



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GÊNIFER ERMINDA SCHREINER

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.)
TRONC.**

CERRO LARGO

2019

GÊNIFER ERMINDA SCHREINER

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.)
TRONC.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,
apresentado como requisito para obtenção de grau
de Licenciada em Ciências Biológicas da
Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus
Cerro Largo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nessana Dartora

CERRO LARGO

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Schreiner, Gênisfer Erminda
Extração e Caracterização de Metabólitos Secundários
de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. / Gênisfer
Erminda Schreiner. -- 2019.
48 f.:il.

Orientadora: Dr^a. Nessana Dartora.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS ,
2019.

1. Plantas medicinais. 2. Fitoterápicos. 3.
Verbenaceae. I. Dartora, Nessana, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- LICENCIATURA
Rua Jacob Reinaldo Haupenthal, 1580, São Pedro, Cerro Largo-RS, CEP 97900-000, 55 3359-3981
cienciasbiologicas.cl@uffs.edu.br, www.uffs.edu.br

GENIFER ERMINDA SCHREINER

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.) TRONC.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Dra. Nessana Dartora

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

02/12/19

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Nessana Dartora - UFFS

Prof.^a Dra. Vanusa Manfredini - UNIPAMPA

Me. Luíza Spohr - UFPEL

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, meus pais que tornaram essa experiência possível, com seu apoio, incentivo, exemplo e palavras de carinho e me assegurarem de que as incertezas e inconsistências fazem parte nessa etapa, mas são superáveis e infundadas. Aos meus irmãos pelos belos exemplos de vida aos quais me espelhei, tanto no meio acadêmico como afetivo e familiar. Todos vocês me ensinaram a importância de buscar sempre mais, obtendo a realização pessoal e profissional.

Sou grata também à família que constituí aqui no meio acadêmico nesses últimos 4 anos; ao Marcelo, meu namorado, que sempre esteve ao meu lado para me apoiar, e até consolar algumas vezes; ao Robson, por deixar a vida mais leve e despreziosa no nosso apartamento 03; à Daniele e Susana, minhas companheiras de estudos, trabalhos, conversas e, principalmente risadas; à Caroline e ao Jefferson, amigos de todas as horas, obrigada por deixarem meus semestres mais suportáveis; à Manoela, com quem nos últimos meses dividi muito mais que apenas o laboratório 109, mas também projetos, anseios, esperanças, alegrias, tristezas e surtos de identidade, obrigada por me deixar de pé.

E à todos os professores que tive durante a minha graduação, assim como todos os outros funcionários necessários para o manter o bom funcionamento da UFFS, mas especialmente a Prof^ª. Dr^ª. Nessana Dartora, por ter feito muito mais que me orientar nesta pesquisa, mas por me ensinar tudo que agora sei sobre a área, obrigada pela paciência e comprometimento. Agradeço também à minha banca, constituída pela Prof^ª. Dr^ª. Vanusa Manfredini e a Ms^a Luíza Spohr, que cederam um pouco do seu tempo para avaliar e auxiliar na melhora deste trabalho.

RESUMO

A *Aloysia gratissima*, conhecida popularmente pelo nome de Garupá na região sul da América, de onde é nativa, é uma planta muito utilizada na medicina popular e já possui muitas das suas propriedades confirmadas cientificamente. Devido a essa importância como fitoterápico em potencial, o presente trabalho tem como objetivo principal extrair e caracterizar os compostos secundários presentes em *A. gratissima*. Deste modo, as folhas da planta foram submetidas à extração com água destilada e hidroalcoólica, com o intuito de isolar e a identificar estruturalmente os principais constituintes químicos presentes em suas folhas em diferentes formas de extração. Foi feita a separação do sobrenadante com etanol refrigerado e centrifugado dos precipitantes de maior peso molecular, as frações solúveis em etanol, contendo os metabólitos secundários, foram denominadas AG-SBH para o extrato hidroalcoólico e AG-SBA para o extrato aquoso. Para simplificar as amostras as mesmas foram submetidas à particionamento líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, resultando em sete diferentes frações (AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq, AG-SBH-BuOH e AG-SBA-BuOH, AG-SBH-AcEt e AG-SBA-AcEt e AG-SBH-CHCl₃), que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. Um total de 32 compostos foram encontrados em AG-SBH e AGSBA, sendo que destes 22 foram identificados: teobromina, ácido clorogênico, ácido benzoico, arenariosídeo, verbascosídeo, hofmaniacetona, rutina, ácido p-cumárico, ácido ferulico, campferol/luteolina diglicosídeo, 5-hidróxi-7,4-dimetoxiapigenina, luteolina, genkwanina, guaiol, bisabolol, spathulenol, zeaxantina, lupeol acetato, betulina, ácido ursólico e ácido oleanóico. Identificou-se também um componente inédito para a planta, o flavonóide campferol/luteolina diglicosídeo. Além disso, alguns compostos puderam ser quantificados por meio de padronização externa. Verificou-se o flavonóide rutina como sendo o composto majoritário para a planta, possuindo cerca de 61,1 ug/mg de peso seco, composto este que pode estar atrelado a muitas das atividades medicinais atribuídas à *Aloysia gratissima*, principalmente a antioxidante e neuroprotetora; seguido pelo fenólico ácido p-cumárico, com 15,2 ug/mg e pelo alcalóide teobromina, com 9,21 ug/mg. Esta quantificação se refere ao extrato AG-SBH, onde no AG-SBA a ordem de concentração foi a mesma, porém os valores encontrados foram consideravelmente menores. Tais dados corroboram pesquisas feitas anteriormente e legitimam futuras pesquisas sobre os compostos desta importante planta medicinal.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Fitoterápicos. Verbenaceae.

ABSTRACT

Aloysia gratissima, popularly known by the name of “Garupá” in the southern region of America, where it is native, is a plant widely used in folk medicine and already has many of its scientifically confirmed properties. Due to its importance as a potential phytotherapeutic agent, the present work aims to extract and characterize the secondary compounds present in *A. gratissima*. Thus, the leaves of the plant were subjected to extraction with distilled water and hydroalcoholic, in order to isolate and structurally identify the main chemical constituents present in their leaves in different forms of extraction. The supernatant was separated with refrigerated ethanol and centrifuged from the higher molecular weight precipitants. The ethanol-soluble fractions containing the secondary metabolites were called AG-SBH for the hydroalcoholic extract and AG-SBA for the aqueous extract. To simplify the samples they were submitted to liquid-liquid partitioning with solvents of different polarities, resulting in seven different fractions (AG-SBH-Aq and AG-SBA-Aq, AG-SBH-BuOH and AG-SBA-BuOH, AG-SBH-AcEt and AG-SBA-AcEt and AG-SBH-CHCl₃), which were analyzed by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. A total of 32 compounds were found in AG-SBH and AGSBA, of which 22 were identified: theobromine, chlorogenic acid, benzoic acid, arenarioside, verbascoside, hofmaniacetone, rutin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, campferol/luteolin diglycoside, 5-hydroxy-7,4-dimethoxypigenin, luteolin, genkwanina, guaiol, bisabolol, spathulenol, zeaxanthin, lupeol acetate, betulin, ursolic acid and oleanic acid. An unprecedented component to the plant was also identified, the campferol/luteolin diglycoside flavonoid. In addition, some compounds could be quantified by external standardization. The rutin flavonoid was found to be the major compound for the plant, having about 61.1 µg/mg dry weight, which may be linked to many of the medicinal activities attributed to *Aloysia gratissima*, mainly antioxidant and neuroprotective; followed by the phenolic *p*-coumaric acid at 15.2 µg/mg and the theobromine alkaloid at 9.21 µg/mg. This quantification refers to the AG-SBH extract, where in AG-SBA the order of concentration was the same, but the values found were considerably lower. Such data corroborate previous research and legitimize future research on the compounds of this important medicinal plant.

Keywords: Medicinal Plants. Herbal medicines. Verbenaceae.

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem demonstrativa de diferentes partes da espécie <i>Aloysia gratissima</i>	21
Figura 2 - Cromatograma obtido por HPLC de (A) AG-SBH e (B) AG-SBA.....	29
Figura 3 – Cromatografias em camada delgada: (1) glicose, (2) sacarose, (3) AG-SBH, (4) AG-SBA e (5) rutina.....	31
Figura 4 - Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AG-SBH-Aq e (B) AG-SBA-Aq.....	32
Figura 5 - Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AG-SBH-BuOH e (B) AG-SBA-BuOH.....	33
Figura 6 - Espectro de massa e possível estrutura química do novo flavonol glicosilado encontrados em <i>A. gratissima</i> : campferol/luteolina diglicosídeo.....	35
Figura 8 - Cromatograma de HPLC-DAD de AG-SBH- CHCl ₃	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos aquoso, hidroalcolico e das frações resultantes do particionamento líquido-líquido obtidos das folhas de <i>A.gratissima</i>	28
Tabela 2 - Identificação dos metabólitos secundários presentes nas folhas de <i>A. gratissima</i> por HPLC-ESI-MS.....	37
Tabela 3 – Concentração de metabólitos secundários presentes em folhas de <i>A. gratissima</i> ..	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL	11
2.1 POTENCIAIS DAS PLANTAS MEDICINAIS	11
2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO	14
2.3 ESCOLHA DA PLANTA	16
2.3.1 Família Verbenaceae	18
2.3.2 <i>Aloysia gratissima</i>	19
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 GERAL.....	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	24
4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES VEGETAIS	25
4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	25
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	26
4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	26
4.4.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	26
4.4.3 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry).....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	27
5.1.1. Identificação dos compostos por HPLC-DAD-ESI-MS	29
5.1.2 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do AG-SBH e AG-SBA.....	31
5.1.2.1 Frações aquosas: AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq	31
5.1.2.2 Frações butanólicas: AG-SBH-BuOH e AG-SBA-BuOH	33
5.1.2.3 Frações acetato de etila: AG-SBH-AcEt e AG-SBA-AcEt	35
5.1.2.4 Fração clorofórmica AG-SBH-CHCl ₃	37
5.1.3 Otimização da análise de HPLC-DAD para a quantificação de compostos em extratos de <i>A. gratissima</i>.....	39
6. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país tropical, com um tamanho quase continental, o que significa que o mesmo possui uma grande diferenciação de relevo e clima no percorrer da sua extensão. Somando-se a isso, cada qual destes possui características próprias, permitindo assim a existência de uma infinidade de microclimas e, conseqüentemente, uma diversidade muito grande de fauna e flora. Segundo Martins e Figueiredo (2009), o país possui cerca de 45 mil espécies vegetais distribuídas pela sua extensão, o que equivale a 18% da disponibilidade global, sendo que aproximadamente 43% destas são endêmicas do país (FIORAVANTI, 2016). Além disso, cerca de 2 mil espécies, encontradas apenas na Amazônia, já foram identificadas como úteis ao homem, porém apenas 8% desse total já foi estudado com relação às suas propriedades bioativas (HEINZMANN; BARROS, 2007).

O mercado mundial de fitoterápicos no começo da década movimentou cerca de 22 bilhões de dólares (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001) e, embora o Brasil seja um país estratégico, já que detém em seu território quase um terço da flora mundial, ainda não tem uma atuação de destaque neste mercado. Outro problema levantado por Yunes, Pedrosa e Cechinel-Filho (2001) é a falta de continuidade de investimentos públicos e/ou privados e falta de integração entre as diferentes áreas do conhecimento, como química, bioquímica, farmacologia, etc.

Apesar destas dificuldades, há que se destacar que as pesquisas com produtos naturais de origem vegetal estão em crescente desenvolvimento, sendo responsáveis por inúmeras descobertas. Nos últimos 25 anos, 42% das produções científicas sobre plantas medicinais publicadas em todo o território da América Latina, era advinda de pesquisas, ou pesquisadores brasileiros. Ainda assim, estes índices são baixos, considerando abundância de biodiversidade presente no país, o que reflete na realidade de apenas mil espécies terem sido estudadas mais profundamente, quanto a seus princípios medicinais no Brasil (BRAGA, 2009; MARTINS; FIGUEIREDO, 2009).

Sendo assim percebe-se a crescente necessidade e oportunidade de realizar novas pesquisas envolvendo plantas potencialmente medicinais regionalmente. Pensando em atender a estes requisitos, escolheu-se a espécie *Aloysia gratíssima* para realizar o presente estudo. Esta planta, que pertence a família Verbenaceae, é conhecida como Garupá e é muito difundida na medicina popular sul americana, é aromática, rica em óleo essencial, nativa da América do Sul e tem seus atrativos medicinais amplamente conhecidos no meio acadêmico (BENOVIT, 2012).

A. gratissima apresenta uma série de estudos pré clínicos evidenciando várias das atividades relacionadas ao seu uso popular (BENOVIT, 2012; FRANCO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2015; SOUZA; WIEST, 2007; VANDRESEN *et al.*, 2010; ZAMORA; TORRES; NUÑES, 2018; ZENI, 2011), sendo portanto, ainda mais qualificada para ser o enfoque deste estudo. Novos estudos acerca dos componentes químicos presentes nesta espécie permitirão não somente elucidar a sua composição estrutural, mas também descobrir novas atividades biológicas a ela relacionadas.

2. REFERENCIAL

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Como já comentado anteriormente, o Brasil é um país agraciado com uma grande diversidade e riqueza de espécies, animais e vegetais, porém, um pouco dessa riqueza também se refere às plantas exóticas, ou invasoras, que já estão tão habituadas às condições do novo país em que se desenvolvem, naturalizando-se de tal modo a gerar preocupações no âmbito de ocuparem nichos destinados à plantas nativas, restringindo-as (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Acredita-se que a maioria das plantas exóticas foram trazidas, principalmente, por imigrantes/colonizadores, sendo assim, estão totalmente integradas nas crenças da medicina popular, o que faz com que sejam preferidas pelos produtores quando comparadas com as nativas, pois possuem mais estudos e, conseqüentemente, mais credibilidade, tanto no mercado nacional como no exterior. Tal fato reflete também a falta de conhecimento, e interesse, em métodos que visem o melhor aproveitamento de recursos naturais de forma sustentável, e o contentamento do mercado nacional com as espécies exóticas acaba por limitar o interesse nas espécies nativas, o que diminui o investimento em estudos e desenvolvimento (MENTZ; BORDIGNON, 2010; REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2010).

Isto se agrava ainda mais quando encarado o problema ocasionado pelo aumento drástico e desenfreado do consumo e exportação dos produtos de origem vegetal, ou seja, o extrativismo, que consiste, basicamente, na colheita direta dessas plantas nos ecossistemas florestais, sem nenhuma perspectiva, ideia ou conhecimento sobre manejo ou métodos reprodutivos das mesmas, o que pode trazer muitos danos para o desenvolvimento da espécie, como foi observado para o pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), xaxim (*Dicksonia sellowiana*) ou araucária (*Araucaria angustifolia*) que tiveram suas populações diminuídas consideravelmente

devido a extração indiscriminada. Isso leva a uma diminuição drástica desses organismos na natureza, afinal, para a obtenção de cerca de 50 mg de um composto em estado puro é necessária cerca de 5kg de matéria seca (em casos com percentual de rendimentos em torno de 0,001%) e para tanto se faz necessário a coleta de cerca de 50 kg de planta fresca (MENTZ; BORDIGNON, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2002), nos países em desenvolvimento, cerca de 80% da população utiliza ervas medicinais como fonte primária de saúde. Isso nos remete também sobre como é a exploração do mercado por pessoas menos privilegiadas, com menor alcance as informações, já que sendo mais vulneráveis, são levadas muitas vezes a consumir plantas medicinais sem eficácia comprovada (BENOVIT, 2012), induzidas pela “propaganda comercial agressiva e pela atuação fraca dos órgãos estatais responsáveis pela vigilância sanitária” (LAPA *et al.*, 2010, p. 248). Aliado a isso, a pouca quantidade de publicações da área na língua portuguesa e a dificuldade em encontrar e interpretar os resultados de pesquisas confiáveis com drogas vegetais, culmina em uma população desinformada ou até mesmo em profissionais com informações limitadas e desatualizadas quanto a eficácia e cuidados que o seu uso envolve (RIBEIRO; MOURA, 2009).

Outro problema enfrentado pelo mercado nacional de plantas com finalidades terapêuticas diz respeito à confiabilidade dos produtos adquiridos, pois, a qualidade das plantas medicinais e dos fitoterápicos (medicamentos preparados exclusivamente à base de compostos extraídos de espécies vegetais) comercializados diminuiu conforme a demanda dos mesmos aumentou (HEINZMANN; BARROS, 2007). Tanto é que constatou-se que aproximadamente 50% destes produtos comercializados no país “apresentam alguma irregularidade devido à presença de matéria orgânica estranha, sujidades e insetos, problemas de identificação botânica, teores de fitocompostos abaixo do especificado e adulteração” (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2010, p. 46).

Mas essa realidade está mudando, pois há um crescente aumento no consumo de plantas medicinais *in natura* pela população, estimulado pelo aumento da realização de estudos de comprovações científicas de espécies já difundidas, aliado à insatisfação dos consumidores com os efeitos indesejáveis do uso abusivo de medicamentos sintéticos, aumentando-se gradativamente também a exigência com a qualidade dos produtos. Sendo assim, vem se instaurando um mercado relativamente emergente para pesquisas relacionadas a terapias alternativas, com plantas medicinais e seu uso na produção de fitoterápicos, fazendo com que esse mercado cresça cerca de 15% ao ano atualmente no Brasil (HEINZMANN; BARROS,

2007). Crescendo juntamente com este mercado, também estão as investigações quanto aos consequentes riscos do uso errôneo das plantas medicinais, pois imagina-se que estas, por serem “naturais”, não podem causar malefícios à saúde humana. Essa percepção errônea é em grande parte responsabilidade da mídia, que a partir do século XX se adaptou a vincular a imagem das plantas com à natureza e com uma vida mais saudável, o que acabou criando uma fisionomia “não agressora das plantas medicinais e buscou anular possíveis riscos para a sua administração” (TAGLIATI; FÉRES, 2009, p. 119).

Porém, o uso de espécies vegetais de forma errônea, conjuntos que apresentem “adulteração com outras drogas vegetais, contaminação com substâncias tóxicas, superdosagem, uso inapropriado pelos consumidores e interação com outros fármacos” (MARTINS; FIGUEIREDO, 2009, p.144) são realidades cujas quais os consumidores leigos não estão preparados, deixando-os assim a mercê de efeitos adversos e complicações resultantes. Assim, novamente se percebe a necessidade urgente de pesquisas exaustivas sobre o tema, pois a maioria das plantas medicinais usadas popularmente nem sequer foi submetida à testes de segurança, ou seja, sua toxicidade não foi analisada e, portanto, não foi descartada (TAGLIATI; FÉRES, 2009).

Além disso, quando se faz uso de produtos de origem vegetal deve-se lembrar também que os efeitos podem não ser apenas imediatos e facilmente relacionáveis com a patologia que levou ao uso da substância, como ocorre no caso dos remédios sintéticos. Podendo assim surgir complicações instauradas após algum tempo de uso repetitivo, na forma de males principalmente relacionados aos rins e ao fígado (LAPA *et al.*, 2010).

Pensando em evitar tais agravantes, o Governo Federal em 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, que tem como objetivo geral “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006). Este decreto procura regulamentar e estimular a pesquisa sobre fitoterápicos e plantas medicinais, incentivadas por fomento, além da elaboração de programas que visem a formação técnica e científica sobre o manejo e o cultivo racional e sustentável das plantas, introduzindo a agricultura familiar neste novo mercado. Também reflete a preocupação em promover o uso dos vegetais pela população de forma consciente e racional, estimulando profissionais de saúde a se informarem e até receitarem plantas medicinais e fitoterápicos como

tratamentos, e, conseqüentemente, incluir estes compostos na lista de medicamentos do programa governamental “Farmácia Popular”.

O uso das plantas como base para compostos farmacológicos se justifica no quesito de que a diversidade molecular encontrada em produtos naturais é muito superior às conseguidas pelas técnicas de criação sintética, que ainda são limitadas, tornando ainda o processo mais barato. Além disso, os organismos, animais e vegetais, possuem uma certa similaridade, o que faz com que os produtos naturais possuam ainda mais propriedades e efeitos *in vivo* do que os conhecidos *in vitro* (GUERRA; NODARI, 2010). Esta complexidade, ainda desconhecida, se reflete no sinergismo, ou seja, a atuação conjunta de mais de um constituinte que pode potencializar ou restringir a ação ou até dos efeitos colaterais provocados por alguns metabólitos, sendo necessário assim muitos estudos para realmente se ter certeza quanto ao potencial e seguridade da utilização de plantas (ZENI, 2011).

2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Desde o século XX, os cientistas procuraram estabelecer relações entre o consumo das plantas, e conseqüentemente os compostos que as formavam, e a cura para certas patologias, o que as tornou interessantes economicamente, no meio medicinal, agrônômico, gastronômico e de perfumaria. Desta forma, descobriu-se que a maioria das substâncias com algum interesse medicinal é proveniente do metabolismo secundário das plantas (também conhecidos como produtos naturais ou micromoléculas) (LEITE, 2009; SANTOS, 2010).

Metabolismo em si, é o nome dado ao conjunto de reações que ocorrem no interior de cada célula para a manutenção da mesma, sendo que enzimas específicas fazem com que as reações certas ocorram de maneira ordenada e para um objetivo final necessário, sendo dividido em metabolismo primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, como nutrição, fotossíntese, respiração, e transporte de solutos. Fazem parte dos compostos de metabolismo primário, os lipídeos, proteínas e carboidratos (LEITE, 2009; SANTOS, 2010).

Moléculas de metabolismo primário são capazes de formar inúmeras outras substâncias que, a princípio, podem não estar diretamente relacionadas à manutenção vital do organismo, porém lhe conferem certa vantagem: os metabólitos secundários, que, em nível molecular, são produzidos pelas plantas com o intuito de proteção contra herbívoros e microrganismos patógenos (explicando assim a enorme gama de produtos de origem vegetal

usados como antimicrobianos) (LEITE, 2009; MARTINS; FIGUEIREDO, 2009; POSER; MENTZ, 2010; SANTOS, 2010).

Os compostos do metabolismo secundário podem também auxiliar na adaptação da planta, e atuar como mecanismo de atração de polinizadores e dispersores, por exemplo (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2010. Deve-se comentar ainda que os metabólitos secundários podem atuar nas interações que acontecem entre plantas, na competição por recursos (alelopatia), até mesmo quando esta competição ocorre entre indivíduos de uma mesma espécie (autopatia), sendo que a combinação de metabólitos específicos pode ser tóxica para a planta que é atingida (POSER; MENTZ, 2010).

Sabendo disso, pode-se dizer que os metabólitos secundários produzidos pela planta são influenciados: i) pelo ambiente onde esta se encontra, podendo citar “o tipo de solo, temperatura, altitude, pluviosidade, luminosidade, entre outros” (LEITE, 2009, p. 51); ii) por fatores ontogenésicos, o que abrange a variação da concentração e da composição segundo a idade e estágio de desenvolvimento em que se encontra a planta; e iii) por fatores genéticos, uma vez que os metabólitos secundários são biossintetizados a partir de metabólitos primários pré-existentes, e para ocorrer tal transformação são necessárias reações de catabolismo (quebra) molecular, o que é feito por intermédio de enzimas celulares, e estas são expressas pelos genes, que são controlados, assim como os demais processos celulares, por um controle genético (LEITE, 2009).

A partir disso pode-se ter uma ideia da grande dificuldade enfrentada por quem cultiva plantas medicinais domesticadas, pois deve-se ter um grande cuidado com a interferência de fatores externos, como o ambiente no qual ela foi disposta, fazendo com que este se pareça ao máximo com o seu habitat natural (LEITE, 2009). Ainda, deve conhecer em que momento a concentração do metabólito desejado está mais proeminente para se realizar a colheita, pois “em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo essa variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano” (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2010, p. 61).

Também é importante saber que as respostas gênicas responsáveis pela produção de enzimas podem ser induzidas ou inibidas, dependendo das necessidades de adaptação da planta. Para se buscar algum controle e constância sobre plantas domesticadas, alguns marcadores, metabólitos secundários ou grupos de metabólitos são analisados. Acredita-se que a manipulação dos genes produtores de certos metabólitos, por meio de uma super-expressão dos mesmos, pode aumentar significativamente a produção dos compostos considerados úteis, o

que se caracteriza como uma grande promessa do ramo da biotecnologia (LEITE, 2009), mas a qual se concretiza como uma tarefa bastante difícil devido, principalmente, a necessidade de muito investimentos e aparelhagem especializada.

Os componentes de metabolismo secundário podem estar armazenadas em diferentes locais e órgãos do vegetal. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero e espécie produz uma categoria de compostos químicos característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na sua estrutura química (p.ex. possuir anel aromático, com ou sem unidades de açúcar), composição (p.ex. conter ou não nitrogênio), a via pela qual são biossintetizados, origem da planta ou sua solubilidade em vários solventes (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Uma classificação simples inclui três grupos principais: terpenóides, fenólicos e alcaloides.

Os terpenóides, ou terpenos, são formados a partir da união de isopentenilpirofosfato justapostos, e dependendo da quantidade destes que formam o composto eles podem ser chamados de monoterpenos (C10), que por seu baixo peso molecular costumam ser compostos voláteis, com os óleos essenciais, por exemplo, sequiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), nos quais se enquadram as saponinas, e os tetraterpenos (C40), cujos representantes mais famosos são os carotenoides e xantofilas (VIZZOTT; KROLOW; WEBER, 2010).

Os compostos fenólicos tem como características principal possuir no mínimo um anel aromático e um hidrogênio substituído por um agrupamento hidroxila, neste grupo se encontram os flavonoides, compostos muito importantes na proteção dos vegetais contra a radiação UV e a sinalização entre plantas (VIZZOTT; KROLOW; WEBER, 2010).

Já no anel que forma os alcaloides, é necessária a existência de pelo menos um átomo de nitrogênio, podendo ser advindo de um aminoácido ou de uma base nitrogenada, e por isso possuem um certo caráter alcalino. Por serem produzidas dentro do reticulo endoplasmático da planta, e armazenados nos vacúolos, não é encontrado em células jovens (VIZZOTT; KROLOW; WEBER, 2010).

2.3 BIOSPRECÇÃO MOLECULAR

A bioprospecção é conhecida como a área de estudo que busca e investiga novas fontes naturais de substâncias que possam ter interesse econômico. Está inclusa nessa área a análise das propriedades de plantas medicinais e aromáticas, e para se fazer a escolha de novas plantas às quais possam gerar interesse comercial pode-se usar de vários fatores, sendo que os mais comuns seriam levando em consideração o conhecimento já existente sobre plantas semelhantes a ela ou usos populares já descritos porém sem confirmação da sua eficácia (GOTTLIEB; BORIN, 2010; ZENI, 2011).

Sabe-se que muitos materiais, costumes e fármacos usados ainda hoje foram conhecidos primeiramente pelos chamados povos primitivos, ou tradicionais, afinal, existem registros que mostram a utilização de extratos vegetais por povos da Índia, China e Japão, com fins terapêuticos desde antes de Cristo. Pensando nisso, uma outra área de estudo em crescimento, a etnofarmacologia, tem como premissa avaliar a atividade e eficiência de plantas utilizadas como medicinais por populações tradicionais. Pesquisas nesta área se mostram muito eficientes, apresentando uma taxa de espécies ativas entre 20-60%, o que no ramo da pesquisa fitoterápica, é uma ótima margem de sucesso (GOTTLIEB; BORIN, 2010; ZENI, 2011)

Apesar de tudo isso, atualmente quando se fala em pesquisas novas a realidade é outra, pois a maioria dos povos indígenas da América Latina já estão aculturados e as plantas utilizadas por eles já foram investigadas. Sem contar o fato de que as populações indígenas se apropriaram apenas de um pequeno número de todos os organismos úteis na natureza. (GOTTLIEB; BORIN, 2010; ZENI, 2011)

Desta forma, o principal meio utilizado para a escolha de espécies para pesquisas na área de bioprospecção é o método randômico, ou seja, a escolha é feita ao acaso, sem levar em consideração nenhum conhecimento prévio sobre a sua utilização ou táxon botânico, para só depois realizar uma análise dos componentes formadores e possíveis usos econômicos. Porém apesar de ser o método mais abrangente, a sua taxa de sucesso é bastante baixa, sendo inferior a 5% dos casos (BRAGA, 2009).

Partindo-se desta premissa, surgiu a quimiosistemática, uma área de estudo que agrupa as espécies com semelhanças químicas uma vez que entende-se que plantas com algum parentesco botânico possuem proximidade e, conseqüentemente, semelhanças no seu metabolismo secundário (LEITE, 2009). Sendo assim, pode-se pensar que plantas de uma mesma família, podem apresentar, por exemplo, propriedades bioativas semelhantes, este conhecimento baseado em referências descrevendo compostos de plantas de um mesmo grupo

taxonômico é bastante útil quando se busca a extração de um metabólito específico, pois é muito possível que plantas com parentesco botânico apresentem o mesmo.

2.3.1 Família Verbenaceae

Sabendo da grande diversidade de metabólitos presentes na família Verbenaceae (CORRÊA, 1978; GARLET; IRGANG, 2001; STEFANINI; RODRIGUES; MING, 2002; RITTER *et al.* 2002; DELAPORTE *et al.* 2005; COSTA *et al.* 2006; GOLENIOWSKI *et al.* 2006; VERDRUSCULO; MENTZ 2011; BARROS *et al.* 2007; NEVES *et al.* 2007; MARTÍNEZ, 2008; BARRETO *et al.* 2010), optou-se por estudar uma de suas espécies, a *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. Assim, para o presente trabalho, a escolha da espécie a ser estudada se deu por meio da junção de análises quimiossistemáticas e etnofarmacológicas, priorizando uma espécie nativa, como meio de enaltecer a flora regional e talvez reverter a presente pesquisa em benefícios para a população local. pois uma vez que os metabólitos secundários de uma planta são descritos, avança-se nas pesquisas referentes a comprovações de usos medicinais das mesmas, tornando-as cada vez potencialmente mais relevantes economicamente.

A família conta com 34 gêneros e 1175 espécies amplamente distribuídas pela América, com poucos representantes nos outros continentes (STEVENS, 2010). Possui sua maior diversidade concentrada nas regiões subáridas e subtropicais da América do Sul, ocupando a faixa que vai das Cordilheiras do México aos Andes. No Brasil, são catalogados representantes de 16 gêneros e cerca de 310 espécies da família (FLORA DO BRASIL, 2015).

De maneira geral, esta família é caracterizada por ervas, subarbustos, arbustos, árvores ou arvoretas. O indumento (envoltório) esta quase sempre presente e é formado por tricomas, estes podem ser tectores simples, glandulares, unicelulares, pluricelulares e unisseriados. A abundância de tricomas também é um indicativo de grande produção de metabolismo secundário e óleos essenciais, ali armazenados. As folhas podem ser simples, opostas, opostas cruzadas, alternas ou verticiladas, podem ser inteiras, lobadas ou pinatissectas, sem estípulas (CRESPAM, 2010).

Já as flores podem ser perfeitas ou não (mais raro), são gamossépalas e gamopétalas, com 3 ou 5 pétalas, são organizadas em inflorescências do tipo racemo, racemo espiciforme, espiga ou espiga capituliforme, com brácteas sempre presentes. O fruto é representado geralmente por um esquisocárpo ou drupa, raramente uma drupa esquizocárpica e as sementes possuem embrião reto e sem endosperma (CRESPAM, 2010). No âmbito da quimiossíntese, a

família Verbenaceae é identificada pela produção de feniletanóides e iridóides glicosídicos, mas já os diterpenóides são raros (SANTOS, 2007).

No estado do Rio Grande do Sul são encontrados representantes de três tribos da família: a tribo Verbeneae, que num total é composta por quatro gêneros, dos quais *Glandularia* e *Verbena* são encontrados no estado; da tribo Lantaneae, que conta com onze gêneros, são encontrados exemplares de *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia*, *Phyla* e *Stachytarpheta*; e a tribo Citharexyleae possui apenas representantes de *Citharexylum*, *Verbenoxylum* e *Duranta*, no RS. Totalizando assim, 71 espécies representantes em 11 gêneros, dos 17 que compõe a família, lembrando que só foram contadas espécies nativas da flora gaúcha (CRESPAM, 2010, FLORA DO BRASIL, 2015).

Fazendo parte deste arsenal botânico, encontra-se a espécie objeto de estudo deste trabalho, a qual é muito difundida popularmente na América do Sul para tratar sintomas de doenças relacionadas principalmente ao sistema respiratório.

2.3.2 *Aloysia gratissima*

Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. é uma Verbenaceae, da tribo Lantaneae e do gênero *Aloysia*. Este gênero possui cerca de 34 espécies, com distribuição pela América subtropical e temperada, abrangendo territórios do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Patagônia, destas, 9 são consideradas nativas no Brasil. No Rio Grande do Sul são encontradas cerca de 8 espécies (não se entrando um consenso entre botânicos), sendo duas em cultivo (CRESPAM, 2010; BENOVI, 2012). Espécies desse gênero, de maneira geral, apresentam compostos polifenólicos e glicosídeos iridóides (SANTOS, 2007).

A espécie *A. gratissima*, também conhecida pelas sinonímias de *Lippia lycioides* (Cham.), *Lippia lycioides* (Steud.) e *Verbena gratissima* (Gillies & Hook) (BENOVI, 2012), é chamada popularmente como Garupá, Alfazema-do-Brasil, Erva-de-Nossa-Senhora, Erva-Santa, Mimo-do-Brasil, Niño rupá (nome utilizado na Argentina e pelos índios Guaranis), entre outros (SOUZA; WIEST, 2007).

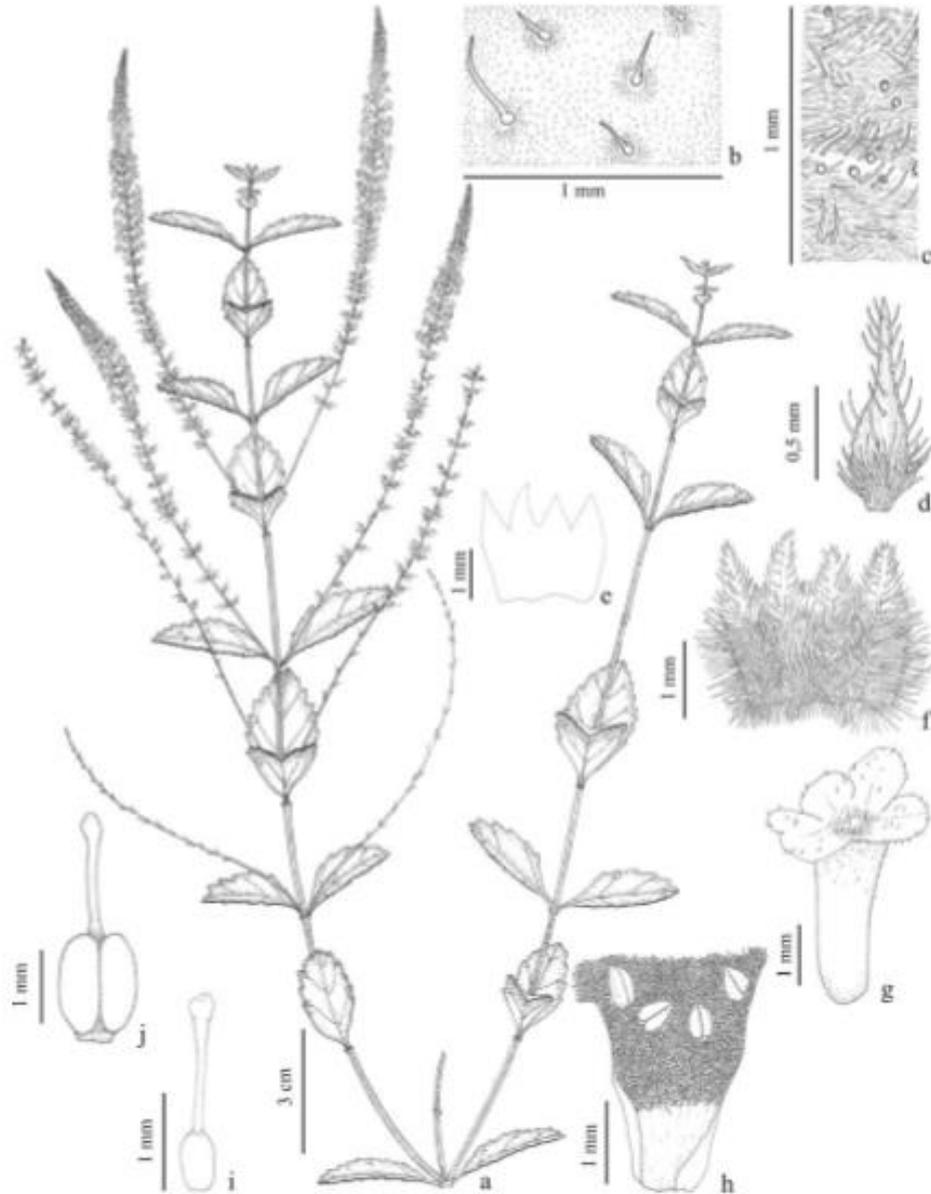
É uma planta perene, de porte arbustivo, podendo alcançar até três metros de altura, possui crescimento desordenado e contem espinhos nos seus ramos. Suas folhas são simples, com disposição opostas, as vezes podem ser alternas, apresenta limbo inteiro e margem dentada, geralmente com as bordas lisas até a metade inferior da folha, seguindo serrilhada da metade até o ápice. Possui um formato lanceolado, podendo apresentar textura subcoriácea ou até macia, coloração verde escura ventral e grisácea dorsalmente, a folhagem é persistente. Seu

caule comumente é fino e longo, possui aspecto áspero, de coloração acinzentada ou verde-oliva, até mesmo seus brotos são herbáceos e resistentes (Figura 1a-c) (BENOVIT, 2012; FRANCO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2007; SANTOS, 2007; SOUZA; WIEST, 2007; ZENI, 2011).

Este vegetal é reconhecido como planta ornamental, devido a sua floração intensa, formada por flores perfeitas, pequenas, brancas, muito perfumadas, dispostas em inflorescências paniculadas terminais, agrupamentos axilares solitários ou geminados, ou ainda pode se apresentar de forma isolada (Figura 1e-i). A época de floração vai de agosto a fevereiro, com a dispersão de suas sementes iniciando em março (melhor época de coleta), e terminando em setembro. As sementes, são pequenas, com aproximadamente 0,2 mm de comprimento e 0,29 mg de peso, envoltas por uma casca pilosa dura, que protege o embrião, porém esta não precisa ser necessariamente retirada para a germinação. Não podem ser armazenadas por muito tempo, 4 meses já são suficientes para provocar uma diminuição significativa da sua viabilidade, sendo que para uma germinação aceitável é necessário um bom nível de umidade e de matéria orgânica no solo (SANTOS, 2007).

A planta pode se propagar por via sexuada ou assexuada, de forma vegetativa por meio de estacas herbáceas. Possui sementes pequenas e fotoblásticas positivas e apesar da luz não afetar muito o processo, mudanças na temperatura se mostraram como fatores limitantes, sendo apresentados melhores índices de germinação com temperaturas alternantes entre 20° e 30°C (ROSA; FERREIRA, 2001; SANTOS, 2007).

Figura 1 – Imagem demonstrativa de diferentes partes da espécie *Aloysia gratissima*.



Fonte: adaptado de Crespam, 2010.

Nota: a. porção apical de um ramo; b. dimensão e formato da folha encontradas na espécie (esquema); c. detalhe da superfície adaxial da folha; d. bráctea; e. cálice (esquema); f. cálice; g. corola em vista lateral; h. corola em vista frontal, i. corola aberta mostrando estames; j. gineceu; k. fruto.

A *A. gratissima* é muito utilizada na medicina popular, principalmente por meio do chá das suas folhas (GARLET; IRGANG, 2001) devido a suas propriedades sedativas, antidepressivas, antiespasmódica, digestivas, diaforéticas, cardiotômicas, carminativas, antioxidante, no tratamento de hipertensão, dores de cabeça e no estomago, gripes, resfriados e demais doenças relacionadas ao sistema respiratório e sistema nervoso central, além de ser

utilizada para tratar cólicas de bebês e dores de ouvido (BENOVIT, 2012; GARLET; IRGANG, 2001; SOUZA; WIEST, 2007; ZENI, 2011). Muitas destas propriedades biológicas vêm sendo comprovadas cientificamente, no entanto ainda são escassos os estudos relacionados a sua composição química abrangente e a qual(is) composto(s) são atribuídas tais propriedades.

Os primeiros estudos de composição química de *A. gratissima* abordam a caracterização do óleo essencial da planta, onde Bailac *et al.* (1999), por cromatografia gasosa (GC-MS) identificaram os compostos majoritários *trans*-verbenol (2,8%), β -cariofileno (3,3%), óxido de cariofileno (11%) e cadinol (33%). Em 2001, Sartoratto, a partir da extração por SPME (microextração em fase sólida), identificou, entre muitos compostos, limoneno (1,80%), linalol (2,15%), *trans*- e *cis*-pinocanfona (10,86 e 4,02%) e *trans*-acetato de ponocarvoila (9,27%), entre os majoritários.

Ricciardi *et al.* (2006) analisaram o óleo essencial de exemplares desta espécie coletados em três locais próximos à cidade de Corrientes (Argentina) no outono, primavera e verão. Os principais constituintes identificados foram β -elemeno, viridiflorol, β -cariofileno, α -tujona, 10-epi-cubebol, biciclogermacreno, (E)-nerolidol e germacreno D. A composição química dos óleos essenciais apresentou significativa variação associada às diferentes épocas de coleta, bem como à localização.

Santos (2007) procurou saber se a produção de óleo essencial de *Aloysia gratissima* era afetada pela diferença de luminosidade a qual é exposta, e, quando comparada com plantas cultivadas sob malhas vermelhas, azuis e pretas, as plantas cultivadas a pleno sol mostraram um maior teor de óleo essencial, o que novamente mostra a sua resistência à grandes irradiações. Quanto a composição química encontrada na planta, foram identificados 22 compostos oxigenados e 10 não oxigenados, totalizando 32 compostos, que foram identificados como sendo:

um monoterpene, 16 monoterpenos oxigenados, nove sesquiterpenos e seis sesquiterpenos [...] Ao observar a quantidade de mono e sesquiterpenos presentes na folha, verifica-se um equilíbrio nos tratamentos a pleno sol e nas malhas coloridas, porém, para as inflorescências, há uma produção muito superior de sesquiterpenos (SANTOS, 2007, p. 103).

Segundo Benovit (2012) o óleo essencial da planta é formado por 73 constituintes, sendo que os majoritários foram 1,8-cineole (18,54%), sabineno (9,5%), guaiol (6,79%) e biciclogermacreno (5,12%). Nesta mesma pesquisa a autora comprovou o efeito sedativo do óleo essencial de *A. gratissima* sobre jundiás (*Rhamdia quelen*). Quando os animais eram expostos ao óleo puro em concentrações de 300 mg/L⁻¹ ficavam anestesiados, ou seja,

apresentavam a perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes (pressão no pedúnculo caudal) dentro de aproximadamente 18 minutos, e quando submetidos a 900 mg/L⁻¹ obtinham o mesmo resultado em aproximadamente 12 minutos.

Outras propriedades biológicas vêm sendo atribuídas ao óleo essencial de *A. gratissima* e comprovadas cientificamente. Nesse contexto, ensaios *in vitro* demonstraram que a espécie *Aloysia* tem atividade para muitas bactérias gram-positivas responsáveis por infecções do trato respiratório em humanos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*) (CÁCERES *et al.*, 1993). Em estudos da ação fungitóxica do óleo essencial total das folhas de *A. gratissima*, Pinto *et al.* (2007) verificaram uma inibição no crescimento micelial em três concentrações (20, 100 e 500 ppm) para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*; e para o fungo *Fusarium oxysporium* apenas a concentração de 500 ppm foi significativa para tal inibição.

Como pode-se observar, a maioria dos estudos desenvolvidos com a planta, visa a caracterização de seu óleo essencial, e poucas pesquisas foram realizadas até o momento com os demais metabólitos secundários, porém nada de forma abrangente. O extrato metabólico de *A. gratissima* tem atividade antioxidante (ROSAS-ROMERO, SAAVEDRA, 2005) e, conforme Vandresen *et al.* (2010), também possui efeitos, antibacteriano e antiedematogênico. Silva *et al.* (2006) relatam a presença de cauranos, flavonóides e feniletanóides, sendo esta composição química compatível com a família Lamiaceae. Além disso, Vandresen *et al.* (2010) também mostram a presença de sesquiterpenos (α -bisabolol), triterpenos (α -amirina, ácido betulínico, ácido oleanóico e, ácido ursólico) e flavonoides (genkwanina, 5-hidróxi-7,4''-dimetoxiapigenina, 5-hidróxi-7,3'',4''-trimetóxiluteolina e rutina).

Zeni (2011) determinou que os compostos majoritários da *A. gratissima* são os ácidos fenólicos, englobando os ácidos vanílico, clorogênico, ferúlico (em maior concentração), caféico e gálico, e os carotenoídes, principalmente o *trans*- α -caroteno, que mudam quantitativamente de acordo com as condições ambientais, sendo que, quando comparadas as estações do ano, no outono se obteve maiores concentrações de polifenóis e carotenoides, antioxidantes conhecidos popularmente.

Essa característica antioxidante, entre outras coisas, possibilita a modulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase, que quando tem sua expressão aumentada, eleva também a sensibilidade do neurônio à estímulos inflamatórios, que levam a morte celular por danos oxidativos. Esta enzima é induzida pelo glutamato, que em excesso se torna tóxico, sendo nesse estado associado a doenças crônicas do sistema nervoso central. Esta interação foi

totalmente bloqueada pela pré administração do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* em animais, o que conseqüentemente reduziu o dano oxidativo cerebral causado pela grande produção de ácido nítrico, caracterizando-a, assim, também como neuroprotetora, devido a um efeito antagônico que a planta exerce sobre os receptores N-metil-D-aspartato (ZENI, 2011).

Embora se conheçam alguns compostos presentes na planta, assim como algumas de suas propriedades terapêuticas, considera-se importante avançar no conhecimento científico sobre esta espécie de âmbito nacional utilizada na fitoterapia popular, a qual pode ser uma potencial fonte de novos princípios de interesse medicinal. Dessa forma, novos estudos acerca dos componentes químicos presentes nesta espécie permitirão não somente elucidar a sua composição estrutural, mas também descobrir novas atividades biológicas a ela relacionadas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Extrair e caracterizar estruturalmente metabólitos secundários presentes nas folhas de *Aloysia gratissima*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Coletar e obter extratos de *A. gratissima* por infusão e por refluxo com misturas hidroalcoólicas;
- Extrair e caracterizar estruturalmente metabólitos secundários das folhas de *A. gratissima*
- Desenvolver técnicas de separação cromatográfica e detecção visando maior sensibilidade e velocidade com menor consumo de solventes;
- Desenvolver técnicas de ionização que permitam obter diferentes informações sobre a estrutura das moléculas pela formação de diferentes íons e fragmentos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Para a obtenção de material vegetal, foram realizadas expedições de coleta a campo no município de Alecrim-RS a 27°39'48,5" de latitude sul e 54°48'10,3" oeste, aos 162 metros de altitude. Folhas e pequenos ramos de *Aloysia gratissima* pertencentes a três populações distintas foram coletadas em novembro de 2018, no período da manhã, sendo acondicionados em redes de tecido e conduzidas ao laboratório, onde foram secas em estufa a 50 °C por

aproximadamente 2 dias. Exemplar da mesma espécie, contendo estruturas reprodutivas (flores) foi utilizado na confecção de uma exsicata, que está depositada no Laboratório de Botânica da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Repetiu-se o processo, em maio de 2019, alterando o local de coleta para o município de Guarani das Missões-RS a 28°08'04,4" de latitude sul e 54°36'18,8" oeste, aos 283 metros de altitude com o objetivo de comparar os resultados obtidos na análise dos metabólitos destas plantas de regiões diferentes e coletadas em épocas diferentes. Usaram-se estes dados também para a quantificação de metabólitos secundários em *A. gratissima*.

4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES VEGETAIS

Folhas secas e trituradas (50 g) foram submetidas a extração aquosa (250 mL) sob refluxo por duas horas, sendo este processo repetidos por três vezes. Após o tempo de extração, o material foi filtrado e os extratos combinados e concentrados, em evaporador rotatório com pressão reduzida, até pequeno volume, sendo em seguida liofilizados. Obtendo-se assim, o extrato bruto aquoso, denominado AG-BA. Processo de extração mais intenso foi realizado com etanol 70%, de igual maneira, onde 50 g de material vegetal foram submetidas à extração hidroalcoólica, durante duas horas à 100 °C, repetido três vezes, resultando no extrato bruto hidroalcoólico, denominado AG-BH

Com a finalidade de separar compostos de baixa massa molar (metabólitos secundários) daqueles de alta massa (polissacarídeos e proteínas, principalmente) os extratos brutos (AG-BA e AG-BH) foram solubilizados em água destilada (250 mL), aos quais foi adicionado três volumes de álcool etílico refrigerado. Estas soluções foram deixadas em repouso por cerca de trinta minutos, para promover a precipitação dos compostos de alto peso molecular, que foi intensificada por meio de centrifugação (5.000 r.p.m., 10 min, 4 °C). As frações precipitadas não foram analisadas nesta pesquisa e os sobrenadantes etanólicos resultantes (denominadas AG-SBA e AG-SBH) foram concentrados a pequeno volume, liofilizados, mantidos em frascos fechados e armazenados em freezer.

4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Buscando diminuir a complexidade dos sobrenadantes etanólicos (AG-SBA e AG-SBH) realizou-se um fracionamento líquido-líquido, dividindo os metabólicos presentes em cada fração de acordo com a sua polaridade. Assim, ambos extratos foram solubilizados em água e foram adicionados os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade,

clorofórmio, acetato de etila e butanol para AG-SBH e acetato de etila e butanol para AG-SBA. O processo de partição então, rendeu 4 frações para AG-SBH, nomeadas: AG-SBH-CHCl₃, AG-SBH-AcEt, AG-SBH-BuOH e AG-SBH-Aq; e 3 frações para AG-SBA, nomeadas AG-SBA-AcEt, AG-SBA-BuOH e AG-SBA-Aq. As frações resultantes tiveram seu volume reduzido no evaporador rotativo, foram liofilizadas e armazenadas em freezer para posterior análise.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas para detectar a presença de carboidratos ou metabólitos contendo glicídeos em sua estrutura, como flavonoides glicosilados e saponinas. Estas análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). As amostras (2 mg/ml) foram preparadas com metanol/água (v/v), o solvente utilizado foi EtOAc:H₂O:HOAc:HCOOH (9:2,3:1:1, v/v) (MEDIC-SARIC; JASPRICA; MALES, 2008); e a visualização dos compostos foi obtida com orcinol-H₂SO₄, a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

4.4.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*) foi usada para identificação e quantificação de metabólitos nos extratos obtidos após a precipitação com etanol (AG-SBA e AG-SBH) e nas frações obtidas após o fracionamento líquido-líquido. A cromatografia foi realizada em um sistema LC-MS-2020 (Shimadzu), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. A detecção foi realizada por detector de arranjo de diodos (DAD) ou, nas análises *online*, por espectrometria de massas do tipo electrospray (ESI-MS – *electrospray ionization mass spectrometry*).

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (~22 °C) e a temperatura da coluna foi de 40 °C. As separações foram desenvolvidas em coluna C18 (Shimadzu) com 150 mm x 4.6 mm i.d. e 3.0 µm de tamanho da partícula. A fase móvel consistiu em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambas contendo 0,1 % e ácido fórmico. Dois sistemas de gradiente linear foram desenvolvidos:

1) Aumento da concentração do solvente B, de 0 a 35% em 10 min, seguido do aumento da concentração do solvente B a 100%, dos 10 aos 15 min, mantido por mais 3 min e retornando

para a condição inicial (100% A) em 18 min. O fluxo utilizado foi de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção.

2) Aumento da concentração do solvente B, de 0 a 35% em 10 min, seguido do aumento da concentração do solvente B a 100%, dos 10 aos 15 min, mantido por mais 3 min e retornando para a condição inicial (100% A) em 18 min. O fluxo utilizado foi de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção.

As amostras foram preparadas em MeOH-H₂O (1 mg/mL), sendo que 10 μL de cada amostra foi injetado. A detecção foi realizada por DAD (210 – 400 nm) e por ESI-MS. Para as análises quantitativas, curvas padrões foram preparadas com padrões de ácido benzoico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumarico, ácido vanílico, betulina, luteolina, lupeol acetato, quercitina, teobromina, teofilina e rutina nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, e 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.4.3 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry)

As amostras (~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram solubilizadas em MeOH-H₂O (1:1, v/v), e submetidas a ionização positiva e negativa em pressão atmosférica (API – atmospheric pressure ionization). As análises *online* foram realizadas em um espectrômetro de massas LC-MS-2020, simples quadrupólo com nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação e utilizando o HPLC como sistema de injeção. As análises *offline* foram conduzidas por injeção direta das amostras, utilizando uma bomba de infusão (KDSscientific) a um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Espectros de MS² foram obtidos por fragmentação induzida por colisão (CID - *collision induced dissociation*), usando argônio como gás de colisão. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5 e as análises foram obtidas em modo de scan contínuo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Estudos etnofarmacológicos apontam que as folhas de *A. gratissima* são amplamente utilizadas na medicina popular: nos casos de hipertensão e cefaléias, como

hipocolesterolemiante, nos casos de afecções do estômago, resfriado e gripe (VERDRUSCULO; MENTZ 2011). A esta espécie também são atribuídas propriedades cardiotônicas, sedativas, carminativas, diaforéticas e digestivas, comprovadas pela literatura científica (VITTO; PETANATTI; PETANATTI, 1997; GOLENIOWSKI *et al.*, 2006; BENOVI, 2012).

A principal forma de utilização desta planta pela população se dá por meio da infusão de suas folhas, onde são extraídos diversos metabólitos, entre estes, os componentes do metabolismo secundário, como terpenos, flavonoides e compostos fenólicos. Apesar disso, a maioria dos estudos de investigação química da planta, foca na caracterização de seus óleos essenciais, uma vez que é aromática e com a característica de apresentar uma constância química de sua composição do óleo essencial (RICCIARDI *et al.*, 2006). Assim, existe uma carência de trabalhos objetivando a caracterização de metabólitos que são consumidos na ingestão do chá de *A. gratissima*.

Desta maneira, neste trabalho as folhas de *A. gratissima* foram submetidas à extração aquosa sob refluxo simulando o que acontece quando a infusão é preparada para ser consumida. Além disso, também foi realizada uma extração hidroalcoólica, para posterior comparação, a qual comumente extrai praticamente todos os componentes presentes na planta, possibilitando sua identificação.

Após a extração, o extrato bruto hidroalcoólico (AG-BH) e o extrato bruto aquoso (AG-BA) foram tratados com etanol para separação e isolamento dos compostos de baixa massa molar (os metabólitos secundários), resultando nas frações solúveis em etanol AG-SBH e AG-SBA. Estas, em seguida foram submetidas ao fracionamento líquido-líquido, gerando as frações correspondentes Aq, BuOH, AcEt e CHCl₃, para AV-SBH; e Aq, BuOH, AcEt, para AG-SBA. A determinação dos compostos presentes nos extratos e/ou frações foi feita pelas técnicas de CCD, HPLC e ESI-MS. Os rendimentos destes extratos e suas frações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos aquoso, hidroalcoólico e das frações resultantes do particionamento líquido-líquido obtidos das folhas de *A. gratissima*.

Extrato/Fração (sigla)	Rendimento (%)
Sobrenadante etanólico do extrato hidroalcoólico (AG-SBH)	16,9
Fração aquosa do extrato hidroalcoólico (AG-SBH-Aq)	11,7
Fração butanólica do extrato hidroalcoólico (AG-SBH-BuOH)	1,8
Fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico (AG-SBH-AcEt)	1,1
Fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico (AG-SBH-CHCl ₃)	2,3
Sobrenadante etanólico do extrato aquoso (AG-SBA)	16,2

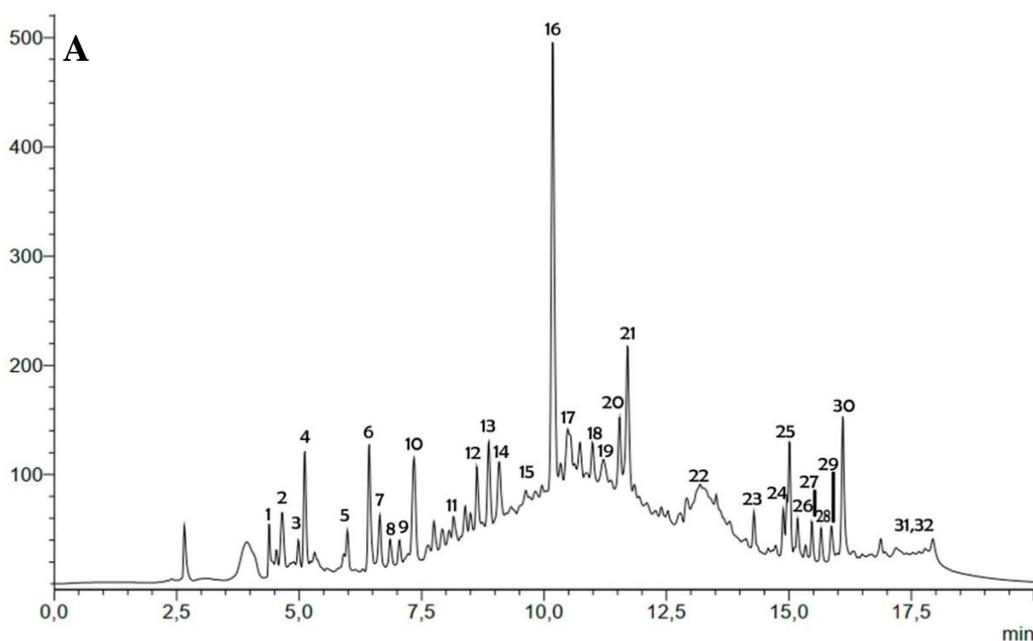
Fração aquosa do extrato aquoso (AG-SBA-Aq)	13,5
Fração butanólica do extrato aquoso (AG-SBA-BuOH)	1,8
Fração acetato de etílica do extrato aquoso (AG-SBA-AcEt)	0,9

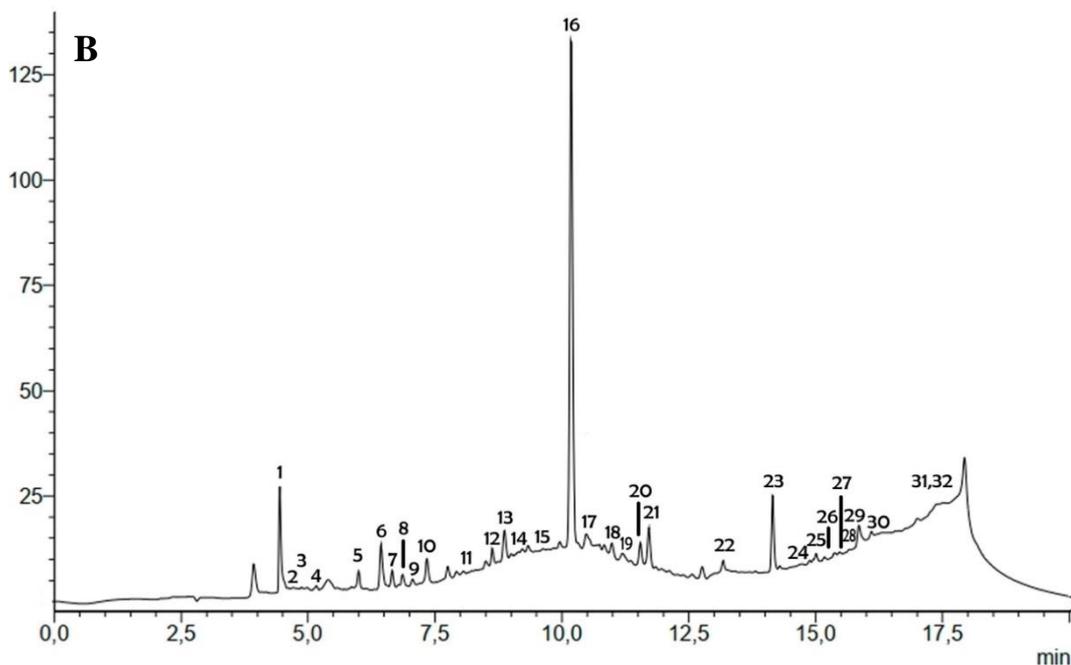
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.1. Identificação dos compostos por HPLC-DAD-ESI-MS

As frações solúveis em etanol AG-SBH e AG-SBA foram analisadas por HPLC-DAD-ESI-MS e mostraram-se bastante complexas, sendo qualitativamente semelhantes (Figura 2 A e B). Como esperado, ocorreu uma grande variação na polaridade dos compostos, variando desde os carboidratos até os terpenoides (Tabela 2, página 38). O tempo total de análise proposto para separação em HPLC foi menor que 18 minutos, utilizando-se o gradiente 1, descrito na sessão de metodologia, mas pode ser observado que alguns compostos ficaram muito próximos, não sendo totalmente separados, por exemplo, os picos **24** e **25** e **31** e **32**. Esta técnica permitiu a identificação 32 picos majoritários em AG-SBH e AG-SBA (Figura 2 A e B), selecionados por sua abundância relativa (área maior que 5000) ou por sua identificação por padrão comparativo.

Figura 2 - Cromatograma obtido por HPLC de (A) AG-SBH e (B) AG-SBA.

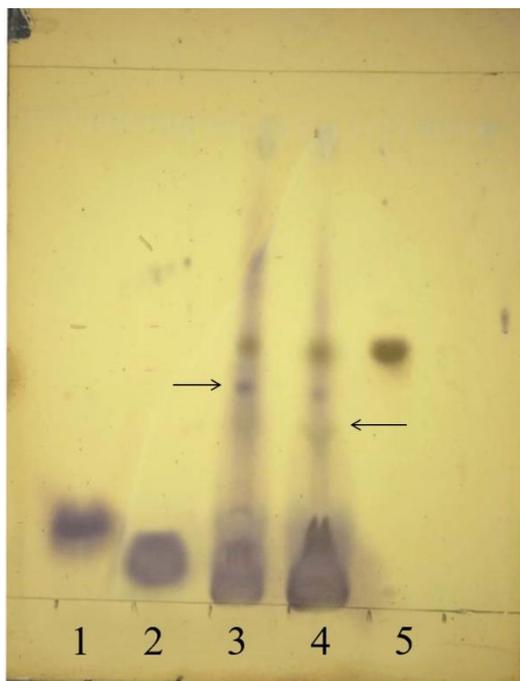




A análise de cromatografia em camada delgada (CCD) também foi aplicada nas frações AG-SBH e AG-SBA, a qual é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Esta técnica foi usada para detectar a presença do monossacarídeo glicose e do dissacarídeo sacarose, que geralmente aparecem em grande quantidade nas plantas superiores, e de flavonoides glicosilados, como a rutina, os quais também são abundantes entre os organismos vegetais. A detecção foi realizada utilizando-se o revelador orcinol- H_2SO_4 , específico para carboidratos, e verificou-se a presença de glicose (1) e sacarose (2) para ambos os extratos (AG-SBH e AG-SBA) (Figura 3).

Coincidentemente, o flavonoide padrão (rutina (5)), que foi utilizado na cromatografia, também foi identificado em grande quantidade para ambos os extratos. Este composto foi utilizado para encontrar bandas correspondentes a outros flavonoides, as quais apareceriam em tempos de retenção (Rt) semelhante a ela (Figura 3). Como pode-se observar, existem duas bandas (sinalizadas pelas flechas) com Rt similar ao da rutina, possivelmente correspondente a esta classe de compostos, além de uma banda, de coloração roxa, com Rt maior, mais evidente em AG-SBH, que pode indicar a presença de triterpenoides glicosilados, pois estes apresentaram comportamentos similares em condições parecidas às quais foram expostos em estudos anteriores (SOUZA, *et al.*, 2011; DARTORA, *et al.* 2011).

Figura 3 – Cromatografias em camada delgada: (1) glicose, (2) sacarose, (3) AG-SBH, (4) AG-SBA e (5) rutina.



Fonte: o autor.

5.1.2 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do AG-SBH e AG-SBA

Após o particionamento líquido-líquido de AG-SBH e AG-SBA, a menor complexidade das frações permitiu uma melhor identificação dos constituintes. A identificação dos picos foi baseada em seu tempo de retenção (Rt), espectro de UV e padrões de fragmentação de massa por comparação com dados da literatura (OLIVEIRA, 2015; VANDRESEN, *et al.*, 2010; ZENI *et al.*, 2013), além do uso de padrões químicos. Os compostos presentes em ambos os extratos estão identificados na Tabela 2 (página 38).

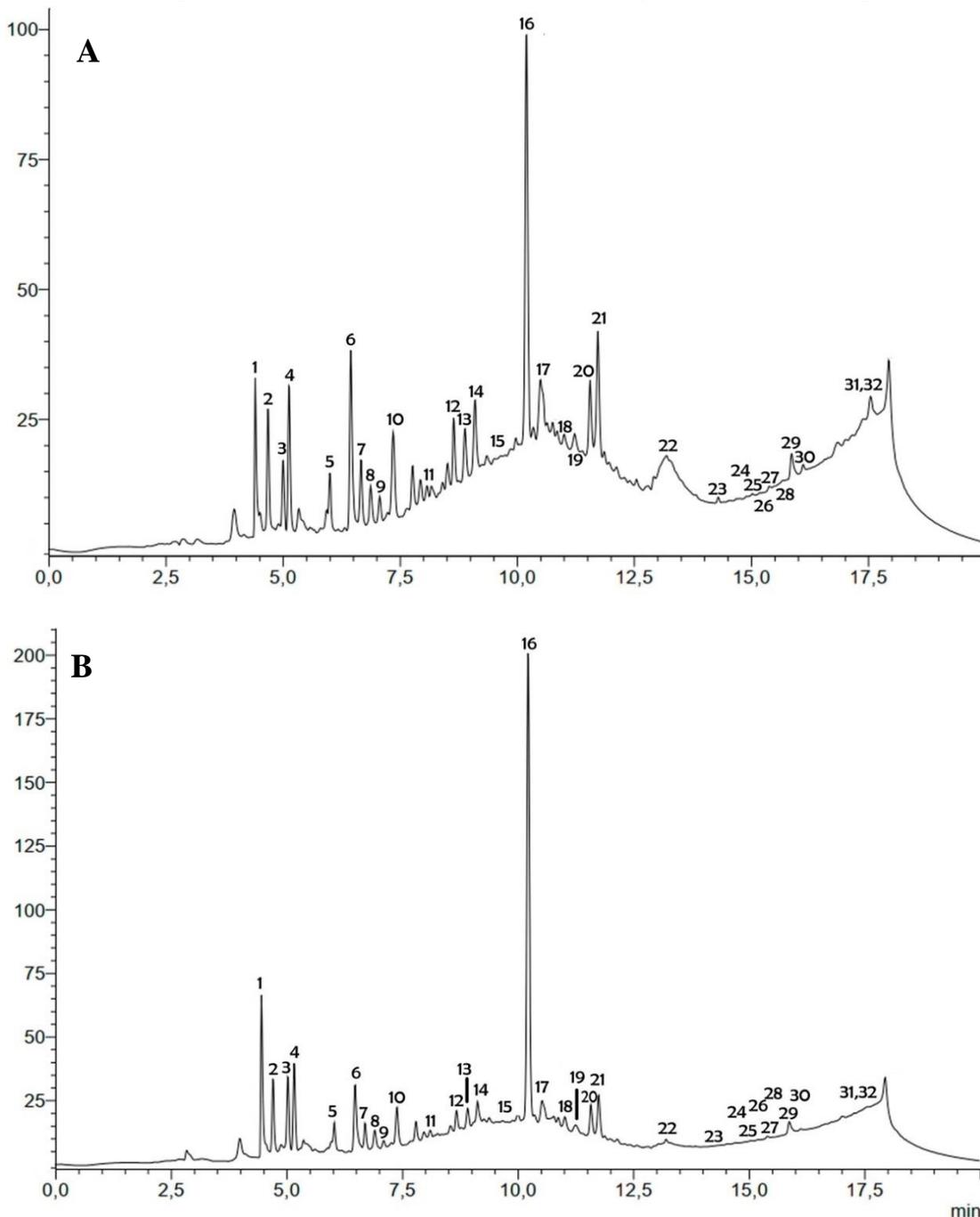
Além disso, antes do fracionamento AG-SBA apresentava praticamente um único pico majoritário (pico **16**), identificado como rutina, que por estar em grande concentração, dificultava a análise dos demais componentes presentes no extrato.

5.1.2.1 Frações aquosas: AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq

Dos 32 compostos observados em AG-SBH e AG-SBA, as frações AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq concentraram 18, entre os quais encontramos xantinas (picos **6** e **9**), compostos fenólicos (picos **11**, **12**, **17** e **18**), feniletanóides (picos **13** e **14**), flavonoides (picos **16**, **20** e **21**) e cauranos (pico **15**), os quais puderam ser identificados de acordo com suas massas, dados da literatura e com o uso de padrões (SILVA *et al.*, 2006; VANDRESEN *et al.*, 2010). Assim

como esperado, as frações aquosas retiveram os compostos mais polares, incluindo fenólicos e flavonoides glicosilados, os quais em cromatografia de fase reversa costumam ser os primeiros picos eluídos na coluna.

Figura 4 - Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AG-SBH-Aq e (B) AG-SBA-Aq.



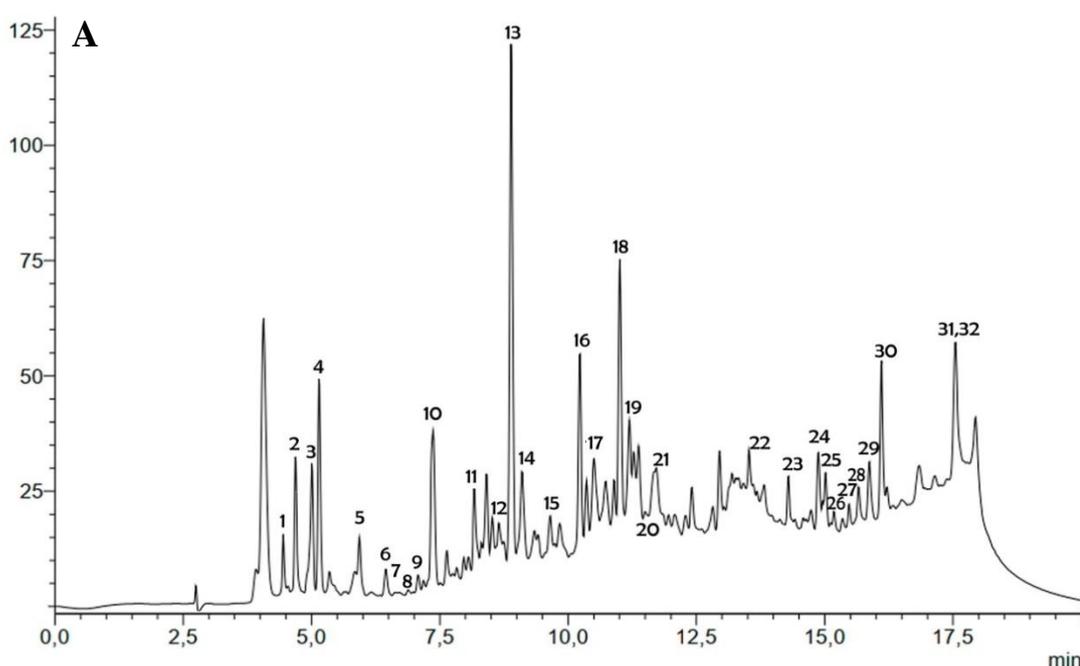
Pode-se observar que, embora sejam qualitativamente similares, as frações AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq, retém compostos majoritários diferentes e em quantidades diferentes, o que pode ser verificado ao analisar a abundância relativa dos picos, uma vez que ambas frações

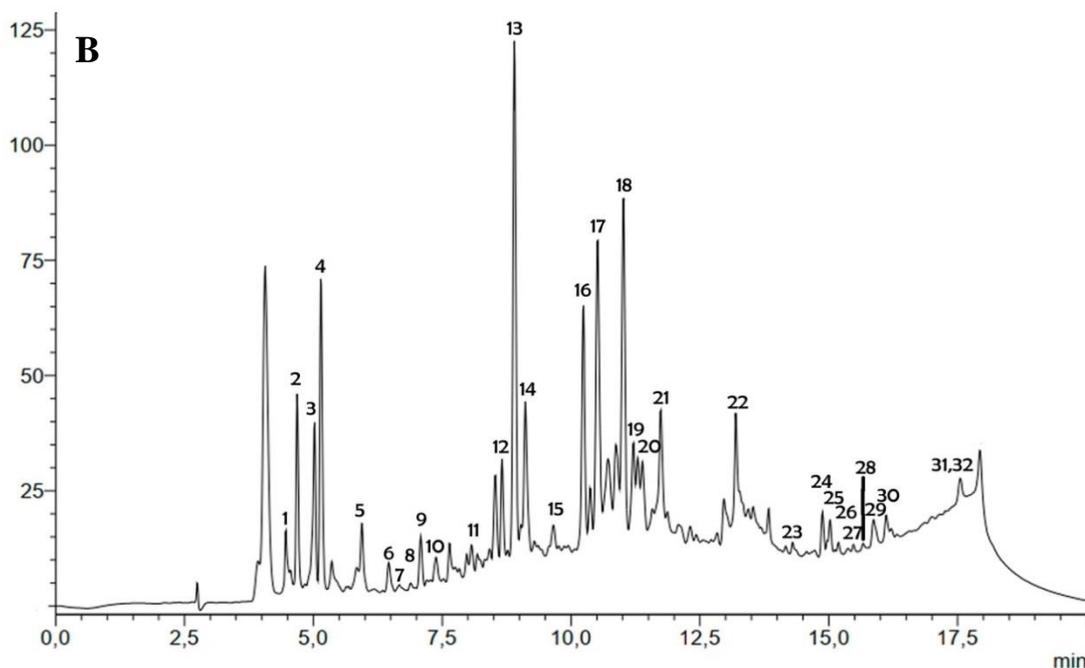
foram preparadas e injetadas no cromatógrafo nas mesmas condições. Assim, enquanto a fração AG-SBA-Aq retém como componentes majoritários a rutina (pico **16**) e o pico **1** (não identificado), a fração AG-SBH-Aq, retém outros além destes, como o pico **6** (teobromina), **10** (não identificado), **20** (não identificado) e **21** (5-hidróxi-7,4''-dimetoxiapigenina). Sendo assim, a fração AG-SBA-Aq pode ser considerada um boa fonte para o isolamento e estudos farmacológicos da rutina, para a qual já foram relatadas diversas propriedades biológicas, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral e principalmente antioxidante (OLIVEIRA, 2015), Também foram relatadas atividades anti-candida, antihiperlipidêmica, anticonvulsivante, atuando na supressão da imunidade celular, além de apresentar funções de relaxamentos de músculos lisos e melhorar a permeabilidade capilar, usada no tratamento de artrite (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

5.1.2.2 Frações butanólicas: AG-SBH-BuOH e AG-SBA-BuOH

As frações butanólicas AG-SBH-BuOH e AG-SBA-BuOH contém a maioria dos flavonoides glicosídeos e compostos fenólicos de *A. gratissima* (Figura 5 A e B). Estes compostos foram observados a λ 325 nm, confirmados por tandem-MS, dados da literatura ou uso de padrões (SILVA *et al.*, 2006; VANDRESEN *et al.*, 2010; ZENI *et al.* 2013).

Figura 5 - Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AG-SBH-BuOH e (B) AG-SBA-BuOH.

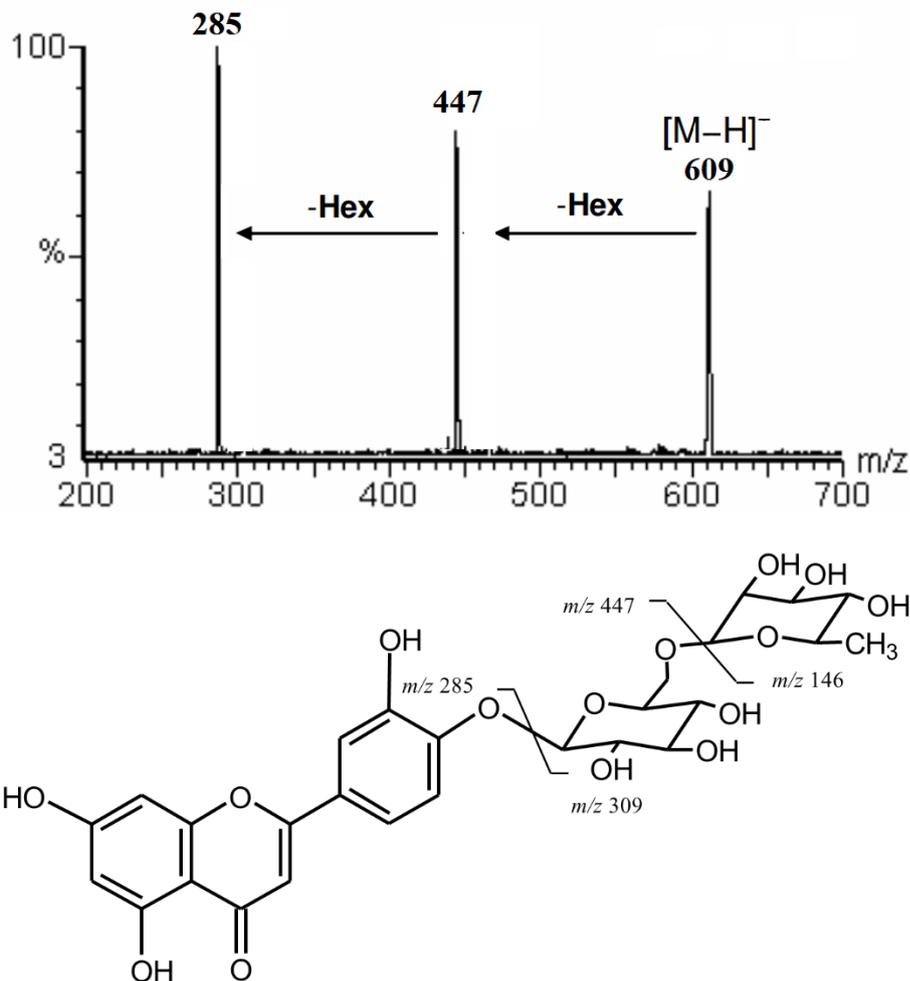




A fração AG-SBH-BuOH, derivada do extrato hidroalcoólico concentrou os picos **4** e **10** (não identificados), **13** (arenariosídeo), **16** (rutina), **18** (ácido ferúlico), **19** (campferol/luteolina diglicosídeo), além de outros em menor abundância. E a fração AG-SBA-BuOH reteve majoritariamente o ácido ferúlico, o arenariosídeo e outros picos em menor quantidade: **4** (não identificado), **14** (verbascosídeo), **16** (rutina), **17** (ácido *p*-cumárico), **21** (5-hidróxi-7,4''-dimetoxiapigenina) e **22** (luteolina). Arenariosídeo, rutina e ácido ferúlico já foram observados em alguns extratos obtidos de *A. gratíssima* (SILVA *et al.*, 2006; VANDRESEN *et al.*, 2010), inclusive para Zeni e colaboradores (2013), o ácido ferúlico foi o componente majoritário encontrado no extrato aquoso da planta, o qual exibiu potencial antioxidante.

O pico **19**, retido nestas frações foi pela primeira vez descrito em *A. gratíssima*, sendo identificado com campferol/luteolina diglicosídeo de acordo com sua massa e perfis de fragmentação em MS² (Figura 6). Assim, o espectro MS² produziu: m/z 609 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 447 (M - hexose) e 285 (447-hexose). Embora não se possa distinguir se estes flavonoides são derivados de campferol ou luteolina, acredita-se que a aglicona seja a luteolina, a qual já foi anteriormente identificada em *A. gratíssima*.

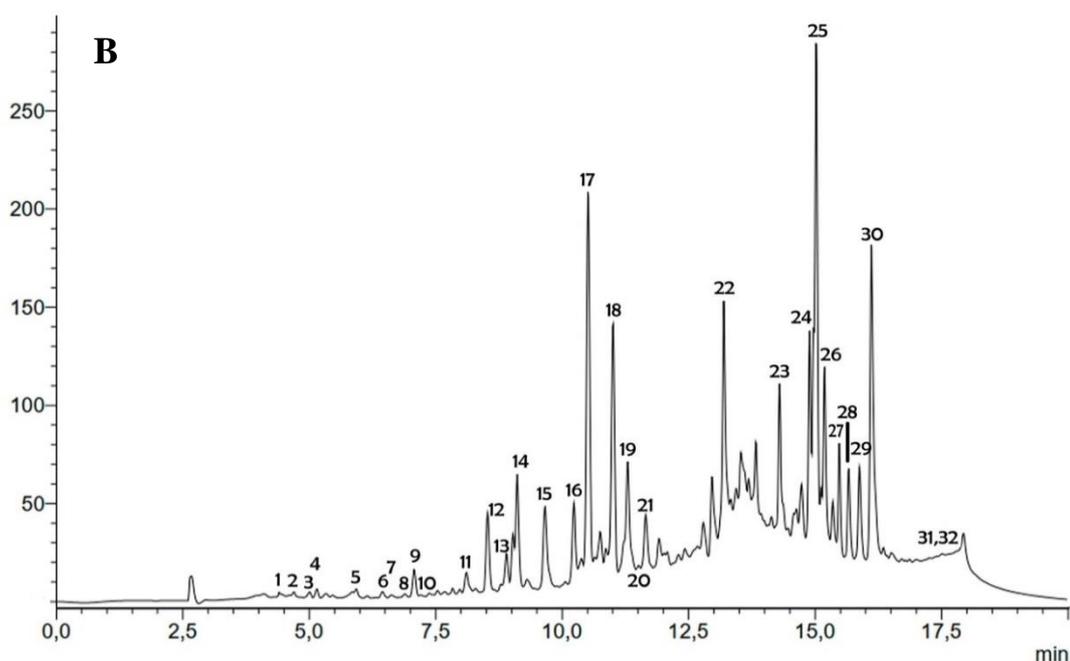
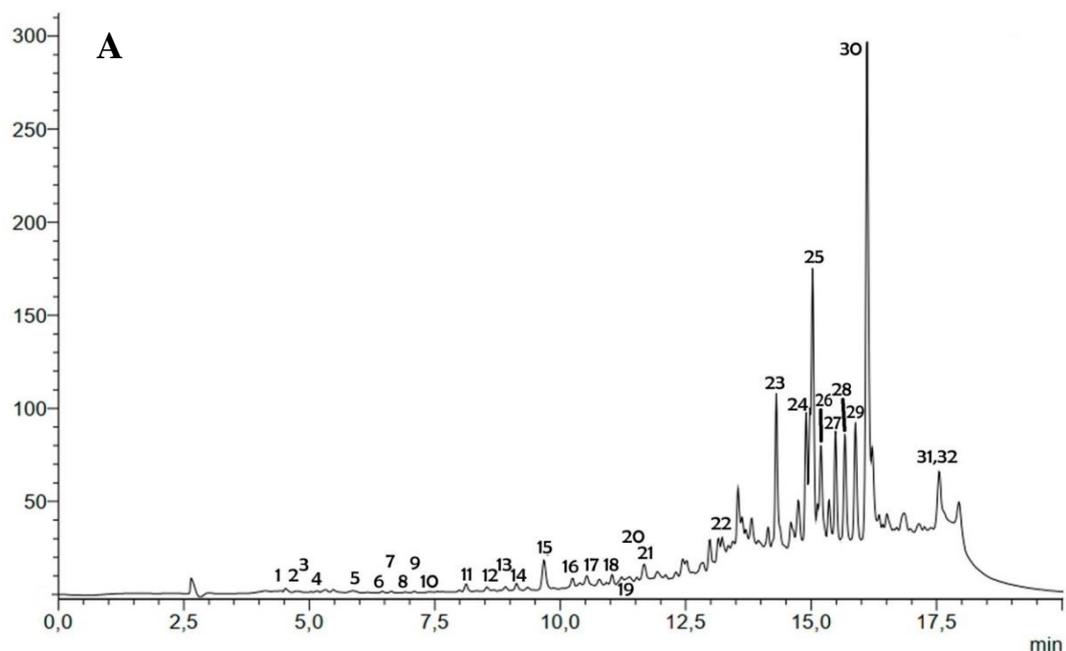
Figura 6 - Espectro de massa e possível estrutura química do novo flavonol glicosilado encontrados em *A. gratissima*: campferol/luteolina diglicosídeo.



5.1.2.3 Frações acetato de etila: AG-SBH-AcEt e AG-SBA-AcEt

Terpenos dos tipos sesquiterpenos, triterpenos e carotenoides foram encontrados nas frações AG-SBH-AcEt e AG-SBA-AcEt. AG-SBH-AcEt reteve os picos **23**, **24**, **25** e **30** principalmente, identificados como genkwanina, guaiol, bisabolol e betulina, respectivamente. AG-SBA-AcEt, por sua vez, concentrou os compostos relatos acima, além de alguns compostos fenólicos como ácido *p*-cumárico (pico **17**) e ácido ferúlico (pico **18**) e carotenoide zeaxantina (pico **28**) (Figura 7 A e B).

Figura 7 - Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AG-SBH-AcEt e (B) AG-SBA-AcEt.



Verifica-se ainda, que o componente majoritário da fração AG-SBH-AcEt é o triterpeno betulina (**pico 30**), enquanto que o da fração AG-SBA-AcEt é o sesquiterpeno bisabolol.

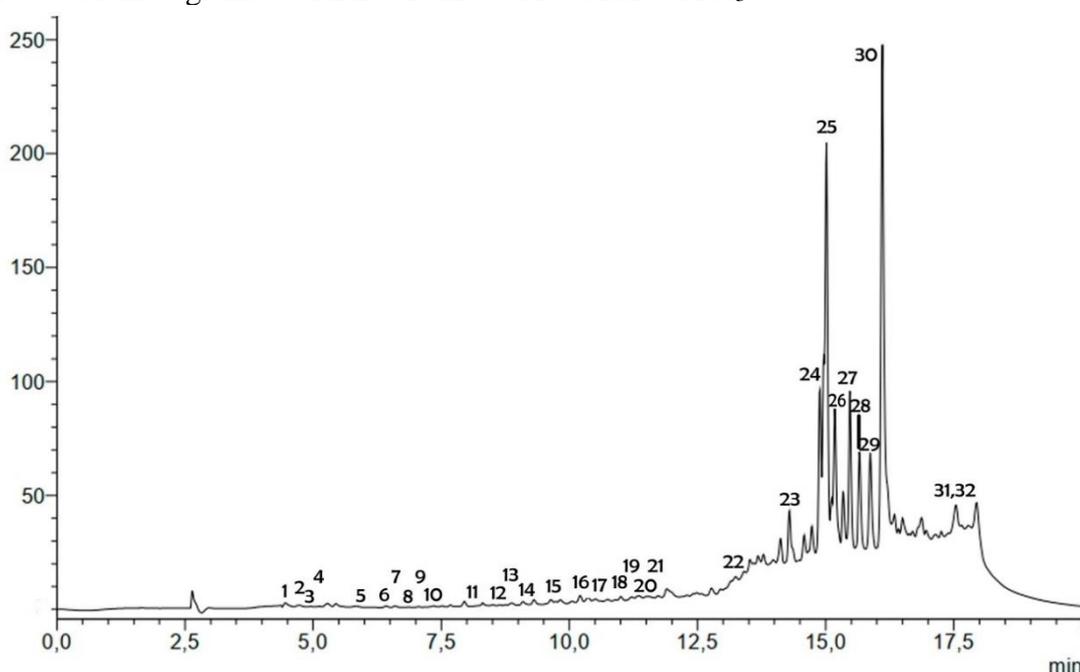
Além disso, sabe-se que em um fracionamento líquido-líquido geralmente a fração acetato de etila pode conter as saponinas. Estas não puderam ser detectadas via DAD, mas são observadas na CCD (Figura 3), como bandas coloridas acima do R_t da rutina, comportamento comum para saponinas ao utilizar esta fase móvel (EtOAc:H₂O:HOAc:HCOOH (9:2,3:1:1, v/v)) (SOUZA, *et al.*, 2011; DARTORA, *et al.*, 2011).

5.1.2.4 Fração clorofórmica AG-SBH-CHCl₃

A fração clorofórmica foi somente obtida para o extrato hidroalcoólico, uma vez que não espera-se extrair compostos apolares por meio de uma extração aquosa. Dessa forma, observa-se que a fração AG-SBH-CHCl₃ foi qualitativamente similar a fração AG-SBH-AcEt, concentrando os compostos terpenoides (Figura 8). Os componentes majoritários retidos na fração foram o bisabolol (**pico 25**) e a betulina (**pico 30**).

Nenhum lipídeo, os quais são comuns na fração clorofórmica, pode ser encontrado por esta análise, assim esta fração deve ser analisada por meio de HPLC-DAD-ESI-MS/MS, a qual momentaneamente não se tem disponível.

Figura 8 - Cromatograma de HPLC-DAD de AG-SBH- CHCl₃.



A Tabela 2 traz os compostos identificados nos extratos hidroalcoólico (AG-SBH) e aquoso (AG-SBA) de *A. gratissima*, por meio das análises de HPLC-ESI-MS, os quais foram melhor observados nas técnicas de análise após a realização do fracionamento líquido-líquido.

Tabela 2 - Identificação dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *A. gratissima* por HPLC-ESI-MS.

Picos	Tempo de retenção (Rt)	[M-H] ⁻ (m/z)	Composto	Identificação
1	4,400	-	n.i.	-
2	4,664	-	n.i.	-
3	4,988	-	n.i.	-
4	5,120	-	n.i.	-

5	6,019	-	n.i.	-
6	6,495	179	Teobromina	Padrão
7	6,648	-	n.i.	-
8	6,857	-	n.i.	-
9	7,225	179	Teofilina	Padrão
10	7,354	-	n.i.	-
11	8,207	353	Ácido clorogênico	Padrão
12	8,501	121	Ácido benzoico	Padrão
13	8,933	755	Arenariosídeo	Ref*
14	9,270	623	Verbascosídeo	Ref
15	9,663	319	Hofmaniacetona	Ref
16	10,176	609	Rutina	Padrão
17	10,539	163	Ácido <i>p</i> -cumárico	Padrão
18	11,016	193	Ácido ferúlico	Padrão
19	11,217	609	Campferol/luteolina diglicosídeo	MS ²
20	11,536	-	n.i.	-
21	11,705	301	5-hidróxi- 7,4”dimetoxiapigenina	Ref
22	13,511	285	Luteolina	Ref
23	14,279	283	Genkwanina	Ref
24	14,888	221	Guaiol	Ref
25	15,009	221	Bisabolol	Ref
26	15,187	219	Spathulenol	Ref
27	15,474	-	n.i.	-
28	15,663	567	Zeaxantina	Ref
29	15,858	467	Lupeol acetato	Padrão
30	16,132	441	Betulina	Padrão
31	17,785	455	Ácido ursólico	Padrão
32	17,785	455	Ácido oleanólico	Padrão

*SILVA *et al.*, 2006; VANDRESEN *et al.*, 2010; ZENI *et al.* 2013.

Dos 32 compostos observados nos extratos AG-SBH e AG-SBA, provenientes de folhas de *A. gratíssima*, 22 tiveram sua estrutura caracterizada neste trabalho. E embora, neste trabalho tenha-se encontrado apenas um composto inédito para a planta, até o momento, não foi encontrado nenhum outro trabalho da literatura científica que descrevesse a presença de tantos compostos em um único extrato. Silva e colaboradores, em 2006, descreveram a presença de 14 compostos no extrato das folhas, enquanto Vandresen *et al.* (2010) observaram a presença destes mesmos 14 componentes no extrato etanólico da planta. Zeni e colaboradores (2013), por sua vez, observaram a presença de outros 10 compostos no extrato aquoso desta espécie vegetal.

Além disso, para a caracterização dos compostos ainda não identificados, novas análises de HPLC-DAD-MS/MS estão sendo realizadas em parceria com pesquisadores do Instituto de Pesquisa Pequeno Príncipe, em Curitiba, no Paraná.

Há de se destacar ainda que, apesar dos mesmos componentes serem detectados nos extratos hidroalcoólico e aquoso, ou seja, os 32 compostos aparecerem em ambos os extratos, verifica-se que a extração hidroalcoólica concentra grande quantidade de rutina (pico **16**) e uma menor concentração de outros componentes, teobromina (pico **6**), 5-hidróxi-7,4”dimetoxiapigenina (pico **21**), bisabolol (pico **25**) e betulina (pico **30**) (Figura 2 A), que posteriormente ficam retidos em frações diferentes. A extração aquosa concentra somente rutina (pico **16**) e de genkwanina (pico **23**) (Figura 2 B), que posteriormente ficam retidas na fração AG-SBA-Aq e AG-SBA-AcEt, respectivamente. Este comportamento pode facilitar o isolamento destes componentes a partir das frações que os concentram, para posteriormente serem testados quanto à suas atividades farmacológicas.

Observa-se ainda que os compostos ácido ursólico e oleanólico, que coeluíram (picos **31** e **32**) que já foram relatados em extratos de *A. gratissima* (SILVA, *et al.* 2006), aparecem em pouca quantidade nos extratos AG-SBH e AG-SBA, mas posteriormente são visualizados na fração butanólica, de ambos os extratos, mas principalmente na fração proveniente da extração hidroalcoólica.

5.1.3 Otimização da análise de HPLC-DAD para a quantificação de compostos em extratos de *A. gratissima*.

Vários compostos bioativos foram identificados por meio das análises de HPLC-DAD-MS e alguns deles puderam ser quantificados utilizando padrões: ácido benzoico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumarico, betulina, luteolina, lupeol acetato, teobromina, teofilina e rutina.

HPLC-DAD foi otimizado utilizando o sistema de gradiente 2 (descrito na metodologia), para a quantificação desses compostos e uma boa separação e resolução dos picos foi possível em 18 min de corrida. A detecção pelo DAD foi otimizada para cada um dos padrões, em 270 nm, para teobromina e teofilina e em 325 nm para os demais compostos (Tabela 3). A concentração dos compostos foi calculada por padronização externa, utilizando-se suas respectivas curvas padrões: ácido benzoico ($y=4844,19x+1315,33$, $R^2=0,9995628$); ácido clorogênico ($y=1867,85x+641,781$, $R^2=0,9998422$); ácido ferúlico ($y=2594,83x-499,31$, $R^2=0,9998293$); ácido *p*-cumárico ($y=1694,12x+124,260$, $R^2=0,9998612$); betulina

($y=6542,18x+4803,89$, $R^2=0,9861109$); luteolina ($y=1149,47x+159,998$, $R^2=0,9998639$); lupeol acetato ($y=1944,12x+241,88$, $R^2=0,9993241$); morina ($y=$, $R^2=$); teobromina ($y=4625,03x+2510,97$, $R^2=0,9995414$); teofilina ($y=2703,42x-254,31$, $R^2=0,9998322$) e rutina ($y=2660,86x-4407,47$, $R^2=0,9991222$).

Tabela 3 – Concentração de metabólitos secundários presentes em folhas de *A. gratissima*.

Metabólito secundário	AG-SBH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco)	AG-SBA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco)
Ácido benzoico	1 \pm 0,014	0,12 \pm 0014
Ácido clorogênico	3,59 \pm 0,042	-
Ácido ferúlico	4,61 \pm 0	0,87 \pm 0
Ácido <i>p</i> -cumárico	15,2 \pm 0,820	2,08 \pm 0,085
Betulina	1,26 \pm 0,021	0,0329 \pm 0,045
Luteolina	2,65 \pm 0,141	-
Lupeol acetato	5,26 \pm 0,021	1,93 \pm 0,014
Teobromina	9,21 \pm 0,198	1,47 \pm 0,042
Teofilina	2,73 \pm 0,032	2,05 \pm 2,336
Rutina	61,1 \pm 0,269	35,51 \pm 0,191

Pesquisas anteriores, mostram que a composição da *Aloysia gratissima* pode distinguir quantitativamente de forma significativa quando comparados os resultados obtidos em diferentes estações do ano, Zeni e colaboradores (2013) destaca que o maior rendimento de extrato aquoso ocorreu no outono, e o menor rendimento ocorreu no verão. Isto se dá porque os metabólitos secundários atuam diretamente na capacidade de adaptação da planta, ficando a sua produção dependente das necessidades da planta, que podem variar conforme as condições às quais esta exposto o vegetal, bem como temperatura, humidade, tipo de solo ou nível de insolação, por exemplo (LEITE, 2009).

Neste trabalho, encontrou-se a rutina como composto majoritário (61 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco no AG-SBH e 35,51 $\mu\text{g}/\text{mg}$ no AG-SBA), o que diferiu das demais pesquisas encontradas para a planta. Zeni *et al.* (2013) não encontrou rutina em suas análises e o componente

majoritário encontrado foi o ácido ferúlico (11,57-86,40 mg 100 g⁻¹), que, por sua vez, foi o 5º composto mais abundante nos extratos obtidos nesta pesquisa (4,61 µg/mg em AG-SBH e 0,87 µg/mg em AG-SBA).

Apesar da maioria dos compostos encontrados nesta pesquisa serem compatíveis com a literatura (SILVA *et al*, 2006; ZENI *et al*, 2013), encontrou-se um flavonoide inédito para esta planta, o campferol/luteolina diglicosídeo, cujo atualmente não conseguimos identificar ainda se a glicona que o forma é a de campferol ou de luteolina, porém como se encontrou a última neste estudo, e na literatura, acredita-se que se trate de uma luteolina diglicosídeo. A luteolina é conhecida por seu poder antioxidante, livrando assim tecidos de radicais livres, poder quimioprotetor e anti-inflamatório (RAMÍREZ *et al*, 2015).

O composto encontrado em maior quantidade no presente estudo, a rutina, é um flavonoide formado por um dissacarídeo e que pertence à subclasse dos flavonóis, relativamente comum na natureza, podendo ser encontrada numa grande quantidade de vegetais, como cebola, tomate, maçã, uvas, e em bebidas como o chá-preto e vinho (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Atualmente, a rutina é matéria para muitos estudos fitoquímicos, pois é sabida a capacidade antioxidante dos flavonoides em geral, porém estudos avaliando a sua atividade inibitória de acetilcolinesterase, diminuindo assim os danos oxidativos nas membranas, reversão de danos de memória e efeitos ansiogênico provocados por ingestão de cádmio, mostram que ela pode atuar sobre a neurotransmissão colinérgica, ou seja, auxiliar numa melhora cognitiva (FIORENZA, 2011). Propriedades antialérgicas, antitumorais, anti-inflamatórias, antiplaquetárias, antiespasmódico, antivirais, antiúlcera, antidiarreico, vasodilatadoras, citoprotetora, antihipertensivas, antimutagênicas e de proteção contra o estresse nitrosativo e lesão hepatocelular também já foram descritas anteriormente para a rutina (OLIVEIRA, 2015).

As propriedades listadas acima, demonstram o grande potencial farmacológico da rutina, e, conseqüentemente, a importância de buscar vegetais abundantes em sua concentração. Verifica-se então que *A. gratíssima* tem potencial para ser uma boa fonte e extração e isolamento deste metabólito, que posteriormente pode ser testado farmacologicamente.

6. CONCLUSÕES

Depois de feitas as devidas análises nos extratos obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- Os extratos aquoso e hidroalcoólico diferiram entre si quantitativamente, sendo que todos os compostos aparecerem em maior quantidade no extrato hidroalcoólico (AG-SBH). Sendo assim, a extração por meio de álcool 70% mostrou-se mais eficiente na extração de metabólitos quando comparada com a utilizando água destilada.

-Um total de 32 compostos foram encontrados em AG-SBH e AG-SBA, sendo que destes 22 foram identificados: teobromina, ácido clorogênico, ácido benzoico, arenariosídeo, verbascosídeo, hofmaniacetona, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, campferol/luteolina diglicosídeo, 5-hidróxi-7,4''dimetoxiapigenina, luteolina, genkwanina, guaiol, bisabolol, spathulenol, zeaxantina, lupeol acetato, betulina, ácido ursólico e ácido oleanólico.

- As frações proeminentes do particionamento líquido-líquido com acetato de etila retiveram principalmente genkwanina, guaiol, bisabolol, betulina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e carotenoide zeaxantina, sendo que estes três últimos foram concentrados apenas no AG-SBA. Nas frações butanólicas, os compostos que se destacaram foram o arenariosídeo, a rutina, o ácido ferúlico e o composto **4**, que não foi identificado. Porém na fração AG-SBA-BuOH destacaram-se também o verbascosídeo, o ácido *p*-cumárico, a 5-hidróxi-7,4''-dimetoxiapigenina e a luteolina. Já na fração AG-SBH-BuOH reteve, além dos descritos acima, o campferol/luteolina diglicosídeo, composto ainda não descrito para a planta. As frações AG-SBH-Aq e AG-SBA-Aq concentraram a maior parte dos compostos extraídos (18 dos 32), entre os quais encontramos xantinas (picos **6** e **9**), compostos fenólicos (picos **11**, **12**, **17** e **18**), feniletanóides (picos **13** e **14**), flavonoides (picos **16**, **20** e **21**) e cauranos (pico **15**). Já fração AG-SBH-CHCl₃ foi qualitativamente similar a fração AG-SBH-AcEt, por reter os compostos mais apolares, sendo principalmente os terpenoides bisabolol e betulina.

- Quantificou-se o flavonóide rutina como sendo o composto majoritário para a planta, possuindo cerca de 61,1 µg/mg de peso seco, composto este que pode estar atrelado a muitas das atividades medicinais atribuídas à *Aloysia gratissima*, principalmente a antioxidante e neuroprotetora; seguido pelo fenólico ácido *p*-cumárico, com 15,2 µg/mg e pelo alcalóide teobromina, com 9,21 µg/mg. Esta quantificação se refere ao extrato AG-SBH, onde no AG-SBA a ordem de concentração foi a mesma, porém os valores encontrados foram consideravelmente menores.

REFERÊNCIAS

BAILAC, Pedro .N. *et al.* **Composition of the essential oil of *Aloysia gratissima* from San Luiz, Argentina.** *Anales de La Asociacion Quimica Argentina*, v. 87, p. 149-153, 1999.

BARRETO, F. *et al.* Antibacterial Activity of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* Brig Extracts from Cariri-Ceará, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 1, p. 42-4, 2010.

BARROS, Francisco. M. C. *et al.* Plantas de Uso Medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-662, 2007.

BECHO, Juliana Raso Marques; MACHADO, Hussien; GUERRA, Martha de Oliveira. Rutina – Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009.

BENOVIT, Simone Cristina. **Composição e Atividade Sedativa e Anestésica do Óleo Essencial de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae) em Jundiás (*Rhamdia quelen*).** Orientadora: Berta Maria Heinzmann. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

BRAGA, Fernão Castro. Pesquisa Fitoquímica. *In*: LEITE, João Paulo Viana (editor). **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas.** Editora Atheneu, 2009. cap. 4, p. 99-118.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Casa Civil, Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em: 06 de fev. 2019.

BRESOLIN, Tania Mari Bellé; CECHINEL FILHO, Valdir. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos.** Itajaí: UNIVALI, 2003.

CÁCERES, Armando *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 31– 38, 1993.

CORRÊA, Manuel Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v.1, p. 64-65, 1978.

COSTA, Larissa Corrêa Bomfim *et al.* Levantamento preliminar das espécies vegetais com potencial econômico no Parque Municipal da Boa Esperança Ilhes, Bahia, Brasil. **Acta Farmcêutica Bonaerense**, v. 25, n.2, p. 184- 191, 2006.

CRESPAM, Priscila Ceribola. **Estudos na família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil.** Orientadora: Lilian Auler Mentz. 2010. 115 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, 2010.

- DARTORA, Nessana *et al.* UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453-1461, 2011.
- DELAPORTE, Rosemeres Horwat *et al.* Estudo mineral das espécies vegetais de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 2, p. 133- 136, 2005.
- FIORAVANTI, Carlos. A maior diversidade de plantas do mundo. **Revista Pesquisa FAPESP**. Edição 241, 2016. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/03/042-047_Botanica_241.pdf. Acesso em: 02 mai. 2019.
- FIORENZA, Amada Maino. **Efeitos da rotina sobre a atividade da acetilcolinesterase e sobre o comportamento em ratos expostos ao cádmio**. 2011. p. 94. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 25 abr. 2019.
- FRANCO, Ana L.P. *et al.* Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafão). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 4, n. 2, 2007.
- GARLET, T.M.B.; IRGANG, B.E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 9-18, 2001.
- GOLENIOWSKI, Marta Ester G.A *et al.* Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones” Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341, 2006.
- GOTTLIEB, Otto Richard; BORIN, Maria Renata de M. B. Quimiosistemática como Ferramenta na Busca de Substâncias ativas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap.5, p. 91-105.
- GUERRA, Miguel Pedro; NODARI. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 1, p. 13-28.
- HEINZMANN, Berta Maria; BARROS, Francisco Maikon Correa de. **Potencial das Plantas Nativas Brasileiras para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos Tendo como Exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Saúde, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.
- LAPA, Antonio José *et al.* Farmacologia e Toxicologia de Produtos Vegetais. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 11, p. 247-262.

- LEITE, João Paulo Viana. Química dos Produtos Naturais: Uma abordagem Biosintética. *In:* LEITE, João Paulo Viana (editor). **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Editora Atheneu, 2009. cap.3, p. 47-97.
- MARTÍNEZ, Gustavo. J. Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de lapitel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba (Republica Argentina). **Dominguezia**, v. 24, n. 1, 2008.
- MARTINS, Ernane Ronie; FIGUEIREDO, Lourdes Silva de. Cultivo de Plantas Mediciniais. *In:* LEITE, João Paulo Viana (editor). **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Editora Atheneu, 2009. cap. 6, p. 143-167.
- MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, A. M.; MALES, Z. Application of TLC in the Isolation and Analysis of Flavonoids. *In:* WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phitochemistry. US: CRC Press, 2008. v.99, p. 405-423
- MENTZ, Lilian Auler; BORDIGNON, Sérgio Augusto de Loreto. Nomenclatura Botânica, Classificação e Identificação de plantas Mediciniais. *In:* SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 9, p. 211-227.
- NEVES, Ilzena. A. *et. al.* **Composição química do óleo essencial de duas espécies de Lantana de Matas Serranas de Permanbuco**. *In:*. 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2007.
- OLIVEIRA, George Laylson da Silva. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 36. n 3. p. 461-466, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales**. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS. 2002. Disponível em:
file:///C:/Users/G%C3%AAAnifer/Google%20Drive/UFRGS/Pesquisa/poromocion%20do%20uso%20racional%20de%20medicamentos.%20OMS.pdf. Acesso em: 29 de jan. 2019.
- PINTO, José. Eduardo. B. P. *et al.* Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.
- POSER, Gislane Lino von; MENTZ, Lilian Auler. Diversidade Biológica e sistemas de Classificação. *In:* SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 4, p.75-90.
- RAMÍREZ, Homero *et al.* La prohexadiona-Ca provoca cambios en el crecimiento vegetativo, giberelinas, rendimiento y luteolina en chile jalapeño. **Ecosistemas y recursos agropecuarios**. v.2. n. 4. Villahermosa, 2015.

REIS, Maurício Sedrez dos; MARIOT, Alexandre; STEENBOCK, Walter. Diversidade e Domesticação de Plantas Medicinais. *In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. (org). Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 3, p. 47-74.

RIBEIRO, Andréia Queiroz; MOURA, Cristiano Soares de. Informações sobre Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Contexto da Farmacoterapia. *In: LEITE, João Paulo Viana (editor). Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas*. Editora Atheneu, 2009. cap. 10, p. 279-309.

RICCIARDI, Gabriela Ana Leticia *et al.* **Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina.** *Flavour and Fragrance Journal*; 21. p. 698–703. 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ffj.1690>. Acesso em: 04 fev. 2019.

RITTER, M. R. *et al.* Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 52-62, 2002.

ROSA, Shirley G.T.da; FERREIRA, Alfredo Gui. **Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas.** *Acta Botanica Brasilica*, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2001.

ROSAS-ROMERO, Alfredo., SAAVEDRA, Glória.. Screening Bolivian plants for antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 79-86, 2005.

SANTOS, Fúlvia Maria. **Aspectos ecofisiológicos de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso [Verbenaceae] associados à composição do óleo essencial e sua ação antimicrobiana.** Orientador: Amauri Alves de Alvarenga. 2007. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SANTOS, Rosana Isabel dos. Metabolismo Básico e Orige dos Metabólitos Secundários. *In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. (org). Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 16, p. 403-434.

SANTOS, Thalita G. *et al* Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, p. 125-130, 2015.

SARTORATTO, Adilson. **Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por micro-extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/ CG).** Orientador: Fabio Augusto. 2001. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) — Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, Cleuza C da *et al.* Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34. p. 593–595, 2006.

SOUZA, Ana Paula Gestoso de; WIEST, José Maria. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

SOUZA, L. M. *et al.* Comprehensive analysis of Maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307-7315, 2011. (Doc. 57).

STEFANINI, Mirian Baptista; RODRIGUES, Selma Dzimidas; MING, Lin Chau. Ação de fotirreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**. v. 20. n. 1. p. 18-23, 2002.

STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Criado em 2012. Versão 14. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 22 de out. 2019.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. *Methods in Enzymology*, v. 35, p. 396-425, 1975

TAGLIATI, Carlos Alberto; FÉRES, Cássia Aparecida de Oliveira. Pesquisas Toxicológicas e Farmacológicas. *In*: LEITE, João Paulo Viana (editor). **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Editora Atheneu, 2009. cap. 5, p. 119-140.

VANDRESEN, Fábio *et al.* Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e anti-dematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers. Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 317-321, 2010.

VERDRUSCOLO, Giovana Secretti; MENTZ, Lilian Auler. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 61, p. 83-103, 2011.

VITTO, L. A.; PETANATTI, E. M.; PETANATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. **Multequina**. v. 6. p. 49-66, 1997.

VIZZOTTO, Márcia; KROLOW, Ana Cristina; WEBER, Gisele Eva Bruch. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado. doc. 316, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>. Acesso em 09 de dez. 2019.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika.; SHERMA, Joseph.; KOWALSKA, Teresa. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. v. 99. Chromatographic Science Series, 2008.

YUNES, Rosendo A.; PEDROSA, Rozangela Curi; CECHINEL-FILHO, Valdir. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, A. A.; NUÑES, M. B. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. **Molecules**, v. 23, p. 544, 2018.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello. **Estudo fitoquímico, toxicológico e dos efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Troncoso (erva santa)**. 2011. p. 237. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello *et al.*. Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). **Quím. Nova.** v. 36. n.1. p. 69-73, 2013.