



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus Professor Aloísio Teixeira



Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante da Espécie
***Stachytarpheta crassifolia* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) da Restinga de**
Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil

Autora: Rafaela Gonçalves Dionisio

Macaé
Setembro de 2014

Rafaela Gonçalves Dionisio

**Título: Estudo Fitoquímico e Avaliação da
Atividade Antioxidante da Espécie
Stachytarpheta crassifolia (Rich.) Vahl
(Verbenaceae) da Restinga de Jurubatiba,
Rio de Janeiro, Brasil**

**Monografia apresentada ao Curso de
Farmácia da Universidade Federal do Rio
de Janeiro – Campus Macaé como
requisito para obtenção de título de
farmacêutico.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Michelle Frazão
Muzitano

**Macaé,
Setembro de 2014**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar sempre me iluminando, guiando e protegendo, pois dele vem tudo que sei, tenho e sou. Graças a ele tive força para chegar aqui.

Agradeço aos meus pais, Elice e Gilmar, pelo amor incondicional, paciência, dedicação e por acreditarem no meu sonho e por não ter me deixado desistir quando senti dificuldades.

Agradeço a toda minha família, irmão (João Pedro), tios, tias, primos amigos do Rio e de Macaé que sempre acreditaram em mim e sempre me incentivaram. E ao meu namorado (Douglas) por ter muita paciência comigo durante toda a faculdade e quando estava me dedicando ao TCC.

Aos amigos do LAPRON que sempre estavam dispostos a me ajudar e sempre me tratavam com carinho. Em especial a minha amiga Katharine e o técnico Jobert que estavam sempre dispostos a me ajudar. Além deles não poderia deixar de mencionar a Letícia, Arielly, Alan, Polyana, Amélia, Marta, Maria Sandra, Isabela, Marlon e Maíra, que sempre me ajudavam nos meus momentos de dúvida.

A minha querida orientada Michelle, que estava sempre disposta a me ajudar. E me tratava com muito carinho e amor. Aprendi a gostar da pesquisa graças a minha orientada, que me cativou com o seu amor pelo trabalho.

Agradeço a todos os professores do Lapron que me ajudaram direta e indiretamente para elaboração desse trabalho. Em especial a professora Denise, o professor Thiago e o professor Shaft.

Lista de figuras

Figura 1. Produtos do metabolismo secundário das plantas.	5
Figura 2. Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcaloides. PAL – enzima fenilalanina amônio liase.	6
Figura 3. Rota biossintética para formação dos flavonoides. Fonte: Adaptado.	7
Figura 4. Neutralização do radical livre por um agente oxidante	9
Figura 5. (A) Estrutura básica de um fenol. (B) Estrutura básica dos flavonoides. (C) Estrutura química dos principais flavonoides.	11
Figura 6. Requisitos estruturais mínimos para atividade antioxidante de flavonoides	12
Figura 7. Moléculas dos ácidos hidrocínâmico (A) e do hidroxibenzóico (B).	13
Figura 8. Esquema da redução do radical livre estável DPPH• por um antioxidante.	14
Figura 9. (A) Foto Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (B) Mapa mostrando a localização das áreas de estudo no PNRJ	16
Figura 10. (A) Estrutura química de um iridoide. (B) Estrutura química do feniletanoide verbascosídeo.	18
Figura 11. Estrutura química da 6-beta-hidroxiipolamida.	19
Figura 12. Foto das flores de <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	21
Figura 13. Esquema da Partição Líquido-Líquido.	25
Figura 14. Diluição em H ₂ O destilada e acetonitrila da concentração mãe do padrão secundário verbascosídeo para análise em CLAE-DAD.	27
Figura 15. Diluição em etanol da concentração mãe do padrão verbascosídeo.	29
Figura 16. Placa de 96 poços representando o ensaio de DPPH em triplicata em microplacas.	30
Figura 17. Leitor de microplacas modelo ASYS UVM 340 utilizado no ensaio do DPPH.	30
Figura 18. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato bruto de <i>Stachytarpheta crassifolia</i> com os tempos de retenção destacados, em 254nm. E ampliação entre os tempos de retenção de 12 e 18 minutos.	33
Figura 19. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 9,63 min.	33
Figura 20. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 13,79 min e (B) 14,43min.	34
Figura 21. Feniletanoide verbascosídeo, com os grupamentos cromóforos marcados.	34
Figura 22. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,04 min., (B) 15,29 min. e (C) 16,65 min.	35
Figura 23. Estrutura geral de um flavonoide, com os grupamentos cromóforos marcados.	35

Figura 24. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo do feniletanoide verbascosídeo isolado de <i>S. schottiana</i> com os tempos de retenção destacados, em 254nm.	36
Figura 25. Espectro de UV do verbascosídeo do extrato bruto de <i>S. crassifolia</i>	37
Figura 26. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração acetato de etila de <i>Stachytarpheta crassifolia</i> com os tempos de retenção destacados, em 254 nm. Ampliação entre os tempos de retenção 10 e 20 minutos.....	38
Figura 27. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 9,62 min.. ..	38
Figura 28. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 14,67, (B) 14,43 e (C) 13,78 min. (D) Espectro de UV do feniletanoide verbascosídeo isolado de <i>S. schottiana</i>	39
Figura 29. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 15,02 min.	39
Figura 30. (A) Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da coinjeção da fração acetato de etila de <i>S. crassifolia</i> com o verbascosídeo isolado de <i>S. schottiana</i> com os tempos de retenção destacados, em 254nm. (B) Tabela com área referente ao pico do verbascosídeo na coinjeção.	40
Figura 31. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração butanólica de <i>Stachytarpheta crassifolia</i> com os tempos de retenção destacados, em 254nm. Ampliação entre os tempos de retenção de 11 e 19 minutos.....	41
Figura 32. Espectro de UV dos picos com tempo de retenção de (A) 14,45 e (B) 13,83 min. (B) Mesmo tempo de retenção e espectro de UV do feniletanoide verbascosídeo.	42
Figura 33. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,11, (B) 15,35 (C) 16,71 e (D) 16,93 min.. ..	42
Figura 34. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração aquosa de <i>Stachytarpheta crassifolia</i> com os tempos de retenção destacados, em 254nm. Ampliação entre os tempos de retenção 11 e 20 minutos.	43
Figura 35. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 3,70 e (B) 9,63 min.....	45
Figura 36. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,07, (B) 16,65, (C) 16,87 e (D) 15,29 min.. ..	44
Figura 37. Curva de calibração do verbascosídeo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=2).....	46
Figura 38. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo do flavonoide rutina, em 254nm. Espectro de UV da rutina.	51
Figura 39. Curva de calibração da rutina. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=2).. ..	52
Figura 40. Avaliação da Porcentagem de Atividade Antioxidante de diferentes amostras de <i>S. crassifolia</i> pelo método de DPPH em diferentes concentrações.	56
Figura 41. Avaliação da Porcentagem de Atividade Antioxidante do verbascosídeo isolado da fração acetato de etila de <i>S. schottiana</i> , por LEAL (2014) pelo método de	

DPPH em diferentes concentrações. (A) Gráfico com as concentrações (linear). (B) Gráfico com as concentrações expressas na em log 10.	56
Figura 42. Valores de EC50 de diferentes amostras de <i>S. crassifolia</i> pelo método de DPPH em diferentes concentrações.	59
Figura 43. Estrutura da quercetina, evidenciando as hidroxilas na posição orto.	61
Figura 44. Estrutura do feniletanoide verbascosídeo, evidenciando as hidroxilas na posição no anel aromático, as quais podem ser as responsáveis pela atividade antioxidante.	61
Figura 45. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Feniletanoides totais.	63
Figura 46. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Verbascosídeo.	63
Figura 47. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Flavonoides.	64

Lista de tabelas

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Stachytarpheta</i> citadas na literatura com potencial terapêutico.....	20
Tabela 2. Método utilizado para eluição dos compostos.	26
Tabela 3. Quantidade de solução mãe e de etanol utilizada para preparar cada concentração.....	28
Tabela 4. Rendimento total das frações após processo de partição líquido-líquido.	32
Tabela 5. Áreas da fração acetato de etila e do verbascosídeo na concentração de 125 µg/ml. A soma das áreas se aproxima da área da coinjeção (1.438.203).....	40
Tabela 6. Soma das áreas referentes aos picos com espectros de UV semelhantes ao dos feniletanoides, dos dois experimentos independentes.	46
Tabela 7. Massa de feniletanoides presentes nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração do verbascosídeo. A soma das áreas foram plotadas na equação da reta no lugar do y.....	47
Tabela 8. Teor (%) de Feniletanoides totais no extrato bruto e nas frações de <i>S. crassifolia</i> quantificados em termos de verbascosídeo. Os resultados estão expressos como média ± DP de dois experimentos independentes.	47
Tabela 9. Área referente ao pico do verbascosídeo de cada amostra, dos dois experimentos independentes.....	48
Tabela 10. Massa do feniletanoide verbascosídeo presente nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração do verbascosídeo. A área foi plotada na equação da reta no lugar do y.	48
Tabela 11. Teor (%) de Verbascosídeo no extrato bruto e nas frações de <i>S. crassifolia</i> . Os resultados estão expressos como média ± DP de dois experimentos independentes.....	49
Tabela 12. Soma das áreas referentes aos picos com espectros de UV semelhantes ao dos flavonoides, dos dois experimentos independentes.	52
Tabela 13. Massa de flavonoides presentes nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração da rutina. A soma das áreas foram plotadas na equação da reta no lugar do y.....	53
Tabela 14. Teor (%) de Flavonoides Totais no extrato bruto e nas frações de <i>S. crassifolia</i> . Os resultados estão expressos como média ± DP de dois experimentos independentes.....	53
Tabela 15. Atividade Antioxidante do extrato bruto e das frações de <i>S. crassifolia</i> , e dos padrões <i>G. biloba</i> e verbascosídeo. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes.....	58
Tabela 16. Atividade Antioxidante da fração acetato de etila de diferentes espécies pertencentes ao gênero <i>Stachytarpheta</i> citada na literatura.	60

Lista de Abreviações

- AAO- Atividade Antioxidante
Absa - Absorbância da amostra
Absb - Absorbância do branco
Absc - Absorbância do controle (média de todas as leituras do controle)
ACN- Acetonitrila
CLAE – DAD- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Detecto de Arranjos de Diodos
DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH – Etanol
F. AQ – Fração aquosa
Ex. Br – Extrato Bruto
F. Hex. – Fração hexânica
F. Dicl – Fração diclorometano
F. AcoEt – Fração acetato de etila
F. But – Fração butanólica
H₂O dest. – Água destilada
Egb761 – Extrato padronizado de *Gingko biloba*
MeOH - metanol
N.T. - Não testado
PNRJ- Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba
UV- Ultravioleta
VERBASC – Verbascosídeo

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Plantas Medicinais	1
1.2 Metabólitos Secundários	3
1.3 Os Radicais Livres e Antioxidantes	7
1.4 Região Norte Fluminense e o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba	14
1.5 Família Verbenaceae	16
1.6 Gênero <i>Stachytarpheta</i>	19
1.6.1 <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	21
2. Justificativa	22
3. Objetivos Gerais	23
4. Objetivos Específicos	23
5. Materiais e Métodos	24
5.1 Coletas do Material Botânico	24
5.2 Obtenção do Extrato Bruto de <i>S. crassifolia</i>	24
5.3 Partição líquido-líquido a partir do Extrato de <i>S. crassifolia</i>	24
5.4 Análise por CLAE-DAD	25
5.5 Avaliação da Atividade Sequestradora do radical DPPH (Atividade Antioxidante)	28
5.6 Análise Estatística	31
6. Resultados e Discussão	31
6.1 Rendimento das frações após o processo extrativo	31
6.2 Análise Qualitativa do experimento em CLAE-DAD	32
6.2.1 Extrato bruto de <i>S. crassifolia</i>	32
6.2.2 Frações	37
6.2.2.1 Fração Acetato de Etila	37
6.2.2.2 Fração Butanólica	41
6.2.2.3 Fração Aquosa	42
6.3 Análise Quantitativa do experimento em CLAE-DAD	45
6.3.1 Quantificação de feniletanoides e do composto isolado de <i>S. schottiana</i> , verbascosídeo	45
6.3.2 Quantificação de flavonoides	51
6.4 Avaliação da atividade antioxidante - Ensaio de DPPH	55

6.5 Correlação da Atividade Antioxidante e o Teor de Flavonoides, Feniletanoies e Verbascosídeo.	62
7. Conclusões.....	65
8. Referências Bibliográficas.....	67

Resumo

O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) possui cerca de 113 espécies, com algumas atividades farmacológicas como anti-inflamatória e antioxidante. A espécie *S. crassifolia* não possui estudos químicos e farmacológicos descritos na literatura e é uma espécie ocorrente na Restinga de Jurubatiba, sendo então alvo desse estudo. O objetivo do trabalho é fazer um estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante (AAO) de *S. crassifolia*. As folhas foram secas, pulverizadas e submetidas a um processo de maceração com EtOH:H₂O (70:30). A solução obtida foi concentrada em rota-evaporador e o extrato obtido foi submetido a partição líquido-líquido, obtendo-se as frações Hex, But, AcoEt, Dicl. e AQ. Todas as amostras, com exceção das frações Hex. e Dicl., foram avaliadas por CLAE-DAD analítico utilizando um sistema gradiente compreendendo diferentes proporções de ACN e H₂O acidificada pH 2.5 (H₃PO₄). A análise do cromatograma das amostras de *S. crassifolia*, juntamente com os espectros de UV sugere a presença de derivados flavonóidicos e feniletanoides. Através da comparação dos espectros de UV e do Tr das amostras com o do padrão verbascosídeo (Tr 13,77 min), isolado da espécie *S. schottiana* foi confirmada a presença do mesmo no Ex. Br (Tr 13,79min), F. Bu. (Tr 13,84 min) e F. AcoEt (Tr 13,78 min). A F. AcoEt foi a que obteve maior quantidade de feniletanoides (33,95 ± 1,22 %p/p), verbascosídeo (12,83 ± 0,15 %p/p) e flavonoides (5,80 ± 0,34 %p/p). A atividade antioxidante (AAO) das amostras, com exceção da F. Hex foi avaliada utilizando o método DPPH. Com os resultados obtidos foi possível observar que a F. AcoEt possui maior atividade antioxidante (EC₅₀ = 19,96 ± 3,16 µg/ml) e que existe correlação entre essa maior AAO e os teores de feniletanóides e flavonoides.

Palavras chaves: *Stachytarpheta crassifolia*, CLAE-DAD, Atividade Antioxidante, Verbascosídeo, Flavonoides, DPPH.

1. Introdução

1.1 Plantas Medicinais

As plantas são utilizadas há séculos pela humanidade na alimentação e no tratamento de várias doenças, como doenças infecciosas e cancerígenas. Sabe-se que uma das primeiras formas de utilização desses produtos pode ter sido pela busca de alívio dos sintomas e cura de doenças, através da ingestão de ervas e folhas (LUDWIG, 2006; PEREIRA & CARDOSO, 2012; CARMEN, 2014).

Existem vários registros históricos da utilização de plantas no tratamento de patologias desde 4.000 a. C., sendo o primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia em 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral. Outro registro existente aponta o uso frequente de aproximadamente mil substâncias químicas de origem vegetal da Mesopotâmia, no tratamento de vários sintomas de diferentes doenças (LEAL, 2014). Atualmente, mesmo com toda tecnologia e evolução da medicina moderna, esse uso representa o único recurso terapêutico de várias comunidades de baixa renda, pois segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca 65% a 80% da população dos países em desenvolvimento, devido à pobreza e à falta de acesso a medicina moderna, usam bastante a medicina tradicional, sendo o principal componente o uso de plantas medicinais, para os cuidados primários em saúde (CALIXTO, 2000; BARBOSA, 2008).

Essa riqueza de conhecimento popular no uso de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças está diretamente relacionada à biodiversidade da região onde se desenvolveram as civilizações. Atualmente o conhecimento popular é utilizado para o desenvolvimento de novos fármacos (ELISABETSKY & SOUZA, 1999; FIRMO *et al.*, 2011).

Os chineses possuem como cultura a utilização do conhecimento popular de plantas medicinais, hábito que perdura durante cinco séculos, sendo atualmente introduzida como filosofia de em princípios médicos e na pesquisa que novas moléculas candidatas a fármacos (FOGLIO, *et al.*, 2006).

No planeta existem cerca de 250 a 500 mil espécies de plantas já foram identificadas, sendo o Brasil o país que detém uma das maiores biodiversidades do planeta, e estima-se que cerca de 20% das espécies já foram identificadas. Com

uma das floras mais ricas do mundo e sua extensa diversidade de plantas, que fornecem substâncias químicas biologicamente ativas, proporciona uma boa oportunidade para o seu desenvolvimento econômico, desde o cultivo de plantas medicinais até a obtenção de drogas vegetais, derivados destas drogas, fitoterápicos e um grande potencial para descoberta de novos fármacos. (FILHO & YUNES, 1998; DUTRA, 2013; CALIXTO, 2013; MMA, 2014).

Apesar de possuir uma enorme biodiversidade o Brasil não desenvolveu estudos suficientes, pois apenas 8% da flora brasileira já foi estudada, por isso necessita de pesquisas para ampliar o conhecimento científico, visando à obtenção de novos fármacos mais específicos e eficazes (VOLPATO, 2005). Assim, para suprir as deficiências no estudo de plantas o governo instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como objetivo facilitar o acesso aos medicamentos fitoterápicos, garantir a sustentabilidade da biodiversidade brasileira, promover a valorização do conhecimento tradicional e preservação de comunidades, associada ao desenvolvimento industrial e tecnológico (BRASIL, 2007).

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos, substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, vem aumentando bastante, devido a principal capacidade destes compostos em sequestrar radicais livres, que podem ser prejudiciais à saúde humana. Por isso podem ser consideradas substâncias antioxidantes, que quando presentes em concentrações ideais inibem e/ou retardam significativamente os processos oxidativos. Podendo então gerar novos fármacos antioxidantes (VAYA & AVIRAM, 2001).

Entre as plantas medicinais que já foram estudadas e são utilizadas atualmente pode-se citar o *Coleus barbatus*, que possui como princípio ativo a forskolina, e é utilizada para o tratamento da hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores; a *Artemisia annua*, onde a artemisinina possui atividade antimalárica; a *Stachytarpheta cayennensis* possui atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, antipirética, laxante, dentre outras (FILHO & YUNES, 1998; MOREIRA, 2007).

As plantas possuem diversos efeitos farmacológicos, mas é importante ressaltar que as mesmas também possuem efeitos colaterais e muitas são tóxicas, por isso seu uso deve ser realizado sob prescrição médica e controlado. Devido a esses motivos é muito importante o estudo das plantas medicinais e que se tenha uma interação entre a Botânica, a Química e a Farmacologia (FILHO & YUNES, 1998).

1.2 Metabólitos Secundários

Metabolismo é o conjunto total de reações de moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, e que supre o organismo de energia, renovando assim suas moléculas e garantindo o estado organizado da célula (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Os vegetais, os micro-organismos e os animais, em menor escala, apresentam um metabolismo diferenciado, com enzimas, organelas e coenzimas, que é capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias essenciais ou não à manutenção da vida do organismo produtor (MACHADO, 2007). E é dividido em metabolismo primário e secundário (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

O metabolismo primário é responsável pelos processos metabólicos que desempenham funções essenciais no vegetal, tais como fotossíntese, respiração e transporte de soluto. Os compostos produzidos nesse metabolismo são os açúcares, os aminoácidos, os ácidos graxos, as proteínas, a celulose, a lignina e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais (PERES, 2001; PEREIRA & CARDOSO, 2012; MARTINS 2012).

No Metabolismo secundário encontram-se as substâncias que possuem produção e acumulação restritas a um número limitado de organismos, tendo à bioquímica e o metabolismo específico características únicas. Os produtos desse metabolismo possuem vantagens para a sobrevivência do organismo produtor e para perpetuação da espécie apesar de não ser necessariamente essencial para o organismo (MACHADO, 2007).

Os metabólitos secundários possuem um importante papel na interação das plantas com o meio ambiente, ajudando na sua sobrevivência e na perpetuação da espécie no ecossistema. São produzidos em pequena escala, possuem baixo peso molecular, características químicas variadas e às vezes complexa. Estes compostos possuem como função proteger a planta da herbivoria, do ataque de patógenos; favorecem a atração de polinizadores, de dispersores de sementes e beneficia a planta na competição com outros vegetais. Além desses fatores bióticos, os produtos secundários também protegem o vegetal da temperatura, umidade, exposição à luz ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001; PEREIRA & CARDOSO, 2012; MARTINS 2012; PERES, 2014).

Os metabólitos secundários no passado, eram considerados como produtos da excreção do vegetal, mas sabe-se que muitas dessas substâncias estão envolvidas diretamente com os mecanismos que permitem adequação do produtor ao seu meio. Assim, por serem fatores de interação entre os organismos, os metabólitos secundários, despertam grande interesse, devido às atividades biológicas e farmacológicas que possuem (PEREIRA & CARDOSO, 2012; MACHADO, 2007). E, por isso, são de grande importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas de alimentos, agronomia e perfumaria (MACHADO, 2007).

Os componentes do metabolismo secundário das plantas são utilizados na alimentação, na medicina e na indústria (ALVES, 2001; PERES, 2014). Essas substâncias interessam ao homem principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico, pois muitos desses componentes quando utilizados em doses adequadas tornam-se medicamentos. Assim os produtos oriundos do metabolismo secundário que possuem atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes microbianos, e aqueles que possuem atividade neurotóxica podem ser utilizados como antidepressivos, sedativos, anestésicos ou relaxantes musculares (BRISKIN, 2000).

Os metabólitos secundários são oriundos, resumidamente, a partir da via glicolítica, tendo dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (PEREIRA & CARDOSO, 2012). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: os alcalóides, as substâncias fenólicas e os terpenos (**Figura 1**).

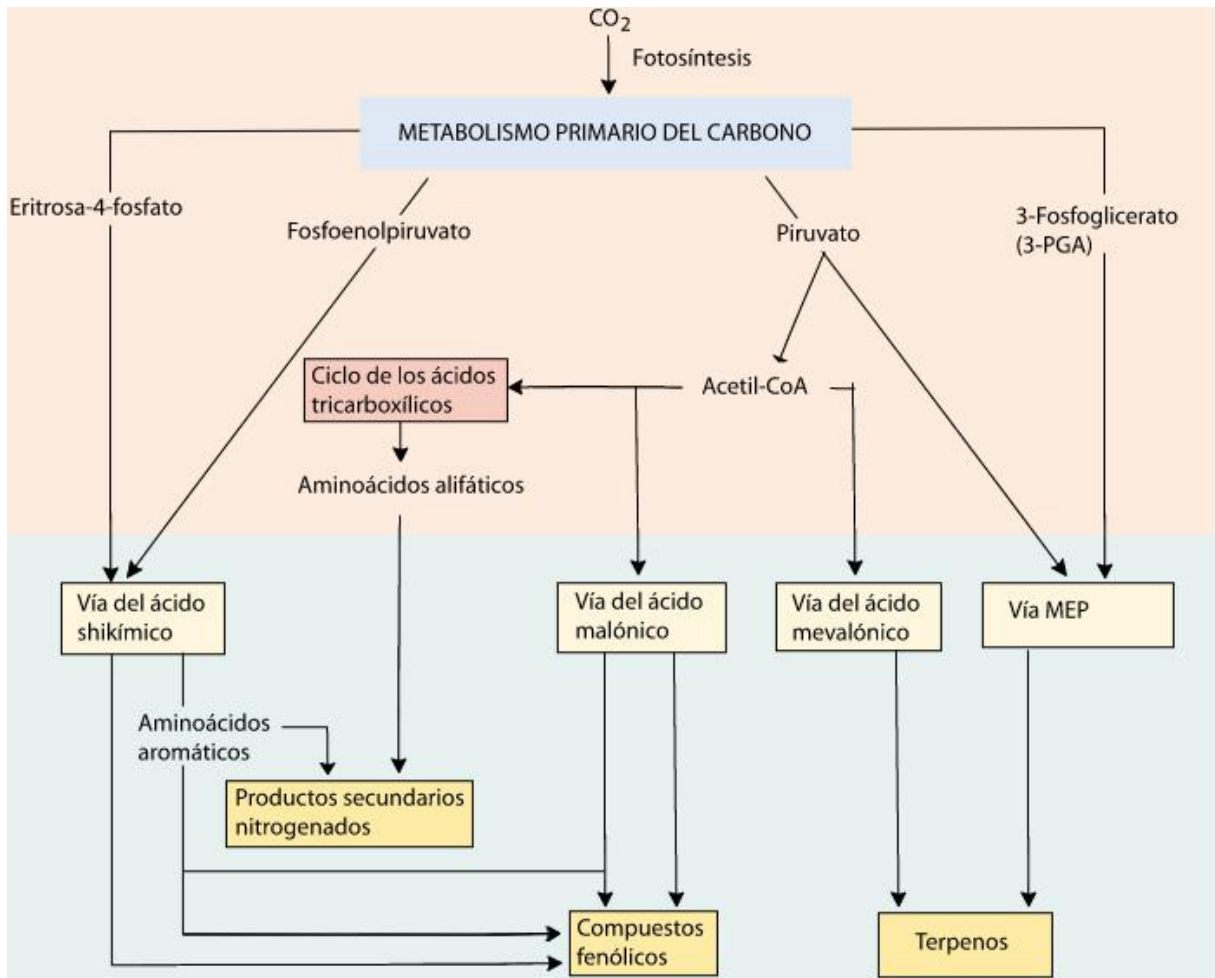


Figura 1. Produtos do metabolismo secundário das plantas (BARBOSA, 2008).

As substâncias fenólicas podem ser formadas por duas rotas metabólicas: pela via do ácido chiquímico - a partir dos carboidratos onde obtém-se compostos com grupos hidroxilas na posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico - ou da via do acetato- a partir da acetil coenzima A e manoil coenzima A, que formam compostos com hidroxilas na posição *meta* (GORINSTEIN *et al.*, 2001; BARBOSA, 2008).

O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico, formado, se junta com uma molécula de fosfoenolpiruvato formando assim o ácido corísmico, que gera os aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, que são os precursores dos alcaloides. Contudo um dos primeiros grupos de substâncias fenólicas formadas a partir do ácido corísmico são os feniletanoides ou

fenilpropanoides que são precursores da lignina (polímero de fenilpropanos altamente ramificados) (**Figura 2**) (PERES, 2014).

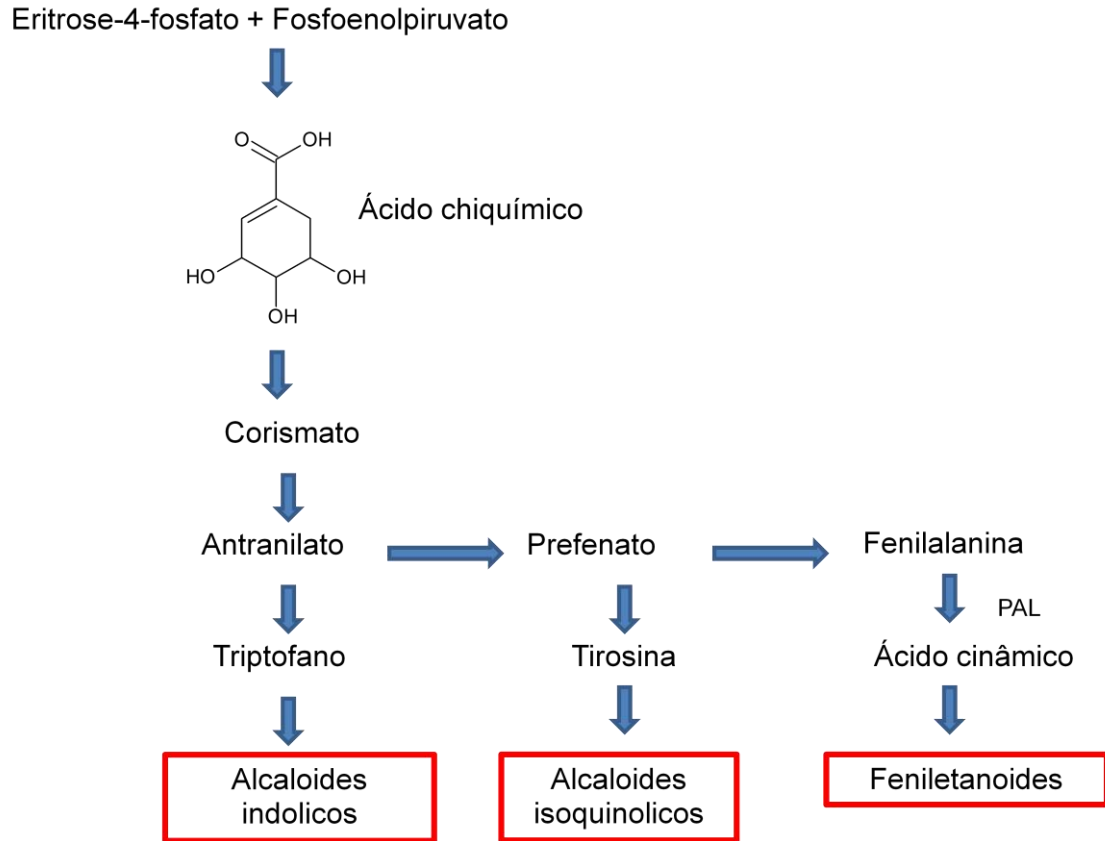


Figura 2. Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcaloides. PAL – enzima fenilalanina amônio liase. Fonte: Adaptado PERES, 2014.

Os flavonoides também são formados pela via do ácido chiquímico e também são derivados da PAL (enzima fenilalanina amônio liase) (**Figura 3**) (PERES, 2014).

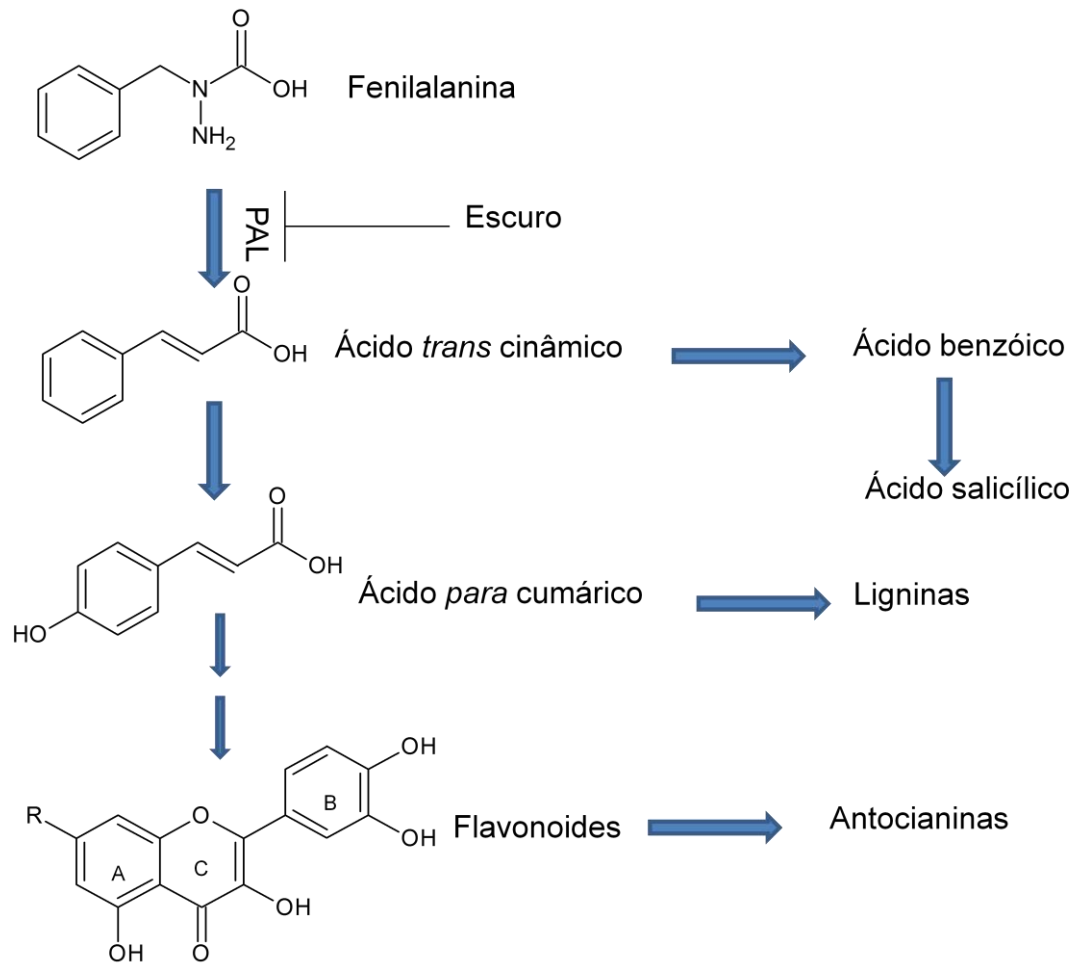


Figura 3. Rota biossintética para formação dos flavonoides. Fonte: Adaptado PERES, 2014.

1.3 Os Radicais Livres e Antioxidantes

Radicaís livres são átomos ou moléculas que possuem na sua última camada eletrônica elétrons não pareados, são altamente reativos, instáveis e se multiplicam em cascata. São formados em um cenário de oxi-redução, ora cedendo o elétron, oxidando-se, ou recebendo outro reduzindo-se (MANRUR, 2011; PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Nas células aeróbicas o oxigênio molecular e seus radicais são os agentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres. Os radicais livres que possuem oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GULCIM *et al.*, 2003). As ERO são geradas naturalmente nos organismos pelo processo metabólico normal. Em condições fisiológicas do metabolismo aeróbico celular, o O₂ sofre

redução trivalente, com aceitação de quatro elétrons, formando assim H_2O . Durante o processo, intermediários reativos são formados, sob a forma de radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA, 2008).

Os radicais agem diretamente sobre alguns sistemas biológicos causando assim alterações nas células. Cadeias poli-insaturadas, como as dos fosfolipídios e do colesterol, podem ser atacadas pelas espécies EROs, o que dará início ao processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os ácidos graxos insaturados dos lipídeos da membrana possuem ligações duplas entre alguns átomos de carbono. Essas ligações são vulneráveis ao ataque pelas EROs. Os radicais de carbono formados podem reagir com o oxigênio, originando assim os radicais peroxila, que podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, propagando assim a reação. Segue-se uma cadeia de reações auto catalíticas, tendo como resultado final a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperoxídeos formados na peroxidação lipídica possuem vida curta e, quando reagem com metais formam aldeído (monaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, que são reativos e causam novos danos ao DNA, à membrana citoplasmática e as organelas (BARBOSA, 2008; PEREIRA & CARDOSO, 2012, LEAL, 2014).

Nos sistemas aeróbicos é de fundamental importância manter o equilíbrio entre agentes óxi-redutores e o sistema de defesa antioxidante (BARBOSA, 2008). O desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e a produção de radicais livres causa o estresse oxidativo (ATOUI *et al.*, 2005; LAGUERRE *et al.*, 2007). Que leva à efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, como agressão às proteínas da membrana, dos tecidos, prejuízo às enzimas e danos ao DNA. O estresse oxidativo pode ocorrer devido à exposição excessiva ao sol (radiação UV), aumento da poluição do ar, fumo, estresse, e outros fatores. E é um dos grandes causadores de várias patologias, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais, diabetes mellitus tipo I, artrite, doenças do pulmão, demência senil, esclerose múltipla etc. O envelhecimento é um evento relacionado com o estresse oxidativo (BARBOSA, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Antioxidantes são substâncias que quando presentes em concentrações adequadas combatem o excesso de radicais livres no organismo, retardando ou inibindo a oxidação dos substratos cataliticamente, suprimindo, captando,

neutralizando ou removendo os radicais livres, e também promovendo a ligação dos íons metálicos e outros agentes pró-oxidantes às proteínas, ou seja, são as substâncias que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos danosos dos processos. São formados por um conjunto de substâncias heterogêneas que é constituído por minerais, vitaminas, pigmentos naturais, outros compostos vegetais e também de enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres, pois são capazes de inibir ou retardar a oxidação dos substratos oxidáveis. O efeito antioxidante pode ser conseguido através de um ou mais mecanismos, tais como inativação dos radicais livres, complexação de íons metálicos ou redução dos hidroperóxidos (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2006; BISCAIA, 2007; BARBOSA, 2008; PEREIRA & CARDOSO, 2012;).

Quando os antioxidantes reagem com os radicais livres formam-se radicais não reativos e por isso a reação em cadeia que é prejudicial para a célula não se propaga. Pois, os radicais são neutralizados quando reagem com outro radical, formando, assim, produtos estáveis (**Figura 4**) (BARBOSA, 2008).

Radical Livre

Poluição, radiação solar e o próprio metabolismo liberam moléculas de oxigênio com um elétron desemparelhado – o radical livre

Antioxidante

Para se equilibrar, ele “recebe” elétrons de outras células. Os antioxidantes “doam” um elétron ao radical, neutralizando sua atividade nociva

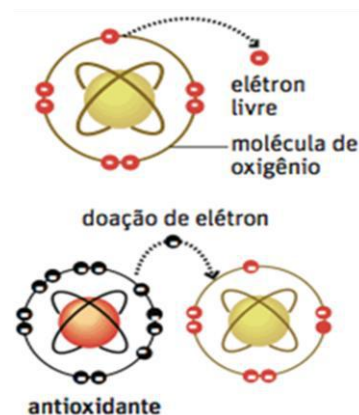


Figura 4. Neutralização do radical livre por um agente oxidante. Fonte: Adaptado Barakat, 2012.

Existem dois tipos de antioxidantes exógenos e endógenos. Os primeiros são produzidos pelo próprio organismo e são classificados em enzimáticos (superóxidos dismutases citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutathionaperoxidase, glutathionaredutase) e não enzimáticos (glutathiona, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina, ceruloplasmina). Já os exógenos são antioxidantes adquiridos através da alimentação e possuem uma diversidade de

antioxidantes, como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), os carotenóides, os produtos naturais como as substâncias fenólicas e os demais metabólitos secundários de vegetais, o zinco, o cobre, o selênio e o magnésio (ALEMIDA *et al.*, 2006; ANDRADE, 2011; PEREIRA & CARDOSO, 2012).

As substâncias fenólicas apresentam, geralmente, ampla distribuição no reino vegetal. Sua principal característica é a presença do núcleo fenólico, que pode apresentar mais de uma hidroxila ligada ao anel aromático (**Figura 5A**) (FERREIRA, 2011). Tendem a ser solúveis em água e podem estar ligados a açúcares. São compostos instáveis facilmente oxidáveis em pH alcalino (BRUNETON, 1995).

A atividade antioxidante das substâncias fenólicas esta relacionada com a sua capacidade redutora, estrutura química, cuja intensidade da ação depende do número e posição das hidroxilas presentes na molécula, com a propriedade de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. Estas características possuem um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais, tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HASLAM, 1996; SCOTTI *et al.*, 2007; LEAL, 2014).

A posição fixa de uma hidroxila no anel aromático influencia diretamente na atividade antioxidante dessas substâncias. Substâncias que possuem a hidroxila na posição *para* (posição 4) são mais ativos do que aqueles substituídos em *orto* ou *meta* (posições 1 e 2, respectivamente). A atividade antioxidante é maior para substâncias que possuem dois (mais comum) ou três substituintes grupos de hidroxilas no anel aromático do que para as monohidroxiladas (SCOTTI *et al.*, 2007). Quando há presença de grupo hidroxila substituído na posição *orto* e/ou *para* em anel contendo heteroátomo nitrogênio ou oxigênio, a atividade antioxidante é potencializada por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo p do heteroátomo e o radical fenóxi formado (PANNALA *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2002; SCOTTI *et al.*, 2007).

As ligações de hidrogênio da molécula na forma neutra não aumenta a atividade antioxidante, elas favorecem a ação após a retirada do hidrogênio fenólico, estabilizando o radical (SCOTTI, 2007).

Existe uma grande variedade de substâncias fenólicas, classificadas em dois grandes grupos, flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (HRAZDINA *et al.*, 1970; SILVA *et al.*, 2010; SUCUPIRA, 2012). A atividade

antioxidante das substâncias fenólicas é atribuída, principalmente, à presença de flavonoides (**Figura 5B e 5C**). Flavonoides são substâncias aromáticas caracterizadas pelo esqueleto C6-C3-C6 com quinze átomos de carbono dispostos em três anéis, sendo dois deles do tipo fenólico (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica) (**Figura 5B**) (LEITE, 2009). Estes componentes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelante de metais ou desativadores do oxigênio singlete, ou podem possuir mais de uma dessas funções (BARBOSA, 2008).

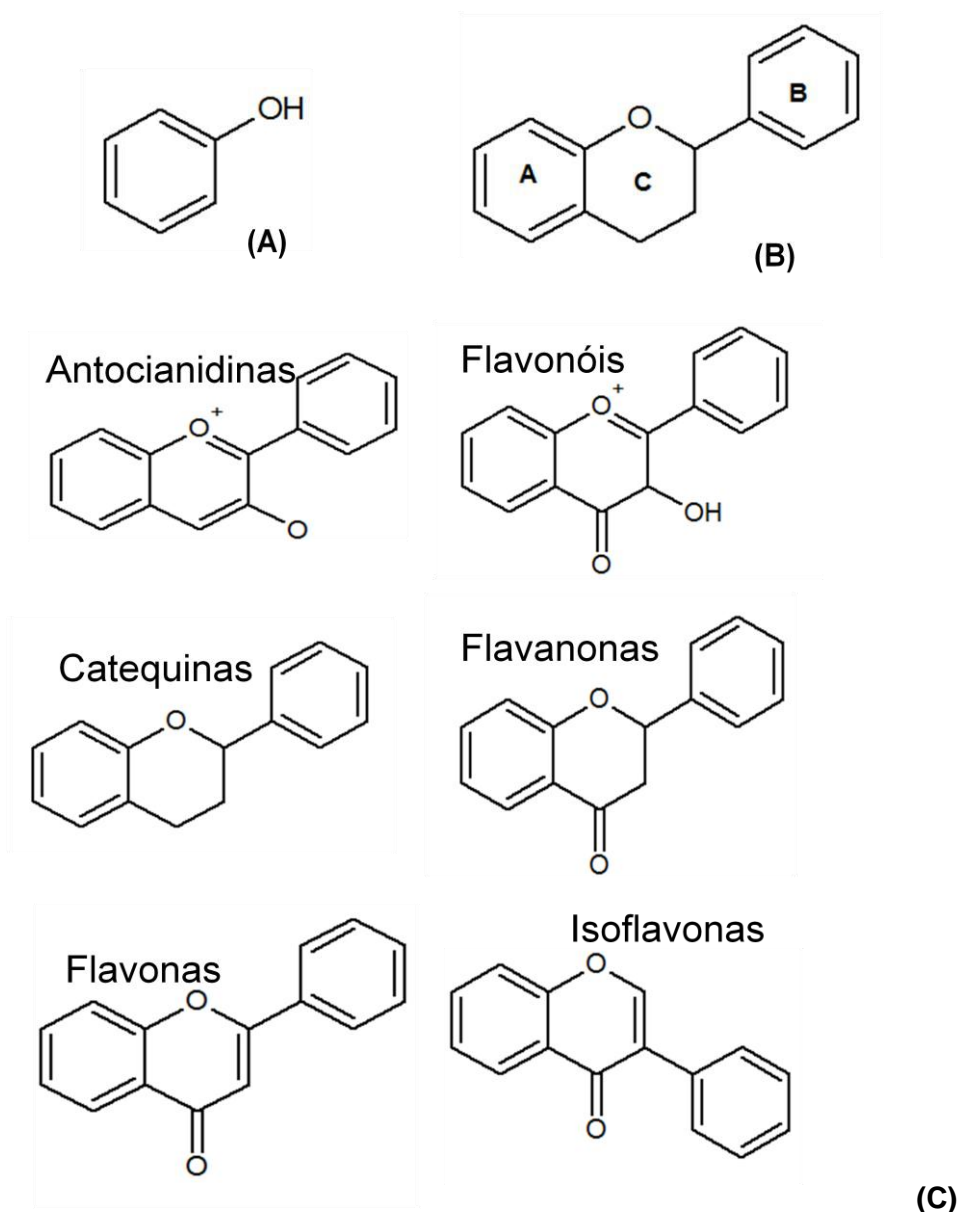


Figura 5. (A) Estrutura básica de um fenol. (B) Estrutura básica dos flavonoides. (C) Estrutura química dos principais flavonoides. Fonte: (B) Adaptado MENSUR, 2011, (C) Adaptado MARÇO *et al.*, 2008.

A alta atividade antioxidante dos polifenóis se deve ao fato de algumas moléculas possuírem átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados em varias posições dos anéis A, B e C; as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da carbonila (C=O) (RICE-EVANS *et al.*, 1996; HRAZDINA *et al.*, 1970; SILVA *et al.*, 2010).

Estudos da relação estrutura atividade de flavonoides indicam que a presença do grupo (3' e 4') catecólico livre no anel B, de dupla ligação nos carbonos C2 e C3 do anel C e a hidroxila fenólica livre na posição 3 (**Figura 6**) contribuem fortemente para a atividade antioxidante dos flavonoides. Quando há uma glicosilação na posição C-3 a capacidade antioxidante é bastante reduzida. No entanto, uma hidroxila fenólica adicional no anel B aumenta consideravelmente a atividade antioxidante, como é o caso do flavonol e miricetina (PIETTA, 2000; PEREIRA, 2010).

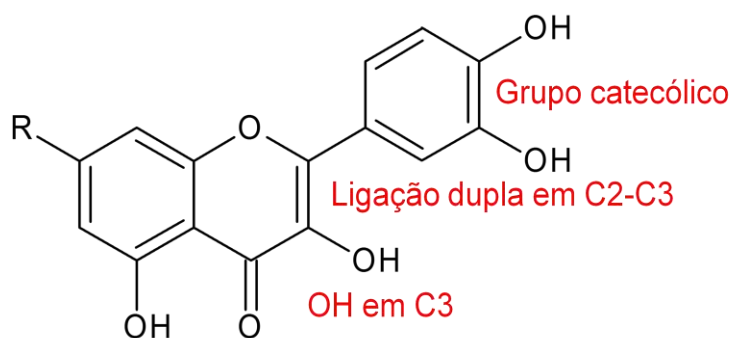


Figura 6. Requisitos estruturais mínimos para atividade antioxidante de flavonoides
Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2010.

Na classe dos não flavonoides a atividade antioxidante esta relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e com a proximidade do grupo -CO₂H em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (**Figura 7**) (HRAZDINA *et al.*, 1970; SILVA *et al.*, 2010).

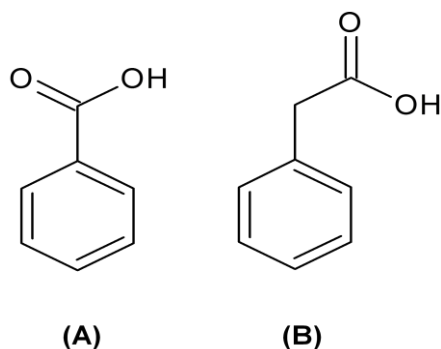


Figura 7. Moléculas dos ácidos hidrocinâmico (A) e do hidroxibenzóico (B). Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2010.

Existem vários métodos que podem ser utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* das espécies vegetais. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), poder de redução do metal (FRAP, CRUPAC) e quantificação de produtos formados durante a peroxidação lipídica (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Mas os métodos espectrofotométricos mais utilizados atualmente são o ABTS, FRAP, DPPH e ORAC (EMBRAPA, 2007).

O método de DPPH é um método químico utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical livre, e é um dos mais utilizados, pois é considerado rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical orgânico de nitrogênio, estável, de cor violeta e possui absorção na faixa de 515-520 nm. O decréscimo da absorbância da reação permite monitorar a redução do radical DPPH. Pois, na presença de um doador de hidrogênio o radical DPPH, de coloração roxa, é reduzido dando origem ao DPPH-H (hidrazina) e passa a ter coloração amarelada, de acordo com o número de elétrons capturados (**Figura 8**). A partir de então é determinada a porcentagem de atividade antioxidante, ou seja, à quantidade de radical DPPH que reagiu com o antioxidante ou a atividade sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH restante no meio reacional. Uma das vantagens desse método em relação ao método ABTS, é que o DPPH por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por diferentes formas e também facilita o uso. Outra vantagem é que frente a outros antioxidantes ele é mais solúvel em

solventes orgânicos (ALMEIDA, 2005; HASLAM, 2005; BARBOSA, 2008; SUCUPIRA, 2012).

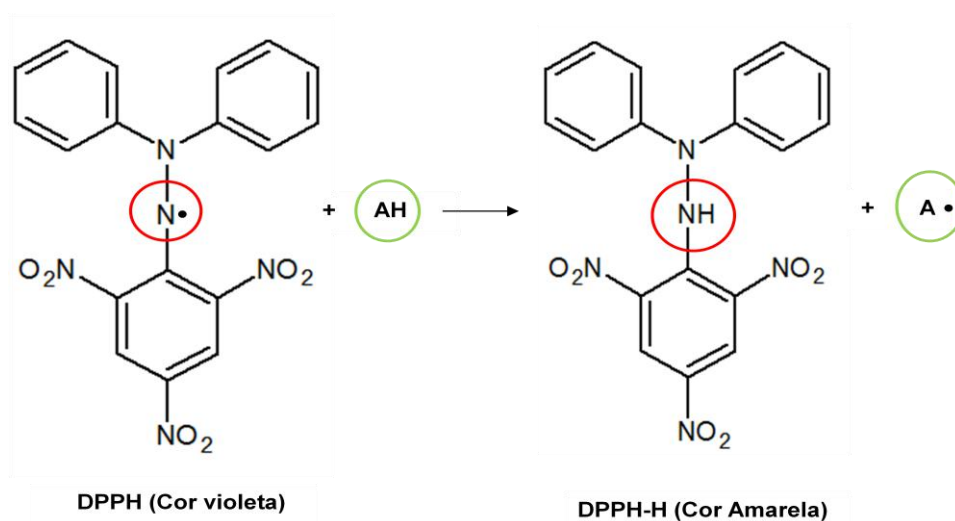


Figura 8. Esquema da redução do radical livre estável DPPH• por um antioxidante. Fonte: Adaptado MANSUR, 2011.

O método de DPPH tem sido o método de escolha para amostras ricas em fenólicos totais. Pois o método provou ser bastante útil na determinação das propriedades antioxidantes de fenóis como também de animais e compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamento (IONITA, 2005). Já o método ORAC é o de escolha para amostras ricas em antocianinas, como morangos, amora-preta e framboesa (HASSIMOTO *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2008).

1.4 Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) ocorrem várias espécies que são pertencentes às famílias Vebenaceae, Convolvulaceae, Amaranthaceae, Cyperaceae, Leguminosae, Poaceae e Clusiaceae, que são estudadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFRJ *Campus Macaé*.

Restinga é o nome empregado, de forma genérica, para designar os ambientes, que se estendem de forma descontínua, desde 4° N a 33° S pela costa brasileira, tendo cerca de 9.000 Km de extensão (NOLASCO *et al.*, 2012). Sendo então denominada por Santos, Sylvestre e Araujo (2004, p.271) como o “conjunto

formado pela deposição de sedimentos arenosos marinhos quartenários ao longo do litoral brasileiro”.

As restingas possuem uma heterogeneidade vegetal, pois elas possuem inúmeras formas vegetacionais de características próprias a partir de uma relação particular com o ambiente. Por isso a vegetação que ocorre sobre as planícies quartenárias está interessando bastantes pesquisadores (NOLASCO *et al.*, 2012).

No estado do Rio de Janeiro existem muitas restingas, que são protegidas por Unidades de Conservação, como a Área de Proteção Ambiental da Massambaba, a Área de Proteção Ambiental de Maricá, o PNRJ, o Parque Estadual e a Reserva Ecológica da Juatinga. Entre as restingas do estado esta o PNRJ (Imbassahy, 2008).

O PNRJ foi criado em 1998 e situa-se no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro (22° $-22^{\circ}23'S$; 41° $15'$ - $41^{\circ}45'W$), a aproximadamente 200 km da capital. Possui uma área total de 148,6 Km² em uma planície arenosa quaternária que vai desde a cidade de Macaé até Barra do Furado e possui uma extensão de 60 km ao longo da costa (**Figura 9**) (Carvalho, 2001; Montezuma & Araujo, 2007).

Desde 1980, vários projetos de pesquisa em zoologia, botânica e ecologia são desenvolvidos no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. E isso tornou esta região uma das áreas de restinga mais bem estudadas do litoral brasileiro. As instituições que atuam nesta área são o Museu Nacional do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Universidade Estadual Norte Fluminense e o Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ) (Imbassahy, 2008).

Devido a grande diversidade florística do PNRJ e o importante papel dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos, este projeto tem por finalidade estudar a fitoquímica e as atividades biológicas da espécie *Stachytarpheta crassifolia*, de ocorrência no Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro.

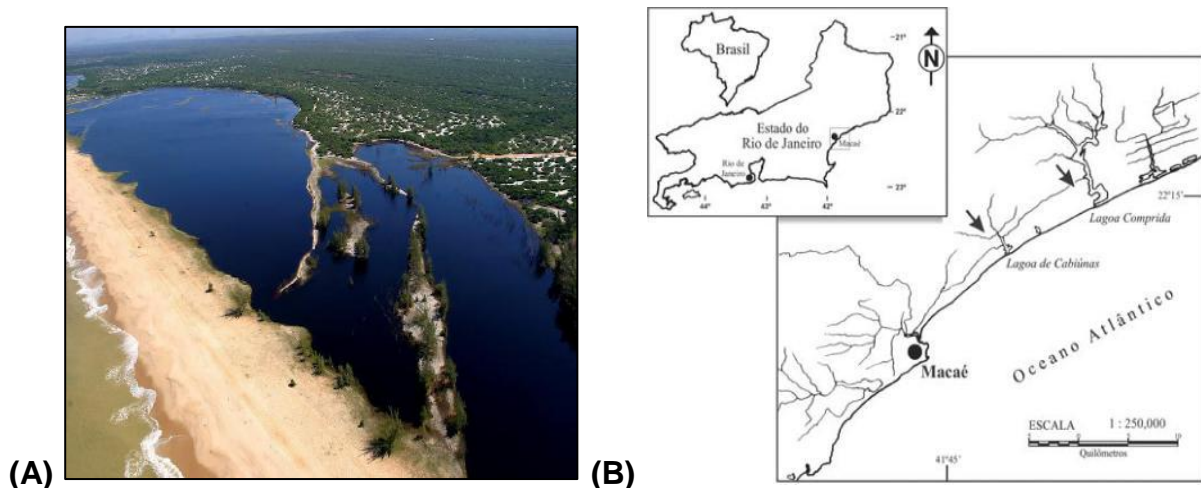


Figura 9. (A) Foto Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba **(B)** Mapa mostrando a localização das áreas de estudo no PNRJ. Fonte: Flinte, 2006; ICMBio, 2014 .

1.5 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae é cosmopolita pertencente à ordem Lamiales e possui aproximadamente 35 gêneros e 1.000 espécies associadas às regiões tropicais, subtropicais e temperadas do hemisfério sul e alguns no hemisfério norte (MELO *et al.*, 2010; CANTELI, 2012). No Brasil ocorrem 250 espécies, onde 33 delas estão no cerrado, e 17 gêneros nativos sendo eles, *Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Cithrexyllum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petrea*, *Phyla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena*, *Verbenoxylume* um gênero cultivado, o *Congea* (SOUZA & LORENZI, 2008). Esta família é composta por plantas subarborescentes, arbustivas, arbóreas e lianáceas, sendo essas duas últimas menos frequentes (FAVORITO, 2009; MELO *et al.*, 2010).

As espécies de Verbenaceae possuem seu potencial econômico amplamente explorado devido as suas diferentes aplicações, destacando-se as usadas como ornamentais e madeiras, ou ainda pelas propriedades terapêuticas de algumas delas (SANTOS, 2009; MELO *et al.*, 2010). Como a espécie *Duranta vestita*, que é utilizada no tratamento da malária e da doença cardiovascular trombótica (CANTELI, 2012).

A família Verbenaceae possui alguns representantes que são muito utilizados na medicina popular devido as suas propriedades digestiva, antidiabética,

antimalárica, anti-úlceras e anti-inflamatória e também porque são utilizadas na área odontológica e cosmética (BRAGA, 2009).

Estudos realizados com verbenáceas demonstraram que as plantas pertencentes à família possuem atividades analgésicas, antimicrobianas, antiespasmódicas, sedativas, anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, antitumorais, hepatoprotetoras, antigripal, anti-reumática e calmante (VANDRESEN, 2005; SANTOS *et al.*, 2009).

Um estudo de bioatividade realizado por Oliveira *et al.* (1992) com extratos aquosos de 55 espécies de plantas verbenáceas demonstrou que os gêneros *Clerodendrum*, *Verbena*, *Stachytarpheta* e *Vitex* possuem índices de letalidade frente à *Artemia salina*, com valores LC_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (VANDRESEN, 2005; SANTOS *et al.*, 2009).

Os principais metabólitos secundários presentes na família Verbenaceae, são os compostos fenólicos, iridoídeos (**Figura 10A**) e feniletanóides glicosídicos (**Figura 10B**), que geralmente são derivados do ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e do ácido sinápico, podendo existir sob as formas isoméricas *cis* e *trans*, sendo a conformação *trans* a mais estável e a mais encontrada na natureza. Para esta classe de metabólitos secundários, destacam-se as atividades antibacteriana, anti-inflamatória, citotóxica e anorexígena. Além dessas atividades os feniletanóides possuem outras ações como inibição enzimática e auxiliar no controle da hipertensão arterial (GHISALBERTI, 2000; VANDRESEN, 2005; BERTÊ, 2013). Há descrições na literatura sobre a presença do feniletanoide verbascosídeo, também denominado de acteosídeo, em algumas famílias de angiospermas, dentre elas a família Verbenaceae (**Figura 10B**) (CORRÊA, 2005).

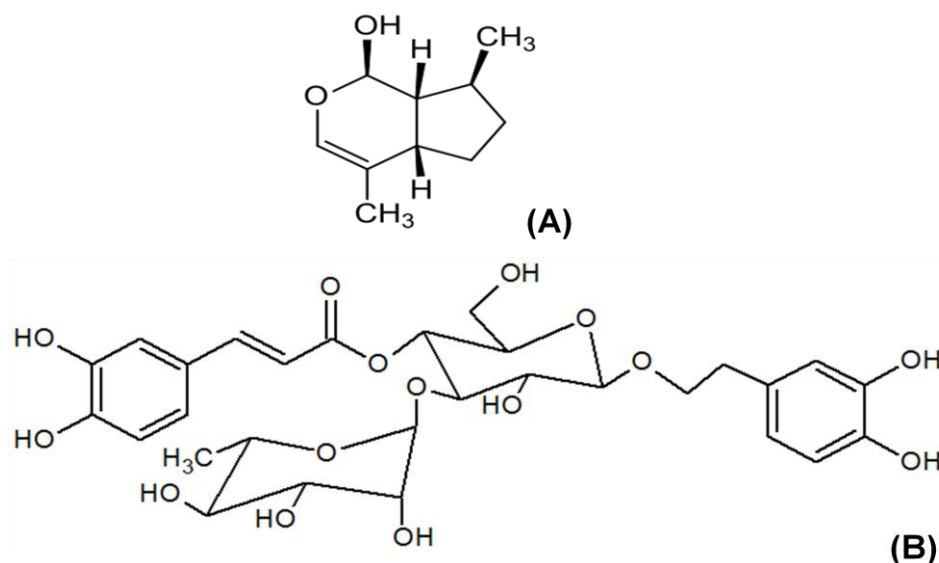


Figura 10. (A) Estrutura química de um iridoide. (B) Estrutura química do feniletanoide verbascosídeo.

Outras classes de metabólitos secundários como flavonoides (**Figura 5B e 5C**), saponinas, terpenóides, quinonas e alcaloides também são relatados em algumas espécies pertencentes a família Verbenaceae e apresentam um amplo espectro de atividades biológicas (VANDRESEN, 2005).

Os flavonoides (**Figuras 5B e 5C**) estão presentes nas espécies *S. crassifolia* (extrato bruto) (LEAL, 2014), *S. schottiana* (LEAL, 2014), *Verbena litoralis* (BERTÊ, 2013) *Aloysia gratissima* (VANDRESEN, 2005), *Lippia Alba* (FARIAS, 2010), *Lippia citriodora* (BILIA *et al.*, 2008), *Lippia dulcis* (KANEDA *et al.*, 1992; ONO *et al.*, 2005), *Lippia multiflora* (KANKO *et al.*, 2004) e *Lippia sidoides* (COSTA *et al.*, 2012).

Muitos efeitos benéficos à saúde estão atribuídos aos flavonoides, devido a sua diversidade de propriedades biológicas e farmacológicas, como: quimiopreventiva, antioxidante, antibacteriana, cardiovascular, leishmanicida, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antiplaquetária, citotóxica entre outras. E por isso, de maneira geral, vêm sendo alvo de muitos estudos (PEREIRA, 2010; BERTÊ, 2013).

1.6 Gênero *Stachytarpheta*

Stachytarpheta é um gênero que possui vários estudos que relatam a sua importância para a medicina (SULAIMAN *et al.*, 2007) e inclui aproximadamente 113 espécies distribuídas na América tropical e subtropical (SILVA *et al.*, 2012). Normalmente os seus representantes são arbustos ou subarbustos ramificados e raramente ervas, com 0,5 a 1,5 m de altura, mas podem chegar até 4 m. Com flores arranjadas de forma espiralada ao longo do eixo da inflorescência de maneira muito compacta, atingindo até 60 cm de comprimento. Apresentam corolas bastante vistosas e facilmente localizadas à distância no campo, sendo comumente azuis, mas podem apresentar diferentes colorações dependendo da espécie (SANTOS, 2008). Algumas espécies desse gênero são usadas, tradicionalmente, na medicina popular como purgativo, vermífugo, expectorante, diurético (SILVA *et al.*, 2012).

Estudos realizados anteriormente com o gênero *Stachytarpheta* demonstraram a ocorrência de iridoides (**Figura 10A**), como a ipolamida (**Figura 11**) e a lamiida e do feniletanoide verbascosídeo (**Figura 10B**) em algumas espécies, incluindo *S. jamaicensis*, *S. cayennensis*, *S. indica*, *S. australis*, *S. mutabilis*, *S. urticifolia* e *S. glabra*. E as atividades biológicas dessas espécies podem ser atribuídas à presença dessas substâncias, pois estudos vêm demonstrando que as mesmas possuem atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, laxativa, hepatoprotetora e antinocepsiva (SULAIMAN, 2008, SOUZA *et al.*, 2010, SOUZA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

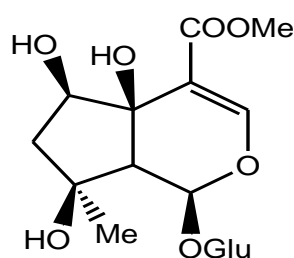


Figura 11. Estrutura química da 6-beta-hidroxiipolamida.

Algumas das espécies do gênero possuem muitos estudos que relatam a fitoquímica e a atividade biológica das mesmas. A espécie *S. cayennensis* (L. C. Rich) Vahl, conhecida como “gervão-roxo” é muito utilizada no Brasil, na Nicarágua e

na Guatemala para o tratamento da malária, aliviando os sintomas mais específicos ou as condições que muita das vezes acompanham a doença. Além disso, a planta é utilizada como analgésico, anti-inflamatório, anti-hipertensivo e antidiarreico (FROELICH, 2008; SOUZA *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com *S. cayennensis* comprovaram as atividades farmacológicas, como a ação antiúlcera, anti-inflamatória e antinociceptiva (VELA *et al.*, 1997; SCHAPOVAL *et al.*, 1998; PENIDO *et al.* 2006). Além disso, estudos realizados por SOUZA *et al.* (2010) demonstram atividade antioxidante significativa para o ácido betunílico e para o verbascosídeo, ambos isolados das raízes de *S.cayennensis*. Algumas espécies citadas na literatura com atividade terapêutica estão demonstradas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Espécies do gênero *Stachytarpheta* citadas na literatura com potencial terapêutico.

Espécie Vegetal	Atividade Farmacológica	Referência Bibliográfica
<i>S. jamaicensis</i> (L. C. Rich) Vahl	Hipertensiva, antigripal, anti-inflamatória, purgativa, vermícida, antifebril, diurética, antimalárica e antibacteriana.	SULAIMAN <i>et al.</i> , 2007.
<i>S. schottiana</i> (L. C. Rich) Vahl (gervão- da- praia).	Vermícida e hepatoprotetora (uso popular).	HORTA BOSCOLO & SENNA VALLE, 2008.
<i>S. canyennensis</i> (L. C. Rich) Vahl	Antiulcerativo, anti-inflamatória, antinociceptiva, antidiarreica, sedativa, antioxidante (raízes), antimalárica.	VELA <i>et al.</i> , 1997; SCHAPOVAL <i>et al.</i> , 1998; PENIDO <i>et al.</i> , 2006.
	Anti-hipertensivo	KVIST <i>et al.</i> , 2006.
	Anti-inflamatória e antinociceptiva	IDU <i>et al.</i> , 2006.
	Antiulcerativa (causadas por <i>Leishmania</i> spp) e hipoglicemiante.	SCHAPOVAL <i>et al.</i> , 1998; MOREIRA <i>et al.</i> , 2002.
	Antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora	ROENGSUMRAN <i>et al.</i> , 2002; ADEBAJO, 2007;

1.6.1 *Stachytarpheta crassifolia*

Stachytarpheta crassifolia (Rich.) Vahl é uma planta nativa encontrada na Restinga de Jurubatiba, na costa do sudeste brasileiro. E apesar da importância do gênero não foram encontrados estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica envolvendo a espécie (**Figura 12**).



Figura 12. Foto das flores de *Stachytarpheta crassifolia*. Fonte: Dittrich, 2014.

2. Justificativa

Não existem estudos sobre a constituição química e avaliação da biológica da espécie *Stachytarpheta crassifolia*, na literatura só existem informações sobre a constituição química e avaliação da atividade biológica de outras espécies pertencentes ao gênero *Stachytarpheta*, como a *S. cayennensis* e *S. jamaicensis*.

Esta espécie foi selecionada tendo em vista, além da escassez de estudos a cerca dela, o fato do nosso grupo ter obtido resultados químicos e farmacológicos bastante relevantes com a espécie *S. schottiana* também coletada na Restinga de Jurubatiba (LEAL, 2014). Atividades biológica como antioxidante, imunomoduladora, antibacteriana e vasodilatadora foram por nós descritas para *S. schottiana* e foi um estímulo para a escolha e estudo de *S. crassifolia*.

3. Objetivos Gerais

Realizar o estudo do perfil fitoquímico e da atividade antioxidante de *Stachytarpheta crassifolia*, de forma a contribuir para o conhecimento a cerca das espécies da família Verbenaceae ocorrentes na Restinga de Jurubatiba.

4. Objetivos Específicos

- Investigar o perfil fitoquímico do extrato e das frações de *S. crassifolia* por CLAE-DAD;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e das amostras de *S. crassifolia*;
- Quantificar flavonoides totais;
- Quantificar feniletanoides totais, em especial o verbascosídeo;
- Verificar a correlação entre a atividade antioxidante e os teores de flavonoides, feniletanoides e verbascosídeo.

5. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos naturais LaProN-UFRJ/Macaé). Todos os solventes utilizados foram em grau de padrão analítico (PA) da Tedia[®] e os solventes usados para análise em CLAE-DAD foram em grau espectroscópico para HPLC, oriundos da Tedia[®]. A água utilizada para as análises foi purificada pelo sistema Elga Purelab.

5.1 Coletas do Material Botânico

As folhas da espécie *S. crassifolia* foram coletadas no Parque Nacional de Jurubatiba (220' e 22023'S e 41015' e 41045'W), no Município de Quissamã, e sua identificação botânica foi feita pela Prof^a. Dra. Tatiana U.P. Konno e a exsicata (RFA 38975) foi guardada no herbário do NUPEM/UFRJ.

5.2 Obtenção do Extrato Bruto de *S. crassifolia*

O material seco e pulverizado de *S. crassifolia* foi submetido à maceração estática à temperatura ambiente por 7 dias. O macerado obtido foi filtrado e a solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotatório.

5.3 Partição líquido-líquido a partir do Extrato de *S. crassifolia*

Sob agitação o extrato bruto obtido foi submetido em seguida a um processo de partição líquido-líquido com solventes extratores em ordem crescente de polaridade: hexano (HeX), diclorometano (Dicl), acetato de etila (FAocEt), butanol (But) e água (AQ).

Foram pesados 3,2351 g do extrato bruto e dissolvido em uma solução 9:1 de metanol/água (225 ml de metanol e 25 ml de H₂O). Este foi transferido de um elermeyer para um funil de separação e adicionou-se 250 ml de hexano para partição. A fração hexânica foi separada e foi posta para secar no evaporador rotatório e em banho-maria e foi quantificada. A solução hidroalcoólica foi rotaevaporada e solubilizada em H₂O, após a mesma retornou ao funil e foram

adicionados 250 ml de diclorometano. Esse procedimento foi feito para os outros solventes, acetato de etila, e butanol, com isso pode-se calcular o rendimento de cada fração. Um esquema contendo as diferentes etapas do processo de fracionamento do extrato bruto com os respectivos solventes está ilustrado na **Figura 10**.

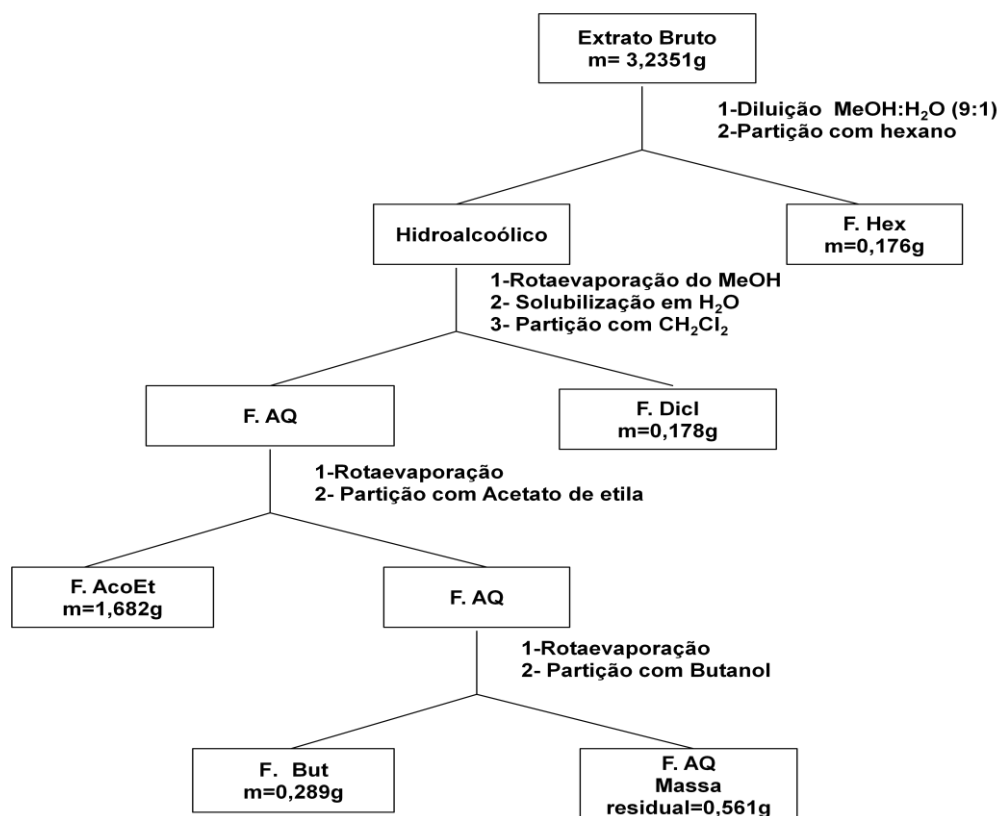


Figura 13. Esquema da Partição Líquido-Líquido.

5.4 Análise por CLAE-DAD

O extrato bruto e as frações de média polaridade, AcoEt, butanol, e AQ obtidas na partição líquido-líquido de *S. crassifolia* e o padrão verbascosídeo foram selecionados para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em aparelho Shimadzu Proeminence equipado com detector ultravioleta em arranjo de diodos (CLAE-DAD). Nas análises foi utilizada coluna analítica de sílica C-18 de fase reversa (4.6 x 250 mm; 5 micra; Supelcosil), vazão de 1,0 mL/min. Foram injetados 10,0 µL das amostras de *S. crassifolia* na concentração de 500

$\mu\text{g/mL}$ a detecção foi feita a 254 e 365 nm. Para eluição das amostras utilizou-se o gradiente de H_2O pH 2,5 (H_3PO_4) e acetonitrila conforme a seguir (**Tabela 2**).

Tabela 2. Método utilizado para eluição dos compostos.

T (min.)	% Acetonitrila
0	10
10	32
22	40
23	46
29	50
34	80
44	85
48	100

A quantificação dos verbascosídeo foi feita empregando-se a curva de calibração contendo cinco concentrações diferentes da substância, o verbascosídeo isolado de *Stachytarpheta schottiana* por Leal, 2014, que foram preparadas com acetonitrila (ACN) e H_2O destilada na proporção de 1:1 (250 ml de ACN e 250 ml de H_2O). Cada concentração foi analisada em triplicata no cromatógrafo, com volume de injeção de 10 μl . As medias das áreas dos picos de cada uma das amostras foram lançadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta obtida é expressa por $y=a+bx$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. E com isso foi possível determinar a quantidade de verbascosídeo presente nas amostras (**Figura 14**).

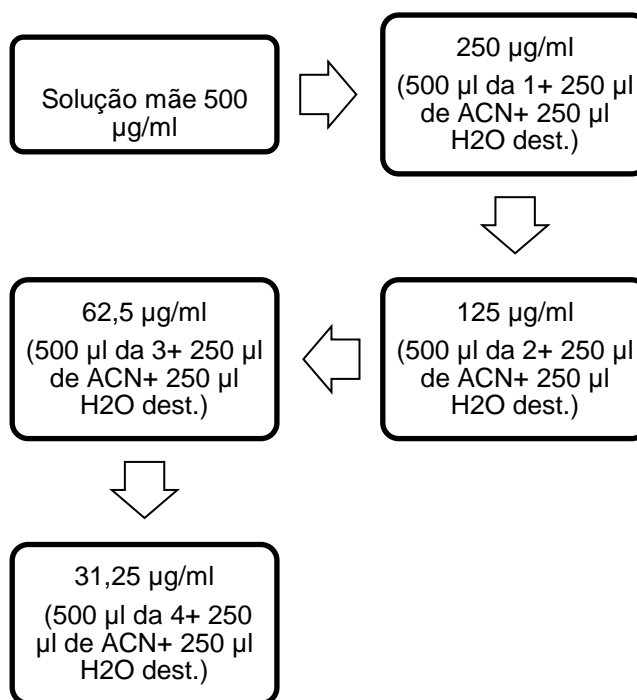


Figura 14. Diluição em H₂O destilada e acetonitrila da concentração mãe do padrão secundário verbascosídeo para análise em CLAE-DAD.

A fração acetato de etila foi a que obteve uma maior área do pico referente ao feniletanoide verbascosídeo, como demonstrado nos itens 6.2.2.1 6.3.1, por isso realizou-se uma coinjeção em CLAE-DAD da fração na concentração de 5 mg/ml (200 µl) com o verbascosídeo isolado de *S. schottiana* na concentração de 250 µg/ml (200 µl) para confirmar a presença do mesmo na amostra.

Com a obtenção da curva de calibração do verbascosídeo foi possível quantificar o teor de feniletanoides totais nas amostras. A área relativa referente aos picos com espectros semelhantes aos dos feniletanoides nas amostras foram somadas e plotadas na equação da reta $y = 327086,09462x - 19462,70833$, no lugar do y, obtida através da curva de calibração do verbascosídeo, a partir de então obteve-se o valor de x (coeficiente angular) (quantidade de feniletanoides), expresso em µg de verbascosídeo.

A quantificação de flavonoides totais foi feita empregando-se a curva de calibração da rutina contendo cinco concentrações diferentes da substância, 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml e 62,5 µg/ml, utilizando a mesma metodologia para obtenção da curva de calibração do verbascosídeo. A área relativa referente aos picos com espectros semelhantes aos dos flavonoides nas amostras

foram somadas e plotadas na equação da reta $y = 2117432,02366x - 2065756,29167$, no lugar do y , obtida através da curva de calibração da rutina, a partir de então obteve-se o valor de x (coeficiente angular) (quantidade de flavonoides), expresso em μg de rutina.

A metodologia utilizada para quantificação de feniletanoides totais e de flavonoides totais foi a mesma utilizada na análise das amostras.

5.5 Avaliação da Atividade Sequestradora do radical DPPH (Atividade Antioxidante).

A atividade antioxidante foi avaliada para o extrato bruto obtido para as partições obtidas através da partição líquido-líquido da espécie *Stachytarpheta crassifolia*, utilizando o método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

A atividade antioxidante foi realizada de acordo com Brand-Williams e Berset (1995). Foram utilizados como controles positivos verbascosídeo e o (Extrato padronizado de *Ginkgo biloba*) Egb761.

Preparou-se uma solução mãe para o extrato bruto, para as frações e para o padrão Egb761 na concentração de $280 \mu\text{g/mL}$. Pesou-se $1,4 \text{ mg}$ da amostra e solubilizou em $200 \mu\text{l}$ DMSO, a solução foi transferida para um balão de 5 ml e o volume do mesmo foi completado com etanol. A solução mãe das amostras foi diluída em etanol, obtendo-se as seguintes concentrações $1,4$; 7 ; 14 ; 35 ; 70 ; $140 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de solução mãe e de etanol utilizada para preparar cada concentração.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Solução mãe (μl)	Etanol (μl)
280	1000	-
140	500	500
70	250	750
35	125	875
14	50	950
7	25	975
1,4	5	995

Para o padrão verbascosídeo foi preparada também uma solução mãe na concentração de 280 µg/ml, na mesma condição das outras amostras. A partir dela prepararam-se amostras nas concentrações de 0,068 – 70 µg/mL, conforme mostrado na **Figura 15**.

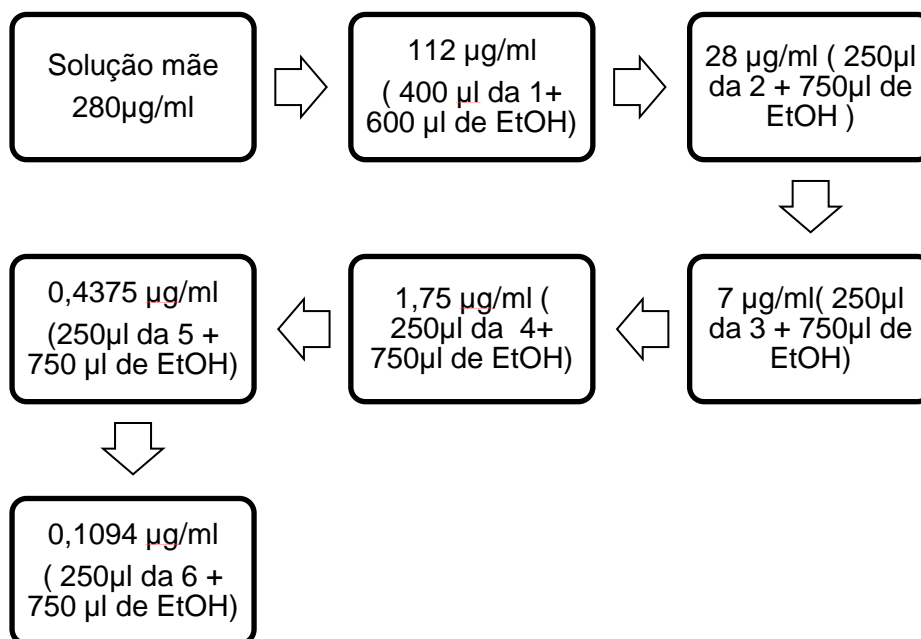


Figura 15. Diluição em etanol da concentração mãe do padrão verbascosídeo.

Para realização dos experimentos utilizou-se microplaca de 96 poços (**Figura 16**). As amostras (125 µl) e o DPPH (50 µl), 9 alíquotas do controle (50 µl de DPPH + 125 µl de etanol), uma alíquota do branco (125 µl da amostra + 50 µl etanol) para cada amostra e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Esse procedimento foi feito em triplicata, ou seja, três experimentos independentes. As leituras foram obtidas a 517 nm em equipamento modelo ASYS UVM 340 (**Figura 17**).

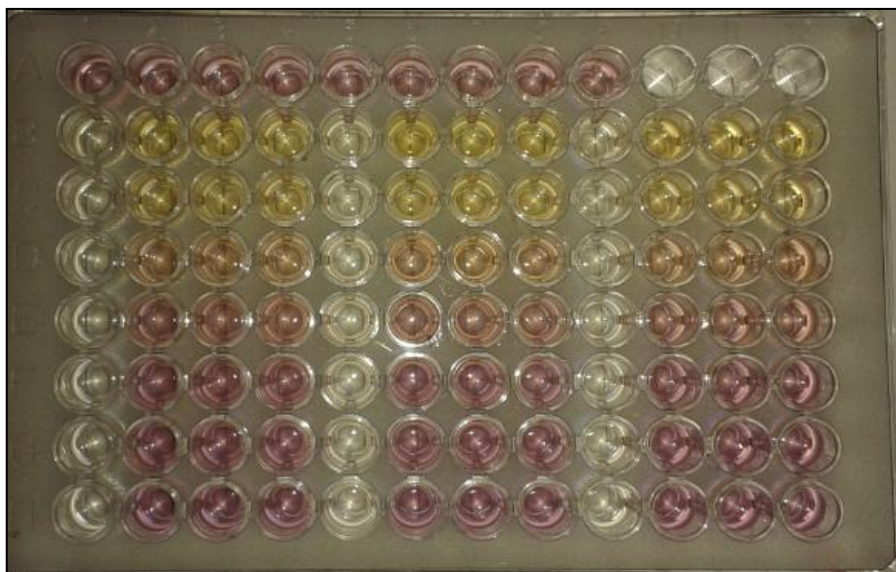


Figura 16. Placa de 96 poços representando o ensaio de DPPH em triplicata em microplacas.

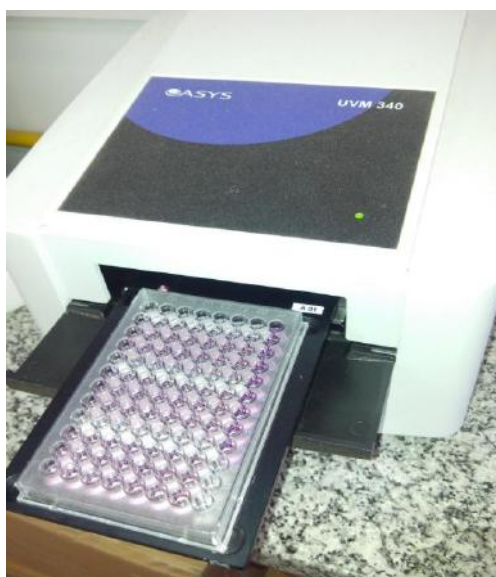


Figura 17. Leitor de microplacas modelo ASYS UVM 340 utilizado no ensaio do DPPH.

A atividade foi expressa de acordo com a equação 1 de MENSOR *et al.* (2001) e expressos em valores de CE_{50} (concentração efetiva para obter 50 % da atividade máxima, estimada em 100%), que foi calculada a partir do programa GraphPad Prism 3.0.

$$\%AAO = \frac{[(100 - (Absa - Absb))x100]}{Absc}$$

Equação 1. Porcentagem de atividade antioxidante

5.6 Análise Estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem a média de três ensaios independentes ($n=3$) \pm DP da média. A comparação entre os dados foi avaliada através do programa Microsoft Office Excel e GraphPAd Prism 3, onde foram feitas análises de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes resultados que apresentam probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p<0,05$). Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de concentração resposta de cada experimento, através de regressão não linear para um total de 3 experimentos independentes. A avaliação da correlação entre a atividade antioxidante e o teor de feniletanoides, de verbascosídeo e de flavonoides foi feita através da correlação de Pearson.

6. Resultados e Discussão

6.1 Rendimento das frações após o processo extrativo

A massa de extrato bruto da *S. crassifolia* utilizada para fazer a partição foi de 3,2351 g. Os rendimentos das frações foram calculados a partir da relação percentual da massa de material vegetal recuperado no processo em relação a massa do extrato utilizado (**Equação 2**). A **Tabela 4** descreve os rendimentos das frações. A fração acetato de etila foi a que obteve um maior rendimento.

$$\%p/p = \frac{\text{Massa do extrato orgânico} \times 100\%}{\text{Massa de extrato bruto}}$$

Tabela 4. Rendimento total das frações após processo de partição líquido-líquido.

Frações	Massa obtida(g)	Rendimento (%p/p)
Hexânica	0,1755	5,42
Diclorometano	0,1781	5,50
Acetato de Etila	1,6816	51,98
Butanólica	0,2899	8,96
Aquosa	0,5611	17,34

A atividade antioxidante das frações obtidas foi avaliada, e as mesmas foram analisadas no CLAE-DAD analítico, com intuito de separar as substâncias e pode identificar quais são os metabólitos secundários que podem estar presentes em cada fração.

6.2 Análise Qualitativa do experimento em CLAE-DAD

Está técnica foi utilizada para obter o perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações obtidas por partição líquido-líquido.

6.2.1 Extrato bruto de *S. crassifolia*

Analisando o perfil cromatográfico do extrato bruto de *S. crassifolia* observou-se seis picos majoritários com diferentes proporções de área entre os tempos de retenção (Tr) de 10 a 20 minutos, que identificam a presença de feniletanoides, flavonoides e de ácido aromático simples (**Figuras 18**). O pico com tempo de retenção de igual a 9,63 min., e absorvância entre 202 e 227 nm sugere a presença de ácido aromático simples (C6-C1) (**Figura 19**). Os picos com tempo de retenção de 13,78 min. e de 14,43 min. apresentam máximo de absorvância de 201, 299 e 333 nm o que sugere a presença de um esqueleto compatível com feniletanoides (C6-C3) (**Figura 20**), esta classe de substâncias fenólicas é comumente encontrada em espécies da família Verbenaceae. E os picos com tempos de retenção de 15,00; 15,29 e 16,65 min., apresentando absorvância máxima de 205, 271 e 341 indicam

presença de flavonoides no extrato (**Figura 21**). No estudo realizado por LEAL (2014) com o extrato bruto de *S. schottiana* também verifica-se a presença de feniletanoides e flavonoides na amostra.

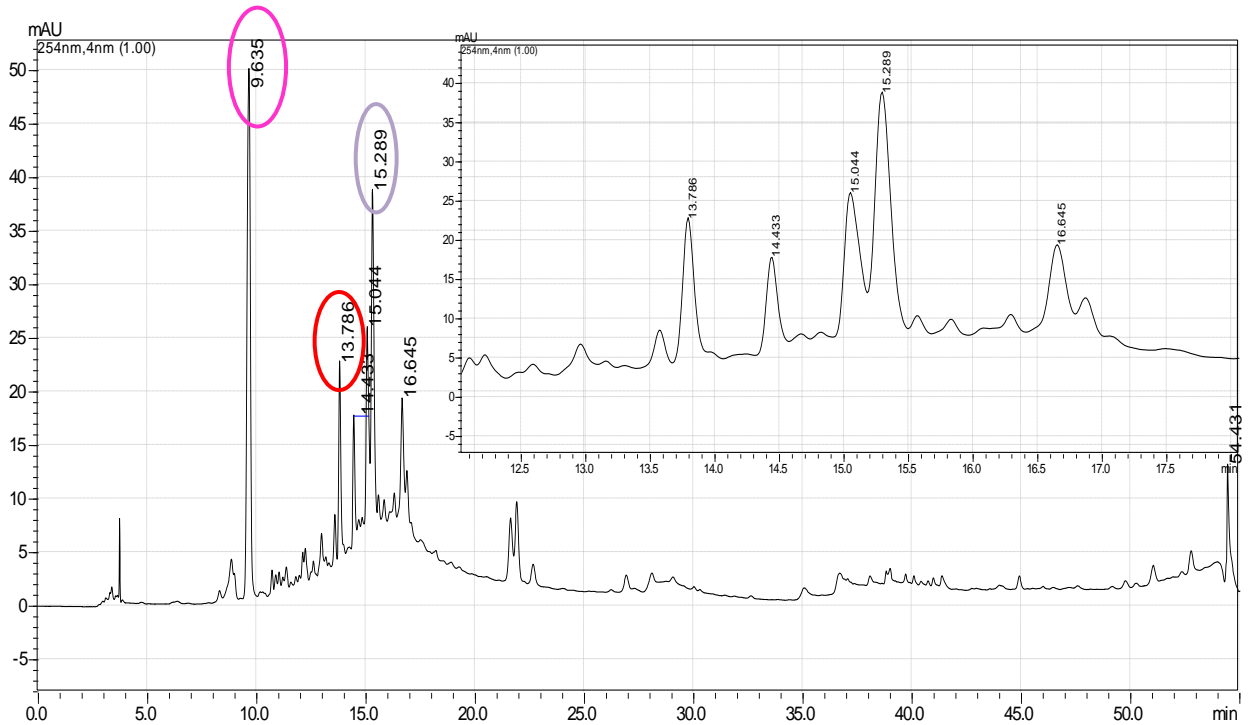


Figura 18. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato bruto de *Stachytarpheta crassifolia* com os tempos de retenção destacados, em 254 nm. E ampliação entre os tempos de retenção de 12 e 18 minutos.

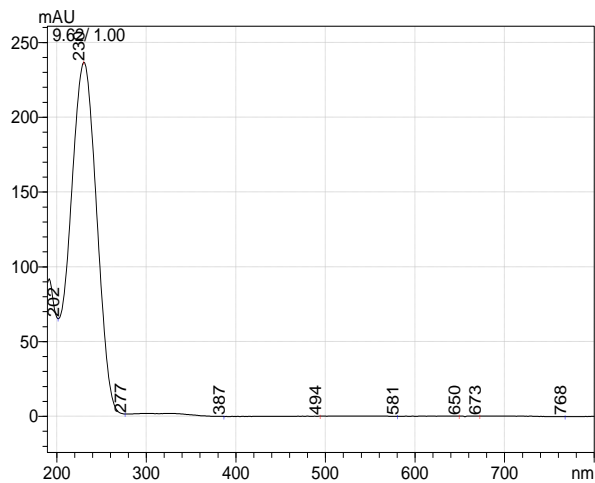


Figura 19. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 9,63 min. Indica a presença de ácido aromático simples no extrato.

Os feniletanoides possuem em sua estrutura dois grupamentos cromóforos, a porção C6-C3 e a porção C6-C2, as quais possuem absorbâncias características no espectro de UV, de 210, 217 e 331 nm. O espectro deste fenilpropanóide é semelhante ao obtido por outros autores (CANTELI, 2012; LEAL, 2014).

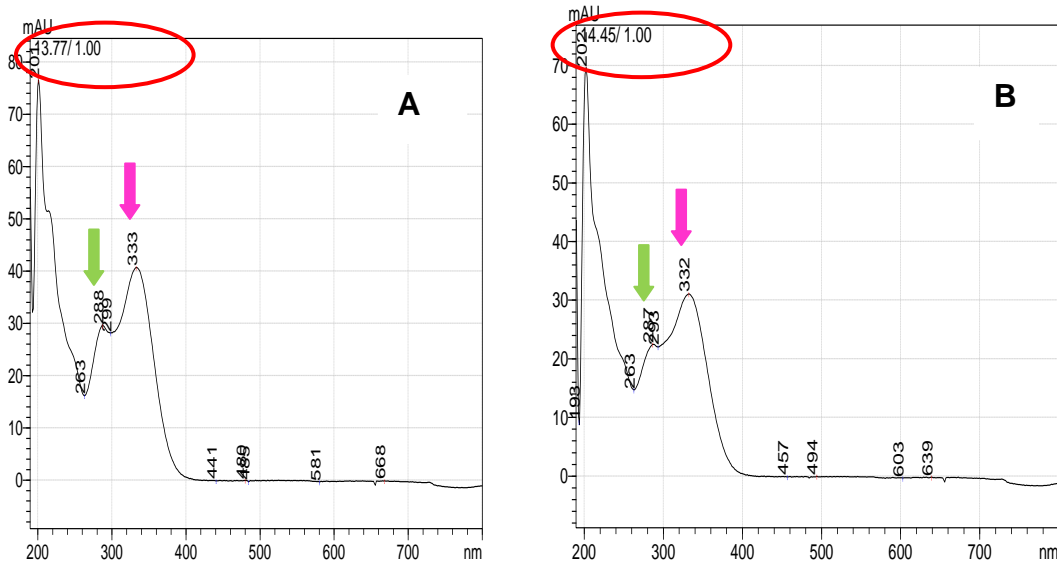


Figura 20. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 13,79 min e (B) 14,43min. Indica presença de feniletanoides no extrato.

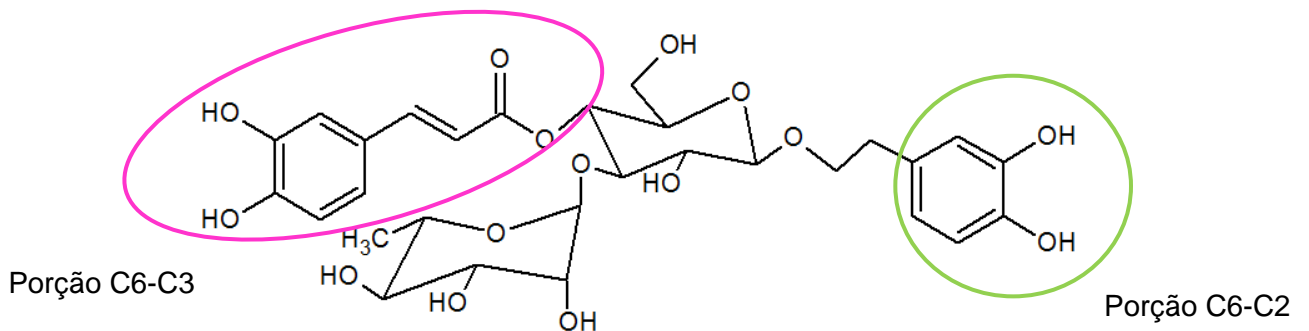


Figura 21. Feniletanoide verbascosídeo, com os grupamentos cromóforos marcados.

Os flavonoides possuem em sua estrutura dois grupamentos cromóforos os quais possuem absorbâncias características no espectro de UV, sendo de 251-271 nm e de 335-350nm (Figura 22 e 23) (GREENHAM . *et al*, 2003).

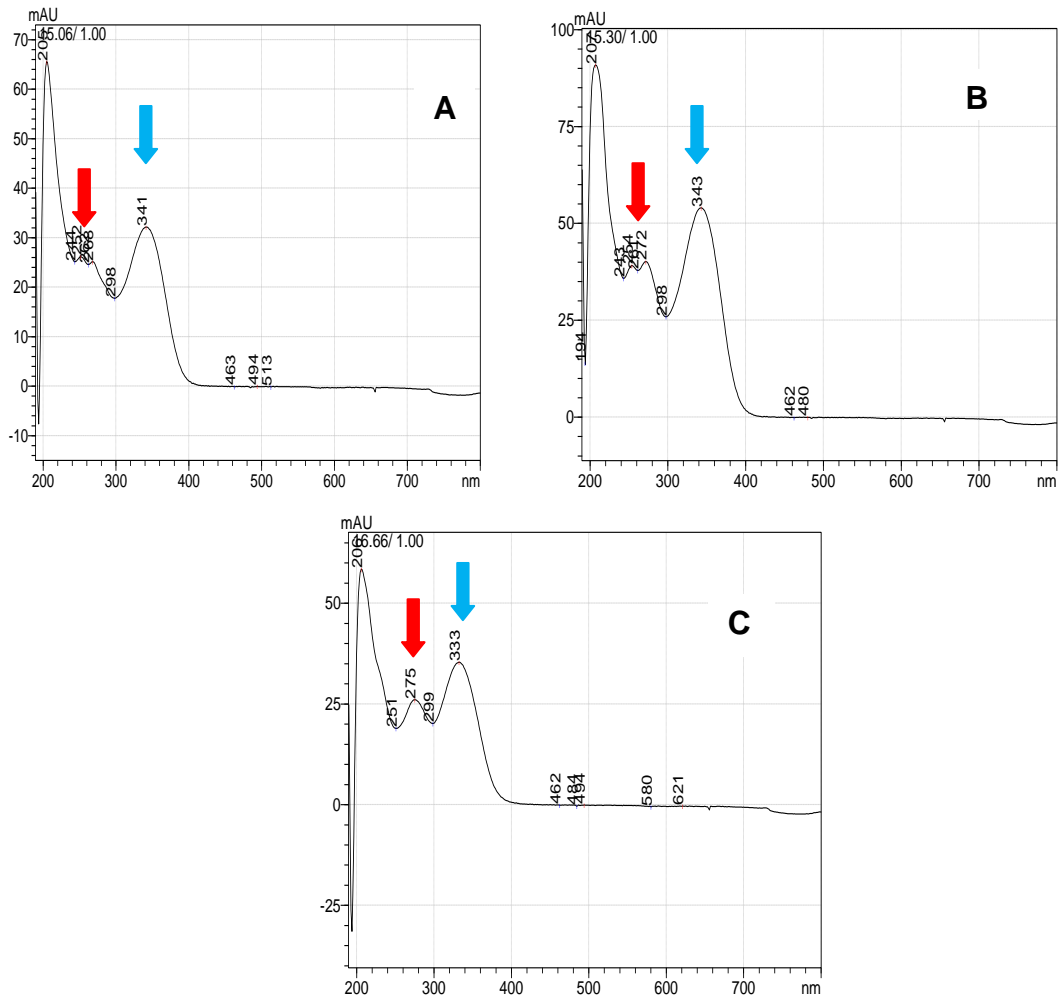


Figura 22. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,04 min., (B) 15,29 min. e (C) 16,65 min.. Indica presença de flavonoides no extrato.

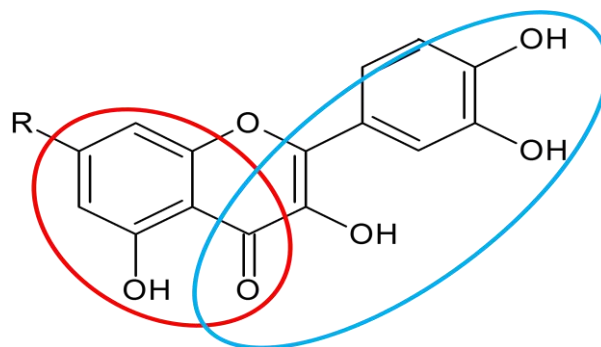


Figura 23. Estrutura geral de um flavonoide, com os grupamentos cromóforos marcados.

Foi isolado no nosso grupo o feniletanoide verbascosídeo da espécie *Stachytarpheta schottiana*. Como foi verificada a presença de feniletanoídeos no extrato, analisou-se o composto isolado em CLAE-DAD utilizando a metodologia descrita no item 5.4. Comparando o cromatograma obtido nessa análise com o cromatograma do extrato bruto observou-se, através do tempo de retenção e do espectro de UV, a presença desse composto no extrato. Na **Figura 24** está apresentado o cromatograma do verbascosídeo isolado de *S. schottiana*. Os espectros de UV do verbascosídeo isolado (Tr= 13,78 min.) e o do pico do cromatograma do extrato bruto referente a esse composto (Tr=13,77 min.) estão representados na **Figura 25**. O verbascosídeo é um feniletanoide que já foi isolado e identificado em espécies do gênero *Stachytarpheta* (PÉRTILE, 2007; SULAIMAN, 2007; FROELICH, 2008; SOUZA *et.al.*, 2010; LEAL, 2014).

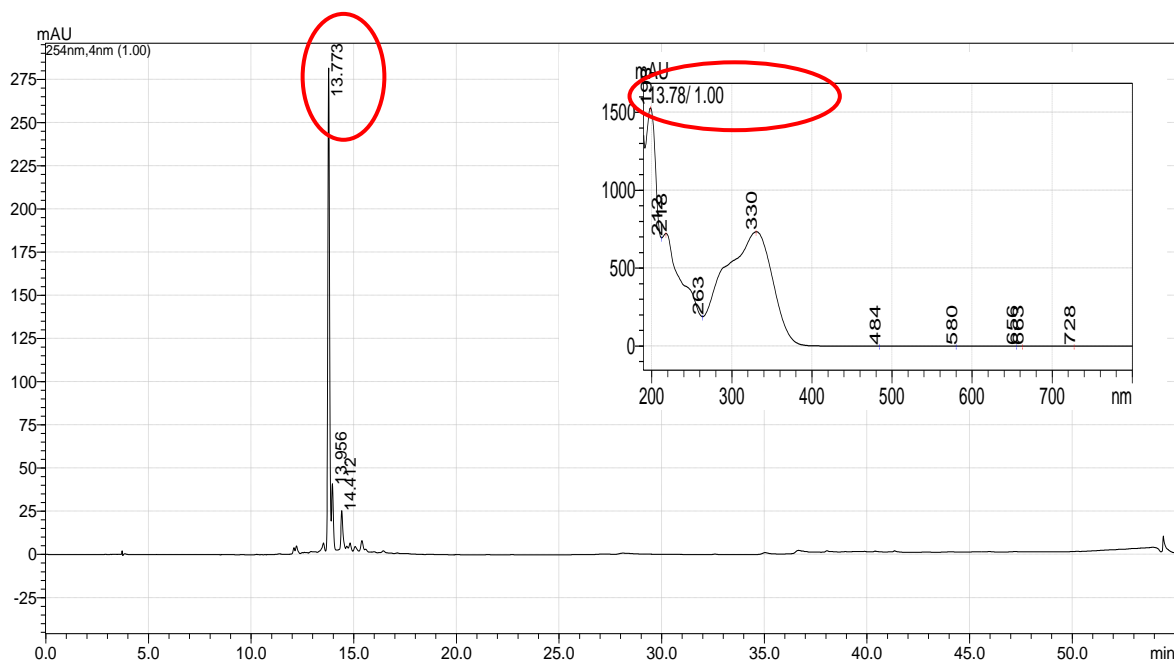


Figura 24. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo do feniletanoide verbascosídeo isolado de *S. schottiana* com os tempos de retenção destacados, em 254nm.

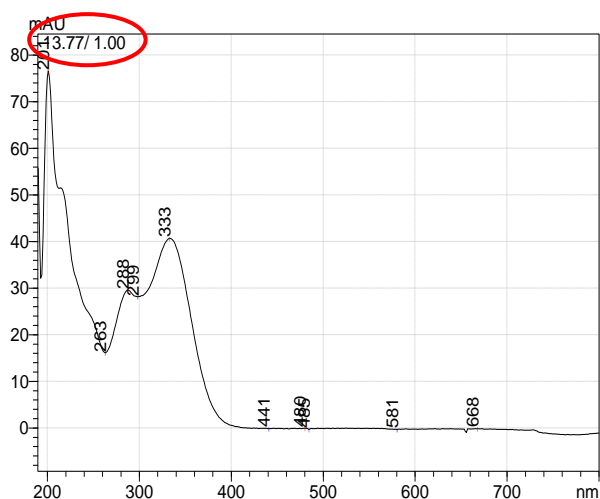


Figura 25. Espectro de UV do verbascosídeo do extrato bruto de *S. crassifolia*.

6.2.2 Frações

6.2.2.1 Fração Acetato de Etila

A fração acetato de etila apresentou 8 picos majoritários entre os tempos de retenção de 9 – 20 minutos (**Figura 26**), que são semelhantes aos visualizados no extrato bruto, mas com diferentes proporções de área, e indicam a presença de ácido aromático simples (**Figura 27**), feniletanoides (**Figura 28**) e flavonoides (**Figura 29**).

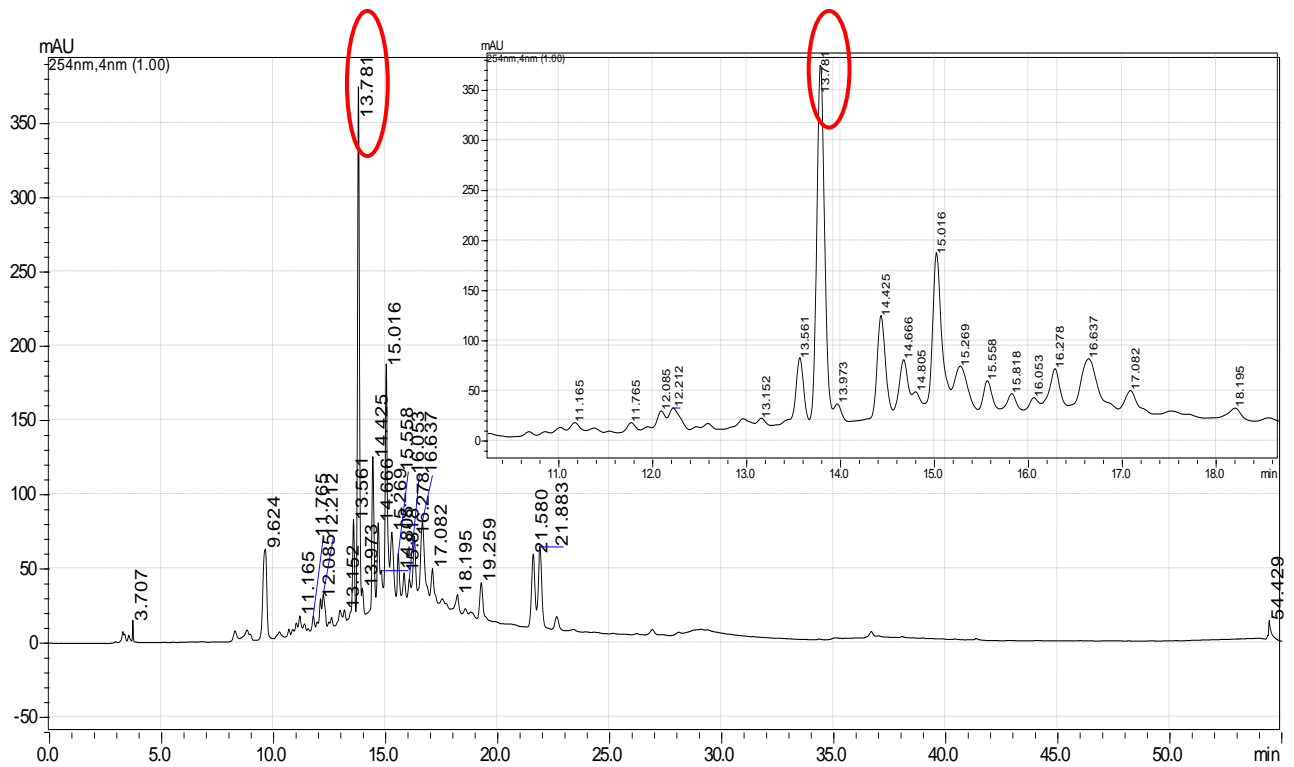


Figura 26. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração acetato de etila de *Stachytarpheta crassifolia* com os tempos de retenção destacados, em 254 nm. Ampliação entre os tempos de retenção 10 e 20 minutos

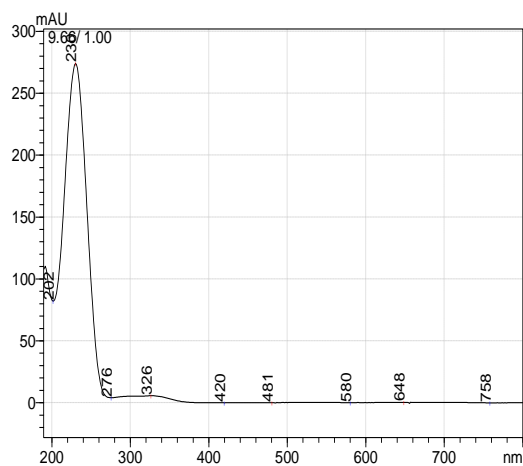


Figura 27. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 9,62 min. Indica a presença de ácido aromático simples na fração acetato.

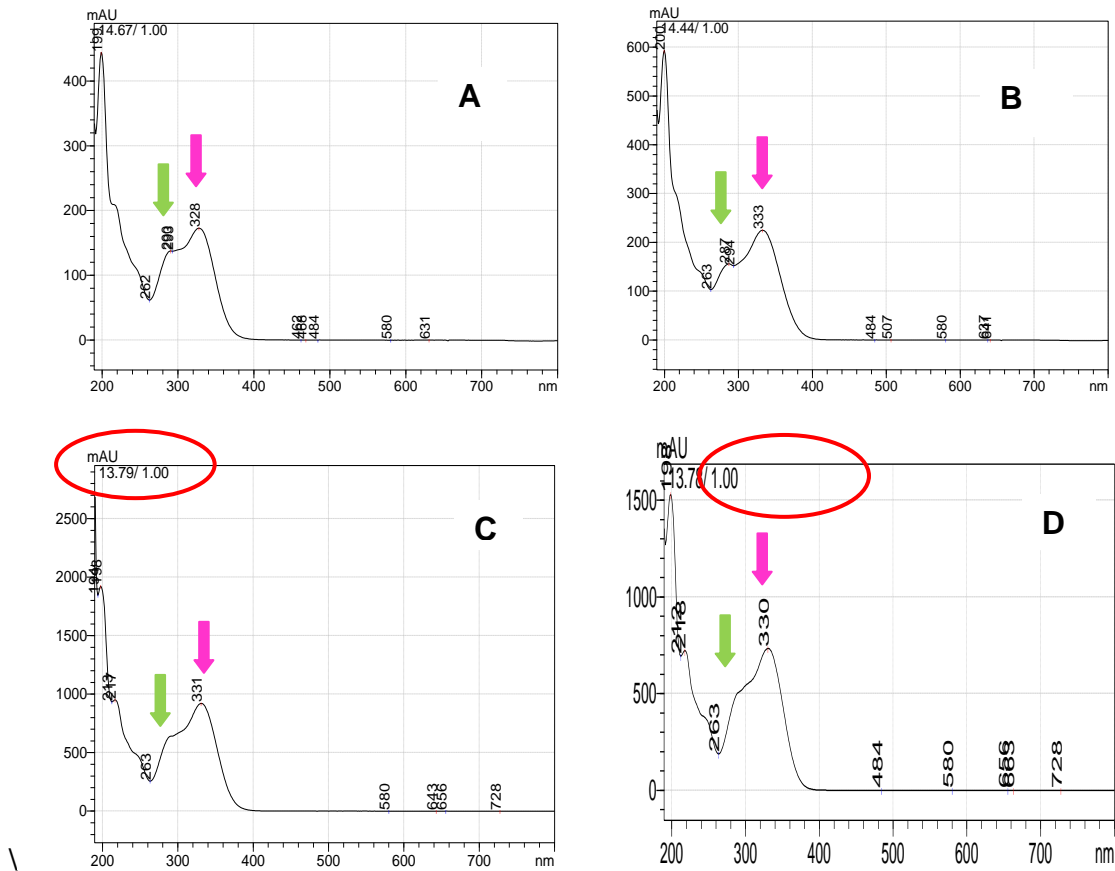


Figura 28. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 14,67, (B) 14,43 e (C) 13,78 min. Indica presença de feniletanoides na fração acetato. (D) Espectro de UV do feniletanoide verbascosídeo isolado de *S. schottiana*.

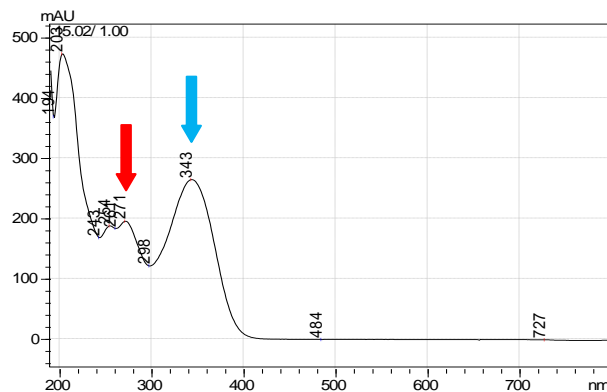


Figura 29. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de 15,02 min.. Indica presença de flavonoides na fração acetato.

O pico majoritário da amostra, tempo de retenção de 13,78 minutos, possui o mesmo espectro de UV e tempo de retenção do feniletanoide verbascosídeo isolado

de *S. schottiana* ($T_r = 13,78$ min.) (**Figura 28C e 28D**). Para confirmar a presença dessa substância na amostra realizou-se uma coinjeção da fração acetato de etila com o verbascosídeo isolado de *S. schottiana*, na proporção de 1:1. E através dessa análise confirmou-se a presença do verbascosídeo na amostra, pois a soma das áreas se aproxima da área da coinjeção (1.438.203) e o tempo de retenção foi coincidente (**Figura 30**) (**Tabela 5**).

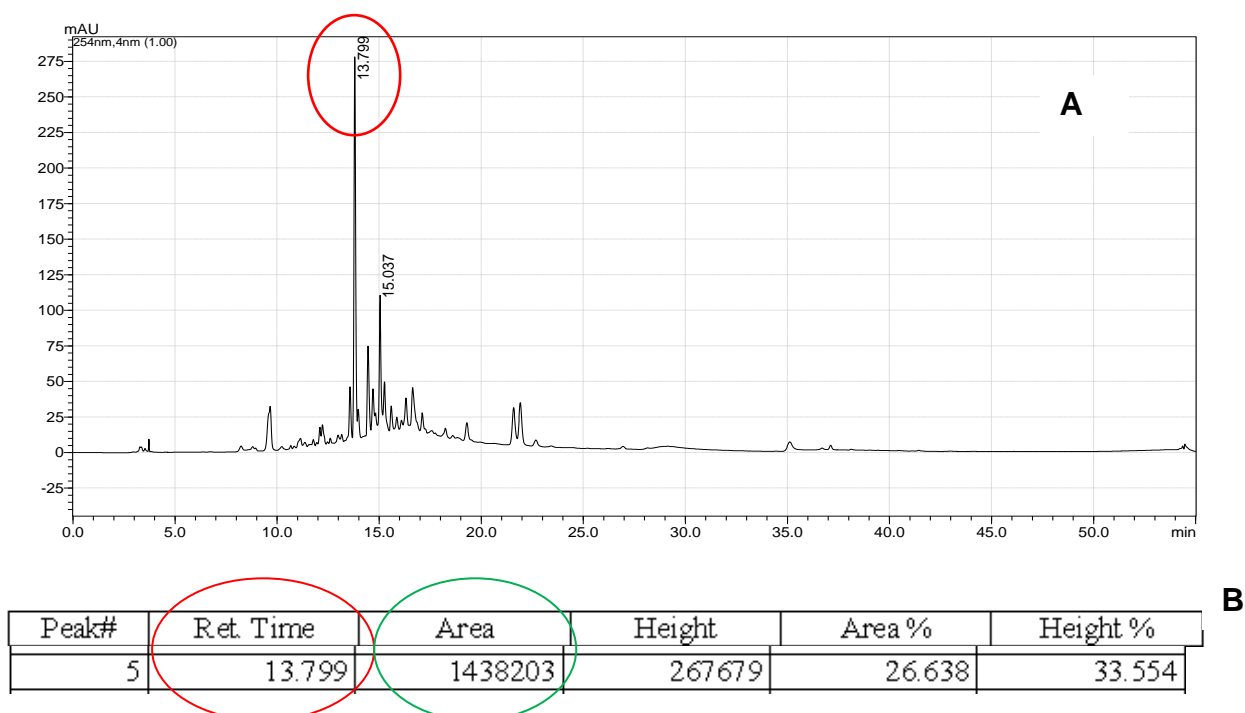


Figura 30. (A) Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da coinjeção da fração acetato de etila de *S. crassifolia* com o verbascosídeo isolado de *S. schottiana* com os tempos de retenção destacados, em 254nm. (B) Tabela com área referente ao pico do verbascosídeo na coinjeção.

Tabela 5. Áreas da fração acetato de etila e do verbascosídeo na concentração de 125 µg/ml. A soma das áreas se aproxima da área da coinjeção (1.438.203).

Amostras	Área
Acetato de etila 250 µg/ml	1.021.688
Verbascosídeo 125 µg/ml	368.745
Soma	1.390.433

6.2.2.2 Fração Butanólica

A fração butanólica apresentou 6 picos majoritários entre os tempos de retenção de 9-18 minutos (**Figura 31**) que são semelhante aos picos do extrato bruto e fração em acetato de etila, mas com diferentes proporções de área. Com espectros semelhantes aos de ácidos aromáticos simples (C6-C1) (**Figura 19 e 27**), de feniletanoide (C6-C3) (**Figura 32**) e de flavonoides (**Figura 33**). Entre os feniletanoides presentes na amostra tem-se o verbascosídeo, que foi identificado através da comparação do tempo de retenção da amostra (Tr=13,83 min.) com o tempo de retenção do feniletanoide verbascosídeo isolado de *S. schottiana* (Tr= 13,78 min.). Além disso, também foi feita a comparação entre os espectros de UV (**Figura 25 e 32B**). Ao contrário da fração acetato de etila os maiores picos presentes no cromatograma são os referentes ao ácido aromático simples, com tempo de retenção de 9,64 min. (**Figuras 19 e 27**) e o flavonoide com tempo de retenção de 15,35 min. (**Figura 33B**).

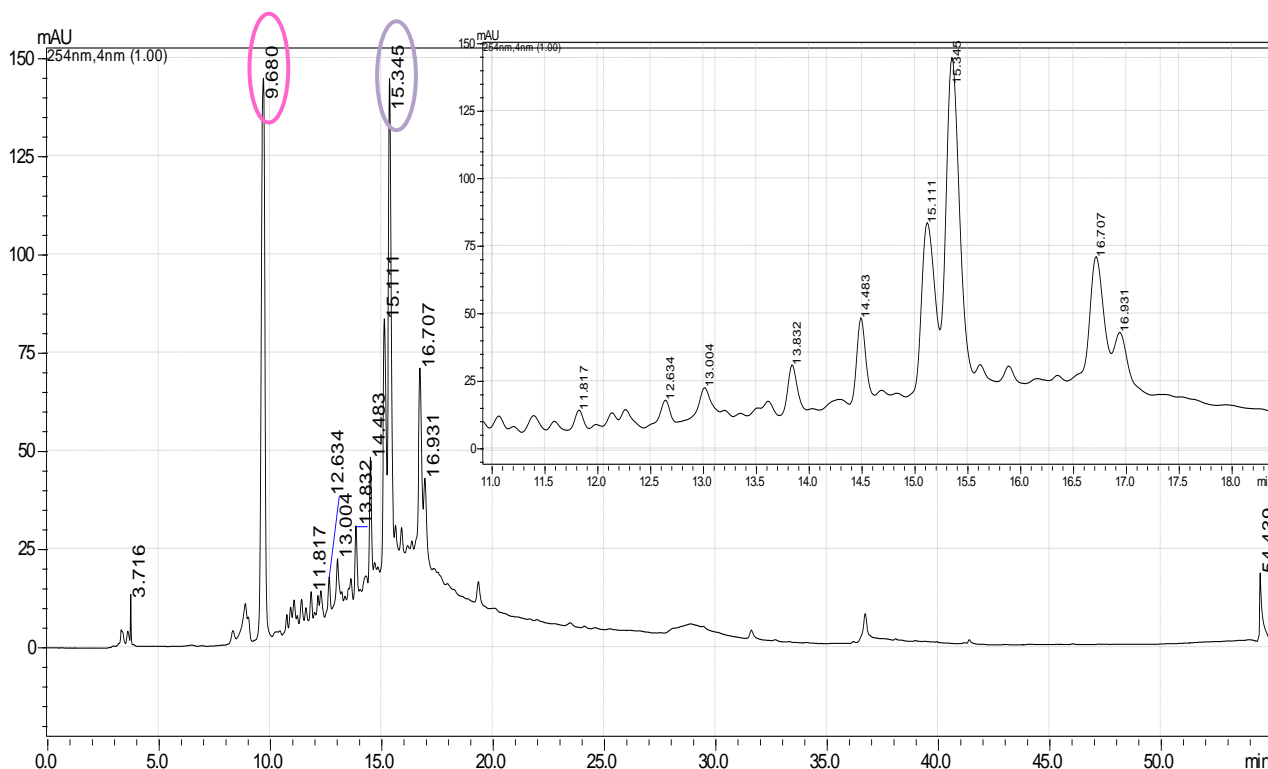


Figura 31. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração butanólica de *Stachytarpheta crassifolia* com os tempos de retenção destacados, em 254nm. Ampliação entre os tempos de retenção de 11 e 19 minutos.

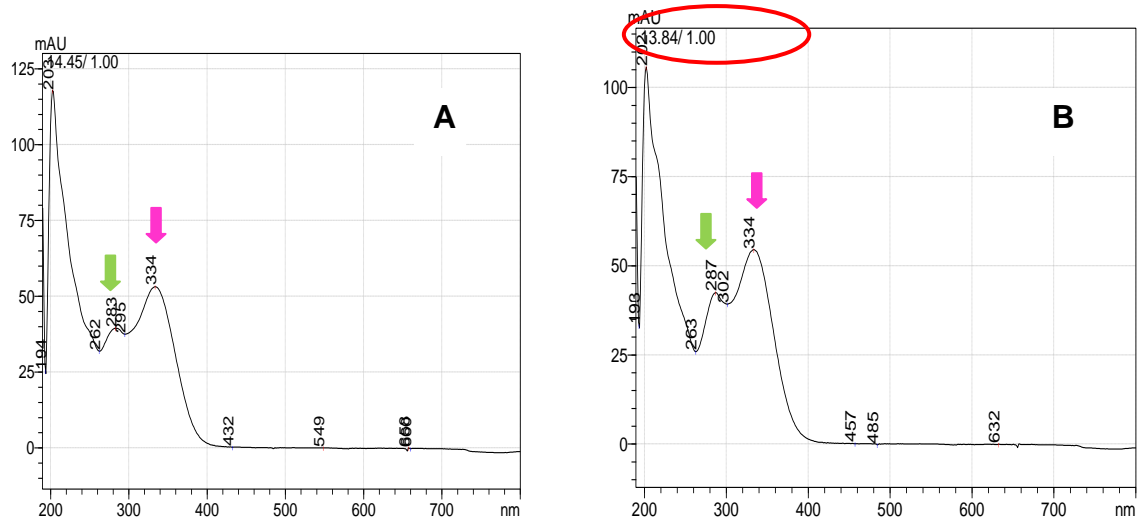


Figura 32. Espectro de UV dos picos com tempo de retenção de (A) 14,45 e (B) 13,83 min.. Indica presença de feniletanoides na fração butanólica. (B) Mesmo tempo de retenção e espectro de UV do feniletanoide verbascosídeo.

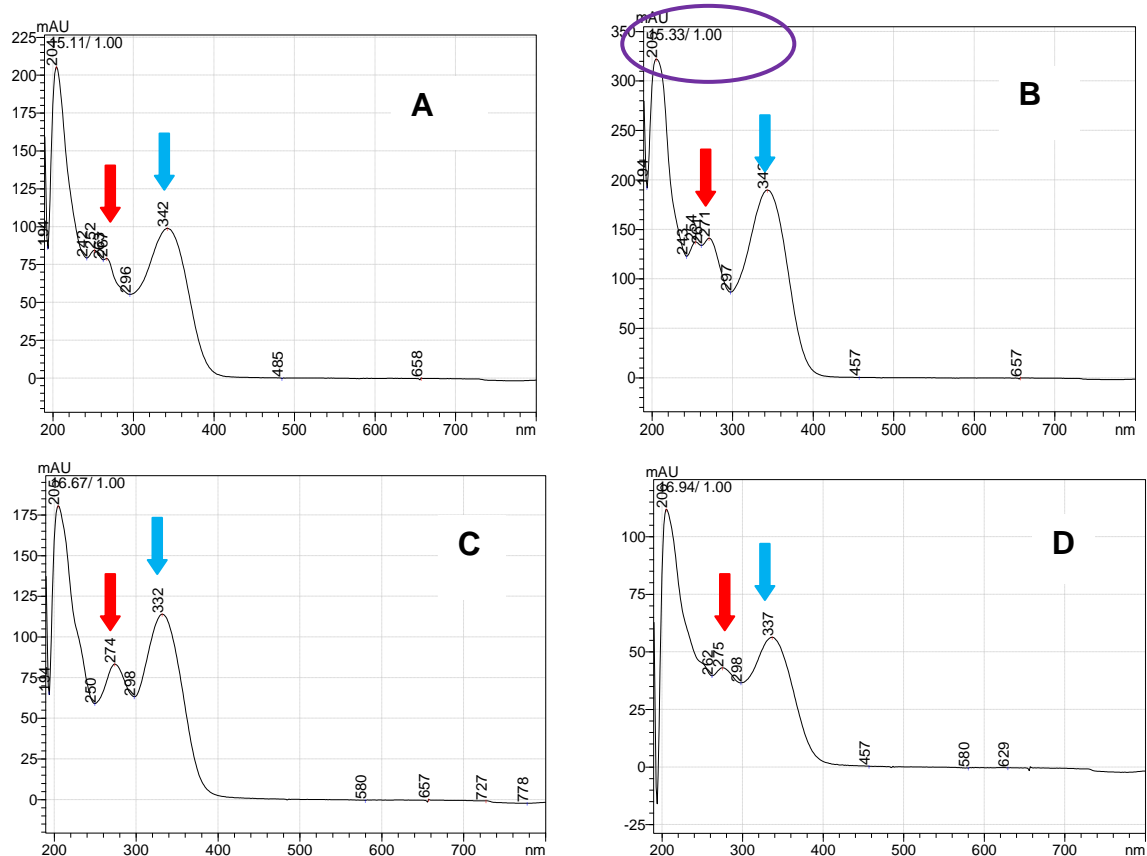


Figura 33. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,11, (B) 15,35 (C) 16,71 e (D) 16,93 min. Indica presença de flavonoides na fração butanólica.

6.2.2.3 Fração Aquosa

A fração aquosa apresentou 6 picos majoritários entre os tempos de retenção de 3-18 minutos (**Figura 34**). Sendo dois deles com espectros de UV e tempo de retenção ($Tr= 3,71\text{min.}$ e $Tr=9,63\text{ min.}$) semelhantes aos de ácidos aromáticos simples (**Figura 35**), os outros quatro picos são semelhantes a espectros de UV de flavonoides ($Tr= 15,07$; $Tr= 16,85$, $Tr=16,61$ e $Tr=15,29\text{ min.}$) (**Figura 36**). Essa fração possui picos majoritários semelhantes aos encontrados no extrato bruto, na fração acetato de etila e na fração butanólica. Apesar dessa semelhança, não são encontrados entre os picos majoritários, os da classe feniletanoide (**Figura 34**). Isso pode porque a essa classe de substâncias fenólicas foi bem extraída na partição feita com os outros solventes. Analisando o espectro como um todo encontram-se substâncias pertencentes a essa classe, mas seu picos não são majoritários.

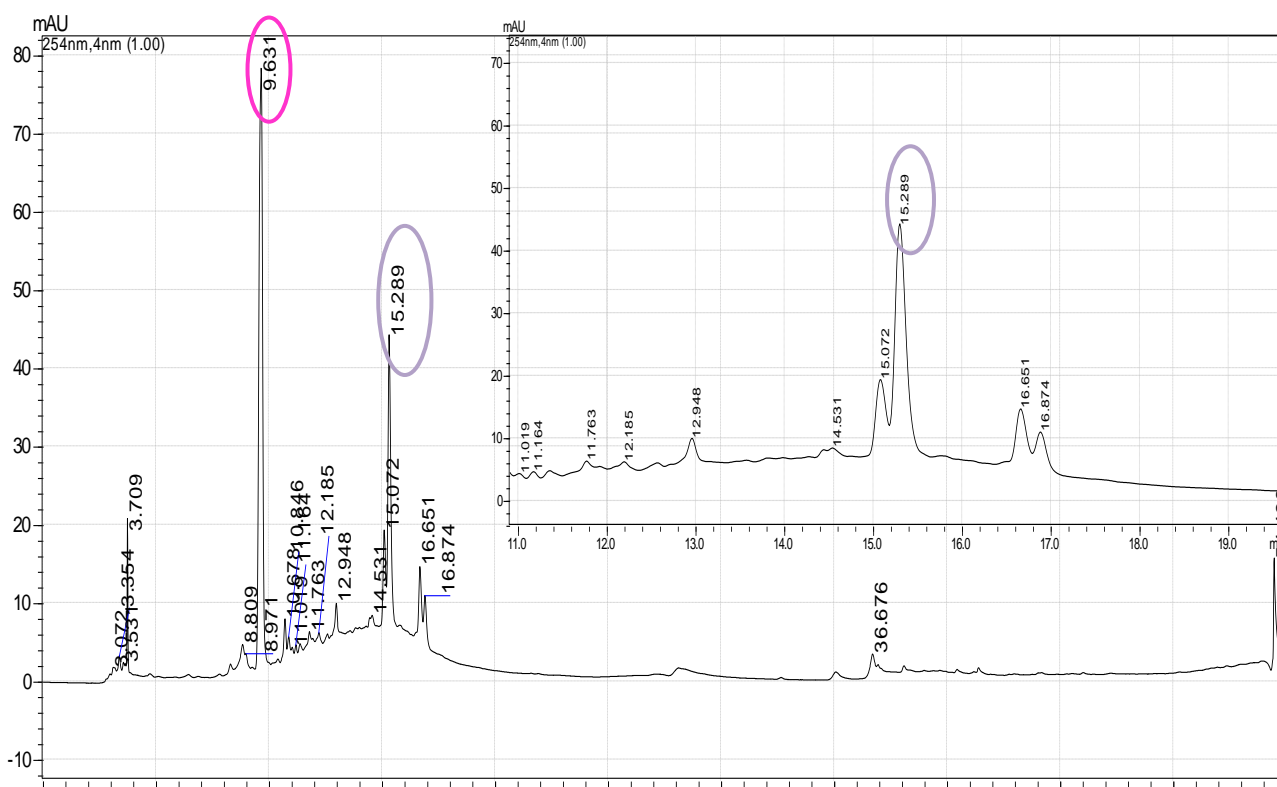


Figura 34. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração aquosa de *Stachytarpheta crassifolia* com os tempos de retenção destacados, em 254nm. Ampliação entre os

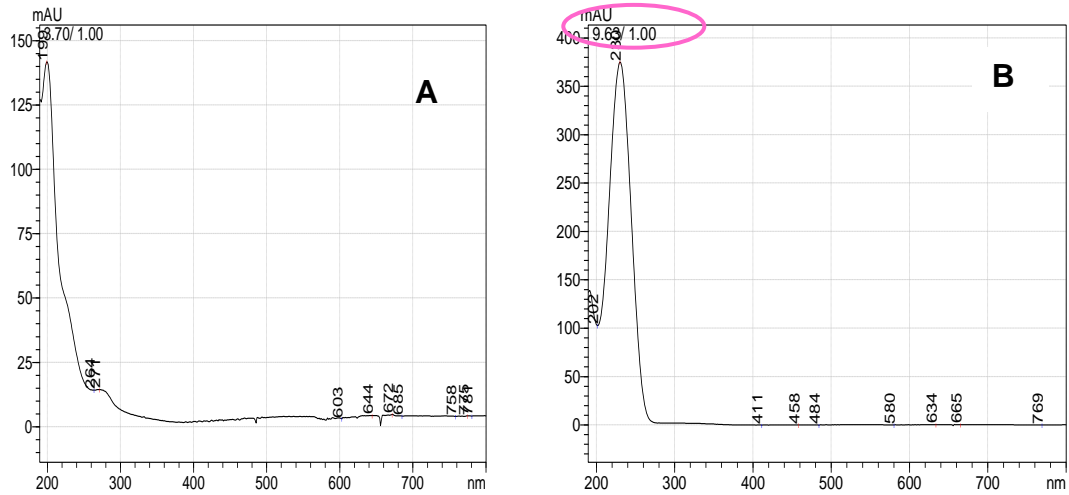


Figura 35. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 3,70 e (B) 9,63 min.. Indica a presença de ácido aromático simples na fração aquosa.

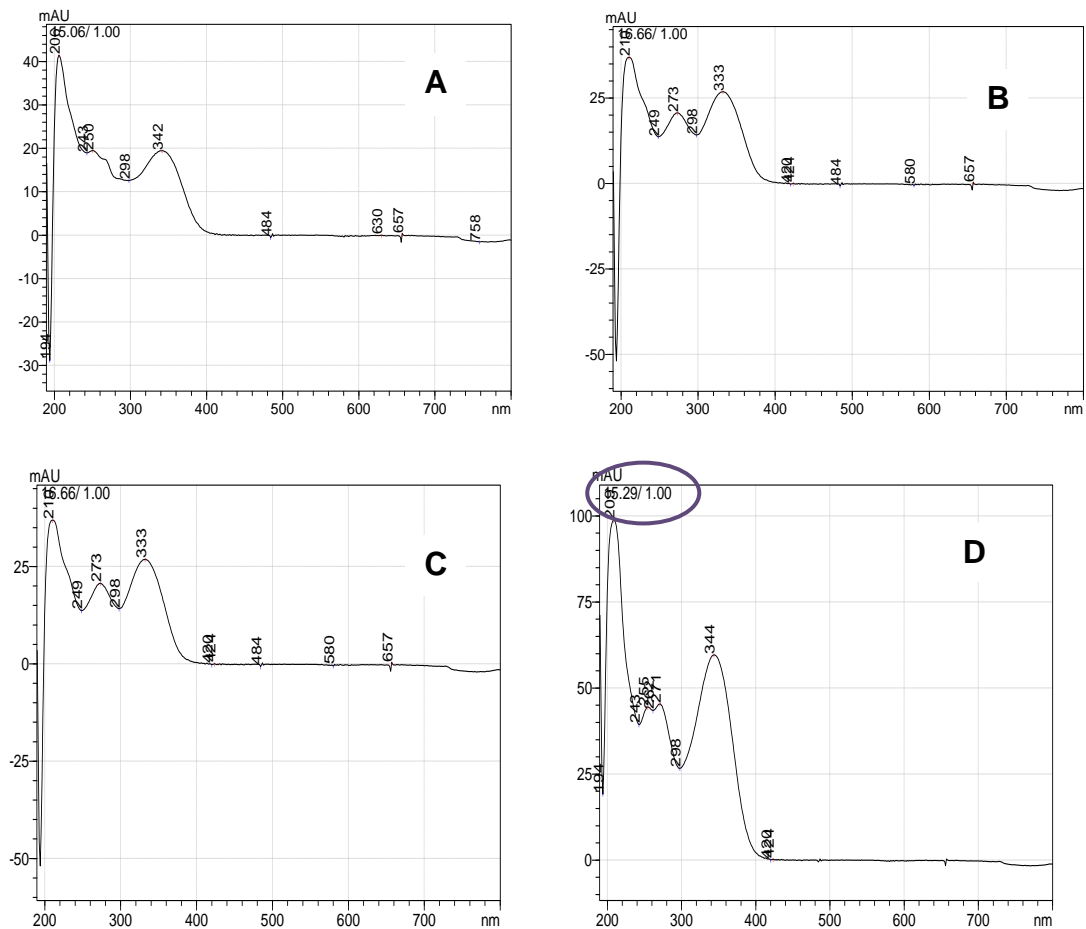


Figura 36. Espectro de UV do pico majoritário com tempo de retenção de (A) 15,07, (B) 16,65, (C) 16,87 e (D) 15,29 min. Indica presença de flavonoides na fração aquosa.

Comparando o perfil cromatográfico das amostras observou-se que todas apresentam picos majoritários que são referentes ao ácido aromático simples, aos flavonoides e aos feniletanoides, com exceção da fração aquosa que não possui a presença desta última classe majoritariamente em seu cromatograma. O extrato bruto, a fração butanólica e a fração acetato de etila possuem em comum um dos picos majoritários revelados pelos cromatogramas e espectros com Tr de 13,78 minutos. Estes picos apresentam-se com máximos de absorbâncias de 202, 262 e 332 nm sugerindo a presença de um esqueleto compatível com feniletanoide verbascosídeo. Sendo que a fração acetato de etila é que possui maior área do pico referente ao composto, o que também foi observado por LEAL (2014) para espécie *S. schottiana*, seguida do extrato bruto e da fração butanólica.

6.3 Análise Quantitativa do experimento em CLAE-DAD

6.3.1 Quantificação de feniletanoides e do composto isolado de *S. schottiana*, verbascosídeo.

Após verificar a presença de feniletanoides no extrato bruto (**Figura 20**) e nas frações (**Figuras 28, 32 e 34**), fez-se uma curva de calibração utilizando o feniletanoide verbascosídeo isolado de *S. schottiana*, que é uma substância bastante encontrada nas espécies da família Verbenacea (GHISALBERTI, 2000; VANDRESEN, 2005; CORRÊA, 2005; BERTÊ, 2013). Foram injetadas diferentes concentrações da substância em CLAE-DAD, obtendo-se uma área compatível à concentração do mesmo (**Figura 24**). Através da curva de calibração do verbascosídeo (**Figura 37**) e da comparação dos resultados obtidos por CLAE-DAD dos extratos brutos e das frações de *S. crassifolia* foi possível determinar a quantidade de feniletanoides totais nas amostras e a quantidade do verbascosídeo no extrato bruto, na F. AcoEt e na F. But.

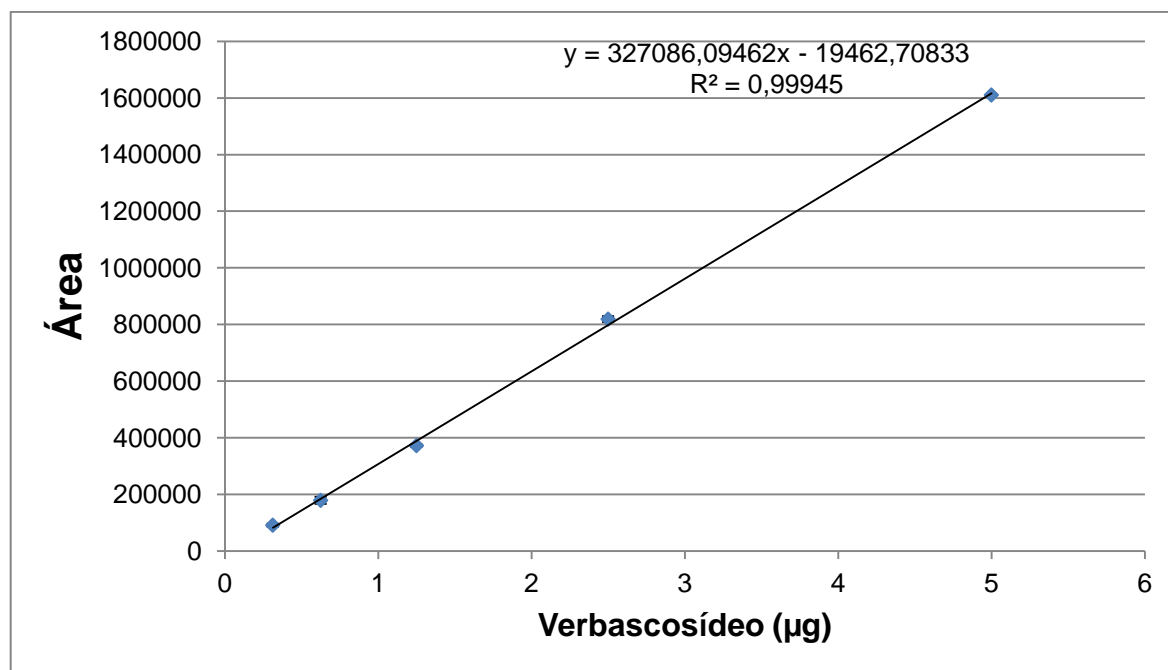


Figura 37. Curva de calibração do verbascosídeo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=2). Legenda: concentração 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (0,313 μg) = 91158 \pm 5539,48; concentração 62,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,625 μg) = 178957 \pm 12357,39; concentração 125 $\mu\text{g/ml}$ (1,25 μg) = 372228 \pm 4925,71; concentração 250 $\mu\text{g/ml}$ (2,5 μg) = 818757 \pm 10347,09; concentração 500 $\mu\text{g/ml}$ (5 μg) = 1610233 \pm 864,09.

A soma da área referente aos picos cujo espectro de UV é semelhante ao dos feniletanoides em cada amostra, de dois experimentos independentes, está descrita na **Tabela 6**. A soma de cada área foi plotada na equação ($y = 327086,09462x - 19462,70833$) da reta obtida através da curva de calibração do verbascosídeo e a partir de então obteve-se a massa de feniletanoides para cada experimento (**Tabela 7**). A partir dessa massa calculou-se o teor (%p/p), através de uma regra de três (massa \times 100/50), e então calculou-se a média do %p/p de cada experimento (**Tabela 8**).

Tabela 6. Soma das áreas referentes aos picos com espectros de UV semelhantes ao dos feniletanoides, dos dois experimentos independentes.

Amostra	Soma área 1	Soma área 2
Extrato Bruto	628528	71317
F. AcoEt	5830622	5233675
F. But	649549	559094
F. AQ	128239	108118

Tabela 7. Massa de feniletanoides presentes nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração do verbascosídeo. A soma das áreas foram plotadas na equação da reta no lugar do y.

Amostra	Massa 1 (μg)	Massa 2 (μg)
Extrato Bruto	1,9811	2,2397
F. AcoEt	17,8855	16,0604
F. But	2,0453	1,7688
F. AQ	0,45164	0,3901

Tabela 8. Teor (%) de Feniletanoides totais no extrato bruto e nas frações de *S. crassifolia* quantificados em termos de verbascosídeo. Os resultados estão expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes.

Amostras	%p/p 1	%p/p 2	Média da Quantidade de Feniletanoides Totais (μg de verbascosídeo)
Extrato Bruto	3,98	4,48	$4,22 \pm 0,17^c$
F. AcoEt	35,77	32,122	$33,95 \pm 1,22^b$
F. But	4,09	3,54	$3,81 \pm 0,18^{a,c}$
F. AQ	0,90	0,78	$0,84 \pm 0,04^{a,c,d}$

Ext. Br., extrato bruto; F. AcoEt, fração acetato de etila; F. But, fração butanólica; fração diclorometano; F. AQ, fração aquosa. As comparações foram feitas por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. ^a não difere significativamente do Ext. Br. ($p > 0.05$); ^b difere significativamente do Ext. Br. ($p < 0.01$); ^c difere significativamente da F. AcoEt ($p < 0.001$), ^d não difere significativamente do F. But ($p > 0.05$) na quantificação de feniletanoides.

A fração AcoEt foi a que obteve uma maior concentração de feniletanoides totais ($33,95 \pm 1,22$ %p/p), seguida do extrato bruto ($4,22 \pm 0,17$ %p/p) (**Tabela 8**).

Levando em consideração a análise estatística dos dados da quantidade de feniletanoides totais nas amostras, aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se que existe uma diferença significativa entre a F. AcoEt ($33,95 \pm 1,22$ % p/p) e o Ext. Br. ($0,79 \pm 0,0103$ % p/p); e a F. But e a F. AQ ($p < 0.001$); e entre a F. AcoEt ($33,95 \pm 1,22$ % p/p) e a F. But ($0,73 \pm 0,05$ % p/p); e entre a F. AcoEt ($33,95 \pm 1,22$ % p/p) e a F. AQ. ($p < 0.01$) em relação ao teor de feniletanoides totais.

Quando comparou o Ext. Br. com a F. But não verificou diferença significativa ($p > 0.05$) em relação à concentração de feniletanoídeos totais nas amostras (**Tabela 8**).

A área referente ao pico do verbascosídeo em cada amostra está descrita na **Tabela 9**. A partir dessa área pode-se calcular a massa de verbascosídeo em cada amostra, através da equação da reta obtida pela curva de calibração do verbascosídeo (**Tabela 10**). A partir dessa massa calculou-se o teor (%p/p) para cada experimento, depois calculou-se a média desse teor (**Tabela 11**).

Tabela 9. Área referente ao pico do verbascosídeo de cada amostra, dos dois experimentos independentes

Amostra	Área 1	Área 2
Extrato Bruto	107503	117686
F. AcoEt	2043376	2115015
F. But	106057	111462
F. AQ	N.D.	N. D.

Tabela 10. Massa do feniletanoídeo verbascosídeo presente nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração do verbascosídeo. A área foi plotada na equação da reta no lugar do y.

Amostra	Massa 1 (μg)	Massa 2 (μg)
Extrato Bruto	0,3881	0,4193
F. AcoEt	6,3067	6,5257
F. But	0,3287	0,4129
F. AQ	N. D.	N.D.

Tabela 11. Teor (%) de Verbascosídeo no extrato bruto e nas frações de *S. crassifolia*. Os resultados estão expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes.

Amostra	%p/p 1	%p/p 2	Média Quantidade de Verbascosídeo (μ g)
Ext. Br.	0,776	0,807	0,79 \pm 0,010
F. AcEt	12,614	13,052	12,83 \pm 0,15 ^b
F. But	0,656	0,826	0,73 \pm 0,05 ^{a, c}
F. AQ	N.D.	N.D.	N.D.

N.D., não detectado; Ext. Br., extrato bruto; F. AcoEt, fração acetato de etila; F. But, fração butanólica; F. AQ, fração aquosa. As comparações foram feitas por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.^a não difere significativamente do Ext. Br. ($p > 0.05$); ^b difere significativamente do Ext. Br. ($p < 0.01$); ^c difere significativamente do F. AcoEt ($p < 0.01$) na quantificação de verbascosídeo.

A fração AcoEt foi a que obteve maior teor do feniletanoide verbascosídeo (12,83 \pm 0,15 % p/p) mais de um terço dos feniletanoides totais presentes na fração acetato de etila (**Tabela 11**). No estudo realizado por LEAL (2014) com *S. schottiana*, a fração acetato de etila foi também a que obteve maior concentração de verbascosídeo.

Levando em consideração a análise estatística dos dados da concentração de verbascosídeo no Ex. Br., na F. AcoEt e na F. But, aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se que existe uma diferença significativa entre a F. AcoEt (12,83 \pm 0,15 % p/p) e o Ext. Br. (0,79 \pm 0,0103 % p/p) ($p < 0.01$); e a F. AcoEt (12,83% \pm 0,15 % p/p) e F. But (0,73 \pm 0,05 % p/p) ($p < 0.01$) em relação ao teor de verbascosídeo. Quando comparou o Ext. Br. com a F. But não verificou diferença significativa ($p > 0.05$) em relação à concentração de verbascosídeo nas amostras (**Tabela 11**).

Devido ao elevado teor de verbascosídeo nas amostras e a identificação do mesmo em outras espécies pertencentes ao gênero *Stachytarpheta* este pode ser utilizado com marcador fitoquímico para espécie *S. crassifolia*. Já que a presença do feniletanoide verbascosídeo no gênero já foi relatada na literatura. E porque ele é um marcador fitoquímico da família Verbenaceae

O verbascosídeo é um feniletanoide (**Figura 10B**) pertencente à classe dos polifenóis hidrossolúveis amplamente distribuídos nos vegetais (CARVALHO, 2006; ALIPIVIEVA *et al.*, 2014), já isolado e identificado em diversas espécies vegetais,

dentre elas estão: *Lippia dulcis*, *Lippia multiflora*, *Lippia triphylla* (CORRÊA, 2005), *Lippia Alba*, *Lippia canescens*, *Castilleja linariaefolia*, *Lantana camara*, *Pedicularis lasiophrys*, *Euphrasia pectinata*, *Stachys officinalis*, *Plantago lanceolata* L., *Ballota nigra*, *Asystasia intrusa*, *Ligustrum purpurascens*, *Buddleja officinalis*, *Olea europaea* (CARVALHO, 2006), *Buddleja stachyoides* (OLIVEIRA *et al.*, 2014) *Stachytarpheta cayennensis* (FROELICH, 2008; SOUZA, 2010,) e *Stachytarpheta schottiana* (LEAL, 2014).

Diversas atividades biológicas e farmacológicas são atribuídas ao verbascosídeo e aos extratos de plantas que possuem este feniletanoide. Dentre as atividades encontradas podem-se citar a antibacteriana moderada frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis* com concentração mínima inibitória de 128 µg/ml, antiviral, onde o feniletanoide apresentou-se mais seletivo que a droga ribavirina, além das atividades antioxidante, anti-inflamatória, citoprotetora, antimetastática, antibacterina e antiproliferativa (VANDRESEN, 2005; CORRÊA, 2005; SOUZA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2006; OLIVEIRA, 2014,).

O verbascosídeo apresentou atividade anti-inflamatória em estudos *in vivo* e *in vitro*. No estudo *in vitro* o composto foi capaz de reduzir significativamente, de forma dose - dependente, a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias e também foi capaz de promover a melhora e reparação de inflamações na pele, devido a sua capacidade de sequestrar ERO (atividade antioxidante), de quelar ferro e a da propriedade indutora glutathione transferase (GST) (OLIVEIRA, 2014). No estudo *in vivo* a atividade anti-inflamatória foi demonstrada através da inibição de histamina e bradicinina, ou ainda, através do sequestro de óxido nítrico. Além disso, o composto é capaz de inibir enzimas da cascata do ácido araquidônico, interferindo na atividade da tromboxano sintase; reduzir a geração de óxido nítrico e de TNF- α , e apresenta seletividade para inibição de COX-2 (CORRÊA. 2005).

Como o verbascosídeo é um constituinte químico presente em algumas espécies que são utilizadas para fins terapêuticos e possui varias atividades biológicas farmacológicas é de fundamental importância o estudo fitoquímico, biológico e farmacológico desse composto (CORRÊA, 2005; CARVALHO, 2006, ALIPIVIEVA *et al.*, 2014).

6.3.2 Quantificação de flavonoides

Através da análise em CLAE-DAD verificou-se nas amostras a presença de flavonoides. Por isso fez-se uma curva de calibração utilizando a rutina, que é flavonoide muito encontrado em espécies vegetais. Foram injetadas diferentes concentrações da substância em CLAE-DAD, obtendo-se uma área compatível à concentração do mesmo (**Figura 38**). Através da curva de calibração da rutina (**Figura 39**) e dos resultados obtidos por CLAE-DAD do extrato bruto (**Figura 22**) e das frações de *S. crassifolia* (**Figuras 29, 33 e 36**) foi possível determinar a quantidade de flavonoides totais nas amostras.

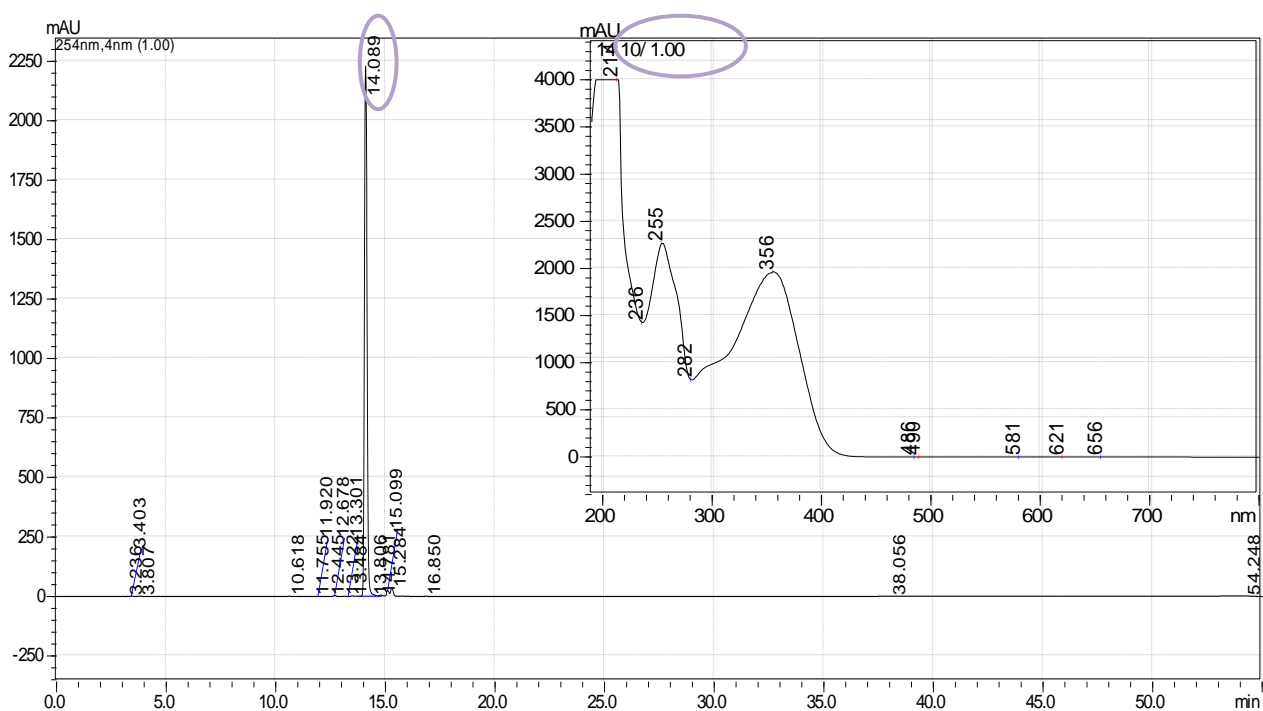


Figura 38. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo do flavonoide rutina, em 254nm. Espectro de UV da rutina.

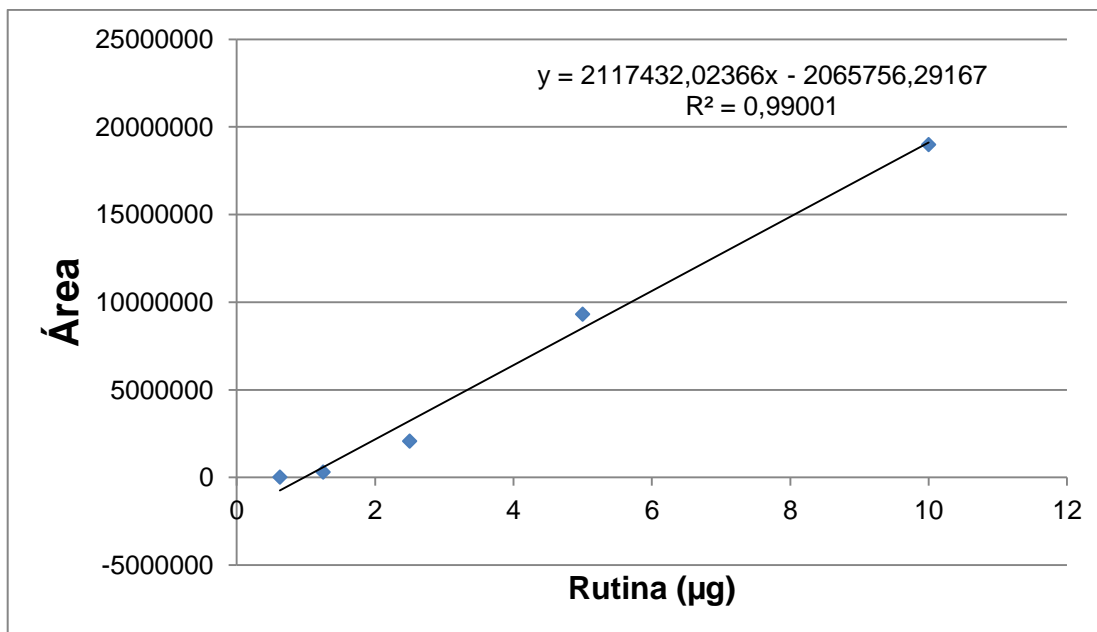


Figura 39. Curva de calibração da rutina. Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n=2$). Legenda: concentração 62,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,625 μg) = 17495 \pm 162,64; 125 $\mu\text{g/ml}$ (1,25 μg) = 305924 \pm 2246,48; 250 $\mu\text{g/ml}$ (2,5 μg) = 2071684 \pm 8612,56; 500 $\mu\text{g/ml}$ (5 μg) = 9312325 \pm 0; 1000 $\mu\text{g/ml}$ (10 μg) = 18989036 \pm 28513,37.

A soma da área referente aos picos com espectros de UV semelhantes aos dos flavonoides de cada amostra, dos dois experimentos independentes, está descrita na **Tabela 12**. A soma de cada área foi plotada na equação ($y = 2117432,02366x - 2065756,29167$) da reta obtida através da curva de calibração da rutina e a partir de então obteve-se a massa de flavonoides para cada experimento (**Tabela 13**). A partir dessa massa calculou-se o teor (%p/p), através de uma regra de três (massa \times 100/50), e então calculou-se a média da %p/p de cada experimento (**Tabela 14**).

Tabela 12. Soma das áreas referentes aos picos com espectros de UV semelhantes aos dos flavonoides, dos dois experimentos independentes.

Amostra	Soma área 1	Soma área 2
Extrato Bruto	1885508	1083612
F. AcoEt	3539049	4608211
F. But	2059405	2475459
F. AQ	1322154	1635676

Tabela 13. Massa de flavonoides presentes nas amostras, obtida através da equação da reta da curva de calibração da rutina. A soma das áreas foram plotadas na equação da reta no lugar do y.

Amostra	Massa 1 (μg)	Massa 2 (μg)
Extrato Bruto	1,8661	1,4874
F. AcoEt	2,6470	3,1519
F. But	1,9482	2,1447
F. AQ	1,6000	1,7481

Tabela 14. Teor (%) de Flavonoides Totais no extrato bruto e nas frações de *S. crassifolia*. Os resultados estão expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes.

Amostra	% p/p 1	% p/p 2	Média da Quantidade de Flavonoides (μg de rutina)
Extrato Bruto	3,73	2,98	3,35 \pm 0,25 ^{c,d}
F. AcoEt	5,29	6,30	5,80 \pm 0,34 ^b
F. But	3,90	4,29	4,09 \pm 0,13 ^{a,c,d}
F. AQ	3,20	3,50	3,35 \pm 0,10 ^{a,c}

Ext. Br., extrato bruto; F. AcoEt, fração acetato de etila; F. But, fração butanólica ; F. AQ, fração aquosa. As comparações foram feitas por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. ^a não difere significativamente do Ext. Br. ($p > 0.05$); ^b difere significativamente do Ext. Br. ($p < 0.01$); ^c difere significativamente do F. AcoEt ($p < 0.01$); ^d não difere significativamente do F. AQ ($p > 0.05$) na quantificação de flavonoides totais.

A fração AcoEt foi a que obteve uma maior concentração de flavonoide (5,80 \pm 0,34 % p/p) (**Tabela 14**). Levando em consideração a análise estatística dos dados da quantidade de flavonoides totais das amostras, aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se que existe uma diferença significativa entre a F. AcoEt (5,80 \pm 0,34 % p/p) e o Ext. Br (3,35 \pm 0,25 % p/p) ($p < 0.01$); e a F. AcoEt (5,80% \pm 0,34 % p/p) e a F. But (4,09 \pm 0,13 % p/p); e a e a F. AcoEt (5,80% \pm 0,34 % p/p) e a F. AQ

(3,35 ± 0,10 % p/p) ($p < 0.01$) em relação ao teor de flavonoides totais. Quando comparou o Ext. Br. com a F. But e com a F. AQ não verificou diferença significativa ($p > 0.05$) em relação a concentração de flavonoides totais nas amostras (**Tabela 14**).

Como descrito no item 1.5 uma das classes de metabólitos secundários presentes em algumas espécies pertencentes à família Verbenaceae é a dos flavonoides (**Figuras 2B e 2C**) (VANDRESEN, 2005). E muitas atividades biológicas das espécies estão atribuídas aos flavonoides, como ação quimiopreventiva, atividade antioxidante, antibacteriana, cardiovascular, leishmanicida, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antiplaquetária, citotóxica entre outras (PEREIRA, 2010; BERTÊ, 2013).

A atividade antioxidante dos flavonoides é atribuída capacidade dos mesmos em sequestrar radicais livres, pois quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável é capaz de regenerá-lo ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo (PEREIRA, 2010). A capacidade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com membranas (BARREIROS *et al.*, 2006), como descrito no item 1.3.

O efeito cardioprotetor esta relacionado com a capacidade dos flavonoides em inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Estudos demonstram que dietas ricas em flavonoides diminuem, de forma significativa, os riscos de mortalidade por doenças coronarianas, de incidência de infarto do miocárdio em idosos do sexo masculino e em mulheres pós-menopausa (PEREIRA, 2010).

6.4 Avaliação da atividade antioxidante - Ensaio de DPPH

O método utilizado para avaliação da atividade antioxidante foi o do radical DPPH. Pois este método tem sido o método de escolha para avaliar a atividade de amostras ricas em fenólicos totais e por ser considerado rápido (IONITA, 2005; ALMEIDA, 2005; HASLAM, 2005; BARBOSA, 2008; SUCUPIRA, 2012). Ele determina a capacidade de uma amostra em sequestrar radical livre, como dito no item 1.3. Foram testadas as amostras do extrato bruto e das frações obtidas por partição líquido-líquido de *S. crassifolia*.

Com a avaliação da atividade antioxidante das amostras obteve-se os resultados expressos em porcentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) é correspondente à quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante (NASCIMENTO, 2011). As amostras testadas obtiveram, de maneira geral, melhor atividade antioxidante nas maiores concentrações, aproximadamente 100 % do DPPH foi consumido pelo antioxidante na maior concentração testada (280 µg/ml), sendo assim dose dependente da concentração. O que é confirmado por NASCIMENTO (2011) que demonstra que quando maior a concentração da amostra menor a absorbância, maior é o consumo do DPPH pela amostra e conseqüentemente maior será atividade antioxidante (**Figura 40 e 41**). O que também é demonstrado por LEAL (2014) aonde a atividade antioxidante das amostras de *S. schottiana* mostrou-se dependente da concentração.

Todas as frações, o verbascosídeo isolado de *S. schottiana* e o padrão *G. biloba* (Egb761) obtiveram atividade superior a 50% na maior concentração. Sendo a F. AcoEt a que obteve atividade superior a 50% em todas as concentrações (Figura 43). Testes realizados por LEAL (2014) com a espécie *S. schottiana*, demonstraram também que todas as frações obtiveram na maior concentração atividade superior a 50%, com exceção da F. AQ.

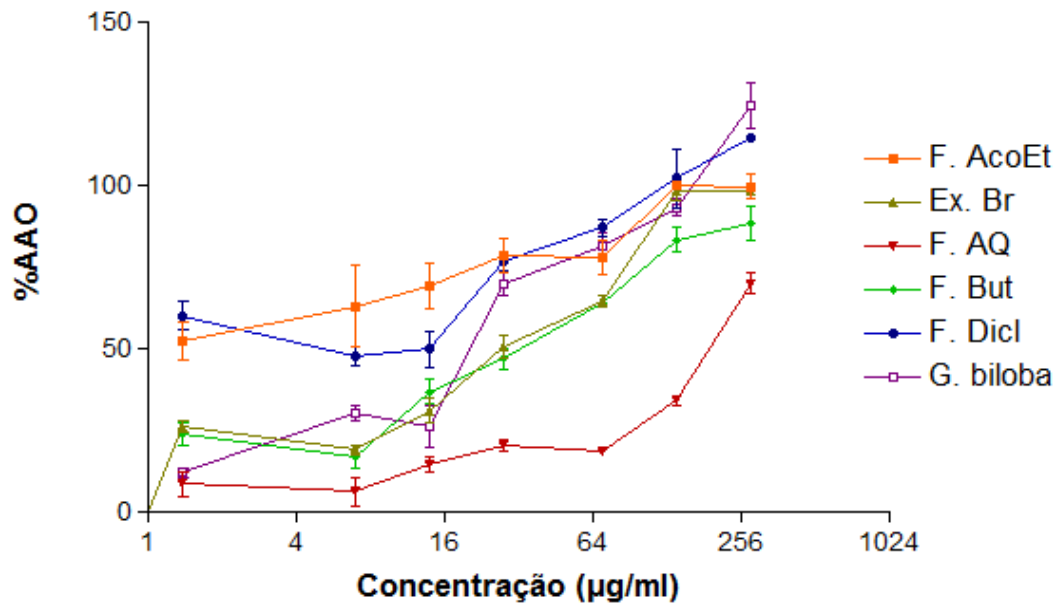


Figura 40. Avaliação da Porcentagem de Atividade Antioxidante de diferentes amostras de *S. crassifolia* pelo método de DPPH em diferentes concentrações. Legenda Ex. Br, extrato bruto; F. AcoEt, fração em acetato de etila; F. AQ, fração aquosa; F. Dicl, fração em diclorometano; F. But, fração em butanol; G. biloba, *Ginkgo biloba* (Egb761).

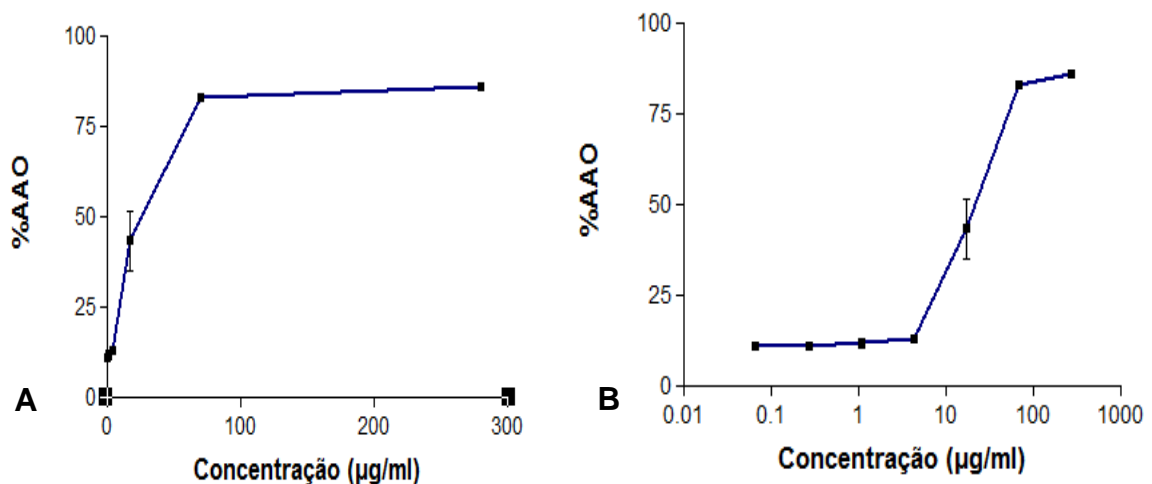


Figura 41. Avaliação da Porcentagem de Atividade Antioxidante do verbascosídeo isolado da fração acetato de etila de *S. schottiana*, por LEAL (2014) pelo método de DPPH em diferentes concentrações. (A) Gráfico com as concentrações (linear). (B) Gráfico com as concentrações expressas em escala logarítmica (log 10).

A partir da porcentagem de atividade antioxidante obteve-se o valor de EC_{50} , utilizando-se o programa GraphPad Prism 3.0. O extrato bruto e as frações em acetato de etila, em butanol, em diclorometano e aquosa da espécie *S. crassifolia* obtiveram valores de CE_{50} de $71,14 \pm 2,46 \mu\text{g/ml}$; $19,96 \pm 3,16 \mu\text{g/ml}$; $37,86 \pm 0 \mu\text{g/ml}$; $124,1 \pm 6,33 \mu\text{g/ml}$ e $> 280 \mu\text{g/ml}$, respectivamente (**Tabela 15**). De acordo com os dados presentes na **Tabela 15** e na **Figura 42** todas as amostras apresentaram atividade sequestradora de radical livre, com exceção da F. AQ ($EC_{50} > 280 \mu\text{g/ml}$), considerando-se que as amostras são ativas quando apresentam valores de $EC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ (CAMPOS *et al.*, 2003), sendo a F. AcoEt ($EC_{50} = 19,96 \pm 3,16 \mu\text{g/ml}$) a que apresentou a melhor atividade antioxidante. Quando comparado com o extrato de *G. biloba* ($EC_{50} = 32,29 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$), que foi utilizado como padrão devido a sua bem estabelecida atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2010) e com o composto isolado de *S. schottiana* ($EC_{50} = 22,48 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$), que foi utilizado por apresentar atividade antioxidante em estudos realizados por LEAL (2014) e por SOUZA *et. al.*(2010), a F. AcoEt ($EC_{50} = 19,96 \pm 3,16 \mu\text{g/ml}$) mostrou-se mais potente.

A F. AcoEt obteve maior atividade antirradicalar frente ao radical DPPH do que o *G. biloba* e o verbascosídeo, isso pode ser devido a presença dos feniletanoides, em especial o verbascosídeo, e de flavonoides na amostra.

A F. But ($EC_{50} = 37,86 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$), a F. Dicl ($EC_{50} = 124,1 \pm 6,33 \mu\text{g/ml}$) e o Ex. Br ($EC_{50} = 71,14 \pm 2,46 \mu\text{g/ml}$) apresentaram valores de EC_{50} maiores que a F. AcoEt ($EC_{50} = 19,96 \pm 3,16 \mu\text{g/ml}$) que o padrão *G. biloba* ($EC_{50} = 32,29 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$) e que o composto isolado de *S. schottiana*, verbascosídeo, ($EC_{50} = 22,48 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$). Sendo a F. But ($EC_{50} = 37,86 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$) a que apresenta maior atividade sequestradora de radicais livres em relação a F. Dicl ($EC_{50} = 124,1 \pm 6,33 \mu\text{g/ml}$) e o extrato bruto ($71,14 \pm 2,46 \mu\text{g/ml}$). A F. Dicl ($EC_{50} = 124,1 \pm 6,33 \mu\text{g/ml}$), com exceção da F. AQ ($EC_{50} > 280 \mu\text{g/ml}$) foi a que apresentou maior EC_{50} , e isso pode ser atribuída a ausência de substâncias fenólicas nessa fração. A fração em hexano por ser muito apolar não solubilizou e, por isso não pôde ser avaliada em todas as metodologias, não sendo possível concluir sobre seu mecanismo antioxidante.

Levando em consideração a análise estatística dos dados da atividade antioxidante (EC_{50}) de todas as amostras, aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se, com exceção da F. AQ, que as demais amostras não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) no potencial antiradicalar frente ao DPPH. A F. AQ quando comparada com o Ext. Br., com as outras frações, com o padrão *G. biloba* e com o VERBASC isolado de *S. schottiana* apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) no ensaio de DPPH (**Tabela 15**).

Tabela 15. Atividade Antioxidante do extrato bruto e das frações de *S. crassifolia*, e dos padrões *G. biloba* e verbascosídeo. Os resultados estão expressos como média \pm DP de três experimentos independentes.

Amostras	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ext. Br.	71,14 \pm 2,46 ^{a,b}
F. AcoEt	19,96 \pm 3,16 ^{a,b,c}
F. But	37,86 \pm 0,12 ^{a,b,c}
F. Dicl	124,1 \pm 6,33 ^{a,b,c}
F. AQ	>280 ^d
Padrão <i>G. biloba</i>	32,29 \pm 0,47 ^{b,c}
VERBASC isolado de <i>S. schottiana</i>	22,48 \pm 1,46 ^{a,c}

Ext. Br., extrato bruto; F. AcoEt, fração acetato de etila; F. But, fração butanólica; F. Dicl, fração diclorometano; F. AQ, fração aquosa; *G. biloba*, *Gingko biloba*, VERBASC isolado de *S. schottiana*, verbascosídeo. As comparações foram feitas por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.^a não difere significativamente de *G. biloba* ($p > 0.05$); ^b não difere significativamente do VERBASC isolado de *S. schottiana* ($p > 0.05$); ^c não difere significativamente do Ext. Br. ($p > 0.05$); ^d difere significativamente do *G. biloba* e do VERBASC isolado de *S. schottiana* ($p < 0.05$) no ensaio de DPPH.

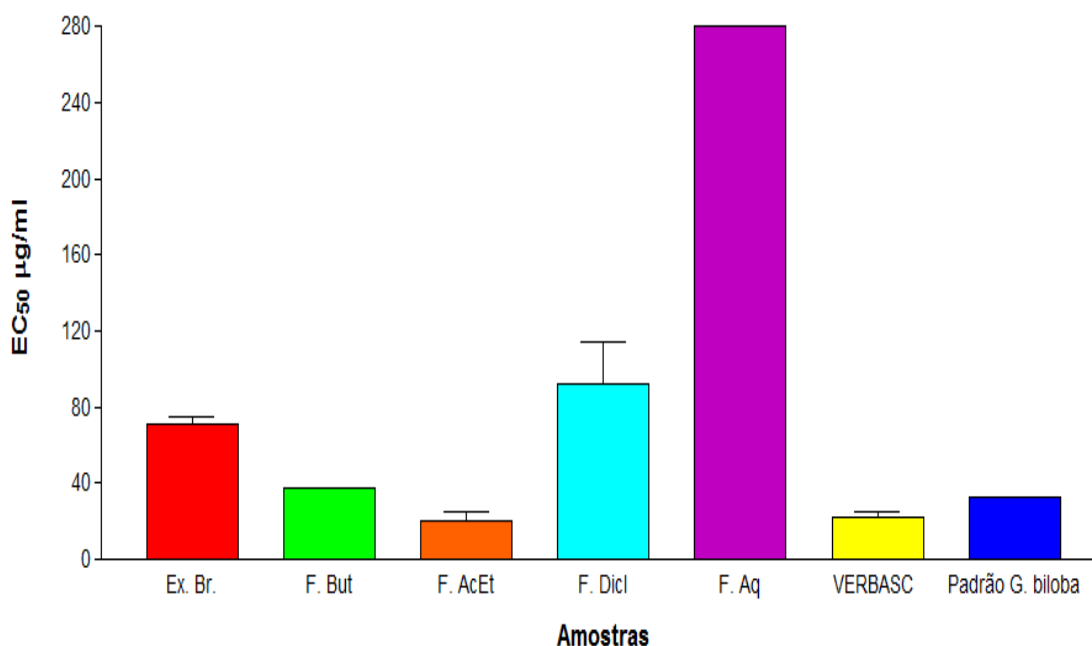


Figura 42. Valores de EC₅₀ de diferentes amostras de *S. crassifolia* pelo método de DPPH em diferentes concentrações. Legenda Ex. Br= extrato brut, F. AcEt = fração em acetato de etila, F. AQ = fração aquosa, F. Dicl= fração em diclometano, F. But= fração em butanol.

As amostras testadas, com exceção da F. AQ (EC₅₀ > 280 µg/ml) apresentaram atividade antioxidante significativa, destacando-se a fração em acetato de etila (EC₅₀ = 19,96 ± 3,16 µg/ml) de *S. crassifolia*. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por SOUZA *et al.*(2010); SILVA *et al.* (2012) e LEAL (2014) onde a fração em acetato de etila de plantas da mesma espécie que *S. crassifolia* demonstrou significativa atividade antioxidante frente ao radical DPPH, quando comparado com os padrões *G. biloba* e BHT (butil-hidroxitolueno) (**Tabela 16**).

Tabela 16. Atividade Antioxidante da fração acetato de etila de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Stachytarpheta* citada na literatura.

Amostra	EC ₅₀ (µg/ml)	Padrão EC ₅₀ (µg/ml)	Referência
F. AcoEt <i>S. schottiana</i>	1,42 ± 0,89	<i>G. biloba</i> (16,93± 2,61)	LEAL, 2014
F. AcoEt <i>S. cayennensis</i>	15,16± 0,72	<i>G. biloba</i> (26,60± 0,00)	SOUZA <i>et al.</i> , 2010
F. AcoEt <i>S. gesnerioides</i>	9,41	BHT (11,82)	SILVA <i>et al.</i> , 2012
F. AcoEt <i>S. crassifolia</i>	19,96 ± 3,16	<i>G. biloba</i> (32,29 ± 0,47) Verbascosídeo (22,48 ± 1,46)	

A atividade antioxidante das amostras pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos, pertencentes à classe dos flavonoides e dos feniletanoides, como o verbascosídeo, que foi o metabólito secundário presente no cromatograma do extrato bruto e das frações AcoEt e But na análise em CLAE-DAD. Resultados semelhantes foram obtidos por LEAL (2014) que identificou a presença desse composto no extrato bruto e nas frações AcoEt e But de *Stachytarpheta schottiana*. E, além disso, isolou o verbascosídeo da sub - fração da fração acetato em etila. Em estudos realizados por SOUZA *et al.* (2010) com a fração acetato de etila de *Stachytarpheta cayennensis* também obteve como resultados o isolamento do verbascosídeo, martinósídeo e isoverbascosídeo, o que evidencia a presença do feniletanoide em outra planta do mesmo gênero que a *Stachytarpheta crassifolia*.

A atividade antioxidante das substâncias fenólicas pode ser uma consequência de suas propriedades redox, pois eles podem atuar adsorvendo e neutralizando os radicai livres ou causando decomposição dos peróxidos (SILVA, 2012). O número de hidroxilas nos compostos fenólicos pode desempenhar um papel importante na atividade antioxidante desses compostos. Existem relatos na literatura que compostos com grupo hidroxila na posição orto no anel aromático, como por exemplo, a quercetina (**Figura 43**), possuem uma elevada atividade contra as espécies reativas de oxigênio (SOUZA *et al.*, 2011).

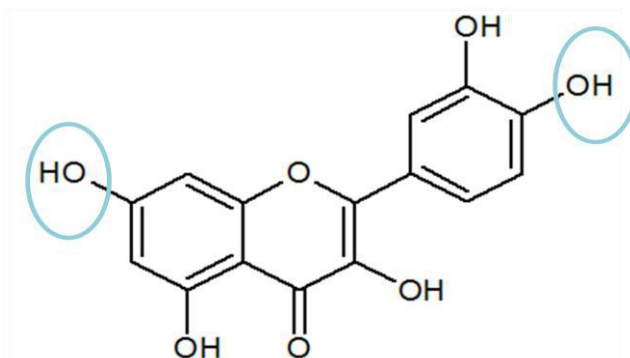


Figura 43. Estrutura da quercetina, evidenciando as hidroxilas na posição orto.

Várias atividades biológicas e farmacológicas são atribuídas ao verbascosídeo. Por ser um composto fenólico ele é eficaz no sequestro do radical hidroxila e do ânion superóxido. Além disso, por ser um fenilpropanóide glicosilado com dois grupos orto-dihidroxila no anel fenólico, possui atividade antioxidante bastante significativa, sendo capaz de reagir rapidamente contra os radicais livres (**Figura 44**) (CORRÊA, 2005).

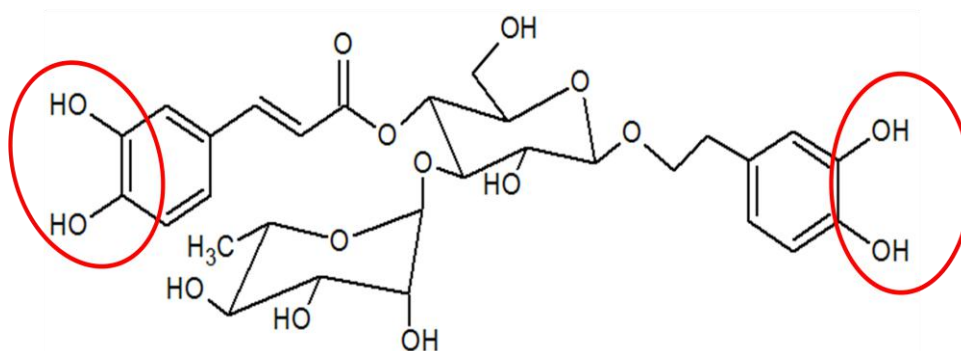


Figura 44. Estrutura do feniletanoide verbascosídeo, evidenciando as hidroxilas na posição no anel aromático, as quais podem ser as responsáveis pela atividade antioxidante.

Diversos estudos realizados com o verbascosídeo e com seus derivados demonstram que os mesmos são capazes de inibir a peroxidação lipídica, a auto-oxidação do ácido linoleico e a hemólise de eritrócitos induzidas pelos radicais (ZHAO *et al.*, 200). Desta forma, a presença destes compostos no extrato e nas

frações de *S. crassifolia* sugere a provável hipótese que essas substâncias sejam uma das responsáveis pela ação antioxidante.

Um estudo realizado com o verbascosídeo demonstrou uma alta afinidade do composto com as membranas carregadas negativamente de compostos de fosfatidilglicerol. Ele promoveu a separação de fase dos domínios lipídicos em membranas de fosfatidilcolina e formou o complexo estável fosfolípido/verbascosídeo. Os efeitos do verbascosídeo sobre as propriedades físicas das membranas podem contribuir para explicar suas atividades antioxidante e antimicrobiana (OLIVEIRA, 2014).

Estudos realizados por SOUZA *et al.* (2011) com *Stachytarpheta cayennensis*, demonstraram que o verbascosídeo atua prevenindo o estresse oxidativo relacionado com a disfunção mitocondrial, e como tal, pode ser utilizado no tratamento de uma variedade de doenças agudas e crônicas. Mas estudos pré-clínicos em modelos *in vivo* precisam ser realizados para avaliar a eficácia e a toxicidade dos antioxidantes frente a mitocôndria antes de recomendar doses específicas para utilização em seres humanos. O que pode sugerir que atividade antioxidante observada no presente estudo pode ser atribuída a esse composto.

6.5 Correlação da Atividade Antioxidante e o Teor de Flavonoides, Feniletanoides e Verbascosídeo.

Após as análises foi possível estabelecer uma correlação entre a atividade antioxidante e o teor de feniletanoides totais; de verbascosídeo e de flavonoides das amostras, com exceção da fração aquosa, pois nem na maior concentração testada ela foi capaz de inibir em 50 % o radical DPPH ($EC_{50} > 280\mu\text{g/ml}$).

Na **Figura 45** observa-se que houve uma correlação inversa entre a atividade antioxidante e a % de feniletanoides total das amostras. Mas essa correlação não foi muito linear, pois o valor de R^2 foi de 0,577.

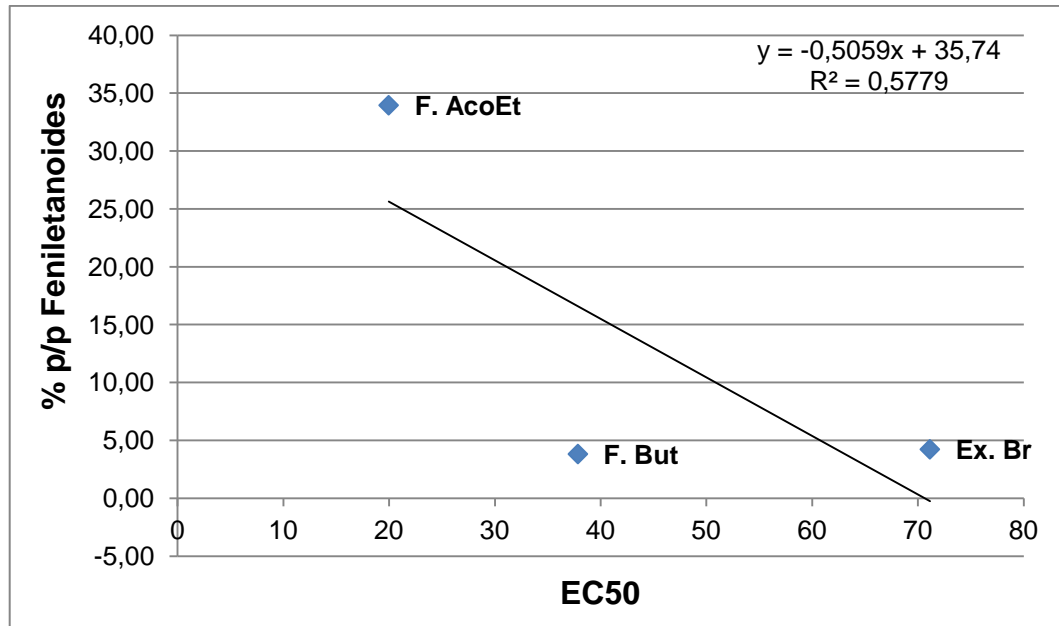


Figura 45. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Feniletanoides totais.

Quando foi feita a correlação entre a atividade antioxidante e o teor de verbascosídeo das amostras observou-se que há uma correlação inversa entre essas duas variáveis. Mas essa correlação também não foi muito linear, pois o valor de R^2 foi muito inferior a um ($R^2 = 0,585$) (**Figura 46**).

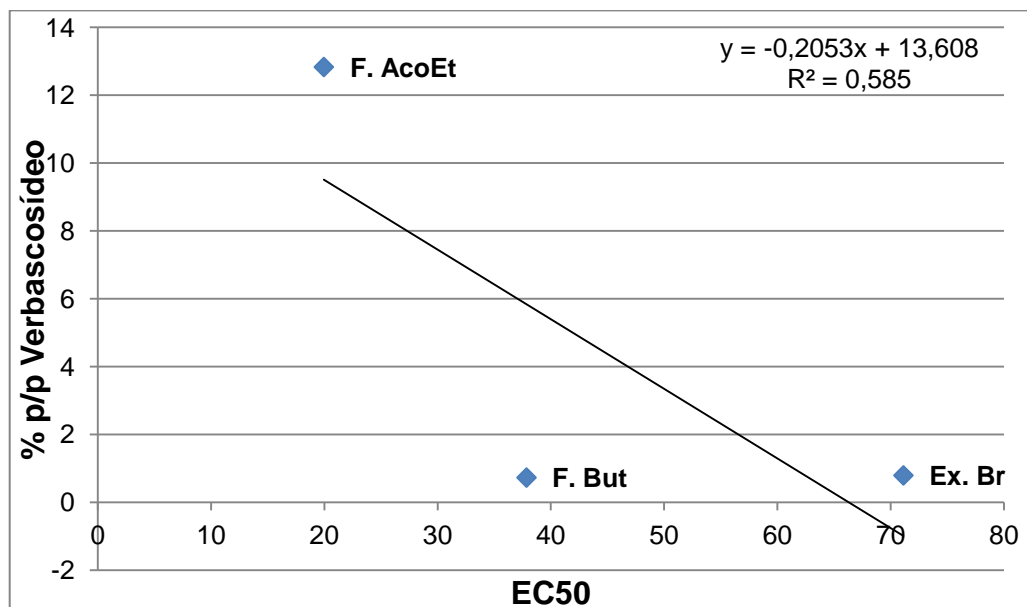


Figura 46. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Verbascosídeo.

Quando analisou a correlação entre a atividade antioxidante e o teor de flavonoides totais das amostras observou-se que há uma correlação inversa e linear ($R^2 = 0,851$) (**Figura 47**).

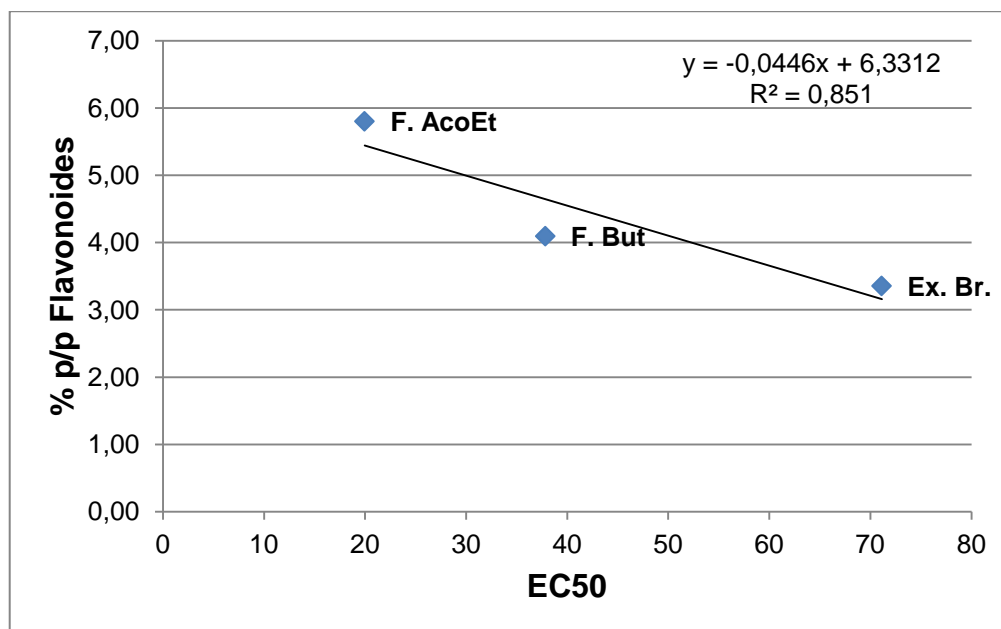


Figura 47. Correlação de Pearson entre a Atividade Antioxidante (EC50) e a % p/p de Flavonoides.

Então pode-se dizer que houve uma correlação inversa entre o teor de feniletanoides, de verbascosídeo e de flavonoides das amostras. Pois quanto maior o teor dessas substâncias nas amostras maior a atividade antioxidante (menor o EC_{50}).

Como a correlação entre a atividade antioxidante e a % p/p de flavonoides foi a que c obteve R^2 mais próximo de 1 ($R^2 = 0,851$), pode-se dizer que os flavonoides presentes nas amostras influenciam de uma forma mais linear a atividade antioxidante das amostras e que para os feniletanoide a variação parece não obedecer um padrão linear em todas as faixas de concentração. No entanto, é possível observar que flavonoides e feniletanóides parecem estar relacionados com a atividade antioxidante como descrito também para essas classes na literatura.

7. Conclusões

- O perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato e das frações de *S. crassifolia* são semelhantes, sendo possível observar como substâncias majoritárias com espectros semelhantes a ácidos aromáticos simples, flavonoides e feniletanoides.
- Com a comparação dos cromatogramas das amostras obtidos por CLAE-DAD, observou-se que o extrato bruto, a fração acetato de etila e a fração butanólica apresentaram em comum a presença de um feniletanoide glicosilado conhecido como verbascosídeo. Tendo esse feniletanoide sido identificado pela primeira vez para *S. crassifolia*.
- A fração acetato de etila de *S. crassifolia* quando comparada com o extrato e as outras frações obteve uma maior quantidade de feniletanoides totais e do verbascosídeo (que um tipo de feniletanoide).
- Devido à presença do feniletanoide verbascosídeo no extrato bruto e nas frações butanólica e acetato de etila, sendo nesta última em maior concentração, e por ele já ter sido isolado e identificado em outras espécies pertencentes ao gênero *Stachytarpheta*. Esta substância pode ser utilizada como marcador químico para espécie. Como tem sido utilizado para outras espécies pertencentes a família Verbenaceae.
- A fração acetato de etila foi a que obteve maior atividade antioxidante pelo método de DPPH quando comparada com o extrato bruto e as outras frações. Os resultados obtidos, provavelmente, deve-se a uma maior concentração de constituintes químicos na fração acetato de etila, e pela presença de um potencial antioxidante, verificado em maior concentração por CLAE-DAD nessa fração, o verbascosídeo. Além da presença de flavonoides, compostos que possuem atividade antioxidante elevada atividade antioxidante.
- Quando atividade antioxidante do extrato e das frações de *S. crassifolia* foi comparada com o extrato de *G. biloba*, que foi utilizado como padrão devido a sua bem estabelecida atividade antioxidante e com o verbascosídeo isolado de *S. schottiana*, a fração acetato de etila mostrou-se mais potente. Os dados obtidos estão relacionados, possivelmente, com a presença de compostos fenólicos das classes dos flavonoides e dos feniletanoides glicosilados, como

o verbascosídeo, composto identificado como majoritário no extrato e nas frações butanólica e acetato de etila.

- Através da correlação de Pearson pode-se dizer que atividade antioxidante das amostras é influenciada pela concentração de feniletanoides totais, verbascosídeo e flavonoides presentes nas amostras.

8. Referências Bibliográficas

ADEBAJO, A.C. *et al.* Hypoglycaemic constituents of *Stachytarpheta cayennensis* leaf. **Plant Méd**, New York, vol. 73, n°3:241-250, 2007.

Alipivieva K. *et al.* Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances* 32 (2014) 1065–1076, 2014.

Almeida, J. M. D. *et. al.* Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH•. **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental**, São Paulo, p 446-452, Abr,2006.

Alves, H. M. A diversidade química da plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola** , v. 3, p.10-15, 2001.

Andrade, K. S. **Avaliação das Técnicas de Extração e do Potencial Antioxidante dos Extratos Obtidos a Partir de Casca e de Borra de Café (*Coffea arabica* L.)**. 2011. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

Atoui, A. K. *et al.* Tea and herbal infusions: their antioxidant. Activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, n. 1, p. 27-36, 2005.

Barakat, M. **Quais doenças os radicais livres podem causar?**. Dr Barakat. Disponível em: < <http://rspress.com.br/health4life/quais-doencas-os-radicaais-livres-podem-causar/>>. Acessado em 02 jun.2014

Barbosa, B. D. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas *Anacardium Humile* St. Hill (Anacardiaceae)**. p 5 Dissertação de Mestrado (Área Genética). Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

Barreiros, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo : relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

Braga, J. M. F. *et al.* Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico de *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 516-523, Abr./Jun. 2009.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25–30.

BRASIL. **PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília – DF. 2007.

Bertê, R. ***Verbena litoralis* KUNTH (Verbenaceae) Micropropagação, Estaquia e Análise de Flavonóides e Cumarinas**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestre em Agrobiologia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BILIA, A. R. *et al.* HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 463-470, 2008.

Briskin, D. B. Palnts and Phytomedicines. Linky Palnt. Biochemistry and **Physiology to Homan Healt Plant Physiology**, v. 124, p.507-514, 2000.

BOSCOLO, O. H. & SENNA VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

BRUNETON, J. Phenols and Phenolic acids In BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants**. Lavoisier Press. EUA. 211-227, 1995.

Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.*, v.55, n.3, São Paulo July/Sept, 2003.

Campos, M. G. *et al.* Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonóides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

Canteli, V. C. D. **Composição Fitoquímica E Atividades Biológicas de *Duranta vestita* Cham., Verbenaceae**. 2012. 122f. Graduação (Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

Carvalho, L. C. *et al.* Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revta Brasil. Bot*, São Paulo, v.24, n.1, p. 1-9, março, 2001.

Carvalho, R. S. M. **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**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestre em Farmacologia)- Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

Carmen, M. M. M. **“Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de La especie *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.” árbol de fruta de pan” de La provincia de Zamora Chinchipe**. 2014. 92f. Dissertação (Área Biológica). Unisersidad Técnica Particular de Loja, La Universidad Católica de Loja, Loja- Ecuador, 2014.

Corrêa, M. M. **ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N. E. BR.** 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

COSTA, S. M. O. *et al.* Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

CHENG, Z. *et al.* Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorganic Med. Chem.**, v.10, n.12, p.4067-4073, 2002.

Dittrich, V. A. O. ***Stachytarpheta crassifolia* subsp. ,minasesis (Verbenaceae), Reserva Biológica da Mata Escura, Jequitinhonha, MG, Brasil.** Panoramio. Disponível em: < <http://www.panoramio.com/photo/9151940>>. Acessado em: 10 mar. 2014.

Dutra, M. D. **Desenvolvimento e Validação de Método por CLAE Para Análise da Estabilidade de Soluções Extrativas e Extrato Seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae).** 2013. 129 f. Dissertação (Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí (SC), 2013.

Elisabetsky, E. Souza, G. C. **Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias Ativas.** Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Capítulo 6. 6ª ed. UFRGS. 1999. 107-108 p.

Embrapa Agroindústria Tropical. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Primeira edição on-line. Fortaleza, CE, 4p, 2007.

FARIAS, M. R. *et al.* Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 927-933, 2010.

Favorito, S. **Tricomas Secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): Estrutura, Ontogênese e Secreção.** 2009. 89f. Dissertação (Ciências Biológicas) -

Universidade Estadual Paulista Câmpus de Botucatu Instituto de Biociências. UNESP, São Paulo, 2009.

Ferreira, R. O. **Contribuição ao Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Frutos Verdes de *Clusia paralicola* (Clusiaceae)**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2011.

Filho, V. C. & Yuenes R. A. Estratégias Para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização da Atividade. Química Nova. Santa Catarina, p. 99-105, 1998.

Firmo, W. C. A.. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FOGLIO, M. A. *et al.* Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP. Campinas – SP. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf Acesso em: 15 set. 2014.

Froelich, S. *et al.* Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**. s.l., p. 516 – 520, Out./Dez, 2008.

Flinte *et. al.* Insetos fitófagos associados ao murici da praia, *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae), na Restinga de Jurubatiba (RJ). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, dec. 2006.

Gomes, A. M. C. M. **Avaliação da actividade captadora de espécies reactivas de oxigênio e de azoto por antagonistas β -adrenérgicos**. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade) - Faculdade de Farmácia- Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2005.

Gonçalves, A. E. S. S. **Avaliação da Atividade Antioxidante de Frutas e Polpas de Frutas Nativas e Determinação dos Teores de Flavonoides e Vitamina C.**

Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, Març. 2008.

GORINSTEIN, S. *et al.* Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 952-957, 2001.

Gulcim, I. *et al.* Screening of antioxidant and antimicrobial actives of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, V. 83, p. 371-382, 2003.

GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 467-86, sept. 2000.

Greenham J. *et al.* "Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis". *Phytochem Anal*, vol. 14, pp. 100-118, 2003.

Haslam, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, n. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

Hassimoto *et al.* Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HRAZDINA, G. *et al.* Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

ICMBio. **Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.** Parques e florestas Nacionais. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/guia-do-visitante.html#topo>> Acessado em: 04 jun. 2014.

IDU M. *et al.* 2006. Some cardiovascular effects of the aqueous extract of the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*. L. vahl. *Int J Pharmacol.* 2:163–5.

Ionita, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?. **Chemical Papers**, v.59, n. 1, p.11-16, 2005.

Imbassahy, C .A. A. *et al.* Briófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. Versão eletrônica do artigo em www.scielo.br/abb e <http://www.botanica.org.br/acta/ojs>, Rio de Janeiro, p. 1,2008.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E .**Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, jul./set, 1998.

KANEDA, N. *et al.* (+)-4b-Hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1136-1141, 1992.

KVIST L. P. *et al.* 2006. Identification and evaluation of peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol.* 106:390–402.

Languerre, M. *et al.* Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods , new trends and challengs. **Progress in Lipid Research –Review**, v. 46, p. 244-282, 2007.

Leal, M. C. R. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante de *Stachytarpheta schottiana* (SCHAUER) E *Stachytarpheta crassifolia* (RICH.) VAHL (VERBENACEAE) Do parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil.** 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2014.

Leite, T. C. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Espécies do Gênero *MAR CETIA* (MELASTOMATA CEAE).** 2009. 131f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA 2009.

Ludwig, S. M. **Análise comparativa do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides no extrato das folhas e do egb 761 de *gingko biloba* L.** 2006. p.14 Trabalho de Conclusão de Curso (Instituto de ciências da saúde curso de ciências farmacêuticas). Centro Universitário Feevale. Novo Hamburgo, 2006.

Machado, M. M. **Perfil Fitoquímico e Avaliação dos Principais Efeitos Biológicos e Imunológicos *In Vitro* da *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. 105 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

Mansur, M. C. P. P. R. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar** . 2011. 145f. Dissertação (Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Março, P. H. *et al.* Procedimentos Analíticos para Identificação de Antocianinas Presentes em Extratos Naturais. **Química Nova**, s. l., v. 31, n. 5, p. 1218 – 1223, 2008.

Martins, M. C. **Estudo Químico, Atividade Antioxidante, Atividade Antimicrobiana e Análise do Óleo Essencial da Espécie *Kielmeyera cariaceae* Mart. e Succ (Pau-Santo) do Cerrado.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

Melo, J. I. M. *et. al.* Verbenaceae *Sensu Lato* em um Trecho da Esec Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, jul.-set., 2010.

Monteiro, G. A Região Norte Fluminense. Museu do Rio. Disponível em <www.museusdorrio.com.br>. Acesso em: 10 Março 2014.

Montezuma, R. C. M. & Araujo, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro.

Pesquisas, Botânica, São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, n. 58, p.157-176, 2007.

Moreira, R. C. R. *et al.* Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.)Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**. S. I., p. 59-63, Jan/Mar, 2007.

MMA, Ministério do Meio Ambiente (2004) Identificação e divulgação de informações sobre espécies da flora de importância econômica atual ou potencial, para uso direto e ou para ampliar a utilização comercial, com vistas a fomentar o desenvolvimento de produtos voltados para o mercado interno e exportação, Carta Consulta – Ofício Circular nº 30/ 2004/ SBF/ MMA, p. 1-18. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/>. Acesso em: Junho/2014.

Nascimento, J. C. *et al.* Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. . **Revista Brasileira de Farmácia (RBF)**. Belo Horizonte, p. 327-332, Nov. 2011.

Nolasco, A. P. *et. al.* Aspectos florísticos e fitossociológicos da vegetação de entre-moitas em um trecho de uma restinga de Praia do Forte, município de Mata de São João, litoral norte do Estado da Bahia. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 18, n.1, p. 42 – 48, 2012.

Oliveira, D. M. S. Isolamento do Verbascosídeo e Validação do Método Analítico para Padronização do Extrato Bruto das Partes Aéreas de *Buddeja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae). **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 2, p. 344-348, 2014.

ONO, M. *et al.* New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1175-1177, 2005.

PANNALA, A.S. *et al.* Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PENIDO C. *et al.* 2006. Anti-inflammatory and antiulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayenensis* (L.C.Rich) Vahl. *J Ethnopharmacol* 104: 225-233.

Pereira, C. ***Guarea macrophylla* (Meliaceae): Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica.** 2010. 118 f. Dissertação (Mestre em Ciências)- Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Pereira, J. R. & Cardoso G. M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes . *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, Novembro 2012.

Peres, L. E. P. Metabolismo Secundário. Disponível em:< <http://www.ciagri.usp.br/~laxaropp/FisiovVegGradBio/MetSec.pdf>> Acessado em 20/06/ 2014.

Pértile, R. **Isolamento e Elucidação Estrutural de Compostos Polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt & Wils.** 2007. 93f. Dissertação (Mestre em Farmácia) – Centro de Ciências em Saúde , Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

Santos, F. M. G. **Comportamento germinativo de espécies do gênero *Stachytarpheta* Vahl. (Verbenaceae) ocorrentes nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais.** 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Març., 2008.

Santos, J. S. *et al.* *Verbenaceae Sensu stricto* na Região do Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. s. l., Pernambuco, p. 985- 998, 2009.

Santos, M. G. *et al.* Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 18, n.2, p. 271-280, 2004.

Silva, P. S. *et.al.* *Stachytarpheta gesnerioides* Cham.: chemical composition of hexane fraction and essential oil, antioxidant and antimicrobial activities. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.11, n.2, p., s. I.,542-548, 2012.

Silva, M. L. C. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

Souza, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**:guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

Souza, P. A. *et. al.* Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 922-928, Dez. 2010.

Souza, P. A. *et. al.* Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 420-426, May/Jun. 2011.

Sucupira, N. R. *et. al.* Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos (Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits). **Departamento de Tecnologia de Alimentos**, Ceará, n 270, p. 263-270, 2012.

Sulaiman, M. R. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae) in Experimental Animal Models. **Medicinal Principles and Practice**, Malásia, p. 272- 279, Novemb., 2007.

Schapoval E.E.*et al.* 1998. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *J Ethnopharmacol.* 60:53–9.

Scotti, L. *et. al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, São Paulo, v. 43, n.2, p. 153 – 164, abr./jun., 2007.

Vandresen, F. **Constituição Química, Atividades Antibacteriana, Antiedematogênica e Toxicidade Frente à *Artemia salina* da espécie Vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae)**. 2005. 182 f. Mestrado (Programa de Pós-graduação em Química Aplicada) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual De Maringá, Maringá, Junho de 2005.

Vaya, J. & Aviram, M. Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr Med Chem Imm Endoc Metab Agents* 1: 99-117, 2001.

VELA NS, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MT, LAPA AT 1997. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extracts and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. *Planta Med.* 63:36–9.

Viegas, C. Jr. *et. al.* Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. Vol. 29, n. 2, 2006.

Volpato, A. M. **Avaliação do Potencial Antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) Para Seu Emprego Como Fitoterápico**. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) Curitiba, 2005.

ZHAO C, *et. al.* In vitro protection of DNA from Fenton Reaction by plant polyphenol verbascoside. **Biochimica et Biophysica Acta.**; 1723: 114-23, 2005.