



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS CERRO LARGO

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

MANOELA FERNANDA SCHUSTER

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
ALOYSIA VIRGATA (RUÍZ & PAVÓN) JUSS**

CERRO LARGO

2019

MANOELA FERNANDA SCHUSTER

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
ALOYSIA VIRGATA (RUÍZ & PAVÓN) JUSS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas – Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador (a): Prof^{ta} Dr^a Nessana Dartora

CERRO LARGO

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Schuster, Manoela Fernanda
Extração e Caracterização de Metabólitos Secundários
de *Aloysia virgata* (Ruíz & Pavón) Juss. / Manoela
Fernanda Schuster. -- 2019.
41 f.:il.

Orientador: 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. Lixeira. . 2. Fitoterápico. . 3. Metabolismo
vegetal.. 4. 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 Hauptenthal, 1580, São Pedro, Cerro Largo-RS, CEP 97900-000, 55 3359-3981
cienciasbiologicas.cl@uffs.edu.br, www.uffs.edu.br

MANOELA FERNANDA SCHUSTER

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *ALOYSIA VIRGATA* (RUÍZ E PAVÓN) JUSS

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

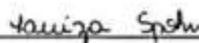
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Nessana Dartora - UFFS



Prof.ª Dra. Lauren Lúcia Zamin - UFFS



Me. Luíza Spohr - UFPEL

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a minha família, em especial a minha mãe, Rosa Maria, que nunca mediu esforços em me apoiar mesmo tendo que se dedicar exclusivamente ao meu pai por um ano e quatro meses enquanto permaneceu acamado. Nunca terei palavras para expressar o quão grandiosa e admirável tu és.

Ao meu pai, José Felipe (*in memoriam*), que durante minha infância sempre me tratou da melhor forma possível, me incentivando a ser uma pessoa melhor do que ele já foi, mesmo tendo perdido parte da vida pelo caminho, tenho certeza que sempre me guiará e apoiará durante toda a minha vida, donde estiver. Te terei como herói para sempre!

Aos meus irmãos, Márcio, César e Luciane, pelas vezes que demonstraram palavras de apoio e incentivo e por cuidarem da caçula da família.

As minhas amadas sobrinhas, Eduarda, Carolina, Alexandra, Mayla e Mariana, por trazerem a leveza do que é ser criança e me mostrarem que a vida pode ser levada sempre de forma mais plena.

Ao meu namorado, Adolfo, que nos últimos dois anos em que compartilhamos momentos, nunca mediu palavras de conforto, abraços de consolação e ajuda quando precisei, sei que muitas vezes o estresse me levou ao limite, te agradeço por me trazer de volta.

A minha orientadora e futura co-orientadora de mestrado, Dr^a Nessana Dartora, que durante esse ano não mediu esforços e paciência em auxiliar em todos os processos que levaram a construção desta pesquisa. Admiro imensamente a mulher forte e batalhadora que pude conhecer, obrigada por tudo!

A minha banca, Me. Luiza Spohr, que tenho o prazer de convidar para a avaliação de meu trabalho, já tendo a conhecido durante seu estágio no ensino médio, durante sua graduação. É bom revê-la e saber que seremos colegas de área! A minha futura orientadora de mestrado, Dr^a Lauren Zamin, a qual tive oportunidade de ser aluna durante a graduação e, no último ano, aprender sobre suas pesquisas no campo da Bioquímica. Tenho certeza que teremos uma grande parceria nos próximos dois anos.

Aos meus fiéis e insubstituíveis amigos que conheci durante a graduação e pude criar um vínculo que espero levar para a vida: Caroline, Daniele, Jéfferson e, em especial, a minha colega de pesquisa, laboratório e de vida, Gênisfer. Lhe agradeço por todas as horas dentro do lab 109, todas as escritas compartilhadas, risadas e quase surtos!

Por fim, mas essencial, agradeço imensamente a Universidade Federal da Fronteira Sul, que me proporcionou essa graduação, em minha cidade, Cerro Largo, oportunizando uma

faculdade na porta de minha casa. Agradeço toda a estrutura, professores, técnicos, terceirizados, aos programas que participei, que de uma ou outra forma auxiliaram em minha formação, tanto profissional, quanto pessoal. Fico feliz em pensar o quanto cresci como profissional e que terei a UFFS como segunda casa por mais dois anos em um mestrado.

Obrigada aos que não citei, mas que em algum momento me incentivaram, expressaram palavras de conforto, amizade e carinho. Meu muito obrigada!

RESUMO

Ao longo da história da humanidade, plantas com poder medicinal passaram a ser utilizadas para curar doenças e ferimentos, e, para a comprovação destas atividades, cresceram os estudos referentes a esses métodos de cura de doenças por meio natural. Dentre as famílias botânicas tradicionalmente com exemplares medicinais ou com potencial medicinal, destaca-se Verbenaceae, família com espécies amplamente utilizadas pela medicina popular e que apresenta ainda poucos estudos relacionados à sua composição química. Neste contexto insere-se a espécie *Aloysia virgata*, popularmente conhecida como lixeira, é muito difundida popularmente na América do Sul para tratar sintomas de doenças relacionadas principalmente ao sistema digestório. Apesar de ser bastante consumida pela população em geral, a maioria dos estudos referentes a essa planta são voltados ao seu óleo essencial e são escassos os trabalhos científicos que relacionam os compostos químicos de metabolismo secundário responsáveis por suas atividades biológicas. Sendo assim, neste trabalho as folhas de *A. virgata* foram submetidas à extração com água destilada, simulando o chá popularmente consumido, e hidroalcoólica, com o intuito de isolar e a identificar estruturalmente os principais constituintes químicos presentes em suas folhas em diferentes formas de extração. Com a finalidade de separar compostos de alta massa molecular daqueles de baixa massa, os extratos brutos foram precipitados com álcool etílico refrigerado, resultado em frações solúveis em etanol, contendo os metabólitos secundários, denominadas AV-SBH para o extrato hidroalcoólico e AV-SBA para o extrato aquoso. Os extratos aquosos e hidroalcoólicos apresentaram composição química semelhante, mas abundância de compostos diferentes. AV-SBH apresentou como pico majoritário a hoffmaniacetona, sendo identificado pela primeira vez como composto em maior quantidade para *A. virgata*, e, AV-SBA, apresentou campferol/luteolina diglicosídeo em maior concentração, composto este, descrito pela primeira vez na planta. Além disso, outro composto inédito também foi encontrado em ambos os extratos, o campferol/luteolina triglicosídeo. Alguns metabólitos presentes nos extratos puderam ser quantificados por padronização externa. Destes, os majoritários foram o ácido *p*-cumarico e rutina. Verificou-se durante esta pesquisa que foram encontrados diversos componentes que já tiveram suas atividades biológicas descritas e comprovadas, contudo, alguns compostos majoritários descritos aqui, não haviam sido relatados anteriormente para *A. virgata*. Estes compostos podem ser futuramente isolados e testados quanto às suas atividades biológicas.

Palavras-chave: Lixeira. Fitoterápico. Metabolismo vegetal. Verbenaceae.

ABSTRACT

Throughout the history of mankind, plants with medicinal power have been used to cure diseases and wounds, and to prove these activities, studies on these methods of natural healing of diseases have grown. Among the botanical families traditionally with medicinal specimens or with medicinal potential, stands out Verbenaceae, family with species widely used by folk medicine and which still has few studies related to its chemical composition. In this context, the species *Aloysia virgata*, popularly known as trash, is very popular in South America to treat symptoms of diseases related mainly to the digestive system. Despite being widely consumed by the general population, most studies concerning this plant are focused on its essential oil and there is little scientific work relating the secondary metabolism chemicals responsible for its biological activities. Thus, in this work the leaves of *A. virgata* were submitted to extraction with distilled water, simulating the popularly consumed tea, and hydroalcoholic, in order to isolate and structurally identify the main chemical constituents present in its leaves in different forms of extraction. In order to separate high molecular weight compounds from low mass compounds, the crude extracts were precipitated with refrigerated ethyl alcohol, resulting in ethanol-soluble fractions containing secondary metabolites, called AV-SBH for hydroalcoholic extract and AV-SBA for the aqueous extract. The aqueous and hydroalcoholic extracts presented similar chemical composition, but abundance of different compounds. AV-SBH presented the major peak as hoffmaniacetone, being identified by the first as the largest compound for *A. virgata*, and AV-SBA presented higher concentration campferol / luteolin diglycoside, which was first described in the plant. In addition, another unpublished compound was also found in both extracts, campferol / luteolin triglycoside. Some metabolites present in the extracts can be quantified by external standardization. Of these, the major ones were p-coumaric acid and rutin. It was found during this research that several components were found that had their biological activities described and proven, however, some major compounds described here had not been previously reported for *A. virgata*. These compounds may be further isolated and tested for their biological activities.

Keywords: Trash. Herbal medicine. Plant metabolism. Verbenaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem demonstrativa de diferentes partes da espécie <i>Aloysia virgata</i>	19
Figura 2: Cromatograma obtido por HPLC de (A) AV-SBA e (B) AV-SBH.	25
Figura 3: Cromatografias em camada delgada: (1) glicose, (2) sacarose, (3) AV-SBH, (4) AV-SBA e (5) rutina.	26
Figura 4: Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AV-SBH-Aq e (B) AV-SBA-Aq.....	27
Figura 5: Espectros de massas e possível estrutura molecular dos novos flavonóis glicosilados encontrados em <i>A. virgata</i> : (A) campferol/luteolina diglicosídeo e (B) campferol/luteolina triglicosídeo.	28
Figura 6: Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AV-SBH-BuOH e (B) AV-SBA-BuOH.	29
Figura 7: Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AV-SBH-AcEt e (B) AV-SBA-AcEt.	30
Figura 8: Cromatograma de HPLC-DAD de AV-SBH- CHCl ₃	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos dos extratos aquoso, hidroalcolico e das frações resultantes do particionamento líquido-líquido obtidos das folhas de <i>A. virgata</i>	24
Tabela 2: Identificação dos metabólitos secundários presentes nas folhas de <i>A. virgata</i> por HPLC-ESI-MS.....	32
Tabela 3: Concentração de metabólitos secundários presentes em folhas de <i>A. virgata</i>	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 PLANTAS MEDICINAIS: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA	12
2.2 METABOLISMO VEGETAL.....	14
2.2.1 Metabolismo secundário	15
2.3 FAMÍLIA VERBENACEAE	16
2.3.1 <i>Aloysia virgata</i>.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 GERAL.....	20
3.2 ESPECÍFICOS.....	20
4. METODOLOGIA	20
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	20
4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES VEGETAIS.....	20
4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	21
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	21
4.4.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	22
4.4.3 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry).....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	23
5.1.1. Identificação dos compostos por HPLC-DAD-ESI-MS	24
5.1.2 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do AV-SBH e AV-SBA.....	26
5.1.2.1 Frações aquosas: AV-SBH-Aq e AV-SBA-Aq.....	27
5.1.2.2 Frações butanólicas: AV-SBH-BuOH e AV-SBA-BuOH.....	29
5.1.2.3 Frações acetato de etila: AV-SBH-AcEt e AV-SBA-AcEt	30
5.1.2.4 Fração clorofórmica AV-SBH-CHCl ₃	31
5.1.3 Otimização da análise de HPLC-DAD para a quantificação de compostos em extratos de <i>A. virgata</i>.....	34
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas por nossos antepassados desde meados da pré-história, onde os vegetais eram usados para a cura de doenças ou ferimentos (MONTEIRO & BRANDELLI, 2017) e, atualmente, são conhecidas pela grande maioria da população por terem um papel importante na cura e tratamento de algumas enfermidades. De modo que em algumas comunidades, essas plantas simbolizam a única forma de tratamento de determinadas patologias. Estima-se que aproximadamente 80% da população do planeta já tenha feito uso de algum vegetal para aliviar sintomas de alguma doença (SANTOS, 2019).

No Brasil, o uso dos vegetais e reconhecimento de suas propriedades, tanto alimentícia, quanto farmacológica se deve em grande parte aos conhecimentos indígenas que desde muito antes do descobrimento do país pelos portugueses já usavam tais plantas como exclusiva fonte de alimento e cura de doenças (VEIGA, 2005). Além disso, o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, tendo 55.000 espécies catalogadas de um total estimado brasileiro de aproximadamente 350.000 a 550.000. Entretanto, apenas 8% dessas espécies já tiveram seus compostos bioativos e propriedades medicinais estudadas (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Dentre as famílias com alto poder medicinal, encontra-se à família Verbenaceae. Pertencente ao grupo das angiospermas, esse grupo possui diversas espécies que produzem óleos essenciais a partir de seus tricomas secretores (METCALFE; CHALK, 1983). Esses óleos são ricos em matéria prima para a produção de antibacterianos e antifúngicos (SALLES, 2015). O uso popular das espécies deste família é muito frequente em países da América do Sul, incluindo o Brasil (SANTOS, 2015).

Aloysia virgata (RUÍZ & PAVÓN) Juss. está classificada dentro do gênero *Aloysia* e é popularmente conhecida como lixa ou lixeira, por conta de suas folhas serem ásperas tanto quanto uma lixa de cozinha (PARANAGUÁ, 2015). Os estudos referentes a essa planta são principalmente voltados ao seu potencial como óleo essencial e sua atividade neuroativa (WASOWSKI E MARDER, 2011),

Apesar da principal forma de uso popular da planta ser na forma de infusão, há poucos trabalhos sobre a caracterização química e biológica de compostos obtidos por meio deste tipo de extração. Vandresen et al. (2010) relataram componentes como feniletanóides verbascosídeo e arenariosídeo, os diterpenos caurânicos hoffmaniacetona e seu monoacetato, além da flavona luteolina. Em 2004, um estudo do extrato metanólico das folhas de *A.*

virgata, revelou a presença de ent-caureno, um precursor de giberilinas, que antes só havia sido encontrado em espécies do gênero *Calicarpa* (OLIVEIRA, 2005).

Em 2012, Ferreira demonstrou o poder antioxidante do extrato etanólico das folhas de *A. virgata*, comportamento este muito parecido com o controle positivo usado no estudo (trolox), concluindo que este extrato se apresenta como uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Porém, até o momento não se sabe dizer a quais componentes do extrato é atribuída esta atividade antioxidante, uma vez que existem raros relatos na literatura sobre a composição química associada às atividades biológicas desta espécie. Uma pesquisa recente revelou a presença de dois diterpenos ((16R)-16,17,18-triidroxifilocladan-3-ona e (16R)-16,17- diidroxifilocladan-3-ona) majoritários, ambos com atividade neuroativa, nas partes aéreas de *A. virgata* (WASOWSKI e MARDER, 2011). Mas na literatura não foram encontrados relatos de atividade antioxidante para estes compostos, concluindo-se que a capacidade de combater radicais livres é atribuída a outros componentes da planta.

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. Assim, o presente trabalho descreve uma investigação fitoquímica nesta espécie, e, o isolamento e a identificação estrutural dos principais constituintes químicos presentes em suas folhas, por meio de extração aquosa e hidroalcóolica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças, por meio da ingestão de ervas e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, moradia, proteção e reprodução. Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS JR. *et al.*, 2006). Embora suas propriedades tenham passado a ser estudadas recentemente, o uso de plantas como fitoterápicos vem desde meados da pré-história, onde os vegetais eram usados para a cura de doenças ou ferimentos (MONTEIRO & BRANDELLI, 2017).

Na história, as antigas civilizações possuíam suas próprias referências sobre as plantas medicinais e apesar de inicialmente cultivarem plantas apenas para o consumo alimentar, passaram a experimentá-las como método de cura para certas patologias (BRAGA, 2011).

Ao longo da história, os recursos e uso dessas plantas foram sendo aprimorados conforme o homem foi descobrindo o que estava ao seu redor sem medo de testar objetos e plantas. Como um exemplo, podemos destacar a utilização das ervas como medicina alternativa desde a idade média, como alimento, bebida ou remédio, e na Europa, onde eram utilizadas como principal fonte para a cura de doenças (VEIGA, 2005).

No Brasil, o uso dos vegetais e reconhecimento de suas propriedades, tanto alimentícia, quanto farmacológica se deve em grande parte aos indígenas que desde antes do descobrimento do país pelos portugueses usavam-nas como exclusiva fonte de alimento e para cura de doenças (VEIGA, 2005). Segundo o autor, só na região amazônica, existem mais de 25 mil espécies de plantas das quais, apenas cerca de 5 mil já foram catalogadas e estudadas, comprovando seus fins terapêuticos.

Mais de 25% de todos os medicamentos fabricados hoje em dia são de origem vegetal. Conforme já mencionado, as plantas medicinais são objeto de estudo de longa data, onde vem se buscando novas fontes para obtenção de princípios ativos, responsáveis por sua ação farmacológica ou terapêutica (VEIGA, 2005).

Neste sentido, começa a se desenvolver uma nova área de pesquisa, voltada aos fitoterápicos, que são produzidos a partir de plantas frescas ou secas, ou ainda parte delas, extraídos por destilação, percolação, maceração e outras operações.

Caracteristicamente, os constituintes ativos são obtidos juntos com outras substâncias presentes na planta. Algumas vezes estas substâncias atuam sinergicamente melhorando a atividade biológica. Sendo assim, para manter a qualidade de um fitoterápico, antes é necessário assegurar a coexistência destas substâncias, ou de grupos químicos, presentes na espécie, visto que as substâncias responsáveis pela atividade biológica ainda são desconhecidas. Um fitoterápico de qualidade pode ser alcançado se todas as etapas de processamento da matéria-prima ativa vegetal e manufatura do produto conservar o constituinte ativo e as substâncias sinérgicas (SCHIMIDT *et al.*, 1993).

A fitoterapia, tem se tornado cada vez mais popular entre os povos de todo o mundo e com o reconhecimento da Organização Mundial de Saúde em 1978, o interesse pelas potencialidades dos produtos vegetais com ação farmacológica vem crescendo, aumentando conseqüentemente a produção dos fitoterápicos na indústria farmacêutica (PACHÚ, 2007).

A crescente demanda de medicamentos, associada ao elevado custo dos medicamentos sintéticos, tornam o interesse pela fitoterapia ainda maior e a implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais completamente justificável. Já em 1976, 25% de todos os medicamentos prescritos em países industrializados continham princípios ativos, os quais, eram extraídos de plantas medicinais (FARNSWORTH e MORRIS, 1976). Apesar disso, atualmente apenas uma pequena fração do imenso número de espécies de plantas superiores existentes foi adequadamente estudada do ponto de vista químico e ou farmacológico (PACHÚ, 2007).

A elucidação dos constituintes químicos presentes nas plantas, bem como de suas atividades biológicas, representa, ainda, um desafio (MACIEL et al., 2002). Embora existam vários trabalhos que avaliem aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de plantas com potencial medicinal de diversas regiões do mundo, tendo em vista a grande diversidade genética vegetal, sabe-se que ainda há um vasto campo a ser pesquisado, o que serve de incentivo às investigações científicas e à busca por novas drogas naturais (BORELLA et al., 2006).

2.2 METABOLISMO VEGETAL

Do Norte ao Sul do país, diferentes biomas abrigam as espécies vegetais de ocorrência natural que se adaptam às condições de clima, solo e água, existentes naquele local. Nesse processo de interação, todo o complexo conjunto de substâncias que faz parte da sua fisiologia também está em estreita interação com o ambiente. Condições sazonais, luminosidade, temperatura e clima podem alterar a composição química dos mesmos, ou seja, seu metabolismo (FREIRE, 2004).

O metabolismo vegetal é o conjunto de reações químicas que continuamente ocorrem em cada célula vegetal. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, chamadas de rotas metabólicas. Resultantes, as rotas metabólicas são formadas por compostos químicos denominados de metabólitos, juntamente com as reações enzimáticas envolvidas, anabólicas, catabólicas e de biotransformação (SANTOS, 2003).

Primeiramente, as rotas metabólicas visam à obtenção de nutrientes para as necessidades fundamentais da célula, como energia (ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese de compostos essenciais à sua sobrevivência (macromoléculas celulares) (SANTOS, 2003). No reino vegetal, os processos anabólicos, responsáveis pela biossíntese de macromoléculas a partir de monômeros, apresentam também vias alternativas de

metabolismo, possibilitando à produção de grande variedade de compostos que participam, principalmente, da adaptação da planta ao meio em que vive (LEITE, 2009).

O metabolismo está atualmente dividido em primário e secundário. O primário, essencial a todos os seres vivos, se caracteriza pela sustentação funcional da planta, responsabilizando-se por sintetizar, degradar e interconverter compostos. Esse grupo inclui lipídeos, protídeos e glicídeos, com funções vitais bem definidas (PERES, 2013).

Já o metabolismo secundário é caracterizado pela biossíntese de micromoléculas com diversidade e complexidade estrutural e distribuição restrita e específica. Tem papel de adaptação ao meio, defesa, proteção UV, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, sendo influenciado pelas condições edafoclimáticas e encontrado apenas em alguns grupos de organismos vegetais (PERES, 2015).

2.2.1 Metabolismo secundário

Em grande parte das células e organismos, rotas metabólicas de síntese, degradação, interconversão das moléculas e reações de conservação de energia são similares. Contudo, as rotas de síntese de metabólitos secundários não estão presentes em todos os organismos e provavelmente sejam ativadas apenas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse da planta (SOUZA, 2008).

O metabolismo secundário está restrito a processos químicos únicos para espécies específicas, ou seja, não está presente em todas as plantas. O metabolismo é a química que conduz à formação de um produto natural de uma planta e atualmente, a química dos produtos naturais usualmente é diferente de uma planta para outra, onde precursores químicos comuns podem conduzir a resultados diferentes (PEREIRA, 2012).

Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto sua produção é associada à defesa da planta contra-ataque de patógenos, radiação solar e herbivoria (MONTANARI, 2002) ou ainda, atuam na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes (PERES, 2008). Na maioria dos casos, os metabólitos secundários não parecem ser necessários para a sobrevivência das plantas, mas podem fornecer uma vantagem competitiva considerável (PEREIRA, 2012).

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são os seguintes: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição

atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Além de sofrer a influência de fatores ambientais o metabolismo secundário vegetal também é afetado por vários inimigos potenciais, como bactérias, fungos, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros. Como plantas não conseguem evitar esses predadores simplesmente deslocando-se, elas dispõem de outros mecanismos de proteção. Barreiras físicas como cutículas, formadas pela camada externa cerosa e pela periderme, além de reduzirem à perda de água, funcionam como obstáculo à entrada de microrganismos. Em nível molecular, a planta se protege biossintetizando uma enorme gama de metabólitos secundários que atuam não apenas na defesa do vegetal contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos, como também auxiliam a adaptação da planta ao seu ambiente (MARTINS; FIGUEIREDO, 2009).

A produção de metabólitos secundários na planta também é influenciada por fatores genéticos, em conjunto com fatores ambientais e ontogenéticos. O fator ontogenético é à variação da composição e concentração dos metabólitos secundários de acordo com a idade e estágio da planta. (MARTINS; FIGUEIREDO, 2009, p. 145). Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir de metabólitos primários pré-existentes, e para ocorrer tal transformação são necessárias reações de catabolismo 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).

Já em relação a importância dos metabólitos secundários para as plantas medicinais, sabe-se que as drogas vegetais são constituídas por uma mistura complexa desses agentes, que podem ser responsáveis pelas suas atividades farmacológica. Sendo assim, podem ser diretamente utilizados como medicamentos, ou então utilizados como uma espécie de molde para o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, muitos produtos naturais apresentam estruturas muito complexas e não podem ser sintetizados em laboratórios. Além disso, muitas drogas “não-naturais”, ou seja, drogas sintéticas podem causar efeitos colaterais graves que geralmente não são aceitáveis em muitos tipos tratamentos. Assim, a descoberta produtos naturais biologicamente ativos a partir de plantas pode ajudar a prevenir os efeitos colaterais das drogas sintéticas (EL-SHEMY et al., 2007).

2.3 FAMÍLIA VERBENACEAE

Fazendo parte da grande diversidade de espécies vegetais ricas em metabólitos secundários, encontra-se a família Verbenaceae, que compreende cerca de 98 gêneros e 2614

espécies no mundo. No Brasil, encontram-se 16 gêneros e 310 espécies nos diferentes hábitos, desde ervas perenes, arbustos e até subarbustos, encontrados nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando distribuição pantropical, mas principalmente neotropical (SALIMENA, et al., 2013).

Suas espécies estão distribuídas em todas as regiões do país, ocorrendo em vegetações do tipo Campo Rupestre, Cerrado (*latu sensu*) e Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), sendo presente em diversos domínios fitogeográfico, como: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (SALIMENA, et al. 2013). Apresentam diferentes aplicações, podendo ser utilizadas pelas propriedades medicinais, na ornamentação e como madeiras, sendo esta última amplamente empregada na economia (MELO, et al. 2010). Uma característica da família é a presença de tricomas secretores, geralmente produtores de óleos essenciais de grande valor medicinal (FAVORITO, 2009).

Na natureza podem ser encontrados sob a forma de ervas, árvores, arbustos ou lianas. Possuem tricomas glandulares ou tectores na epiderme vegetal. As folhas quase sempre são opostas, mas também podem ser verticiladas, inteiras ou lobadas. As inflorescências podem ser politélicas (cimeiras com um par de flor). As flores são bissexuais e com simetria zigomorfa. O cálice tem suas sépalas unidas e a corola pode ter cinco lobos e aparentar ter somente quatro, isso graças à união dos lobos. Os estames são em número de quatro, sendo dois pequenos e dois maiores, e estão aderidos às pétalas (ARAÚJO, 2019)

Diversas espécies de Verbenaceae possuem óleos essenciais que são produzidos em seus tricomas secretores (METCALFE & CHALK, 1983). Eles são ricos em mono e sesquiterpenos, o que faz dos exemplares excelente matéria-prima para produção de ativos antibacterianos e antifúngicos (SALLES, 2015), sendo frequentemente usada em países da América do Sul, incluindo o Brasil (SANTOS, 2015).

Como exemplo do uso dessas plantas, as folhas e flores de *Aloysia* (gênero o qual terá enfoque neste trabalho) são usadas na preparação de uma infusão que serve para tratar dores de estômago, inchaços, náuseas e vômitos. Em algumas regiões, como no norte da Argentina, é utilizada com erva-mate na preparação do tererê. De outras *Aloysias* são extraídos os galhos e as folhas para serem usados em bebidas para a digestão, dores de estômago e palpitações cardíacas (HARAGUCHI & CARVALHO, 2010).

2.3.1 *Aloysia virgata*

O gênero *Aloysia* é constituído de aproximadamente 30 espécies de arbustos com folhas e inflorescências aromáticas conhecidas principalmente por seus óleos essenciais

(HERNANDEZ et al., 2003; SIEDO, 2006; 2010) e muitos são os estudos farmacológicos já publicados em espécies do gênero (KUTSCHKER et al., 2002; DEMO et al., 2005; ARIAS, 2009; DAMBOLENA et al., 2010; PINA et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Porém estudos fitoquímicos são escassos e restritos a poucas espécies.

Pertencente ao gênero *Aloysia* e popularmente conhecida por lixa ou lixeira, *Aloysia virgata* (Ruíz & Pavón) Juss. é uma árvore de pequeno porte, com quatro à seis metros de altura que ocorre em terrenos altos, comumente vista ao longo de cercas e pastagens. Essa espécie possui tronco fino, com aspecto descamante. Suas folhas são simples e extremamente ásperas, dado a isso seu nome popular. Ainda, possui flores pequenas e brancas e suas sementes são facilmente disseminadas pelo vento (Figura 1) (PARANAGUÁ, 2015).

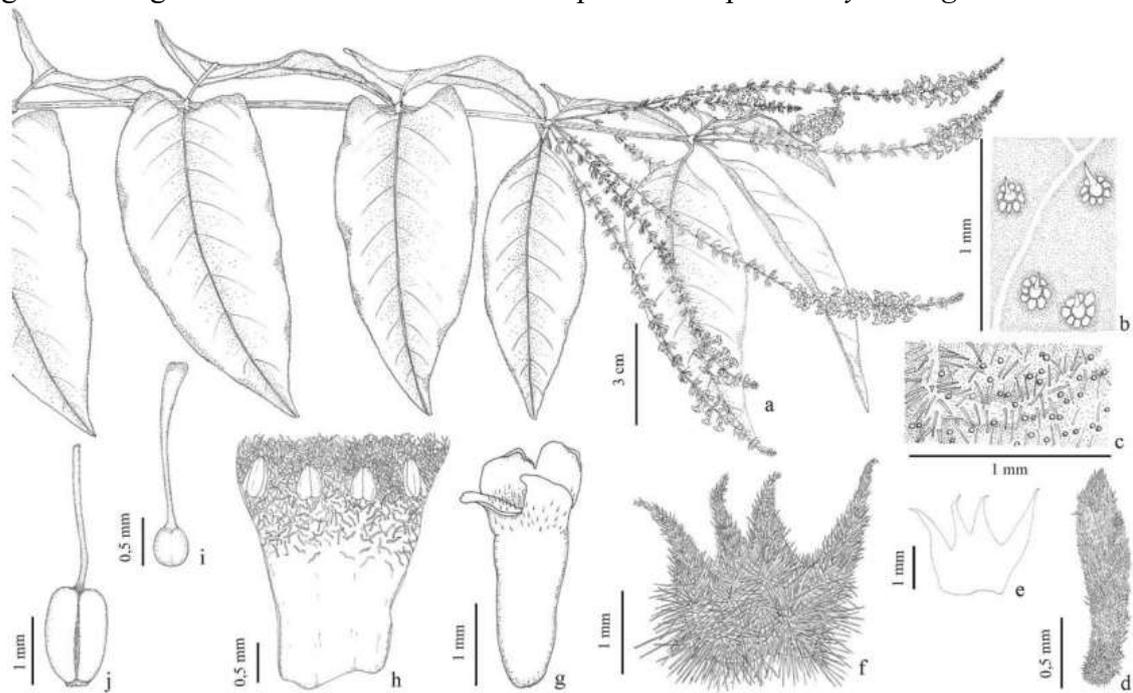
Bastante cultivada no Rio Grande do Sul, pode ser encontrada também nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. Ainda há registros de *A. virgata* na Argentina. Essa árvore não exige muita água e tolera, inclusive, solos mal drenados. O diferencial fica por conta do aroma, em função do alto teor de óleo essencial que ela possui. Por conta disso é usada em indústrias de perfumaria, cosméticos e alimentos (RICCIARDI et.al., 2005).

É uma planta medicinal usada popularmente para uma grande variedade de indicações. Na Bolívia, Paraguai e Argentina é popularmente usado como diaforético, estimulante, estomacal, tônico, anticatarral e anti-reumático (BASSOLS, GURNI, 1996).

Atualmente, quase não existem referenciais sobre o estudo de metabólitos secundários, e os que existem estão concentrados nos óleos essenciais da planta, por seu grande poder em produzir substâncias perfumadas para à atração de polinizadores.

Os óleos essenciais extraídos dessa planta possuem constituição química variada e são compostos em grande parte por substâncias sesquiterpênicas. Em relação à atividade do óleo como antibacteriano, estudada juntamente ao gênero *Lippia* (também pertencente à família Verbenaceae) apresentam atividades moderadas contra as cepas de bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* (MONTANARI, 2010).

Figura 1: Imagem demonstrativa de diferentes partes da espécie *Aloysia virgata*.



Fonte: Adaptado de CRESPAM, 2010.

Nota: a. porção apical do ramo; b. detalhe da superfície adaxial da folha; c. detalhe de superfície abaxial da folha; d. bráctea; e. cálice (esquema); f. cálice; g. corola em vista lateral h. corola aberta mostrando os estames; i. gineceu; j. fruto.

Ferreira (2012) apresentou um teste antioxidante do extrato etanólico da folha de *Aloysia virgata* onde este demonstrou valores de absorvância próximo ao do padrão trolox (controle positivo), evidenciando que esse extrato se apresenta como uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Existem raros relatos na literatura sobre a composição química e atividades biológicas desta espécie. Recente pesquisa revelou a presença de dois diterpenos ((16R)-16,17,18-triidroxifilocladan-3-ona e (16R)-16,17- diidroxifilocladan-3-ona), ambos com atividade neuroativa, nas partes aéreas de *A. virgata* (WASOWSKI e MARDER, 2011). Não foram encontrados relatos de atividade antioxidante para estes compostos, de modo que as substâncias responsáveis por esta atividade ainda não foram isoladas desta planta.

Desta maneira, neste trabalho desenvolveu-se um estudo acerca desta planta, voltados para sua composição química de metabólitos secundários e caracterização.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Diante do exposto anteriormente, este trabalho teve por objetivo extrair e caracterizar estruturalmente metabólitos secundários presentes nas folhas da planta medicinal *Aloysia virgata*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Coletar e obter extratos de *A. virgata* por infusão e por refluxo em solventes orgânicos e com misturas hidroalcoólicas;
- Extrair e caracterizar estruturalmente metabólitos secundários das folhas de *A. virgata*.
- 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. METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Para a obtenção de material vegetal foram realizadas expedições de coleta a campo na região de Cerro Largo a 28°08'49" de latitude e 54°44'17" oeste; aos 211 metros de altitude, mais precisamente nos arredores de mata pertencente a Escola Municipal Pe. José Schardong. Folhas e pequenos ramos de *Aloysia virgata* pertencentes a três populações distintas foram coletadas no período da manhã, sendo acondicionados em redes de tecido e conduzidos ao laboratório, onde foram secas em estufa a 50 °C por aproximadamente 2 dias. Exemplar da mesma espécie está depositado no Laboratório de Botânica da Universidade Federal da Fronteira Sul.

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 (AV-BA). Processo de extração mais

intenso foi realizado com etanol 70%, de igual maneira, onde 50 g de material vegetal foram submetidas a extração hidroalcoólica, durante duas horas à 100 °C, repetido três vezes, resultando no extrato bruto hidroalcoólico, denominado AV-BH.

Com a finalidade de separar compostos de alta massa molecular (polissacarídeos e proteínas, principalmente) daqueles de baixa massa, os extratos brutos (AV-BA e AV-BH) foram solubilizados em água destilada, aos quais foi adicionado álcool etílico refrigerado (3:1, v/v). Estas soluções foram deixadas em repouso por cerca de trinta minutos, para promover a formação de um material insolúvel (precipitados etanólicos, denominados “AV-PBA e AV-PBH”), os quais foram separados por centrifugação (8.500 r.p.m., 10 min, 4 °C), liofilizados e armazenados em *freezer*. As frações solúveis em etanol (denominadas de sobrenadante etanólico, AV-SBA e AV-SBH) foram concentradas a pequeno volume, liofilizadas, mantidas em frascos fechados e armazenadas em freezer.

4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido é uma operação básica de separação de compostos com diferentes características de solubilidade face a solventes orgânicos e aquosos imiscíveis entre si. Uma vez que AV-SBA e AV-SBH são frações complexas, ricas em diversos metabólitos, um fracionamento líquido-líquido foi realizado, no sentido de diminuir a complexidade das frações e facilitar sua análise. 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 AV-SBH e acetato de etila e butanol para AV-SBA. O processo de partição então, rendeu 4 frações para AV-SBH, nomeadas: AV-SBH-CHCl₃, AV-SBH-AcEt, AV-SBH-BuOH e AV-SBH-Aq; e 3 frações para AV-SBA, nomeadas AV-SBA-AcEt, AV-SBA-BuOH e AV-SBA-Aq. Estas frações foram secas em evaporador rotativo e então armazenadas em *freezer* para análises posteriores.

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 et al., 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 (AV-SBA e AV-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 µL/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 µL/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 clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumarico, ácido siríngico, betulina, luteolina, lupeol acetato, morina, teobromina, teofilina e rutina nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL.

4.4.3 ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*)

As amostras (~10 µg/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 (KDScientific) a um fluxo de 10 µL/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 DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Conforme mencionado anteriormente, *Aloysia virgata* é uma planta nativa amplamente consumida na forma de infusão, sendo usada para o tratamento de diversas doenças e distúrbios, principalmente os associados ao sistema digestório. Durante o processo de obtenção do chá são extraídos diversos componentes, entre estes, os metabólitos secundários. No entanto, ainda são escassos os estudos químicos voltados a caracterização destes metabólitos. Na literatura atual, apenas é descrito o isolamento e identificação de cinco substâncias presentes em folhas e caule de *A. virgata*, usando para tanto uma extração etanólica (VANDRESEN, et al. 2010).

Sendo assim, neste trabalho as folhas de *A. virgata* 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 hidroalcolica, para posterior comparação, a qual geralmente permite uma extração mais intensa, ou seja, extrai praticamente todos os componentes presentes na planta, possibilitando sua identificação.

Após a extração, o extrato bruto aquoso (AV-BA) e o extrato bruto hidroalcolico (AV-BH) foram tratados com etanol para separação e isolamento dos compostos de baixa massa molar (os metabólitos secundários), resultando nas frações solúveis em etanol AV-SBA e AV-SBH. Estas foram também submetidas ao particionamento líquido-líquido, gerando as frações correspondentes Aq, BuOH, AcEt e CHCl₃, para AV-SBH e Aq, BuOH, AcEt para AV-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. virgata*.

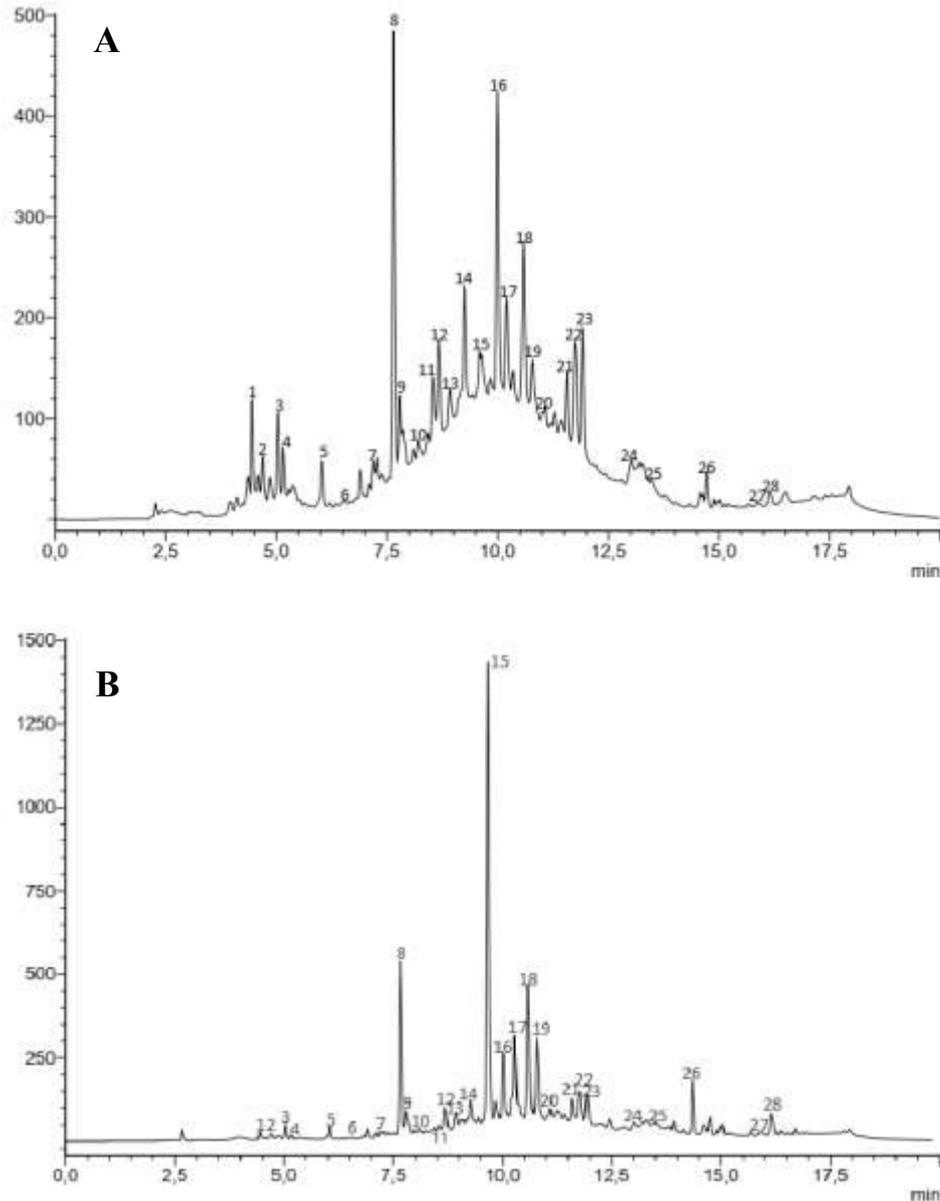
Extrato/Fração (sigla)	Rendimento (%)
Sobrenadante etanólico do extrato hidroalcoólico (AV-SBH)	30,6
Fração aquosa do extrato hidroalcoólico (AV-SBH-Aq)	22,7
Fração butanólica do extrato hidroalcoólico (AV-SBH-BuOH)	4,3
Fração acetato de etílica do extrato hidroalcoólico (AV-SBH-AcEt)	1,7
Fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico (AV-SBH-CHCl ₃)	1,9
Sobrenadante etanólico do extrato aquoso (AV-SBH)	26,9
Fração aquosa do extrato aquoso (AV-SBH-Aq)	22,5
Fração butanólica do extrato aquoso (AV-SBH-BuOH)	3,1
Fração acetato de etílica do extrato aquoso (AV-SBH-AcEt)	1,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

Análises de cromatografia de AV-SBH e AV-SBA permitiram observar que extratos complexos foram obtidos da extração hidroalcoólica e aquosa. Como esperado, ocorreu uma grande variação na polaridade dos compostos, variando desde os carboidratos até os terpenos (Tabela 2, página 32). O tempo total de análise proposto para separação em HPLC foi menor que 18 minutos (Figura 2 A e B), utilizando-se o gradiente 1, descrito na sessão de metodologia, mas pode ser observado que alguns compostos ficaram muito próximos, não sendo totalmente separados. Esta técnica permitiu a identificação 28 picos majoritários em AV-SBA e AV-SBH (Figura 2 A e B), selecionados por sua abundância relativa ou por sua identificação por padrão comparativo.

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



AV-SBH e AV-SBA também foram analisados por CCD, 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 e sacarose para ambos os extratos (AV-SBH e AV-SBA), enquanto a rutina não foi possível de ser identificada (Figura 3). Além disso, é possível verificar duas bandas coloridas com tempo de retenção (Rt) próximo ao da rutina em ambos os extratos,

coradas de roxo, provavelmente correspondes a flavonoides com perfis cromatográficos e peso molecular semelhantes à rutina.

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



Fonte: O autor.

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

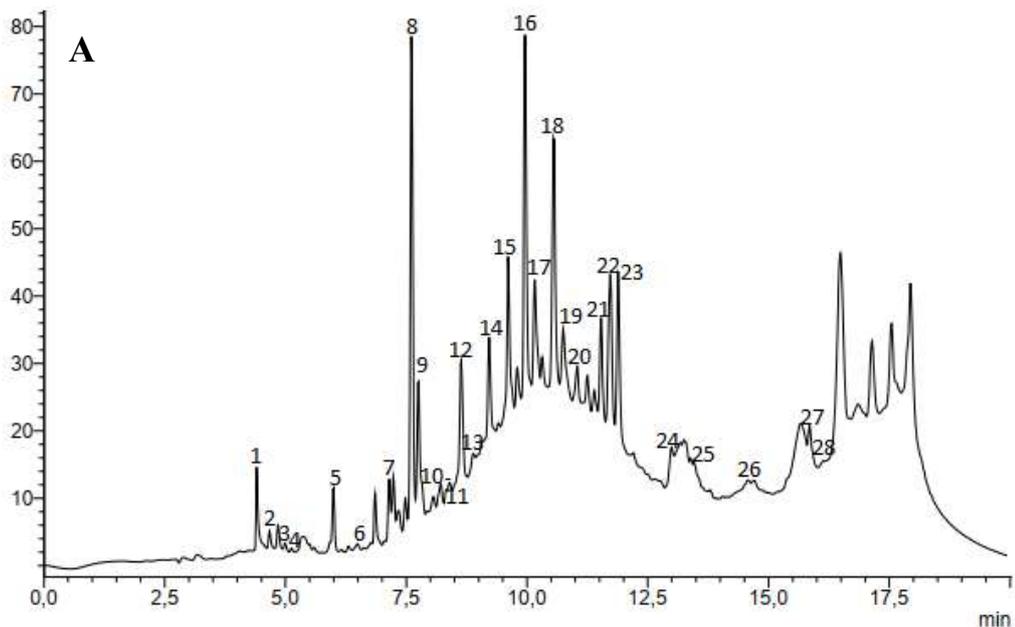
Após o particionamento líquido-líquido de AV-SBH e AV-SBA, a menor complexidade das frações permitiu uma melhor identificação dos constituintes. A identificação dos picos foi baseada em seu tempo de retenção (Rt), espectro de UV e padrões de fragmentação de massa por comparação com dados da literatura (VANDRESEN, et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2005), além do uso de padrões químicos. Os compostos presentes em ambos os extratos estão identificados na Tabela 2 (página 32).

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

Em um fracionamento com diferentes solventes a fração aquosa geralmente retém os compostos mais polares, incluindo açúcares e flavonoides associados à vários monossacarídeos, os quais em cromatografia em fase reversa costumam ser os primeiros picos eluídos na coluna. Com relação às frações AV-SBH-Aq e AV-SBA-Aq, verifica-se que ambas contêm os 28 compostos originais, encontrados nos sobrenadantes etanólicos (AV-SBH e AV-SBA, respectivamente (Figura 4 A e B). Mas, nota-se aqui, que a relação entre os picos é diferente da encontrada nos sobrenadantes, onde a abundância relativa deles é mais semelhante, fazendo com que estas frações sejam as mais adequadas para a análise e separação de compostos em *A. virgata*.

Ainda assim, nota-se que a fração AV-SBH-Aq concentrou os picos **8**, **16** e **18**, identificados como campferol/luteolina diglicosídeo, campferol/luteolina triglicosídeo e ácido *p*-cumarico, respectivamente. Enquanto a fração AV-SBA-Aq reteve principalmente os picos **8** e **16**. Nenhum desses compostos havia sido relatado anteriormente para *A. virgata*, sendo que os picos **8** e **16** identificados de acordo com suas massas e perfis de fragmentação em MS² (Figura 5) e o pico **18** identificado com o uso de padrão.

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



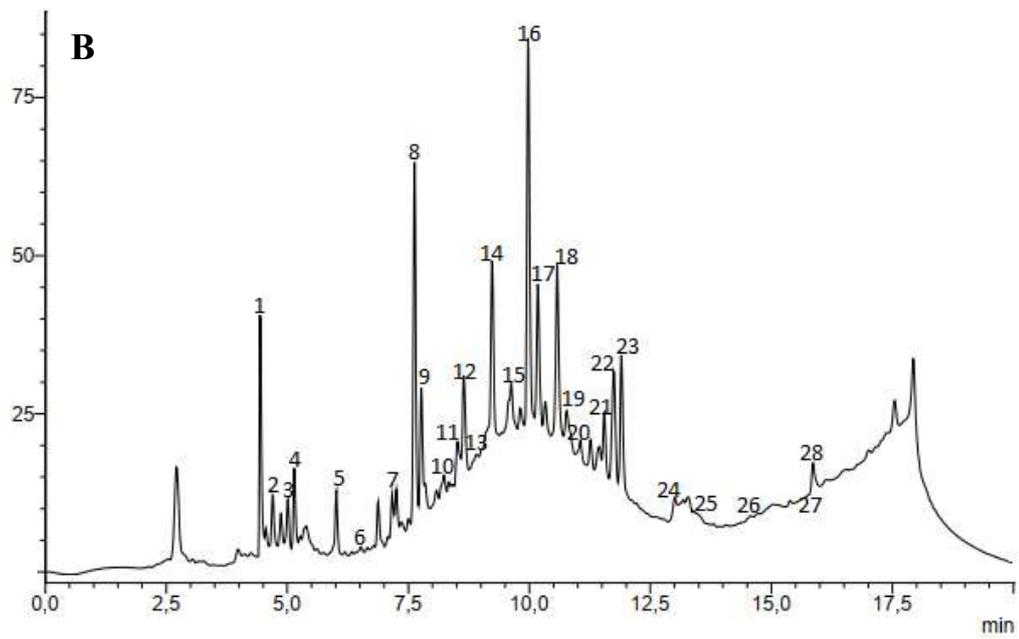
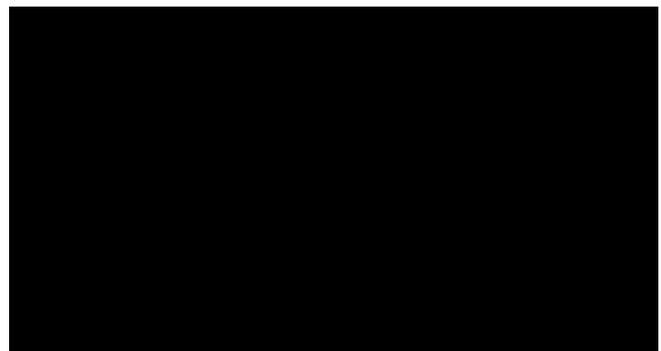
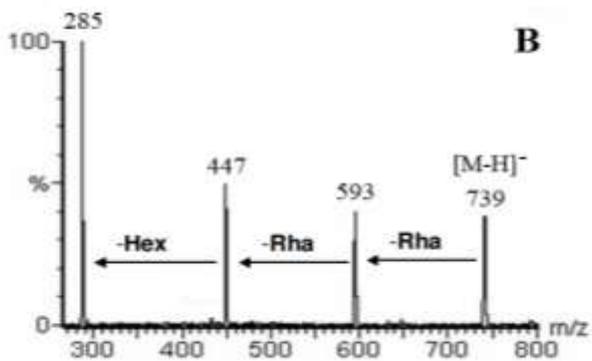
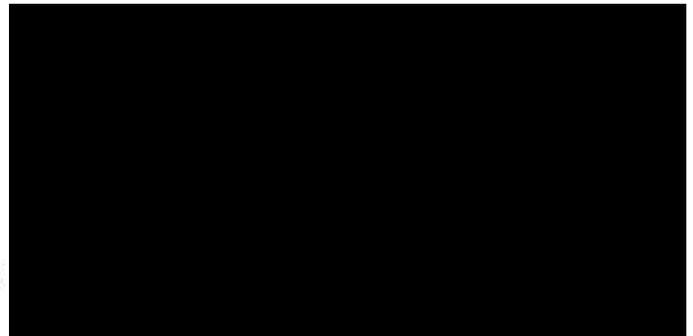
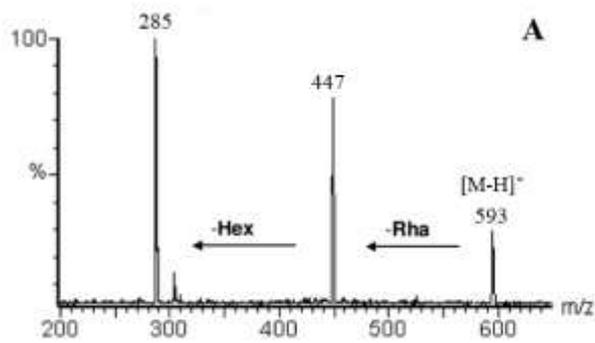


Figura 5: Espectros de massas e possível estrutura molecular dos novos flavonóis glicosilados encontrados em *A. virgata*: (A) campferol/luteolina diglicosídeo e (B) campferol/luteolina triglicosídeo.



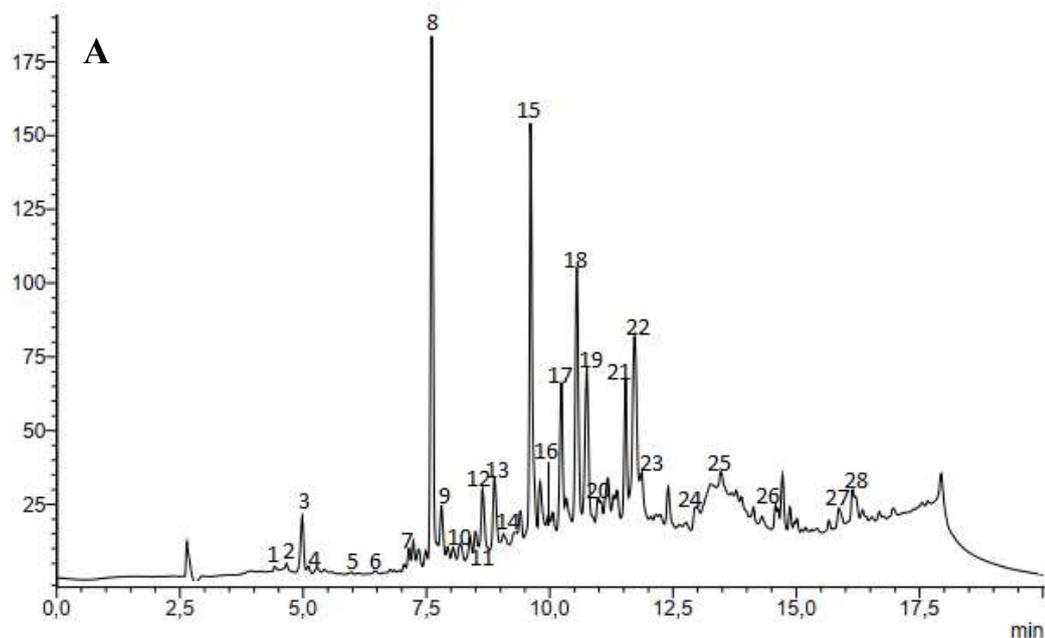
Assim, os espectros MS² produziram: m/z 593 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 447 (M-rhamnose) e 285 (campferol/luteolina), correspondente ao pico **8** (Figura 5 A); e m/z 739 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 593 (M-rhamnose), 447 (593-rhamnose) e 285 (campferol/luteolina), correspondente ao pico **16** (Figura 5 B). 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. virgata*

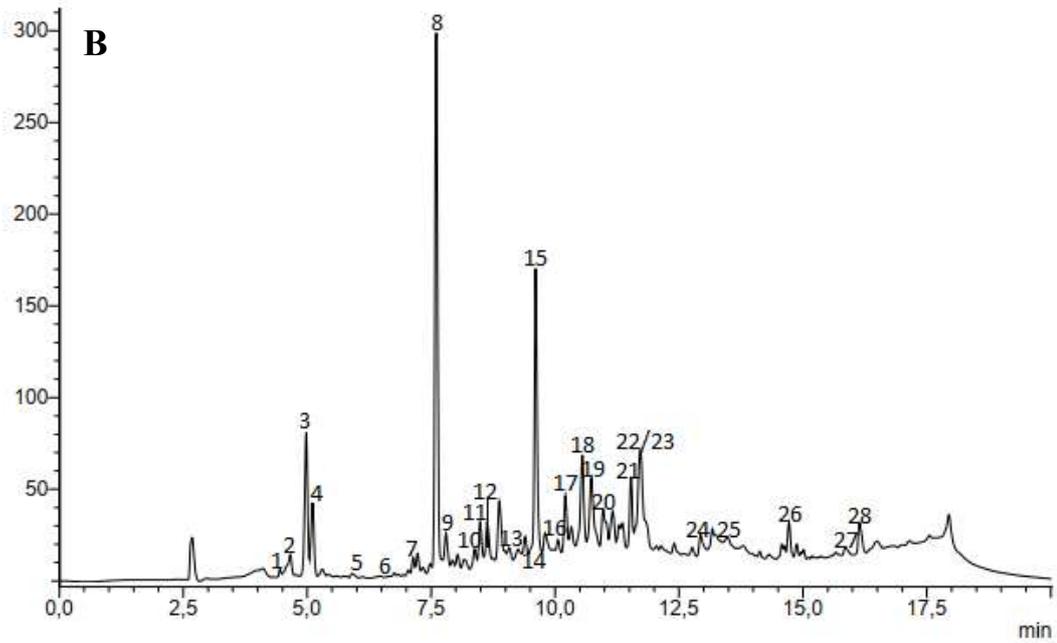
5.1.2.2 Frações butanólicas: AV-SBH-BuOH e AV-SBA-BuOH

As frações butanólicas AV-SBH-BuOH e AV-SBA-BuOH contém a maioria dos flavonoides glicosídeos e compostos fenólicos de *A. virgata* (Figura 6 A e B). Estes compostos foram observados a λ 325 nm, confirmados por tandem-MS, dados da literatura ou uso de padrões (VANDRESEN, et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2005).

A fração AV-SBH-BuOH, derivada do extrato hidroalcoólico concentrou o campferol/luteolina diglicosídeo (pico **8**), a hoffmaniacetona (pico **15**), a rutina (pico **17**), o ácido *p*-cumarico (pico **18**) e os picos **19**, **21** e **22** que não puderam ser identificados. Enquanto a fração butanólica, derivada do extrato aquoso concentrou majoritariamente apenas os picos **8** e **15**, correspondentes a campferol/luteolina diglicosídeo e a hoffmaniacetona.

Figura 6: Cromatograma de HPLC-DAD: (A) AV-SBH-BuOH e (B) AV-SBA-BuOH.

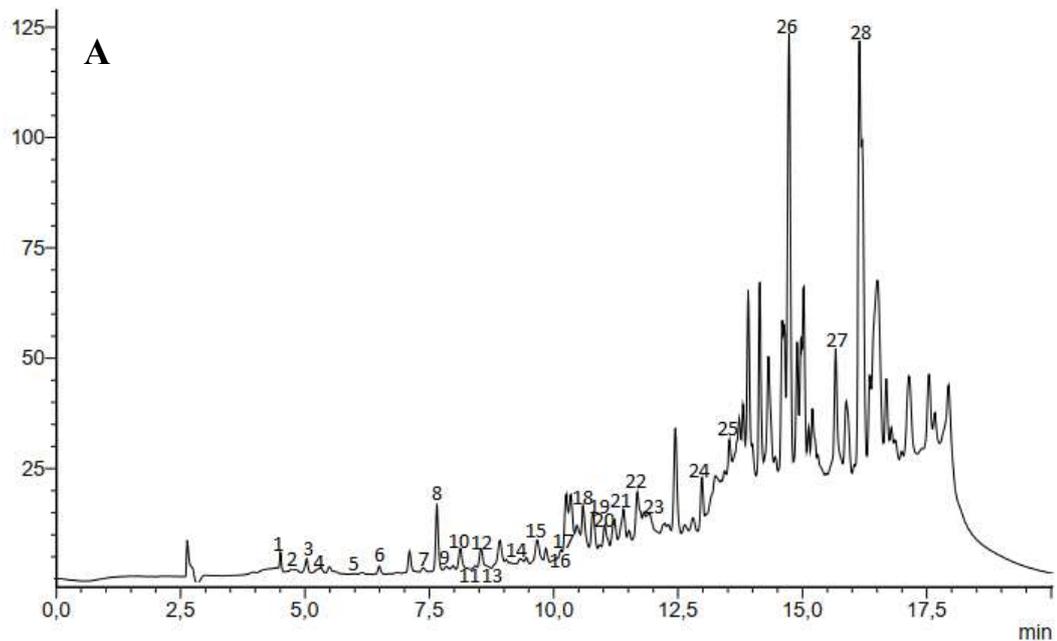


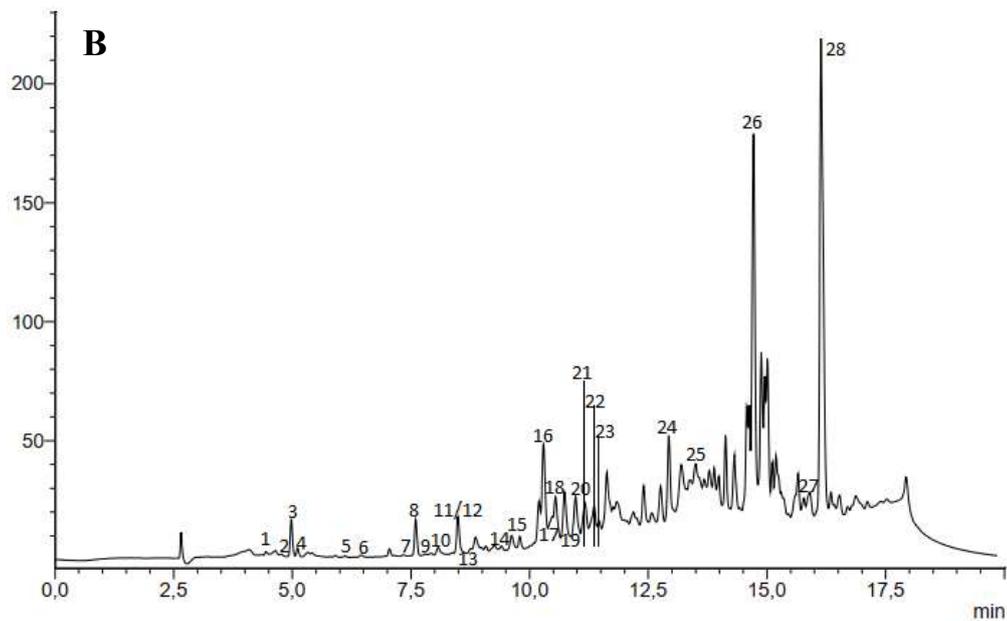


5.1.2.3 Frações acetato de etila: AV-SBH-AcEt e AV-SBA-AcEt

As frações AV-SBH-AcEt e AV-SBA-AcEt retiveram principalmente dois compostos majoritários, a betulina (pico **28**) e o outro componente (pico **26**) não foi identificado, mas sabe-se que o mesmo tem característica mais apolar, uma vez que sua eluição aconteceu mais ao final da corrida, quando houve um aumento da concentração do solvente orgânico no gradiente de análise (Figura 7 A e B).

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



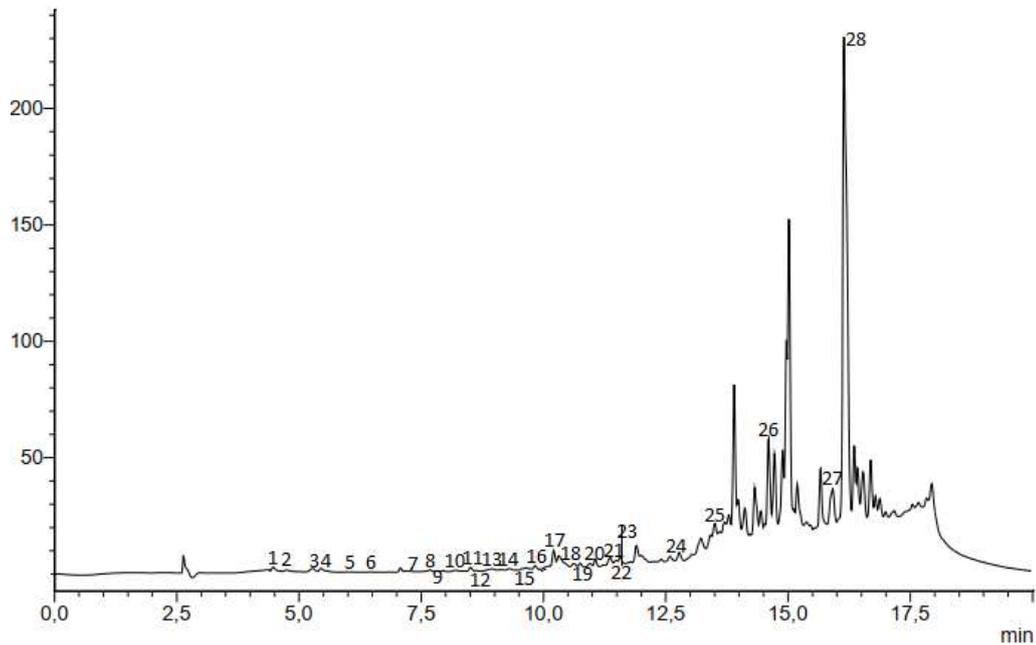


Além disso, sabe-se que em um fracionamento líquido-líquido geralmente a fração acetato de etila pode conter as saponinas. Estas não puderam ser detectadas via DAD, mas são observadas na CCD (Figura 3), como bandas coloridas acima do R_t da rutina, comportamento comum para saponinas ao utilizar esta fase móvel (EtOAc:H₂O:HOAc:HCOOH (9:2,3:1:1, v/v)) (SOUZA, et al., 2014; DARTORA, et al. 2011).

5.1.2.4 Fração clorofórmica AV-SBH-CHCl₃

A fração clorofórmica foi somente obtida para o extrato hidroalcoólico, uma vez que não se espera extrair compostos apolares que ficariam solúveis nesta fração, quando proveniente de uma extração aquosa. Assim, verifica-se que a fração AV-SBH-CHCl₃ reteve principalmente a betulina (pico **28**) e outro componente ($R_t = 15,22$) não enumerado no extrato do qual foi obtida (AV-SBH), devido ao fato de sua intensidade relativa ser muito baixa. Também são observados os picos **26** (não caracterizado) e **27**, identificado como lupeol acetato (Figura 8).

Nenhum lipídeo 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 AV-SBH- CHCl₃.

A Tabela 2 traz os compostos identificados nos extratos hidroalcoólico e etanólico de *A. virgata*, por meio das análises de HPLC-ESI-MS, os quais foram mais bem observados nas técnicas de análise, após a realização do fracionamento líquido-líquido.

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

Picos	Tempo de retenção (Rt)	[M-H] ⁻ (m/z)	Composto	Identificação
1	4,451	-	n.i.	-
2	4,687	-	n.i.	-
3	5,038	-	n.i.	-
4	5,159	-	n.i.	-
5	6,031	-	n.i.	-
6	6,495	179	Teobromina	Padrão
7	7,225	179	Teofilina	Padrão
8	7,760	593	Campferol/luteolina diglicosídeo	MS ²
9	7,787	-	n.i.	-
10	8,207	353	Ácido clorogênico	Padrão
11	8,501	121	Ácido benzoico	Padrão
12	8,676	-	n.i.	-
13	8,933	755	Arenariosídeo	Ref*
14	9,270	623	Verbascosídeo	Ref*
15	9,663	319	Hoffmaniacetona	Ref*
16	10,000	739	Campferol/luteolina triglicosídeo	MS ²
17	10,176	609	Rutina	Padrão

18	10,539	163	Ácido p-cumarico	Padrão
19	10,794	-	n.i.	-
20	11,016	193	Ácido ferulico	Padrão
21	11,573	-	n.i.	-
22	11,751	-	n.i.	-
23	11,918	-	n.i.	-
24	13,000	301	Morina	Padrão
25	13,511	285	Luteolina	Padrão
26	14,731	-	n.i.	-
27	15,858	467	Lupeol acetato	Padrão
28	16,132	441	Betulina	Padrão

*VANDRESEN, et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2005.

Até o momento a literatura descreve apenas cinco metabólitos presentes em *A. virgata*, sendo eles os feniletanóides verbascosídeo (pico **14**) e arenariosídeo (pico **13**), os diterpenos caurânicos hoffmaniacetona (pico **15**) e seu monoacetato, além da flavona luteolina (pico **25**). Sendo assim, no presente trabalho, além de serem observados estes cinco componentes, foram encontrados mais 23 compostos inéditos, 11 destes caracterizados pelo uso de padrões e 2 pela técnica de tandem-MS.

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 28 compostos aparecerem em ambos os extratos, verifica-se que a extração hidroalcoólica concentra grande quantidade da hoffmaniacetona (pico **15**), que posteriormente é retida na fração AV-SBH-BuOH, enquanto que o extrato aquoso apresenta como componentes majoritário os flavonoides campferol/luteolina diglicosídeo (pico **8**) e campferol/luteolina triglicosídeo (pico **16**), retidos posteriormente na fração AV-SBA-Aq. Este comportamento pode facilitar o isolamento destes componentes para posteriormente serem testados quanto à suas atividades biológicas, podendo até mesmo, agir como fitoterápicos.

Os compostos citados acima fazem parte da classe dos flavonoides que representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Na literatura, são afirmados como auxiliares no processo anti-inflamatório (COUTINHO et.al., 2009), agindo como antioxidantes, antibacterianos, antiparasitários, além de serem cardioprotetores (FLAMBÓ, 2013).

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

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, morina, 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*-cumarico ($y=1694,12x+124,260$, $R^2=0,9998612$); betulina ($y=6,54218x+4803,89$, $R^2=0,9861109$); luteolina ($y=1149,47x+159,998$, $R^2=0,9998639$); lupeol acetato ($y=1944,12x+241,88$, $R^2=0,9993241$); morina ($y=4467,88x-512,13$, $R^2=0,9998539$); 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. virgata*

Metabólito secundário	AV-SBH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco)	AV-SBA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco)
Ácido benzoico	$0,942 \pm 0,0593$	$3,92 \pm 0,0827$
Ácido clorogênico	$1,06 \pm 0,0084$	$3,815 \pm 0,0749$
Ácido ferúlico	$3,782 \pm 0,0650$	$3,42 \pm 0,0827$
Ácido <i>p</i> -cumarico	$102,305 \pm 0,4171$	$40,864 \pm 0,0028$
Betulina	$4,069 \pm 0,1725$	$0,911 \pm 0,0219$
Luteolina	Tr	$1,017 \pm 0,089$
Lupeol acetato	$2,234 \pm 0,0417$	$1,112 \pm 0,0671$
Morina	$1,865 \pm 0,007$	$1,68 \pm 0,0565$
Teobromina	$0,475 \pm 0,0282$	$0,39 \pm 0,0169$
Teofilina	$1,037 \pm 0,0296$	$1,5 \pm 0,0431$
Rutina	$44,511 \pm 0,1251$	$11,655 \pm 2,3836$

Dos compostos listados na Tabela 3, apenas a luteolina já havia sido descrita para a *A. virgata*, mas os ácidos clorogênico, ferulico e *p*-cumarico são bastante comuns em vegetais, também sendo encontrados em outras espécies de *Aloysias* (MONTANARI, 2010). Teobromina, teofilina e rutina, encontradas aqui, em folhas de *A. virgata* também já foram observados em *Aloysia citriodora* (GIL et al., 2007) e *Aloysia gratissima* (TROVATI et al., 2009).

Além disso, o ácido *p*-cumarico é precursor de formação dos flavonoides e compostos fenólicos, pela rota do ácido chiquínico, por isso é normal sua concentração estar elevada, por isso é um dos compostos com maior concentração em AV-SBH e AV-SBA. O ácido *p*-cumarico tem demonstrado atividade antioxidante, antitumoral em células de câncer de mama e atividade antimicrobiana, contra várias bactérias e fungos patógenos (HELENO et.al., 2015). Já a rutina também encontrada nesta pesquisa, é conhecida por ser um bioflavonoide hidrossolúvel, que tem propriedades antioxidantes (BECHO et.al., 2009).

A quantificação dos metabólitos acima aconteceu pelo uso de padrões químicos, mas estes não são os compostos majoritários na planta, como pode-se observar pelos cromatogramas de AV-SBA e AV-SBH (Figura 2 A e B). Os compostos majoritários (da classe dos flavonoides), infelizmente não puderam ser quantificados pela falta de padrões específicos para estes. No entanto, devido a sua abundância, estes flavonoides podem ser facilmente extraídos, isolados e testados separadamente, a fim de elucidar sua capacidade como fitoterápicos, agindo por exemplo, como antitumoral e antifúngico, propriedades já atribuídas para esta classe de compostos.

6. CONCLUSÃO

Após as análises dos resultados obtidos com esta pesquisa, pode-se concluir que:

- Os extratos aquosos e hidroalcoólicos de *A. virgata* apresentaram composição química semelhante, mas abundância de compostos diferentes. AV-SBH apresentou como pico majoritário a hoffmaniacetona (pico **15**), sendo identificado pela primeira como composto em maior quantidade para *A. virgata*, e, AV-SBA, apresentou campferol/luteolina diglicosídeo (pico **8**) em maior concentração, composto este, descrito pela primeira vez na planta.

- Cada uma das frações obtidas após o fracionamento líquido-líquido apresentou compostos majoritários diferentes entre si. Em AV-SBH-AcEt e AV-SBA-AcEt, os principais metabólitos identificados ficaram dentro das classes das saponinas polares e flavonoides, picos **28** (betulina) e **26** (n.i.). Já em AV-SBH-BuOH e AV-SBA-BuOH, foram constatados flavonoides e compostos fenólicos, presentes principalmente nos picos **8** (campferol/luteolina diglicosídeo), **15** (hoffmaniacetona), **17** (rutina), **18** (ácido clorogênico). As frações aquosas, AV-SBH-Aq e AV-SBA-Aq retiveram em maior concentração os compostos polares (incluindo açúcares) e flavonoides ricos em açúcares, com picos similares aos extratos de origem. Como o solvente CHCl₃ interage melhor com compostos extremamente apolares, apenas AV-SBH foi submetida para fracionamento, onde apresentou retenção de lipídeos, e saponinas apolares

- Dos compostos que foram quantificados pelo uso de padrão, os majoritários foram o ácido *p*-cumarico e rutina para AV-SBH e AV-SBA.

- Durante esse estudo, foram encontrados diversos componentes que já tiveram suas atividades biológicas descritas e comprovadas, contudo, alguns compostos majoritários descritos aqui, não haviam sido relatados anteriormente para *A. virgata*. Estes compostos podem ser futuramente isolados e testados quanto às suas atividades biológicas.

7. REFERÊNCIAS

- BASSOLS, G., GURNI, A., 1996. **Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular Latinoamericana**. Dominguezia 13, 7–24.
- BORELLA, J. DUARTE, D. NOVARETTI, A. MENEZES JR., A. FRANÇA, S. RUFATO, C. SANTOS, P. VENEZIANI, R. LOPES, N. **Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona**. Revista brasileira de farmacognosia. Vol. 16, Nº 4. João Pessoa, Brasil. 2006.
- BRAGA, Carla. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás. Brasília. 2011. Disponível em: http://bdm.unb.br/bitstream/10483/1856/1/2011_CarladeMoraisBraga.pdf. Acesso em 19 nov. 2019.
- MONTEIRO, S. BRANDELLI, C. **Farmacobotânica - aspectos teóricos e aplicação**. Editora ARTMED. 1^a ed. Porto Alegre. 2017.
- COUTINHO, M. MUZITANO, M. COSTA, S. **Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório**. Revista virtual de Química. Vol. 1, Nº 3. Rio de Janeiro. 2009. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/51> . Acesso em 21 nov. 2019.
- CVEK, J. MEDIĆ-ŠARIĆ, M. VITALI, D. VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I. ŠMIT, Z. TOMIĆ, S. **The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures**. Journal of Apicultural Research. Vol. 47, Nº 1, p. 35-45. Croácia. 2007.
- DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. **UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing**. Food Chemistry. Vol. 129, p. 1453-1461, 2011.
- EL-SHEMY, H. ABOUL-ENEIN, A. ABOUL-ENEIN, K. FUJITA, K. **Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types**. Plos One. Califórnia. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000178> . Acesso em: 12 dez. 2019.
- FARNSWORTH, N. R. & MORRIS, R.W. **Higher plants – the sleeping giant of drug development**. Amer. J. Pharmacy., 147: 46-52, 1976
- FAVORITO, Shelly. **Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção**. 2009. 83 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/88132>. Acesso em: 12 dez. 2019.
- FERREIRA, Elayne. **Avaliação da composição química e atividades biológicas de sete espécies de plantas cultivadas no nordeste do Brasil**. Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Química. Fortaleza. 2012. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/13710/1/2012_dis_ebferreira.pdf. Acesso em 19 nov. 2019.

- FLAMBÓ, Diana. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2013. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>. Acesso em 22 nov. 2019.
- FREIRE, M. F. I. **Plantas medicinais: a importância do saber cultivar**. Revista científica eletrônica agronomia – ISSN 1677- 0293 periodicidades semestral – ano III. 5 ed., 2004.
- VEIGA JR, G. PINTO, A. MACIEL, M. **Plantas medicinais: cura segura?** Química Nova. Vol. 28, Nº 3. São Paulo. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>. Acesso em: 12 dez. 2019.
- GIL, A. VAN BAREN, C. LIRA, P. BANDONI, A. **Identification of the Genotype from the Content and Composition of the Essential Oil of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora Palau*)**. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 55. Buenos Aires. 2007.
- GOBBO Neto, L.; LOPES, N. P. **Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites**. Química Nova. vol. 30. n. 2. São Paulo. mar/abr 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026&lng=en&nrm=iso. Acesso em 19 nov. 2019.
- HARAGUCHI, L. CARVALHO, O. **Plantas medicinais**. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem. Vol. 1. São Paulo. 2010. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/meio_ambiente/arquivos/plantas_med_web.pdf. Acesso em 12 dez. 2019.
- HEINZMANN, B. BARROS, F. **Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Saúde. Santa Maria. Vol 33, Nº 1. P. 43-48. 2007 Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasaude/article/view/6463/3931>. Acesso em 19 nov. 2019.
- LEITE, J. P. V. **Química dos produtos naturais: uma abordagem biossintética**. Fitoterapia - bases científicas e tecnológicas. 1 ed. Editora Atheneu, São Paulo, 2009, p. 47-98.
- MACIEL, M. PINTO, A. VEIGA JR, V. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química nova. Vol. 25, nº 3. São paulo. 2002.
- MARTINS, E. R., FIGUEIREDO, L. S. **Cultivo de plantas medicinais**. Fitoterapia - bases científicas e tecnológicas. 1 ed. Editora Atheneu, São Paulo, 2009, p. 143-168.
- MELO, J.I.M. **Verbenaceae**. Revista Caatinga, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010. Bahia.
- METCALFE, R. CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Wood Structure and Conclusions of the General Introduction. Volume II. 2nd edition, p. 297. Clarendon Press, Oxford. 1983.
- MONTANARI JR., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. UNICAMP. 2002. Disponível no site: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>. Acesso em 19 nov. 2019.
- MONTANARI, Ricardo. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. LOCUS UFV. Viçosa. 2010. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/213>. Acesso em 19 nov. 2019.

- OLIVEIRA, C. SILVA, C. FERREIRA, H. LEMES, G. SCHMITT, E. **Kauranes, phenylethanoids and flavone from *Aloysia virgata***. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 33, Nº 11. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197805001067>. Acesso em 21 nov. 2019.
- PACHÚ, Clésia. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. Universidade Federal de Campina Grande. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Tese (doutorado). Paraíba. 2007. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp110643.pdf>. Acesso em 19 nov. 2019.
- PARANAGUÁ, Patricia. ***Aloysia virgata***. Instituto de Pesquisas Ecológicas. 2015. Disponível em: <http://flora.ipe.org.br/sp/141> Acesso em 19 nov. 2019.
- PAULA, E. PINTO, P. AMOROZO, M. FURLAN, M. **Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil**. *Acta Botânica Brasileira*. Vol. 20, Nº 4 São Paulo. 2006.
- PEREIRA, R. CARDOSO, M. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes**. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, Nº 4. p. 146-152. Brasil. 2012.
- PERES, Luciano. **Metabolismo secundário**. Faculdade Integrado de Campo Mourão. Campo de Mourão. 2013. Disponível em: <https://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Metabolismo-Secund%C3%A1rio/32755963.html>. Acesso em 25 nov. 2019.
- SALIMENA, F. R. G.; THODE, V.; MULGURA, M.; O'LEARY, N.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S. **Verbenaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.
- SALLES, Helia. **Aplicação da cultura *in vitro* à produção de óleos essenciais e seu potencial econômico em Portugal**. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s. Campinas. Vol.17, Nº 4. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s2/1516-0572-rbpm-17-4-s2-0992.pdf>. Acesso em 19 nov. 2019.
- SANTOS, A. NUNES, T. **Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. Vol. 17, Nº 4. Botucatu, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000600980. Acesso em 19 nov. 2019.
- SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. *Farmacologia - da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, p. 403-434.
- SCHIMIDT, P.C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. **Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavoidgehaltes von *Passiflorae herba***. *Deutscher Apotheker Zeitung*., v. 47, p. 17-26, 1993.
- SKIPSKI, V. P. **Thin layer chromatography of neutral glycolipids**. *Methods in Enzymology*, v. 35, p. 396-425, 1975.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. **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).

SOUZA, Wesley Mauricio. **Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae – (agoniada).** Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/c635/e41a767019383f28463538276ef7537edbad.pdf>. Acesso em 12 dez. 2019.

TROVATI, G. CHIERICE, G. SANCHES, E. GALHIANE, M. **Essential Oil Composition of *Aloysia gratissima* From Brazil.** Journal of Essential Oil Research. São Paulo. Vol. 21. 2009.

VANDRESEN, F. SCHMITT, E. KATO, L. OLIVEIRA, C. AMADO, C. SILVA, C. **Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 20, Nº 3. Brasil. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n3/a05v20n3>. Acesso em 21 nov. 2019.

VIEGAS, C. BOLZANI, V. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, Vol. 29, Nº. 2, 326-337, 2006.

WASOWSKY, Cristina. MARDER, Mariel. **Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*.** Elsevier. Buenos Aires. 2010. Disponível em: <https://www.elsevier.com/de-de>. Acesso em 19 nov. 2019.