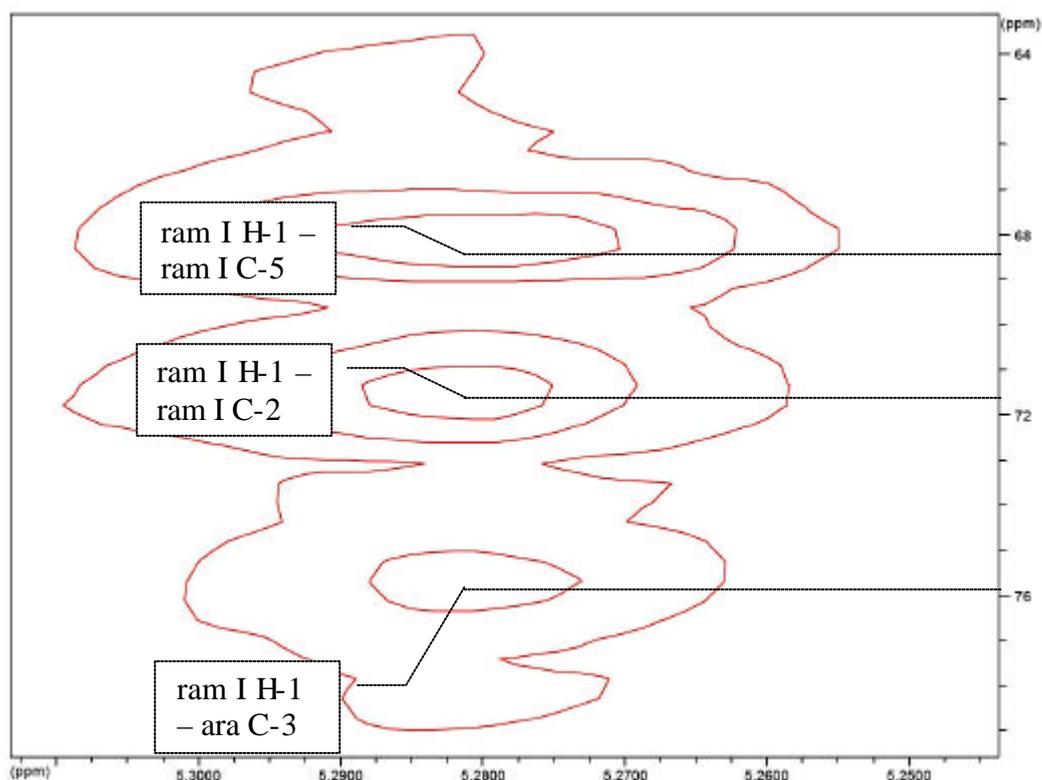


Figura 39. Ampliação 2/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz).  
Destaque para a correlação do C-3 da arabinose (d 76,59) com o H-1 da ramnose I (d 5,28),  
evidenciando a ligação entre a ramnose I e a arabinose através de ligação glicosídica 1<sup>o</sup> - 3.

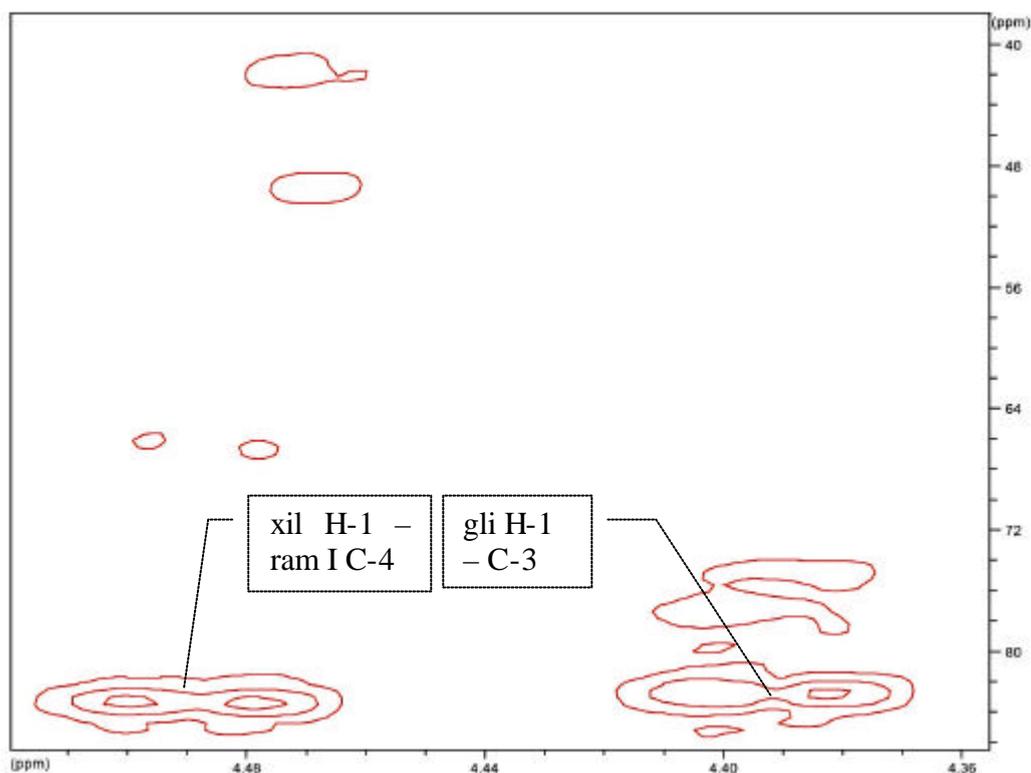


Figura 40. Ampliação 3/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Destaque para o acoplamento entre os prótons anoméricos da xilose (d 5,28) e da glicose (d 4,39), respectivamente com o C-4 da ramnose I (d 84,30) e com o C-3 da aglicona (d 83,76).

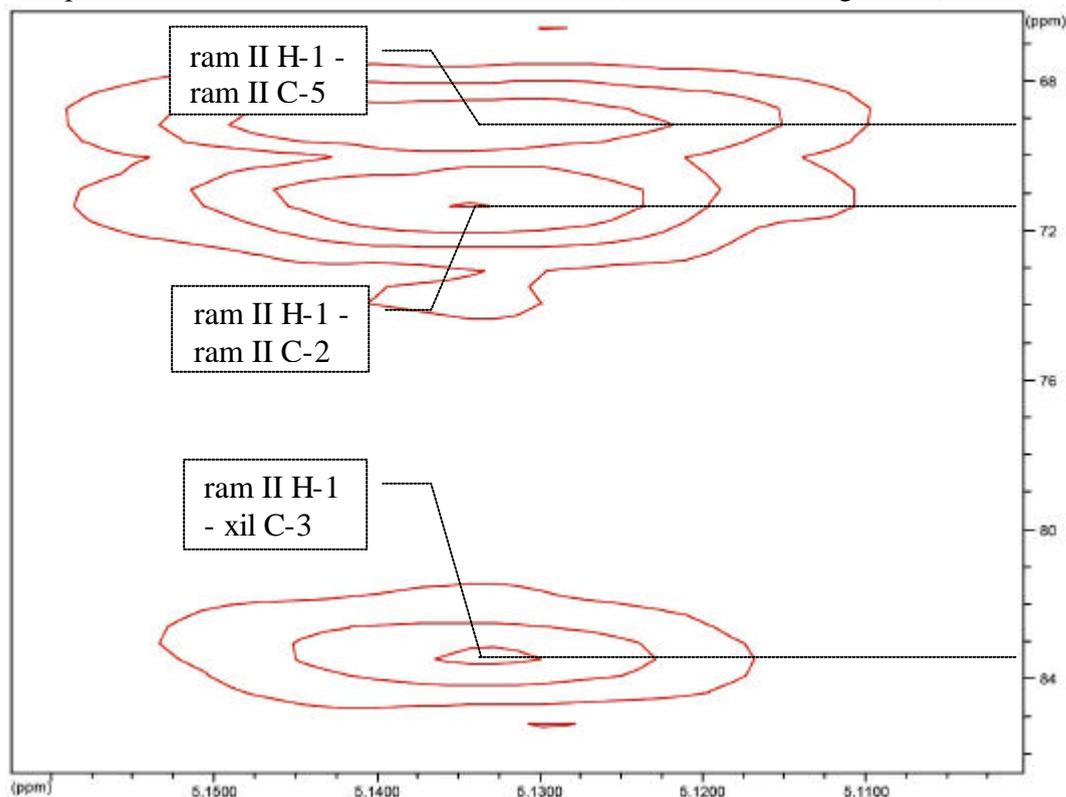


Figura 41. Ampliação 4/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Destaque para o acoplamento entre o próton anomérico da ramnose II (d 5,133) com o C-3 da xilose (d 84,28).

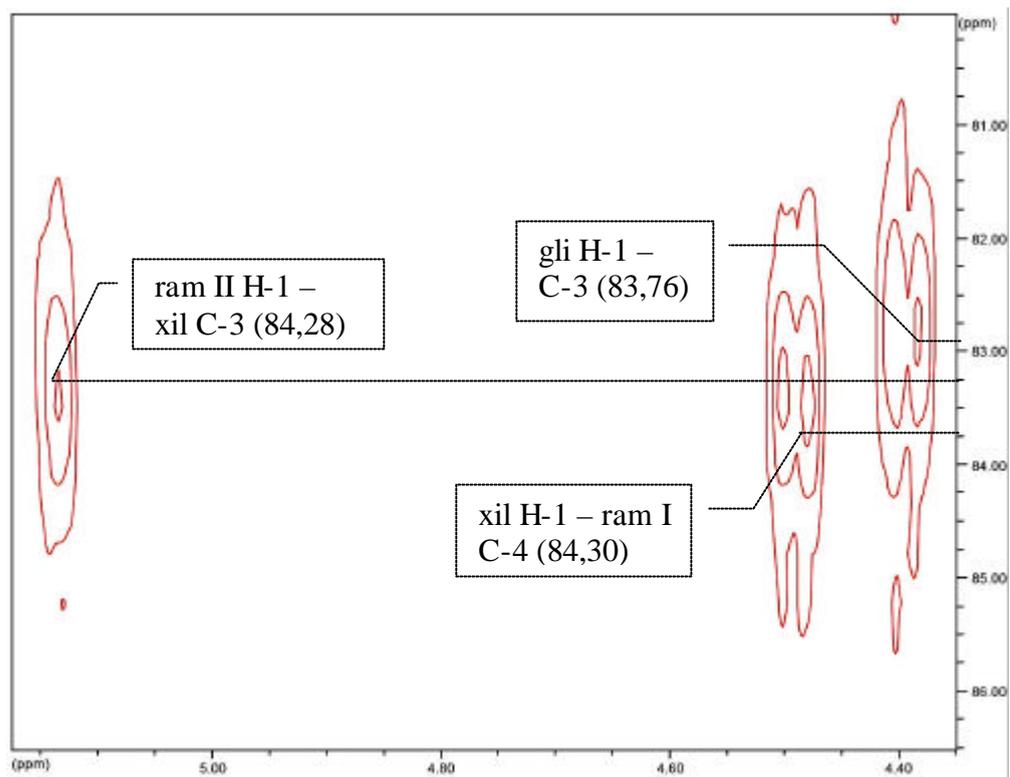


Figura 42. Ampliação 5/5 do experimento HMBC da substância LA4 em MeOD (400 – 100 MHz). Destaque para o acoplamento entre o hidrogênio anomérico da ramnose II (d 5,133) com o C-3 da xilose; do hidrogênio anomérico da ramnose I (d 5,28) com o C-4 da ramnose I e do hidrogênio anomérico da glicose (d 4,39) com o C-3 da aglicona.



Quando esta configuração foi aplicada a um modelo molecular, foi mensurado um ângulo de aproximadamente  $180^\circ$  entre os Ara H-1 e Ara H-2 para a estrutura  $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo na conformação  ${}^4C_1$  cadeira. Projetando-se esse valor na curva de Karplus tem-se uma alta constante de acoplamento de  $J = 9,5$  a  $13,5$  Hz (Figura 44).

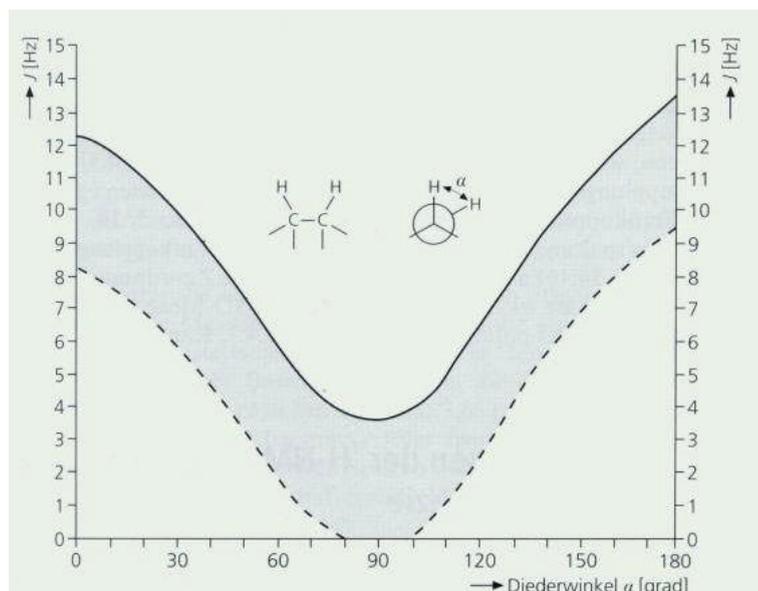


Figura 44. Curva de Karplus. Demonstra a relação do ângulo entre dois hidrogênios vizinhos (eixo X) com a constante de acoplamento (eixo Y). Fonte: Rücker, Neugebauer e Willens (2001), p. 257.

A predominância da conformação  ${}^4C_1$  na arabinose da saponina LA4 pode ser explicada pela substituição O-Ramnose no C-3 da arabinose, já que o C-2 está estericamente impedido, devido à proximidade da aglicona que está O-substituída no C-1 da arabinose.

Portanto, a saponina LA4 foi identificada como o éster glicosídico 28-O-a-L-ramnopiranosil-(1? 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1? 4)-a-L-ramnopiranosil-(1? 3)-a-L-arabinopiranosídeo do ácido 3-O- $\beta$ -glicopiranosil-16a, 23-diidroxi-olean-12-en-28-óico (Figura 45). Este é o primeiro relato desta substância na literatura.

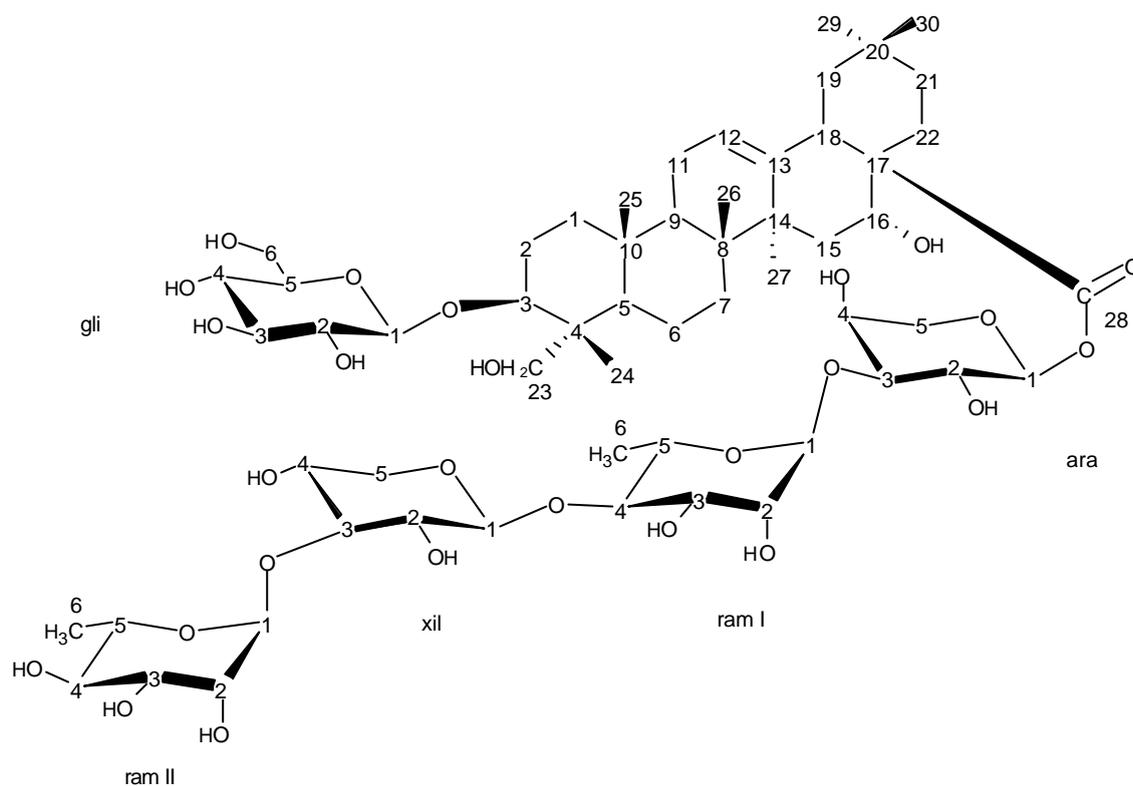


Figura 45. Estrutura proposta para a saponina LA4.

Quando os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY e HMBC da LA4 foram comparados com LA3, previamente descrita por Correa (2005) foi observada uma grande coincidência de valores. Entretanto, algumas diferenças fizeram com que os valores anteriormente atribuídos por Correa (2005) fossem revistos e, assim, correções foram realizadas, com base na pró-sapogenina e na saponina LA4. Foram corrigidas as atribuições nas seguintes posições: gli 4, ara 3, ram I 5 e 6, xil 4 e ram II 5 e 6. As novas atribuições, bem como a comparação entre os valores atribuídos aos carbonos e aos hidrogênios da saponina LA3 e LA4 são apresentadas no Quadro 12.

Quadro 12. Comparação dos dados de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  das saponinas LA3 e LA4.

Carbonos	DEPT	LA3 (CORREA, 2005)		LA4	
		$d_C$	$d_H$ mult. ( $J = \text{Hz}$ )	$d_C$	$d_H$ mult. ( $J = \text{Hz}$ )
Aglicona					
1	CH <sub>2</sub>	39,60	1,61 m; 1,65 m	39,62	0,96 m; 1,62 m
2	CH <sub>2</sub>	26,34	1,90 m; 1,90 m	26,38	1,75 m; 1,93 m
3	CH	83,64	3,64 t	83,76	3,66 t
4	C	43,87	-	43,92	-
5	CH	48,41	1,23 d	48,50	1,2 d
6	CH <sub>2</sub>	19,01	1,47 m; 1,47 m	19,21	?
7	CH <sub>2</sub>	33,68	1,37 m; 1,61 m	33,69	1,48 m; 1,58 m
8	C	40,81	-	40,80	-
9	CH	48,13	1,67 m	48,10	1,67 m
10	C	37,70	-	37,74	-
11	CH <sub>2</sub>	24,50	1,90 m; 1,90 m	24,51	1,90 m; 1,90 m
12	CH	123,69	5,34 t	123,54	5,32 t
13	C	144,69	-	144,76	-
14	C	42,75	-	42,85	-
15	CH <sub>2</sub>	36,41	1,15 d; 1,39 dd	36,56	1,47 m; 1,67 m
16	CH	74,58	4,48 t	74,54	4,46 t
17	C	50,36	-	50,30	-
18	CH	42,10	3,02 dd	42,22	2,96 dd
19	CH <sub>2</sub>	47,66	1,04 d; 2,27 t	47,94	1,05 dd; 2,28 t
20	C	31,30	-	31,31	-
21	CH <sub>2</sub>	36,41	1,43 dd; 1,75 m	36,56	1,16 m; 1,93 m
22	CH <sub>2</sub>	31,86	1,90 m; 1,90 m	32,09	1,89 m; 1,92 m
23	CH <sub>2</sub>	65,18	3,36 d; 3,62 d	65,38	3,305 m; 3,64 dd
24	CH <sub>3</sub>	13,51	0,72 s	13,60	0,739 s
25	CH <sub>3</sub>	16,65	0,99 s	16,68	0,997 s
26	CH <sub>3</sub>	17,98	0,77 s	17,84	0,767 s
27	CH <sub>3</sub>	27,30	1,37 s	27,19	1,35 s
28	C	177,05	-	177,09	-
29	CH <sub>3</sub>	33,33	0,87 s	33,31	0,87 s
30	CH <sub>3</sub>	25,12	0,96 s	24,87	0,937 s
3-O-açúcar					
Glicose					
1	CH	105,66	4,40 d (7,7)	105,71	4,39 d (8,0)
2	CH	75,62	3,17 t	75,66	3,165 d
3	CH	78,30	3,35 dd	78,33	3,33 m
4	CH	<b>71,56*</b>	<b>3,29 m</b>	<b>71,59</b>	<b>3,287 m</b>
5	CH	77,70	3,27 m	77,75	3,265 m
6	CH <sub>2</sub>	62,72	3,70 m; 3,81 d	62,72	3,68 m; 3,82 m

28-O-açúcares					
Arabinose					
1	CH	94,00	5,60 d (3,8)	95,46	5,43 d (5,2)
2	CH	75,75	3,77 dd	77,07	3,54 dd
<b>3</b>	<b>CH</b>	<b>71,20*</b>	<b>3,86 m</b>	<b>76,59</b>	<b>3,557 m</b>
4	CH	67,02	3,82 m	70,93	3,52 m
5	CH <sub>2</sub>	63,76	3,50 d; 3,89 m	66,71	3,28 d; 3,91 m
Ramnose I (°)					
1	CH	101,35	5,03 d (1,4)	101,30	5,28 d (1,6)
2	CH	72,12	3,85 m	71,92	3,912 m
3	CH	72,38	3,84 m	72,36	3,816 dd
4	CH	83,44	3,55 m	84,30	3,525 m
<b>5</b>	<b>CH</b>	<b>68,99*</b>	<b>3,68 m</b>	<b>68,96</b>	<b>3,706 d</b>
<b>6</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>18,13*</b>	<b>1,29 d</b>	<b>18,36</b>	<b>1,31 d</b>
Xilose					
1	CH	106,55	4,53 d (7,7)	107,04	4,48 d (7,7)
2	CH	76,25	3,34 dd	76,40	3,37 dd
3	CH	84,12	3,45 m	84,28	3,45 m
<b>4</b>	<b>CH</b>	<b>69,88*</b>	<b>3,53 m</b>	<b>69,90</b>	<b>3,52 m</b>
5	CH <sub>2</sub>	67,13	3,18 d; 3,82 m	67,20	3,21 d; 3,86 m
Ramnose II (°)					
1	CH	102,51	5,13 d (1,6)	102,56	5,133 d (1,6)
2	CH	72,28	3,94 dd	72,32	3,946 dd
3	CH	72,23	3,71 m	72,24	3,71 d
4	CH	74,00	3,38 m	74,05	3,37 d
<b>5</b>	<b>CH</b>	<b>70,00*</b>	<b>3,99 dd</b>	<b>70,02</b>	<b>3,995 m</b>
<b>6</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>17,87*</b>	<b>1,23 d</b>	<b>17,89</b>	<b>1,23 d</b>

\* Os valores em negrito foram corrigidos.

A principal diferença encontrada entre as saponinas LA3 e LA4 está nas atribuições dos deslocamentos dos carbonos e hidrogênios da arabinose. Na saponina LA4, todos os carbonos estão deslocados para a região de desblindagem. Além disso, a constante de acoplamento do H-1 da arabinose da LA4 é de  $J = 5,2$  Hz, enquanto que LA3 apresenta  $J = 3,8$  Hz.

Uma constante de acoplamento de 3,8 Hz (Ara H-1 – LA3) sugere a configuração a-L-arabinopiranosídeo na conformação  ${}^1C_4$  (ISHII *et al.*, 1981). Quando esta conformação, na forma de cadeira, é construída no modelo molecular, observa-se com o ângulo entre Ara H-1 e Ara H-2 é de aproximadamente 80-90°, que, segundo a curva de Karplus, confere um valor de  $J = 0-4$  Hz. Assim, a conformação  ${}^1C_4$  na saponina LA3 pode ser explicada pela substituição O-Ramnose no C-2 da arabinose, já que a ligação nesse carbono aumenta a proporção de arabinopiranosídeos na conformação  ${}^1C_4$  (ISHII *et al.*, 1981). A prova definitiva

de que esta arabinose da saponina LA3 está na conformação  ${}^1C_4$  foi obtida no espectro COSY, em que foi observado um acoplamento W entre o Ara H-3 (d 3,86) e o Ara H-5a (d 3,50) (Figura 47). Este tipo de acoplamento somente pode ser encontrada para a arabinose na conformação  ${}^1C_4$  e não para a conformação  ${}^4C_1$ , conforme demonstrado na Figura 46 (MASSIOT *et al.*, 1991).

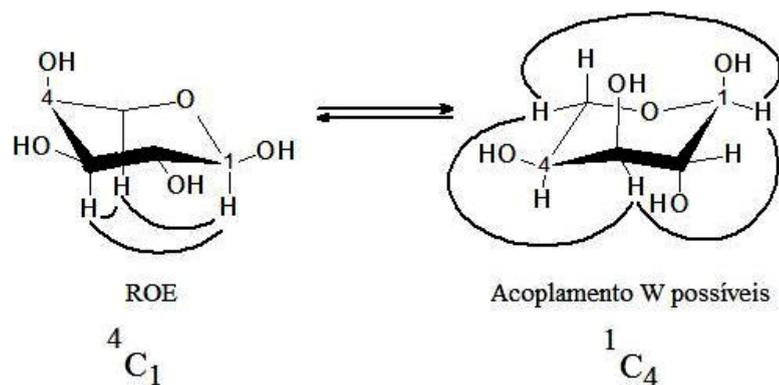


Figura 46. Equilíbrio entre as conformações  ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$  para a-L-arabinose.

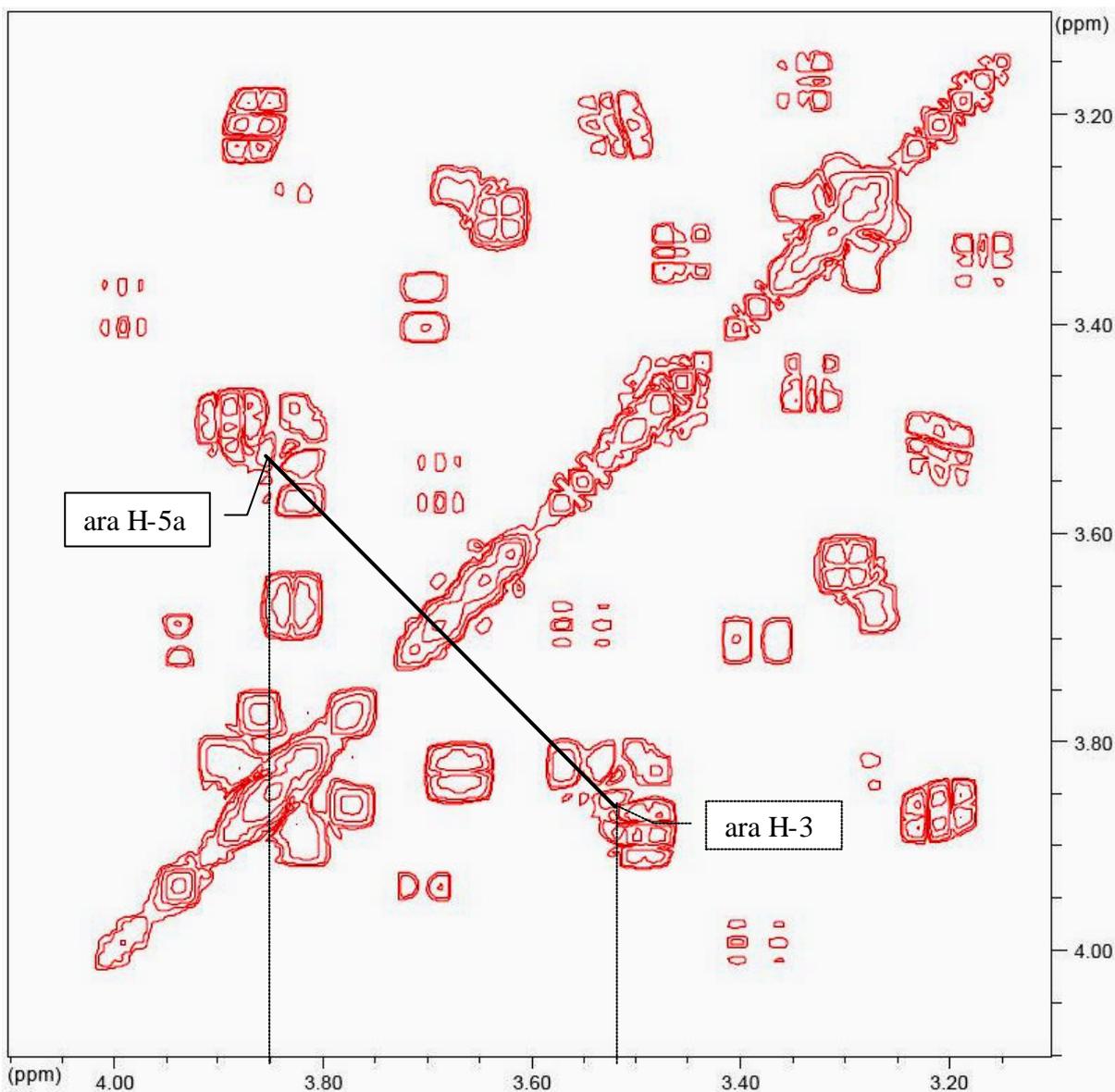
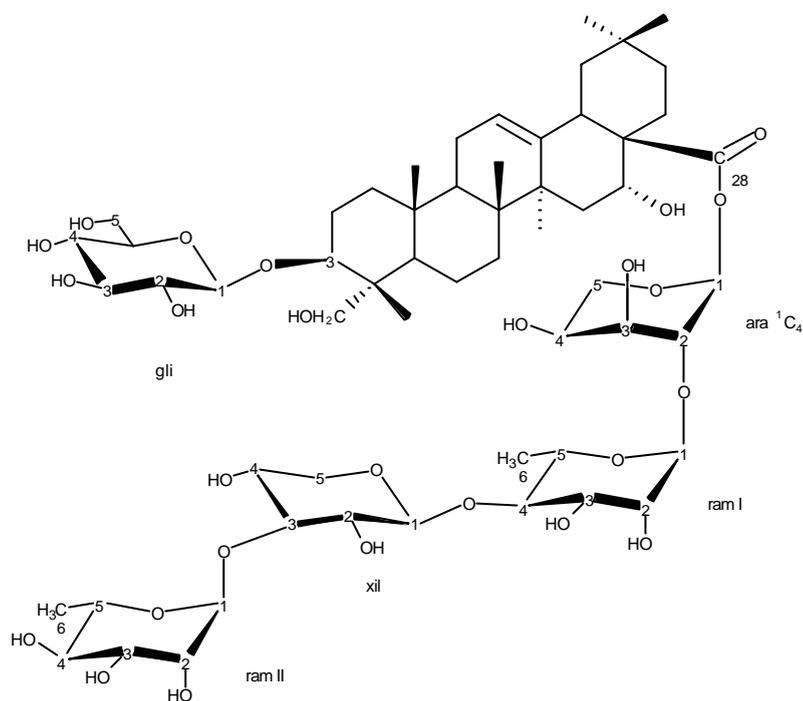


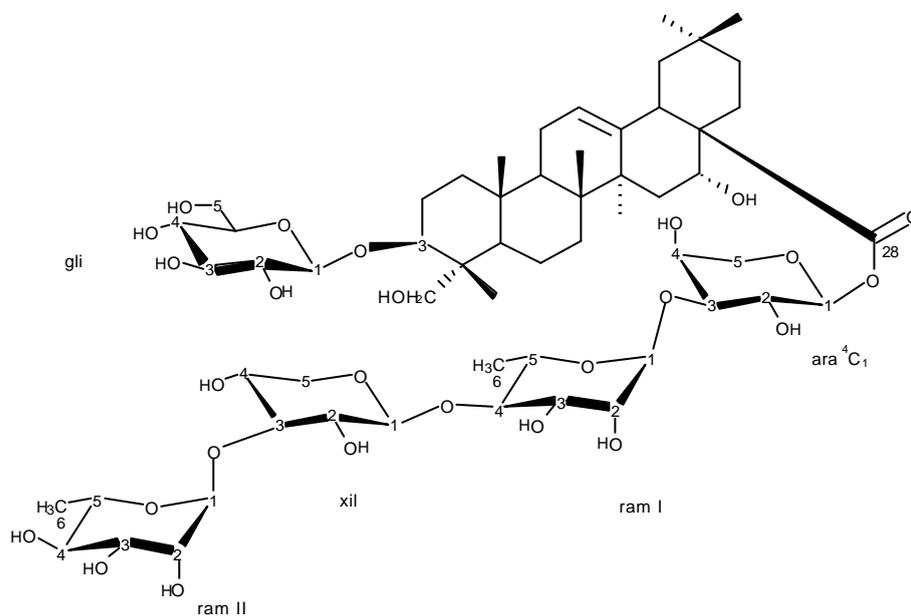
Figura 47. Ampliação do experimento COSY da saponina LA3 em MeOD a 400 MHz. Destaque para o acoplamento W entre o hidrogênio 3 da arabinose e o hidrogênio 5a da arabinose.

Assim,  $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo na conformação  ${}^1C_4$  favorece a ligação da ramnose no C-2 e apresenta uma constante de acoplamento menor que o  $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo de conformação  ${}^4C_1$ , o qual favorece a ligação da ramnose no C-3.

Na Figura 48 são mostradas as duas estruturas, LA3 e LA4, comparadas, nas suas respectivas conformações.



Estrutura da saponina LA3



Estrutura da saponina LA4.

Figura 48. Comparação das estruturas das saponinas LA3 e LA4.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram isolados e identificados compostos polares das folhas secas de *Lippia alba* coletadas na Costa da Lagoa, Florianópolis, SC, no período da floração em abril de 2005.

Até agora, a maior parte dos trabalhos publicados com essa planta foi realizada utilizando-se o óleo volátil, tanto no que se refere aos estudos químicos quanto aos farmacológicos. Estes estudos sugerem a existência de, pelo menos, 3 quimiotipos para esta espécie, os quais já foram bem caracterizados (MATOS, 1996b; TAVARES *et al.*, 2005). Considerando esses trabalhos, o material vegetal utilizado neste trabalho foi caracterizado, por meio de cromatografia em camada delgada, como o quimiotipo I, rico em citral e mirceno.

Por outro lado, poucos trabalhos têm tratado dos constituintes polares dessa espécie, apesar de sua ampla utilização em todo o Brasil. Etnofarmacologicamente, sua utilização se dá principalmente na forma de chá, o que ressalta a importância dos constituintes hidrossolúveis para os efeitos farmacológicos. Popularmente o chá é utilizado como agente antiespasmódico, analgésico, carminativo, sedativo, ansiolítico, estomáquico e expectorante (SILVEIRA; PESSOA, 2005). Vale destacar que a espécie *L. alba* é citada em vários estudos etnobotânicos e, recentemente, está incluída numa coletânea de monografias publicada recentemente sob o nome ‘*Monografias de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas*’ (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005), o que destaca a importância sócio-econômica e cultural desta espécie.

Os resultados obtidos nesta dissertação foram o isolamento do verbascosídeo e da saponina identificada como o éster glicosídico 28-*O*-a-L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-a-L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-a-L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-16a, 23-diidróxi-olean-12-en-28-óico, codificada como LA3, previamente relatados por Correa (2005) e da saponina identificada como o éster glicosídico 28-*O*-a-L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-a-L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-a-L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-16a, 23-diidróxi-olean-12-en-28-óico, codificada como LA4, relatada pela primeira vez na literatura. Para a elucidação de LA4, foi realizada uma hidrólise básica da saponina e isolada, assim, a pró-sapogenina, que também foi elucidada. Cromatograficamente, foi detectada a presença de outras saponinas mais polares. Essas saponinas, codificadas como LA5, LA6 e LA7, foram isoladas e realizados

experimentos de RMN. No entanto, devido à pureza ou quantidade obtidos, não foi possível realizar a sua elucidação.

Na literatura, apenas dois trabalhos relatam o isolamento e a identificação de saponinas para as espécies da família Verbenaceae. Toyota, Msonthi e Hostettmann (1990) identificaram na espécie *Clerodendrum wildii* Moldenke a Mi-Saponina A, identificada como o éster glicosídico 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,23-tetraidróxi-olean-12-en-28-óico. O estudo demonstrou a atividade molusquicida contra *Biomphalaria glabrata* e antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* da Mi-Saponina A. Hiradate e colaboradores (1999) isolaram a partir das folhas de *Duranta repens* três novas saponinas, que foram chamadas de durantanina I, II e III e identificadas como o éster 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3')- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-poligalácico (durantanina I), o éster 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-poligalácico (durantanina II) e o éster 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-poligalácico (durantanina III). Para o gênero *Lippia*, Forestieri e colaboradores (1996) relataram a presença de saponinas caracterizadas com base em análises fitoquímicas preliminares. Assim, a família Verbenaceae, que conta com 100 gêneros e aproximadamente 2.000 espécies, apresenta um potencial para a pesquisa fitoquímica, tanto de constituintes voláteis, quanto de constituintes fixos polares.

Para dar continuidade dessa linha de investigação, considera-se de especial interesse:

- analisar as frações polares, principalmente a fração n-BuOH, para o isolamento e elucidação de outras saponinas;
- isolar quantidades maiores de saponinas a partir da fração n-BuOH para a realização de ensaios biológicos;
- estudar os diversos quimiotipos de *Lippia alba* e avaliar diferenças quali- e quantitativas nas frações polares.

## 7 CONCLUSÕES

• A partir da fração *n*-BuOH, obtida por partição do macerado hidroalcoólico das folhas secas de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils, foram isolados e caracterizados o fenilpropanóide verbascosídeo e a saponina codificada como LA3 e identificada como o éster glicosídico 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-16a, 23-diidróxi-olean-12-en-28-óico, previamente isolados por Correa (2005). As atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  relacionadas com a glicose em C-3 e com a cadeia de açúcares em C-28 foram corrigidas para as seguintes posições: glicose (posição 4), arabinose ( $\beta$ ), ramnose I (5 e 6), xilose (4) e ramnose II (5 e 6);

• A partir da mesma fração foi isolada uma nova saponina (LA4), cuja estrutura foi elucidada através de RMN mono e bi-dimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, RCT) e de espectrometria de massas, como sendo o éster glicosídico 28-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo do ácido 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-16a, 23-diidróxi-olean-12-en-28-óico.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chemical Research**, v. 93, p. 2189-2206, 1993.
- AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Levantamento da flora medicinal da Paraíba e triagem fitoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 72-76, 1990.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMOES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374-378, 2005.
- BARBOSA, F.G.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n.11, p. 819-821, 2006.
- BARBOSA, F.G.; LIMA, M. A.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignments of new [C7-O-C7"]-biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 334-338, 2005.
- BORGES, D. B. **Comparação de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle de qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal**. Florianópolis, 2005. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. 167 p.
- BURGER, I.; BURGER, B. V.; ALBRECHT, C. F.; SPIES, H. S. C.; SÁNDOR, P. Triterpenoid saponins from *Becium grandiflorum* var. *obovatum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2087-2095, 1998.
- CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, A. V.; OVANDO, A. E.; SAMOYOA, B. E. Plants used in Guatemala for treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 193-208, 1991.
- CÓRDOVA, C. M. M.; DEMÉTRIO, S. **Uso de ervas medicinais e fitoterápicos na comunidade da Costa da Lagoa, Florianópolis**. Monografia de Conclusão de estágio (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.
- COREA, G.; IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; CAMMARERI, M.; CONICELLA, C.; LAZZA, C.; BIFULCO, M. Astersedifolioside A-C, three new olean-type saponins with antiproliferative activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4909-4915, 2004.
- CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt.; Wilson erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.
- CORREA, M. M. **Estudo fitoquímico da fração n-butanólica de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils.** Florianópolis, 2005. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. 88 p.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 9. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, 1986.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 235-239, 1991.

ELISABETSKY, E.; DE SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 6, p. 107-122.

ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; POUNY, I.; SOLIMAN, H. S. M.; ABDEL-KHALIK, S. M.; MAHMOUD, I. I. Saponins from the seeds of *Mimusops laurifolia*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1793-1799, 2006.

FALKENBERG, M. B.; DOS SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 10, p. 229-246.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 12, p. 263-288.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Parte I.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Parte I.

FORESTIERI, A. M.; MONFORTE, M. T. ; RAGUSA, S. ; TROVATO, A. ; IAUK, L. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plants extracts used in African medicine. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 100-106, 1996.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. 1 ed. Curitiba: Abifito, 2005, p. 61-77.

GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 173-187, 1991.

GOMES, E. C.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A.; WEISS FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quimiossistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 5, p. 91-106.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 1, p. 13-28.

GUPTA, M. P. (Ed). **270 Plantas medicinales iberoamericanas**. CYTED. Santa Fé de Bogotá: Editorial Presencia, 1995. p. 557-567.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 63-80, 1992.

HIRADATE, S.; YADA, H.; ISHII, T.; NAKAJIMA, N.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SUGIE, H.; ZUNGSONTIPORN, S.; FUJII, Y. Three plant growth inhibiting saponins from *Duranta repens*. **Phytochemistry**, v. 52, 1223-1228, 1999.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry & pharmacology of natural products: saponins**. Cambridge/New York: Cambridge University Press, 1995. 548 p.

ISHII, H.; KITAGAWA, I.; MATSUSHITA, K.; SHIRAKAWA, K.; TORI, K.; TOZYO, T.; YOSHIKAWA, M.; YOSHIMURA, Y. The configuration and conformation of the arabinose moiety in platycodins, saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*, and Mi-saponins from *Madhuca longifolia* based on carbon-13 and hydrogen-1 NMR spectroscopic evidence: the total structures of the saponins. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 16, p. 1529-1532, 1981.

KLÜEGER, P. A.; DAROS, M. R.; SILVA, R. M.; FARIAS, M. R.; DE LIMA, T. C. M. Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae). In: INTERNATINAL JOINT SYMPOSIUM – IOCD/CYTED, 1997, Panamá. **Chemistry, biological, and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas**. Panamá, 1997.

KLÜEGER, P. A.; TEUBER, C. A.; DAROS, M. R.; FARIAS, M. R.; DE LIMA, T. C. M. Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae). SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XIV, Florianópolis, 1996. **Resumos...** Florianópolis, 1996, p. 118.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BECCHI, M.; MISRA, G.; NIGAM, S. K. Saponins from three species of *Mimusops*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 887-893, 1996.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial activity os essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 82-82, 1990.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Review article. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa – SP, 2002. p. 488.

MARQUES DE CARVALHO, R. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown (Falsa Melissa) – Verbenaceae**. Florianópolis, 2006. Dissertação de

Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. 96 p.

MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; BESSON, V. ; MEN-OLIVIER, L. L. ; BINST, G. V. Saponins from aerial parts of alfafa (*Medicago sativa*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 78-82, 1991.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) – Parte I – Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 2, p. 65-67, 1996a.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) – Parte II – Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 4, p. 137-141, 1996b.

MENTZ, L. A; BORDIGNON, S. A L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed.da UFSC, 2003, cap. 9, p. 211-228.

MING, L. C. Rooting of cuttings of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.–Verbenaceae. **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 643–646, 1996.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

PAGLIARINI, W. S. M. **Levantamento das plantas de uso medicinal do distrito de Ribeirão da Ilha**. Florianópolis, 1995. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1969. p. 40.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G. G. **Instrumentelle pharmazeutische Analytik**: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2001. p. 257.

SAHU, N. P.; KOIKE, K.; JIA, Z.; NIKAIDO, T. Novel triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 48, p. 13435-13446, 1995.

SAHU, N. P.; KOIKE, K.; JIA, Z.; NIKAIDO, T. Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1145-1149, 1997.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed.da UFSC, 2003, cap. 27, p. 711-740.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed.da UFSC, 2003, cap. 15, p. 371-400.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; BEGUM, S.; NAEED, A., 1990 apud ATHAYDE, M. L. **Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero Ilex**. Porto Alegre, 1993. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 183 p.

SILVEIRA, E. R; PESSOA, O. D. L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN <sup>13</sup>C**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005. p. 207-213.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (Falsa-melissa) Verbenaceae**. Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. 173 p.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M O. *et al.* (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003, cap. 13, p. 289-326.

TAN, N.; ZHOU, J. ZHAO, S. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-*O*-bisdesmosides (1962-1997). **Phytochemistry**, v. 52, p. 152-192, 1999.

TANIGUCHI, T., MONDE K., MIURA N., NISHIMURA, S.-I. A characteristic CH band in VCD of methyl glycosidic carbohydrates. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 8451-8453, 2004.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TOYOTA, M.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. A molluscicidal and antifungal triterpenoid saponin from the roots of *Clerodendrum wildii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2849-2851, 1990.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J. Volatile leaf oil of the “Licorice Verbena” [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown ex Britton and P. Wils. var. *carterae* Moldenke] from the North American Herb Trade. **Journal Essential Oil Research**, v. 11, n. 3, p. 314–316, 1999.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; DE LIMA, T. C. M.; VIANA, G. S. B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 127-133, 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2 ed. Springer, 1996. 384 p.

**WORLD** Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva: WHO, 1998.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207-215, 2002.

ZHOU, Y.-H., 1988 apud TAN, N.; ZHOU, J. ZHAO, S. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-*O*-bisdesmosides (1962-1997). **Phytochemistry**, v. 52, p. 152-192, 1999.