

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ/UNICENTRO
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEL/UEPG/UNICENTRO

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES

ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA *Verbena minutiflora*
(*VERBENACEAE*)

GUARAPUAVA
2015

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA *Verbena minutiflora*
(*VERBENACEAE*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em química analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Coorientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA
2015

S676e Soares, Kelly Cristina Nogueira
Estudo químico e farmacológico da *Verbena minutiflora* (verbenaceae) /
Kelly Cristina Nogueira Soares. -- Guarapuava, 2016.
xix, 158 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla
associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química,
2016

Orientadora: Sueli Pércio Quináia
Coorientadora: Yohandra Reyes Torres
Banca examinadora: Sandro Xavier de Campos, Adelmo Lowe Pretzch,
Marcos Roberto da Rosa, Vanderlei Aparecido de Lima

Bibliografia

1. Química. 2. Níquel. 3. Aditivos orgânicos. 4. Eletrodeposição. 5.
Nucleação.. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

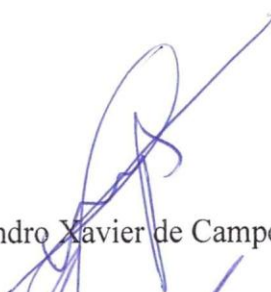
CDD 540

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA VERBENA MINUTIFLORA
(VERBENACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor.

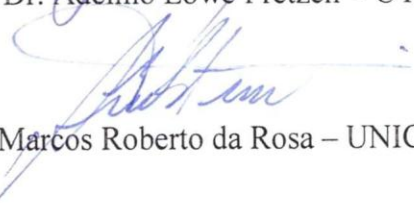
Aprovado em 19 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos - UEPG



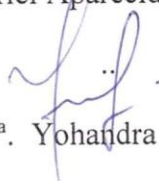
Prof. Dr. Adelmo Lowe Pretzch - UTFPR



Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa – UNICENTRO



Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima – UTFPR



Profª. Drª. Yohandra Reyes Torres

Coorientadora



Profª. Drª. Sueli Pécio Quináia

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao marido Fabio, pelo amor,
incentivo e dedicação a nossa família.

Ao meu filho Matheus, pelo carinho, alegria e compreensão.

Aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional em todos os
momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me dado força e coragem para nunca desistir, por sempre ter me iluminado e por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me ajudaram de muitas formas no desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Dra. Sueli Pércio Quináia e a Dra. Yohandra Reyes Torres, minhas estimadas orientadoras, agradeço pela oportunidade, apoio, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo de vida e perseverança.

À professora Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, por disponibilizar seu laboratório na UNICAMP, ao João, muito obrigada por sua dedicação na realização das medidas por espectrometria de massas.

À Daiane e ao Karlos, meus amigos, que sempre colaboraram de forma imprescindível para o meu trabalho, agradeço pela convivência, risadas, apoio, companheirismo e substancial incentivo.

Aos meus amigos, Cristiane, Jéssica, Felipe, Luciana e Camila que sempre colaboraram de forma valorosa com meu trabalho.

À Faculdade Guairacá, pelo imenso apoio e por disponibilizar seus laboratórios para a realização das atividades biológicas.

A todos os colegas e docentes do curso, pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho.

Posso todas as coisas em Deus que me fortalece.

Filipenses 4:13

RESUMO

Verbena minutiflora (Verbenaceae) é uma planta conhecida popularmente como gervão, muito consumida como infusão (chá) e é frequentemente utilizada para o tratamento de diversas doenças, no entanto, até o momento não existe validação química e farmacológica que subsidie as suas aplicações terapêuticas. A análise da composição química, teor de fenólicos totais, flavonoides e da atividade antioxidante nesta espécie é de grande importância. As partes aéreas da *V. minutiflora* (folhas, flores e caules) e infusões foram monitoradas por quatro anos consecutivos. Os extratos etanólicos da folha e flor apresentaram em média teores de fenólicos e flavonoides significativamente maiores que o extrato etanólico do caule e da infusão independentemente do ano de coleta, mas a infusão apresentou um potencial antioxidante. A composição química foi elucidada por meio de HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS, os fenilpropanoides, verbascosídeo e isoverbascosídeo e o iridoide hastatosídeo foram identificados através da interpretação e comparação de seus dados de UV e de ESI-MS/MS com a literatura. Um estudo de validação *in house* demonstrou boa exatidão e precisão para determinar os compostos bioativos em *V. minutiflora* por HPLC-DAD. O teor de fenilpropanoides variou nos extratos (para folhas 139,70 - 221,20 mg/g, flores 106,43-227,22 mg/g, para caules 42,18 - 56,48 mg/g). O verbascosídeo estava em maior concentração nos extratos de folhas (87,66 - 136,16) mg/g e flores (58,12 - 148,96) mg/g do que nos caules (19,24-24,62) mg/g. Iridoides em extratos foram: folhas (46,60-54,79) mg/g, flores (55,88 - 93,87) mg/g e caules (40,05 a 61,74) mg/g. Altos níveis de iridoides (314,70 - 415,10) µg/mL, fenilpropanoides (1996,39 - 2.674,13) µg/mL e verbascosídeo (1029,38 - 1.456,42 µg/mL) em infusões corroboram para o uso popular de consumir *V. minutiflora*. O conteúdo de íons metálicos apontou que a *Verbena minutiflora* é rica em K, Ca, Na e Mg. A análise no modelo de diurese aguda em ratos demonstrou que a fração acetato de etila e a infusão da *Verbena minutiflora* possuem atividade diurética.

ABSTRACT

Verbena minutiflora (Verbenaceae) is popularly known as gervão. It is consumed as an infusion for the treatment of various diseases. However, so far there is no pharmacological or chemical validation to support its therapeutic applications. Therefore, the analysis of the chemical composition and pharmacological activities of *V. minutiflora* is of paramount importance. In this study, extracts and infusions of the aerial parts of *V. minutiflora* (leaves, flowers and stems) were analysed during four consecutive years. Extracts of leaves and flowers had significantly higher phenolic content and antiradical capacity than stems regardless of the year of collection. The infusions of leaves presented constant composition throughout the studied period with high levels of bioactive compounds and high antioxidant potential. The chemical composition was elucidated by HPLC-DAD and LC-ESI-MS/MS. The phenylpropanoids, verbascoside and isoverbascoside and the iridoid hastatoside were identified by interpretation and comparison of its UV and ESI-MS/MS spectra with data from literature. An *in house* validation study showed good accuracy and precision to determine the bioactive compounds in *V. minutiflora* by HPLC-DAD. Phenylpropanoids varied in extracts (leaves 139.70 to 221.20 mg/g, flowers 106.43 to 227.22 mg/g, stems 42.18 to 56.48 mg/g). Verbascoside was in higher concentration in extracts of leaves (87.66 – 136.16) mg/g and flowers (58.12 – 148.96) mg/g than in stems (19.24 – 24.62) mg/g. Iridoids in extracts were: leaves (46.60 – 54.79) mg/g, flowers (55.88 – 93.87) mg/g and stems (40.05 to 61.74) mg/g. High levels of iridoids (314.70 – 415.10) µg/mL, phenylpropanoids (1996.39 – 2674.13) µg/mL and verbascoside (1029.38 – 1456.42 µg/mL) in infusions support the popular consume of *V. minutiflora*. The content of metal ions pointed out that *Verbena minutiflora* is rich in K, Ca, Na and Mg. The analysis in acute diuresis model in rats has shown that ethyl acetate fraction and infusion *Verbena minutiflora* has diuretic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Principais compostos encontrados em plantas do gênero <i>Verbena</i>	27
Figura 1.2 – Estrutura química dos ácidos 1',5'-O-dicafeoilquinico e 4',5'-O-dicafeoilquinico.....	29
Figura 1.3 – Aspecto morfológico da <i>Verbena littoralis</i>	30
Figura 1.4 – Estrutura química dos iridoides isolados das partes aéreas da <i>Verbena littoralis</i>	31
Figura 1.5 – Partes aéreas da <i>Verbena minutiflora</i> (A e B), Foco das flores (C)	32
Figura 2.1 – Principais fatores que podem influenciar na variação dos metabólitos secundários.....	43
Figura 2.2 – Etapas do Processo de Extração Metanólica das partes aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	48
Figura 2.3 – Etapas do Processo de Fracionamento do Extrato Metanólico da <i>Verbena minutiflora</i>	49
Figura 2.4 – Etapas do Processo de Extração Etanólica das partes aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	50
Figura 2.5 – Etapas do Processo do Preparo das Infusões da <i>Verbena minutiflora</i>	50
Figura 2.6 – Etapas da determinação de fenólicos totais nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>	52
Figura 2.7 – Etapas da determinação de flavonoides nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>	53
Figura 2.8 – Etapas da determinação da atividade antirradicalar nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>	54
Figura 2.9 – Reação entre o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu e os compostos fenólicos.	58
Figura 2.10 – Curva analítica para quantificação de fenólicos totais nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>	58
Figura 2.11 – Reação de complexação entre o cloreto de alumínio e os flavonoides.	59
Figura 2.12 – Curva analítica para quantificação de flavonoides nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>	60

Figura 2.13 – Reação de transferência de um átomo de hidrogênio ao radical DPPH•.....	60
Figura 2.14 – Descoloração da solução durante a reação entre o DPPH• e as espécies ativas presente na amostra em diferentes concentrações.	61
Figura 2.15 – Curva analítica para a determinação da atividade antirradicalar.....	62
Figura 2.16 – Interação entre os fatores Ano de coleta e Parte da planta nos teores médios de fenólicos, flavonoides e capacidade antirradicalar IC ₅₀ (mg/mL) nas amostras de <i>Verbena minutiflora</i>	68
Figura 2.17 – ESI(-)-MS do extrato etanólico das flores da <i>Verbena minutiflora</i> coletadas de 2009 a 2012.	71
Figura 2.18 – ESI(-)-MS do extrato etanólico das folhas, flores e caule da <i>Verbena minutiflora</i> coletada no ano de 2010.....	72
Figura 2.19 – Cromatograma do extrato etanólico das folhas da <i>Verbena minutiflora</i> coletada no ano de 2010 nos comprimentos de onda 240 e 330 nm e o seu espectro UV dos picos cromatográficos destacados.	76
Figura 2.20 – Espectro ESI(-)-MS e possíveis fragmentações para (A) iridoide hastatosídeo e (B) fenilpropanoide verbascosídeo.....	78
Figura 3.1 – Cromatograma a 330 nm e espectro UV do pico com tempo de retenção 20.1 minutos do padrão Verbascosídeo (A) e das amostras das Folhas 2010 (B), Flores 2011 (C) e Caule 2012 (D) da <i>Verbena minutiflora</i>	96
Figura 3.2 – Cromatograma a 240 nm e espectro UV do pico com tempo de retenção 9.8 minutos do padrão Geniposídeo (A) e das amostras das Folhas 2010 (B), Flores 2011 (C) e Caule 2012 (D) da <i>Verbena minutiflora</i>	98
Figura 3.3 – Curva analítica para determinação de Verbascosídeo e teor de fenilpropanoides em extratos de <i>Verbena minutiflora</i> por HPLC-DAD.....	100
Figura 3.4 – Curva analítica para determinação de Geniposídeo e teor de iridoides em extratos de <i>Verbena minutiflora</i> por HPLC-DAD.....	100
Figura 3.5 – Os teores de verbascosídeo (A), fenilpropanoides totais (B) e iridoides (C) na <i>Verbena minutiflora</i>	105
Figura 4.1 – Média das replicatas e limite de confiança para cada procedimento de digestão da planta avaliada.....	125
Figura 4.2 – Pca para o teor de minerais em amostras da <i>Verbena minutiflora</i> (A) Variáveis (B) Amostras.....	128

Figura 5.1 – Avaliação da Atividade diurética do Extrato metanólico bruto da <i>Verbena minutiflora</i> em ratos....	147
Figura 5.2 – Avaliação da Atividade diurética da Fração Acetato de Etila da <i>Verbena minutiflora</i> em ratos....	148
Figura 5.3 – Avaliação da Atividade diurética da infusão da <i>Verbena minutiflora</i> em ratos....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Teor de Fenólicos Totais, Flavonoides e Capacidade Antirradicalar do extrato metanólico, frações e infusão das partes aéreas de <i>Verbena minutiflora</i> .	63
Tabela 2.2 – Teor de Fenólicos Totais, Flavonoides e Capacidade Antirradicalar encontrados anualmente nas partes aéreas de <i>Verbena minutiflora</i> .	66
Tabela 2.3 – Dados Meteorológicos dos anos de estudo cedidos pelo IAPAR para o mês de novembro de cada ano considerado no estudo.	70
Tabela 2.4 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os dados meteorológicos e os compostos presentes na <i>Verbena minutiflora</i> .	70
Tabela 3.1 – Parâmetros de Regressão Linear para Verbascosídeo e Geniposídeo.	99
Tabela 3.2 – Estudo de Precisão para Determinação de Verbascosídeo, Fenilpropanoides e Iridoides em <i>Verbena minutiflora</i> .	102
Tabela 3.3 – Ensaio de Exatidão para diferentes amostras para Verbascosídeo e Geniposídeo.	103
Tabela 4.1 – Parâmetros instrumentais para determinação de metais por espectrometria de absorção atômica (FAAS).	122
Tabela 4.2 – Parâmetros instrumentais para o ICP-OES Optima 8000.	123
Tabela 4.3 – Resultados obtidos com a otimização de experimento para o preparo da amostra da <i>Verbena minutiflora</i> .	124
Tabela 4.4 – Teor de minerais encontrados na <i>Verbena minutiflora</i> por FAAS.	127

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	<i>Graus Celsius</i>
ANOVA	<i>Análise de Variância</i>
ANVISA	<i>Agencia Nacional de Vigilância Sanitária</i>
ACP	<i>Análise da Componente Principal</i>
CP	<i>Componente Principal</i>
CCD	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>
CG	<i>Cromatografia Gasosa</i>
CV	<i>Coeficiente de Variação</i>
CRONAT	<i>Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais</i>
DEQ	<i>Departamento de Química</i>
DPPH•	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
ESI	<i>Ionização por eletrospray</i>
ESI-MS	<i>Espectrometria de massas com Ionização por eletrospray</i>
ESI-MS/MS	<i>Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray</i>
ESI(-)-MS	<i>Espectrometria de massa com ionização por eletrospray no modo negativo</i>
FAAS	<i>Espectrometria de absorção atômica em chama</i>
GC-MS	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>
GFAAS	<i>Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite</i>
HPLC	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
HPLC-DAD	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos</i>
HPLC-MS	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de Massas</i>
ICP-MS	<i>Espectrometria de massas com plasma indutivamente</i>

	<i>acoplado</i>
IC ₅₀	<i>Inibição da Concentração em 50%</i>
LABGATI	<i>Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação</i>
LQ	<i>Limite de Quantificação</i>
LD	<i>Limite de Detecção</i>
LC-MS	<i>Cromatografia Líquida acoplada com espectrometria de massas</i>
LC-MS/MS	<i>Cromatografia Líquida acoplada com espectrometria de massas seqüencial</i>
<i>m/z</i>	<i>Razão massa/carga</i>
OMS	<i>Organização mundial da Saúde</i>
RS%	<i>Radical Scavenging Percentage</i>
RSD	<i>Desvio Padrão Relativo</i>
UNICENTRO	<i>Universidade Estadual do Centro-Oeste</i>
UPLC-MS	<i>Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada com espectrometria de massas</i>
UV-VIS	<i>Ultravioleta – Visível</i>
V	<i>Volt</i>
µL	<i>Micro-litro</i>
<i>V. minutiflora</i>	<i>Verbena minutiflora</i>
<i>V. officinalis</i>	<i>Verbena officinalis</i>

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Fingerprints obtidos por ESI-MS para o Extrato Etanólico das Folhas, Flores e Caules coletados nos anos de 2009 a 2012 da <i>Verbena minutiflora</i>	155
Anexo 2 – Cromatograma das infusões das folhas da <i>Verbena minutiflora</i> coletada no ano de 2010.....	157
Anexo 3 – ESI(-)-MS para Verbascosídeo e Compostos Relacionados Estruturalmente no extrato etanólico das Flores, coletada no ano de 2010 da <i>Verbena minutiflora</i>	159
Anexo 4 – Artigo científico – Variability and Chemical Composition of Aerials Parts of <i>Verbena minutiflora</i>	160
Anexo 5 – Artigo científico – Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of aerial parts of <i>Verbena minutiflora</i> : in house validation of an HPLC-DAD method	160

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	21
1. Introdução.....	22
1.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos	22
1.1.2. Gênero <i>Verbena</i>	26
1.2. Objetivos	33
1.2.1. Objetivo Geral.....	33
1.2.2. Objetivos Específicos	33
1.3. Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VARIABILIDADE DA <i>Verbena minutiflora</i> (VERBENACEAE)	40
2.1. Composição Química.....	41
2.1.2. Variabilidade Química	42
2.2. Objetivos	47
2.2.1. Objetivo Geral	47
2.2.2. Objetivos Específicos	47
2.3. Materiais e Métodos	48
2.3.1. Planta.....	48
2.3.2. Preparações dos Extratos e Frações para caracterização química e para realização de testes <i>in vivo</i>	48
2.3.3. Preparo dos Extratos e Infusões para o Estudo da Variabilidade do Perfil Químico da <i>Verbena minutiflora</i>	49
2.3.4. Medidas Espectrofotométricas	51
2.3.4.1. Determinação do Teor de Fenólicos Totais	51
2.3.4.2. Determinação do Teor de Flavonoides.....	52
2.3.4.3. Avaliação da Atividade Antirradicalar	53
2.3.5. Análise Qualitativa por HPLC-DAD de Extrato, Frações e Infusões Provenientes das Partes Aéreas de <i>Verbena minutiflora</i>	55

2.3.6. Análises Qualitativas por ESI-MS e LC-MS/MS.....	56
2.3.7. Dados meteorológicos.....	56
2.3.8. Análise Estatística.....	57
2.4. Resultados e Discussões	57
2.4.1. Composição Química das partes aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	57
2.4.1.1. Teores de Compostos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antiradicalar em Extrato Metanólico, Frações e Infusão de <i>Verbena minutiflora</i>	57
2.4.2. Variabilidade do Perfil Químico das partes aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	65
2.4.2.1. Teores de Compostos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antiradicalar em Extratos Etanólicos e Infusões de <i>Verbena minutiflora</i> coletada em quatro anos consecutivos	65
2.4.3. Composição Química e Análise da Variabilidade Anual das Partes Aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	71
2.4.4. Identificação dos Principais Constituintes presentes nas Partes Aéreas da <i>Verbena minutiflora</i>	75
2.5. Conclusões	80
2.6. Referências Bibliográficas	81
CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DE IRIDOIDES E FENILPROPANOIDES EM EXTRATOS E INFUSÕES DE <i>Verbena minutiflora</i> POR HPLC-UV: VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL	86
3.1. Validação de Métodos Analíticos.....	87
3.2. Objetivos	90
3.2.1. Objetivo Geral	90
3.2.2. Objetivos Específicos	90
3.3. Materiais e Métodos	91
3.3.1. Preparo dos Extratos e Infusões	91
3.3.2. Análises por HPLC-DAD	91

3.3.3. Validação Intralaboratorial do Método HPLC-DAD para Determinação de Fenilpropanoides e Iridoides nas amostras da <i>Verbena minutiflora</i>....	91
3.3.3.1. Amostras	91
3.3.3.2. Padrões Analíticos	91
3.3.3.3. Preparo das Soluções das Amostras	91
3.3.3.4. Validação do Método de Determinação do Verbascosídeo e derivados fenilpropanoides e de Iridoides em <i>Verbena minutiflora</i>.....	92
3.3.3.5. Seletividade	92
3.3.3.6. Linearidade	92
3.3.3.7. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	93
3.3.3.8. Precisão	93
3.3.3.9. Exatidão	93
3.3.3.10. Quantificação de Verbascosídeo e Iridoides em amostras de <i>Verbena minutiflora</i>.....	94
3.3.4. Análise Estatística.....	94
3.4. Resultados e Discussões	94
3.4.1. Validação do Método Cromatográfico para Determinação Quantitativa de Verbascosídeo e seus derivados e Iridoides em extratos de <i>Verbena minutiflora</i>	94
3.5. Conclusões	109
3.6. Referências Bibliográficas	110
CAPÍTULO 4. ANÁLISE DO TEOR DE MINERAIS DA	114
<i>Verbena minutiflora</i> (VERBENACEAE)	114
4.1. Introdução.....	115
4.2. Objetivos	120
4.2.1. Objetivo Geral.....	120
4.2.2. Objetivos Específicos	120
4.3. Materiais e Métodos	121

4.3.1. Otimização do processo de digestão da <i>Verbena minutiflora</i>	121
4.3.2. Avaliação da Variação Mineral na <i>Verbena minutiflora</i>	121
4.4. Resultados e Discussões	123
4.4.1. Avaliação das condições para Otimização do processo de digestão da <i>Verbena minutiflora</i>	123
4.4.2 Análise da Variação Mineral na <i>Verbena minutiflora</i>	126
4.5. Conclusões	130
4.6. Referências Bibliográficas	131
CAPÍTULO 5. ANÁLISE DA ATIVIDADE DIURÉTICA DA	134
<i>Verbena minutiflora</i> (VERBENACEAE)	134
5.1. Introdução	135
5.1.2. Pressão Arterial	137
5.1.3. Mecanismos fisiológicos que atuam no controle da pressão arterial	138
5.1.4. Endotélio vascular e o controle do tônus vascular	140
5.1.5. Tratamento da Hipertensão	142
5.2. Objetivos	144
5.2.1. Objetivo Geral	144
5.2.2. Objetivos Específicos	144
5.3. Metodologia	145
5.3.1. Avaliação da Atividade Diurética	145
5.3.2. Animais	146
5.3.3. Análise Estatística	146
5.4. Resultados e Discussões	147
5.5. Conclusões	150
5.6. Referências Bibliográficas	151
ANEXOS	155

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. Introdução

1.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos

Há milhares de anos, o homem vem utilizando as plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias (Gurib-Fakim, 2006). O uso de plantas medicinais na cura de enfermidades é uma forma antiga de tratamento fundamentada em informações provenientes de sucessivas gerações, os povos mais antigos, através de observações e experimentações sabiam que algumas plantas continham princípios ativos com poder curativo no combate às doenças (Dantas & Guimarães, 2006; Pinto et al., 2006; Tresvenzol et al., 2006; Ceolin et al., 2011; Pires et al., 2014).

A cultura popular brasileira é particularmente rica na utilização de plantas medicinais. O Brasil possui uma grande biodiversidade vegetal e conhecimento popular em relação as plantas, é o país com a maior biodiversidade do planeta. Estimativas indicam que o número de espécies de plantas conhecidas no Brasil é de aproximadamente 210.000, que é igual a aproximadamente 13% da biota do mundo (Mendes & Carlini, 2007, Nascimento, et al., 2011).

Uma pesquisa da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicou que cerca de 70-80% da população mundial dependem da medicina não-convencional, principalmente através de plantas medicinais para os cuidados primários à saúde e muitas vezes é o único recurso terapêutico disponível para determinadas comunidades (Arceusz et al., 2010).

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (Pinto et al., 2006).

Os compostos que atribuem às plantas medicinais suas propriedades terapêuticas são denominados princípios ativos, uma vez que são estes os responsáveis pela ação no organismo exercendo efeito farmacológico. O uso de plantas como medicamento, para o tratamento ou prevenção de doenças, se deve a presença de metabólitos especializados, geralmente de grande valor terapêutico, sintetizados pelas plantas. São inúmeros os exemplos de

medicamentos que foram desenvolvidos, diretos ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, como a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*), o taxol (*Taxus brevifolia*), o quinino (casca da *Chinchona sp*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (Calixto, 2001; Newman et al., 2003; Boldi, 2004). Cerca de 50% das drogas aprovadas durante 1981-2006 foram diretamente ou indiretamente, derivada de produtos naturais (Bonifácio et al., 2014).

As plantas medicinais podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos e o seu uso para o tratamento de diversas doenças vem aumentando em todo o mundo devido à facilidade de acesso e os baixos efeitos colaterais apresentados (Başgel & Erdemoglu, 2006).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (Veiga-Junior et al., 2005).

A importância das plantas medicinais para a população tem sido demonstrada por estudos etnobotânicos realizados em diversas regiões brasileiras, abrangendo os biomas como a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Cada bioma possui diferentes características e uma grande biodiversidade de plantas medicinais com potencial terapêutico que ainda não foram descobertas (Coelho-Ferreira, 2009; Marinho et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Evangelista et al., 2013).

Grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulação industrializada. Em geral, essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa. É cada vez mais frequente o uso de plantas

medicinais. Estas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos (Veiga-Junior et al., 2005).

Atualmente, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, existem relativamente poucas plantas medicinais avaliadas cientificamente, sendo, dessa forma, necessários estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (Veiga-Junior et al., 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *“fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou parte de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes, que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção ou tratamento sintomático de doenças”*. Em razão disso, as plantas medicinais estão cada vez mais sendo valorizadas pelo seu poder terapêutico pesquisado e ratificado pela ciência com isso vem crescendo sua utilização através de recomendações de profissionais da saúde (Arnous, et al., 2005).

Não são considerados como fitoterápicos medicamentos que em sua composição incluam quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas, ou compostos químicos sintéticos de atividade conhecida (ANVISA, 2004).

As plantas medicinais, como recurso terapêutico, despertam o interesse para as investigações no intuito de desenvolver fitoterápicos, de documentar as plantas, compreender como elas são percebidas nas comunidades, identificar a importância delas no contexto da medicina tradicional e de sua incorporação no setor de saúde pública, principalmente na Atenção Primária à Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (Bittencourt et al., 2002; Pires et al., 2014).

Ao reconhecer a importância do uso de plantas medicinais junto à população brasileira, o governo federal legalizou a fitoterapia no Sistema Único

de Saúde (SUS), em 2005. A Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares no SUS foi renomeada, posteriormente, como Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (Brasil 2005; 2006). A PNPMF foi avaliada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que normatizou registros de medicamentos fitoterápicos. As normas da ANVISA foram avaliadas pelo grupo de Carvalho e colaboradores (2011), que atualizou os requisitos para comprovar a segurança e eficácia de medicamentos. A incorporação da prática integrativa da fitoterapia no SUS culminou na necessidade de pesquisas nessa área com o intuito de enriquecer o conhecimento dos profissionais da saúde, além de tornar as práticas fitoterápicas mais seguras e eficazes (Calixto, 2000; Pires et al., 2014).

No Brasil, resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 16 de março de 2004 visam à normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. A Resolução-RDC N° 48 determinam que todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos deverão ser realizados em rede credenciada, os fitoterápicos tradicionais, deverão apresentar, no primeiro protocolo de renovação, uma série de relatórios que atestem a segurança, eficácia e as normas de produção e controle de qualidade. Entre as exigências da Resolução-RDC no. 48 estão à necessidade de controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica (ANVISA, 2004).

Estudos multidisciplinares envolvendo biólogos, químicos e farmacologistas são necessários para que sejam ampliados os conhecimentos das plantas medicinais, como agem, quais são os seus efeitos tóxicos, como seriam suas interações com os medicamentos alopáticos e quais as estratégias mais adequadas para o controle das plantas medicinais (Veiga-Junior et al., 2005).

1.1.2. Gênero *Verbena*

A família *Verbenaceae* compreende aproximadamente 100 gêneros e 2000 espécies, distribuídas por todo mundo, sendo encontrada principalmente nas zonas temperadas, tropicais e subtropicais, dentre eles o gênero *Verbena*, com aproximadamente 250 espécies distribuídas preferencialmente nas regiões tropicais e temperadas da América. Espécies de *Verbena* são encontradas na região andina do Chile ao Peru, Guianas, Venezuela, Argentina e regiões Sudeste e Sul do Brasil (Bonzani et al., 2003; Souza et al., 2005).

No Brasil podem – se encontrar pelo menos 14 gêneros desta família, dos quais os representantes desta vão desde árvores de grande porte como a *Tectoma grandis* L., até ervas como a *Verbena officinalis* L., sendo o gênero *Verbena* considerado o maior (O'Leary et al., 2010).

As propriedades medicinais desta família são destacadas como digestiva, antidiabética, antimalárica, antiúlcera e antiinflamatória (Leitão et al., 2009; Dornas et al., 2009; Mariath et al., 2009; Jesus et al., 2009).

As plantas do gênero *Verbena* crescem amplamente em todas as regiões de diferentes temperaturas em todo mundo, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias (Akerreta et al., 2007).

O gênero *Verbena* compreende plantas medicinais usadas tradicionalmente por causa dos seus efeitos diuréticos, expectorantes e efeitos anti-reumáticos (Schönbichler et al., 2013). Para extratos de plantas do gênero *Verbena* já foram relatadas atividades antibacteriana (Hernández et al., 2000), antifúngica (Casanova et al., 2008), anti-inflamatória (Deepak & Handa, 2000; Calvo, 2006; Speroni et al., 2007), analgésica (Calvo, 2006) e antioxidantes (Casanova et al., 2008; Rehecho et al., 2011; Bilia et al., 2008).

Várias espécies de *Verbena* foram investigadas previamente e foram encontrados metabólitos secundários pertencentes às várias classes químicas, como flavonoides, ácidos fenólicos, iridoides, fenilpropanoides, verbenachalconas e triterpenos. Alguns destes compostos, especialmente os flavonoides demonstraram propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas,

bem como antibacteriana, antiviral, antialérgica, vasodilatadora, antitrombótica e antioxidante (Calvo, 2006, El-Hela et al., 2010).

A planta *Verbena officinalis* L. foi amplamente estudada por diversos pesquisadores, cujos estudos apontam que a principal classe de compostos das plantas deste gênero é a dos fenilpropanóides, sendo o verbascosídeo, juntamente com seus isômeros (isoverbascosídeo e β -OH-verbascosídeo), os compostos mais abundantes. Iridóides como o hastatosídeo e a verbenalina, bem como flavonóides derivados da luteolina e apigenina são também encontrados (Bilia et al., 2008). Todos estes compostos estão representados na figura 1.1.

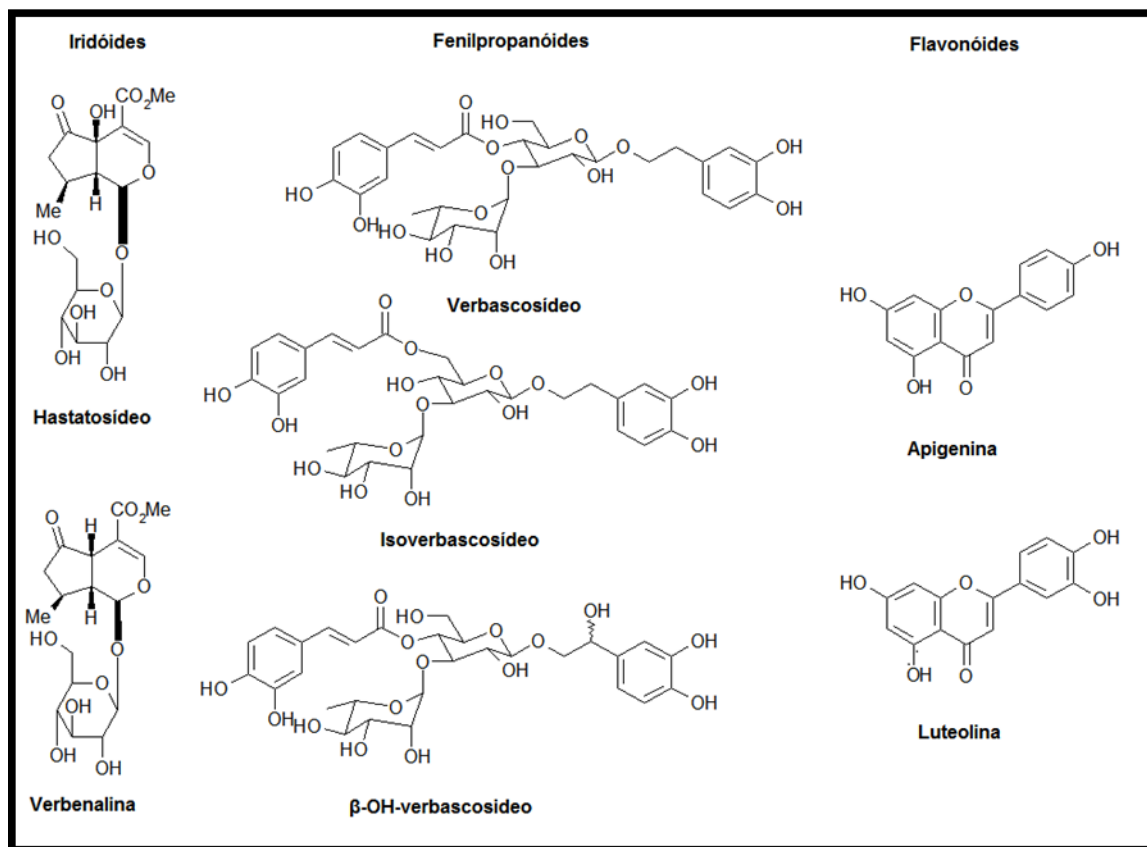


Figura 1.1 – Principais compostos encontrados em plantas do gênero *Verbena*.

O iridoide verbenalina e o fenilpropanoide verbascosídeo são os principais constituintes, além de participar em alguns dos efeitos acima mencionados, a verbenalina promove efeito hepato-protetor e para o verbascosídeo uma atividade neuro-protetora foi provada (Schönbichler et al., 2013).

Estudos nos extratos aquosos de *V. officinalis* demonstraram atividade neuroprotetora. Os efeitos neuroprotetores são aqueles que aumentam o nascimento e permitem a sobrevivência dos neurônios. As análises foram realizadas *in vitro* sobre a cultura de neurônios corticais e com diferentes concentrações dos extratos. Os resultados demonstraram que os extratos aquosos das partes aéreas exibiram uma neuroproteção contra o estresse biológico causado pelo peptídeo β -amiloide, que é conhecido por ser um dos fatores tóxicos que desencadeia a morte dos neurônios na doença de Alzheimer, sugerindo que os compostos presentes na *V. officinalis* podem atuar como agentes que combatem doenças neurodegenerativas (Lai et al., 2006).

O extrato metanólico das folhas de *V. officinalis* demonstrou atividade antiinflamatória quando aplicado em modelos *in vivo*, no teste do edema de pata induzido por carragenina e ação analgésica em modelos de atividade antinociceptiva no teste da formalina. Os ensaios para analisar as propriedades antiinflamatória na forma tópica da espécie vegetal *V. officinalis* mostraram que um preparo tópico com no mínimo 3% de extrato metanólico da planta apresenta efeitos antiinflamatórios e analgésicos, podendo ser utilizado em tratamentos de locais inflamados (Deepak & Handa, 2000; Calvo, 2006).

A atividade antifúngica das folhas de *V. officinalis* foi estudada através da inibição *in vitro* da cultura de *Alternaria alternata*, *Botrytis cynerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*, testadas com três diferentes extratos, algumas frações de extratos e compostos puros. Nenhum dos três extratos demonstrou uma inibição significativa contra a *A. alternata* e *B. cynerea*, sendo o extrato obtido com 50% de metanol o que apresentou maior atividade contra a *P. expansum* e *R. stolonifer* (Casanova et al., 2008).

Extratos aquosos e hidroalcoólicos de *V. officinalis* foram obtidos e caracterizados através da análise por meio de HPLC-DAD e LC-MS permitindo a detecção e identificação de três iridoides, hastatosídeo, verbenalina e

aucubina, quinze flavonoides e quatro derivados de ácidos fenólicos, onde quatro flavonoides e dois derivados de ácidos fenólicos foram identificados pela primeira vez nessa planta, sendo eles respectivamente, scutellarein 7-O-diglucuronide, scutellarin 7-O-glucoronide, pedaltin 6-galactoside, scutellarein 7-glucoside, ácido 1',5'-O-dicafeoilquinico e o ácido 4',5'-O-dicafeoilquinico (Rehecho et al., 2011).

As estruturas químicas dos dois derivados de ácidos fenólicos estão representadas na figura 1.2.

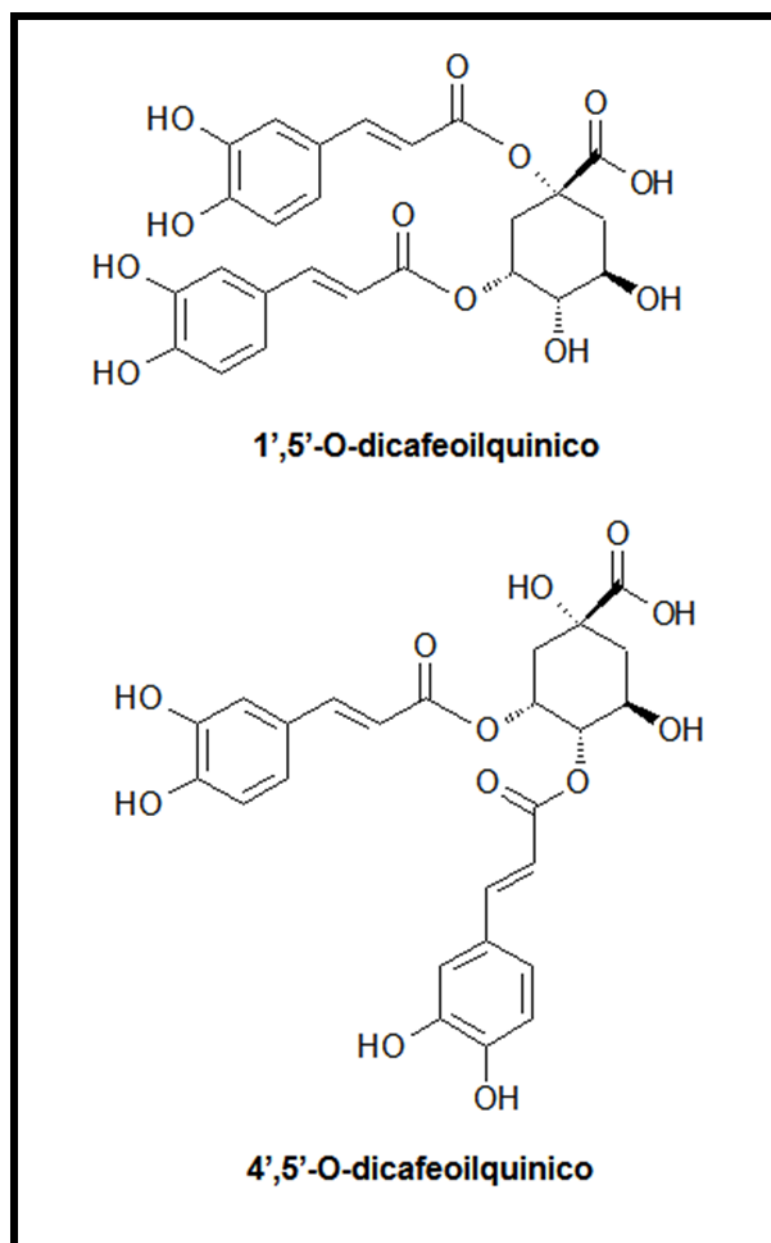


Figura 1.2 – Estrutura química dos ácidos 1',5'-O-dicafeoilquinico e 4',5'-O-dicafeoilquinico

Em relação à atividade antioxidante, o extrato hidroalcoólico das folhas de *V. officinalis* apresentou uma melhor atividade quando comparada com a solução aquosa da mesma. Os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, desempenham um grande papel na atividade antioxidante. O fenilpropanoide verbascosídeo é apontado como o principal composto responsável pela atividade antioxidante de *V. officinalis*, juntamente com os outros compostos que são encontrados em menor proporção como luteolina-7-glucosido, ácidos 1',5'-O-dicafeoilquinico, 4',5'-O-dicafeoilquinico e isoverbascosídeo, onde a atividade antioxidante foi demonstrada anteriormente (Bilia et al., 2008; Rehecho et al., 2011).

Com relação ao estudo da composição mineral dos extratos de *V. officinalis* é relatado que o macronutriente mais abundante presente é o potássio, seguido do fósforo, cálcio e magnésio, enquanto o sódio está em baixa concentração (Rehecho et al., 2011).

A *Verbena littoralis* é considerada o tipo mais comum de *Verbena* encontrada na América do Sul, seu aspecto morfológico é variável e também a sua distribuição, conseqüentemente numerosas categorias infraespecíficas foram reconhecidos e descritos, gerando uma grande quantidade de nomes, considerados sinônimos científicos (O'Leary et al., 2010). A morfologia da *V. littoralis* é muito similar ao da *Verbena minutiflora*, planta que é o objeto de estudo desta pesquisa, o aspecto morfológico da *V. littoralis* é demonstrado na figura 1.3.

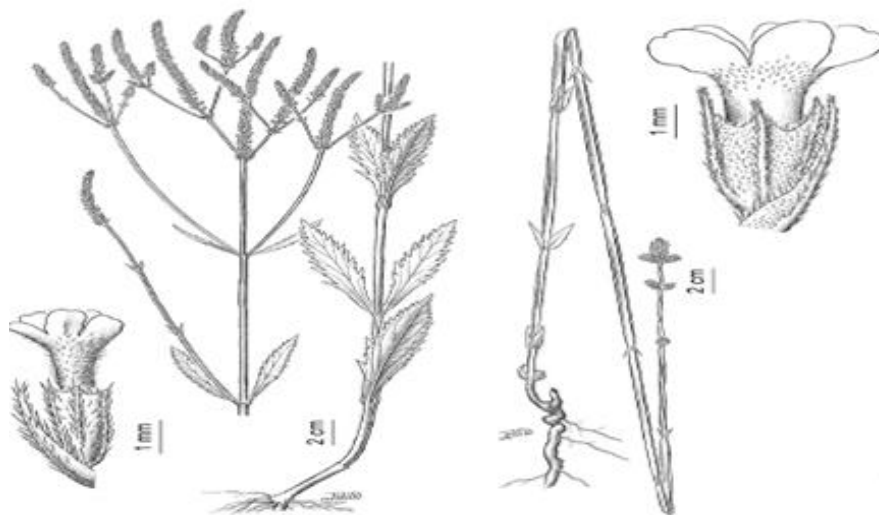


Figura 1.3 – Aspecto morfológico da *Verbena littoralis* (Fonte: O'Leary et al., 2010).

Dois novos iridoides foram isolados das partes aéreas da *V. littoralis* e identificadas por meio de análise de dados espectrais por ressonância nuclear magnética, 6S-hydroxy-8S-methyl-4-methylene-hexahydro-cyclopenta[c]pyran-3-one(1) e 6S,9S-dihydroxy-8S-methyl-4-methylene-hexahydro-cyclopenta[c]pyran-3-one (2) (Castro-Gamboa & Castro, 2004).

Ambos compostos mostraram moderada atividade antibacteriana, realizadas *in vitro* contra bactérias gram-positivas e negativas, bem como atividade peristáltica intestinal moderada *in vivo* em ratos e também apresentaram moderada atividade antioxidante (Castro-Gamboa & Castro, 2004). A estrutura química dos dois novos iridoides esta representada na figura 1.4.

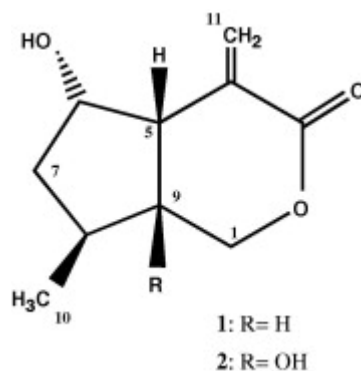


Figura 1.4 – Estrutura química dos iridoides isolados das partes aéreas da *Verbena littoralis*. (Fonte: Castro-Gamboa & Castro, 2004).

A *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (*Verbenaceae*), mostrada nas figuras 1.5 (A) e (B), é uma espécie típica da região sul do país e é conhecida popularmente como gervão. Esta planta é consumida geralmente como infusão (chá). A principal indicação popular é como diurético e também para o tratamento de diversas patologias como a hipertensão. No entanto, inexistente validação química e farmacológica que subsidie suas aplicações terapêuticas popularmente disseminadas. Assim, a caracterização química, qualitativa e quantitativa, dos princípios ativos presentes em espécies de *Verbena* é de grande importância.



Figura 1.5 – Partes aéreas da *Verbena minutiflora* (A e B), Foco das flores (C)
(Fonte: Kelly C. N. Soares, 2009).

Mesmo com a falta de estudos referentes à espécie *V. minutiflora*, devido às plantas do gênero *Verbena* possuem forte efeito farmacológico, a espécie em estudo possui características semelhantes às demais espécies do gênero. Desta forma se faz necessário analisar a composição química desta planta, bem como as propriedades exercidas por esta quando utilizada como fonte para o tratamento de algumas patologias. Estabelecer um padrão de qualidade para a *V. minutiflora* e seus extratos é importante e necessário para garantir o seu uso de forma segura e eficaz.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Considerando que as espécies do gênero *Verbena* são farmacologicamente potentes e que não há estudo químico referente às partes aéreas (folhas, flores, caule) da *Verbena minutiflora*, que são as partes da planta utilizadas com fins medicinais, este trabalho tem como objetivo principal realizar o estudo da composição química e atividade farmacológica das partes aéreas de *Verbena minutiflora*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar e quantificar os principais metabólitos especializados presentes nos extratos e infusões das partes aéreas de *Verbena minutiflora*;
- ✓ Avaliar o potencial antirradicalar, teores de fenólicos totais e flavonoides do extrato, frações e infusões da *Verbena minutiflora*;
- ✓ Investigar a variabilidade do perfil químico de extratos de *Verbena minutiflora*;
- ✓ Validar um método de HPLC-UV para determinação dos principais metabólitos especializados (fenilpropanoides e iridoides) em amostras da *Verbena minutiflora*;
- ✓ Aplicar o método HPLC-UV desenvolvido e validado para a determinação dos teores de compostos bioativos em extratos e infusões de *Verbena minutiflora*;
- ✓ Quantificar minerais essenciais e tóxicos em amostras da *Verbena minutiflora* por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS e espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES);
- ✓ Investigar a atividade diurética aguda do extrato, frações e infusões da *Verbena minutiflora* utilizando modelo de diurese em ratos.

1.3. Referências Bibliográficas

AKERRETA, S.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. First comprehensive contribution to medical ethnobotany of Western Pyrenees. ***Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine***, 3, 26, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao SNVS. Diário Oficial da União. 2004a.

ARCEUSZ, A.; RADECKA, I.; WESOŁOWSKI, M. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. ***Food Chemistry***, v. 120, p. 52–58, 2010.

ARNOUS, H. A.; SANTOS, A. S.; BEINER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro: Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. ***Revista Espaço para a saúde***. Londrina. v.6. n.2, p.1-6. Jun, 2005.

BAŞGEL, S.; ERDEMOĞLU, S.B. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. ***Science of the Total Environment***, v. 359, p. 82–89, 2006.

BILIA, A. R.; GIOMI, M.; INNOCENTI, M.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 46, 463–470, 2008.

BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S.; FALKENBERG, M. B. O uso das plantas medicinais sob prescrição médica: pontos de diálogo e controvérsias com uso popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.89-91, 2002.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. Curr. Opin. **Chem. Biol.**, v.8, p.281-286, 2004.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B. DA.; RAMOS, M. A. D. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014.

BONZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOZA, G. E. Estudio anatómico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Bot.** 74, 31-45, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Proposta de Política de Medicina Natural e Práticas Complementares no SUS, Brasília: Ministério da Saúde, 49p. 2005.

BRASIL. Diário Oficial da União. Decreto 5813, de 22 de junho de 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33 n.2, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Medicamentos fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Editora Argos. pp.297-315, 2001.

CALVO, M. I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 107, 380–382, 2006.

CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; SILVA, L. V. C.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.3, p.467-73, 2011.

CASANOVA, E.; GARCIA-MINA, J.; CALVO, M. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. **Plant Foods Hum. Nutr.** 63, 93–97, 2008.

CASTRO-GAMBOA, I.; CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**. 65, 2369–2372, 2004.

CEOLIN, T.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; SCHWARTZ, E.; MUNIZ, R. M.; PILLON, C. N. Plantas Medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.45, n.1, p.46-53, 2011.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Para State (Brazil), **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p.159-175, 2009.

DANTAS, I. C.; GUIMARÃES, F. R. Perfil dos raizeiros que comercializam plantas medicinais no município de Campina Grande, PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.1, p.39-44, 2006.

DEEPAK, M.; HANDA, S. S. Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. **Phytotherapy Research**, 14, 463-465, 2000.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA T. T.; DORES R. G. R.; FABRES M. H. A.; NAGEM T. J. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Res Bras Farmacogn.** 19, 488-500, 2009.

EL-HELA, A. A.; AL-AMIER, H. A.; IBRAHIM, T. A. Comparative study of the flavonoids of some *Verbena* species cultivated in Egypt by using high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217 (2010) 6388–6393.

EVANGELISTA, S. S.; SAMPAIO, F. C.; PARENTE R. C.; BANDEIRA, M. F. C. L. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, p.513-9, 2013.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27, 1–93, 2006.

HERNANDEZ, N. E.; TERESCHUK, M.; ABDALA, L. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucuman, Argentina), **Journal of Ethnopharmacology**, 73, 317–322, 2000.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, D. T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal. **Rev Bras Farmacogn** 19, 130-139, 2009.

LAI, L.; YU, M.; YUEN, W.; CHANG, R. Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. **Neuropharmacology**, 50, 641-650, 2006.

LEITÃO, F.; FONSECA-KRUEL, V. S.; SILVA, I. M.; REINERT, F. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo. Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Bras Farmacogn**. 19, 333-342, 2009.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Rev Bras Farmacogn** 19, 158-192, 2009.

MARINHO, M. G. V.; SILVA, C. C.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.2, p.170-82, 2011.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493–500, 2007.

NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, 44, 2112–2119, 2011.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, pp.1022-1037, 2003.

O'LEARY, N.; MÚLGURA, M. E.; MORRONE, O. Revisión Taxonómica de las Especies del Género *Verbena* (Verbenaceae). II: Serie *Verbena*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 97, 365-424, 2010.

OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, suppl.1, 283-9, 2011.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.20, n.4, p.751-62, 2006.

PIRES, I. F. B.; SOUZA, A. A.; FEITOSA, M. H. A.; COSTA, S. M. Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, **Brasil Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.426-433, 2014.

REHECHO, S.; HIDALGO, O.; CIRANO, M. G.; NAVARRO, I.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 875-882, 2011.

SCHÖNBICHLER, S.; BITTNER, L. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 84, 97–102, 2013.

SOUZA, T. J. T.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D.; HOELZEL, S. C. S. M.; PAGLIARIN, V. P. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Acta Farm. Bonaerense**, 24 (2), 209-14, 2005.

SPERONI, E.; CERVELLATI, R.; COSTA, S.; GUERRA, M. C.; UTAN, A.; GOVONI, P.; BERGER, A.; MULLER, A.; STUPPNER, H. Effects of differential extraction of *Verbena officinalis* on rat models of inflammation, cicatrization and gastric damage. **Planta Medica**, 73(3), 227–235, 2007.

TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.1, p.23-8, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**. 8, 519-528, 2005.

CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VARIABILIDADE DA
***Verbena minutiflora* (VERBENACEAE)**

2.1. Composição Química

Elucidar a composição química das plantas medicinais e seus usos populares tornou-se um foco de pesquisa para as comunidades científicas. Esta pesquisa pode conduzir a produtos cada vez mais inovadores, com menos efeitos colaterais do que aqueles observados pelo uso de fármacos alopáticos. Além disso, existe uma enorme diversidade de estruturas nos produtos naturais, bem como as suas propriedades físico-químicas e biológicas (Bonifácio et al., 2014).

Os estudos da atividade biológica de plantas medicinais baseiam-se nos usos populares de diferentes espécies, ou seja, através do conhecimento popular os estudos científicos buscam validar o uso da planta medicinal, como fitoterápico (Bonifácio et al., 2014).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, sendo necessária a realização de estudos que comprovem a eficácia destas plantas, bem como a análise de seus princípios ativos (Veiga-Junior et al., 2005).

As plantas são produtoras de substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande variedade de doenças em homens e animais. Em toda a parte da planta podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo especializados das plantas que dão origem a uma série de substâncias conhecidas e com diversas aplicações biotecnológicas (McGaw & Eloff, 2008).

Os compostos ativos das plantas podem ser originados de dois tipos de metabólitos: primários e especializados, os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, nas plantas superiores estão concentrados em sementes e órgãos de armazenamento sendo necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico (Raven, et al., 2007).

Os metabólitos especializados são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e são encontrados em concentrações relativamente baixas em determinados grupos de plantas, geralmente possuem um papel ecológico,

como por exemplo, atrativos para polinizadores ou defensores químicos contra microrganismos, insetos e predadores superiores (Raven et al., 2007).

As atividades biológicas das plantas medicinais geralmente são atribuídas aos seus metabólitos especializados, que na maioria das vezes, possuem estrutura química complexa com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de compostos bioativos com ação farmacológica (Agra et al., 2007).

Da mesma forma que os medicamentos comuns, os fitoterápicos precisam oferecer uma garantia de qualidade e eficiência, seus efeitos terapêuticos devem ser comprovados, sua composição química padronizada e oferecer segurança de uso para a população, através de um controle de qualidade (Maciel et al., 2002).

O início do controle de qualidade dos fitoterápicos é através da identificação da planta por suas características macromorfológicas e sensoriais. Ensaio químicos de identificação e quantificação dos princípios ativos realizados através de cromatografia, espectrofotometria, gravimetria, volumetria, dentre outras, se fazem necessários, pois uma planta em seu estado normal pode não apresentar seus constituintes ativos na quantidade desejada. Avaliações da contaminação microbiológica também devem ser realizadas com a planta (Maciel et al., 2002).

2.1.2. Variabilidade Química

A indústria farmacêutica utiliza os princípios ativos de plantas para desenvolvimento de novos agente fitoterápicos, sendo necessária uma padronização dos mesmos e a comprovação de sua eficácia farmacológica. A quantificação do teor dos princípios ativos é um parâmetro importante de qualidade dos fitoterápicos, e também é necessário um estudo da variabilidade da composição química qualitativa e quantitativa dos fitoterápicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

O teor dos compostos presentes nas plantas com propriedades terapêuticas varia através da influência de diversos fatores, pois a síntese dos metabolitos especializados é freqüentemente afetada por condições ambientais

como, temperatura, índice pluviométrico, radiação, sazonalidade e altitude. Alguns destes fatores podem atuar isoladamente bem como em conjunto, interferindo na síntese dos metabólitos secundário (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Os principais fatores que podem alterar a taxa de produção de metabólitos especializados estão representados na figura 2.1.

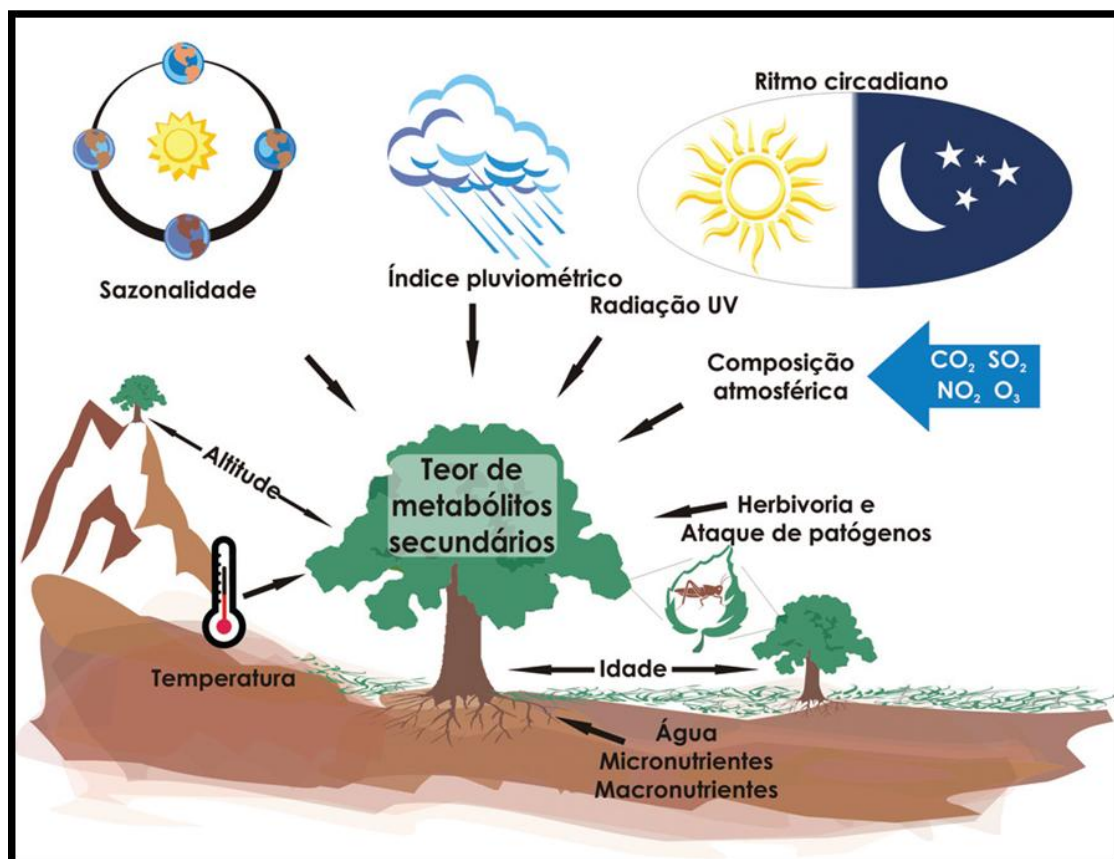


Figura 2.1 – Principais fatores que podem influenciar na variação dos metabólitos especializados
Fonte: (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A época de coleta da planta (sazonalidade) é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Estudos mostram variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos especializados, como óleos essenciais (Schwob et al., 2002), ácidos fenólicos (Zidorn et al., 2001), flavonoides (Brooks et al., 2004), iridoides (Menkovic et al., 2000) entre outros, como por exemplo, lactonas sesquiterpênicas,

cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Os relatos de como deve ser realizada a coleta de plantas medicinais são de extrema importância, pois o conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos especializados, variam com o passar dos anos e com a localização da planta. Estas variações ocorrem em diferentes níveis e, mesmo com um controle genético para a produção destes compostos, algumas modificações ocorrem através da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos sobre a planta (Kutchan, 2001).

O índice pluviométrico promove variação teor dos metabólitos especializados nas plantas, para entender o efeito que as chuvas causam, deve-se levar em consideração a relação da sua distribuição ao longo do ano, seu efeito na umidade e a capacidade de absorção de água do solo pelo vegetal. Há relatos de que um excesso no índice pluviométrico leva a um aumento da produção de vários tipos de metabólitos especializados como alcaloides e terpenóides. A escassez de chuva pode levar a um aumento na produção de metabólitos especializados quando o período é curto. Ocorre uma diminuição de produção destes compostos quando a seca permanece por grandes períodos. No entanto um período chuvoso prolongado influencia negativamente no teor de metabólitos em plantas, uma vez que esta ocasiona a perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Variação de temperatura anual, mensal e diária é um dos fatores de maior influencia no desenvolvimento da planta, bem como na produção de metabólitos especializados. Contudo, devido ao fato de a temperatura ser uma consequência de outros fatores como altitude e a sazonalidade, não há estudos sobre a atuação desta isoladamente sobre o teor de metabólitos especializados (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A diminuição da camada de ozônio, devido o aumento da poluição ou por agentes químicos, promove uma crescente preocupação com o aumento da incidência da radiação ultravioleta sobre a superfície terrestre. Diferentes espécies estão adaptadas a esta grande variação na intensidade e quantidade

de incidência luminosa estando protegidas contra esse aumento de radiação ultravioleta (Raven, et al., 2007).

Estudos mostram que conforme ocorre um aumento na intensidade de radiação solar, há uma maior produção de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Isso ocorre, de forma especial, no caso dos flavonoides, pois são estes os responsáveis pela proteção contra a foto-destruição ocasionada pela radiação ultravioleta, devido ao fato de que estes compostos são capazes de absorver ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (Grace et al., 2000).

Desta forma, os compostos responsáveis por proteger os tecidos superficiais e que são utilizados como filtros para a radiação, estão localizados nos tecidos mais externos dos vegetais. Estes compostos conseguem filtrar a radiação sem modificar a radiação fotossinteticamente ativa. Os flavonoides atuam também como antioxidante e sequestradores de radicais livres, e o aumento na produção destes compostos são induzidos por enzimas que são ativadas pela luz (Grace et al., 2000; Bieza, et al., 2001).

Vale ressaltar que junto com a capacidade de absorver radiação UV, a capacidade de atuar como antioxidantes podem determinar a concentração e composição de metabólitos que atuam como filtros de radiação ultravioleta (Tattini, et al., 2004).

Outro fator que influencia no teor de metabólitos especializados é a altitude. Sabe-se que em altas altitudes há uma maior exposição à radiação ultravioleta e, devido ao fato de os flavonoides serem a classe de compostos responsáveis pela proteção do vegetal contra radiação, logo haverá um maior teor de flavonoides em vegetais localizados em altitudes maiores. Estudos relatam que compostos não fenólicos são influenciados pela altitude, como os iridoides, que em altitudes maiores apresentam maiores concentrações, enquanto nos alcaloides conforme a altitude se eleva, ocorre um decréscimo no seu conteúdo total destes compostos (Zidorn et al., 2001).

Nesta pesquisa foi realizada a investigação da composição química da *V. minutiflora*, sendo feito a quantificação dos compostos orgânicos por espectrofotometria no ultravioleta na região do visível, visando verificar possíveis variações anuais nos teores destes compostos, bem como na

atividade antirradicalar. Os fenólicos totais foram determinados pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, enquanto para os teores de flavonoides uma reação de complexação com o cloreto de alumínio foi utilizada. A variação da atividade antirradicalar foi analisada utilizando o radical estável DPPH•.

Através de técnicas de cromatografia líquida junto com espectrometria de massas foi possível analisar as variações anuais de composição química das partes aéreas da *V. minutiflora*, bem como identificar alguns compostos presentes na planta.

A análise das alterações do metabolismo secundário através das variações temporais se faz necessário para que se possa traçar um perfil de variação dos princípios ativos da planta, conforme cada uma das variáveis temporais se distingue ou a forma como elas atuam em conjunto nesta planta, estabelecendo assim um padrão de qualidade para a planta. Desta forma se torna possível verificar a melhor condição para realizar a extração da planta do ambiente sendo possível a aplicação em escala industrial e em medicamentos.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Identificar os principais metabólitos especializados presentes nas partes aéreas de *Verbena minutiflora*.

2.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar a fração derivada do extrato metanólico das partes aéreas de *V. minutiflora* mais rica em compostos bioativos para investigação da atividade diurética de *V. minutiflora* em testes *in vivo*;
- ✓ Avaliar o potencial antirradicalar, teores de fenólicos totais e flavonoides dos extratos, frações e infusões da *V. minutiflora*;
- ✓ Investigar a variabilidade do perfil químico de extratos de *V. minutiflora* através de ESI-MS em plantas coletadas durante quatro anos consecutivos
- ✓ Identificar os principais metabólitos especializados presentes nos extratos e infusões das partes aéreas da *V. minutiflora*;

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Planta

A planta *Verbena minutiflora* foi coletada na cidade de Guarapuava/PR (25° 23'08.57" S, 51° 26'50. 63" W; altitude 1115 m) e devidamente identificada e classificada pelo Curador Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal de Curitiba/PR. Um exemplar está catalogado no Herbário do Museu sob o registro N°359683.

Para o estudo de variabilidade química da planta, o material vegetal foi coletado no mesmo local (terreno urbano) durante quatro anos consecutivos desde 2009 a 2012 e sempre em novembro, estação da primavera, quando a planta tem muitas flores e folhas.

2.3.2. Preparações dos Extratos e Frações para caracterização química e para realização de testes *in vivo*

O material coletado (partes aéreas da planta) foi seco à temperatura ambiente e triturado. Foram transferidos 455,57g deste material para um recipiente de vidro de boca larga. Este material foi macerado em metanol e filtrado a cada 24h com reposição de solvente por 10 dias, até que os metabólitos especializados presentes nos tecidos fossem completamente extraídos. A evaporação foi realizada em rotaevaporador, fornecendo 43,23 g do extrato metanólico bruto (EB). (Figura 2.2).

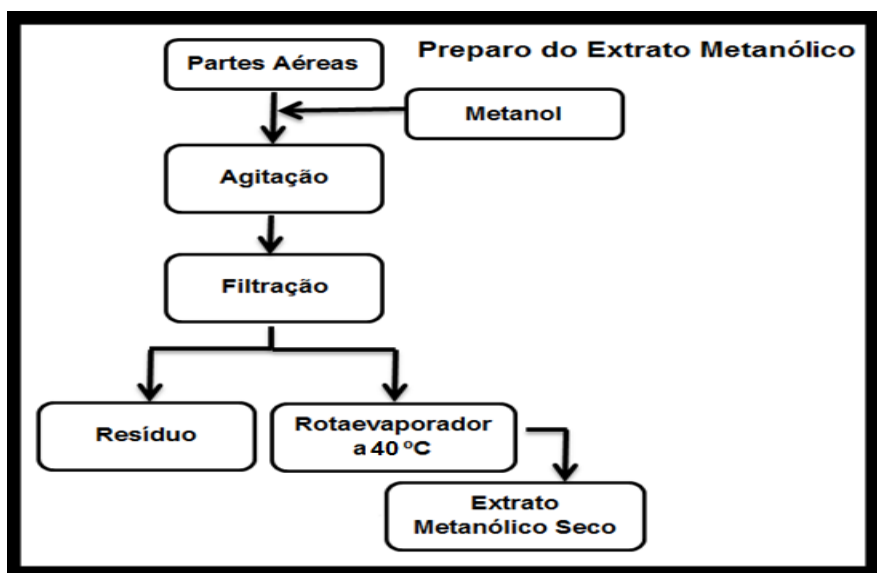


Figura 2.2 – Etapas do Processo de Extração Metanólica das partes aéreas da *Verbena minutiflora*

Utilizou-se 30 g do extrato metanólico bruto da *V. minutiflora* para o fracionamento com solventes de polaridade crescente. O extrato foi dissolvido utilizando uma mistura de metanol/água a 7/3 (v/v) e submetido a partição líquido/líquido, em funil de separação, com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila (AcOEt) obtendo-se, após evaporação dos solventes, as frações semipurificadas: fração hexânica (Fr. Hex.) (3,73 g), fração acetato de etila (Fr. AcOEt) (2,12g), fração diclorometano (Fr. Dicl) (1,23g) e fração hidrometanólica (Fr. EtOH/H₂O) (10,5 g) (Figura 2.3). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

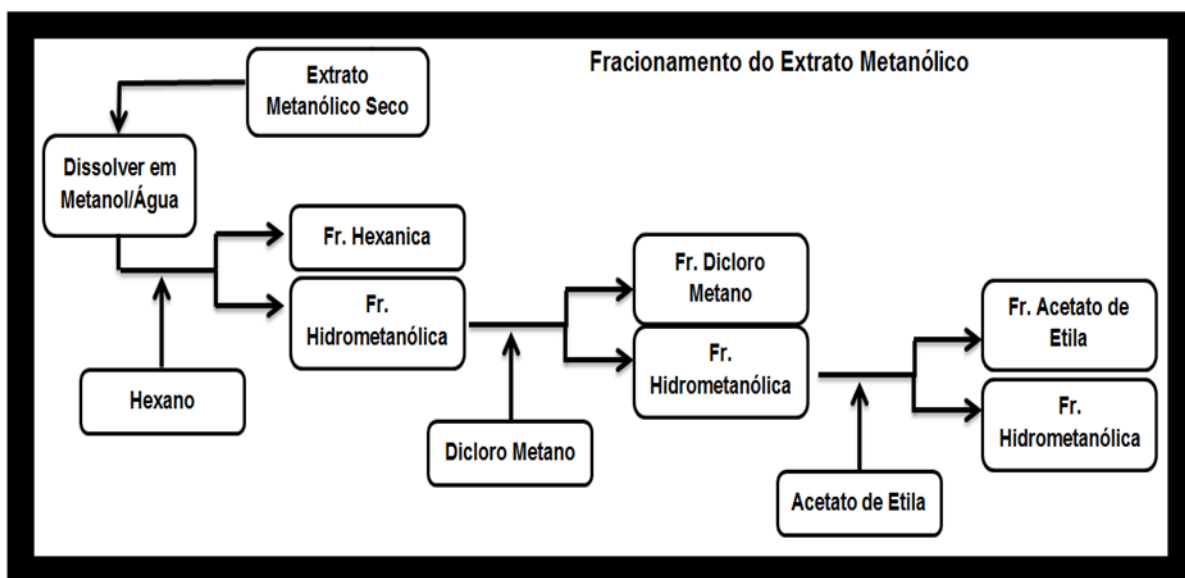


Figura 2.3 – Etapas do Processo de Fracionamento do Extrato Metanólico da *Verbena minutiflora*

2.3.3. Preparo dos Extratos e Infusões para o Estudo da Variabilidade do Perfil Químico da *Verbena minutiflora*

Para realizar o Estudo da Variabilidade do Perfil Químico da *V. minutiflora* foram coletadas diferentes partes da planta em diferentes anos consecutivos, sempre no mês de novembro.

As partes aéreas da planta (folhas, flores e o caule), coletadas nos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012 foram secas à temperatura ambiente e trituradas.

Foram transferidos aproximadamente 10g destes materiais para um recipiente de vidro de boca larga, a extração do material vegetal foi realizada na proporção material vegetal/etanol 1: 20 e permaneceram sob agitação constante e a temperatura ambiente. A solução extrativa foi filtrada a cada 12 h por 2 dias com reposição de solvente, até que os metabólitos especializados

presentes nos tecidos fossem completamente extraídos. A evaporação do solvente foi realizada em rotaevaporador, obtendo-se o extrato etanólico bruto, o rendimento de extração em média foi de 14,27% para as folhas, 14,47% para as flores e 11,13% para o caule para todos os anos de coleta (Figura 2.4).

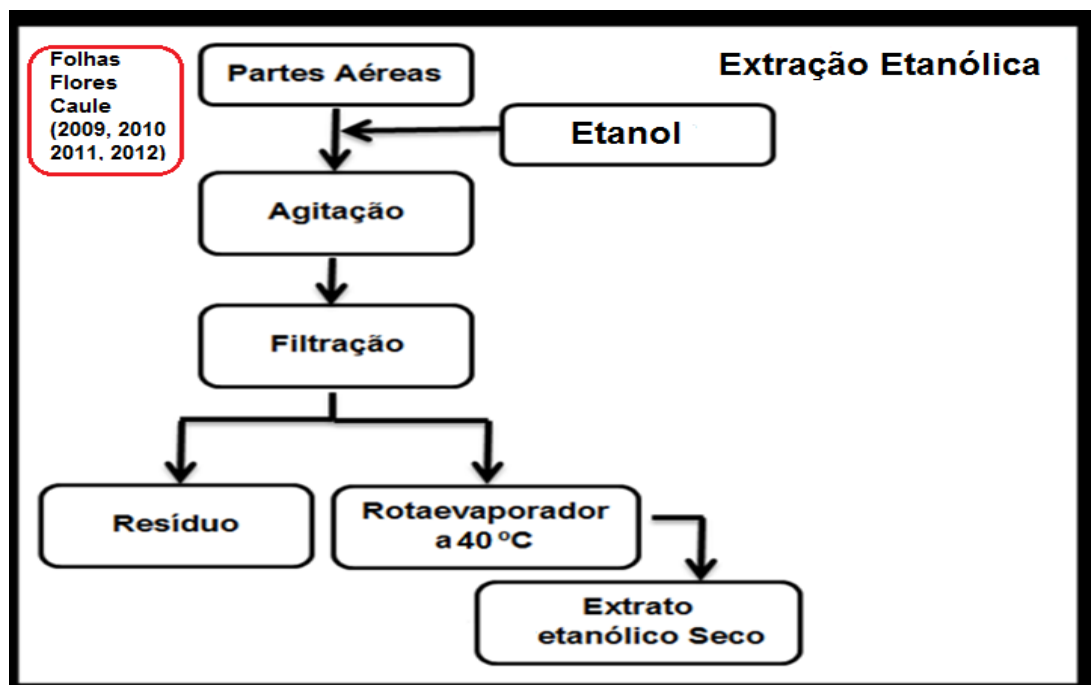


Figura 2.4 – Etapas do Processo de Extração Etanólica das partes aéreas da *Verbena minutiflora*

As infusões foram preparadas pela adição de 200 mL água fervente sobre 10g de folhas secas da *V. minutiflora* coletadas em diferentes anos consecutivos, permanecendo em contato por 20 minutos, depois foi resfriada. Realizou-se então uma filtração separando o filtrado do resíduo (Figura 2.5).

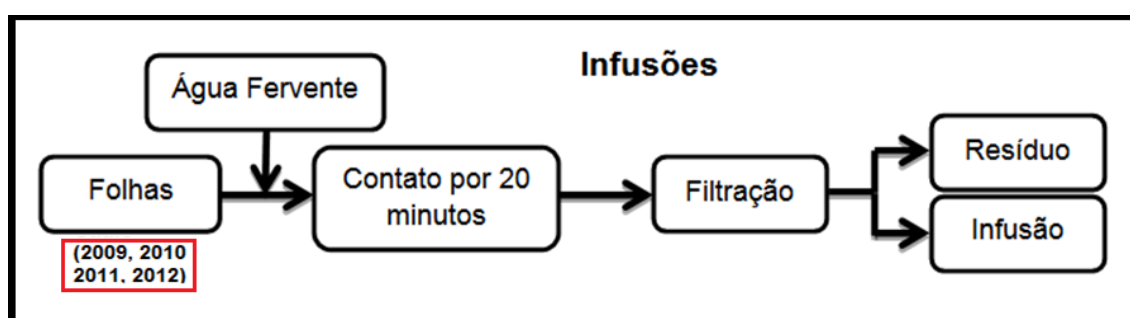


Figura 2.5 – Etapas do Processo de Preparo das Infusões da *Verbena minutiflora*

2.3.4. Medidas Espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas para a quantificação dos teores de fenólicos totais, de flavonoides e determinação da atividade antirradicalar foram realizadas em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio locado no CIMPE/UNICENTRO. Os solventes utilizados foram de grau espectrofotométrico. Para determinação dos teores de fenólicos totais fez-se uso do reagente Folin-Ciocalteu (Biotec, 2N) e o ácido gálico (VETEC, 99%) como padrão analítico. Para os flavonoides utilizou-se como padrão analítico a quercetina (SIGMA, 98%) e o reagente de cloreto de alumínio hexahidratado (VETEC, 99,5%). Enquanto para análise da atividade antirradicalar utilizou-se o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, SIGMA) e metanol grau espectrofotométrico.

2.3.4.1. Determinação do Teor de Fenólicos Totais

Os teores de compostos fenólicos foram determinados utilizando o método colorimétrico de Folin- Ciocalteu com algumas modificações (Schmidt, et al., 2014). Para determinar o teor de fenólicos totais contidos nas amostras da *V. minutiflora*, construiu-se uma curva analítica com soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico em metanol, na faixa de 40,0 a 280,0 mg.L⁻¹. Em um balão volumétrico de 5 mL foram adicionados 500 µL de solução tampão super saturada de carbonato/tartarato (20,0g de Na₂CO₃ e 1,20 g de KNaC₄H₄O₆·4H₂O em 100,0 mL de água), 300 µL de cada solução padrão e 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. O volume final foi completado com água destilada. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância no UV-Vis a 760 nm. Para cada amostra repetiu-se o mesmo procedimento substituindo o padrão por amostras de extratos, frações ou infusões da *V. minutiflora* (figura 2.6). Os resultados para os extratos foram expressos em miligramas de compostos fenólicos por g de extrato seco (mg/g). Para infusões, os resultados foram expressos como a quantidade total de compostos fenólicos em 200 mL de água.

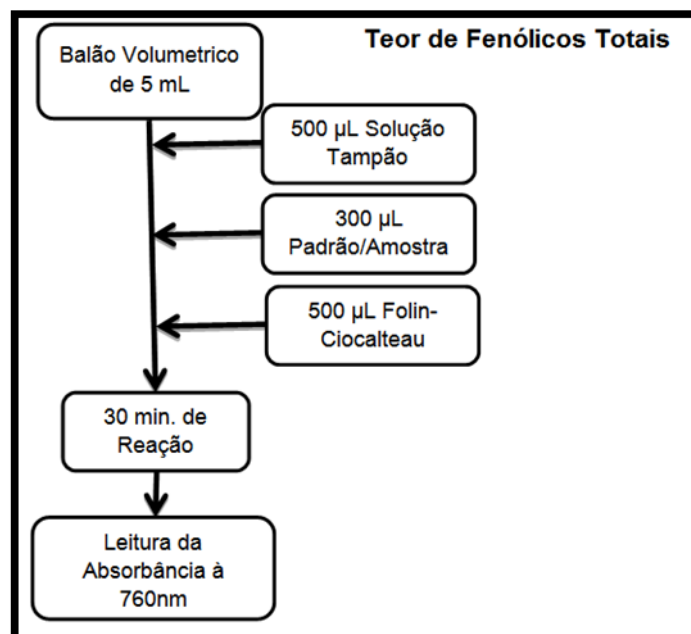


Figura 2.6 – Etapas da determinação de fenólicos totais nas amostras da *Verbena minutiflora*

Para as diferentes amostras da *V. minutiflora* prepararam-se soluções, em metanol, a aproximadamente $1000,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e repetiu-se o mesmo processo descrito para as soluções padrões. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas. Para o branco foi preparada uma solução aquosa de todos os reagentes em balão volumétrico de 5,0 mL, contudo no lugar dos padrões ou da amostra adicionou-se 300,0 μL de metanol.

2.3.4.2. Determinação do Teor de Flavonoides

A determinação espectrofotométrica de flavonoides foi realizada por complexação com cloreto de alumínio a 5% m/v em metanol (Bors, et al., 1990, Buriol, et al., 2009). A curva analítica foi construída usando quercetina em metanol como padrão analítico em diferentes concentrações, na faixa entre 1,0 a $50,0 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$. As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 5,0 mL onde foram adicionados 500 μL de cada solução padrão de quercetina e 250 μL da solução de cloreto de alumínio (AlCl_3). O volume da solução foi ajustado com metanol. Depois de 30 minutos foi realizada a medida da absorbância a 425 nm (figura 2.7). Para as diferentes amostras o mesmo procedimento foi usado, simplesmente substituindo o padrão quercetina por soluções de extrato ou infusão de *V. minutiflora*. Os resultados para os extratos foram expressos

em miligramas de flavonoides por g de extrato seco (mg/g). Para infusões, os resultados foram expressos como a quantidade total de flavonoides em 200 mL de água.

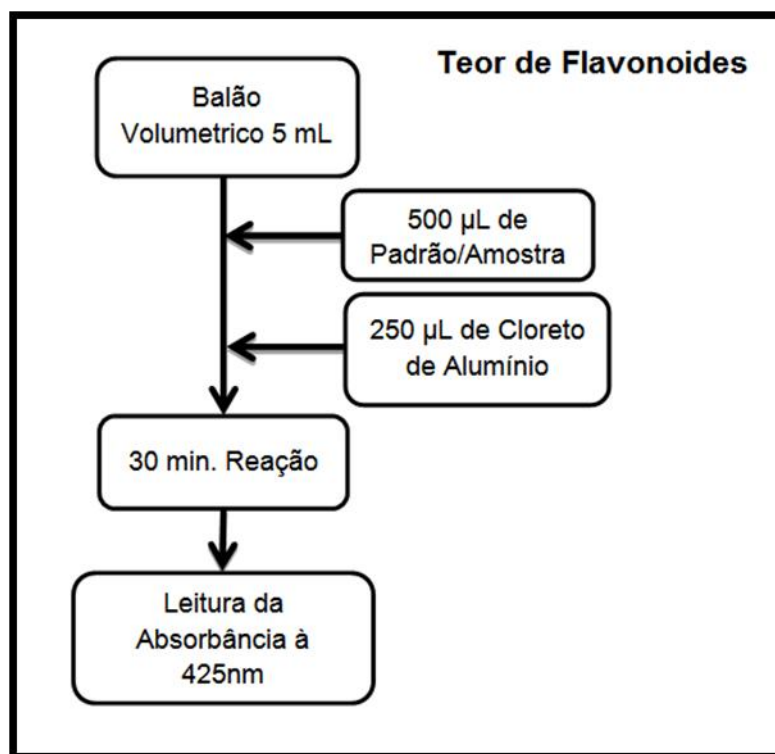


Figura 2.7 – Etapas da determinação de flavonoides nas amostras da *Verbena minutiflora*

2.3.4.3. Avaliação da Atividade Antirradicalar

A atividade antirradicalar foi determinada pelo método espectrofotométrico e leitura de absorbância a 515 nm, através da reação entre o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e os antioxidantes presentes no extrato, frações e infusões da *V. minutiflora* de acordo com Rufino (2009) com algumas modificações (Schmidt et al. 2014).

Primeiramente preparou-se uma solução estoque de DPPH[•] em metanol na concentração $1,6 \times 10^{-3}$ mol/L a partir da pesagem de 0,00630g de DPPH[•] (MM 394,32g/mol). A partir da diluição da solução estoque preparou-se a solução de trabalho de DPPH[•] na concentração $9,0 \times 10^{-5}$ mol/L e com absorbância aproximada de 0,7000.

Os extratos e frações da *V. minutiflora* foram preparados na concentração estoque de 1000 µg/mL em metanol e foram utilizadas as infusões prontas diretamente. A reação foi feita por diluição direta na cubeta,

adicionando-se volume fixo de DPPH• $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (2,5mL) e volume variável da solução do antioxidante, completando com metanol para se obter um volume final de 3mL (figura 2.8).

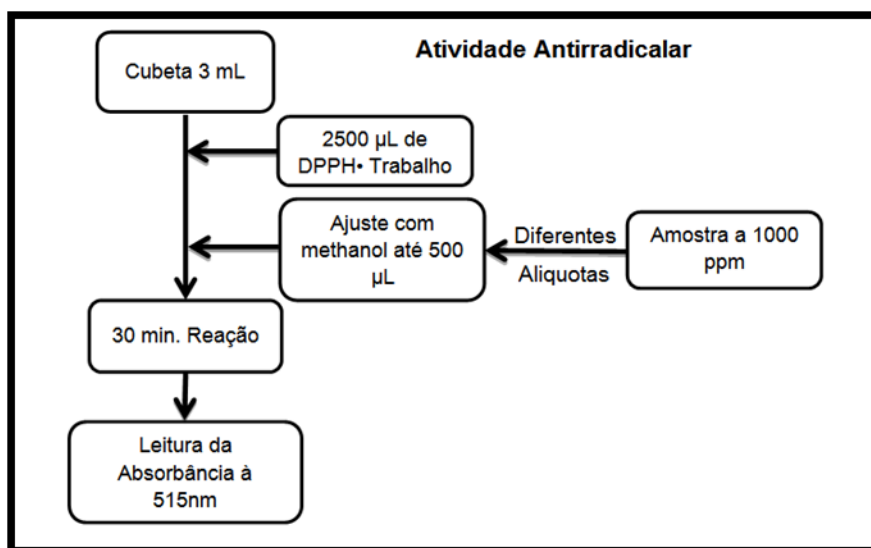


Figura 2.8 – Etapas para a determinação da atividade antirradicalar nas amostras da *Verbena minutiflora*

As alíquotas retiradas da solução estoque do extrato e frações foram determinadas com a finalidade de se obter concentrações de extrato e frações entre 10 e 100mg/L em 3mL. Por exemplo, para se obter a concentração de 40mg/L de extrato da *V. minutiflora*, na cubeta de 3mL, adicionou-se 120µL de solução estoque do extrato 1000 µg/mL, 380µL de metanol e 2,5mL de solução de DPPH•. Assim, cada extrato e fração foram avaliados em cinco concentrações diferentes, variando na faixa entre 5,0 a 120,0 mg.L⁻¹, de acordo com a sua atividade.

Para cada amostra da *V. minutiflora* elaborou-se uma curva analítica com a porcentagem de inibição do radical (RS%) em função da concentração do extrato. Esta porcentagem foi calculada da seguinte forma:

$$RS\% = \left(\frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \right) * 100$$

$A_{inicial}$ foi determinada pela medida de absorbância da solução contendo somente 2500,0 µL da solução de trabalho de DPPH e 500 µL de metanol PA. A_{final} é o valor da absorbância obtido após 30 minutos de reação, da solução

inicialmente preparada pela mistura de 2500,0 µL da solução de trabalho de DPPH• e diferentes alíquotas de solução do extrato (volume final 3000,0 µL ajustado com metanol).

A atividade antirradicalar de cada uma das amostras foi reportada em IC₅₀, que representa a concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a absorbância inicial da solução de DPPH• de trabalho.

Para as infusões, a capacidade antirradicalar foi relatado como um valor de IC₅₀, o que significa a concentração de infusão (miligramas de material vegetal por volume de solução) requerida para reduzir de 50% da absorbância inicial de solução de DPPH• de trabalho.

2.3.5. Análise Qualitativa por HPLC-DAD de Extrato, Frações e Infusões Provenientes das Partes Aéreas de *Verbena minutiflora*

O extrato, frações e as infusões obtidas foram analisados por HPLC (Waters, 600 Controller) com detecção UV por arranjo de diodos (Waters, 2996) (HPLC-DAD) para verificar seus perfis cromatográficos. A cromatografia foi realizada em uma coluna Waters XT Terra MS C18 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro, 5 µm) mantida a 26 °C e com pré-coluna com a mesma fase. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/min⁻¹. A fase móvel foi composta por H₂O com pH de 3,2 ajustados com ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O gradiente linear aplicado foi de 87% para 85% de A em 10 minutos, e para 25% de A em 20 minutos, permanecendo até 26 minutos. A percentagem de A então passou para 5% em 28 minutos e manteve-se inalterada até 30 minutos. Após voltou-se a condição inicial. O tempo total de análise foi de 31 minutos, com um tempo de equilíbrio de 10 minutos (Bilia et al., 2008). Os espectros de UV-vis foram registrados entre 220 e 500 nm e os cromatogramas foram registrados em 240, 330 e 350 nm de acordo com relatos prévios por Bilia e colaboradores (2008). Cada amostra foi injetada no HPLC em triplicata.

2.3.6. Análises Qualitativas por ESI-MS e LC-MS/MS

A identificação de produtos naturais da *V. minutiflora* foi realizada pelo uso de técnicas hífenadas de análise com LC-MS-MS. Para comparar perfil qualitativo dos extratos, suas impressões digitais foram obtidas por infusão direta na fonte ESI.

Para as análises de espectrometria de massa as amostras foram analisadas num sistema de UHPLC acoplado com um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com fonte de ionização ESI (modelo ACQUITY, Waters Corp., Manchester, UK), disponível no Laboratório de Biologia Vegetal da UNICAMP. O software MassLynx V.4.1 (Waters Corp., Manchester, UK) foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados. Os extratos foram diluídos em metanol em uma concentração final de 5µg/mL foram filtrados por uma membrana de Politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm. Os dados foram adquiridos por injeção de 10 e 3µl de cada amostra, que foram inseridas para obter impressões digitais ESI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS. A separação cromatográfica dos componentes foi efetuada utilizando uma Waters Acquity BEH C₁₈ (50 x 2,1 mm i.d., 1,7 µm) coluna a 30 °C. Água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B), foram usados como fase móvel a um fluxo de 0,2 mL/min⁻¹. A condição inicial foi de 95% A e 5% B mudando para 100% de B em 9 minutos, mantendo durante 1 minuto e depois voltando à condição inicial e um tempo de estabilização de 12 minutos. Nitrogênio e argônio foram utilizados como nebulizador e gás de colisão, respectivamente. ESI-MS/MS foram obtidos sob as seguintes condições: capilar ± 3,5 KV, cone ± 30 V, temperatura da fonte e dessolvatação foi de 150 e 350 °C, respectivamente. Para os íons selecionados por LC-ESI-MS/MS, a energia para a colisão dissociações induzidas (CID) foi de 25 eV. Os dados foram adquiridos na faixa de m/z 100-800 em modo positivo e negativo.

2.3.7. Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos foram cedidos pelo Agrometeorologista Edmirson Borrozzino do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), localizado em Londrina/PR.

2.3.8. Análise Estatística

Para uma melhor interpretação dos resultados aplicaram-se ferramentas estatísticas como Análise de Variância (ANOVA) de um e dois fatores. Toda a análise estatística aplicada nesta pesquisa foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2.

2.4. Resultados e Discussões

2.4.1. Composição Química das partes aéreas da *Verbena minutiflora*

2.4.1.1. Teores de Compostos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antiradicalar em Extrato Metanólico, Frações e Infusão de *Verbena minutiflora*

A composição química quantitativa do extrato metanólico preparado utilizando as partes aéreas de *Verbena minutiflora* (Verbenaceae), das frações dele derivadas e da infusão das folhas foi analisada nesta pesquisa primeiramente visando à identificação do melhor material a ser utilizado nos testes *in vivo* para investigar a atividade diurética popularmente atribuída para a planta.

Assim, os teores de fenólicos, flavonoides e atividade antiradicalar foram avaliados no extrato bruto, fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração hidrometanólica e na infusão das folhas, sendo um total de seis amostras analisadas.

Os teores de compostos fenólicos totais presentes nas amostras da *V. minutiflora* foram determinados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O método para quantificação dos teores de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu é bastante conhecido. Este reagente é constituído de uma solução aquosa dos ácidos fosfotungstístico e fosfomolibdico, cuja reação (figura 2.9) que acontece entre esses ácidos e os compostos fenólicos é uma reação de oxido-redução. O reagente de Folin-Ciocalteu apresenta uma coloração amarelada em seu estado de oxidação inicial, e conforme a reação se processa este se torna de coloração azul. Desta maneira, apresenta banda

de absorção na região do visível do espectro eletromagnético na faixa de 700 a 760 nm (Souza, 2007).

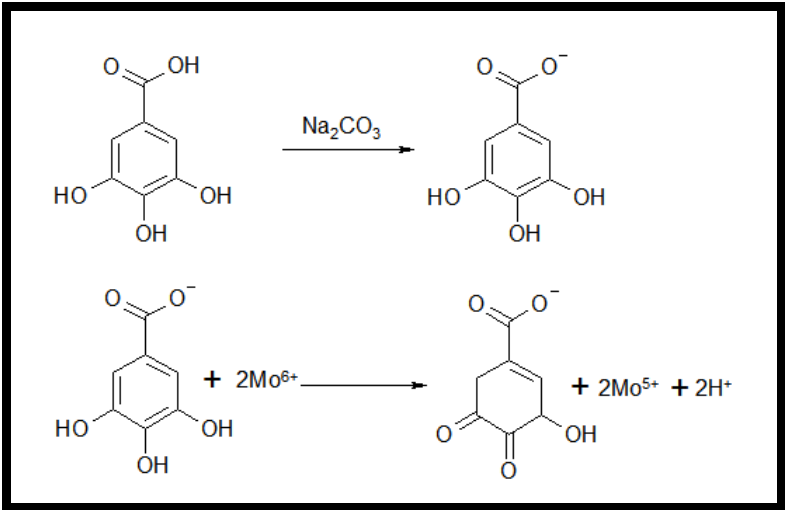


Figura 2.9 – Reação entre o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu e os compostos fenólicos.

Para determinar o teor de fenólicos totais nas diferentes amostras da *V. minutiflora*, construiu-se uma curva analítica ajustada por regressão linear (figura 2.10) e tendo como resposta as absorbâncias encontradas para soluções de concentrações diferentes de ácido gálico. Através das absorbâncias obtidas das soluções das diferentes concentrações de ácido gálico (40, 80, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 mg/L) foi possível montar uma curva de analítica com o coeficiente de determinação de 0,99.

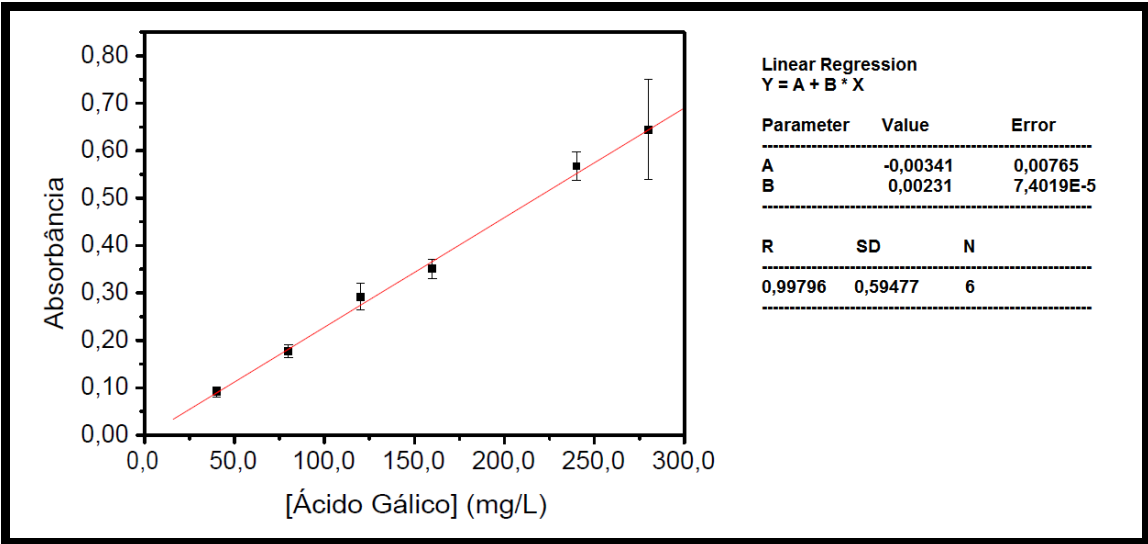


Figura 2.10 – Curva analítica para quantificação de fenólicos totais em amostras da *Verbena minutiflora*

Para a quantificação de flavonoides utilizou-se o cloreto de alumínio como reagente de complexação. O cátion alumínio em contato com os flavonoides gera complexos estáveis, tornando a solução de coloração amarelada cuja absorbância pode ser analisada no comprimento de onda de 425 nm (Marcucci, et al., 2005) (figura 2.11).

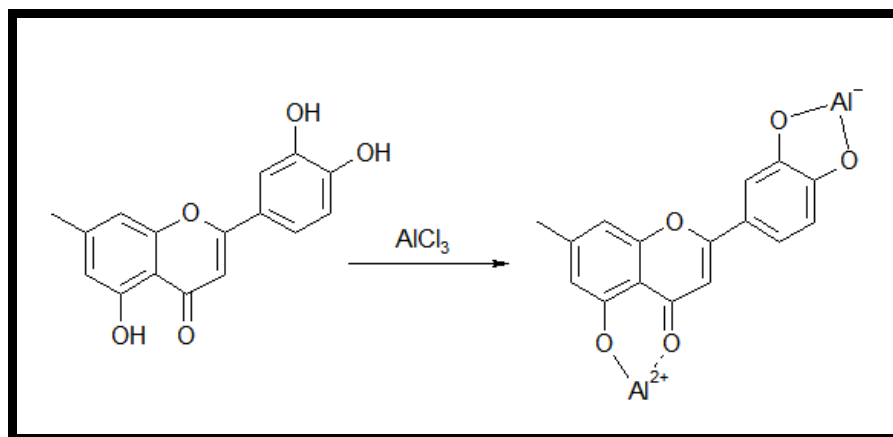


Figura 2.11 – Reação de complexação entre o cloreto de alumínio e os flavonoides

Para determinar o teor de flavonoides nas diferentes amostras da *V. minutiflora*, construiu-se uma curva analítica ajustada por regressão linear (figura 2.12) e tendo como resposta as absorbâncias encontradas para soluções de concentrações diferentes das soluções do padrão de quercetina. Através das absorbâncias obtidas das soluções das diferentes concentrações de quercetina (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L) foi possível montar uma curva de analítica com o coeficiente de 0,99.

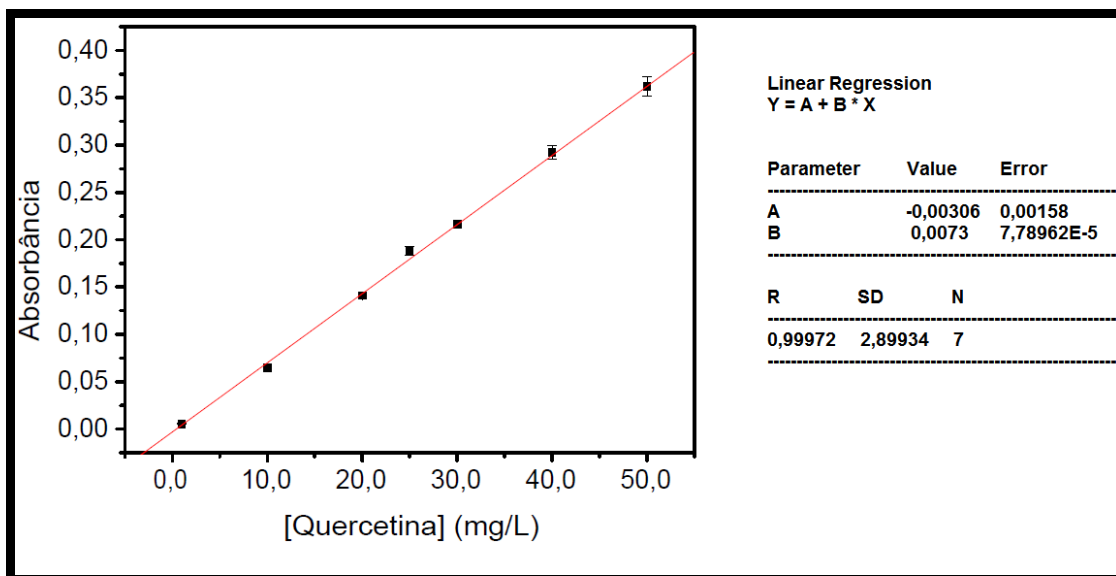


Figura 2.12 – Curva analítica para quantificação de flavonoides nas amostras da *Verbena minutiflora*

Na determinação da atividade antirradicalar foi construída uma curva analítica para cada amostra avaliada (figura 2.15). Para tal, a variável dependente RS % representa a extensão da inibição do radical estável DPPH• provocada por soluções da amostra em diferentes concentrações. A inibição do DPPH• ocorre quando os compostos presentes na amostra cedem um átomo de hidrogênio (figura 2.13), formando uma espécie contendo todos os elétrons estão emparelhados. Esta espécie não absorve radiação no comprimento de onda de estudo. Portanto, quando o radical DPPH está em excesso em relação às substâncias antirradicalares da amostra, a leitura da absorbância em 515 nm é proporcional à concentração do DPPH livre, ou seja, o radical que não reagiu.

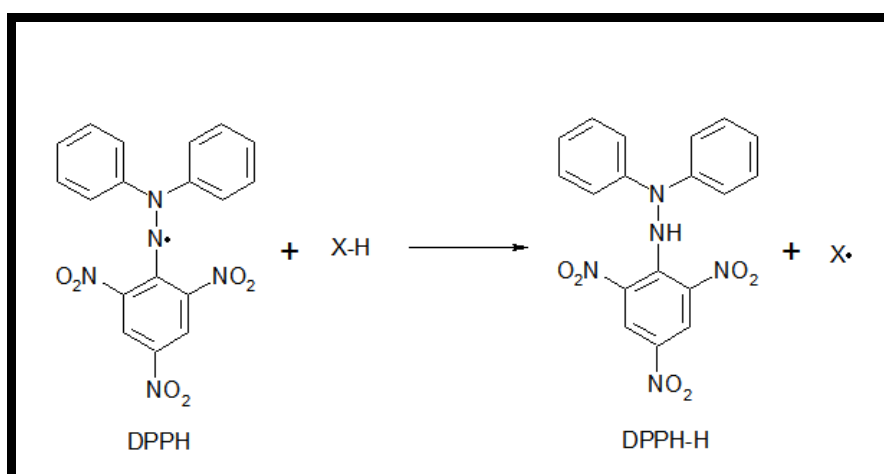


Figura 2.13 – Reação de transferência de um átomo de hidrogênio ao radical DPPH•

O radical DPPH• possui coloração púrpura e quando em contato com substâncias doadoras de hidrogênio este se torna incolor, modificando gradualmente a coloração da solução. Na figura 2.14 é mostrada a mudança de cor que ocorre quando extratos da *V. minutiflora*, em concentrações que variaram desde 10 até 90 mg/L, foram adicionados a soluções contendo quantidades fixas de DPPH•.



Figura 2.14 – Descoloração da solução durante a reação entre o DPPH• e as espécies ativas presente na amostra em diferentes concentrações

Desta forma, quanto maior a concentração de espécies ativas presentes na amostra, maior será a inibição do radical DPPH•. Sendo assim, por regressão linear dos dados experimentais obtidos, se obtém uma curva analítica que permite a determinação do IC₅₀ que representa a concentração de amostra necessária para inibir 50% da concentração inicial do radical.

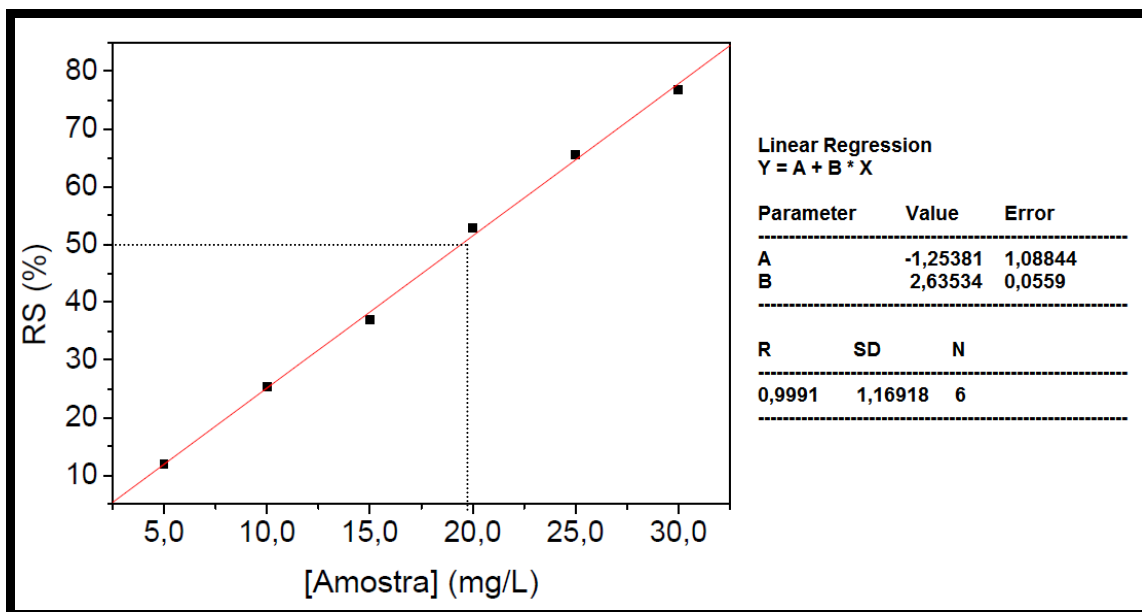


Figura 2.15 – Curva analítica para a determinação da atividade antirradicalar

Os teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante no extrato, frações e infusão estão representados na Tabela 2.1 e foram expressos como um valor médio mais o desvio padrão em mg de compostos orgânicos por g de material seco (extrato, fração). A amostra da infusão analisada foi liofilizada e realizado o mesmo procedimento para a determinação dos teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante que os extratos e frações, o valor reportado representa o valor médio mais o desvio padrão em mg de compostos orgânicos por g de material seco (amostra liofilizada). Para a capacidade antirradicalar foi relatado como um valor de IC₅₀, o que significa a concentração de infusão (miligramas de material vegetal por volume de solução) requerida para reduzir de 50% da absorbância inicial de solução de DPPH• de trabalho.

A todos os resultados foi aplicada uma Análise de Variância ANOVA de um fator para o nível de significância estatística de 95% ($P < 0,05$) seguida do teste de probabilidade de Fisher.

Tabela 2.1 - Teor de Fenólicos Totais, Flavonoides e capacidade antirradicalar do extrato metanólico, frações e infusão das partes aéreas de *Verbena minutiflora*

Amostras <i>Verbena minutiflora</i>	Teor de fenólicos Totais (mg/g)	Teor de flavonoides (mg/g)	IC₅₀ (mg/L)
Extrato Bruto	116,58 ± 4,07 ^a	50,42 ± 0,50 ^a	22,76 ± 0,40 ^a
Fração Hexano	33,08 ± 9,76 ^b	38,04 ± 2,59 ^b	Não apresentou
Fração Diclorometano	167,44 ± 5,33 ^c	35,28 ± 0,97 ^b	42,69 ± 0,03 ^b
Fração Acetato de Etila	393,04 ± 1,87 ^d	13,79 ± 0,87 ^c	3,53 ± 0,37 ^c
Fração Hidrometanólica	66,22 ± 2,22 ^e	7,79 ± 0,44 ^d	32,26 ± 0,58 ^d
Infusão	28,76 ± 2,20 ^f	2,95 ± 0,04 ^e	321,50 ± 0,69 ^e

Valores médios ± desvio padrão relativo. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas $P < 0,05$.

Recentemente tem aumentado o interesse em investigar a propriedade antioxidante de plantas e suas infusões, pois são utilizadas tradicionalmente na medicina popular. Sabe-se que a utilização de nutrientes antioxidantes pode diminuir ou prevenir o risco de muitas doenças causadas por estresse oxidativo, como a inflamação crônica e doenças cardiovasculares. A sua utilização também tem sido associada com uma redução do risco de câncer, porque eles podem evitar danos ao DNA causados pelos radicais livres (Bilia et al., 2008).

Os resultados demonstram que todas as frações apresentaram teores de fenólicos com diferenças estatísticas significativas no nível de confiança de 95%. A fração acetato de etila da *V. minutiflora* possui a maior concentração de fenólicos totais, seguido das amostras da fração diclorometano e do extrato bruto. Em relação ao teor de flavonoides todos os extratos apresentaram

diferenças significativas, com exceção, das frações menos polares hexânica e diclorometânica.

Para cada amostra, com exceção da fração hexânica, foi possível calcular a concentração necessária para inibir 50% do radical livre. Estes resultados demonstram que a fração acetato de etila também possui uma atividade antioxidante significativamente mais potente.

Ainda, destaca-se que a infusão apresentou capacidade antirradicalar estatisticamente similar ao extrato bruto da *V. minutiflora* e, portanto, a ingestão popular de *V. minutiflora* na forma de chás é justificada e se apresenta como boa fonte de substâncias antioxidantes. De maneira similar a outras plantas medicinais do gênero *Verbena*, a *V. minutiflora* possui uma boa capacidade antioxidante. Isso pode ser observado ao comparar os resultados obtidos neste trabalho, onde o extrato metanólico apresentou $IC_{50} = 22,76 \pm 0,40$ mg/mL e a infusão $IC_{50} = 21,50 \pm 0,69$ mg/mL, com os resultados para os extratos etanólicos ($IC_{50} = 21,04 \pm 1,61$ mg/mL) e aquosos ($IC_{50} = 33,8 \pm 0,43$ mg/mL) da *V. officinalis* testados por Rehecho e colaboradores (2011).

Através dessa análise quantitativa do extrato e frações da *Verbena minutiflora* verificou-se que a fração acetato de etila possui um maior teor de fenólicos e melhor atividade antioxidante. Por esse motivo essa fração foi escolhida, juntamente com o extrato metanólico e a infusão das partes aéreas de *V. minutiflora*, para investigar a atividade diurética da planta em testes *in vivo* (capítulo 5).

2.4.2. Variabilidade do Perfil Químico das partes aéreas da *Verbena minutiflora*

2.4.2.1. Teores de Compostos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antirradicalar em Extratos Etanólicos e Infusões de *Verbena minutiflora* coletada em quatro anos consecutivos

As determinações de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antirradical foram realizadas em extratos de folhas, flores e caules, separadamente das infusões de folhas de *V. minutiflora*, coletadas na primavera dos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012. Foram preparados os extratos etanólicos e infusões resultando num total de 16 amostras analisadas.

Os teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante nos extratos e infusões estão representados na Tabela 2.2. Para os extratos os teores de compostos fenólicos e flavonoides foram expressos como valor médio e desvio padrão em mg de compostos orgânicos por g de extrato seco. Para as infusões foi relatada a quantidade total de compostos fenólicos e flavonoides extraídos de 10 g de folhas em 200 mL de água quente. Os teores de fenólicos totais nos extratos de caules variaram de 49,46 a 104, 41 mg/g, enquanto que nos extratos de folhas e flores variaram de 118,81 a 217,99 mg/g e 73,50 a 202,55 mg/g, respectivamente.

Para destacar esta variabilidade entre os constituintes químicos e capacidade antirradical, a Análise de Variância ANOVA de um fator foi realizada e os resultados foram resumidos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2- Teor de Fenólicos Totais, Flavonoides e capacidade antirradicalar IC₅₀ encontrados anualmente nas partes aéreas de *Verbena minutiflora*

Amostras <i>V. minutiflora</i>	Ano de Coleta	Teor de Fenólicos Totais (mg/g)	Teor de Flavonoides (mg/g)	IC₅₀ (DPPH) (mg/L)*
Flores	2009	176.25 ± 2.27 [†]	23.33 ± 0.47 ^a	11.21 ± 0.01 ^{d,e,f}
Folhas	2009	192.39 ± 2.18 ^d	34.47 ± 2.02 ^d	10.31 ± 0.43 ^d
Caules	2009	104.41 ± 1.43 ^a	23.10 ± 0.28 ^a	28.69 ± 1.12 ^a
Flores	2010	202.55 ± 0.87 ^d	17.18 ± 1.59 ^b	18.75 ± 0.67 ^g
Folhas	2010	217.99 ± 3.58 ^e	20.61 ± 0.59 ^{a,b}	12.23 ± 0.65 ^f
Caules	2010	79.11 ± 0.95 ^b	19.68 ± 1.64 ^{a,b}	26.43 ± 0.33 ^b
Flores	2011	195.72 ± 18.82 ^d	22.18 ± 1.14 ^a	16.69 ± 0.21 ⁱ
Folhas	2011	207.12 ± 3.30 ^{d,e}	61.04 ± 2.40 ^e	19.75 ± 0.43 ^{g,h}
Caules	2011	74.50 ± 3.01 ^b	23.39 ± 2.37 ^a	27.60 ± 0.06 ^{a,b}
Flores	2012	73.50 ± 9.24 ^b	11.89 ± 0.04 ^g	20.49 ± 0.62 ^h
Folhas	2012	118.81 ± 9.59 ^a	47.69 ± 2.83 ^f	19.23 ± 0.54 ^g
Caules	2012	49.46 ± 1.39 ^c	28.94 ± 2.87 ^c	45.68 ± 0.24 ^c
Amostras <i>V. minutiflora</i>	Ano de Coleta	Teor de Fenólicos Totais (mg/200mL)	Teor de Flavonoides (mg/200mL)	IC₅₀ (DPPH) (mg/L)*
Infusão	2009	24.87 ± 0.95 ^a	1.58 ± 0.08 ^a	391.77 ± 27.33 ^a
Infusão	2010	28.08 ± 2.11 ^a	2.96 ± 0.02 ^b	358.45 ± 11.61 ^a
Infusão	2011	25.68 ± 1.45 ^a	2.64 ± 0.00 ^c	415.93 ± 16.79 ^a
Infusão	2012	28.62 ± 0.09 ^a	2.88 ± 0.08 ^b	330.59 ± 13.06 ^b

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas $P < 0,05$ por testes de Fisher e Tukey.

† Para os extratos o IC₅₀ é expresso em miligramas de extratos por volume de solução. Para as infusões o IC₅₀ é expresso em miligramas de materiais vegetais por volume de solução.

Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados devido aos seus diversos benefícios para a saúde como antioxidantes e para a prevenção de doenças inflamatórias crônicas, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (Acosta-Estrada, et al., 2014; Atoui, 2005).

Os dados da tabela 2.2 foram analisados por ANOVA de dois fatores para verificar a influência dos fatores ano de coleta e partes da planta sob o teor de fenólicos, de flavonoides e capacidade antirradicalar. A ANOVA demonstrou que todos os fatores, partes da planta, ano de coleta, bem como a interação entre esses fatores, tiveram efeitos altamente significativos ($P < 0.001$) e influenciaram os teores médios de fenólicos e de flavonoides nos extratos e infusão da *V. minutiflora*. A parte da planta extraída foi o fator mais importante para influenciar os teores médios de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antirradical dos extratos. Os extratos etanólicos das folhas e flores apresentaram em média teores de fenólicos e de flavonoides significativamente maiores que o extrato etanólico do caule e a infusão das partes aéreas de *V. minutiflora* independentemente do ano de coleta (Figura 2.16).

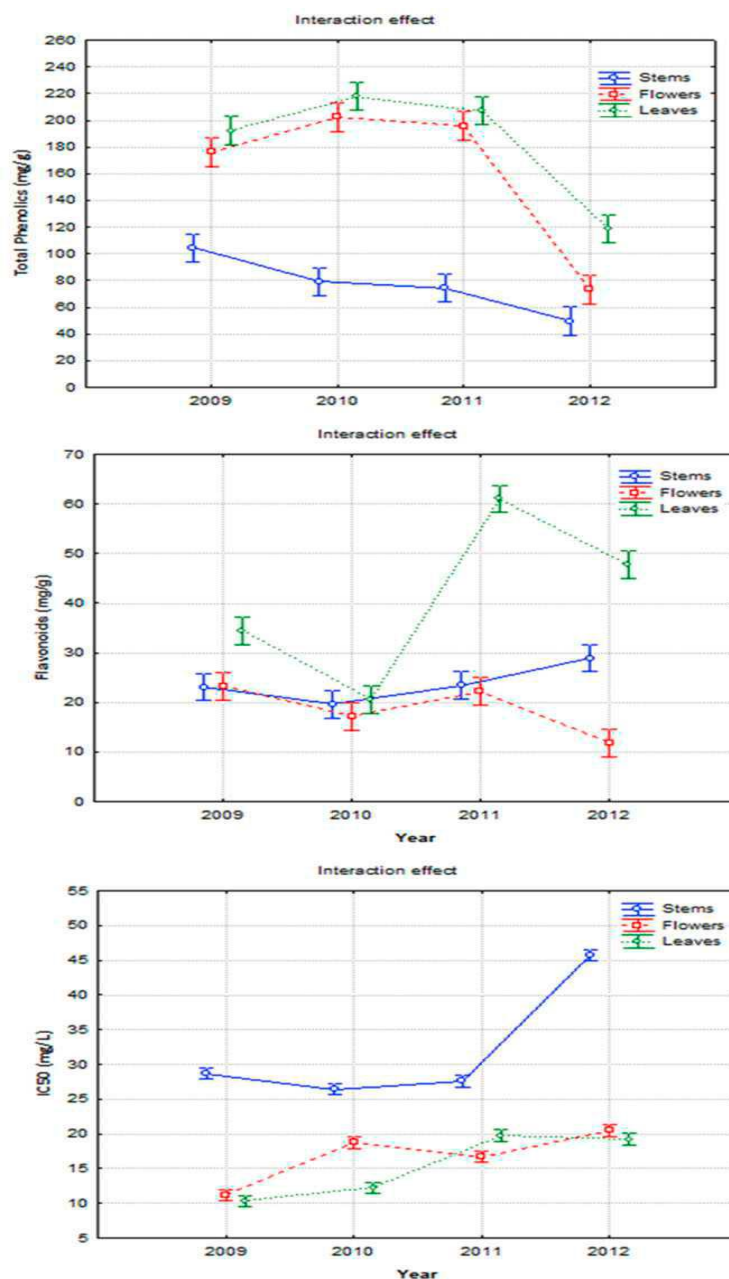


Figura 2.16 – Interação entre os fatores Ano de coleta e Parte da planta nos teores médios de fenólicos, flavonoides e capacidade antirradicalar IC₅₀ (mg/mL) nas amostras de *Verbena minutiflora*

Consequentemente, as folhas e flores apresentaram a melhor capacidade antirradicalar. O fator mais importante na definição do teor de fenólicos e de flavonoides no extrato foi a parte da planta extraída junto com a forma de extração, etanólica ou aquosa.

Em relação as infusões da *V. minutiflora*, observou uma elevada e constante concentração de componentes fenólicos durante todo o período de estudo que resultou em excelente capacidade antirradicalar.

A análise química das infusões da *V. minutiflora*, mostrou uma concentração de componentes bioativos similares independentemente do ano de coleta e sempre menores que os obtidos nos extratos etanólicos. As infusões apresentaram capacidade antirradicalar e portanto possuem potencial antioxidante *in vivo*. Portanto, a ingestão popular de *V. minutiflora* na forma de chás é justificada e apresenta como boa fonte de substâncias antioxidantes.

O chá é a bebida mais consumida depois da água, devido aos seus efeitos refrescantes e levemente estimulantes e também desempenha um papel importante na entrada de um número de elementos nutricionais nos seres humanos. Beber chá está associado com a redução do colesterol, a prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a diminuição do risco de doença cardiovascular, o seu consumo regular pode contribuir para as necessidades nutricionais diárias e também é considerada uma importante fontes de antioxidante (Almajano, et al., 2008; Malik, et al., 2008; Karak & Bhagat, 2010; Sang, et al., 2011).

Outras plantas medicinais do gênero *Verbena* tem demonstrado elevada capacidade antirradicalar como, por exemplo, a *V. officinalis* com $IC_{50}=21.04 \pm 1.61$ mg/mL para o extrato etanólico e $IC_{50} = 33.8 \pm 0.43$ mg/mL para a infusão (Rehecho et al., 2011).

Para investigar a possível influência de parâmetros meteorológicos nos teores de fenólicos e flavonóides, bem como na atividade antirradicalar da *V. minutiflora* coletada nos anos de 2009 a 2012, dados meteorológicos foram reunidos com o auxílio do Instituto Agrônômico do Paraná (tabela 2.3). No estudo foram consideradas as temperaturas mínimas e máximas, índice pluviométrico e radiação incidida. Os valores reportados na tabela correspondem aos parâmetros considerados para o mês de novembro, quando aconteceu a coleta da planta durante todos os anos de estudo.

Tabela 2.3– Dados Meteorológicos dos anos de estudo cedidos pelo IAPAR para o mês de novembro de cada ano considerado no estudo

Ano de Coleta	Temperatura Mín. (°C)	Temperatura Máx. (°C)	Índice Pluviométrico (mm)	Radiação (Cal/cm ² /d)
2009	14,6	24,3	253,4	13088,2
2010	12,1	24,0	119,8	20052,7
2011	12,2	23,4	149,3	15061,2
2012	13,5	25,4	137,3	14805,9

Combinando esses dados com os teores de fenólicos, flavonoides e atividade antirradicalar determinados para cada amostra de *Verbena minutiflora* verificou-se a possível correlação a partir dos coeficientes de correlação de Pearson (Tabela 2.4). No entanto, pelos valores observados entende-se que não há correlação simples entre os fatores meteorológicos considerados e os teores de fenólicos, flavonóides e atividade antirradicalar da *V. minutiflora* coletada nos anos de 2009 a 2012.

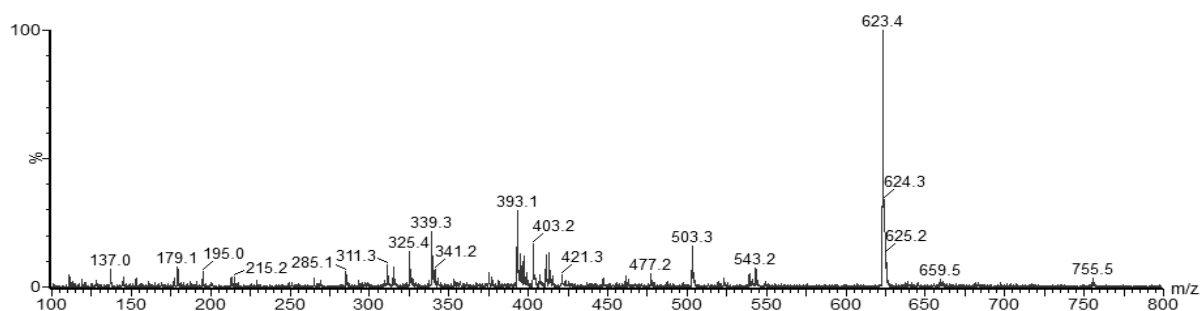
Tabela 2.4– Coeficientes de correlação de Pearson entre os dados meteorológicos e os compostos presentes na *Verbena minutiflora*

Metabolitos e Atividade Antirradicalar	Temperatura Mín.	Temperatura Máx.	Índice Pluviométrico	Radiação
Fenólicos Totais	-0,237	0,062	-0,144	0,366
	P = 0,763	P = 0,938	P = 0,856	P = 0,634
Flavonóides	0,079	-0,376	0,666	0,562
	P = 0,921	P = 0,624	P = 0,334	P = 0,438
IC₅₀	-0,169	-0,481	-0,071	0,029
	P = 0,831	P = 0,519	P = 0,929	P = 0,971

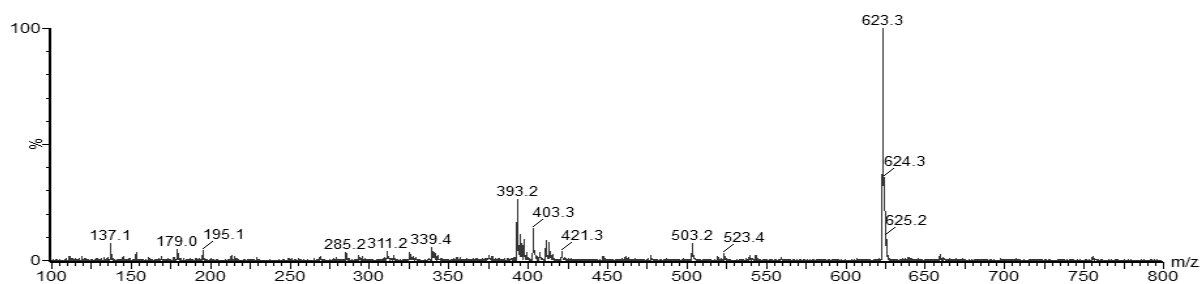
2.4.3. Composição Química e Análise da Variabilidade Anual das Partes Aéreas da *Verbena minutiflora*

Na figura 2.17 são mostrados os fingerprints obtidos por ESI(-)-MS para as flores nos anos de 2009 a 2012. Na figura 2.18 são mostrados os fingerprints obtidos por ESI(-)-MS para todas as partes da planta analisadas no ano de 2010. Os demais fingerprints estão disponíveis no anexo 1.

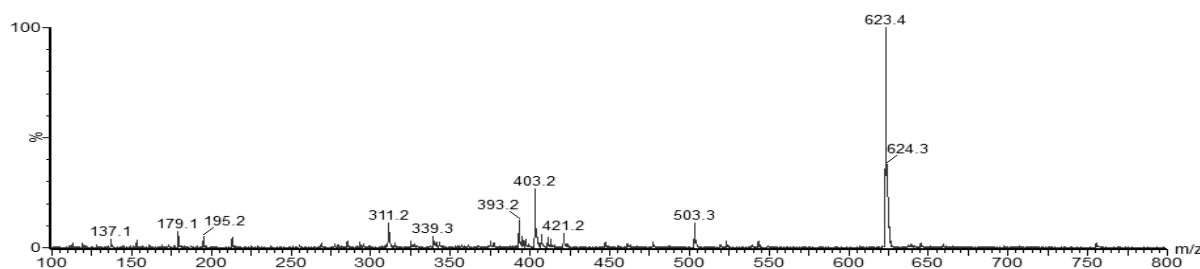
Flower 2009



Flower 2010



Flower 2011



Flower 2012

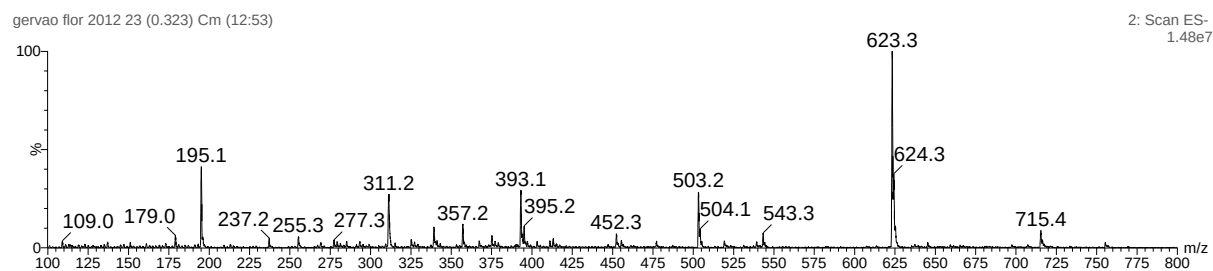
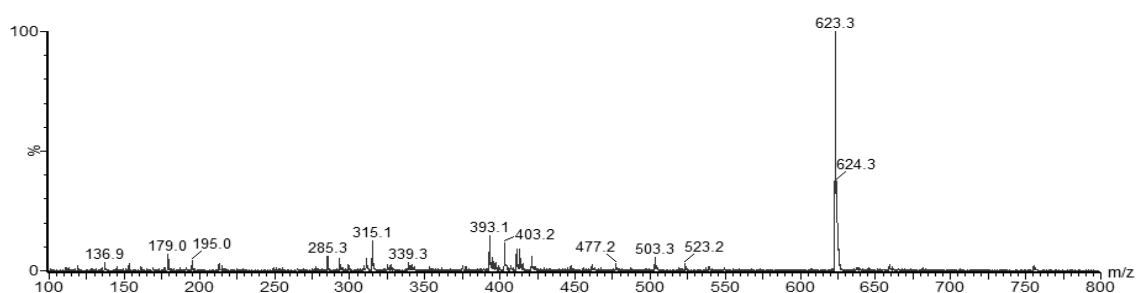


Figura 2.17 – ESI(-)-MS do extrato etanólico das flores da *Verbena minutiflora* coletadas de 2009 a 2012.

Os fingerprints (Figura 2.18) mostram que existe uma diferença qualitativa entre as partes da planta. A composição química das folhas e flores é semelhante, porém apresenta diferenças qualitativas se comparadas aos extratos do caule. Apenas o extrato da folha do ano de 2009 demonstrou uma diferença no fingerprints em relação aos outros anos de coleta (2010 a 2012). Porém, de maneira geral os fingerprints demonstram que não houve variação entre a composição qualitativa dos extratos no decorrer dos quatro anos de estudo (Figura 2.17).

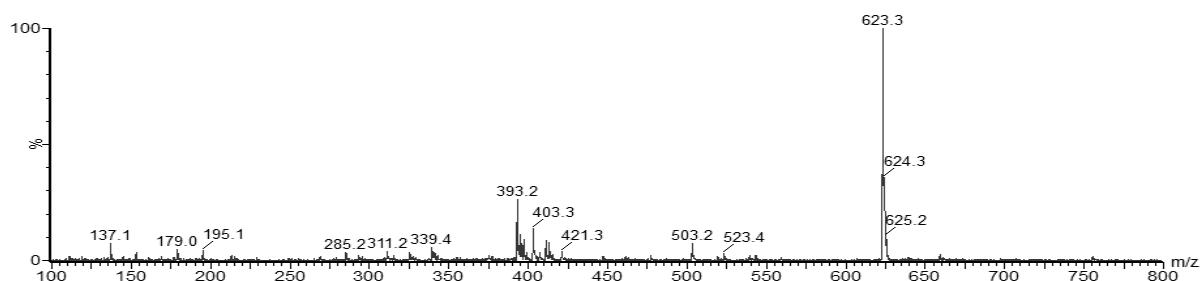
Gervão folhas (-)

2010



Gervão flor (-)

2010



Gervão caule (-)

2010

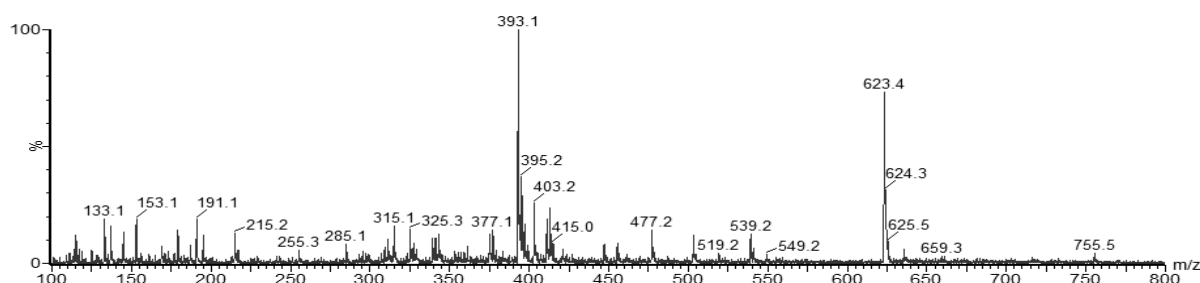


Figura 2.18 – ESI(-)-MS do extrato etanólico das folhas, flores e caule da *Verbena minutiflora* coletada no ano de 2010.

As impressões digitais ESI(-)-MS dos extratos de *V. minutiflora* mostram que esta espécie tem uma composição química semelhante a outras espécies do mesmo gênero (Deepak & Handa, 2000; Castro-Castro & Gamboa, 2004; Bilia, et al., 2008; Funes, et al, 2009; Rehecho et al, 2011; Schönbichler, et al, 2013). Os íons $[M-H]^-$ m/z 403 e 623 foram atribuídos ao iridoide hastatosídeo e os fenilpropanoides verbascosídeo e/ou isoverbascosídeo, respectivamente, baseado na interpretação do padrão de fragmentação por ESI(-)-MS/MS e comparação com os dados da literatura (Funes, et al, 2009; Rehecho et al, 2011). Estes compostos foram principalmente identificados nos extratos de folhas e flores, independentemente do ano de coleta e são comumente presentes em outras espécies de *Verbena* (Deepak & Handa, 2000; Castro-Castro & Gamboa, 2004; Bilia, et al., 2008; Funes, et al, 2009; Rehecho et al, 2011; Schönbichler, et al, 2013).

A análise da variabilidade anual da *V. minutiflora* mostra que não houve uma alteração significativa na produção dos metabólitos especializados, uma vez que, os fingerprints no modo negativo demonstram a presença dos íons $[M-H]^-$ 403 e 623 atribuídos ao iridoide hastatosídeo e os fenilpropanoides verbascosídeo e/ou isoverbascosídeo, respectivamente, em todos os anos de coleta. Também, verifica-se que esses metabolitos encontram-se principalmente nas folhas e flores. Pode-se observar que as variações climáticas ou ambientais ocorridas ano a ano não afetaram significativamente o metabolismo especializado de *V. minutiflora*.

No entanto, é importante notar que a capacidade de antirradicalar manteve a mesma tendência ao longo dos anos de estudo e extratos de folhas e flores tiveram maior capacidade antiradical que os extractos de caules (figura 2.16), independentemente do ano da coleta.

Os perfis químicos dos extratos de folhas e flores foram semelhantes, mas apresentaram diferenças qualitativas quando comparados com extratos do caule. Em geral, as impressões digitais ESI(-)-MS mostraram que não houve nenhuma alteração substancial qualitativa na composição dos extratos durante os quatro anos de estudo, o que indica que o metabolismo da planta não estava significativamente alterado pela variação ambiental.

Os metabólitos especializados em uma planta ocorrem em diferentes concentrações, onde vários fatores influenciam a presença destes, a sua formação pode ser afetada principalmente por alterações das condições ambientais, como já citado anteriormente, como por exemplo, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, disponibilidade de nutrientes e poluição atmosférica. A época de coleta da planta é um fator importante, pois são relatadas variações sazonais do conteúdo para praticamente todas as classes de metabólitos especializados, como os ácidos fenólicos, flavonoides, iridoides, entre outros. As plantas geralmente apresentam maiores teores de seus metabólitos especializados na primavera, ocorrendo um decréscimo no outono (Gobbo-neto & Lopes, 2007).

A *V. minutiflora* foi coletada sempre na primavera, pois ela é uma planta decídua, uma planta que, numa certa estação do ano, perde suas folhas, geralmente nos meses mais frios e sem chuva (outono e inverno). Por esse motivo, neste estudo não foi realizada a avaliação de variabilidade sazonal dos metabólitos especializados da *V. minutiflora*, uma vez que, são as folhas e flores de *V. minutiflora* as partes mais ricas nos metabolitos com capacidade antirradicalar e essas partes estão ausentes no outono e inverno, restando apenas às partes aéreas galhos e o caule (Gobbo-neto & Lopes, 2007).

As condições de coleta, estabilização, estocagem, podem ter grande influencia na qualidade e consequentemente no valor terapêutico das plantas medicinais, onde o controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos, envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade da matéria –prima tem um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (Gobbo-neto & Lopes, 2007).

2.4.4. Identificação dos Principais Constituintes presentes nas Partes Aéreas da *Verbena minutiflora*

A identificação dos constituintes presentes na *V. minutiflora* foi realizada por HPLC-DAD e LC-MS/MS através da comparação dos espectros de UV (HPLC-DAD, figura 2.19) e de MS (ESI-MS/MS, figura 2.20) dos picos cromatográficos observados para as amostras com dados relatados na literatura (Bilia et al., 2008; Rehecho et al., 2011; Funes et al., 2009).

Estudos de HPLC/DAD/ESI/MS com a *V. officinalis* demonstraram a presença de iridoides, fenilpropanoides e flavonoides que foram monitorados nos comprimentos de onda de 240, 330 e 350 nm, respectivamente (Bilia et al., 2008; Rehecho et al., 2011; Funes et al., 2009).

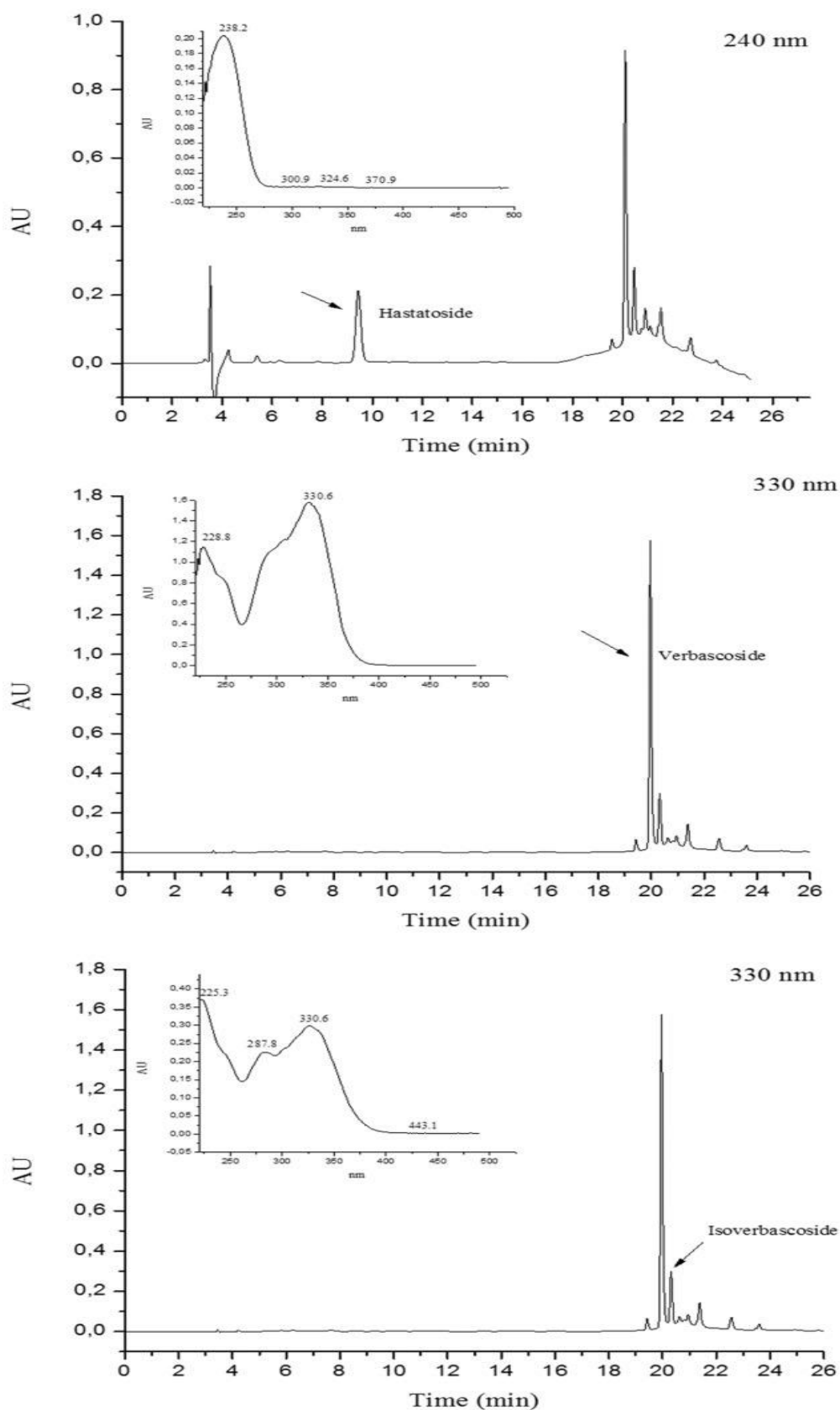


Figura 2.19 – Cromatograma do extrato etanólico das folhas da *Verbena minutiflora* coletada no ano de 2010 nos comprimentos de onda 240 e 330 nm e espectro UV dos picos cromatográficos destacados

A figura 2.19 mostra os cromatogramas obtidos por HPLC/DAD para o extrato etanólico das folhas 2010 da *V. minutiflora* no comprimento de onda de 240 e 330 nm. Os cromatogramas para as infusões são mostrados no anexo 2. O pico com tempo de retenção de 10 minutos no cromatograma detectado a 240 nm foi atribuído ao iridoide hastatosídeo. Da mesma maneira, os cromatogramas em 330 nm, possuem o pico no tempo de retenção em 21 minutos, sugerido como sendo o verbascosídeo ou seu isômero isoverbascosídeo, esses compostos foram anteriormente relatados para o gênero *Verbena* (Bilia et al., 2008).

Para confirmar a identidade dos componentes químicos majoritários de *V. minutiflora* foi realizada a análise por LC-MS e LC-MS/MS com ionização por eletrospray no modo negativo. A partir das perdas de massas observadas, por inspeção do padrão de fragmentação e pela comparação com dados da literatura (Bilia et al., 2008) foi possível sugerir a presença do iridoide hastatosídeo com íon $[M - H]^-$ de m/z 403 (figura 2.20 A).

A presença de vários fenilpropanoides derivados do verbascosídeo foi deduzida pela ocorrência de vários íons $[M - H]$ de m/z 623, porém com tempos de retenção diferentes e que apresentam padrão de fragmentação idêntico por ESI(-)-MS/MS (anexo 3). O verbascosídeo por ser ligeiramente mais polar do que o isoverbascosídeo, possui tempo de retenção menor que seu isômero em cromatografia de fase reversa (Bilia et al., 2008).

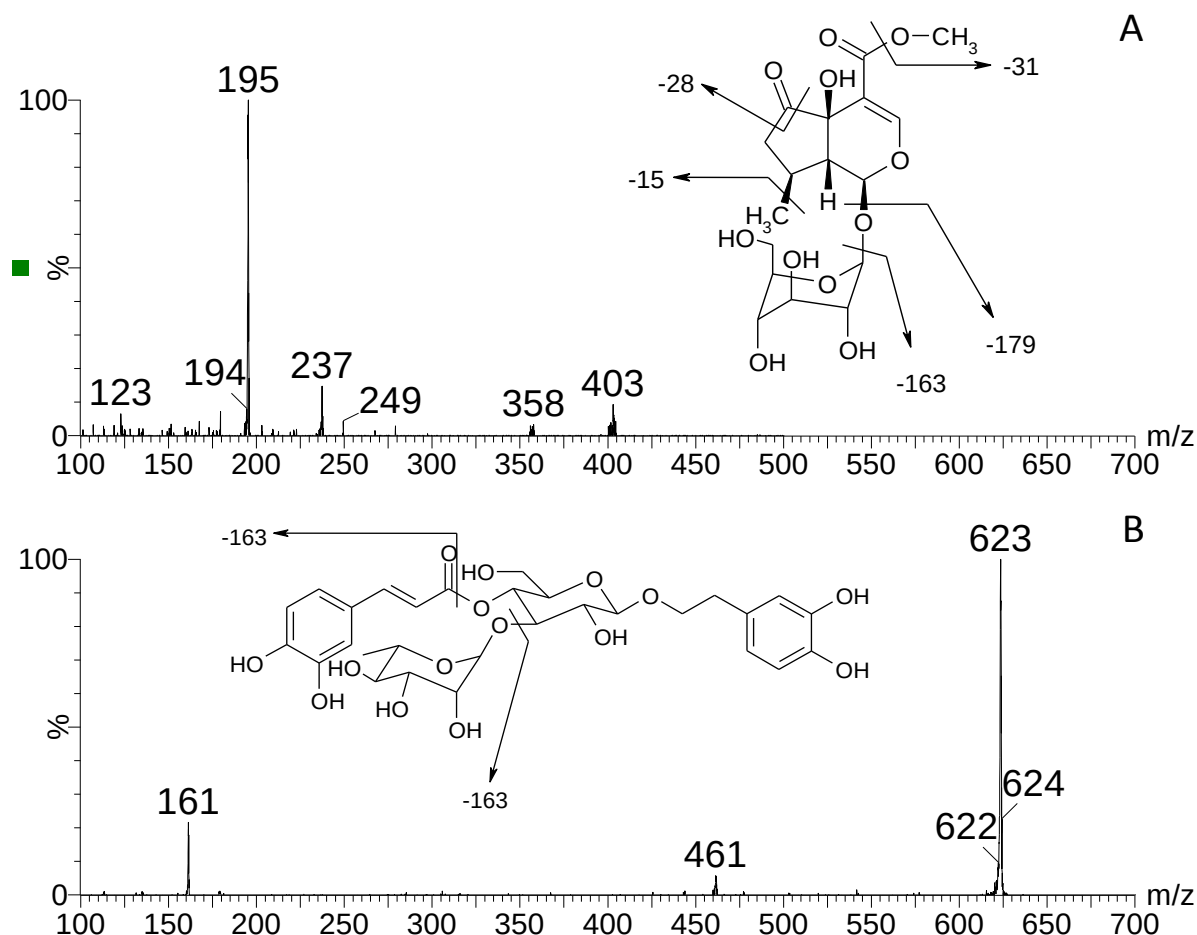


Figura 2.20 – Espectro ESI(-)-MS/MS e possíveis Fragmentações para (A) iridoide hastatosídeo e (B) fenilpropanoide verbascosídeo

As possíveis fragmentações que ambos os íons $[M-H]^-$ de m/z 403 e $[M-H]^-$ de m/z 623 sofrem estão representadas na figura 2.20, juntamente com as estruturas do iridoide hastatosídeo e do fenilpropanoide verbascosídeo.

Para o iridoide hastatosídeo, o pico base do espectro encontra-se em m/z 195, originado pela perda de 208 Da, compatível com a perda da unidade glicosídica (179 Da) e mais 28 Da pela perda de uma molécula neutra de CO $[M-2H-179-CO]^-$. Outros íons fragmentos são observados em m/z 358 correspondente à perda de 46 Da, que pode ser explicada como $[M-H-OCH_3-CH_3]^-$, em m/z 237 $[M-H-163-3H]^-$.

O espectro ESI-MS/MS do verbascosídeo (figura 2.20 B) mostrou seu íon desprotonado em m/z 623. O íon fragmento com m/z 461 é formado pela perda de 162 Da a partir do íon molecular desprotonado $[MH-162]^-$ ou pela

perda de 163 Da diretamente a partir do íon molecular. Essa fragmentação pode envolver a perda da unidade cafeoil ou a unidade de ramnose. Uma via de fragmentação semelhante pode produzir o íon m/z 161 pela perda de 462 Da a partir do íon molecular desprotonado $[M-H-462]^-$.

Sendo assim, com os dados da literatura, o espectro de massa do íon $[M-H]$ de m/z 623, juntamente com as possíveis fragmentações que os isômeros sofrem se consegue confirmar a presença destes compostos na *V. minutiflora*. Estes compostos já foram isolados e identificados por alguns autores para diferentes espécies do gênero *Verbena* (Bilia et al., 2008), (Deepak & Handa, 2000), (Schönbichler, et al., 2013; Rehecho et al., 2011; Castro-Gamboa & Castro, 2004). Contudo é a primeira vez que se reporta esse tipo de estudo para a espécie *V. minutiflora*. O verbascosídeo presente nos extratos de *V. minutiflora* possui várias atividades biológicas relatadas como atividade antiinflamatória, gastro-protetora, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, podendo ser o composto químico responsável pela potente atividade antioxidante dos extratos da planta (Funes et al., 2010; Singh et al., 2010).

Funes e colaboradores (2009) realizaram a avaliação de toxicidade oral aguda em ratos, para avaliar o efeito da ingestão oral de erva-cidreira (*Lippia citriodora*), uma planta pertencente à família Verbenaceae, que contém altos teores de verbascoside. Os autores testaram um extrato contendo um elevado teor de verbascosídeo para estabelecer a DL50 por via oral em ratos e nenhum sinal de toxicidade, a uma concentração tão elevada quanto 2000 mg/kg foi observado.

Parte destes resultados apresentados foi escrito um artigo científico intitulado “Variability and Chemical Composition of Aerials Parts of *Verbena minutiflora*”, que foi submetido, aceito e publicado pela revista Journal of Food Processing and Preservation (anexo 4).

2.5. Conclusões

Pela primeira vez é reportada a análise química da planta *Verbena minutiflora*. O estudo fitoquímico demonstrou que a maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides esta nas frações acetato de etila e extrato bruto. Por esse motivo esses extratos foram escolhidos para testes de atividade *in vivo*, juntamente com a infusão das folhas.

O estudo identificou a presença de hastatosídeo, verbascosídeo e isoverbascosídeo, metabólitos já identificados para outras plantas do gênero *Verbena*. A análise da variabilidade anual mostra que não houve uma alteração significativa na produção dos metabólitos especializados e que os extratos etanólicos da folha e flor apresentaram em média teores de fenólicos e flavonoides significativamente maiores que o extrato etanólico do caule e da infusão independentemente do ano de coleta. Os resultados validam o uso popular da infusão ou de preparado fitoterápico de *V. minutiflora* uma vez que todos os extratos apresentaram alto teor de compostos fenólicos e, portanto, potencial antioxidante principalmente para as partes aéreas folhas e flor.

Também se verifica que a infusão de *V. minutiflora*, apesar de conter teores mais baixos de fenólicos e flavonoides, apresenta capacidade antiradicalar o que justifica seu consumo na forma de chá.

2.6. Referências Bibliográficas

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, 152, 46–55, 2014.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 17: 114-140, 2007.

ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, J. A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chem.** 108(1), 55–63, 2008.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89(1), 27–36, 2005.

BIEZA, K.; LOIS, R. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiol.** 126, 1105, 2001.

BILIA, A. R.; GIOMI, M.; INNOCENTI, M.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 46, 463–470, 2008.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B. DA.; RAMOS, M. A. D. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flanonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.** 186, 343-355, 1990.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Quím Nova.** 32(2), 296–302, 2009.

BROOKS, J. S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochem. Syst. Ecol.** 32, 769-782, 2004.

CASTRO-GAMBOA, I.; CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry.** 65, 2369–2372, 2004.

DEEPAK, M.; HANDA, S. S. Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. **Phytotherapy Research**, 14, 463-465, 2000.

FUNES, L.; FERNANDEZ-ARROYO, S.; LAPORTA, O.; PONS, A.; ROCHE, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chem**, 117(4), 589–598, 2009.

FUNES, L.; LAPORTA, O.; CERDAN-CALERO, M.; MICOL, V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chem Phys Lipids.** 163(2), 190–199, 2010.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos especializados. **Quím. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. ***Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*** 355, 1499, 2000.

KARAK, T.; BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. ***Food Res Int.*** 43(9), 2234–2252, 2010.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. ***Plant Physiology*** 125, 58–60, 2001.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. ***Quim. Nova***, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 119, p. 559-574, 2008.

MALIK, J.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; BALIK, J.; KOKOSKA, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. ***Food Chem.*** 111(2), 520–525, 2008.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALANTINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. ***Apacame***, São Bernardo do Campo, 2005.

MENKOVIC, N.; SAVIKIN-FODULOVIC, K.; SAVIN, K. Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in *Gentiana lutea* leaves and flowers. ***Planta Med.*** 66, 178–80, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. ***Biologia Vegetal***. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REHECHO, S.; HIDALGO, O.; CIRANO, M. G.; NAVARRO, I.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 875-882, 2011.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH. **Food Chem.** 114, 693–695, 2009.

SANG, S.; LAMBERT, J. D.; HO, C. T.; YANG, C. S. 2011. The chemistry and biotransformation of tea constituents. **Pharmacol Res.** 64(2), 87–99, 2011.

SCHWOB, I.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. **C. R. Biol.** 325, 781–785, 2002.

SCHÖNBICHLER, S. A; BITTNER, L. K. H.; PALLUA, J. D.; POPP, M.; ABEL, G.; BONN, G. K.; HUCK, C. W. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 84, 97–102, 2013.

SCHMIDT, E. M.; STOCK, D.; CHADA, F. J. G.; FINGER, D.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; FELSNER, M. L.; QUINÁIA, S. P.; MONTEIRO, M. C.; TORRES, Y. R. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. **BioMed Res Int.** 1–10, 2014.

SINGH, N.; SHUKLA, N.; SINGH, P.; SHARMA, R.; RAJENDRAN, S. M.; MAURYA, R.; PALIT, G. Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. **Fitoterapia.** 81(7), 755–761, 2010.

SOUZA, C. M. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 30, 351-355, 2007.

TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytol.** 163, 547, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**. 8, 519-528, 2005.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**. 50, 115, 2001.

**CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DE IRIDOIDES E
FENILPROPANOIDES EM EXTRATOS E INFUSÕES DE *Verbena
minutiflora* POR HPLC-UV: VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL**

3.1. Validação de Métodos Analíticos

De acordo com a Anvisa (2003) a eficácia e a segurança das plantas medicinais são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em publicações ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. Desta forma os estudos devem conter, nome botânico com referência aos autores, detalhes da fonte da planta, descrição do material vegetal, testes de identificação dos princípios ativos ou marcadores, ensaios dos constituintes de atividade terapêutica, métodos para determinação de possíveis contaminações por pesticidas, testes para metais pesados e contaminantes semelhantes, materiais estranhos e adulterantes e teste para radiação e contaminação microbiana. A validação de equipamentos e processos é outra etapa para a garantia de qualidade, na qual esta trás evidências documentadas de que tanto os equipamentos quanto o processo cumprem satisfatoriamente sua finalidade quando utilizados corretamente.

Atualmente uma preocupação com a utilização segura das plantas medicinais e dos fitoterápicos, levando ao desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e quantificação de substâncias e/ou compostos químicos que possam estar presentes em diferentes matrizes, como uma forma de controle de qualidade e para garantir a segurança, as técnicas de separação, como HPLC e CG ganham destaque, devido à capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas em diferentes amostras, como por exemplo, amostras ambientais, biológicas, farmacêuticas e em alimentos (Ribani et al., 2004).

Os métodos analíticos desenvolvidos devem originar resultados que sejam confiáveis. Para isso, é necessário avaliar o método proposto, sua eficiência, bem como sua precisão e exatidão, para que este possa ser aplicado como método de análise de rotina em um laboratório (Ribeiro et al., 2008). Para que isso ocorra, um estudo de validação de método é de extrema importância e deve ser realizado, o qual é um processo que define as exigências analíticas, para confirmar se o método proposto apresenta bom desempenho para determinada finalidade e para garantir a confiabilidade dos resultados (Ribani et al., 2004; Ribeiro et al., 2008).

O estudo de validação pode ser realizado de forma intralaboratorial (*in house validation*), em que as etapas de validação são realizadas em um único laboratório, ou de forma completa (*full validation*) em que se realiza um estudo interlaboratorial para avaliar o comportamento da metodologia com uma matriz específica em laboratórios diferentes (Ribani et al., 2004).

A validação de métodos é realizada por meio de parâmetros de validação, que são os indicadores do bom desenvolvimento e confiabilidade da metodologia, para um estudo de validação são determinados normalmente os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), exatidão e robustez (Ribeiro et al., 2008; Araujo, 2009).

A seletividade permite verificar se o método é seletivo para quantificar o analito de interesse na presença de outras substâncias que podem interferir na análise em uma amostra complexa (Araujo, 2009; Ribani et al., 2004). Este parâmetro é o primeiro passo a ser avaliado na validação de um método que está sendo desenvolvido (Ribani et al., 2004). A seletividade pode ser avaliada pela comparação da matriz sem a substância de interesse e a matriz contendo esta substância (adição de uma quantidade de padrão). Assim nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância que está sendo analisada. Esta avaliação pode ocorrer ainda, pela utilização de detectores modernos, como arranjo de diodos e espectrômetro de massas, em que há a comparação do pico obtido na separação dos componentes de uma amostra com o do padrão, indicando assim, a presença do composto puro (Ribani et al., 2004).

A linearidade permite determinar a faixa na qual o sinal analítico é linearmente proporcional à concentração do analito de interesse, sendo esta análise realizada por meio de curva de calibração ou curva analítica, as curvas de calibração podem ser construídas pelo método de padronização externa, adição de padrão e padronização interna. Para analisar a linearidade do método, realiza-se uma regressão linear (Ribani et al., 2004; Ribeiro et al., 2008). Na literatura, muitos pesquisadores consideram ainda o coeficiente de correlação linear (r) como uma forma de avaliar a linearidade. Segundo a Anvisa (2003) este deve ser $> 0,99$.

A sensibilidade do método pode ser avaliada por meio dos limites de detecção e de quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito que pode ser detectada pela técnica instrumental e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão do método (Ribeiro et al., 2008).

A precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, é determinada através do desvio padrão relativo, sigla em inglês *relative standard deviation* (RSD) ou coeficiente de variação (CV) e pode ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribeiro et al., 2008; Araujo, 2009).

A repetitividade permite verificar se os resultados obtidos para as análises de uma amostra são concordantes, utilizando as mesmas condições de análise, mesmo analista, instrumento e laboratório e no mesmo dia (Ribani et al., 2004). A precisão intermediária é uma estimativa da precisão do método dentro de um mesmo laboratório (intralaboratorial), utilizando as mesmas condições, mas com analistas, equipamentos e/ou dias diferentes, ou combinação dos três fatores (Ribeiro et al., 2008; Ribani et al., 2004). A reprodutibilidade é a precisão realizada para uma mesma amostra, em laboratórios diferentes, com as mesmas condições de análise (Ribeiro et al., 2008; Ribani et al., 2004).

A exatidão de um método permite verificar se os resultados individuais obtidos para uma amostra apresentam concordância com um valor de referência considerado como verdadeiro (Ribeiro et al., 2008). A exatidão de um método pode ser avaliada pelo uso de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (Ribani et al., 2004).

Os parâmetros utilizados para a validação de um método diferem dependendo da finalidade do mesmo, bem como a técnica analítica empregada ou protocolo de validação a ser seguido (Ribani et al., 2004; Ribeiro et al., 2008).

Os fenilpropanoides e iridoides têm sido apontados como os responsáveis pelas atividades do gênero *Verbena* e sugeridos como seus marcadores químicos. Assim, e de extrema importância conhecer os teores dessas classes de compostos bioativos presentes na *V. minutiflora*. Uma vez

que não existem estudos prévios sobre a concentração desses compostos em *V. minutiflora* e para ter garantia da confiabilidade dos resultados gerados, neste estudo foi realizada primeiramente a validação de método HPLC-DAD para determinar os teores de verbascosídeo, fenilproanóides e iridoides na *V. minutiflora*.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo Geral

Determinar o teor de fenilpropanoides e iridoides em extratos e infusões das partes aéreas da *Verbena minutiflora*.

3.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar e validar um método analítico HPLC-DAD para a determinação do fenilpropanoide verbascosídeo e seus derivados e para a classe de iridoides, compostos reconhecidos como marcadores químicos do gênero *Verbena*;
- ✓ Aplicar diferentes testes estatísticos (ANOVA e regressão linear) para análise dos resultados dos ensaios de validação do método analítico;
- ✓ Reportar o teor de fenilpropanoides e iridoides em diferentes amostras de *Verbena minutiflora* determinados pelo método HPLC—DAD validado.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Preparo dos Extratos e Infusões

Para realizar o estudo da validação do método de HPLC-DAD para a determinação de fenilpropanoides e iridoides em partes aéreas da *Verbena minutiflora* foi utilizado os extratos e infusões de diferentes partes da planta, que foram coletados 4 anos consecutivos, sempre no mês de novembro.

A preparação dos extratos das folhas, flores e caules e infusões das folhas da *Verbena minutiflora* foi realizada como descrito no item 2.3.3 e 2.3.4.

3.3.2. Análises por HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD dos extratos das folhas, flores e caules e infusões das folhas da *Verbena minutiflora* foi realizada como descrito no item 2.3.6.

3.3.3. Validação Intralaboratorial do Método HPLC-DAD para Determinação de Fenilpropanoides e Iridoides nas amostras da *Verbena minutiflora*

3.3.3.1. Amostras

Para realizar a validação do método para quantificação dos fenilpropanoides verbascosídeo e seus derivados e para a classe de iridoides nas diferentes amostras coletadas da *Verbena minutiflora*, foram selecionadas três amostras aleatoriamente, que foram folhas 2010, flores 2011 e caule 2012.

3.3.3.2. Padrões Analíticos

Nos estudos de validação e aplicação da metodologia analítica foram utilizados os padrões Verbascosídeo 86,87% HWI Analytik GMBH Pharma Solutions (Alemanha) e o Geniposídeo 98% (Sigma-Aldrich).

3.3.3.3. Preparo das Soluções das Amostras

As amostras analisadas apresentaram concentrações de fenilpropanoide verbascosídeo e iridoides diferentes. Em vista disso, a concentração das soluções das amostras foi ajustada para assegurar que a área do pico do verbascosídeo e iridoides nos cromatogramas estivesse dentro da faixa de

áreas dos padrões usados para a construção da curva de calibração. As soluções das amostras selecionadas e os padrões foram preparados em metanol. Preparou-se uma solução estoque de ambos os padrões de 500 µg/mL. Para os estudos de validação e aplicação da metodologia cromatográfica para a determinação de fenilpropanoides, a concentração das soluções das amostras da folha 2010, flor 2011 e caule 2012 foi igual a 2,3; 2,2 e 6,2 µg/mL, respectivamente. Da mesma forma, para a determinação dos iridoides, a concentração das soluções das amostras da folha 2010, flor 2011 e caule 2012 foi igual a 8,2; 8,1 e 6,1 µg/mL, respectivamente.

3.3.3.4. Validação do Método de Determinação do Verbascosídeo e derivados fenilpropanoides e de Iridoides em *Verbena minutiflora*

Para realizar a validação do método para quantificação do fenilpropanoide verbascosídeo e seus derivados, bem como para a classe de iridoides nas diferentes amostras coletadas da *Verbena minutiflora*, foram selecionadas três amostras aleatoriamente, que foram folhas 2010, flores 2011 e caule 2012. A validação do método foi feita por HPLC-UV e realizada pela avaliação de diferentes parâmetros.

3.3.3.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos espectros UV-PDA do padrão de verbascosídeo e do geniposídeo com os picos cromatográficos atribuídos ao verbascosídeo e a iridoides nas amostras. Adicionalmente foram comparados os tempos de retenção nos cromatogramas de padrões e de analitos em amostras de *V. minutiflora*. Como reportado por Bilia e colaboradores (2008) os fenilpropanides foram monitorados no comprimento de onda de 330 nm e os iridoides em 240 nm.

3.3.3.6. Linearidade

Para avaliar a linearidade do método foi construída uma curva analítica com soluções padrão de verbascosídeo na faixa de 40 a 200 µg/mL e da mesma forma para o geniposídeo na faixa de 50 a 500 µg/mL.

Aos dados do experimento de calibração (área do pico e concentração) foi ajustado um modelo linear pela aplicação da técnica de regressão linear no

nível de 95% de confiança. Para avaliar a linearidade do modelo gerado foi realizada uma análise de variância característica da regressão linear a 95% de confiança e foi aplicado um teste de falta de ajuste (F_{faj}) para verificar se o modelo gerado é apropriado. Os valores de linearidade foram comparados de acordo com as recomendações da Anvisa (2003) e da AOAC (2012).

3.3.3.7. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para avaliar se o método proposto possibilitaria a determinação de verbascosídeo e iridoides presente nas amostras em baixas concentrações foram calculados os limites de detecção e de quantificação. Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados com base em $3 \times s/b$ e $10 \times s/b$, respectivamente, em que s é o desvio padrão do intercepto da curva de calibração e b é o coeficiente angular da equação da curva analítica (Araújo, 2009) obtidas por regressão linear.

3.3.3.8. Precisão

O estudo de precisão foi realizado avaliando-se a repetitividade, no mesmo dia em períodos diferentes (manhã e tarde) e a precisão intermediária, realizada em 05 dias diferentes nas mesmas condições do estudo de repetitividade. Este parâmetro foi analisado pelo desvio padrão relativo DPR (%) da repetitividade e da precisão intermediária, calculado pela equação $DPR (\%) = (S/x) \times 100$, em que S é o desvio padrão das amostras e x é a concentração média determinada. Os valores de desvio padrão relativos foram analisados de acordo com as recomendações da Anvisa.

3.3.3.9. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação por adição de padrão de verbascosídeo e geniposídeo em três níveis de concentração (50, 120 e 180 $\mu\text{g/mL}$) e (80, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, para as três amostras investigadas de folha, flor e caule. As taxas de recuperação foram calculadas pela equação $Recuperação(\%) = [(C_1 - C_2)/C_3] \times 100$. Em que C_1 = concentração do analito na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 = concentração do analito adicionado à amostra.

3.3.3.10. Quantificação de Verbascosídeo e Iridoides em amostras de *Verbena minutiflora*

Após a realização do estudo de validação do método de HPLC-DAD para a determinação de verbascosídeo e iridoides nas amostras selecionadas, o mesmo foi aplicado a todas as amostras de folhas, flores, caules e infusões (2009, 2010, 2011 e 2012) da *Verbena minutiflora*. Os teores de verbascosídeo e iridoides foram determinados em triplicatas, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas validadas descritas.

3.3.4. Análise Estatística

Para uma melhor interpretação dos resultados aplicaram-se ferramentas estatísticas como Análise de Variância de dois fatores (ANOVA). Toda a análise estatística aplicada nesta pesquisa foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2.

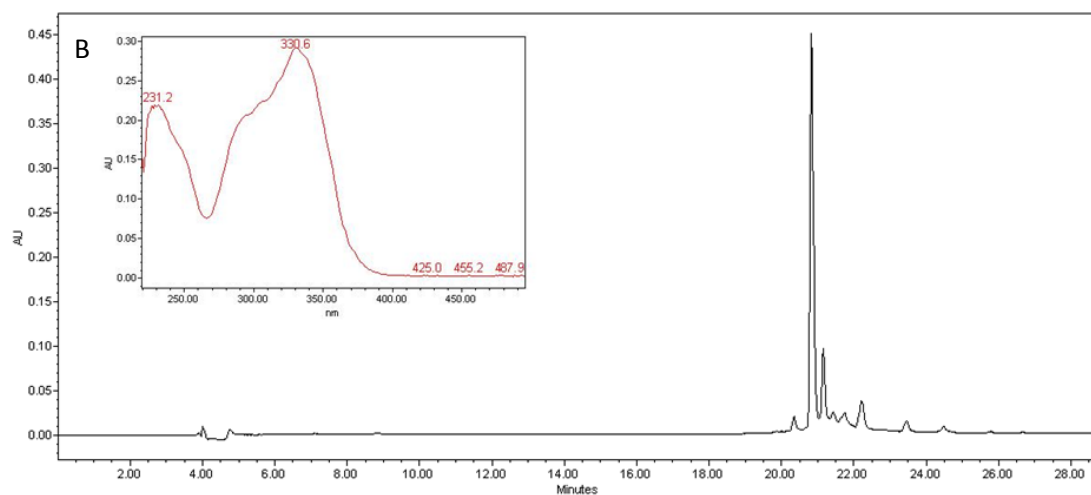
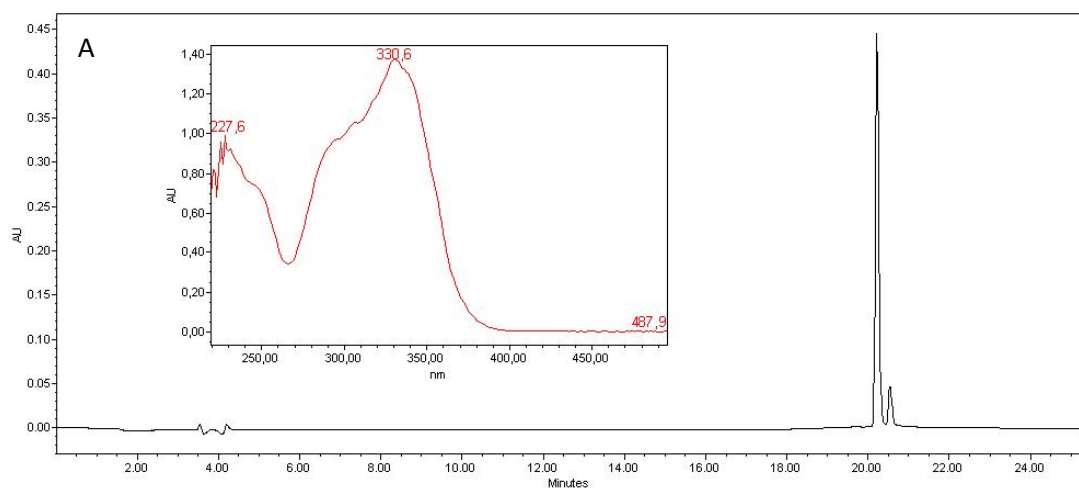
3.4. Resultados e Discussões

3.4.1. Validação do Método Cromatográfico para Determinação Quantitativa de Verbascosídeo e seus derivados e Iridoides em extratos de *Verbena minutiflora*

No presente estudo foi realizada a validação intralaboratorial para a determinação de verbascosídeo e outros fenilpropanoides e também de iridoides nos extratos e infusões das partes aéreas de *V. minutiflora*. Foram verificados os parâmetros de validação a seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

A seletividade do método de determinação do verbascosídeo por HPLC-DAD foi confirmada pelo perfil similar dos espectros UV-PDA do padrão de verbascosídeo e do pico atribuído ao verbascosídeo nas amostras, com máximo de absorção em 330 nm para o tempo de retenção de 20.1 min (figura 3.1). Ainda, é possível observar em todos os cromatogramas a ocorrência de picos cromatográficos com tempo de retenção próximos ao verbarcosideo (tempo de retenção entre 20 e 22 min). A inspeção dos espectros UV-DAD desses picos revelou que os mesmos correspondem a compostos derivados do verbascosídeo, ou seja, a fenilpropanoides de estrutura similar. A ocorrência desses compostos em plantas do gênero *Verbena* é comumente relatada (Bilia,

et al., 2008; Funes, et al, 2009; Rehecho et al, 2011; Schönbichler, et al, 2013). Dessa maneira, o método analítico desenvolvido permitiu diferenciar entre verbascosídeo e os seus análogos, tornando-se possível determinar o teor de verbascosídeo e o teor total de fenilpropanoides em amostras de *V. minutiflora*. Assim, a seletividade do método para a determinação de fenilpropanoides é garantida pelo perfil similar dos espectros UV-PDA do padrão de verbascosídeo e dos compostos nas amostras de *V. minutiflora* que apresentam tempo de retenção próximo ao padrão verbascosídeo.



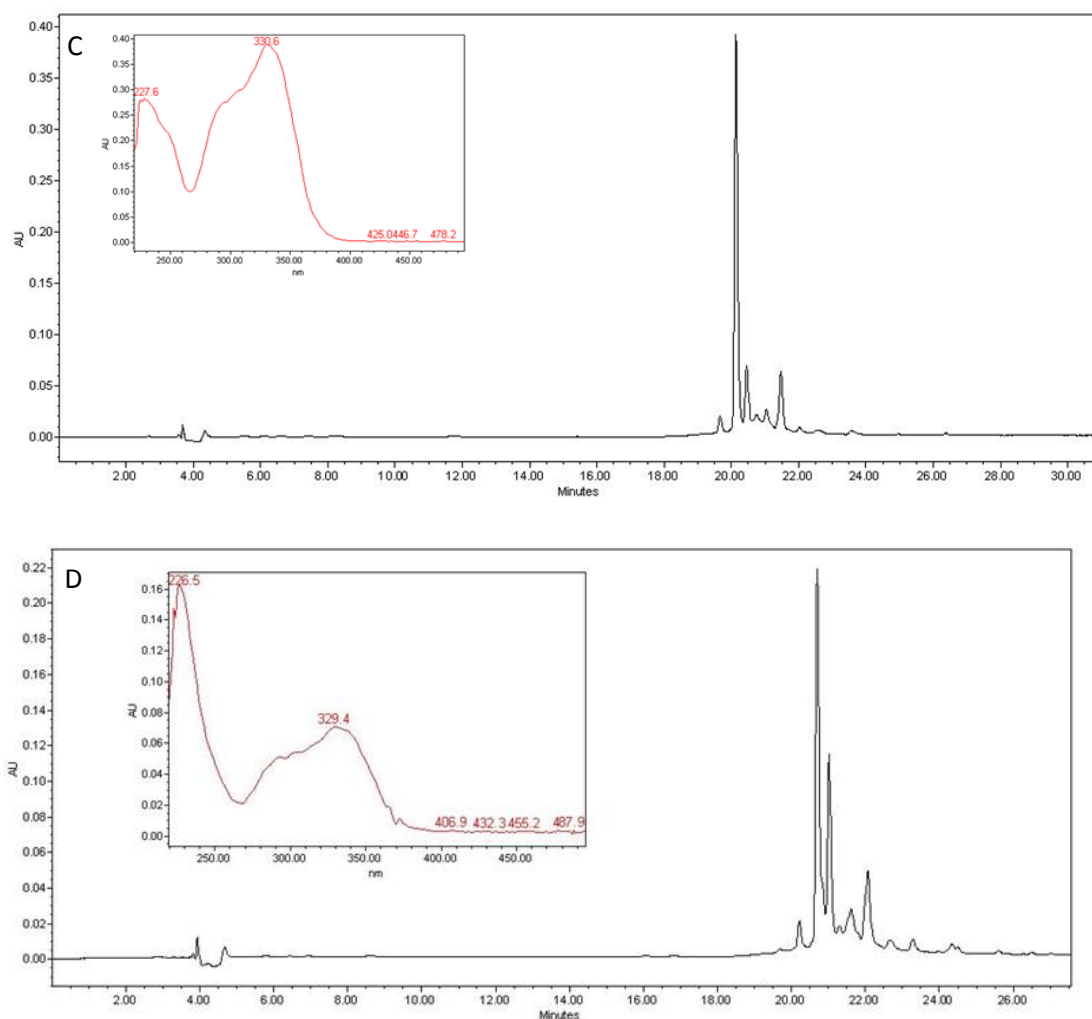
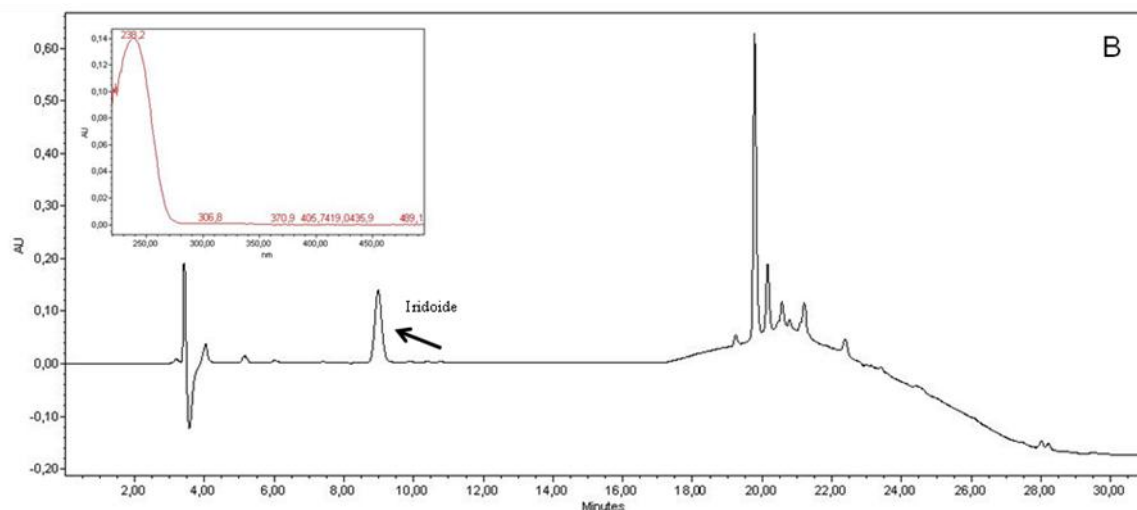
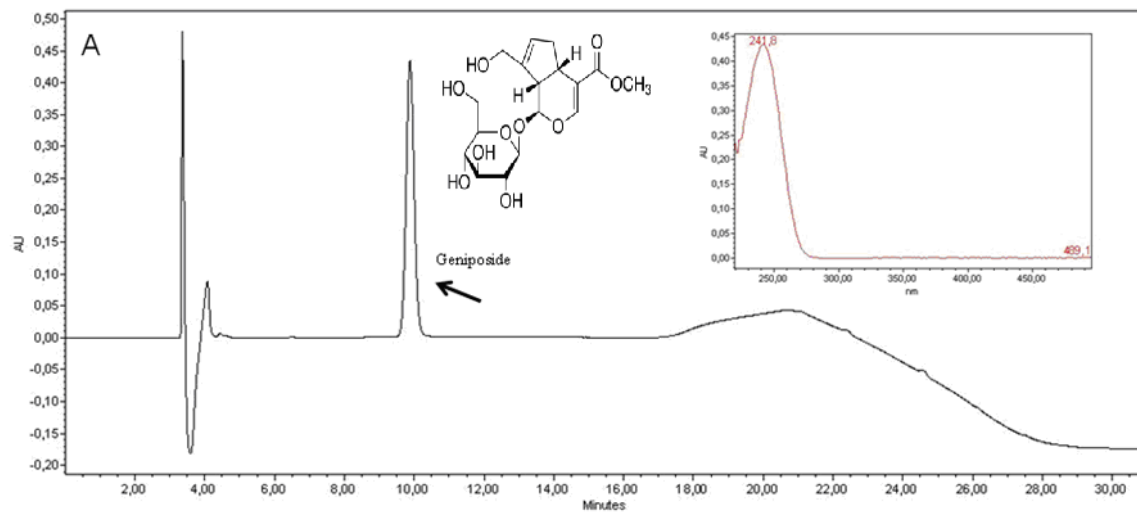


Figura 3.1 - Cromatograma a 330 nm e espectro UV do pico com tempo de retenção 20.1 minutos do padrão Verbascosídeo (A) e das amostras das Folhas 2010 (B), Flores 2011 (C) e Caule 2012 (D) da *Verbena minutiflora*.

A seletividade do método foi também avaliada para a classe de iridoides. O Geniposídeo não ocorre nas amostras de *V. minutiflora* sob investigação, mas previamente identificou-se o iridoide hastatosídeo como um composto bioativo destas amostras de *V. minutiflora*.

O Geniposídeo e hastatosídeo estão estruturalmente relacionados e, sob o conjunto de condições analíticas cromatográficas, estes compostos apresentaram o mesmo tempo de retenção em 9,8 min. Além disso, ambos os compostos têm perfil de absorção de UV-DAD idêntico com um máximo de absorção a 240 nm (figura 3.2). Em vista destes fatos, o iridoide geniposídeo foi considerado um padrão apropriado para determinar iridoides em *V. minutiflora*.

Consequentemente, o método cromatográfico proposto apresentou seletividade adequada para análise de iridoides nas amostras investigadas e o teor de iridoides pode ser relatado como equivalentes ao geniposídeo.



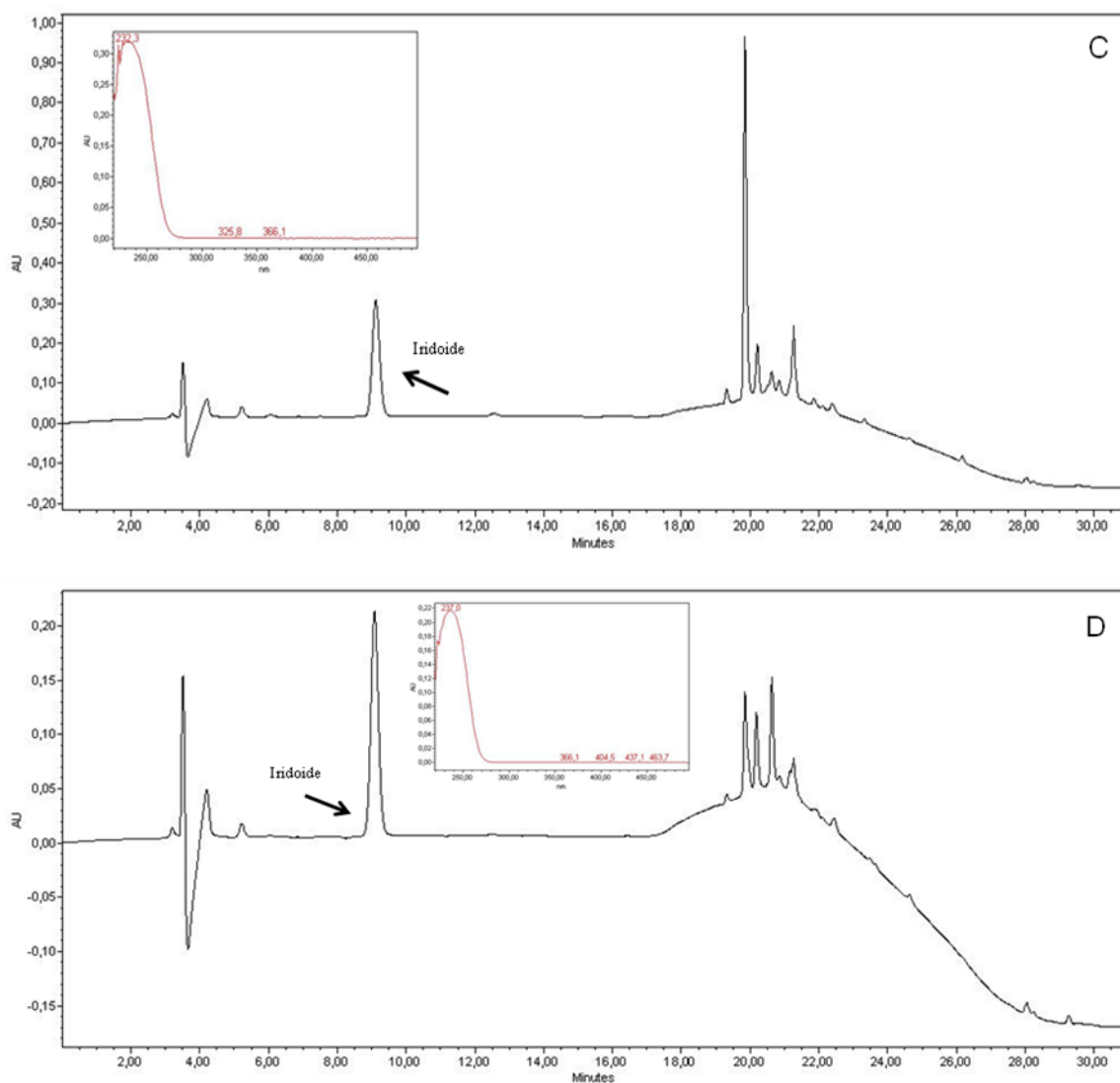


Figura 3.2 - Cromatograma a 240 nm e espectro UV do pico com tempo de retenção 9.8 minutos do padrão Geniposídeo (A) e das amostras das Folhas 2010 (B), Flores 2011 (C) e Caule 2012 (D) da *Verbena minutiflora*.

Para avaliar a linearidade do método de HPLC-DAD para a determinação de verbascosídeo, fenilpropanoides e iridoides em *V. minutiflora* foi construída uma curva analítica com soluções padrão de verbascosídeo na faixa de 40 a 200 µg/mL e do padrão geniposídeo na faixa de 50 a 500 µg/mL. Aos dados do experimento de calibração (área do pico e concentração) foi ajustado um modelo linear pela aplicação da técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança. Para avaliar a linearidade do modelo gerado foi realizada uma análise de variância característica da regressão linear a 95% de confiança e foi aplicado um teste de falta de ajuste (F_{faj}) para verificar se o modelo gerado foi apropriado. Os resultados (tabela 3.1) indicam que o modelo

linear é adequado para estabelecer a relação entre a área do pico cromatográfico do verbascosídeo e/ou iridoide e a concentração, pois apresentou valores para F_{faj} não significativos no nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Este fato é ressaltado também pelo valor do $F_{regressão}$ altamente significativo ($p = 0,000$) observado no mesmo nível de confiança. A curva analítica de calibração para o verbascosídeo (Figura 3.3) foi linear na faixa de concentrações estudada e pode ser representada pela equação: $\text{área} = -199442,89655 + 20935,64808 \times \text{concentração de verbascosídeo } (\mu\text{g/mL})$ e a curva analítica de calibração para o geniposídeo (Figura 3.4) também foi linear na faixa de concentrações estudada e pode ser representada pela equação: $\text{área} = -199442,89655 + 20935,64808 \times \text{concentração de geniposídeo } (\mu\text{g/mL})$.

Tabela 3.1 – Parâmetros de Regressão Linear para Verbascosídeo e Geniposídeo

Verbascosídeo					
Regressão		Falta de Ajuste		r	R^2
$F_{regressão}$	valor de p	F_{faj}	valor de p	0.996	99.2
2518.5	0.000	0.30	0.902		
Coeficientes da Reta de Regressão $\pm$ Erro Padrão				$t_{observado}$	valor de p
Intercepto: -199443 ± 58062				3.43	0.003
Inclinação: 20936 ± 417				50.18	0.000
Geniposídeo					
Regressão		Falta de Ajuste		r	R^2
$F_{regressão}$	valor de p	F_{faj}	valor de p	0.998	99.6
3998.4	0.000	5.16	0.008		
Coeficientes da Reta de Regressão $\pm$ Erro Padrão				$t_{observado}$	valor de p
Intercepto: 278769 ± 63734				4.37	0.000
Inclinação: 13415 ± 212				63.23	0.000

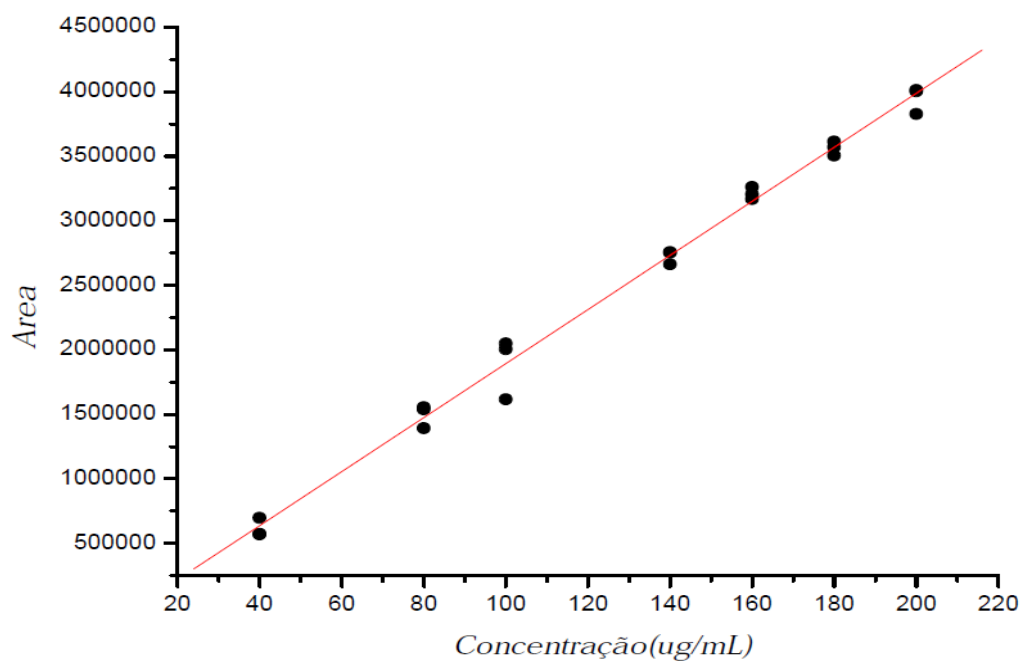


Figura 3.3 - Curva analítica para determinação de Verbascosídeo e teor de fenilpropanoides em extratos de *V. minutiflora* por HPLC-DAD.

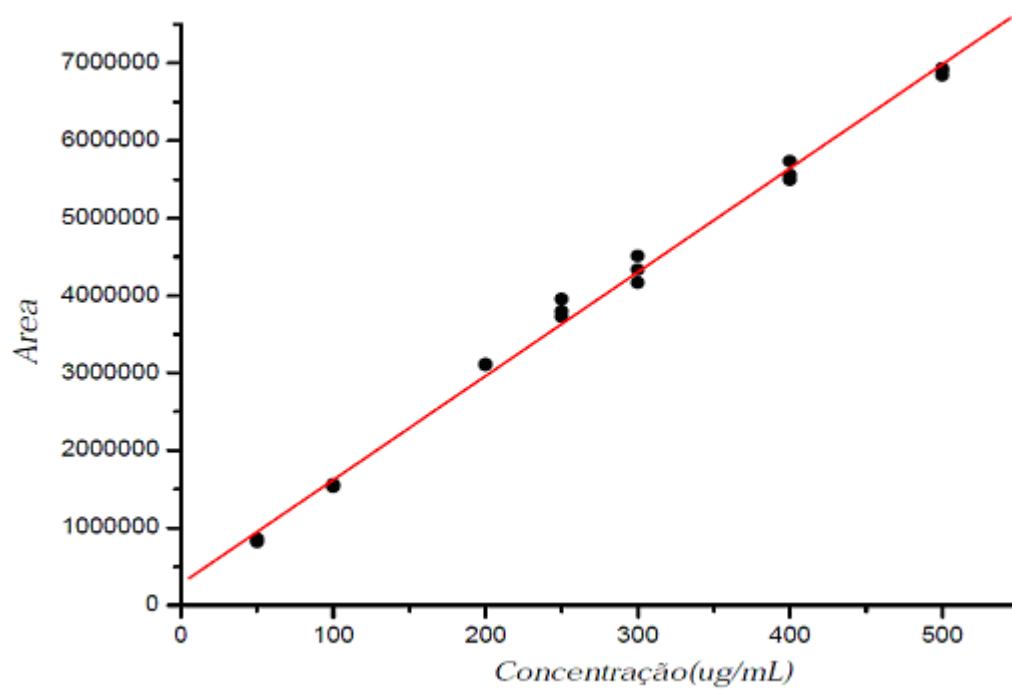


Figura 3.4 - Curva analítica para determinação de Geniposídeo e teor de iridoides em extratos de *V. minutiflora* por HPLC-DAD.

Para o verbascosídeo e o geniposídeo, respectivamente, o coeficiente de determinação (R^2) mostrou que a regressão linear explica 99,2% e 99,6% da variação de dados para verbascosídeo e geniposídeo, respectivamente, no qual apenas 0,8% (verbascosídeo) e 0,4% (geniposídeo) são referentes aos resíduos ou erros aleatórios. Os coeficientes observados de correlação (r) de 0,996 e 0,998 para verbascosídeo e geniposídeo, respectivamente, estão dentro dos limites recomendados ($r > 0,99$) pelo órgão regulador nacional ANVISA (2003) e pela AOAC (2012).

Para avaliar se o método proposto possibilitaria a determinação de verbascosídeo e iridoides presente nas amostras em baixas concentrações foram calculados os limites de detecção e de quantificação. Os valores de LD e LQ estimados para determinação de verbascosídeo e fenilpropanoides foram 8,32 e 27,73 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os valores de LD e LQ para determinação de iridoides com base à resposta analítica do geniposídeo foram 14,25 e 47,50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, assim o método apresenta limites adequados para a determinação de fenilpropanoides e iridoides em níveis de poucas partes por milhão, que são os níveis em que esses compostos ocorrem em amostras *Verbena* como anteriormente relatados por outros autores (Schönbichler et al., 2013). Os valores de LD e LQ demonstraram que o método é sensível para a faixa de concentração estudada. Isto é confirmado analisando o valor de LD que ficou consideravelmente abaixo do primeiro ponto da curva analítica para quantificação de verbascosídeo e geniposídeo.

Os resultados do estudo de precisão obtidos para as amostras da folha 2010, flores 2011 e caule 2012 para a determinação do verbascosídeo, fenilpropanoides totais e iridoides totais na *V. minutiflora* estão representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Estudo de Precisão para Determinação de Verbascosídeo, Fenilpropanoides e Iridoides em *Verbena minutiflora*

Precisão*			
	Amostras	Repetitividade	Precisão Intermediária
Verbascosídeo	Folhas 2010	2.71	9.55
	Flores 2011	1.79	6.05
	Caules 2012	1.12	4.41
Fenilpropanoides Totais	Folhas 2010	2.55	7.99
	Flores 2011	1.54	6.47
	Caules 2012	0.57	5.48
Iridoides Totais	Folhas 2010	4.11	4.69
	Flores 2011	3.36	4.39
	Caules 2012	4.58	4.87

* Expressa como o desvio padrão relativo de RSD (%)

Para a repetitividade e precisão intermediária são aceitáveis valores de DPR (%) abaixo de 15% para compostos orgânicos de acordo com a Anvisa (2003). Desta forma a metodologia proposta mostrou precisão adequada para determinar fenilpropanoides e iridoides.

A exatidão do método foi avaliada, por meio da realização dos testes de recuperação por adição de padrão em três níveis de concentração de verbascosídeo (50, 120 e 180 µg/mL) e para o geniposídeo de (80, 200 e 400 µg/mL), para as três amostras investigadas. Através do ensaio de recuperação foi possível verificar a exatidão do método. As taxas de recuperação de verbascosídeo e geniposídeo para as diferentes amostras estão representadas na tabela 3.3.

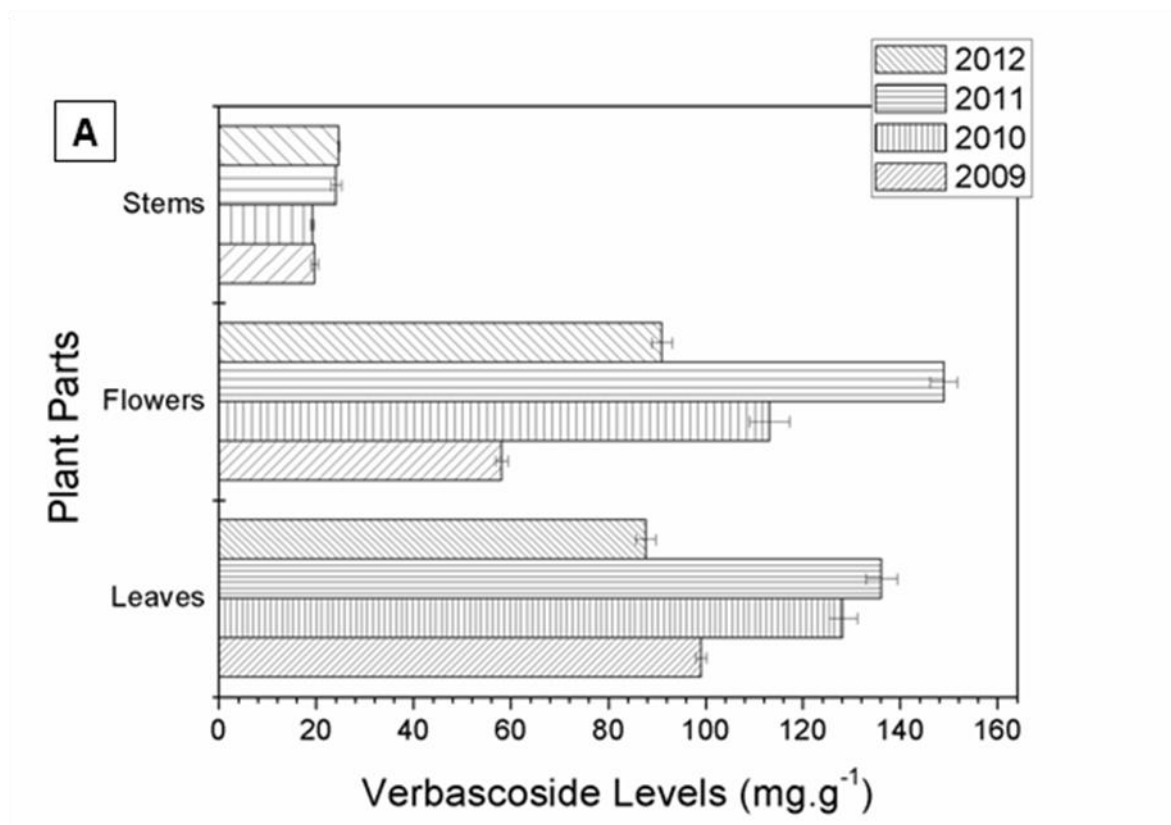
Tabela 3.3– Ensaio de Exatidão para as Diferentes Amostras para o Verbascosídeo e Geniposídeo

Exatidão				
Amostras	Verbascosídeo		Geniposídeo	
	Concentração µg/mL	% Recuperação	Concentração µg/mL	% Recuperação
Folhas 2010	50	107,14	80	88,91
	120	84,96	200	92,23
	180	75,73	400	102,74
Flores 2011	50	102,23	80	76,07
	120	75,74	200	106,11
	180	76,74	400	112,89
Caules 2012	50	81,18	80	90,51
	120	77,93	200	103,86
	180	114,22	400	114,33

A exatidão do método foi avaliada através da realização de testes de recuperação de adição padrão em três níveis de concentração (Tabela 3.3). As taxas de recuperação variaram de 75,73% a 114,22% para verbascosídeo e 76,07 a 114,33% para geniposídeo e encontram-se dentro da faixa aceitável de 60-115%, de acordo com as diretrizes da AOAC (2012) e pesquisas anteriores (Brito, et al., 2003). Estes resultados indicam que o método de HPLC-DAD proposto tem precisão adequada para a quantificação de verbascosídeo e iridoides nas amostras investigadas.

3.4.2 Aplicação do método HPLC-DAD Desenvolvido para a Determinação de Verbascosídeo, Teor de Fenilpropanoides Totais e Iridoides em amostras de *Verbena minutiflora*

Após a realização do estudo de validação intralaboratorial do método de HPLC-DAD para a determinação de verbascosídeo e seus análogos fenilpropanoides e de iridoides nas amostras selecionadas, o mesmo foi aplicado a todas as amostras de folhas, flores, caules e infusões (2009, 2010, 2011 e 2012) da *Verbena minutiflora*. Os teores de verbascosídeo e iridoides foram determinados em triplicatas, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas validadas descritas. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.5 e são expressos como miligramas de metabolitos secundários por grama de extrato seco.



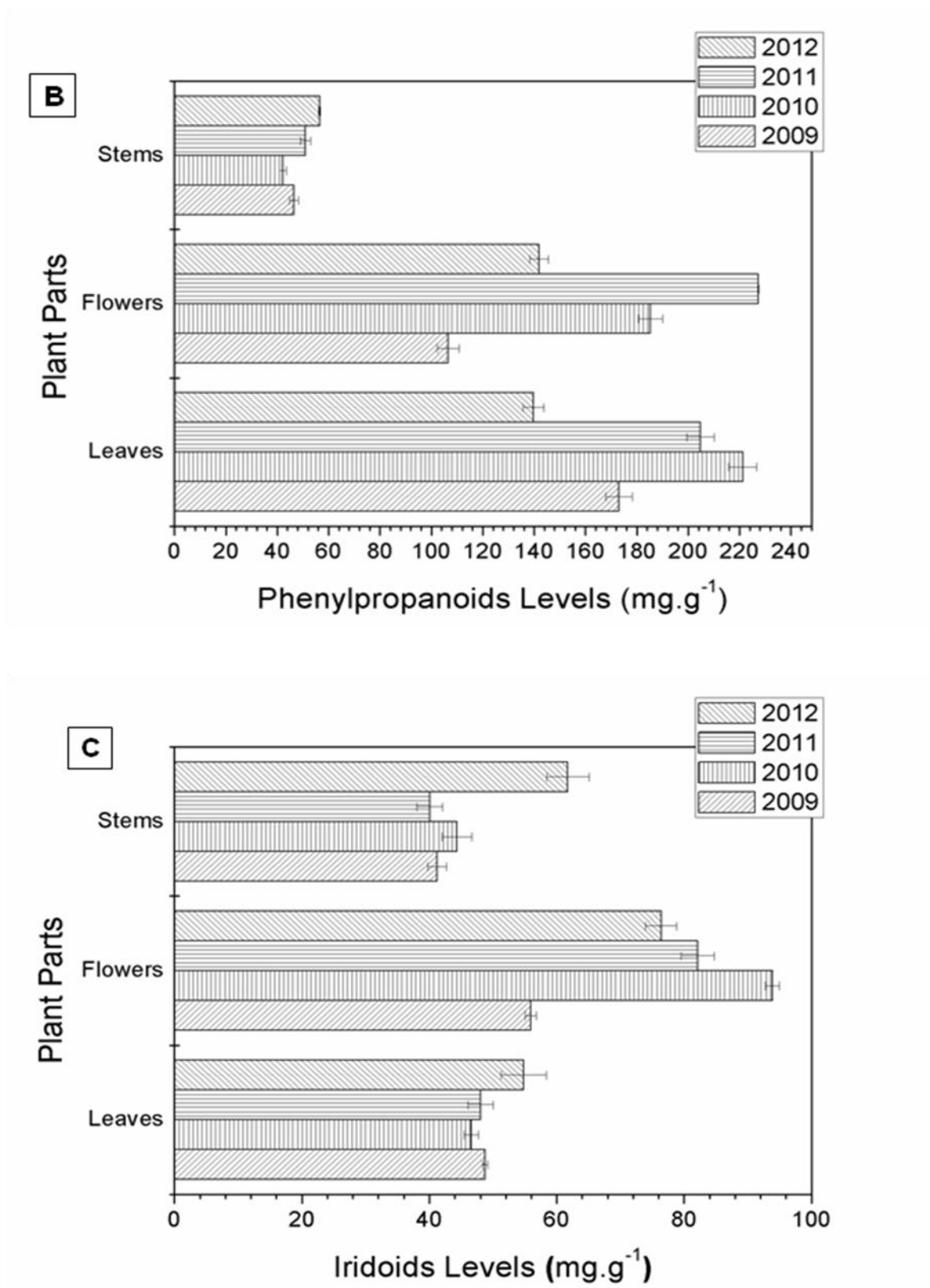


Figura 3.5 – Variação anual dos teores de verbascosídeo (A), fenilpropanoides totais (B) e iridoides (C) nas partes aéreas da *Verbena minutiflora*

Todos os extratos etanólicos apresentaram altos níveis de fenilpropanoides e iridoides. Houve grande variabilidade no teor de verbascosídeo e fenilpropanoides totais para as diferentes partes aéreas. Níveis mais elevados destes compostos bioativos foram extraídos a partir de folhas e flores.

As Infusões também apresentaram altas concentrações dos compostos bioativos investigados, os teores de iridoides variaram de 314,70 a 415,10 µg/mL, fenilpropanoides totais de 1.996,39 a 2.674,13 µg/mL e de verbascosídeo de 1.029,38 a 1.456,42 µg/mL. No capítulo 2 foi reportado que as infusões feitas a partir de partes aéreas de *V. minutiflora* tiveram uma atividade antioxidante notável. Essa atividade pode estar relacionada com os altos níveis de fenilpropanoides e glicosídeos iridoides determinados nas infusões.

Os resultados da infusão para os teores de verbascosídeo e fenilpropanoides totais podem ser explicados pela composição química complexa da planta, sabe-se que o gênero *Verbena* é rico em compostos tendo semelhanças estruturais com verbascosídeo, por exemplo, o isoverbascosídeo, eukovosídeo (Bilia et al., 2008) e também que a composição majoritária de verbascosídeos na infusão corrobora com a sua atividade antioxidante.

A determinação simultânea de quatro compostos bioativos (aucubina, hastatosídeo, verbenalina e verbascosídeo) no extrato metanólico de *V. officinalis* mostrou que os níveis de verbascosídeo variaram entre (1,32-10,99) mg/g e os níveis dos iridoides hastatosídeo variaram entre (2,84 - 7,21) mg/g e verbenalina variaram entre (1,21 - 5,01) mg/g (Liu et al., 2012).

Os fenilpropanoides são compostos naturais extraídos principalmente de plantas medicinais, esses compostos são utilizados pelas plantas para proteção contra infecções, radiação ultravioleta, e contra herbívoros. Alguns fenilpropanoides têm sido relatados possuir diferente atividade farmacológica como antioxidante, antiinflamatória e antitumoral (Chen, et al., 2002; Silveira e Sá, et al., 2014). Pesquisas sobre os efeitos do isoverbascosídeo sobre a proliferação e diferenciação de linha celular de células tumorais MGC 803 de cancro gástrico humano e Me₂SO conhecida indutor de diferenciação, utilizado como controle positivo, demonstrou que o isoverbascosídeo inibiu a

proliferação dessas células com características fenotípicas malignas e consequentemente diferenciação causada em células MGC 803, estes efeitos podem estar associados com sua atividade regulatória da expressão de proteínas do ciclo celular (Chen, et al., 2002).

O verbascosídeo possui várias atividades biológicas relatadas como atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (Deepak & Handa, 2000; Carrillo-Ocampo et al., 2013; Avila et al., 1999; Funes et al., 2009; Xie et al., 2012; Funes et al., 2010; Alipieva et al., 2014)., podendo ser o composto químico responsável pela potente atividade antioxidante dos extratos de *V. minutiflora*.

Os iridoides representam um grande grupo de metabolitos do tipo ciclopentapirano monoterpenóides que são abundantes em famílias de plantas dicotiledôneas e especialmente em famílias como a *Apocynaceae*, *Scrophulariaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae* e *Rubiaceae* (Tiwari et al., 2008; Viljoen et al., 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que iridoides possuem atividade neuroprotetora, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora, cardioprotetora, anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, hipoglicemiante, antiespasmódica e propriedades purgativas (Tundis et al., 2008; Viljoen et al., 2012).

Foi relatado que o iridoide geniposídeo isolado de plantas da família *Rubiaceae* possui uma potente atividade anti-inflamatória, demonstrando uma inibição significativa de IL-2, que promove uma ativação da co-estimulação de linfócitos T, mostrando deste modo ser imunossupressor, pesquisas relatam que extratos etanólicos contendo geniposídeo podem reduzir os riscos de gastrite e de lesões gástricas em ratos e inibem o edema de pata em ratos induzidos por carragenina (Koo et al., 2006; Lee et al., 2009; Viljoen et al., 2012).

Dois novos iridoides, 3- (5- (metoxicarbonil) -2-oxo-2H-piran-3-il) butanóico, chamado verbeofflin I e 7-hidroxidehidrohastatosídeo foram isolados a partir das partes aéreas da *V. officinalis*, juntamente com três iridoides conhecidos, verbenalina, 3,4-dihidroverbenalina, hastatosídeo por meio de cromatografia em coluna de várias etapas. As estruturas destes compostos foram elucidadas através da análise de dados espectroscópicos obtidos

utilizando técnicas de RMN e MS. O verbeofflin I pertence a uma nova classe de secoiridoides identificados na família *Verbenaceae* (Wang et al., 2014). Também dois novos iridoides, brasoside e verbraside foram isolados a partir das partes aéreas da *Verbena brasiliensis* VELL (*Verbenaceae*), que é uma planta nativa da América do Sul (Ono et al., 2006).

Iridoides isolados a partir de espécies de verbena, por exemplo, verbenalina e hastatosídeo são componentes característicos, e exibem várias atividades biológicas, incluindo promoção do sono, atividade antioxidante e hepatoprotetora. Além disso, os dois compostos são considerados marcadores, sendo utilizados com constituintes alvos para o controle de qualidade de plantas medicinais (Wang et al., 2014).

Parte destes resultados estão descritos em artigo científico intitulado “Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of aerial parts of *Verbena minutiflora*: in house validation of an HPLC-DAD method”, que foi escrito e submetido para a revista Food Research International (anexo 5).

3.5. Conclusões

Pela primeira vez é reportada a análise quantitativa de princípios ativos individuais e por classes da planta *Verbena minutiflora*, bem como a variabilidade ano a ano para os extratos e infusões dessa espécie coletada na região sul do Brasil.

Através do estudo de validação de metodologia foi possível verificar que o método proposto para quantificação do fenilpropanoide verbascosideo e seus derivados e dos iridoides, baseado no teor de geniposídeo, por HPLC-DAD apresenta seletividade, linearidade na faixa de estudo de interesse, limite de detecção e de quantificação adequados para a determinação de concentrações em ppm e precisão e exatidão que atendem as recomendações estabelecidas por agências nacionais Anvisa e pela AOAC.

Através da quantificação dos fenilpropanoides e iridoides em *Verbena minutiflora* coletada em quatro anos consecutivos se tem dados suficientes para estabelecer um padrão de qualidade para esta planta, que possui amplo uso etnofarmacológico e, portanto, forte apelo para se tornar um fitoterápico devido a excelente fonte de compostos antioxidantes.

3.6. Referências Bibliográficas

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis of AOAC international (19th ed.). Appendix F – Guidelines for standard method performance requirements, 16, 2012.

ANVISA. Resolução - RDC nº 899, de 29 de maio. 2003. 2003b Disponível em: < <http://e-legis.ANVISA.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 277, 2224–2234, 2009.

ALIPIEVA, K.; KORKINA, L.; ORHAN, I. E.; GEORGIEV, M. I. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32, 1065–1076, 2014.

AVILA, J. G., DE LIVERANT, J. G., MARTÍNEZ, A., MARTÍNEZ, G., MUÑOZ, J. L., ARCINIEGAS, A.; ROMO DE VIVAR, A. Mode of action of Buddleja cordata verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 75–78, 1999.

BILIA, A. R., GIOMI, M., INNOCENTI, M., GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 463–470, 2008.

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. A., POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 13, 129-146, 2003.

CARRILLO-OCAMPO, D., BAZALDÚA-GÓMEZ, S., BONILLA-BARBOSA, J. R., ABURTO-AMAR, R.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V. Anti-Inflammatory Activity of Iridoids and Verbascoside Isolated from *Castilleja tenuiflora*. **Molecules**, 18, 12109-12118, 2013.

CHEN RUI-CHUAN., SU JIN-HUA., YANG SHAN-MIN., LI JI., WANG TIAN-JIAO.; ZHOU HONG. Effect of isoverbascoside, a phenylpropanoid glycoside antioxidant, on proliferation and differentiation of human gastric cancer cell¹. **Acta Pharmacologica Sinica**, 23 (11): 997-1001, 2002.

CHEN, Q. C., ZHANG, W. Y., YOUN, U., KIM, H., LEE, I., JUNG, H-J., NA, M., MIN, B-S.; BAE, K. Iridoid glycosides from *Gardeniae fructus* for treatment of ankle sprain. **Phytochemistry**, 70, 779-784, 2009.

DEEPAK, M.; HANDA, S. S. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. **Phytotherapy Research**, 14, 463–465, 2000.

FUNES, L., FERNANDEZ-ARROYO, S., LAPORTA, O., PONS, A., ROCHE, E., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chemistry**, 117(4), 589–598, 2009.

FUNES, L., LAPORTA, O., CERDAN-CALERO, M., MICOL, V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, 163(2), 190–199, 2010.

KOO, H.-J., LIM, K.-H., JUNG, H.-J.; PARK, E.-H. Anti-inflammatory evaluation of Gardenia extract, geniposide and genipin. **Journal of Ethnopharmacology**, 103, 496-500, 2006.

LEE, J.-H., LEE, D.-U.; JEONG, C.-S. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 47, 1127-1131, 2009.

LIU, Z., XU, Z., ZHOU, H., CAO, G., CONG, X., ZHANG, Y.; CAI, B. Simultaneous determination of four bioactive compounds in *Verbena officinalis* L. **Pharmacognosy Magazine**, 8 (30), 162–165, 2012.

ONO, M., OISHI, K., HIROAKI, A., MASUOKA, C., OKAWA, M., IKEDA, T.; NOHARA, T. New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 54(10), 1421—1424, 2006.

REHECHO, S., HIDALGO, O., CIRANO, M. G., NAVARRO, I., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D., CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 875–882, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27. p. 771-780. 2004.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**. v. 31. p. 164-171. 2008.

SÁ, R. C. S., ANDRADE, L. N., OLIVEIRA, R. R. B.; SOUSA, D. P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**, 19, 1459-1480, 2014.

SCHÖNBICHLER, S. A., BITTNER, L. K. H., PALLUA, J. D., POPP, M., ABEL, G., BONN, G. K.; HUCK, C. W. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 84, 97– 102, 2013.

TIWARI, N., YADAV, A. K., SRIVASTAVA, P., SHANKER, K., VERMA, R. K.; GUPTA, M. M. Iridoid glycosides from *Gmelina arborea*. **Phytochemistry**, 69, 2387–2390, 2008.

TUNDIS, R., LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: *Recent developments. Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 8, 399-420, 2008.

VILJOEN, A., MNCWANGI, N. VERMAAK, I. Anti-Inflammatory Iridoids of Botanical Origin. **Current Medicinal Chemistry**, 19, 2104-2127, 2012.

WANG, Z., SHU, J.; CHOU, G. Two New Iridoids from *Verbena officinalis* L. **Molecules**, 19, 10473-10479, 2014.

XIE, J., TAN, F., ZHU, J., YUE, C.; LI, Q. Separation, purification and quantification of verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav.) Roth. **Food Chemistry**, 135, 2536–2541, 2012.

CAPÍTULO 4. ANÁLISE DO TEOR DE MINERAIS DA
***Verbena minutiflora* (VERBENACEAE)**

4.1. Introdução

As plantas medicinais tem um papel fundamental no sistema de saúde em todo o mundo, pois servem como um ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (Basgel & Erdemoglu, 2006).

As plantas medicinais também podem ser usadas como fontes alternativas de nutrientes minerais na dieta alimentar. Elementos como ferro e zinco apresentam biodisponibilidade variável em função de suas formas químicas (espécies) presentes em um alimento (Silva et al., 2010).

O corpo humano necessita de uma série de minerais, a fim de manter uma boa saúde. Um número de minerais essenciais para a nutrição humana é acumulado em diferentes partes das plantas (Ajasa et al., 2004). A análise dos níveis de minerais em plantas é importante, porque eles são essenciais na dieta humana, mas uma ingestão inadequada destes componentes nutricionais ocorre frequentemente (Rehecho et al., 2011). Os elementos presentes em plantas medicinais desempenham um papel significativo na formação de produtos químicos ativos, tais como Zn, Cu e Fe e só se tornam tóxicos em concentrações elevadas (Nookabkaew et al., 2006; Abugassa et al., 2008).

É importante ter um bom controle de qualidade para as plantas medicinais, a fim de proteger os consumidores de contaminação. A medicina tradicional desempenha um importante papel no estado geral de saúde de uma população. Muitas plantas medicinais e as suas misturas podem apresentar um risco para a saúde devido a presença de elementos tóxicos tais como o Pb, Cd, Al, Hg e outros elementos, tais como Cr, que são perigosas para os seres humanos, em função da sua estados de oxidação e presente em altas concentrações, o Pb e Cd são considerados perigosos para o corpo em baixas concentrações (Garcia, et al., 2000; López, et al., 2000; Basgel & Erdemoglu, 2006).

As plantas medicinais podem ser facilmente contaminadas durante cultivo e processamento, existe um elo importante na transferência de oligoelementos do solo para as plantas e conseqüentemente para o homem. O nível de elementos essenciais para as plantas é condicional, o conteúdo que está sendo afetado pelas características geoquímicas do solo e pela capacidade das

plantas de acumular seletivamente alguns desses elementos (Basgel & Erdemoglu, 2006).

Espécies de plantas foram identificadas por conter nutrientes que apresentam novas propriedades medicinais ou terapêuticas benéficas; e que possuem elementos que apresentam um papel preventivo ou curativo no combate às doenças, sendo de grande interesse estabelecer os níveis de alguns elementos em plantas medicinais, uma vez que estes elementos em altas concentrações podem apresentar um potencial tóxico (Ajasa et al., 2004).

As plantas medicinais são coletadas nas florestas ou quintais residenciais e podem ser comercializados em feiras livres, supermercados, farmácias de manipulação ou em lojas especializadas. A utilização das plantas medicinais para o tratamento de doenças é muito comum e pode-se utilizar várias partes das plantas como raiz, caule, folha, flores, frutos ou sementes dependendo da espécie vegetal. A forma de preparação também pode ser variada, porém, a mais utilizada é a infusão (chá), que se apresenta como uma das bebidas mais consumidas no mundo, seja pelo sabor agradável, seja por seu potencial terapêutico que auxilia a cura de doenças. Não há um rigor, por parte dos consumidores, na preparação e na utilização das infusões (chás) de plantas medicinais, uma vez que sua preparação e sua indicação na maioria das vezes é herança de antigas culturas (Diniz et al., 2013).

O chá é uma bebida obtida da infusão de folhas, cascas ou raízes na forma seca ou *in natura* de uma planta. Os chás foram mundialmente difundidos pela Companhia Inglesa das Índias Orientais e amplamente popularizados na cultura brasileira como 'remédios caseiros'. Apesar da grande evolução da medicina alopática, a população carente enfrenta vários obstáculos na sua utilização que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição da população sobre o uso de plantas medicinais, contribuem para o aumento da sua utilização no País (Amarante et al., 2011).

O chá é a bebida mais consumida depois da água, devido aos seus efeitos refrescantes e levemente estimulantes e desempenha um papel importante na entrada de um número de elementos vestigiais nutricionais e

tóxicos nos seres humanos (Malik et al., 2008). Beber chá está associado com a redução do colesterol, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a diminuição do risco de doença cardiovascular, o consumo regular de chá pode contribuir para as necessidades nutricionais diárias de alguns elementos (Karak et al., 2010).

Nos últimos anos, vem sendo crescente o número de estudos envolvendo não apenas a determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais, mas também estudos que forneçam informações mais completas para identificar as formas químicas (espécies) e a estrutura dos compostos aos quais diferentes nutrientes minerais estão associados (Almeida et al., 2002; Ajasa et al., 2004; Silva et al., 2010).

Existe uma grande preocupação em se conhecer a composição das plantas medicinais, visto que muitas delas são indicadas para as mais diversas enfermidades que acometem o homem. Muitas pessoas ainda utilizam as plantas ou preparados medicinais como primeiro recurso terapêutico no tratamento de enfermidades. Um grande interesse vem sendo dado ao estudo de constituintes inorgânicos presentes em alimentos, bebidas e fitoterápicos, porque estes elementos podem auxiliar no metabolismo ou, dependendo da sua concentração, podem ser prejudiciais à saúde do homem (Diniz et al., 2013).

Alguns nutrientes minerais presentes em plantas possuem um papel preventivo no combate de doenças, mas é importante ressaltar que níveis elevados desses minerais podem ser perigosos e tóxicos ao organismo. Alguns minerais como Cu, Fe, Mn, Mg e Zn são considerados essenciais à saúde por atuarem em importantes vias metabólicas, participando de atividades associadas à síntese de proteínas, vitaminas e controle do metabolismo de diversas enzimas, que atuam em processos de síntese e degradação, necessárias ao homem (Silva et al., 2010).

Os sais minerais realizam diversas funções específicas no corpo humano estando relacionados com o bom desempenho do metabolismo de enzimas, as quais são responsáveis pela manutenção da saúde do organismo. O corpo humano necessita de sais minerais dentro de certos limites admissíveis para obter um bom crescimento e a manutenção da saúde. A concentração de

elementos traços diversos é importante para determinar a eficácia das plantas medicinais no tratamento de várias doenças e também para compreender sua ação farmacológica e sua importância nutritiva (Nookabkaew et al., 2006; Abugassa et al., 2008).

O estudo da composição mineral nas plantas medicinais tem se mostrado bastante relevante, uma vez que as plantas podem ser uma fonte alternativa de minerais necessários para manter a saúde do corpo. Os constituintes inorgânicos estão envolvidos em muitas funções importantes do corpo humano, tais como a mineralização óssea, reações enzimáticas, secreção de hormônios, proteção de células e lipídios. Os elementos químicos podem ser encontrados incorporados à estrutura de proteínas (metaloproteínas), enzimas (metaloenzimas) e a complexos de carboidratos que participam de reações bioquímicas no organismo em diferentes matrizes. Os constituintes inorgânicos podem exercer algumas funções metabólicas no corpo humano. O cálcio, por exemplo, está presente nos ossos e dentes, auxilia na coagulação sanguínea, na contração e no relaxamento muscular e é ativador de várias enzimas. O cobre é necessário para o transporte do ferro, está envolvido na síntese do tecido conjuntivo e na proteção antioxidante. O ferro é essencial na formação da hemoglobina e está presente em várias enzimas. O magnésio atua como coenzima em todas as enzimas envolvidas na transferência de fosfato e é importante para a transmissão de impulsos nervosos. O zinco tem efeito na síntese de proteínas, essencial para a mobilização hepática da vitamina A, atua na maturação sexual, fertilidade e reprodução e apresenta um importante papel no desenvolvimento e na regulação do apetite (Tirmizi et al., 2007; Diniz et al., 2013).

Os teores de minerais de alguns chás de ervas foram determinados em várias publicações (Gallaher et al., 2006; Özcan & Akbulut, 2008; Özcan et al., 2008; Kara, 2009). Nestes estudos são normalmente utilizados métodos univariados, tais como análise de variância (ANOVA), comparando a concentração de um elemento com outro ou a uma amostra com outra. No entanto, métodos multivariados, como a análise de componentes principais (PCA) pode fornecer maiores interpretações. A PCA é uma técnica de redução de dados que tem o objetivo de explicar a maior parte da variação nos dados

ao mesmo tempo reduzindo o número de variáveis a alguns componentes não correlacionados (Mehra & Baker, 2007).

Para a análise de metais nas plantas medicinais o método mais utilizado é a espectrometria de absorção atômica. Se uma determinada quantidade de energia é aplicada sobre o átomo e esta é absorvida, um dos elétrons mais externos será promovido a um nível energético superior, levando o átomo a uma configuração energética menos estável denominada “estado excitado”. Uma vez que esta configuração é instável, o átomo retorna imediatamente para o “estado fundamental”, liberando a energia absorvida sob a forma de luz. Esses dois processos (absorção e emissão de luz) são explorados, com fins analíticos, através das técnicas de Emissão Atômica e Absorção Atômica (Skoog et al., 1992).

A determinação dos teores de minerais na espécie *Verbena minutiflora* foi considerada de grande importância. O objetivo deste estudo foi avaliar o teor de minerais nas partes aéreas e infusões da *Verbena minutiflora* e monitorar a variabilidade dos minerais durante quatro anos consecutivos, a fim de determinar a contribuição das partes aéreas e infusões para a dieta humana. Consequentemente, os elementos essenciais e não essenciais para o organismo humano (Cu, Fe, Zn, Mg, Na, K, Al, Ca, Pb, Cd e Cr), foram quantificados. A análise foi realizada utilizando espectrometria de absorção atômica de chama e espectrometria de emissão atômica. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de componentes principais (PCA) para avaliar possíveis correlações entre os íons metálicos, ano de coleta da planta e partes, bem como semelhanças entre as amostras.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo Geral

Investigar a variabilidade do teor de minerais nas partes aéreas da *Verbena minutiflora*;

4.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Otimização do processo de digestão por via seca da planta *Verbena minutiflora* por meio da variação do tempo de calcinação e solubilidade das cinzas em meio ácido;
- ✓ Quantificação dos minerais essenciais e tóxicos em amostras da *Verbena minutiflora* por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES);
- ✓ Avaliação temporal dos teores de minerais da *Verbena minutiflora*;
- ✓ Avaliação dos teores de minerais da infusão das folhas da *Verbena minutiflora*.

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Otimização do processo de digestão da *Verbena minutiflora*

A otimização do processo de digestão da *Verbena minutiflora* foi realizada com amostra adquirida em loja especializada na venda de produtos naturais voltados ao consumo na cidade de Guarapuava - PR.

Utilizou-se o procedimento de digestão por via seca (calcinação). Pesou-se, aproximadamente, 1g da amostra, partes aéreas (folhas, flores e caule), em cadinhos de porcelana, carbonizou-se em bico de Bunsen até completa liberação de fumos e calcinou-se em mufla durante tempo variável (4h, 5h e 7h) à 550°C. Após, solubilizou-se as cinzas com volume variável (3 mL e 5 mL) de uma solução de HCl 1:1 v/v, e transferiu-se para balão de 50 mL (completando-o com água deionizada). Os procedimentos foram feitos em triplicata. Quantificações dos íons metálicos Fe e Zn foram feitas para avaliar o melhor processo de calcinação da planta.

4.3.2. Avaliação da Variação Mineral na *Verbena minutiflora*

As amostras da *Verbena minutiflora* utilizadas nas determinações foram coletadas nos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012 respectivamente, sendo realizadas as análises em três partes da planta, as folhas, flores e caules. Infusões das folhas também foram quantificadas, a preparação das infusões da *Verbena minutiflora* foi realizada como descrito no item 3.3.2. Foi pesado entre 0,5 e 1,0 g de cada amostra de gervão (folhas, flores ou caule) em cadinhos previamente pesados, carbonizou-se em bico de bunsen até a completa liberação de fumos, após foi feita a calcinação em forno mufla durante 4h a 550°C. Após, esfriou-se em dessecador, pesou-se as cinzas, solubilizou-se em 3 mL da solução de ácido nítrico (HNO₃) 1:3 (v/v), transferiu-se para balão de 50 mL e completou-se com água deionizada.

As determinações de diversos minerais como Cu, Fe, Zn, Mg, Na, K, Al e Ca foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica modo chama (FAAS) (Modelo Varian 220), equipado com lâmpadas de catodo oco da marca

Varian e lâmpada de Deutério como corretor de fundo. Todos os metais foram determinados pelo modo absorção com a exceção do Na e K que foram realizados no modo emissão. Os parâmetros instrumentais do FAAS estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Parâmetros instrumentais para determinação de metais por espectrometria de absorção atômica (FAAS)

Metal	λ (nm)	Resolução (nm)	Corrente (mA)	Chama
Cu	324,8	1,0	5	Ar/C₂H₂
Al	309,3	0,5	10	C₂H₂/N₂O
Fe	248,3	0,2	5	Ar/C₂H₂
Zn	213,9	1,0	5	Ar/C₂H₂
Mg	285,2	0,5	4,0	Ar/C₂H₂
Na	589,0	0,2	-	Ar/C₂H₂
K	766,5	0,2	-	Ar/C₂H₂
Ca	422,7	0,5	10	C₂H₂/N₂O

As determinações dos metais Cd, Cr e Pb foram realizadas em um espectrômetro de emissão atômica (ICP-OES) modelo Optima 8000 DV, da Perkin Elmer. Argônio comercial (White Martins/Praxair) foi utilizado para geração do plasma, como gás de nebulização e auxiliar. Como gás de purga do sistema óptico do equipamento de ICP OES foi utilizado nitrogênio com pureza de 99,996%, da White Martins/Praxair. As linhas espectrais para os elementos foram às seguintes: Cd (228,8 nm), Cr (267,71 nm) e Pb (220,35 nm). Os parâmetros instrumentais usados estão listados na Tabela 4.2. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas. Curvas de calibração foram obtidas através da utilização de soluções padrão estoque 1000 mg/L (J.T.Baker Instra-Analysed®) dos metais avaliados. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, proveniente do aparelho HUMAN UP 900®.

Tabela 4.2 - Parâmetros instrumentais para o ICP-OES Optima 8000

Parâmetros Instrumentais	Valor
Potência de radiofrequência	1500 W
Fluxo do gás principal	15 L min ⁻¹
Fluxo do gás auxiliar	0,2 L min ⁻¹
Fluxo do gás de nebulização	0,8 L min ⁻¹
Fluxo da amostra	1,5 L min ⁻¹
Posição do detector	Axial
Número de replicata	3

4.4. Resultados e Discussões

4.4.1. Avaliação das condições para Otimização do processo de digestão da *Verbena minutiflora*

Através da variação do tempo de calcinação e volume ácido usado na solubilização de cinzas foi possível otimizar o método de digestão por via seca (calcinação) e a solubilização das cinzas em meio ácido das amostras de *Verbena minutiflora*.

Após a calcinação, a massa de cinzas resultante de cada amostra, foi medida. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 4.3. A Figura 4.1 apresenta os gráficos das médias entre as replicatas para cada procedimento e seus limites de confiança a 95 %.

Pode-se observar que a primeira medida do segundo procedimento experimental não está em concordância com as demais medidas, e isso pode ser atribuído à perda de massa durante o processo em um dos cadinhos, baixa solubilização das cinzas e ainda, a presença de caules grossos presentes na amostra que não foram totalmente degradados durante o processo de calcinação.

Tabela 4.3. Resultados obtidos com a otimização do experimento para o preparo de amostra de *Verbena minutiflora*

Procedimento	Massa de gervão (g)	Cinzas (g)	% de cinzas	Fe (mg/L)	Zn (mg/L)
(1) T _{calcinação} = 4 h, V _{ácido} = 3 mL	1,0214	0,0394	3,85	0,865	0,4409
	1,0610	0,0405	3,82	0,998	0,4429
	1,0075	0,0419	4,16	1,304	0,4668
(2) T _{calcinação} = 5 h, V _{ácido} = 3 mL	1,0343	0,0352	3,40	0,189	0,1637
	1,0026	0,0400	3,99	0,952	0,4466
	1,0925	0,0409	3,74	1,251	0,4588
(3) T _{calcinação} = 7 h, V _{ácido} = 5 mL	1,0071	0,0447	4,44	1,046	0,4539
	1,0069	0,0445	4,42	1,044	0,4537
	1,0535	0,0546	5,18	1,353	0,4347

O terceiro procedimento, no qual o tempo de calcinação e o volume de ácido utilizados foram maiores (7h, 5 mL), mostrou melhores resultados no quesito concentração de Fe e menor para o Zn. No entanto, a Figura 4.1 demonstra que a diferença obtida para esses íons não foram significativas no limite de confiança de 95 %. Assim, pode-se considerar que os três procedimentos apresentaram resultados iguais. Este fato também pode ser observado pelo desvio padrão das triplicatas em cada procedimento.

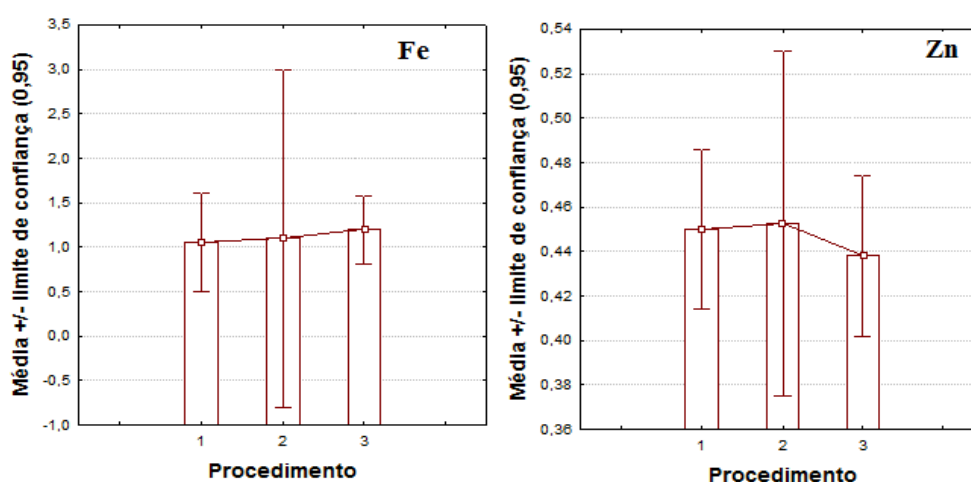


Figura 4.1 - Média das replicatas e limite de confiança para cada procedimento de digestão da planta avaliada.

O método de digestão por via seca (calcinação) é um dos mais utilizados em análise foliar, porém é um procedimento que exige cuidados para evitar a contaminação e/ou perda do material (Moraes & Rabelo, 1986).

Um maior tempo de calcinação (7h) e uma maior quantidade de ácido (5 mL) não proporcionaram um melhor resultado na determinação dos minerais avaliados (Fe e Zn). Portanto, podemos concluir, que o tempo de digestão de 4 h e 3 mL de ácido clorídrico (1:1) foram suficientes para o preparo de amostra e posterior determinação dos minerais na *Verbena minutiflora*.

4.4.2 Análise da Variação Mineral na *Verbena minutiflora*

A determinação de metais por espectrometria de absorção atômica mostrou os teores mais elevados para os metais K, Ca, Mg e Na com valores médios de 9,135; 7,301; 1,187 e 0,325 mg.g⁻¹, respectivamente. Já para os metais Al (0,449 mg.g⁻¹), Fe (0,140 mg.g⁻¹), Cu (0,012 mg.g⁻¹) e Zn (0,025 mg.g⁻¹), os valores médios foram moderados (Tabela 4.4). Para todas as amostras o nível de Cd, Cr e Pb ficaram abaixo do limite de detecção do método, indicando que esta planta não absorve significativamente esses metais e/ou ainda que o solo de cultivo da mesma é isento desses elementos.

Os elementos mais abundantes presentes na *Verbena minutiflora* coletadas em 2009, 2010, 2011 e 2012 foram o K, seguido de Ca, Mg e Na. O Cu foi o elemento encontrado em menor concentração em todas as coletas. O teor de K foi elevado em comparação ao de Na. Este fato é considerado como sendo uma vantagem do ponto de vista nutricional, uma vez que menor consumo de cloreto de sódio e dieta com um maior consumo de potássio tem sido relacionada a uma menor incidência de hipertensão (Rehecho et al., 2011).

O valor elevado de Ca encontrado demonstra que pode ser considerada uma fonte de alimentação apropriada para a manutenção da função biológica na mediação da contração vascular, na vasodilatação e na transmissão nervosa da contração muscular (Rehecho et al., 2011).

As folhas e flores são ricas em Mg, a ingestão de magnésio inadequada leva a anormalidades bioquímicas e a manifestações clínicas, principalmente relacionadas com cardiopatia isquêmica, crescimento esquelético deficiente, osteoporose e diabetes mellitus (Rehecho et al., 2011).

Tabela 4.4 - Teor de minerais encontrados na *Verbena minutiflora* por FAAS (mg.g⁻¹ ± desv. Padrão)

Amostras	Ferro	Zinco	Cobre	Cálcio	Magnésio	Alumínio	Potássio	Sódio
Caule 2009	0,0503± 0,0072	0,0268± 0,0021	0,0104± 0,0024	5,189± 0,5039	1,016± 0,0999	0,0900± 0,0046	12,92± 0,4578	0,5836± 0,1103
Flor 2009	0,1928± 0,0189	0,0389± 0,0023	0,0180± 0,0013	6,716± 0,2295	1,091± 0,0974	0,5478± 0,0346	10,33± 0,5134	0,3647± 0,0783
Folha 2009	0,4215± 0,0209	0,0381± 0,0008	0,0236± 0,0021	13,64± 0,6459	2,522± 0,2587	1,238± 0,0867	12,20± 0,2609	0,5139± 0,0724
Caule 2010	0,0562± 0,0089	0,0218± 0,0043	0,0049± 0,0008	4,604± 0,1767	0,7017± 0,0991	0,1372± 0,0213	14,39± 0,9243	0,3412± 0,0232
Flor 2010	0,1525± 0,0051	0,0314± 0,0027	0,0136± 0,002	7,500± 0,3810	1,342± 0,0502	0,4298± 0,0180	9,547± 0,6638	0,2325± 0,1027
Folha 2010	0,3575± 0,0066	0,0318± 0,0046	0,0244± 0,0011	13,63± 0,0818	2,184± 0,0040	1,223± 0,0635	11,23± 0,1887	0,4318± 0,0931
Caule 2011	0,0372± 0,0010	0,0169± 0,0006	0,0081± 0,0008	3,739± 0,0383	0,8218± 0,0919	0,1110± 0,0113	12,84± 0,9433	0,2334± 0,0145
Flor 2011	0,1797± 0,0161	0,0323± 0,0004	0,0135± 0,0006	7,621± 0,2628	1,119± 0,0858	0,5955± 0,0844	9,848± 0,5236	0,2324± 0,0039
Folha 2011	0,3635± 0,0278	0,0344± 0,0003	0,0251± 0,0009	12,76± 0,9546	1,830± 0,1861	1,1916± 0,0811	11,35± 0,0997	0,4552± 0,0907
Caule 2012	0,0543± 0,0113	0,0245± 0,0003	0,0081± 0,0006	4,324± 0,1826	0,5762± 0,0539	0,1405± 0,0142	13,85± 0,3372	0,2647± 0,0207
Flor 2012	0,1107± 0,008	0,0316± 0,0007	0,0151± 0,0029	8,247± 0,2834	0,9082± 0,0228	0,3718± 0,0273	12,83± 0,9780	0,2479± 0,0411
Folha 2012	0,2644± 0,0276	0,0371± 0,0015	0,0191± 0,0018	10,52± 1,097	1,197± 0,0623	1,078± 0,1019	13,96± 0,3632	0,3215± 0,0463
Infusão 2009	0,001± 0,0002	0,0151± 0,0039	0,0030± 0,0008	3,604± 0,2541	0,7273± 0,1206	0,0071± 0,0007	0,3455± 0,0663	0,2000± 0,0082
Infusão 2010	0,0014± 0,0009	0,0104± 0,0001	0,0024± 0,0006	4,887± 0,0033	1,021± 0,0700	0,0177± 0,0022	0,1575± 0,0153	0,2523± 0,0378
Infusão 2011	0,0021± 0,0006	0,0112± 0,0013	0,0018± 0,0004	5,258± 0,1866	1,076± 0,0721	0,0084± 8,764x10 ⁻⁵	0,1603± 0,0326	0,2455± 0,0426
Infusão 2012	0,0019± 0,0007	0,0100± 0,0012	0,0035± 0,0007	4,579± 0,1897	0,8709± 0,0325	0,0083± 0,0003	0,1996± 0,0674	0,2832± 0,0087

Um tratamento estatístico através da análise de componentes principais (PCA) foi usado para correlacionar as amostras (partes da planta e ano de coleta) com as variáveis (íons metálicos). As Figuras 4.2 A e B apresentam os *scores* e *loading* da PCA envolvendo os íons metálicos. A primeira e segunda componentes principais responderam a 71,3% e 14,3% da variabilidade dos dados, respectivamente. Os níveis de íons metálicos (em mg.g⁻¹) foram as variáveis na matriz da PCA, sendo que cada amostra de *Verbena minutiflora* constituiu um caso.

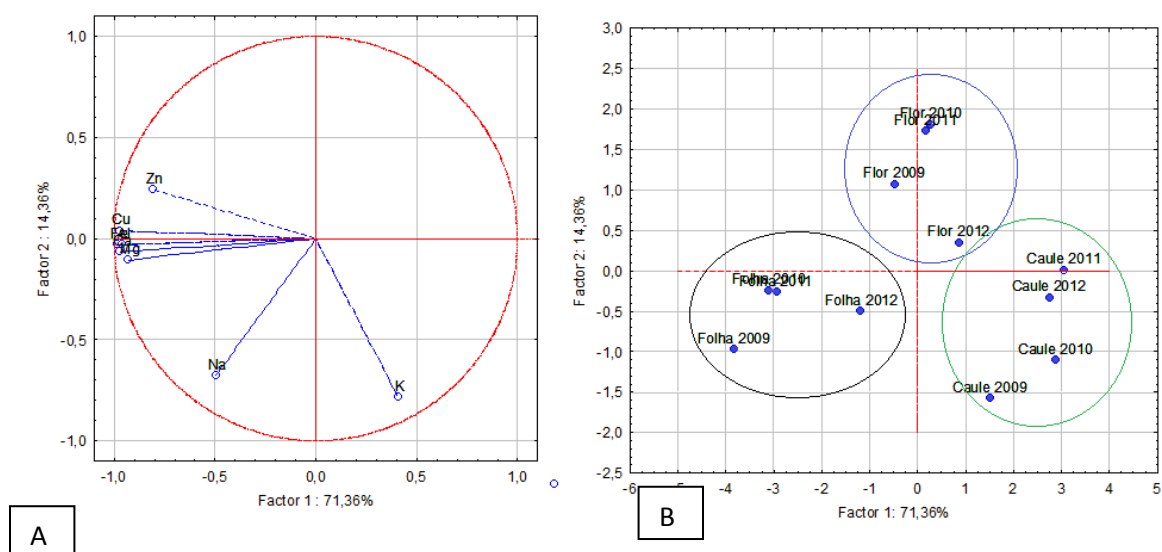


Figura 4.2 - PCA para o teor de minerais em amostras da *Verbena minutiflora*. (A) Variáveis, (B) Amostras

As Figuras 4.2 (A) e (B) apresentam uma relação positiva no grupo das folhas da *Verbena minutiflora* entre a maioria dos íons metálicos, demonstrando que existe uma concentração maior dos mesmos nas folhas (pelo fator 1, 71,36%).

As folhas apresentaram a maior concentração dos elementos seguido das flores e caule, isso ocorre devido a mobilidade que os metais tem na planta, isto é, a absorção de diversos elementos pela planta através do sistema radicular (raiz), que depende de vários fatores, como o tipo de solo a estrutura botânica e tecidos específicos da planta, além disso, os microelementos podem ser sorvidos na planta por outros compartimentos externos. A presença de maior concentração dos elementos nas folhas é importante, pois essa é a parte da planta mais consumida pela população no preparo de chá (infusão), sendo uma fonte de suplemento alimentar.

Pelo Fator 2 (14,36%), foi possível verificar que o Na e K apresentaram uma correlação maior com as partes da folha e caule da *Verbena minutiflora*.

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 também foram analisados por ANOVA de dois fatores para investigar a influencia dos fatores partes da planta e ano de coleta, bem como, a possível interação entre eles, na composição

mineral das partes aéreas da planta (dados não apresentados). A análise para a significância estatística de 95% demonstrou que, a parte da planta utilizada é uma fonte de variação altamente significativa para o teor de cada elemento. As folhas seguidas das flores tiveram a maior concentração de todos os elementos, sendo a única exceção o teor de potássio que teve um teor médio maior nos caules. O ano de coleta também influenciou no teor dos elementos Fe, Zn, Cu, Mg, Al, K, Na, porém em menor extensão que as partes da planta. Efeito de interação entre os fatores partes da planta e ano de coleta foi observado para todos os metais exceto para o Cu.

A determinação de metais por espectrometria de absorção atômica nas amostras das infusões demonstrou os teores mais elevados para os metais Ca, Mg, Na e K com valores médios de 4,582; 0,9238; 0,2452 e 0,2157 mg.g⁻¹, respectivamente, como apresentado na tabela 4.4.

Os minerais determinados nas infusões aquosas de *Verbena minutiflora* apresentaram proporções que variaram de 1,7% a 57,1% do valor total de minerais encontrados nas folhas da planta e pode ser considerada uma importante fonte de minerais, considerando as recomendações de ingestão diária.

Do ponto de vista nutricional, alguns componentes valiosos também estão contidos em quantidades consideráveis nas plantas medicinais. É bastante entendido que os componentes minerais, particularmente macrominerais e elementos vestigiais desempenham um papel essencial para a ativação de sistemas enzimáticos ou o envolvimento no metabolismo de biomoléculas. A presença destes micronutrientes nas plantas, em grande parte dependente das condições de cultivo, incluindo as técnicas de cultivo, estresse abiótico ou biótico e estado nutricional, já foi estabelecida que a deficiência de vários minerais (nitrogênio, fósforo, boro e manganês) pode induzir a acumulação de flavonoides, enquanto potássio, cálcio, cobalto e níquel podem promover um aumento na produção de flavonoides e, como consequência a atividade antioxidante da planta (Rehecho et al., 2011).

A composição mineral de extrato aquoso e hidroalcoólico da *Verbena officinalis*, demonstra que as concentrações de sais minerais nos extratos da planta tinha o mesmo perfil em ambos, e diferenças quantitativas foram

detectadas de acordo com a diferença do solvente de extração. O macroelemento mais abundante foi o potássio em ambos os extratos, seguido de fósforo, cálcio e magnésio; sendo que a determinação de metais por espectrometria de absorção atômica na amostra do extrato hidroalcoólico demonstrou os teores de K, P, Ca e Mg de 7934 ± 319 ; 2307 ± 48 ; 926 ± 3 e 689 ± 8 (mg.Kg⁻¹/planta seca), respectivamente; sendo que os níveis de minerais fornecidos pelos os extratos analisados da *Verbena officinalis* foram maiores quando comparados com os de outras plantas *Verbenaceae* (Rehecho et al., 2011).

4.5. Conclusões

Os elementos mais abundantes presentes na *Verbena minutiflora* são K, seguido de Ca, Mg e Na. A análise da variabilidade anual do conteúdo mineral e de metabólicos secundários das diferentes partes aéreas da *Verbena minutiflora* demonstra que existe uma estabilidade na concentração de compostos fenólicos e de metais, bem como, na atividade antioxidante dos extratos e infusões. Foi verificado que, considerando apenas as partes aéreas da planta, as folhas apresentaram a maior concentração dos elementos inorgânicos e orgânicos seguido da flor e do caule. A investigação estatística dos dados por ANOVA de dois fatores indicou que as partes da planta analisada são a principal fonte de variação tanto para o conteúdo mineral quanto de metabólitos secundários. O ano de coleta, bem como a interação entre os fatores ano de coleta e partes da planta, foi menos significativo para explicar a variabilidade na composição química da planta.

4.6. Referências Bibliográficas

ABUGASSA, I. O.; BASHIR, A. T.; DOUBALI, K.; ETWIR, R. H.; ABU-ENAWEL, M.; ABUGASSA, S. O. Characterization of trace elements in medicinal herbs by instrumental neutron activation analysis. ***Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry***, 278, 559–563, 2008.

AJASA, A. M. O.; BELLO, M. O.; IBRAHIM, A. O.; OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. ***Food Chemistry***, v. 85, n. 1, p. 67-71, 2004.

ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D.; MAGALHÃES, C. E. C.; MORAIS, N. M. T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 22, n. 1, p. 94-97, 2002.

AMARANTE, C. B; SILVA, J. C. F; MÜLLER, R. C. S; MÜLLER, A. H. Avaliação da Composição Mineral do Chá da Folha Senescente de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS). ***Química Nova***, Vol. 34, No. 3, 419-423, 2011.

BASGEL, S.; ERDEMOGLU, S.B. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. ***Science of the Total Environment***, 359, 82 – 89, 2006.

DINIZ, V. W. B; FILHO, H. A. D; MÜLLER, R. C. S; FERNANDES, K. G; PALHETA, D. C. Classificação Multivariada de Ervas Medicinais da Região Amazônica e suas Infusões de acordo com sua Composição Mineral. ***Química Nova***, Vol. 36, No. 2, 257-261, 2013.

GALLAHER, R. N.; GALLAHER, K.; MARSHALL, A. J.; MARSHALL, A. C. Mineral analysis of ten types of commercially available tea. ***Journal of Food Composition Analysis***, 19, 53-57, 2006.

GARCIA, E.; CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LOPEZ, M. C. Chromium levels in spices and aromatic herbs. ***Sci Total Environ***, 247:51– 6, 2000.

LOPEZ, F. F.; CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LOPEZ, M. C. Aluminium levels in spices and aromatic herbs. ***Sci Total Environ***, 257:191– 7, 2000.

KARA, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. ***Food Chemistry***, 114, 347-354, 2009.

KARAK, T.; BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. ***Food Research International***, 43, 2234-2252, 2010.

MALIK, J.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; BALIK, J.; KOKOSKA, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. ***Food Chemistry***, 111, 520 – 525, 2008.

MEHRA A.; BAKER, C. L. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). ***Food Chemistry***, 100, 1456-1463, 2007.

MORAES, J. F. V.; RABELO, N. A. Um método simples para a digestão de amostras de plantas. EMBRAPA-CNPAF, Goiânia, 1986.

NOOKABKAEW, S.; RANGKADILOK, N.; SATAYAVIVAD, J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 54, 6939–6944, 2006.

ÖZCAN, M. M.; AKBULUT, M. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. ***Food Chemistry***, 106, 858-858, 2008.

ÖZCAN, M. M.; ÜNVER, A.; UÇAR, T.; ARSLAN, D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. **Food Chemistry**, 106, 1120-1127, 2008.

REHECHO, S., HIDALGO, O., CIRANO, M. G., NAVARRO, I., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D., CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 875–882, 2011.

SILVA, C. S; NUNES, P. O; MESCOUTO, C. S. T; MÜLLER, R. C. S; PALHETA, D. C; FERNANDES, K. G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 30(3): 751-754, jul.-set. 2010.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. Principles of instrumental analysis. Saunders CollegePublishing, 4 edição, Orlando, Florida, 1992.

TIRMIZI, A. S; WATTOO, M. H. S; MAZHAR, M; WATTOO, F. H; MEMON, A. N; IQBAL, J. Analytical Investigation of Chromium and Zinc in Sweet, Sour and Bitter Tasting Fruits, Vegetables and Medicinal Plants. **Química Nova**, Vol. 30, No. 7, 1573-1577, 2007.

**CAPÍTULO 5. ANÁLISE DA ATIVIDADE DIURÉTICA DA
Verbena minutiflora (VERBENACEAE)**

5.1. Introdução

Diversas plantas medicinais são utilizadas pela população para o tratamento de diversas patologias que afetam o sistema cardiovascular como a hipertensão, aterosclerose e a diabetes *mellitus* (Vora e Mansoor, 2005). No entanto, poucas dessas plantas têm sua segurança, efetividade e mecanismo de ação confirmada cientificamente (Vora e Mansoor, 2005). A validação das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros não pode ser realizada somente com base no conhecimento e usos populares. Por isso a autorização oficial do uso de plantas medicinais como medicamento ou de seus derivados fitoterápicos é necessária e deve ser fundamentada em dados experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que demonstrem que os benefícios obtidos a partir do uso de drogas de origem vegetal sejam superiores aos riscos que eles oferecem àqueles que os utilizam (Yunes et al, 2001).

Várias plantas conhecidas são importantes por sua contribuição como fonte natural e potencial para a produção de fármacos. Alguns fitoterápicos que tem atividade diurética apresentam características que facilitam a eliminação de líquidos do organismo, ajudando na desintoxicação e no tratamento de algumas infecções urinárias. Além disso, também são indicados no combate de outras patologias, vários relatos sobre a atividade diurética das plantas medicinais estão descritos na literatura. Tendo em vista o grande uso que a população faz desses medicamentos para tratar vários tipos de enfermidades, os estudos com plantas medicinais objetivam estabelecer parâmetros de segurança e visam comprovar seu efeito farmacológico em animais, como ratos, por exemplo, com possibilidade de um futuro uso popular desses medicamentos (Pucci et al., 2010).

Plantas do gênero *Verbena* são frequentemente usadas pela população como diurético, embora a eficácia e a segurança do uso de suas preparações não tenham sido ainda todas comprovadas cientificamente.

A planta que possui atividade diurética pode ser utilizada no tratamento da hipertensão. A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônico-degenerativa que afeta o sistema cardiovascular, e seu controle tem constituído um desafio para todos os profissionais da saúde (Axon et al., 2010). É

caracterizada como uma das mais importantes causas de mortes em todo o mundo que pode ser prevenida através de mudanças no estilo de vida ou com medidas farmacológicas (SBC/SBH, 2006; Nola et al., 2010).

Tanto a morbidade quanto a mortalidade por doenças cardiovasculares são comumente elevadas em pessoas com hipertensão (Zhang et al., 2006). É sabidamente uma doença de alta prevalência na população, ocasionando quando não tratada adequadamente, complicações clínicas graves como o acidente vascular cerebral (AVC), doença das coronárias, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Williams et al., 2004). Além disso, também é considerado um grave problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (Molina et al., 2003; Axon et al., 2010).

As complicações da HAS derivam das modificações anatômicas e fisiológicas decorrentes do regime de pressão elevadas a que estão submetidas às câmaras cardíacas e as artérias, e também, da aceleração do processo aterosclerótico (Who, 2005). A HAS atua sinergicamente com outros fatores de risco aterogênicos como o sedentarismo, o estresse, o tabagismo, o envelhecimento, a história familiar, a raça, o gênero, o peso, a elevada ingestão de sal, a baixa ingestão de potássio e o consumo excessivo de álcool (SBC/SBH, 2006; Costanzo et al., 2010).

A HAS apresenta elevados custos médicos e socioeconômicos, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular das extremidades (Lewington et al., 2002; Quinn et al., 2010). Estudos mostram que no Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, sendo a principal causa de morte o AVC. Assim, a elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para as doenças cardiovasculares (Lotufo, 2005).

5.1.2. Pressão Arterial

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de acompanhamento médico em pacientes de muitos países do mundo (Yusuf et al., 2001). Um dos principais fatores de risco para as desordens cardiovasculares é a pressão sanguínea elevada (Carretero et al., 2000). A hipertensão é uma das doenças mais comuns em humanos, sendo que de 90 a 95% dos hipertensos desconhece a causa (Ku, 2006). É considerada de origem multifatorial (Jacob, 1999), envolvendo predisposição genética e fatores ambientais (fisiológicos e psicológicos) como dieta, atividade física, obesidade e fumo (Crackower, et al., 2002; Kakar, et al., 2006). De acordo com Ku (2006) a ideia mais aceita é que a hipertensão é causada por uma interação entre fatores gênicos, múltiplos fatores pressores patogênicos e desordens de fatores depressores fisiológicos.

O tratamento para a hipertensão se faz necessário para garantir a sobrevivência do paciente bem como a qualidade de vida do mesmo (Mar et al., 2001). A hipertensão arterial é uma das principais causas de eventos cardiovasculares, como infartos, insuficiência cardíaca e AVCs (acidentes vascular cerebrais). É um dos fatores de risco cardiovascular mais preocupante porque, em 80% dos casos, não apresenta sintomas. Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante períodos longos está na adesão do paciente ao tratamento. Esta adesão ao tratamento pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural/Plantas Medicinais que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que acreditam na ação benéfica da planta e desta forma pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade. Além disto, as descobertas de novas substâncias com ação inédita irão aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (Yunes et al, 2001).

Neste contexto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes que possam oferecer novas ações terapêuticas contra a hipertensão arterial.

5.1.3. Mecanismos fisiológicos que atuam no controle da pressão arterial

A pressão arterial é definida como a força que o sangue exerce contra as paredes dos vasos. Em seres humanos, a pressão sanguínea varia constantemente, porém, raramente desvia do normal mais do que 10 a 15% durante o dia. Em um adulto normal os níveis pressóricos se mantêm em média entre 120 e 80 mmHg, geralmente próximo à 100 mmHg. Entretanto ela pode ser elevada a mais de 160 mmHg em indivíduos com hipertensão ou até mesmo chegar a 0 nas pessoas que se encontram em situações que comprometem a circulação sanguínea normal (hemorragias) (Guyenet et al, 2006). Felizmente o organismo possui mecanismo de controle da pressão arterial que conseguem promover uma resposta adequada frente às ocasiões que a alteram (Guyenet et al, 2006).

De acordo com Guyton (1991) os mecanismos de controle da pressão sanguínea podem ser classificados de acordo com o tempo necessário para produzir uma ação. Uma resposta rápida (podendo reagir em segundos) é feita pelos barorreceptores, quimiorreceptores e o sistema nervoso central. O controle dos níveis pressóricos que ocorre em horas ou dias é feita pelos rins. O controle em médio prazo (ocorre em minutos) é feito pelos sistemas hormonais como renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, calcitreína-cinina, fator natriurético atrial e autacóides derivados do endotélio. Os barorreceptores estão situados nas paredes das artérias, no seio carotídeo e arco aórtico. Estes são receptores de extensão que respondem alterações estruturais nas paredes dos vasos (distensão ou constrição). Consistem na primeira linha de defesa à hipertensão ou hipotensão aguda (Guyton, 1991; Opie, 1998), ajustam tanto o tônus vagal quanto o sistema nervoso simpático. Os barorreceptores respondem à taxa de aumento de pressão induzida por deformações e a ações estáticas causadas por mudanças contínuas na pressão arterial. Eles se originam de nervos aferentes do vago e nervos glossofaríngeos e se dirigem para o núcleo do trato solitário que faz parte do centro vasomotor na medula oblonga. Impulsos destes receptores são inibitórios por natureza, assim, na hipertensão aguda os baroreflexos geram uma transmissão neuronal aumentada para o centro vasomotor, com consequente inibição do sistema simpático e aumento do tônus vagal (Opie,

1998). Essas mudanças reduzem a força e a frequência cardíaca (Opie, 1998; Guyenet, 2006) e induzem diminuição da resistência vascular periférica.

Dessa forma um aumento agudo na pressão arterial induz mudanças que tendem a reduzi-la. No caso de hipotensão aguda, há uma redução na distensão produzida pela pressão nos barorreceptores, resultando em uma diminuição da frequência de descarga reduzindo os sinais enviados ao centro vasomotor e um consequente aumento da atividade simpática e inibição do tônus vagal (Guyenet et al, 2006).

Também ocorre a ativação dos quimiorreceptores devido às concentrações elevadas de CO_2 (dióxido de carbono) e às baixas concentrações de O_2 (oxigênio) no sangue. Desta forma, um sinal é enviado aos centros cerebrais de controle da pressão sanguínea, causando a redução da mesma. Esse controle é extremamente importante durante a atividade física, onde o consumo de O_2 pelos músculos e a excreção de CO_2 são igualmente elevados (Guyenet et al, 2006).

O controle em longo prazo (horas ou dias) é feito principalmente pelos rins. Quando a pressão sobe além do normal os rins passam a excretar mais água e sal, isso reduz a volemia e faz com que o coração bombeie menos sangue levando à queda da pressão arterial. Reciprocamente quando a pressão cai abaixo do normal há um aumento no balanço entre fluídos que entram e saem, aumentando assim as concentrações dos líquidos e eletrólitos corporais e a pressão sanguínea (Guyenet et al, 2006).

Os mecanismos intermediários são ativados minutos após a ativação dos controladores neurais da pressão. Um dos principais é o sistema renina-angiotensina, que tem função vasoconstritora ativada quando a baixa pressão sanguínea faz com que o fluxo de sangue para os rins caia abaixo do normal. Isso faz com que as células justaglomerulares dos rins secretem renina e a liberem na corrente sanguínea. A renina é uma enzima glicoproteica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II causa vasoconstrição ao longo dos vasos sanguíneos corporais e consequentemente restabelece os níveis pressóricos normais (Guyton, 1991; Opie, 1998; Crackower et al., 2002).

Opie (1998) propõe que a liberação de renina pelas células justaglomerulares ocorre em resposta a três estímulos principais: aumento da estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos; redução da pressão arterial renal e diminuição na reabsorção tubular de sódio (Na^+).

Outros sistemas hormonais participam do controle da pressão sanguínea como o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina. O ADH é um hormônio (peptídeo) neurohipofisário envolvido em vários processos fisiológicos, inclusive regulação dos fluídos corporais, do tônus vascular e da contratilidade cardiovascular. Sua ativação ocorre com o aumento da osmolaridade plasmática, principalmente ao sódio (Na^+), e redução da pressão intravascular. Atua aumentando a reabsorção de água, pelos túbulos renais, sem interferir na eliminação de sódio (Na^+), isso contribui para a elevação da sobrecarga sanguínea e consequentemente da pressão arterial (Lee et al., 2003).

Os peptídeos são importantes no auxílio ao controle da pressão arterial, dentre eles destacamos o peptídeo natriurético atrial (PNA), que possui propriedades diuréticas/natriuréticas e vasodilatadoras e ambas contribuem para uma redução nos níveis pressóricos. Estes efeitos são mediados pela ligação do PNA a um receptor de superfície de membrana, que irá ativar a guanilato ciclase A (GC-A) que por sua vez aumentará as concentrações de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) (Ku, 2006) que vai inibir a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e causar vasodilatação. O PNA também contribui para a inibição da secreção de aldosterona e é antagonista endógeno da angiotensina II (Opie, 1998).

5.1.4. Endotélio vascular e o controle do tônus vascular

O endotélio vascular é considerado um órgão dinâmico que responde a diversos estímulos físicos e humorais, possui uma posição estratégica, na interface entre o sangue e o tecido que favorece o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular. Os vasos sanguíneos são constituído de três camadas: a camada íntima, a camada média e a camada adventícia. A camada íntima consiste em uma única camada de células delgadas, altamente ativas no controle da circulação. Elas produzem vários compostos vasoconstritores como a endotelina, a angiotensina II e o

tromboxano A₂. E também produzem compostos vasodilatadores como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), as prostaciclina (PGI₂), e o óxido nítrico (NO). O endotélio através destes agentes tem influência sobre o fluxo sanguíneo e ainda sobre as células circulantes, como os leucócitos, as plaquetas e ainda sobre substâncias envolvidas na coagulação sanguínea. Todos estes efeitos contribuem para a modulação do tônus das paredes vasculares na hipertensão e participam no desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares. A camada média é composta principalmente de células musculares lisas, que com a estimulação apropriada contraem para estreitar o diâmetro da artéria. Outro componente desta camada é a matriz, que une as células musculares mantendo a orientação correta da parede do vaso. A camada adventícia, que é a mais externa, constituída de fibroblasto, colágeno e poucas células além das dos vasos sanguíneos. Nela também se encontram os vasos linfáticos e nervos autônomos que controlam o tônus arteriolar (Opie, 1998).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina. Por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS). O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outra vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. O NO derivado das células endoteliais é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico, a toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema

antioxidante. A caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças (Toda et al., 2007).

5.1.5. Tratamento da Hipertensão

Uma das principais estratégias no tratamento farmacológico da hipertensão refere-se às drogas diuréticas, que exercem suas atividades principalmente pela redução do volume extracelular e do débito cardíaco. Este efeito pode ser decorrente, entre outros, da inibição da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ no ramo ascendente espesso da alça de henle (diuréticos de alça), do bloqueio do co-transportador Na^+/Cl^- no túbulo convoluto distal (tiazídicos), do antagonismo dos receptores da aldosterona (espironolactona), do bloqueio dos canais de sódio no epitélio renal (amilorida) e/ou por alterações no fluxo sanguíneo renal. Por outro lado, durante o tratamento prolongado, o efeito hipotensor é mantido devido uma redução na resistência periférica total, que frequentemente, é acompanhada da normalização do débito cardíaco e do volume extracelular. Neste sentido, alguns autores tem postulado que os diuréticos, principalmente os tiazídicos, podem apresentar efeito direto sobre o músculo liso vascular, que é independente do seu efeito salurético. Não obstante, acredita-se que estas drogas possam modular canais de potássio, e considerando que o efeito natriurético prolongado pode reduzir secundariamente a concentração intracelular de cálcio, estes efeitos poderiam resultar em vasodilatação e consequentemente hipotensão (Wargo e Banta, 2009; Derer et al., 2010; Heran et al., 2010; Neff e Nawarskas, 2010).

A terapia anti-hipertensiva eficaz evita quase que totalmente, AVCs hemorrágicos, insuficiência cardíaca e a insuficiência renal decorrentes da hipertensão (Cominacini et al., 2003).

Um dos maiores problemas da farmacoterapia anti-hipertensiva é a não adesão ao tratamento, assim contribuindo para o inadequado controle dos níveis pressóricos do paciente (Busnello et al., 2001; Hackam et al., 2010). Vários são os fatores que contribuem para a não adesão do paciente ao tratamento farmacológico, entre eles, destacam-se: a falta de conhecimento sobre a doença, ou de motivação para tratar uma doença assintomática e

crônica; baixo nível sócioeconômico; aspectos culturais e crenças erradas sobre a patologia; relacionamento inadequado com a equipe de saúde; dificuldades em marcar a consulta e em ser atendido; custo elevado dos medicamentos; ocorrências de efeitos adversos desagradáveis; e a interferência na qualidade de vida após o início do tratamento (Andrade et al., 2002; Pierin et al., 2004; Klarenbach et al., 2010).

Da mesma forma, uma das maiores dificuldades encontradas nas terapias farmacológicas refere-se ao fato de que alguns pacientes mostram-se refratários aos tratamentos convencionais, enquanto outros têm seus níveis pressóricos reduzidos substancialmente, podendo elevar o risco aos portadores de doença coronariana associada (Messerli et al., 2006). Neste contexto, o investimento em novos estudos que visem investigar alternativas de prevenção e tratamento (que possam ser utilizadas isoladamente ou aliadas às terapias convencionais) seriam extremamente úteis (Egan et al., 2010). Assim, uma opção tradicionalmente bem aceita provém dos produtos naturais, especialmente aqueles habitualmente utilizados devido o grande apelo popular. Estes produtos podem representar, potencialmente, uma fonte alternativa no fornecimento de novas estruturas químicas, assim como um recurso ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (Schenkel et al., 1999).

Diversas pesquisas utilizando plantas medicinais têm procurado demonstrar a contribuição de substâncias de origem natural no efeito cardioprotetor e antihipertensivo (Suzuki et al., 2002; Testai et al., 2002), pois se sabe, há muito tempo, que a redução vigorosa da pressão arterial a limites próximos ao normal proporciona enormes benefícios em termos da redução da morbidade e da mortalidade por causas cardiovasculares (Macgregor, 2000; Vainio et al., 2001).

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de investigar o efeito diurético da planta *Verbena minutiflora*, por se tratar de uma ação que, futuramente, talvez possa auxiliar como meio farmacológico para o controle de distúrbios cardiovasculares.

5.2. Objetivos

5.2.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade diurética aguda de extratos, frações e infusões de *V. minutiflora* em ratos Wistar.

5.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Investigar a influência de diferentes fatores como: temperatura, tempo de coleta da urina e adaptação dos animais na gaiola metabólica no modelo de diurese;
- ✓ Avaliar a atividade diurética aguda (dose única) do extrato bruto, fração acetato de etila e infusão da *Verbena minutiflora* utilizando modelo de diurese em ratos.

5.3. Metodologia

5.3.1. Avaliação da Atividade Diurética

A avaliação da atividade diurética foi realizada no Laboratório de Análise Comportamental da Faculdade Guairacá. Foram utilizados grupos experimentais constituídos por ratos Wistar, que foram acondicionados em gaiola metabólica de aço inoxidável, nas quais foi possível monitorar o consumo de água e produção de urina.

A atividade diurética foi determinada segundo métodos previamente descritos por (Kau et al., 1984), com pequenas modificações. Para estes protocolos os animais foram divididos em três grupos experimentais (n=6), um grupo (controle positivo) foi tratado com furosemida, grupo tratado (extrato metanólico, fração acetato de etila e infusão) e o grupo (controle negativo) foi tratado apenas com água deionizada.

As administrações foram feitas pela via oral, através do método de gavagem. A avaliação da atividade diurética aguda foi testada, através da administração de uma única dose para cada tratamento. Antes dos tratamentos, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 mL/100g) para impor uniformidade corporal de sal e água (Benjumea et al; 2005).

A atividade diurética foi feita através de protocolos separados, onde os animais foram divididos em cinco grupos (n=6), que foram formados da seguinte forma: um grupo controle foi tratado com água deionizada (5 mL/kg do peso corporal), outros três foram grupos foram tratados com o extrato bruto metanólico (10, 50, e 100 mg/kg), fração acetato de etila (1, 5, e 25 mg/kg) e infusão (5 mL/kg do peso corporal) da planta *Verbena minutiflora* solubilizadas em solução fisiológica 0,9%, (5 mL/kg do peso corporal); e o último grupo (controle positivo) foi tratado com furosemida (10 mg/kg - 5 mL/kg do peso corporal).

As administrações foram feitas pela via oral, através do método de gavagem. A avaliação da atividade diurética aguda foi testada, através da administração de uma única dose para cada tratamento, os experimentos foram realizados em temperatura controlada ($20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), o tempo de coleta de

urina foi realizado em intervalos de 2 horas durante 8 horas, após a administração dos tratamentos. Ao final do experimento, todos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.

O volume de urina foi monitorado nesses mesmos intervalos. Análises físico-químicas foram realizadas nas amostras de urina de 12 horas. Os parâmetros analisados foram: volume, pH, densidade. O volume e pH foram determinados em amostras frescas de urina usando provetas 25 mL e um pHmetro, respectivamente. A estimativa da densidade foi feita pela massa da amostra na balança analítica sob o volume mensurado.

5.3.2. Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, machos, variedade Wistar, albinos, com idade entre 2 e 3 meses, fornecidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $20 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. O número de animais por grupo foi de 6 (seis) indivíduos. Este número foi estimado com base em estudos prévios, dos quais se extraiu a variabilidade esperada (variância) e se estimou estatisticamente o N por grupo de 6 animais, pois este número permite que se detecte uma diferença maior ou igual a 20% nos parâmetros a serem investigados.

5.3.3. Análise Estatística

Os resultados para o estudo da atividade diurética foram expressos através da Média $\pm$ DP, organizados e resumidos na forma de gráficos e tabelas. Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foi aplicado, por meio de software “Graphpad Instat Prism 5” os testes de análise de variância (ANOVA). Para todos os grupos foi considerado resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

5.4. Resultados e Discussões

5.4.1. Análise da atividade diurética da *Verbena minutiflora*

Foram analisados os resultados sobre a atividade diurética da *Verbena minutiflora* através da investigação farmacológica do seu extrato metanólico das partes aéreas, da fração acetato de etila e da infusão das folhas. A presença de atividade diurética é constatada quando há alterações do volume de urina coletado.

Neste trabalho foi analisado o volume de urina coletado em relação aos diferentes tratamentos, sendo dividido em 5 grupos de ratos (n=5), o grupo 1 - C (controle negativo, recebeu água deionizada), os grupos 2, 3 e 4 receberam 10, 50 e 100 mg/kg do extrato metanólico, fração acetato de etila (1, 5, e 25 mg/kg) e infusão (5 mL/kg do peso corporal) da planta *Verbena minutiflora* respectivamente, e o grupo 5 – F (controle positivo, recebeu 10 mg/kg de Furosemida). Os animais foram submetidos aos tratamentos pela via oral e os resultados obtidos são observados nas figuras 5.1; 5.2 e 5.3.

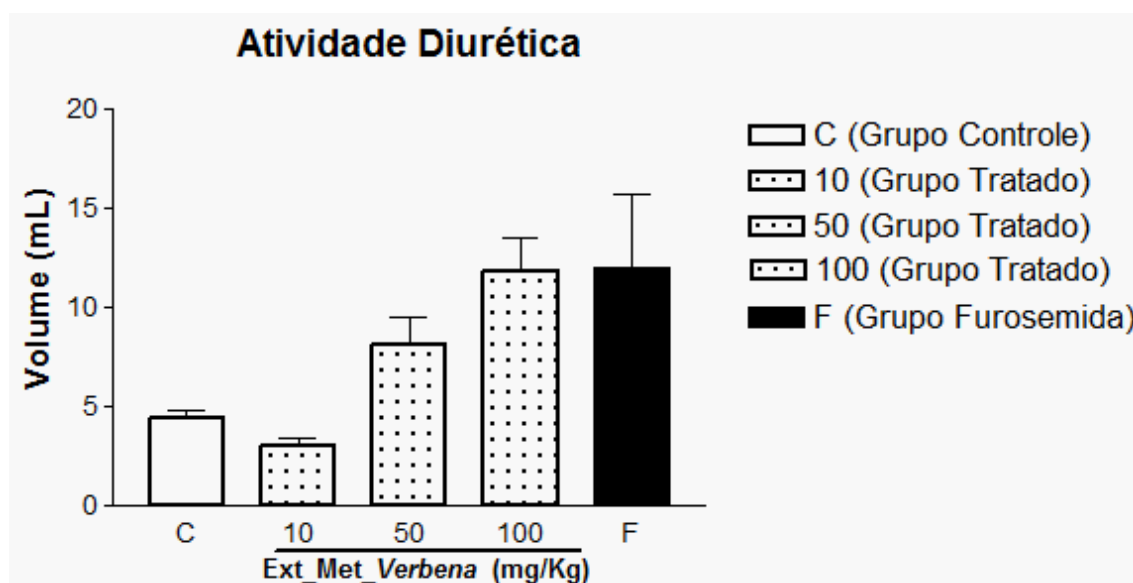


Figura 5.1: Avaliação da Atividade diurética do Extrato Metanólico Bruto da *Verbena minutiflora* em ratos

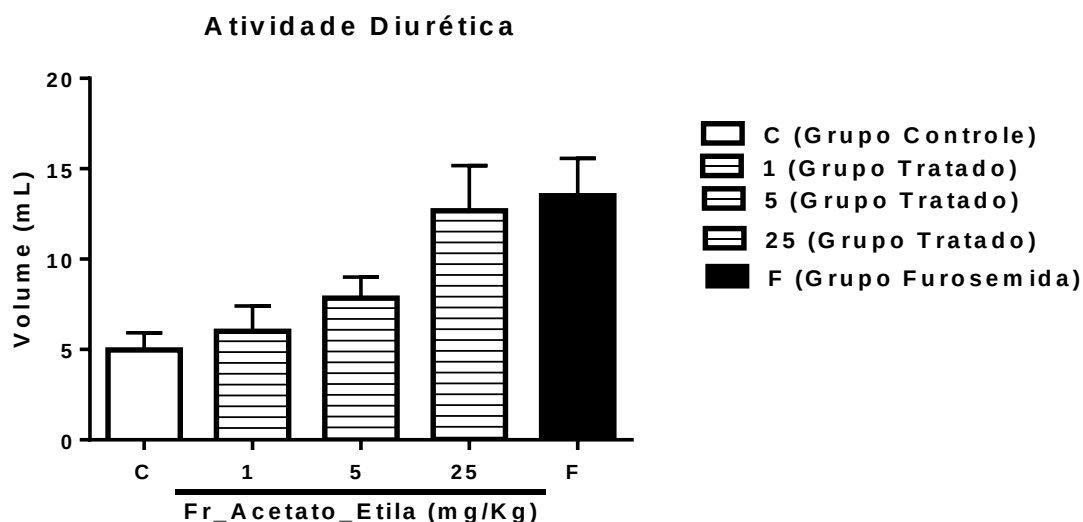


Figura 5.2: Avaliação da Atividade diurética da Fração Acetato de Etila da *Verbena minutiflora* em ratos

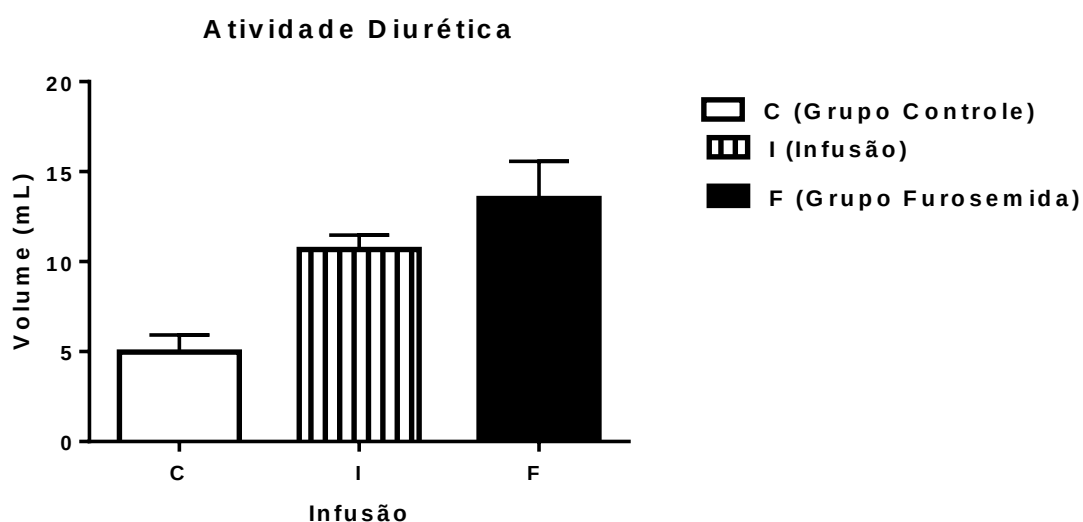


Figura 5.3: Avaliação da Atividade diurética da Infusão da *Verbena minutiflora* em ratos

Para a verificação da atividade diurética foi seguido um padrão onde o volume de urina foi medido por meio de uma proveta graduada, a cada 2h durante um período de 8h.

A *Verbena minutiflora* administrada por via oral nos ratos nos diferentes tratamentos apresentou atividade diurética dose-dependente. A dose de 100 mg/kg do extrato metanólico é significativa quando comparada com o grupo controle positivo furosemida, que é um diurético de referência utilizado na clínica, devido seu mecanismo de ação. Era de se esperar que a furosemida

aumentasse a diurese dos animais por ser um diurético que atua nos túbulos renais em especial na alça de Henle, o aumento do volume urinário se dá por causa da menor reabsorção tubular de sódio, já que este eletrólito é bastante reabsorvido neste segmento tubular, esta maior presença de sódio provoca retenção de água, gerando uma maior diurese. O principal mecanismo dos diuréticos é elevar a eliminação renal de sal e água, diminuindo assim o volume de fluido intravascular intersticial e a pressão de enchimento ventricular, reduzindo a retenção de fluido e eliminando a congestão pulmonar, os edemas e a pressão arterial (Araujo, et al., 2010).

A fração acetato de etila apresentou atividade diurética e uma potencia maior em relação ao extrato metanólico e a infusão. Nos estudos quantitativos descritos nos capítulo 2 desta tese a fração acetato de etila apresentou maior concentração de fenólicos e flavonoides.

A infusão (10g de folhas mais 200mL de água quente) apresentou atividade diurética menor que a furosemida, que é o diurético de referência, mais mostrou atividade diurética com potencia maior em relação ao grupo controle água, sugerindo que a infusão também promova essa atividade.

Estudo com o extrato etanólico e infusão da *Tropaeolum majus*, planta medicinal muito utilizada e conhecida popularmente como “chaguinha”, o extrato etanólico na dose de 300mg/kg e a infusão apresentaram efeito diurético no modelo de diurese aguda, aumentando a excreção de Na^+ (Gasparotto Junior, et al., 2009).

A validação científica do uso de plantas medicinais é muito importante, pois a população utiliza as plantas para determinada finalidade terapêutica, onde muitas vezes a planta não possui o princípio ativo para exercer essa função. A ação diurética das plantas citadas pela população pode ser confundida pelo próprio consumo da infusão (chá), muitas vezes a utilização da planta medicinal proporciona o aumento da diurese, devido ao aumento da ingestão de líquidos na forma do chá. A comparação do grupo tratado com a infusão e o grupo água com mesmos volumes de administração demonstra que a infusão possui atividade diurética.

A análise do pH foi feita utilizando-se pHmetro. Segundo estudos realizados por (Barros & Gilvana, 2008) não existem valores fixos para o pH da

urina, podendo este variar durante um período de 25h de valores que variam entre 5,5 até 8,0. Durante esta pesquisa não foram detectadas alterações relevantes, pois o pH das amostras variou ligeiramente de ácido a básico, A densidade é expressa massa sob volume, os ratos que apresentaram uma diurese menor, consequentemente apresentaram valores de densidade menor como o esperado.

Através da análise realizada no modelo de diurese aguda desta pesquisa, pode se afirmar que a *Verbena minutiflora* possui atividade diurética, e que mais estudos devem ser realizados.

5.5. Conclusões

Os diuréticos são uma classe de fármacos muito utilizados no tratamento da hipertensão, uma patologia que vem aumentando a incidência cada vez mais na população, as plantas medicinais representam potencialmente, uma fonte alternativa no fornecimento de novas estruturas químicas e substâncias que podem contribuir no efeito cardioprotetor e antihipertensivo.

A análise dos resultados do modelo de diurese aguda pode se afirmar que a *Verbena minutiflora* possui atividade diurética, e o efeito diurético são dose-dependente, onde a fração acetato de etila apresentou uma potencia maior em relação ao extrato metanólico bruto e a infusão da *Verbena minutiflora*, esse foi um estudo prévio, onde mais investigações devem ser realizadas.

5.6. Referências Bibliográficas

ANDRADE, J. P. *et al.* Aspectos Epidemiológicos da Aderência ao Tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica. **Arq. Bras. Cardiol.** , v. 79, n. 4, p. 375-379, 2002.

ARAUJO, S.; LEMES, CUNHA, H. P.; QUEIROZ D. A; V. S.; NASCIMENTO, D. D.; FERREIRA S, R. Morfologia e função cardíacas em pacientes renais crônicos, com ou sem diurese residual, em tratamento hemodialítico. Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia – MG – Brasil, 2010.

AXON, R. N. *et al.* Prevalence and management of hypertension in the inpatient setting: A systematic review. **J Hosp Med**, Jul 22 2010.

BENJUMEA, D. *et al.* Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic Canary species. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 205-9, Aug 22 2005.

BUSNELLO, R. G. *et al.* Características associadas ao abandono do acompanhamento de pacientes hipertensos atendidos em um ambulatório de referência. **Arq. Bras. Cardiol.** , v. 76, p. 349-351, 2001.

COMINACINI, L. *et al.* **Antioxidant activity of different dihydropyridines.** *BiochemBiophys Res Commun*, v. 302, p. 679-684, 2003.

COSTANZO, S. *et al.* Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. **Circulation**, v. 121, n. 17, p.1951-9, May 4 2010.

DERER, W. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonists: inhibition of the rennin angiotensin system. **MMW Fortschr Med**, v. 152, n. 6, p. 48-9, Feb 11 2010.

EGAN, B. M. *et al.* Does dark chocolate have a role in the prevention and management of hypertension?: commentary on the evidence. **Hypertension**, v. 55, n.6, p. 1289-95, Jun 2010.

HACKAM, D. G. *et al.* The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. **Can J Cardiol**, v. 26, n. 5, p. 249-58, May 2010.

HANSSON, L. *et al.* Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. **Lancet**, v. 351, n. 9118, p.1755-62, Jun 13 1998.

HERAN, B. S. *et al.* Blood pressure lowering efficacy of potassium-sparing diuretics (that block the epithelial sodium channel) for primary hypertension. **CochraneDatabase Syst Rev**, n. 1, p. CD008167, 2010.

KAU, S. T. *et al.* A method for screening diuretic agents in the rat. **J Pharmacol Methods**, v. 11, n. 1, p. 67-75, Mar 1984.

LESSA, I. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca e da Hipertensão Arterial Sistêmica no Brasil. **Rev. Bras. de Hipertensão**, v. 8, p. 383-392, 2001.

LEWINGTON, S. *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 14 2002.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **São Paulo Medical Journal**, v.123, n. 1, p. 3-4, 2005.

MESSERLI, F. H. *et al.* Dogma disputed: can aggressively lowering blood pressure in hypertensive patients with coronary artery disease be dangerous? **Ann Intern Med**, v. 144, n. 12, p. 884-93, Jun 20 2006.

MOLINA, M. D. C. B. *et al.* Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 743-749, 2003.

NEFF, K. M.; NAWARSKAS, J. J. Hydrochlorothiazide versus chlorthalidone in the management of hypertension. **Cardiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 51-6, Jan-Feb 2010.

NOLA, I. A. *et al.* Dietary habits and cardiovascular diseases. **Acta Med Croatica**, v.64, n. 2, p. 89-95, May 2010.

PIERIN, A. M. G. *et al.* O desafio do controle da hipertensão arterial e a adesão ao tratamento. In: PIERIN, A. M. G. (Ed.). *Hipertensão arterial: uma proposta para cuidar*. São Paulo: Manole, 2004. p. 275-289.

PUCCI, L. L; CUNHA, L. C; TRESVENZOL, L. M; DE PAULA, J. R; BOZINIS, M. C.V; FREITAS, P. C.M. Avaliação da toxicidade aguda oral e da atividade diurética da *rudgea viburnoides* (congonha-de-bugre). **Latin American Journal of Pharmacy**, 2010.

SBC/SBH. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Disponível em: <http://www.sbh.org.br/documentos/index.asp>. Acesso em: 03 mar 2009.2006.

SCHENKEL, E. P. *et al.* *Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul, 1999.

WARGO, K. A.; BANTA, W. M. A comprehensive review of the loop diuretics: should furosemide be first line? **Ann Pharmacother**, v. 43, n. 11, p. 1836-47, Nov 2009.

WHO. Pharmacy-Based Hypertension Management Model: Protocol and Guidelines. *A joint CINDI/EuroPharm Forum project*, 2005.

WILLIAMS, B. *et al.* British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. **BMJ**, v. 328, n. 7440, p. 634-40, Mar 13, 2004.

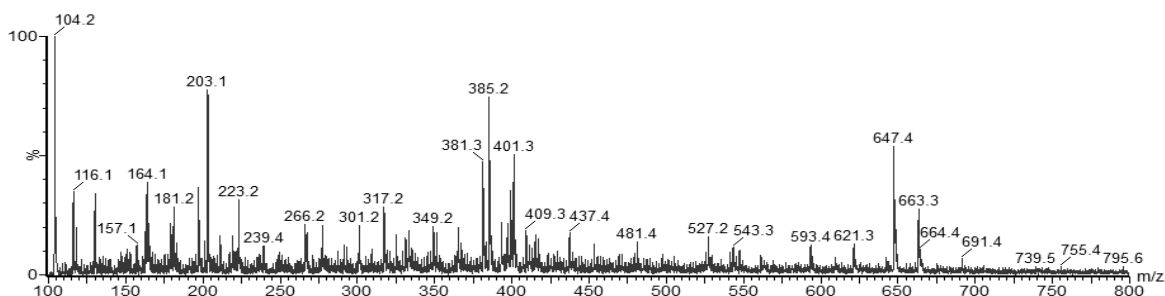
ZHANG, Y. *et al.* Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population-based sample: the Strong Heart Study. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 410-4, Mar 2006.

ANEXOS

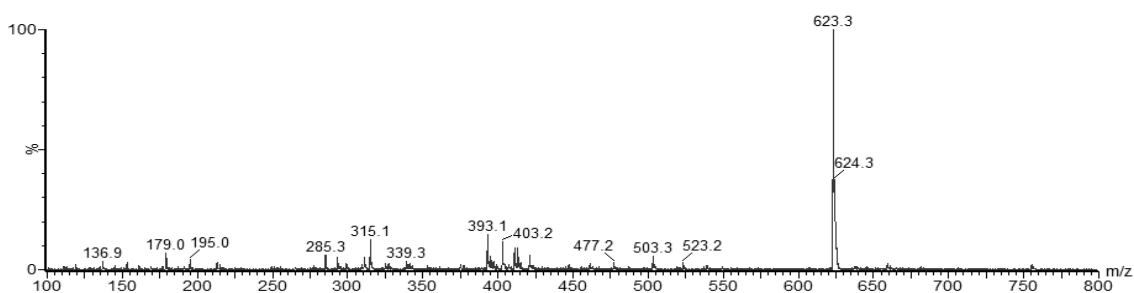
Anexo 1 – Fingerprints obtidos por ESI-MS para o Extrato Etanólico das Folhas, Flores e Caules coletados nos anos de 2009 a 2012 da *Verbena minutiflora*

Gervão folhas (-)

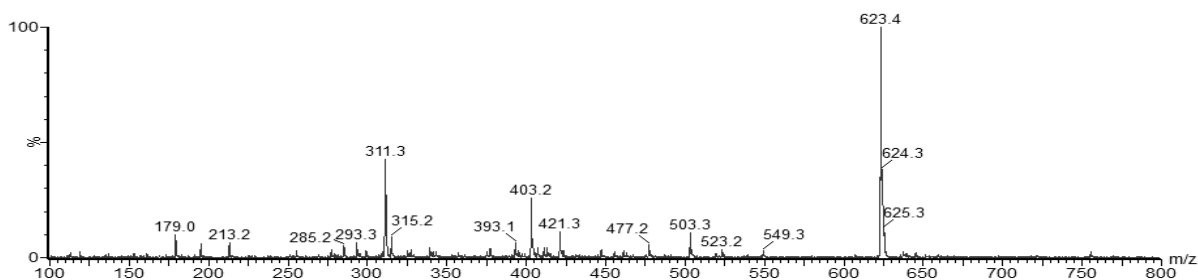
2009



2010



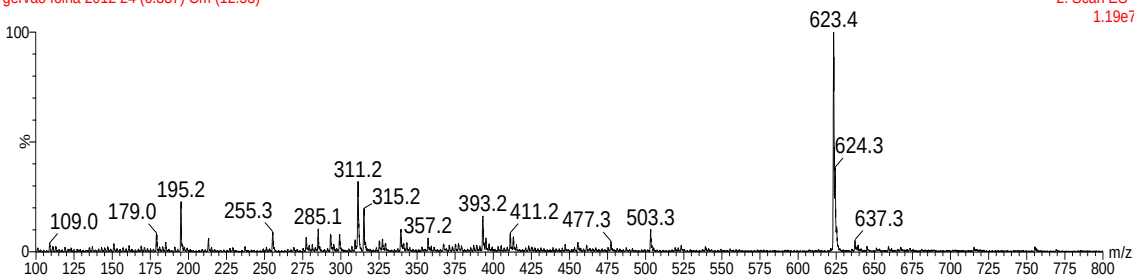
2011



2012

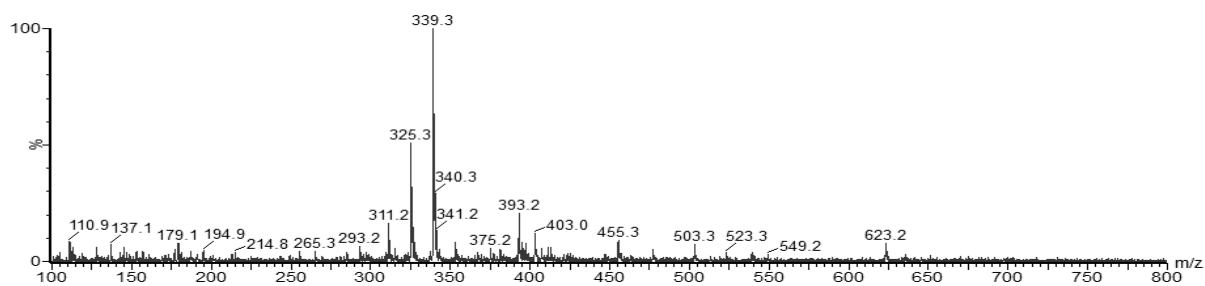
gervao folha 2012 24 (0.337) Cm (12:53)

2: Scan ES-
1.19e7

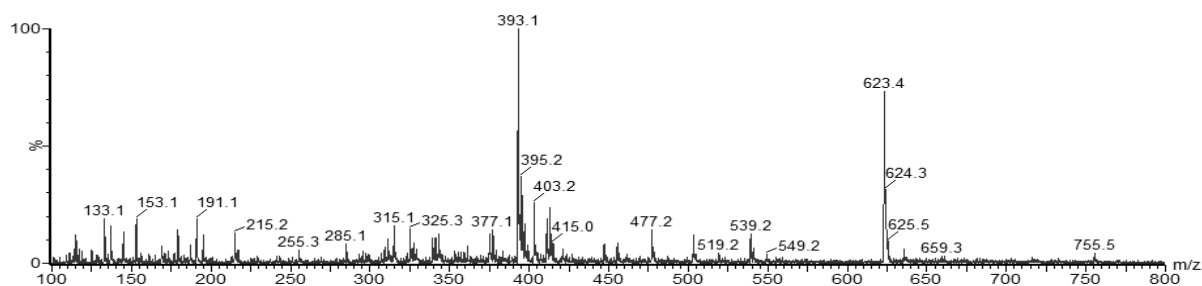


ESI(-)-MS do Extrato Etanólico das Folhas da *Verbena minutiflora* coletadas de 2009 a 2012

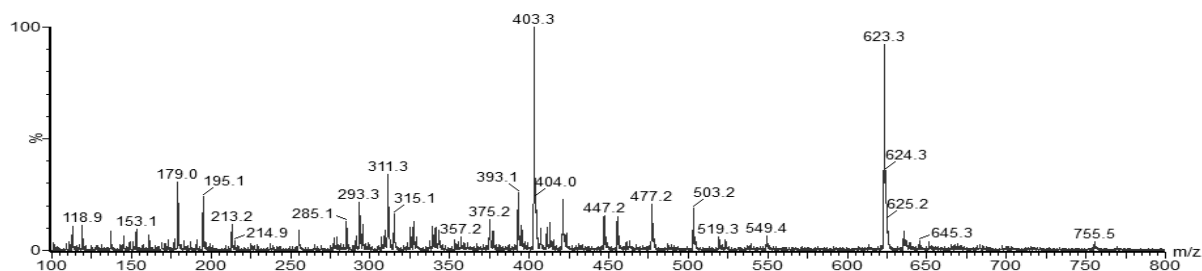
Gervão caule (-)
2009



2010



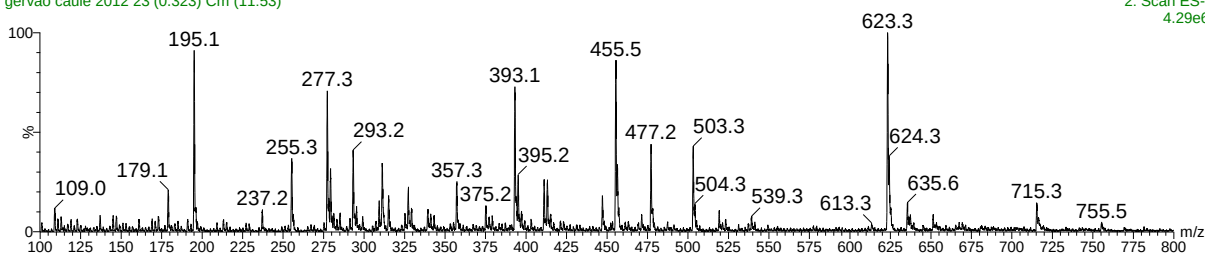
2011



2012

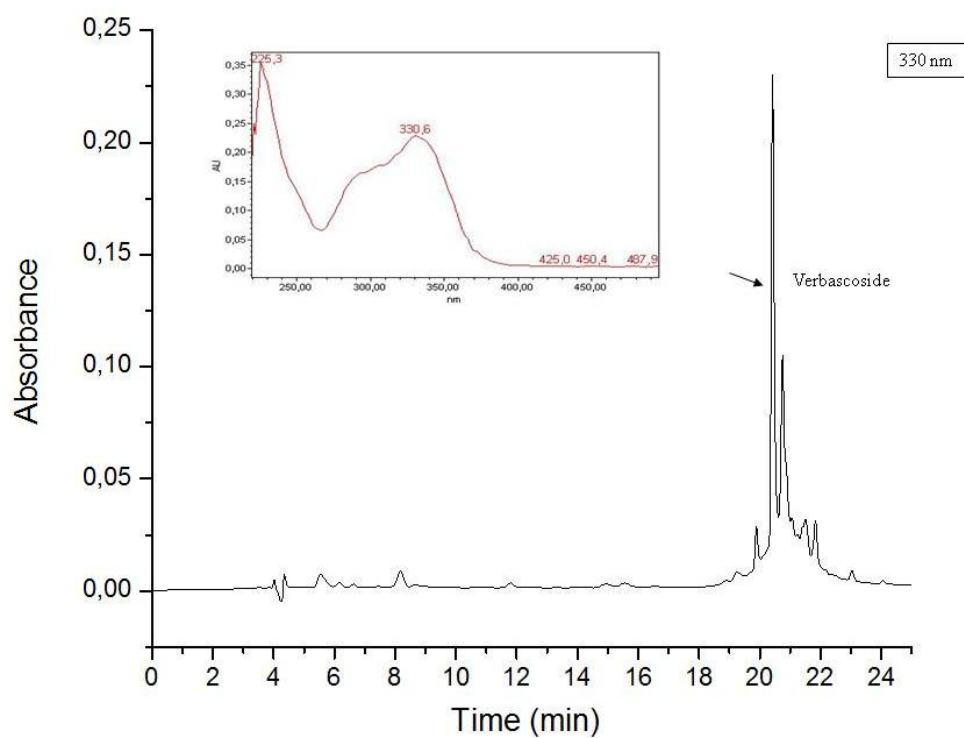
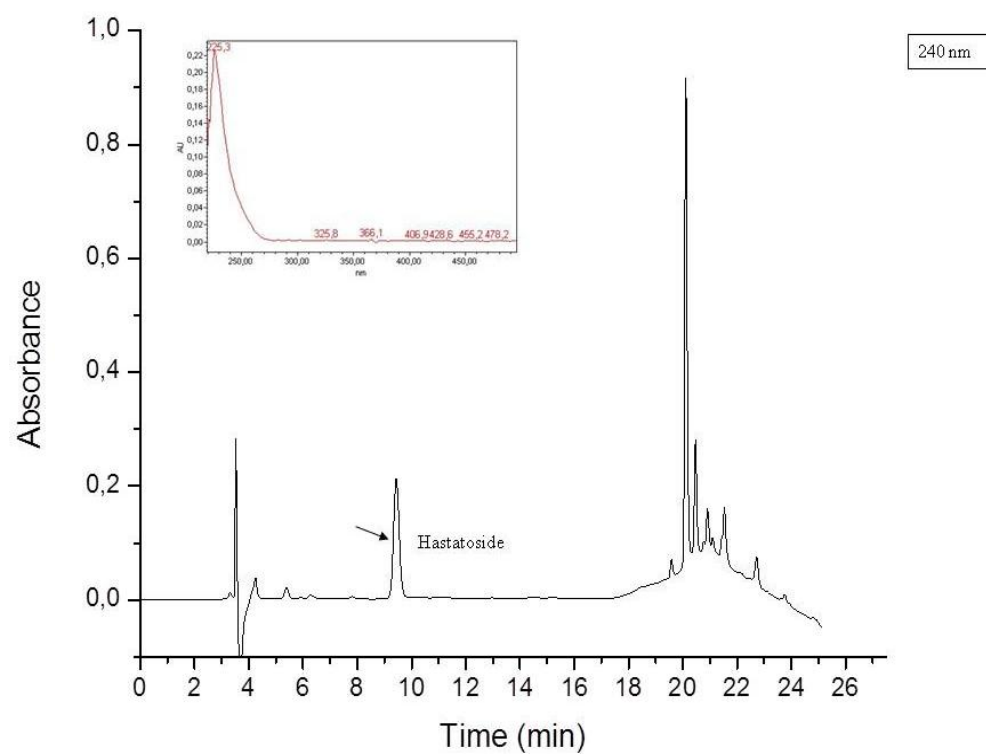
gervao caule 2012 23 (0.323) Cm (11:53)

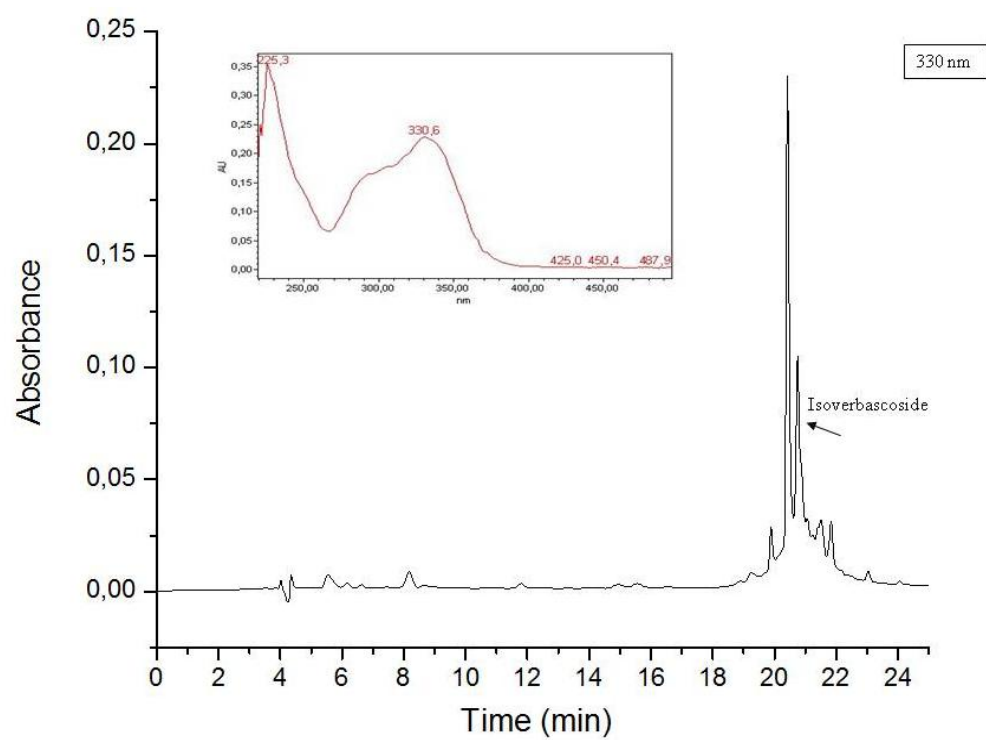
2: Scan ES-
4.29e6



ESI(-)-MS do Extrato Etanólico dos Caules da *Verbena minutiflora* coletados de 2009 a 2012

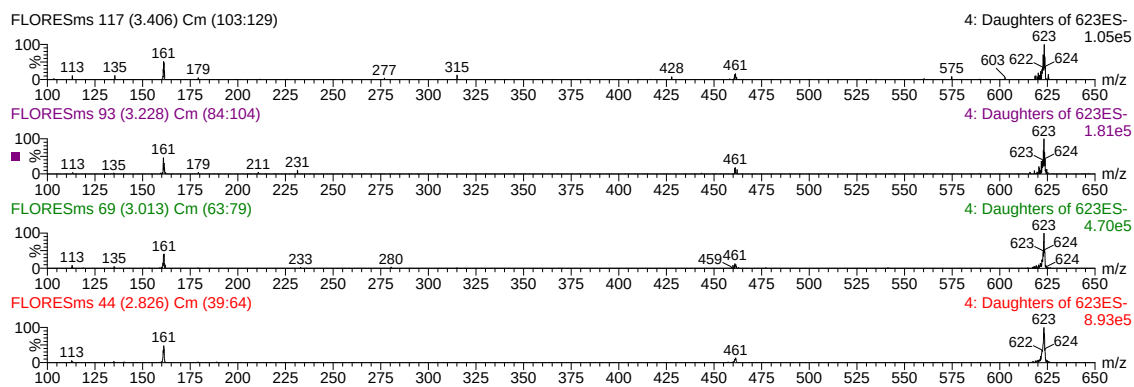
Anexo 2 – Cromatograma das infusões das folhas da *Verbena minutiflora* coletada no ano de 2010



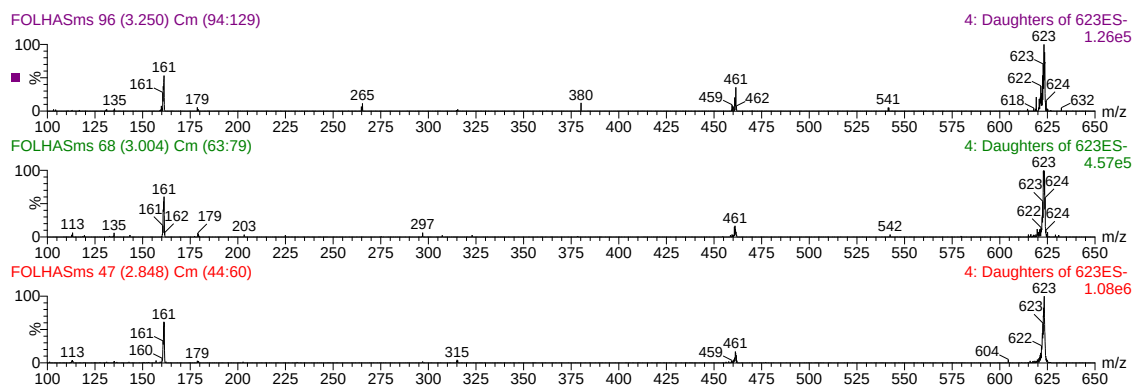


Cromatograma das infusões das folhas da *Verbena minutiflora* coletada no ano de 2010 nos comprimentos de onda 240 e 330 nm e espectro UV dos picos cromatográficos destacados

Anexo 3 – ESI(-)-MS para Verbascosídeo e Compostos Estruturalmente Relacionados no Extrato Etanólico das Flores, coletada no ano de 2010 da *Verbena minutiflora*



ESI(-)-MS/MS para verbascosídeo e compostos estruturalmente relacionados a 3,4, 3,2, 3,0, 2,8 min no extratos etanólicos das flores, coletada em 2010 da *V. minutiflora*



ESI(-)-MS/MS para verbascosídeo e compostos estruturalmente relacionados a 3,2, 3,0, 2,8 min no extratos etanólicos das flores, coletada em 2010 da *V. minutiflora*

Anexo 4 – Artigo científico intitulado Variability and Chemical Composition of Aerials Parts of *Verbena minutiflora* publicado pela revista Journal of Food Processing and Preservation

Anexo 5 – Artigo científico intitulado “Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of aerial parts of *Verbena minutiflora*: in house validation of an HPLC-DAD method”, que foi escrito e submetido para a revista Food Chemistry

VARIABILITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF AERIALS PARTS OF *VERBENA MINUTIFLORA*

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES¹, KARLOS EDUARDO PIANOSKI¹, JOÃO BENHUR MOKOCHINSKI², DAIANE FINGER¹, ALEXANDRA CHRISTINE HELENA FRANKLAND SAWAYA², ELISA AGUAYO DA ROSA¹, SUELI PÉRCIO QUINÁIA¹ and YOHANDRA REYES TORRES^{1,3}

¹Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03, Vila Carli, Guarapuava, Paraná 85040-080, Brazil

²Programa BTPB, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

³Corresponding author.

TEL: 55-042-3629-8301;

55-042-3629-8325;

EMAIL: ryohandra@yahoo.com

Received for Publication May 7, 2015

Accepted for Publication October 22, 2015

doi:10.1111/jfpp.12687

ABSTRACT

Verbena minutiflora (Verbenaceae) is popularly consumed as an infusion for the treatment of various diseases. However, so far there is no pharmacological or chemical validation to support its therapeutic applications. Therefore, the analysis of the chemical composition and pharmacological activities of *V. minutiflora* is crucial. In this study, extracts and infusions of the aerial parts of *V. minutiflora* (leaves, flowers and stems) were analyzed during four consecutive years. Extracts of leaves and flowers had significantly higher phenolic content and antiradical capacity than stems regardless of the year of collection. The infusions of leaves presented constant composition throughout the studied period with high levels of bioactive compounds and high antioxidant potential. Samples were analyzed by HPLC with photodiode array detector (HPLC-DAD) and by LC-ESI-MS/MS, and the potent antioxidants verbascoside and isoverbascoside (phenylpropanoids) and the iridoid hastatoside were tentatively identified in extracts and infusions of the aerial parts of *V. minutiflora*.

PRACTICAL APPLICATIONS

Medicinal plants are used since ancient times and are increasingly attracting worldwide attention as functional foods or beverages. *Verbena minutiflora* is popularly consumed as an infusion to reduce the levels of glucose and cholesterol in blood. Despite its popularity, so far there is no pharmaceutical or chemical validation to support their therapeutic applications. Therefore, it is extremely important to identify the main bioactive constituents of *V. minutiflora* in order for the plant to be safely used as a phytotherapeutic resource. All extracts showed high concentration of phenolic compounds and therefore potential antiradical capacity, especially the extracts of leaves and flowers. Despite lower amounts of phenolic and flavonoid compounds extracted by hot water, infusions showed high antiradical capacity that might be due to the presence of hastatoside, verbascoside and its isomers. This result justifies the popular intake of infusions of *V. minutiflora* as a source of antioxidant compounds.

INTRODUCTION

The Verbenaceae family comprises approximately 100 genera of tropical and subtropical distribution, including the *Verbena* genus with approximately 250 species distrib-

uted preferentially in tropical and temperate regions of America. Several species of *Verbena* are found in the Andean region of Chile to Peru, Guyana, Venezuela, Argentina and South and Southeast regions of Brazil (Souza *et al.* 2005). The *Verbena* genus contains medicinal plants traditionally

used as infusion due to therapeutic effect such as diuretic, expectorant, anti-rheumatic (Schönbichler *et al.* 2013), antibacterial (Hernández *et al.* 2000), antifungal (Casanova *et al.* 2008), anti-inflammatory (Calvo *et al.* 1998; Deepak and Handa 2000; Speroni *et al.* 2007), analgesic (Calvo 2006) and antioxidant (Bilia *et al.* 2008; Casanova *et al.* 2008; Rehecho *et al.* 2011). The major classes of secondary metabolites present in *Verbena officinalis* are iridoids, phenylpropanoids, flavonoids, triterpenes and monoterpenes (Deepak and Handa 2000; El-Hela *et al.* 2010). The iridoid verbenalin and the phenylpropanoid verbascoside are compounds with hepatoprotective (Singh *et al.* 1998) and neuroprotective effects, respectively (Sheng *et al.* 2002), commonly identified in species of *Verbena*.

Verbena minutiflora Briq. ex Moldenke is known in Brazil as gervão. It is popularly consumed as a diuretic infusion used to treat several gastrointestinal and skin disorders (Lorenzi and Abreu Matos 2002; Panizza 2002). However, there is no chemical or pharmacological validation to subsidize the therapeutic applications. Therefore, it is important to study the chemical composition of *V. minutiflora* and the chemical variability of its bioactive compounds. The current research aimed to investigate for the first time the main secondary metabolites in aerial parts (leaves, flowers and stems) of *V. minutiflora*. Plant material was collected throughout four consecutive years and was extracted with ethanol to qualify and quantify the chemical variability and antiradical capacity of *V. minutiflora*.

MATERIALS AND METHODS

Plant, Extracts and Infusions

V. minutiflora plant was collected in Guarapuava in Paraná state located in southern Brazil (25°23'08.57"S, 51°26'50'63"W; altitude 1,115 m). The species was identified and classified by the Curator Osmar Ribas Santos at Municipal Botanical Museum located in Curitiba, Paraná, Brazil. A voucher specimen of the plant was deposited and catalogued in the Herbarium Museum under registration no. 359683. The plant samples were collected in the same location for four consecutive years from 2009 to 2012 and always in November (spring season) when the plant has many flowers and leaves.

The aerial parts of the plant (leaves, flowers and stems), collected in 2009, 2010, 2011 and 2012, were dried at room temperature and crushed. Samples were macerated with ethanol (plant material/ethanol 1:20) under stirring at room temperature. The extraction solution was filtered every 12 h for 2 days with renewal of the solvent. Evaporation of solvent was carried in a rotary evaporator to give the crude ethanolic extracts (average extraction yield: leaves

14.27%, flowers 14.27% and stems 11.13% of dry plant mass). The infusions of *V. minutiflora* were prepared with 10 g of leaves and 200 mL of boiling water. The capped mixture was maintained for 20 min, then cooled and filtered.

Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents

The total phenolic content was measured using the Folin–Ciocalteu method with some modifications (Schmidt *et al.* 2014). Methanolic standard solutions of gallic acid were prepared from a stock solution at 1,000 mg/L. The reaction mixtures were prepared by mixing 300 µL of gallic acid standards at different concentrations with 500.0 µL of Folin–Ciocalteu reagent and 500.0 µL of a buffer (1.2 g of carbonate buffer and 20.0 g of sodium tartrate in 100.0 mL of water, pH = 11.0 ± 0.2). The volume was adjusted with ultrapure water to 5.0 mL. The absorbance readings were made on UV-vis spectrophotometer at $\lambda = 760$ nm. For the samples, the same procedure was employed, simply by replacing the gallic acid standard solutions by extract solutions or infusions of *V. minutiflora* obtained in four consecutive years. Before spectrophotometric analysis, all samples were left for 30 min in the dark to complete the reaction. The results for extracts were expressed as milligrams of phenolic compounds per grams of dry extracts (mg/g). For infusions, the results were expressed as total amount of phenolic compounds in 200 mL of water.

Spectrophotometric determination of flavonoids was accomplished by complexation with aluminum chloride in methanol. Stock solutions of quercetin at 1,000 mg/L and aluminum chloride at 5.0% (w/v) were prepared in methanol (Bors *et al.* 1990; Buriol *et al.* 2009). To elaborate the calibration curve, aliquots of 500.0 µL of standard solutions of quercetin and 250.0 µL of AlCl₃ solution were added. The volume was adjusted to 5.0 mL with methanol. After 30 min, the absorbance was read at 425 nm. For the samples, the same procedure was used simply by replacing the quercetin standard by extract solutions or infusions of *V. minutiflora*. The results for extracts were expressed as milligrams of flavonoids per grams of dry extracts (mg/g). For infusions, the results were expressed as total amount of flavonoids in 200 mL of water.

Evaluation of the Antiradical Capacity

The antiradical activity was determined by the spectrophotometric method that used 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) according to Rufino *et al.* (2009) with some modifications (Schmidt *et al.* 2014). The reaction was carried out by direct dilution in the cuvette by adding a fixed volume

(2.5 mL) of a solution of DPPH (absorbance 0.7 at 515 nm). Tests were performed with variable amounts of the extract solutions and infusions and supplementing with methanol to a final volume of 3 mL. For each sample, an analytical curve was developed with the radical scavenging percentage, RS% ($100 \times A_{\text{initial}} - A_{\text{final}}/A_{\text{initial}}$) against extract concentration. A_{initial} is the absorbance of the solution containing only 2.5 mL of DPPH (working solution) and 500 μ L of methanol PA. The final absorbance is the value obtained after 30 min of reaction between DPPH and the antioxidants in the extracts and infusions of *V. minutiflora*. The antiradical capacity of each extract was reported as an IC_{50} , which is the required extract concentration to reduce 50% of the initial absorbance of DPPH solution. For infusions, the antiradical capacity was reported as an IC_{50} value, meaning the infusion concentration (milligrams of vegetal material per solution volume) required to reduce 50% of the initial absorbance of DPPH solution.

Analysis by HPLC-DAD

Extracts and infusions were analyzed by HPLC (Waters 600 Waters Technologies do Brasil Ltda, Barueri, SP, Brazil) with UV diode array detection (Waters 2996) (HPLC-DAD). Chromatography was performed on a Waters XT Terra MS C18 column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) (Waters Technologies do Brasil Ltda, Barueri, SP, Brazil) maintained at 26°C and with pre-column with the same stationary phase. The mobile phase flow rate was 0.8 mL/min and consisted of aqueous formic acid solution at pH 3.2 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The linear gradient was performed according to Bilia *et al.* (2008) and started with 87–85% of solvent A in 10 min and then to 25% in 20 min. This mobile phase composition was held until 26 min and then the percentage of solvent A was gradually decreased to 5% until 28 min and remained unchanged for 2 min. Afterward the initial elution condition was established for subsequent injection. The total chromatographic analysis took 31 min with a 10-min equilibration time. The UV-vis spectra for chromatographic peaks were recorded between 220 and 500 nm, and the chromatograms were monitored at 240, 330 and 350 nm according to previous reports by Bilia *et al.* (2008). Each sample was injected in triplicate.

Qualitative Analysis by ESI-MS and LC-ESI-MS/MS

The samples were analyzed by flow injection using the autosampler of a UHPLC system coupled with a triple quadrupole mass spectrometer equipped with ESI ionization source (Model Acquity, Waters Corp., Manchester, UK), available at the Department of Plant Biology, Institute of

Biology (UNICAMP). The v.4.1 MassLynx (Waters Corp.) software was used for the acquisition and data process. Crude extracts were diluted in methanol to a final concentration of 5 μ g/mL and then filtered through 0.22 μ m PTFE syringe filter. Sample volume of 10 and 3 μ L was directly inserted to obtain ESI-MS fingerprints and LC-ESI-MS/MS runs, respectively. The chromatographic separation of the components was performed using a Waters Acquity BEH C₁₈ (50 $\times$ 2.1 mm i.d., 1.7 μ m) column at 30°C. Water with 0.1% of formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was used as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The initial condition was 95% A and 5% B changing to 100% B in 9 min, holding during 1 min and then returning to the initial condition and stabilizing in 12 min. Nitrogen and argon were used as nebulizer and collision gases, respectively. The electrospray ionization was obtained under the following conditions: capillary $\pm$ 3.5 KV, cone $\pm$ 30 V, desolvation and source temperature was 150 and 350°C, respectively. For LC-ESI-MS/MS of selected ions, the energy for the collision-induced dissociation was 25 eV. Data were acquired in the range m/z 100–800 in negative ion mode.

Statistical Analysis

All data were statistically investigated by analysis of variance (ANOVA) of one and two factors at 95% level of confidence.

RESULTS

Variability of the Content of Total Phenolics, Flavonoids and Antiradical Activity in *V. minutiflora*

The determination of total phenolics, flavonoids and antiradical capacity was performed for extracts of leaves, flowers and stems, separately and for infusions of leaves of *V. minutiflora*, collected in the spring of the years 2009, 2010, 2011 and 2012. Overall a total of 16 samples were analyzed. The content of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in extracts and infusions is shown in Table 1. For extracts, the content of phenolics and flavonoids was expressed as mean values plus their standard deviation in milligrams of organic compounds per grams of dry extract. For infusions, the total amount of phenolics and flavonoids extracted from 10 g of leaves with 200 mL of hot water was reported. Levels of phenolic compounds in extracts varied widely among the aerial parts and throughout the study period. For example, total phenolics in extracts of stems ranged from 49.46 to 104.41 mg/g while for extracts of leaves and flowers they varied from 118.81 to 217.99 mg/g and 73.50 to 202.55 mg/g, respectively. To

<i>V. minutiflora</i>	Collection year	Total phenolics (mg/g)	Flavonoids (mg/g)	IC ₅₀ (DPPH) (mg/L) [†]
Flowers	2009	176.25 ± 2.27 ^f	23.33 ± 0.47 ^a	11.21 ± 0.01 ^{d,e,f}
Leaves	2009	192.39 ± 2.18 ^d	34.47 ± 2.02 ^d	10.31 ± 0.43 ^d
Stems	2009	104.41 ± 1.43 ^a	23.10 ± 0.28 ^a	28.69 ± 1.12 ^a
Flowers	2010	202.55 ± 0.87 ^d	17.18 ± 1.59 ^b	18.75 ± 0.67 ^g
Leaves	2010	217.99 ± 3.58 ^e	20.61 ± 0.59 ^{a,b}	12.23 ± 0.65 ^f
Stems	2010	79.11 ± 0.95 ^b	19.68 ± 1.64 ^{a,b}	26.43 ± 0.33 ^b
Flowers	2011	195.72 ± 18.82 ^d	22.18 ± 1.14 ^a	16.69 ± 0.21 ⁱ
Leaves	2011	207.12 ± 3.30 ^{d,e}	61.04 ± 2.40 ^e	19.75 ± 0.43 ^{a,h}
Stems	2011	74.50 ± 3.01 ^b	23.39 ± 2.37 ^a	27.60 ± 0.06 ^{a,b}
Flowers	2012	73.50 ± 9.24 ^b	11.89 ± 0.04 ^g	20.49 ± 0.62 ^h
Leaves	2012	118.81 ± 9.59 ^a	47.69 ± 2.83 ^f	19.23 ± 0.54 ^g
Stems	2012	49.46 ± 1.39 ^c	28.94 ± 2.87 ^c	45.68 ± 0.24 ^c
Infusion	2009	24.87 ± 0.95 ^a	1.58 ± 0.08 ^a	391.77 ± 27.33 ^a
Infusion	2010	28.08 ± 2.11 ^a	2.96 ± 0.02 ^b	358.45 ± 11.61 ^a
Infusion	2011	25.68 ± 1.45 ^a	2.64 ± 0.00 ^c	415.93 ± 16.79 ^a
Infusion	2012	28.62 ± 0.09 ^a	2.88 ± 0.08 ^b	330.59 ± 13.06 ^b

Different letters within a column mean statistical difference $P < 0.05$ by Fisher's least significant difference and Tukey's honestly significant difference tests.

[†] For extracts IC₅₀ is expressed as milligrams of extracts per volume of solution. For infusions IC₅₀ is expressed as milligrams of vegetal material per volume of solution.

DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

TABLE 1. TOTAL PHENOLICS, FLAVONOIDS AND ANTIRADICAL CAPACITY FOR EXTRACTS AND INFUSIONS OF THE AERIAL PARTS OF *VERBENA MINUTIFLORA* COLLECTED FROM 2009 TO 2012

highlight this variability among chemical constituents and antiradical capacity, a one-way ANOVA was carried out and results were summarized in Table 1.

Additionally, a two-way ANOVA was carried out to further investigate the influence of the factors year of collection and parts of the plant on the phenolic content, flavonoids and antiradical capacity of the extracts. All factors as well as the interaction between them were highly significant ($P < 0.00000$). The part of the plant extracted was the most important factor to influence the average levels of phenolics and flavonoids and the antiradical capacity of extracts. On average, the ethanol extracts of leaves and flowers had significantly higher phenolic content than the ethanol extract of the stems regardless of the year of collection (Fig. 1). Consequently, the leaves and flowers presented the best antiradical capacity.

Regarding *V. minutiflora* infusions, high and constant concentration of phenolic components was observed throughout the study period that resulted in excellent antiradical capacity (Table 1).

Chemical Composition and Analysis of the Annual Chemical Variability of Aerial Parts of *V. minutiflora*

The negative ion mode ESI(-)-MS fingerprints obtained for the extracts of flowers collected throughout the years 2009 to 2012 and the ESI(-)-MS fingerprints of the extracts of all the aerial parts of *V. minutiflora* analyzed in 2010 are shown in Fig. 2 and Fig. 3, respectively. The other fingerprints are available in the supplementary material.

ESI(-)-MS fingerprints for extracts of *V. minutiflora* show that this species has a chemical composition similar to other species of the same genus (Deepak and Handa 2000; Castro-Gamboa and Castro 2004; Bilia *et al.* 2008; Funes *et al.* 2009; Rehecho *et al.* 2011; Schönbichler *et al.* 2013). Ions $[M-H]^-$ m/z 403 and 623 were tentatively assigned to the iridoid hastatoside and the phenylpropanoids verbascoside and/or isoverbascoside based on interpretation of their ESI(-)-MS/MS fragmentation pattern and comparison with data from the literature (Funes *et al.* 2009; Rehecho *et al.* 2011). These compounds were mainly identified in extracts of leaves and flowers regardless of the year of collection and are commonly present in other species of *Verbenas* (Deepak and Handa 2000; Castro-Gamboa and Castro 2004; Bilia *et al.* 2008; Funes *et al.* 2009; Rehecho *et al.* 2011; Schönbichler *et al.* 2013). *V. minutiflora* was always collected in the spring because it is a deciduous plant that loses its leaves during fall and winter leaving only bare branches and stems. As the leaves and flowers of *V. minutiflora* are the richest in bioactive metabolites and these parts are absent in autumn and winter, this study was not undertaken to evaluate seasonal variability of secondary metabolites of *V. minutiflora* (Gobbo-Neto and Lopes 2007).

The constituents of *V. minutiflora* were tentatively identified by HPLC-DAD and ESI(-)-MS/MS by comparing the observed UV spectra (HPLC-DAD; Fig. 4) and MS (ESI(-)-MS/MS; Fig. 5) of peaks observed with data reported in the literature (Bilia *et al.* 2008; Funes *et al.* 2009; Rehecho *et al.* 2011). These researchers monitored the presence of iridoids, phenylpropanoids and flavonoids in *V. officinalis* by HPLC/

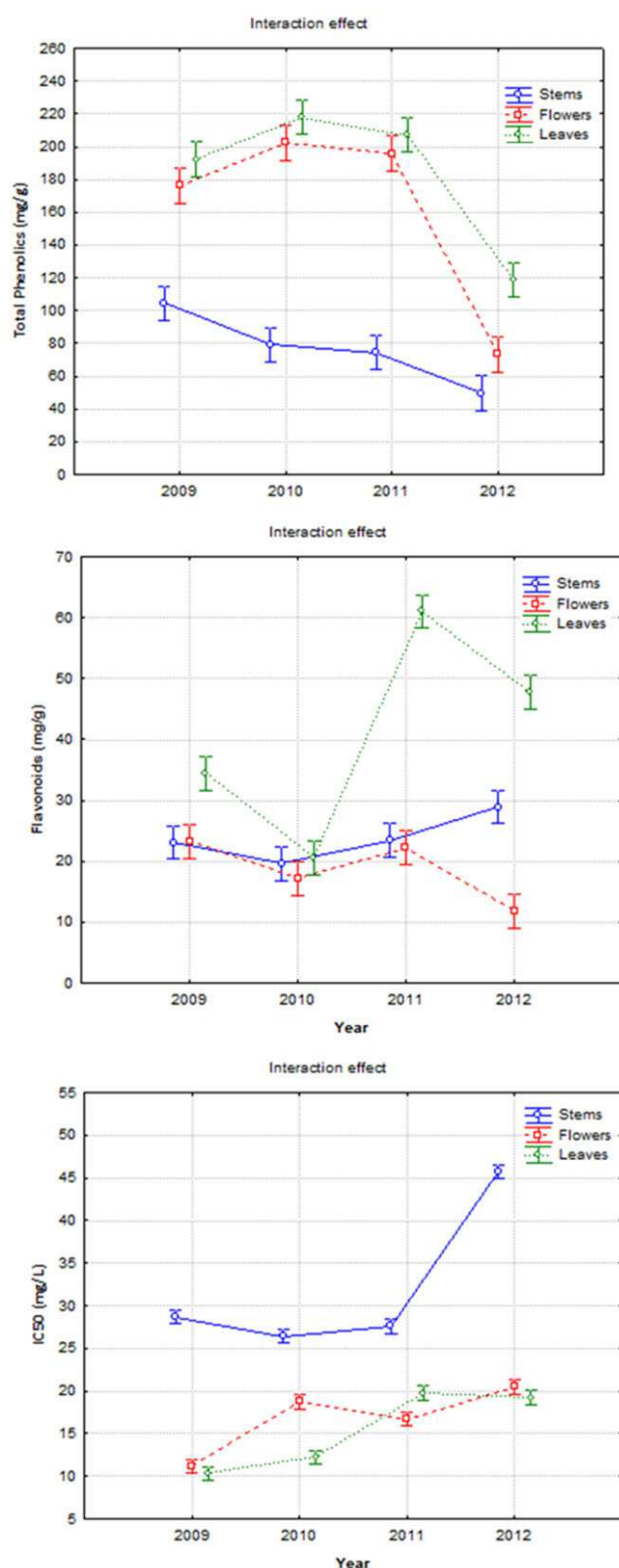


FIG. 1. INTERACTION PLOT FOR FACTORS YEAR OF COLLECTION AND PLANT PART TO THE AVERAGE LEVELS OF PHENOLICS, FLAVONOIDS AND ANTIRADICAL CAPACITY IN *VERBENA MINUTIFLORA*

DAD/ESI/MS at wavelengths of 240, 330 and 350 nm, respectively (Bilia *et al.* 2008; Funes *et al.* 2009; Rehecho *et al.* 2011).

Figure 4 shows the chromatograms obtained by HPLC/DAD for the ethanol extract of the leaves 2010 of *V. minutiflora*. The chromatograms for infusions are shown in the supplementary material. The peak at 10 min in the chromatogram detected at 240 nm was assigned to the iridoid hastatoside. Likewise, the chromatograms monitored at 330 nm have a peak at 21 min, which is indicative of the phenylpropanoid verbascoside or isoverbascoside or another isomer previously reported for *Verbena* (Bilia *et al.* 2008).

To tentatively identify the main chemical components of *V. minutiflora*, ESI-MS/MS analysis was carried out with electrospray ionization in the negative ion mode. By inspection of the fragmentation pattern and comparison with data from the literature (Bilia *et al.* 2008), the presence of iridoid hastatoside was attributed to the ion $[M-H]^-$ of m/z 403 (Fig. 5A) and the isomers verbascoside and isoverbascoside to the ion $[M-H]^-$ of m/z 623 (Fig. 5B).

The base peak in the spectrum of hastatoside is at m/z 195, caused by the loss of 208 Da, consistent with the loss of a glycoside unit (179 Da) and 28 Da for the loss of a neutral molecule CO $[M-2H-179-CO]^-$. Other fragment ions are observed at m/z 358 corresponding to a loss of 46 Da, which can be explained as $[M-OCH_3-CH_3]^-$, and at m/z 237 $[M-H-163-3H]^-$.

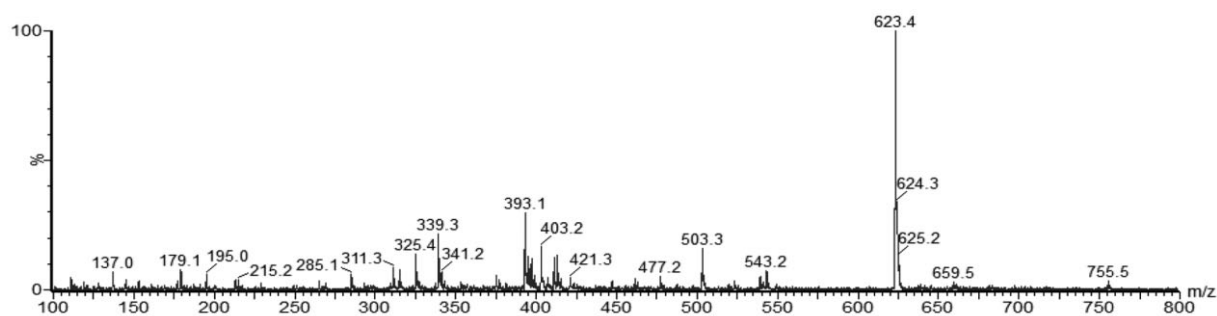
The presence of various derivatives of the phenylpropanoid verbascoside is inferred by the occurrence of several ions $[M-H]^-$ at m/z 623 with different retention times and with identical fragmentation pattern (Figs. S4 and S5 at supplementary material). Verbascoide is slightly more polar than isoverbascoside and has a lower retention time on reverse-phase chromatography than its isomer (Bilia *et al.* 2008).

The ESI-MS/MS spectrum of verbascoside showed its deprotonated ion at m/z 623. Fragment ion at m/z 461 is formed by the loss of 162 Da from the deprotonated molecular ion $[M-H-162]^-$ or either by the loss of 163 Da directly from the molecular ion. This fragmentation might involve the loss of the caffeoyl unit or the rhamnose unit. A similar fragmentation pathway might produce the ion at m/z 161 by the loss of 462 Da from the deprotonated molecular ion $[M-H-462]^-$.

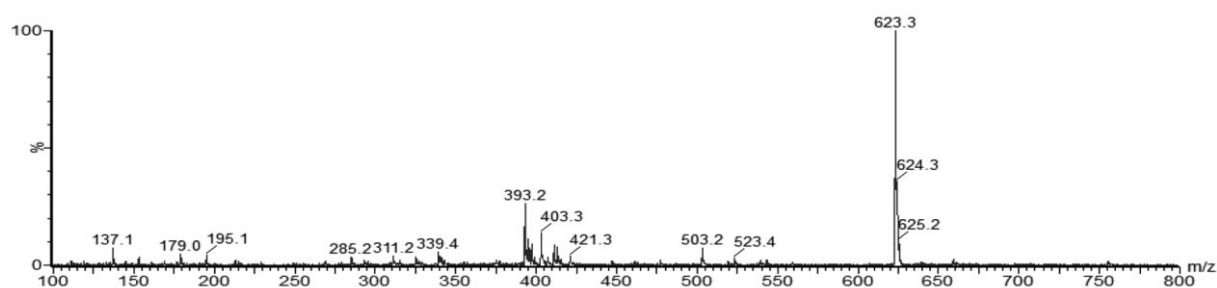
DISCUSSION

Phenolic compounds have been extensively studied because of their many health benefits as antioxidants and for the prevention of chronic inflammatory diseases, cardiovascular

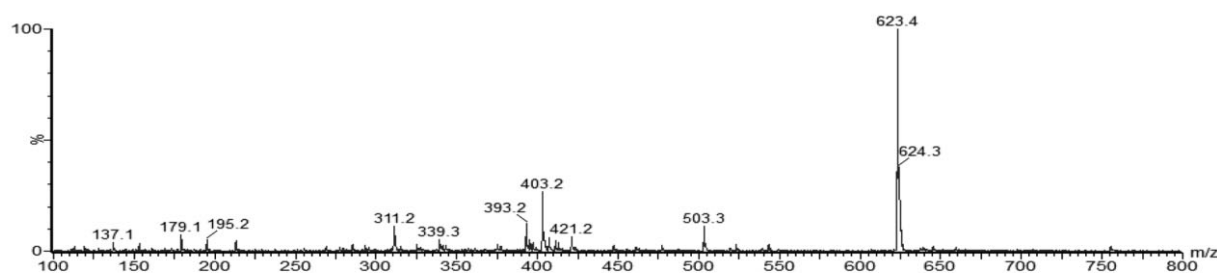
Flowers 2009



Flowers 2010



Flowers 2011



Flowers 2012

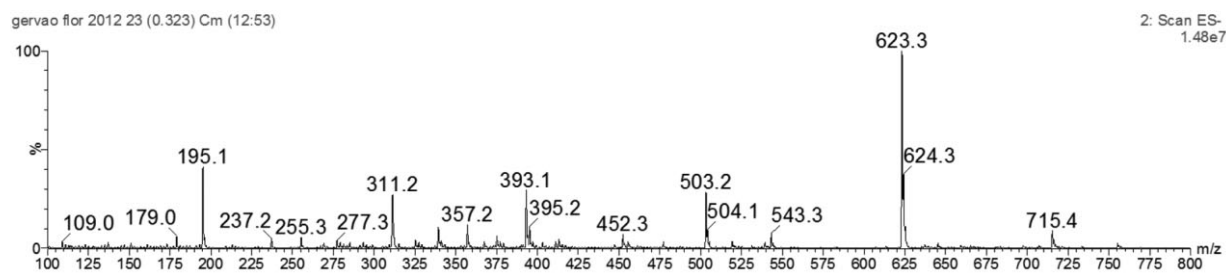


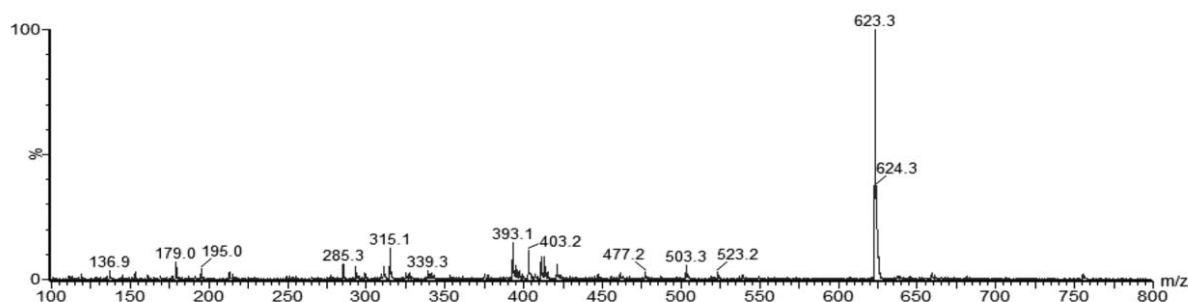
FIG. 2. ESI(-)-MS OF THE ETHANOL EXTRACTS OF FLOWERS OF *VERBENA MINUTIFLORA* COLLECTED FROM 2009 TO 2012

diseases, cancer and diabetes (Atoui *et al.* 2005; Acosta-Estrada *et al.* 2014).

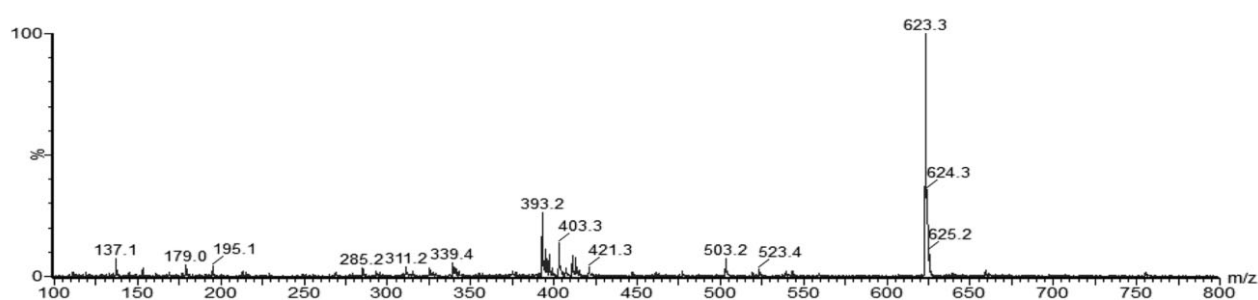
The chemical analysis of infusions of *V. minutiflora* showed a similar concentration of bioactive components

regardless of the year of extraction. It is worth noting that infusions showed antiradical scavenging activity and then the potential to have antioxidant activity *in vivo*. The results show that the infusion of roughly 0.4 g of leaves of

Leaves 2010



Flowers 2010



Stems 2010

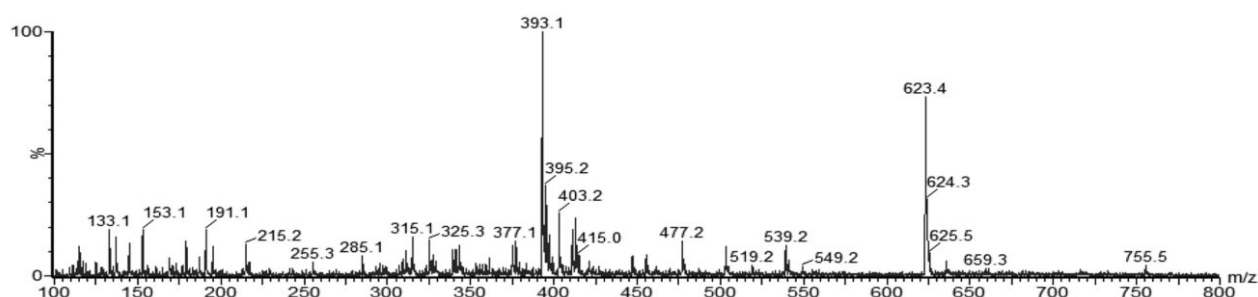


FIG. 3. ESI(-)-MS OF THE ETHANOL EXTRACTS OF THE LEAVES, FLOWERS AND STEMS OF *VERBENA MINUTIFLORA* COLLECTED IN 2010

V. minutiflora might present antioxidant potential. Therefore, the popular intake of *V. minutiflora* as infusions is justified as a source of antioxidants (Table 1). Teas and infusions are some of the most widely consumed beverages due to their refreshing and mildly stimulating effects and also play an important role in supplying a number of nutritional elements to the human diet (Malik *et al.* 2008). Drinking tea is associated with reduced cholesterol, the prevention of oxidation of low-density lipoproteins and decreased risk of cardiovascular disease and its regular consumption can contribute to the daily nutritional needs and is also considered an important source of antioxidant (Almajano *et al.* 2008; Malik *et al.* 2008; Karak and Bhagat 2010; Sang *et al.* 2011).

Other medicinal plants of the genus *Verbena* have demonstrated high antiradical capacity such as *V. officinalis* L. with $IC_{50} = 21.04 \pm 1.61 \mu\text{g/mL}$ and $IC_{50} = 33.8 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$ for the hydroalcoholic and aqueous extracts of aerial parts (Rehecho *et al.* 2011).

The chemical profiles of the extracts of leaves and flowers were similar but had qualitative differences when compared with stem extracts. In general, the ESI(-)-MS fingerprints showed that there was no substantial change on the qualitative composition of the extracts during the 4 years of study (Fig. 2), indicating that the metabolism of the plant was not significantly altered by specific weather variation. As known, the secondary metabolites in plant occur at different concentrations and might be affected by changes in environ-

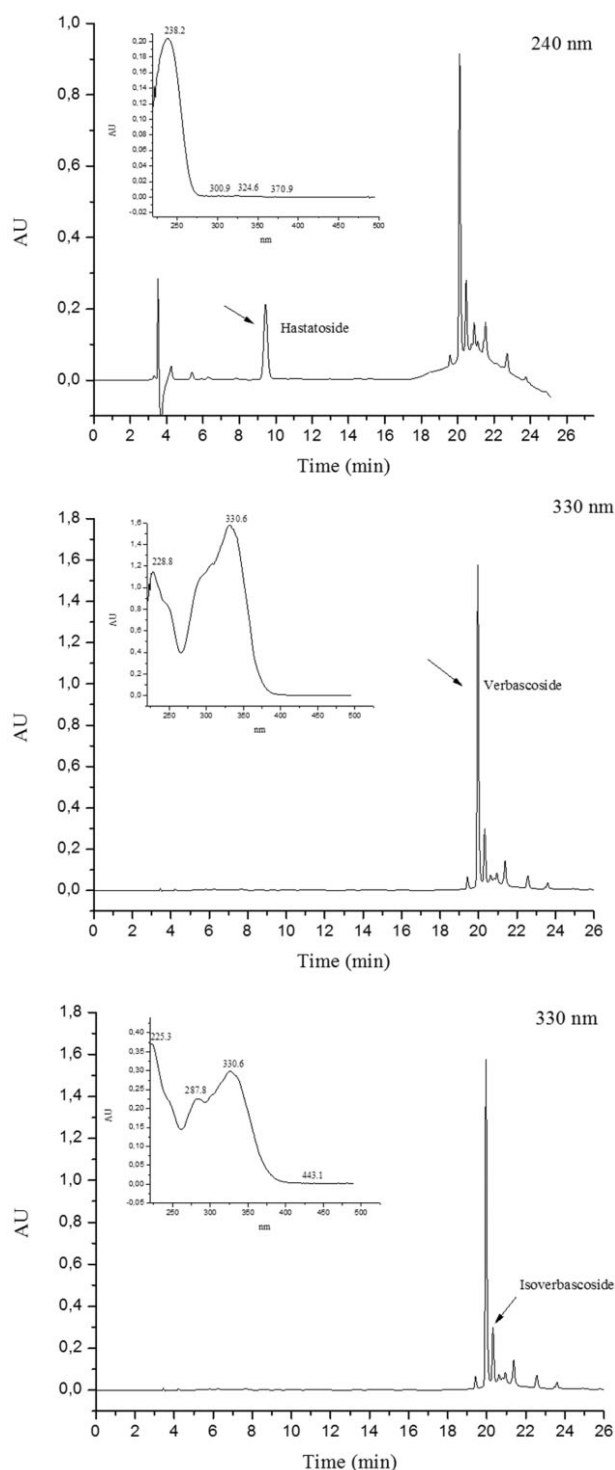


FIG. 4. CHROMATOGRAMS MONITORED AT 240 AND 330 NM OF THE ETHANOL EXTRACT OF LEAVES OF *VERBENA MINUTIFLORA* COLLECTED IN 2010: UV-DAD SPECTRA FOR IDENTIFIED COMPOUNDS

mental conditions, such as seasonality, rainfall, temperature, altitude, nutrient availability and atmospheric pollution. A study is currently in progress in our research group to assess if there was a statistically significant annual variation in the amounts of the main metabolites of *V. minutiflora*. However, it is important to note that the antiradical capacity kept the same trend throughout the years of the study and extracts of leaves and flowers had higher antiradical capacity than extracts of stems (Fig. 1), regardless of the year of collection.

The period of plant collection is known as one of the most important factors to affect metabolite composition and seasonal variations of the content of almost all classes of secondary metabolites such as phenolic acids, flavonoids and iridoids, among others, have been reported. Plants generally have higher levels of their secondary metabolites in the spring and tend to decrease in autumn (Gobbo-Neto and Lopes 2007).

In this study, the main metabolites of *V. minutiflora*, hastatoside, verbascoside and isoverbascoside were tentatively identified through their fragmentation pattern by ESI(-)-MS/MS. These compounds have been isolated and identified by some authors for different species of the genus *Verbena* (Deepak and Handa 2000; Castro-Gamboa and Castro 2004; Bilia *et al.* 2008; Rehecho *et al.* 2011; Schönbichler *et al.* 2013). Yet it is the first time that these compounds are reported for the species *V. minutiflora*. Several biological activities are known for the phenylpropanoid verbascoside as anti-inflammatory, gastroprotective, antimicrobial, antitumor and antioxidant activities. This compound and others structurally related may be the chemical compounds responsible for the potent antioxidant activity of *Verbena* extracts and infusions

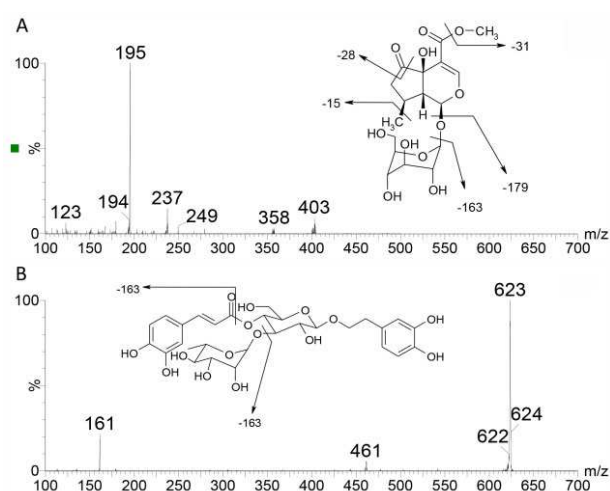


FIG. 5. ESI(-)-MS/MS SPECTRA AND POSSIBLE FRAGMENTATION PATHWAYS FOR (A) HASTATOSIDE AND (B) VERBASCOSIDE

(Funes *et al.* 2010; Singh *et al.* 2010). Furthermore, Funes *et al.* (2009) carried out acute oral toxicity assessment in mice to evaluate the effect of oral intake of lemon verbena (*Lippia citriodora*), a plant belonging to the Verbenaceae family that shows high levels of verbascoside. The authors tested an extract containing a high content of verbascoside to establish the approximate oral LD₅₀ in mice. No sign of toxicity at a concentration as high as 2,000 mg/kg was observed.

To conclude, this is the first report about the chemical composition of *V. minutiflora*. LC-ESI(-)-MS/MS analysis allowed to suggest the presence of hastatoside, verbascoside and isoverbascoside in extracts and infusions of *V. minutiflora*. These metabolites have been identified for other plants of the genus *Verbena*. The analysis of the annual variability of the chemical composition of the aerial parts of *V. minutiflora* showed that there was no significant change in the profile of secondary metabolites, but quantitative differences were found in the content of phenolic compounds and consequently in the power of the antiradical capacity. Overall, the ethanol extracts of leaves and flowers had significantly higher levels of phenolic compounds than the ethanolic extract of the stems, independently of the year of collection. The results support the popular use of the herbal infusion or phytochemical formulations of *V. minutiflora* as all extracts showed high concentration of phenolic compounds and therefore potential antiradical capacity, especially for extracts of leaves and flowers. The infusion of *V. minutiflora* is a good source of phenolic compounds and showed high antiradical capacity that might be due to verbascoside and its isomers but also to the presence of iridoids. This result reinforces the popular use of *V. minutiflora* as infusions.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank CAPES for scholarships and FINEP, SETI and CNPq for financial support. The authors also acknowledge P. Mazzafera (UNICAMP) for use of the UHPLC-MS equipment.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that they have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- ACOSTA-ESTRADA, B.A., GUTIÉRREZ-URIBE, J.A. and SERNA-SALDÍVAR, S.O. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* 152, 46–55.
- ALMAJANO, M.P., CARBÓ, R., JIMÉNEZ, J.A.L. and GORDON, M.H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108, 55–63.
- ATOUI, A.K., MANSOURI, A., BOSKOU, G. and KEFALAS, P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 89, 27–36.
- BILIA, A.R., GIOMI, M., INNOCENTI, M., GALLORI, S. and VINCIGI, F.F. 2008. HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 463–470.
- BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. and SARAN, M. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343–355.
- BURIOL, L., FINGER, D., SCHMIDT, E.M., SANTOS, J.M.T., ROSA, M.R., QUINÁIA, S.P. and TORRES, Y.R. 2009. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quím. Nova.* 32, 296–302.
- CALVO, M.I. 2006. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* 107, 380–382.
- CALVO, M.I., VILALTA, N., SAN JULIÁN, A. and FERNÁNDEZ, M. 1998. Anti-inflammatory activity of leaf extract of *Verbena officinalis* L. *Phytomedicine* 5, 465–467.
- CASANOVA, E., GARCÍA-MINA, J.M. and CALVO, M.I. 2008. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63, 93–97.
- CASTRO-GAMBOA, I. and CASTRO, O. 2004. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochemistry* 65, 2369–2372.
- DEEPAK, M. and HANDA, S.S. 2000. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother. Res.* 14, 463–465.
- EL-HELA, A.A., AL-AMIER, H.A. and IBRAHIM, T.A. 2010. Comparative study of the flavonoids of some *Verbena* species cultivated in Egypt by using high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 6388–6393.
- FUNES, L., FERNANDEZ-ARROYO, S., LAPORTA, O., PONS, A., ROCHE, E., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. and MICOL, V. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chem.* 117, 589–598.
- FUNES, L., LAPORTA, O., CERDAN-CALERO, M. and MICOL, V. 2010. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 163, 190–199.
- GOBBO-NETO, L. and LOPES, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova.* 30, 374–381.
- HERNÁNDEZ, N.E., TERESCHUK, M.L. and ABDALA, L.R. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants

- from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). *J. Ethnopharmacol.* 73, 317–322.
- KARAK, T. and BHAGAT, R.M. 2010. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Res. Int.* 43, 2234–2252.
- LORENZI, H. and ABREU MATOS, F.J. 2002. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*, 1ª Ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, São Paulo.
- MALIK, J., SZAKOVA, J., DRABEK, O., BALIK, J. and KOKOSKA, L. 2008. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. *Food Chem.* 111, 520–525.
- PANIZZA, S. 2002. *Plantas que curam: cheiro de mato*, 25th Ed., IBRASA, São Paulo.
- REHECHO, S., HIDALGO, O., GARCÍA-IÑIGUEZ DE CIRANO, M., NAVARRO, I., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D., CAVERO, R.Y. and CALVO, M.I. 2011. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 875–882.
- RUFINO, M.S.M., FERNANDES, F.A.N., ALVES, R.E. and DE BRITO, E.S. 2009. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chem.* 114, 693–695.
- SANG, S., LAMBERT, J.D., HO, C.T. and YANG, C.S. 2011. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* 64, 87–99.
- SCHMIDT, E.M., STOCK, D., CHADA, F.J.G., FINGER, D., SAWAYA, A.C.H.F., EBERLIN, M.N., FELSNER, M.L., QUINÁIA, S.P., MONTEIRO, M.C. and TORRES, Y.R. 2014. A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–10.
- SCHÖNBICHLER, S.A., BITTNER, L.K.H., PALLUA, J.D., POPP, M., ABEL, G., BONN, G.K. and HUCK, C.W. 2013. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 84, 97–102.
- SHENG, G.Q., ZHANG, J.R., PU, X.P., MA, J. and LI, C.L. 2002. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 451, 119–124.
- SINGH, B., SAXENA, A., CHANDAN, B.K., ANAND, K.K., SURI, O.P., SURI, K.A. and SATTI, N.K. 1998. Hepatoprotective activity of verbenalin on experimental liver damage in rodents. *Fitoterapia* 69, 135–140.
- SINGH, N., SHUKLA, N., SINGH, P., SHARMA, R., RAJENDRAN, S.M., MAURYA, R. and PALIT, G. 2010. Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. *Fitoterapia* 81, 755–761.
- SOUZA, T.J.T., MANFRON, M.P., ZANETTI, G.D., HOELZEL, S.C.S.M. and PAGLIARIN, V.P. 2005. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. *Acta Farm. Bonaerense* 24, 209–214.
- SPERONI, E., CERVELLATI, R., COSTA, S., GUERRA, M.C., UTAN, A., GOVONI, P., BERGER, A., MULLER, A. and STUPPNER, H. 2007. Effects of differential extraction of *Verbena officinalis* on rat models of inflammation, cicatrization and gastric damage. *Planta Med.* 73, 227–235.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

- Fig. S1. ESI(-)-MS of the Ethanol Extracts of Leaves of *Verbena minutiflora* Collected from 2009 to 2012
- Fig. S2. ESI(-)-MS of the Ethanol Extracts of Stems of *Verbena minutiflora* Collected from 2009 to 2012
- Fig. S3. Chromatograms Monitored at 240 and 330 nm for Infusions of Leaves of *Verbena minutiflora* Collected in 2010: UV-DAD Spectra for Identified Compounds
- Fig. S4. ESI(-)-MS/MS for Verbascoside and Structurally Related Compounds at 3.4, 3.2, 3.0 and 2.8 min in the Ethanol Extracts of Flowers 2010 of *Verbena minutiflora*
- Fig. S5. ESI(-)-MS/MS for Verbascoside and Structurally Related Compounds at 3.2, 3.0 and 2.8 min in the Ethanol Extracts of Leaves 2010 of *Verbena minutiflora*

***Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of aerial parts of
Verbena minutiflora: in house validation of an HPLC-DAD method***

Kelly Cristina Nogueira Soares^a, Karlos Eduardo Pianoski^a, Daiane Finger^a, Sueli
Pércio Quináia^a and Yohandra Reyes Torres^{a*}

^a*Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO,
Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03. Vila Carli – Guarapuava – Paraná – Brazil.
85040-080.*

*Corresponding authors. Tel.: +055-42-36298325

E-mail address: ryohandra@yahoo.com (Y. R. Torres)

Abstract

Herein we report for the first time the levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of *V. minutiflora*, consumed in Brazil to treat urinary and infectious disorders. An *in house* validation study demonstrated good accuracy and precision to determine the bioactive compounds in *V. minutiflora* by HPLC-DAD. Phenylpropanoids varied in extracts (leaves 139.70 to 221.20 mg g⁻¹, flowers 106.43 to 227.22 mg g⁻¹, stems 42.18 to 56.48 mg g⁻¹). Verbascoside was in higher concentration in extracts of leaves (87.66 – 136.16) mg g⁻¹ and flowers (58.12 – 148.96) mg g⁻¹ than in stems (19.24 – 24.62) mg g⁻¹. Iridoids in extracts were: leaves (46.60 – 54.79) mg g⁻¹, flowers (55.88 – 93.87) mg g⁻¹ and stems (40.05 to 61.74) mg g⁻¹. High levels of iridoids (314.70 – 415.10) µg ml⁻¹, phenylpropanoids (1996.39 – 2674.13) µg ml⁻¹ and verbascoside (1029.38 – 1456.42 µg ml⁻¹) in infusions support the popular consume of *V. minutiflora*.

Keywords: Medicinal plants; Verbenaceae; Gervão; analytical validation; HPLC-DAD; Verbascoside, Iridoids, hastatoside

List of chemical compounds studied in this article:

Verbascoside (PubChem CID: 5281800); isoverbascoside (PubChem CID: 6476333);
Hastatoside (PubChem CID: 599030); Geniposide (PubChem CID: 16760120)

Running head: *Levels of phenylpropanoids and iridoids in Verbena minutiflora*

Your recent submission to FOODRES

Food Research International <ees.foodres.0.3624f5.1f81424f@eesmail.elsevier.com>

Para kellcristinas@yahoo.com.br

Dear Dr. Kelly Cristina Soares,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food Research International

Corresponding Author: Yohandra Torres

Co-Authors: Kelly Cristina N Soares, MSc; Karlos Eduardo Pianoski; Daiane Finger, PhD; Sueli P Quináia, PhD;

Title: Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of aerial parts of *Verbena minutiflora*: in house validation of an HPLC-DAD method.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at ryohandra@yahoo.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/foodres/l.asp?i=108013&l=ARMVMIDR>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Food Research International

