

**INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA E HEMODINÂMICA DE
PLANTAS MEDICINAIS ANTI-HIPERTENSIVAS**

AMARO CHAVES RAMOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL/2019

INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA E HEMODINÂMICA DE PLANTAS MEDICINAIS ANTI-HIPERTENSIVAS

AMARO CHAVES RAMOS

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais, na área de Bio-orgânica e Bio-inorgânica.”

Orientador: Prof. D.Sc. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

R175

Ramos, Amaro Chaves.

Investigação metabólica e hemodinâmica de plantas medicinais anti-hipertensivas / Amaro Chaves Ramos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

246 f. : il.

Bibliografia: 225 - 242.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2019.

Orientador: Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

1. Metabólica. 2. Hemodinâmica. 3. Plantas medicinais. 4. Hipertensão. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 500

INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA E HEMODINÂMICA DE PLANTAS MEDICINAIS ANTI-HIPERTENSIVAS

AMARO CHAVES RAMOS

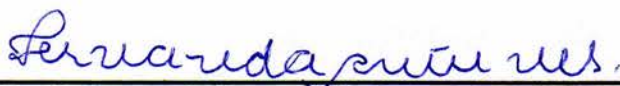
“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais, na área de Bio-orgânica e Bio-inorgânica.”

Aprovado em: 11 / 04 / 2019

Comissão examinadora:



Prof^a. Daniela Barros de Oliveira (D.Sc.) – UENF/CCTA



Prof^a. Fernanda Antunes (D.Sc.) – UENF/CCTA



Prof. Shaft Corrêa Pinto (D.Sc.) – UFRJ Macaé



Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D.Sc.) UENF/CCT. Professor Orientador

“A oportunidade favorece a mente preparada.”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado diferentes sentimentos ao longo desse trabalho. Agradeço pelas alegrias, pelos momentos de descontração, pelas novas amizades, mas também pelas adversidades e dúvidas que foram momentos que permitiram maior crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Celma e José Amario, que sempre me transmitiram a importância e o poder transformador do estudo. A minha irmã, Carolina, pelos conhecimentos compartilhados e também pelo amor e incentivo.

À Marianna, por todo amor, carinho e compreensão ao longo desses anos. Por entender que os momentos que eu estive ausente foram para elaboração desse trabalho. Agradeço também pelas informações trocadas, dicas, sugestões e ajudas.

Aos meus amigos mais antigos por sempre me incentivarem, apoiarem e entenderem minha ausência quando foi necessário.

Aos amigos do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI), local onde passei quase 10 anos e tive a oportunidade de conviver com diversas pessoas que sempre me incentivaram, ajudaram e trouxeram novos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal (LCCA) pelo companheirismo, auxílio e por todos os momentos de alegria proporcionados.

A prof^ª. Fernanda por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, por ter aceitado participar desse estudo e por todo o auxílio e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Rodrigo, pela amizade e companheirismo. Por ter acreditado que podíamos seguir outros rumos com essa pesquisa, o que muito agregou na minha formação. Agradeço também por sua orientação, preocupação e carinho.

A CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

RAMOS, Amaro Chaves; D.Sc.; Investigação metabólica e hemodinâmica de plantas medicinais anti-hipertensivas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril, 2019, Campos dos Goytacazes - RJ. Prof. Orientador: Rodrigo Rodrigues de Oliveira

A hipertensão arterial é uma doença que acomete grande parcela da população e é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Embora exista um grande arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessa doença, uma grande parcela dos hipertensos não possui sua pressão arterial controlada devido às dificuldades de acesso ao atendimento primário à saúde e os elevados custos das terapias modernas, o que tem levado a busca por formas alternativas de medicina, como as plantas medicinais. Desta forma, o presente trabalho visou investigação metabólica e hemodinâmica de seis espécies vegetais utilizadas popularmente no tratamento da hipertensão arterial, sendo elas: erva-cidreira (*Lippia alba*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), gervão-roxo (*Stachytarpheta cayennensis*), gurdumão (*Alpinia zerumbet*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis*). Para cada espécie foram obtidos os extratos clorofórmicos e metanólicos. O ensaio hemodinâmico dos extratos metanólico foi realizado em ratos normotensos na concentração de $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Esses mesmo extratos foram submetidos às análises por RMN e CLAE-EM a fim de determinar seus componentes e, em alguns casos, foi feita a quantificação das substâncias majoritárias por qRMN. Também foi verificado o perfil químico dos extratos obtidos pela extração com solventes deuterados por RMN. A investigação hemodinâmica revelou que cinco dos seis extratos metanólicos apresentaram efeitos significativos sobre dois ou mais parâmetros avaliados (pressões sistólica, média, diastólica e frequência cardíaca). A investigação dos extratos por RMN revelou a presença de constituintes como kavalactonas, flavonoides, derivados cinâmicos, feniletanoides e iridoides, sendo que alguns desses puderam ser quantificados. A análise dos extratos metanólicos por CLAE-EM possibilitou a identificação de 333 metabólitos que compreendem substâncias do metabolismo primário e secundário, sendo muitos desses descritos pela primeira vez na espécie. Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram a utilização popular de cinco das seis espécies vegetais investigadas e permitiram inferir os princípios ativos de alguns extratos. Desta forma, a análise metabólica se mostrou adequada, uma vez que diversos constituintes ativos dos extratos puderam ser identificados utilizando-se pequenas quantidades de material vegetal.

Palavras-chave: metabólica; hemodinâmica; plantas medicinais; hipertensão; RMN; CLAE-EM.

ABSTRACT

RAMOS, Amaro Chaves; D.Sc.; Metabolomic and hemodynamic investigation of anti-hypertensive medicinal plants. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, April, 2019, Campos dos Goytacazes - RJ. Supervisor: Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

Hypertension is a chronic disease which occurs in a great portion of world's population being one of the main risk factors for cardiovascular diseases. Although several pharmacological therapies are available to treat this disease, many hypertensive patients do not have their blood pressure controlled. Difficulties on the access to primary health care and the costly modern therapies contribute on crescent interest on alternative treatments which includes the medicinal plants. Thus, the present work aimed the metabolomic and hemodynamic investigation of six medicinal plants popularly used to treat high blood pressure. The selected species comprises: erva-cidreira (*Lippia alba*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), gervão-roxo (*Stachytarpheta cayennensis*), gurdumão (*Alpinia zerumbet*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) and sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis*). Each plant material was extracted with chloroform and subsequently extract with methanol. The hemodynamic investigations were conducted on normotensive male rats which received 30mg·kg⁻¹ by intravenous administration. The extracts were also submitted to NMR and HPLC-MS experiments in order to determine their chemical composition. Also, the quantification of some major components of selected extracts was performed by qNMR. We had also verified the metabolic fingerprint of the plant material extracted with deuterated solvents. The hemodynamic assays showed that five extracts possess significant effects at least on two of the evaluated parameters (systolic, mean, diastolic pressures and heart rate). NMR investigation of the extracts revealed the presence of several metabolites such as kavalactones, flavonoids, cinnamic derivatives, phenylethanoids and iridoids. Chromatographic investigation of the extracts by HPLC-MS allowed the identification of 333 substances which comprises primary and secondary metabolites. Many of the identified substances are being described for the first time in the species. The popular utilization of five of the six plants evaluated in this work was corroborated by the results of hemodynamic investigations. Also, the metabolic investigation allowed us to suggest the active components of the extract which may account for most of the hypotensive effects observed. Finally, the metabolomic investigation of the extracts by NMR and HPLC-MS was an efficient choice, once several active constituents of the extracts were identified by using small amounts of plant material.

Keywords: metabolomic; hemodynamic; medicinal plants; hypertension; NMR; LC-MS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Hipertensão arterial.....	19
2.2. Metabolômica	26
2.3. <i>Alpinia zerumbet</i> (Zingiberaceae).....	31
2.4. <i>Cuphea carthagenensis</i> (Lythraceae)	34
2.5. <i>Foeniculum vulgare</i> (Apiaceae)	37
2.6. <i>Lippia alba</i> e <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Verbenaceae).....	40
2.7. <i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)	45
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos específicos	48
4. METODOLOGIA	49
4.1. Análise metabolômica	49
4.1.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	49
4.1.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	51
4.1.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DA SETE-SANGRIAS (ACM) ..	52
4.1.4. ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	52
4.1.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS METANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-ESI-EM-TOF).....	54
4.2. Avaliação das atividades biológicas dos extratos	55
4.2.1. ANÁLISE HEMODINÂMICA EM RATOS	55
4.2.2. ANÁLISE DA CAPACIDADE MOTORA DE CAMUNDONGOS	56
4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. <i>Alpinia zerumbet</i> (Gurdumão).....	60
5.1.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN	60
5.1.1.1. Extratos em clorofórmio (AAC e AAC-R)	60
5.1.1.2. Extratos em metanol (AAM e AAM-R)	67
5.1.2. INVESTIGAÇÃO DE AAM POR CLAE-EM.....	74
5.1.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AAM	88
5.1.4. INVESTIGAÇÃO DE AAM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA	91
5.2. <i>Cuphea carthagenensis</i> (Sete-sangrias).....	92
5.2.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN	92
5.2.1.1. Extratos em clorofórmio (ACC e ACC-R).....	92
5.2.1.2. Extratos em metanol (ACM e ACM-R) e frações (ACM1 e ACM2).....	93
5.2.2. INVESTIGAÇÃO DE ACM POR CLAE-EM	100

5.2.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE ACM.....	110
5.2.4. INVESTIGAÇÃO DE ACM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA.....	113
5.3. <i>Foeniculum vulgare</i> (Erva-doce)	114
5.3.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN.....	114
5.3.1.1. Extrato em clorofórmio (AFC).....	114
5.3.1.2. Extrato em metanol (AFM).....	115
5.3.2. INVESTIGAÇÃO DE AFM POR CLAE-EM.....	118
5.3.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AFM.....	128
5.3.4. INVESTIGAÇÃO DE AFM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA.....	130
5.4. <i>Ocimum basilicum</i> (Manjeriço)	131
5.4.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN.....	131
5.4.1.1. Extratos em clorofórmio (AOC e AOC-R).....	131
5.4.1.2. Extratos em metanol (AOM e AOM-R).....	133
5.4.1.3. Quantificação de ácido rosmarínico em AOM.....	137
5.4.2. INVESTIGAÇÃO DE AOM POR CLAE-EM.....	139
5.4.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AOM.....	151
5.4.4. INVESTIGAÇÃO DE AOM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA.....	153
5.5. <i>Lippia alba</i> (Erva-cidreira)	154
5.5.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN.....	154
5.5.1.1. Extratos em clorofórmio (FLC e FLC-R).....	154
5.5.1.2. Extratos em metanol (FLM e FLM-R).....	155
5.5.1.3. Quantificação de acteosideo em FLM.....	165
5.5.2. INVESTIGAÇÃO DE FLM POR CLAE-EM.....	167
5.5.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE FLM.....	182
5.5.4. INVESTIGAÇÃO DE FLM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA.....	184
5.6. <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Gervão-roxo).....	185
5.6.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN.....	185
5.6.1.1. Extratos em clorofórmio (FSC e FSC-R).....	185
5.6.1.2. Extratos em metanol (FSM e FSM-R).....	187
5.6.1.3. Quantificação de acteosideo e ipolamiida em FSM.....	197
5.6.2. INVESTIGAÇÃO DE FSM POR CLAE-EM.....	200
5.6.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE FSM.....	217
5.6.4. INVESTIGAÇÃO DE FSM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA.....	220
6. CONCLUSÃO	222
REFERÊNCIAS.....	225
APÊNDICE 1	243

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência da hipertensão pelo mundo. Adaptado de Kearney et al., 2005.....	21
Figura 2: Exemplo de substâncias que demonstram a complexidade e variabilidade de esqueletos químicos sintetizados por plantas: (1) – vimblastina; (2) – ginkgolideo A; (3) – hipericina; (4) – calixina A; (5) – estriquinina; (6) – taxol.....	26
Figura 3: Perfis metabólicos obtidos por RMN ¹ H de diferentes extratos de <i>Alpinia zerumbet</i> extraídos com água deuterada (D ₂ O - azul), clorofórmio deuterado (CDCl ₃ - verde), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d ₆ - vermelho) e metanol deuterado (CH ₃ OD - rosa).....	28
Figura 4: A) Rizomas de <i>A. galanga</i> ; B) comida típica japonesa que utiliza folhas de <i>A. zerumbet</i> para embrulhar os bolinhos; C) inflorescências de <i>A. purpurata</i> ; D) inflorescência de <i>A. zerumbet</i> . Fonte: Google imagens.	31
Figura 5: Exemplos de substâncias encontradas em <i>A. zerumbet</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: kavalactonas (7-8) , flavonoides (9) e diterpenos (10-12) . (7) – 7,8-dihidro-5,6-desidro-kavaína; (8) – 5,6-desidro-kavaína; (9) – kaempferol-3-O-glicuronídeo; (10) – labdadieno; (11) – zerumina A; (12) – zerumina B.	33
Figura 6: Exemplares do gênero <i>Cuphea</i> . A) <i>C. ignea</i> (ornamental); B) <i>C. llavea</i> (ornamental); C) <i>C. speciosa</i> (medicinal); D) <i>C. calophylla</i> (medicinal). Fonte: Google Imagens.	34
Figura 7: Exemplos de substâncias encontradas em <i>C. carthagenensis</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: flavonóis (13, 15 e 18) , terpenoides (14 e 16) e polifenóis (17) . (13) – quercetina-3-O-sulfato; (14) – ácido ursólico; (15) – quercetina-5-glicosídeo; (16) – carthagenol; (17) – tri-galoil-glicose; (18) – miricetina-3-glicosídeo.	36
Figura 8: Exemplares da família Apiaceae. A) <i>Angelica archangelica</i> ; B) <i>Apium graveolens</i> ; C) <i>Cuminum cyminum</i> ; D) <i>Coriandrum sativum</i> ; E) <i>Pimpinella anisum</i> . Fonte: Google Imagens...	37
Figura 9: Exemplos de substâncias encontradas em <i>F. vulgare</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: monoterpênos (19 e 20) , flavonoides (21 e 22) , polifenóis (23) , estilbenoides (24) e poliacetilenos (25) . (19) – fenchona; (20) – <i>trans</i> -anetol; (21) – astragalina; (22) – eriocitrina; (23) – ácido clorogênico; (24) – miyabenol C; (25) – falcarinol.	39
Figura 10: Exemplares do gênero <i>Lippia</i> . A) <i>L. alba</i> (erva-cidreira); B) <i>L. gracilis</i> (Alecrim-da-chapada); C) <i>L. organoides</i> (Alecrim-da-Angola). Fonte: Google Imagens.	40
Figura 11: Exemplos de substâncias encontradas em <i>L. alba</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: feniletanoides (26) , fenilpropanoides (27) , flavonoides (28 e 29) e iridoídes (30) . (26) – acteosídeo; (27) – cistanosídeo F; (28) – apigenina-7-diglicuronídeo; (29) – luteolina-7-glicosídeo; (30) – geniposídeo.	42
Figura 12: Exemplares do gênero <i>Stachytarpheta</i> . A) <i>S. cayennensis</i> (gervão-roxo); B) <i>S. elatior</i> (gervão); C) <i>S. jamaicensis</i> (chá-do-Brasil). Fonte: Google Imagens.	42
Figura 13: Exemplo de substâncias encontradas em <i>S. cayennensis</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: iridoídes (31 e 32) , terpenoides (33) e feniletanoides (34 e 35) . (31) – ipolamiida; (32) – 6β-hidroxi-ipolamiida; (33) – ácido betulínico; (34) – martinósídeo; (35) – isoacteosídeo.....	44

Figura 14: Exemplos do gênero <i>Ocimum</i> . A) <i>O. basilicum</i> ; B) <i>O. gratissimum</i> ; C) <i>O. canum</i> ; D) <i>O. sanctum</i> . Fonte: Google Imagens.	45
Figura 15: Exemplos de substâncias encontradas em <i>O. basilicum</i> ilustrando as classes de maior ocorrência: monoterpenos (36-39), polifenóis (40 e 41), flavonoides (42 e 43) e triterpenos (44). (36) – linalool; (37) – cânfora; (38) – limoneno; (39) – eucaliptol; (40) – ácido rosmarínico; (41) – 4'-carbometoxi-2'-hidroxifenil ferulato; (42) – vicenina-2; (43) – nevadensina; (44) – basilol.	47
Figura 16: Esquema do processo de extração utilizado demonstrando cada etapa.	51
Figura 17: Fotos ilustrativas do preparo dos ratos para administração dos extratos, registro das pressões sistólica, diastólica e média, e eletrocardiografia. A, B, C e D – dissecação da veia jugular direita; E e F – dissecação da artéria carótida esquerda; G – eletrodos de eletrocardiografia (Cedido por Prof. Fernanda Antunes – LCCA/UENF).	56
Figura 18: Foto ilustrativa do teste Rota Rod demonstrando o aparato e a avaliação de quatro animais simultaneamente (Acervo pessoal).	57
Figura 19: Ampliação (8,0 ppm – 3,5 ppm) do espectro em CDCl ₃ de AAC e principais correlações observadas para a kavalactona 5,6-desidro-kavaína.	61
Figura 20: Ampliação (8,0 ppm – 2,5 ppm) do espectro em CDCl ₃ de AAC e principais correlações observadas para a kavalactona dihidro-5,6-desidro-kavaína.	62
Figura 21: Ampliação (6,0 ppm – 5,0 ppm) do espectro em CDCl ₃ de AAC demonstrando indícios de outras kavalactonas minoritárias. Vermelho – 5,6-desidro-kavaína; azul – dihidro-5,6-desidro-kavaína; verde – outras kavalactonas.	63
Figura 22: Ampliações dos espectros HSQC (A) e HMBC (B) demonstrando a presença de metoxilas características de kavalactonas no extrato AAC. Vermelho – 5,6-desidro-kavaína; azul – dihidro-5,6-desidro-kavaína; verde – outras kavalactonas.	64
Figura 23: Ampliações dos espectros HSQC (A) e HMBC (B) demonstrando a presença de metoxilas características de kavalactonas no extrato AAC-R.	65
Figura 24: Comparativo dos espectros em CDCl ₃ de AAC (azul) e AAC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	66
Figura 25: Estrutura dos açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e substâncias nitrogenadas identificadas nos extratos AAM e AAM-R, e as principais evidências espectrais observadas. (45) – α-glicose; (46) – β-glicose; (47) – alanina; (48) – glutamato; (49) – treonina; (50) – valina; (51) – ácido succínico; (52) – ácido fórmico; (53) – colina.	68
Figura 26: Ampliações (6,0 ppm – 5,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de AAM e AAM-R demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de kavalactonas.	69
Figura 27: Ampliações dos espectros HSQC (A) e HMBC (B) de AAM-R demonstrando a presença de sinais característicos dos H3 e H5 de kavalactonas, e os acoplamentos ³ J _{CH} das metoxilas com C4.	70
Figura 28: Ampliação (8,2 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD ₃ OD de AAM demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.	71

Figura 29: Comparativo dos espectros em CD ₃ OD de AAM (azul) e AAM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	73
Figura 30: Cromatograma do pico base (BPC) de AAM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.	74
Figura 31: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.....	81
Figura 32: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AAM, respectivamente.....	88
Figura 33: Gráficos das pressões arterial sistólica (A) , média (B) , diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AAM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.	89
Figura 34: Resultados da avaliação de AAM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,001; e para o diazepam: # - p<0,001.	91
Figura 35: Comparativo dos espectros em CDCl ₃ de ACC (azul) e ACC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	93
Figura 36: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de ACM e ACM-R demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.	94
Figura 37: Ampliação (8,0 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD ₃ OD de ACM2 demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.	96
Figura 38: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de ACM1 e ACM2 demonstrando a região referente à taninos hidrolisáveis.	97
Figura 39: Ampliações dos espectros HSQC de ACM1 e ACM2 demonstrando a presença de sinais característicos de H2-6 de derivados do ácido gálico.	98
Figura 40: Comparativo dos espectros em CD ₃ OD de ACM (azul) e ACM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	99
Figura 41: (A) Cromatograma do pico base (BPC) de ACM obtido pelo modo de ionização negativo. (B) Ampliação (3 min – 125 min) do BPC de ACM demonstrando os picos minoritários presentes. Os números representam as substâncias identificadas.....	101
Figura 42: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em ACM e suas propostas de fragmentação.....	105
Figura 43: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato ACM, respectivamente.	110
Figura 44: Gráficos das pressões arterial sistólica (A) , média (B) , diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato ACM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.	111
Figura 45: Ampliação (8,0 ppm – 3,5 ppm) do espectro em CDCl ₃ de AFC demonstrando algumas evidências observadas para o fenilpropanoide <i>trans</i> -anetol.....	114

Figura 46: Ampliação (8,2 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD ₃ OD de AFM demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de substâncias fenólicas.	116
Figura 47: Cromatograma do pico base (BPC) de AFM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.	118
Figura 48: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em AFM e suas propostas de fragmentação.....	123
Figura 49: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AFM, respectivamente.	128
Figura 50: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AFM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.	129
Figura 51: Resultados da avaliação de AFM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,001, † - p<0,01, ‡ - p<0,05; e para o diazepam: # - p<0,001.	131
Figura 52: Comparativo dos espectros em CDCl ₃ de AOC (azul) e AOC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	132
Figura 53: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de AOM e AOM-R demonstrando os sinais referente ao ácido rosmarínico.	134
Figura 54: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de AOM e AOM-R demonstrando os sinais referente ao ácido rosmarínico.	134
Figura 55: Comparativo dos espectros em CD ₃ OD de AOM (azul) e AOM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	136
Figura 56: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD ₃ OD de AOM demonstrando os sinais e integrações do ácido rosmarínico e do padrão interno (PI).....	137
Figura 57: Cromatograma do pico base (BPC) de AOM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.	139
Figura 58: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.....	145
Figura 59: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AOM, respectivamente.	151
Figura 60: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AOM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.	152
Figura 61: Resultados da avaliação de AOM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,001, ‡ - p<0,05; e para o diazepam: # - p<0,001.	153
Figura 62: Comparativo dos espectros em CDCl ₃ de FLC (azul) e FLC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	155

Figura 63: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.	157
Figura 64: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.	157
Figura 65: Ampliações dos espectros HSQC de FLM e FLM-R demonstrando a presença de sinais característicos de glicose e ramnose.....	158
Figura 66: Ampliações dos espectros HMBC de FLM (A) e FLM-R (B) demonstrando correlações chave (C) observadas para o acteosideo.....	158
Figura 67: Ampliações dos espectros HSQC de FLM (A) e FLM-R (B) demonstrando as correlações observadas para o isoacteosideo (C)	160
Figura 68: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais de um feniletanoide triglicosilado (vermelho) e de um feniletanoide com substituinte ferúlico (azul).....	161
Figura 69: Comparativo dos espectros em CD ₃ OD de FLM (azul) e FLM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	165
Figura 70: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD ₃ OD de FLM demonstrando os sinais e integrações do acteosideo e do padrão interno (PI).	166
Figura 71: Cromatograma do pico base (BPC) de FLM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.	167
Figura 72: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.....	175
Figura 73: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato FLM, respectivamente.	182
Figura 74: Gráficos das pressões arterial sistólica (A) , média (B) , diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato FLM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.	183
Figura 75: Resultados da avaliação de FLM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,001; e para o diazepam: # - p<0,001, † - p<0,01.	185
Figura 76: Comparativo dos espectros em CDCl ₃ de FSC (azul) e FSC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.	186
Figura 77: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.	188
Figura 78: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.	188
Figura 79: Ampliações dos espectros HMBC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando correlações chave (C) observadas para o acteosideo.....	189
Figura 80: Ampliações dos espectros HSQC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando as correlações observadas para o isoacteosideo (C)	191

Figura 81: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais de um feniletanoide triglicosilado (vermelho) e de um feniletanoide com substituinte ferúlico (azul).....	192
Figura 82: Ampliações (8,0 ppm – 1,0 ppm) dos espectros em CD ₃ OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente à ipolamiida.....	194
Figura 83: Ampliações dos espectros HMBC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando correlações chave observadas para a ipolamiida.....	195
Figura 84: Comparativo dos espectros em CD ₃ OD de FSM (azul) e FSM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.....	197
Figura 85: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD ₃ OD de FSM demonstrando os sinais e integrações do acteosideo e do padrão interno (PI).....	198
Figura 86: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD ₃ OD de FSM demonstrando os sinais e integrações da ipolamiida e do padrão interno (PI).....	199
Figura 87: Cromatograma do pico base (BPC) de FSM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.....	200
Figura 88: Espectros de MS ² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.....	209
Figura 89: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato FSM, respectivamente.....	218
Figura 90: Gráficos das pressões arterial sistólica (A) , média (B) , diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato FSM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001; e para o DMSO: # - p<0,05, ## - p<0,01, ### - p<0,001.....	219
Figura 91: Resultados da avaliação de FSM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - p<0,001, † - p<0,01; e para o diazepam: # - p<0,001, ‡ - p<0,05.....	220

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para tratamento de hipertensão e outras doenças relacionadas a afecções do sistema cardiovascular.	24
Tabela 2: Algumas das atividades biológicas de diferentes partes de <i>A. zerumbet</i> determinadas por diferentes ensaios.	32
Tabela 3: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de <i>C. carthagenensis</i> determinadas por diferentes ensaios.	35
Tabela 4: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de <i>F. vulgare</i> determinadas por diferentes ensaios.	38
Tabela 5: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de <i>L. alba</i> determinadas por diferentes ensaios.	41
Tabela 6: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de <i>S. cayennensis</i> determinadas por diferentes ensaios.	43
Tabela 7: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de <i>O. basilicum</i> determinadas por diferentes ensaios.	46
Tabela 8: Informações sobre coleta, identificação e preparo das amostras vegetais.	50
Tabela 9: Rendimento percentual e quantidade em gramas obtida dos extratos em clorofórmio (CHCl_3) e em metanol (CH_3OH) das plantas estudadas. EC – erva cidreira; ED – erva-doce; GR – gervão-roxo; GU – gurdumão; MA – manjerição; SS – sete-sangrias.	52
Tabela 10: Gradientes de eluição utilizados nas análises cromatográficas dos extratos.	55
Tabela 11: Códigos utilizados para denominar os extratos e frações obtidas.	58
Tabela 12: Investigações conduzidas com cada extrato/fração vegetal obtida.	59
Tabela 13: Deslocamentos químicos da 5,6-desidrokaína observado no extrato AAC e comparação com dados da literatura.	61
Tabela 14: Deslocamentos químicos da dihidro-5,6-desidrokaína observado no extrato AAC e comparação com dados da literatura.	62
Tabela 15: Deslocamentos químicos atribuídos as kavalactonas 5,6-desidrokaína e dihidro-5,6-desidrokaína observadas no extrato AAM-R e comparação com dados da literatura em CDCl_3	70
Tabela 16: Deslocamentos químicos do flavonoide observado no extrato AAM e comparação com dados da literatura.	71
Tabela 17: Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.	75
Tabela 18: Deslocamentos químicos do flavonoide observado nos extratos ACM e ACM-R, e comparação com dados da literatura.	95
Tabela 19: Deslocamentos químicos do flavonoide observado na fração ACM2 e comparação com dados da literatura.	96
Tabela 20: Substâncias identificadas na análise de ACM por CLAE-EM no modo negativo de ionização.	102

Tabela 21: Deslocamentos químicos do <i>trans</i> -anetol observado no extrato AFC e comparação com dados da literatura.....	115
Tabela 22: Substâncias identificadas na análise de AFM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.....	119
Tabela 23: Deslocamentos químicos do ácido rosmarínico identificado nos extratos AOM e AOM-R, e comparação com dados da literatura.....	135
Tabela 24: Valores de integral dos sinais selecionados do ácido rosmarínico e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.....	138
Tabela 25: Substâncias identificadas na análise de AOM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.....	140
Tabela 26: Deslocamentos químicos do acteosídeo identificado nos extratos FLM e FLM-R, e comparação com dados da literatura.....	159
Tabela 27: Deslocamentos químicos do isoacteosídeo observado nos extratos FLM e FLM-R, e comparação com dados da literatura.....	161
Tabela 28: Deslocamento químico de um feniletanoide triglicosilado observado nos extratos FLM e FLM-R. O forsitosídeo B foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.....	162
Tabela 29: Deslocamentos químicos de um feniletanoide com substituinte ferúlico observado nos extratos FLM e FLM-R. O alissonosídeo foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.....	163
Tabela 30: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosídeo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.....	166
Tabela 31: Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.....	168
Tabela 32: Deslocamentos químicos do acteosídeo identificado nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.....	190
Tabela 33: Deslocamentos químicos do isoacteosídeo observado nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.....	191
Tabela 34: Deslocamento químico de um feniletanoide triglicosilado observado nos extratos FSM e FSM-R. O forsitosídeo B foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.....	192
Tabela 35: Deslocamentos químicos de um feniletanoide com substituinte ferúlico observado nos extratos FSM e FSM-R. O alissonosídeo foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.....	193
Tabela 36: Deslocamentos químicos da ipolamiida identificada nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.....	195

Tabela 37: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosideo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.....	198
Tabela 38: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosideo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.....	199
Tabela 39: Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.....	201

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é um importante problema de saúde pública por aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares tais como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE), dentre outras, além de acometer uma grande parcela da população mundial. No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, causando mais óbitos do que as neoplasias, as doenças respiratórias e os acidentes. Estudos recentes demonstraram que 31% dos óbitos notificados no Brasil foram decorrentes de doenças cardiovasculares (Brant et al., 2017; Ribeiro et al., 2016).

Uma vez que o acesso ao atendimento primário à saúde é dificultado, uma grande parcela da população recorre a formas alternativas de tratamento utilizando plantas medicinais. Nos últimos anos observa-se um crescente interesse pelas mesmas por conta de seu histórico de utilização somada à crença de não possuírem efeitos colaterais, além de apresentarem menor custo comparado às terapias modernas. Estima-se que em países desenvolvidos, cerca de 70% da população tem utilizado terapias alternativas, sendo que as plantas medicinais representam grande parcela deste montante. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, estima-se que este número seja ainda maior, especialmente nas zonas rurais. Por outro lado, muitas das plantas utilizadas pela população não possuem estudos que indiquem seu(s) princípio(s) ativo(s) e/ou comprovem sua eficácia e segurança terapêutica (Al Disi, Anwar, & Eid, 2016; Shukla et al., 2010).

A análise metabolômica surge como uma importante ferramenta no estudo de plantas medicinais, pois permite a identificação e quantificação dos constituintes químicos através de técnicas analíticas sofisticadas que demandam uma menor quantidade de materiais e menor tempo de análise (Kim, Choi, & Verpoorte, 2010; Kim & Verpoorte, 2010; Schripsema et al., 2014).

Em vista do exposto anteriormente, o presente trabalho propõe investigar as espécies vegetais popularmente utilizadas na região Norte Fluminense no tratamento da hipertensão arterial. Seis plantas medicinais foram selecionadas para esse estudo com base na investigação etnofarmacológica conduzida por Neves (2012). Assim, propôs-se a investigação hemodinâmica dos extratos dessas plantas a fim de verificar seus efeitos hipotensores em ratos normotensos, além da realização da investigação metabolômica dos mesmos no intuito de ampliar o conhecimento fitoquímico dessas e elucidar os possíveis constituintes responsáveis pela atividade observada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é uma condição clínica definida pela elevação sustentada das pressões sistólica e/ou diastólica acima de 140 mm Hg e 90 mm Hg, respectivamente. Apresenta-se como uma doença multifatorial que pode ter como causas desde caracteres genéticos, condições ambientais ou comportamentais (Ayele, Urga & Engidawork, 2010; Rendón-Vallejo et al., 2012; Wang & Wang, 2004). Essa doença acomete grande parte da população mundial e é considerada como um importante problema de saúde pública, por ser uma das principais causas de problemas cardiovasculares como infarto do miocárdio, doenças coronarianas, acidente vascular encefálico (AVE), insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal e doença vascular periférica (Ayele et al., 2010; Burt, Cutler, et al., 1995; Burt, Whelton, et al., 1995; Hajjar & Kotchen, 2013; Kearney et al., 2005; Olmos & Lotufo, 2002; Rendón-Vallejo et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta as doenças cardiovasculares como a principal causa de morte nos países ocidentais. No século passado, as doenças cardiovasculares deixaram de ser causa minoritária de mortalidade e passaram a ser uma das principais causas de mortalidade. Dados recentes demonstram que as doenças cardiovasculares são responsáveis por 31% dos óbitos notificados (Brant et al., 2017; Ribeiro et al., 2016).

No Brasil, as doenças cardiovasculares aparecem como a principal causa de mortalidade, representando cerca de um terço dos óbitos notificados. Em 2009 foram notificados mais de 193 mil óbitos causados por essas doenças, número que supera a mortalidade por neoplasias (166 mil), doenças respiratórias (106 mil) e causas externas (77 mil). Outro levantamento em 2013 apontou novamente as doenças cardiovasculares como principal causa de mortalidade no Brasil, respondendo por quase 340 mil óbitos. A hipertensão arterial desponta como grande vilã neste panorama uma vez que lhe é atribuída contribuição direta e indireta em cerca de 50% dos óbitos (Malachias et al., 2016; Mansur & Favarato, 2012; Prando et al., 2015).

Por conta deste cenário, as doenças cardiovasculares apresentam custos socioeconômicos elevados e possuem alta frequência de internação. No início dos anos 2000, apresentava-se como uma das principais causa de hospitalização no setor público, respondendo por quase 30% das internações de pessoas acima de 60 anos. A partir dos anos de 2010, houve um decréscimo significativo que sugere uma

diminuição desta tendência (S. R. G. Ferreira & Zanella, 2000; Lessa, 2001; Malachias et al., 2016; Mansur & Favarato, 2012; Passos, Assis, & Barreto, 2006).

Apesar de ser a principal causa de morte no Brasil, na última década foi constatada uma diminuição da mortalidade por doenças cardiovasculares nas regiões sul e sudeste e na faixa etária de 60 anos ou mais. Entretanto, estas taxas ainda são elevadas devido ao fraco controle dos fatores de riscos que provocam o surgimento das doenças cardiovasculares (Mansur & Favarato, 2012).

Fatores de riscos como hipertensão, diabetes e dislipidemia são frequentemente encontrados na nossa população e necessitam de controle permanente, o que representa um custo elevado para o governo e população (Mansur & Favarato, 2012; Olmos & Lotufo, 2002).

A maioria das manifestações cardiovasculares acontece em indivíduos com pequenas alterações dos fatores de riscos que quando deixados sem tratamento por um longo período podem acarretar na sua ocorrência (Passos et al., 2006). O controle adequado dos fatores de riscos reduz em pelo menos 50% a mortalidade por doenças cardiovasculares (S. R. G. Ferreira & Zanella, 2000; Passos et al., 2006).

A obesidade também é considerada um importante fator de risco e está diretamente ligada à ocorrência de hipertensão arterial, uma vez que há maior ocorrência de obesidade em hipertensos do que nos normotensos. Estudos demonstraram que grande parte das ocorrências de hipertensão em homens e mulheres está diretamente relacionada ao excesso de peso (Ferreira & Zanella, 2000; Malta et al., 2017; Olmos & Lotufo, 2002).

Normalmente, a obesidade está associada com a redução da atividade metabólica devido ao envelhecimento da população ou com práticas comportamentais que incluem o tabagismo, etilismo, sedentarismo e hábitos alimentares. As práticas comportamentais são responsáveis pela obesidade em jovens e, conseqüentemente, despontam como principais causas de hipertensão na faixa etária de 20 a 50 anos (Bopda et al., 2014; S. R. G. Ferreira & Zanella, 2000; Kearney et al., 2005; Mansur & Favarato, 2012; Olmos & Lotufo, 2002).

A prevalência da hipertensão pelo mundo varia bastante de acordo com a área estudada. Kearney e colaboradores (2005) estimaram que 26,4% da população mundial seria hipertensa no ano 2000, e que este número subirá para 29,2% em 25 anos. Os autores ainda ressaltam que esta é uma estimativa otimista, uma vez que não leva em consideração alterações no estilo de vida das populações, principalmente nos países em desenvolvimento, que representam um quantitativo populacional significativamente elevado em relação aos países desenvolvidos. De fato essa projeção mostrava-se bastante otimista uma vez que em 2010 a prevalência da

hipertensão no mundo foi de 31,1%, o que correspondia a aproximadamente 1,39 bilhão de pessoas (Kearney et al., 2005; Mills et al., 2016; Wolf-Maier et al., 2003).

A incidência de hipertensão também varia de acordo com sexo, idade, raça e país em que se reside. A relação entre o sexo e a hipertensão varia bastante de acordo com a região analisada podendo em alguns casos ser maior em homens e em outros casos maior nas mulheres. Entre 2000 e 2025 estima-se um aumento de 9% e 13% na prevalência da hipertensão em homens e mulheres, respectivamente (Kearney et al., 2005). A **Figura 1** mostra a relação entre sexo e hipertensão para alguns países desenvolvidos e em desenvolvimento no ano de 2000.

Nos países desenvolvidos a prevalência da hipertensão foi de 37,4% para homens e 37,2% para mulheres, sendo a Alemanha o país com maior prevalência. Em comparação no mesmo período, a prevalência para países africanos foi de 26,9% para homens e 28,3% para mulheres, sendo o Zimbábue o país com maior prevalência (**Figura 1**) (Kearney et al., 2005; Passos et al., 2006). Estes dados evidenciam a influência de hábitos comportamentais (má alimentação, estresse, entre outros) na prevalência da hipertensão (Lolio et al., 1993; Olmos & Lotufo, 2002). Deve-se salientar que no estudo realizado por Kearney e colaboradores (2005) apenas alguns parâmetros sobre prevalência da hipertensão foram analisados e não haviam dados sobre o Brasil em sua pesquisa.

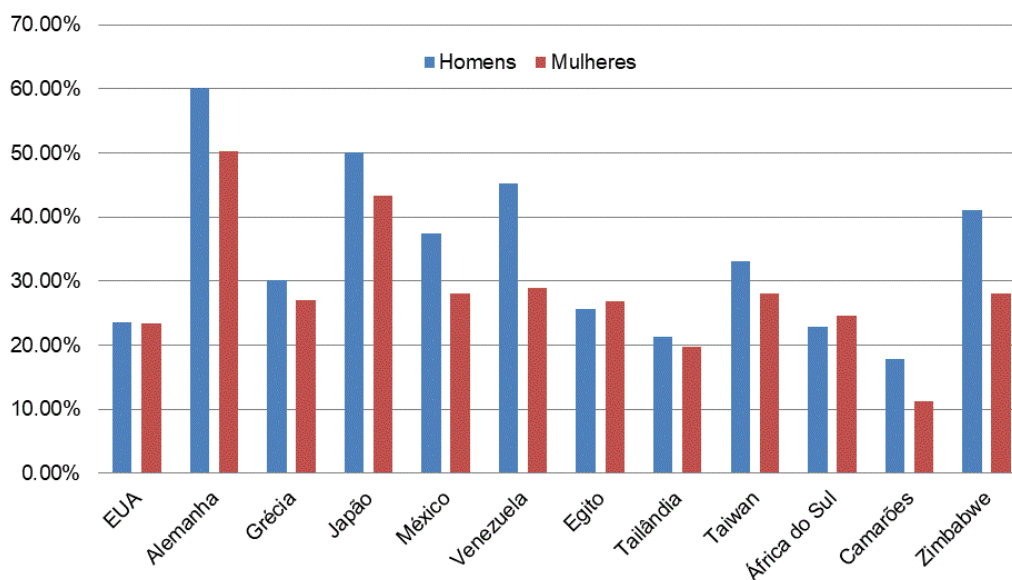


Figura 1: Prevalência da hipertensão pelo mundo. Adaptado de Kearney et al., 2005.

Em relação à idade, diversos autores concordam que há uma maior prevalência de hipertensão nas faixas etárias mais elevadas e isso está relacionado a diversos fatores como o envelhecimento populacional, o aumento da expectativa de vida e as mudanças comportamentais (Kearney et al., 2005; Passos et al., 2006). As

faixas etárias mais elevadas são ainda as mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares devido aos fatores mencionados anteriormente que estão diretamente ligados a maior incidência de doenças crônicas (Passos et al., 2006; A. R. A. de Souza et al., 2007).

Quanto à raça geralmente observa-se uma maior prevalência da hipertensão na população negra do que nos brancos (Lolio et al., 1993; Malta et al., 2017). Entretanto, a prevalência também pode variar de acordo com a região analisada apresentando algumas divergências (Kearney et al., 2005).

Em relação às regiões, Kearney e colaboradores (2005) encontraram a maior prevalência média de hipertensão em países da América Latina (México, Venezuela e Paraguai) enquanto que a menor encontrada foi em países do leste asiático (Coreia, Taiwan e Tailândia) (**Figura 1**).

Fatores sociais como escolaridade, renda familiar e atividade profissional também apresentam relevância na prevalência da hipertensão sendo as classes menos favorecidas as mais acometidas (Lolio et al., 1993; Malta et al., 2017; Olmos & Lotufo, 2002).

Outro fator que contribui significativamente para uma maior prevalência da hipertensão é a baixa adesão ao tratamento e o mau acompanhamento dos pacientes hipertensos (Prando et al., 2015; Youfa Wang & Wang, 2004). Nos Estados Unidos estimou-se que um terço dos pacientes hipertensos não tinha o hábito de realizar a aferição da sua pressão arterial. Além disso, poucos adotaram mudanças no estilo de vida (Youfa Wang & Wang, 2004). No Brasil, apenas 30% dos hipertensos apresentaram níveis pressóricos controlados (Olmos & Lotufo, 2002; Passos et al., 2006; A. R. A. de Souza et al., 2007).

O tratamento correto da hipertensão arterial, seja farmacológico ou não-farmacológico, está implicitamente ligado a diminuição dos riscos cardiovasculares (Burt, Whelton, et al., 1995; Hajjar & Kotchen, 2013; Passos et al., 2006). O controle da hipertensão normalmente se dá pelo uso prolongado de diferentes medicamentos, associados ou não como: diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores de angiotensina II, bloqueadores beta-adrenérgicos, antagonistas dos canais de cálcio, bloqueadores alfa-adrenérgicos e vasodilatadores. De modo geral, esses fármacos atuam em quatro segmentos: nos vasos de resistência, nos vasos de capacitância, no coração e nos rins (Manga et al., 2013; Rendón-Vallejo et al., 2012).

Desde a introdução do primeiro fármaco anti-hipertensivo em 1950, uma enorme variedade de medicamentos foi introduzida no mercado. Entretanto, os custos das terapias mais modernas são bastante elevados o que impossibilita o tratamento de

parte da população, principalmente aquela menos favorecida socioeconomicamente (Ayele et al., 2010; Bopda et al., 2014; Manga et al., 2013; Prando et al., 2015). Somado a esse fato, o atendimento primário a saúde especialmente nos países em desenvolvimento deixa a desejar e faz com que grande parte da população recorra a formas alternativas de medicina como o uso de plantas medicinais (Ayele et al., 2010; Bopda et al., 2014; Manga et al., 2013; Mansur & Favarato, 2012).

Nos últimos anos houve um crescente interesse pelas plantas medicinais por conta de seu histórico de utilização somada à crença de não possuírem efeitos colaterais, além de apresentarem menor custo comparado às terapias modernas. Estima-se que em países desenvolvidos cerca de 70% da população tem utilizado terapias alternativas, sendo que as plantas medicinais representam grande parcela deste montante. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, estima-se que este número seja ainda maior, especialmente nas zonas rurais onde o acesso ao atendimento primário à saúde é dificultado (Al Disi, Anwar, & Eid, 2016; Shukla et al., 2010).

As plantas medicinais têm sido utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças. Diversos estudos etnofarmacológicos conduzidos em diferentes regiões do mundo demonstram a grande variedade de aplicações das plantas medicinais no tratamento de doenças. Entre as doenças usualmente citadas nesses trabalhos destacam-se as doenças do sistema cardiovascular, especialmente a hipertensão arterial (Bieski et al., 2012; Costa & Mayworm, 2011; de Albuquerque et al., 2007; Di Stasi et al., 2002; Silva et al., 2012). Alguns exemplos de espécies vegetais popularmente utilizadas no tratamento destas doenças são apresentados na **Tabela 1.**

Tabela 1: Exemplos de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para tratamento de hipertensão e outras doenças relacionadas a afecções do sistema cardiovascular.

Nome científico	Nome popular	Utilização
<i>Alpinia zerumbet</i> ^c sin. <i>Alpinia speciosa</i> ^{bf}	Alevante vermelho ^c , Colônia ^{bdf}	Hipertensão ^{bcd} , problemas cardíacos ^b
<i>Amburana cearensis</i>	Imburana de cheiro	Problemas circulatórios ^f
<i>Anacardium occidentale</i>	Caju	Diurético ^f
<i>Aristolochia cymbifera</i>	Jarrinha	Problemas circulatórios ^f
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja ^{ad}	Diurético ^{ad} , hipertensão ^a
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca	Diurético, hipertensão ^a
<i>Bidens pilosa</i>	Carrapicho	Hipertensão ^c
<i>Cassia occidentalis</i>	Fedegoso	Diurético ^a
<i>Cecropia pachystachya</i>	Embaúba ^{de}	Hipertensão ^{de}
<i>Cecropia palmata</i>	Torém, toré	Diurético ^f
<i>Commelina erecta</i>	Erva-de-santa-luzia	Hipertensão ^b
<i>Coriandrum sativum</i>	Coentro	Hipertensão ^a
<i>Croton zehntneri</i>	Velame	Problemas circulatórios ^f
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim sidrol ^a , capim-caboclo ^b , capim-santo ^{bce} , capim-cidreira ^d , capim-limão ^e , erva-cidreira ^e	Hipertensão ^{abcde}
<i>Hymenaea courbail</i>	Jatobá	Problemas circulatórios ^f
<i>Lippia alba</i>	Erva-cidreira ^{abcd} , cidreira, melissa ^b	Hipertensão ^{abcd} , problemas cardíacos ^b
<i>Melissa officinalis</i>	Melissa ^a , cidreira ^e	Hipertensão ^{ae}
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição-roxo ^b , manjerição ^{bc}	Diurético ^b , hipertensão ^c
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Alfavaca	Hipertensão ^b
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Diurético ^f
<i>Persea americana</i>	Abacate	Diurético ^f
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim ^{ad} , alecrim-de-jardim ^b	Hipertensão ^{ad} , cardiotônico ^b
<i>Roupala montana</i>	Congonha	Diurético ^f
<i>Sesamum indicum</i>	Gergelim	Trombose ^f , ataque cardíaco ^f , taquicardia ^f
<i>Sideroxylon obtusifolium</i>	Quixaba	Problemas circulatórios ^f
<i>Stryphnodendron rotundifolium</i>	Barbatimão	Hipertensão ^f

^a Di Stasi et al., 2002; ^b de Albuquerque et al., 2007; ^c Barboza da Silva et al., 2012; ^d Bieski et al., 2012; ^e Costa & Mayworm, 2011; ^f Bitu et al., 2015.

O número de espécies utilizadas popularmente com tal finalidade é bastante grande e muitas delas motivaram pesquisas a fim de avaliar seu potencial farmacológico. *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Melissa officinalis* são exemplos de plantas que possuem estudos que corroboram suas utilizações

populares (Cunha et al., 2013; Gazola et al., 2004; Moura et al., 2005). Por outro lado, muitas espécies ainda se mostram inexploradas em relação ao seu potencial no tratamento de doenças do sistema cardiovascular. Desta forma, com base no estudo etnofarmacológico de comunidades rurais da região Norte Fluminense conduzido por Neves (2012) foi possível identificar seis espécies vegetais utilizadas no tratamento de afecções cardiovasculares. Estas compreendem *Alpinia zerumbet* (gurumão), *Cuphea carthagenensis* (sete-sangrias), *Foeniculum vulgare* (erva-doce), *Lippia alba* (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* (manjerição) e *Stachytarpheta cayennensis* (gervão-roxo). Embora sejam espécies com significativa utilização pela medicina popular, essas ainda carecem de estudos que corroborem suas propriedades anti-hipertensivas. Além disso, também é necessário conhecer e ampliar o conhecimento a cerca de sua composição química, já que algumas espécies apresentam-se pouco estudadas. Dentre as abordagens mais usuais, destaca-se a análise metabolômica que têm se mostrado ideal para análise de uma maior quantidade de espécies, pois permite a identificação de diversas substâncias através do uso de técnicas analíticas sofisticadas, como espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear, que demandam uma menor quantidade de material e tempo.

2.2. Metabolômica

A metabolômica integra as ciências ômicas juntamente com a genômica, transcriptômica e proteômica. Esta ciência visa à identificação e quantificação de todas as micromoléculas em um determinado organismo (Schripsema, 2010). Em outro momento, sua definição foi expandida incluindo a obtenção e análise de diferentes perfis metabólicos (*fingerprints*) e a formulação de hipóteses capazes de explicar as diferenças metabólicas (Schripsema et al., 2014).

As micromoléculas presentes nos organismos podem possuir estruturas complexas e são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os produzem. Tais substâncias também apresentam grande interesse aos seres humanos sendo utilizados como fármacos, cosméticos, agrotóxicos e para outras finalidades (Funari et al., 2013; Verpoorte, Choi & Kim, 2007).

Dentre as ciências ômicas, a metabolômica é a mais complexa, pois não apresenta metodologias de análise tão bem definidas como na genômica, transcriptômica e proteômica. Considerando ainda a variabilidade estrutural, deve-se ter em mente que uma única planta é capaz de sintetizar milhares de metabólitos secundários utilizando-se de diversas vias metabólicas, que por vezes são utilizadas em conjunto, contribuindo para uma maior diversidade e complexidade das estruturas (**Figura 2**) (Dixon & Strack, 2003; Schripsema, 2010; Schripsema et al., 2014).

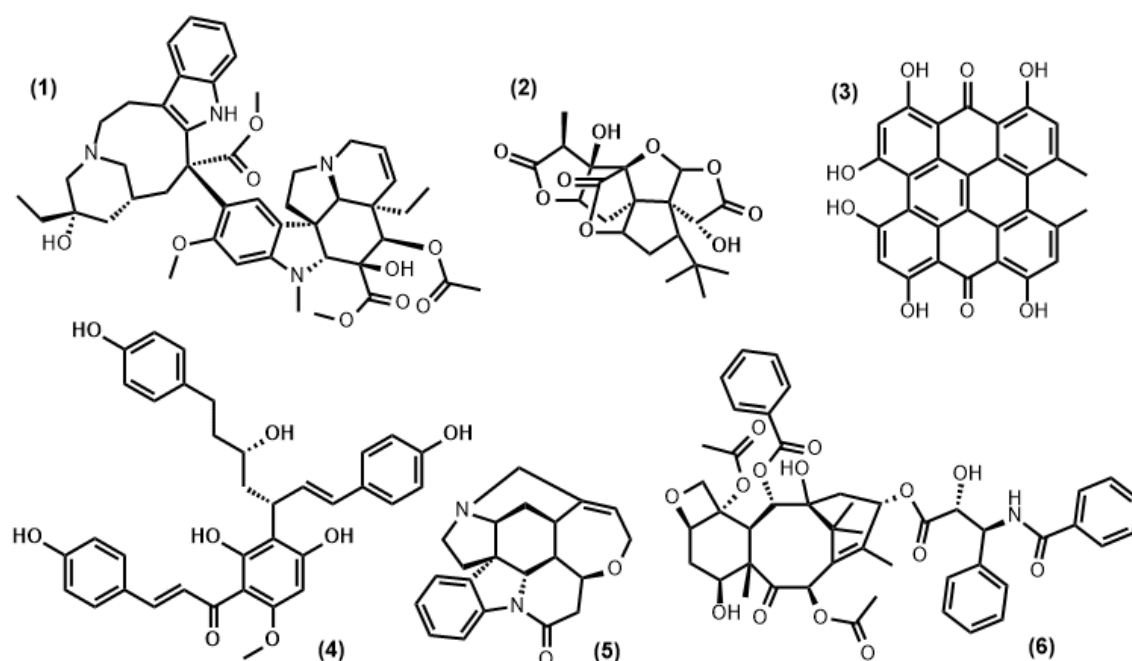


Figura 2: Exemplo de substâncias que demonstram a complexidade e variabilidade de esqueletos químicos sintetizados por plantas: **(1)** – vimbastina; **(2)** – ginkgolideo A; **(3)** – hipericina; **(4)** – calixina A; **(5)** – estriquinina; **(6)** – taxol.

A análise metabolômica envolve diferentes etapas, sendo elas: a obtenção do material de estudo, preparo da amostra, análise instrumental, processamento dos dados e interpretação dos resultados (Kim & Verpoorte, 2010; Mushtaq et al., 2014).

A obtenção do material é uma etapa importante e deve ser cuidadosamente planejada. O horário de coleta, estágio de desenvolvimento do organismo e estresse, são fatores que podem alterar a composição química do organismo. Os níveis de determinados metabólitos em plantas podem variar durante o dia, bem como a ocorrência de patologias que podem induzir a síntese de outros metabólitos. Uma vez coletado, o material está sujeito à atividade enzimática e aos processos oxidativos que também podem alterar a composição metabólica do material analisado. Quando há necessidade, a rápida inativação de todas as atividades bioquímicas do organismo pode ser realizada pelo processo conhecido por “*quenching*”. A forma mais comum de “*quenching*” é a imersão do material em nitrogênio líquido causando um choque térmico que cessa a atividade enzimática (Kim, Choi & Verpoorte, 2010; Kim & Verpoorte, 2010; Mushtaq et al., 2014).

Em relação ao preparo do material, a primeira etapa a ser considerada é a secagem. A eliminação da água presente no material cessa as atividades enzimáticas e inibe o crescimento microbiano. Além disso, a presença de água no material pode interferir na extração (capacidade de solvatação do solvente) e ainda na análise instrumental, especialmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) onde pequenos traços de água podem afetar a resolução do espectro (Kim & Verpoorte, 2010; Mushtaq et al., 2014).

Existem diversas formas de secagens como em estufas, ao ar livre, por micro-ondas e liofilização. A escolha do método deve levar em consideração o tempo de secagem em conjunto com as características do material como tamanho, órgão vegetal e estabilidade dos metabólitos (Kim et al., 2010; Kim & Verpoorte, 2010; Mushtaq et al., 2014).

A etapa de homogeneização do material é de grande importância na metabolômica, principalmente se tratando da análise de plantas, pois estas apresentam grande heterogeneidade. De modo geral, este processo pode ser feito pela ruptura da matriz celular ou pela redução do tamanho das partículas. A escolha do método de moagem deve levar em consideração as características físicas da amostra e ainda evitar o aquecimento do material que pode acarretar na ativação enzimática e, conseqüente, alteração do perfil metabólico (Mushtaq et al., 2014).

A extração representa a etapa crítica no estudo metabolômico. O objetivo da extração é obter a maior quantidade de metabólitos possíveis a partir da amostra. Nas plantas, por exemplo, existem inúmeras moléculas com diferentes características

físico-químicas o que limita a capacidade extrativa do solvente. Desta forma, um único solvente dificilmente será capaz de extrair todos os metabólitos presentes na amostra. Soluções de diferentes solventes, misturas bifásicas e extrações sucessivas com diferentes solventes surgem como alternativas para essa problemática. Além da escolha do solvente ideal, outros fatores a serem considerados no processo de extração são: razão entre solvente e material, tempo de extração e temperatura (Kim et al., 2010; Kim & Verpoorte, 2010; Mushtaq et al., 2014; Verpoorte et al., 2007). A **Figura 3** exemplifica as diferenças nos perfis metabólicos de uma mesma planta utilizando-se diferentes solventes deuterados como extratores.

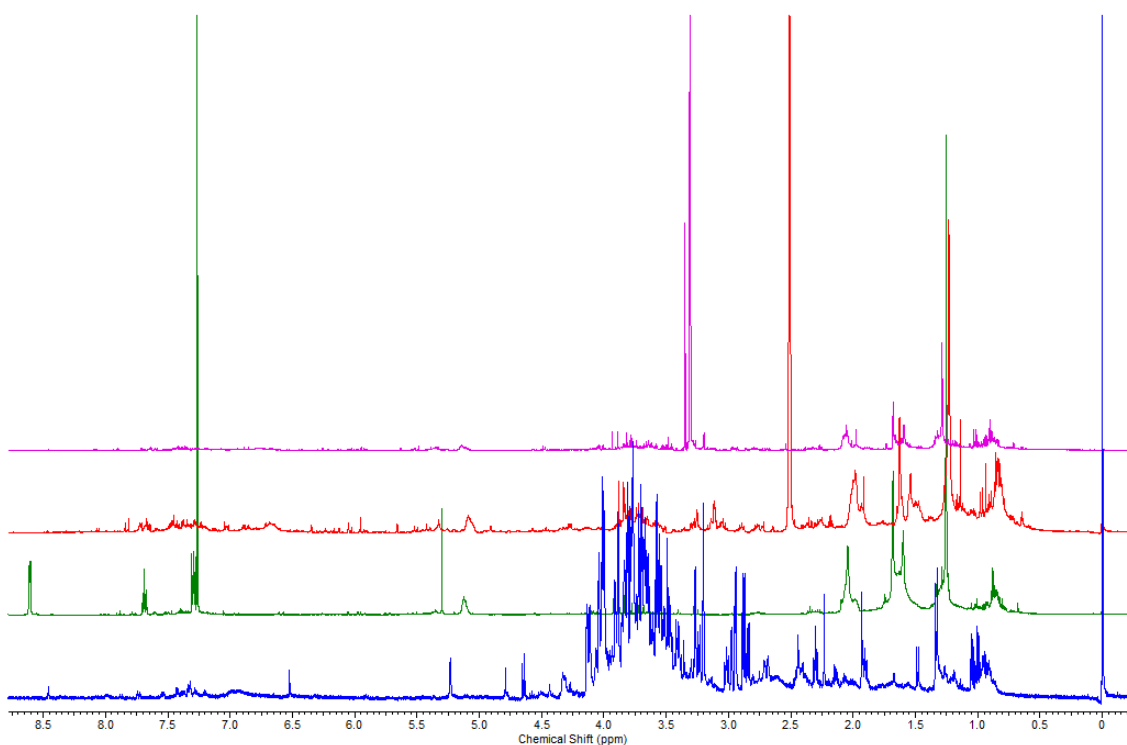


Figura 3: Perfis metabólicos obtidos por RMN ^1H de diferentes extratos de *Alpinia zerumbet* extraídos com água deuterada (D_2O - azul), clorofórmio deuterado (CDCl_3 - verde), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6 - vermelho) e metanol deuterado (CH_3OD - rosa).

O processo de extração também influenciará diretamente na escolha da plataforma analítica, pois de acordo com o solvente utilizado serão obtidas substâncias com diferentes propriedades físico-químicas. A análise instrumental pode ser realizada por diversas técnicas como Espectroscopia de Ultravioleta (UV), de Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), além de técnicas cromatográficas como Cromatografia em fase Gasosa (CG) e em fase Líquida (CLAE). Técnicas hífenadas como CG-EM, CLAE-EM, CLAE-RMN, entre outras, também são amplamente usadas na análise metabolômica. Cada técnica possui suas

particularidades e a escolha da plataforma ideal deve considerar o tempo de análise, a seletividade e a sensibilidade (Kim & Verpoorte, 2010; Schripsema, 2010; Sumner, Mendes & Dixon, 2003).

Entre as plataformas de análise mais utilizadas estão a RMN e EM. A RMN é um método não destrutivo que apresenta fácil manuseio e requer um preparo simples e rápido da amostra. Essa técnica é muito utilizada na obtenção de perfis metabólicos, já que qualquer molécula que contenha átomos de hidrogênio irá gerar um sinal no espectro. Entretanto, por apresentar baixa sensibilidade, substâncias minoritárias podem não aparecer no espectro. De um modo geral, a análise por RMN gera uma visão macroscópica da amostra, mas se utilizado em conjunto com outras técnicas, como a cromatografia, pode gerar uma visão microscópica. A hifenação do RMN e CLAE geralmente é realizada “*off-line*”, pois o acoplamento “*in-line*” demanda, entre outras coisas, um gasto financeiro elevado devido ao uso de solventes deuterados como fase móvel (Schripsema, 2010; Sumner et al., 2003; Verpoorte et al., 2007).

A EM é uma análise destrutiva que também apresenta facilidade de manuseio e preparo da amostra. Possui diferentes formas (fontes) de ionização e analisadores, o que possibilita uma grande variedade de aplicações. Aparelhos de alta resolução com fonte de ionização ESI (*electrospray ionization*) são os mais utilizados na obtenção de perfis metabólicos. Essa técnica de caracterização possui alta sensibilidade e é utilizado juntamente a técnicas cromatográficas como CG e CLAE, permitindo a obtenção de uma maior quantidade de dados dentro de um perfil químico. Comparado a RMN, a EM é capaz de detectar uma quantidade superior de metabólitos (Schripsema, 2010; Sumner et al., 2003; Verpoorte et al., 2007).

A CG-EM é uma análise destrutiva que apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade. Possui inúmeros bancos de dados que facilitam a identificação dos metabólitos. Entretanto, essa técnica limita-se a análise de substâncias voláteis, sendo necessárias etapas de derivatização quando substâncias de maior polaridade estão presentes na amostra. Se tratando de plantas, alguns metabólitos secundários como as substâncias fenólicas podem gerar derivados voláteis instáveis e, conseqüentemente, não serem detectados na análise. Considerando o fator tempo, as análises por CG-EM podem ser longas, especialmente se houver a necessidade de derivatização prévia da amostra (Kim & Verpoorte, 2010; Schripsema, 2010; Sumner et al., 2003).

Outra abordagem cromatográfica muito utilizada é a CLAE-EM que se mostra altamente seletiva e sensível, embora a reprodutibilidade seja geralmente relacionada às condições específicas do equipamento. No dia a dia laboratorial a reprodutibilidade é satisfatória, enquanto que a reprodução em outros laboratórios é dificultada devido a

condições externas, reagentes, solventes e principalmente a coluna cromatográfica. Além disso, a utilização de diversas fontes de ionização cria espectros com diferentes abundâncias e fragmentação para uma mesma substância. Esses fatores dificultam a introdução de banco de dados tais como os disponíveis para CG-EM o que facilitaria a identificação de diversas moléculas. Entretanto, já existem diversos bancos de dados online contendo os dados espectrais de massas de milhares de substâncias conhecidas. Embora o trabalho de comparação ainda seja feito de forma manual na maioria das vezes, estes têm auxiliado de forma significativa na identificação das substâncias. Essa técnica permite a análise de metabólitos não voláteis, sem a necessidade de derivatização e, ainda, o acoplamento simultâneo a detectores de UV, por exemplo, o que aumenta a quantidade de informações obtidas em uma única análise (Schripsema, 2010; Sumner et al., 2003; Verpoorte et al., 2007).

Na análise metabolômica, a organização dos dados é essencial para verificar diferenças e semelhanças. Entretanto, o grande volume de dados obtido nas análises impossibilita o processo manual e faz com que as análises de multivariadas sejam essenciais. Entre as mais utilizadas estão a PCA (*Principal Component Analysis*), PLS (*Partial Least Squares*) e HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) (Kim et al., 2010; Schripsema, 2010; Sumner et al., 2003).

O estudo metabolômico de plantas apresenta inúmeras finalidades como diferenciação e classificação de espécies, controle de qualidade, identificação de biomarcadores e substâncias potencialmente ativas (Van Der Kooy et al., 2009).

No estudo conduzido por Cifuentes e colaboradores (2018) foram realizadas a investigação hemodinâmica e vasodilatadora de *Xenophyllum poposum*, uma planta medicinal amplamente utilizada em regiões montanhosas da América do Sul no tratamento da hipertensão e de distúrbios causados pela altitude. Após a determinação das propriedades hipotensoras do extrato hidroalcoólico, os autores realizaram uma abordagem metabolômica por CLAE-EM a fim de identificar os principais componentes do extrato que, posteriormente, foram isolados para novas investigações.

Outro exemplo de abordagem metabolômica de interesse ao estudo de plantas medicinais foi conduzida por Cao e colaboradores (2019). Nesse estudo os autores utilizaram a CLAE-EM como forma de caracterizar a origem de *Flos Carthami* (flores secas de *Carthamus tinctorius*) um produto medicinal amplamente utilizado como hipotensor e vasodilatador pela medicina tradicional chinesa. Através de análises de multivariadas foram evidenciadas diferenças metabólicas significativas entre as 32 amostras analisadas demonstrando que as variações fitogeográficas e metabólicas podem auxiliar no controle de qualidade desse produto (T.-T. Cao et al., 2019).

2.3. *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae)

A família Zingiberaceae compreende 53 gêneros e cerca de 1200 espécies nativas do sul e sudeste da Ásia, ocorrendo também na África e na América Central e do Sul (Victório, 2011). Esta família contém inúmeras espécies utilizadas com finalidade alimentícia, medicinal e/ou ornamental, como *Zingiber officinale* (gengibre), *Curcuma longa* (curcuma) e *Elettaria cardamomum* (cardamomo) (Chan et al., 2008; Chan, Lim, & Wong, 2011; Victório, 2011).

O gênero *Alpinia* é originário do leste asiático e compreende entre 230 e 250 espécies, sendo considerado o maior gênero desta família. Muitas espécies desse gênero são cultivadas pelo mundo devido a suas características ornamentais e terapêuticas (Barcelos et al., 2010; Victório, 2011).

As principais características do gênero são: a presença de rizomas; folhas largas protegidas por brácteas; inflorescências terminais; além disso, todas as partes da planta são aromáticas (Victório, 2011). As espécies de *Alpinia* também são utilizadas com fim medicinal e alimentício. Na Tailândia, os rizomas de *A. galanga* são utilizados no tratamento de doenças gástricas e diarreia (**Figura 4 – A**), enquanto que as folhas de *A. zerumbet* são utilizadas no Japão para aromatizar macarrão e envolver bolinhos de arroz (**Figura 4 – B**). Outra característica marcante é a beleza de suas inflorescências o que justifica sua comercialização para fins ornamental (**Figura 4 – C, D**) (Chan et al., 2008; Victório, 2011).

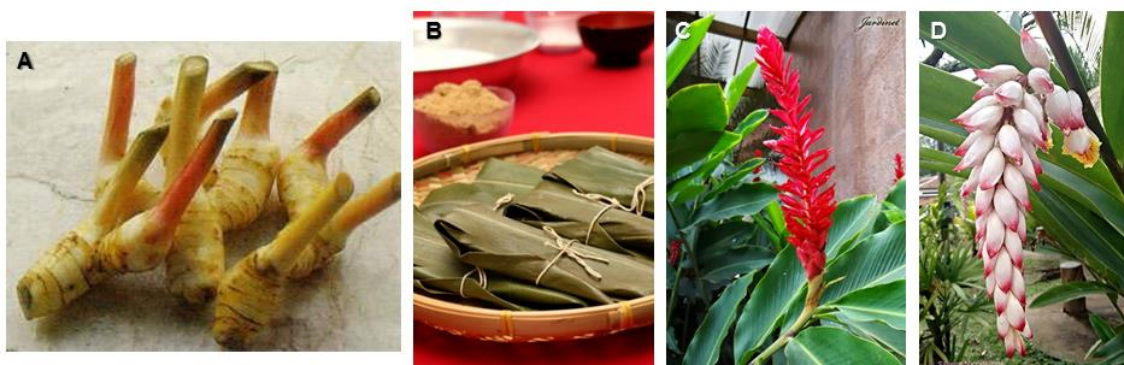


Figura 4: **A)** Rizomas de *A. galanga*; **B)** comida típica japonesa que utiliza folhas de *A. zerumbet* para embrulhar os bolinhos; **C)** inflorescências de *A. purpurata*; **D)** inflorescência de *A. zerumbet*. Fonte: Google imagens.

A espécie *Alpinia zerumbet* é uma erva terrestre, perene, com 1,5 a 3 metros de altura, rizomatosa, com pseudocaule aéreo curto agrupado em touceiras, originado pela sobreposição das bainhas. As folhas são coriáceas, espessas e lanceoladas,

curto-pecioladas, verde-luzidias, com bainha aberta, língula desenvolvida e em disposição dística (Barcelos et al., 2010; Correa, Lima, & Costa, 2010).

Possui diversos nomes populares entre eles flor-da-redenção, bastão-do-imperador, colônia, gurdumão, cuité-açu, pacová e gengibre-concha (Barcelos et al., 2010; Cavalcanti et al., 2012; Chan et al., 2009; Correa et al., 2010). As folhas, flores e rizomas desta espécie são utilizados na medicina popular como depurativo, diurético, hipotensor, antibacteriano, antifúngico, anti-histérico, antiespasmódico, anti-inflamatório, vermífugo e no tratamento de doenças cardiovasculares, intestinais e reumáticas (Barcelos et al., 2010; Cavalcanti et al., 2012; Victório, 2011). O Ministério da Saúde através da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) preconiza a utilização desta espécie com fins medicinais devido a sua ampla utilização em diferentes partes do país (Victório, 2011). Isto motiva a avaliação do seu potencial biológico e algumas das atividades já avaliadas são demonstradas na

Tabela 2.

Tabela 2: Algumas das atividades biológicas de diferentes partes de *A. zerumbet* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Óleo essencial das folhas	<i>in vivo</i> (ratos hipertensos)	Anti-hipertensivo e cardiotônico	[1]
Óleo essencial das folhas	<i>in vitro</i> (halo de inibição sob bactérias e fungos)	Bacteriostático e fungistático	[2]
Extrato aquoso das folhas e rizomas	<i>in vitro</i> (enzimas relacionadas a replicação do HIV e influenza)	Antiviral (inibição das enzimas)	[3]
Extrato acetônico do rizoma, folha, caule, flor, pericarpo e semente	<i>in vitro</i> (enzimas relacionadas a aterosclerose)	Antiaterosclerótico (inibição das enzimas)	[4]
Óleo essencial das folhas	<i>in vivo</i> (camundongos – ensaio de dor induzida)	Antinociceptivo	[5]
Extrato metanólico das folhas	<i>in vitro</i> (DPPH)	Antioxidante	[6]
Óleo essencial dos frutos	<i>in vitro</i> (viabilidade celular – MTT, TUNEL, entre outros)	Ateroprotetor (impede apoptose de células endoteliais)	[7]
Fração metanólica do óleo essencial das folhas	<i>ex vivo</i> (anéis de aorta); <i>in vivo</i> (ratos hipertensos)	Vasorelaxante Anti-hipertensivo	[8]
Óleo essencial das folhas	<i>in vivo</i> (hiperlocomção induzida por cetamina); <i>in vivo</i> (hipnose induzida por pentobarbital)	Antipsicótico Sedativo	[9]

[1] Barcelos et al., 2010; [2] Victório et al., 2009; [3] Upadhyay et al., 2011; [4] Chompoo et al., 2012; [5] Pinho et al., 2005; [6] Chan et al., 2008; [7] Chen et al., 2014; [8] Cunha et al., 2013; [9] De Araújo et al., 2011.

Apesar de muitos estudos químicos avaliarem a composição e variação de seus óleos essenciais, há relatos na literatura da ocorrência de esteroides, terpenos, flavonoides, kavalactonas e ácidos fenólicos, sendo as kavalactonas e os terpenos, especialmente os diterpenos com esqueleto labdano, os principais constituintes desta espécie (**Figura 5**) (Chan et al., 2011; Chompoo et al., 2012; Elzaawely, Xuan, & Tawata, 2007; Kuster et al., 1999; Mpalantinos et al., 1998; Tu & Tawata, 2014; Victório, Lage, & Kuster, 2009; Xu, Dong, & Sim, 1996; Yuan-Ying, Yan-Fang, & Xue-Mei, 1997).

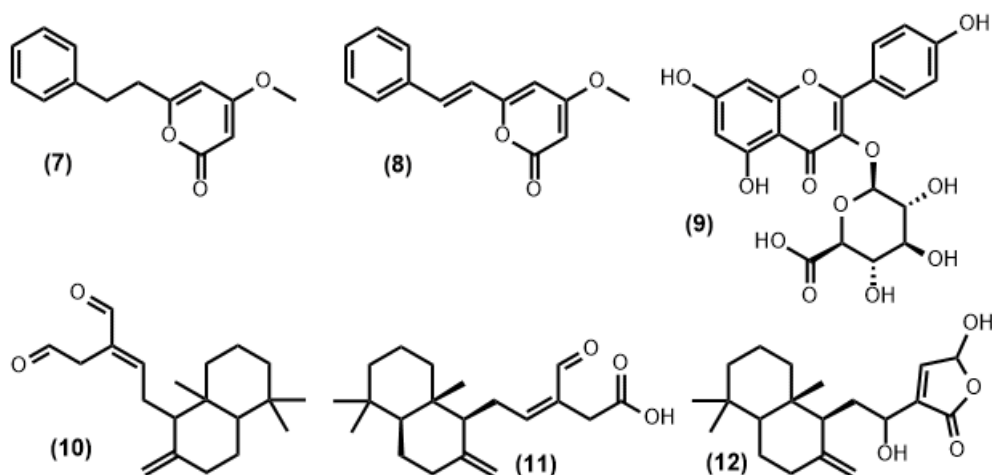


Figura 5: Exemplos de substâncias encontradas em *A. zerumbet* ilustrando as classes de maior ocorrência: kavalactonas (**7-8**), flavonoides (**9**) e diterpenos (**10-12**). (**7**) – 7,8-dihidro-5,6-desidro-kavaína; (**8**) – 5,6-desidro-kavaína; (**9**) – kaempferol-3-O-glicuronídeo; (**10**) – labdadieno; (**11**) – zerumina A; (**12**) – zerumina B.

As kavalactonas e flavonoides possuem grande interesse terapêutico, pois são descritas como possuidoras de atividade ansiolítica, sedativa, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, antitrombótica, dentre outras. Tais constituintes são frequentemente relacionados às atividades terapêuticas desta espécie. Entretanto, nenhum estudo até o momento correlacionou de maneira direta a atividade observada com alguma substância obtida e/ou identificada na espécie (Mpalantinos et al., 1998; Victório, 2011).

2.4. *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae)

A família Lythraceae possui significativa distribuição pelo mundo sendo encontrada em abundância na América latina. A família compreende 22 gêneros e cerca de 500 espécies, muitas delas de interesse econômico como *Lagerstroemia indica* (árvore-de-júpiter), *Lawsonia inernis* (Hena) e *Punica granatum* (Romã), além de espécies medicinais como *Woodfordia fruticosa*, *Lythrum salicaria* (erva-carapau), *Trapa natans*, entre outras (Golebiewski & Wróbel, 1981; Piwowarski, Granica, & Kiss, 2015; Tariq, Mussarat, & Adnan, 2015).

O gênero *Cuphea* é distribuído desde os EUA até a Argentina e compreende cerca de 260 espécies o que o caracteriza como maior gênero da família Lythraceae (Dezanet et al., 2007; Ghebretinsae et al., 2008; Miller et al., 1964). Plantas deste gênero são alvo de diversos estudos devido ao alto teor de ácidos graxos de cadeia média (C₈-C₁₄) presentes em suas sementes. Estes ácidos graxos possuem grande importância para a indústria alimentícia e química, além de serem utilizados como biodiesel (Biavatti et al., 2004; Crane et al., 2003; Crane et al., 2006; Ghebretinsae et al., 2008; Gonzalez et al., 1994).

Espécies do gênero *Cuphea* são utilizadas com finalidade ornamental e medicinal. Nos EUA, *C. ignea* (flor-de-santo-antônio) e *C. llavea* são usadas como ornamento principalmente nas regiões de clima mais quente (**Figura 6** – A, B). Entre as espécies medicinais, *C. speciosa* (cigarrinha) é utilizada no Brasil para tratamento de hemorroidas, enquanto que no México *C. calophylla* é usada no tratamento de hipertensão e como diurético (**Figura 6** – C, D) (Gonzalez et al., 1994; Miller et al., 1964).



Figura 6: Exemplares do gênero *Cuphea*. **A)** *C. ignea* (ornamental); **B)** *C. llavea* (ornamental); **C)** *C. speciosa* (medicinal); **D)** *C. calophylla* (medicinal). Fonte: Google Imagens.

Cuphea carthagenensis é uma espécie herbácea de aproximadamente 60 cm de altura e de ocorrência espontânea nas Américas, Havaí e ilhas do pacífico sul. É de fácil adaptação, sendo encontrada desde em terrenos alagados até regiões rochosas

com água corrente e solos arenosos. É facilmente encontrada a beira de rodovias, pastos e plantações sendo em alguns casos considerada como erva-daninha (Biavatti et al., 2004; Dezanet et al., 2007; Krepsky et al., 2010; Krepsky et al., 2012; Prando et al., 2015).

Esta espécie é popularmente conhecida como sete-sangrias e muito utilizada na medicina popular brasileira para tratar diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, febre, hipercolesterolemia, palpitações, distúrbios circulatórios, sífilis e malária (Andrighetti-Fröhner et al., 2005; Barboza et al., 2016; Biavatti et al., 2004; Braga, Wagner, Lombardi, & Oliveira, 2000; Campana et al., 2015; Dickel, Rates, & Ritter, 2007). Devido a essa grande gama de utilizações medicinais que lhe são atribuídas, diversos autores devotaram a estudar as propriedades farmacológicas de *C. carthagenensis* (Tabela 3).

Tabela 3: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de *C. carthagenensis* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Extrato das folhas em mistura de diclorometano e metanol (1:1)	<i>in vitro</i> (viabilidade da enzima ECA)	Anti-hipertensiva	[1]
Extrato hidroetanólico das partes aéreas	<i>in vitro</i> (inibição de diferentes vírus)	Antiviral (contra herpes)	[2]
Extrato em acetona das partes aéreas	<i>in vitro</i> (ELISA - inibição da citocina TNF- α)	Anti-inflamatório	[3]
Extrato hidroetanólico das partes aéreas e frações	<i>ex vivo</i> (anéis de aorta torácica de ratos)	Vasodilatador	[4]
Extrato hidroetanólico das partes aéreas e frações	<i>in vitro</i> (viabilidade de enzimas e peroxidação lipídica)	Antioxidante	[5]
Fração etanólica obtida da infusão das folhas	<i>in vivo</i> (Coelhos – dieta rica em colesterol)	Hipolipemiante Antiaterogênico	[6]
Infusão das partes aéreas	<i>in vivo</i> (Ratos – dieta de alto teor calórico)	Hipocolesterolêmico	[7]
Extrato aquoso e frações	<i>in vivo</i> (camundongos – contorções abdominais)	Antinociceptivo	[8]
Extrato etanólico das partes aéreas e outras frações	<i>ex vivo</i> (anéis de aorta torácica de ratos)	Vasodilatador	[9]
Fração solúvel em etanol obtida de infusão das folhas	<i>in vivo</i> (Ratos – ovariectomizado e 2K1C)	Cardioprotetor Renoprotetor	[10]

[1] Braga et al., 2000; [2] Andrighetti-Fröhner et al., 2005; [3] Campana et al., 2015; [4] Schuldt et al., 2000; [5] Schuldt et al., 2004; [6] Barboza et al., 2016; [7] Biavatti et al., 2004; [8] Fernandes et al., 2002; [9] Krepsky et al., 2012; [10] Schaedler et al., 2018.

Em relação a fitoquímica desta espécie são descritos a ocorrência de flavonoides, triterpenos, esteroides, taninos e polifenóis (Gonzalez et al., 1994; Krepsky et al., 2012; Schaedler et al., 2018). Krepsky e colaboradores (2012) conduziu um estudo quantitativo de diferentes extratos das partes aéreas de *C. carthagenensis*, onde verificou a presença de flavonoides, taninos, proantocianidinas e substâncias fenólicas. A **Figura 7** demonstra algumas substâncias identificadas nesta espécie.

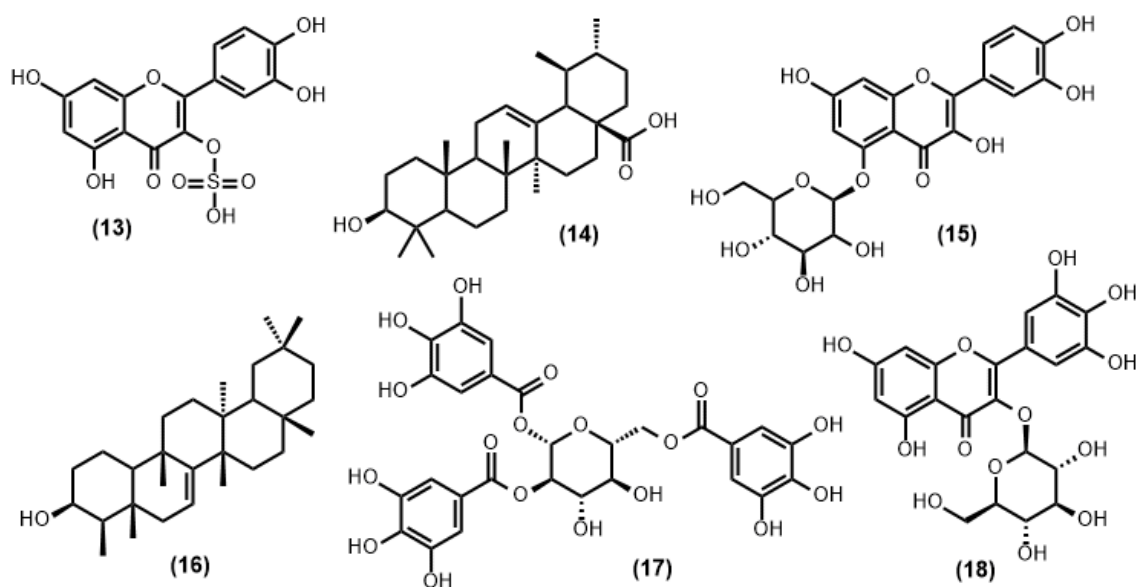


Figura 7: Exemplos de substâncias encontradas em *C. carthagenensis* ilustrando as classes de maior ocorrência: flavonóis (**13**, **15** e **18**), terpenoides (**14** e **16**) e polifenóis (**17**). (**13**) – quercetina-3-O-sulfato; (**14**) – ácido ursólico; (**15**) – quercetina-5-glicosídeo; (**16**) – carthagenol; (**17**) – tri-galoil-glicose; (**18**) – miricetina-3-glicosídeo.

O flavonoide quercetina-3-O-sulfato é sugerido como marcador químico da espécie *C. carthagenensis*, entretanto essa substância não é marcador da família ou do gênero, pois sua ocorrência está limitada apenas a esta espécie. Além disso, diversos autores têm atribuído a esta substância e aos seus derivados glicosilados, como a quercetina-5-glicosídeo, o emprego popular desta espécie para o tratamento de doenças circulatórias, uma vez que sua aglicona (quercetina) possui atividade vasodilatadora (Krepsky et al., 2010).

2.5. *Foeniculum vulgare* (Apiaceae)

A família Apiaceae, também conhecida como Umbelliferae, possui cerca de 3600 espécies distribuídas em aproximadamente 455 gêneros. Devido ao seu tamanho é dividida em três subfamílias, sendo elas: Hydrocotyloideae, Saniculoideae e Apioideae (Abdulmanea et al., 2012; Tabanca et al., 2007). Espécies desta família são utilizadas como alimento, flavorizantes e para fins medicinais, entre elas pode-se citar: *Angelica archangelica* (angélica – medicinal), *Apium graveolens* (salsão ou aipo), *Cuminum cyminum* (cominho), *Coriandrum sativum* (coentro) e *Pimpinella anisum* (anis – flavorizante e medicinal) (Christova-Bagdassarian, Bagdassarian, & Atanassova, 2013; Denev et al., 2011).

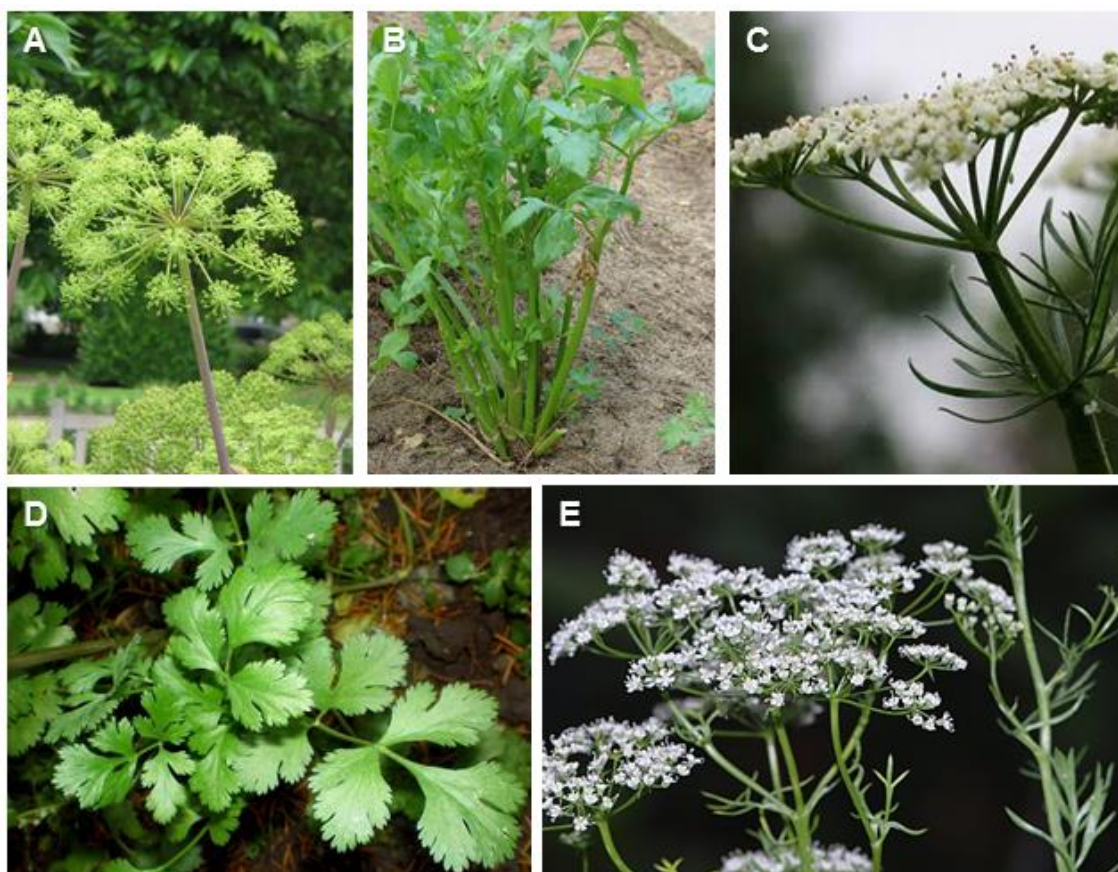


Figura 8: Exemplos da família Apiaceae. **A)** *Angelica archangelica*; **B)** *Apium graveolens*; **C)** *Cuminum cyminum*; **D)** *Coriandrum sativum*; **E)** *Pimpinella anisum*. Fonte: Google Imagens.

Embora existam divergências em relação ao número de espécies no gênero *Foeniculum* alguns autores sugerem que o mesmo compreenda três espécies: *F. azoricum*, *F. dulce* e *F. vulgare*; sendo as duas primeiras espécies menos estudadas e também consideradas como variedades de *F. vulgare* (De, 2004; Rather et al., 2016).

Foeniculum vulgare é uma planta medicinal cultivada em muitos países e utilizada pelo homem desde a antiguidade. Trata-se de uma planta bienal ou perene, com folhas filiformes e inflorescências amarelas, podendo atingir até 2 m de altura (Badgujar, Patel, & Bandivdekar, 2014; Garga et al., 2009)

Esta espécie é conhecida no Brasil como erva-doce, endro ou funcho, possuindo ainda mais de 100 nomes populares em diferentes partes do mundo. É muito utilizada para fins alimentícios, sendo considerada uma especiaria imprescindível na culinária contemporânea francesa e italiana. Ademais é utilizada pela medicina popular como analgésico, anti-hipertensivo, depurativo, diurético, sedativo, entre outras finalidades (Badgujar et al., 2014; De, 2004; Rather et al., 2012). Por se tratar de uma espécie medicinal, diversos estudos farmacológicos foram conduzidos visando confirmar e assegurar sua eficácia (**Tabela 4**).

Tabela 4: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de *F. vulgare* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Extrato metanólico das frutas	<i>in vivo</i> (edema de pata, de orelha; indução de artrite; sensibilidade térmica)	Anti-inflamatório Analgésico	[1]
Óleo essencial das sementes	<i>in vivo</i> (ratos diabéticos induzidos)	Hipoglicemiante	[2]
Extrato etanólico e aquoso das sementes	<i>in vitro</i> (diversos ensaios)	Antioxidante	[3]
Extrato aquoso das folhas	<i>in vivo</i> (ratos anestesiados por pentobarbital)	Hipotensor	[4]
Extrato em acetona das sementes	<i>in vivo</i> (ratos)	Estrogênica	[5]
Fração em clorofórmio do extrato hidroalcoólico das sementes	<i>in vitro</i> (viabilidade celular – MCF-7 e MDA-MB-231)	Anticancerígeno (câncer de mama)	[6]
Extrato aquoso das sementes	<i>in vitro</i> (viabilidade parasitária)	Antiparasitário (<i>Blastocystis</i> spp.)	[7]
Óleo essencial comercial	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (diversos ensaios) <i>ex vivo</i> (anéis de aorta)	Antitrombótico Vasorelaxante	[8]
Óleo essencial das sementes	<i>in vivo</i> (Ratos – dano hepático induzido por CCl ₄)	Hepatoprotetor	[9]
Creme 2% do extrato etanólico das sementes	<i>in vivo</i> (Mulheres)	Anti-hirsutismo	[10]

[1] Choi & Hwang, 2004; [2] El-Soud et al., 2011; [3] Oktay, Gülçin, & Küfrevioğlu, 2003; [4] Abdul-Ghani & Amin, 1988; [5] Malini et al., 1984; [6] Syed et al., 2018; [7] Méabed et al., 2018; [8] Tognolini et al., 2007; [9] Özbek et al., 2003; [10] Javidnia et al., 2003.

Quanto à fitoquímica dessa espécie, a maior parte dos trabalhos devotou-se ao estudo dos componentes voláteis. A composição química do óleo essencial de *F. vulgare* varia de acordo com a região, tendo sido descrito mais de 87 substâncias diferentes sendo o *trans*-anetol, estragol, limoneno e fenchona, os constituintes

majoritários (Badgujar et al., 2014; De, 2004). Flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, derivados da benzoisofuranona e poliacetilenos são os principais tipos de substâncias não voláteis encontrados nesta espécie (Badgujar et al., 2014; Garga et al., 2009; W. He & Huang, 2011; Rather et al., 2016). A **Figura 9** exemplifica algumas substâncias identificadas em *F. vulgare*.

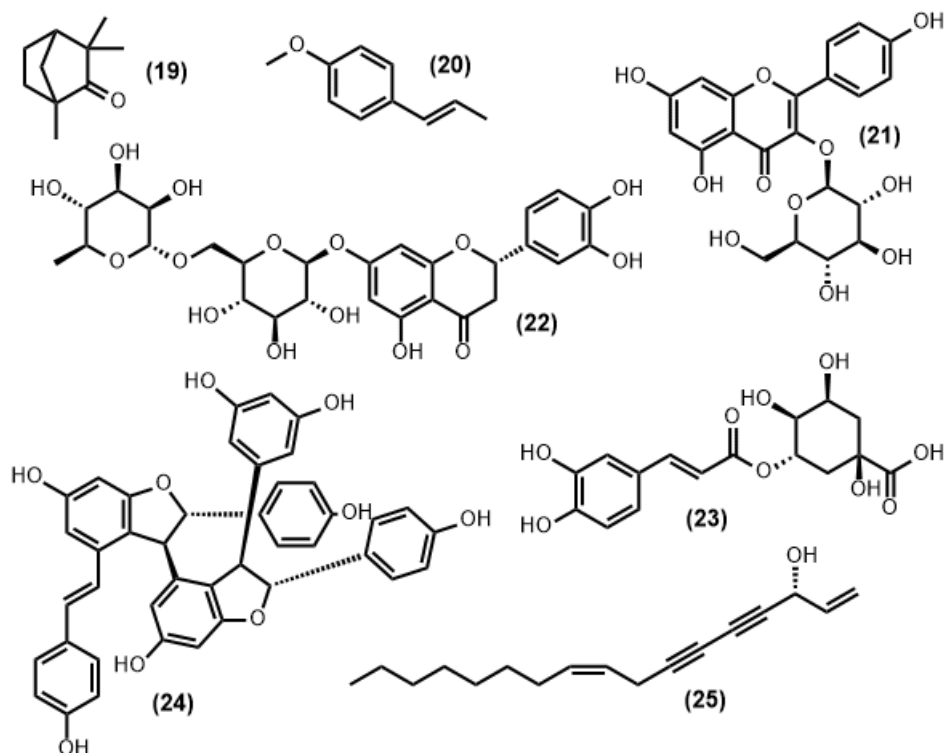


Figura 9: Exemplos de substâncias encontradas em *F. vulgare* ilustrando as classes de maior ocorrência: monoterpenos (19 e 20), flavonoides (21 e 22), polifenóis (23), estilbenoides (24) e poliacetilenos (25). (19) – fenchona; (20) – *trans*-anetol; (21) – astragalina; (22) – eriocitrina; (23) – ácido clorogênico; (24) – miyabenol C; (25) – falcarinol.

A fenchona e o *trans*-anetol são um dos constituintes majoritários do óleo essencial e conferem sabor/aroma adocicado característico da espécie. Os flavonoides, em especial flavonóis e flavanonas glicosiladas, possuem significativa ocorrência nesta planta, enquanto que os poliacetilenos são considerados marcadores quimiosistemático da família Apiaceae (De, 2004; W. He & Huang, 2011; Rather et al., 2016).

2.6. *Lippia alba* e *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae)

A família Verbenaceae é formada por plantas de hábito herbáceo, arbustivo e arbóreo de distribuição tropical e subtropical. A quantidade de gêneros e espécies é incerta e alguns autores apontam entre 35 a 100 gêneros e 1035 a 2600 espécies (Gomes, Nogueira, & Moraes, 2011; Sena Filho et al., 2007). Segundo Salimena & Múlgura (2015) o Brasil detém maior diversidade dessa família compreendendo 16 gêneros e 290 espécies das quais 191 são endêmicas.

Diversas espécies dessa família são utilizadas na alimentação como *Lippia dulcis* devido à presença da (+)-hernandulcidina, uma substância que lhe confere característica adocicada; e no tratamento de doenças como *Lantana camara* (cambará) e *Vitex polygama* (azeitona do mato) que são utilizadas, respectivamente, no tratamento de afecções das vias respiratórias e de doenças reumáticas. Entre os gêneros com maior quantitativo de espécies aparecem: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (Gomes et al., 2011; Grandi et al., 1989; Salimena & Múlgura, 2015; Sena Filho et al., 2007; Senatore & Rigano, 2001).

O gênero *Lippia* compreende cerca de 200 espécies distribuídas nos países das Américas do Sul e Central e na África tropical. Aproximadamente 120 espécies ocorrem no Brasil apresentando grande relevância etnofarmacológica. *L. alba* é utilizada como anti-inflamatório e sedativo, *L. gracilis* é usada como anti-inflamatório e cicatrizante e *L. origanoides* no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias (**Figura 10**) (Gomes et al., 2011; Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, & Stashenko, 2009; Pascual et al., 2001).



Figura 10: Exemplos do gênero *Lippia*. **A)** *L. alba* (erva-cidreira); **B)** *L. gracilis* (Alecrim-da-chapada); **C)** *L. origanoides* (Alecrim-da-Angola). Fonte: Google Imagens.

A espécie *Lippia alba* apresenta-se como um arbusto com ramos quadrangulares, folhas membranosas, opostas, e flores branca ou rosa. É popularmente conhecida como erva-cidreira, cidreira, e outros nomes que fazem menção ao seu aroma agradável. Ocorre em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas. Possui grande importância na medicina popular sendo,

muita das vezes, a espécie mais citada em investigações etnofarmacológicas. Esta planta é utilizada no tratamento de bronquite, diarreia, hipertensão, problemas digestivos, náuseas, resfriados, e ainda como analgésico, cicatrizante e sedativo. Sua ampla utilização medicinal motivou a realização de estudos farmacológicos e algumas atividades verificadas são demonstradas na **Tabela 5** (Hennebelle et al., 2008; Olivero-Verbel et al., 2009; Timóteo et al., 2015).

Tabela 5: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de *L. alba* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Extrato em acetato de etila e em metanol das raízes	<i>in vitro</i> (inibição de crescimento bacteriano)	Antibacteriana (contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumonia</i>)	[1]
Extrato etanólico das folhas e frações	<i>in vitro</i> (inibição de diferentes vírus)	Antiviral (contra Herpes resistente e poliovírus)	[2]
Óleo essencial das partes aéreas	<i>ex vivo</i> (duodeno e íleo isolados - ratos)	Antiespasmódica	[3]
Extrato hidroetanólico (70%) das folhas	<i>in vivo</i> (Mulheres)	Analgésica (contra enxaqueca)	[4]
Óleo essencial das folhas	<i>in vitro</i> (concentração mínima inibitória)	Antimicobacteriano (contra <i>Candida albicans</i>)	[5]
Extrato etanólico das partes aéreas	<i>ex vivo</i> (anéis de aorta torácica – ratos)	Vasodilatador leve	[6]
Óleo essencial das folhas	<i>in vivo</i> (Ratos – labirinto T elevado)	Ansiolítico	[7]
Extrato aquoso das folhas	<i>ex vivo</i> (coração isolado – ratos)	Bradicárdico	[8]
Óleo essencial das partes aéreas	<i>in vitro</i> (inibição do desenvolvimento parasitário)	Antiprotozoário (<i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>)	[9]
Extrato etanólico das folhas	<i>in vitro</i> (DPPH e homogenatos – fígado e cérebro)	Antioxidante	[10]

[1] Sena-Filho et al., 2006; [2] Andrighetti-Fröhner et al., 2005; [3] Blanco et al., 2013; [4] Carmona et al., 2013; [5] Duarte et al., 2005; [6] Guerrero et al., 2002; [7] Hatano et al., 2012; [8] Gazola et al., 2004; [9] Escobar et al., 2010; [10] Chies et al., 2013.

Quanto à composição química desta espécie, é descrito a ocorrência de substâncias fenólicas como feniletanoides, fenilpropanoides e flavonoides glicosilados, além de iridoides, terpenoides e saponinas (**Figura 11**) (Barbosa et al., 2006; Barbosa, Lima, & Silveira, 2005; Farias et al., 2010; Sena Filho et al., 2007; Timóteo et al., 2015).

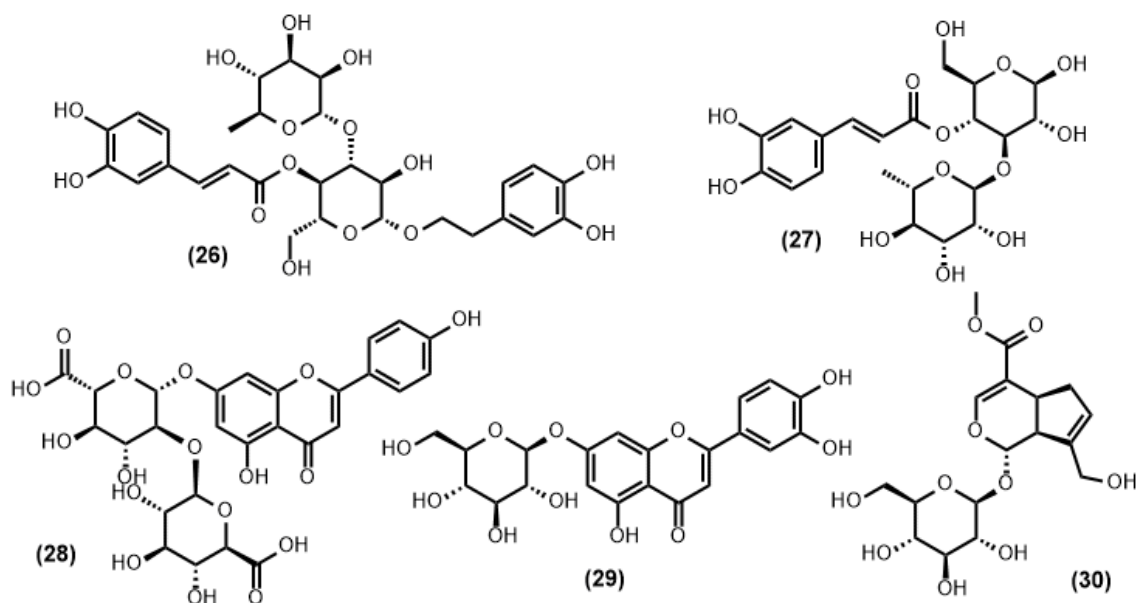


Figura 11: Exemplos de substâncias encontradas em *L. alba* ilustrando as classes de maior ocorrência: feniletanoides (26), fenilpropanoides (27), flavonoides (28 e 29) e iridoides (30). (26) – acteosideo; (27) – cistanosideo F; (28) – apigenina-7-diglicuronídeo; (29) – luteolina-7-glicosídeo; (30) – geniposídeo.

Feniletanoides glicosilados como o acteosideo são componentes característicos da família Verbenaceae, enquanto que os iridoides, como geniposídeo, são característicos dos gêneros *Lippia*, *Lantana*, *Phyla*, *Stachytarpheta* e *Aloysia* (Barbosa et al., 2006).

O gênero *Stachytarpheta* compreende 133 espécies distribuídas principalmente nas Américas. No Brasil é descrito a ocorrência de 79 espécies sendo muitas delas utilizada na medicinal popular. *S. cayennensis* é usada no tratamento de distúrbios estomacais e respiratórios, *S. elatior* no tratamento de doenças respiratórias e *S. jamaicensis* no tratamento de úlceras, disenteria e verminoses (Figura 12) (Almeida et al., 1995; Atkins, 2005; da Silva et al., 2013; Agra, Freitas, & Barbosa-Filho, 2007; Fenner et al., 2006; Onofre, Kagimura, & Mattiello, 2014).



Figura 12: Exemplos do gênero *Stachytarpheta*. **A)** *S. cayennensis* (gervão-roxo); **B)** *S. elatior* (gervão); **C)** *S. jamaicensis* (chá-do-Brasil). Fonte: Google Imagens.

A espécie *Stachytarpheta cayennensis* é uma planta herbácea de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, em especial nas Américas. É popularmente conhecida como gervão-roxo, rinchão, gervão-do-campo e vassourinha-de-botão. É utilizada com finalidade medicinal no tratamento de dores no peito e estomacais, diarreia e verminoses, além de ser empregada como anti-inflamatório, ansiolítico, diurético, estimulante, sudorífico, entre outras finalidades. Alguns estudos farmacológicos corroboram suas aplicações medicinais (**Tabela 6**) (Okoye et al., 2010; Onofre et al., 2014; Penido et al., 2006; Schapoval et al., 1998).

Tabela 6: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de *S. cayennensis* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Infusão, decocção e extrato hidroetanólico (70%) das folhas e frações	<i>in vivo</i> (ratos – edema de pata; sensibilidade térmica)	Anti-inflamatório e Antinociceptivo	[1]
Óleo essencial das folhas	<i>in vitro</i> (contra diferentes sorotipos de <i>Escherichia coli</i>)	Antibacteriano (contra 4 dos 11 sorotipos)	[2]
Extrato aquoso das folhas	<i>in vivo</i> (ratos e camundongos)	Antidiarreica	[3]
Extratos hidroetanólico (70% e 96%)	<i>in vivo</i> (camundongos)	Anti-inflamatório e gastroprotetor	[4]
Extrato metanólico das folhas e frações	<i>in vitro</i> (antimicrobiano) <i>ex vivo</i> (antiespasmódico)	Antimicrobiano e antiespasmódico	[5]
Extrato aquoso e metanólico das folhas e suas frações	<i>in vivo</i> (ratos com diabetes induzida)	Hipoglicemiante	[6]
Extrato etanólico das folhas	<i>in vivo</i> (camundongos infectados com malária)	Antiparasitário (contra Malária)	[7]
Fração butanólica do extrato aquoso das folhas	<i>in vitro</i> (viabilidade de enzimas e do parasita)	Antiparasitário (contra Leishmaniose)	[8]
Extrato aquoso da planta inteira	<i>in vivo</i> (úlceras induzidas – camundongos)	Antiulcerogênico	[9]
Extrato metanólico das folhas e suas frações	<i>in vivo</i> (camundongos – hipnose por pentobarbital e labirinto T elevado)	Sedativo Ansiolítico	[10]

[1] Schapoval et al., 1998; [2] Duarte et al., 2007; [3] Almeida et al., 1995; [4] Penido et al., 2006; [5] Okoye et al., 2010; [6] Adebajo et al., 2007; [7] Okokon, Ettebong, & Antia, 2008; [8] Maquiaveli et al., 2016; [9] Vela et al., 1997; [10] Olayiwola, Ukponmwan, & Olawode, 2013.

A composição química de *S. cayennensis* é bastante parecida com a de *Lippia* embora menos explorada. Os estudos conduzidos até o momento revelaram a presença de substâncias como feniletanoides, iridoides e terpenoides. Estudos qualitativos sugerem a presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas, entretanto, não há relatos de isolamento destas classes de metabólitos. Conforme mencionado anteriormente, feniletanoides são considerados marcadores da família Verbenaceae, enquanto que iridoides são característicos de alguns gêneros como

Lippia, *Stachytarpheta*, entre outros (**Figura 13**) (Barbosa et al., 2006; Froelich et al., 2008; Leitao et al., 2005; Souza et al., 2010, 2011; Vela et al., 1997).

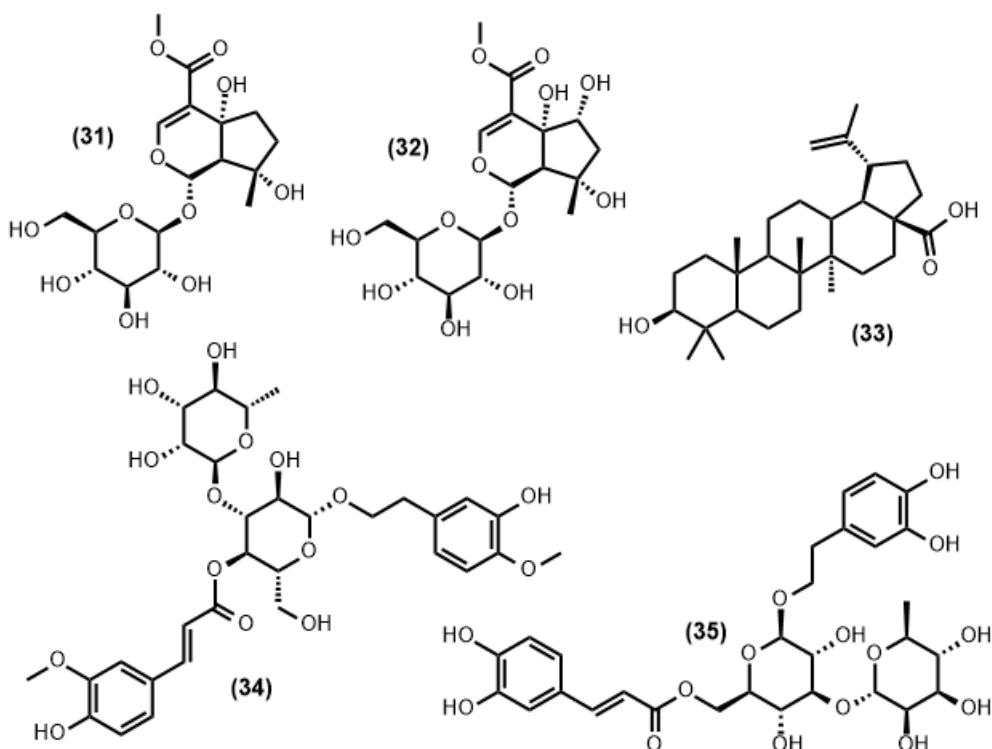


Figura 13: Exemplo de substâncias encontradas em *S. cayennensis* ilustrando as classes de maior ocorrência: iridoides (**31** e **32**), terpenoides (**33**) e feniletanoides (**34** e **35**). (**31**) – ipolamiida; (**32**) – 6β-hidroxi-ipolamiida; (**33**) – ácido betulínico; (**34**) – martinósideo; (**35**) – isoacteosideo.

2.7. *Ocimum basilicum* (Lamiaceae)

A família Lamiaceae apresenta significativa distribuição no mundo e compreende aproximadamente 252 gêneros e 7000 espécies, sendo a maioria delas aromáticas. As plantas desta família apresentam elevada importância na medicina, além de serem amplamente utilizadas na culinária como especiarias. Assim, muitas espécies são cultivadas visando finalidades comerciais. Espécies importantes desta família incluem *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (salvia) e *Thymus vulgaris* (tomilho) (A. K. Pandey, Singh, & Tripathi, 2014).

O gênero *Ocimum* compreende espécies amplamente distribuídas pelas regiões temperadas do mundo. O número de espécies que este gênero abrange é controverso, podendo variar entre 65 a 200 espécies de acordo com o padrão de estudo. Tal divergência se deve ao elevado grau de polimorfismo que acarreta em subespécies e variedades. Apesar desta problemática, muitas espécies são cultivadas com finalidade comercial, seja para fins de extração do seu óleo essencial ou para alimentação. O óleo essencial destas espécies é amplamente comercializado pelo mundo, sendo utilizado como flavorizante, conservante e também para fins medicinais. Espécies importantes deste gênero abrangem *O. basilicum* (manjeriçã), *O. gratissimum* (alfavacão) e *O. canum* (alfavaca), que são utilizadas com finalidade medicinal e alimentícia, e ainda *O. sanctum* (manjeriçã-sagrado) que, além de medicinal, é considerada uma planta sagrada pelos indianos (**Figura 14**) (Grayer et al., 2002; A. K. Pandey et al., 2014; Vieira et al., 2014).



Figura 14: Exemplos do gênero *Ocimum*. **A)** *O. basilicum*; **B)** *O. gratissimum*; **C)** *O. canum*; **D)** *O. sanctum*. Fonte: Google Imagens.

Ocimum basilicum é um arbusto ereto, anual, de médio porte, de aroma forte e característico, originário da Ásia e amplamente cultivado pelo mundo. Seu óleo essencial possui grande importância econômica sendo utilizado tanto para fins

alimentícios quanto medicinais. Em alguns lugares, também é utilizada na ornamentação (Adigüzel et al., 2005; Bilal et al., 2012; Khair-ul-Bariyah, Ahmed, & Ikram, 2012).

Popularmente conhecido como manjeriço, esta espécie apresenta diversas finalidades medicinais como anti-inflamatória, antiulcerogênica, carminativo, sedativa, e ainda no tratamento de câimbras, dores, diabetes, problemas da via respiratória, entre outras finalidades (Adigüzel et al., 2005; Hussain et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Selvakkumar et al., 2007). Alguns estudos farmacológicos de *O. basilicum* são exemplificados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Algumas das atividades farmacológicas de diferentes partes de *O. basilicum* determinadas por diferentes ensaios.

Parte analisada	Tipo de ensaio	Atividades determinadas	Ref.
Extrato metanólico e aquoso das partes aéreas	<i>in vivo</i> (úlceras induzidas por aspirina – ratos)	Antiulcerogênico	[1]
Óleo essencial das folhas	<i>in vivo</i> (hipnose e convulsão induzida -camundongos)	Anticonvulsivante Sedativo	[2]
Óleo essencial	<i>in vitro</i> (viabilidade parasitária)	Antiparasitário (contra <i>Trypanosoma cruzi</i>)	[3]
Extrato metanólico da planta inteira	<i>in vitro</i> (viabilidade de citocinas pró-inflamatórias)	Anti-inflamatório	[4]
Diferentes extratos das partes aéreas	<i>in vitro</i> (concentração mínima inibitória)	Antimicrobiano	[5]
Extrato aquoso das folhas	<i>in vitro</i> (diferentes ensaios de viabilidade viral)	Antiviral (contra HIV-1)	[6]
Extrato hidrometanólico (70%) das folhas	<i>in vitro</i> (inibição de acetilcolinesterase) <i>in vivo</i> (labirinto em cruz elevado e estímulo aversivo)	Anti-amnésico	[7]
Extrato aquoso das partes aéreas	<i>in vivo</i> (Ratos hipertensos – 2K1C)	Anti-hipertensivo Cardioprotetor	[8]
Extrato hidroalcoólico das folhas	<i>in vitro</i> (diferentes ensaios)	Antioxidante Anti-inflamatório	[9]
Extrato aquoso das partes aéreas	<i>ex vivo</i> (anéis de aorta torácica) <i>in vitro</i> (agregometria ótica)	Vasorelaxante Anticoagulante	[10]

[1] Akhtar & Munir, 1989; [2] Oliveira et al., 2009; [3] Santoro et al., 2007; [4] Selvakkumar et al., 2007; [5] Adigüzel et al., 2005; [6] Yamasaki et al., 1998; [7] Singh et al., 2016; [8] Umar et al., 2010; [9] Güez et al., 2017; [10] Amrani et al., 2009.

Do ponto de vista químico, existe uma vasta quantidade de estudos focados na determinação da composição do óleo essencial de *O. basilicum*. O elevado grau de polimorfismo nessa espécie contribui para uma maior ocorrência destes estudos já que podem contribuir na identificação de variedades e subespécies. De um modo geral os principais constituintes do óleo são linalol, cânfora, geraniol e eucaliptol (**Figura 15**). Quanto aos constituintes não voláteis são descritos a ocorrência de polifenóis,

terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides (**Figura 15**) (Bilal et al., 2012; Grayer et al., 2002; Khair-ul-Bariyah et al., 2012; Siddiqui et al., 2007; Siddiqui et al., 2012).

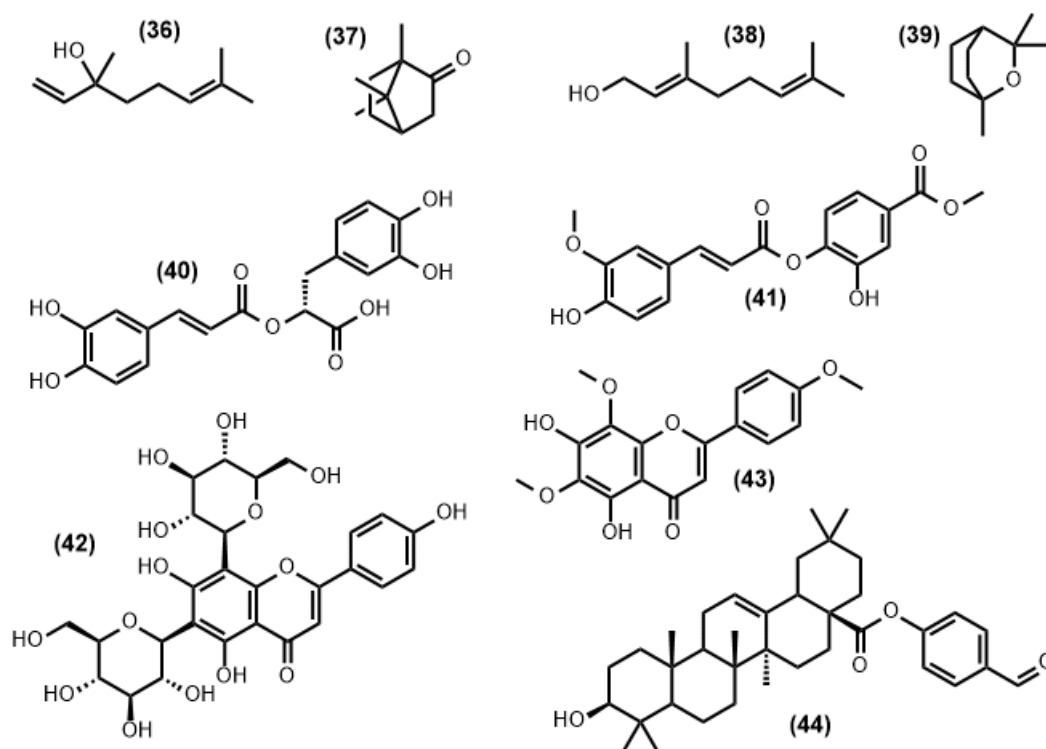


Figura 15: Exemplos de substâncias encontradas em *O. basilicum* ilustrando as classes de maior ocorrência: monoterpenos (**36-39**), polifenóis (**40 e 41**), flavonoides (**42 e 43**) e triterpenos (**44**). (**36**) – linalool; (**37**) – cânfora; (**38**) – limoneno; (**39**) – eucaliptol; (**40**) – ácido rosmarínico; (**41**) – 4'-carbometoxi-2'-hidroxifenil ferulato; (**42**) – vicenina-2; (**43**) – nevadensina; (**44**) – basilol.

Flavonoides metoxilados como a nevadensina são comuns na família Lamiaceae, especialmente nos gêneros *Thymus*, *Salvia* e *Ocimum*. Essas substâncias ocorrem na superfície de folhas, galhos e inflorescências. Já os flavonoides glicosilados, como a vicenina-2, são encontrados apenas a nível intracelular, armazenada nos vacúolos das folhas (Berim & Gang, 2015; Grayer et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial anti-hipertensivo das plantas medicinais erva-cidreira (*Lippia alba*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), gervão-roxo (*Stachytarpheta cayennensis*), gurdumão (*Alpinia zerumbet*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis*) utilizadas popularmente na região Norte Fluminense e identificar possíveis metabólitos envolvidos no efeito.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a análise metabolômica dos extratos das plantas usando técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas.
- Avaliar o potencial hipotensor dos extratos vegetais em ratos normotensos anestesiados.

4. METODOLOGIA

4.1. Análise metabólica

4.1.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As seis espécies vegetais utilizadas no tratamento da hipertensão descritas no levantamento etnofarmacológico conduzido por Neves (2012) foram coletadas em municípios próximos com o auxílio de “mateiros”. Exsiccatas das espécies foram preparadas e levadas ao Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (HUENF) onde foram identificadas e armazenadas (**Tabela 8**). O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante (MA035/1152, Marconi) à 45°C por um período de 2 a 3 dias. Uma vez seco, cada material foi triturado em moinho de facas e acondicionado em sacos plásticos até o preparo dos extratos. Exceções à metodologia proposta foram as espécies: erva-cidreira e gervão-roxo que foram secos a temperatura ambiente; e o gurdumão que precisou ser congelado com nitrogênio líquido e posteriormente triturado em liquidificador industrial, uma vez que suas folhas apresentam caráter coriáceo e não foram devidamente trituradas pelo moinho de facas (**Tabela 8**).

Tabela 8: Informações sobre coleta, identificação e preparo das amostras vegetais.

Espécie	Data de coleta	Local de coleta	Quantidade coletada	Número de identificação	Forma de secagem	Forma de trituração	Parte trabalhada
Erva-cidreira	09/10/2015	Saturnino Braga, Campos dos Goytacazes – RJ	67,70 g	HUENF 11008	Ar livre	Moinho de facas	Folhas
Erva-doce	27/09/2015	São José do Calçado – ES	50,2 g	HUENF 11010	Estufa de ar circulante	Moinho de facas	Partes aéreas
Gervão-roxo	14/10/2015	Bom Jesus do Itabapoana – RJ	187,93 g	HUENF 5329	Ar livre	Moinho de facas	Folhas
Gurdumão	20/07/2015	Campos dos Goytacazes – RJ	843,41 g	HUENF 11002	Estufa de ar circulante	Congelamento com nitrogênio líquido e trituração por liquidificador	Partes aéreas
Manjerição	27/09/2015	São José do Calçado – ES	78,41 g	HUENF 9950	Estufa de ar circulante	Moinho de facas	Partes aéreas
Sete-sangrias	30/09/2015	Bom Jesus do Itabapoana – RJ	2,1 Kg	HUENF 11003	Estufa de ar circulante	Moinho de facas	Partes aéreas

4.1.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Exatos 25 g de cada planta triturada foram acondicionados em erlenmeyers de 250 mL. Para cada planta foi feito dois extratos, totalizando 50 g de material a ser extraído. A extração se deu em incubadora *shaker* (SL-222, Solab) sob agitação constante a 135 rpm e temperatura controlada (30°C), por 24h. Utilizaram-se solventes de padrão analítico da marca Synth, respeitando sempre a relação planta: solvente de 1:6, ou seja, 150 mL de solvente para cada 25 g de material a extrair. Cada frasco contendo o material vegetal (25 g) foi extraído seis vezes: três vezes com clorofórmio (1ª, 2ª e 3ª extrações) e três vezes com metanol (4ª, 5ª e 6ª extrações). Ao fim das extrações com clorofórmio (3ª extração), o material vegetal foi seco a fim de remover o solvente residual para então proceder com a extração com metanol. Cada extrato obtido ao fim das 24h foi acondicionado em frascos separados a fim de determinar o rendimento de cada etapa e verificar se houve decréscimo significativo no rendimento. Uma vez calculado o rendimento, os extratos foram agrupados em outros recipientes, constituindo assim um único extrato clorofórmico e um único extrato metanólico. A **Figura 16** apresenta um esquema do processo de extração.

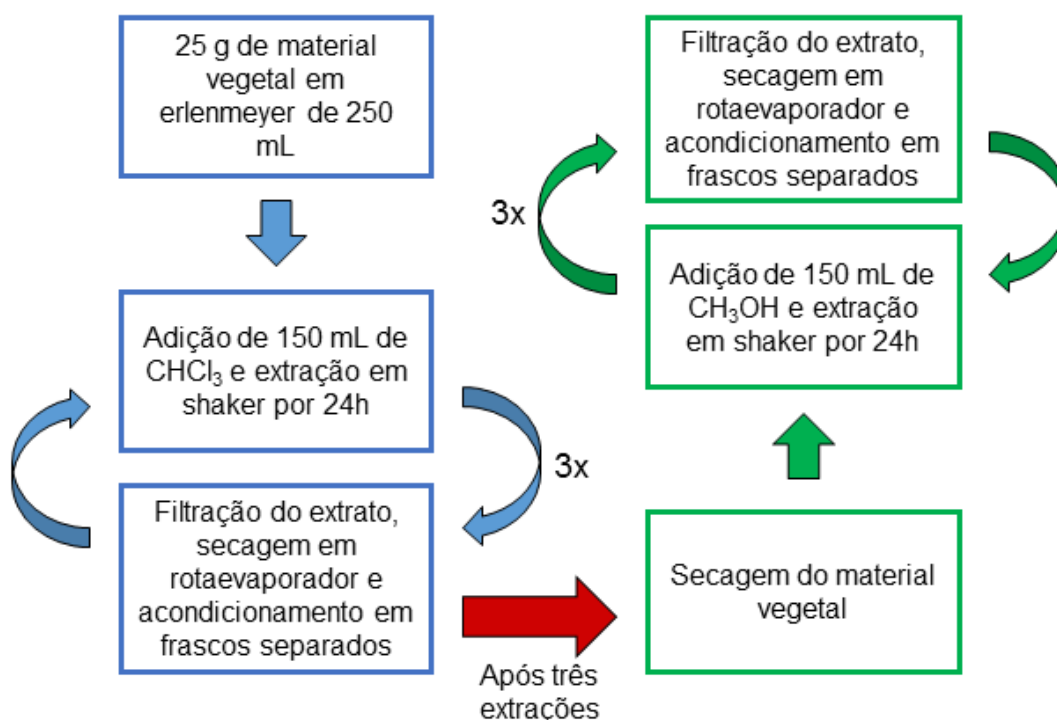


Figura 16: Esquema do processo de extração utilizado demonstrando cada etapa.

Os extratos metanólicos foram liofilizados (Liotop – L101) a fim de remover a água residual e possibilitar o cálculo preciso do seu rendimento. Os rendimentos de cada um dos extratos obtidos são descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Rendimento percentual e quantidade em gramas obtida dos extratos em clorofórmio (CHCl_3) e em metanol (CH_3OH) das plantas estudadas. **EC** – erva cidreira; **ED** – erva-doce; **GR** – gervão-roxo; **GU** – gurdumão; **MA** – manjerição; **SS** – sete-sangrias.

	EC	ED	GR	GU	MA	SS
CHCl_3	2,6678% (1,3339 g)	2,6542% (1,3271 g)	3,3764% (1,6882 g)	2,1666% (1,0833 g)	3,3656% (1,6828 g)	3,0868% (1,5434 g)
CH_3OH	11,1576% (5,5788 g)	12,5448% (6,2724 g)	26,3268% (13,1634 g)	6,1836 % (3,0918 g)	6,3720% (3,1860 g)	14,8190% (7,4095 g)

4.1.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DA SETE-SANGRIAS (ACM)

Devido ao alto teor de taninos encontrados no extrato metanólico da sete-sangrias (ACM) optou-se pelo fracionamento deste visando obter frações com diferentes características químicas. O extrato ACM foi submetido à cromatografia em coluna aberta utilizando Amberlite XAD-2 como fase estacionária. Gradientes de água destilada e metanol foram utilizadas como fase móvel e acetato de etila (AcOEt , P.A. – Synth) foi utilizado para limpeza da fase estacionária. Pouco menos de 1 g do extrato ACM foi solubilizado em 10 mL de água destilada e injetado na coluna. A eluição se iniciou com água destilada seguida por 25% $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 50% $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 100% MeOH ; e 100% AcOEt . Obtiveram-se cinco frações (F1-F5) que foram secas em evaporador rotatório e posteriormente liofilizadas. Este procedimento foi repetido duas vezes a fim de aumentar os rendimentos das frações. A análise de similaridade das frações (F1-F5) em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) resultou em duas novas frações denominadas ACM 1 (F1-F2 – 1,337 g) e ACM 2 (F3-F5 – 120,3 mg).

4.1.4. ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Dez miligramas de cada extrato foram acondicionados em tubos eppendorf de 2 mL (Axygen). Os extratos em clorofórmio foram solubilizados em clorofórmio deuterado (CDCl_3 – Cambridge Isotope Laboratories) enquanto os extratos metanólicos e frações oriundas destes foram solubilizados em metanol deuterado (CD_3OD – Cambridge Isotope Laboratories). Posteriormente os extratos dissolvidos

foram transferidos para tubos de 5 mm específicos para RMN (Wilmad) e submetidos às análises.

Foi realizado também um procedimento de extração direta com solventes deuterados utilizando o material vegetal intacto, a fim de determinar possíveis diferenças entre os perfis químicos dos extratos já obtidos (**Seção 4.1.2.**) (Kim et al., 2010). Exatos 100 mg de material vegetal intacto foi pesado e acondicionado em tubos eppendorf de 2 mL, seguida pela adição de 800 µL do solvente deuterado. Cada tubo foi vigorosamente agitado em vórtex por 1 minuto (Kasvi K40-1010), colocadas em banho ultrassônico por 15 minutos (Kondortech 2,5 L) e, posteriormente, centrifugadas por 30 minutos (Microcentrifuga Kasvi K14-0602). Ao término deste processo, as amostras foram filtradas e transferidas para tubos de 5 mm específicos para RMN. Cada material vegetal foi extraído com clorofórmio e metanol deuterados, originando dois perfis químicos pelo processo de extração direta para cada planta estudada.

Os espectros foram obtidos num aparelho Bruker Ascend 500, operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . Os *fingerprints* dos extratos foram obtidos pelo acúmulo de espectros de RMN ^1H tal como descrito por Kim, Choi, & Verpoorte, 2010. Também foram realizadas as análises bidimensionais HSQC e HMBC com intuito de auxiliar na identificação das substâncias.

A análise quantitativa dos extratos metanólico por RMN (qRMN) se deu pela adição de quantidades conhecidas de um padrão interno. Floroglucinol (Sigma Aldrich/Vetec) foi escolhido como padrão interno devido seu elevado grau de pureza (98%), características espectroscópicas, estabilidade e solubilidade em metanol deuterado (CD_3OD). Foi preparada uma solução estoque 10 mg/mL de floroglucinol em CD_3OD . Dez miligramas do extrato metanólico da erva-cidreira (FLM), gervão-roxo (FSM) e manjerição (AOM) foi precisamente pesado e dissolvido em 500 µL de CD_3OD . Após completa solubilização, 100 µL da solução estoque foram adicionados e homogeneizados em vórtex. A amostra foi transferida para tubos específicos para RMN e imediatamente analisadas. Os espectros de ^1H RMN obtidos foram manualmente ajustados (fase, linha base e ajuste em função do TMS) antes de realizar a integração dos sinais. Em seguida, atribuiu-se um valor de 15 para o sinal do padrão interno (5,79 ppm) e então procedeu com a integração dos sinais dos componentes dos extratos. O cálculo das concentrações dos componentes foi feito utilizando a equação abaixo (Chauthe et al., 2012).

$$W_x = \left(\frac{A_x}{A_s}\right) \times \left(\frac{N_s}{N_x}\right) \times \left(\frac{M_x}{M_s}\right) \times W_s$$

Onde: W_x = massa do analito na solução

W_s = massa do padrão interno na solução

A_x = valor da integral do analito

A_s = valor da integral do padrão interno

N_x = número de prótons do sinal integrado (analito)

N_s = número de prótons do sinal integrado (padrão interno)

M_x = massa molecular do analito

M_s = massa molecular do padrão interno

4.1.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS METANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-ESI-EM-TOF)

Dez miligramas de cada extrato metanólico foi colocado em tubos eppendorf de 2 mL (Axygen). Os extratos foram solubilizados em 1 mL de uma solução 5% de acetonitrila (grau HPLC – Tedia) em água ultrapura (Sartorius Arium®), a exceção do extrato ACM que foi solubilizado em uma solução 5% de metanol (grau HPLC – Tedia) em água ultrapura. As amostras foram agitadas em vórtex, colocadas em banho ultrassônico por cerca de 10 minutos e, em seguida, centrifugadas por 30 minutos. Após esse processo, as amostras foram filtradas para vials âmbar de 2 mL utilizando membranas de nylon com poros de 0,45 μm (Tedia).

O sistema de CLAE-EM-ESI compreende um cromatógrafo Shimadzu UFLC equipado com duas bombas LC-20AD, degasseificador DGU-20A, injetor automático SIL-20A, forno CTO-20A, detector arranjo de diodos SPD-M20A e controladora CBM-20^a. Esse sistema está acoplado ao espectrômetro Bruker MicrOTOF-Q II equipado com fonte de ionização por spray de elétrons (*electrospray ionization* – ESI) e analisador de massas por tempo de voo (*time of flight* – TOF).

Para as separações cromatográficas foi utilizada a coluna Kinetex C-18 (75 mm x 2,1 mm x 1,7 μm – Phenomenex) equipada com pré-coluna SecurityGuard C-18 (Phenomenex). A fase móvel consistiu de gradientes de água ultrapura e acetonitrila (acidificados a 0,1% de ácido fórmico), exceto para análise do extrato ACM onde foi utilizado metanol (0,1% ácido fórmico) ao invés de acetonitrila. Após diversas eluições cromatográficas, os seguintes parâmetros foram estabelecidos para análise dos seis extratos (**Tabela 10**).

Tabela 10: Gradientes de eluição utilizados nas análises cromatográficas dos extratos.

AAM		ACM		AFM		AOM, FLM e FSM	
T	[B]	T	[B]	T	[B]	T	[B]
0 min	5%	0 min	5%	0 min	5%	1 min	5%
20 min	5%	40 min	10%	20 min	5%	24 min	9%
70 min	15%	110 min	17%	70 min	10%	30 min	9%
110 min	25%	120 min	100%	110 min	20%	35 min	13%
130 min	100%	140 min	100%	120 min	100%	50 min	13%
140 min	100%	145 min	5%	130 min	100%	70 min	20%
145 min	5%	150 min	5%	135 min	5%	80 min	20%
155 min	5%	-	-	145 min	5%	90 min	100%
-	-	-	-	-	-	100 min	100%
-	-	-	-	-	-	105 min	5%
-	-	-	-	-	-	110 min	5%

Legenda: **T** – tempo em minutos; **[B]** – concentração da fase móvel B; **AAM** – extrato metanólico do gurdumão; **ACM** – extrato metanólico da sete-sangrias; **AFM** – extrato metanólico da erva-doce; **AOM** – extrato metanólico do manjeriço; **FLM** – extrato metanólico da erva-cidreira; **FSM** – extrato metanólico do gervão-roxo.

4.2. Avaliação das atividades biológicas dos extratos

4.2.1. ANÁLISE HEMODINÂMICA EM RATOS

Ratos machos, albinos, Wistar, com peso entre 200 a 300 g foram obtidos no Biotério Central da UENF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas tendo livre acesso à água e ração, em ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro-escuro de 12 em 12 horas (luz das 7 às 19h).

Os animais foram anestesiados com solução inalante de isoflurano (Isoflorine®) para realização do processo de canulação da veia jugular direita, que foi utilizada para administração dos extratos, e da artéria carótida esquerda que foi utilizada para o registro dos parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial sistólica – PAS; pressão arterial média – PAM; pressão arterial diastólica – PAD; frequência cardíaca – FC) (**Figura 17**).

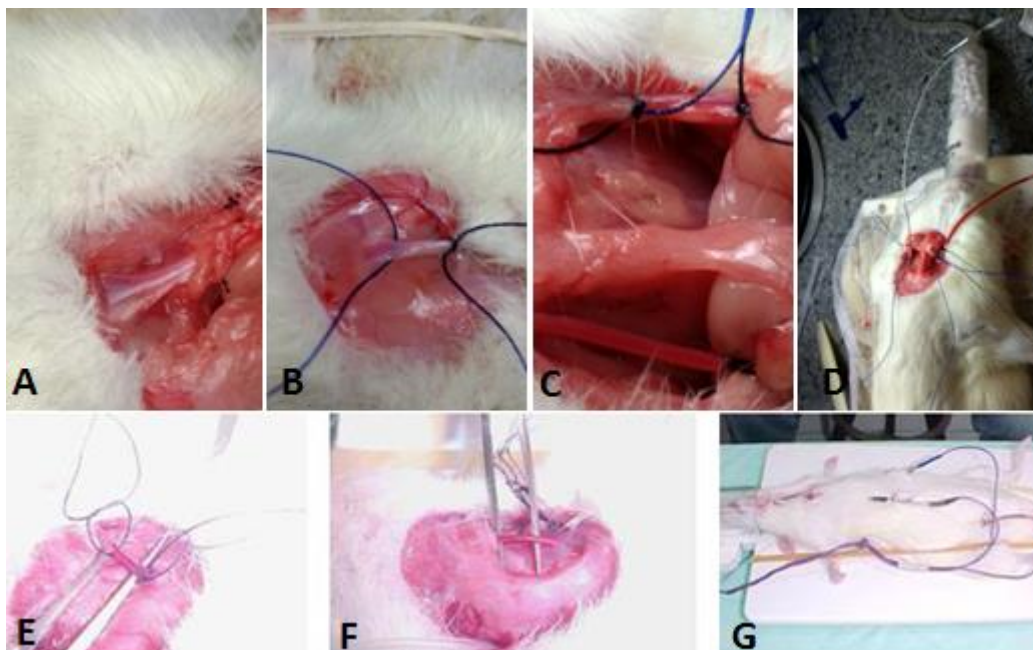


Figura 17: Fotos ilustrativas do preparo dos ratos para administração dos extratos, registro das pressões sistólica, diastólica e média, e eletrocardiografia. **A, B, C e D** – dissecação da veia jugular direita; **E e F** – dissecação da artéria carótida esquerda; **G** – eletrodos de eletrocardiografia (Cedido por Prof. Fernanda Antunes – LCCA/UENF).

Após a estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, P.A. – Vetec) foi injetado como controle já que o mesmo apresenta efeito hipotensor e, como foi usado como veículo (solvente) deve ser injetado primeiramente para permitir a correção do efeito hipotensor dos extratos. Uma vez normalizada a pressão arterial, $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de extrato foi injetado, diluído em 100 μL de DMSO.

Os registros da pressão arterial sistólica (PAS), média (PAM), diastólica (PAD) foram obtidos através de um transdutor de pressão (BioAmp – AdInstruments), possibilitando os registros de pressão em mmHg. Os eletrocardiogramas foram obtidos simultaneamente pelo mesmo aparelho. Uma vez reestabelecido uma condição hemodinâmica constante (platô), os animais foram eutanaziados por overdose de isoflurano.

4.2.2. ANÁLISE DA CAPACIDADE MOTORA DE CAMUNDONGOS

Utilizou-se um aparelho Rota Rod automatizado modelo EFF 411 (Insight®) equipado com uma barra de 8 cm de diâmetro disposta transversalmente a cerca de 20 cm do piso do equipamento e mantida sob rotação ajustável através de um motor. O equipamento é dividido em quatro baias de aproximadamente 10 cm de largura e possui cronômetros em cada baia, que são parados mediante a queda dos animais.

Camundongos machos pesando entre 25-30 g foram previamente testados na barra por 3 minutos e aqueles que não caíram foram selecionados para realização do ensaio. Cada animal ($n=10$) recebeu $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de extrato por via intraperitoneal. Diazepam ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi utilizado como controle positivo ($n=10$). Dado determinado intervalo de tempo após a administração da amostra (15, 30, 60, 90 e 120 minutos), os animais foram colocados na barra em movimento (10 rpm) a fim de verificar seu tempo de permanência na mesma por um período total de 3 minutos (25 rpm). Mediante a queda, o tempo de permanência foi anotado e o animal imediatamente recolocado na barra (**Figura 18**).



Figura 18: Foto ilustrativa do teste Rota Rod demonstrando o aparato e a avaliação de quatro animais simultaneamente (Acervo pessoal).

4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos nas avaliações biológicas são descritos como média \pm erro padrão da média. Os grupos de animais tratados foram comparados com o grupo controle e as diferenças foram estimadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido ao grande número de extratos e frações obtidos nesse estudo, optou-se pela criação de siglas a fim de minimizar a possibilidade de confusão entre os diferentes extratos (**Tabela 11**).

Tabela 11: Códigos utilizados para denominar os extratos e frações obtidas.

Planta	Extrato ou Fração	Sigla
Gurdumão (<i>Alpinia zerumbet</i>)	Extrato das partes aéreas em clorofórmio	AAC
	Extrato rápido das partes aéreas em clorofórmio deuterado	AAC-R
	Extrato das partes aéreas em metanol	AAM
	Extrato rápido das partes aéreas em metanol deuterado	AAM-R
Sete-sangrias (<i>Cuphea carthagenensis</i>)	Extrato das partes aéreas em clorofórmio	ACC
	Extrato rápido das partes aéreas em clorofórmio deuterado	ACC-R
	Extrato das partes aéreas em metanol	ACM
	Extrato rápido das partes aéreas em metanol deuterado	ACM-R
	Fração de alta polaridade oriunda de ACM	ACM 1
	Fração de média polaridade oriunda de ACM	ACM 2
Erva-doce (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Extrato das partes aéreas em clorofórmio	AFC
	Extrato das partes aéreas em metanol	AFM
Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	Extrato das partes aéreas em clorofórmio	AOC
	Extrato rápido das partes aéreas em clorofórmio deuterado	AOC-R
	Extrato das partes aéreas em metanol	AOM
	Extrato rápido das partes aéreas em metanol deuterado	AOM-R
Erva-cidreira (<i>Lippia alba</i>)	Extrato das folhas em clorofórmio	FLC
	Extrato rápido das folhas em clorofórmio deuterado	FLC-R
	Extrato das folhas em metanol	FLM
	Extrato rápido das folhas em metanol deuterado	FLM-R
Gervão-roxo (<i>Stachytarpheta cayennensis</i>)	Extrato das folhas em clorofórmio	FSC
	Extrato rápido das folhas em clorofórmio deuterado	FSC-R
	Extrato das folhas em metanol	FSM
	Extrato rápido das folhas em metanol deuterado	FSM-R

As espécies vegetais investigadas nesse estudo apresentam no mínimo dois extratos e no máximo seis extratos/frações. Destes, todos foram analisados por RMN a fim de obter seu perfil metabólico e identificar os constituintes presentes. No mais, os extratos metanólicos de cada uma das plantas foram analisados por CLAE-ESI-EM-TOF e submetidos à análise das atividades biológicas pelo ensaio hemodinâmico em ratos e pela avaliação da capacidade motora de camundongos (RotaRod). A **Tabela 12** detalha as investigações conduzidas com cada extrato.

Tabela 12: Investigações conduzidas com cada extrato/fração vegetal obtida.

Sigla	Análise metabólica			Análise biológica	
	RMN	qRMN	CLAE-EM	Hemodinâmica	RotaRod
AAC	X	-	-	-	-
AAC-R	X	-	-	-	-
AAM	X	-	X	X	X
AAM-R	X	-	-	-	-
ACC	X	-	-	-	-
ACC-R	X	-	-	-	-
ACM	X	-	X	X	X
ACM-R	X	-	-	-	-
ACM 1	X	-	-	-	-
ACM 2	X	-	-	-	-
AFC	X	-	-	-	-
AFM	X	-	X	X	X
AOC	X	-	-	-	-
AOC-R	X	-	-	-	-
AOM	X	X	X	X	X
AOM-R	X	-	-	-	-
FLC	X	-	-	-	-
FLC-R	X	-	-	-	-
FLM	X	X	X	X	X
FLM-R	X	-	-	-	-
FSC	X	-	-	-	-
FSC-R	X	-	-	-	-
FSM	X	X	X	X	X
FSM-R	X	-	-	-	-

Os resultados das identificações das substâncias presentes em cada um dos extratos/frações e de suas propriedades biológicas são descritos em tópicos separados para cada uma das espécies estudadas.

5.1. *Alpinia zerumbet* (Gurdumão)

5.1.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.1.1.1. Extratos em clorofórmio (AAC e AAC-R)

Os espectros de RMN do extrato AAC revelaram a presença de sinais característicos de ácidos graxos e kavalactonas. O mapeamento dos sinais presentes nos espectros HSQC e HMBC somada à comparação com dados de referência, possibilitaram a identificação de duas kavalactonas. Por outro lado, os espectros de RMN do extrato AAC-R apresentaram sinais menos abundantes, possibilitando apenas a identificação das classes de substâncias anteriormente citadas, de modo que os sinais característicos das kavalactonas observados nesse extrato possivelmente são referentes às mesmas kavalactonas identificadas em AAC. A **Tabela A1 (Apêndice 1)** resume as substâncias e as classes metabólicas identificadas em cada um dos onze extratos clorofórmicos analisados.

A ocorrência de ácidos graxos saturados nos extratos analisados foi evidenciada pela presença de um sinal em 0,88 ppm que quando não sobreposto se apresenta na forma de um tripleto com constante de acoplamento de 7,5 Hz; e um sinal largo em 1,30 ppm referente a cadeia de carbonos metilênicos. Os deslocamentos químicos observados para os ácidos graxos em AAC e AAC-R são dados na **Tabela A2 (Apêndice 1)**.

As principais evidências observadas no extrato AAC para a 5,6-desidrokaavaína são os sinais de hidrogênio olefínicos H7 e H8 em 6,58 ppm (d, 16,0 Hz) e 7,53 ppm (m) que indicam a configuração *trans*, além do acoplamento a longa distância entre o H5 em 5,95 ppm (d, 1,9 Hz) e H3 em 5,51 ppm (d, 1,9 Hz) correspondente a porção lactônica da molécula (**Figura 19**). Foi observado ainda um sinal em 3,83 ppm (s) referente aos hidrogênios da metoxila na posição 4. O mapa de correlação HSQC permitiu identificar os átomos de carbono correspondente a cada um dos hidrogênios mencionados anteriormente. Além disso, foi observado no mapa de correlação HMBC o acoplamento a três ligações ($^3J_{CH}$) entre os hidrogênios da metoxila (3,83 ppm, s) com o carbono em 171,4 ppm confirmando o substituinte na posição 4. Os deslocamentos químicos atribuídos a esta molécula foram comparados com dados da literatura (**Tabela 13**).

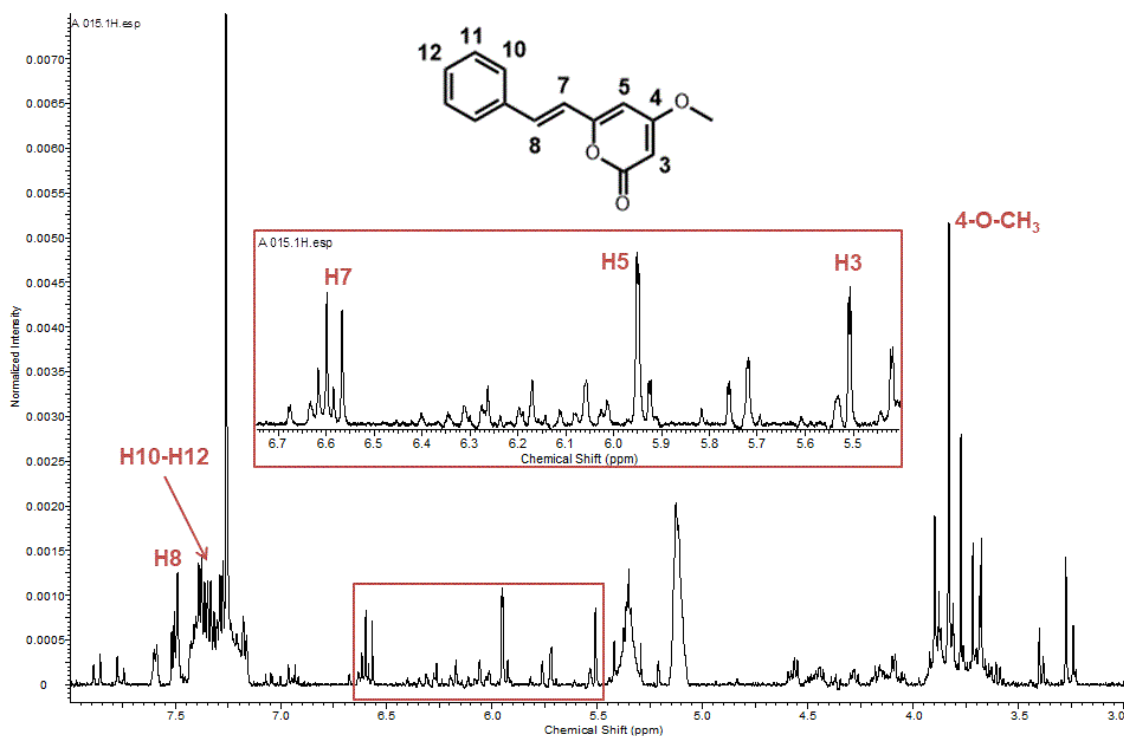


Figura 19: Ampliação (8,0 ppm – 3,5 ppm) do espectro em CDCl_3 de AAC e principais correlações observadas para a kavalactona 5,6-desidro-kavaína.

Tabela 13: Deslocamentos químicos da 5,6-desidro-kavaína observado no extrato AAC e comparação com dados da literatura.

N	5,6-desidro-kavaína			Referência*	
	^1H	^{13}C	HMBC	^1H	^{13}C
3	5,51 d 1,9	88,6	101,5	5,50 d	89,0
4	-	171,4	-	-	171,3
5	5,95 d 1,9	101,1	-	5,95 d	101,5
7	6,58 d 16,0	118,3	135,2	6,55 d	118,3
8	7,50 m	135,5	-	7,47 d	136,3
9	-	135,2	-	-	136,0
10 a 12	7,27 m	128	-	7,33 m	128,8
4-O-CH ₃	3,83 s	55,8	171,4	3,83 s	56,1

*Rao et al., 2014

A dihidro-5,6-desidro-kavaína, outra kavalactona, também foi identificada nesse mesmo extrato (AAC). Observou-se o acoplamento a longa distância característico entre os H3 e H5 de kavalactonas em 5,41 ppm (d, 1,9) e em 5,71 ppm (d, 1,9), respectivamente. Além disso, a presença de hidrogênios metilênicos em 2,74 ppm e em 2,96 ppm; e um sinal de metoxila em 3,72 ppm (s) são condizentes com as posições em H7, H8 e 4-O-CH₃, respectivamente (**Figura 20**). O mapa de correlação HSQC permitiu definir os carbonos ligados a estes átomos de hidrogênio, enquanto o

HMBC permitiu observar o acoplamento $^3J_{CH}$ entre a metoxila em 3,72 ppm e o átomo de carbono em 171,1 ppm, referente a C4. Os deslocamentos químicos atribuídos a esta molécula foram comparados com dados da literatura (**Tabela 14**).

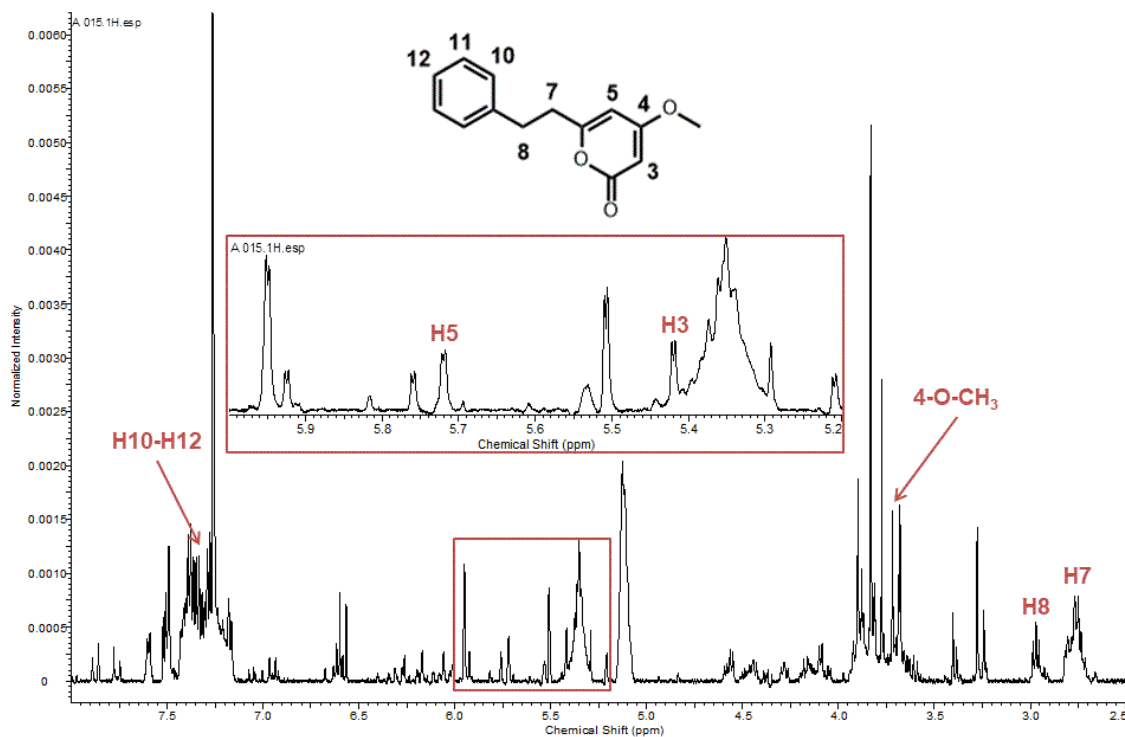


Figura 20: Ampliação (8,0 ppm – 2,5 ppm) do espectro em $CDCl_3$ de AAC e principais correlações observadas para a kavalactona dihidro-5,6-desidro-kavaína.

Tabela 14: Deslocamentos químicos da dihidro-5,6-desidro-kavaína observado no extrato AAC e comparação com dados da literatura.

N	dihidro-5,6-desidro-kavaína			Referência*	
	1H	^{13}C	HMBC	1H	^{13}C
3	5,41 d 1,9	87,4	100,0	5,34 d	87,9
4	-	171,1	-	-	171,3
5	5,71 d 1,9	100,0	87,4	5,64 d	100,4
6	-	164,3	-	-	165,1
7	2,74 m	35,1	164,3; 100,0; 32,6	2,68 t	35,6
8	2,96 m	32,6	164,3; 139,7; 35,1; 128,1	2,92 t	33,0
9	-	139,7	-	-	140,0
10 a 12	7,27 m	128,1	-	7,09-7,30	128,5
4-O-CH ₃	3,72 s	55,7	171,1	3,70 s	56,0

*Rao et al., 2014

Além das substâncias descritas anteriormente foram observados outros indícios de kavalactonas no extrato AAC. Dois dupletos com constante de

acoplamento de 2,1 Hz indicativos de acoplamento a longa distância, característicos da porção lactônica dessa classe de substâncias, foram observados na região entre 6,0 ppm e 5,0 ppm do espectro de ^1H (**Figura 21**). Outra evidência que corrobora este achado foi observada nos espectros HSQC e HMBC na região de metoxilas, onde é possível observar, além dos sinais descritos anteriormente, outros três sinais que acoplam a $^3\text{J}_{\text{CH}}$ com carbonos na região de 162 ppm a 171 ppm condizentes com C4 (**Figura 22**). Ambos os padrões observados se mostram semelhante às kavalactonas identificadas anteriormente e suportam a hipótese da presença de outros constituintes minoritários desta natureza no extrato AAC (Bilia et al., 2002).

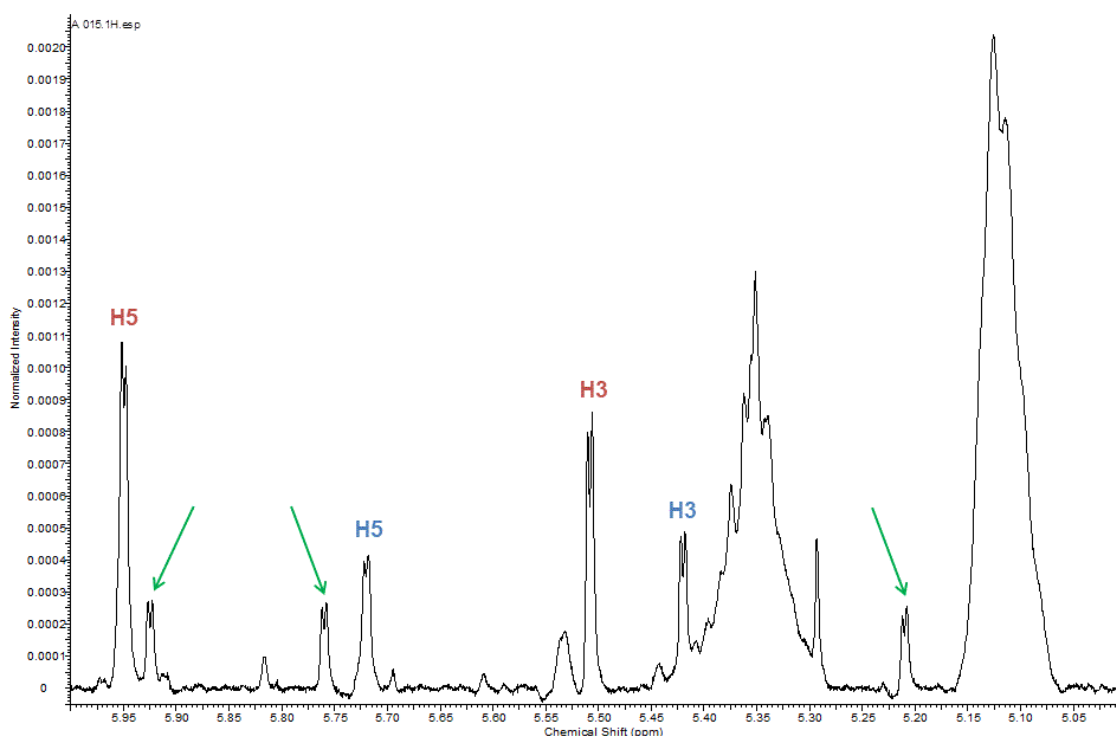


Figura 21: Ampliação (6,0 ppm – 5,0 ppm) do espectro em CDCl_3 de AAC demonstrando indícios de outras kavalactonas minoritárias. Vermelho – 5,6-desidrokavaína; azul – dihidro-5,6-desidrokavaína; verde – outras kavalactonas.

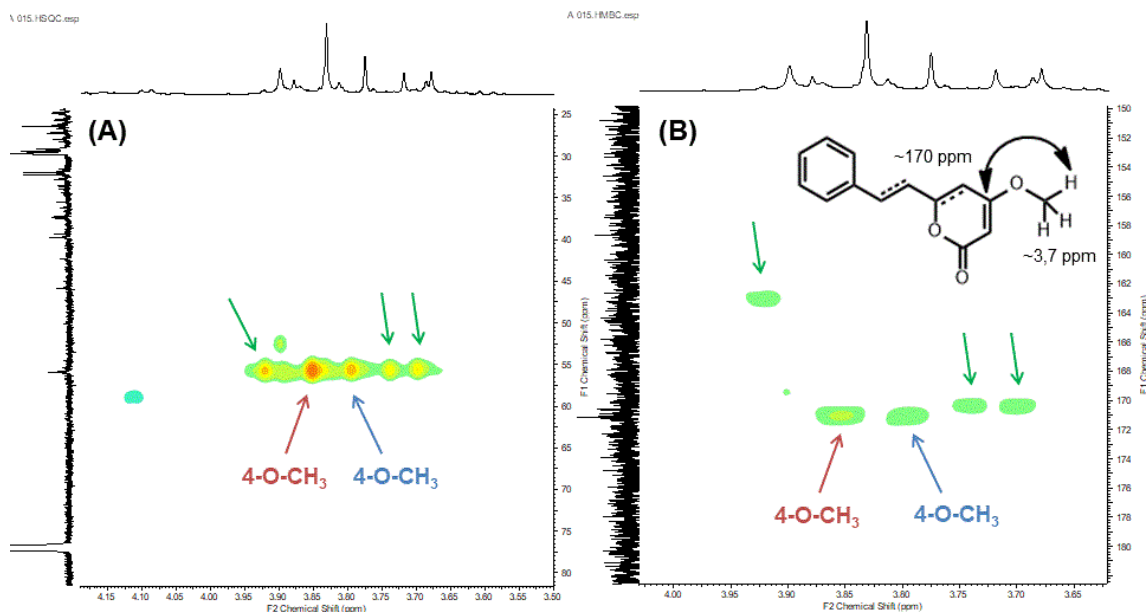


Figura 22: Ampliações dos espectros HSQC **(A)** e HMBC **(B)** demonstrando a presença de metoxilas características de kavalactonas no extrato AAC. Vermelho – 5,6-desidro-kavaína; azul – dihidro-5,6-desidro-kavaína; verde – outras kavalactonas.

Os espectros de AAC-R apresentaram menor resolução e quantidade de informações em comparação ao espectro de AAC. Entretanto, existem indícios suficientes que confirmam a presença de kavalactonas no extrato AAC-R. Apesar de não ser possível observar no espectro de ^1H o acoplamento a longa distância característico destas substâncias, foi possível verificar pelo HSQC a presença de pelo menos quatro sinais de metoxila na faixa de 3,94-3,71 ppm que acoplam a átomos de carbono na faixa de 55 ppm. O mapa de correlação HMBC revelou que pelo menos duas destas metoxilas acoplam a $^3\text{J}_{\text{CH}}$ com carbonos na faixa de 170 ppm, tal como descrito para as kavalactonas anteriores (**Figura 23**).

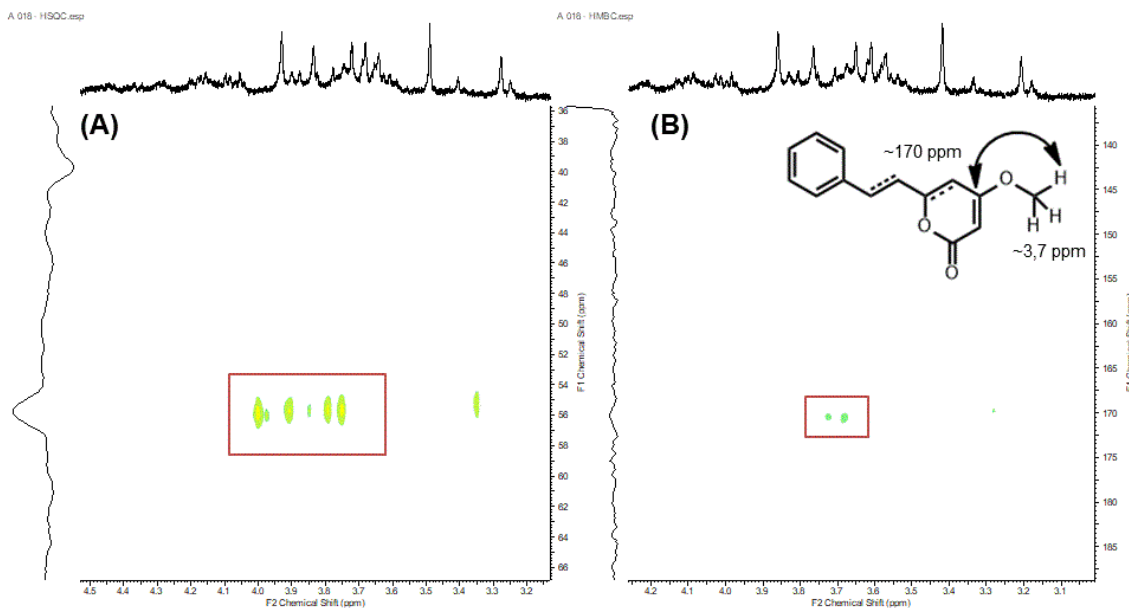


Figura 23: Ampliações dos espectros HSQC (A) e HMBC (B) demonstrando a presença de metoxilas características de kavalactonas no extrato AAC-R.

Além da menor quantidade de kavalactonas no extrato AAC-R, uma maior quantidade de sinais de substâncias graxas e esteroides foi evidenciada pela análise dos mapas de correlação bidimensionais. Tal diferença possivelmente se deve as diferenças no processo de extração. Deve-se ter em mente ainda que as folhas do gurdumão (*Alpinia zerumbet*) são bastante fibrosas e que o processo de trituração empregado não produziu partículas com a granulometria desejada. Este material com menor superfície de contato implica em uma maior dificuldade de extração.

As kavalactonas como a 5,6-desidrokaivaína e a dihidro-5,6-desidrokaivaína são frequentemente encontradas nas folhas e rizomas de *A. zerumbet*. Estas substâncias ocorrem em grandes quantidades sendo considerados constituintes majoritários das espécies do gênero *Alpinia* e por isso, são constantemente associadas a diversas atividades biológicas descritas, em especial aquelas relacionadas ao sistema nervoso central (Upadhyay et al., 2011; Victório, 2011). A identificação de kavalactonas em plantas medicinais por RMN já foi descrita por Bilia e colaboradores (2002). Neste estudo, os autores verificaram a presença de três tipos de esqueletos de kavalactonas em amostras comerciais de kava-kava (*Piper methysticum*) baseando-se, principalmente, na variação dos deslocamentos químicos de H3 e H5. Outras evidências tais como os sinais de hidrogênios olefínicos presentes em kavalactonas 7-8 insaturadas e dos hidrogênios metilênicos em kavalactonas 7-8-dihidrogenadas também foram descritos. Entretanto, devido a grande variedade de kavalactonas que ocorre no extrato, não foi possível determinar a estrutura de nenhum constituinte (Bilia et al., 2002).

Os espectros de RMN ^1H do gurdumão (AAC e AAC-R) foram um dos que apresentaram maior variação. A sobreposição desses revela que os sinais de AAC-R são menos intensos que os de AAC, sugerindo que a extração rápida foi menos efetiva do que a convencional. Esta menor intensidade dos sinais em AAC-R corrobora a maior dificuldade na identificação das kavalactonas. Comparado à AAC, o espectro de RMN ^1H de AAC-R revelou uma menor quantidade de sinais característicos dessas substâncias, de modo que a confirmação das kavalactonas no extrato foi amparada pelas análises HSQC e HMBC. A comparação das intensidades dos sinais de metoxila entre 4,0 ppm e 3,5 ppm, exemplifica as diferenças observadas (**Figura 24**).

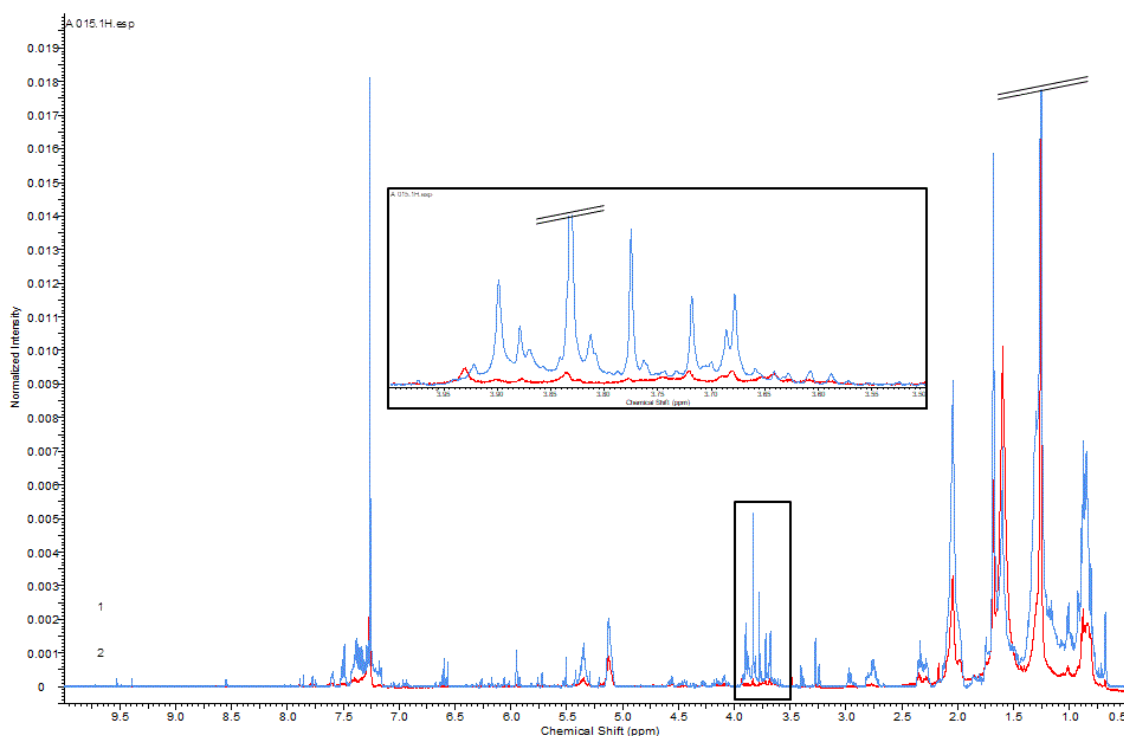


Figura 24: Comparativo dos espectros em CDCl_3 de AAC (azul) e AAC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

Deve-se ressaltar que esta maior discrepância nos perfis do gurdumão possivelmente é decorrente da dificuldade de homogeneização do material vegetal. Conforme foi descrito anteriormente, as folhas desta espécie não foram devidamente trituradas por conta da sua característica coriácea. É sabido que a homogeneização do material é uma das etapas críticas do estudo metabolômico, uma vez que quanto menor for o tamanho da partícula, maior será a eficiência da extração e, conseqüentemente, a quantidade de informações obtidas (Mushtaq et al., 2014). Nesse caso, o fator tempo pode ter sido determinante para alcançar maiores quantidades de substâncias no extrato AAC, embora tenham sido empregados

métodos auxiliares, como agitação e ultrassom, para promover uma extração rápida de maneira eficiente.

5.1.1.2. Extratos em metanol (AAM e AAM-R)

Nos espectros de RMN dos extratos AAM e AAM-R foram observados sinais que indicam a presença de açúcares, aminoácidos e outras substâncias oriundas do metabolismo primário. Além disso, foram observados sinais característicos de flavonoides e kavalactonas no extrato AAM, enquanto que no extrato AAM-R apenas os sinais indicativos de kavalactonas puderam ser evidenciados. A **Tabela A3 (Apêndice 1)** resume as substâncias e classes identificadas em todos os extratos metanólicos e frações analisadas.

Em ambos os extratos foi possível observar sinais referentes a açúcares livres. Dois sinais duplos referentes aos hidrogênios anoméricos dos isômeros alfa e beta da glicose foram observados por volta de 5,11 ppm (3,6 Hz) e 4,47 ppm (7,7 Hz), respectivamente (**Tabela A4 – Apêndice 1**). A diferenciação dos isômeros da glicose é feito pelo deslocamento químico e pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico. O sinal referente ao isômero alfa apresenta constante de acoplamento menor que 4 Hz e é devido à maior distância espacial entre o hidrogênio anomérico na posição equatorial e o H2 na posição axial. Esta maior distância diminui o efeito magnético que o próton H1 experimenta, fazendo com que este apresente uma menor constante de acoplamento. Já para o isômero beta, H1 e H2 se encontram na posição axial e, conseqüentemente, H1 sofre maior influência do campo magnético de H2. Por esta razão, o isômero beta da glicose apresenta deslocamento químico mais blindado e constante de acoplamento mais elevada (**Figura 25**) (Dona et al., 2016; Verpoorte et al., 2007).

No extrato AAM foram identificados os aminoácidos alanina, glutamato, treonina e valina, enquanto que no extrato AAM-R foi possível verificar apenas a presença da alanina. Foi observado um sinal duplo em aproximadamente 1,46 ppm (7,1 Hz) característico da β -CH₃ da alanina em ambos os espectros de RMN ¹H. Para o glutamato foram observados sinais sobrepostos em 2,08 ppm e em 2,32 ppm referentes a β -CH₂ e γ -CH₂, respectivamente. Pela análise do mapa de correlação HSQC foi possível determinar os acoplamentos ¹J_{CH} destes hidrogênios, mostrando-se de acordo com a literatura (Fan, 1996). Já a treonina apresentou um sinal duplo em aproximadamente 1,32 ppm (6,5 Hz) que mostra acoplamento ¹J_{CH} com o carbono em 20,1 ppm, sendo estes sinais referentes ao γ -CH₃ desta molécula. Por fim, dois sinais duplos referentes às metilas na posição γ e γ' da valina foram observados em 1,02

ppm (7,0 Hz) e em 1,06 ppm (7,0 Hz). Estes sinais acoplam $^1J_{CH}$ com os carbonos em 16,9 ppm e em 17,7 ppm, corroborando a presença deste aminoácido (**Figura 25**, **Tabela A4** e **Tabela A5 – Apêndice 1**) (Fan, 1996).

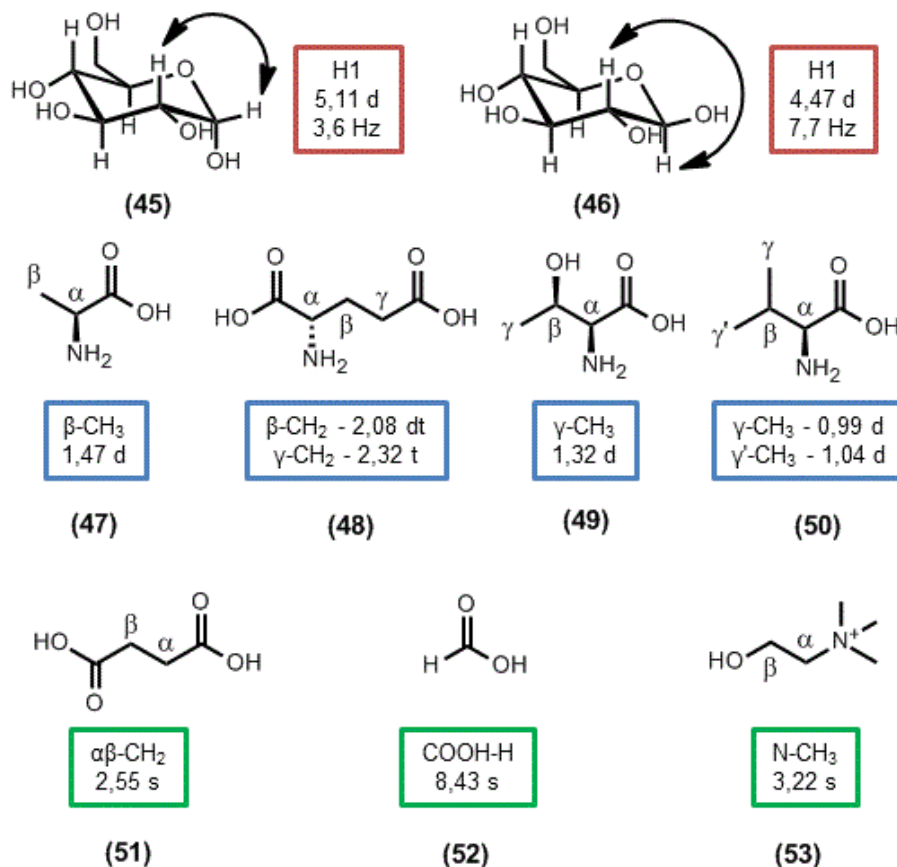


Figura 25: Estrutura dos açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e substâncias nitrogenadas identificadas nos extratos AAM e AAM-R, e as principais evidências espectrais observadas. **(45)** – α -glicose; **(46)** – β -glicose; **(47)** – alanina; **(48)** – glutamato; **(49)** – treonina; **(50)** – valina; **(51)** – ácido succínico; **(52)** – ácido fórmico; **(53)** – colina.

Outras substâncias oriundas do metabolismo primário como ácidos orgânicos e substâncias nitrogenadas também foram observados nos extratos AAM e AAM-R. O ácido succínico foi facilmente detectado em ambas as amostras, pois apresenta um sinal de hidrogênio simples em aproximadamente 2,55 ppm que é referente aos $\alpha\beta$ -CH₂ simétricos. Esses sinais geralmente apresentam acoplamento $^1J_{CH}$ com o carbono em 29,2 ppm (Fan, 1996; Kim et al., 2010). Outro ácido orgânico encontrado apenas no extrato AAM-R foi o ácido fórmico que apresentou um sinal simples desprotegido em 8,43 ppm referente ao átomo de hidrogênio ligado a carbonila (Fan, 1996). Em ambos os espectros de RMN 1H foram observados sinais referente à colina. A presença de um sinal simples em 3,22 ppm se mostra referente as três metilas ligadas ao átomo de nitrogênio (N-CH₃). Foi possível observar ainda o acoplamento $^1J_{CH}$ dos

hidrogênios metílicos com o carbono em 53,1 ppm e os acoplamentos $^3J_{CH}$ com os carbonos em 53,1 ppm (N-CH₃) e em 67,4 ppm (α -CH₂) (**Figura 25, Tabela A4 e Tabela A5 – Apêndice 1**) (Fan, 1996).

Assim como nos extratos clorofórmico do gurdumão (AAC e AAC-R) os extratos metanólicos (AAM e AAM-R) mostraram sinais referentes à kavalactonas, embora apareçam em menor intensidade, é possível observar nos espectros de 1H pelo menos cinco sinais duplos (2,1 Hz) característicos dos átomos de hidrogênio H3 e H5 dessas substâncias (**Figura 26**).

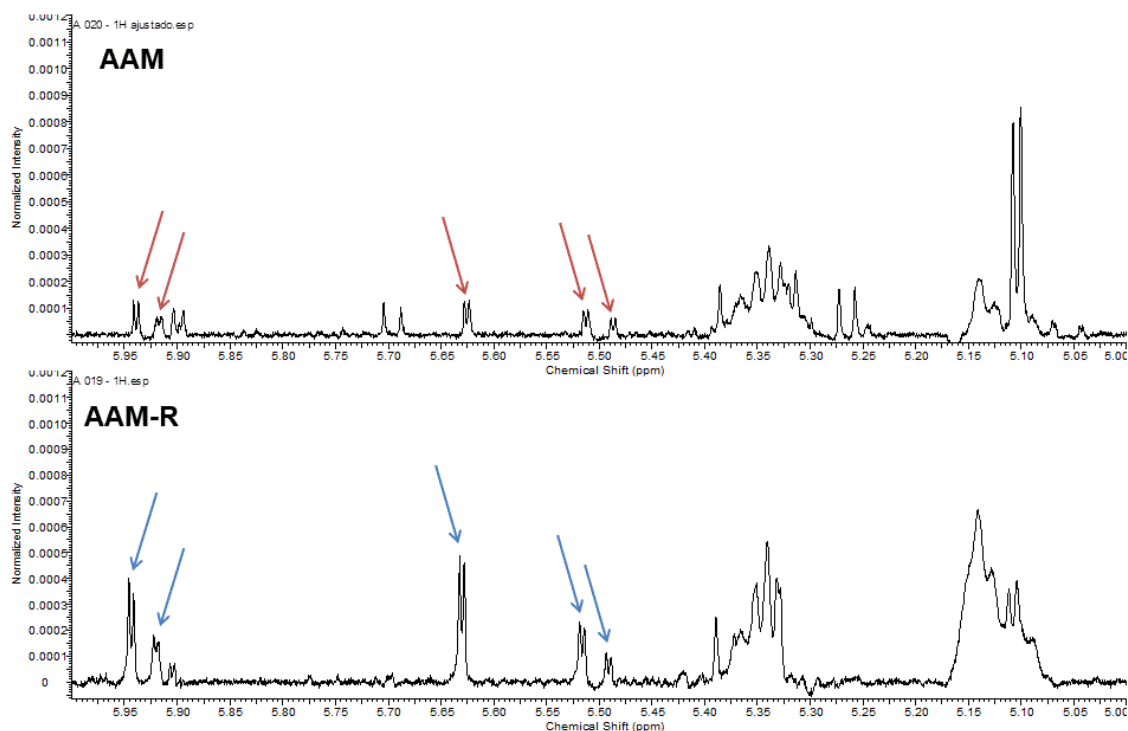


Figura 26: Ampliações (6,0 ppm – 5,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de AAM e AAM-R demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de kavalactonas.

No mapa de correlação HSQC do espectro de AAM-R é possível observar que estes átomos de hidrogênio acoplam com os átomos de carbono entre 85 e 100 ppm, o que está de acordo com os deslocamentos químicos descritos para os C3 e C5, respectivamente, da estrutura das kavalactonas (**Figura 27 - A**). Além disso, foram observados nos espectros de AAM e AAM-R sinais característicos de grupos metoxilas na região entre 3,9 a 3,7 ppm que apresentam acoplamento $^1J_{CH}$ com os átomos de carbono em aproximadamente 55 ppm. Foram observadas ainda as correlações $^3J_{CH}$ entre esses átomos de hidrogênio metoxílicos e os átomos de carbono em 170 ppm (**Figura 27 – B**).

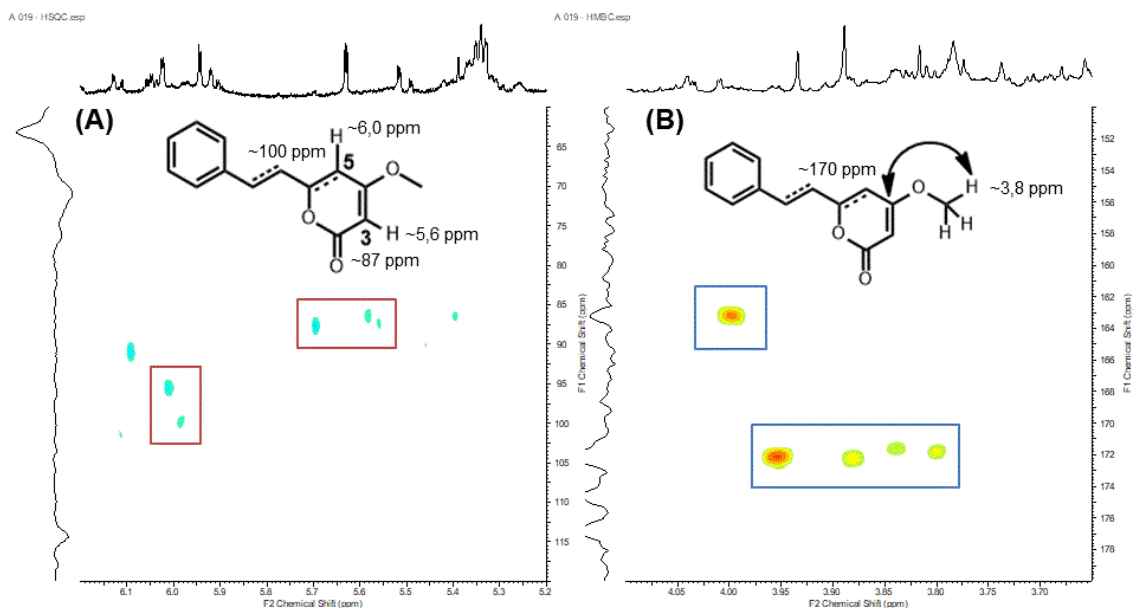


Figura 27: Ampliações dos espectros HSQC (A) e HMBC (B) de AAM-R demonstrando a presença de sinais característicos dos H3 e H5 de kavalactonas, e os acoplamentos $^3J_{CH}$ das metoxilas com C4.

Ainda no espectro de AAM-R foram observados outros sinais que evidenciam a presença das kavalactonas 5,6-desidrokaivaína e dihidro-5,6-desidrokaivaína (Tabela 15).

Tabela 15: Deslocamentos químicos atribuídos às kavalactonas 5,6-desidrokaivaína e dihidro-5,6-desidrokaivaína observadas no extrato AAM-R e comparação com dados da literatura em $CDCl_3$.

N	5,6-desidrokaivaína			Referência*		dihidro-5,6-desidrokaivaína			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
4	-	172,2	-	-	171,3	-	171,5	-	-	171,3
7	6,87 d 16,0	118,1	-	6,55 d	118,3	2,77 m	35,0	-	2,68 t	35,6
8	7,42 m	134,9	-	7,47 d	136,3	2,95 m	32,3	-	2,92 t	33,0
4-O-CH ₃	3,82 s	55,1	172,2	3,83 s	56,1	3,78 s	55,2	171,5	3,70 s	56,0

*Rao et al., 2014

A análise dos espectros de AAM e AAM-R revelou que apenas o extrato AAM possui sinais referentes a flavonoides. Neste são observados dois sinais duplos em 6,21 ppm (2,1 Hz) e 6,41 ppm (2,1 Hz) que são referentes, respectivamente, aos átomos de hidrogênio H6 e H8 do anel A dos flavonoides. Outros dois sinais duplos simétricos em 8,08 ppm (9,0 Hz) e em 6,88 ppm (9,0 Hz) referentes aos H2'-H6' e H3'-

H5', respectivamente, sugerem que o anel B é 1,4-dissubstituído (**Figura 28**). O mapa de correlação HSQC revelou os acoplamentos $^1J_{CH}$ entre os hidrogênios descritos anteriormente e seus respectivos átomos de carbono (**Tabela 16**). Entretanto, devido ao caráter minoritário desta substância, não foi possível observar correlações a longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) no espectro HMBC. As evidências observadas sugerem se tratar de um flavonoide como a apigenina ou kaempferol.

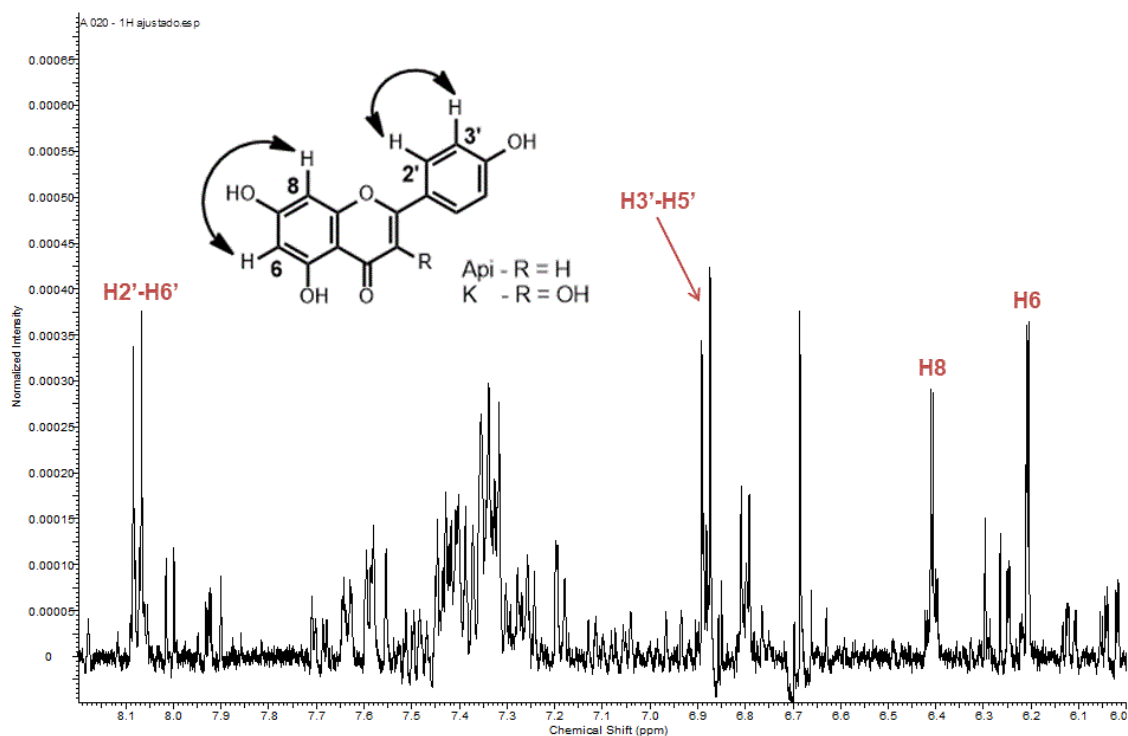


Figura 28: Ampliação (8,2 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD_3OD de AAM demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.

Tabela 16: Deslocamentos químicos do flavonoide observado no extrato AAM e comparação com dados da literatura.

N	Flavonoide			Apigenina ¹		Kaempferol ²	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
6	6,21 d 2,1	98,3	-	6,21 d	98,8	6,21 d	99,1
8	6,41 d 2,1	93,2	-	6,46 d	94,0	6,44 d	94,1
2'-6'	8,08 d 9,0	130,0	-	7,94 d	128,4	8,04 d	131,3
3'-5'	6,88 d 9,0	114,6	-	7,24 d	116,0	6,88 d	115,5

¹-Lin & Lee, 2014, ²-Ramos & de Oliveira, 2017.

A presença de kavalactonas em *A. zerumbet* é bastante documentada. Grande parte dos estudos devotou à análise de extratos de menor polaridade onde estas substâncias podem ser facilmente detectadas por CG-EM (Kuster et al., 1999;

Mpalantinos et al., 1998). Além disso, devido a seu caráter majoritário, diversos estudos descrevem o isolamento de grandes quantidades dessas substâncias (Rao et al., 2014; Upadhyay et al., 2011). No estudo conduzido por Mpalantinos e colaboradores (1998) foi detectada a presença da 5,6-desidrokaivaína e dihidro-5,6-desidrokaivaína no extrato aquoso das folhas de *A. zerumbet*. Outro estudo revelou a presença destas substâncias no extrato metanólico dos frutos desta planta (Rao et al., 2014). Estes dados suportam a hipótese da ocorrência de kavalactonas nos extratos AAM e AAM-R.

Os dados a cerca da química de *A. zerumbet* ainda são muito escassos. Grande parte dos autores devotou à análise de óleos essenciais e de constituintes de menor polaridade, por esta razão, poucos estudos descrevem a ocorrência de substâncias de maior polaridade, tal como os flavonoides (Mpalantinos et al., 1998; Victório, Lage, et al., 2009). São descritos a ocorrência de flavonóis glicosilados como a rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-O-glucoronídeo, além de (+)-catequina e (-)-epicatequina. Baseando-se neste estudo anterior e considerando a comparação descrita na **Tabela 16**, é possível supor que os sinais de flavonoide descritos anteriormente sejam um kaempferol, possivelmente glicosilado.

Os espectros de RMN ^1H de AAM e AAM-R apresentaram um padrão de sinais bastante semelhante entre si, embora algumas pequenas diferenças tenham sido evidenciadas. No espectro AAM foram observados sinais que corroboram a presença de kavalactonas e flavonoides, enquanto que em AAM-R não foram observados sinais característicos de flavonoides e os sinais das kavalactonas se mostraram mais intensos do que os de AAM (**Figura 29**).

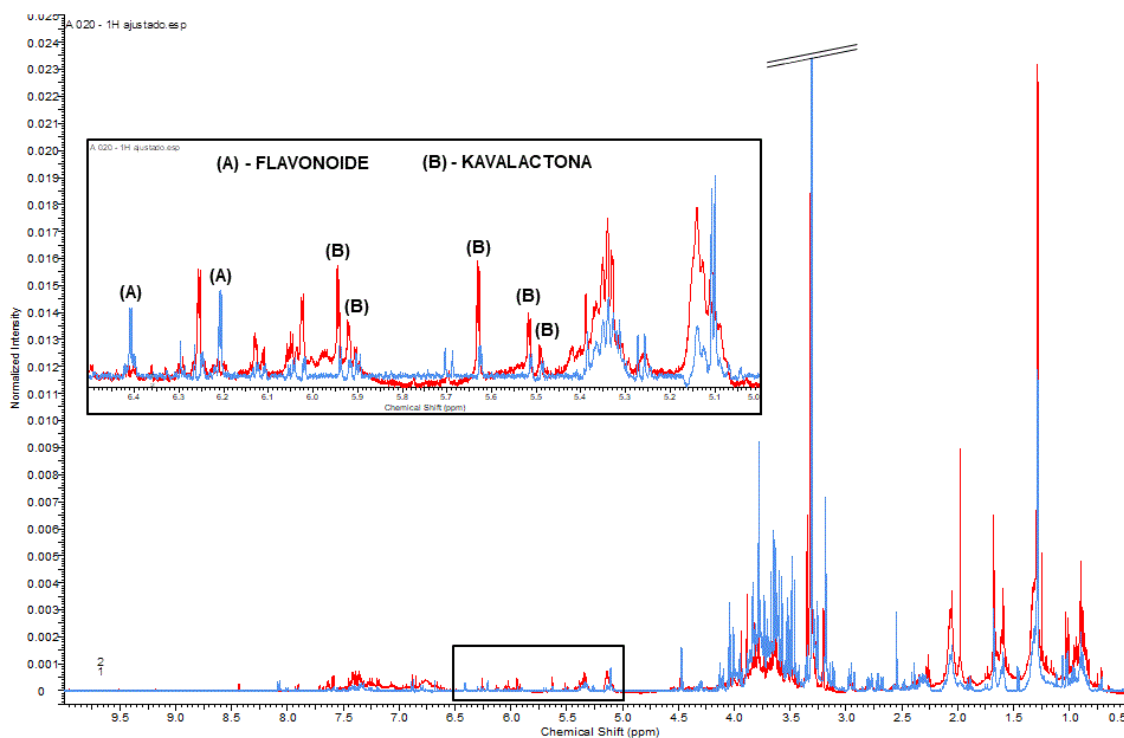


Figura 29: Comparativo dos espectros em CD_3OD de AAM (azul) e AAM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

Esta maior quantidade de kavalactonas em AAM-R provavelmente se deve ao processo de extração. Na extração realizada em duas etapas, o material vegetal a ser extraído com metanol foi previamente extraído com clorofórmio por três vezes. Este processo concentrou as kavalactonas em AAC, conforme foi demonstrado anteriormente. Assim, a disponibilidade destes constituintes no material vegetal a ser extraído pelo metanol era menor, o que corrobora a menor intensidade destes sinais. Já em AAM-R, o material vegetal utilizado na extração estava intacto, o que permitiu a extração das kavalactonas pelo metanol deuterado. De maneira semelhante, este mesmo fator contribuiu num maior acúmulo de substâncias graxas em AAM-R.

5.1.2. INVESTIGAÇÃO DE AAM POR CLAE-EM

A análise cromatográfica de AAM revelou diversos picos de intensidades equivalentes e um sinal majoritário no tempo de retenção de 57,4 min. Nesta amostra foi possível identificar substâncias em diferentes regiões do cromatograma, obtendo assim um maior leque de informações a cerca do perfil metabólico dessa planta. Embora não tenha sido possível identificar alguns picos, grande parte dos sinais apresentados foi identificada. Estes correspondem a 58 substâncias que compreendem ácidos orgânicos simples, ácidos fenólicos, derivados cinâmicos, flavonoides, dentre outras substâncias (**Figura 30**).

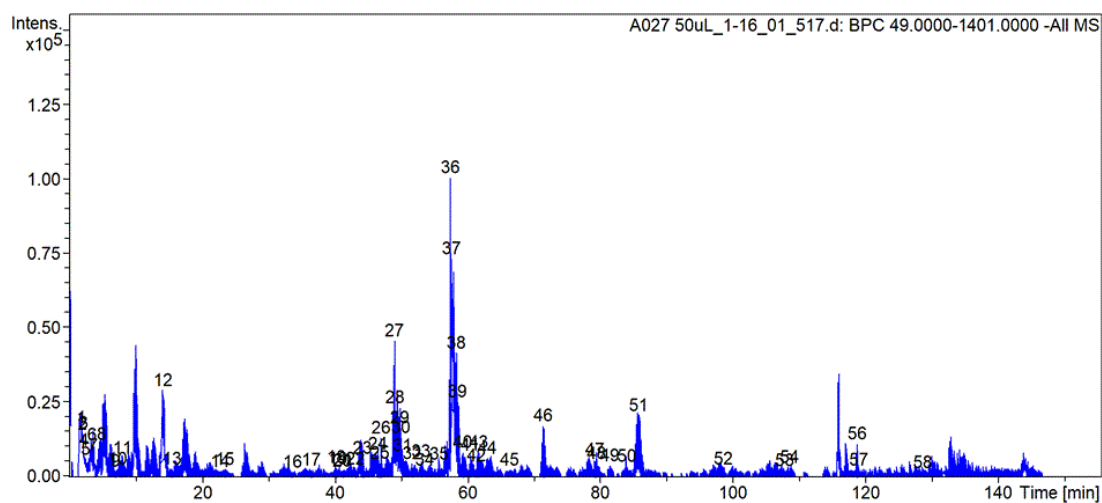


Figura 30: Cromatograma do pico base (BPC) de AAM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.

Para cada um dos picos assinalados acima são descritos: o tempo de retenção em minutos; o m/z experimental e os adutos observados; a fórmula molecular referente ao sinal; o m/z teórico; o erro entre o m/z experimental e o m/z teórico em ppm; os picos observados no espectro de fragmentação (MS^2); a proposta estrutural; e a referência. Todas essas informações referentes às 58 substâncias identificadas em AAM são descritas na **Tabela 17**.

Tabela 17: Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	1,8	128,0351 [M-H]-	C ₅ H ₇ NO ₃	128,0353 [M-H]-	-1,56	-	Ácido piroglutâmico	[1]
2	1,9	133,0137 [M-H]-	C ₄ H ₆ O ₅	133,0142 [M-H]-	-3,75	-	Ácido málico	[2]
3	2,1	191,0199 [M-H]-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0197 [M-H]-	1,04	87	Ácido cítrico	[2]
4	2,1	268,1038 [M+H]+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268,1040 [M+H]+	-0,74	136	Adenosina	[1]
5	2,5	164,0719 [M-H]- 166,0864 [M+H]+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164,0717 [M-H]- 166,0862 [M+H]+	1,21 1,20	- 120; 103	Fenilalanina	[2]
6	3,3	153,0194 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193 [M-H]-	0,65	108	Ácido protocatecúico	[1]
7	3,6	203,0825 [M-H]- 205,0970 [M+H]+ 188,0703 [M+H-NH ₃]+	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203,0826 [M-H]- 205,0971 [M+H]+	-0,49 -0,48	142; 116 143; 118 143; 118	Triptofano	[2]
8	4,8	137,0243 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244 [M-H]-	-0,72	-	Ácido salicílico	[1]
9	6,9	341,0846 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341,0878 [M-H]-	-9,38	179; 135	Ácido cafeico-O-glicosídeo	[1]
10	7,2	167,0348 [M-H]-	C ₈ H ₈ O ₄	167,0349 [M-H]-	-0,59	-	Ácido vanílico	[1]
11	7,9	179,0348 [M-H]-	C ₉ H ₈ O ₄	179,0349 [M-H]-	-0,55	134	Ácido cafeico	[1]
12	14,1	163,0402 [M-H]- 165,0540 [M+H]+ 147,0422 [M+H-H ₂ O]+	C ₉ H ₈ O ₃	163,0400 [M-H]- 165,0546 [M+H]+	1,22 -3,63	119 119; 91 91	Ácido cumárico	[1]
13	15,4	289,0729 [M-H]- 291,0852 [M+H]+	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0717 [M-H]- 291,0863 [M+H]+	4,15 -3,77	- 147; 139; 123	(<i>epi</i>)-catequina	[2]
14	22,6	345,1559 [M-H]-	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	345,1554 [M-H]-	1,44	-	Jasminosídeo B	[3]
15	23,4	193,0506 [M-H]- 195,0647 [M+H]+ 177,0511 [M+H-H ₂ O]+	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0506 [M-H]- 195,0651 [M+H]+	0 -2,05	133 134; 117 89	Ácido ferúlico	[4]
16	33,5	623,1240 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	623,1242 [M-H]-	-0,32	447; 285	Kaempferol-O-glicosídeo-O-glicuronídeo	[5]

Tabela 17 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
17	36,4	755,2053 [M-H]- 757,2151 [M+H]+	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2040 [M-H]- 757,2185 [M+H]+	1,72 -4,49	593; 446; 285 449; 287	Kaempferol-O-glicosídeo-O-rutinosídeo	[5]
18	40,2	625,1409 [M-H]- 627,1547 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1410 [M-H]- 627,1555 [M+H]+	-0,15 -1,27	463; 300 465; 303	Quercetina-O-glicosídeo-O-glicosídeo	[5]
19	40,5	785,2096 [M-H]-	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	785,2145 [M-H]-	-6,24	623; 477; 315	Isoramnetina-O-glicosídeo-O-rutinosídeo	[5]
20	41,1	755,2035 [M-H]-	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2040 [M-H]-	-0,66	755; 300	Quercetina-O-glicosil-diramnosídeo	[5]
21	41,2	609,1467 [M-H]-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]-	0,98	609; 446; 283	Kaempferol-O-glicosídeo-O-glicosídeo	[5]
22	43,1	623,1264 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	623,1242 [M-H]-	3,53	301	Quercetina-O-glicuronídeo-ramnosídeo	[5]
23	44,2	453,3396 [M+H]+ 475,3182 [M+Na]+	C ₂₄ H ₄₄ N ₄ O ₄	453,3435 [M+H]+	-8,60	453; 435; 322; 228; 209; 114 475; 322	Ciclo tetraleucil(isoleucil)	[6]
24	46,5	463,0872 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]-	-2,15	300	Quercetina-O-glicosídeo	[5]
25	46,8	739,2087 [M-H]-	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739,2091 [M-H]-	-0,54	739; 284	Kaempferol-O-glicosil-diramnosídeo	[5]
26	46,9	609,1456 [M-H]- 611,1558 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	-0,82 -7,85	609; 300 303	Rutina	[5]
27	49,0	463,0876 [M-H]- 465,0961 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]- 465,1027 [M+H]+	-1,29 -14,19	300 303	Quercetina-O-glicosídeo	[5]
28	49,1	477,0673 [M-H]- 955,1495 [2M-H]- 479,0778 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]- 479,0820 [M+H]+	-0,20 -8,76	301 477; 301 303	Quercetina-O-glicuronídeo	[5]
29	49,7	609,1466 [M-H]- 1219,2829 [2M-H]- 611,1579 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	0,82 -4,41	609; 300 609; 301 303	Rutina	[5]
30	49,9	477,0684 [M-H]- 479,0781 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]- 479,0820 [M+H]+	2,09 -8,14	301 303	Quercetina-O-glicuronídeo	[5]
31	50,2	609,1452 [M-H]-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]-	-1,44	609; 300; 285	Kaempferol-O-diglicosídeo	[5]

Tabela 17 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
32	51,6	769,2188 [M-H]- 771,2332 [M+H]+	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769,2196 [M-H]- 771,2342 [M+H]+	-1,04 -1,29	769; 314 317 ; 129	Isoramnetina-O-glicosil- diramnosídeo	[5]
33	53,0	593,1508 [M-H]- 595,1641 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	-0,50 -2,68	593; 284 287 ; 129	Kaempferol-O-rutinosídeo	[5]
34	53,5	447,0970 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0932 [M-H]-	8,49	284	Kaempferol-O-glicosídeo	[1]
35	55,7	519,1869 [M-H]- 565,1932 [M+FA-H]-	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	519,1871 [M-H]-	-0,38	357; 342; 151 ; 136 357 ; 342; 151	Pinoresinol-O-glicosídeo	[1]
36	57,4	447,0944 [M-H]- 449,1050 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0932 [M-H]- 449,1078 [M+H]+	2,68 -6,23	447; 284 287	Kaempferol-O-glicosídeo	[1]
37	57,5	461,0727 [M-H]- 923,1526 [2M-H]- 1385,2218 [3M-H]- 692,1117 [3M-2H]- 1154,1929 [5M-2H]- 463,0820 [M+H]+ 485,0619 [M+Na]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725 [M-H]- 463,0871 [M+H]+	0,43 -11,01	285 461; 285 461 ; 285 461; 285 461 ; 285 287 287	Kaempferol-O-glicuronídeo	[5]
38	58,2	593,1499 [M-H]- 595,1628 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	-2,02 -4,87	593; 285 287	Kaempferol-O-rutinosídeo	[5]
39	58,4	461,0719 [M-H]- 463,0815 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725 [M-H]- 463,0871 [M+H]+	-1,30 -12,09	285 287	Kaempferol-O-glicuronídeo	[5]
40	59,3	623,1620 [M-H]- 625,1710 [M+H]+	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1617 [M-H]- 625,1763 [M+H]+	0,48 -8,47	623; 314 ; 299 317	Isoramnetina-O-rutinosídeo	[5]
41	60,4	610,4189 [M+FA-H]- 566,4253 [M+H]+ 588,3939 [M+Na]+ 283,7116 [M+2H]2+	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	610,4185 [M+FA-H]- 566,4275 [M+H]+	0,65 -3,88	564 ; 225 566 ; 548; 453; 435; 341; 322; 228; 209 588 453; 226; 209; 114	Ciclo pentaleucil(isoleucil)	[6]

Tabela 17 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
42	61,3	477,1024 [M-H]- 479,1175 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1038 [M-H]- 479,1184 [M+H]+	-2,93 1,87	477; 314 317	Isoramnetina-O-glicosídeo	[5]
43	61,6	623,1617 [M-H]- 625,1727 [M+H]+	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1617 [M-H]- 625,1763 [M+H]+	0 -5,75	623; 315 ; 300 317	Isoramnetina-O-rutinosídeo	[5]
44	62,9	491,0826 [M-H]- 493,0920 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0831 [M-H]- 493,0976 [M+H]+	-1,01 -11,35	315 ; 300 317	Isoramnetina-O-glicuronídeo	[5]
45	66,3	503,0822 [M-H]- 505,0957 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	503,0831 [M-H]- 505,0976 [M+H]+	-1,78 -3,76	285 287	Kaempferol-O-glicuronil-acetil	[5]
46	71,4	713,4720 [M+Cl]- 723,5028 [M+FA-H]- 679,5041 [M+H]+ 701,4795 [M+Na]+ 340,2536 [M+2H]2+ 351,2406 [M+H+Na]2+ 359,2241 [M+H+K]2+	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	713,4737 [M+Cl]- 679,5116 [M+H]+	-2,38 -11,03	713; 677 677 ; 225 679 ; 661; 566; 435; 341; 322; 228; 209 701 ; 359 566; 548; 453; 322; 228; 209; 114 588; 351; 228; 114 359	Ciclo hexaleucil(isoleucil)	[6]
47	79,2	503,0822 [M-H]-	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	503,0831 [M-H]-	-1,78	285	Kaempferol-O-glicuronil-acetil	[5]
48	79,4	836,5862 [M+FA-H]- 792,5859 [M+H]+ 814,5576 [M+Na]+ 396,7939 [M+2H]2+ 407,7813 [M+H+Na]2+ 415,7661 [M+H+K]2+	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	836,5866 [M+FA-H]- 792,5957 [M+H]+	-0,47 -12,36	790 ; 225 792; 774; 209 814 679; 566; 453; 435; 387; 322; 228; 114 701; 588; 407; 228; 114 415 ; 114	Ciclo heptaleucil(isoleucil)	[6]
49	81,4	503,0830 [M-H]- 505,0967 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	503,0831 [M-H]- 505,0976 [M+H]+	-0,19 -1,78	285 287; 201; 159	Kaempferol-O-glicuronil-acetil	[5]

Tabela 17 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AAM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
50	83,9	453,3387 [M+2H] ²⁺ 464,3289 [M+H+Na] ²⁺ 302,5599 [M+3H] ³⁺	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	453,3435 [M+2H] ²⁺	-10,58	566; 453; 444; 341; 228; 114 114 114	Ciclo octaleucil(isoleucil)	[6]
51	85,7	269,0816 [M-H] ⁻ 271,0950 [M+H] ⁺ 293,0745 [M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269,0819 [M-H] ⁻ 271,0964 [M+H] ⁺	-1,11 -5,16	253; 216; 184; 149 ; 121 167 293	Pinostrobin (chalcona)	[7]
52	98,5	231,1010 [M+H] ⁺ 253,0784 [M+Na] ⁺ 461,1863 [2M+H] ⁺ 483,1643 [2M+Na] ⁺	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	231,1015 [M+H] ⁺	-2,16	153; 140 ; 105; 91 129 ; 91 231 ; 133; 105; 91 253 ; 231	Dihidro-5,6-desidro-kavaína	RMN [8]
53	107,7	229,0847 [M+H] ⁺ 251,0627 [M+Na] ⁺ 479,1358 [2M+Na] ⁺	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229,0859 [M+H] ⁺	-5,23	183; 168; 152; 141 ; 131; 115; 103 - 251	5,6-desidro-kavaína	RMN [8]
54	108,4	255,0658 [M-H] ⁻ 257,0812 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255,0662 [M-H] ⁻ 257,0819 [M+H] ⁺	-1,56 -2,72	171 153 ; 131; 103	Pinocembrina	[9]
55	113,5	285,1136 [M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	285,1121 [M+H] ⁺	5,26	181	Flavokavaína B	[7, 8]
56	118,6	269,0814 [M-H] ⁻ 271,0927 [M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269,0819 [M-H] ⁻ 271,0964 [M+H] ⁺	-1,85 -13,64	253 ; 177 167	Pinostrobin (chalcona)	[7]
57	118,8	263,1411 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O	263,1430 [M+H] ⁺	-7,22	105 ; 91	Alnustoneo	[9]
58	128,4	593,2676 [M+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2758 [M+H] ⁺	-13,82	593 ; 533	Feoforbídeo a	[2]

[1] - Sun et al., 2015; [2] - Bijttebier et al., 2016; [3] - Zhou, Shan, & Meng, 2018; [4] - Xu et al., 2018; [5] - Qiao et al., 2016; [6] - Duan et al., 2017; [7] - Einbond et al., 2017; [8] - Lhuissier et al., 2017; [9] - Zhang et al., 2015

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

Dentre as substâncias identificadas no extrato AAM destacam-se os flavonoides com 34 substâncias distribuídas entre flavonóis glicosilados e chalconas. As identificações foram baseadas nos dados espectrais descritos na literatura e considerando as tendências metabólicas das espécies do gênero *Alpinia* (Habsah et al., 2003; Ito, Morita, & Mihashi, 1981; Mpalantinos et al., 1998; Nakatani, 2003)

As primeiras substâncias detectadas em AAM foram metabólitos de baixo peso molecular que correspondem a aminoácidos (**5**, **7**) e seus derivados (**1**, **4**) ácidos orgânicos simples (**2**, **3**), derivados benzoicos (**6**, **8**, **10**) e derivados cinâmicos (**9**, **11**, **12**, **15**). Embora as substâncias **1**, **2**, **8** e **10** não tenham apresentado espectro de fragmentação (MS^2), estas foram identificadas pela comparação da m/z do íon molecular com dados da literatura. Além disso, estas substâncias apresentam grande ocorrência no reino vegetal, sendo descritas em diversos estudos realizados por CLAE-EM (Bijttebier et al., 2016; Geng et al., 2014; Gómez-Romero, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010; Rodríguez-Pérez et al., 2018; Sanz et al., 2012).

Para as demais substâncias citadas acima foram observados picos no espectro MS^2 que corroboram suas identificações. Os aminoácidos e seus derivados (**4**, **5**, **7**) foram identificados pela análise do espectro MS^2 obtido pelo modo positivo de ionização, embora o triptofano (**7**) também tenha sido detectado pelo modo de ionização negativo. A adenosina apresentou m/z 136 referente à perda do açúcar $[M+H-ribose]^+$, enquanto as substâncias **5** e **7** apresentaram perdas de CO_2 (44 Da) e NH_2 (17 Da) $[M+H-CO_2-NH_2]^+$. Os ácidos orgânico (**3**), benzoico (**6**) e cinâmicos (**11**, **12**, **15**) apresentaram um único sinal no espectro MS^2 referente à perda de CO_2 $[M-H-CO_2]^-$, sendo que o ácido críico (**3**) apresentou perda conjunta de $C_2H_3O_2$ $[M-H-CO_2-C_2H_3O_2]^-$ gerando um fragmento m/z 87, enquanto o ácido ferúlico (**15**) apresentou perda de CO_2 em conjunto com a perda do substituinte metil (CH_3), gerando um único fragmento característico de m/z 133 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$. Um quarto derivado cinâmico (**9**) de m/z 341 apresentou dois fragmentos sendo o m/z 179 referente à perda da glicose (162 Da) $[M-H-Glc]^-$ e o m/z 135 formado pela perda posterior de CO_2 $[M-H-Glc-CO_2]^-$.

Grande parte dos flavonoides presentes em AAM são glicosilados, podendo conter até três açúcares ligados em uma ou mais posições na aglicona. A principal evidência observada para esses flavonoides são os fragmentos m/z 285, m/z 301 e m/z 315 que se referem às agliconas kaempferol, quercetina e isoramnetina. Foram identificados 14 derivados do kaempferol (**16**, **17**, **21**, **25**, **31**, **33**, **34**, **36-39**, **45**, **47**, **49**), 9 derivados da quercetina (**18**, **20**, **22**, **24**, **26-30**) e 6 derivados da isoramnetina (**19**, **32**, **40**, **42-44**). As principais perdas observadas foram de: 162 Da – referente a uma glicose; 176 Da – referente a um ácido glicurônico; 218 Da – referente a um ácido

glicurônico acetilado (176 Da + 42 Da); 308 Da – referente a um rutinosídeo (162 Da + 146 Da); 322 Da – referente a uma ramnose ligada a um ácido glicurônico (176 Da + 146 Da); 324 Da – referente a duas glicoses ligadas (162 Da + 162 Da); e 454 Da – referente a duas ramnosos ligadas a uma glicose (162 Da + 146 Da + 146 Da). Com base nessas informações e pela observação dos demais íons presentes no espectro MS² de cada substância, foi possível determinar os possíveis açúcares presentes, a natureza da ligação e se estes se ligam em mais de uma posição na aglicona. Os outros seis flavonoides correspondendo a *epi*-catequina (ou isômero) (**13**), isômeros da chalcona pinostrobin (**51**, **56**), pinocembrina (chalcona) (**54**) e flavokavaina B (**55**) foram identificados pela comparação do espectro MS² com dados da literatura.

Ainda foram identificadas três substâncias características das espécies do gênero *Alpinia*, sendo duas kavalactonas (**52**, **53**) e um diarilheptanoide (**57**). Na análise pelo modo de ionização positivo foram observados dois íons moleculares de m/z 231 e m/z 229 condizentes com as kavalactonas dihidro-5,6-dehidrokavaina e 5,6-dehidrokavaina previamente identificadas nos extratos AAC e AAM por RMN. O perfil de fragmentação desses sinais mostrou-se semelhante ao descrito na literatura (Lhuissier et al., 2017). De maneira semelhante, a alnustoneo (**57**) também foi detectada na análise pelo modo positivo, tendo apresentado perfil de fragmentação semelhante ao descrito na literatura (J.-Q. Zhang et al., 2015)

Os espectros de MS² das substâncias observadas na análise no modo negativo de ionização e suas propostas de fragmentação são apresentados na **Figura 31**.

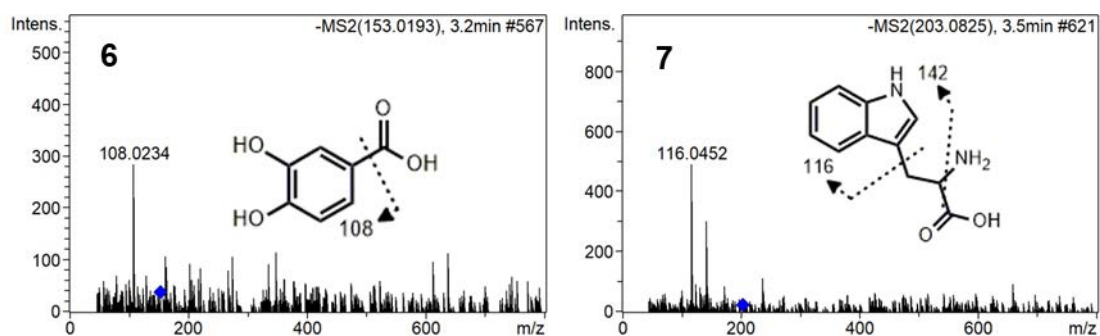


Figura 31: Espectros de MS² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.

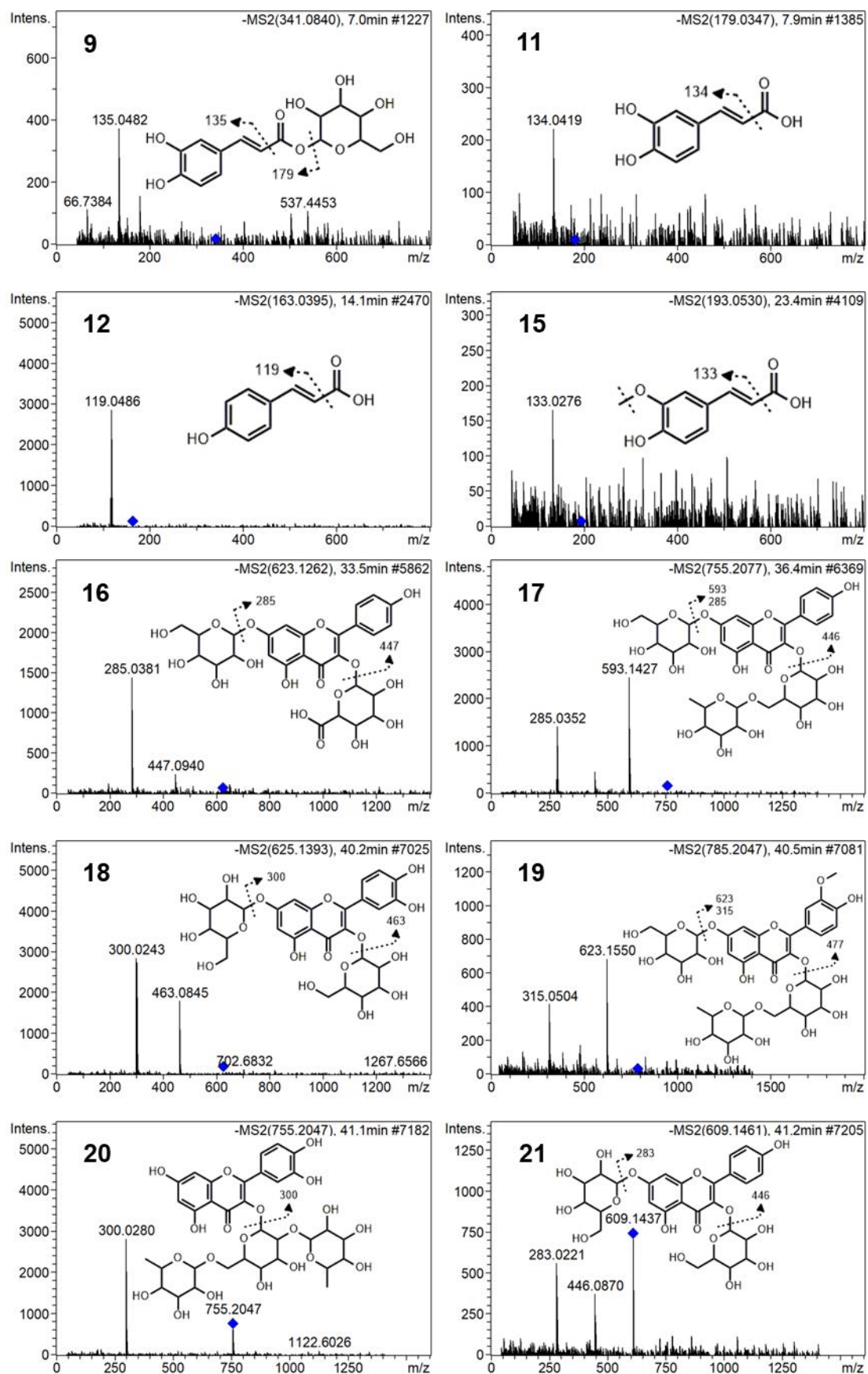


Figura 31 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.

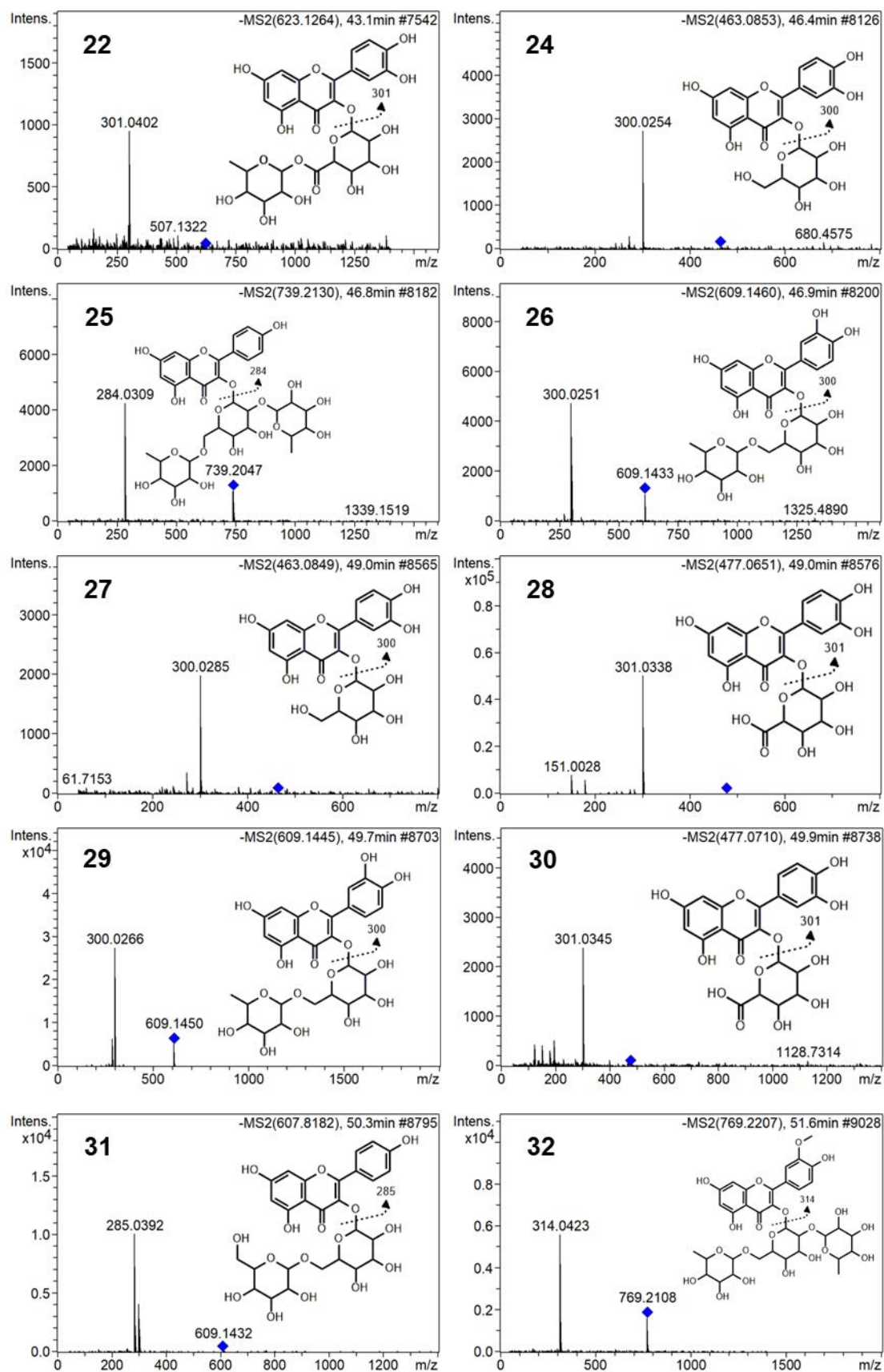


Figura 31 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.

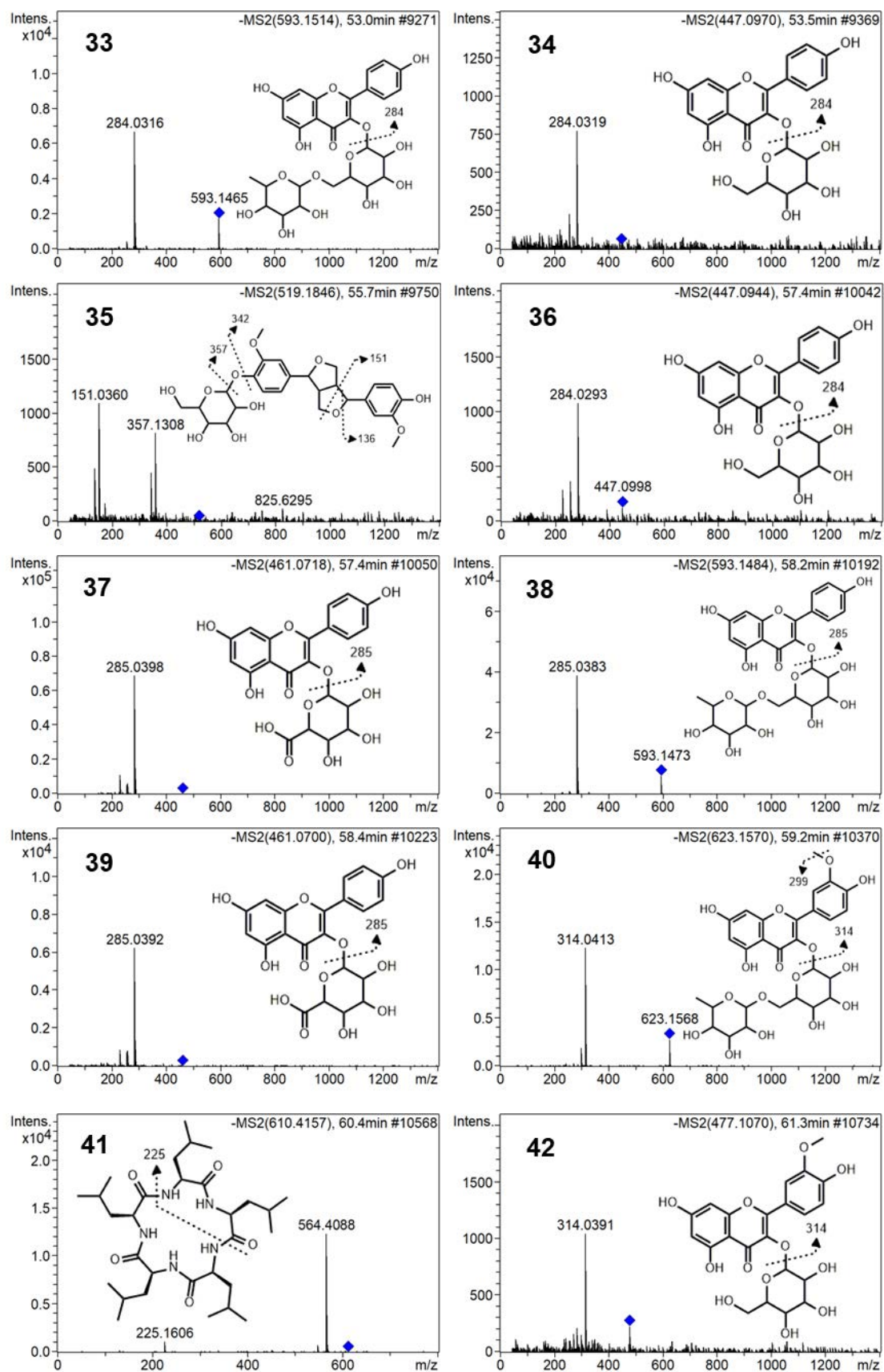


Figura 31 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.

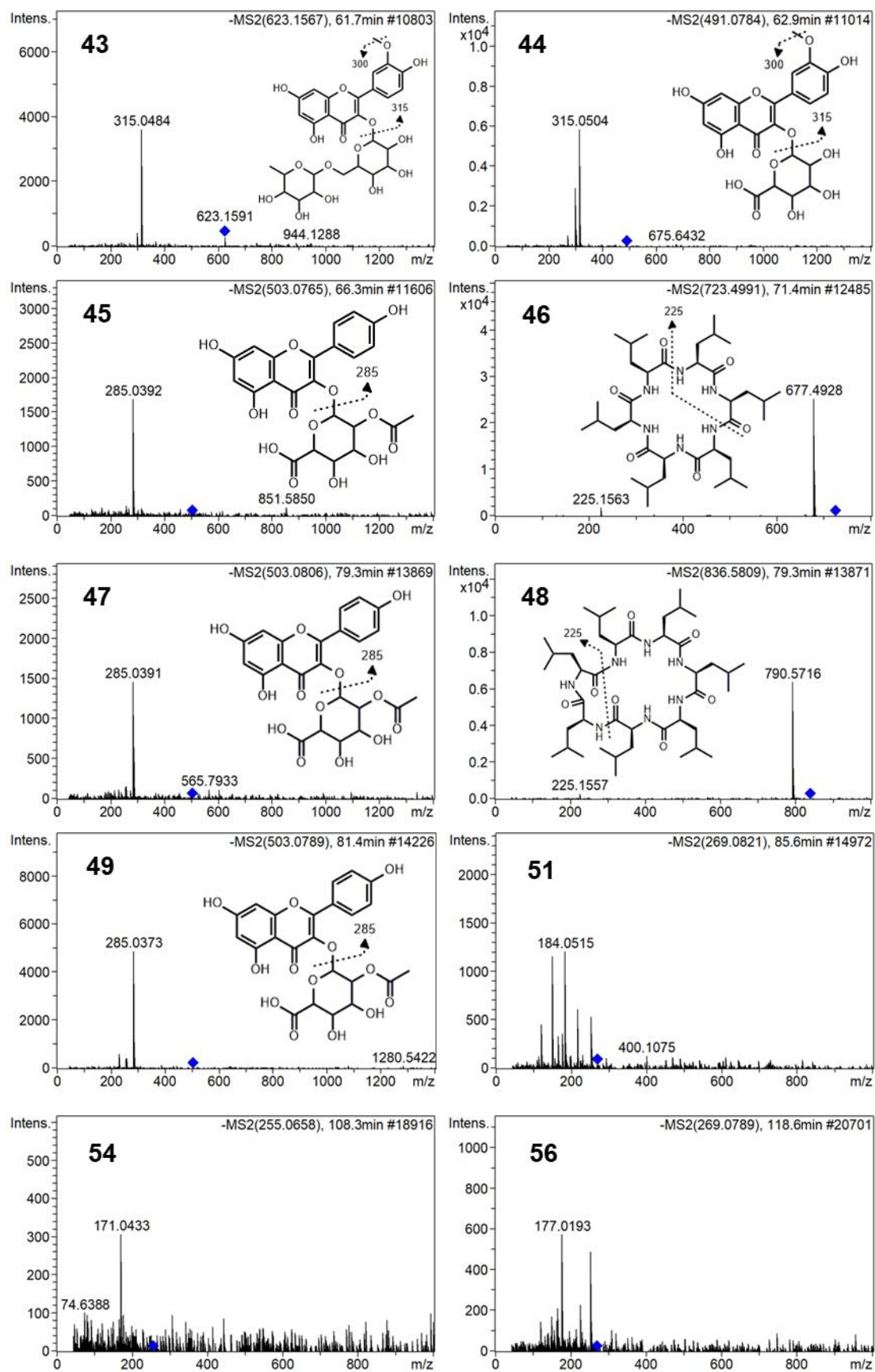


Figura 31 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AAM e suas propostas de fragmentação.

Conforme apresentado anteriormente, a análise do extrato AAM por CLAE-EM revelou a presença de uma grande variedade de flavonoides, sendo a maioria derivados do kaempferol. O pico majoritário observado no cromatograma no tempo de retenção de 57,5 min mostrou-se referente ao kaempferol-*O*-glicosídeo e ao kaempferol-*O*-glicuronídeo. Essa significativa ocorrência de flavonoides do tipo kaempferol nesse extrato corrobora os resultados obtidos na análise de AAM por RMN, uma vez que os indícios de flavonoides observados são condizentes com derivados glicosilados do kaempferol.

A determinação das agliconas dos flavonoides levou em consideração as evidências observadas na análise do extrato por RMN e os dados quimiotaxonômicos do gênero. Foram identificados nas folhas de *A. zerumbet* os flavonóis glicosilados rutina, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo e kaempferol-3-*O*-glicuronídeo (Mpalantinos et al., 1998). Em outra investigação das folhas dessa espécie foram identificados kaempferol-3-*O*-glicosídeo, kaempferol-3-*O*-glicuronídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-glicuronídeo e quercetina-3-*O*-ramnosil-(1,6)-galactosídeo (Nakatani, 2003).

O estudo fitoquímico dos rizomas e sementes dessa espécie revelou apenas a presença de chalconas como a flavokavaína B e cardamonina e flavanonas como a alpinetina (Itokawa et al., 1981; Krishna & Chaganty, 1973). De fato, outros estudos sugerem que as espécies de *Alpinia* concentrem tais constituintes em seus rizomas. A investigação química dos rizomas de *A. nutans*, *A. mutica* e *A. rafflesiana* levou ao isolamento da flavokavaína B (chalcona) e da pinocembrina (flavanona) (Habsah et al., 2003; Sirat et al., 1996). Embora não haja relatos da ocorrência destas substâncias nas folhas de *Alpinia*, deve-se considerar que a maior parte dos estudos fitoquímicos devotou à análise dos rizomas, de modo que a composição química das folhas de muitas espécies ainda permanece desconhecida. No entanto, com base nas evidências espectrais observadas pela análise de AAM por CLAE-EM é possível supor que estes metabólitos também ocorram em pequenas quantidades nas folhas de *A. zerumbet*.

Ainda em relação aos flavonoides, as características metabólicas das espécies de *Alpinia* também auxiliaram na determinação das posições de glicosilação dos flavonoides. Conforme demonstrado nos exemplos acima, há uma predominância de glicosilação na posição 3 para os flavonóis. Por esta razão os flavonoides identificados foram tentativamente atribuídos como 3-*O*-glicosídeos. No caso em que a substância demonstrou mais de um ponto de glicosilação foi atribuído como 3,7-*O*-diglicosídeo, baseando na ocorrência deste tipo de glicosilação em *A. katsumadai* (Y.-Y. Li, Chou, & Wang, 2009).

Por fim, a identificação das kavalactonas dihidro-5,6-desidrokaivaína e 5,6-desidrokaivaína no extrato AAM por CLAE-EM corroboram os resultados observados pela análise do extrato por RMN, onde foi possível observar sinais característicos desta classe metabólica. Embora apenas duas kavalactonas tenham sido identificadas por CLAE-EM, é possível que outras substâncias desta classe estejam presentes em AAM. Entretanto, devido ao caráter menos polar destes constituintes, a maior parte dos trabalhos descrevem sua identificação por técnicas hífenadas a cromatografia em fase gasosa e poucos trabalhos descrevendo a identificação destes constituintes por técnicas hífenadas a CLAE foram encontrados. Deste modo, a comparação com dados espectrais de referência não foi possível, o que acarretou em um menor número de metabólitos identificados.

5.1.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AAM

Na investigação hemodinâmica de AAM foram utilizados oito animais, sendo que sete desses apresentaram perfis semelhantes e adequados para análise estatística. Pela observação dos gráficos de pressão obtidos foi possível verificar que a administração do extrato AAM induziu uma hipotensão aguda, intensa e duradoura do que a causada pelo DMSO. Também foi observada a necessidade de um maior tempo para o reestabelecimento das condições hemodinâmicas iniciais (controle) (**Figura 32**).

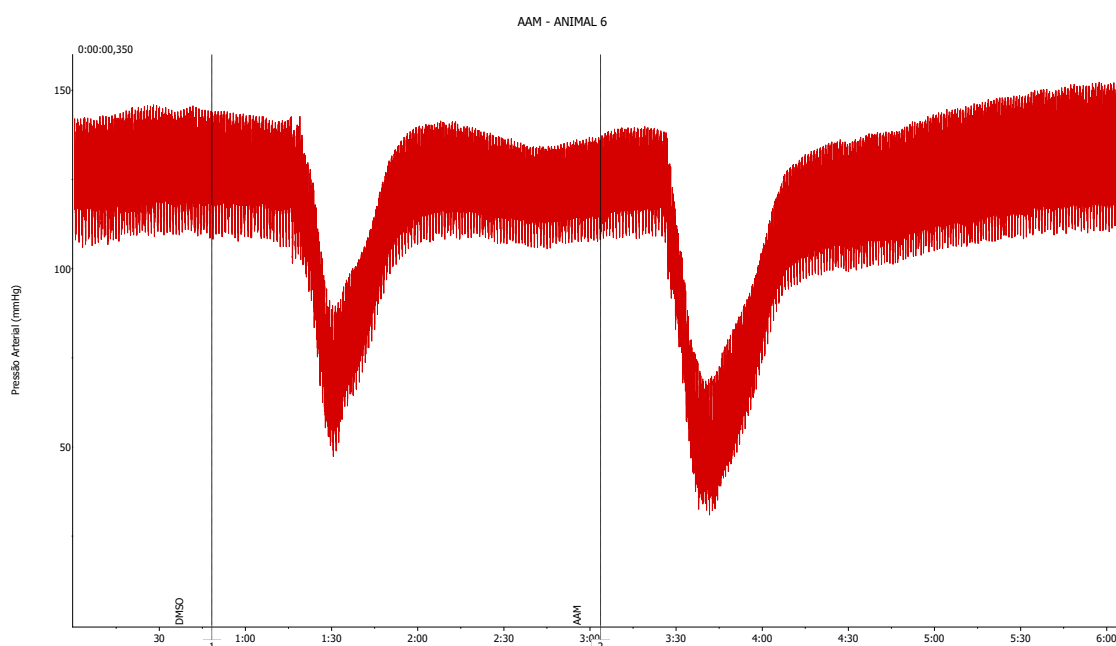


Figura 32: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AAM, respectivamente.

A administração do extrato AAM causou uma diminuição de $75,5 \pm 5,9$ mmHg, $78,2 \pm 3,8$ mmHg e $73,4 \pm 3,1$ mmHg nas PAS, PAM e PAD, respectivamente. O efeito de AAM mostrou-se mais intenso que o causado pelo DMSO, tendo sido evidenciada uma diferença de $30,7 \pm 7,4$ mmHg na PAS, $28,2 \pm 7,8$ mmHg na PAM e de $23,8 \pm 7,55$ mmHg na PAD em comparação com o mesmo. A análise estatística revelou que os efeitos induzidos pelo DMSO e o extrato apresentaram diferença significativa em comparação com os parâmetros iniciais (controle – $p < 0,001$). Quando comparado o efeito de AAM ao do DMSO, também foram evidenciadas diferenças significativas nas PAS e PAM que apresentaram $p < 0,01$, enquanto a PAD apresentou $p < 0,05$ (**Figura 33**).

Em relação às alterações na frequência cardíaca, foi observada uma redução de $92,2 \pm 18,8$ batimentos por minuto (bpm) após administração de AAM. Este efeito mostrou-se mais intenso do que a redução causada pelo DMSO, que foi de $51,4 \pm 14,9$ bpm. Embora ambos tenham se mostrados diferentes do controle ($p < 0,05$ para DMSO e $p < 0,001$ para AAM), a análise estatística não revelou diferenças entre o efeito do DMSO e de AAM, sugerindo que o extrato não possua efeitos sobre a frequência cardíaca (**Figura 33**).

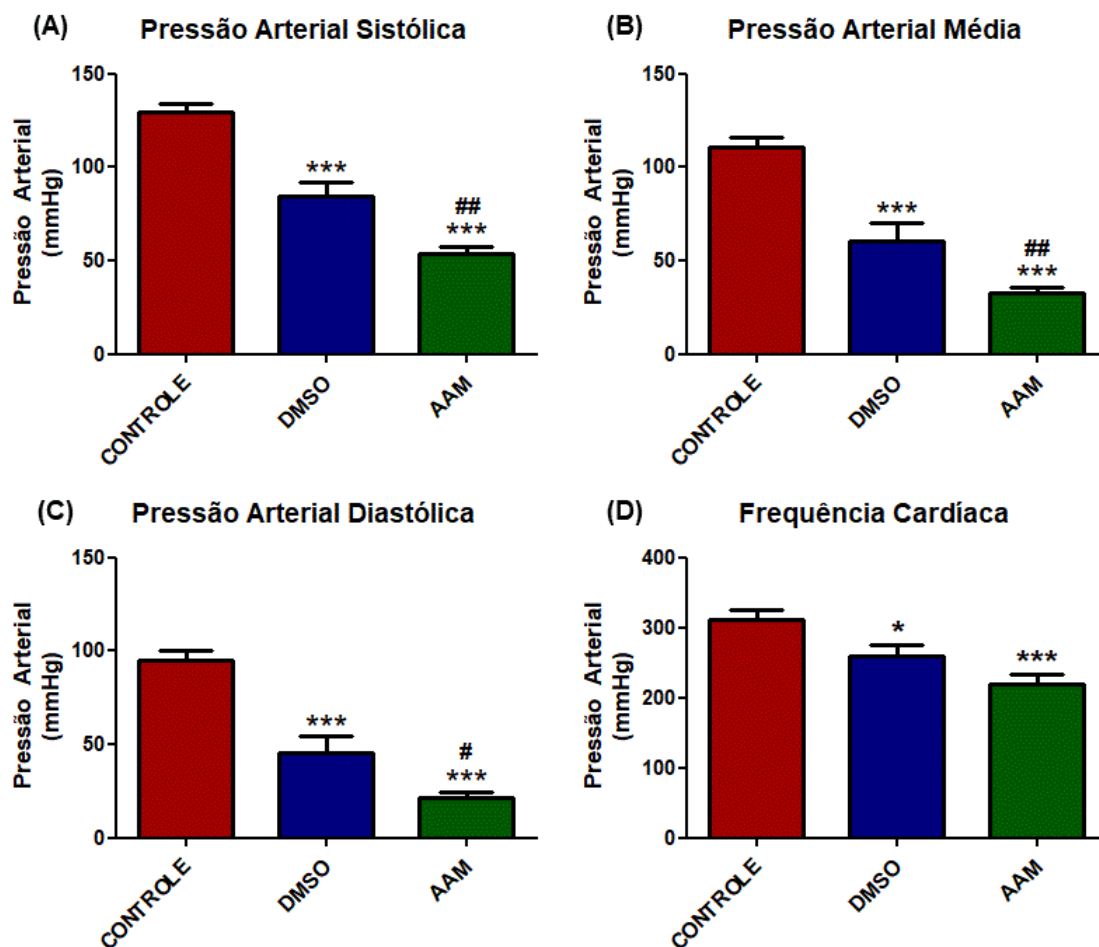


Figura 33: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AAM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Por se tratar de uma planta medicinal amplamente utilizada com finalidade anti-hipertensiva, diversos estudos já foram conduzidos visando avaliar seu potencial. Entretanto, a grande maioria desses trabalhos se refere à análise dos seus óleos essenciais. A avaliação do óleo essencial das folhas de *A. zerumbet* em ratos normotensos e hipertensos (SHR) demonstrou efeito significativo sobre a PAM na dose de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, tendo sido observado ainda efeito cardioprotetor (Barcelos et al.,

2010). Outras avaliações em ratos utilizando o óleo essencial das folhas ou suas frações revelaram atividades hipotensora e anti-hipertensiva (Cunha et al., 2013; Lahlou et al., 2002; Lahlou et al., 2003). O óleo essencial dos frutos, que apresenta diferenças em sua composição química em comparação com o da folha, apresentou efeito vasorelaxante dependente de endotélio, que possivelmente envolve a via do óxido nítrico (NO-GMPc) (Tao, Hu, & Shen, 2013).

Em contraste, apenas um estudo descrevendo a avaliação dos constituintes não voláteis de *A. zerumbet* foi encontrado. Neste, os autores investigaram o potencial vasodilatador do extrato hidroetanólico das folhas em leitões mesentéricos de ratos e também o efeito anti-hipertensivo crônico do extrato em ratos com hipertensão induzida por sal DOCA. Foi evidenciado efeito vasodilatador dependente do endotélio que envolve principalmente a via do NO-GMPc, embora o efeito possa envolver ainda a participação de receptores de bradicinina. O tratamento com o extrato hidroetanólico ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) por 28 dias reduziu a PAD, PAM e PAS dos ratos em comparação com o grupo não tratado. Por outro lado, os autores não determinaram os possíveis constituintes ativos do extrato (Moura et al., 2005).

Tomadas em conjunto, os trabalhos descritos acima corroboram o grande potencial cardiovascular de *A. zerumbet* observados na análise hemodinâmica de AAM, sugerindo que a atividade hipotensora independe de alterações na frequência cardíaca.

A investigação química de AAM por CLAE-EM evidenciou que os flavonoides são as substâncias com maior ocorrência no extrato. Mais da metade dos constituintes identificados em AAM são flavonoides, em especial flavonóis glicosilados. Sabe-se que esses constituintes possuem diversas atividades cardiovasculares tais como anti-hipertensiva e vasodilatadora. Diversos flavonóis têm apresentado efeito vasorelaxante que pode depender ou não do endotélio, além de capacidade de inibir a ECA (Loizzo et al., 2008). Considerando que os picos majoritários observados em AAM por CLAE-EM correspondem a flavonoides e ainda a grande ocorrência destas substâncias no extrato, supõem-se que esses constituintes sejam os principais responsáveis pela atividade hipotensora de AAM.

5.1.4. INVESTIGAÇÃO DE AAM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

A primeira avaliação dos efeitos de AAM na concentração de $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sobre a capacidade motora dos animais mostrou algum efeito tóxico durante a avaliação tendo alguns animais apresentado convulsões que evoluíram a óbito. Após o período de observação foram constatados nove óbitos ($n=10$), sendo necessário reduzir a concentração do extrato.

A administração de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AAM acarretou em prejuízo na coordenação motora dos animais, uma vez que foi observada redução significativa no tempo de permanência na barra giratória em comparação com o controle. No intervalo de 15 minutos foi observada uma permanência média de $133,4\pm 2,6$ s que se mostrou estatisticamente diferente do controle ($p<0,001$) e equivalente à causada pelo diazepam ($132,8\pm 2,6$ s). Com o passar do tempo, a permanência na barra aumentou, tendo sido observado $160,5\pm 1,77$ s no intervalo de 30 min, e $170,3\pm 0,5$ s após 60 min. Esses efeitos apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p<0,001$) e se mostraram menores que os causados pelo diazepam ($p<0,001$). As demais avaliações nos intervalos de 90 e 120 min apresentaram permanência de $176,0\pm 0,4$ s e $176,9\pm 0,3$ s, respectivamente e não foram estatisticamente significativas em comparação com o controle (**Figura 34**).

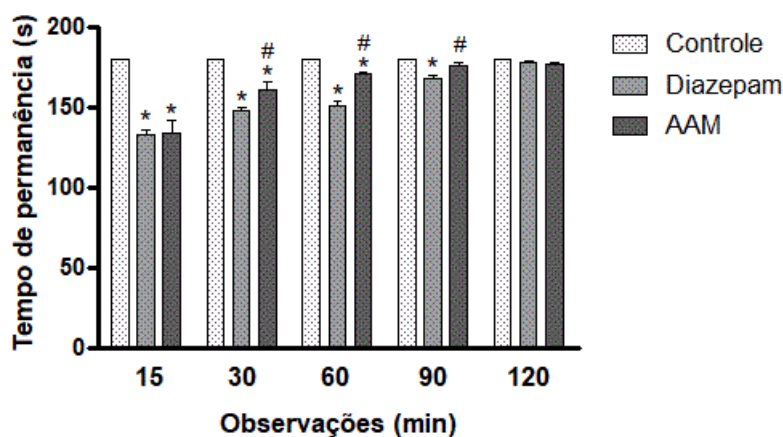


Figura 34: Resultados da avaliação de AAM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p<0,001$; e para o diazepam: # - $p<0,001$.

Embora não haja relatos acerca dos extratos de *Alpinia zerumbet*, existem investigações descrevendo os efeitos de seu óleo essencial no sistema nervoso central. No estudo conduzido por Araújo e colaboradores (2009) foram realizados diversos ensaios, a fim de avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto),

cataplexia, ansiedade (labirinto em cruz elevado) e depressão. O óleo essencial dessa planta promoveu uma redução dose-dependente da atividade locomotora e aumentou o estado cataléptico e a imobilidade dos animais, sugerindo efeito depressor e antipsicótico. Outra investigação avaliou o efeito do óleo essencial na capacidade motora dos camundongos, tendo sido observado nenhuma alteração significativa desse parâmetro (De Araújo et al., 2011).

5.2. *Cuphea carthagenensis* (Sete-sangrias)

5.2.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.2.1.1. Extratos em clorofórmio (ACC e ACC-R)

Os espectros de RMN dos extratos ACC e ACC-R revelaram apenas a presença de sinais característicos de ácidos graxos saturados (**Tabela A1 – Apêndice 1**). O mapeamento dos sinais presentes nos espectros HSQC e HMBC auxiliou na identificação dessa classe metabólica.

Tal como descrito para os espectros do gurdumão (AAC e AAC-R), a ocorrência de ácidos graxos saturados em ACC e ACC-R foi evidenciada pela presença dos sinais em 0,88 ppm, referente a metila terminal, e em 1,29-1,30 ppm referente a cadeia de carbonos metilênicos (**Tabela A2 – Apêndice 1**).

Os perfis metabólicos dos extratos da sete-sangrias (ACC e ACC-R) apresentaram-se bastante simples, possibilitando apenas a identificação de substâncias graxas. Os sinais em ACC-R se apresentaram mais intensos e largos do que os de ACC (**Figura 35**). Esta perda de resolução no extrato ACC-R pode estar relacionada à grande quantidade de ácidos graxos de cadeia média, que são comuns nessa espécie (Miller et al., 1964). Segundo Chatterjee e colaboradores (2010) a presença de quantidades significativas de substâncias semelhantes pode contribuir para o alargamento dos sinais no espectro.

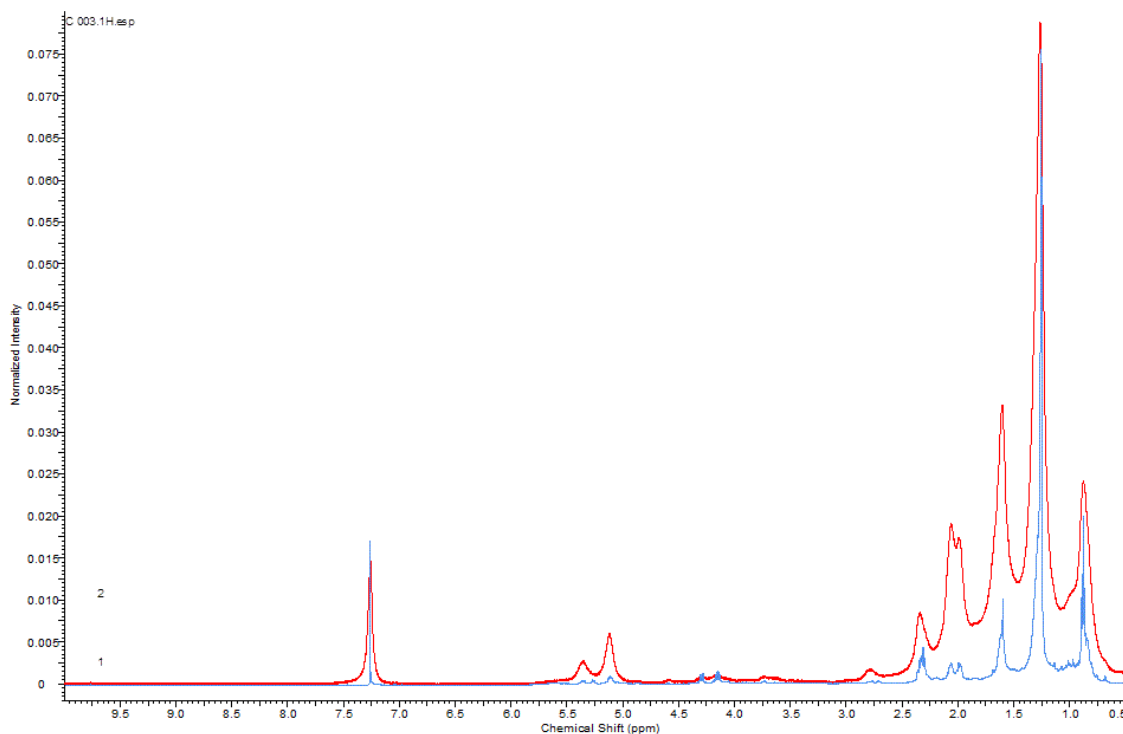


Figura 35: Comparativo dos espectros em CDCl_3 de ACC (azul) e ACC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

5.2.1.2. Extratos em metanol (ACM e ACM-R) e frações (ACM1 e ACM2)

Os espectros de RMN de ACM, ACM-R, ACM1 e ACM2 apresentaram sinais indicativos da presença de açúcares, ácidos orgânicos, ácidos graxos, flavonoides e de taninos hidrolisáveis (**Tabela A3 – Apêndice 1**).

Nos dois extratos (ACM e ACM-R) e na fração ACM1 foi possível verificar a presença de sinais de açúcares livres. Os sinais duplos referentes aos hidrogênios anoméricos dos isômeros alfa e beta da glicose foram observados em 5,10-5,11 ppm (3,6 Hz) e em 4,47 ppm (7,6 Hz), respectivamente, tal como descrito anteriormente para os extratos do gurdumão (**Tabela A4 – Apêndice 1**).

Por outro lado, apenas nos espectros de ACM e ACM1 foi possível identificar ácidos orgânicos simples, como o ácido succínico que foi detectado pela presença de um sinal simples em 2,56 ppm que acopla $^1J_{\text{CH}}$ com o carbono em 28,4 ppm (**Tabela A4 e Tabela A5 – Apêndice 1**) (Fan, 1996).

Devido à elevada concentração de substâncias graxas presentes nessa planta foi possível detectar a presença de ácidos graxos saturados e insaturados em ACM e de ácidos graxos saturados em ACM-R, ACM1 e ACM2. Os sinais referentes aos ácidos graxos saturados se mostraram semelhantes àqueles observados anteriormente nos extratos clorofórmicos dessa planta (AAC e AAC-R). Já para os

ácidos graxos insaturados presentes em ACM foi observado um sinal triplo em 0,97 ppm (7,3 Hz) que se mostra referente a metila terminal (**Tabela A4 – Apêndice 1**).

Foram observados sinais que corroboram a presença de flavonoides nos extratos ACM, ACM-R e na fração ACM2. Nos extratos ACM e ACM-R foram observados sinais referentes aos H6 e H8 em 6,20 ppm e em 6,40 ppm, além de um duplo duplete em 7,65 ppm referente a H6' que se mostra característico de anel B 1',3',4'-trissubstituído tal como de flavonoides como a luteolina e a quercetina. Os sinais referentes à H2' e H5' foram observados em 7,68 ppm e em 6,87 ppm, respectivamente (**Figura 36**). Pela análise do espectro HSQC foi possível determinar os carbonos os quais estes hidrogênios estão ligados (**Tabela 18**). Por outro lado, o mapa de correlação HMBC não demonstrou as correlações à longa distância entre estes hidrogênios, dificultando a determinação estrutural da substância.

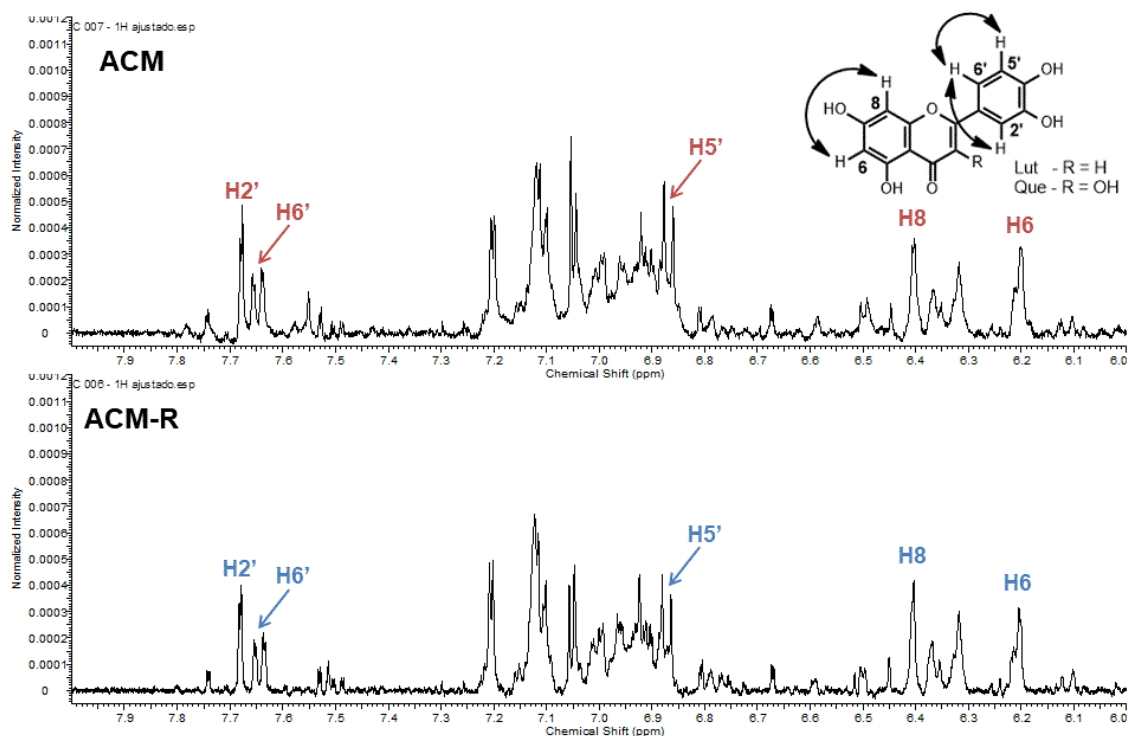


Figura 36: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de ACM e ACM-R demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.

Tabela 18: Deslocamentos químicos do flavonoide observado nos extratos ACM e ACM-R, e comparação com dados da literatura.

N	ACM		ACM-R		Luteolina ¹		Quercetina ²	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
6	6,20 m	98,2	6,20 m	98,3	6,19 d	100,1	6,19 d	99,9
8	6,40 d 1,8	93,1	6,40 m	93,1	6,42 d	95,0	6,38 d	94,8
2'	7,68 d 1,8	115,6	7,68 d 1,9	115,5	7,36 m	114,1	7,70 d	116,0
5'	6,87 d 8,5	114,6	6,87 d 8,3	114,6	6,88 d	116,8	6,86 d	117,6
6'	7,65 dd 8,2 e 1,8	121,4	7,64 dd 8,2 e 1,9	121,6	7,36 m	120,3	7,57 dd	123,1

¹-Lin, Pai, & Tsai, 2015, ²-Park et al., 2012.

O espectro de RMN ¹H da fração ACM2 apresentou sinais característicos de flavonoides semelhantes aos descritos nos extratos ACM e ACM-R. Entretanto, estes se apresentam em maior intensidade, sugerindo que o processo de fracionamento foi capaz de concentrar estas substâncias na fração ACM2. Foram observados dois sinais sobrepostos referentes aos H6 e H8 de flavonoides em 6,20 ppm e em 6,40 ppm. A ampliação destes sinais revela a presença de sinais duplos típicos com constante de acoplamento de aproximadamente 2 Hz. Além disso, foi observado um duplo duplete em 7,65 ppm (8,4 e 1,8 Hz) característico de anel B 1',3',4'-trissubstituído e condizente com o H6'. Os H2' e H5' foram detectados em 7,69 ppm (d, 1,8 Hz) e em 6,88 ppm (m) corroborando a presença de um flavonoide (**Figura 37**). Os mapas de correlação HSQC e HMBC revelaram os acoplamentos que se mostraram de acordo com a literatura (**Tabela 19**).

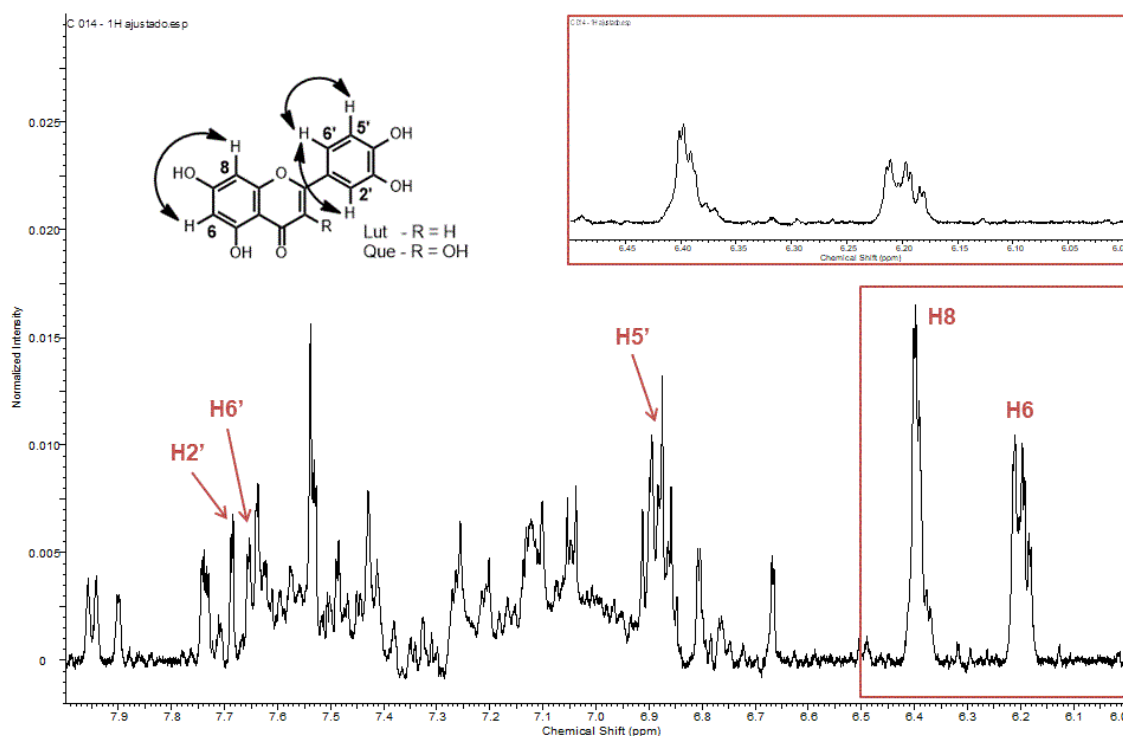


Figura 37: Ampliação (8,0 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD_3OD de ACM2 demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de flavonoides.

Tabela 19: Deslocamentos químicos do flavonoide observado na fração ACM2 e comparação com dados da literatura.

N	Flavonoide			Luteolina ¹		Quercetina ²	
	^1H	^{13}C	HMBC	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
6	6,20 m	98,1	93,0; 103,9; 164,5	6,19 d	100,1	6,19 d	99,9
7	-	164,5	-	-	166,4	-	166,1
8	6,40 m	93,0	98,1; 103,9; 156,7	6,42 d	95,0	6,38 d	94,8
9	-	156,7	-	-	159,4	-	158,4
10	-	103,9	-	-	105,3	-	105,6
2'	7,69 d 1,8	115,4	121,3	7,36 m	114,1	7,70 d	116,0
3'	-	144,5	-	-	147,0	-	145,9
5'	6,88 m	114,5	121,3; 144,5	6,88 d	116,8	6,86 d	117,6
6'	7,65 dd 8,4 e 1,8	121,3	115,4	7,36 m	120,3	7,57 dd	123,1

¹-Lin, Pai, & Tsai, 2015, ²-Park et al., 2012.

Nos espectros das frações ACM1 e ACM2 foram observados sinais que indicam a presença de taninos hidrolisáveis oriundos do ácido gálico. Na fração ACM1 foi observado um sinal simples em 7,06 ppm que apresentou acoplamento $^1J_{\text{CH}}$ com o carbono em 108,8 ppm. Estas evidências estão de acordo com os dados descritos

para o ácido gálico, entretanto, não é possível afirmar se esta substância se encontra na sua forma livre ou conjugada (M. Zhang et al., 2019). Além disso, os espectros de RMN ^1H das frações ACM1 e ACM2 apresentaram alguns sinais referentes aos H2-6 de ácidos gálicos na região entre 7,2 e 6,8 ppm (**Figura 38**).

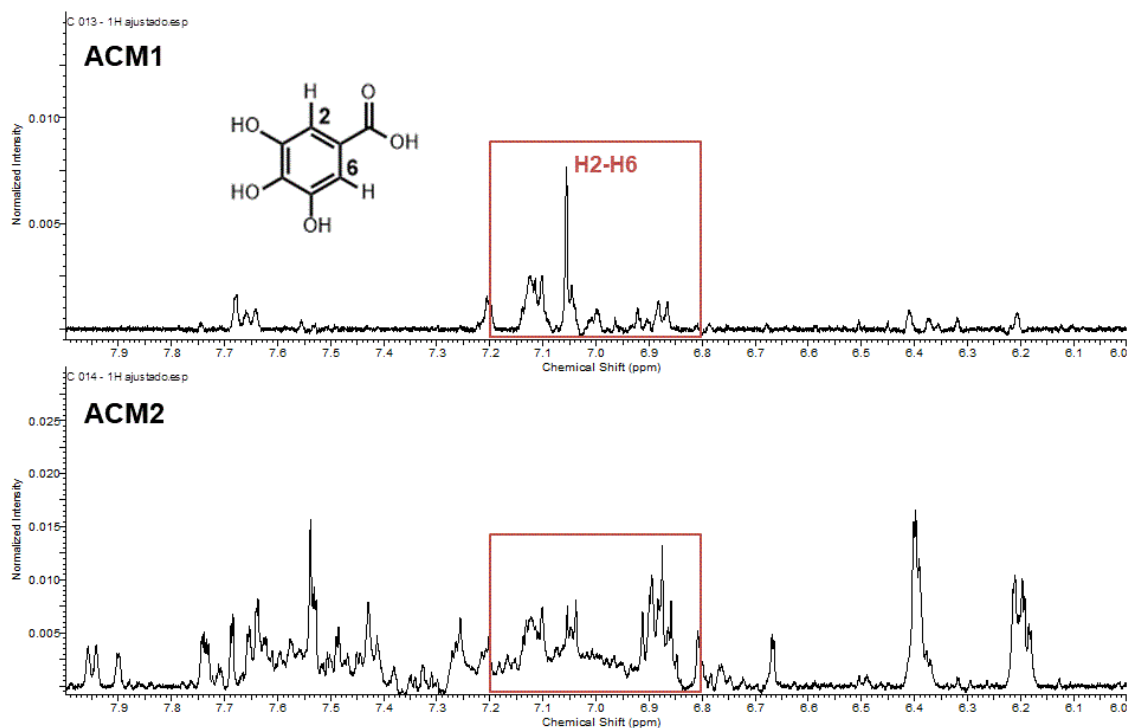


Figura 38: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD_3OD de ACM1 e ACM2 demonstrando a região referente à taninos hidrolisáveis.

No mapa de correlação HSQC foi possível verificar diversos acoplamentos entre estes hidrogênios com átomos de carbono em aproximadamente 109 ppm, tal como descrito para o ácido gálico (**Figura 39**). Estes sinais acoplado numa mesma região são referentes aos diferentes resíduos de ácidos gálicos que se encontram ligados a glicosídeos. Sabe-se que os sinais referentes aos resíduos gálicos variam de acordo com a posição em que este se encontra e ainda em relação à quantidade de resíduos (Cardullo et al., 2018).

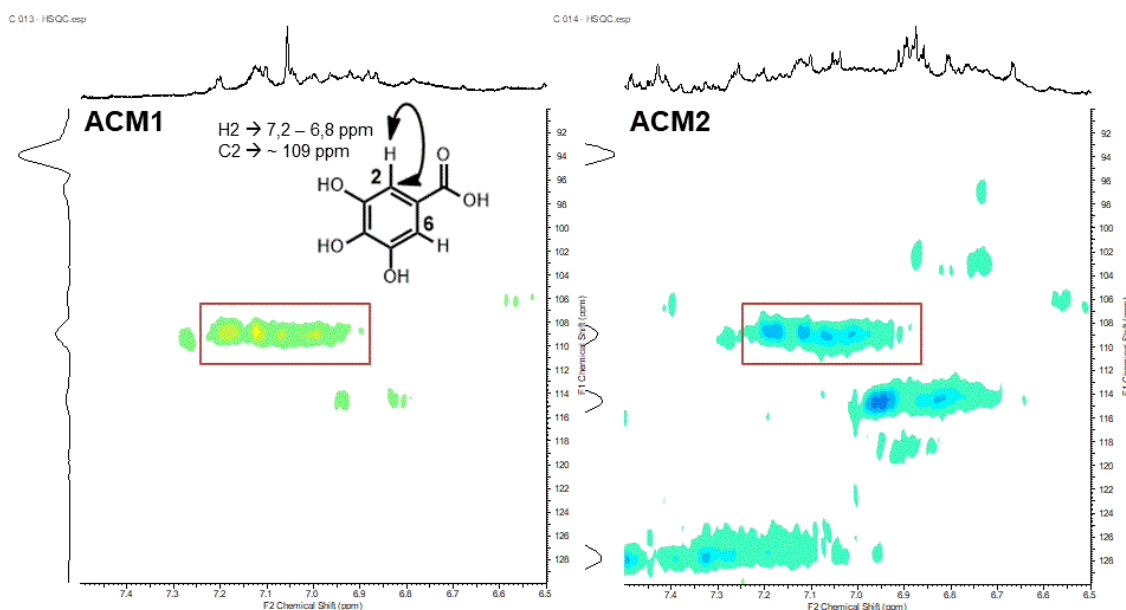


Figura 39: Ampliações dos espectros HSQC de ACM1 e ACM2 demonstrando a presença de sinais característicos de H2-6 de derivados do ácido gálico.

A fitoquímica das espécies do gênero *Cuphea* foi pouco explorada. A maior parte dos estudos tem devotado à análise e avaliação dos ácidos graxos, uma vez que estes despertam o interesse de diversos segmentos da indústria. Entretanto, substâncias como flavonoides e taninos hidrolisáveis foram descritos em *C. carthagenensis* (Sete-sangrias), com destaque para a identificação da quercetina-3-O-sulfato que é considerado marcador químico da espécie (Krepky et al., 2010; Schaedler et al., 2018). O estudo a cerca dos flavonoides de *C. carthagenensis* revelou apenas a ocorrência de flavonóis, em especial derivados glicosilados de quercetina, kaempferol e miricetina (Schaedler et al., 2018). Outros estudos conduzidos com *C. glutinosa* também revelou a presença de flavonóis glicosilados derivados da quercetina e do kaempferol (M. Santos et al., 2018; Zago et al., 2018). Estes estudos indicam que as espécies do gênero *Cuphea* produzem preferencialmente flavonóis. Desta forma, os sinais de flavonoides observados nos espectros de ACM, ACM-R e ACM2, possivelmente, são de um derivado da quercetina.

Taninos hidrolisáveis também foram descritos em algumas espécies do gênero *Cuphea* (Chen et al., 1999; Krepky et al., 2012; Morales-Serna et al., 2011; Schaedler et al., 2018). Essas substâncias geralmente são formadas por uma unidade de glicose central onde os resíduos de ácidos gálico ou seus produtos de oxidação se ligam, dando origem a estruturas complexas. A identificação destes componentes em extratos e frações vegetais por meio de RMN foi recentemente descrita por Cardullo e colaboradores (2018), onde as principais evidências observadas foram referentes aos

resíduos de ácidos gálicos e alguns sinais do glicosídeo que apareceram em regiões deslocadas em comparação à usual. Na análise dos espectros das frações ACM1 e ACM2 foi possível observar diversos sinais característicos dos resíduos gálicos, mas não os sinais referentes à unidade glicosídica. Entretanto, com base na ocorrência destas substâncias em espécies do gênero, é possível sugerir a presença destes constituintes nas frações.

Os perfis metabólicos de ACM e ACM-R apresentaram-se bastante semelhantes em relação à quantidade de sinais demonstrados e suas intensidades. A sobreposição dos espectros de RMN ^1H revelou alto grau de similaridade dos sinais nas regiões aromática (8,0 ppm a 6,0 ppm) e na de açúcares (5,0 ppm a 3,0 ppm), mas não na região referente aos ácidos graxos (2,5 ppm a 0,75 ppm). Em ACM-R foi observado uma maior quantidade de sinais nessa região, sendo que os mesmos também apresentaram aumento significativo em suas intensidades. Em relação às evidências descritas anteriormente e que sugerem a presença de flavonoides, observou-se um elevado grau de similaridade dos sinais de flavonoides em ambos os extratos (**Figura 40**). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nas intensidades dos sinais, o que sugere que a metodologia de extração rápida pode ser aplicada para triagem de flavonoides em amostras desta planta.

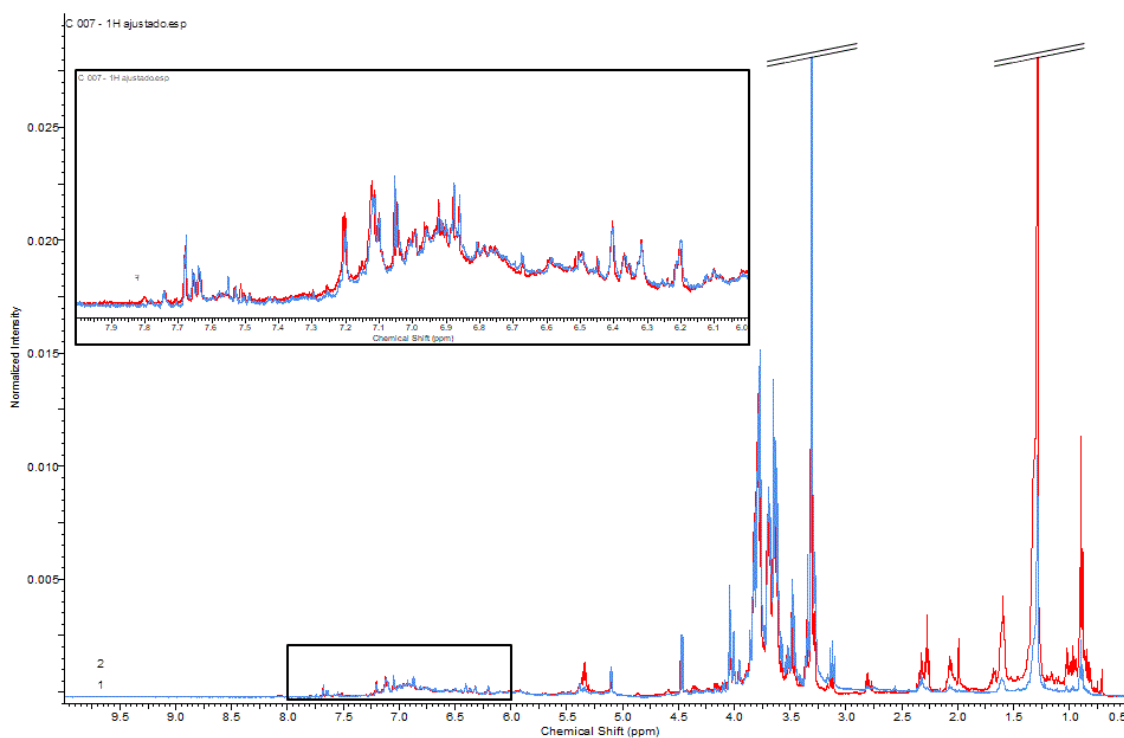


Figura 40: Comparativo dos espectros em CD_3OD de ACM (azul) e ACM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

Essa maior intensidade de sinais graxos em ACM-R está de acordo com o descrito anteriormente para AAM-R. Como o material vegetal extraído pelo método em duas etapas já foi extraído com clorofórmio, substâncias de menor polaridade como os ácidos graxos estão preferencialmente concentrados nesses extratos. De maneira contrária, o material vegetal que ainda não foi extraído e apresenta-se intacto, tal como o utilizado na extração rápida com solventes deuterados, resultará em maiores concentrações de substâncias menos polar, acarretando no aumento da intensidade destes sinais no espectro de ACM-R.

5.2.2. INVESTIGAÇÃO DE ACM POR CLAE-EM

No curso do desenvolvimento da metodologia analítica para análise do extrato ACM foram evidenciados alguns problemas inerentes à sua composição química. Durante a etapa de definição dos parâmetros cromatográficos, foi evidenciado que a amostra causou danos à pré-coluna. Acredita-se que o elevado teor de taninos hidrolisáveis, que são descritos para as espécies da família Lythraceae, tenha contribuído para tal. Visando minimizar outros possíveis danos ao sistema cromatográfico, optou-se pela troca do sistema de eluição e pela realização da análise apenas no modo de ionização negativo.

Conforme pode ser observado na **Figura 41 (A)** o cromatograma de ACM demonstrou um perfil atípico, apresentado dois picos majoritários sendo o primeiro no início da eluição (2,3 min) e o segundo, mais intenso e mais largo, ao término da mesma (126,6 min). No primeiro pico foram observados íons moleculares de m/z 217,0474 e 377,0849 que, embora tenham sido fragmentados, não apresentaram nenhum sinal no espectro MS^2 . A busca por candidatos que estivessem de acordo para os íons descritos acima sugerem que esses correspondam a açúcares, sendo sinal de m/z 217 $[M+Cl]^-$ referente a sacarídeos como manitol, sorbitol, entre outros, e o sinal de m/z 377 $[M-H]^-$ referente a dissacarídeos como a lactose, sacarose, entre outros. Já o segundo pico exibiu, entre outros, o íon m/z 311,1647 que embora tenha apresentado espectro de fragmentação não foi possível determinar sua estrutura.

Por outro lado, diversos outros sinais de menor intensidade foram observados entre estes dois sinais de maior intensidade. A **Figura 41 (B)** mostra a ampliação do cromatograma de ACM entre 3,0 min e 125 min, evidenciando as substâncias identificadas.

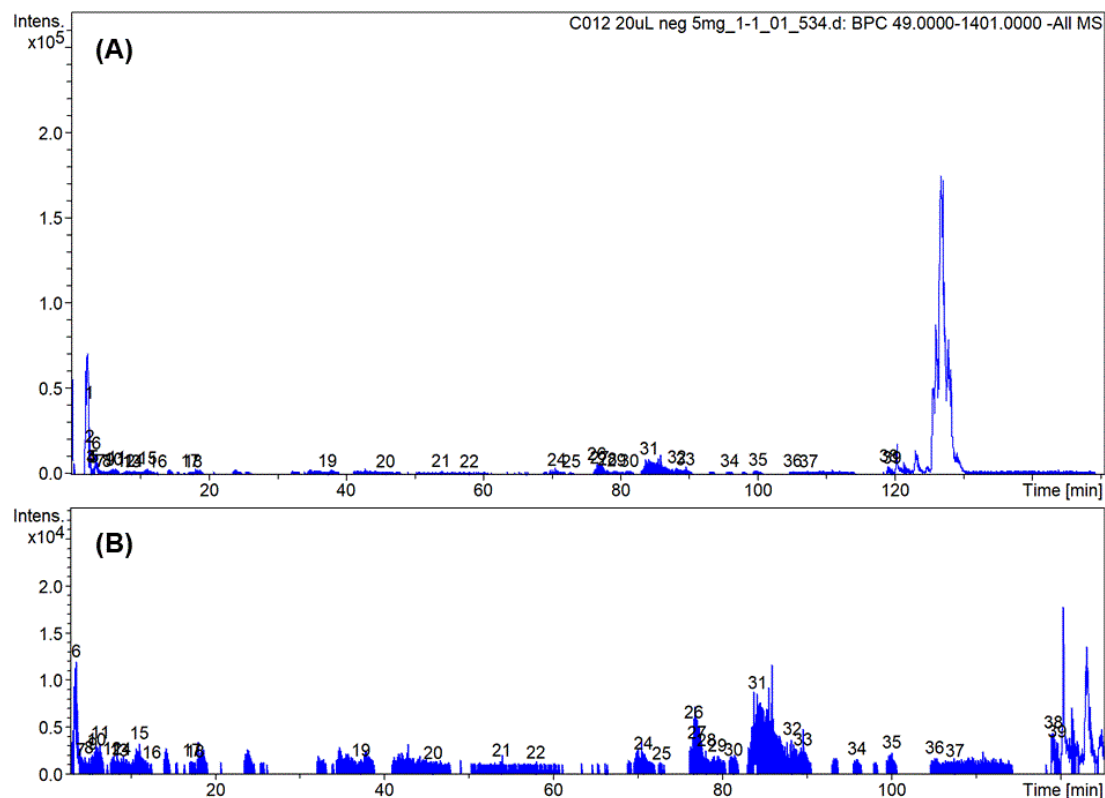


Figura 41: (A) Cromatograma do pico base (BPC) de ACM obtido pelo modo de ionização negativo. (B) Ampliação (3 min – 125 min) do BPC de ACM demonstrando os picos minoritários presentes. Os números representam as substâncias identificadas.

Ao todo foram identificadas 39 substâncias como: ácidos orgânicos simples, ácidos benzoicos, taninos, flavonoides, entre outras. O tempo de retenção, o íon molecular experimental e adutos formados, a fórmula molecular, a massa teórica, o erro da medida, além dos picos observados no espectro MS² e a proposta de identificação para cada um dos picos assinalados são descritos na **Tabela 20**.

Tabela 20: Substâncias identificadas na análise de ACM por CLAE-EM no modo negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	2,6	133,0144 [M-H]-	C ₄ H ₆ O ₅	133,0142 [M-H]-	1,50	-	Ácido málico	[1]
2	2,8	191,0195 [M-H]-	C ₆ H ₈ O ₇	191,0197 [M-H]-	-1,04	-	Ácido cítrico	[1]
3	2,9	290,0880 [M-H]-	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	290,0881 [M-H]-	-0,34	128	Ácido piroglutâmico-O-glicosídeo	[5]
4	2,9	128,0349 [M-H]-	C ₅ H ₇ NO ₃	128,0353 [M-H]-	-3,00	-	Ácido piroglutâmico	[4]
5	3,3	331,0677 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0670 [M-H]-	2,11	169 ; 125	Galoil-glicosídeo	[2]
6	3,6	169,0144 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142 [M-H]-	1,18	125; 124	Ácido gálico	[1]
7	4,2	331,0675 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0670 [M-H]-	1,51	169 ; 125	Galoil-glicosídeo	[2]
8	5,2	305,0664 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0666 [M-H]-	-0,65	137	(<i>epi</i>)galocatequina (ou isômero)	[2]
9	5,6	153,0191 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193 [M-H]-	-1,30	-	Ácido protocatecúico	[2]
10	6,0	315,0718 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315,0721 [M-H]-	-0,95	152 ; 108	Ácido protocatecúico-O-glicosídeo	[1]
11	6,4	248,9709 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₈ S	248,9710 [M-H]-	-0,40	169; 125	Ácido gálico-sulfato	[6]
12	7,9	483,0777 [M-H]-	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483,0780 [M-H]-	-0,62	211	Digaloil-glicosídeo	[2]
13	8,7	216,9815 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₆ S	216,9813 [M-H]-	0,92	-	Ácido hidroxibenzóico-sulfato	[7]
14	9,0	783,0685 [M-H]-	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0686 [M-H]-	-0,12	275	Pedunculagina	[2]
15	11,1	183,0297 [M-H]-	C ₈ H ₈ O ₅	183,0298 [M-H]-	-0,54	140	Metil galato	[2]
16	12,5	289,0716 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0717 [M-H]-	-0,34	-	(<i>epi</i>)catequina (ou isômero)	[2]
17	17,3	262,9866 [M-H]-	C ₈ H ₈ O ₈ S	262,9868 [M-H]-	-0,76	183 ; 140	Metil galato-sulfato	[6]
18	17,6	325,0921 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0928 [M-H]-	-2,15	119	Ácido cumárico-O-glicosídeo	[5]
19	37,2	305,0666 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0666 [M-H]-	0,00	-	(<i>epi</i>)galocatequina (ou isômero)	[2]
20	45,7	543,0457 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₅ S	543,0453 [M-H]-	0,73	463; 301	Quercetina-O-glicosídeo-sulfato	[8]
21	53,8	593,1495 [M-H]-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]-	-2,69	593; 473; 383; 353	Vicenina-2	[1]
22	57,9	479,0817 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0831 [M-H]-	-2,92	316	Miricetina-O-glicosídeo	[3]
23	66,2	449,0713 [M-H]-	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449,0725 [M-H]-	-2,67	316	Miricetina-O-arabinosídeo	[3]
24	70,6	463,0879 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]-	-0,64	463; 301	Quercetina-3-O-glicosídeo (ou isômero)	[3]
25	72,7	463,0879 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]-	-0,64	301	Quercetina-3-O-glicosídeo (ou isômero)	[3]
26	76,5	187,0971 [M-H]-	C ₉ H ₁₆ O ₄	187,0975 [M-H]-	-2,13	-	Ácido azeláico	[2]

Tabela 20 (cont.): Substâncias identificadas na análise de ACM por CLAE-EM no modo negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
27	76,9	477,0673 [M-H]-	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]-	-0,20	301 ; 151	Quercetina-3-O-glicoronídeo (ou isômero)	[3]
28	78,0	463,0881 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]-	-0,21	300	Quercetina-3-O-glicosídeo (ou isômero)	[3]
29	79,3	477,0675 [M-H]-	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]-	0,20	301	Quercetina-3-O-glicoronídeo (ou isômero)	[3]
30	81,2	609,1460 [M-H]-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]-	-0,16	609; 300	Rutina	[1]
31	84,1	380,9919 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S	380,9922 [M-H]-	-0,78	301 ; 151	Quercetina-3-O-sulfato	[3]
32	88,1	380,9922 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S	380,9922 [M-H]-	0,00	301; 151	Quercetina-3-O-sulfato (isômero)	[3]
33	89,4	433,0772 [M-H]-	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0776 [M-H]-	-0,92	300	Quercetina-3-O-arabinosídeo	[3]
34	95,8	447,0928 [M-H]-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0932 [M-H]-	-0,89	284	Kaempferol-O-glicosídeo	[3]
35	99,9	593,1507 [M-H]-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]-	-0,67	593; 285	Kaempferol-O-rutinosídeo	[3]
36	105,0	364,9971 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₀ O ₉ S	364,9974 [M-H]-	-0,82	285 ; 257; 229	Kaempferol-sulfato	[9]
37	107,3	600,3881 [M+Cl]- 610,4204 [M+FA-H]-	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	600,3897 [M+Cl]-	-2,66	- 564 ; 225	Ciclo pentaleucil(isoleucil)	[4]
38	119,0	713,4747 [M+Cl]- 723,5020 [M+FA-H]-	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	713,4737 [M+Cl]-	1,40	677 677 ; 225	Ciclo hexaleucil(isoleucil)	[4]
39	119,4	826,5574 [M+Cl]- 836,5840 [M+FA-H]-	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	826,5578 [M+Cl]-	-0,48	826 ; 790 790 ; 225	Ciclo heptaleucil(isoleucil)	[4]

[1] – Ammar et al., 2017; [2] - Bijttebier et al., 2016; [3] - Schaedler et al., 2018; [4] - Duan et al., 2017; [5] - Sun et al., 2015; [6] - Clarke et al., 2014; [7] - Geng et al., 2014; [8] - Abu-Reidah et al., 2017; [9] - Guo et al., 2015

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

A análise de ACM por CLAE-EM revelou a presença de ácidos orgânicos, derivados de aminoácidos, ácidos benzoicos, taninos, flavonoides, derivados cinâmicos e peptídeos. Os primeiros metabólitos identificados foram ácidos orgânicos simples como o ácido málico (**1**) e ácido cítrico (**2**), seguidos por produtos do metabolismo de aminoácidos como o ácido piroglutâmico-O-glicosídeo (**3**) e o ácido piroglutâmico (**4**). Posteriormente foi observado um sinal de m/z 169 que apresentou perfil de fragmentação característico do ácido gálico (**6**). Foi observado um fragmento intenso de m/z 124 que se mostrou referente ao íon radicalar gerado pela perda de CO₂ [M-H-CO₂]⁻. Outros dois picos (**5**, **7**) próximos ao ácido gálico (**6**) apresentaram íon molecular m/z 331 e foram identificados como isômeros do galoil-glicosídeo. Estes picos apresentaram dois fragmentos característicos sendo m/z 169 referente ao ácido gálico após perda da glicose [M-H-Glc]⁻, e m/z 125 referente à perda posterior de CO₂ pelo ácido gálico [M-H-Glc-CO₂]⁻. Outros dois taninos derivados do ácido gálico foram identificados, sendo o digaloil-glicosídeo (**12**) e a pedunculagina (**14**).

Dentre as classes de substâncias identificadas em ACM destacam-se os derivados benzoicos e os flavonoides. Ao todo foram identificados sete ácidos benzoicos ou seus derivados glicosilados ou sulfatados. Além do ácido gálico, foram identificados o ácido protocatecúico (**9**) e seu derivado glicosilado (**10**) que apresentou fragmento m/z 152 referente à perda do glicosídeo [M-H-Glc]⁻ e m/z 108 referente à perda posterior de CO₂ [M-H-Glc-CO₂]⁻. Já o pico 11 apresentou um íon molecular de m/z 248,9709 que se mostrou característico de substâncias sulfatadas. A análise do espectro MS² mostrou se tratar do ácido gálico-sulfatado (**11**) uma vez que foram observados os fragmentos característicos m/z 169 e m/z 125. Outros dois derivados benzoicos sulfatados foram identificados nos picos 13 e 17 correspondendo ao ácido hidroxibenzoico-sulfatado (**13**) e ao metil galato-sulfatado (**17**). Este último também foi identificado em sua forma livre (**15**).

Já os flavonoides representaram grande parcela dos metabólitos identificados em ACM, tendo sido observados 19 ocorrências. Além de flavonoides como as substâncias **8**, **16** e **19**, foi observada uma predominância de flavonóis glicosilados que compreendem em sua maioria derivados de quercetina. Ao todo foram identificados 10 derivados de quercetina (**20**, **24**, **25**, **27-33**), três derivados do kaempferol (**34-36**) e dois derivados da miricetina (**22**, **23**). Estes foram identificados com base nos espectros de fragmentação onde foram observados os sinais referentes às suas agliconas, sendo o m/z 285 referente ao kaempferol, m/z 301 referente à quercetina e m/z 316 referente à miricetina. As substâncias **20**, **22-25**, **27-30**, **33-35** apresentaram perfil condizente com o de O-glicosídeos, tendo sido observadas as perdas de 132 Da (arabinose), 162 Da (glicose), 176 Da (ácido glicurônico) e 308 Da (rutinosídeo). Além

destas, foi constatada uma perda de 79,9 Da que se mostrou referente à saída de um substituinte sulfato (SO_3H). Os picos 20, 31, 32 e 36 que apresentaram íon molecular m/z 543,0457, m/z 380,9919, m/z 380,9922 e m/z 364,9971, respectivamente, apresentaram fragmento oriundo da perda de SO_3H . Estas substâncias foram identificadas como quercetina-*O*-glicosídeo-sulfato (**20**), isômeros da quercetina-3-*O*-sulfato (**31**, **32**) e kaempferol-sulfato (**36**).

Um último flavonoide foi observado no pico 21 apresentou íon molecular m/z 593 condizente com flavonoides diglicosilados. O espectro MS^2 desta substância não demonstrou o pico característico da aglicona que é formado a partir da perda do glicosídeo. Por outro lado, observaram-se três picos no espectro de fragmentação desta substância que são referentes às quebras intraglicosídicas. Estas podem ocorrer em diversos pontos do glicosídeo de modo que as quebras 1-3, 1-4 e 1-5 acarretam nas perdas de 120 Da, 90 Da e 60 Da, respectivamente. Dessa forma, esse pico foi identificado como um flavonoide-*C*-diglicosilado denominado vicenina-2 (**21**). A proposta de fragmentação da vicenina-2 (**21**) e das demais substâncias que apresentaram espectro MS^2 são descritos na **Figura 42**.

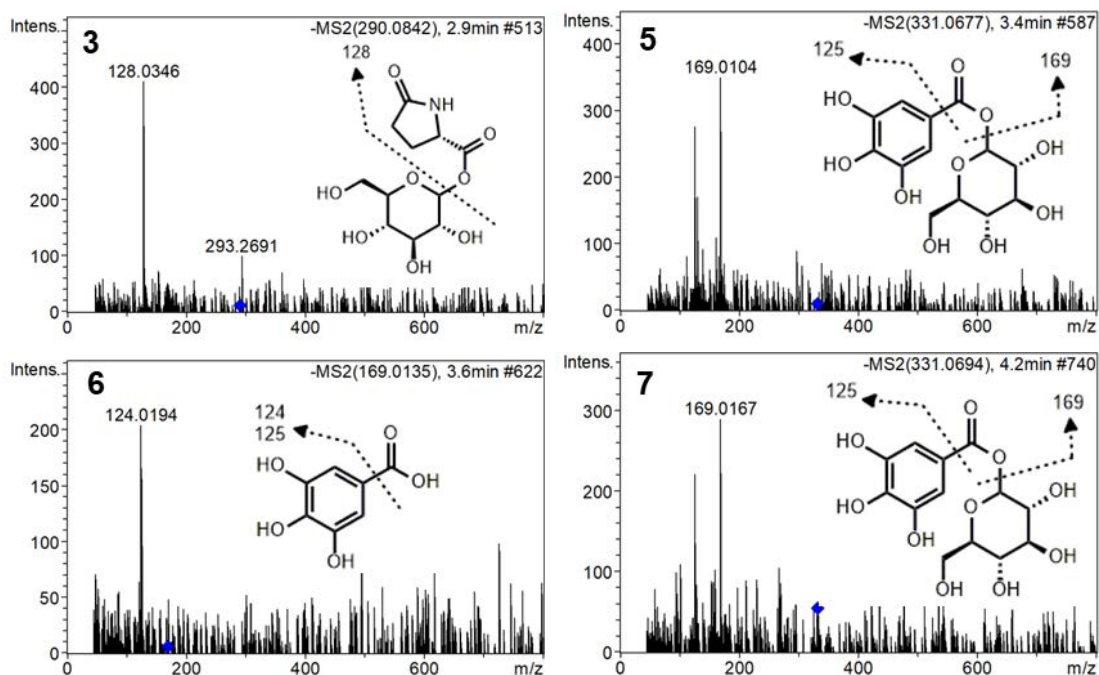


Figura 42: Espectros de MS^2 das substâncias identificadas em ACM e suas propostas de fragmentação.

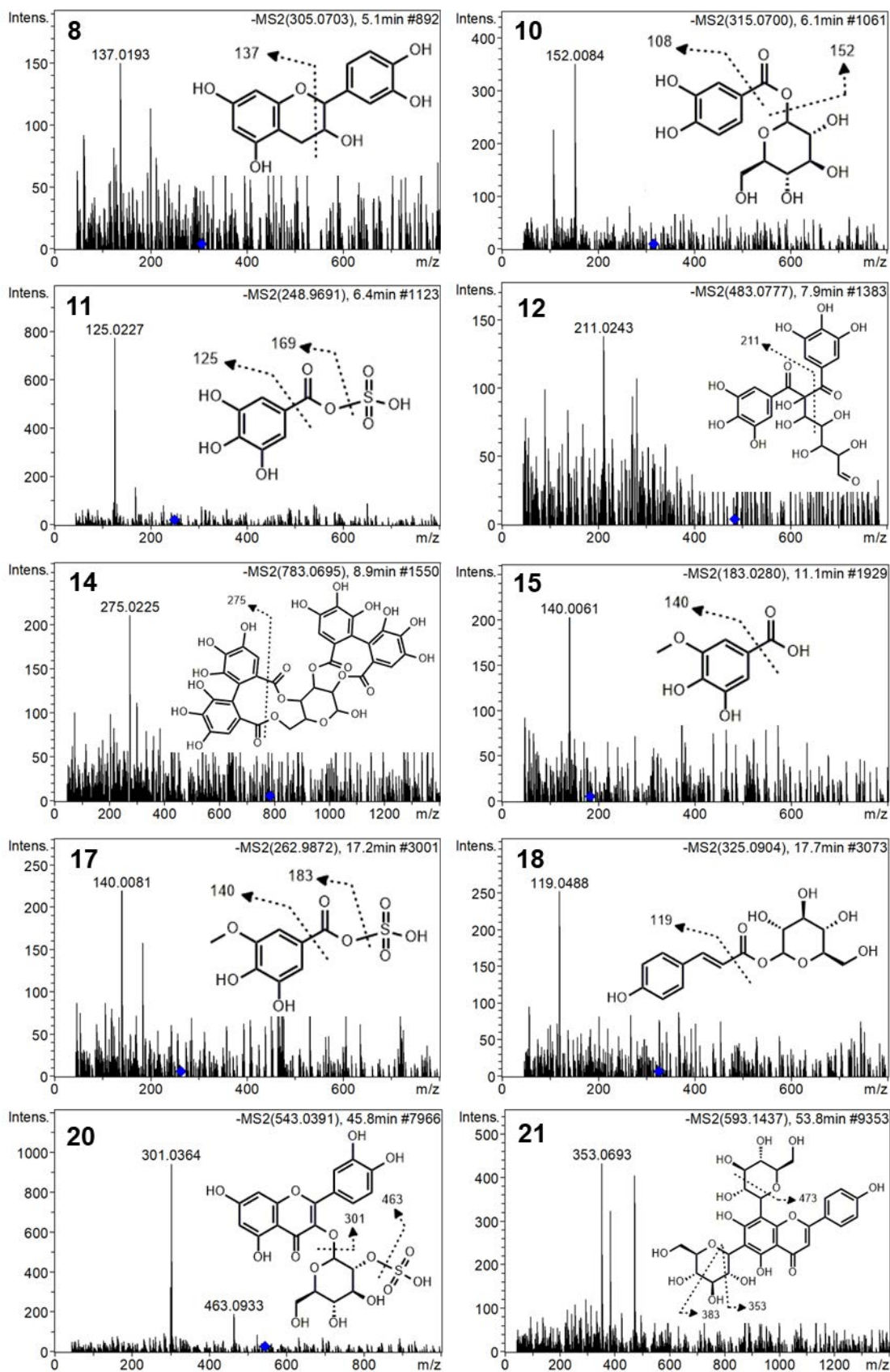


Figura 42 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em ACM e suas propostas de fragmentação.

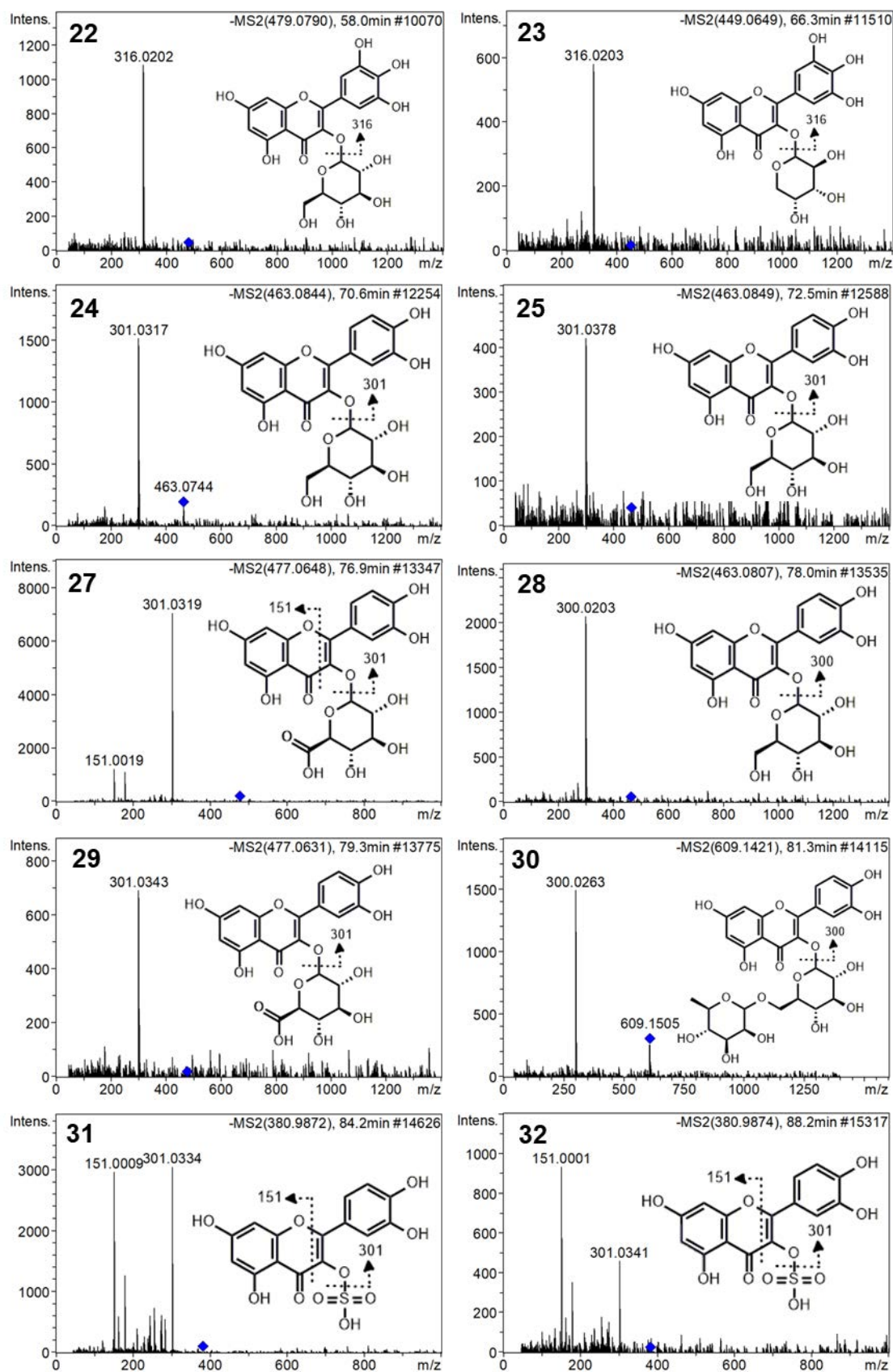


Figura 42 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em ACM e suas propostas de fragmentação.

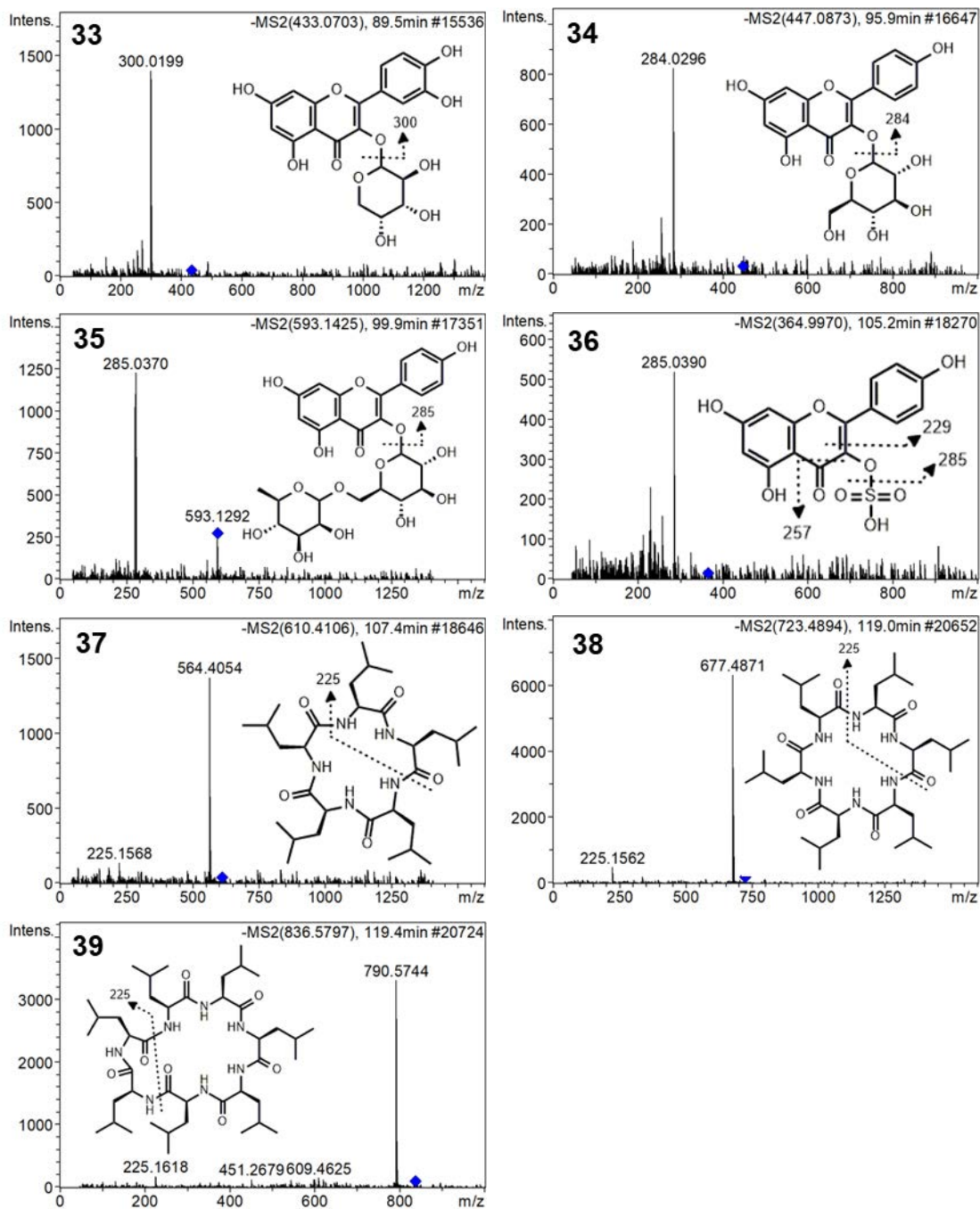


Figura 42 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em ACM e suas propostas de fragmentação.

A composição química de *C. carthagenensis* ainda se mostra pouco explorada, sendo descrito principalmente a ocorrência de taninos gálicos e de flavonoides derivados da quercetina, miricetina e kaempferol. Estes geralmente apresentam-se substituídos por açúcares como glicose, ácido glicurônico, arabinose e rutinosídeo (ramnose-(1,6)-glicose) ocorrendo nas posições 3 e 5 (Krepesky et al., 2010; Schaedler et al., 2018). As mesmas características foram observadas em outras espécies do gênero. A investigação química de 16 espécies de *Cuphea* revelou a predominância

destes flavonóis com destaque para os 3-O-glicosídeos de quercetina e miricetina. Foi evidenciado ainda que essas espécies produzem preferencialmente monoglicosídeos e diglicosídeos, tendo sido descrito a ocorrência de triglicosídeos em apenas duas espécies (*C. disperma* e *C. ericoides*) (D. Y. Santos, Salatino, & Salatino, 1995). Em outro trabalho, a investigação de *C. glutinosa* revelou resultados semelhantes, tendo sido descritos três glicosídeos de quercetina (M. Santos et al., 2018). Tomadas em conjunto, estes dados corroboram os resultados obtidos pela análise de ACM por CLAE-EM, além de suportar a identificação de quercetina descrita pela análise do extrato por RMN.

Deve-se ressaltar ainda a identificação de metabólitos sulfatados como a quercetina-3-sulfato que é considerada o marcador químico da espécie (Krepesky et al., 2010). Além desta, foram identificados outros seis metabólitos sulfatados (**11**, **13**, **17**, **20**, **32**, **36**) que incluem um isômero da quercetina-3-sulfato (**32**). A exceção do isômero (**32**), as outras cinco substâncias são descritas pela primeira vez em *C. carthagenensis*, sendo **11** e **17** inéditas no reino vegetal.

Uma grande variedade de taninos gálicos e elágicos tem sido descrito nas espécies de *Cuphea* (Chen et al., 1999; Morales-Serna et al., 2011). Alguns estudos resultaram na obtenção de substâncias inéditas como a Cuphiina D₁ e D₂ presentes em *C. hyssopifolia* (L. Chen et al., 1999). Por outro lado, pouco é conhecido a cerca dos taninos presentes em *C. carthagenensis* mesmo sabendo que esta planta produz grandes quantidades desses componentes. No estudo realizado por Krepesky e colaboradores (2012) foi feita a quantificação do teor de taninos em dois extratos das partes aéreas desta planta, tendo sido evidenciado 11,8% de taninos no extrato aquoso e 38,3% no extrato etanólico. Este estudo corrobora os problemas encontrados na análise de ACM por CLAE-EM, uma vez que se optou pela realização de um extrato metanólico. Além disso, embora poucos taninos tenham sido identificados por esta análise, acredita-se que os outros possam estar presentes concomitantemente no primeiro pico majoritário (2,3 min). Não obstante, a possibilidade de ocorrência de taninos sulfatados não pode ser descartada, uma vez que foram identificadas outras substâncias com este substituinte. Novas investigações visando o estudo dos taninos de *C. carthagenensis* se mostram de grande interesse.

5.2.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE ACM

A avaliação hemodinâmica de ACM abrangeu a utilização de seis animais dos quais cinco apresentaram perfis semelhantes e apropriados para análise estatística. O extrato ACM provocou uma hipotensão mais acentuada do que a causada pelo DMSO e bastante duradora, de modo que passados alguns minutos da administração do extrato ainda era possível observar diferenças significativas em relação à pressão inicial (controle). A **Figura 43** demonstra o perfil obtido de um dos animais utilizados na análise do extrato ACM.

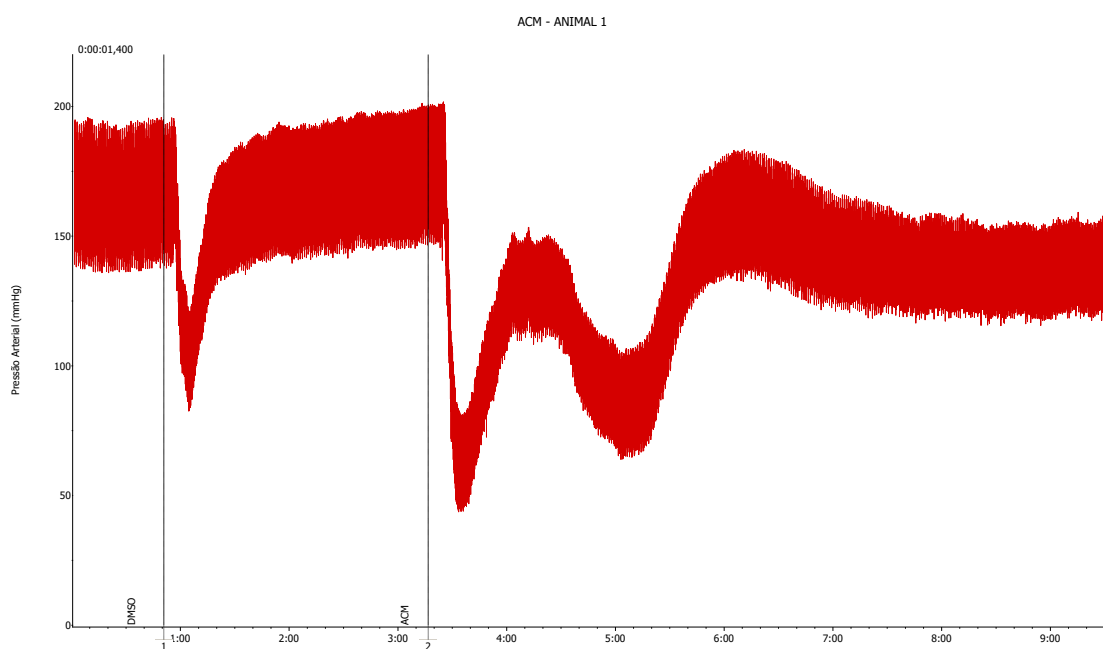


Figura 43: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato ACM, respectivamente.

A administração de ACM promoveu reduções drásticas nas PAS, PAM e PAD dos animais avaliados. Inicialmente, os parâmetros hemodinâmicos médios dos animais mostravam-se em $166,9 \pm 6,6$ mmHg para PAS, $147,2 \pm 5,4$ mmHg para PAM e $129,4 \pm 5,0$ mmHg para PAD. No pico de hipotensão causado pela administração do extrato ACM os mesmos parâmetros apresentaram-se em $54,1 \pm 15,0$ mmHg para PAS, $37,5 \pm 11,2$ mmHg para PAM e $27,2 \pm 7,8$ mmHg para PAD.

O resultado acima mostra que o extrato ACM reduziu as PAS, PAM e PAD, respectivamente, em $112,8 \pm 13,2$ mmHg, $109,7 \pm 9,7$ mmHg e $102,2 \pm 7,6$ mmHg. Este efeito foi maior do que o causado pelo DMSO, apresentando uma diferença de $42,4 \pm 9,1$ mmHg para PAS, $34,0 \pm 6,5$ mmHg para PAM e $24,5 \pm 6,2$ mmHg para PAD. A análise estatística revelou que os efeitos apresentados pelo DMSO e ACM diferem do

controle ($p < 0,001$), de modo que o efeito de ACM sob todas as pressões também foi diferente em relação ao DMSO ($p < 0,05$) (**Figura 44**).

O extrato ACM mostrou efeitos sobre a frequência cardíaca dos animais avaliados. A administração desse extrato promoveu uma redução de $135,4 \pm 36,7$ bpm que se mostrou $50,5 \pm 21,4$ bpm maior do que a causada pelo DMSO. A análise estatística revelou que ambos produziram redução significativa em relação ao controle ($p < 0,01$ para DMSO, $p < 0,001$ para ACM), sendo evidenciada a diferença entre o efeito do DMSO e do extrato ($p < 0,05$) (**Figura 44**).

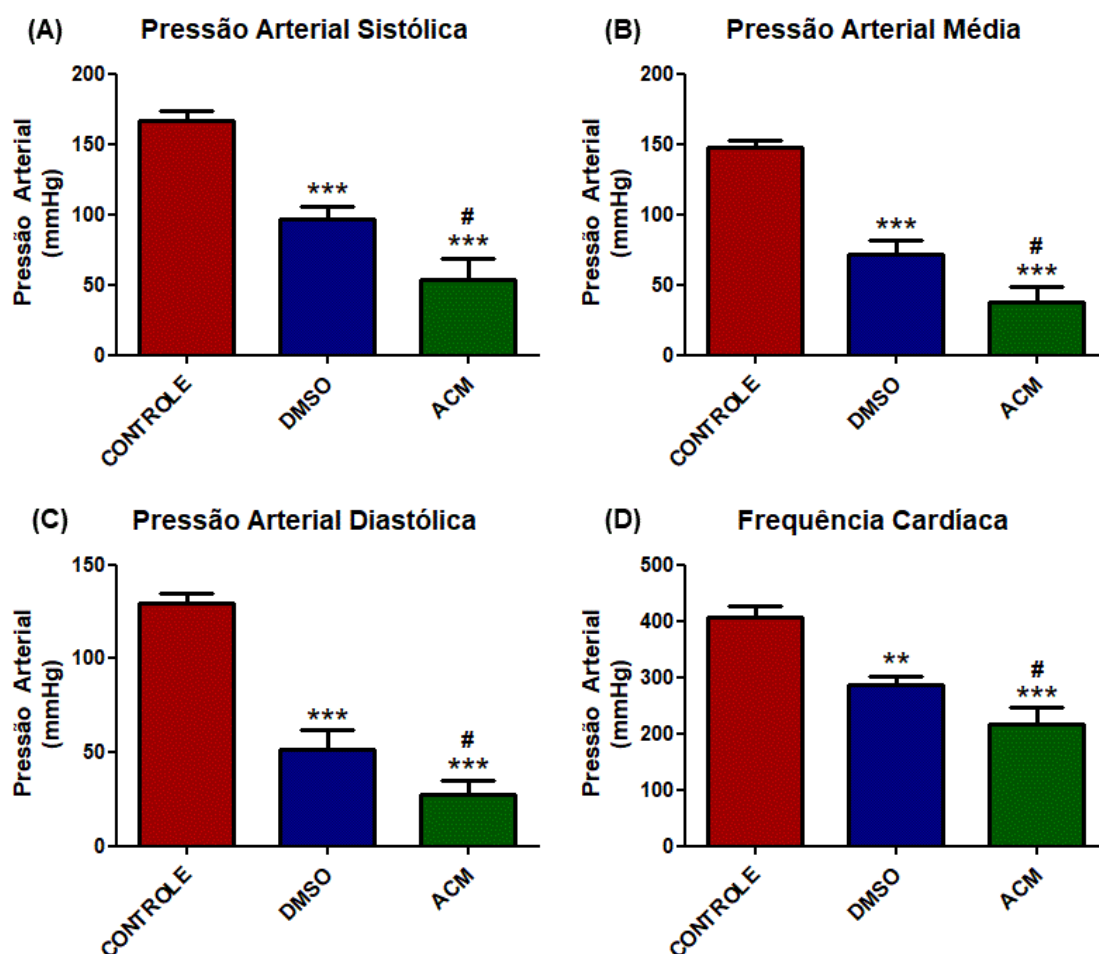


Figura 44: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato ACM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Alguns estudos devotaram à análise das propriedades cardiovasculares de *C. carthagenensis*. O extrato das folhas em diclorometano/metanol (1:1) apresentou atividade inibitória sobre a ECA, enquanto outros extratos e frações apresentaram efeito vasodilatador em anéis de aorta torácica de ratos (Braga et al., 2000; Krepsky et al., 2012; Schuldt et al., 2000). Outra investigação evidenciou efeito cardioprotetor

da infusão das folhas desta planta, uma vez que a mesma foi capaz de preservar a função renal, além de prevenir a elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca de ratos hipertensos e ovariectomizadas (Schaedler et al., 2018).

No estudo conduzido por Prando e colaboradores (2015) foi realizada a investigação hemodinâmica da fração solúvel em etanol da infusão de *C. carthagenensis*. A administração de 30, 100 e 300mg·kg⁻¹ da fração em ratos Wistar normotensos anestesiados não apresentou efeitos significativos sobre a PAM e frequência cardíaca (Prando et al., 2015).

Embora esse estudo não tenha evidenciado o efeito hipotensor da fração etanólica de *C. carthagenensis*, deve-se considerar que o mesmo foi conduzido a partir de uma fração obtida do extrato aquoso e que a utilização de diferentes solventes acarreta em extratos com diferentes composições. De fato, isto foi evidenciado num estudo recente que demonstrou que os extratos dessa planta apresentam diferenças significativas em sua composição, de acordo com o solvente utilizado. O extrato aquoso, por exemplo, apresentou menores teores de flavonoides, taninos e fenólicos do que o extrato etanólico (Krepsky et al., 2012). Desta forma, sugere-se o efeito observado na avaliação hemodinâmica de ACM se deve a possíveis variações em sua composição, dadas as diferenças no processo de extração. Ademais, os outros trabalhos que descrevem atividade vasorelaxante e inibitória sobre a ECA corroboram os resultados observados para ACM.

Por fim, não foi possível sugerir uma classe de substâncias responsável pelas atividades observadas, uma vez que apenas substâncias minoritárias foram identificadas por CLAE-EM. Embora as análises por RMN sugiram a presença de taninos gálicos, outras investigações se fazem necessárias a fim de assegurar seus constituintes majoritários.

5.2.4. INVESTIGAÇÃO DE ACM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

Na análise do extrato ACM também foram observados efeitos tóxicos na concentração de $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Durante a primeira avaliação deste extrato, após 120 minutos da administração, dois animais evoluíram a óbito ($n=10$). A fim de verificar se esta ocorrência se devia a algum efeito de ACM, foi realizada uma segunda investigação utilizando a mesma concentração de extrato. Durante a avaliação dos animais no intervalo de 60 min, um dos animais ($n=10$) apresentou imobilidade total evoluindo a óbito na sequência. Desta forma, optou-se pela repetição do ensaio utilizando uma menor concentração de extrato, tal como feito para AAM.

Curiosamente, a redução da concentração de ACM para $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ acarretou em três óbitos durante a análise. Cinco minutos após a administração do extrato, um dos animais ($n=10$) convulsionou e evoluiu a óbito. De maneira semelhante, outros dois animais vieram a óbito cerca de 90 minutos após a administração do extrato.

Esses resultados demonstram que ACM apresenta efeitos tóxicos em camundongos quando administrados por via intraperitoneal, sendo necessária a determinação da dose letal (DL50) do extrato. A investigação de outras vias de administração também se mostra de interesse, uma vez que não foram observados óbitos durante os ensaios hemodinâmicos, onde o extrato foi administrado por via intravenosa.

Não foram encontrados estudos que descrevam os efeitos de *Cuphea carthagenensis* sobre o sistema nervoso central, assim como ensaios de toxicidade aguda. Por outro lado, a investigação da toxicidade crônica do extrato aquoso das folhas dessa planta revelou aumento da vascularização hepática e do tamanho dos hepatócitos, embora nenhuma diferença significativa na concentração das enzimas hepáticas tenha sido evidenciada após o tratamento (Biavatti et al., 2004). Já o extrato aquoso de *C. aequipetala* administrado por via oral na dose de $5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ não apresentou efeitos tóxicos e alterações comportamentais (Palacios-Espinosa et al., 2014).

5.3. *Foeniculum vulgare* (Erva-doce)

5.3.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.3.1.1. Extrato em clorofórmio (AFC)

A análise dos espectros de RMN de AFC revelou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados, sinais característicos de esteroides, além do fenilpropanoide *trans*-anetol (**Tabela A1 – Apêndice 1**).

As evidências que indicam a presença de ácidos graxos saturados e insaturados estão de acordo com as descritas anteriormente para os extratos clorofórmico do gurdumão e da sete-sangrias. Três sinais observados em regiões blindadas do espectro de RMN ^1H de AFC sugerem a presença de esteroides. Foram observados sinais característicos de metilas do esqueleto esteroidal em 0,79 ppm, 0,85 ppm e em 0,89 ppm que correspondem, respectivamente, as posições 18, 19 e 21 (**Tabela A2 – Apêndice 1**).

Algumas evidências observadas nos espectros de AFC sugerem a presença do *trans*-anetol. Foi observado um sinal de hidrogênio olefínicos em 6,18 ppm, além de um sinal de metoxila em 3,81 ppm (s) e sinais de hidrogênios aromáticos em 6,89 ppm e 7,28 ppm (**Figura 45**).

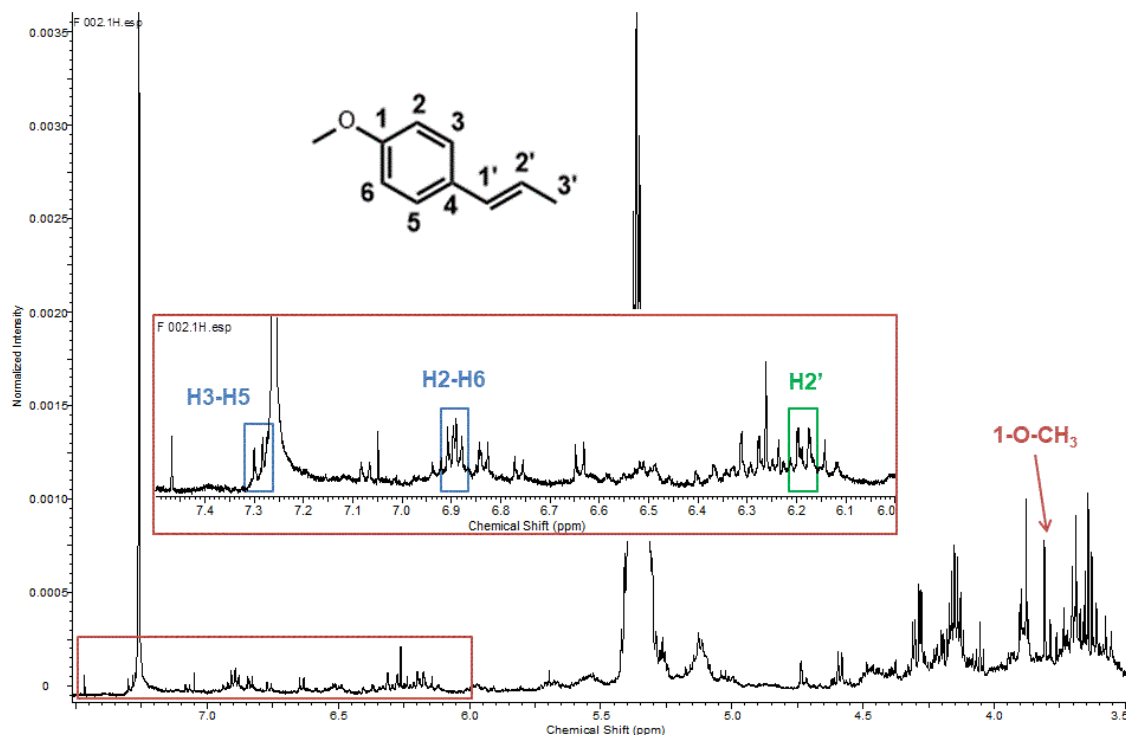


Figura 45: Ampliação (8,0 ppm – 3,5 ppm) do espectro em CDCl_3 de AFC demonstrando algumas evidências observadas para o fenilpropanoide *trans*-anetol.

As correlações $^1J_{CH}$ observadas no HSQC permitiram identificar os átomos de carbono ligados aos sinais descritos acima. Embora não seja possível determinar a multiplicidade de alguns sinais, estes estão de acordo com os dados descritos na literatura (**Tabela 21**).

Tabela 21: Deslocamentos químicos do *trans*-anetol observado no extrato AFC e comparação com dados da literatura.

N	<i>trans</i> -anetol			Referência*	
	1H	^{13}C	HMBC	1H	^{13}C
H2 e H6	6,89	113,7	-	6,84 ψ dt	113,8
H3 e H5	7,28	127,9	-	7,25 ψ dt	126,8
H2'	6,18	122,6	-	6,10 dq	123,5
1-O-CH ₃	3,81 s	55,1	-	3,79 s	55,2

*Guerrini et al., 2006

O *trans*-anetol é um dos constituintes do óleo essencial das folhas, galhos e sementes da erva-doce (*Foeniculum vulgare*). Diversos estudos conduzidos em diferentes partes do mundo têm descrito esta substância como constituinte majoritário dos óleos dessa planta (Chiboub et al., 2019; Guerrini et al., 2006; Tognolini et al., 2007). Guerrini e colaboradores (2006) realizaram a análise de uma amostra comercial de óleo essencial por CG-EM onde verificaram que o *trans*-anetol corresponde por 75% da composição. Outros estudiosos sugerem que esta substância possa representar até 90% do óleo (El-Soud et al., 2011). A grande ocorrência desse fenilpropanoide em *F. vulgare* faz com que mesmo em extratos de maior polaridade seja possível detectá-lo. Além disso, esta substância é constantemente correlacionada aos efeitos estrogênicos descritos para a erva-doce (Javidnia et al., 2003). Desta forma, embora as evidências espectrais apresentadas não permitam a determinação inequívoca desta substância no extrato AFC, sugere-se a presença do mesmo.

5.3.1.2. Extrato em metanol (AFM)

A análise dos espectros de RMN de AFC revelou a presença de açúcares livres, aminoácidos, substâncias nitrogenadas, ácidos graxos saturados e insaturados, além de padrões característicos de substâncias fenólicas (**Tabela A3 – Apêndice 1**).

Tal como os demais extratos metanólicos também foram identificados os isômeros alfa e beta da glicose no extrato AFM pela presença dos sinais em 5,11 ppm (3,6 Hz) e em 4,47 ppm (7,7 Hz), respectivamente. Outras substâncias como a alanina

e os ácidos graxos saturados e insaturados apresentaram as mesmas evidências espectrais descritas anteriormente para os demais extratos (**Tabela A4 – Apêndice 1**).

Duas substâncias nitrogenadas oriundas do metabolismo primário foram evidenciadas em AFM. O ácido γ -aminobutírico (GABA) foi detectado pela presença dos sinais referentes aos $\alpha\beta\gamma$ -CH₂ em 2,30 ppm (m), 1,90 ppm (m) e 2,98 ppm (t, 7,2 Hz), respectivamente. A análise do mapa de correlação HSQC revelou apenas o acoplamento $^1J_{CH}$ entre os átomos de hidrogênio em 2,98 ppm e o carbono em 39,0 ppm, o que se mostra de acordo com a literatura (Fan, 1996; Verpoorte et al., 2007). A colina, por sua vez, apresentou um sinal simples em 3,22 ppm referente as três metilas ligadas ao átomo de nitrogênio (N-CH₃). O mapeamento desse sinal nos espectros HSQC e HMBC revelou o acoplamento $^1J_{CH}$ dos hidrogênios metílicos com o átomo de carbono em 53,1 ppm e os acoplamentos $^3J_{CH}$ com os carbonos em 53,1 ppm (N-CH₃) e em 67,4 ppm (α -CH₂) (**Tabela A4 e Tabela A5 – Apêndice 1**) (Fan, 1996).

No espectro de RMN 1H do extrato AFM foram observados sinais pouco intensos na região de aromáticos, mas que indicam a presença de anéis 1,4-dissubstituído e 1,3,4-trissubstituído. Dois sinais duplo em 8,01 ppm (8,0 Hz) e em 6,80 ppm (8,0 Hz) são condizentes com hidrogênio simétricos H2-H6 e H3-H5, respectivamente, em sistemas 1,4-dissubstituído. Outros três sinais em 7,32 ppm (m), 7,87 ppm (d, 8,5 Hz) e 6,76 ppm (dd, 8,5 Hz e 2,1 Hz) estão de acordo com os H2, H5 e H6, respectivamente, de anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos (**Figura 46**).

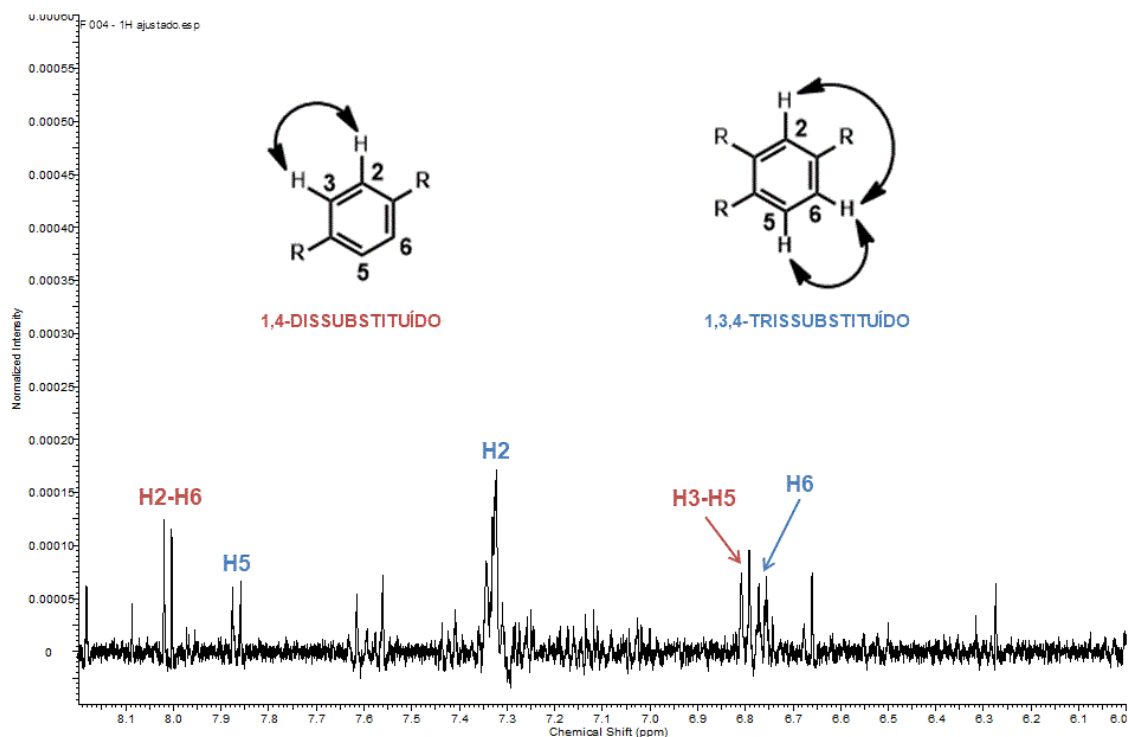


Figura 46: Ampliação (8,2 ppm – 6,0 ppm) do espectro em CD₃OD de AFM demonstrando alguns sinais que sugerem a presença de substâncias fenólicas.

O espectro de AFM revelou ainda não apresentar sinais característicos de H6 e H8 de flavonoides, tampouco sinais de hidrogênios olefínicos que pudessem sugerir a presença de derivados cinâmicos. Por conta da baixa abundância destes sinais, apenas algumas correlações foram observados no HSQC sendo elas referentes aos sinais 6,80 ppm que acopla com o carbono em 114,5 ppm, 7,32 ppm acoplando com o carbono 128,5 ppm e o sinal em 6,76 ppm que acopla com o carbono em 114,8 ppm. Estes sinais corroboram a presença de substâncias de natureza fenólica.

Os estudos fitoquímicos da espécie *Foeniculum vulgare* descrevem a ocorrência de uma grande variedade de substâncias fenólicas tais como flavonoides, estilbenos, derivados da benzoisofuranona e derivados cinâmicos (De Marino et al., 2007; Parejo et al., 2004). Diferente do seu óleo essencial onde há a predominância de uma substância específica, os extratos de maior polaridade desta planta não apresentam grandes quantidades de uma substância específica ou de uma classe metabólica (Badgujar et al., 2014). Os sinais observados permitem inferir apenas sobre a presença de substâncias de natureza fenólica e, possivelmente, com determinados padrões de substituição no anel aromático. As evidências apresentadas são condizentes com dados referentes a flavonoides, estilbenos, derivados cinâmicos e outras substâncias que apresentem anéis aromáticos em suas estruturas (De Marino et al., 2007; Kikuzaki & Nakatani, 1989; Park et al., 2012). Por esta razão, não foi possível distinguir uma classe metabólica nesse extrato.

A grande variabilidade de estruturas produzidas por *F. vulgare* foi evidenciada num estudo recente onde os extratos etanólico, hidroetanólico (75%) e aquoso desta planta foram analisados por RMN (Bhatti et al., 2018). Neste estudo, foi sugerida a presença de diversas classes de substâncias nos três extratos analisados, como: ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, furanocumarinas e taninos. Entretanto, os autores não determinaram a estrutura de nenhum dos componentes.

5.3.2. INVESTIGAÇÃO DE AFM POR CLAE-EM

O cromatograma de AFM revelou a presença de diversos picos, sendo dois sinais de maior intensidade (17,0 min e 33,1 min) e alguns outros de intensidade considerável ao término da eluição cromatográfica (entre 114,9-121,1 min). O pico observado no tempo de retenção 17,0 min apresentou íon molecular de m/z 431,1925 que, embora tenha sido fragmentado, não apresentou sinais no espectro MS^2 . De maneira semelhante, o pico em 33,1 minutos apresentou m/z 375,1664 e também não apresentou sinais no espectro MS^2 . Ambos os picos não puderam ser identificados. Já os demais sinais entre 114,9 min e 121,1 minutos apresentaram íons moleculares condizentes com o de ácidos graxos. Contudo, outras substâncias puderam ser identificadas nas demais regiões do cromatograma (**Figura 47**).

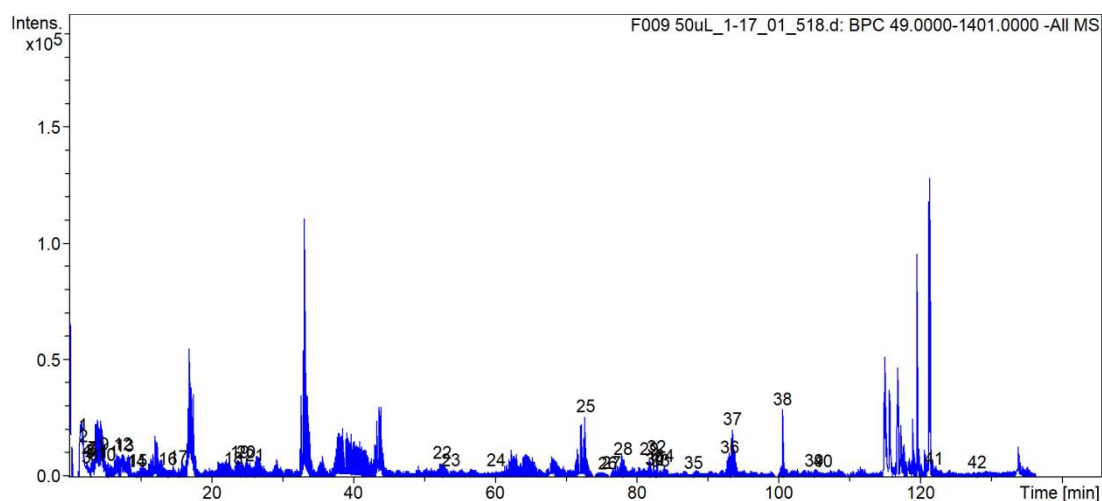


Figura 47: Cromatograma do pico base (BPC) de AFM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.

A investigação de AFM por CLAE-EM levou a identificação de 42 substâncias como ácidos orgânicos simples, ácidos benzoicos, taninos, flavonoides, dentre outras. O tempo de retenção, dados espectrais e as propostas de identificação de cada substância são descrito na **Tabela 22**.

Tabela 22: Substâncias identificadas na análise de AFM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	1,9	191,0563 [M-H]-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0561 [M-H]-	1,04	-	Ácido quínico	[1]
2	2,0	133,0143 [M-H]-	C ₄ H ₆ O ₅	133,0142 [M-H]-	0,75	-	Ácido málico	[1]
3	2,4	164,0712 [M-H]- 166,0861 [M+H]+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164,0717 [M-H]- 166,0862 [M+H]+	-3,04 -0,60	- 120 ; 103	Fenilalanina	[2]
4	2,4	326,1247 [M-H]- 328,1396 [M+H]+ 310,1288 [M+H-H ₂ O]+	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	326,1245 [M-H]- 328,1401 [M+H]+	0,61 -1,52	164 ; 147; 130 264; 166; 132; 120 250; 236; 132; 120	Fructosil-Fenilalanina	[3]
5	3,0	315,0718 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315,0721 [M-H]-	-0,95	153 ; 109	Ácido dihidroxibenzóico-O-glicosídeo	[1]
6	3,2	153,0194 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193 [M-H]-	0,65	-	Ácido protocatecúico	[4]
7	3,2	353,0888 [M-H]-	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878 [M-H]-	2,83	191	Ácido clorogênico (isômero)	[5]
8	3,4	205,0970 [M+H]+ 188,0715 [M+H-NH ₃]+	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,0982 [M+H]+	-5,85	143; 132; 118 143; 118	Triptofano	[2]
9	4,9	137,0243 [M-H]- 139,0389 [M+H]+	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244 [M-H]- 139,0389 [M+H]+	-0,72 0	- 121	Ácido hidroxibenzóico	[2]
10	5,2	299,0785 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	299,0772 [M-H]-	4,34	137	Ácido hidroxibenzóico-O-glicosídeo	[3]
11	5,4	339,0722 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339,0721 [M-H]-	0,29	177 ; 133	Esculina	[1]
12	7,5	325,0929 [M-H]- 651,1926 [2M-H]- 344,1351 [M+NH ₄]+	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0928 [M-H]- 344,1350 [M+NH ₄]+	0,3 0,29	163 ; 119 323; 291; 163 147 ; 119	Ácido cumárico-O-glicosídeo	[4]
13	7,8	353,0880 [M-H]- 355,1034 [M+H]+	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878 [M-H]- 355,1034 [M+H]+	0,56 0	191 163 ; 145; 135	Ácido clorogênico (isômero)	[5]
14	9,4	367,1035 [M-H]-	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1034 [M-H]-	0,27	193; 134	Ácido feruloilquínico	[5]
15	9,6	353,0870 [M-H]-	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878 [M-H]-	-2,26	191 ; 135	Ácido clorogênico (isômero)	[5]
16	13,8	163,0401 [M-H]- 165,0537 [M+H]+ 147,0421 [M+H-H ₂ O]+	C ₉ H ₈ O ₃	163,0400 [M-H]- 165,0546 [M+H]+	0,61 -7,27	119 119 ; 91 91	Ácido cumárico	[4]

Tabela 22 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AFM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
17	15,4	161,0244 [M-H]- 163,0390 [M+H]+	C ₉ H ₆ O ₃	161,0244 [M-H]- 163,0389 [M+H]+	0 0,61	- 107	Hidroxicumarina	[6]
18	23,0	193,0502 [M-H]-	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0506 [M-H]-	-2,07	133	Ácido ferúlico	[2]
19	24,0	367,1031 [M-H]- 369,1174 [M+H]+	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1034 [M-H]- 369,1180 [M+H]+	-0,81 -1,62	191 ; 173; 134 177 ; 145; 117	Ácido feruloilquínico	[5]
20	24,9	367,1039 [M-H]-	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1034 [M-H]-	1,36	191 ; 134	Ácido feruloilquínico	[5]
21	26,1	367,1024 [M-H]-	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1034 [M-H]-	-2,72	191; 173 ; 134	Ácido feruloilquínico	[5]
22	52,6	187,0976 [M-H]-	C ₉ H ₁₆ O ₄	187,0975 [M-H]-	0,53	-	Ácido azeláico	[2]
23	53,8	497,3338 [M+FA-H]- 453,3418 [M+H]+ 475,3242 [M+Na]+	C ₂₄ H ₄₄ N ₄ O ₄	497,3344 [M+FA-H]- 453,3435 [M+H]+	-1,20 -3,74	451 ; 225 453 ; 435; 339; 322; 226; 209; 114 475	Ciclo tetraleucil(isoleucil)	[2]
24	60,1	477,0676 [M-H]- 479,0801 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]- 479,0820 [M+H]+	0,41 -3,96	301 303	Quercetina-3-O-glicuronídeo	[5]
25	72,7	519,1886 [M-H]-	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	519,1871 [M-H]-	2,88	357; 151	Pinoresinol-glicosídeo	[4]
26	75,8	461,0704 [M-H]-	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725 [M-H]-	-4,55	285	Kaempferol-3-O-glicuronídeo	[4]
27	76,4	515,1200 [M-H]-	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195 [M-H]-	0,97	353; 191; 179; 173 ; 135	Ácido dicafeoilquínico	[5]
28	78,0	515,1194 [M-H]- 517,1328 [M+H]+	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195 [M-H]- 517,1340 [M+H]+	-0,19 -2,32	191 ; 179; 161 163	Ácido dicafeoilquínico	[5]
29	81,7	600,3894 [M+Cl]- 610,4178 [M+FA-H]- 566,4268 [M+H]+ 588,4090 [M+Na]+ 283,7167 [M+2H] ²⁺	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	600,3897 [M+Cl]- 566,4275 [M+H]+	-0,49 -1,23	- 564 ; 225 566 ; 548; 453; 435; 322; 228; 209 588 453; 435; 322; 227; 209; 114	Ciclo pentaleucil(isoleucil)	[2]
30	82,5	359,1483 [M+H]+	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359,1489 [M+H]+	-1,67	163; 137 ; 131	Matairesinol	[6]
31	82,6	601,1197 [M-H]-	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₅	601,1198 [M-H]-	-0,16	353; 233 ; 179; 161	Ácido malonil-dicafeoilquínico	[5]
32	82,7	579,2083 [M-H]-	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	579,2083 [M-H]-	0	417; 402; 387; 181	Siringaresinol O-glicosídeo	[3]

Tabela 22 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AFM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
33	83,3	491,0832 [M-H]- 493,0975 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0831 [M-H]- 493,0976 [M+H]+	0,20 -0,20	315 ; 300 317	Isoramnetina-3-O-glicuronídeo	[5]
34	83,9	519,1867 [M-H]- 543,1831 [M+Na]+	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	519,1871 [M-H]- 543,1836 [M+Na]+	-0,77 -0,92	357 ; 342; 137 543 ; 381	Pinoresinol-glicosídeo	[4]
35	87,9	515,1187 [M-H]-	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195 [M-H]-	-1,55	191; 179 ; 173	Ácido dicafeoilquínico	[5]
36	93,1	529,1359 [M-H]-	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529,1351 [M-H]-	1,51	193; 191 ; 179; 173; 161	Ácido cafeoil-feruloilquínico	[4]
37	93,4	713,4735 [M+Cl]- 723,5027 [M+FA-H]- 679,5123 [M+H]+ 701,4919 [M+Na]+ 340,2578 [M+2H]2+ 351,2466 [M+H+Na]2+ 359,2307 [M+H+K]2+	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	713,4737 [M+Cl]- 679,5116 [M+H]+	-0,28 1,03	713; 677 677 ; 225 679 ; 661; 548; 435; 322 701 ; 359 566; 548; 453; 435; 322; 228; 114 588; 351; 209; 114 359	Ciclo hexaleucil(isoleucil)	[2]
38	100,5	836,5861 [M+FA-H]- 792,5927 [M+H]+ 814,5738 [M+Na]+ 396,8006 [M+2H]2+ 407,7907 [M+H+Na]+ 415,7730 [M+H+K]+	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	836,5866 [M+FA-H]- 792,5957 [M+H]+	-0,59 -3,78	790 ; 225 792 ; 774; 661; 322 814 ; 415 679; 566; 453; 435; 322; 209; 114 701; 566; 407; 398; 351; 228; 114 560; 415 ; 114	Ciclo heptaleucil(isoleucil)	[2]
39	104,9	543,1497 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543,1508 [M-H]-	-2,02	193 ; 191; 173; 155; 134	Ácido diferuloilquínico	[7]
40	106,2	949,6703 [M+FA-H]- 927,6613 [M+Na]+ 453,3415 [M+2H]2+ 464,3318 [M+H+Na]2+ 475,3238 [M+2Na]2+ 302,5648 [M+3H]3+	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	949,6707 [M+FA-H]- 927,6617 [M+Na]+	-0,42 -0,43	903 ; 225 907 566; 453 ; 444; 341; 228; 114 464 ; 114 475 ; 114 114	Ciclo octaleucil(isoleucil)	[2]
41	121,8	593,2734 [M+H]+	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2758 [M+H]+	-4,04	593 ; 533	Feoforbídeo a	[8]
42	127,9	871,5737 [M+H]+	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871,5731 [M+H]+	0,68	871 ; 593; 533	Feofitina a	[8]

[1] - Ammar et al., 2017; [2] - Duan et al., 2017; [3] - Rodríguez-Pérez et al., 2018; [4] - Sun et al., 2015; [5] - Caleja et al., 2015; [6] - Wang et al., 2016; [7] - Ferreres et al., 2014; [8] - Bijttebier et al., 2016

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

A composição química de AFM mostrou-se bastante diversificada tendo sido observado substâncias como ácidos orgânicos, aminoácidos e seus derivados, derivados benzoicos e cinâmicos, cumarinas, flavonoides, lignanas, dentre outras. As substâncias de maior ocorrência foram os derivados cinâmicos, em especial àqueles conjugados com ácido quínico. Também foi observada uma ocorrência relevante de derivados benzoicos e lignanas.

Os primeiros metabólitos identificados correspondem a ácidos orgânicos (**1**, **2**), aminoácidos (**3**, **8**) e seus derivados (**4**) e derivados benzoicos (**5**, **6**, **9**, **10**). Os picos 1 e 2 apresentaram íon molecular 191,0563 e 133,0143, respectivamente, condizentes com o ácido quínico (**1**) e málico (**2**). A fenilalanina (**3**), seu derivado conjugado a uma frutose (**4**) e o triptofano (**8**) foram identificados pela análise no modo positivo, onde foi observada a perda característica de CO_2 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$ seguida pela perda de NH_3 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{NH}_3]^+$. Para a substância **4** foi observado um fragmento de m/z 164 referente à perda do glicosídeo $[\text{M}+\text{H}-\text{frutose}]^+$. Já para alguns dos derivados benzoicos foi observada uma perda característica de CO_2 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ e, para as substâncias **5** e **10** foi evidenciado a perda de uma glicose $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$.

Conforme mencionado anteriormente, foi identificado um número significativo de derivados cinâmicos em AFM, totalizando 16 substâncias. Estas compreendem ácidos cinâmicos livres (**16**, **18**), seus derivados glicosilados (**12**) e conjugados ao ácido quínico (**7**, **13-15**, **19-21**, **27**, **28**, **31**, **35**, **36**, **39**). As substâncias **16** e **18** foram identificadas com base na perda característica de CO_2 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ e perda de CO_2 seguida pela perda de CH_3 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_3]^-$, respectivamente. Já o derivado glicosilado do ácido cumárico (**12**) apresentou dois fragmentos característicos sendo m/z 163 referente à perda da glicose $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ e m/z 119 referente à perda posterior de CO_2 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{CO}_2]^-$. Diversos isômeros de ácidos cinamoil-quínico foram observados sendo três do ácido clorogênico (**7**, **13**, **15**), quatro do ácido feruloilquínico (**14**, **19-21**) e três do ácido dicafeoilquínico (**27**, **28**, **35**). Também foram identificados o ácido malonil-*O*-dicafeoilquínico (**31**), ácido cafeoil-feruloilquínico (**36**) e ácido diferuloilquínico (**39**). A grande maioria destes apresentou em seus espectros de fragmentação um pico de m/z 191,05 que é referente ao ácido quínico. Os demais fragmentos observados para esta classe de substâncias mostrou-se referente à perda de uma ou mais unidades cinâmicas $[\text{M}-\text{H}-\text{cinamoil}]^-$, perdas subsequentes de CO_2 $[\text{M}-\text{H}-\text{cinamoil}-\text{CO}_2]^-$ e, no caso de derivados ferúlicos, de CH_3 $[\text{M}-\text{H}-\text{cinamoil}-\text{CO}_2-\text{CH}_3]^-$.

Outra classe de substâncias que apresentou significativa ocorrência em AFM foram as lignanas. Quatro substâncias deste grupo foram identificadas, sendo três destas glicosiladas. A exceção do matairesinol (**30**) que foi observada apenas no modo de ionização positivo, as substâncias **25**, **30** e **34** apresentaram diversos

fragmentos em seus espectros MS². Além do fragmento característico da perda de glicosídeo [M-H-Glc], outros íons referentes à quebra dos anéis hidrofurano foram observadas.

Diferente do que foi observado nas análises de AAM e ACM onde diversos flavonoides foram descritos, apenas três flavonoides foram identificados em AFM. Os picos 24, 26 e 33 apresentaram em seu espectro MS², respectivamente, os fragmentos m/z 301, m/z 285 e m/z 315 que correspondem as agliconas quercetina, kaempferol e isoramnetina. Nos três casos, foi observada uma perda de 176 Da que corrobora a presença de um ácido glicurônico. Dessa forma, estes foram identificados como quercetina-3-O-glicuronídeo (**24**), kaempferol-3-O-glicuronídeo (**26**) e isoramnetina-3-O-glicuronídeo (**33**). Os espectros MS² e as proposta de fragmentação desses flavonoides e demais substâncias identificadas em AFM são descritos na **Figura 48**.

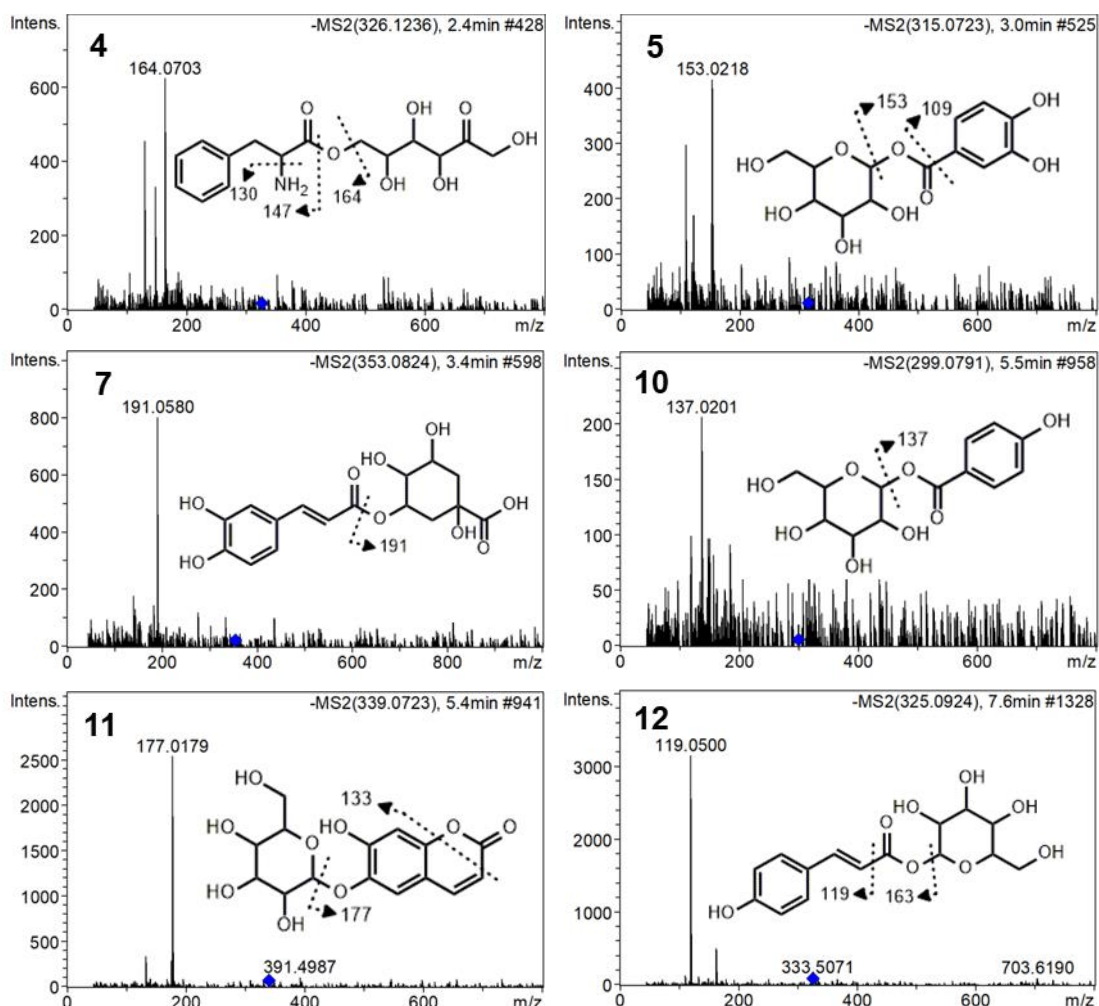


Figura 48: Espectros de MS² das substâncias identificadas em AFM e suas propostas de fragmentação.

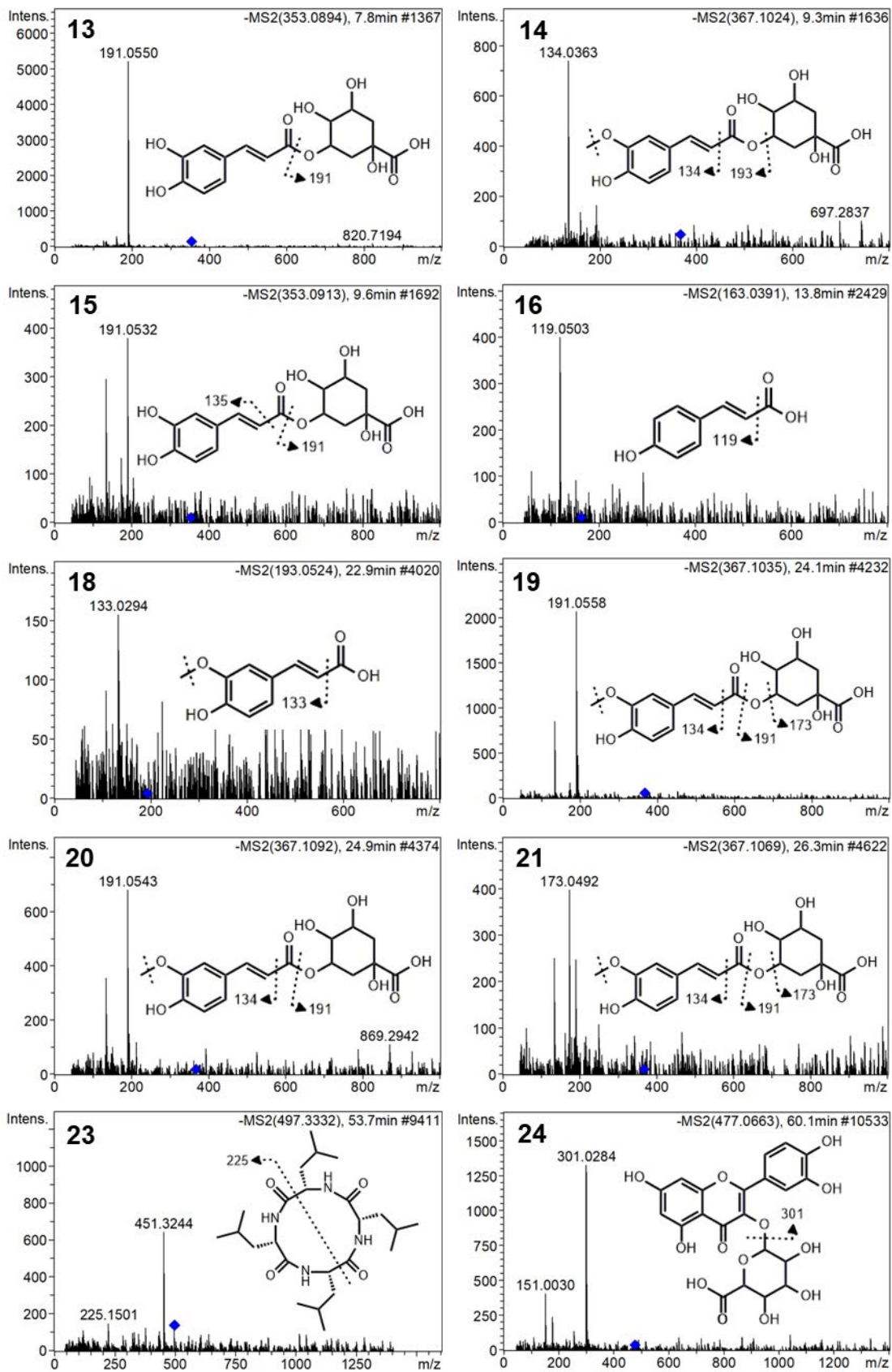


Figura 48 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AFM e suas propostas de fragmentação.

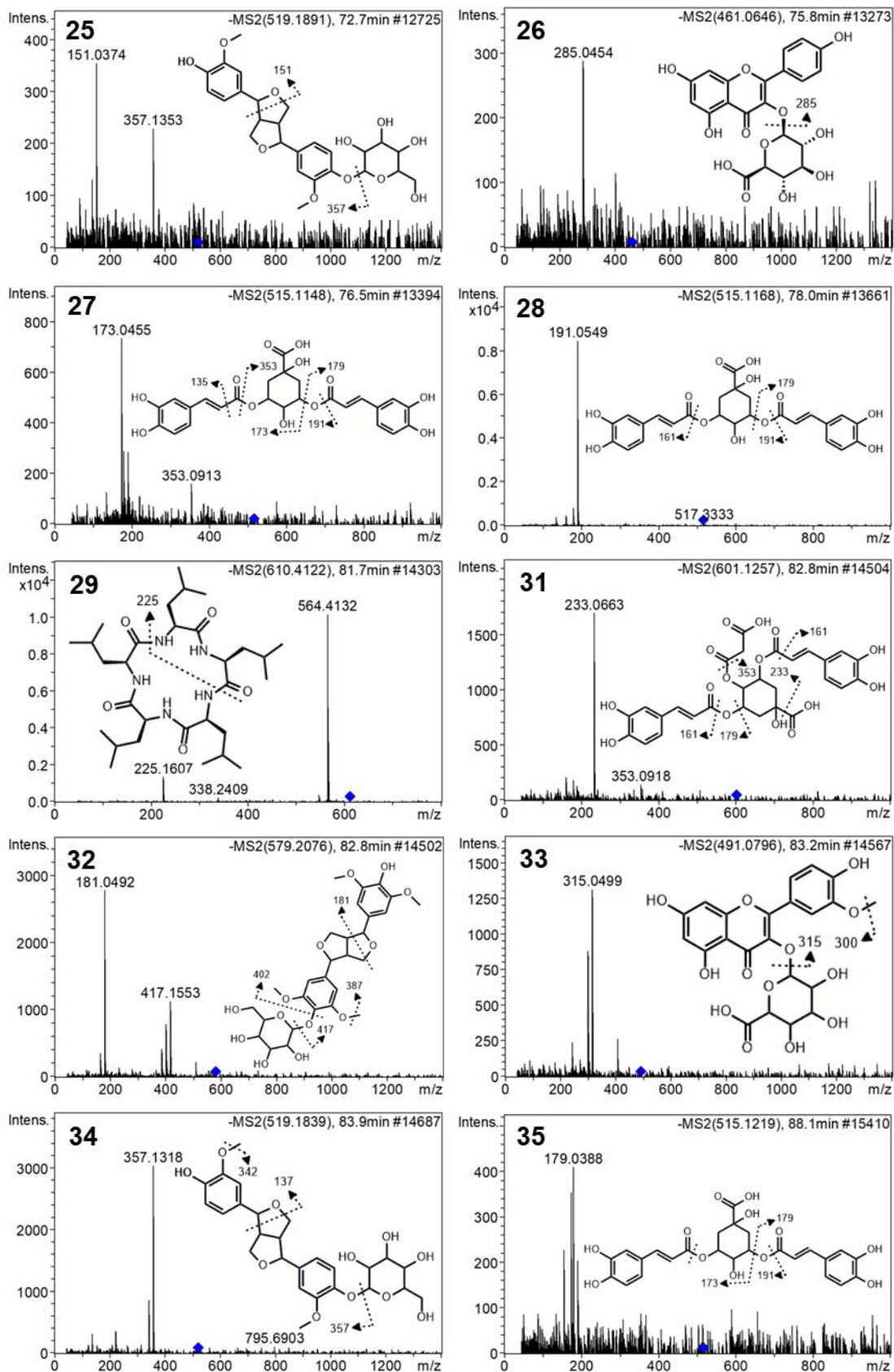


Figura 48 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AFM e suas propostas de fragmentação.

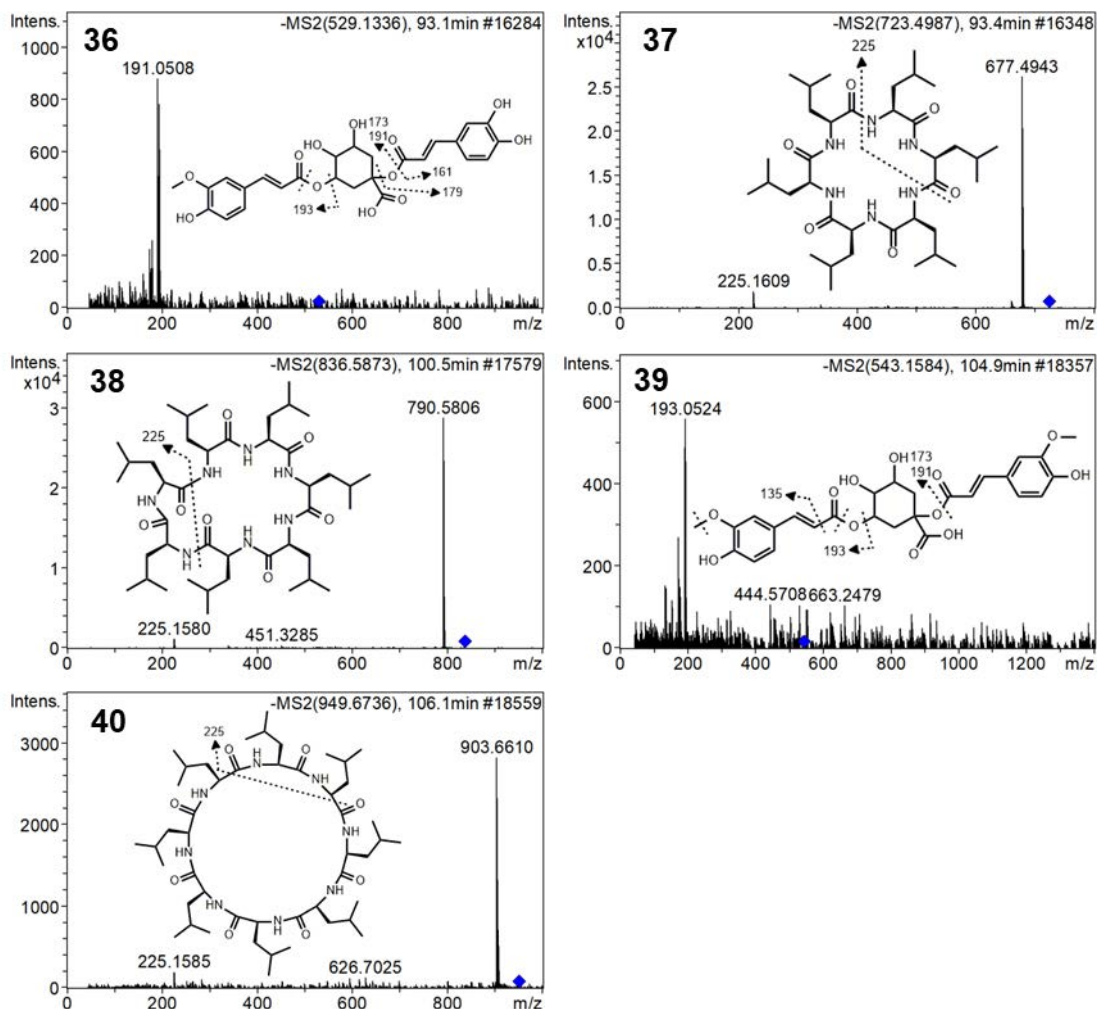


Figura 48 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AFM e suas propostas de fragmentação.

Estudos anteriores sugerem que *F. vulgare* produza uma grande variedade de metabólitos que incluem flavonoides, derivados cinâmicos, poliacetilenos, estilbenoides, entre outros (Caleja et al., 2015; Parejo et al., 2004). Os resultados obtidos pela investigação química de AFM por CLAE-EM se mostram de acordo com esses estudos, uma vez que foram identificadas substâncias pertencentes a diversas classes metabólicas. Embora alguns dos constituintes descritos anteriormente para *F. vulgare* não tenham sido evidenciados nestas análises, deve-se levar em consideração que muitos não possuem dados espectrais de massas disponíveis na literatura, o que pode ter acarretado na sua não identificação. Além disso, o processo de extração e a solubilidade do extrato na fase móvel utilizada também podem influenciar na detecção desses constituintes. Não obstante, por se tratar de um gênero monofilético, a análise direcionada de AFM limitou-se as substâncias e estudos previamente descritos para *F. vulgare*, o que possibilitou a identificação de um pequeno número de constituintes. Somada à análise não direcionada, um total de 42

metabólitos foi identificado com destaque para os derivados cinâmicos, lignanas e derivados benzoicos.

A ocorrência de derivados cinâmicos, especialmente aqueles conjugados ao ácido quínico é conhecida em *F. vulgare*. No estudo conduzido por Caleja e colaboradores (2015) foram identificados e quantificados diversos constituintes como isômeros do ácido cafeoilquínico (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA), ácido 5-O-feruloilquínico, isômeros do ácido dicafeoilquínico (1,3-diCQA, 1,4-diCQA, 1,5-diCQA e 3,4-diCQA), além de um derivado conjugado ao ácido malônico (ácido malonil-dicafeoilquínico). A análise quantitativa dos componentes do extrato aquoso de *F. vulgare* demonstrou significativa ocorrência destes componentes, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico a segunda substância mais abundante no extrato. Esse estudo suporta a identificação dessas substâncias em AFM por CLAE-EM e sugere que a espécie possua tendência pela produção destes metabólitos.

Esse mesmo estudo não descreveu a ocorrência de lignanas e poucos derivados benzoicos foram evidenciados, tendo sido identificado apenas o ácido *p*-hidroxibenzoico. No entanto, a ocorrência de derivados benzoicos em *F. vulgare* é conhecida e descrita em outros estudos (Garga et al., 2009; Rather et al., 2016). Quanto às lignanas, foi descrito a ocorrência de secoisolariciresinol e matairesinol (Kuhnle et al., 2009).

Em relação aos flavonoides, apenas três substâncias foram identificadas. De fato parece existir uma menor preferência na produção destes constituintes por *F. vulgare*, uma vez que em estudos anteriores também foram descritos poucas ocorrências desta classe. Das 17 substâncias identificadas pela investigação do extrato aquoso dessa planta, apenas cinco flavonoides foram detectados, sendo: *epi*-catequina, quercetina-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo, quercetina-3-O-glicosídeo e isoramnetina-3-O-glicuronídeo (Caleja et al., 2015). Em outro estudo foram identificados 3-O-glicosídeos da quercetina e do kaempferol, além de um 7-O-glicosídeo do eriodictiol (Parejo et al., 2004). Esses dados sugerem que *F. vulgare* produza preferencialmente flavonóis 3-O-glicosilados.

5.3.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AFM

Na avaliação hemodinâmica do extrato AFM foram utilizados oito animais, dos quais cinco apresentaram perfis equivalentes para realização das análises estatísticas. A administração de AFM mostrou uma redução drástica e persistente da pressão arterial, em comparação com o efeito causado pelo DMSO (**Figura 49**).

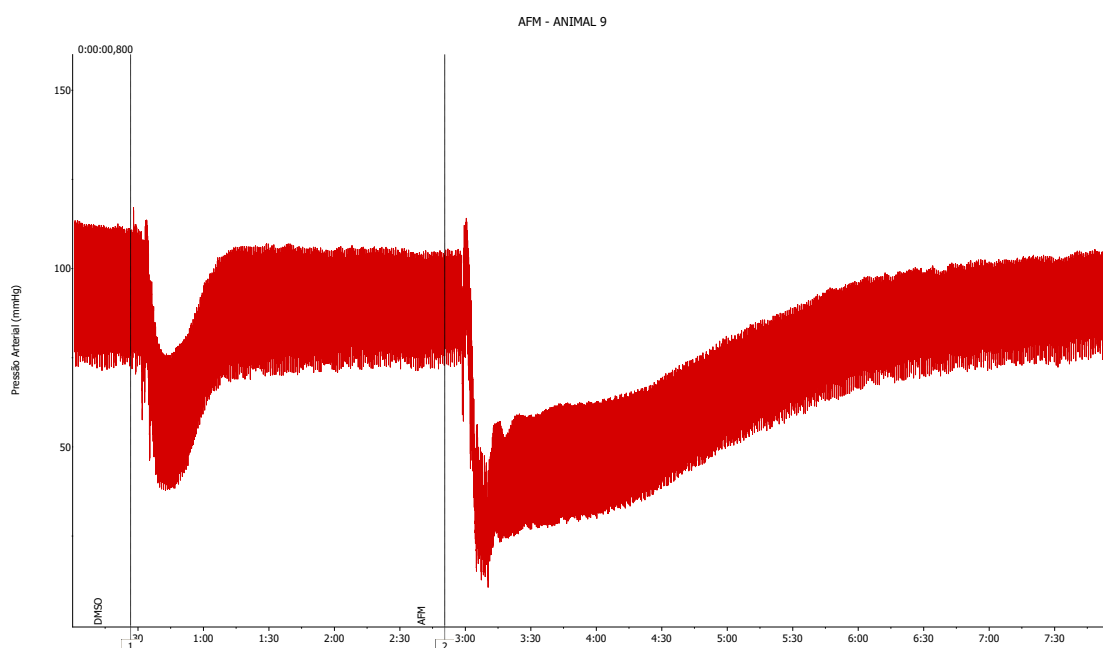


Figura 49: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AFM, respectivamente.

No gráfico é possível observar variações significativas entre o efeito causado pelo DMSO e pelo extrato AFM. A administração de AFM apresentou uma redução média de $50,7 \pm 5,8$ mmHg na PAS, que foi maior em $17,5 \pm 2,0$ mmHg do que o DMSO. De maneira semelhante, a PAM e PAD apresentaram reduções de $56,7 \pm 6,1$ mmHg e $55,3 \pm 6,1$ mmHg, mostrando-se $20,2 \pm 2,9$ mmHg e $17,6 \pm 3,0$ mmHg mais intensas do que as causadas pelo DMSO. Tal como têm sido observado na análise dos demais extratos, tanto o DMSO quanto o extrato AFM apresentaram resultados que diferem estatisticamente do controle ($p < 0,001$). Também foi evidenciado, pela análise estatística, que os efeitos de AFM sobre PAS, PAM e PAD diferem significativamente dos causados pelo DMSO (PAS, PAD – $p < 0,05$ e PAM – $p < 0,01$) (**Figura 50**).

Em relação à frequência cardíaca, o extrato AFM apresentou uma pequena redução de $50,7 \pm 24,9$ bpm que não se mostrou diferente do controle e do DMSO (**Figura 50**).

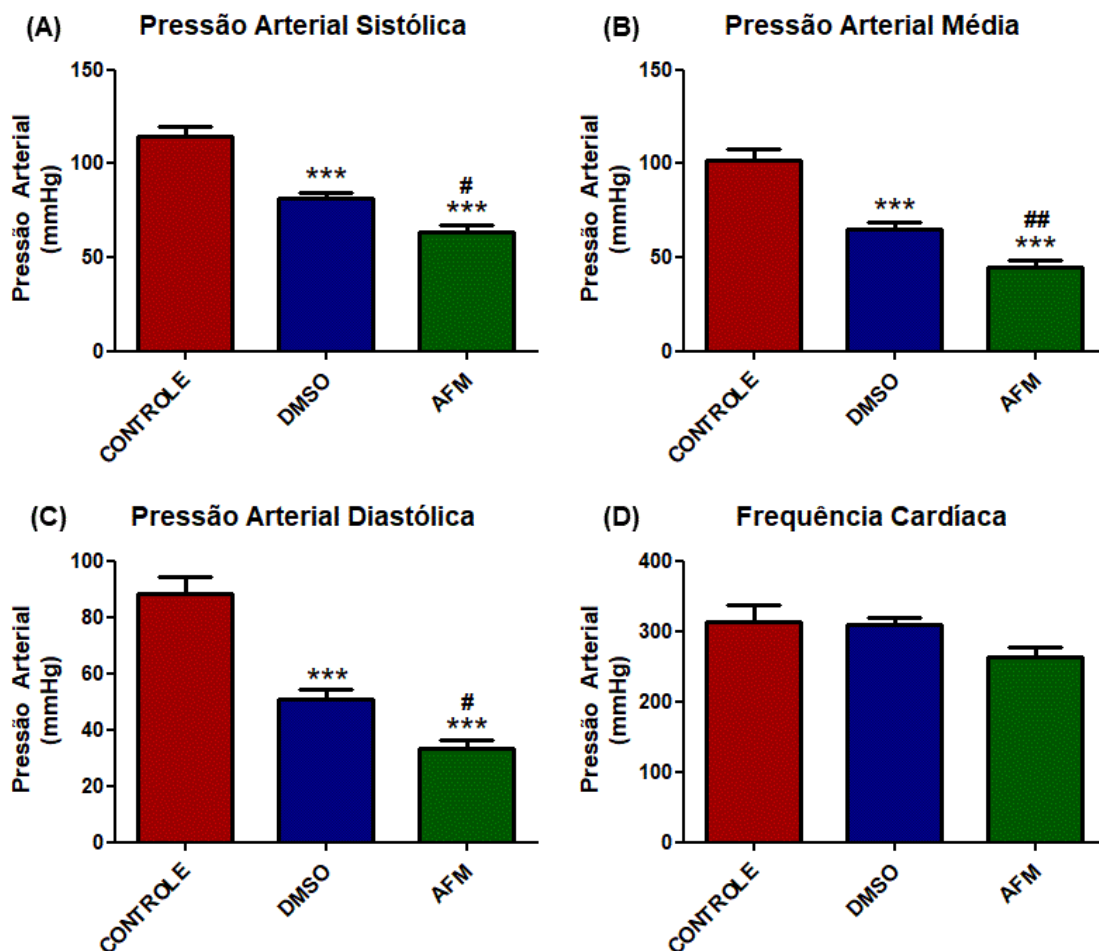


Figura 50: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AFM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Poucos estudos descrevem atividades biológicas relacionadas ao potencial cardiovascular de *F. vulgare*. O extrato aquoso desta planta diminuiu significativamente a PAS de ratos hipertensos (SHR), mas não de ratos normotensos (Wistar). Nesse trabalho foi evidenciado um ligeiro efeito vasorelaxante que foi completamente abolido na presença de inibidor da síntese do óxido nítrico (NOS), sugerindo que o efeito seja mediado pela via do NO-GMPc. Os autores verificaram ainda que a administração do extrato acarretou em uma maior excreção de água, sódio e potássio, sugerindo que o mesmo possua atividade diurética e natriurética (Bardai et al., 2001).

Em outro estudo foi conduzido a investigação hemodinâmica do extrato aquoso das folhas que demonstrou uma significativa redução dose-dependente ($2 - 20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) sobre as PAS, PAM e PAD de ratos normotensos anestesiados (Sprague-Dawley). O efeito foi duradouro e independente de alterações na frequência cardíaca dos animais,

tendo sido parcialmente reduzido na presença de antagonistas histamínicos (Abdul-Ghani & Amin, 1988).

Embora não tenha sido possível determinar as estruturas majoritárias presentes no extrato AFM por CLAE-EM, foi possível evidenciar uma significativa ocorrência de derivados cinâmicos, em especial aqueles conjugados ao ácido quínico. Essas substâncias apresentam atividade hipotensora, anti-hipertensiva, vasodilatadora e inibidora de ECA (Loizzo et al., 2008). A investigação de uma fração rica em ácidos clorogênicos obtida a partir do extrato aquoso de café (*Coffea robusta*) demonstrou atividade anti-hipertensiva e vasorelaxante (Suzuki et al., 2006). Esta mesma fração rica em ácidos clorogênicos também foi investigada em humanos com hipertensão moderada, apresentando diminuição dose-dependente das pressões sistólica e diastólica (Yamaguchi et al., 2008). Desta forma, é possível sugerir que estas substâncias sejam responsáveis pelo menos por parte do efeito observado em AFM.

5.3.4. INVESTIGAÇÃO DE AFM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

A análise do extrato AFM não apresentou nenhum sinal de efeito adverso aos animais, tendo sido evidenciada alteração na capacidade motora dos mesmos nos intervalos de 15, 30 e 60 min. Quinze minutos após a administração de AFM foi observado um tempo de permanência de $127,1 \pm 4,9$ s que se mostrou diferente do controle ($p < 0,001$) e equivalente ao efeito causado pelo diazepam ($132,8 \pm 2,6$ s). No intervalo de 30 min, observou-se aumento no tempo de permanência na barra ($148,6 \pm 5,9$ s) que ainda foi diferente do controle ($p < 0,001$) e equivalente ao diazepam ($147,4 \pm 2,4$ s). Após 60 min, a diferença entre o efeito causado pelo extrato ($169,7 \pm 2,7$ s) e o controle foi menor ($p < 0,05$), tendo sido observado ainda diferença em comparação com o efeito do diazepam ($p < 0,001$ – $151,0 \pm 3,1$ s). Passados 90 minutos da administração de AFM, não foram observados efeitos significativos na coordenação motora dos animais em comparação com o controle (**Figura 51**).

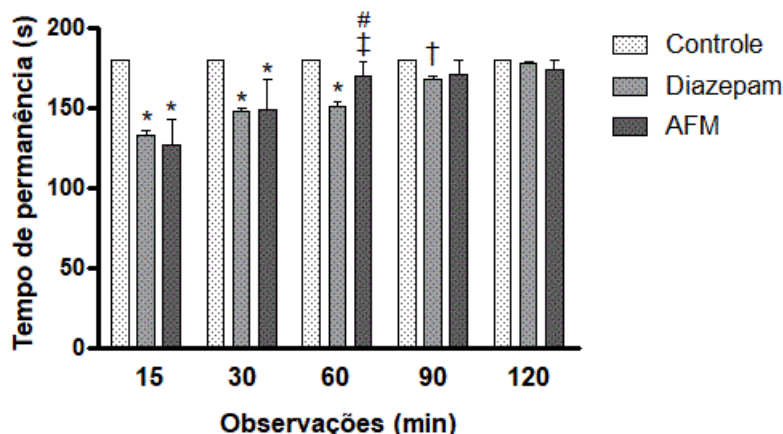


Figura 51: Resultados da avaliação de AFM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,001$, † - $p < 0,01$, ‡ - $p < 0,05$; e para o diazepam: # - $p < 0,001$.

A literatura a cerca dos efeitos de extratos de *F. vulgare* sob a capacidade motora de animais é bastante limitada. A análise da toxicidade aguda do extrato etanólico dos frutos dessa planta revelou prejuízo na atividade locomotora espontânea dos camundongos na dose de $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Tanira et al., 1996). Outro estudo avaliou dois dos componentes majoritários do óleo essencial de *F. vulgare*, tendo sido observado que as substâncias não alteraram de maneira significativa o tempo de permanência na barra, nos intervalos de 30, 90 e 150 minutos (Him et al., 2008).

5.4. *Ocimum basilicum* (Manjericão)

5.4.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.4.1.1. Extratos em clorofórmio (AOC e AOC-R)

Os espectros de RMN de AOC e AOC-R apresentaram sinais característicos de ácidos graxos saturados, insaturados e esteroides (**Tabela A1 – Apêndice 1**).

A ocorrência de ácidos graxos saturados em ambos os extratos foi evidenciada pela presença dos sinais em 0,88 ppm e em 1,30 ppm, enquanto que para os ácidos graxos insaturados foram observados os sinais em 0,98 ppm (t, 7,5 Hz) referente a metila terminal da cadeia; 1,26 ppm referente aos carbonos metilênicos em cadeia; 2,34 ppm (t, 7,5 Hz) referente aos carbonos metilênicos vizinhos à(s) instauração(ões); e em 5,36 ppm (m) referente aos hidrogênios olefínicos. Para os esteroides foram observados os sinais característicos das metilas 18, 19 e 21, tal como descrito anteriormente para o extrato da erva-doce (AFC) (**Tabela A2 – Apêndice 1**).

Diferente dos perfis do gurdumão (AAC e AAC-R) e da sete-sangrias (ACC e ACC-R), o manjericão apresentou perfis metabólicos bastante semelhante em ambos os extratos. Praticamente todos os sinais observados em AOC são observados em AOC-R, com diferenças sutis em sua intensidade. Por esta razão, a análise dos espectros de RMN revelou a presença das mesmas classes de substâncias em ambos os extratos. A ampliação de uma região entre 4,0 ppm e 2,25 ppm do espectro exemplifica a semelhança entre os perfis obtidos (**Figura 52**).

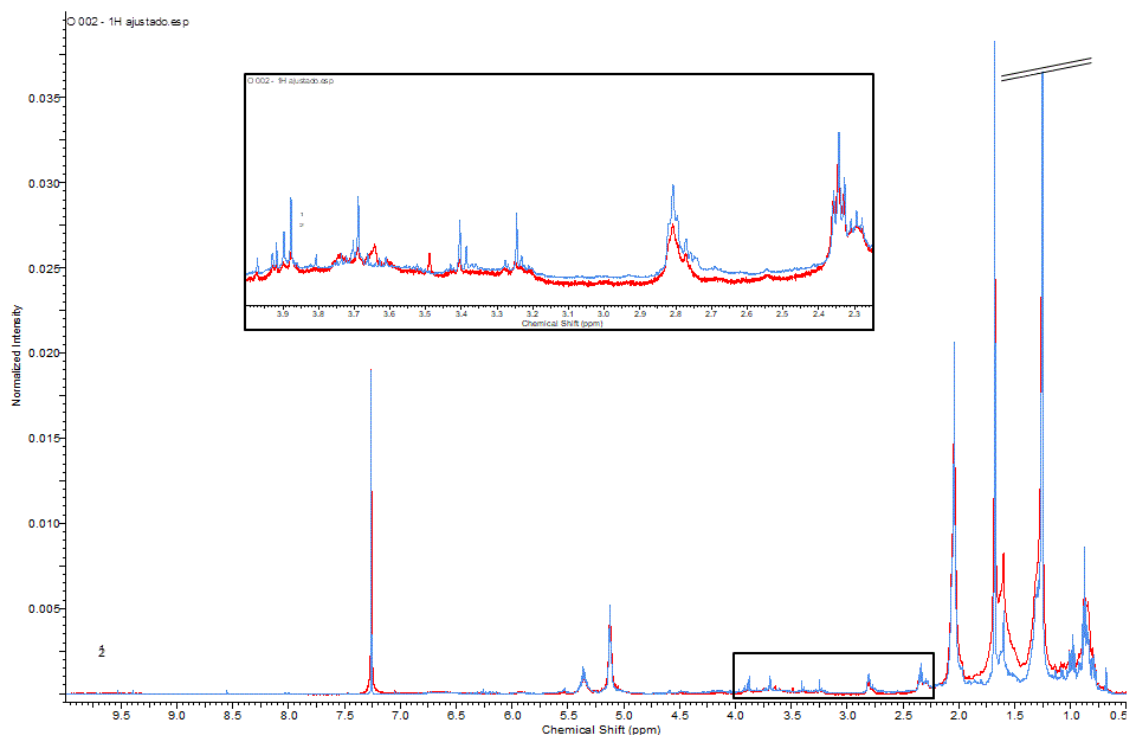


Figura 52: Comparativo dos espectros em CDCl_3 de AOC (azul) e AOC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

Esta semelhança entre os perfis de AOC e AOC-R corrobora os resultados observados para os extratos anteriores. Ao contrário do gurdumão, a homogeneização das partes aéreas do manjericão procedeu de maneira satisfatória. Além disso, o manjericão não é descrito como produtor de grandes quantidades de substâncias como ácidos graxos, tal como a sete-sangrias. Considerando que esses dois fatores podem contribuir de maneira negativa no rendimento do extrato e na resolução do espectro, a ausência desses permitiu obter resultados equivalentes (Chatterjee et al., 2010; Mushtaq et al., 2014).

5.4.1.2. Extratos em metanol (AOM e AOM-R)

A análise dos extratos AOM e AOM-R por RMN revelou a presença de açúcares livres, aminoácidos, ácidos orgânicos, substâncias nitrogenadas, ácidos graxos saturados e insaturados, esteroides e do ácido rosmarínico (**Tabela A3 – Apêndice 1**).

Diferente dos demais extratos metanólicos analisados, ambos os extratos do manjeriço apresentaram apenas o isômero beta da glicose que pode ser detectado pela presença do sinal duplo em 4,48 ppm (7,8 Hz). Em relação aos aminoácidos, foram identificadas alanina e treonina em AOM, enquanto que apenas a alanina pode ser verificada em AOM-R. Por outro lado, AOM apresentou apenas sinais referentes ao ácido succínico, enquanto que AOM-R apresentou, além do ácido succínico, sinais característicos do ácido fórmico. Colina, ácidos graxos saturados e insaturados foram detectados nos espectros de ambos os extratos, embora os sinais característicos de esteroides tenham sido evidenciados apenas em AOM-R (**Tabela A4 e Tabela A5 – Apêndice 1**).

As análises dos espectros de AOM e AOM-R permitiu a identificação do ácido rosmarínico. As principais evidências observadas são dois duplos dupletos em aproximadamente 6,62 ppm (8,0 Hz e 1,9 Hz) e em 6,93 ppm (8,0 Hz e 1,8 Hz) referentes aos átomos de hidrogênio H6 e H6', respectivamente. Esses sinais se mostram característicos de anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos. Os sinais referentes aos H2, H2', H5 e H5' foram observados, respectivamente, em 6,76 ppm (d, 1,9 Hz), 6,68 ppm (d, 8,0 Hz), 7,03 ppm (d, 1,9 Hz) e em 6,77 ppm (d, 8,2 Hz) corroborando a presença de dois anéis trissubstituídos. A presença de sinais olefínicos em 7,52 ppm (d, 15,8 Hz) e em 6,27 ppm (d, 15,8 Hz) referentes a H7' e H8' confirmam a presença da porção cinâmica da molécula (ácido cafeico) com configuração *trans* (**Figura 53**). Foram observados ainda sinais de hidrogênios metilênicos em 3,20 ppm, 2,98 ppm e em 5,10 ppm que correspondem aos H7a, H7b e H8 do ácido rosmarínico (**Figura 54**). As correlações observadas nos espectros HSQC suportam esta identificação. O mapa de correlação HMBC de AOM permitiu identificar todos os átomos de carbono desta substância. Os deslocamentos químicos dos sinais observados em ambos os extratos, os acoplamentos e a comparação com dados da literatura são descritos na **Tabela 23**.

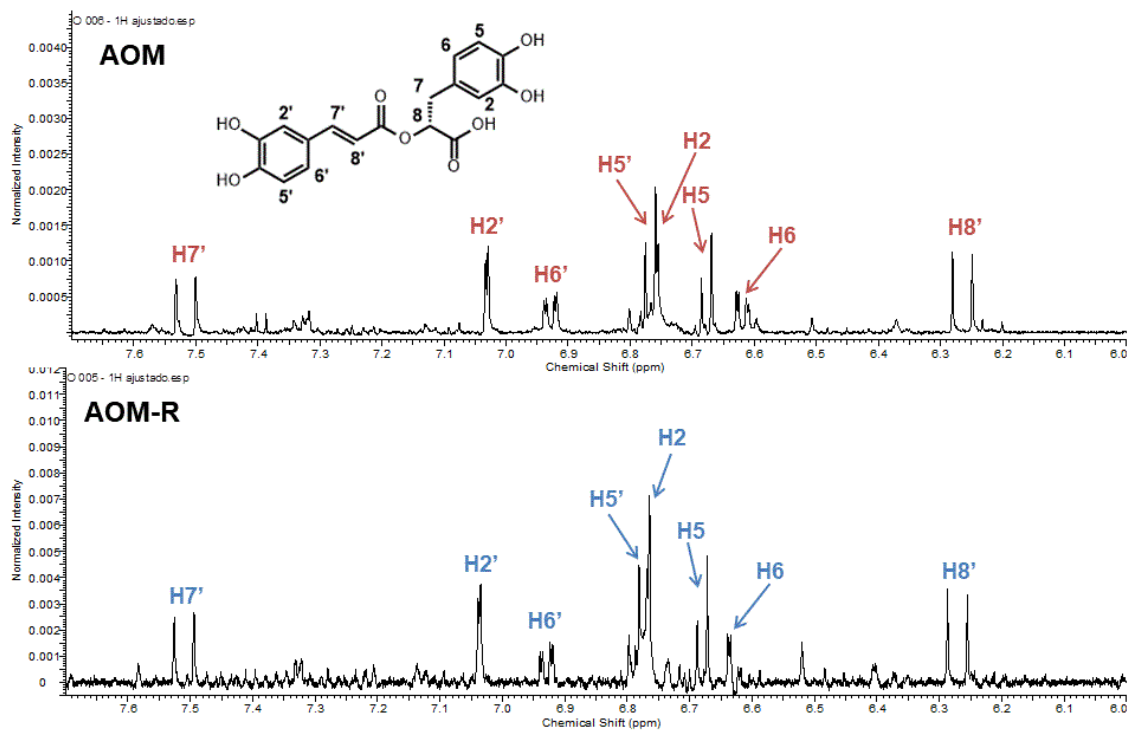


Figura 53: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de AOM e AOM-R demonstrando os sinais referente ao ácido rosmarínico.

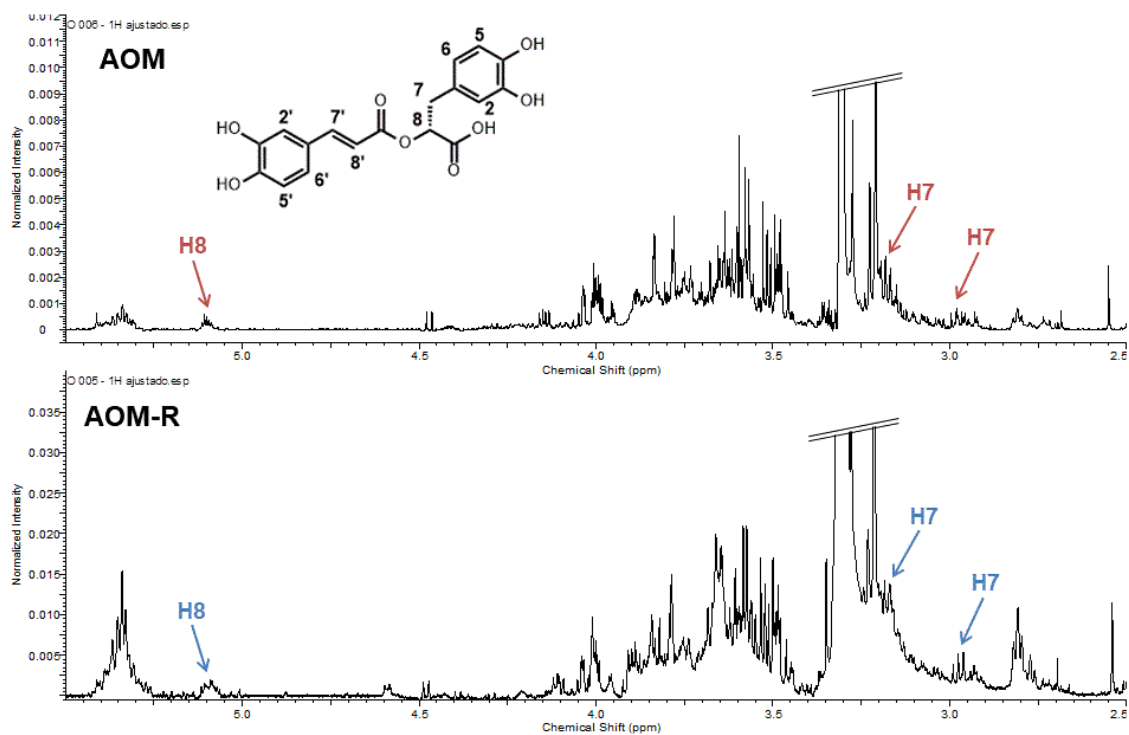


Figura 54: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD₃OD de AOM e AOM-R demonstrando os sinais referente ao ácido rosmarínico.

Tabela 23: Deslocamentos químicos do ácido rosmarínico identificado nos extratos AOM e AOM-R, e comparação com dados da literatura.

N	AOM			AOM-R		Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	-	130,6	-	-	-	-	130,6
2	6,76 d 1,9	116,9	145,0; 121,6	6,77 d 1,9	117,3	6,76 d	117,6
3	-	145,8	-	-	-	-	146,0
4	-	145,0	-	-	-	-	145,0
5	6,68 d 8,0	116,1	130,6; 145,8	6,68 d 7,9	115,8	6,68 d	116,3
6	6,62 dd 8,0 e 1,9	121,6	116,9; 145,0	6,63 dd 7,9 e 1,9	121,5	6,62 dd	121,8
7	3,20 m	39,5	173,4	3,20 m	39,5	3,11 dd	38,4
	2,98 m		130,6; 116,9; 121,6; 76,7	2,98 m		2,97 dd	
8	5,10 m	76,7	-	5,10 m	76,7	5,12 dd	76,7
9	-	173,4	-	-	-	-	176,9
1'	-	127,9	-	-	-	-	127,9
2'	7,03 d 1,9	115,0	146,7; 149,4; 112,9	7,04 d 1,9	114,8	7,03 d	115,2
3'	-	146,7	-	-	-	-	146,7
4'	-	149,4	-	-	-	-	149,5
5'	6,77 d 8,2	116,3	127,9; 146,7	6,78 d 8,2	116,2	6,77 d	116,5
6'	6,93 dd, 8,2 e 1,9	122,9	115,0; 149,4; 146,7	6,93 dd 8,0 e 1,9	122,8	6,92 dd	123,0
7'	7,52 d 15,8	146,7	122,9; 115,1; 168,9	7,51 d 15,7	146,2	7,52 d	147,1
8'	6,27 d 15,8	115,1	127,9	6,27 d 15,8	-	6,26 d	115,2
9'	-	168,9	-	-	-	-	168,9

*Kikuzaki & Nakatani, 1989

O ácido rosmarínico é um constituinte encontrado especialmente em espécies das famílias Boraginaceae e Lamiaceae. A ocorrência dessa substância é bastante descrita no reino vegetal, sendo facilmente encontrado em espécies do gênero *Ocimum* tais como *O. gratissimum*, *O. canum*, *O. sanctum* e *O. basilicum*. Esse constituinte é frequentemente associado às atividades biológicas descritas para o gênero, por ocorrer em grandes quantidades nas espécies (Baliga et al., 2013; Berhow, Affum, & Gyan, 2012; Guez et al., 2017; Petersen & Simmonds, 2003). O manjeriço (*O. basilicum*), por exemplo, foi alvo de um estudo que investigou a composição do extrato aquoso por CLAE-UV e RMN. Foram identificadas substâncias fenólicas como o ácido rosmarínico, ácido caftárico e ácido chicórico, além de ácidos

orgânicos como ácido málico e ácido tartárico. Embora os autores tenham observado menos sinais referentes ao ácido rosmarínico, estes dados estão de acordo com os observados nos extratos AOM e AOM-R. Não obstante, a menor quantidade de sinais observados pelos autores pode ter relação com a presença de outros constituintes que acarretam na sobreposição de sinais, além de variações sazonais e do método de extração (Casanova et al., 2016).

Os espectros de RMN ^1H de AOM e AOM-R apresentaram perfis semelhantes embora notáveis diferenças na intensidade dos sinais tenham sido evidenciadas. Assim como nos espectros de AAM-R e ACM-R, foi observado em AOM-R um ligeiro incremento na intensidade dos sinais referentes às substâncias graxas. Por outro lado, os sinais na região de açúcares e de aromáticos de AOM-R apresentaram-se em menor intensidade do que os de AOM. Em ambos os extratos foi possível observar os sinais referentes ao ácido rosmarínico sendo que em AOM-R os sinais se apresentaram em menor intensidade (**Figura 55**). No entanto, as evidências observadas são suficientes para assegurar a presença deste constituinte no extrato, o que corrobora a importância dessa metodologia na análise de amostras vegetais.

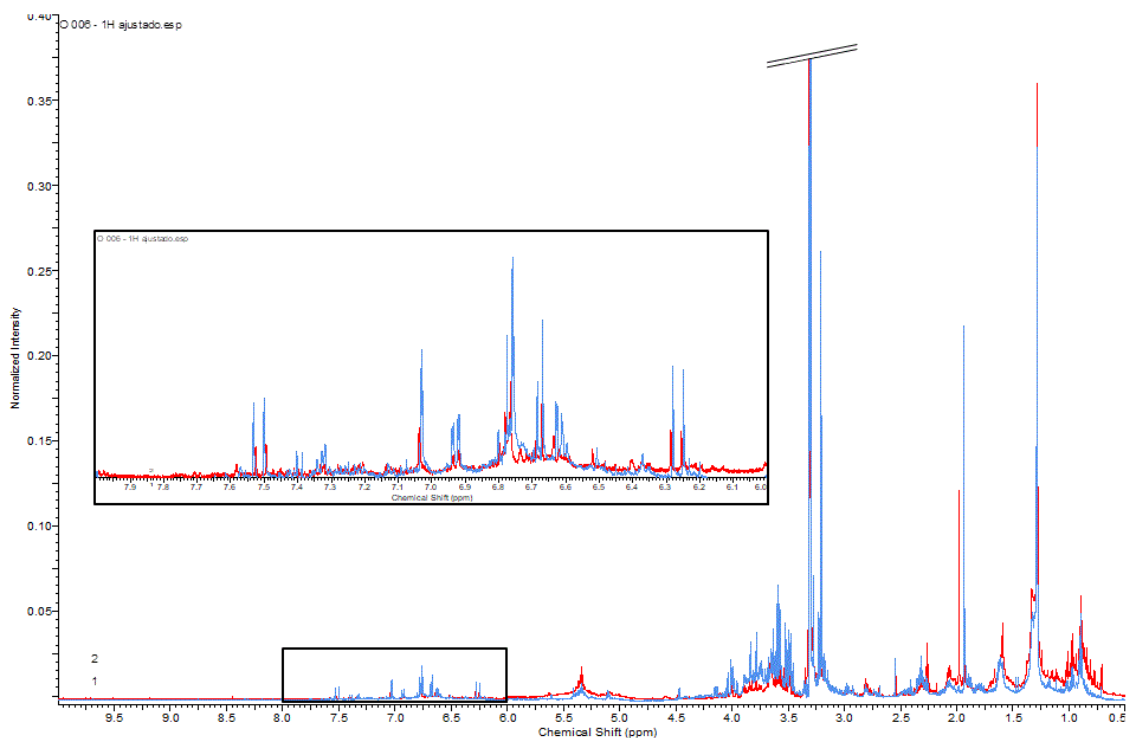


Figura 55: Comparativo dos espectros em CD_3OD de AOM (azul) e AOM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

A maior abundância dos sinais referentes ao ácido rosmarínico em AOM possivelmente está relacionada com o processo de extração. Na extração direta com metanol deuterado existe uma maior quantidade de substâncias disponíveis para

serem extraídas na amostra, ou seja, há uma maior competição em relação à AOM, o que poderia influenciar na capacidade de extração do ácido rosmarínico. Além disso, deve-se ter em mente que na extração em duas etapas houve um maior tempo de contato entre o solvente e a amostra vegetal, o que pode ter contribuído para um maior acúmulo desta substância.

5.4.1.3. Quantificação de ácido rosmarínico em AOM

Pela adição de um padrão interno e aquisição de um novo espectro de RMN de ^1H do extrato AOM, foi possível determinar o teor de ácido rosmarínico nessa amostra. O perfil metabólico de AOM obtido por esse procedimento apresentou-se semelhante aos perfis demonstrados anteriormente, tendo sido possível observar os sinais referentes ao ácido rosmarínico. Foram selecionados cinco sinais para análise quantitativa do ácido rosmarínico sendo eles referentes ao H6, H2', H6', H7' e H8' (**Figura 56**). Todos os sinais selecionados são referentes a hidrogênios metínicos (CH) e seus valores de integral variaram entre 0,21 e 0,29. Os resultados da quantificação variaram entre 11,99 mg/g e 16,56 mg/g tendo sido observado um valor médio de $14,73 \pm 0,91$ mg de ácido rosmarínico por grama de extrato (**Tabela 24**).

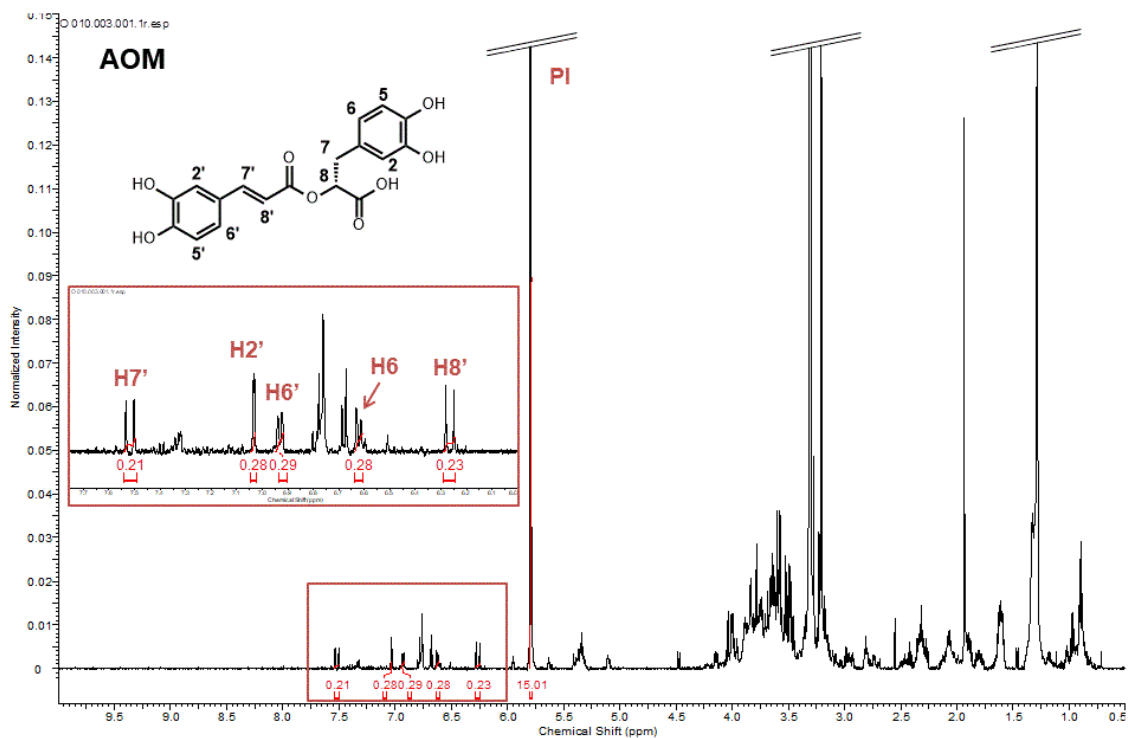


Figura 56: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD_3OD de AOM demonstrando os sinais e integrações do ácido rosmarínico e do padrão interno (PI).

Tabela 24: Valores de integral dos sinais selecionados do ácido rosmarínico e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.

	Ácido rosmarínico					Média ± erro
	H6	H2'	H6'	H7'	H8'	
Integração	0,28	0,28	0,29	0,21	0,23	-
Quantificação (mg/g)	15,98	15,98	16,56	11,99	13,13	14,73 ± 0,91

Diversos estudos devotaram à verificação do teor de ácido rosmarínico em espécies vegetais. A análise de sete espécies vegetais das famílias Asteraceae, Apiaceae e Lamiaceae revelou a presença do ácido rosmarínico em quatro espécies, sendo elas: *Micromeria graeca*, *Origanum vulgare* (orégano), *Satureja montana* e *Thymus longicaulis*. Nesse trabalho, foi evidenciada a ocorrência de grandes quantidades dessa substância, como em *Origanum vulgare* que, no verão, apresentou teor de ácido rosmarínico de $35,50 \pm 5,91$ (Scognamiglio, D'Abrosca, Esposito, & Fiorentino, 2015).

Em outro estudo, as quantidades de ácido carnósico e de ácido rosmarínico em *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foram estimadas por RMN ^1H . Os autores encontraram diferenças no teor dessas substâncias de acordo com a área de coleta do material, tendo sido evidenciado um teor máximo de $1,8 \pm 0,1\%$ de ácido rosmarínico em uma das amostras (Jemia et al., 2013).

Há relato ainda da quantificação dessa substância em espécies do gênero *Ocimum*. No estudo conduzido por Casanova e colaboradores (2016) foi feita a quantificação de diversas substâncias presentes em *Ocimum gratissimum* (alfavaca) e *Ocimum basilicum* (manjerição) por CLAE-UV e RMN. A quantificação por CLAE-UV revelou que o ácido rosmarínico ocorre em maior quantidade no manjerição do que na alfavaca. Embora as análises de RMN dos extratos não tenha permitido a quantificação dessa substância em *O. gratissimum*, o teor de ácido rosmarínico em *O. basilicum* foi estimado em 4,75 mg/g de extrato (Casanova et al., 2016).

Tomadas em conjunto, os trabalhos descritos anteriormente estão de acordo com os resultados encontrados para AOM. Apesar de a quantificação de uma amostra de *O. basilicum* ter resultado em um teor de ácido rosmarínico menor, diversos fatores devem ser considerados como sazonalidade, local de coleta e ainda, quantidade de sinais quantificáveis. No estudo conduzido por Scognamiglio e colaboradores (2015) as influências que a sazonalidade exerce sobre a produção de um determinado metabólito são evidentes. O orégano, por exemplo, que apresentou teor de ácido rosmarínico de $35,50 \pm 5,91$ no verão apresentou uma redução drástica para $11,47 \pm$

6,11 no inverno. Além disso, no trabalho conduzido por Casanova e colaboradores (2016) foram observadas outras substâncias que não foram detectadas em AOM. Essa maior variabilidade química pode estar relacionada a fatores externos como incidência solar, qualidade do solo e presença de predadores e/ou plantas competidoras.

5.4.2. INVESTIGAÇÃO DE AOM POR CLAE-EM

O cromatograma de AOM obtido por CLAE-EM apresentou diversos picos de intensidades equivalentes e dois sinais de caráter majoritário sendo o primeiro no tempo de retenção de 49,2 min e o segundo em 90,2 min. Embora o primeiro tenha sido identificado, não foi possível determinar a estrutura do componente presente no pico de maior intensidade que possivelmente é referente a diversas substâncias de menor polaridade. Por outro lado, a análise dos demais sinais de menor intensidade permitiu a identificação de diversas substâncias (**Figura 57**).

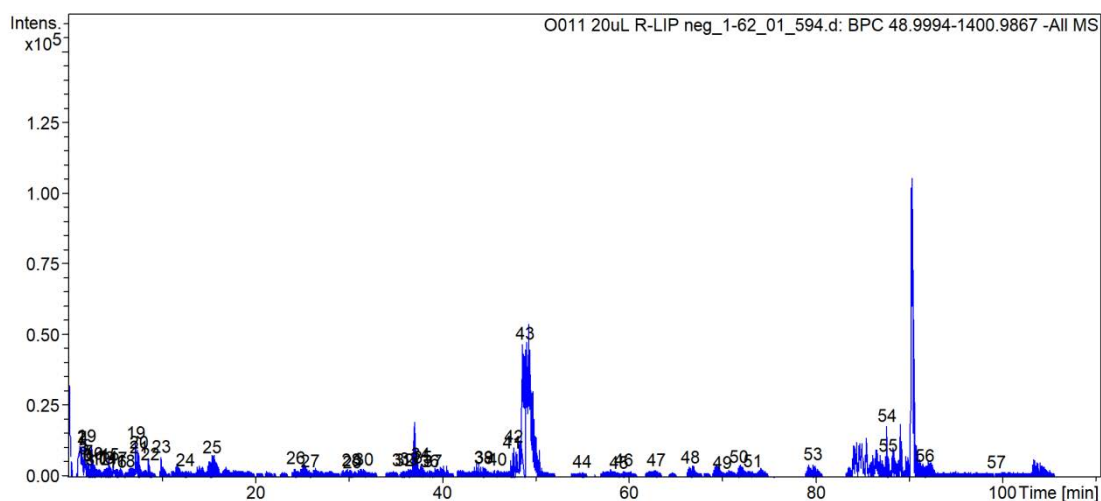


Figura 57: Cromatograma do pico base (BPC) de AOM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.

As análises dos espectros de fragmentação dos picos demonstrados acima permitiu a identificação de 57 substâncias que compreendem ácidos orgânicos simples, aminoácidos e seus derivados, derivados benzoicos e cinâmicos, flavonoides, dentre outras. As propostas de identificação e os demais dados espectrais e cromatográficos observadas para cada substância são descritos na **Tabela 25**.

Tabela 25: Substâncias identificadas na análise de AOM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	1,4	133,0141 [M-H]-	C ₄ H ₆ O ₅	133,0142 [M-H]-	-0,75	-	Ácido málico	[1]
2	1,4	128,0355 [M-H]- 130,0509 [M+H]+	C ₅ H ₇ NO ₃	128,0353 [M-H]- 130,0509 [M+H]+	1,56 0	- 84	Ácido piroglutâmico	[2]
3	1,5	268,1037 [M+H]+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268,1040 [M+H]+	-1,11	136	Adenosina	[2]
4	1,5	136,0635 [M+H]+	C ₅ H ₅ N ₅	136,0628 [M+H]+	5,14	119	Adenina	[2]
5	1,5	290,0883 [M-H]-	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	290,0881 [M-H]-	0,68	128	Ácido piroglutâmico-O-glicosídeo	[3]
6	2,1	164,0721 [M-H]- 166,0859 [M+H]+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164,0717 [M-H]- 166,0862 [M+H]+	2,43 -1,80	- 120; 103	Fenilalanina	[2]
7	2,2	191,0558 [M-H]-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0561 [M-H]-	-1,57	-	Ácido quínico	[1]
8	2,2	326,1250 [M-H]- 328,1387 [M+H]+ 310,1289 [M+H-H ₂ O]+	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	326,1245 [M-H]- 328,1401 [M+H]+	1,53 -4,26	164 ; 147 264; 132 ; 120 189 ; 120	Fructosil-Fenilalanina	[1]
9	2,5	197,0455 [M-H]-	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0455 [M-H]-	0	135	Ácido salviânico A	[4]
10	2,7	153,0195 [M-H]-	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193 [M-H]-	1,3	-	Ácido protocatecúico	[5]
11	2,7	359,0983 [M-H]-	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	359,0983 [M-H]-	0	197; 179 ; 135; 123	Ácido salviânico A-O-glicosídeo	[6]
12	3,4	203,0833 [M-H]- 205,0970 [M+H]+ 188,0707 [M+H-NH ₃]+	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203,0826 [M-H]- 205,0982 [M+H]+	3,44 -5,85	- 143; 118 143; 118 ; 91	Triptofano	[2]
13	3,9	311,0411 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311,0408 [M-H]-	0,96	179; 135	Ácido caftárico	[7]
14	4,2	137,0242 [M-H]- 139,0393 [M+H]+	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244 [M-H]- 139,0389 [M+H]+	-1,45 2,87	- 110	Aldeído protocatecúico	[4]
15	4,4	447,1145 [M-H]- 466,1560 [M+NH ₄]+	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	447,1144 [M-H]- 466,1555 [M+NH ₄]+	0,22 1,07	447; 152 -	Ácido dihidroxibenzóico-O-glicosil-xilosídeo	[1]
16	5,2	299,0787 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	299,0772 [M-H]-	5,01	137	Ácido salicílico-O-glicosídeo	[6]
17	5,2	339,0729 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339,0721 [M-H]-	2,35	177	Esculina	[1]
18	6,0	295,0453 [M-H]-	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	295,0459 [M-H]-	-2,03	119	Ácido cutárico	[7]

Tabela 25 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AOM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
19	7,4	179,0347 [M-H]- 181,0494 [M+H]+ 163,0382 [M+H-H ₂ O]+	C ₉ H ₈ O ₄	179,0349 [M-H]- 181,0495 [M+H]+	-1,11 -0,55	135 135; 117 ; 89 89	Ácido cafeico	[5]
20	7,4	325,0932 [M-H]-	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0928 [M-H]-	1,23	119	Ácido cumárico-O-glicosídeo	[3]
21	7,5	417,1033 [M-H]-	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₂	417,1038 [M-H]-	-1,19	417; 152	Ácido dihidroxibenzóico-O-dixilosídeo	[6]
22	8,8	325,0570 [M-H]-	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325,0565 [M-H]-	1,53	134	Ácido fertárico	[7]
23	9,9	521,1514 [M-H]-	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₅	521,1511 [M-H]-	0,57	341; 326; 197	Ácido siríngico-O-sacarose	[6]
24	12,5	163,0400 [M-H]- 165,0545 [M+H]+ 147,0416 [M+H-H ₂ O]+	C ₉ H ₈ O ₃	163,0400 [M-H]- 165,0546 [M+H]+	0 -0,60	119 119 ; 91 91	Ácido cumárico	[8]
25	15,2	387,1657 [M-H]- 411,1607 [M+Na]+	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	387,1660 [M-H]- 411,1636 [M+Na]+	-0,77 -7,05	387; 207 ; 163 411 ; 367; 249; 149	Ácido tuberônico-O-glicosídeo	[6]
26	24,3	593,1515 [M-H]- 595,1659 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	0,67 0,33	593; 503; 473; 383; 353 523; 457; 421; 379; 355 ; 337; 325	Vicenina-2	[6]
27	25,8	537,1033 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	537,1038 [M-H]-	-0,93	339 ; 295; 267; 229	Ácido salvianólico I/H ou Ácido litospérmico	[9]
28	30,2	193,0505 [M-H]-	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0506 [M-H]-	-0,51	133	Ácido ferúlico	[5]
29	30,4	537,1040 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	537,1038 [M-H]-	0,37	339; 295; 269; 229; 197; 179; 135	Ácido salvianólico I/H ou Ácido litospérmico	[4]
30	31,7	473,0725 [M-H]-	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	473,0725 [M-H]-	0	219; 179 ; 149; 135	Ácido chicórico	[7]
31	35,7	537,1051 [M-H]-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	537,1038 [M-H]-	2,42	295 ; 203; 197	Ácido salvianólico I/H ou Ácido litospérmico	[9]
32	35,9	187,0972 [M-H]-	C ₉ H ₁₆ O ₄	187,0975 [M-H]-	-1,6	-	Ácido azeláico	[2]
33	36,4	539,1401 [M-H]-	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₄	539,1406 [M-H]-	-0,92	359; 341; 269; 239; 197 ; 179; 135	Derivado do ácido rosmarínico-O-glicosídeo	[6]
34	37,6	463,0880 [M-H]- 465,1023 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]- 465,1027 [M+H]+	-0,43 -0,86	300 303	Quercetina-O-glicosídeo	[3]
35	37,9	609,1462 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	0,16 0	609; 300 303	Rutina	[7]

Tabela 25 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AOM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
36	38,7	579,1354 [M-H] ⁻ 581,1508 [M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579,1355 [M-H] ⁻ 581,1500 [M+H] ⁺	-0,17 -1,37	579 ; 284 287	Kaempferol-O-glicosil-xilosídeo	[6]
37	39,0	521,1295 [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	521,1300 [M-H] ⁻	-0,95	320; 197; 179; 161 ; 135	Ácido rosmarínico-O-glicosídeo	[6]
38	44,4	593,1520 [M-H] ⁻ 595,1665 [M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H] ⁻ 595,1657 [M+H] ⁺	1,51 1,34	593; 285 287	Kaempferol rutinosídeo	[1]
39	44,5	623,1979 [M-H] ⁻ 625,2123 [M+H] ⁺	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H] ⁻ 625,2126 [M+H] ⁺	-0,32 -0,47	623; 461; 315; 161 -	Acteosídeo	[2]
40	45,8	445,0776 [M-H] ⁻ 447,0918 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445,0776 [M-H] ⁻ 447,0921 [M+H] ⁺	0 -0,67	269 271	Apigenina-7-O-glicuronídeo	[3]
41	47,4	566,4271 [M+H] ⁺ 588,4075 [M+Na] ⁺ 283,7172 [M+2H] ²⁺	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	566,4275 [M+H] ⁺	-0,7	566 ; 548; 435; 322; 228 588 453; 435; 322; 227; 209; 114	Ciclo pentaleucil(isoleucil)	[2]
42	47,7	717,1463 [M-H] ⁻ 719,1603 [M+H] ⁺	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717,1461 [M-H] ⁻ 719,1606 [M+H] ⁺	0,27 -0,41	475; 431; 339 ; 321; 295; 197 295 ; 181	Ácido salvianólico B/E	[6]
43	48,7	359,0770 [M-H] ⁻ 719,1619 [2M-H] ⁻ 1079,2465 [3M-H] ⁻ 361,0916 [M+H] ⁺ 343,0774 [M+H-H ₂ O] ⁺ 721,1750 [2M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359,0772 [M-H] ⁻ 361,0917 [M+H] ⁺	-0,55 -0,27	197; 179; 161 ; 135; 133 359; 197; 161 359; 197; 161 181; 163 ; 145; 139; 135 339; 163 325; 295; 181; 163 ; 139; 135	Ácido rosmarínico	RMN
44	55,0	717,1464 [M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717,1461 [M-H] ⁻	0,41	493; 339; 321; 313; 295 ; 197; 179	Ácido salvianólico B/E	[9]
45	58,9	717,1467 [M-H] ⁻ 719,1614 [M+H] ⁺	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717,1461 [M-H] ⁻ 719,1606 [M+H] ⁺	0,83	357; 331; 313 ; 295; 269 -	Ácido salvianólico B/E	[9]
46	59,4	701,1515 [M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₅	701,1511 [M-H] ⁻	0,57	459; 415; 339	Ácido desoxisalvianólico B/E	[9]

Tabela 25 (cont.): Substâncias identificadas na análise de AOM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
47	62,8	723,5020 [M+FA-H]- 679,5121 [M+H]+ 701,4924 [M+Na]+ 340,2577 [M+2H]2+ 351,2468 [M+H+Na]2+ 359,2308 [M+H+K]2+	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	723,5025 [M+FA-H]- 679,5116 [M+H]+	-0,69 0,73	677 ; 225 679 ; 661; 548; 435; 322 701 566; 453; 435; 340; 322; 228; 114 588; 114 359	Ciclo hexaleucil(isodeucil)	[2]
48	66,6	373,0915 [M-H]-	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373,0917 [M-H]-	-0,53	179; 160; 135	Rosmarinato de metila	[9]
49	70,0	836,5869 [M+FA-H]- 396,8005 [M+2H]2+	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	836,5866 [M+FA-H]- 396,8015 [M+2H]2+	0,35 -2,52	790 ; 225 679; 566; 453; 435; 387; 322; 114	Ciclo heptaleucil(isodeucil)	[2]
50	71,7	651,2287 [M-H]- 653,2438 [M+H]+	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651,2294 [M-H]- 653,2439 [M+H]+	-1,07 -0,15	193; 175 -	Martinosídeo	[2]
51	73,2	491,0979 [M-H]-	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	491,0983 [M-H]-	-0,81	311 ; 267	Ácido salvianólico C	[4]
52	75,5	453,3428 [M+2H]2+	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	453,3432 [M+2H]2+	-0,88	548; 453 ; 444; 114	Ciclo octaleucil(isodeucil)	[2]
53	79,6	493,1139 [M-H]-	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	493,1140 [M-H]-	-0,2	295; 197; 161; 135	Ácido salvianólico A	[4]
54	87,5	329,1013 [M+H]+	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329,1019 [M+H]+	-1,82	329; 314; 296; 268 ; 240	Salvigenina	[10]
55	87,5	487,3429 [M-H]- 533,3496 [M+FA-H]- 489,3564 [M+H]+ 471,3429 [M+H-H ₂ O]+ 453,3321 [M+H-2H ₂ O]+	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3428 [M-H]- 489,3574 [M+H]+	0,2 -2,04	487 ; 469; 423 487 ; 469; 443; 423 407; 205 ; 201; 187; 147 407; 205 ; 201; 187 407; 205 ; 201; 187; 177	Ácido tormêntico	[2]
56	91,6	593,2747 [M+H]+	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2758 [M+H]+	-1,85	593 ; 533	Feoforbídeo a	[11]
57	99,3	871,5724 [M+H]+	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871,5731 [M+H]+	-0,8	871 ; 593; 533	Feofitina a	[11]

[1] - Rodríguez-Pérez et al., 2018; [2] - Duan et al., 2017; [3] - Sun et al., 2015; [4] - M. Zhou et al., 2018; [5] – Pandey et al., 2015; [6] – Farag et al., 2016; [7] - Lee & Scagel, 2009; [8] – Hossain et al., 2010; [9] - Cao et al., 2018; [10] - Pandey & Kumar, 2016; [11] - Bijttebier et al., 2016

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

A análise cromatográfica de AOM revelou uma significativa diversificação metabólica, uma vez que constituintes pertencentes a diversas classes foram evidenciados. A análise dos espectros de MS² obtidos pelo modo positivo e negativo de ionização revelou a presença de derivados cinâmicos e benzoicos, flavonoides, feniletanoides, cumarinas, triterpenos, entre outras substâncias.

Substâncias de menor peso molecular como o ácido málico (**1**) e o ácido quínico (**7**) foram detectadas nos primeiros minutos de eluição. Aminoácidos (**6**, **12**) e substâncias derivadas dos mesmos (**2-5**, **8**) foram identificados principalmente pela análise de AOM no modo positivo de ionização. Os principais fragmentos observados se mostraram referentes à perda de CO₂ [M+H-CO₂]⁺ e de NH₃ [M+H-CO₂-NH₃]⁺, além da perda de glicose [M-H-Glc]⁻ que foi observada para as substâncias **5** e **8**.

Também foram identificados alguns derivados benzoicos que se mostraram em sua maioria glicosilados. As exceções foram o ácido protocatecúico (**10**) e o seu aldeído (**14**) que apresentou fragmento m/z 110 característico da perda de CHO [M+H-CHO]⁺. Os demais derivados glicosilados (**15**, **16**, **21** e **23**) apresentaram fragmentos referentes à perda de 324 Da (162 Da + 162 Da), 294 Da (162 Da + 132 Da), 264 Da (132 Da + 132 Da) e 162 Da, que correspondem à sacarose, glicosil-xilosídeo, dixilosídeo e glicose, respectivamente. Esses foram identificados como ácido dihidroxibenzoico-O-glicosil-xilosídeo (**15**), ácido salicílico-O-glicosilado (**16**), ácido dihidroxibenzoico-O-dixilosídeo (**21**) e ácido siríngico-O-sacarose (**23**).

A principal classe metabólica identificada em AOM foi os derivados cinâmicos, totalizando 23 ocorrências. Foram observadas desde substâncias simples como o ácido salviânico A (**9**), ácido cafeico (**19**), ácido cumárico (**24**), ácido ferulico (**28**), entre outros (**11**, **13**, **18**, **20**, **22**), quanto dímeros (**30**, **33**, **37**, **43**, **48**), trímeros (**27**, **29**, **31**, **51**, **53**) e tetrâmeros (**42**, **44-46**). Diversos fragmentos referentes às unidades cinâmicas foram evidenciados nos espectros MS² destas substâncias. Para as substâncias com derivados cumáricos foi evidenciado o fragmento m/z 119 que se mostra característico do ácido cumárico após perda de CO₂. Por outro lado, diversas substâncias mostraram fragmento m/z 179 referente ao ácido cafeico, e m/z 135 que corresponde ao ácido cafeico após perda de CO₂. Por fim, algumas substâncias contendo unidades ferulicas apresentaram fragmento m/z 133 que se mostra referente ao ácido ferulico após perda de CO₂ e CH₃. Outras perdas observadas foram de ácido tartárico (132 Da), glicose (162 Da), ácido cafeico (180 Da) e de ácido salviânico A (198 Da).

A segunda classe de maior ocorrência em AOM foram os flavonoides. Ao todo foram identificados sete flavonoides que correspondem quatro flavonóis glicosilados (**34-36**, **38**), duas flavonas glicosiladas (**26**, **40**) e uma flavona (**54**). Os picos 34 e 35

apresentaram fragmento m/z 300 condizente com a quercetina, enquanto os picos 36 e 38 apresentaram m/z 285 referente ao kaempferol. Foram evidenciadas perdas de 162 Da (glicose), 294 Da (glicosil-xilosídeo) e de 308 Da (rutinosídeo). Esses foram identificados como quercetina-O-glicosídeo (**34**), rutina (**35**), kaempferol-O-glicosil-xilosídeo (**36**) e kaempferol-O-rutinosídeo (**38**).

Para as flavonas glicosiladas, o espectro MS^2 de **26** apresentou perfil condizente com o de C-diglicosídeos, sendo observadas as perdas típicas de 60 Da, 90 Da e 120 Da referente às quebras intraglicosídicas. Para a substância **40**, observou-se um perfil de O-glicosilação, sendo evidenciado o fragmento m/z 269 referente à sua aglicona. A perda de 176 Da sugere que essa substância seja apigenina-O-glicuronídeo.

Os espectros MS^2 obtidos pelo modo negativo de ionização e as proposta de fragmentação das substâncias identificadas em AOM são descritos na **Figura 58**.

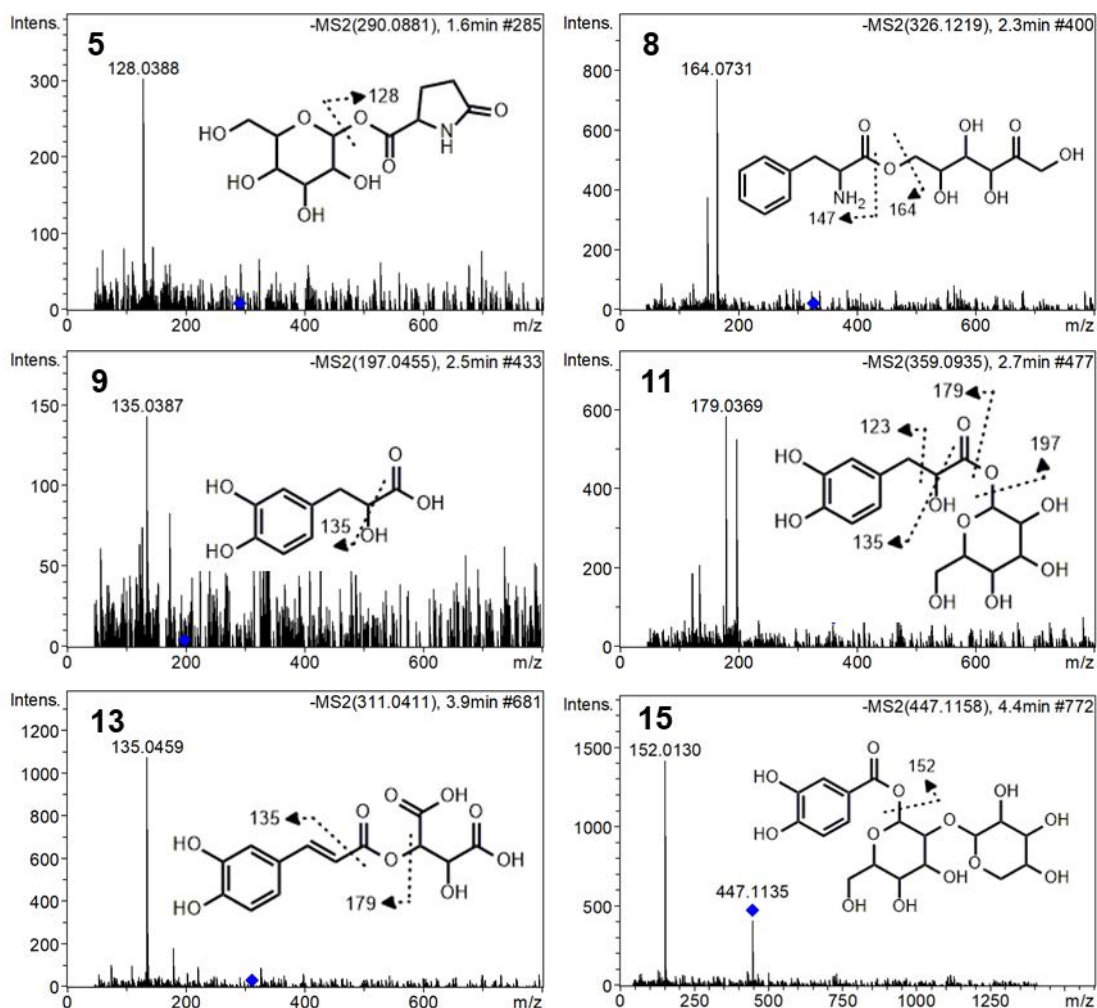


Figura 58: Espectros de MS^2 das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.

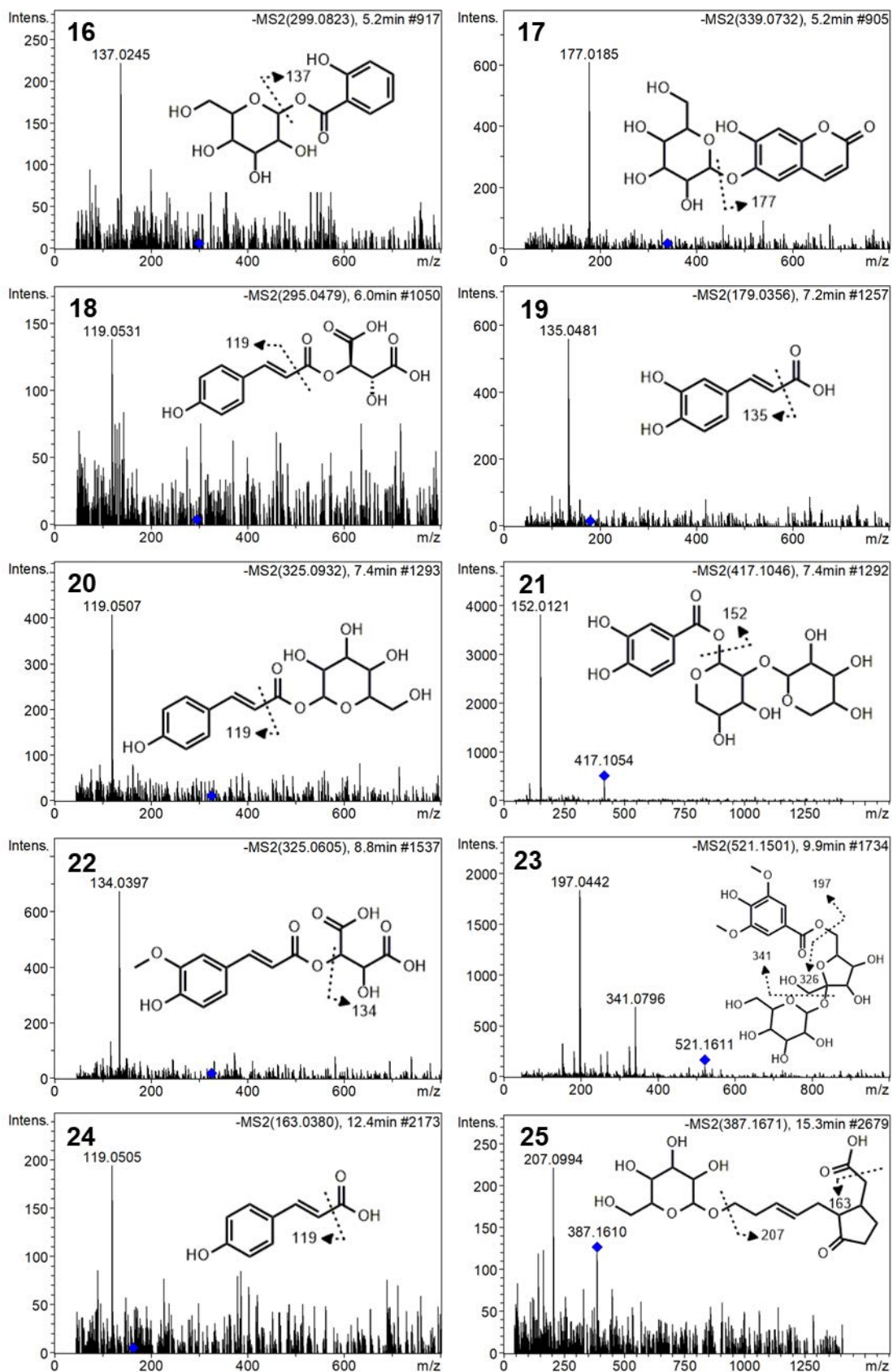


Figura 58 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.

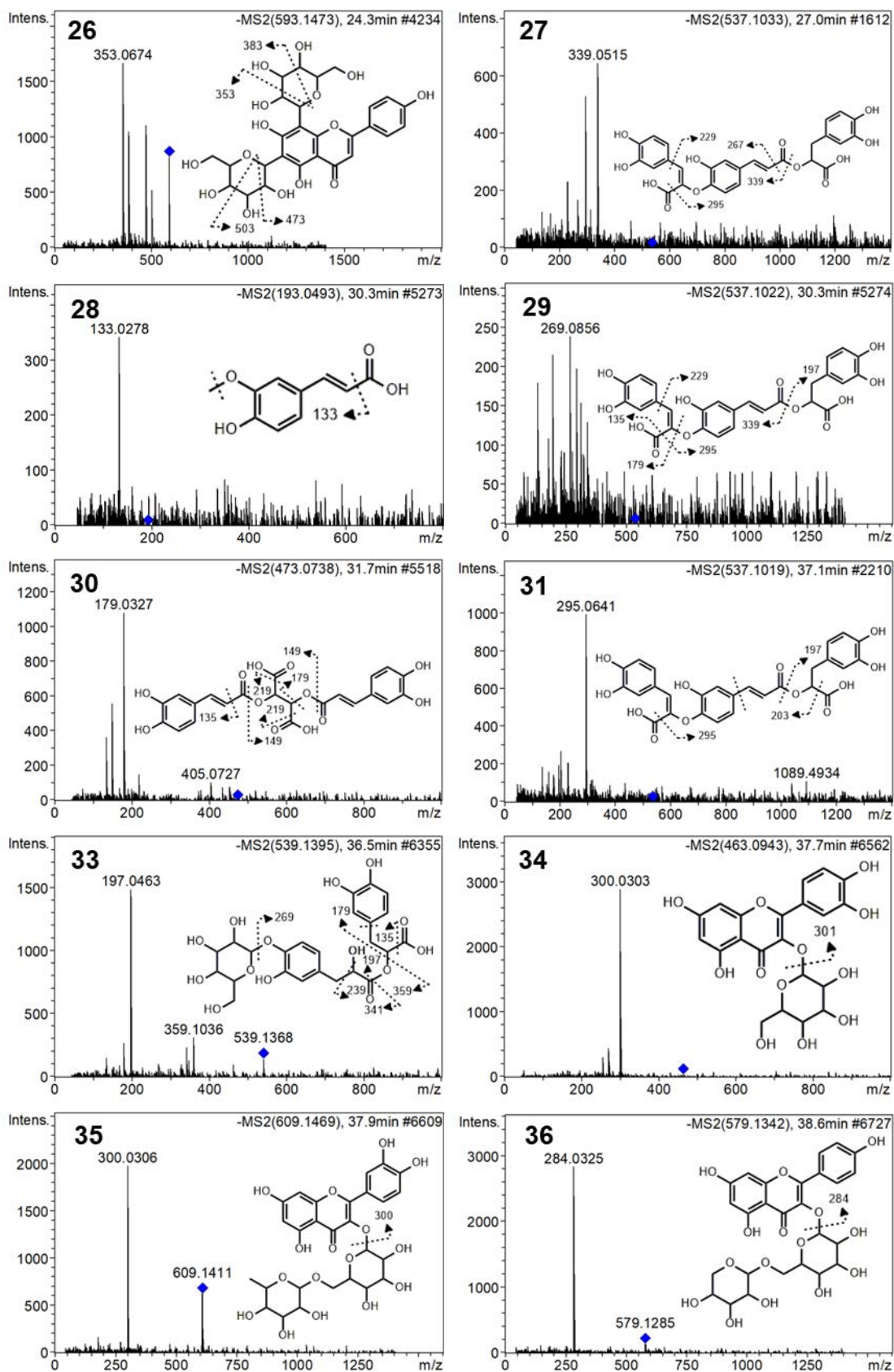


Figura 58 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.

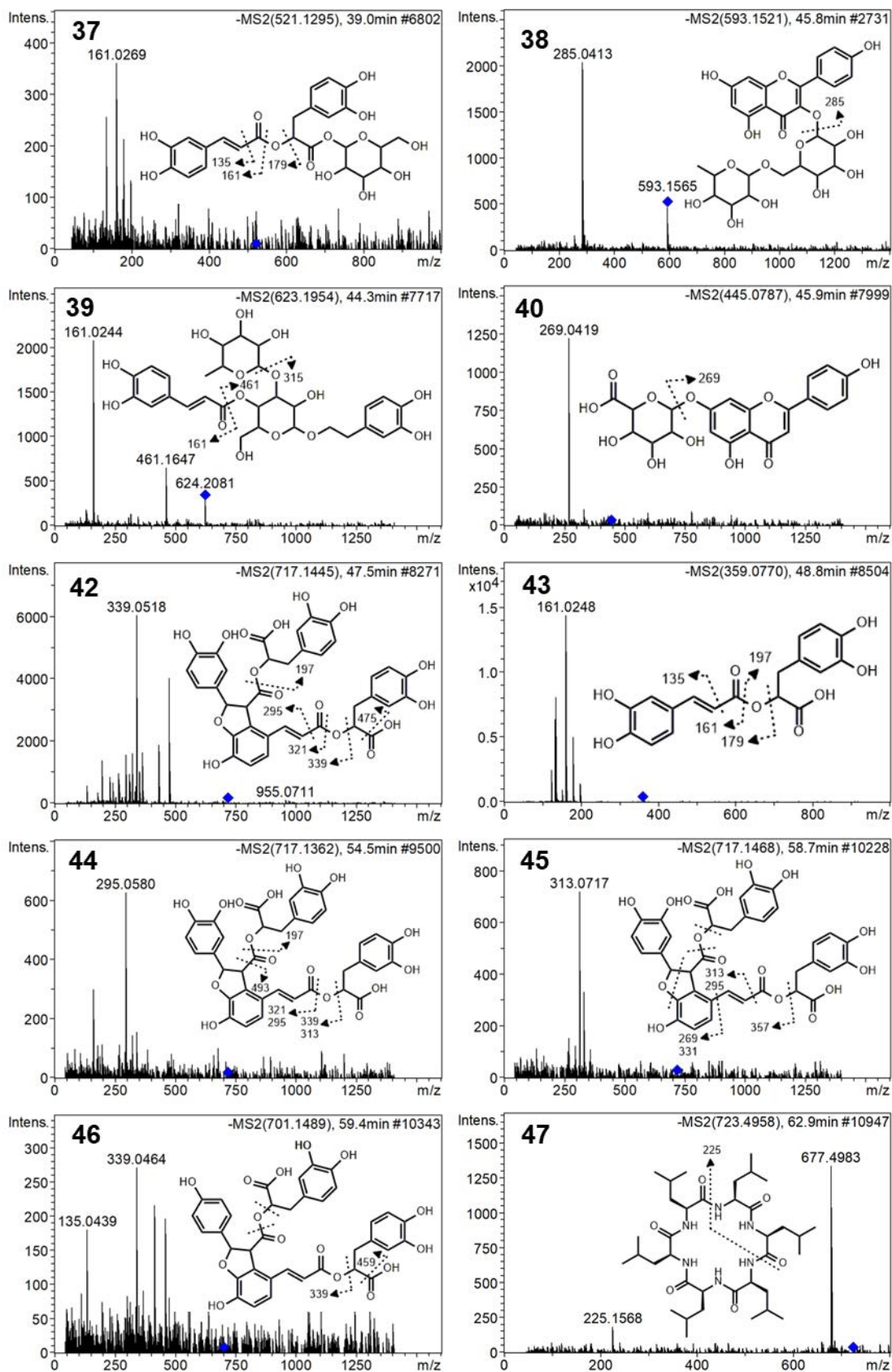


Figura 58 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.

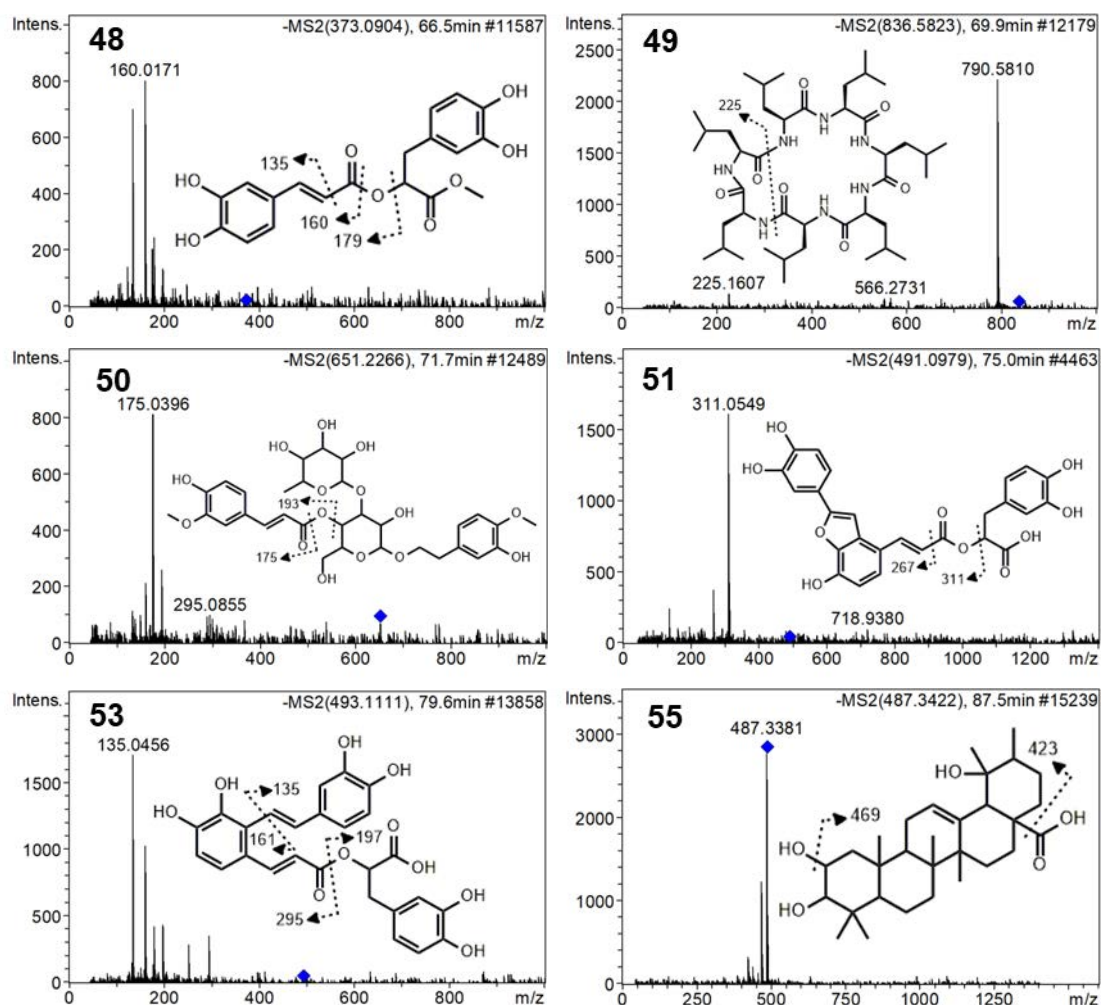


Figura 58 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em AOM e suas propostas de fragmentação.

No estudo conduzido por Farag e colaboradores (2016) foram identificadas diversas substâncias em *O. basilicum* que incluem derivados cinâmicos, derivados benzoicos, flavonoides, taninos gálicos, triterpenos e ácidos graxos. Esta grande variedade química descrita para *O. basilicum* foi evidenciada na análise de AOM por CLAE-EM. Com exceção dos taninos gálicos que não foram observados em AOM, todas as demais classes metabólicas se mostraram presentes, tendo sido identificado ainda outras classes.

A presença de flavonoides em *O. basilicum* é bastante documentada, sendo descrito glicosídeos de flavonóis e flavonas. Além disso, são descritos alguns tipos de flavonoides metoxilados que ocorrem em sua forma livre. Os glicosídeos de flavonoides são derivados do kaempferol, quercetina, luteolina e apigenina. O padrão de substituição descrito para essas substâncias indica predominância de glicosilação nos flavonóis na posição 3, enquanto para as flavonas há preferencialmente 7-O-glicosídeos. Uma grande variedade de substituintes é descrita para essas substâncias,

sendo comumente relatados glicose, ácido glicurônico e rutinosídeo (Lee & Scagel, 2009; R. Pandey & Kumar, 2016). Ainda foi descrito recentemente a ocorrência de flavonas-C-glicosiladas na espécie (Farag et al., 2016).

Dois feniletanoides foram identificados em AOM correspondendo ao acteosídeo (39) e martinósídeo (50). Embora essa classe de substâncias não tenha sido descrita em *O. basilicum*, alguns autores sugerem que os mesmos não ocorram na sub-família onde *Ocimum* está inserida, entretanto, há relato da ocorrência do acteosídeo em *O. gratissimum* (Kapepula et al., 2017).

Uma grande variedade de substâncias derivadas de ácidos cinâmicos é descrita em *O. basilicum* e nas espécies do gênero. Substâncias como o ácido chicórico e ácido rosmarínico foram descritas como majoritárias no extrato aquoso de *O. basilicum* e *O. gratissimum* (Casanova et al., 2016). O ácido rosmarínico também foi evidenciado como um dos constituintes majoritário de *O. sanctum*, além de ser descrito em *O. minimum*, *O. africanum* e *O. americanum* (Farag et al., 2016; R. Pandey et al., 2015). A identificação do ácido rosmarínico no extrato AOM, além de corroborar com os resultados observados pela análise por RMN, se mostra de acordo com a literatura, uma vez que essa é o constituinte majoritário do extrato. Não obstante, são descritos ainda a ocorrência de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros de derivados cinâmicos no gênero. Esses correspondem a substâncias tais como ácido caftárico e ácido coutárico (monômeros), rosmarinato de metila e ácido chicórico (dímeros), ácido salvianólico C e ácido litospérmico A (trímeros) e ácido salvianólico B (tetrâmero) (Farag et al., 2016).

5.4.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE AOM

Oito animais foram utilizados na investigação hemodinâmica do extrato AOM, de modo que sete apresentaram perfis semelhantes e adequados para análise estatística. A administração de AOM promoveu uma hipotensão aguda bastante intensa e que necessitou de um maior tempo para o reestabelecimento das condições iniciais (**Figura 59**).

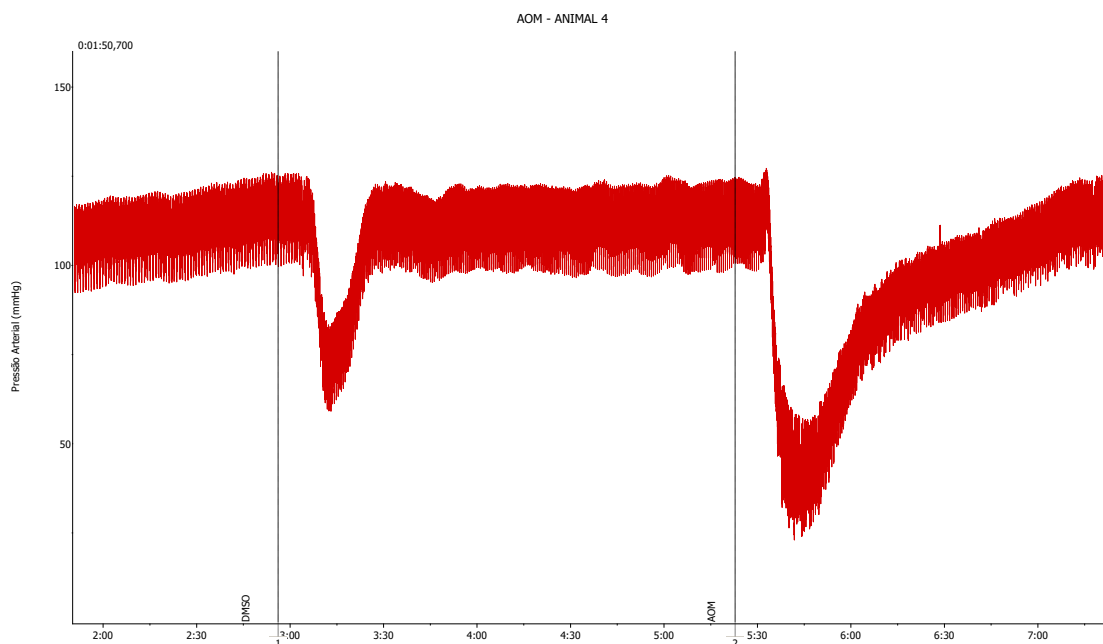


Figura 59: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato AOM, respectivamente.

A injeção intravenosa do extrato AOM promoveu reduções de $55,2 \pm 4,5$ mmHg na PAS, $59,2 \pm 3,6$ mmHg na PAM e $56,7 \pm 3,5$ mmHg na PAD. Esses efeitos se mostraram pouco diferentes em comparação ao DMSO, embora tenham se mostrado mais intensos. As reduções produzidas pelo DMSO nas PAS, PAM e PAD foram, respectivamente, $12,3 \pm 4,0$ mmHg, $12,4 \pm 4,5$ mmHg e $10,3 \pm 4,8$ mmHg menores do que as observadas para AOM. Seguindo a tendência observada para os demais extratos, os efeitos promovidos pelo DMSO e AOM nas pressões avaliadas se mostraram diferentes em relação ao controle ($p < 0,001$). Entretanto, somente as alterações nas PAS e PAM causadas pelo extrato se mostraram diferentes das produzidas pelo DMSO ($p < 0,05$) (**Figura 60**).

Por fim, uma pequena alteração na frequência cardíaca foi observada a partir da administração desse extrato, produzindo uma redução de $33,9 \pm 18,9$ bpm, embora

esse efeito não tenha apresentado diferença estatística em relação ao controle (Figura 60).

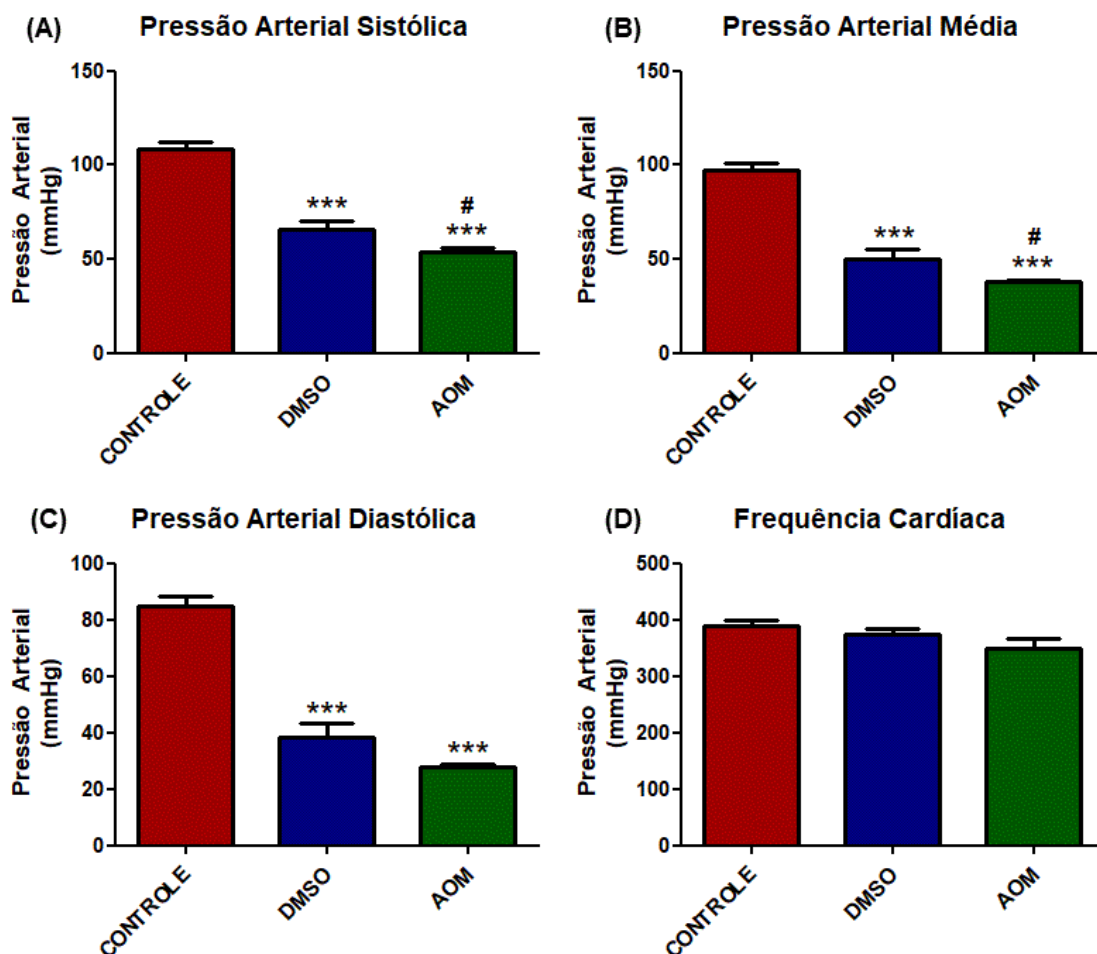


Figura 60: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato AOM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Outras avaliações de extratos do manjeriço foram conduzidas demonstrando atividades anti-hipertensiva, cardioprotetora, ateroprotetora e vasorelaxante. O extrato aquoso das partes aéreas de *O. basilicum* diminuiu a PAS e PAD em ratos hipertensos (modelo renovascular – 2K1C) nas doses de 100, 200 e 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ por via oral. Foram observados ainda diminuição nos níveis plasmáticos de endotelina e angiotensina II após o tratamento com o extrato (Umar et al., 2010). Em ensaios *ex vivo* conduzida em artérias aorta torácica de ratos tratados com dieta rica em colesterol, a infusão de *O. basilicum* promoveu efeito ateroprotetor e vasorelaxante (Amrani et al., 2009).

As análises de AOM por RMN e CLAE-EM mostraram que o ácido rosmarínico é principal constituinte desse extrato. A avaliação de extratos vegetais contendo

grandes quantidades dessa substância mostrou atividade hipotensora, anti-hipertensiva e vasorelaxante (Ersoy et al., 2008; Mihailovic-Stanojevic et al., 2013). Esses estudos corroboram com os resultados obtidos pela análise hemodinâmica de AOM, sugerindo que o ácido rosmarínico possua participação nos efeitos observados.

5.4.4. INVESTIGAÇÃO DE AOM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

De maneira semelhante à AFM, o extrato AOM também não causou efeitos adversos aos animais, mas causou prejuízo na coordenadora motora dos mesmos. Em todos os intervalos analisados, o extrato diminuiu de maneira significativa o tempo de permanência na barra em comparação com o controle ($p < 0,001$ para 15, 30, 60 e 90 min; $p < 0,05$ para 120 min). Nesse teste foi observado um aumento gradual na permanência dos animais na barra no decorrer das análises, de modo que 15 min após a administração do extrato o tempo médio foi de $132,7 \pm 2,1$ s, enquanto que ao término da análise o tempo foi de $174,1 \pm 0,8$ s. Em comparação com o diazepam observou-se que o extrato gerou efeitos equivalentes nos intervalos de 15, 30 e 90 min, tendo apresentado efeito significativamente menor em 60 min ($p < 0,001$). Por outro lado, o extrato continuou apresentando efeito significativo em 120 min, o que não foi observado para o diazepam (**Figura 61**).

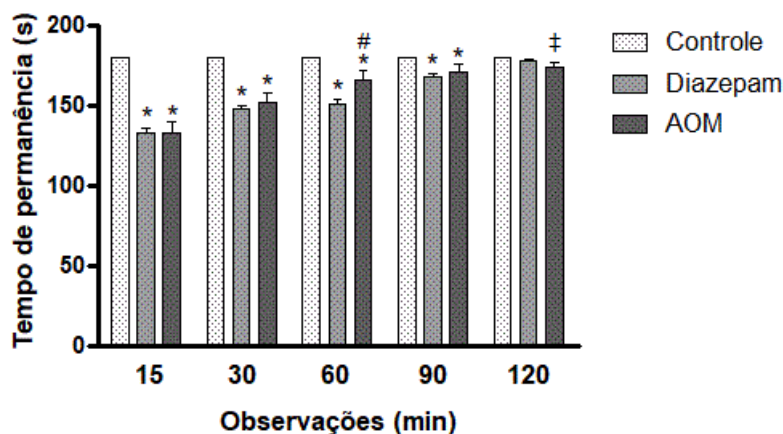


Figura 61: Resultados da avaliação de AOM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,001$, ‡ - $p < 0,05$; e para o diazepam: # - $p < 0,001$.

A investigação do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. basilicum* pelo teste RotaRod revelou que o extrato aumentou o tempo de permanência na barra em comparação com o controle, sugerindo que o mesmo seja capaz de melhorar a coordenação neuromuscular dos animais na dose de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. A avaliação

comportamental pelo teste do campo aberto mostrou resultado semelhante, tendo sido observado melhora na atividade locomotora e exploratória dos animais (Zahra, Khan, & Iqbal, 2015). Esse dado se mostra contrário aos resultados observados para AOM, onde foi evidenciado prejuízo na atividade motora dos animais. Essa divergência nos resultados pode ser atribuída ao método de extração e diferenças nos parâmetros de avaliação pelo ensaio RotaRod.

5.5. *Lippia alba* (Erva-cidreira)

5.5.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.5.1.1. Extratos em clorofórmio (FLC e FLC-R)

Tal como nas análises dos extratos do manjeriço (AOC e AOC-R), apenas sinais característicos de ácidos graxos saturados, insaturados e esteroides foram evidenciados em FLC e FLC-R (**Tabela A1 – Apêndice 1**).

As principais evidências observadas para os ácidos graxos saturados foram a presença dos sinais em 0,88 ppm e em 1,30 ppm, referentes a metila terminal e os carbonos metilênicos em cadeia. De maneira semelhante, foram observados os sinais referentes à metila terminal e a sequência de carbonos metilênicos de ácidos graxos insaturados em 0,97 ppm e em 1,26-1,27 ppm, respectivamente. Não obstante, a presença de sinais em 0,79 ppm, 0,85 ppm e 0,89 ppm em ambos os espectros de RMN ^1H indicam a presença de esteroides nesses extratos (**Tabela A2 – Apêndice 1**).

Os espectros de RMN ^1H da erva-cidreira (FLC e FLC-R) apresentaram diferenças significativas. O extrato FLC-R apresentou uma menor quantidade de sinais e com menor intensidade do que os de FLC (**Figura 62**). Embora a homogeneização do material tenha resultado em partículas de mesmo tamanho, o menor tempo de extração pode ter resultado num extrato menos concentrado. Por outro lado, as classes de substâncias evidenciadas em FLC também foram observadas em FLC-R, demonstrando que apesar da extração ter sido menos efetiva, esta possibilitou a identificação dos constituintes.

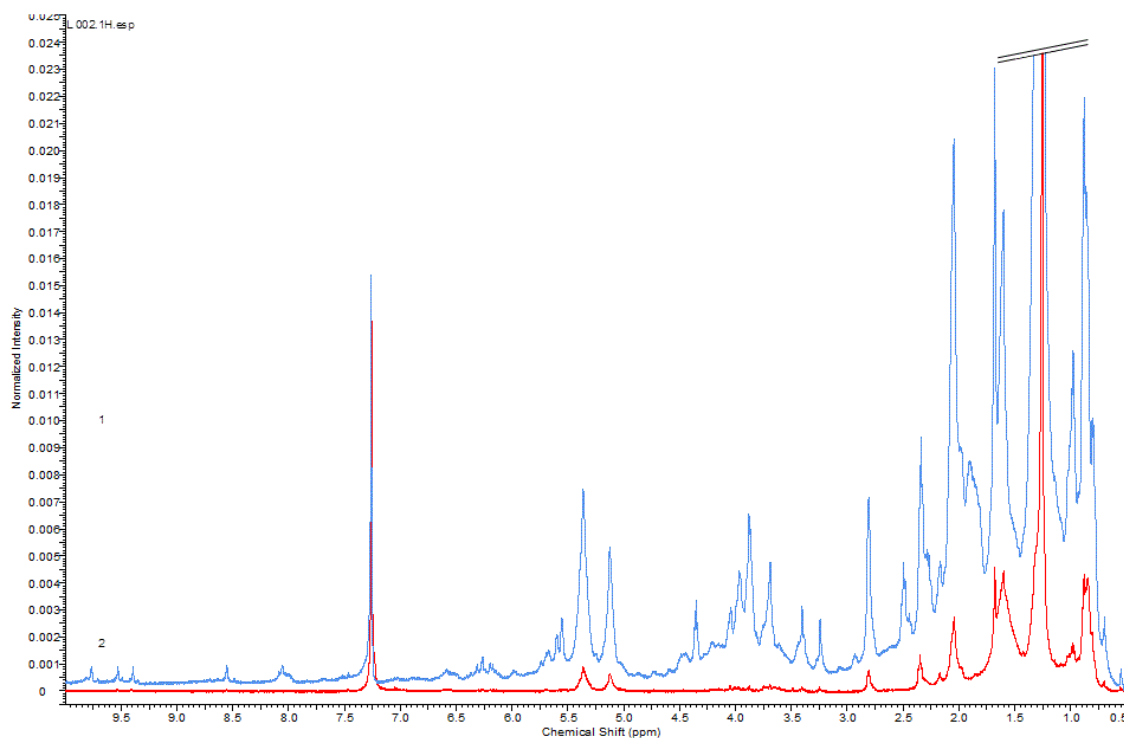


Figura 62: Comparativo dos espectros em CDCl_3 de FLC (azul) e FLC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

5.5.1.2. Extratos em metanol (FLM e FLM-R)

Os espectros de RMN ^1H de FLM e FLM-R revelaram a presença de açúcares livres, aminoácidos, substâncias nitrogenadas, ácidos graxos insaturados e feniletanoides (**Tabela A3 – Apêndice 1**). Nesses extratos foi possível identificar o acteosideo e o isoacteosideo, além de outros sinais característicos que sugerem a presença de outros feniletanoides.

As evidências espectrais observadas para os metabólitos primários identificados em FLM e FLM-R se mostram de acordo com as descritas anteriormente para os demais extratos metanólicos (**Tabela A4 e Tabela A5 – Apêndice 1**). No extrato FLM foram identificados α -glicose, β -glicose, alanina, colina, ácidos graxos insaturados, acteosideo, isoacteosideo e outros sinais referentes à feniletanoides. Já no extrato FLM-R foram identificadas as mesmas substâncias, exceto a alanina.

Nos extratos da erva-cidreira (FLM e FLM-R) foi identificado o feniletanoide acteosideo. No espectro de RMN ^1H de ambos os extratos foram observados dois duplos dupletos em 6,95 ppm (8,0 Hz e 1,9 Hz) e em 6,56 ppm referentes aos $\text{H6}'''$ e H6 , que sugerem a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituído. Os demais sinais aromáticos referente aos H2 , H5 e $\text{H2}'''$ e $\text{H5}'''$ foram observados em 6,70 ppm (d, 1,8 Hz), 6,68 ppm (d, 8,0 Hz), 7,05 ppm (d, 1,8 Hz) e 6,78 ppm (d, 8,0 Hz), respectivamente. A presença de dois sinais de olefinas em 7,59 ppm (d, 15,8 Hz) e em

6,27 ppm (d, 15,8 Hz) são condizentes com os H7''' e H8''' da porção cinâmica (ácido cafeico) da molécula (**Figura 63**). Outros três sinais referentes aos átomos de hidrogênio metilênicos H7, H8a e H8b em 2,80 ppm (m), 3,72 ppm (m) e em 4,04 ppm (m) sugerem a presença do feniletanoide (3,4-dihidroxi-feniletanol). Foram observados ainda dois sinais anoméricos em 4,38 ppm (d, 7,9 Hz) e em 5,18 ppm (d, 1,5 Hz) que sugerem a presença de duas unidades glicosídicas (**Figura 64**). O mapa de correlação HSQC revelou a presença de sinais característicos de glicose e ramnose. Foram observados dois sinais de átomos de hidrogênio metilênicos em 3,62 ppm (m) e em 3,53 ppm (m) que acoplam com o carbono em 62,4 ppm, tal como descrito para H6' da glicose. Ainda, foi observado um sinal em 1,09 ppm (d, 6,2 Hz) acoplando com o carbono em 18,5 ppm, o que se mostra característico dos átomos de hidrogênio metílico H6'' da ramnose (**Figura 65**). O mapa de correlação HMBC apresentou acoplamentos chave que possibilitaram a determinação completa da estrutura. Foi observado que os três substituintes se ligam à glicose em diferentes posições. O acoplamento $^3J_{CH}$ entre os hidrogênios em 3,72 ppm (m) e em 4,04 ppm (m) com o carbono em 104,1 ppm (C1') sugere o feniletanoide (3,4-dihidroxi-feniletanol) na posição 1 da glicose. O hidrogênio anomérico da ramnose em 5,18 ppm (d, 1,5 Hz) apresentou acoplamento $^3J_{CH}$ com o carbono em 81,6 ppm (C3') da glicose, evidenciando este substituinte na posição 3. Por fim, o sinal do H4' da glicose em 4,92 ppm (t, 9,5 Hz) apresentou acoplamento $^3J_{CH}$ com a carbonila do ácido cafeico em 168,3 ppm (C9'''), evidenciando-o como substituinte na posição 4 (**Figura 66**). A **Tabela 26** apresenta os dados espectrais do acteosídeo observados em FLM e FLM-R e a comparação com dados da literatura.

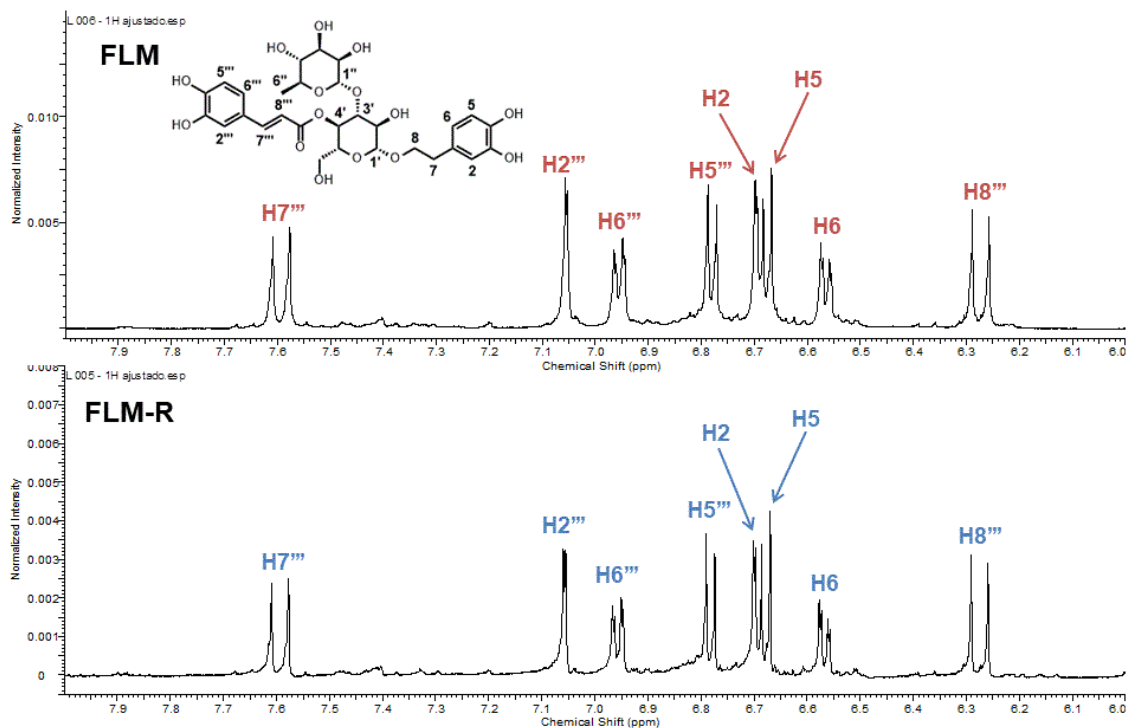


Figura 63: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais referente ao acteosídeo.

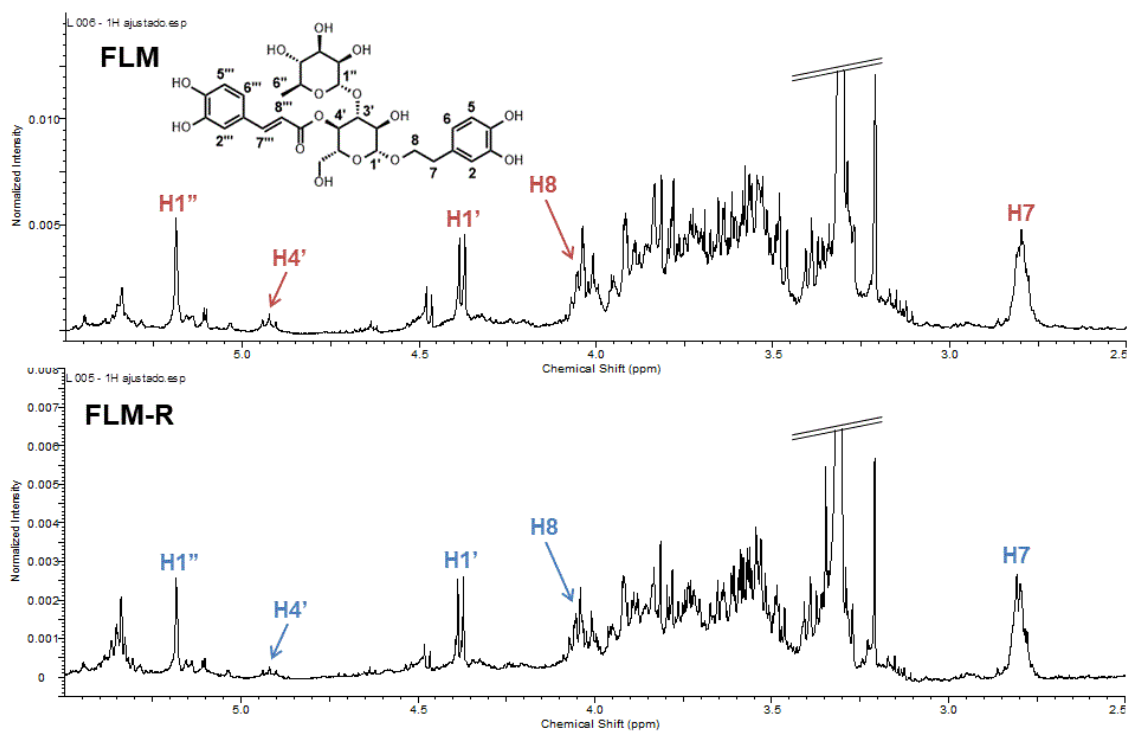


Figura 64: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD₃OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais referente ao acteosídeo.

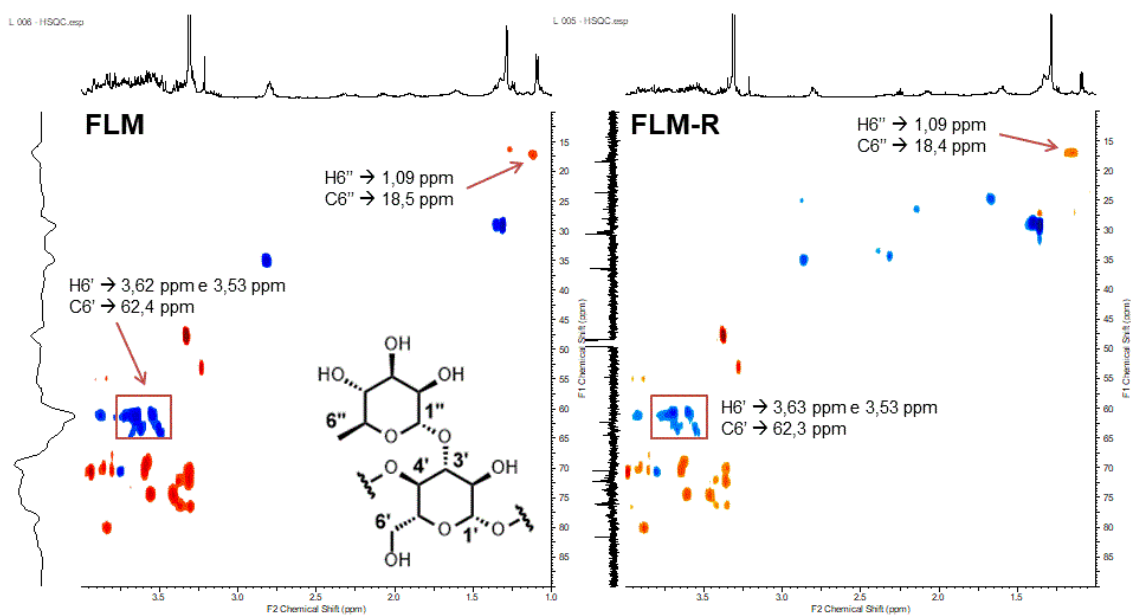


Figura 65: Ampliações dos espectros HSQC de FLM e FLM-R demonstrando a presença de sinais característicos de glicose e ramosa.

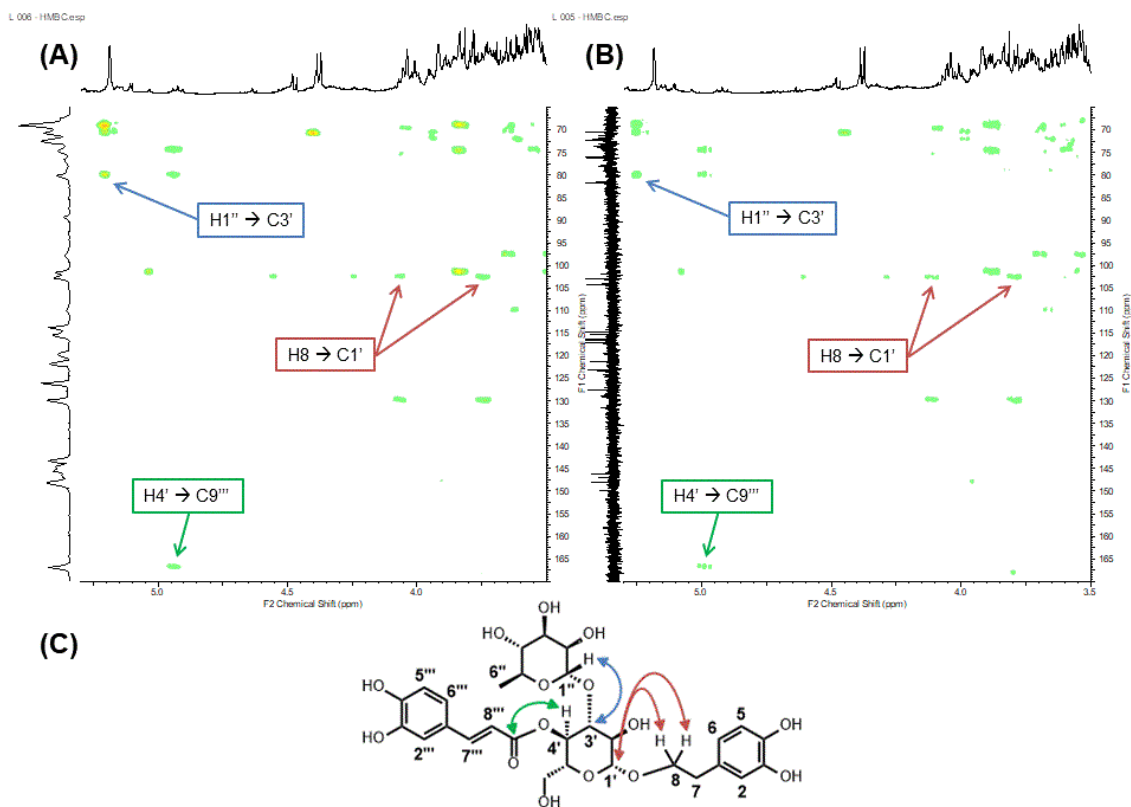


Figura 66: Ampliações dos espectros HMBC de FLM (A) e FLM-R (B) demonstrando correlações chave (C) observadas para o acteosideo.

Tabela 26: Deslocamentos químicos do acteosideo identificado nos extratos FLM e FLM-R, e comparação com dados da literatura.

N	FLM			FLM-R			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
1	-	131,4	-	-	131,4	-	-	131,5
2	6,70 d 1,8	116,9	36,5; 121,1; 144,6	6,70 d 1,9	117,1	36,5; 121,3; 144,7	6,69 d	116,3
3	-	146,0	-	-	146,1	-	-	146,1
4	-	144,6	-	-	144,7	-	-	144,6
5	6,68 d 8,0	116,3	131,4; 146,0	6,68 d 7,9	116,3	131,4; 146,1	6,67 d	117,1
6	6,56 dd 7,9 e 1,9	121,1	36,5; 116,9; 144,6	6,57 dd 8,0 e 1,9	121,3	36,5; 117,1; 144,7	6,56 dd	121,2
7	2,80 m	36,5	72,2; 116,9; 121,1; 131,4	2,80 m	36,5	72,3; 117,1; 121,3; 131,4	2,79 t	36,5
8	3,72 m 4,04 m	72,2	36,5; 104,1; 131,4	3,72 m 4,04 m	72,3	36,5; 104,1; 131,4	3,72 m 4,05 m	72,0
1'	4,38 d 7,9	104,1	72,2	4,38 d 7,9	104,1	72,3	4,37 d	104,2
2'	3,39 m	76,2	81,6; 104,1	3,39 m	76,2	81,6; 104,1	3,39 t	76,2
3'	3,81 t	81,6	70,4; 76,2; 102,9	3,81 t	81,6	70,5; 76,2; 103,0	3,81 t	81,6
4'	4,92 t 9,5	70,4	62,4; 76,0; 81,6; 168,4	4,92 t 9,5	70,5	62,3; 76,0; 81,6; 168,3	4,95	70,6
5'	3,53 m	76,0	-	3,53 m	76,0	-	~3,57	76,0
6'	3,62 m 3,53 m	62,4	- -	3,63 m 3,53 m	62,3	- -	3,53 - 3,61	62,3
1''	5,19 d 1,6	102,9	70,4; 72,2; 81,6	5,18 d 1,5	103,0	70,4; 72,3; 81,6	5,18 d	103,0
2''	3,91 m	72,3	72,2; 73,7	3,91 m	72,3	72,2; 73,8	3,91 d	72,3
3''	-	72,2	-	-	72,2	-	~3,57	72,2
4''	3,29 m	73,7	18,5; 70,4; 72,2	3,28 m	73,8	18,4; 70,4; 72,2	3,28 t	73,8
5''	-	70,4	-	-	70,4	-	~3,57	70,4
6''	1,09 d 6,2	18,5	70,4; 73,7	1,09 d 6,2	18,4	70,4; 73,8	1,09 d	18,4
1'''	-	127,6	-	-	127,6	-	-	127,6
2'''	7,05 d 1,8	115,1	123,1; 146,9; 149,8	7,06 d 1,9	115,2	123,2; 146,8; 148,0; 149,8	7,05 d	115,2
3'''	-	146,9	-	-	146,8	-	-	146,8
4'''	-	149,8	-	-	149,8	-	-	149,7
5'''	6,78 d 8,0	116,3	127,6; 146,9; 149,8	6,78 d 8,0	116,5	127,6; 146,8; 149,8	6,77 d	116,5
6'''	6,95 dd 8,2 e 2,1	123,1	115,1; 147,8; 149,8	6,96 dd 8,0 e 1,9	123,2	115,2; 148,0; 149,8	6,95 dd	123,2
7'''	7,59 d 15,8	147,8	115,1; 123,1; 168,4	7,59 d 15,8	148,0	115,2; 123,2; 168,3	7,59 d	148,0
8'''	6,27 d 15,8	114,6	127,6; 168,4	6,28 d 15,8	114,6	127,6; 168,3	6,27 d	114,7
9'''	-	168,4	-	-	168,3	-	-	168,3

*Froelich et al., 2008; Wu et al., 2004

Foi observado nos espectros de FLM e FLM-R alguns sinais que sugerem a presença de outros feniletanoides. Embora tenham apresentado abundância significativamente menor do que o acteosideo, esses sinais sugerem pelo menos outros três componentes. O isoacteosideo, um isômero estrutural do acteosideo, foi evidenciado pela presença de um sinal duplo em 1,25 ppm (6,1 Hz) referente aos H6'' da ramnose que se apresenta mais desblindado em comparação ao sinal do acteosideo. A posição em que o ácido cafeico se encontra ligado na glicose (posição 4 ou 6) interfere no deslocamento químico dos H6'' da ramnose (Liu et al., 2019). Além disso, o mapa de correlação HSQC revelou dois sinais de hidrogênios metilênicos em 4,49 ppm (m) e em 4,34 ppm (m) que se ligam ao carbono em 64,5 ppm, e se mostram característicos do H6' de glicose (**Figura 67**). Estes sinais mais desblindados corroboram a presença do isoacteosideo uma vez que a ligação do ácido cafeico na posição 6 da glicose exerce efeito desprotetor sobre os hidrogênios da mesma (Froelich et al., 2008). A **Tabela 27** mostra as evidências observadas para o isoacteosideo e a comparação com dados da literatura.

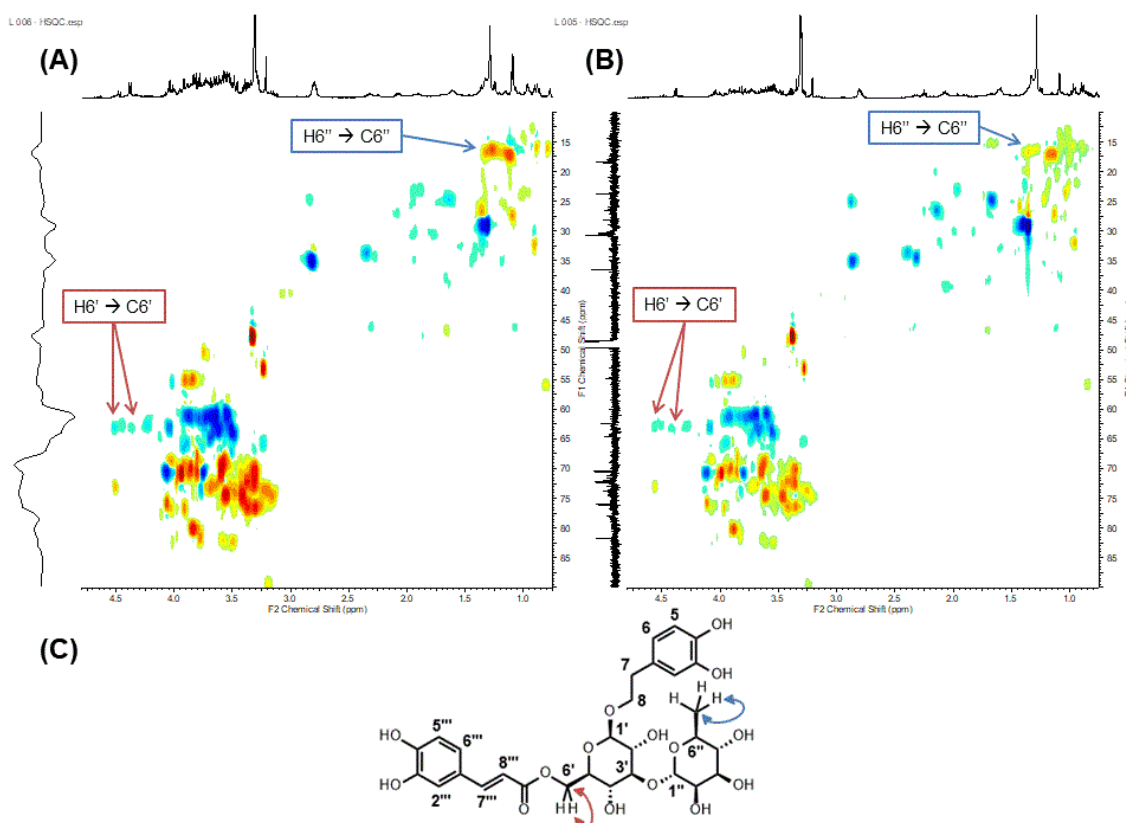


Figura 67: Ampliações dos espectros HSQC de FLM (A) e FLM-R (B) demonstrando as correlações observadas para o isoacteosideo (C).

Tabela 27: Deslocamentos químicos do isoacteosídeo observado nos extratos FLM e FLM-R, e comparação com dados da literatura.

N	FLM			FLM-R			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
6'	4,34 m 4,49 m	64,5	-	4,35 m 4,50 m	64,5	-	4,34 dd 4,49 dd	64,6
4''	-	73,8	-	-	73,8	-	-	73,9
5''	-	69,7	-	-	69,8	-	-	70,0
6''	1,24 d 6,1	17,8	69,7; 73,8	1,25 d 6,2	17,8	69,8; 73,8	1,24 d	17,8

*Frøelich et al., 2008; Wu et al., 2004

Outros sinais foram observados na região aromática sugerindo a presença de mais dois feniletanoides. Segundo Pan e colaboradores (2015) alguns feniletanoides triglicosilados, tal como o forsitosídeo B, apresentam o sinal de H8'''' da porção cinâmica levemente deslocados em relação ao mesmo sinal do acteosídeo. Assim, é possível observar a presença de um sinal duplo de menor intensidade em 6,29 ppm (15,8 Hz) bem próximo ao sinal do acteosídeo em 6,27 ppm (**Figura 68**).

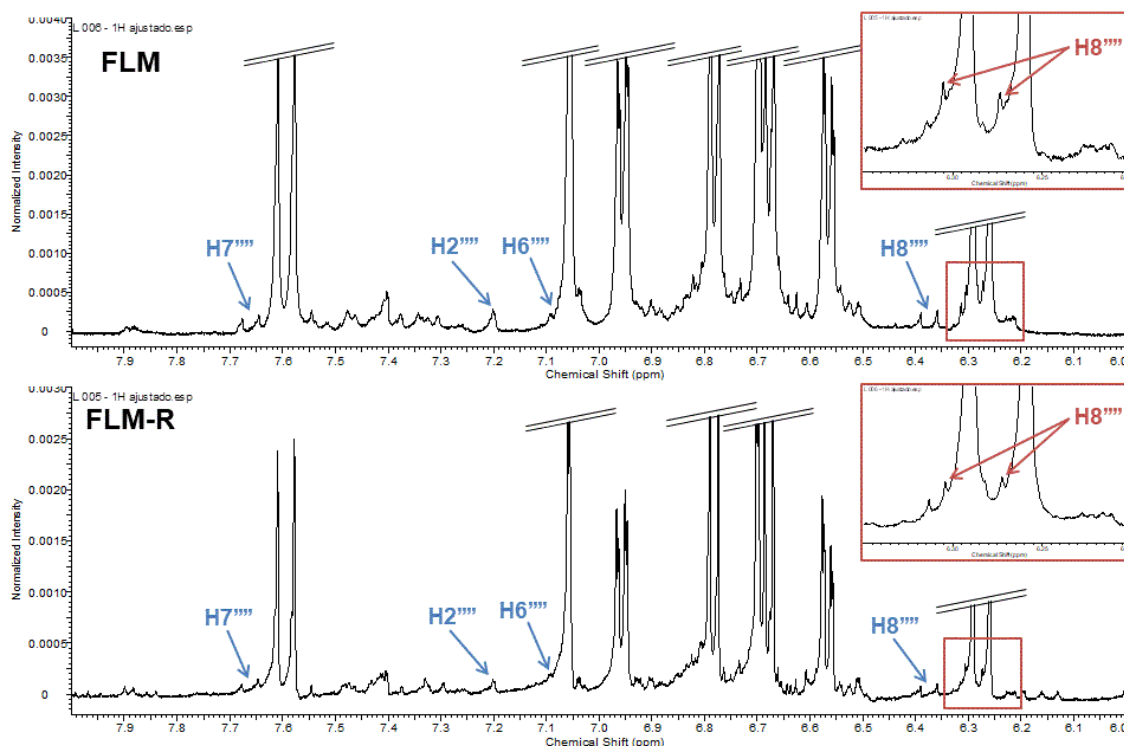
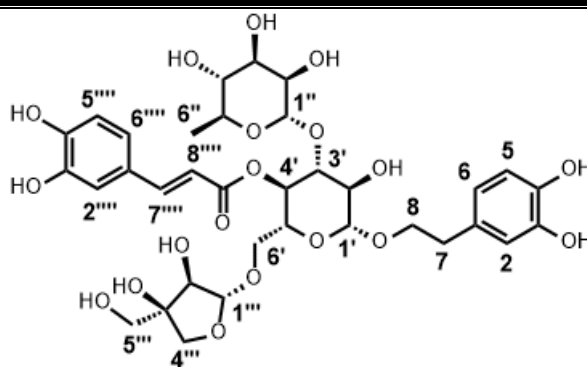


Figura 68: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de FLM e FLM-R demonstrando os sinais de um feniletanoide triglicosilado (vermelho) e de um feniletanoide com substituinte ferúlico (azul).

Entretanto, como apenas um sinal foi observado para o forsitósídeo B não foi possível assegurar sua presença nos extratos metanólicos da erva-cidreira. Por outro lado, considerando o estudo de Pan e colaboradores (2015) que relaciona essa característica a presença de feniletanoides triglicosilados, é possível sugerir a ocorrência de outros constituintes pertencentes a essa classe em FLM e FLM-R (**Tabela 28**).

Tabela 28: Deslocamento químico de um feniletanoide triglicosilado observado nos extratos FLM e FLM-R. O forsitósídeo B foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.

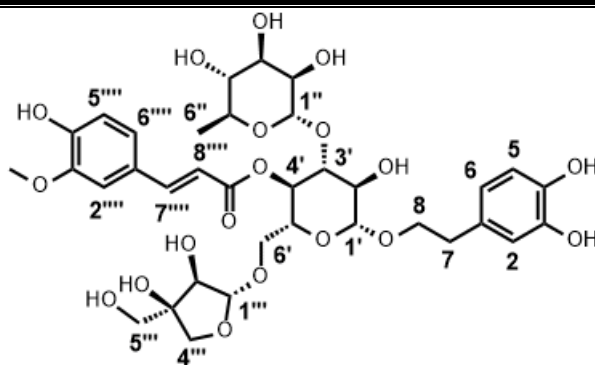


N	FLM		FLM-R		Referência	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
8''''	6,29 d 15,8	-	6,29 d 15,8	-	6,29 d	-

*Pan et al., 2015

Foram observados ainda dois sinais de olefinas em 7,66 ppm (d, 15,8 Hz) e em 6,38 ppm (d, 15,7 Hz) sugerindo a presença de outro derivado cinâmico. Os mapas de correlação HSQC e HMBC revelaram um sinal de metoxila em 3,89 ppm (m) que se liga ao carbono em 56,7 ppm, e apresenta acoplamento $^3J_{CH}$ com o carbono em 149,1 ppm, condizente com C3 do ácido ferúlico. Os demais sinais de hidrogênio referentes à H2'''' e H6'''' foram observados em 7,20 ppm (d, 2,1 Hz) e em 7,08 ppm (m), respectivamente, confirmando a presença de uma unidade cinâmica (ácido ferúlico) (**Figura 68**). Segundo Çaliş e colaboradores (1992), essas evidências estão de acordo com feniletanoides com substituintes ferúlicos, tal como o alissonosídeo. Novamente, por conta da pouca quantidade de sinais detectados, não foi possível determinar a estrutura desse quarto constituinte, embora seja possível supor a presença de feniletanoides substituídos com unidades ferúlicas (**Tabela 29**).

Tabela 29: Deslocamentos químicos de um feniletanoide com substituinte ferúlico observado nos extratos FLM e FLM-R. O alissonosídeo foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.



N	FLM		FLM-R		Referência	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
2''''	7,20 d 2,1	111,8	7,20 m	111,7	7,20 d	111,9
3''''	-	149,1	-	149,4	-	149,3
6''''	7,08 m	124,7	7,08 m	124,9	7,08 dd	124,3
7''''	7,66 d 15,8	-	7,66 d 15,7	146,7	7,65 d	147,9
8''''	6,38 d 15,7	-	6,38 d 15,5	115,0	6,37 d	115,2
3-O-CH ₃	3,89 m	56,7	3,89 m	56,5	3,88 s	56,5

*Çaliş et al., 1992

O acteosídeo é um feniletanoide glicosilado que possui ampla ocorrência no reino vegetal, tendo sido descrito em mais de 150 espécies e 25 famílias. Possui destaque especial nas plantas da ordem Lamiales compreendendo 18 famílias, entre elas a Verbenaceae (Alipieva et al., 2014; He et al., 2011). Estudos químicos conduzidos com as espécies do gênero *Lippia* revelaram a presença do acteosídeo em *L. alba*, *L. citriodora*, *L. nodiflora*, *L. origanoides*, *L. triphylla*, dentre outras (Cádiz-Gurrea et al., 2018; Cheng, Murugaiyah, & Chan, 2015; Hennebelle et al., 2006; Leitão et al., 2017; Zhang et al., 2015). Na erva-cidreira (*L. alba*) esta substância tem sido frequentemente encontrada e, devido ao seu caráter majoritário, associada como principal componente ativo desta planta (Hennebelle et al., 2008). Um estudo recente demonstrou que a quantidade desta substância em *L. alba* variou de acordo com o quimiotipo e a forma de extração utilizada. Ainda assim, os autores observaram grandes quantidades desse componente em suas análises (Timóteo et al., 2015). O caráter majoritário dessa substância nos extratos FLM e FLM-R foi evidenciado pela clareza e abundância dos sinais observados nos espectros de RMN ¹H, HSQC e HMBC.

Ademais, diversos outros feniletanoides já foram descritos em espécies do gênero *Lippia*. Num estudo fitoquímico conduzido com os extratos das folhas de *L. alba* foram isolados alguns feniletanoides, incluindo o isoacteosideo e forsitosídeo B (Hennebelle et al., 2006). O isoacteosideo é geralmente detectado em plantas que produzem o acteosideo, assim como o forsitosídeo B que diferencia do acteosideo pela adição de uma apiose na posição 6 da glicose (Timóteo et al., 2015). Embora o alissonosídeo não tenha sido descrito em *L. alba*, a ocorrência desta substância em outras espécies do gênero é conhecida (C S Funari et al., 2012). Além disso, é descrito para *L. alba* a capacidade de produzir feniletanoides tendo o ácido ferulico como substituinte na posição 4 da glicose, tal como o leucosceptosídeo A e o martinossídeo (Timóteo et al., 2015).

A análise do espectro de RMN ^1H de FLM-R revelou pequenas diferenças em relação ao espectro de FLM. Foi observado um elevado grau de semelhança entre ambos os espectros, tendo sido evidenciada diferenças nas intensidades dos sinais. Em FLM-R observou-se que os sinais referentes às substâncias graxas apresentaram maior intensidade, acompanhando a tendência descrita para AAM-R, ACM-R e AOM-R. Além disso, FLM-R apresentou sinais na região de açúcares e de aromáticos em menor abundância do que em FLM (**Figura 69**). Por outro lado, diversos sinais referentes ao acteosideo foram observados em ambos os espectros, além dos sinais do isoacteosideo e demais sinais de feniletanoides. Assim, a utilização desta metodologia pode ser útil na determinação rápida dessas substâncias, especialmente do acteosideo, em amostras de plantas produtoras de feniletanoides.

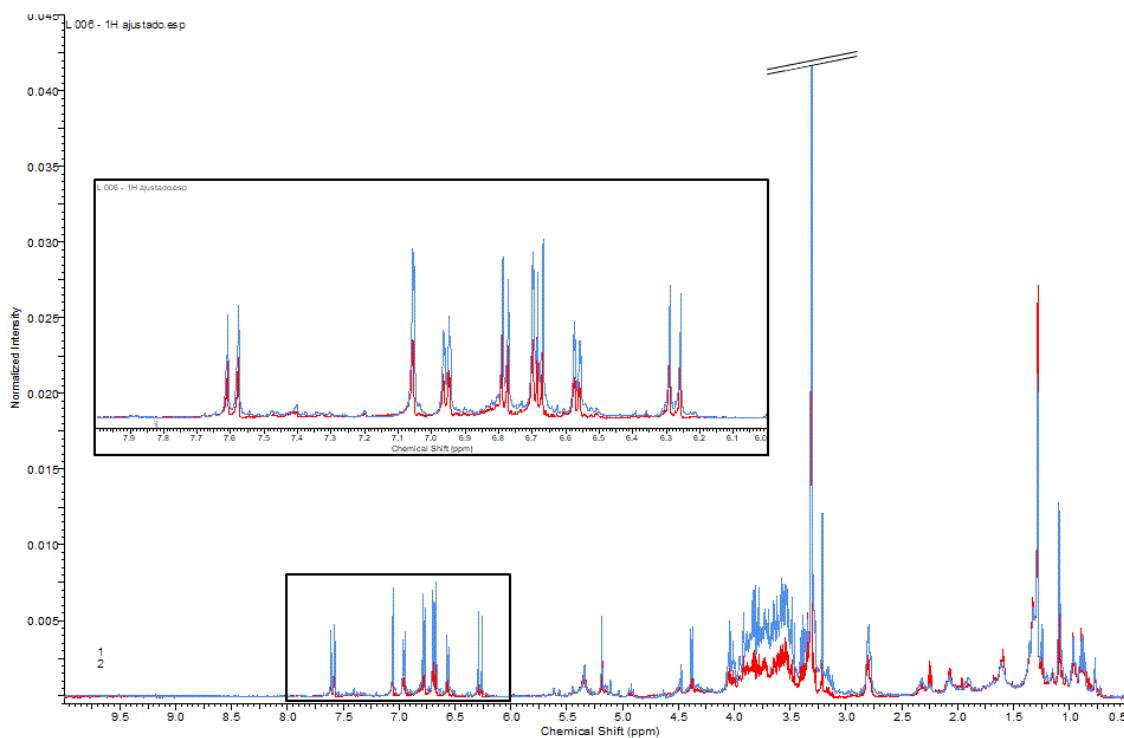


Figura 69: Comparativo dos espectros em CD_3OD de FLM (azul) e FLM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

Novamente as diferenças observadas na concentração do componente majoritário (acteosideo) possivelmente estão relacionadas ao processo de extração, tal como descrito anteriormente para AOM e AOM-R. É plausível supor que o menor tempo de contato entre o solvente e a planta na extração rápida acarretou em uma menor quantidade de acteosideo em FLM-R. Embora a extração rápida seja assistida por agitação e ultrassom, que auxiliam na obtenção de maiores quantidades de substâncias, não se pode descartar a possibilidade de saturação do solvente deuterado, uma vez que o acteosideo ocorre em grandes quantidades nessa planta. Desta forma, repetidas extrações, tal como realizado para FLM, podem ter permitido o acúmulo de maiores quantidade deste componente.

5.5.1.3. Quantificação de acteosideo em FLM

Uma nova análise do extrato FLM contendo quantidades conhecidas de um padrão interno possibilitaram a quantificação do acteosideo nessa amostra. O espectro de RMN ^1H de FLM também apresentou perfil metabólico semelhante aos demais espectros da erva-cidreira demonstrados anteriormente. Os sinais referentes ao acteosideo foram facilmente detectados, de modo que cinco sinais foram selecionados para a análise quantitativa (**Figura 70**). Esses são referentes aos átomos de hidrogênio metilênico H7, o sinal anomérico H1', os sinais aromáticos H2''' e H6''' e o

sinal olefínico H7'''. Os valores das integrais dos sinais metínicos variaram entre 2,85 e 3,05, enquanto o sinal metilênico apresentou valor de integral de 6,00. Os resultados obtidos pela quantificação desses sinais variaram entre 279,32 mg/g e 298,92 mg/g, tendo sido obtido um valor médio de $292,85 \pm 3,47$ mg de acteosideo por grama de extrato FLM (**Tabela 30**).

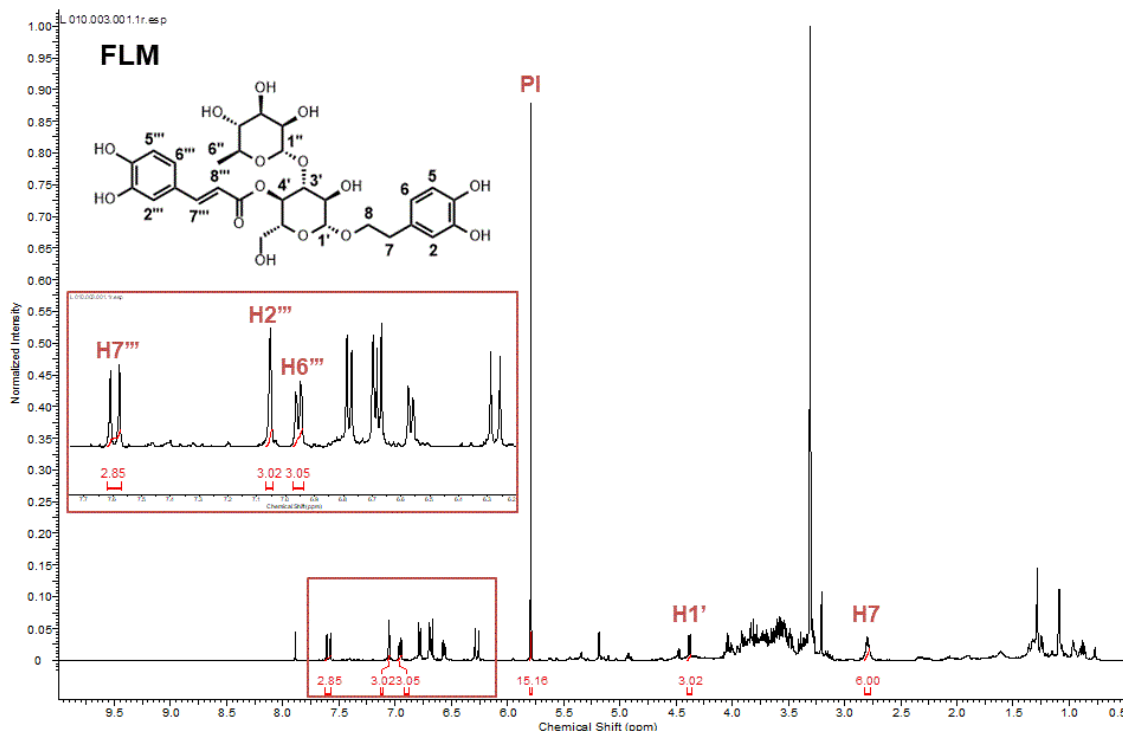


Figura 70: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD_3OD de FLM demonstrando os sinais e integrações do acteosideo e do padrão interno (PI).

Tabela 30: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosideo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.

	Acteosideo					Média \pm erro
	H7	H1'	H2'''	H6'''	H7'''	
Integração	6,00	3,02	3,02	3,05	2,85	-
Quantificação (mg/g)	294,02	295,98	295,98	298,92	279,32	$292,85 \pm 3,47$

Estudos preliminares descrevem a ocorrência de grandes quantidades de acteosideo na erva-cidreira. A quantificação dessa substância por HPLC foi realizada em diferentes extratos de quimiotipos de *L. alba*, onde foi verificado que o teor de acteosideo nas infusões das folhas variou entre 18 e 51 mg/g de extrato seco, enquanto que nos decoctos o teor variou entre 96 e 135 mg/g de extrato seco

(Timóteo et al., 2015). Embora os resultados observados para FLM sejam maiores que os descritos no estudo de Timóteo e colaboradores (2015), deve-se considerar as diferenças no processo de extração. Além disso, deve-se considerar que variações sazonais podem alterar de maneira significativa a quantidade dos metabólitos presente em uma amostra.

5.5.2. INVESTIGAÇÃO DE FLM POR CLAE-EM

A análise de FLM por CLAE-EM revelou a presença de diversos picos distribuídos por todo o cromatograma, sendo observados dois sinais majoritários, o primeiro em 40,3 minutos e o segundo, mais intenso e largo, no tempo de 43,4 min. A análise dos espectros de fragmentação dos mesmos permitiu identifica-los como feniletanoides. O cromatograma de FLM apresentou ainda diversos outros sinais de menor intensidade que foram devidamente identificados com base nos perfis de fragmentação apresentados (**Figura 71**).

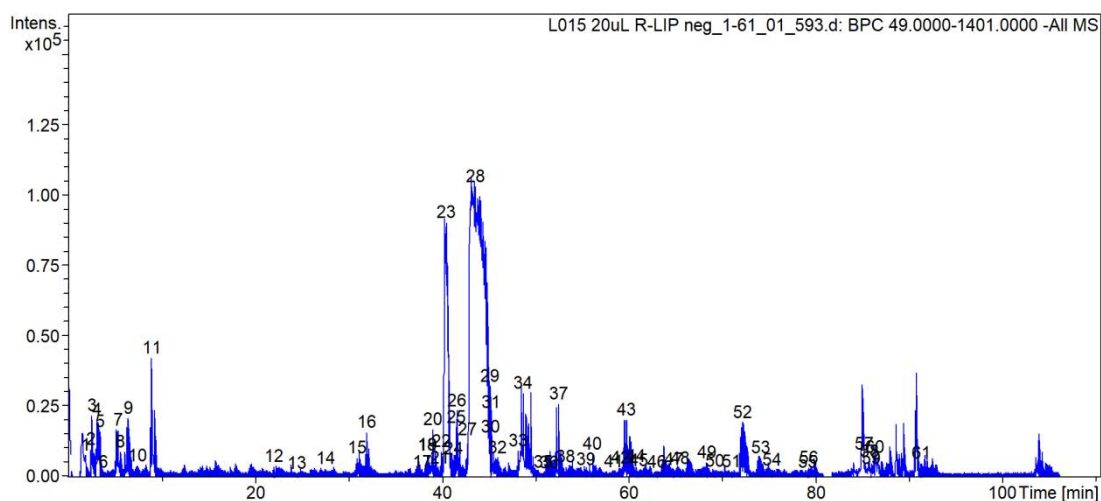


Figura 71: Cromatograma do pico base (BPC) de FLM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.

A análise permitiu identificar 61 substâncias em FLM, pertencendo à classe dos aminoácidos e seus derivados, dos iridoides, dos feniletanoides, dos derivados cinâmicos, dos flavonoides e dos terpenos. Os dados cromatográficos e espectrais das substâncias identificadas são descritos na **Tabela 31**.

Tabela 31: Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	1,8	268,1029 [M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268,1040 [M+H] ⁺	-4,10	136	Adenosina	[1]
2	2,4	164,0709 [M-H] ⁻ 166,0846 [M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164,0717 [M-H] ⁻ 166,0862 [M+H] ⁺	-4,87 -9,63	- 120 ; 103	Fenilalanina	[2]
3	2,5	389,1092 [M-H] ⁻ 425,0864 [M+Cl] ⁻ 779,2234 [2M-H] ⁻ 413,1040 [M+Na] ⁺ 781,2340 [2M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389,1089 [M-H] ⁻ 413,1054 [M+Na] ⁺	0,77 -3,38	321; 191; 165; 147 ; 121 191; 165; 147 ; 121 389 ; 227; 209; 191; 165; 147; 121 215; 185; 175 ; 147; 127 231; 211; 193 ; 175; 165; 147	Tevesídeo	[3]
4	3,1	391,1242 [M-H] ⁻ 783,2559 [2M-H] ⁻ 785,2704 [2M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	391,1245 [M-H] ⁻ 785,2710 [2M+H] ⁺	-0,76 -0,76	229; 211; 167; 149 ; 121 391 ; 229 231; 213; 195 ; 177; 167; 149	Shanzhisídeo	[4,5]
5	3,3	373,1139 [M-H] ⁻ 409,0841 [M+Cl] ⁻ 419,1226 [M+FA-H] ⁻ 747,2325 [2M-H] ⁻ 397,1101 [M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373,1140 [M-H] ⁻ 397,1105 [M+Na] ⁺	-0,26 -1,00	149 ; 123 149 211; 193; 167; 149 ; 123 373; 211 ; 167; 149; 123 397 ; 149	Ácido geniposídico	[3,5]
6	3,7	203,0851 [M-H] ⁻ 205,0972 [M+H] ⁺ 188,0708 [M+H-NH ₃] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203,0826 [M-H] ⁻ 205,0971 [M+H] ⁺	12,31 0,48	118 - -	Triptofano	[2]
7	5,2	461,1663 [M-H] ⁻ 923,3421 [2M-H] ⁻ 463,1806 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	461,1664 [M-H] ⁻ 463,1810 [M+H] ⁺	-0,21 -0,86	461; 315; 297; 135 461 179; 137; 129	Verbasosídeo	[1,6]
8	5,5	447,1508 [M-H] ⁻ 449,1658 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₂	447,1508 [M-H] ⁻ 449,1653 [M+H] ⁺	0 1,11	447; 315; 135 -	Rebousídeo A ou B	[1]
9	6,5	487,1459 [M-H] ⁻ 975,2939 [2M-H] ⁻ 471,1495 [M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487,1457 [M-H] ⁻ 471,1497 [M+H-H ₂ O] ⁺	0,41 -0,42	179 ; 161; 135 487; 179 325; 163	Cistanosídeo F	[3,6]
10	7,3	449,1303 [M+FA-H] ⁻ 427,1194 [M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	449,1300 [M+FA-H] ⁻ 427,1210 [M+Na] ⁺	0,66 -3,74	143 427 ; 233; 189	Teveridosídeo	[7]

Tabela 31 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
11	8,9	451,1457 [M+FA-H]- 407,1527 [M+H]+ 813,2974 [2M+H]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	451,1457 [M+FA-H]- 407,1547 [M+H]+	0 -4,91	243 ; 225; 193; 167 209; 191; 177 ; 149; 121 389; 371; 339; 227; 209 ; 191; 149	Éster metílico do shanzhisídeo	[8]
12	21,9	435,1505 [M+FA-H]- 391,1592 [M+H]+ 413,1408 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	435,1508 [M+FA-H]- 391,1598 [M+H]+	-0,68 -1,53	227 211; 193; 179 ; 161; 151; 133; 123 413 ; 251; 147	Mussaenosídeo	[3]
13	24,4	593,1520 [M-H]- 595,1654 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	1,51 -0,50	593; 575; 503; 473; 383; 353 -	Vicenina-2	[9]
14	27,5	625,1778 [M-H]-	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₆	625,1774 [M-H]-	0,63	607; 445; 179; 161	β-hidroxi-calceolariosídeo C	[10]
15	30,9	639,1932 [M-H]- 663,1858 [M+Na]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	639,1930 [M-H]- 663,1895 [M+Na]+	0,31 -5,57	621; 459; 325; 179; 161 ; 151; 133 663 ; 325; 163	(R-S)-suspensasídeo (isômero)	[3,11]
16	31,9	639,1933 [M-H]- 663,1826 [M+Na]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	639,1930 [M-H]- 663,1895 [M+Na]+	0,46 -10,40	621; 487; 459; 179; 161 ; 151; 133 663 ; 325; 163	(R-S)-suspensasídeo (isômero)	[3,11]
17	37,9	785,2492 [M-H]-	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	785,2509 [M-H]-	-2,16	785; 769; 623; 179; 161	Equinacosídeo	[11]
18	38,4	461,0722 [M-H]- 923,1519 [2M-H]- 463,0828 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725 [M-H]- 463,0871 [M+H]+	-0,65 -9,28	285 461; 285 287	Luteolina-7-O-glicuronídeo	[3]
19	38,4	637,1776 [M-H]- 639,1904 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	637,1774 [M-H]- 639,1919 [M+H]+	0,31 -2,34	637; 623; 475 ; 329; 161 -	β-oxo-acteosídeo	[12]
20	39,0	447,0933 [M-H]- 895,1899 [2M-H]- 449,1046 [M+H]+ 897,1966 [2M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0932 [M-H]- 449,1078 [M+H]+	0,22 -7,12	447; 285 447 ; 285 287 449; 287	Luteolina-7-O-glicosídeo	[1]
21	39,7	477,1397 [M-H]- 479,1529 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477,1402 [M-H]- 479,1547 [M+H]+	-1,04 -3,75	477; 315; 179; 161 325; 163	Calceolariosídeo A	[1]
22	39,9	741,2244 [M-H]- 765,2200 [M+Na]+	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉	741,2247 [M-H]- 765,2212 [M+Na]+	-0,40 -1,56	741; 579; 447; 161 -	Parabosídeo A ou isômero	[13]

Tabela 31 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
23	40,4	609,1825 [M-H]- 645,1535 [M+Cl]- 914,2740 [3M-2H]2- 1219,3748 [2M-H]- 633,1743 [M+Na]+	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609,1824 [M-H]- 633,1789 [M+Na]+	0,16 -7,26	447; 315; 161 609; 447; 161 609 ; 447; 161 609 ; 447; 161 633 ; 325; 163	Calceolariosídeo C/E ou isonuomiosídeo	[3]
24	41,2	597,1817 [M-H]- 599,1958 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	597,1824 [M-H]- 599,1970 [M+H]+	-1,17 -2,00	477; 459; 417; 387 ; 357; 209 497; 479; 449; 419; 395 ; 341; 107	Floretina 3',5'-diglicosídeo	[14]
25	41,5	477,1036 [M-H]- 479,1179 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1038 [M-H]- 479,1184 [M+H]+	-0,41 -1,04	462; 315 ; 299 317 ; 163	Isoramnetina-O-glicosídeo	[15, 16]
26	41,6	653,2090 [M-H]- 677,2040 [M+Na]+	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	653,2087 [M-H]- 677,2052 [M+Na]+	0,45 -1,77	621; 459; 325; 179; 161 ; 151 -	Campneosídeo I	[6]
27	42,7	755,2405 [M-H]- 779,2372 [M+Na]+	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	755,2404 [M-H]- 779,2369 [M+Na]+	0,13 0,38	755; 593; 447; 161 -	Forsitosídeo B ou isômero	[11]
28	43,5	623,1973 [M-H]- 659,1669 [M+Cl]- 935,2938 [3M-2H]2- 1247,4057 [2M-H]- 625,2087 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]- 625,2126 [M+H]+	-1,28 -6,23	623; 461; 315; 161 623; 461; 161 623 ; 461; 161 623 ; 161 471; 325; 163	Acteosídeo	[3] RMN
29	45,2	445,0764 [M-H]- 447,0884 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445,0776 [M-H]- 447,0921 [M+H]+	-2,69 -8,27	269 271	Apigenina-7-O-glicuronídeo	[1]
30	45,2	431,0968 [M-H]- 433,1124 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0983 [M-H]- 433,1129 [M+H]+	-3,47 -1,15	431; 268 271	Apigenina-7-O-glicosídeo	[1]
31	45,2	623,1964 [M-H]- 1247,3997 [2M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]-	-2,72	623; 461; 315; 161 623 ; 461; 161	Isoacteosídeo ou isômero	[3]
32	45,9	755,2408 [M-H]- 779,2354 [M+Na]+	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	755,2404 [M-H]- 779,2369 [M+Na]+	0,52 -1,92	755; 593; 461; 161 -	Forsitosídeo B ou isômero	[11]

Tabela 31 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
33	48,1	593,1873 [M-H]- 617,1802 [M+Na]+	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	593,1875 [M-H]- 617,1840 [M+Na]+	-0,33 -6,15	447; 315; 161; 145 -	Feniletanoide 1 (isômero) (Ácido cumárico-glicosil-xilosil-dihidroxifeniletíl)	
34	48,7	623,1977 [M-H]- 1247,4232 [2M-H]- 625,2076 [M+H]+ 647,1856 [M+Na]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]- 625,2112 [M+H]+	-0,64 -7,99	623; 461; 315; 161 623 325; 307; 163 647 ; 332; 163	Forsitosídeo A	[11]
35	50,8	475,0875 [M-H]- 477,1004 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475,0882 [M-H]- 477,1027 [M+H]+	-1,47 -4,82	299 ; 284 301; 163	Crisoeriol-7-O-glicuronídeo	[16]
36	51,4	609,1829 [M-H]- 633,1721 [M+Na]+	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609,1824 [M-H]- 633,1789 [M+Na]+	0,80 -10,73	609; 447; 315; 161 633 ; 535; 325; 163	Calceolariosídeo C/E ou isonuomiosídeo	[3]
37	52,4	769,2561 [M-H]- 771,2716 [M+H]+	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	769,2560 [M-H]- 771,2706 [M+H]+	0,12 1,29	769; 607; 461; 161 -	Poliumosídeo ou Forsitosídeo G	[1]
38	53,2	593,1876 [M-H]-	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	593,1875 [M-H]-	0,16	447; 315; 145	Feniletanoide 1 (isômero) (Ácido cumárico-glicosil-xilosil-dihidroxifeniletíl)	
39	55,3	503,0836 [M-H]- 505,0978 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	503,0831 [M-H]- 505,0976 [M+H]+	0,99 0,39	329; 285 331; 287	Acetil-luteolina-7-O-glicuronídeo (isômero)	[15]
40	56,1	607,2028 [M-H]- 609,2174 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	607,2032 [M-H]- 609,2177 [M+H]+	-0,65 -0,49	609; 461; 315; 145 -	Lipedosídeo A (isômero)	[1, 10]
41	58,3	769,2559 [M-H]-	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	769,2560 [M-H]-	-0,12	769; 623; 607; 461; 161	Poliumosídeo ou Forsitosídeo G	[1]
42	59,1	577,1925 [M-H]-	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₃	577,1926 [M-H]-	-0,17	431; 145	Ovatosídeo F	[17]
43	59,7	637,2132 [M-H]- 1275,4279 [2M-H]- 639,2222 [M+H]+	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637,2137 [M-H]- 639,2283 [M+H]+	-0,78 -9,54	637; 461; 315; 175 637 ; 461; 175 339; 177	Leucosceptosídeo A ou isômero	[3]
44	60,7	487,0881 [M-H]- 489,0996 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	487,0882 [M-H]- 489,1027 [M+H]+	-0,20 -6,33	383; 311 ; 269 271	Acetil-apigenina-7-O-glicuronídeo (isômero)	[18]

Tabela 31 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
45	61,0	607,2031 [M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	607,2032 [M-H]-	-0,16	607; 461; 315; 145	Lipidosídeo A (isômero)	[1]
46	62,9	593,1873 [M-H]-	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	593,1875 [M-H]-	-0,33	447; 315; 145	Feniletanoide 1 (isômero) (Ácido cumárico-glicosil-xilosil-dihidroxifeniletil)	
47	64,7	517,0984 [M-H]- 519,1072 [M+H]+	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	517,0987 [M-H]- 519,1133 [M+H]+	-0,58 -11,75	413 ; 398; 341; 299 301	Acetil-crisoeriol-7-O-glicuronídeo (isômero)	[16]
48	65,4	487,0879 [M-H]- 489,0994 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	487,0882 [M-H]- 489,1027 [M+H]+	-0,61 -6,74	269 271	Acetil-apigenina-7-O-glicuronídeo (isômero)	[18]
49	68,3	783,2727 [M-H]- 807,2675 [M+Na]+	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	783,2717 [M-H]- 807,2682 [M+Na]+	1,27 -0,86	607; 443; 461; 175 -	Angorosídeo C	[19]
50	69,1	517,0993 [M-H]- 519,1141 [M+H]+	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	517,0987 [M-H]- 519,1133 [M+H]+	1,16 1,54	299 ; 284 301	Acetil-crisoeriol-7-O-glicuronídeo (isômero)	[16]
51	70,9	503,0820 [M-H]- 505,0953 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	503,0831 [M-H]- 505,0976 [M+H]+	-2,18 -4,55	285 287	Acetil-luteolina-7-O-glicuronídeo (isômero)	[15]
52	72,1	651,2350 [M-H]- 697,2387 [M+FA-H]- 1303,4797 [2M-H]- 653,2392 [M+H]+	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651,2294 [M-H]- 653,2439 [M+H]+	8,59 -7,19	475; 329; 175 651; 475; 175 651 ; 475; 175 485; 339; 177	Martinosídeo (isômero)	[3,6]
53	74,0	591,2103 [M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	591,2083 [M-H]-	3,38	591; 161	Jionosídeo C	[20]
54	75,2	651,2264 [M-H]- 653,2444 [M+H]+	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651,2294 [M-H]- 653,2439 [M+H]+	-4,60 0,76	651; 505; 329; 175 -	Martinosídeo (isômero)	[3]
55	79,0	593,1287 [M-H]- 595,1440 [M+H]+	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	593,1300 [M-H]- 595,1446 [M+H]+	-2,19 -1,00	593; 447; 285 287 ; 147	Luteolina 7-cumaroilglicosídeo	
56	79,2	487,0883 [M-H]- 489,1016 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	487,0882 [M-H]- 489,1027 [M+H]+	0,20 -2,24	427; 269 271	Acetil-apigenina-7-O-glicuronídeo (isômero)	[18]

Tabela 31 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FLM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
57	85,2	1251,6004 [M+FA-H]- 1207,6069 [M+H]+	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₆	1251,6015 [M+FA-H]- 1207,6106 [M+H]+	-0,87 -3,06	1205; 649; 483 599; 471; 453 ; 279	Lippiasaponina	[21]
58	85,6	1321,6424 [M-H]- 1367,6478 [M+FA-H]- 1323,6570 [M+H]+	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₂₉	1321,6434 [M-H]- 1323,6579 [M+H]+	-0,75 -0,67	1321 ; 765; 483 1321 ; 765; 555; 483; 145 -	Saponina 1 (Lippiasaponina-3-xilosil-ramnosil)	[21]
59	85,8	1235,6053 [M+FA-H]- 1191,6149 [M+H]+	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₅	1235,6066 [M+FA-H]- 1191,6156 [M+H]+	-1,05 -0,58	1189; 779; 633; 483 601; 455; 437; 279	Saponina 2 (Lippiasaponina-3-ramnosil)	[21]
60	86,2	439,3539 [M+H-H ₂ O]+	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	439,3570 [M+H-H ₂ O]+	-7,05	203 ; 189; 135	Ácido oleanólico ou Ácido ursólico	[22]
61	91,1	439,3557 [M+H-H ₂ O]+	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	439,3570 [M+H-H ₂ O]+	-2,95	203; 191; 137	Ácido oleanólico ou Ácido ursólico	[22]

[1] - Sun et al., 2015; [2] - Gómez-Romero et al., 2010; [3] – Timóteo et al., 2015; [4] - L. Wang, Liu, Xing, et al., 2016; [5] - L. Wang, Liu, Zhang, et al., 2016; [6] - Quirantes-Piné et al., 2009; [7] - Sena Filho et al., 2007; [8] - S. Zhang et al., 2016; [9] - Abu-Reidah et al., 2012; [10] - Tóth et al., 2016; [11] - Y. Wang et al., 2009; [12] – Deyama et al., 2006; [13] - X. Wang et al., 2011; [14] – Tan et al., 2016; [15] - Ferreira et al., 2012; [16] - Q. Li et al., 2016; [17] – Kil et al., 2017; [18] - Song et al., 2012; [19] – Tian et al., 2017; [20] – Ahn et al., 2017; [21] - Farias et al., 2010; [22] - W. Zhou et al., 2018

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

A análise de FLM por CLAE-EM permitiu a identificação de um número significativo de metabólitos, sendo os feniletanoides, flavonoides e iridoides as classes com maiores ocorrências. Ao todo foram identificados 30 feniletanoides, 16 flavonoides, 6 iridoides, além da presença de três saponinas.

As primeiras substâncias identificadas em FLM correspondem a aminoácidos (**2, 6**) e produtos do seu metabolismo (**1**). Esses foram identificados pelos fragmentos referentes à perda de glicosídeo $[M+H-\text{ribose}]^+$ para **1**, e pelas perdas características de CO_2 $[M+H-\text{CO}_2]^+$ e NH_3 $[M+H-\text{NH}_3]^+$, tal como descrito anteriormente.

Na sequência do cromatograma foram detectados os primeiros iridoides não metilados na posição 12 (**3-5**) e esses apresentaram o perfil de fragmentação típica da classe, mostrando diversos sinais referentes às perdas de glicosídeo, de CO_2 , de H_2O , além de alguns fragmentos referentes a quebras no anel pirano (Quirantes-Piné et al., 2009). Também foram observados ésteres metílicos de iridoides (**10-12**) que apresentaram o perfil de fragmentação semelhante ao descrito acima, exceto pela perda de CH_3CO_2 ao invés de CO_2 (T. Zhou et al., 2010).

Uma grande quantidade de feniletanoides (**7, 8, 14-17, 19, 21-23, 26-28, 31-34, 36-38, 40-43, 45, 46, 49, 52-54**) foi identificada em FLM. Esses apresentaram perfil de fragmentação característico que geralmente refere-se à perda dos açúcares, de aril propanoides e da porção ariletil. Em alguns casos foram observadas perdas de 18 Da (H_2O) que se mostram característicos de β -OH-feniletanoides (**14-16**), perda de 14 Da (O^{2-}) característico de β -oxo-feniletanoides (**19**) e de 32 Da (OCH_3) condizente com β - OCH_3 -feniletanoides (**26**). Foram identificados feniletanoides que não continham substituintes cinâmicos (**7 e 8**), quanto aqueles que apresentaram diferentes derivados cinâmicos como substituintes. As substâncias **14-17, 19, 21-23, 26-28, 31, 32, 34, 36, 37, 41, 53** apresentaram em seu espectro de MS^2 um íon de m/z 161 que se mostra característico do substituinte cafeico. Já as substâncias **33, 38, 40, 42, 45 e 46** demonstraram fragmento de m/z 145 referente ao substituinte cumárico. Por fim, para os feniletanoides que apresentaram substituinte ferulico (**43, 49, 52, 54**) foi observado um fragmento de m/z 175.

A segunda classe de maior ocorrência em FLM foram os flavonoides, com destaque para as flavonas glicosiladas. Do total de 16 flavonoides identificados, 13 apresentaram perfil de fragmentação condizente com flavonas O-glicosiladas, sendo observados fragmentos de m/z 269, m/z 285 e m/z 299 referentes as agliconas apigenina (**29, 30, 48, 56**), luteolina (**18, 20, 39, 44, 51, 55**) e crisoeriol (**35, 47, 50**). Os fragmentos observados se mostraram referentes às perdas de glicose (162 Da), ácido glicurônico (176 Da) e de ácido glicurônico acetilado (218 Da). Algumas substâncias apresentaram perda de acetil (42 Da), enquanto a substância **55** apresentou perda de

146 Da referente a um ácido cumárico. Também foram identificados uma flavona C-diglicosilada (**13**), uma dihidrochalcona diglicosilada (**24**) e um flavonol-O-glicosilado (**25**).

Os espectros MS² e as propostas de fragmentação dos flavonoides e demais substâncias identificadas em FLM são apresentados na **Figura 72**.

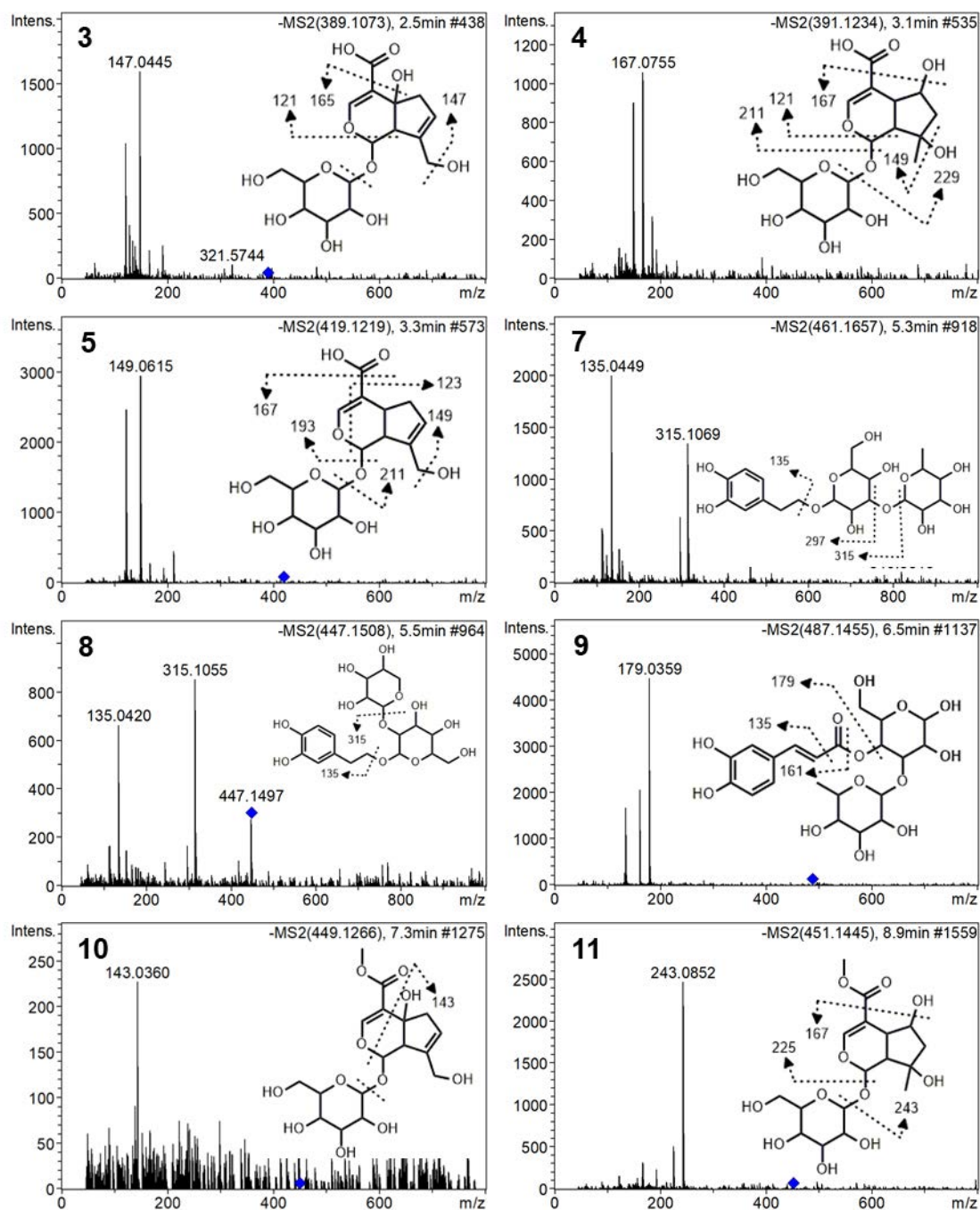


Figura 72: Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

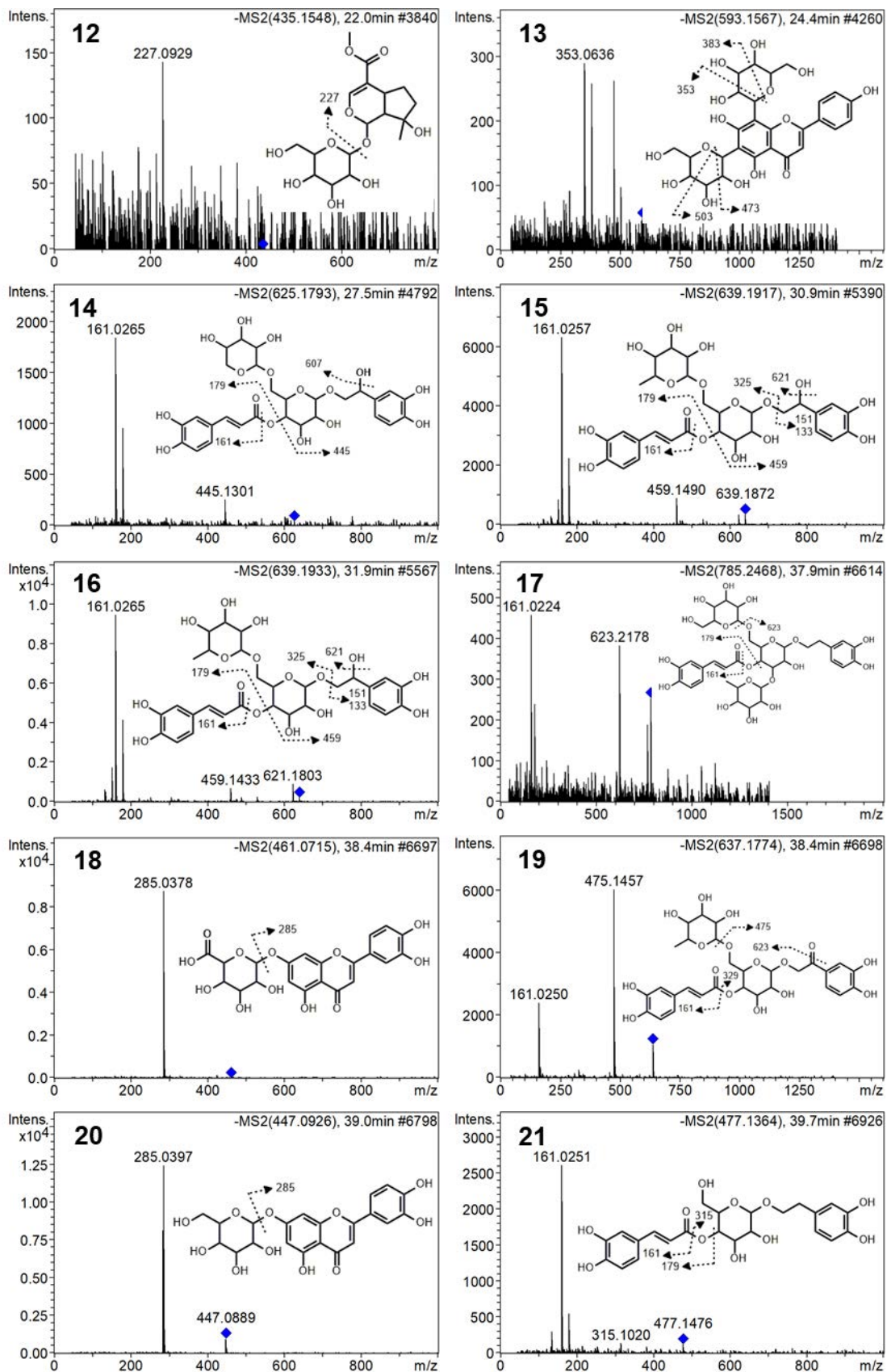


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

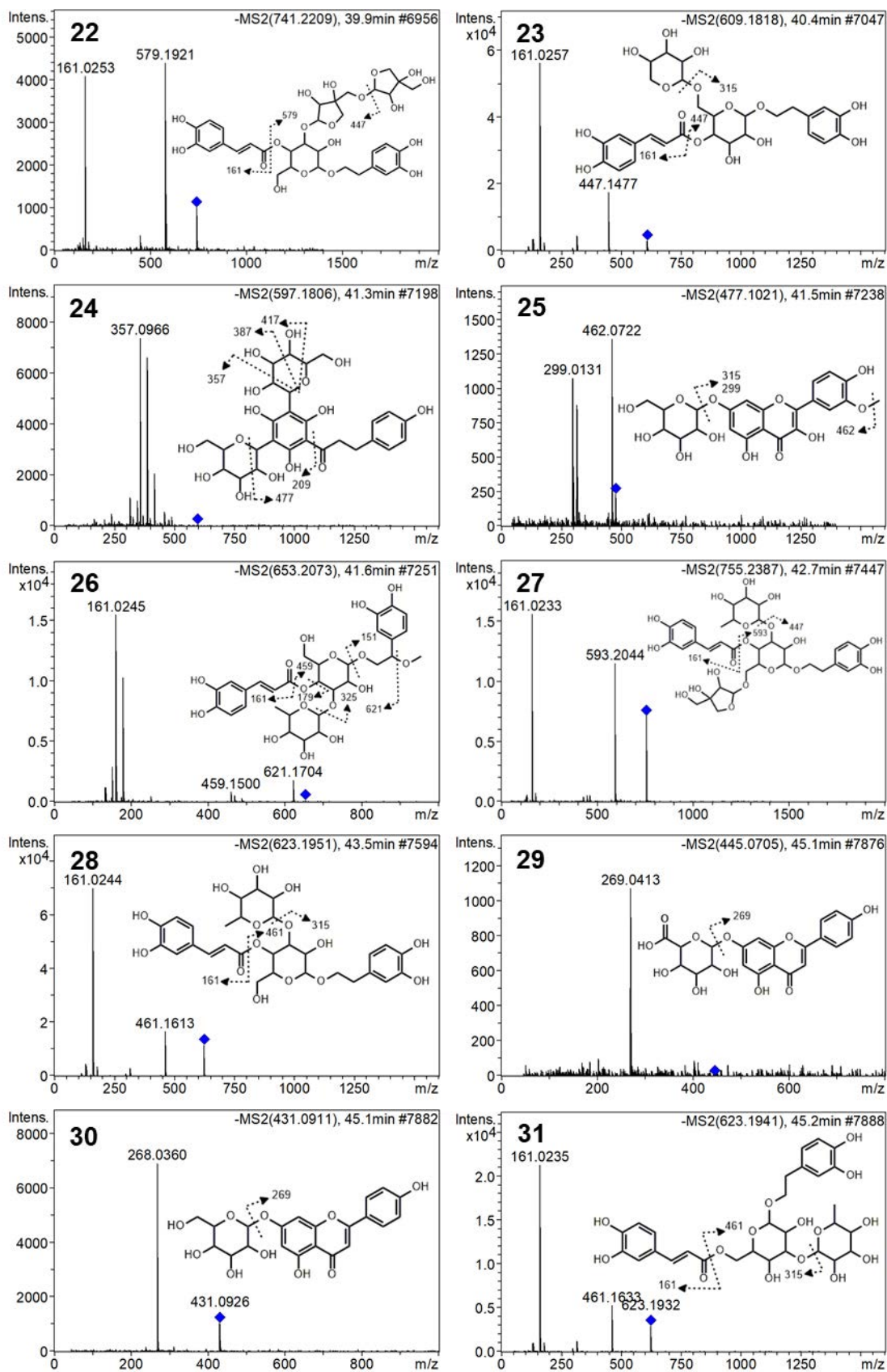


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

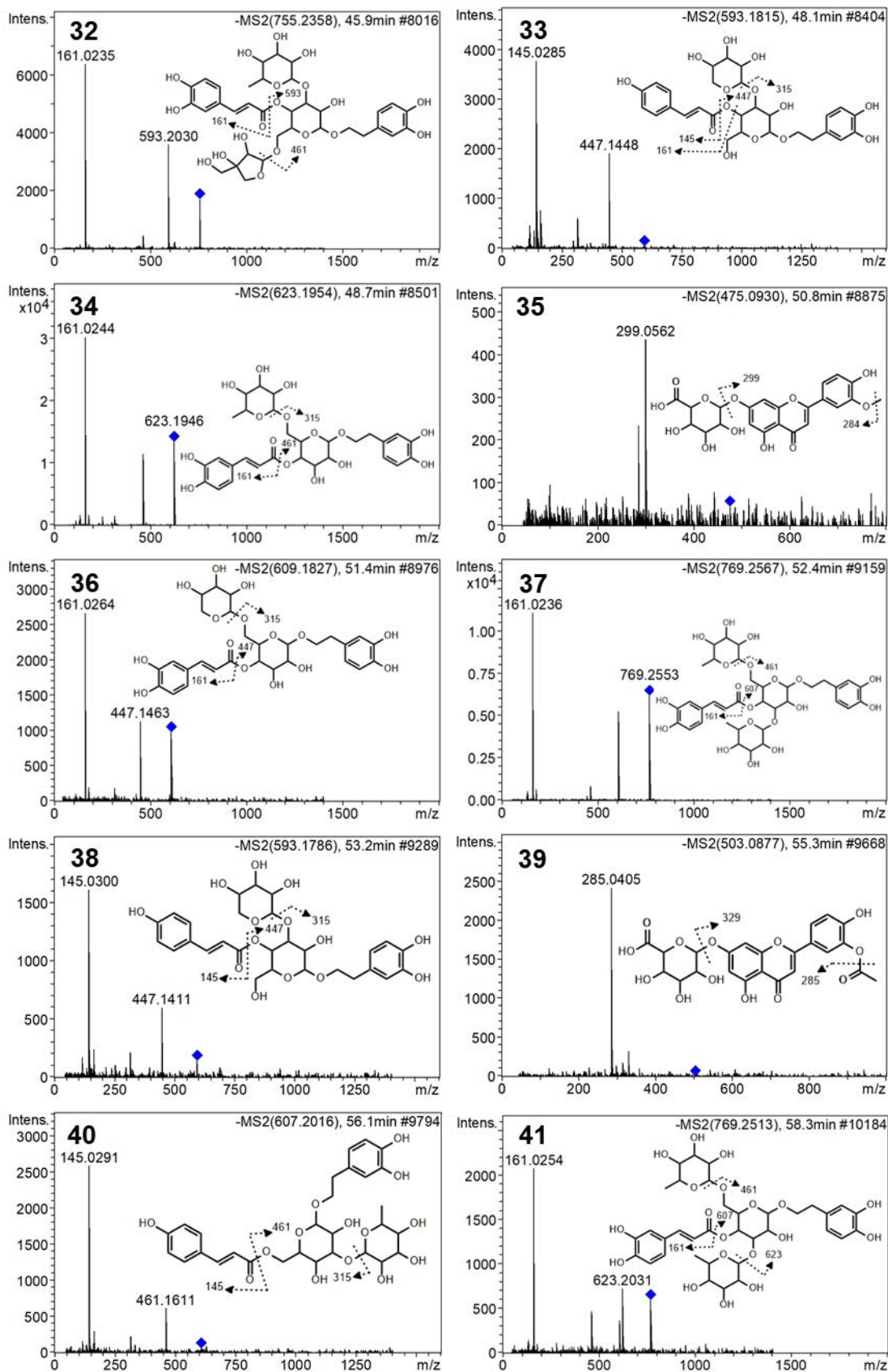


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

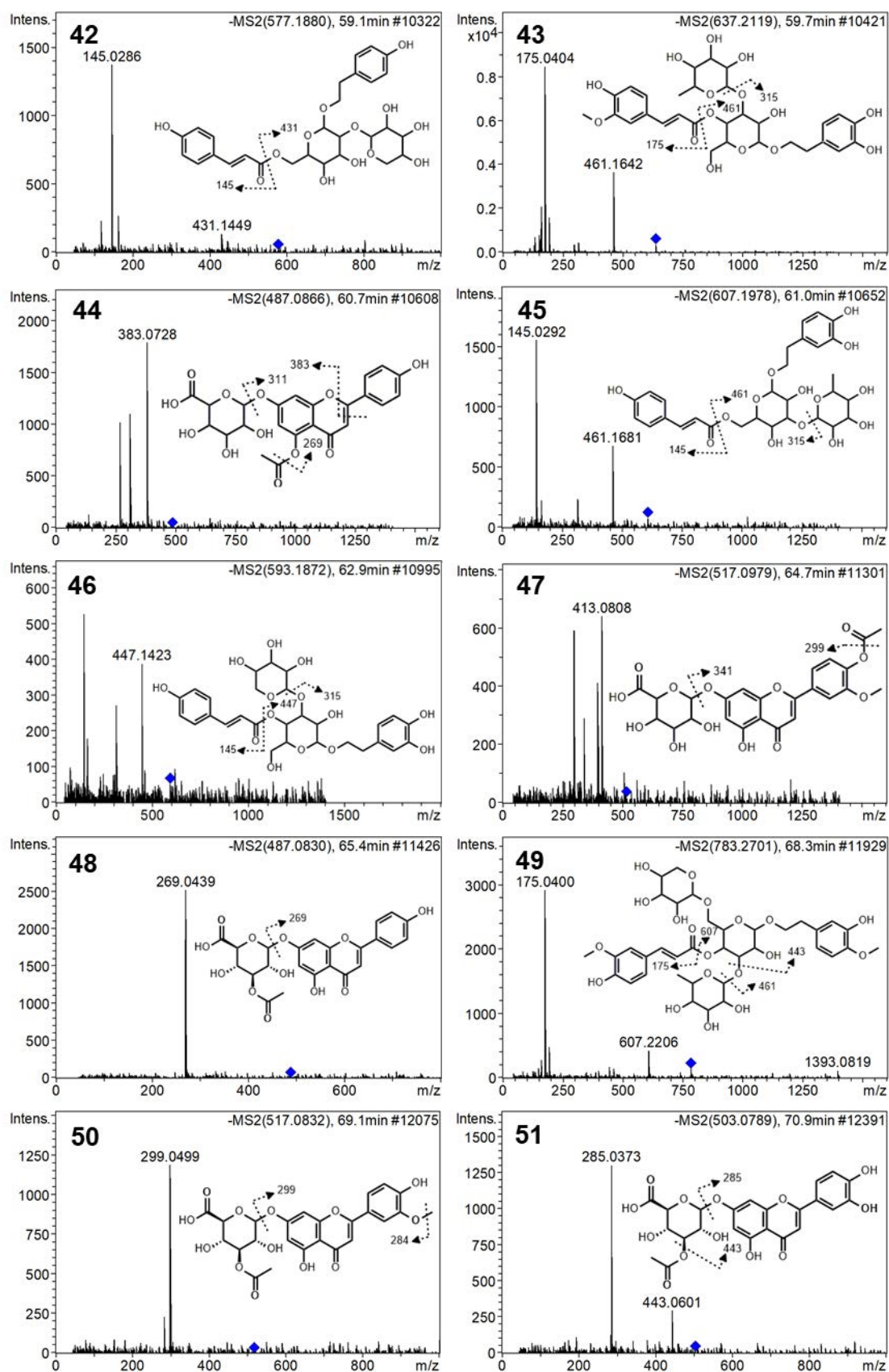


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

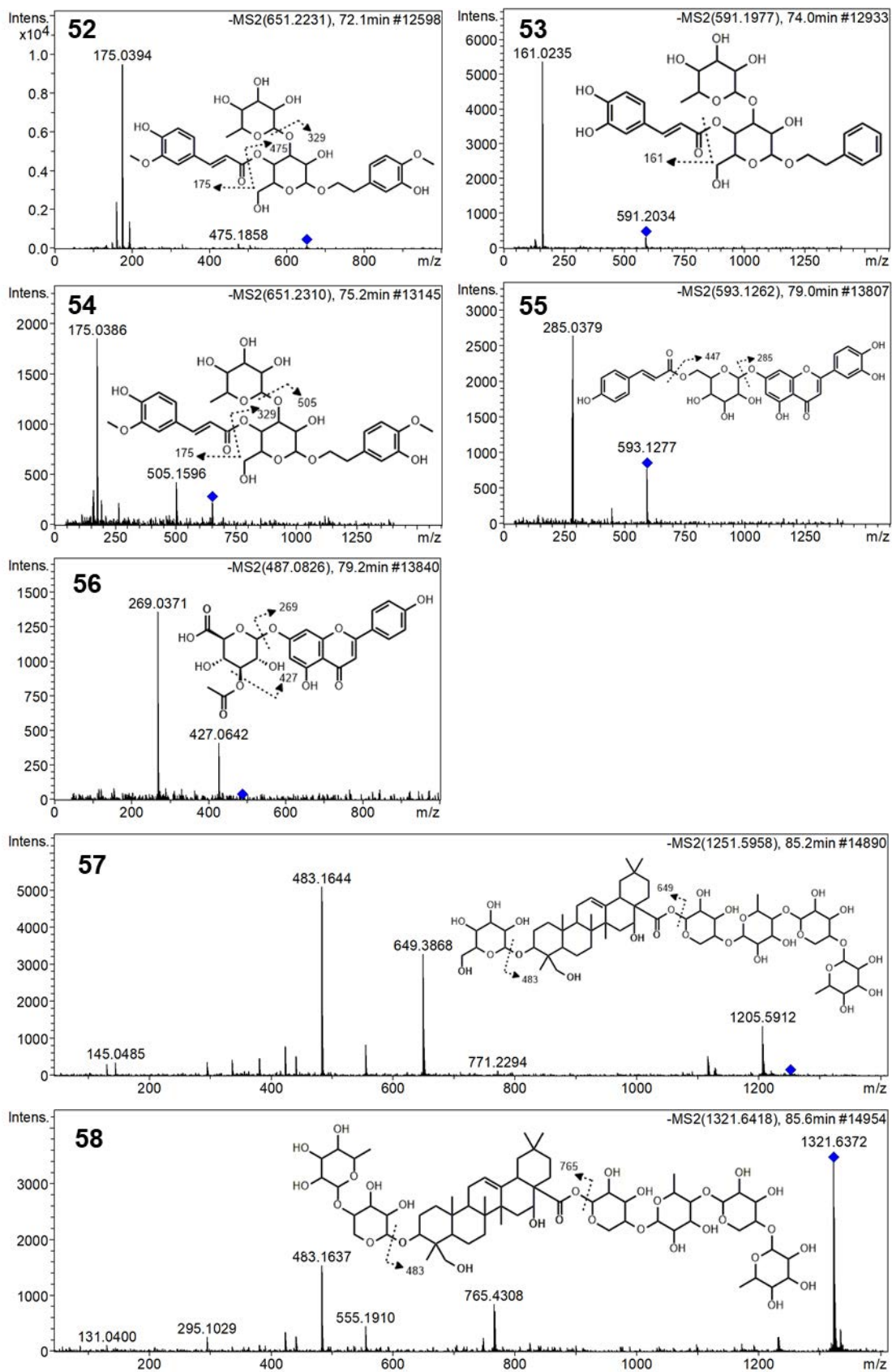


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

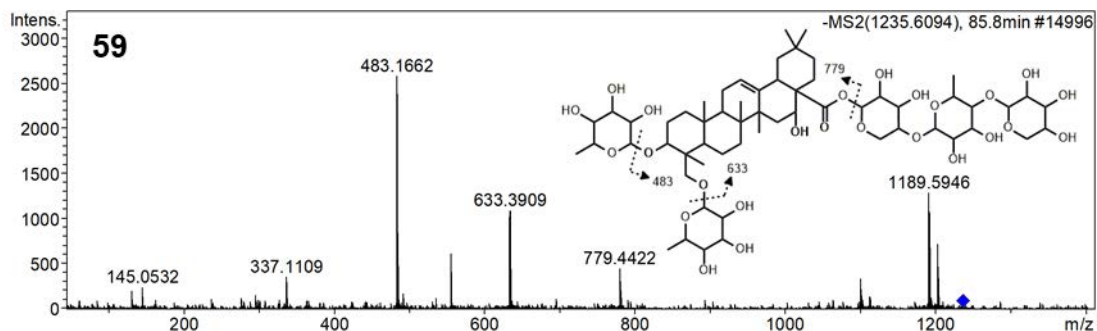


Figura 72 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FLM e suas propostas de fragmentação.

A investigação da composição química das espécies do gênero *Lippia* tem recebido crescente atenção nos últimos anos. Em relação à erva-cidreira (*L. alba*) existem diversos relatos que descrevem a ocorrência de iridoides, feniletanoides, flavonoides e saponinas, tendo sido descrito, inclusive, substâncias inéditas (Barbosa, Lima, & Silveira, 2005; Farias et al., 2010; Hennebelle et al., 2006).

Iridoides são substâncias de pequena ocorrência no reino vegetal e que se mostram restritas a algumas famílias tais como Lamiaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae (José G. Sena Filho et al., 2007). No gênero *Lippia*, em especial na erva-cidreira (*L. alba*), há relatos da ocorrência de iridoides glicosilados com ou sem o substituinte metil na posição 12 (Barbosa et al., 2006; Hennebelle et al., 2006; Sena Filho et al., 2007). A análise de FLM por CLAE-EM revelou perfis de fragmentação condizente com o de alguns iridoides já descrito para a espécie. Além disso, foram identificados iridoides glicosilados tanto em sua forma ácida (**3-5**) quanto na forma de éster metílico (**10-12**).

Outra classe de substância amplamente encontrada em espécies de Verbenaceae são os feniletanoides. Diversos estudos têm descrito a ocorrência dessas substâncias em espécies do gênero *Lippia*, sendo o acteosideo (**28**) descrito como componente majoritário dessa planta (Cádiz-Gurrea et al., 2018; C S Funari et al., 2012; Hennebelle et al., 2006). Estes estudos corroboram os resultados observados para FLM, uma vez que essa classe de substâncias mostrou-se abundante no extrato. Além disso, a presença de um sinal majoritário referente ao acteosideo corrobora os resultados obtidos pela análise por RMN.

Os flavonoides também tem apresentado significativa ocorrência nas espécies de *Lippia*. Estudos anteriores têm demonstrado que as espécies do gênero produzem preferencialmente flavonas-7-O-glicosiladas. No estudo conduzido por Hennebelle e colaboradores (2006) foram identificados cinco flavonoides no extrato metanólico das folhas de *L. alba*, sendo três derivados da apigenina e dois derivados da luteolina. Todos os flavonoides se apresentaram como 7-O-glicosídeos, sendo que um destes

apresentou acetilação em um dos açúcares. Na análise do extrato FLM por CLAE-EM foram identificados diversos flavonoides glicosilados que apresentaram perfil de fragmentação condizente com dos derivados da apigenina e da luteolina. Além disso, foram observados alguns flavonoides acetilados, o que se mostra de acordo com o perfil químico descrito anteriormente.

Por fim, a análise direcionada do extrato FLM permitiu a identificação de um saponina já descrita na espécie, a lippiasaponina (**57**). No estudo conduzido por Farias e colaboradores (2010) foram identificadas duas saponinas denominadas lippiasaponina I e lippiasaponina II, que se diferenciam pela posição de ligação de um dos açúcares. Embora as análises por CLAE-EM não permitam identificar qual dos isômeros apresenta-se em FLM, foi possível determinar a presença desta substância no extrato. Além disso, com base no perfil de fragmentação observado, foi possível identificar outras duas saponinas (**58**, **59**) que se mostraram bastante semelhante à substância **57**, sendo diferente pela glicosilação na posição 3.

5.5.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE FLM

Um total de sete animais foi utilizado na investigação hemodinâmica de FLM, sendo cinco utilizados para análise estatística, por apresentar perfis semelhantes. Nessas análises foi observado que o extrato FLM promoveu hipotensão mais intensa que o DMSO, que acarretou no reestabelecimento dos parâmetros hemodinâmicos em níveis abaixo dos iniciais (**Figura 73**).

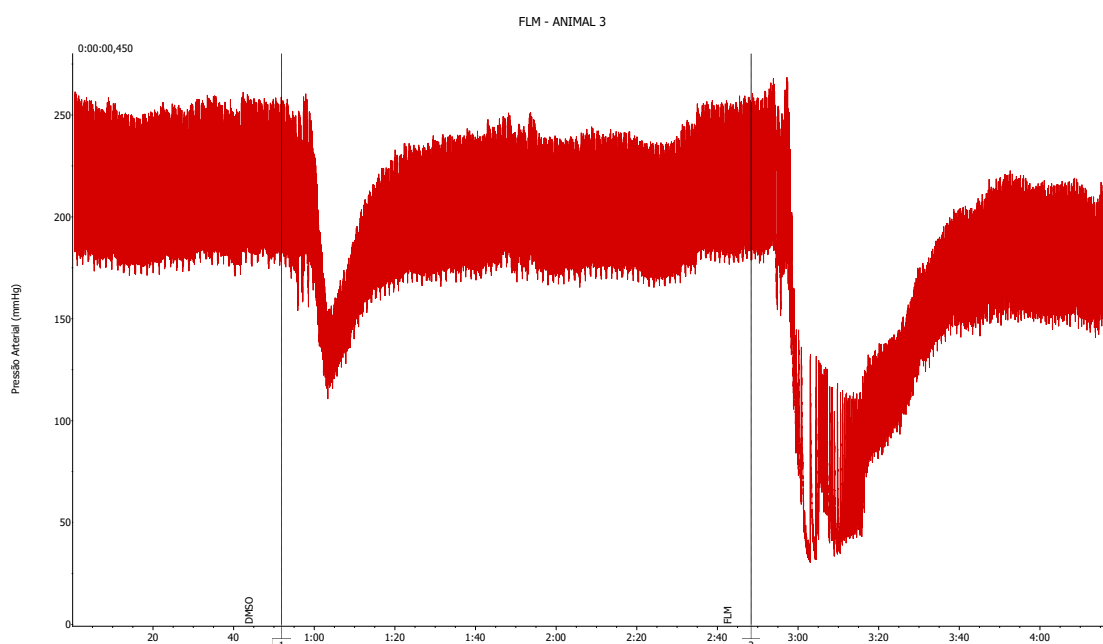


Figura 73: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato FLM, respectivamente.

Notáveis reduções nas pressões sistólica, média e diastólica foram observadas após a administração de FLM. Quando comparado ao controle, o extrato FLM promoveu uma redução de $101,8 \pm 10,4$ mmHg na PAS, que se mostrou $32,7 \pm 10,5$ mmHg mais intensa do que a produzida pelo DMSO. De maneira semelhante, foram observadas reduções de $112,8 \pm 11,4$ mmHg e de $109,4 \pm 10,6$ mmHg nas PAM e PAD que correspondem, respectivamente, a uma diferença de $50,5 \pm 13,0$ mmHg e $50,1 \pm 13,0$ mmHg em comparação com o resultado do DMSO. Os efeitos de FLM apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$) e quando comparado ao DMSO não foi evidenciada diferença sobre a PAS, enquanto PAM e PAD apresentaram-se diferentes (PAM – $p < 0,01$ e PAD – $p < 0,001$) (**Figura 74**).

Por outro lado, foi observada uma grande redução nos batimentos cardíacos dos animais. A administração do extrato FLM produziu uma redução de $169,0 \pm 41$ bpm que se mostrou $110,4 \pm 37,6$ bpm menor do que a causada pelo DMSO. Este efeito foi estatisticamente diferente do controle ($p < 0,01$) e do DMSO ($p < 0,05$) (**Figura 74**).

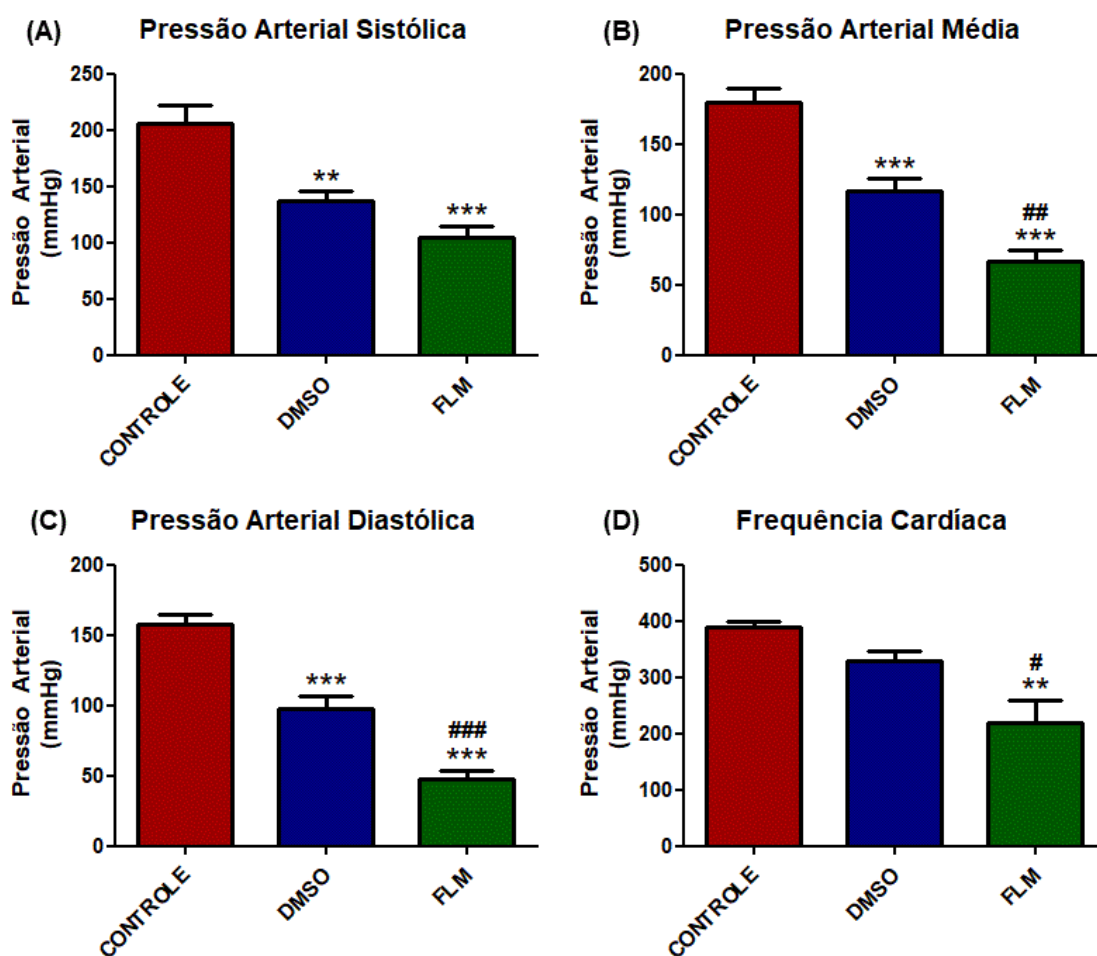


Figura 74: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato FLM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Um estudo anterior demonstrou que o extrato etanólico de *L. alba* na concentração de $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ promoveu um ligeiro decréscimo na PAM de ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), embora o efeito não tenha se mostrado estatisticamente significativo. De maneira semelhante, foi observada uma pequena redução na frequência cardíaca dos ratos normotensos que também não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Guerrero et al., 2002). O estudo realizado por Gazola e colaboradores (2004) mostrou que o extrato aquoso de *L. alba* promove efeitos bradicárdicos em corações isolados de ratos. Tomadas em conjunto estes estudos corroboram os resultados de FLM, uma vez que as mesmas tendências descritas foram observadas. Além disso, a avaliação de uma maior concentração de extrato ($30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) permitiu evidenciar diferenças significativas nas pressões e na frequência cardíaca.

A investigação química de FLM por RMN e CLAE-EM revelou o feniletanoide acteosideo como componente majoritário do extrato. Essa substância foi alvo de diversas investigações biológicas que incluem avaliações do seu potencial cardiovascular. Estudos demonstram que essa substância é capaz de promover a hipotensão em ratos normotensos (Wistar) e exercer efeitos anti-hipertensivos em ratos SHR na concentração de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ahmad et al., 1995; Chen et al., 2012). Esse efeito se mostrou independente de ativação muscarínica e histamínica, e do bloqueio alfa-adrenérgico. Além disso, foi observada uma diminuição dose-dependente da frequência cardíaca após administração do mesmo (Ahmad et al., 1995). Com base nesses dados é possível sugerir que o acteosideo é uma das substâncias responsável pelos efeitos de FLM sobre as pressões arterial e a frequência cardíaca.

5.5.4. INVESTIGAÇÃO DE FLM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

O extrato FLM também não apresentou efeitos tóxicos para os animais analisados, mas afetou significativamente a capacidade motora dos mesmos. Em todos os intervalos analisados foi evidenciado um efeito significativo do extrato em comparação com o controle ($p < 0,001$). Quinze minutos após a administração do mesmo foi observado um tempo de permanência de $147,3 \pm 2,6$ s e esse tempo aumentou gradativamente até um máximo de $163,1 \pm 2,2$ s para o intervalo de 120 min. Em comparação com o diazepam, o extrato foi menos efetivo no tempo de 15, 30 e 60 minutos ($p < 0,001$ para 15 min, $p < 0,01$ para 30 e 60 min), tendo apresentado efeito equivalente após 90 minutos da administração. No tempo de 120 minutos, FLM apresentou efeito significativamente maior que o do diazepam ($p < 0,001$) (**Figura 75**).

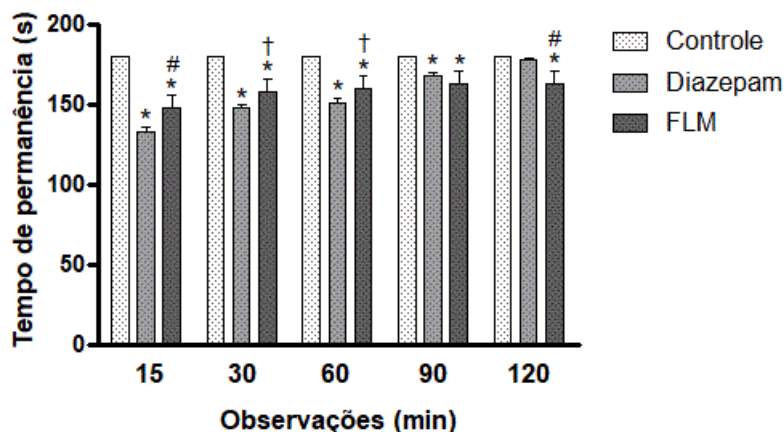


Figura 75: Resultados da avaliação de FLM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,001$; e para o diazepam: # - $p < 0,001$, † - $p < 0,01$.

Estudos avaliando a capacidade motora de animais tratados com diferentes extratos de *L. alba* são descritos na literatura, embora os resultados se mostrem controversos. A investigação de sete extratos etanólicos distintos dessa espécie não revelou influencia na atividade motora na concentração de $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Neto et al., 2009). Em outro estudo, a administração do extrato etanólico das folhas de *L. alba* na dose de $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ causou prejuízo motor aos animais, uma vez que aumentou de maneira significativa o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra (Zétola et al., 2002). Embora a avaliação de FLM tenha sido conduzida em uma menor concentração ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), foi possível observar efeitos significativos sobre a capacidade motora dos animais mesmo após 120 minutos da administração. As discrepâncias em relação aos dados descritos na literatura podem estar relacionados com os parâmetros utilizados no teste RotaRod.

5.6. *Stachytarpheta cayennensis* (Gervão-roxo)

5.6.1. INVESTIGAÇÕES POR RMN

5.6.1.1. Extratos em clorofórmio (FSC e FSC-R)

Assim como os extratos do manjeriço (AOC e AOC-R) e da erva-cidreira (FLC e FLC-R), os extratos do gervão-roxo (FSC e FSC-R) mostraram apenas sinais indicativos de ácidos graxos saturados e insaturados, e esteroides (**Tabela A1 – Apêndice 1**).

A identificação de ácidos graxos saturados nos extratos FSC e FSC-R se deu pela presença dos sinais em 0,88 ppm e em 1,30-1,31 ppm que se mostram referentes, respectivamente, a metila terminal e a cadeia de átomos de carbono metilênicos. Os ácidos graxos insaturados, por sua vez, mostram sinais deslocados em comparação aos ácidos saturados, apresentando o sinal da metila terminal em 0,98 ppm (7,5 Hz) e o sinal dos átomos de carbono metilênicos em cadeia em 1,26-1,27 ppm. Foram observados ainda o sinal dos carbonos metilênicos próximos a ligação dupla em 2,34 ppm (7,5 Hz) e o sinal da insaturação em 5,36 ppm. Por fim, a identificação de esteroides nesses extratos se deu pela detecção dos sinais de metila nas posições 18, 19 e 21 do esqueleto esteroidal (**Tabela A2 – Apêndice 1**).

Os espectros de RMN ^1H do gervão-roxo (FSC e FSC-R) apresentaram bastante semelhantes, tal como os do manjeriço (AOC e AOC-R). Todos os sinais observados no espectro FSC são observados em FSC-R, sendo que alguns se apresentaram com maior intensidade (**Figura 76**). Não houve problemas na homogeneização dessa planta, assim como não é descrito a ocorrência de nenhum componente majoritário de menor polaridade. Tais fatores, conforme discutido anteriormente, podem contribuir de maneira negativa na qualidade do espectro do extrato rápido (Chatterjee et al., 2010; Mushtaq et al., 2014).

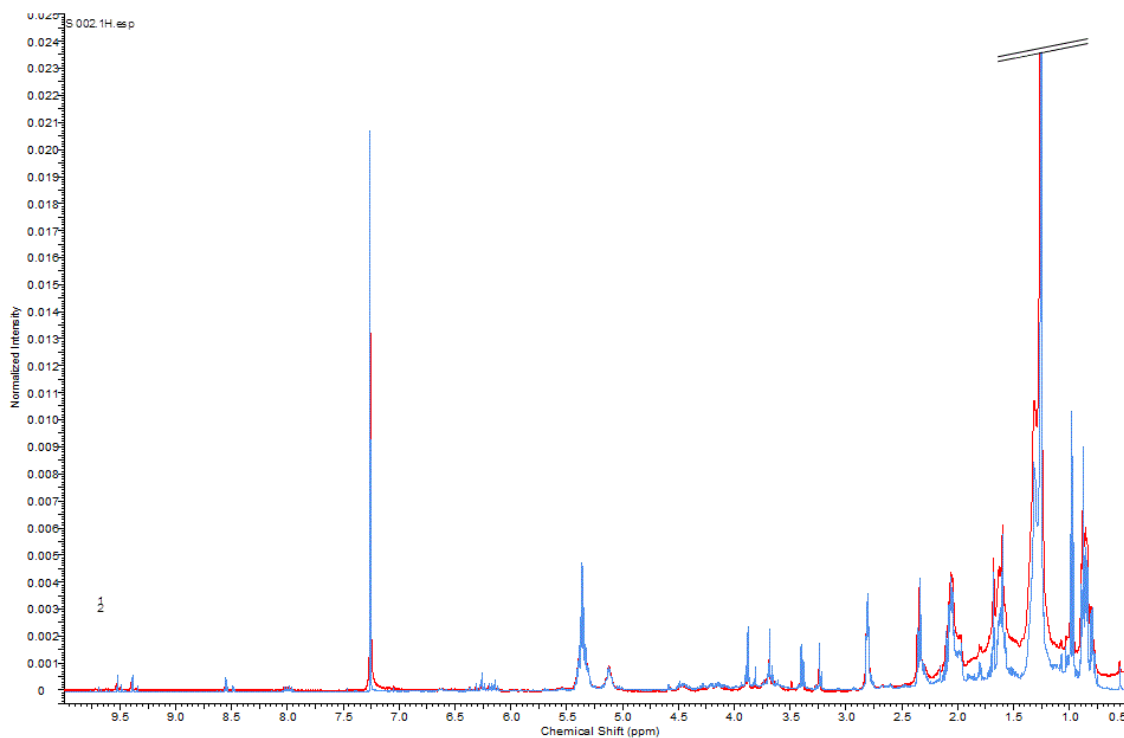


Figura 76: Comparativo dos espectros em CDCl_3 de FSC (azul) e FSC-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

5.6.1.2. Extratos em metanol (FSM e FSM-R)

A análise dos espectros de RMN dos extratos metanólicos do gervão-roxo mostraram a presença de açúcares livres, aminoácidos, ácidos orgânicos, substâncias nitrogenadas, feniletanoides e iridoides (**Tabela A3 – Apêndice 1**).

Em ambos os extratos foram identificadas as mesmas substâncias, tendo sido evidenciada a presença de α -glicose, β -glicose, alanina, ácido fórmico, ácido succínico, colina, acteosideo, isoacteosideo e ipolamiida. Além disso, foram observados indícios da presença de outros feniletanoides, embora não tenha sido possível identifica-los. Os dados espectrais das substâncias oriundas do metabolismo primário estão de acordo com as descritas anteriormente e se encontram resumidas na **Tabela A4 e Tabela A5 (Apêndice 1)**.

Nos espectros de RMN dos extratos do gervão-roxo (FSM e FSM-R) foi observado um padrão de sinais semelhante ao descrito para os extratos FLM e FLM-R o que sugere a presença do feniletanoide acteosideo. Foram observados os sinais referentes ao feniletanoide (3,4-dihidroxi-fenil-etanol) em 6,70 ppm (d, 1,9 Hz), 6,68 ppm (d, 8,0 Hz), 6,56 ppm (dd, 8,0 Hz e 1,9 Hz), 2,79 ppm (m), 3,73 ppm (m) e em 4,04 ppm (m) que correspondem, respectivamente, aos H2, H5, H6, H7, H8a e H8b. Os demais sinais aromáticos correspondente aos átomos de hidrogênio H2''', H5''', H6''', H7''' e H8''' da porção cinâmica (ácido cafeico) foram observados em 7,05 ppm (d, 1,9 Hz), 6,78 ppm (d, 8,2 Hz), 6,95 ppm (dd, 8,3 Hz e 1,9 Hz), 7,59 ppm (d, 15,8 Hz) e 6,28 ppm (d, 15,8 Hz), respectivamente. Também foram observados dois sinais de átomos de hidrogênio anomérico em 4,38 ppm (d, 7,7 Hz) e em 5,18 ppm (d, 1,8 Hz), além de um sinal triplo em 4,92 ppm (9,5 Hz) característico do H4' da glicose e um sinal duplo em 1,09 ppm (6,2 Hz) referente a metila H6'' da ramnose (**Figura 77 e Figura 78**). O mapa de correlação HMBC apresentou as mesmas evidências chave, tais quais descritas para os extratos FLM e FLM-R, sendo os acoplamentos entre os H8 do feniletanoide com o carbono em 103,9 ppm referente ao C1' da glicose, o acoplamento do H4' da glicose com o carbono em 168,2 ppm que corresponde a carbonila do ácido cafeico (C9''') e o acoplamento entre o H1'' da ramnose com o carbono C3' da glicose em 81,3 ppm (**Figura 79**). Tais evidências confirmam a presença do acteosideo nos extratos FSM e FSM-R. A **Tabela 32** apresenta os dados espectrais do acteosideo nesses extratos e a comparação com dados da literatura.

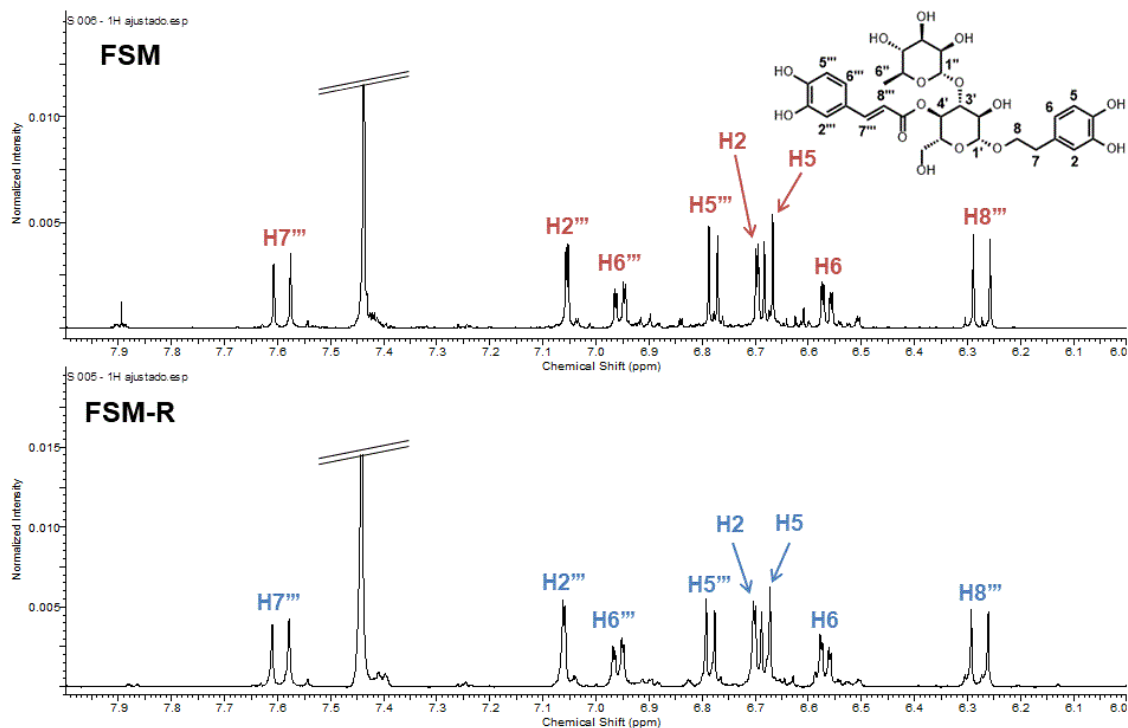


Figura 77: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.

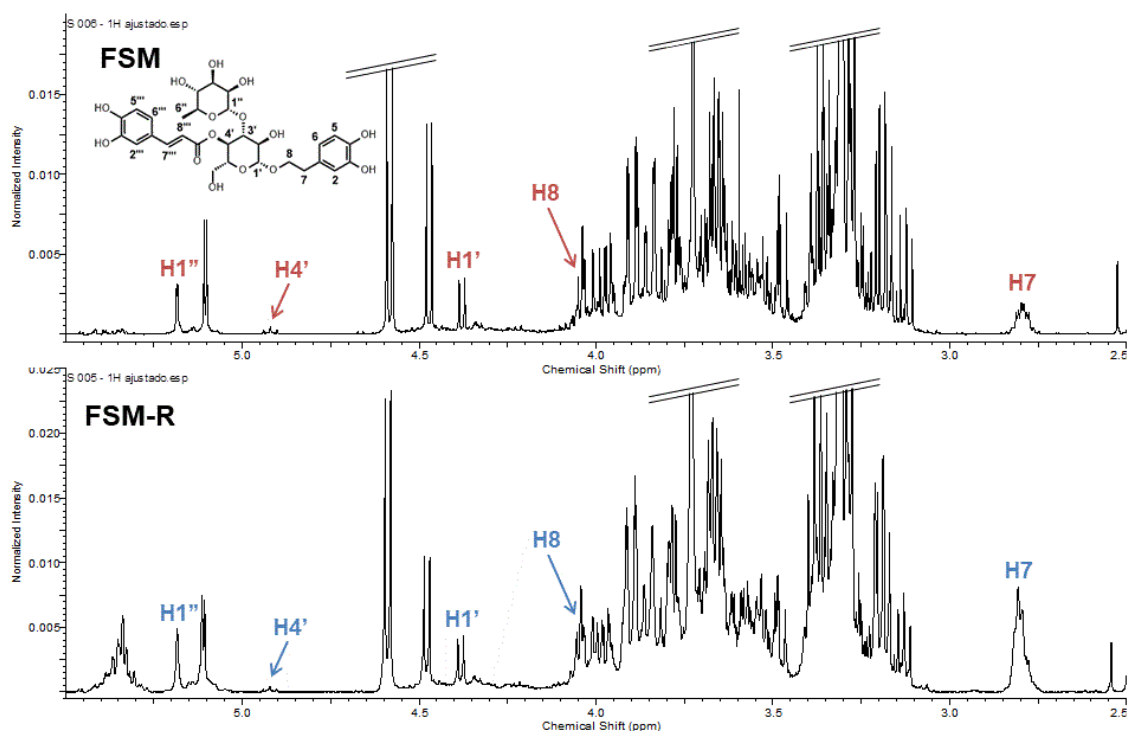


Figura 78: Ampliações (5,5 ppm – 2,5 ppm) dos espectros em CD₃OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente ao acteosideo.

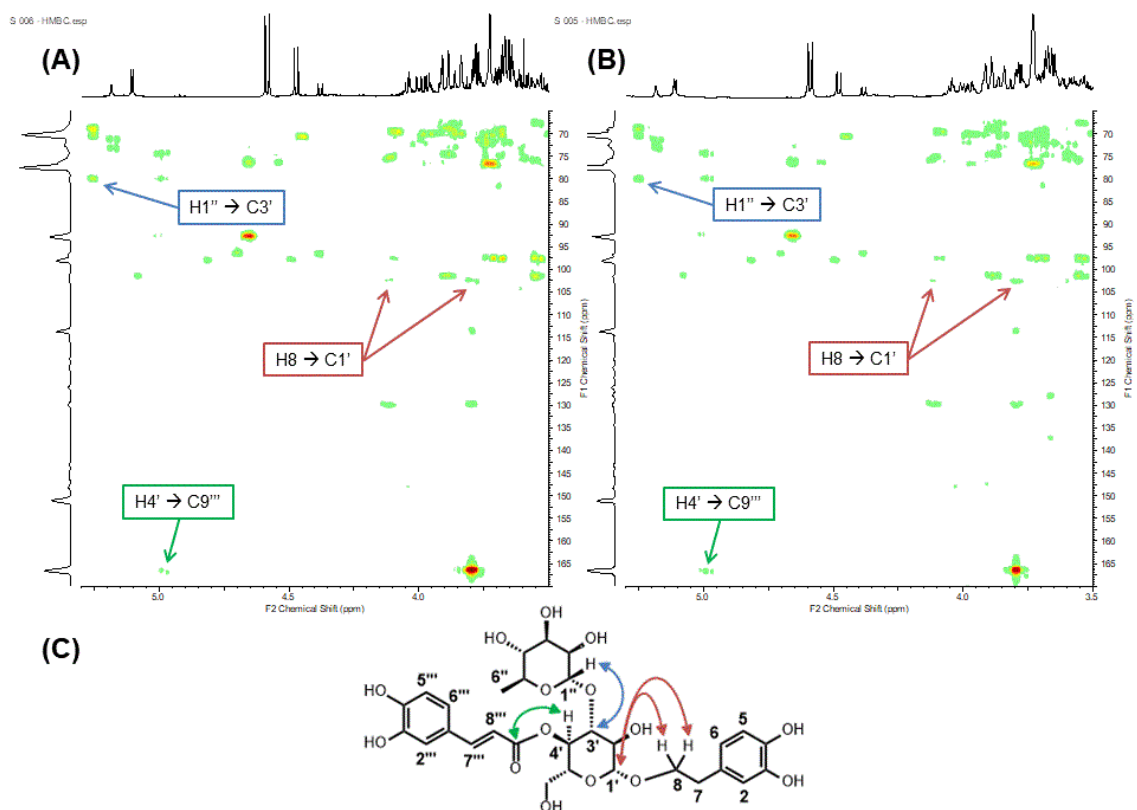


Figura 79: Ampliações dos espectros HMBC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando correlações chave (C) observadas para o acteosídeo.

Tabela 32: Deslocamentos químicos do acteosideo identificado nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.

N	FSM			FSM-R			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
1	-	131,3	-	-	131,3	-	-	131,5
2	6,70 d 1,9	116,8	36,4; 121,0; 144,6	6,70 d 1,8	116,8	36,4; 121,0; 144,4	6,69 d	116,3
3	-	146,1	-	-	145,8	-	-	146,1
4	-	144,6	-	-	144,4	-	-	144,6
5	6,68 d 8,0	116,1	131,3; 146,1	6,68 d 8,0	116,2	131,3; 145,8	6,67 d	117,1
6	6,56 dd 8,0 e 1,9	121,0	36,4; 116,8; 144,6	6,57 dd 8,0 e 1,9	121,0	36,4; 116,8; 144,4	6,56 dd	121,2
7	2,79 m	36,4	72,1; 116,8; 121,0; 131,3	2,80 m	36,4	72,1; 116,8; 121,0; 131,3	2,79 t	36,5
8	3,73 m 4,04 m	72,1	36,4; 103,9; 131,3	3,73 m 4,05 m	72,1	36,4; 103,9; 131,3	3,72 m 4,05 m	72,0
1'	4,38 d 7,7	103,9	72,1	4,39 d 7,9	103,9	72,1	4,37 d	104,2
2'	-	76,2	-	-	76,0	-	3,39 t	76,2
3'	3,81 m	81,3	70,3; 76,2; 102,7	3,82 m	81,4	70,4; 76,0; 102,7	3,81 t	81,6
4'	4,92 t 9,5	70,3	62,3; 76,0; 81,3; 168,2	4,92 t 9,6	70,4	61,9; 75,7; 81,4; 168,2	4,95	70,6
5'	-	76,0	-	-	75,7	-	~3,57	76,0
6'	- -	62,3	- -	- -	61,9	- -	3,53 - 3,61	62,3
1''	5,18 d 1,8	102,7	70,4; 72,1; 81,3	5,18 d 1,5	102,7	70,2; 71,9; 81,4	5,18 d	103,0
2''	3,91 m	72,1	72,0	3,92 m	72,1	71,9; 73,6	3,91 d	72,3
3''	-	72,0	-	-	71,9	-	~3,57	72,2
4''	-	73,7	-	-	73,6	-	3,28 t	73,8
5''	-	70,4	-	-	70,2	-	~3,57	70,4
6''	1,09 d 6,2	18,4	70,4; 73,7	1,09 d 6,1	18,4	70,2; 73,6	1,09 d	18,4
1'''	-	127,5	-	-	127,4	-	-	127,6
2'''	7,05 d 1,9	115,0	123,0; 147,8; 149,5	7,06 d 1,8	114,9	122,9; 146,6; 147,8; 149,5	7,05 d	115,2
3'''	-	146,8	-	-	146,6	-	-	146,8
4'''	-	149,5	-	-	149,5	-	-	149,7
5'''	6,78 d 8,2	116,3	127,5; 146,8; 149,5	6,79 d 8,2	116,2	127,4; 146,8; 149,5	6,77 d	116,5
6'''	6,95 dd 8,3 e 1,9	123,0	115,0; 147,8; 149,5	6,96 dd 8,2 e 1,9	122,9	114,9; 147,8; 149,5	6,95 dd	123,2
7'''	7,59 d 15,8	147,8	115,0; 123,0; 168,2	7,59 d 15,8	147,8	114,9; 122,9; 168,2	7,59 d	148,0
8'''	6,28 d 15,8	114,4	127,5; 168,2	6,28 d 15,8	114,4	127,4; 168,2	6,27 d	114,7
9'''	-	168,2	-	-	168,2	-	-	168,3

*Froelich et al., 2008; Wu et al., 2004

Assim como nos extratos da erva-cidreira (FLM e FLM-R) também foram observados sinais referentes a outros feniletanoides nas amostras FSM e FSM-R. O sinal referente ao H6'' da ramnose do isoacteosideo foi observado em 1,25 ppm (d, 6,2 Hz), assim como os sinais dos hidrogênios metilênicos H6' da glicose em 4,49 ppm (m) e em 4,35 ppm (m). A análise do mapa de correlação HSQC revelou o acoplamento do sinal em 1,25 ppm com o átomo de carbono em 17,6 ppm, e dos sinais em 4,49 ppm e em 4,35 ppm com o carbono em 64,3 ppm (**Figura 80**). Os dados espectrais observados para o isoacteosideo são demonstrados na **Tabela 33**.

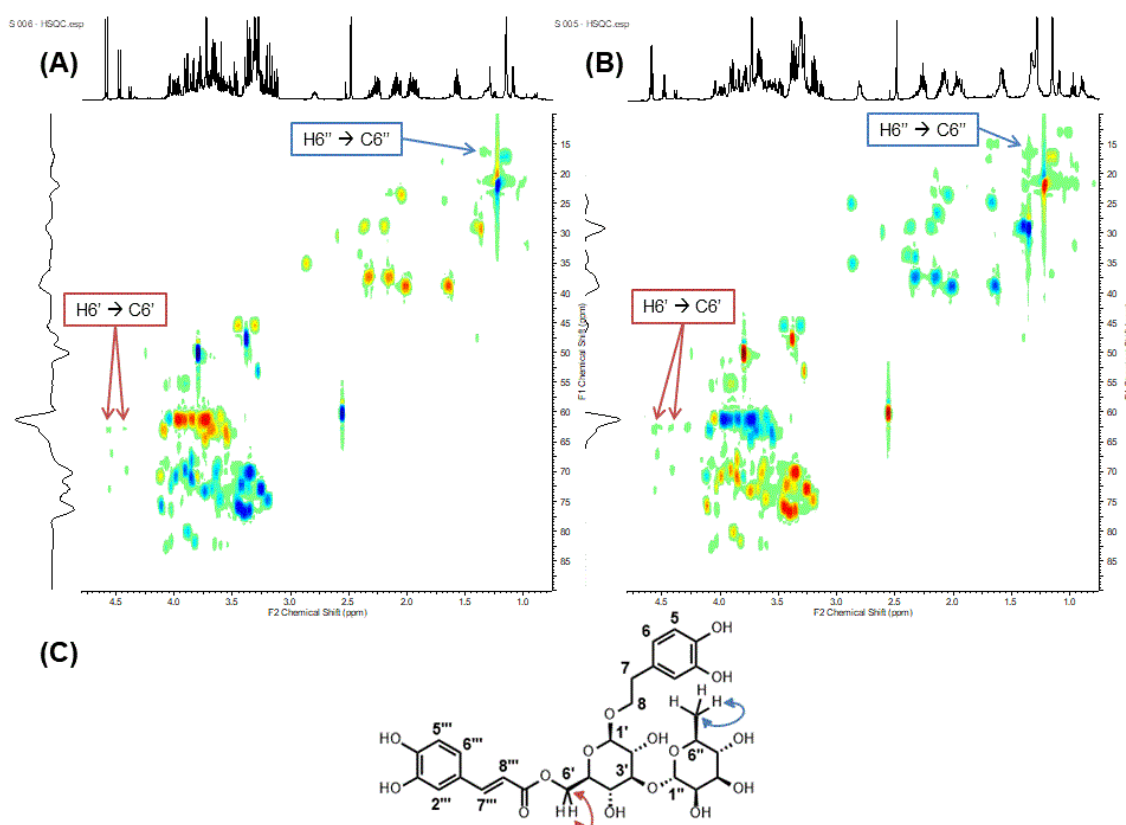


Figura 80: Ampliações dos espectros HSQC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando as correlações observadas para o isoacteosideo (C).

Tabela 33: Deslocamentos químicos do isoacteosideo observado nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.

N	FSM			FSM-R			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
6'	4,35 m 4,49 m	64,3	-	4,35 m 4,50 m	64,2	-	4,34 dd 4,49 dd	64,6
4''	-	73,9	-	-	73,8	-	-	73,9
5''	-	69,8	-	-	69,9	-	-	70,0
6''	1,25 d 6,2	17,6	69,8; 73,9	1,25 d 6,2	-	69,9; 73,8	1,24 d	17,8

*Froelich et al., 2008; Wu et al., 2004

Também foram observados sinais que sugerem a presença de outros feniletanoides. Tal como descrito para os extratos da erva-cidreira, ambos os espectros do gervão-roxo apresentaram um duplete em 6,29 ppm (15,8 Hz) que sugere a presença de feniletanoides triglicosilados conforme descrito na literatura (Figura 81 e Tabela 34) (Pan et al., 2015).

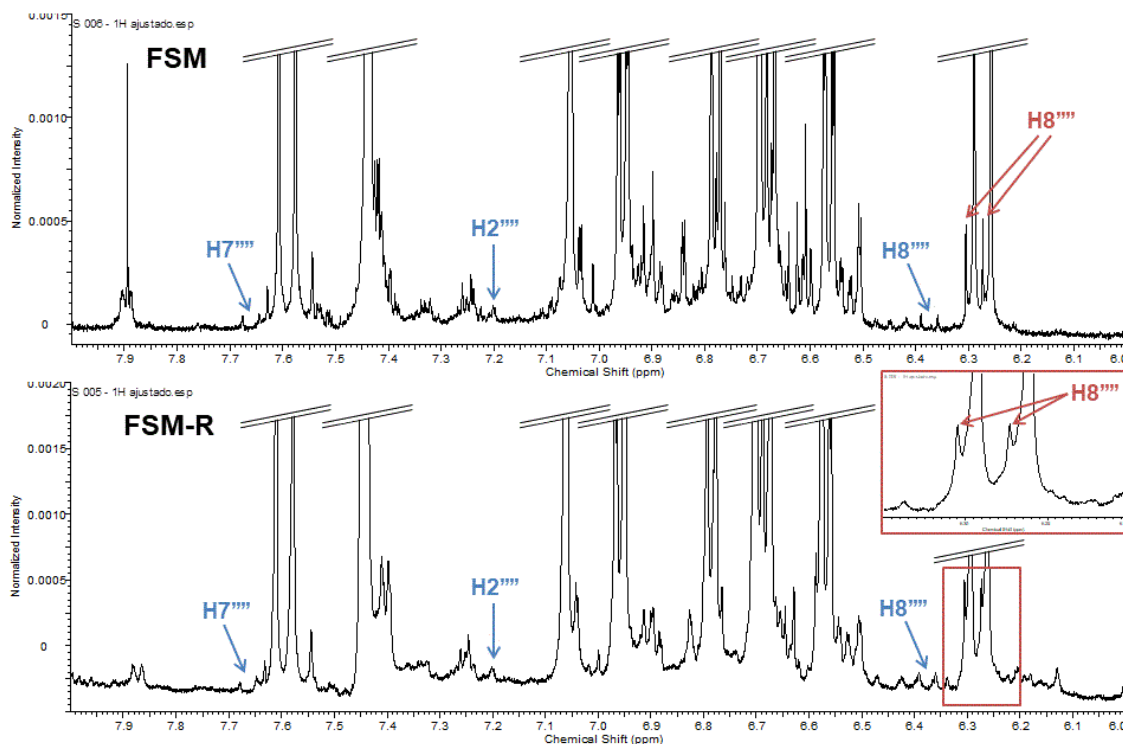
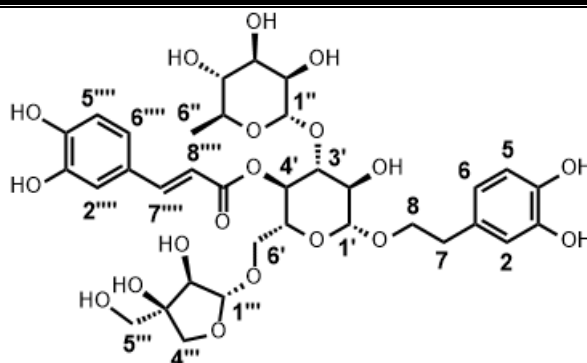


Figura 81: Ampliações (8,0 ppm – 6,0 ppm) dos espectros em CD_3OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais de um feniletanoide triglicosilado (vermelho) e de um feniletanoide com substituinte ferúlico (azul).

Tabela 34: Deslocamento químico de um feniletanoide triglicosilado observado nos extratos FSM e FSM-R. O forsitosídeo B foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.

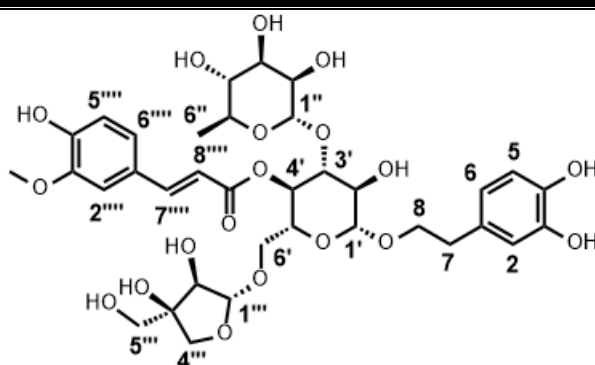


	FSM		FSM-R		Referência	
N	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
8''''	6,29 d 15,8	-	6,29 d 15,8	-	6,29 d	-

*Pan et al., 2015

Foram observados ainda dois sinais olefínicos referentes aos H7'''' e H8'''' em 7,66 ppm (d, 16,0 Hz) e em 6,38 ppm (d, 15,6 Hz), respectivamente (**Figura 81**). O espectros HSQC e HMBC revelaram um sinal de metoxila em 3,89 ppm que apresentou acoplamento $^1J_{CH}$ com o átomo de carbono em 56,5 ppm e acoplamento $^3J_{CH}$ com o átomo de carbono em 149,4 ppm, mostrando-se de acordo com a metoxila em C3 do substituinte ferúlico de alguns feniletanoides, tal como o alissonosídeo (**Tabela 35**). Assim como ocorrido para os extratos da erva-cidreira, não foi possível determinar a estrutura desses feniletanoides devido a pouca quantidade de evidências observadas.

Tabela 35: Deslocamentos químicos de um feniletanoide com substituinte ferúlico observado nos extratos FSM e FSM-R. O alissonosídeo foi selecionado para exemplificar e permitir a comparação com dados da literatura.



N	FSM		FSM-R		Referência	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C	1H	^{13}C
2''''	7,20 m	-	7,20 m	-	7,20 d	111,9
3''''	-	-	-	149,4	-	149,3
7''''	7,66 d 15,7	-	7,66 d 16,0	-	7,65 d	147,9
8''''	6,38 d 15,8	-	6,38 d 15,6	-	6,37 d	115,2
3-O-CH ₃	3,89 m	56,5	3,89 m	56,5	3,88 s	56,5

*Çaliş et al., 1992

A análise dos espectros de RMN de FSM e FSM-R revelou ainda a presença do iridoide ipolamiida. Foram observados três sinais simples em 5,81 ppm, 7,43 ppm e 2,48 ppm que se mostraram condizentes com os átomos de hidrogênio metínicos H1, H3 e H9 de iridoide. Dois pares de sinais de hidrogênios metilênicos foram observados em 2,26 ppm (m), 2,09 ppm (m), 1,95 ppm (m) e 1,58 ppm sendo estes correspondentes aos H6a, H6b, H7a e H7b, respectivamente. Foram observados ainda um sinal de átomo de hidrogênio anomérico em 4,58 ppm (d, 7,9 Hz) que sugere

a presença de glicose, um sinal de metoxila em 3,72 ppm (s) que sugere um substituinte metil na porção éster da molécula (H12), e um sinal em 1,14 ppm (s) característico de substituinte metil (H10) (**Figura 82**). A análise do mapa de correlação HSQC evidenciou os átomos de carbono ligados a cada um dos átomos de hidrogênio mencionados acima. Pela análise do mapa de correlação HMBC foi possível confirmar a posição de cada substituinte. O sinal do hidrogênio 1 do iridoide em 5,81 ppm apresentou acoplamento $^3J_{CH}$ com o átomo de carbono C1' da glicose em 99,3 ppm, confirmando este substituinte na posição 1. Também foi observado o acoplamento $^3J_{CH}$ entre os átomos de hidrogênio em 1,14 ppm (H10) com o átomo de carbono 8 do iridoide em 78,9 ppm, e o acoplamento dos hidrogênios em 3,72 ppm com a carbonila 11 em 168,0 ppm (**Figura 83**). Os deslocamentos químicos e acoplamentos observados nos extratos FSM e FSM-R para o iridoide ipolamiida são dados na **Tabela 36**.

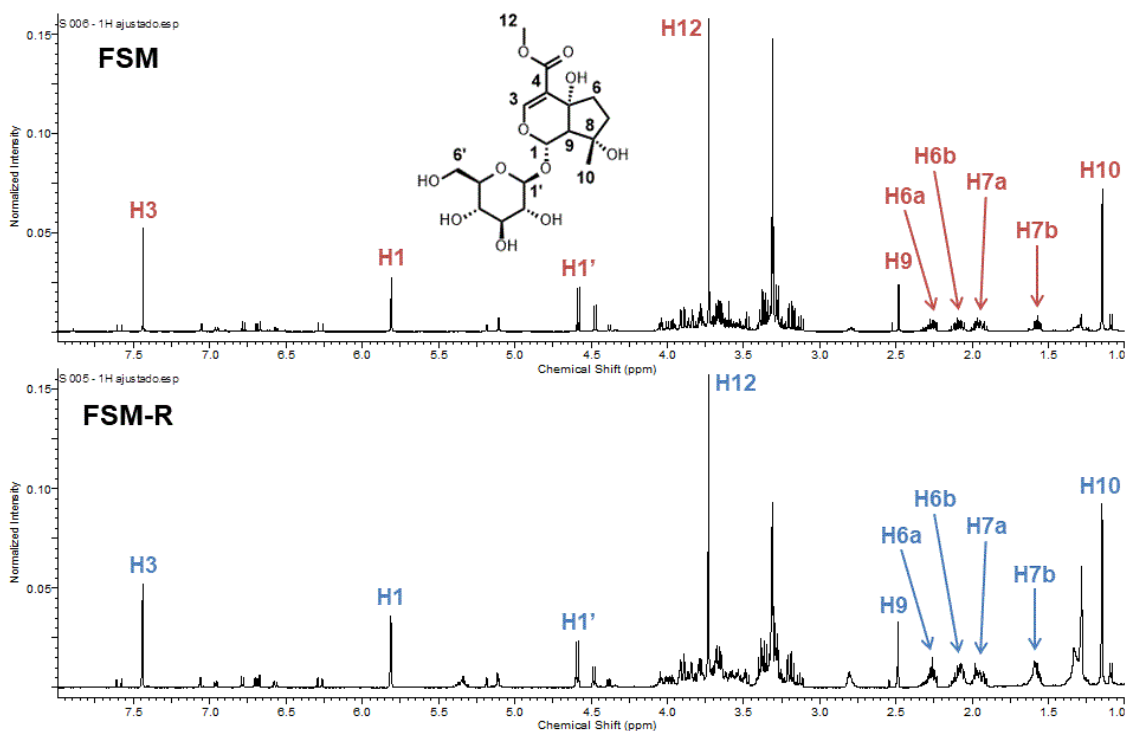


Figura 82: Ampliações (8,0 ppm – 1,0 ppm) dos espectros em CD₃OD de FSM e FSM-R demonstrando os sinais referente à ipolamiida.

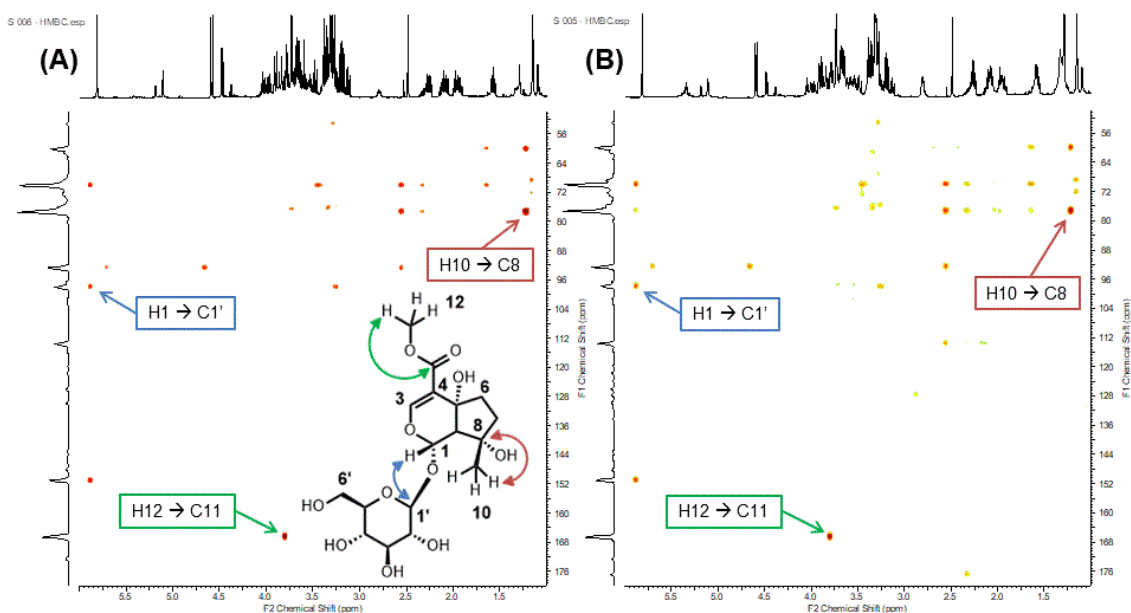


Figura 83: Ampliações dos espectros HMBC de FSM (A) e FSM-R (B) demonstrando correlações chave observadas para a ipolamiida.

Tabela 36: Deslocamentos químicos da ipolamiida identificada nos extratos FSM e FSM-R, e comparação com dados da literatura.

N	FSM			FSM-R			Referência*	
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
1	5,81 s	93,9	71,6; 78,9; 99,3; 152,0	5,81 s	93,9	71,5; 78,7; 99,3; 152,0	5,81 s	94,1
3	7,44 s	152,0	71,6; 93,9; 115,1; 168,0	7,44 s	152,1	71,5; 93,9; 115,0; 167,8	7,44 s	152,6
4	-	115,1	-	-	115,0	-	-	115,1
5	-	71,6	-	-	71,5	-	-	71,6
6	2,26 m 2,09 m	38,7	40,2; 61,5; 71,6; 78,9; 115,1	2,26 m 2,09 m	38,7	40,2; 71,5; 78,7; 115,0	2,26 m 1,92 m	38,8
7	1,95 m 1,57 m	40,2	23,2; 38,7; 61,5; 71,6; 78,9	1,95 m 1,58 m	40,2	23,2; 38,7; 61,5; 71,5; 78,7	2,10 m 1,59 m	40,3
8	-	78,9	-	-	78,7	-	-	78,9
9	2,48 s	61,5	23,2; 71,6; 78,9; 93,9; 115,1	2,48 s	61,5	23,2; 71,5; 78,7; 93,9; 115,0	2,48 s	61,6
10	1,14 s	23,2	40,2; 61,5; 78,9	1,14 s	23,2	40,2; 61,5; 78,7	1,15 s	23,2
11	-	168,0	-	-	167,8	-	-	168,0
12	3,72 s	51,4	168,0	3,72 s	51,5	167,8	3,73 s	51,7
1'	4,58 d 7,9	99,3	93,9	4,59 d 7,9	99,3	93,9	4,58 d	99,5
6'	3,90 dd 11,9 e 2,1 3,66 m	62,5	- -	3,90 dd 12,0 e 2,1 3,67 dd 12,0 e 6,0	62,5	- -	3,90 dd 3,71 dd	62,8

*Yalçin et al., 2007

Conforme mencionado anteriormente, o acteosideo é uma substância que ocorre com frequência nas plantas das famílias da ordem Lamiales, tal como a Verbenaceae. Ao contrário do gênero *Lippia*, onde a ocorrência desta substância é bastante documentada, poucas espécies do gênero *Stachytarpheta* possuem relatos da sua ocorrência. Além do gervão-roxo (*S. cayennensis*), que é uma das espécies mais estudadas do gênero, o acteosideo foi descrito apenas em *S. angustifolia*, *S. jamaicensis* e *S. glabra* (Mohammed et al., 2013; Rodríguez & Castro, 1996; Schapoval et al., 1998; Viccini et al., 2008). Entretanto, deve-se salientar que a fitoquímica das espécies de *Stachytarpheta* ainda foi pouco explorada, inclusive daquelas espécies de maior interesse, tal como *S. cayennensis* e *S. jamaicensis*. O acteosideo já foi descrito em diversos trabalhos conduzidos com o gervão-roxo (*S. cayennensis*), sendo considerado um dos componentes majoritário desta planta (Penido et al., 2006). Devido seu caráter majoritário esta substância é frequentemente avaliada em ensaios biológicos, e frequentemente associada como um dos princípios ativos da espécie (Maquiaveli et al., 2016; Penido et al., 2006; Souza et al., 2010).

Embora o gervão-roxo seja menos estudado que a erva-cidreira do ponto de vista químico, a presença do isoacteosideo nessa planta foi evidenciada em alguns estudos (Froelich et al., 2008; Leitao et al., 2005). Entretanto, o conhecimento a cerca da espécie limita-se a poucos feniletanoides e não incluem o forsitósideo B e o alissonosídeo. No melhor do nosso conhecimento, é desconhecida a ocorrência dessas duas substâncias em espécies do gênero *Stachytarpheta*. Por outro lado, feniletanoides com porção ferúlica como o leucosceptosídeo A e o martinósideo já foram descritos em *S. cayennensis* corroborando a ocorrência de feniletanoides com substituintes ferúlicos em FSM e FSM-R (Froelich et al., 2008).

O iridoide ipolamiida é outra substância presente nas plantas da ordem Lamiales. Embora possua menor incidência que o acteosideo no reino vegetal, essa substância foi descrita em diversas espécies de *Stachytarpheta*, tais como *S. australis*, *S. cayennensis*, *S. dichotoma*, *S. glabra*, *S. guyanensis*, *S. indica*, *S. jamaicensis*, *S. mutabilis* e *S. urticaefolia* (Akisue et al., 1981; Brito, Lainetti, & Guimarães, 1987; Chowdhury et al., 2003; Damtoft, Jensen, & Nielsen, 1984; Garnier, 1977; Leitao et al., 2005; Luca, 1980; Tantisewie & Sticher, 1975; Viccini et al., 2008). De fato, as espécies do gênero *Stachytarpheta* detêm maior capacidade de sintetizar iridoídeos do que feniletanoides. Diversos estudos conduzidos com *S. cayennensis* revelaram a ipolamiida como constituinte majoritário da planta, seguido pelo acteosideo (G. G. Leitão et al., 2005; Schapoval et al., 1998). Estes estudos corroboram os resultados observados nos extratos FSM e FSM-R. Pela análise por RMN foi possível identificar os dois constituintes majoritários dos extratos sendo que a ipolamiida apresentou

sinais mais intensos que o acteosideo, demonstrando que esse ocorre em maior quantidade na espécie.

A sobreposição de FSM e FSM-R revelou pequenas diferenças entre os perfis metabólicos. Em FSM-R foram observados sinais mais intensos de substâncias graxas, o que também foi observado para os demais extratos rápido em metanol. Apesar do aumento na intensidade dos sinais graxos, não foram observadas diferenças em relação aos demais sinais, especialmente aqueles referentes à ipolamiida e ao acteosideo. Ambos os extratos apresentaram evidências que permitiram a identificação dos dois constituintes (**Figura 84**). Além disso, os sinais referentes ao isoacteosideo e demais sinais de feniletanoides também foram observados em FSM-R, demonstrando que a metodologia de extração rápida também foi capaz de detectar substâncias de caráter minoritário. Desta forma, o uso dessa metodologia demonstrou-se efetiva na identificação de substâncias características da espécie.

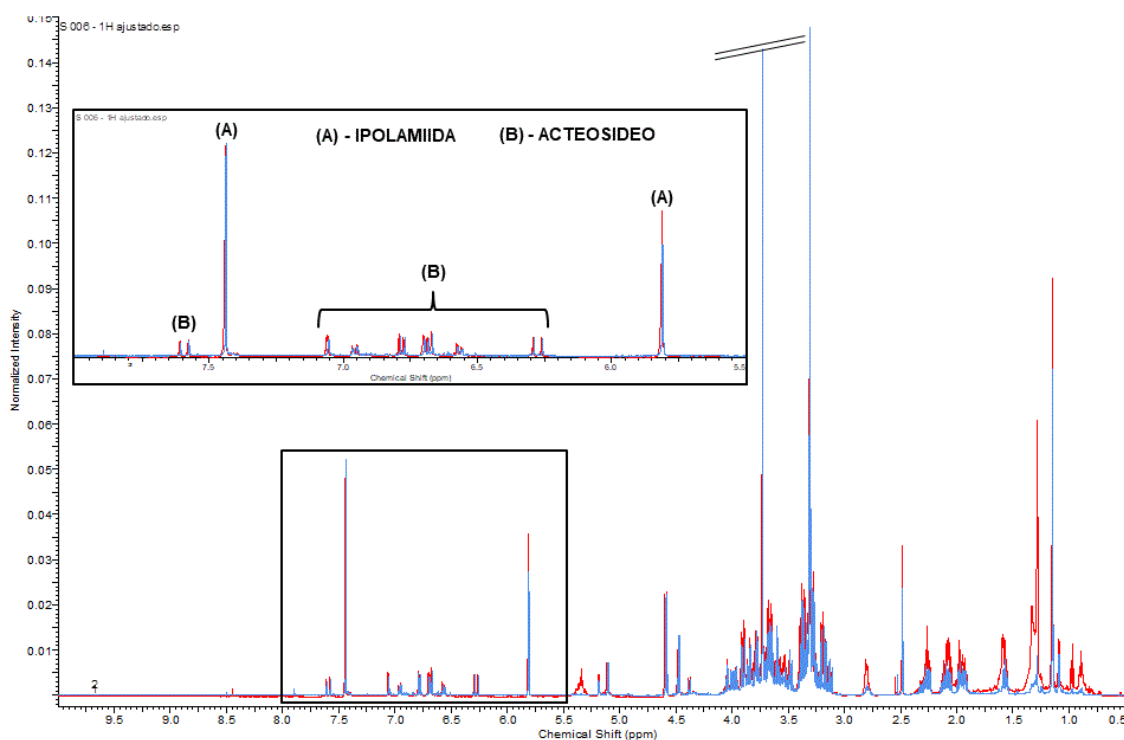


Figura 84: Comparativo dos espectros em CD_3OD de FSM (azul) e FSM-R (vermelho) demonstrando as diferenças entre os perfis obtidos.

5.6.1.3. Quantificação de acteosideo e ipolamiida em FSM

Por conta da significativa abundância dos sinais do acteosideo e da ipolamiida, optou-se pela quantificação desses constituintes no extrato FSM. O novo espectro obtido apresentou perfil metabólico semelhante ao dos demais espectros

demonstrados anteriormente. Para a quantificação do acteosideo foram selecionados cinco sinais que compreendem o hidrogênio metilênico H7, o sinal metílico H6'', dois sinais aromáticos H2''' e H5''' e o sinal olefínico H7''' (Figura 85). O valor de integral dos sinais metínicos variou entre 0,95 e 0,96, enquanto o sinal metilênico apresentou valor de 2,12 e o sinal metílico o valor de 3,05. O resultado da quantificação desses sinais variou entre 94,73 mg/mg e 105,70 mg/g, tendo sido obtido $98,65 \pm 2,11$ mg de acteosideo por grama de extrato como valor médio (Tabela 37).

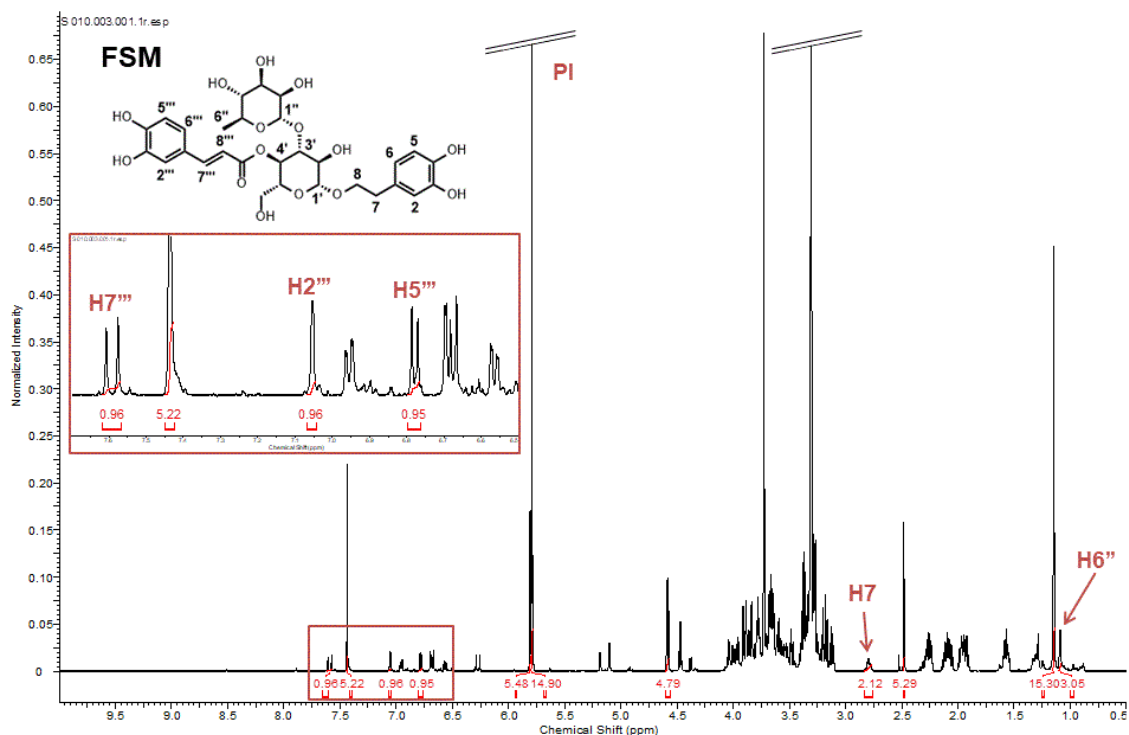


Figura 85: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD_3OD de FSM demonstrando os sinais e integrações do acteosideo e do padrão interno (PI).

Tabela 37: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosideo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.

	Acteosideo					Média \pm erro
	H7	H6''	H2'''	H5'''	H7'''	
Integração	2,12	3,05	0,96	0,95	0,96	-
Quantificação (mg/g)	105,70	101,38	95,73	94,73	95,73	$98,65 \pm 2,11$

Em relação ao acteosideo, no melhor do nosso conhecimento, é desconhecida a quantificação dessa substância em espécies do gênero *Stachytarpheta*. Entretanto, por se tratar de uma espécie com tendências biossintéticas semelhantes às espécies

de *Lippia*, é possível sugerir que o teor de acteosideo encontrado em FSM apresenta-se dentro da faixa esperada. Entretanto, deve-se ter em mente que essa substância embora ocorra em grandes quantidades no extrato, não é a substância de maior ocorrência no mesmo. O iridoide ipolamiida apresentou sinais com maior intensidade que o acteosideo e, provavelmente, ocorre em maior quantidade no extrato.

Desta forma, a quantificação do iridoide ipolamiida em FSM também foi realizada, sendo selecionados cinco sinais que correspondem aos hidrogênios metínicos H1, H3 e H9, o sinal anomérico H1' e os hidrogênios metílicos H10 (**Figura 86**). O valor de integral dos sinais metínicos variou entre 4,79 e 5,48, enquanto o sinal metílico apresentou integral de 15,30. O resultado das quantificações dos sinais variou entre 310,78 mg/g e 355,54 mg/g, tendo sido observado um valor médio de $335,82 \pm 7,42$ mg de ipolamiida por grama de extrato FSM (**Tabela 38**).

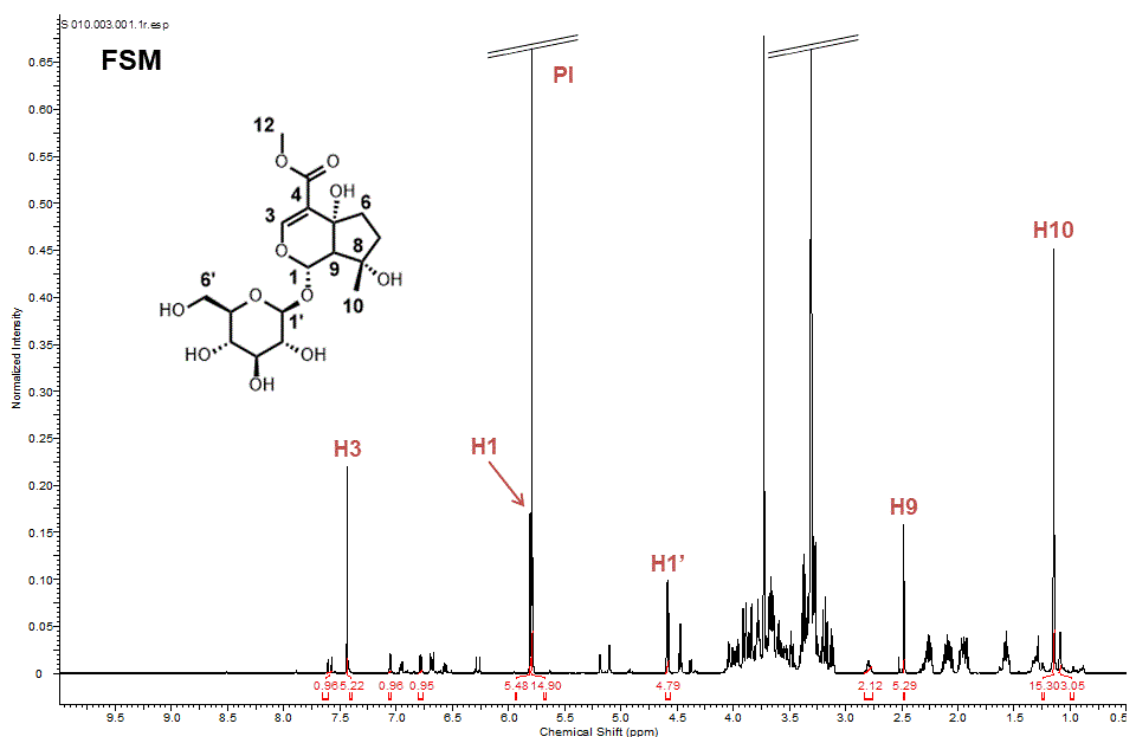


Figura 86: Ampliação (10,0 ppm – 0,5 ppm) do espectro em CD_3OD de FSM demonstrando os sinais e integrações da ipolamiida e do padrão interno (PI).

Tabela 38: Valores de integral dos sinais selecionados do acteosideo e resultados da quantificação individual e média. Os resultados da quantificação são expressos em mg de substância por g de extrato.

	Ipolamiida					Média \pm erro
	H1	H3	H9	H10	H1'	
Integração	5,48	5,22	5,29	15,30	4,79	-
Quantificação (mg/g)	355,54	338,67	343,22	330,89	310,78	$335,82 \pm 7,42$

Conforme mencionado anteriormente, a fitoquímica das espécies do gênero *Stachytarpheta* ainda se mostra pouco explorada, tendo sido descrito apenas estudos de isolamento de algumas substâncias. Estudos envolvendo plataformas analíticas mais sofisticadas como RMN e EM ainda são escassos e, por essa razão, não foram encontrados trabalhos que descrevam a identificação e quantificação da ipolamiida em extratos vegetais. Por outro lado, essa grande quantidade de ipolamiida observada em FSM corrobora o recente interesse comercial sobre as espécies desse gênero, uma vez que existe uma patente brasileira de 2018 que descreve uma forma de extrair a ipolamiida a partir de biomassas de espécies de *Stachytarpheta*.

5.6.2. INVESTIGAÇÃO DE FSM POR CLAE-EM

A análise cromatográfica de FSM por CLAE-EM apresentou diversos picos de intensidade equivalente, além de dois sinais majoritários em 10,6 minutos e em 43,3 minutos. O primeiro pico apresentou perfil de fragmentação típico de iridoides, enquanto o segundo apresentou características condizentes com feniletanoides. A análise dos espectros de fragmentação permitiu a identificação dos constituintes desse extrato (**Figura 87**).

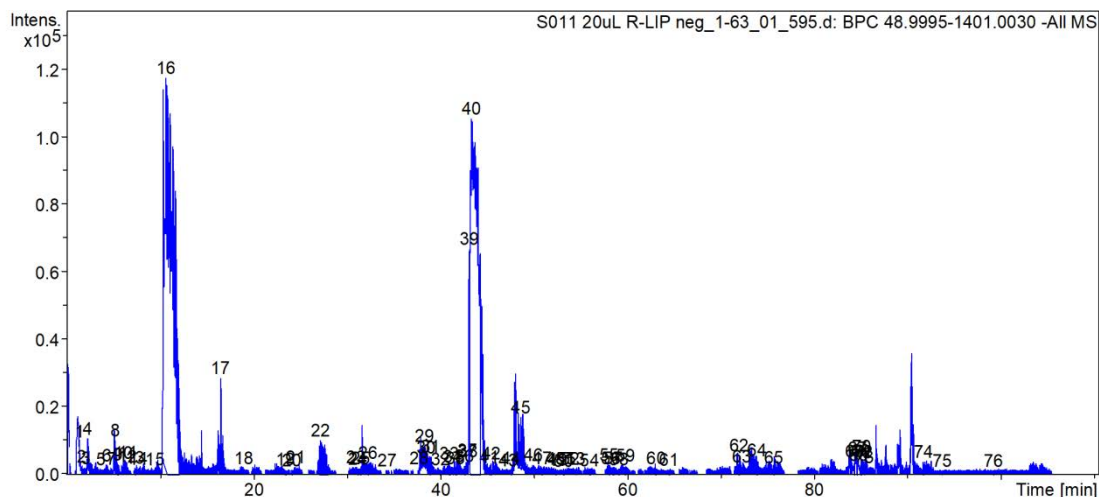


Figura 87: Cromatograma do pico base (BPC) de FSM obtido pelo modo de ionização negativo. Os números representam as substâncias identificadas.

A análise dos espectros de fragmentação de FSM permitiu a identificação de 76 substâncias, sendo o extrato que apresentou o maior número de constituintes identificados com grande variedade estrutural. Nesse extrato foram identificados ácidos orgânico, derivados cinâmicos e benzoicos, iridoides, feniletanoides, flavonoides, saponinas, entre outras substâncias. Os dados cromatográficos e espectrais das substâncias identificadas em FSM são apresentados na **Tabela 39**.

Tabela 39: Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
1	1,3	133,0133 [M-H]-	C ₄ H ₆ O ₅	133,0142 [M-H]-	-6,76	-	Ácido málico	[1]
2	1,6	268,1043 [M+H]+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268,1040 [M+H]+	1,11	136	Adenosina	[2]
3	2,0	164,0721 [M-H]- 166,0847 [M+H]+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164,0717 [M-H]- 166,0862 [M+H]+	2,43 -9,03	- 120; 103	Fenilalanina	[2]
4	2,2	191,0562 [M-H]-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0561 [M-H]-	0,52	-	Ácido quínico	[3]
5	3,6	203,0811 [M-H]- 205,0975 [M+H]+ 188,0709 [M+H-NH ₃]+	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203,0826 [M-H]- 205,0982 [M+H]+	-7,38 -2,92	- 178; 132; 118 118 ; 115	Triptofano	[4]
6	4,2	353,0880 [M-H]- 355,1021 [M+H]+	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878 [M-H]- 355,1034 [M+H]+	-0,56 -3,66	191 ; 179; 135 -	Ácido clorogênico (isômero)	[3]
7	4,8	447,1143 [M-H]-	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	447,1144 [M-H]-	-0,22	447; 152	Ácido dihidroxibenzóico-glicosil-xilosídeo	[1]
8	5,2	461,1669 [M-H]- 923,3365 [2M-H]- 463,1833 [M+H]+	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	461,1664 [M-H]- 463,1821 [M+H]+	1,08 2,59	461; 315; 297; 135 461 ; 135 179; 137 ; 129	Verbasosídeo	[5]
9	5,4	449,1304 [M+FA-H]- 427,1225 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	449,1300 [M+FA-H]- 427,1221 [M+Na]+	0,89 0,93	223 -	5-hidroxi-verbenalina	[6]
10	6,1	467,1415 [M+FA-H]- 445,1321 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₂	467,1406 [M+FA-H]- 445,1327 [M+Na]+	1,92 -1,34	241; 223 ; 169 -	6β-hidroxi-ipolamiida ou Lamiida	[3]
11	6,4	487,1451 [M-H]- 471,1503 [M+H-H ₂ O]+	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487,1457 [M-H]- 471,1508 [M+H-H ₂ O]+	-1,23 -1,06	179 ; 161; 135 325; 163	Cistanosídeo F	[7]
12	6,5	337,0939 [M-H]-	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,0928 [M-H]-	3,26	191; 163 ; 119	Ácido cumaroilquínico	[5]
13	7,3	467,1402 [M+FA-H]- 445,1320 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₂	467,1406 [M+FA-H]- 445,1327 [M+Na]+	-0,85 -1,57	241; 223 ; 209 445 ; 283; 265; 247; 233	6β-hidroxi-ipolamiida ou Lamiida	[3]
14	7,6	449,1305 [M+FA-H]- 405,1404 [M+H]+	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	449,1300 [M+FA-H]- 405,1402 [M+H]+	1,11 0,49	143 193; 175 ; 165; 137	Teveridosídeo	[8]

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
15	9,4	353,0871 [M-H]- 355,1032 [M+H]+	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878 [M-H]- 355,1034 [M+H]+	-1,98 -0,56	191; 179; 135 -	Ácido clorogênico (isômero)	[3]
16	10,7	405,1399 [M-H]- 451,1482 [M+FA-H]- 811,2878 [2M-H]- 857,2969 [2M+FA-H]- 1217,4368 [3M-H]- 371,1333 [M+H-2H ₂ O]+ 429,1367 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	405,1402 [M-H]- 371,1347 [M+H-2H ₂ O]+	-0,74 -3,77	225 ; 190 243; 225 ; 199; 193 243 ; 225 405; 243 ; 225 405; 243 ; 225; 179 195; 191; 177 ; 149; 133 429 ; 249; 217; 209; 191	Ipolamiida	RMN
17	16,4	435,1523 [M+FA-H]- 413,1419 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	435,1513 [M+FA-H]- 413,1418 [M+Na]+	2,29 0,24	227 ; 183 413; 179	Mussaenosídeo ou isômero	[6]
18	18,9	415,1608 [M-H]- 461,1679 [M+FA-H]- 439,1570 [M+Na]+	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₀	415,1609 [M-H]- 439,1574 [M+Na]+	-0,24 -0,91	- - 439	Feniletil primeverosídeo	[9]
19	23,4	433,1366 [M+FA-H]- 411,1274 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	433,1351 [M+FA-H]- 411,1261 [M+Na]+	3,46 3,16	225 ; 207 -	Verbenalina	[6]
20	24,1	593,1512 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	0,16 0	593; 473; 383; 353 -	Vicenina-2	[1]
21	24,5	389,1448 [M-H]- 413,1426 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	389,1453 [M-H]- 413,1418 [M+Na]+	-1,28 1,93	209; 177 ; 165; 133 413 ; 251	Mussaenosídeo ou isômero	[1]
22	27,3	389,1451 [M-H]- 779,2964 [2M-H]- 391,1600 [M+H]+ 413,1394 [M+Na]+	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	389,1453 [M-H]- 391,1609 [M+H]+	-0,51 -2,30	209; 177 ; 165; 147; 133 209 ; 177; 165 211; 193; 165 ; 151; 133 413 ; 251; 178; 151; 145; 133	Mussaenosídeo ou isômero	[1]
23	30,9	477,0688 [M-H]- 479,0825 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0674 [M-H]- 479,0820 [M+H]+	2,93 1,04	301 303	6-hidroxiluteolina-7-O-glicuronídeo	[3]

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
24	31,1	345,1558 [M-H]- 369,1519 [M+Na]+	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	345,1554 [M-H]- 369,1519 [M+Na]+	1,15 0	- -	Jasminosídeo B	[10]
25	31,4	639,1906 [M-H]- 663,1859 [M+Na]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	639,1930 [M-H]- 663,1895 [M+Na]+	-3,75 -5,42	621; 529; 459; 179; 161 -	(R,S)-suspensasídeo	[5]
26	32,2	463,0886 [M-H]- 465,1026 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 [M-H]- 465,1027 [M+H]+	0,86 -0,21	463; 301 303	6-hidroxluteolina-7-O-glicosídeo	[3]
27	34,2	453,3424 [M+H]+ 475,3222 [M+Na]+	C ₂₄ H ₄₄ N ₄ O ₄	453,3435 [M+H]+	-2,42	453; 435 ; 322; 228; 114 475 ; 303	Ciclo tetraleucil(isoleucil)	[2]
28	37,6	785,2529 [M-H]-	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	785,2509 [M-H]-	2,54	785; 623; 161	Equinacosídeo (isômero)	[2]
29	38,3	595,1318 [M-H]- 597,1442 [M+H]+	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595,1304 [M-H]- 597,1450 [M+H]+	2,35 -1,33	595; 463; 301 303	6-hidroxluteolina-7-O-glicosil-O-xilosídeo	[11]
30	38,4	461,0731 [M-H]- 923,1542 [2M-H]- 463,0862 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725 [M-H]- 463,0871 [M+H]+	1,30 -1,94	285 461; 285 287	Luteolina-O-glicuronídeo	[11]
31	38,8	447,0942 [M-H]- 449,1084 [M+H]+	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0932 [M-H]- 449,1078 [M+H]+	1,34 1,33	447; 285 287	Luteolina-O-glicosídeo	[1]
32	39,9	785,2536 [M-H]- 787,2691 [M+H]+	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	785,2509 [M-H]- 787,2655 [M+H]+	3,43 4,57	785; 623; 461; 161 -	Equinacosídeo (isômero)	[2]
33	40,9	579,1352 [M-H]- 581,1495 [M+H]+	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579,1355 [M-H]- 581,1500 [M+H]+	-0,51 -0,86	579 ; 447; 285 287	Luteolina-O-glicosídeo-O-xilosídeo	[11]
34	41,3	491,0835 [M-H]- 493,0964 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0831 [M-H]- 493,0976 [M+H]+	0,81 -2,43	315 ; 300 317	Nepetina-O-glicuronídeo	[11]
35	41,6	477,1051 [M-H]- 479,1176 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1038 [M-H]- 479,1184 [M+H]+	2,72 -1,66	477; 462; 315 ; 299 317	Nepetina-O-glicosídeo (isômero)	[4]
36	42,5	491,0831 [M-H]- 493,0992 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0831 [M-H]- 493,0976 [M+H]+	0 3,24	315 ; 300 317	Nepetina-O-glicuronídeo	[11]

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
37	42,8	477,1034 [M-H]- 479,1171 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1038 [M-H]- 479,1184 [M+H]+	-0,83 -2,71	477; 315; 299 317	Nepetina-O-glicosídeo (isômero)	[4]
38	42,9	579,1379 [M-H]- 581,1504 [M+H]+	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579,1355 [M-H]- 581,1500 [M+H]+	4,14 0,68	579; 285 287	Luteolina-O-glicosil-xilosídeo	[11]
39	43,0	609,1432 [M-H]- 611,1607 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	-4,76 0,16	609 ; 445; 315; 299 -	Nepetina-O-glicosídeo-O-xilosídeo	[11]
40	43,5	623,1986 [M-H]- 935,2985 [3M-2H]2- 1247,4078 [2M-H]- 625,2119 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]- 625,2126 [M+H]+	0,80 -1,11	623; 461; 315; 161 623 ; 461; 161 623 ; 161 325; 163	Acteosídeo	RMN
41	45,2	445,0786 [M-H]- 447,0921 [M+H]+	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445,0776 [M-H]- 447,0921 [M+H]+	2,24 0	269 271	Apigenina-O-glicuronídeo	[11]
42	45,4	623,1993 [M-H]- 625,2116 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]- 625,2126 [M+H]+	1,92 -1,59	623; 461; 161 -	Isoacteosídeo	[1]
43	47,2	610,4193 [M+FA-H]- 566,4270 [M+H]+ 588,4092 [M+Na]+ 283,7169 [M+2H]2+	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	610,4185 [M+FA-H]- 566,4275 [M+H]+	1,31 -0,88	564 ; 225 566 ; 548; 453; 435; 322; 209 588 453; 435; 322; 227; 209; 114	Ciclo pentaleucil(isoleucil)	[2]
44	47,5	609,1468 [M-H]- 611,1594 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461 [M-H]- 611,1606 [M+H]+	1,14 -1,96	315 317	Nepetina-O-glicosil-xilosídeo	[11]
45	48,5	623,1988 [M-H]- 1247,4050 [2M-H]- 625,2121 [M+H]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]- 625,2126 [M+H]+	1,12 -0,79	623; 461; 315; 161 623 163	Forsitosídeo A	[5]
46	49,9	755,2407 [M-H]- 779,2388 [M+Na]+	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	755,2404 [M-H]- 779,2369 [M+Na]+	-0,39 2,43	755; 593 ; 461; 161 -	Forsitosídeo B	[5]

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
47	50,8	475,0891 [M-H]- 477,1029 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475,0882 [M-H]- 477,1027 [M+H]+	1,89 0,41	299 ; 284 301 ; 163	Hispidulina-O-glicuronídeo (isômero)	[11]
48	52,3	461,1083 [M-H]- 463,1227 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461,1089 [M-H]- 463,1234 [M+H]+	-1,30 -1,51	446; 283 301	Hispidulina-O-glicosídeo	[11]
49	52,5	593,1513 [M-H]- 595,1650 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	0,33 -1,17	461; 299 ; 284 301	Hispidulina-O-glicosídeo-O-xilosídeo	[1]
50	53,1	475,0909 [M-H]- 477,1023 [M+H]+	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475,0882 [M-H]- 477,1027 [M+H]+	5,68 -0,83	315; 299; 284 301	Hispidulina-O-glicuronídeo (isômero)	[11]
51	53,3	593,1531 [M-H]- 595,1639 [M+H]+	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1511 [M-H]- 595,1657 [M+H]+	3,37 -3,02	299 -	Hispidulina-O-glicosil-xilosídeo	[1]
52	53,8	607,2042 [M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	607,2032 [M-H]-	1,64	607; 161	Lipidosídeo A (isômero)	[5]
53	54,4	623,1982 [M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1981 [M-H]-	-0,16	623; 461; 161	Acteosídeo (isômero)	[5]
54	55,9	607,2048 [M-H]-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	607,2032 [M-H]-	2,63	461; 315; 145	Lipidosídeo A (isômero)	[5]
55	58,0	491,1192 [M-H]- 493,1328 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491,1195 [M-H]- 493,1340 [M+H]+	-0,61 -2,43	476; 328; 313 331	Jaceosidina-O-glicosídeo	[11]
56	58,2	623,1622 [M-H]- 625,1752 [M+H]+	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1617 [M-H]- 625,1763 [M+H]+	0,80 -1,75	329 ; 314 331	Jaceosidina-O-glicosil-xilosídeo	[11]
57	58,4	505,1000 [M-H]- 507,1148 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0987 [M-H]- 507,1133 [M+H]+	2,57 2,95	329; 314 331 ; 195	Jaceosidina-O-glicuronídeo (isômero)	[11]
58	59,0	505,0985 [M-H]- 507,1136 [M+H]+	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0987 [M-H]- 507,1133 [M+H]+	-0,39 0,59	329; 314 -	Jaceosidina-O-glicuronídeo (isômero)	[11]
59	59,7	637,2133 [M-H]- 639,2263 [M+H]+	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637,2137 [M-H]- 639,2283 [M+H]+	-0,62 -3,12	637; 461; 315; 175 -	Leucosceptosídeo A	[2]

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
60	63,0	723,5024 [M+FA-H]- 679,5109 [M+H]+ 701,4916 [M+Na]+ 340,2585 [M+2H]2+ 351,2463 [M+H+Na]2+ 359,2319 [M+H+K]2+	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	723,5025 [M+FA-H]- 679,5116 [M+H]+	-0,13 -1,03	677 ; 225 679 ; 566; 548; 435; 341; 322 701 566; 548; 435; 340; 322; 114 588; 114 359	Ciclo hexaleucil(isoleucil)	[2]
		61		64,4	637,2115 [M-H]-	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637,2137 [M-H]-	-3,45
62	71,9	651,2300 [M-H]- 697,2324 [M+FA-H]- 653,2442 [M+H]+	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651,2294 [M-H]- 653,2439 [M+H]+	0,92 0,45	475; 329; 175 651; 475; 175 -	Martinosídeo	[2]
63	72,2	836,5841 [M+FA-H]- 814,5775 [M+Na]+ 396,7990 [M+2H]2+ 407,7897 [M+H+Na]2+ 415,7754 [M+H+K]2+	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	836,5866 [M+FA-H]- 814,5776 [M+Na]+	-2,98 -0,12	790 ; 225 814 ; 396 679; 566; 435; 322; 209; 114 407 ; 114 415	Ciclo heptaleucil(isoleucil)	[2]
64	73,8	591,2092 [M-H]- 615,2038 [M+Na]+	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	591,2083 [M-H]- 615,2048 [M+Na]+	1,52 -1,62	591; 161 -	Jionosídeo C	[12]
65	75,6	453,3440 [M+2H]2+	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	453,3432 [M+2H]2+	1,76	566; 453 ; 444; 353; 114	Ciclo octaleucil(isoleucil)	[2]
66	84,2	1237,5824 [M-H]- 1283,5929 [M+FA-H]- 1221,5916 [M+H-H ₂ O]+	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₈	1237,5858 [M-H]- 1221,5898 [M+H-H ₂ O]+	-2,74 1,47	1237; 681; 555; 483 1237 ; 681; 555; 483 485; 467 ; 279; 225; 187; 129	Saponina 1	
67	84,5	1279,5965 [M-H]- 1325,6000 [M+FA-H]- 1263,6021 [M+H-H ₂ O]+	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉	1279,5964 [M-H]- 1263,6004 [M+H-H ₂ O]+	0,07 1,34	1279; 1237; 681 ; 483 1279; 1237; 681 ; 483 485; 467; 225; 189	Derivado acetilado da Saponina 1	
68	84,7	1265,5818 [M-H]-	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉	1265,5808 [M-H]-	0,79	1265 ; 1223; 681; 469	Saponina 2 (Acetilada)	

Tabela 39 (cont.): Substâncias identificadas na análise de FSM por CLAE-EM nos modos positivo e negativo de ionização.

Pico	TR (min)	m/z experimental	Fórmula	m/z teórico	Erro (ppm)	Fragmentação	Proposta	Ref
69	84,9	1353,6363 [M-H]- 1399,6420 [M+FA-H]-	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₁	1353,6332 [M-H]-	2,29	1353 ; 1221; 665; 483 1353 ; 1221	Saponina 3	
70	85,0	1221,5901 [M-H]- 1267,5967 [M+FA-H]- 1205,5966 [M+H-H ₂ O]+	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₇	1221,5909 [M-H]- 1205,5949 [M+H-H ₂ O]+	-0,65 1,41	1221 ; 665; 555; 483 1221 ; 665; 483 469 ; 451; 279; 225; 147	Saponina 4	
71	85,1	1395,6458 [M-H]-	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₂	1395,6437 [M-H]-	1,5	1395 ; 1353; 797; 483	Derivado acetilado da Saponina 3	
72	85,2	1263,6008 [M-H]- 1309,6063 [M+FA-H]- 1247,6067 [M+H-H ₂ O]+	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	1263,6015 [M-H]- 1247,6055 [M+H-H ₂ O]+	-0,55 0,96	1263; 1221 ; 665; 555; 483 1263 ; 1221; 665; 483 469; 451; 225; 189 ; 171	Derivado acetilado da Saponina 4	
73	85,3	1249,5871 [M-H]-	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	1249,5858 [M-H]-	1,04	1249 ; 1207; 665; 469	Saponina 5 (Acetilada)	
74	91,6	593,2757 [M+H]+	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2758 [M+H]+	-0,16	593 ; 533	Feoforbídeo a	[4]
75	93,6	885,5548 [M+H]+	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆	885,5524 [M+H]+	2,71	885; 607 ; 547	Feofitina b	[4]
76	99,1	871,5730 [M+H]+	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871,5731 [M+H]+	-0,22	871 ; 593; 533	Feofitina a	[4]

[1] - Ammar et al., 2017; [2] - Duan et al., 2017; [3] - Wu et al., 2016; [4] - Bijttebier et al., 2016; [5] - Sun et al., 2015; [6] - Kucharska & Fecka, 2016; [7] - Quirantes-Piné et al., 2009; [8] - Fu et al., 2014; [9] - Rodríguez-Pérez et al., 2018; [10] - W. Zhou et al., 2018; [11] - Qiao et al., 2016; [12] - J. Xu et al., 2013

*Os sinais em negrito representam o fragmento de maior intensidade.

Conforme mencionado acerca da variabilidade química de FSM, foram evidenciadas substâncias oriundas do metabolismo primário e secundário, sendo identificados 16 feniletanoides, 9 iridoides, 24 flavonoides, 8 saponinas, entre outras classes.

Seguindo a tendência descrita na análise dos demais extratos, os primeiros metabólitos identificados em FSM corresponderam a ácidos orgânicos (**1, 4**) e aminoácidos e seus derivados (**2, 3, 5**). Esses foram identificados pela comparação do íon molecular e, quando possível, de seus fragmentos com dados da literatura. As perdas usualmente observadas para essas classes são de CO₂ e de NH₃.

Na sequência dos picos do cromatograma foram observados os primeiros derivados cinâmicos (**6, 11, 12, 15**) através do fragmento m/z 191 característico do ácido quínico. Esses derivados foram identificados como isômeros do ácido clorogênico (**6, 15**) e do ácido cumaroilquínico (**12**). Já para a substância **11** foram observados os fragmentos m/z 179 [M-H-Glc]⁻, 161 [M-H-Glc-O]⁻ e 135 [M-H-Glc-CO₂]⁻ referente a um resíduo de ácido cafeico.

Assim como na análise do extrato da erva-cidreira (FLM), que pertence à mesma família do gervão-roxo (FSM), foi evidenciado a presença de alguns feniletanoides (**8, 18, 25, 28, 32, 40, 42, 45, 46, 52-54, 59, 61, 62, 64**) que foram facilmente identificados por apresentar perdas que resultam em fragmentos de massa característica de derivados cinâmicos. As substâncias **25, 28, 32, 40, 42, 45, 46, 52, 53 e 64**, que possuem um ácido cafeico como substituinte, apresentaram fragmentos de m/z 179 e/ou 161 referente da perda de açúcar. Já as substâncias **59, 61, 62** apresentaram fragmento m/z 175 referente ao substituinte ferúlico. De maneira semelhante, o fragmento m/z 145 evidenciou a presença de um substituinte cumárico na substância **54**. Outros fragmentos foram observados para essas substâncias, sendo referentes às perdas de glicosídeos. Em alguns casos, também foi observado um fragmento m/z 135 que se mostrou referente à porção dihidroxifeniletil (**8**), e a perda característica de H₂O [M-H-H₂O]⁻ que os β-hidroxi-feniletanoides exibem (**25**).

Outra classe de substância comum aos extratos FLM e FSM foram os iridoides. Na análise de FSM foram identificados nove iridoides (**9, 10, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22**) que se apresentaram na forma de ésteres metílicos e glicosilados. Na maioria dos casos, os principais fragmentos apresentados se mostraram referentes às perdas de glicose [M-H-Glc]⁻ ou [M-H-Glc-O]⁻. Também foram observadas quebras mais complexas como as que ocorrem no anel pirano (**14, 16, 17**) e quebras simples como perda de CH₃CO₂, H₂O e OCH₃ (**10, 13, 16, 21, 22**).

A classe metabólica de maior abundância em FSM foram os flavonoides. Ao todo foram detectados 24 flavonoides sendo em sua grande maioria flavonas O-

glicosiladas. A identificação foi baseada nos sinais referente às agliconas, sendo: m/z 269 para **41**; m/z 285 em **30**, **31**, **33** e **38**; m/z 299 para as substâncias **47** a **51**, m/z 301 para **23**, **26** e **29**, m/z 315 para **34-37**, **39** e **44**; e m/z 329 para **55-58**, que correspondem, respectivamente, a apigenina, luteolina, hispidulina (6-metoxi-apigenina), 6-hidroxluteolina, nepetina (6-metoxi-luteolina) e jaceosidina (6,3'-dimetoxi-luteolina). Os fragmentos observados são referentes às perdas de 132 Da (xilósídeo), 162 Da (glicose), 176 Da (ácido glicurônico) e 294 Da (glicosil-xilosídeo). Ainda, para as substâncias metoxiladas foram observadas perdas de CH₃.

Tal como descrito para a amostra FLM, diversas saponinas foram observadas em FSM. Essas apresentaram fragmentos de m/z 483 e m/z 469 que se mostram referente à aglicona, após a perda de todos os açúcares. Outros fragmentos observados são oriundos das sucessivas perdas dos açúcares, perdas de H₂O e grupo acetil. Das oito saponinas (**66-73**) identificadas, cinco apresentaram acetilação (**67**, **68**, **71-73**) sendo que algumas se mostraram derivadas de outras saponinas (**67**, **71**, **72**). Os espectros de massas e as propostas de fragmentação da saponinas e demais substâncias identificadas em FSM são apresentadas na **Figura 88**.

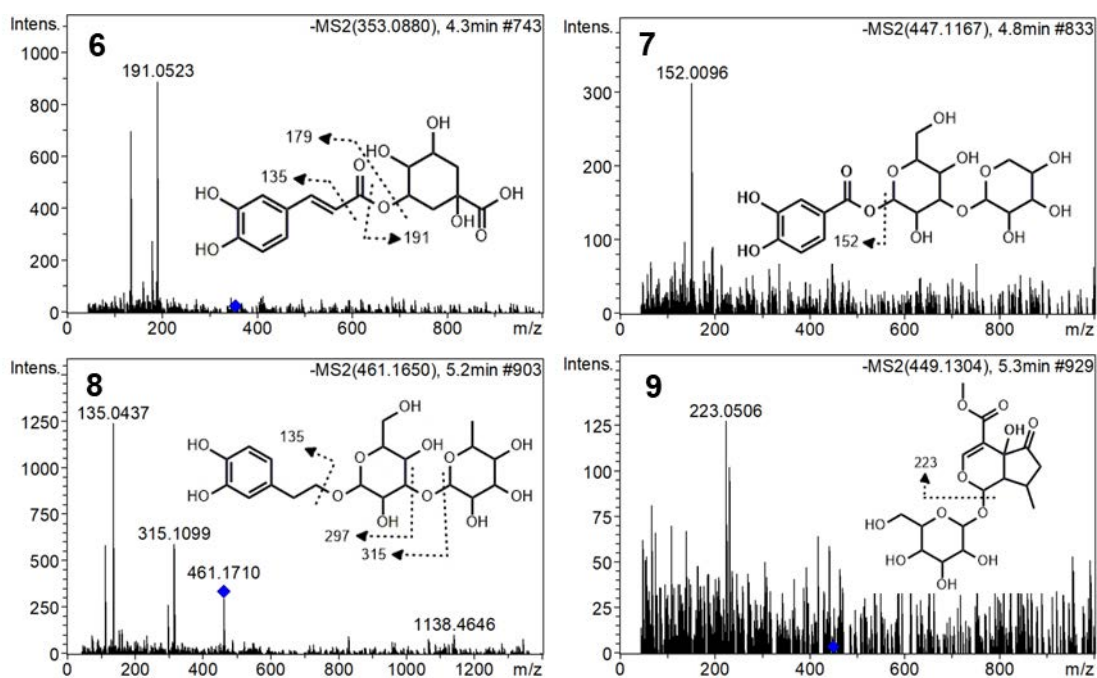


Figura 88: Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

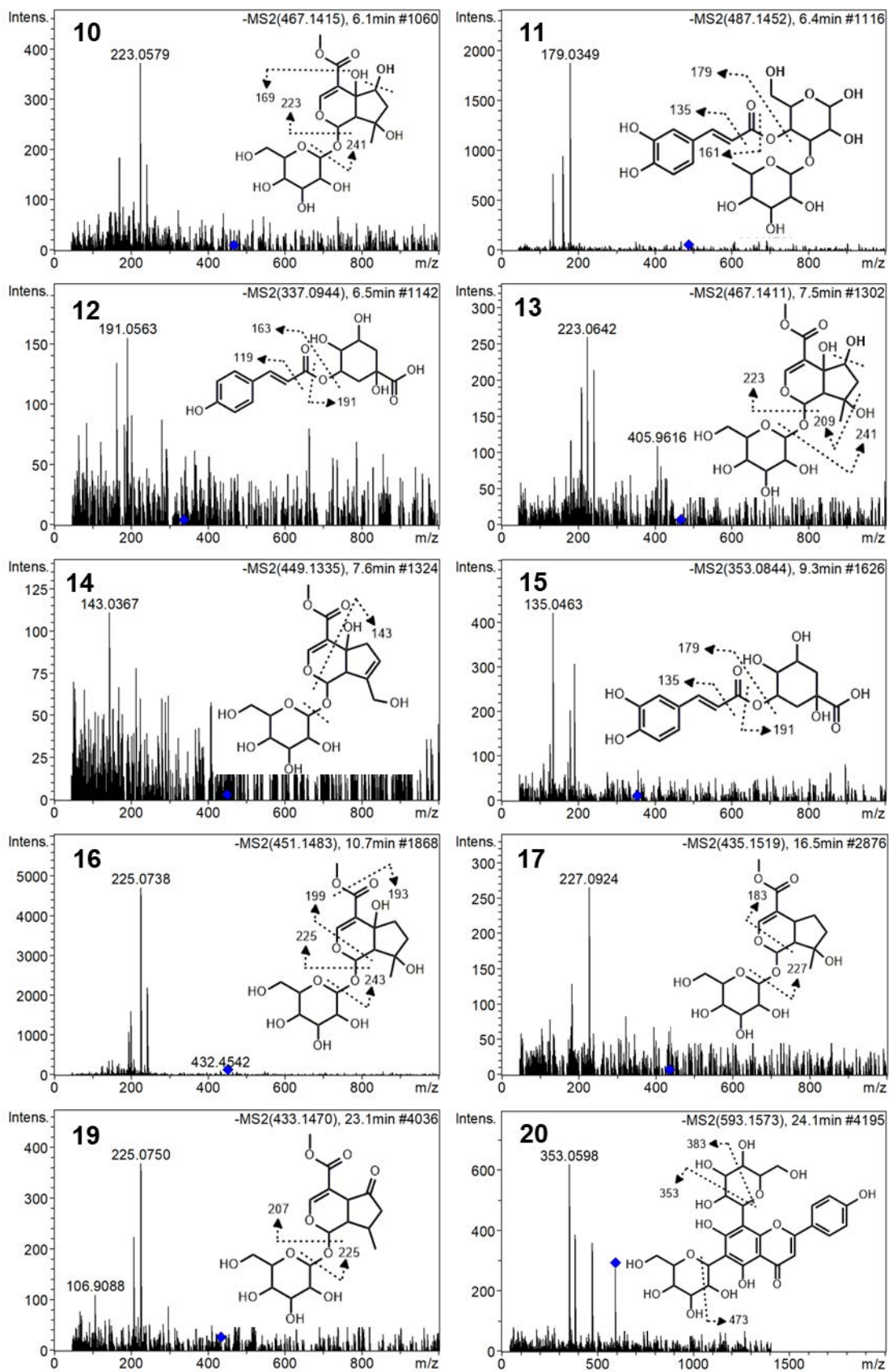


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

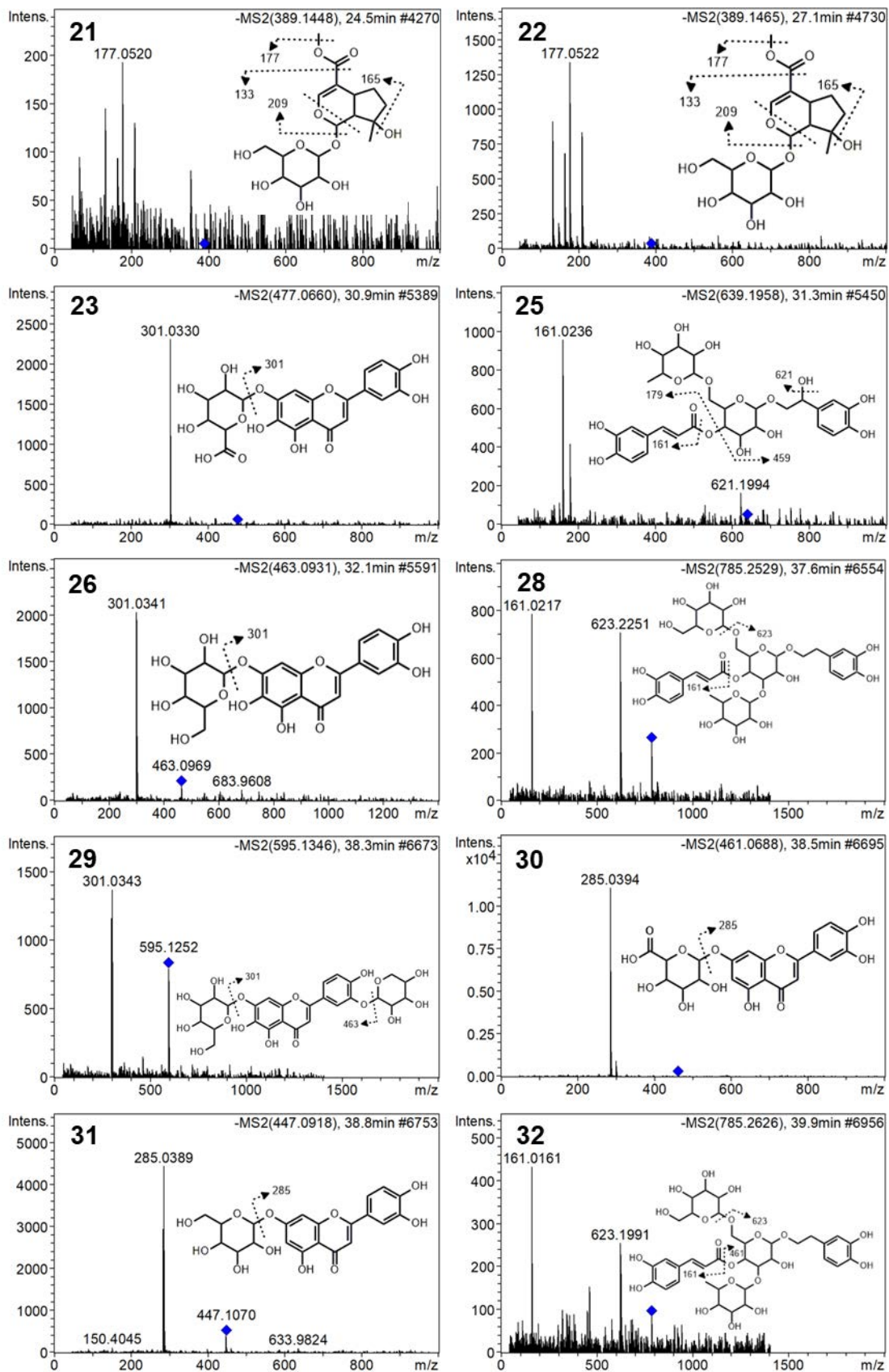


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

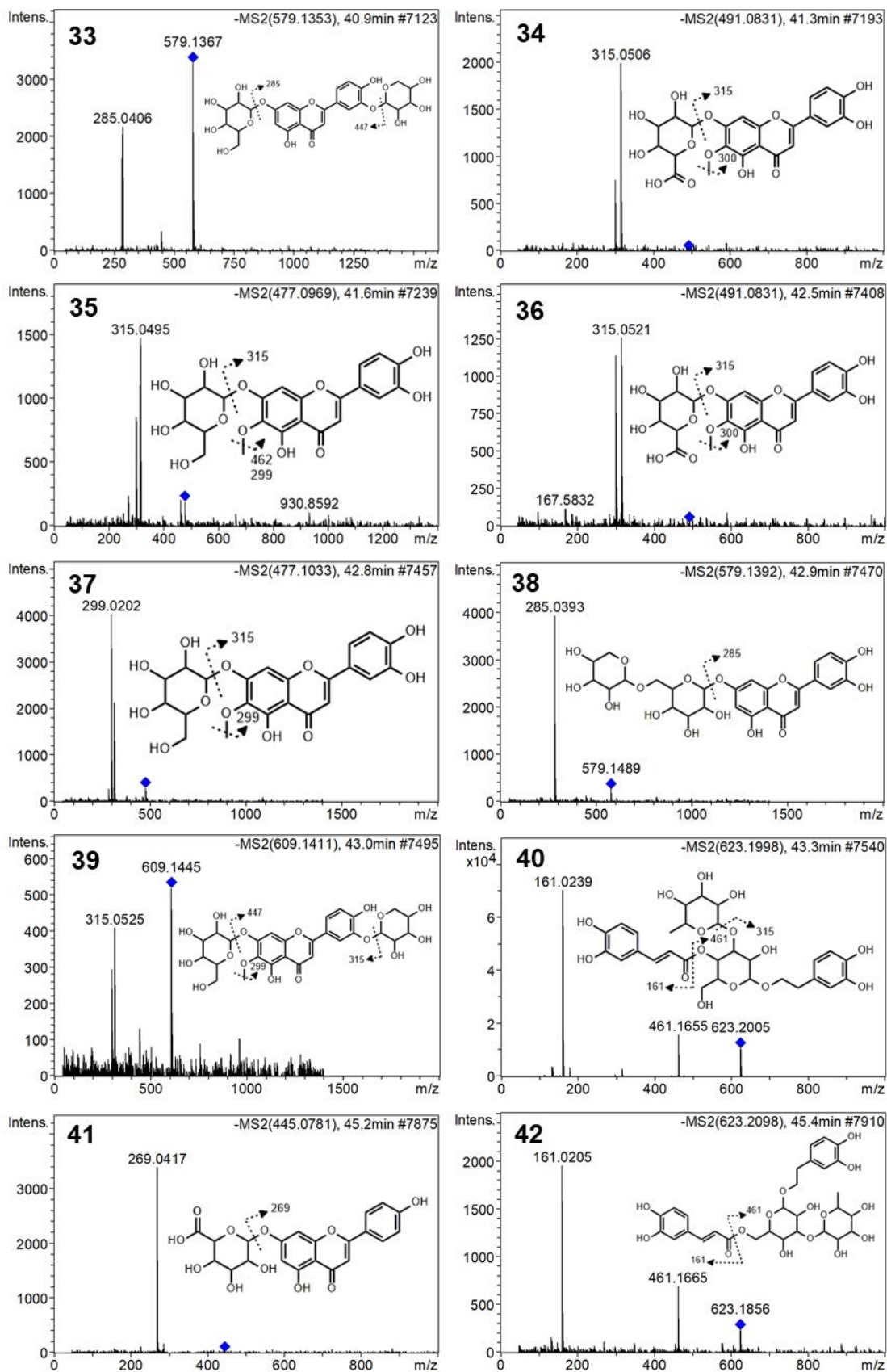


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

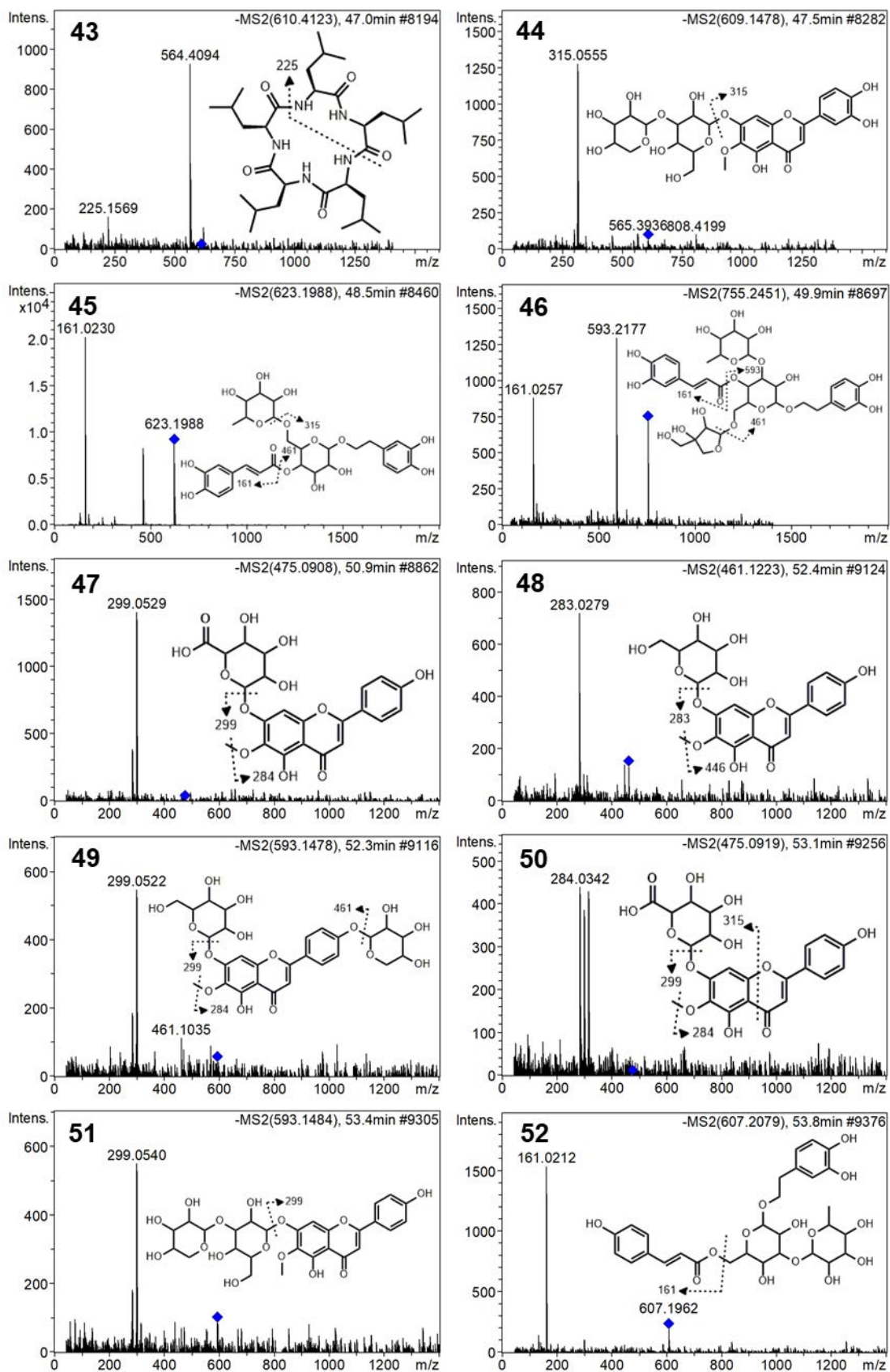


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

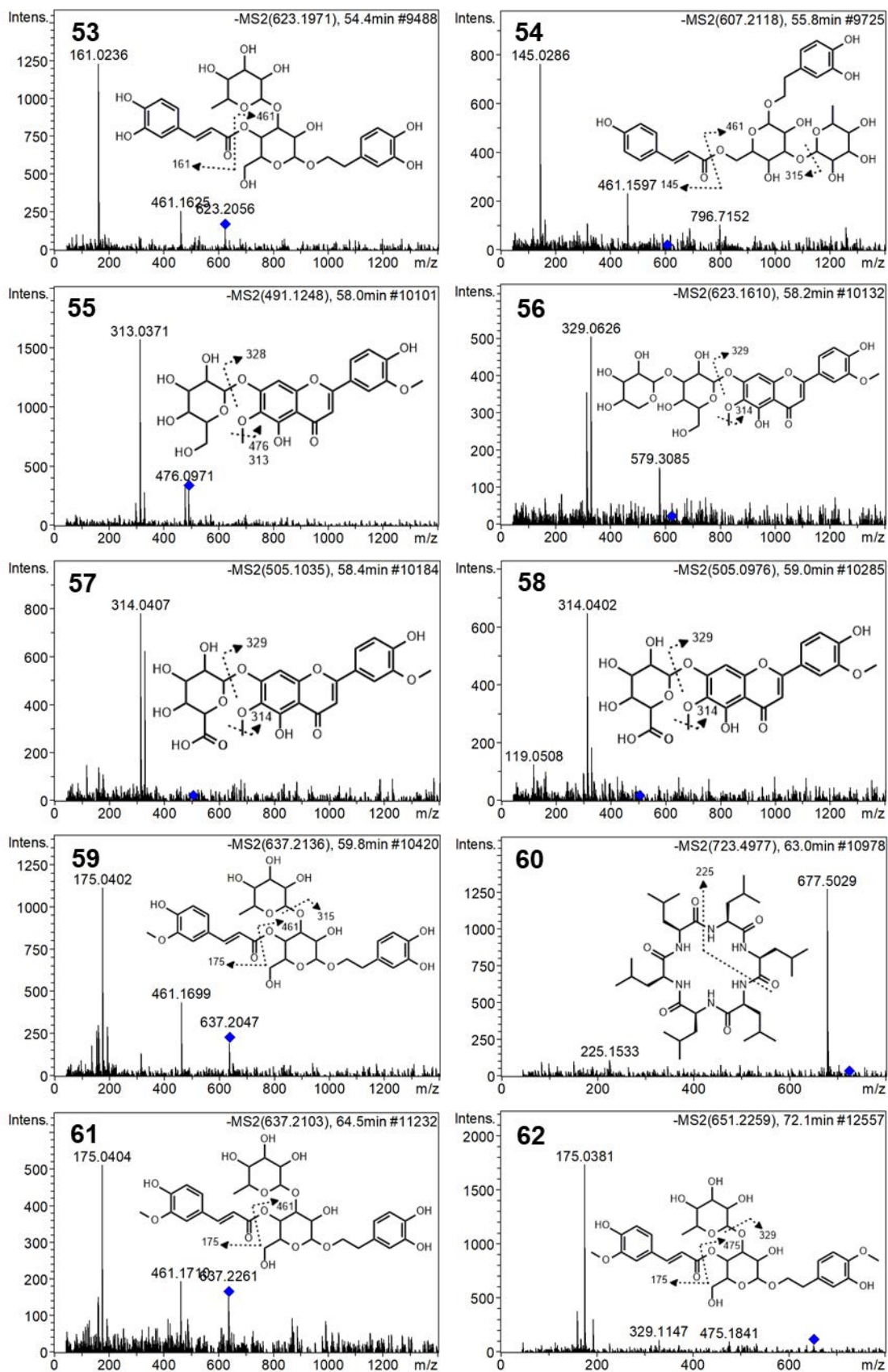


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

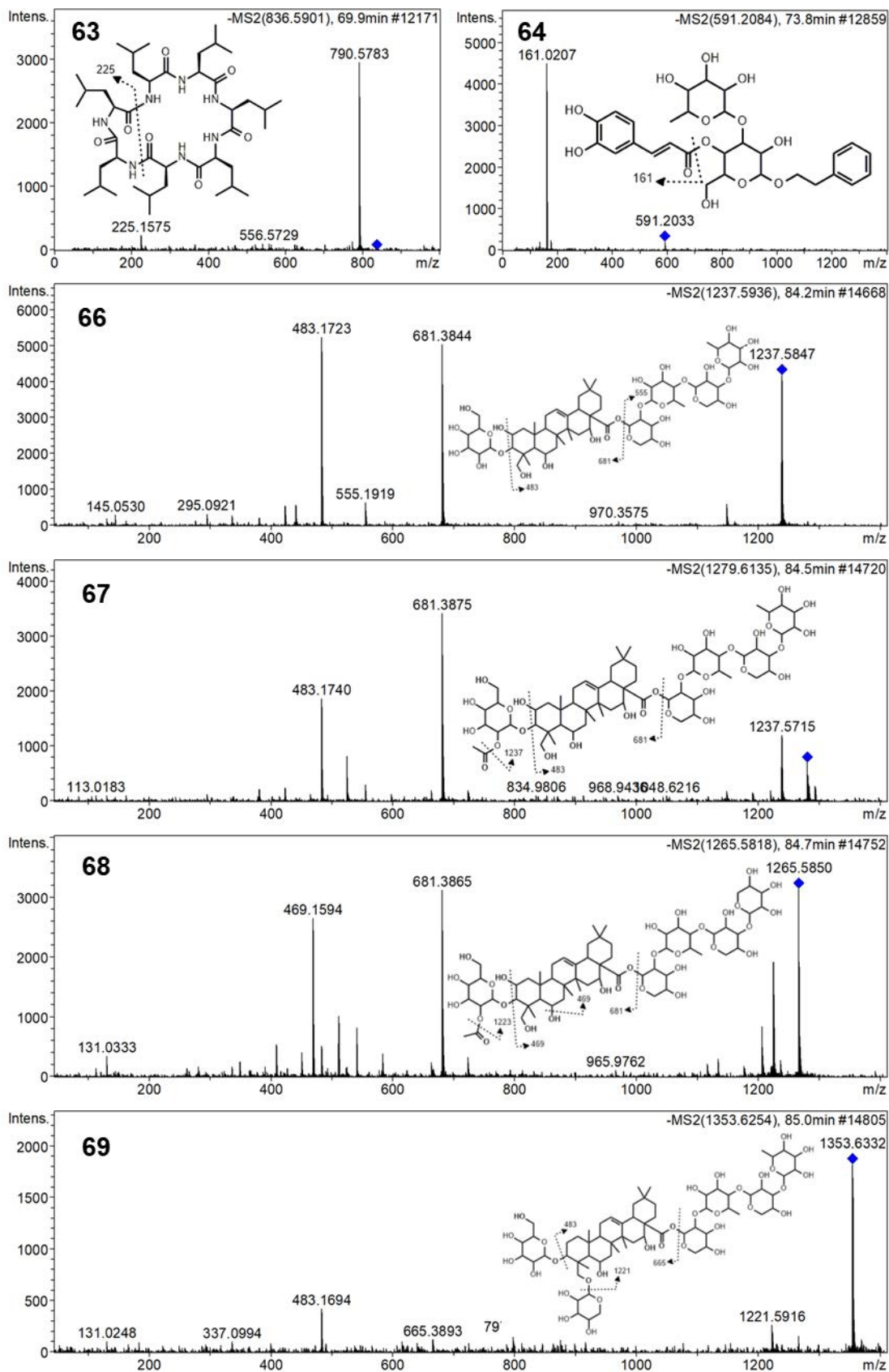


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

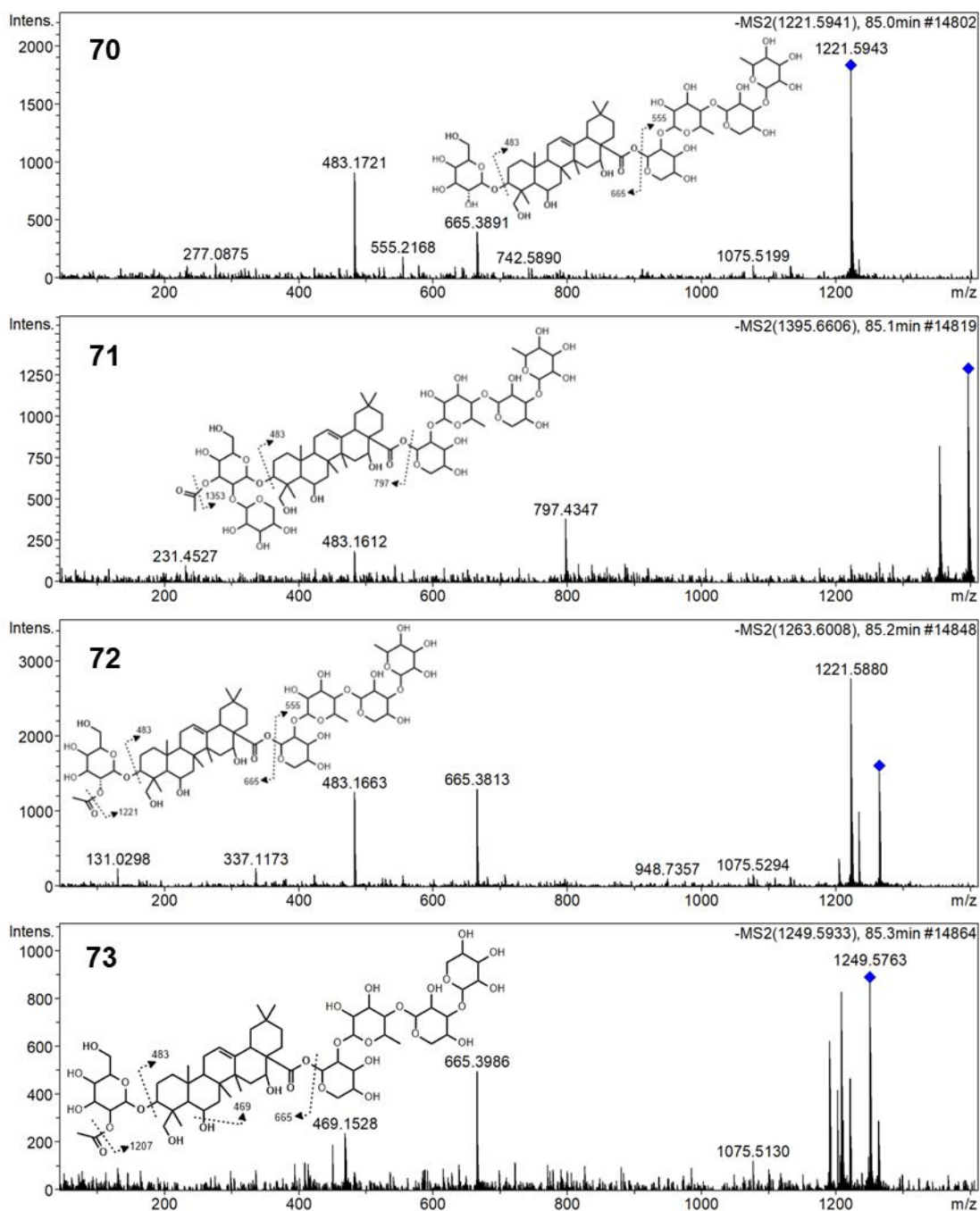


Figura 88 (cont.): Espectros de MS² das substâncias identificadas em FSM e suas propostas de fragmentação.

A composição química de *S. cayennensis* ainda se mostra pouco explorada, restringindo-se a poucos estudos que descreveram apenas a ocorrência de iridoides, terpenoides e feniletanoides (Froelich et al., 2008; Leitao et al., 2005). Substâncias como flavonoides e saponinas, por exemplo, não possuem relatos quanto a sua ocorrência na espécie e até mesmo no gênero. De modo geral, a fitoquímica do gênero *Stachytarpheta* necessita maior atenção, por abranger diversas espécies de uso medicinal com poucas informações a cerca de seus metabólitos. A escassez de

estudos fica evidente ao observar que existe apenas um único estudo descrevendo a ocorrência de flavonoides em *Stachytarpheta* (Duret, Jacquemin, & Paris, 1976).

Por outro lado, feniletanoides e iridoides são substâncias conhecidas nas espécies de *Stachytarpheta*, de modo que a ocorrência de ambas já foi descrita em *S. cayennensis*. Os feniletanoides como o acteosideo (**40**), isoacteosideo (**42**), leucosceptosídeo A (**59**), martinósideo (**62**) e jionósideo D foram descritos em trabalhos anteriores, sendo o acteosideo, considerado o constituinte majoritário na espécie (Froelich et al., 2008; Leitao et al., 2005). O caráter majoritário desta substância foi evidenciado pela análise de FSM por RMN.

De maneira semelhante, os iridoides 6 β -hidroxipolamiida (**10**, **13**) e ipolamiida (**16**) foram descritos em *S. cayennensis* (Adebajo et al., 2007; Futuro & Kaplan, 1998). Como os dados de fragmentação acerca de iridoides são escassos e por vezes controversos, optou-se pela busca por candidatos já descritos no gênero. Diversas substâncias foram assinaladas devido a sua ocorrência em outras espécies do gênero e da família. Por outro lado, a presença da ipolamiida (**16**) foi assegurada devido a análise de FSM por RMN que permitiu a identificação deste constituinte majoritário do extrato.

Por conta da escassez de dados acerca dos flavonoides presentes nas espécies de *Stachytarpheta*, todas as identificações foram baseadas no único estudo que descreve sua ocorrência. Neste trabalho, os autores identificaram 7-O-glicuronídeos das flavonas apigenina, luteolina e 6-hidroxiluteolina. Foi descrito ainda a ocorrência de substituintes metilados em alguns flavonoides (Duret et al., 1976).

No melhor do nosso conhecimento, não há ocorrências de saponinas no gênero *Stachytarpheta*. A presença de saponinas em FSM é suportada pela ocorrência dessas substâncias em outros gêneros da família, tal como *Lippia* (Farias et al., 2010). A observação de perfil de fragmentação semelhante ao das saponinas descritas para FLM confirmam a mesma aglicona. O perfil de glicosilação na posição 28 apresentando xilose-ramnose-xilose-ramnose também foi evidenciado para as substâncias **66**, **67**, **69-72**.

5.6.3. INVESTIGAÇÃO HEMODINÂMICA DE FSM

Na investigação hemodinâmica de FSM foram avaliados 10 animais dos quais nove foram adequados para análise dos dados. Esse teste mostrou que o extrato FSM produz uma hipotensão ligeiramente mais intensa que o DMSO, embora tenha sido observado um maior tempo para reestabelecimento dos parâmetros iniciais (**Figura 89**).

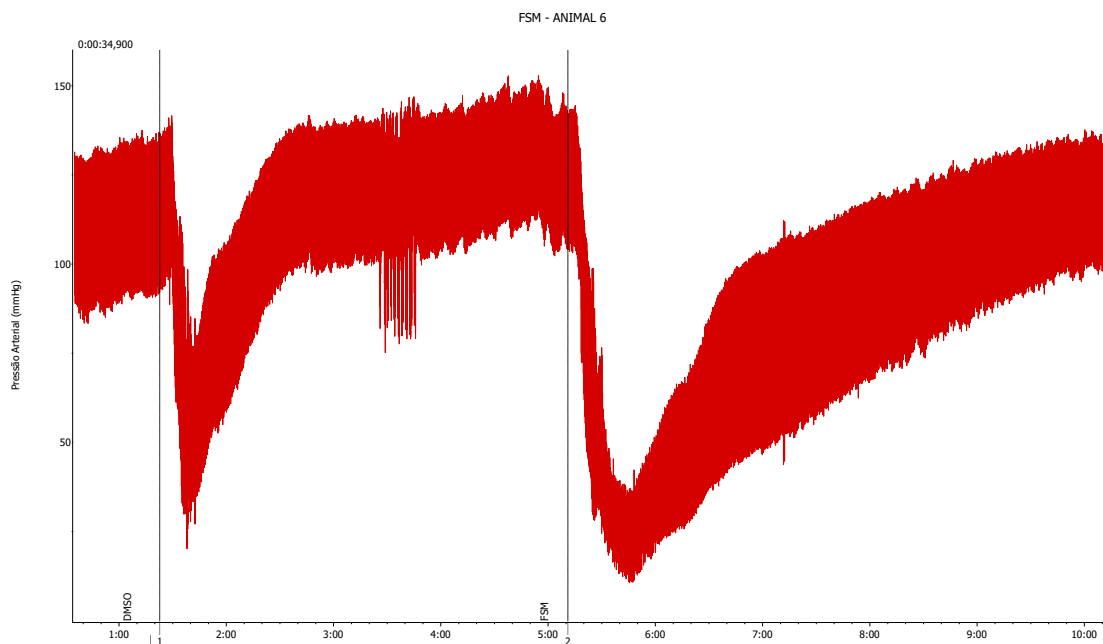


Figura 89: Gráfico de pressão arterial (mmHg) vs tempo (min) em rato Wistar macho após injeção de DMSO e do extrato FSM, respectivamente.

Conforme mencionado anteriormente, os efeitos de FSM sobre as PAS, PAM e PAD foram ligeiramente diferentes dos produzidos pelo DMSO, sendo evidenciada uma diminuição de $63,6 \pm 8,7$ mmHg na PAS que se mostrou apenas $12,8 \pm 5,1$ mmHg maior que do DMSO. Para as PAM e PAD foi observada uma redução de $66,0 \pm 7,7$ mmHg e de $64,71 \pm 6,8$ mmHg que se mostrou, respectivamente, $9,7 \pm 3,0$ mmHg e $7,2 \pm 2,9$ mmHg, maior do que o DMSO. Embora os efeitos causados pelo extrato tenham se mostrados diferente em relação ao controle ($p < 0,001$), nenhum destes apresentou diferença significativa quando comparado com o DMSO (**Figura 90**).

Em relação à frequência cardíaca, o extrato FSM não apresentou efeito bradicárdico, pois promoveu uma redução de $75,0 \pm 14,3$ bpm que se mostrou menor do que a causada pelo DMSO ($91,2 \pm 28,4$ bpm) (**Figura 90**).

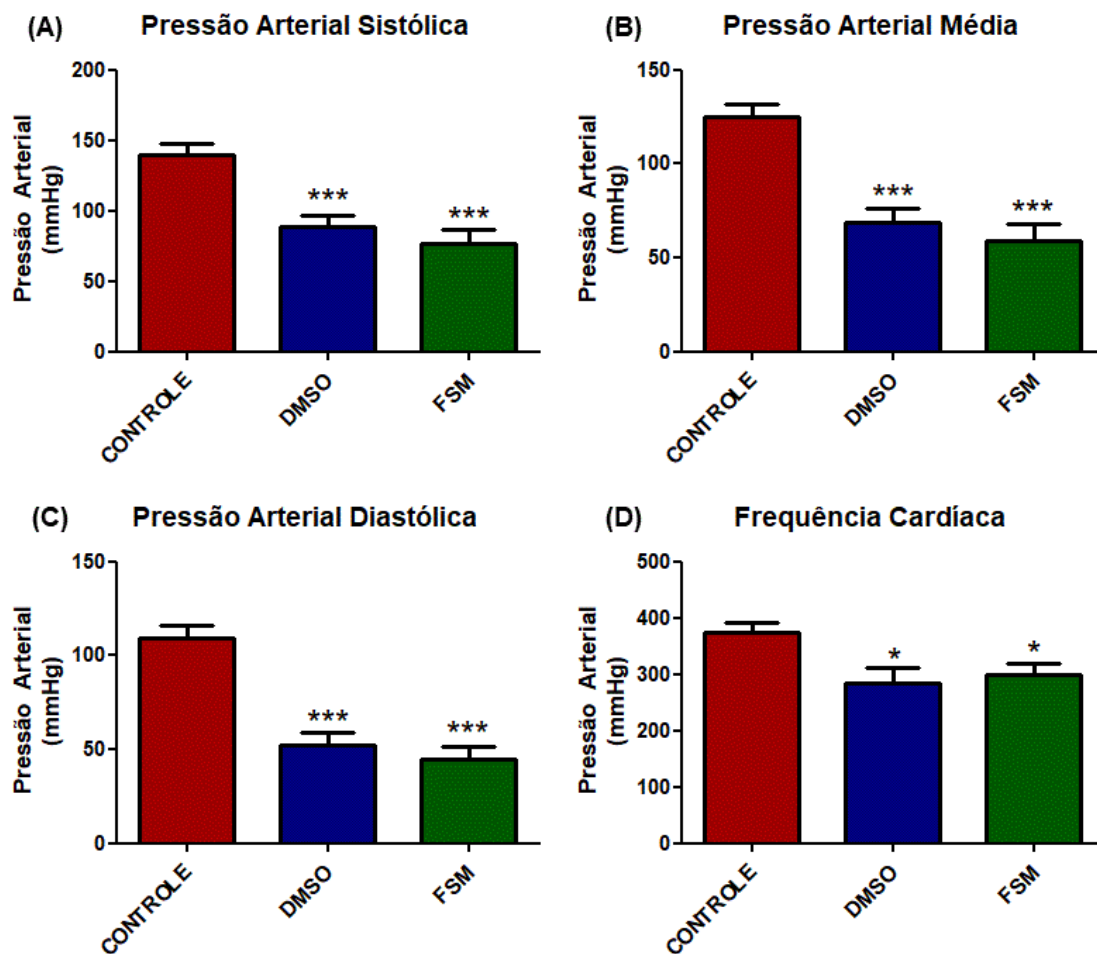


Figura 90: Gráficos das pressões arterial sistólica (A), média (B), diastólica (C) e da frequência cardíaca (D) após injeção de DMSO e do extrato FSM em ratos Wistar machos. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; e para o DMSO: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

Embora gervão-roxo (*S. cayennensis*) seja utilizado popularmente no tratamento da hipertensão, não existem estudos descrevendo alguma propriedade cardiovascular de extratos dessa planta. Para as espécies do gênero foi encontrado apenas um estudo que descreve o efeito hipotensor do extrato aquoso das folhas de *S. jamaicensis* em coelhos normotensos anestesiados. A administração do extrato por via intravenosa nas doses de 2,5, 5, 10, 20, 40 e $80\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ promoveu diminuição dose-dependente da PAM e da frequência cardíaca. Embora os autores não tenham realizado a análise estatística dos dados, os resultados apresentados sugerem que o extrato possua atividade hipotensora (Idu et al., 2006).

A análise química de FSM por RMN e CLAE-EM revelou a ipolamiida como componente majoritário, seguido pelo acteosídeo. Não existem evidências na literatura especializada sobre o efeito cardiovascular da ipolamiida na literatura. Por outro lado, diversos iridoides apresentam efeito inotrópico e cronotrópico negativos, acarretando na diminuição da pressão arterial (Ghisalberti, 1998). Embora as alterações nas

pressões arteriais produzidas pelo extrato FSM não tenham se mostrado estatisticamente significativas é possível sugerir que a ipolamiida não tenha colaborado com este efeito. Além disso, o acteosideo, que foi detectado em menor quantidade nesse extrato, pode ser responsável, em parte, pelos efeitos hipotensores de FSM.

5.6.4. INVESTIGAÇÃO DE FSM SOBRE A CAPACIDADE MOTORA

A avaliação de FSM apresentou efeitos semelhantes aos descritos para FLM, não tendo sido observado a ocorrência de efeitos tóxicos. A administração desse extrato causou significativa perda na capacidade motora dos camundongos analisados, tendo sido evidenciado efeitos em todos os intervalos avaliados. No intervalo de 15 minutos foi observado um tempo de permanência de $139,6 \pm 2,8$ s que se mostrou estatisticamente diferente do controle ($p < 0,001$) e menor do que o efeito causado pelo diazepam ($132,8 \pm 2,6$ s). O efeito foi gradativamente diminuído com o tempo, tendo sido observadas permanências de $159,0 \pm 2,3$ s, $164,0 \pm 2,3$ s e $168,3 \pm 1,7$ s nas análises de 30, 60 e 90 minutos, que se mostram diferentes do grupo controle ($p < 0,001$). Por fim, foi evidenciado efeito significativo do extrato com o tempo de 120 min ($p < 0,01$). Em relação ao diazepam, FSM apresentou menor efeito nos intervalos de 15 ($p < 0,05$), 30 e 60 minutos ($p < 0,001$). Após os 90 minutos da administração do extrato mostrou efeito equivalente, tendo sido evidenciado ainda um efeito maior do que o causado pelo diazepam no tempo de 120 minutos ($p < 0,05$) (**Figura 91**).

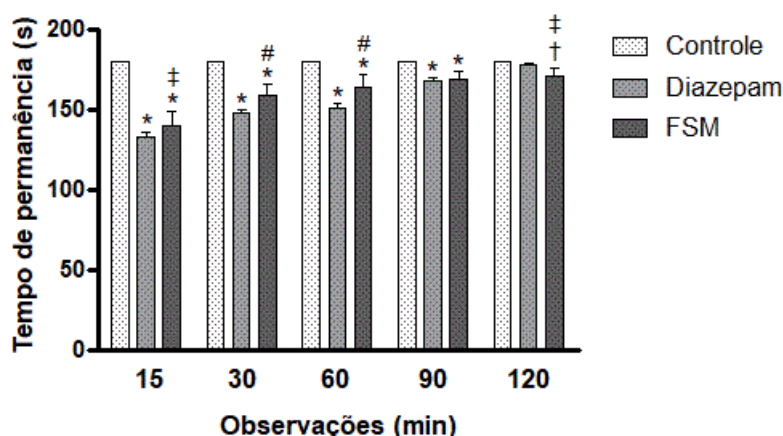


Figura 91: Resultados da avaliação de FSM pelo teste RotaRod. Diferenças estatisticamente significativa para o controle: * - $p < 0,001$, † - $p < 0,01$; e para o diazepam: # - $p < 0,001$, ‡ - $p < 0,05$.

Os dados a cerca das alterações locomotoras causadas por *S. cayennensis* se limitam a observações em testes de ansiedade e toxicidade. A observação dos efeitos do extrato aquoso da planta inteira avaliados nas concentrações de 0,5, 1 e 2 g·kg⁻¹ revelou diminuição na locomoção espontânea dos animais (Vela et al., 1997). Outro estudo também revelou diminuição na atividade locomotora dos animais após administração do extrato hidroalcoólico das folhas por via intraperitoneal. Outros parâmetros foram avaliados e mostraram que o extrato possui atividade sedativa e ansiolítica, com possível participação nos receptores GABA (Olayiwola et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

A investigação química dos extratos conduzida pela análise metabolômica mostrou-se eficaz, pois permitiu a identificação de diversos constituintes utilizando pequenas quantidades de material. A análise dos extratos em clorofórmio por RMN revelou a presença de constituintes característicos como as kavalactonas presentes no extrato de *Alpinia zerumbet* (gurdumão) e o fenilpropanoide *trans*-anetol encontrado no extrato de *Foeniculum vulgare* (erva-doce). De maneira semelhante, a investigação dos extratos metanólico das plantas estudadas permitiu a identificação de substâncias oriundas do metabolismo primário como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, além de substâncias do metabolismo secundário como flavonoides, taninos gálicos, derivados cinâmicos, feniletanoides, iridoides e kavalactonas. Algumas substâncias são características das espécies estudadas e foram observadas em grandes quantidades como o ácido rosmarínico em *Ocimum basilicum* (manjerição), o acteosideo em *Lippia alba* (erva-cidreira) e *Stachytarpheta cayennensis* (gervão-roxo), e o iridoide ipolamiida em *S. cayennensis*.

A fim de verificar a possibilidade de detecção dessas substâncias de maneira rápida foi realizada a extração com solventes deuterados. A análise desses revelou a presença dos constituintes observados pela análise dos extratos convencionais, sendo possível identificar rapidamente, por exemplo, quatro feniletanoides e um iridoide no extrato metanólico rápido do gervão-roxo. Embora pequenas diferenças nas intensidades de alguns sinais tenham sido evidenciadas, essas não prejudicaram a identificação das substâncias.

Além disso, a aplicação da metodologia quantitativa por RMN permitiu determinar o teor de ácido rosmarínico, acteosideo e ipolamiida presentes nos extratos do manjerição, erva-cidreira e gervão-roxo. A adição de quantidades conhecidas de padrão interno correlacionadas com as áreas dos sinais de interesse permitiu, de maneira rápida, a quantificação desses metabólitos, com destaque para a quantidade significativa de acteosideo no extrato da erva-cidreira e de ipolamiida no extrato do gervão-roxo.

Esses resultados corroboram o crescente interesse na utilização da RMN na análise de extratos vegetais por ser uma técnica de análise rápida, além de possibilitar a identificação de diversos constituintes característicos das espécies e, em alguns casos, quantificá-los.

Ainda em relação à análise metabolômica, a investigação dos extratos metanólicos por CLAE-EM mostrou-se bastante eficaz por permitir a identificação de 333 metabólitos. Além disso, foi possível verificar as tendências metabólicas de cada

espécie, com destaques para o gurdumão que apresentou uma grande quantidade de flavonoides e para a erva-cidreira que revelou a presença de diversos feniletanoides. Não obstante, as análises por CLAE-EM revelaram a presença de constituintes não descritos anteriormente para as espécies. A ocorrência de flavonoides e saponinas são descritas pela primeira vez em *S. cayennensis*, enquanto que diversos constituintes sulfatados, sendo alguns inéditos no reino vegetal, foram observados em *C. carthagenensis*.

Desta forma, a CLAE-EM demonstrou seu potencial na análise de extratos vegetais por permitir a identificação de um grande número de substâncias em cada extrato, além de possibilitar a observação de tendências metabólicas desconhecidas. Embora a identificação inequívoca de alguns isômeros seja dificultada por esta análise, a CLAE-EM revelou a presença de diversos constituintes potencialmente inéditos no reino vegetal.

A investigação hemodinâmica dos extratos revelou que cinco das seis espécies avaliadas apresentaram efeitos significativos sobre a pressão arterial dos animais. Apenas o extrato do gervão-roxo não apresentou efeitos significativos embora tenha sido observada uma diminuição das PAS, PAM e PAD em relação ao DMSO. Futuras investigações hemodinâmicas desse extrato se mostram interessantes, a fim de verificar se o mesmo apresenta efeito hipotensor em concentrações mais elevadas. Alguns extratos como o da sete-sangrias e o da erva-cidreira também apresentaram redução na frequência cardíaca dos animais. Embora esse efeito possa sugerir que esses extratos promovam o bloqueio de receptores β -adrenérgicos no coração, outros estudos se fazem necessário a fim de assegurar essa hipótese, uma vez que a atividade reflexa mediada pelos barorreceptores e a atuação dos extratos a nível central também podem contribuir para a diminuição da frequência cardíaca. Além disso, foi evidenciado pelo ensaio RotaRod que os extratos apresentaram efeitos significativos sobre a coordenação motora dos animais, tendo sido observado ainda que dois dos extratos avaliados apresentaram efeitos tóxicos. Desta forma, os resultados da análise hemodinâmica corroboram a utilização popular dessas espécies vegetais no tratamento da hipertensão arterial, embora estudos acerca da toxicidade dos extratos se façam necessários.

A significativa ocorrência de ácido rosmarínico no manjeriço e de acteosideo na erva-cidreira sugere que essas substâncias sejam os principais responsáveis pelos efeitos observados. É sabido que ambas as substâncias são capazes de modular a pressão arterial, atuando em diferentes alvos celulares. Além disso, a menor quantidade de acteosideo no extrato do gervão-roxo somada a maior concentração de ipolamiida no mesmo, sugere que o iridoide não detenha atividade sobre as pressões

arteriais e que o ligeiro efeito hipotensor observado pode ser atribuído à presença de outros constituintes do extrato.

A investigação de frações enriquecidas com a ipolamiida e de frações sem a mesma é interessante, a fim de elucidar o envolvimento desse constituinte no efeito hipotensor do gervão-roxo. Não obstante, a elevada ocorrência de flavonoides, e em especial o kaempferol-O-glicosídeo que foi identificado como substância majoritária no extrato do gurdumão sugere que essa classe de substância é a responsável por parte dos efeitos hipotensores observados.

Infelizmente, não é possível sugerir uma classe de substância responsável pelos efeitos observados nos extratos da sete-sangrias e da erva-doce, uma vez que as substâncias identificadas por CLAE-EM apresentam, em sua maioria, caráter minoritário. Por outro lado, é possível que os flavonoides e as substâncias sulfatadas respondam por parte dos efeitos observados para a sete-sangrias, enquanto que os derivados cinâmicos possam estar envolvidos nos efeitos da erva-doce. Novos estudos se fazem necessário, a fim de validar essas hipóteses.

REFERÊNCIAS

- Abdul-Ghani, A. S., & Amin, R. (1988). The vascular action of aqueous extracts of *Foeniculum vulgare* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 24(2–3), 213–218.
- Abdulmanea, K., Prokudina, E. A., Lanková, P., Vaníčková, L., Koblůvská, R., Zelený, V., & Lapčík, O. (2012). Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 237–243.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Quirantes-Piné, R., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). HPLC-ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*, 46(1), 108–117.
- Abu-Reidah, I. M., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., & Ferreres, F. (2017). Phenolic composition profiling of different edible parts and by-products of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by using HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Research International*, 100, 494–500.
- Adebajo, A. C., Olawode, E. O., Omobuwajo, O. R., Adesanya, S. A., Begrow, F., Elkhawad, A., ... Verspohl, E. J. (2007). Hypoglycaemic constituents of *Stachytarpheta cayennensis* leaf. *Planta Medica*, 73(3), 241–250.
- Adigüzel, A., Güllüce, M., Sengül, M., Ögütcü, H., Sahin, F., & Karaman, I. (2005). Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. *Turkish Journal of Biology*, 29, 155–160.
- Agra, M. D. F., De Freitas, P. F., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(1), 114–140.
- Ahmad, M., Rizwani, G. H., Aftab, K., Ahmad, V. U., Gilani, A. H., & Ahmad, S. P. (1995). Acteoside: A new antihypertensive drug. *Phytotherapy Research*, 9(7), 525–527.
- Ahn, J., Chae, H. S., Chin, Y. W., & Kim, J. (2017). Dereplication-Guided Isolation of New Phenylpropanoid-Substituted Diglycosides from *Cistanche salsa* and Their Inhibitory Activity on NO Production in Macrophage. *Molecules*, 22(7), 1138.
- Akhtar, M. S., & Munir, M. (1989). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 27(1–2), 163–176.
- Akisue, G., Alvarenga, M. de, Marden, A., Barros, D., & Gottlieb, O. (1981). Presença de ipolamida em *Stachytarpheta australis* Moldenke. *Anais de Farmácia e Química de São Paulo*, 21(1), 57–60.
- Al Disi, S. S., Anwar, M. A., & Eid, A. H. (2016). Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action: Part I. *Frontiers in Pharmacology*, 6(Article 323), 1–24.
- Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I. E., & Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065–1076.
- Almeida, C. E., Karnikowski, M. G. O., Foleto, R., & Baldisserotto, B. (1995). Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saude Publica*, 29(6), 428–433.
- Ammar, S., Contreras, M. del M., Gargouri, B., Segura-Carretero, A., & Bouaziz, M. (2017). RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochemical Analysis*, 28(3), 217–229.
- Amrani, S., Harnafi, H., Gadi, D., Mekhfi, H., Legssyer, A., Aziz, M., ... Bosca, L. (2009). Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 157–162.
- Andrighetti-Fröhner, C. R., Sincero, T. C. M., Da Silva, A. C., Savi, L. A., Gaido, C. M., Bettega, J. M. R., ... Simões, C. M. O. (2005). Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, 76(3–4), 374–378.

- Atkins, S. (2005). The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. *Kew Bulletin*, 60(2), 161–272.
- Ayele, Y., Urga, K., & Engidawork, E. (2010). Evaluation of *in vivo* antihypertensive and *in vitro* vasodepressor activities of the leaf extract of *Syzygium guineense* (willd) D.C. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1457–1462.
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., & Bandivdekar, A. H. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *BioMed Research International*, 2014, 1–32.
- Baliga, M. S., Jimmy, R., Thilakchand, K. R., Sunitha, V., Bhat, N. R., Saldanha, E., ... Palatty, P. L. (2013). *Ocimum Sanctum* L (Holy Basil or Tulsi) and Its Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrition and Cancer*, 65(sup1), 26–35.
- Barbosa, F., Lima, M., Braz-Filho, R., & Silveira, E. (2006). Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(11), 819–821.
- Barbosa, F., Lima, M., & Silveira, E. (2005). Total NMR assignments of new [C7-O-C7"]- biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(4), 334–338.
- Barboza, L. N., Lívero, F. A. dos R., Prando, T. B. L., Ribeiro, R. de C. L., Lourenço, E. L. B., Budel, J. M., ... Junior, A. G. (2016). Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 134–145.
- Barcelos, F. F., Oliveira, M. L., Giovaninni, N. P. B., Lins, T. P., Filomeno, C. A., Schneider, S. Z., ... Andrade, T. U. (2010). Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. em ratos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1), 48–56.
- Bardai, S. El, Lyoussi, B., Wibo, M., & Morel, N. (2001). Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 23(4), 329–343.
- Berhow, M. A., Affum, A. O., & Gyan, B. A. (2012). Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims Grown in Ghana. *Journal of Medicinal Food*, 15(7), 611–620.
- Berim, A., & Gang, D. R. (2015). Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*.
- Bhatti, S., Ali Shah, S. A., Ahmed, T., & Zahid, S. (2018). Neuroprotective effects of *Foeniculum vulgare* seeds extract on lead-induced neurotoxicity in mice brain. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(4), 399–407.
- Bhavatti, M., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L., Hort, S., Schuster, L., ... Prado, S. R. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 385–389.
- Bieski, I. G. C., Santos, F. R., De Oliveira, R. M., Espinosa, M. M., Macedo, M., Albuquerque, U. P., & Martins, D. T. de O. (2012). Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Bijtebier, S., Van Der Auwera, A., Voorspoels, S., Noten, B., Hermans, N., Pieters, L., & Apers, S. (2016). A First Step in the Quest for the Active Constituents in *Filipendula ulmaria* (Meadowsweet): Comprehensive Phytochemical Identification by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry. *Planta Medica*, 82(6), 559–572.
- Bilal, A., Jahan, N., Ahmed, A., Bilal, S. N., Habib, S., & Hajra, S. (2012). Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn - A review. *Int J Cur Res Rev*, 4(23), 73–83.

- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Lazari, D., & Vincieri, F. F. (2002). Characterization of commercial kava-kava herbal drug and herbal drug preparations by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(18), 5016–5025.
- Bitu, V. de C. N., Bitu, V. de C. N., Matias, E. F. F., Lima, W. P. de, Portelo, A. da C., Coutinho, H. D. M., & Menezes, I. R. A. de. (2015). Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, *172*, 265–272.
- Blanco, M. A., Colareda, G. A., Van Baren, C., Bandoni, A. L., Ringuet, J., & Consolini, A. E. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*(3), 803–809.
- Bopda, O. S. M., Longo, F., Bella, T. N., Edzah, P. M. O., Taiwe, G. S., Bilanda, D. C., ... Dimo, T. (2014). Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *153*(2), 400–407.
- Braga, F., Wagner, H., Lombardi, J., & Oliveira, A. de. (2000). Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, *7*(3), 245–250.
- Brant, L. C. C., Nascimento, B. R., Passos, V. M. A., Duncan, B. B., Bensenõr, I. J. M., Malta, D. C., ... Ribeiro, A. L. P. (2017). Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: estimativas do Estudo Carga Global de Doença. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *20*, 116–128.
- Brito, N., Lainetti, R., & Guimarães, L. (1987). Ipolamiide, an iridoid glucoside from *Stachytarpheta dichotoma*. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, *96*(8), 633.
- Burt, V. L., Cutler, J. A., Higgins, M., Horan, M. J., Labarthe, D., Whelton, P., ... Roccella, E. J. (1995). Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991. *Hypertension*, *26*(1), 60–69.
- Burt, V. L., Whelton, P., Roccella, E. J., Brown, C., Cutler, J. A., Higgins, M., ... Labarthe, D. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population: Results from the third national health and nutrition examination survey, 1988–1991. *Hypertension*, *25*, 305–313.
- Cádiz-Gurrea, M. de la L., Olivares-Vicente, M., Herranz-López, M., Román-Arráez, D., Fernández-Arroyo, S., Micol, V., & Segura-Carretero, A. (2018). Bioassay-guided purification of *Lippia citriodora* polyphenols with AMPK modulatory activity. *Journal of Functional Foods*, *46*, 514–520.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Ciric, A., Sokovic, M., Oliveira, M. B. P. P., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, *12*, 428–438.
- Çaliş, I., Hosny, M., Khalifa, T., & Rüedi, P. (1992). Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. *Phytochemistry*, *31*(10), 3624–3626.
- Campana, P. R. V., Mansur, D. S., Gusman, G. S., Ferreira, D., Teixeira, M. M., & Braga, F. C. (2015). Anti-TNF- α Activity of Brazilian Medicinal Plants and Compounds from *Ouratea semiserrata*. *Phytotherapy Research*, (November 2014).
- Cao, J. L., Wang, S. S., Hu, H., He, C. W., Wan, J. B., Su, H. X., ... Li, P. (2018). Online comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography \times reversed-phase liquid chromatography coupled with hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry for the analysis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Chromatography A*, *1536*, 216–227.
- Cao, T.-T., Liu, J., Zhang, X. Y., Wei, X. P., Qi, Y., Zhang, B., ... Xiao, P.-G. (2019). Metabolomics characterization of different geographical origins of *Flos Carthami*

- using UPLC-QTOF/MS and their correlation with climate factors. *Analytical Methods*.
- Cardullo, N., Muccilli, V., Saletti, R., Giovando, S., & Tringali, C. (2018). A mass spectrometry and ¹H NMR study of hypoglycemic and antioxidant principles from a *Castanea sativa* tannin employed in oenology. *Food Chemistry*, 268, 585–593.
- Carmona, F., Angelucci, M. A., Sales, D. S., Chiaratti, T. M., Honorato, F. B., Bianchi, R. V., & Pereira, A. M. S. (2013). *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. *Phytomedicine*, 20(10), 947–950.
- Casanova, L., Espindola-Netto, J., Tinoco, L., Sola-Penna, M., & Costa, S. (2016). The Use of NMR Metabolite Profiling and in vivo Hypoglycemic Assay for Comparison of Unfractionated Aqueous Leaf Extracts of Two *Ocimum* Species. *Chemistry and Biodiversity*, 13, 1–9.
- Cavalcanti, B. C., Ferreira, J. R. O., Cabral, I. O., Magalhães, H. I. F., de Oliveira, C. C., Rodrigues, F. a R., ... Moraes, M. O. (2012). Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4051–4061.
- Chan, E., Lim, Y., Wong, L., Lianto, F., Wong, S., Lim, K., ... Lim, T. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109(3), 477–483.
- Chan, E., Lim, Y., & Wong, S. (2011). Antioxidant properties of ginger leaves: An overview. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(1), 6–16.
- Chan, E., Lim, Y., Wong, S., Lim, K., Tan, S., Lianto, F., & Yong, M. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113(1), 166–172.
- Chatterjee, S., Srivastava, S., Khalid, A., Singh, N., Sangwan, R. S., Sidhu, O. P., ... Tuli, R. (2010). Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemistry*, 71(10), 1085–1094.
- Chauthe, S. K., Sharma, R. J., Aqil, F., Gupta, R. C., & Singh, I. P. (2012). Quantitative NMR: An applicable method for quantitative analysis of medicinal plant extracts and herbal products. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 689–696.
- Chen, C. H., Lin, Y. S., Chien, M. Y., Hou, W. C., & Hu, M. L. (2012). Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs. *Botanical Studies*, 53(4), 421–429.
- Chen, L., Yen, K., Yang, L., Hatano, T., Okuda, T., & Yoshida, T. (1999). Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D1 and D2, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Phytochemistry*, 50(2), 307–312.
- Chen, Y., Li, D., Xu, Y., Zhang, Y., Tao, L., Li, S., ... Shen, X. (2014). Essential Oils from Fructus *A. zerumbet* Protect Human Aortic Endothelial Cells from Apoptosis Induced by Ox-LDL In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(Article ID 956824), 9 pages.
- Cheng, L. C., Murugaiyah, V., & Chan, K. L. (2015). Flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Lippia nodiflora* as promising antihyperuricemic agents and elucidation of their mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 485–493.
- Chiboub, W., Sassi, A. Ben, Amina, C. M., Souilem, F., El Ayeb, A., Djlassi, B., ... Harzallah-Skhiri, F. (2019). Valorization of the Green Waste from Two Varieties of Fennel and Carrot Cultivated in Tunisia by Identification of the Phytochemical Profile and Evaluation of the Antimicrobial Activities of Their Essentials Oils. *Chemistry & Biodiversity*, 16(1), e1800546.
- Chies, C., Branco, C., Scola, G., Agostini, F., Gower, A., & Salvador, M. (2013). Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. *Antioxidants*, 2(4), 194–205.
- Choi, E. M., & Hwang, J. K. (2004). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, 75(6), 557–565.

- Chompoo, J., Upadhyay, A., Gima, S., Fukuta, M., & Tawata, S. (2012). Antiatherogenic properties of acetone extract of *Alpinia zerumbet* seeds. *Molecules*, *17*(6), 6237–6248.
- Chowdhury, R., Rashid, M. U., Khan, O. F., & Hasan, C. M. (2003). Ipolamiide and α -spinasterol from *Stachytarpheta urticaefolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *31*(10), 1209–1211.
- Christova-Bagdassarian, V. L., Bagdassarian, K. S., & Atanassova, M. S. (2013). Phenolic compounds and antioxidant capacity in Bulgarian Plans (dry seeds). *International Journal of Advanced Research*, *1*(9), 186–197.
- Cifuentes, F., Palacios, J., Kuzmicic, J., Carvajal, L., Muñoz, F., Quispe, C., ... Paredes, A. (2018). Vasodilator and hypotensive effects of pure compounds and hydroalcoholic extract of *Xenophyllum poposum* (Phil) V.A Funk (Compositae) on rats. *Phytomedicine*, *50*(November 2017), 99–108.
- Clarke, K. A., Dew, T. P., Watson, R. E. B., Farrar, M. D., Bennett, S., Nicolaou, A., ... Williamson, G. (2014). High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry dual extraction method for identification of green tea catechin metabolites excreted in human urine. *Journal of Chromatography B*, *972*, 29–37.
- Correa, A. J. C., Lima, C. E., & Costa, M. C. C. D. (2010). *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológicas e química para o período de 1987 a 2008. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *12*(1), 113–119.
- Costa, V. P., & Mayworm, M. A. S. (2011). Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de extrema, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *13*(3), 282–292.
- Crane, J., Kovach, D., Gardner, C., & Walters, C. (2006). Triacylglycerol phase and “intermediate” seed storage physiology: a study of *Cuphea carthagenensis*. *Planta*, *223*(5), 1081–1089.
- Crane, J., Miller, A. L., Van Roekel, J. W., & Walters, C. (2003). Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Planta*, *217*(5), 699–708.
- Cunha, G. H. Da, Moraes, M. O. De, Fachine, F. V., Bezerra, F. A. F., Silveira, E. R., Canuto, K. M., & Moraes, M. E. A. De. (2013). Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascular Pharmacology*, *58*(5–6), 337–345.
- da Silva, D. X., de Souza, M. W., Corrêa, C. D. S., & Moya, H. D. (2013). A critical study of use of the Fe(II)/3-hydroxy-4-nitroso-2,7-naphthalenedisulfonic acid complexes in the quantification of polyphenols in medicinal plants. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 1325–1332.
- Damtoft, S., Jensen, S., & Nielsen, B. (1984). The identity of the iridoid glucoside tarphetalin with ipolamiide. *Phytochemistry*, *23*(4), 907–908.
- De, A. K. (2004). The genus *Foeniculum*. In *Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*. CRC Press (Vol. 40, p. 232).
- de Albuquerque, U. P., de Medeiros, P. M., de Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Lins Neto, E. M. de F., de Melo, J. G., & dos Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, *114*(3), 325–354.
- De Araújo, F. Y. R., De Oliveira, G. V., Gomes, P. X. L., Soares, M. A., Silva, M. I. G., Carvalho, A. F., ... Macêdo, D. S. (2011). Inhibition of ketamine-induced hyperlocomotion in mice by the essential oil of *Alpinia zerumbet*: Possible involvement of an antioxidant effect. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *63*(8), 1103–1110.
- De Marino, S., Gala, F., Borbone, N., Zollo, F., Vitalini, S., Visioli, F., & Iorizzi, M. (2007). Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry*, *68*(13), 1805–1812.
- Denev, R. V., Kuzmanova, I. S., Momchilova, S. M., & Nikolova-Damyanova, B. M.

- (2011). Resolution and quantification of isomeric fatty acids by silver ion HPLC: Fatty acid composition of aniseed oil (*Pimpinella anisum*, Apiaceae). *Journal of AOAC International*, 94(1), 4–8.
- Deyama, T., Kobayashi(Late), H., Nishibe, S., & Tu, P. (2006). Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33(PART M), 645–674.
- Dezanet, A., Krepsky, P. B., Mathioni, S. M., Farias, M. R., & Nodari, R. O. (2007). Development, biomass production and flavonoid contents in plants of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Macbride, submitted to different substrates, irrigation systems and leaf pruning. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(55), 51–56.
- Di Stasi, L. C., Oliveira, G. P., Carvalhaes, M. A., Queiroz-Junior, M., Tien, O. S., Kakinami, S. H., & Reis, M. S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, 73(1), 69–91.
- Dickel, M. L., Rates, S. M. K., & Ritter, M. R. (2007). Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 60–71.
- Dixon, R. A., & Strack, D. (2003). Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry*, 62(6), 815–816.
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., & Everett, J. R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 135–153.
- Duan, S., Qi, W., Zhang, S., Huang, K., & Yuan, D. (2017). Ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the rapid analysis of constituents in the traditional Chinese medicine formula Wu Ji Bai Feng Pill. *Journal of Separation Science*, 40(20), 3977–3986.
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305–311.
- Duarte, M. C. T., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M., & Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 197–201.
- Duret, S., Jacquemin, H., & Paris, R. (1976). Plantes malgaches N° XIX. Sur la composition chimique de *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl (= *S. indica* Vahl), Verbénacées. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 10(2), 96–104.
- Einbond, L. S., Negrin, A., Kulakowski, D. M., Wu, H., Antonetti, V., Jalees, F., ... Balick, M. J. (2017). Traditional preparations of kava (*Piper methysticum*) inhibit the growth of human colon cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, 24, 1–13.
- El-Soud, N. A., El-Laithy, N., El-Saeed, G., Wahby, M. S., Khalil, M., Morsy, F., & Shaffie, N. (2011). Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(2), 139–146.
- Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., & Tawata, S. (2007). Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 103(2), 486–494.
- Ersoy, S., Orhan, I., Turan, N. N., Şahan, G., Ark, M., & Tosun, F. (2008). Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine*, 15(12), 1087–1092.
- Escobar, P., Leal, S. M., Herrera, L. V., Martinez, J. R., & Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 184–190.
- Fan, T. W. (1996). Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of

- complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28(2), 161–219.
- Farag, M. A., Ezzat, S. M., Salama, M. M., & Tadros, M. G. (2016). Anti-acetylcholinesterase potential and metabolome classification of 4 *Ocimum* species as determined via UPLC/qTOF/MS and chemometric tools. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, 292–302.
- Farias, M. R., Pértile, R., Correa, M. M., De Almeida, M. T. R., Palermo, J. A., & Schenkel, E. P. (2010). Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5), 927–933.
- Fenner, R., Betti, A. H., Mentz, L. A., & Rates, S. M. K. (2006). Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(3), 369–394.
- Fernandes, F. R., Santos, A. L. Dos, Arruda, A. M. S. De, Vasques-Pinto, L. D. M. C., Godinho, R. O., Torres, L. M. B., ... Souccar, C. (2002). Antinociceptive and antiinflammatory activities of the aqueous extract and isolated *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 55–56.
- Ferreira, F. M., Dinis, L. T., Azedo, P., Galhano, C. I. C., Simões, A., Cardoso, S. M., ... Peixoto, F. P. (2012). Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts. *CYTA - Journal of Food*, 10(2), 92–102.
- Ferreira, S. R. G., & Zanella, M. T. (2000). Epidemiologia da hipertensão arterial associada à obesidade. *Rev Bras Hipertens*, 7(2), 128–135.
- Ferreres, F., Grosso, C., Gil-izquierdo, A., Valentão, P., Azevedo, C., & Andrade, P. B. (2014). HPLC-DAD-ESI/MSn analysis of phenolic compounds for quality control of *Grindelia robusta* Nutt. and bioactivities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 163–172.
- Froelich, S., Gupta, M. P., Siems, K., & Jenett-Siems, K. (2008). Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(4), 517–520.
- Fu, Z., Xue, R., Li, Z., Chen, M., Sun, Z., Hu, Y., & Huang, C. (2014). Fragmentation patterns study of iridoid glycosides in *Fructus Gardeniae* by HPLC-Q/TOF-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 28(12), 1795–1807.
- Funari, C. S., Castro-Gamboa, I., Cavalheiro, A. J., & Bolzani, V. D. S. (2013). Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. *Química Nova*, 36(10), 1605–1609.
- Funari, C. S., Eugster, P. J., Martel, S., Carrupt, P. A., Wolfender, J. L., & Silva, D. H. S. (2012). High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *Journal of Chromatography A*, 1259, 167–178.
- Futuro, D. O., & Kaplan, M. A. C. (1998). Analysis of Iridoid Glucosides from *Stachytarpheta cayennensis* by NMR Spectroscopy. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 70(4), 755–759.
- Garga, C., Khan, S. A., Ansari, S. H., Suman, A., & Garg, M. (2009). Chemical composition, therapeutic potential and perspectives of *Foeniculum vulgare*. *Pharmacognosy Review*, 3(6), 346–352.
- Garnier, J. (1977). Etude chimique de deux Verbenacees de Guyane: *Stachytarpheta guyanensis* Vahl. et *Stachytarpheta mutabilis* Vahl. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 11(4), 303–305.
- Gazola, R., Machado, D., Ruggiero, C., Singi, G., & Alexandre, M. M. (2004). *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: Effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research*, 50(5), 477–480.
- Geng, C. A., Chen, H., Chen, X. L., Zhang, X. M., Lei, L. G., & Chen, J. J. (2014). Rapid characterization of chemical constituents in *Saniculiphyllum guangxiense* by

- ultra fast liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 361(1), 9–22.
- Ghebretinsae, A. G., Graham, S. A., Camilo, G. R., & Barber, J. C. (2008). Natural infraspecific variation in fatty acid composition of *Cuphea* (Lythraceae) seed oils. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 279–287.
- Ghisalberti, E. L. (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytochemistry*, 5(2), 147–163.
- Golebiewski, W. M., & Wróbel, J. T. (1981). The Lythraceae Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology* (Vol. 18, pp. 263–322).
- Gomes, S. V. F., Nogueira, P. C. L., & Moraes, V. R. S. (2011). Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Quimica*, 36(1), 64–77.
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71(16), 1848–1864.
- Gonzalez, A. G., Valencia, E., Exposito, T. S., Barrera, J. B., & Gupta, M. P. (1994). Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: A new triterpene from *C. carthagenensis*. *Planta Medica*, 60(6), 592–593.
- Grandi, T. S. M., Trindade, J. A., Pinto, M. J. F., Ferreira, L. L., & Catella, A. C. (1989). Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 3(2), 185–224.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Veitch, N. C., Eckert, M. R., Marin, P. D., Senanayake, P., & Paton, A. J. (2002). Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(4), 327–342.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & Román, L. S. (2002). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 37–42.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Rueda, G. M., Medici, A., Besco, E., & Bruni, R. (2006). Composition of the volatile fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7778–7788.
- Güez, C. M., de Souza, R. O., Fischer, P., Leão, M. F. de M., Duarte, J. A., Boligon, A. A., ... Machado, M. M. (2017). Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(1), e15098.
- Guo, J., Chen, Q. Q., Wang, C., Qiu, H., Liu, B., Jiang, Z. H., & Zhang, W. (2015). Comparison of two exploratory data analysis methods for classification of *Phyllanthus* chemical fingerprint: unsupervised vs. supervised pattern recognition technologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(5), 1389–1401.
- Habsah, M., Lajis, N. H., Ali, A. M., Sukari, M. A., Hin, Y. Y., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (2003). The antioxidative components from *Alpinia nutans*. *Pharmaceutical Biology*, 41(1), 7–9.
- Hajjar, I., & Kotchen, T. A. (2013). Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *Journal of the American Medical Association*, 290(2), 199–206.
- Hatano, V., Torricelli, A., Giassi, A., Coslope, L., & Viana, M. (2012). Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(3), 238–243.
- He, J., Hu, X. P., Zeng, Y., Li, Y., Wu, H. Q., Qiu, R. Z., ... He, Z. D. (2011). Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(5), 449–464.

- He, W., & Huang, B. (2011). A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(16), 3595–3600.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., & Bailleul, F. (2006). Phenolics and iridoids of *Lippia alba*. *Natural Product Communications*, 1(9), 727–730.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., & Bailleul, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 211–222.
- Him, A., Ozbek, H., Turel, I., & Oner, A. C. (2008). Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. *Pharmacologyonline*, 3, 363–369.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576–10581.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986–995.
- Idu, M., Omogbai, E. K. I., Amaechina, F., & Ataman, J. E. (2006). Some cardiovascular effects of the aqueous extract of the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl. *International Journal of Pharmacology*, 2(2), 163–165.
- Itokawa, H., Morita, M., & Mihashi, S. (1981). Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, 20(11), 2503–2506.
- Javidnia, K., Dastgheib, L., Samani, S. M., & Nasiri, A. (2003). Antihirsutism activity of Fennel (fruits of *Foeniculum vulgare*) extract: A double-blind placebo controlled study. *Phytomedicine*, 10(6–7), 455–458.
- Jemia, M. Ben, Tundis, R., Maggio, A., Rosselli, S., Senatore, F., Menichini, F., ... Loizzo, M. R. (2013). NMR-based quantification of rosmarinic and carnosic acids, GC-MS profile and bioactivity relevant to neurodegenerative disorders of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1873–1882.
- Kapepula, P. M., Mungitshi, P. M., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Ngoyi, D. M., Kalenda, P. D. T., ... Muyembe, J. J. T. (2017). Antioxidant potentiality of three herbal teas consumed in Bandundu rural areas of Congo. *Natural Product Research*, 31(16), 1940–1943.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*, 365(9455), 217–223.
- Khair-ul-Bariyah, S., Ahmed, D., & Ikram, M. (2012). *Ocimum Basilicum*: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies. *Pakistan Journal of Chemistry*, 2(2), 78–85.
- Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (1989). Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(2), 519–524.
- Kil, Y.-S., Kim, S. M., Kang, U., Chung, H. Y., & Seo, E. K. (2017). Peroxynitrite-Scavenging Glycosides from the Stem Bark of *Catalpa ovata*. *Journal of Natural Products*, 80, 2240–2251.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536–549.
- Kim, H. K., & Verpoorte, R. (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 4–13.
- Krepesky, P., Farias, M., Côrtes, S., & Braga, F. (2010). Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(1), 125–127.
- Krepesky, P., Isidório, R., de Souza Filho, J., Côrtes, S., & Braga, F. (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine*, 19(11), 953–957.
- Krishna, B., & Chaganty, R. (1973). Cardamonin and alpinetin from the seeds of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, 12, 238.

- Kucharska, A. Z., & Fecka, I. (2016). Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS. *Molecules*, 21(9), 1157.
- Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Joosen, A. M. C. P., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2009). Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and ¹³C-labelled standards. *Food Chemistry*, 116(2), 542–554.
- Kuster, R. M., Mpalantinos, M. a., De Holanda, M. C., Lima, P., Brand, E. T., & Parente, J. P. (1999). GC-MS determination of kava-pyrone in *Alpinia zerumbet* leaves. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22(2), 129–130.
- Lahlou, S., Galindo, C. A. B., Leal-Cardoso, J. H., Fonteles, M. C., & Duarte, G. P. (2002). Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: Role of the autonomic nervous system. *Planta Medica*, 68(12), 1097–1102.
- Lahlou, S., Interaminense, L. F. L., Leal-Cardoso, J. H., & Duarte, G. P. (2003). Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17(3), 323–330.
- Lee, J., & Scagel, C. F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 115(2), 650–656.
- Leitao, G. G., de Souza, P. A., Moraes, A. A., & Brown, L. (2005). Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(12–13), 2053–2060.
- Leitão, S. G., Leitão, G. G., Vicco, D. K. T., Pereira, J. P. B., de Moraes Simão, G., Oliveira, D. R., ... Rastrelli, L. (2017). Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia organoides*. *Journal of Chromatography A*, 1520, 83–90.
- Lessa, Í. (2001). Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 8(4), 383–392.
- Lhuissier, T., Mercier, P.-E., Michalet, S., Lebot, V., & Legendre, L. (2017). Colorimetric assessment of kava (*Piper methysticum* Forst.) quality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 27–34.
- Li, Q., Liu, Y., Han, L., Liu, J., Liu, W., Feng, F., ... Xie, N. (2016). Chemical constituents and quality control of two *Dracocephalum* species based on high-performance liquid chromatographic fingerprints coupled with tandem mass spectrometry and chemometrics. *Journal of Separation Science*, 39(21), 4071–4085.
- Li, Y.-Y., Chou, G., & Wang, Z.-T. (2009). Chemical constituents in n-butanol extract from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(6), 417–420.
- Lin, L., Pai, Y., & Tsai, T. (2015). Isolation of Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7700–7706.
- Lin, Y.-S., & Lee, S.-S. (2014). Flavonol glycosides with α-glucosidase inhibitory activities and new flavone C-diosides from the leaves of *Machilus konishii*. *Helvetica Chimica Acta*, 97, 1672–1682.
- Liu, W., Song, Q., Cao, Y., Xie, N., Li, Z., Jiang, Y., ... Li, J. (2019). From 1H NMR-based non-targeted to LC-MS-based targeted metabolomics strategy for in-depth chemome comparisons among four *Cistanche* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 16–27.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2008). Hypotensive Natural Products: Current Status. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(8), 828–855.

- Lolio, C. A. de, Pereira, J. C. R., Lotufo, P. A., & Souza, J. M. P. de. (1993). Hipertensão arterial e possíveis fatores de risco. *Revista de Saúde Pública*, 27(5), 357–362.
- Luca, C. De. (1980). Isolation of ipolamiide from *Stachytarpheta mutabilis*. *Fitoterapia*, 51(6), 279–280.
- Malachias, M., Souza, W., Plavnik, F., Rodrigues, C., Brandão, A., Neves, M., ... Moreno Júnior, H. (2016). 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(3), 1–83.
- Malini, T., Vanithakumari, G., Megala, N., Anusya, S., Devi, K., & Elango, V. (1985). Effect of *Foeniculum vulgare* Mill. seed extract on the genital organs of male and female rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 29(1), 21–26.
- Malta, D. C., Bernal, R. T. I., Andrade, S. S. C. de A., da Silva, M. M. A., & Velasquez-Melendez, G. (2017). Prevalência e fatores associados com hipertensão arterial autorreferida em adultos brasileiros. *Revista de Saude Publica*, 51, 1S–10S.
- Manga, F. N., El Khattabi, C., Fontaine, J., Berkenboom, G., Duez, P., Noyon, C., ... Pochet, S. (2013). Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extracts from *Hymenocardia acida* Tul. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 623–631.
- Mansur, A., & Favarato, D. (2012). Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 99(2), 755–761.
- Maquiaveli, C. do C., Oliveira e Sá, A. M., Vieira, P. C., & da Silva, E. R. (2016). *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 108–113.
- Méabed, E. M. H., El-Sayed, N. M., Abou-Sreea, A. I. B., & Roby, M. H. H. (2018). Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* and *Foeniculum vulgare* and their efficacy on *Blastocystis spp. cysts*. *Phytomedicine*, 43, 158–163.
- Mihailovic-Stanojevic, N., Belščak-Cvitanović, A., Grujić-Milanović, J., Ivanov, M., Jovović, D., Bugarski, D., & Miloradović, Z. (2013). Antioxidant and Antihypertensive Activity of Extract from *Thymus serpyllum* L. in Experimental Hypertension. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 235–240.
- Miller, R. W., Earle, F. R., Wolff, I. A., & Jones, Q. (1964). Search for New Industrial Oils. IX. *Cuphea*, a Versatile Source of Fatty Acids. *The Journal of the American Oil Chemists Society*, 41, 279–280.
- Mills, K. T., Bundy, J. D., Kelly, T. N., Reed, J. E., Kearney, P. M., Reynolds, K., ... He, J. (2016). Global disparities of hypertension prevalence and control. *Circulation*, 134(6), 441–450.
- Mohammed, M., Musa, A., Adeiza, A., Musa, S., & Lande, L. (2013). Bioactive caffeic glycoside ester and antimicrobial activity of various extracts from the leaf of *Stachytarpheta angustifolia* Mill Vahl (Verbenaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(3), 77–85.
- Morales-Serna, J., García-Ríos, E., Madrigal, D., Cárdenas, J., & Salmón, M. (2011). Constituents of organic extracts of *Cuphea hyssopifolia*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(1), 62–64.
- Moura, R. S. De, Emiliano, A. F., Carvalho, L. C. R. M. De, Souza, M. a. V., Guedes, D. C., Tano, T., & Resende, A. C. (2005). Antihypertensive and Endothelium-Dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(3), 288–294.
- Mpalantinos, M., de Moura, R., Parente, J., & Kuster, R. (1998). Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytotherapy Research*, 12(6), 442–444.
- Mushtaq, M. Y., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Wilson, E. G. (2014). Extraction for metabolomics: Access to the metabolome. *Phytochemical Analysis*, 25(4), 291–306.

- Nakatani, N. (2003). Antioxidants in Herbs of Okinawa Islands. In *Oriental Foods and Herbs* (Vol. 859, pp. 166–175).
- Neto, A. C., Netto, J. C., Pereira, P. S., Pereira, A. M. S., Taleb-Contini, S. H., França, S. C., ... Belebani, R. O. (2009). The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(7), 933–939.
- Neves, F. da S. (2012). *Levantamento Etnofarmacológico das Plantas Medicinais Utilizadas pelas Comunidades Quilombolas e Assentados do Norte Fluminense com enfoque fitoquímico para a espécie Galesia integrifolia (Spreng) Harms.* Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Okokon, J. E., Etebong, E., & Antia, B. S. (2008). In vivo antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis*. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(3), 111–113.
- Okoye, T. C., Akah, P. A., Okoli, C. O., Ezike, A. C., & Mbaoji, F. N. (2010). Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(3), 189–192.
- Oktay, M., Gülçin, I., & Küfrevioğlu, İ. (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 263–271.
- Olayiwola, G., Ukponmwan, O., & Olawode, D. (2013). Sedative and anxiolytic effects of the extracts of the leaves of *Stachytarpheta cayennensis* in mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(6), 568–579.
- Oliveira, J. S., Porto, L. A., Estevam, C. S., Siqueira, R. S., Alves, P. B., Niculau, E. S., ... Quintans-Júnior, L. J. (2009). Phytochemical screening and anticonvulsant property of *Ocimum basilicum* leaf essential oil. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(3), 195–202.
- Olivero-Verbel, J., Güette-Fernandez, J., & Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(5), 419–427.
- Olmos, R. D., & Lotufo, P. A. (2002). Epidemiologia da Hipertensão no Brasil e no Mundo. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 9(1), 21–23.
- Onofre, S. B., Kagimura, F. Y., & Mattiello, S. P. (2014). Antimicrobial activity of essential oils obtained from *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbenaceae) collect in the South-west region of Paraná-Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(46), 1347–1353.
- zbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, İ., Tuncer, İ., ztürk, G., & ztürk, A. (2003). Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74(3), 317–319.
- Palacios-Espinosa, J. F., Arroyo-García, O., García-Valencia, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2014). Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 990–998.
- Pan, Z., Fan, G., Yang, R., Luo, W., Zhou, X., & Zhang, Y. (2015). Discriminating *Lamiophlomis rotata* according to geographical origin by 1 H-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *Phytochemical Analysis*, 26, 247–252.
- Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 682–694.
- Pandey, R., Chandra, P., Srivastava, M., Mishra, D. K., & Kumar, B. (2015). Simultaneous quantitative determination of multiple bioactive markers in *Ocimum sanctum* obtained from different locations and its marketed herbal formulations using UPLC-ESI-MS/MS combined with principal component analysis. *Phytochemical Analysis*, 26(6), 383–394.

- Pandey, R., & Kumar, B. (2016). HPLC-QTOF-MS/MS-based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39(4), 225–238.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, G., Burillo, J., & Codina, C. (2004). Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1890–1897.
- Park, B. J., Matsuta, T., Kanazawa, T., Park, C. H., Chang, K. J., & Onjo, M. (2012). Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* L. quercetin and its glycosides. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(3), 477–479.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201–214.
- Passos, V. M. D. A., Assis, T. D., & Barreto, S. M. (2006). Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiologia E Serviços de Saúde*, 15(1), 35–45.
- Penido, C., Costa, K. A., Futuro, D. O., Paiva, S. R., Kaplan, M. A. C., Figueiredo, M. R., & Henriques, M. G. M. O. (2006). Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1–2), 225–233.
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125.
- Pinho, F. V. S. A., Coelho-De-Souza, A. N., Morais, S. M., Ferreira Santos, C., & Leal-Cardoso, J. H. (2005). Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine*, 12(6–7), 482–486.
- Piwowski, J. P., Granica, S., & Kiss, A. K. (2015). *Lythrum salicaria* L. - Underestimated medicinal plant from European traditional medicine. A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 226–250.
- Prando, T. B. L., Barboza, L. N., Gasparotto, F. M., Araújo, V. de O., Tirloni, C. A. S., de Souza, L. M., ... Gasparotto Junior, A. (2015). Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Qiao, X., Li, R., Song, W., Miao, W. J., Liu, J., Chen, H. B., ... Ye, M. (2016). A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering. *Journal of Chromatography A*, 1441, 83–95.
- Quirantes-Piné, R., Funes, L., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *lemon verbena* extract. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5391–5397.
- Ramos, A. C., & de Oliveira, R. R. (2017). A new alkaloid and flavonoids isolated from *Solanum cernuum* leaves by high-performance countercurrent chromatography. *Natural Product Research*, 31(20), 2405–2412.
- Rao, Y. K., Shih, H. N., Lee, Y. C., Cheng, W. T., Hung, H. C., Wang, H. C., ... Lee, M. J. (2014). Purification of kavalactones from *Alpinia zerumbet* and their protective actions against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(6), 679–688.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. (2016). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(Sup. 2), S1574–S1583.
- Rendón-Vallejo, P., Hernández-Abreu, O., Vergara-Galicia, J., Millán-Pacheco, C.,

- Mejía, A., Ibarra-Barajas, M., & Estrada-Soto, S. (2012). Ex vivo study of the vasorelaxant activity induced by phenanthrene derivatives isolated from *Maxillaria densa*. *Journal of Natural Products*, 75(12), 2241–2245.
- Ribeiro, A. L. P., Duncan, B. B., Brant, L. C. C., Lotufo, P. A., Mill, J. G., & Barreto, S. M. (2016). Cardiovascular Health in Brazil. *Circulation*, 133(4), 422–433.
- Rodríguez-Pérez, C., Gómez-Caravaca, A. M., Guerra-Hernández, E., Cerretani, L., García-Villanova, B., & Verardo, V. (2018). Comprehensive metabolite profiling of *Solanum tuberosum* L. (potato) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 112(May), 390–399.
- Rodríguez, S. M., & Castro, O. (1996). Evaluación farmacológica y química de *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical*, 44(2), 353–359.
- Salimena, F. R. G., & Múlgura, M. E. (2015). Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. *Rodriguesia*, 66(1), 191–197.
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z., & Soares, M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116(3), 283–290.
- Santos, D. Y., Salatino, M. L., & Salatino, A. (1995). Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(1), 99–103.
- Santos, M., Farias, L., Merlugo, L., de Oliveira, T., Barbosa, F., Fuentefria, A., ... Mendez, A. (2018). UPLC-MS for Identification of Quercetin Derivatives in *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltdl (Lythraceae) and Evaluation of Antifungal Potential. *Current Pharmaceutical Analysis*, 14(6), 586–594.
- Sanz, M., De Simón, B. F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Hernández, T., ... Pinto, E. (2012). LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(7), 905–918.
- Schaedler, M. I., Palozi, R. A. C., Tirloni, C. A. S., Silva, A. O., Araújo, V. de O., Lourenço, E. L. B., ... Gasparotto Junior, A. (2018). Redox regulation and NO/cGMP plus K⁺ channel activation contributes to cardiorenal protection induced by *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in ovariectomized hypertensive rats. *Phytomedicine*, 51, 7–19.
- Schapoal, E., Vargas, M. de, Chaves, C., Bridi, R., Zuanazzi, J., & Henriques, A. (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 53–59.
- Schripsema, J. (2010). Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 14–21.
- Schripsema, J., Lemos, M. A., Dianin, M. F. V., Vianna, D. S., & Dagnino, D. S. (2014). New Approaches in Metabolic Fingerprinting: Improved Extraction Method and Automatic Reduction of NMR Spectra to Essential Data. In *Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules* (pp. 361–373).
- Schuldt, E. Z., Ckless, K., Simas, M. E., Farias, M. R., & Ribeiro-Do-Valle, R. M. (2000). Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35(2), 234–239.
- Schuldt, E. Z., Farias, M. R., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Ckless, K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*, 11(6), 523–529.
- Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Esposito, A., & Fiorentino, A. (2015). Chemical composition and seasonality of aromatic mediterranean plant species by NMR-based metabolomics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015(Article ID 258570), 1–9.
- Selvakkumar, C., Gayathri, B., Vinaykumar, K. S., Lakshmi, B. S., & Balakrishnan, A.

- (2007). Potential Anti-inflammatory Properties of Crude Alcoholic Extract of *Ocimum basilicum* L. in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Health Science*, 53(4), 500–505.
- Sena Filho, J. G., Düringer, J. M., Uchoa, D. E. A., Xavier, H. S., Barbosa Filho, J. M., & Braz-Filho, R. (2007). Distribution of iridoid glucosides in plants from the genus *Lippia* (Verbenaceae): An investigation of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Natural Product Communications*, 2(7), 715–716.
- Sena Filho, J. G., Melo, J. G. S., Saraiva, A. M., Gonçalves, A. M., Psiottano, M. N. C., & Xavier, H. S. (2006). Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 506–509.
- Senatore, F., & Rigano, D. (2001). Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3), 169–171.
- Shukla, S. K., Gupta, S., Ojha, S. K., & Sharma, S. B. (2010). Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. *Natural Product Research*, 24(9), 873–898.
- Siddiqui, B., Aslam, H., Ali, S., Begum, S., & Khatoon, N. (2007). Two New Triterpenoids and a Steroidal Glycoside from the Aerial Parts of *Ocimum basilicum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(4), 516–519.
- Siddiqui, B., Bhatti, H., Begum, S., & Perwaiz, S. (2012). Evaluation of the antimycobacterium activity of the constituents from *Ocimum basilicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 220–222.
- Silva, N. C. B. da, Regis, A. C. D., Esquibel, M. A., Santos, J. do E. S., & Almeida, M. Z. de. (2012). Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II - Bahia, Brasil. *Boletim Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 11(5), 435–453.
- Singh, V., Kahol, A., Singh, I. P., Saraf, I., & Shri, R. (2016). Evaluation of anti-amnesic effect of extracts of selected *Ocimum* species using in-vitro and in-vivo models. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 490–499.
- Sirat, H., Rahman, A., Itokawa, H., & Morita, H. (1996). Constituents of the rhizomes of two *Alpinia* species of Malaysia. *Planta Medica*, 62, 188.
- Song, C., Huang, L., Rong, L., Zhou, Z., Peng, X., Yu, S., & Fang, N. (2012). Anti-hyperglycemic effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (Ob-db) mice and its chemical composition. *Fitoterapia*, 83(8), 1474–1483.
- Souza, A. R. A. de, Costa, A., Nakamura, D., Mocheti, L. N., Filho, P. R. S., & Ovando, L. A. (2007). Um estudo sobre hipertensão arterial sistêmica na cidade de Campo Grande, MS. *Arq Bras Cardio*, 88(4), 441–446.
- Souza, P. A. De, Rodrigues, C., Santiago, A. P. S. A., Lucas, N. C. De, Leitao, G. G., & Galina Filho, A. (2011). Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(3), 420–426.
- Souza, P. A. De, Silva, C. G., Machado, B. R. P., Lucas, N. C. De, Leitão, G. G., Eleutherio, E. C. A., ... Benchetrit, L. C. (2010). Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 922–928.
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62(6), 817–836.
- Sun, H., Liu, M., Lin, Z., Jiang, H., Niu, Y., Wang, H., & Chen, S. (2015). Comprehensive identification of 125 multifarious constituents in Shuang-huang-lian powder injection by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, 86–106.
- Suzuki, A., Fujii, A., Yamamoto, N., Yamamoto, M., Ohminami, H., Kameyama, A., ... Saito, I. (2006). Improvement of hypertension and vascular dysfunction by hydroxyhydroquinone-free coffee in a genetic model of hypertension. *FEBS*

- Letters*, 580(9), 2317–2322.
- Syed, F. Q., Elkady, A. I., Mohammed, F. A., Mirza, M. B., Hakeem, K. R., & Alkarim, S. (2018). Chloroform fraction of *Foeniculum vulgare* induced ROS mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway in MCF-7, human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 218, 16–26.
- Tabanca, N., Ma, G., Pasco, D. S., Bedir, E., Kirimer, N., Baser, K. H. C., ... Khan, S. I. (2007). Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF- κ B: a target for antiinflammatory therapy. *Phytotherapy Research*, 21(8), 741–745.
- Tan, S., Zhao, X., Yang, Y., Ke, Z., & Zhou, Z. (2016). Chemical Profiling Using Uplc Q-Tof/MS and Antioxidant Activities of Fortunella Fruits. *Journal of Food Science*, 81(7), C1646–C1653.
- Tanira, M. O. M., Shah, A. H., Mohsin, A., Ageel, A. M., & Qureshi, S. (1996). Pharmacological and toxicological investigations on *Foeniculum vulgare* dried fruit extract in experimental animals. *Phytotherapy Research*, 10(1), 33–36.
- Tantisewie, B., & Sticher, O. (1975). Isolation of ipolamiide from *Stachytarpheta indica*. *Phytochemistry*, 14, 1462–1463.
- Tao, L., Hu, H. S., & Shen, X. C. (2013). Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from Fructus *Alpiniae Zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. *Phytomedicine*, 20(5), 387–393.
- Tariq, A., Mussarat, S., & Adnan, M. (2015). Review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological evidence of Himalayan anticancer plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 96–119.
- Tian, Y. S., Du, Z. Y., Xiao, Y., Yu, B., & Qi, J. (2017). Screening and identification of potential hypoglycemic components in Zeng Ye Tang by high-performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 40(24), 4709–4717.
- Timóteo, P., Karioti, A., Leitão, S. G., Vincieri, F. F., & Bilia, A. R. (2015). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry*, 175, 366–373.
- Tognolini, M., Ballabeni, V., Bertoni, S., Bruni, R., Impicciatore, M., & Barocelli, E. (2007). Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacological Research*, 56(3), 254–260.
- Tóth, G., Barabás, C., Tóth, A., Kéry, Á., Béni, S., Boldizsár, I., ... Noszál, B. (2016). Characterization of antioxidant phenolics in *Syringa vulgaris* L. flowers and fruits by HPLC-DAD-ESI-MS. *Biomedical Chromatography*, 30(6), 923–932.
- Tu, P. T. B., & Tawata, S. (2014). Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*, 19(10), 16656–16671.
- Umar, A., Imam, G., Yimin, W., Kerim, P., Tohti, I., Berké, B., & Moore, N. (2010). Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Hypertension Research*, 33(7), 727–730.
- Upadhyay, A., Chompoo, J., Kishimoto, W., Makise, T., & Tawata, S. (2011). HIV-1 integrase and neuraminidase inhibitors from *Alpinia zerumbet*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2857–2862.
- Van Der Kooy, F., Maltese, F., Young, H. C., Hye, K. K., & Verpoorte, R. (2009). Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Medica*, 75(7), 763–775.
- Vela, S. M., Souccar, C., Lima-Landman, M. T. R., & Lapa, A. J. (1997). Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. *Planta Medica*, 63(1), 36–39.
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., & Kim, H. K. (2007). NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 3–14.
- Viccini, L. F., Silva, P. S., Almeida, M. V. de, Saraiva, M. F., Peixoto, P. H. P., Salimena, F. R. G., ... Oliveira, L. F. C. de. (2008). Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic

- characterization. *Journal of Molecular Structure*, 875, 27–31.
- Victório, C. P. (2011). Therapeutic value of the genus *Alpinia*, Zingiberaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(1), 194–201.
- Victório, C. P., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Lage, C. L. S. (2009). Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(3), 697–701.
- Victório, C. P., Lage, C. L. S., & Kuster, R. M. (2009). Flavonoids extraction from *Alpinia zerumbet* (pers.) burtt et smith leaves using different techniques and solvents. *Eletica Quimica*, 34(1), 19–24.
- Vieira, P. R. N., de Moraes, S. M., Bezerra, F. H. Q., Ferreira, P. A. T., Oliveira, Í. R., & Silva, M. G. V. (2014). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. *Industrial Crops and Products*, 55, 267–271.
- Wang, L., Liu, S., Xing, J., Liu, Z., & Song, F. (2016). Characterization of interaction property of multi-components in *Gardenia jasminoides* with aldose reductase by microdialysis combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30, 87–94.
- Wang, L., Liu, S., Zhang, X., Xing, J., Liu, Z., & Song, F. (2016). A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1452, 47–57.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837.
- Wang, X., Li, L., Bai, Z., Peng, Y., Xiao, P., & Liu, Y. (2011). Five new phenylpropanoid glycosides from *Paraboea glutinosa* (Gesneriaceae). *Journal of Natural Medicines*, 65(2), 301–306.
- Wang, Y., Guo, Z., Jin, Y., Zhang, X., Li, W., & Liang, X. (2009). Selective enrichment with “click oligo (ethylene glycol)” column and TOF-MS characterization of simple phenylpropanoids in the fruits of *Forsythia suspensa*. *Journal of Separation Science*, 32(17), 2958–2966.
- Wang, Y., & Wang, Q. J. (2004). The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem. *Archives of Internal Medicine*, 164(19), 2126–2134.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R. S., Banegas, J. R., Giampaoli, S., Hense, H.-W., Joffres, M., ... Vescio, F. (2003). Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *Journal of the American Medical Association*, 289(18), 2363–2369.
- Wu, J., Huang, J., Xiao, Q., Zhang, S., Xiao, Z., Li, Q., ... Huang, L. (2004). Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42(7), 659–662.
- Wu, L., Li, L., Wang, M., Shan, C., Cui, X., Wang, J., ... Tang, Y. (2016). Target and non-target identification of chemical components in *Lamiophlomis rotata* by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry using a three-step protocol. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(19), 2145–2154.
- Xu, H.-X., Dong, H., & Sim, K.-Y. (1996). Labdane diterpenes from *Alpinia zerumbet*. *Phytochemistry*, 42(1), 149–151.
- Xu, Y., Cai, H., Cao, G., Duan, Y., Pei, K., Tu, S., ... Shen, L. (2018). Profiling and analysis of multiple constituents in Baizhu Shaoyao San before and after processing by stir-frying using UHPLC/Q-TOF-MS/MS coupled with multivariate statistical analysis. *Journal of Chromatography B*, 1083, 110–123.
- Xu, J. Di, Mao, Q., Shen, H., Zhu, L. Y., Li, S. L., & Yan, R. (2013). Ultra-high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array and

- quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based chemical profiling approach to evaluate the influence of preparation methods on the holistic quality of Qiong-Yu-Gao, a tradi. *Journal of Chromatography A*, 1304, 154–168.
- Yalçın, F. N., Ersöz, T., Avci, K., Gotfredsen, C. H., Jensen, S. R., & Çaliş, I. (2007). New iridoid glycosides from *Lamium eriocephalum* subsp. *eriocephalum*. *Helvetica Chimica Acta*, 90(2), 332–336.
- Yamaguchi, T., Chikama, A., Mori, K., Watanabe, T., Shioya, Y., Katsuragi, Y., & Tokimitsu, I. (2008). Hydroxyhydroquinone-free coffee: A double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(6), 408–414.
- Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueda, N., ... Nakanishi, T. (1998). Anti-HIV-1 Activity of Herbs in Labiatae. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 829–833.
- Yuan-Ying, W., Yan-Fang, C., & Xue-Mei, X. (1997). A new diterpenoid from *Alpinia zerumbet*. *Acta Botanica Sinica*, 39(10), 983–984.
- Zago, A., Carvalho, F., Gutierrez, J., Bohnert, C., Fernandes, M., Morandini, L., ... Morel, A. (2018). A phytochemical study of the *Cuphea glutinosa* from Southern Brazil: Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and antioxidant properties. *Natural Product Research*, 21, 1–6.
- Zahra, K., Khan, M. A., & Iqbal, F. (2015). Oral supplementation of *Ocimum basilicum* has the potential to improves the locomotory, exploratory, anxiolytic behavior and learning in adult male albino mice. *Neurological Sciences*, 36(1), 73–78.
- Zétola, M., De Lima, T. C. M., Sonaglio, D., González-Ortega, G., Limberger, R. P., Petrovick, P. R., & Bassani, V. L. (2002). CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2–3), 207–215.
- Zhang, J.-Q., Wang, Y., Li, H.-L., Wen, Q., Yin, H., Zeng, N., ... Li, Y.-B. (2015). Simultaneous quantification of seventeen bioactive components in rhizome and aerial parts of *Alpinia officinarum* Hance using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 7, 4919–4926.
- Zhang, M., Otake, K., Miyauchi, Y., Yagi, M., Yonei, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2019). Comprehensive NMR analysis of two kinds of post-fermented tea and their anti-glycation activities *in vitro*. *Food Chemistry*, 277, 735–743.
- Zhang, S., Li, Y. J., Zhang, C. X., Huang, W. Z., Ding, G., Wang, Z. Z., ... Xiao, W. (2016). Research on the change of chemical composition in productive process of Re Du Ning injection by HPLC/Q-TOF MS. *Biomedical Chromatography*, 30(2), 131–141.
- Zhang, Y., Chen, Y., Wang, S., Dong, Y., Wang, T., Qu, L., & Li, N. (2015). Bioactive constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Molecules*, 20(12), 21946–21959.
- Zhou, M., Li, R., Liao, X. M., Wang, Z., Xu, G. B., Gong, Z. P., ... Liao, S. G. (2018). Screening and analysis of potentially active components in Shenxiong glucose injection using UHPLC coupled with photodiode array detection and MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41(10), 2130–2138.
- Zhou, T., Liu, H., Wen, J., Fan, G., Chai, Y., & Wu, Y. (2010). Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(17), 2520–2528.
- Zhou, W., Shan, J., & Meng, M. (2018). A two-step ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry with mass defect filtering method for rapid identification of analogues from known components of different chemical structure types in Fructus Gardeniae-Fr. *Journal of Chromatography A*, 1563, 99–123.

APÊNDICE 1

Tabela A1: Substâncias e/ou classes metabólicas identificadas nos extratos clorofórmico das espécies estudadas.

Extrato	Substâncias / classes identificadas
AAC	Ácidos graxos; 5,6-desidrokaína; dihidro-5,6-desidrokaína; kavalactonas
AAC-R	Ácidos graxos; kavalactonas
ACC	Ácidos graxos
ACC-R	Ácidos graxos
AFC	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides; <i>trans</i> -anetol
AOC	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides
AOC-R	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides
FLC	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides
FLC-R	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides
FSC	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides
FSC-R	Ácidos graxos; ácidos graxos insaturados; esteroides

Tabela A2: Deslocamentos químicos referentes aos ácidos graxos saturados, insaturados e esteroides observados em cada extrato clorofórmico.

Extrato	Ácidos graxos saturados	Ácidos graxos insaturados	Esteroides
AAC	0,88 m 1,30 br	-	-
AAC-R	0,88 br 1,30 br	-	-
ACC	0,88 t 1,29 br	-	-
ACC-R	0,87 m 1,29 br	-	-
AFC	0,88 m 1,30 br	0,98 t 7,5 1,25 br; 2,34 t 7,5 5,36 m	0,79 m 0,85 m 0,89 m
AOC	0,88 m 1,30 br	0,98 t 7,5 1,26 br; 2,34 t 7,5 5,36 m	0,79 m 0,85 m 0,89 m
AOC-R	0,88 m 1,30 br	0,99 m 1,26 br; 2,34 t 7,4 5,36 m	0,80 m 0,85 m 0,89 m
FLC	0,88 m 1,30 br	0,97 m 1,27 br	0,79 m 0,85 m 0,89 m
FLC-R	0,88 m 1,30 br	0,97 m 1,26 br	0,79 m 0,85 m 0,89 m
FSC	0,88 m 1,30 br	0,98 t 7,5 1,27 br; 2,34 t 7,5 5,36 m	0,79 m 0,85 m 0,89 m
FSC-R	0,88 m 1,31 br	0,98 t 7,2 1,26 br; 2,34 t 7,5 5,36 m	0,80 m 0,85 m 0,89 m

Tabela A3: Substâncias e/ou classes identificadas nos extratos metanólicos e frações de ACM.

Extrato	Substâncias / classes identificadas
AAM	α -glicose; β -glicose; alanina; glutamato; treonina; valina; ácido succínico; colina; kavalactonas; flavonoides
AAM-R	α -glicose; β -glicose; alanina; ácido succínico; ácido fórmico; colina; kavalactonas
ACM	α -glicose; β -glicose; ácido succínico; ácidos graxos saturados e insaturados; flavonoides
ACM-R	α -glicose; β -glicose; ácidos graxos saturados; flavonoides
ACM1	α -glicose; β -glicose; ácido succínico; ácidos graxos saturados; taninos hidrolisáveis
ACM2	Ácidos graxos saturados; taninos hidrolisáveis; flavonoides
AFM	α -glicose; β -glicose; alanina; gaba; colina; ácidos graxos saturados e insaturados; substâncias fenólicas
AOM	β -glicose; alanina; treonina; ácido succínico; colina; ácidos graxos saturados e insaturados; ácido rosmarínico
AOM-R	β -glicose; alanina; ácido fórmico; ácido succínico; colina; ácidos graxos saturados e insaturados; esteroides; ácido rosmarínico
FLM	α -glicose; β -glicose; alanina; colina; ácido graxo insaturado; acteosideo; isoacteosideo; feniletanoides
FLM-R	α -glicose; β -glicose; colina; ácido graxo insaturado; acteosideo; isoacteosideo; feniletanoides
FSM	α -glicose; β -glicose; alanina; ácido fórmico; ácido succínico; colina; acteosideo; isoacteosideo; feniletanoides; ipolamiida
FSM-R	α -glicose; β -glicose; alanina; ácido fórmico; ácido succínico; colina; acteosideo; isoacteosideo; feniletanoides; ipolamiida

Tabela A4: Deslocamentos químicos referentes aos açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, substâncias nitrogenadas, ácidos graxos saturados, insaturados e esteroides observados em cada extrato metanólico e suas frações. Os valores de deslocamento químico são dados em ppm e a constante de acoplamento em Hz.

Extrato	Açúcares		Aminoácidos				Ácidos orgânicos		Substâncias nitrogenadas		Ácidos graxos		Esteroides
	α -glc	β -glc	Ala	Glu	Treo	Val	Suc	For	GABA	Colina	Sat	Insat	
AAM	5,11 d 3,6	4,47 d 7,7	1,46 d 7,1	2,08 m 2,32 m	1,32 d 6,5	1,02 d 7,0 1,06 d 7,0	2,55 s	-	-	3,18 s	-	-	-
AAM-R	5,11 d 3,8	4,48 d 7,6	1,46 d 7,3	-	-	-	2,54 s	8,43 s	-	3,20 s	-	-	-
ACM	5,10 d 3,6	4,47 d 7,6	-	-	-	-	2,56 s	-	-	-	0,90 t 7,3	0,97 t 7,3	-
ACM-R	5,11 d 3,5	4,47 d 7,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,90 t 7,0	-	-
ACM1	5,10 d 3,0	4,47 d 7,6	-	-	-	-	2,56 s	-	-	-	0,89 t 7,2	-	-
ACM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,90 t 7,0	-	-
AFM	5,11 d 3,6	4,47 d 7,7	1,47 d 7,1	-	-	-	-	-	1,90 m 2,30 m 2,98 t 7,2	3,22 s	0,90 t 1,30 br	1,28 br 2,26 t 5,34 m	-
AOM	-	4,48 d 7,8	1,47 d 7,1	-	1,32 d 6,5	-	2,55 s	-	-	3,21 s	0,89 m 1,31 br	0,97 t 7,5 1,28 br 2,26 t 7,5 5,33 m	-
AOM-R	-	4,48 d 7,9	1,47 d 7,3	-	-	-	2,54 s	8,45 s	-	3,21 s	0,89 m 1,31 br	0,99 t 7,5 1,28 br 2,26 t 7,5 5,33 m	0,79 m 0,85m 0,88 m
FLM	5,11 d 3,6	4,47 d 7,7	1,46 d 7,0	-	-	-	-	-	-	3,21 s	-	1,29 br 2,25 t 5,33 m	-
FLM-R	5,11 d 3,6	4,47 d 7,7	-	-	-	-	-	-	-	3,21 s	-	1,28 br 2,25 t 7,4 5,34 m	-
FSM	5,10 d 3,6	4,47 d 7,7	1,46 d 7,1	-	-	-	2,53 s	8,50 s	-	3,21 s	-	-	-
FSM-R	5,11 d 3,6	4,48 d 7,7	1,46 d 7,1	-	-	-	2,54 s	8,44 s	-	3,21 s	-	-	-
REF	5,18 d 3,8	4,58 d 7,8	1,48 d 7,2	2,07 m 2,36 m	1,32 d 6,6	1,00 d 6,8 1,05 d 6,8	2,56 s	8,46 s	1,90 m 2,30 t 7,2 3,01 t	3,24 s	0,88 t 7,5 1,30	0,96 t 7,5 1,28 5,33 m	0,78 s 0,85 s 0,89 d 7,0

Legenda: glc – glicose; Ala – alanina; Glu – glutamato; Treo – treonina; Val – valina; Suc – ácido succínico; For – ácido fórmico; GABA – ácido γ -aminobutírico; Sat – ácidos graxos saturados; Insat – ácidos graxos insaturados. Referências: Fan, 1996; Kim et al., 2010; Verpoorte et al., 2007.

Tabela A5: Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e acoplamentos $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ observados para algumas substâncias identificadas nos diferentes extratos metanólico e frações. Os valores de deslocamento químico são dados em ppm.

Extrato	α -glicose		β -glicose		Alanina			Glutamato		Treonina			Valina			Ácido succínico			GABA		Colina		
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	BC	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	BC	^1H	^{13}C	BC	^1H	^{13}C	BC	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	BC
AAM	5,11	92,2	4,47	96,6	1,46	16,2	50,2; 173,5	2,08 2,32	26,3 33,4	1,32	20,1	-	1,02 1,06	16,9 17,7	17,7; 29,2 16,9; 29,2; 60,2	2,55	29,2	-	-	-	3,18	53,1	53,1; 67,3
AAM-R	5,11	92,1	4,48	96,6	1,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,54	29,7	-	-	-	3,20	53,1	-
ACM	5,10	92,2	4,47	96,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,56	28,4	-	-	-	-	-	-
ACM-R	5,11	92,2	4,47	96,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACM1	5,10	92,3	4,47	96,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,56	-	-	-	-	-	-	-
ACM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AFM	5,11	92,3	4,47	96,6	1,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,90 2,30 2,98	39,0	3,22	53,1	53,1; 67,4
AOM	-	-	4,48	98,0	1,47	-	51,4	-	-	1,32	-	62,0	-	-	-	2,55	30,3	30,3	-	-	3,21	53,6	53,6; 68,8
AOM-R	-	-	4,48	-	1,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,54	29,8	-	-	-	3,21	53,1	53,1; 67,3
FLM	5,11	92,1	4,47	96,6	1,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,21	53,1	53,1; 67,5
FLM-R	5,11	92,1	4,47	96,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,21	53,1	53,1; 67,5
FSM	5,10	92,3	4,47	96,6	1,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,53	30,4	30,4	-	-	3,21	53,1	53,1; 67,3
FSM-R	5,11	92,2	4,48	96,6	1,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,54	29,8	29,8	-	-	3,21	53,2	53,2; 67,3

Legenda: BC – correlações observadas no espectro HMBC.