



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022

ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE *Lippia thymoides*

Laryssa Thaylle Santos da Silva¹; Angélica Maria Lucchese²; Acsa Oliveira Magalhães³ e Wesley de Jesus Santos⁴

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: laryssathaylle@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
3. Participante do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: acsomagalhaes@hotmail.com
4. Participante do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: wesley.santos.biomed@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia thymoides*; cromatografia; metabólitos

INTRODUÇÃO

A investigação de metabólitos ativos em fontes vegetais é de grande importância para o desenvolvimento de novos medicamentos (Desai & Tatke, 2019). Segundo Magalhães (2018) diversas substâncias isoladas de plantas medicinais destacam-se por sua relevante atividade antiespasmódica, tais como, derivados de terpenos, flavonoides, alcaloides, lignanas e esteroides. Partindo desse pressuposto, a pesquisa por compostos naturais com ação espasmolítica tem sido uma linha de pesquisa promissora (Correia, 2013; Heghes *et al.*, 2019). Dentre a variedade de plantas medicinais de interesse farmacológico presentes no semiárido Baiano, pode-se destacar as do gênero *Lippia*, pertencente à família Verbenaceae, com 89 representantes no Brasil (Oliveira, 2014; Salimena & Cardoso, 2020). Dentre eles, existe a espécie *Lippia thymoides*, conhecida popularmente por alecrim-do-mato, nativa, endêmica do Brasil, comumente encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do país (Silva *et al.* 2015). A mesma tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa e apresenta propriedades antiespasmódica, antipirética, antimicrobiana, antisséptica e antinociceptiva (Silva, 2012; Pinto *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015). Os extratos e frações dos caules e folhas desta espécie, assim como seu óleo essencial, demonstraram atividade espasmolítica em traqueia de cobaia, com destaque para fração diclorometano do extrato metanólico das folhas (Silva, 2012). Um ensaio in vivo em traqueia de cobaia para atividade espasmolítica, com extrato bruto, fração em diclorometano e substâncias isoladas e/ou misturadas da fração, demonstrou uma maior potência antiespasmódica para a mistura de jaceosidina e hispidulina, duas flavonas isoladas (Magalhães, 2018). Outro estudo com extratos brutos e frações da espécie em modelo de aorta isolada de rato, objetivando a sinalização de um possível mecanismo de ação para atividade vasorrelaxante demonstrou que a fração diclorometânica de *L. thymoides* foi a mais potente na promoção de vasorelaxamento, atuando por meio de vias como a ativação de canais de KV e diminuição do influxo de Ca²⁺ intracelular (Paiva *et*

al., 2020). Desta forma, diante do grande potencial dos produtos naturais destaca-se a importância de isolar, identificar e caracterizar possíveis substâncias bioativas da fração em acetato de etila e em diclorometano de *Lippia thymoides*.

METODOLOGIA

A avaliação do perfil cromatográfico da fração em diclorometano e acetato de etila foi por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica (TLC sílica gel 60 F254, Merck®) com auxílio de reveladores específicos NP/PEG (para compostos fenólicos) e AS (para terpenos e esteróides) para determinação das classes de metabólitos secundários (Wagner & Blatt, 1995) e seleção dos eluentes mais adequados para a separação cromatográfica. Na separação das substâncias da fração em Acetato de etila o sistema hexano/acetona (6:4) foi o mais eficiente e na separação das substâncias da fração em diclorometano, o sistema diclorometano/acetona (9:1) foi o mais eficiente.

Em relação a purificação e isolamento de metabólitos, a fração em acetato de etila (A) das folhas de *L. thymoides* já estava disponível no laboratório e foi obtida previamente por partição líquido-líquido do extrato metanólico, com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila). A fração A foi submetida a uma coluna cromatográfica com 20,12 gramas do extrato em acetato de etila e 201 gramas de sílica gel 60 (<0,063 nm) (proporção amostra:adsorvente de 1:10), com hexano e acetona como eluentes, com misturas de polaridade crescente, originando 127 frações. A fração 46-59 (m = 2,52 g) e rotulada como AD, oriunda de separação cromatográfica anteriormente realizada da fração em acetato de etila foi selecionada para a purificação em cromatografia em coluna com sílica gel 60 (<0,063 nm), na proporção 1:100 (amostra/adsorvente), empregando hexano, acetona e metanol como eluentes com misturas de polaridade crescente, levando a 343 frações.

A fração diclorometânica (D) das folhas de *L. thymoides* foi submetida a uma coluna cromatográfica com 20 gramas do extrato diclorometânico e 202 gramas de sílica (proporção amostra:adsorvente de 1:10), com hexano e acetona como eluentes, com misturas de polaridade crescente, levando a 88 frações. A fração 64-67 (m = 1,46 g), rotulada como DI, foi selecionada pelo perfil cromatográfico e submetida a cromatografia em coluna (sílica gel 60, mesh<0,063) na proporção de 1:100 (sílica:adsorvente) e eluída com hexano, acetona e metanol, originando 404 frações. A fração 236-300 (m = 0,22 g), oriunda do fracionamento de DI e identificada como DI8, foi selecionada para a cromatografia em coluna (sílica gel 60, mesh<0,063) na proporção de 1:100 (sílica:adsorvente) e eluída com diclorometano, acetona e metanol, com misturas de polaridade crescente, originando 184 frações. A fração D-P6 (m = 0,47 g), oriunda da precipitação da subfração 61 ocorrida após a purificação cromatográfica da fração em diclorometano (D) foi submetida a cromatografia em coluna (sílica gel 60, mesh<0,063) na proporção de 1:100 (sílica:adsorvente) e eluída com diclorometano, acetona e metanol, com misturas de polaridade crescente, originando 173 frações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da separação cromatográfica em coluna da fração de *L. thymoides* em acetato de etila (A) foram obtidos 20 grupos (AA-AT), após a análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A fração AD (2,52g) foi selecionada para uma nova separação

cromatográfica em coluna e suas frações resultaram em 21 grupos (AD1-AD21). Alguns grupos dessas frações apresentaram precipitados, os quais foram lavados com acetona e separados do seu sobrenadante (AD13-P1, AD17-P1, AD17-P2, AD17-P3, AD18-P1, AD18-P2). Destes, AD17-P1 (0,047g), AD17-P2 (0,0085g), AD17-P3 (0,0078g), AD18-P1 (0,1737g) e AD18-P2 (0,02g), de acordo com a CCD apresentaram apenas uma mancha, e foram encaminhadas a análise por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a identificação e elucidação das substâncias.

A partir do fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano (D), foram obtidos 15 grupos (DA- DO), através da análise por CCD. Algumas das 88 frações apresentaram precipitados, os quais foram lavados com acetona separando o sólido e o sobrenadante (D-P1 (21); D-P2 (35-36); D-P3 (37-38); D-P4 (52); D-P5 (58-59); D-P6 (61); D-P7 (64-65); D-P8 (70); D-P9 (71); D-P10 (72)). Destas, as frações D-P1 (0,016g), D-P5 (0,0683g), D-P8 (0,0071g), D-P9 (0,0292g) e D-P10 (0,0317g) foram encaminhadas para análise por RMN para identificação estrutural.

De acordo com o estudo realizado por Magalhães (2018), uma mistura de duas flavonas (jaceosidina e hispidulina) foi isolada da fração diclorometânica de folhas de *Lippia thymoides*, a qual demonstrou potencial espasmolítico. A partir deste dado, as frações DA-DO foram comparadas frente a essa mistura, identificada como C5-C9 (jaceosidina e hispidulina). Diante do interesse do grupo em isolar estas substâncias em maior quantidade, e de acordo com os dados de CCD, a fração DI (1,46 g), foi selecionada para dar continuidade a purificação por cromatografia em nova coluna.

A partir de DI (1,46 g) foram obtidos 17 grupos (DI1-DI17). Alguns grupos dessas frações apresentaram precipitados, os quais foram lavados com acetona separando o sólido e o sobrenadante (DI8-P1 (271-289); DI8-P2 (271-289); DI8-P3 (290-300)). Destes precipitados, DI8-P1 (0,0038g) e DI8-P2 (0,008g), segundo a análise por CCD estão purificadas e foram enviadas para análise em RMN.

Todos os grupamentos DI1-DI17 foram submetidas à CCD em comparação com a mistura de flavonoides C5-C9 (jaceosidina e hispidulina). Foi possível observar que fração DI8 (0,2218 g) possuía a mistura C5-C9 mais purificada e portanto, uma nova coluna cromatográfica foi realizada com essa fração.

A partir de DI8 (0,2218 g) obtiveram-se 5 grupos (DI8A – DI8E). A partir da análise por CCD, as frações DI8A (0,0529g), DI8B (0,0028g), DI8D (0,0023g) e DI8E (0,1189g) foram enviadas para avaliação por RMN, pois apresentaram apenas uma mancha.

Notou-se também que a fração D-P6 (0,4764g), precipitado da primeira coluna em diclorometano, possuía apenas duas substâncias com resolução elevada, uma delas semelhante a mistura C5-C9, sendo um indicativo de facilidade para separação por coluna cromatográfica. Sendo assim, foi realizada uma coluna com a amostra e pelo fracionamento cromatográfico de D-P6, obtiveram-se 9 grupos (D-P6-1 a D-P6-9). A partir das análises cromatográficas, D-P6-2 (0,0304g), D-P6-3 (0,0115g), D-P6-8 (0,0012g) e D-P6-9 (0,0046g) foram selecionadas para análise em RMN, pois estão purificadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas 20 substâncias, que foram encaminhadas para análise por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a identificação e elucidação das mesmas.

Cinco substâncias foram oriundas da fração em acetato de etila (AD17-P1 a P3 e AD18-P1 a P2) e 15 da fração em diclorometano (D-P1, D-P5, D-P8, D-P9, D-P10, DI8-P1, DI8-P2, DI8A, DI8B, DI8D, DI8E, D-P6-2, D-P6-3, D-P6-8 e D-P6-9).

REFERÊNCIAS

- CORREIA, A. C. C. 2013. Estudo comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl. Univ. Federal da Paraíba, DSc tese.
- DESAI, S.; TATKE, P. 2019. Phytochemical Markers: Classification, Applications and Isolation. *Current Pharmaceutical Design*. 25(22):2491-2498.
- HEGHES, S. C.; VOSTINARU, O.; RUS, L. M.; MOGOSAN, C.; IUGA, C. A.; FILIP, L. 2019. Antispasmodic Effect of Essential Oils and Their Constituents: A Review. *Molecules*. 24(9):1675.
- MAGALHÃES, A. O. 2018. Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae). Univ. Estadual de Feira de Santana, MSc diss.
- OLIVEIRA, A. R. M. F. 2014. Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia*. Univ. Estadual de Feira de Santana, DSc tese.
- PAIVA, G. O.; BRITO, B. C.; MENEZES, P. M.N.; RIBEIRO, L. A. A.; RIBEIRO, F. P. R. A.; PEREIRA, E. C. V.; ROLIM, L. A.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. S. 2020. Vasorelaxant effect of the dichloromethane fraction from *Lippia thymoides* involves voltage-gated potassium channels and the suppression of intracellular calcium in rat aortae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 30:848-853.
- PINTO, C. D. A. P.; RODRIGUES, V. D.; PINTO, F. D. A. P.; PINTO, R. D. A. P.; UETANABARO, A. P.; PINHEIRO, C. S.; GADEA, S. F.; SILVA, T. R.; LUCCHESI, A. M. 2013. Antimicrobial activity of lippia species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid Based Complement Alternat Med.*
- SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. 2020. [online]. *Lippia* in Flora do Brasil 2020. Homepage: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB21457>.
- SILVA, F. S. 2012. Estudos fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides*. Univ. Estadual de Feira de Santana, DSc tese.
- SILVA, F. S.; MENEZES, P. M.; SÁ, P. G.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, E. A.; BAMBERG, V. M.; OLIVEIRA, H. R.; OLIVEIRA, S. A.; ARAÚJO, R. E.; UETANABARO, A. P.; SILVA, T. R.; ALMEIDA, J. R.; LUCCHESI, A. M. 2015. Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 1995. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin, Springer Verlag, 384 p.