

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Gustavo Andrade Ugalde

***GLECHON SPATHULATA* BENTH. (LAMIACEAE) COMPOSTOS  
FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Santa Maria, RS  
2016

**Gustavo Andrade Ugalde**

***GLECHON SPATHULATA* BENTH. (LAMIACAEAE) COMPOSTOS FENÓLICOS E  
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Dra. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ugalde, Gustavo Andrade  
Glechon spathulata benth. (Lamiaceae) compostos  
fenólicos e atividade biológica / Gustavo Andrade Ugalde.-  
2016.  
64 f.; 30 cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Lamiaceae 2. Glechon spathulata 3. Polifenóis 4.  
UHPLC-ESI-MS/MS 5. DPPH. ORAC I. Manfron, Melânia Palermo  
II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Gustavo Andrade Ugalde. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: gandradeugalde@yahoo.com.br

**Gustavo Andrade Ugalde**

***GLECHON SPATHULATA* BENTH. (LAMIACEAE) COMPOSTOS FENÓLICOS E  
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 31 de agosto de 2016:**

---

**Melânia Palermo Manfron, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Gizele Scotti do Canto, Dra. (UFSM)**

---

**Ricardo Bizogne Souto (Unipampa)**

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Deisi, pelo apoio de sempre, pela sabedoria e pelo amor que sempre transmitiram. Não seria nada sem vocês. Amo vocês.

Aos meus avós Domingos (in memorian), Clélia (in memorian), Walter e Anna, à Edite (in memorian) e à Tia Evanir pela sabedoria e amor que sempre transmitiram.

Aos meus irmãos Rodrigo e Fernanda, pela ajuda, carinho, respeito e até pelas brigas e falta de paciência, que me fizeram aprender muito sobre limites.

Aos meus tios Walter Júnior, César, Denise e Antônio pela amizade e apoio. Muito obrigado.

Ao resto dos meus familiares que de alguma forma ou de outra sempre procuraram me apoiar.

À minha namorada Lillian, pela compreensão, paciência e amor dedicados.

À Melânia Palermo Manfron, orientadora, amiga, “mãe”, pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

Aos colegas do LABINFITO, Rafaela, Rachel, Evelin, Maiara, Lucas, Gabriel, Raquel Necchi, Marina, Vera, Alexandre, Jocelene, Camila, Iuri, Juliana, Tiago, a todos vocês agradeço pela amizade, apoio e aprendizagem.

Aos meus amigos e colegas do LabMIP, pela amizade, parceria de todo o dia, muito obrigado.

Aos meus grandes amigos Luccas, Vinicius, Rafael, Eduardo Felipe e Douglas, muito obrigado pela amizade e compreensão de sempre.

Ao meu saudoso amigo e colega Murilo (in memorian) que de maneira precipitada nos deixou, mas que eu levo sempre junto.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por conceder esta oportunidade.

*“O Passado: um mundo novo e incerto. Um mundo de incontáveis possibilidades e inúmeros desfechos. Escolhas infinitas definem nosso destino: cada escolha, cada momento, uma ondulação no rio do tempo. Com muitas ondulações mudamos o curso do rio, pois o futuro não está determinado...”*

(Professor Xavier: Filme “X-Men: Dias de um Futuro Esquecido”)

## RESUMO

### **GLECHON SPATHULATA BENTH. (LAMIACEAE) COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

AUTOR: Gustavo Andrade Ugalde  
ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

*Glechon spathulata* Bentham, pertencente à família Lamiaceae, é conhecida como manjerona-do-campo, tem suas folhas empregadas popularmente como condimento culinário, diaforética, estomáquico em dispepsias, antisséptico e expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, bronquites e laringites, entre outros. Da mesma forma que a *G. spathulata*, uma gama de espécies vegetais representantes da flora brasileira são utilizadas no combate das mais diversas enfermidades na medicina popular, sem conhecimentos prévios sobre a farmacologia nem a toxicidade inerentes aos preparados das plantas. Logo, para uma maior eficácia terapêutica, faz-se necessário o conhecimento prévio do perfil químico e da comprovação das atividades biológicas da planta. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma caracterização fitoquímica do extrato bruto (EB) hidroetanólico a 70% das partes aéreas (caules e folhas) de *G. spathulata* a partir de métodos espectrofotométricos e de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a detector de massas com interface de ionização por electrospray (CLUE-ESI-MS/MS) e avaliar suas atividades antimicrobiana e antioxidante. O EB apresentou adequada atividade antioxidante pelos dois métodos empregados, obtendo para o método de inibição do radical DPPH  $CI_{50}$  de  $48,29 \pm 1,21 \mu\text{g/g}$  e para o método ORAC o valor de  $10,51 \pm 0,78 \mu\text{mol Trolox/g}$ , superior ao padrão Trolox testado na mesma concentração. O EB apresentou elevado teor de polifenóis totais ( $186 \pm 4,00 \text{ mg GAE/g}$ ) e flavonoides totais ( $59,4 \pm 0,58 \text{ mg QE/g}$ ) quando comparado à espécies da família. Somado a isso, 13 compostos fenólicos divididos em 5 classes principais (derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido benzoico, derivados do ácido cafeico, flavonoides e terpenos fenólicos) foram identificados e quantificados por UHPLC-ESI-MS/MS, com destaque para o ácido rosmarínico, que apresentou concentração de 34,458% no EB. Apenas as bactérias gram-negativas testadas no estudo foram sensíveis ao EB de *G. spathulata* (*Escherichia coli* ATCC 35218 -  $200 \mu\text{g/mL}$ ; *Escherichia coli* ATCC 25922 -  $800 \mu\text{g/mL}$ ; *Salmonella* spp. ATCC 5217 -  $200 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados obtidos neste estudo, somados, indicam que esta planta possui potencial antioxidante e pode ser uma promissora fonte de antioxidantes naturais e de derivados com potencial antimicrobiano.

**Palavras-chave:** Lamiaceae. *Glechon spathulata*. Polifenóis. UHPLC-ESI-MS/MS. DPPH. ORAC.

## ABSTRACT

### **GLECHON SPATHULATA BENTH. (LAMIACEAE) PHENOLIC COMPOUNDS AND BIOLOGICAL ACTIVITY**

AUTHOR: GUSTAVO ANDRADE UGALDE  
ADVISOR: MELÂNIA PALERMO MANFRON

*Glechon spathulata* Benth, belonging to the Lamiaceae family, is known as manjerona-do-campo, has its leaves used popularly as culinary flavoring, diaphoretic, stomachic in dyspepsia, antiseptic and expectorant in catarrhal respiratory diseases, colds, bronchitis and laryngitis, between others. Similarly to *G. spathulata* a range of plant species of the Brazilian flora representatives are used to combat various diseases of the most popular medicine without prior knowledge of the pharmacology or the inherent toxicity of the prepared plants. Therefore, for greater therapeutic efficacy, it is necessary prior knowledge of the chemical profile and evidence of biological activity of the plant. The objective of this study was to develop a phytochemical characterization of the crude extract (CE) hydroethanolic 70% from the aerial parts (leaves and stems) of *G. spathulata* from spectrophotometric methods and ultra performance liquid chromatography coupled to mass detector with electrospray ionization interface (UHPLC-ESI-MS/MS), and evaluate their antimicrobial and antioxidant activities. The CE showed adequate antioxidant activity by the two methods employed, getting to the method of inhibition of DPPH radical  $IC_{50}$  of  $48.29 \pm 1.21$  mg/g for the ORAC method the value of  $10.51 \pm 0.78$   $\mu$ mol Trolox/g, higher than the standard Trolox tested at the same concentration. The CE showed high levels of total polyphenols ( $186 \pm 4.00$  mg GAE/g) and total flavonoid ( $59.4 \pm 0.58$  mg QE/g) when compared to the species of the family. Added to this, 13 phenolic compounds divided into five major classes (derived from cinnamic acid, derived from benzoic acid, derivatives of caffeic acid, flavonoids and phenolic terpenes) were identified and quantified by UHPLC-ESI-MS/MS, highlighting the rosmarinic acid, which have a concentration of 34.458% in the CE. The gram-negative bacteria tested in the study were sensitive to *G. spathulata* CE (*Escherichia coli* ATCC 35218 - 200  $\mu$ g/mL; *Escherichia coli* ATCC 25922 - 800  $\mu$ g/mL; *Salmonella* spp. ATCC 5217 - 200  $\mu$ g/mL). The results of this study, together indicate that this plant has antioxidant potential and may be a promising source of natural antioxidants and derivatives with antimicrobial potential.

**Keywords:** Lamiaceae. *Glechon spathulata*. Polyphenols. UHPLC-ESI-MS/MS. DPPH. ORAC.



## LISTA DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1 – | Diferentes partes de <i>G. spathulata</i> (A, B, C, D) .....                                | 15 |
| Figura 2–  | Estrutura básica de um flavonoide .....   | 18 |
| Figura 3 – | Mecanismo da reação de redução de compostos fenólicos pelo reagente<br>FolinCiocalteu ..... | 19 |
| Figura 4 – | Defesas antioxidantes de seres aeróbios.....  | 22 |
| Figura 5 – | Demonstração esquemática da redução do radical livre DPPH pelo<br>hidrogênio.....           | 24 |

## MANUSCRITO

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1 – | Capacidade de inibição do AA e do EB <i>G. spathulata</i> ..... | 44 |
| Figura 2 – | Valor de ORAC obtido para a amostra .....                       | 46 |

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1 – | Tempos de retenção (RTWs) e parâmetros MS/MS dos compostos fenólicos analisados no EB de <i>G. spathulata</i> .....   | 63 |
| Tabela 2 – | Valores de polifenóis totais e de flavonoides totais do extrato bruto das partes aéreas de <i>G. spathulata</i> por extração hidroetanólica a 70%. .....  | 40 |
| Tabela 3 – | Concentração dos compostos fenólicos em <i>Glechon spathulata</i> Benth. determinado por UHPLC-ESI-MS/MS usando o extrato bruto hidroetanólico (EB). Os valores são dados em µg/g, seguidos pelo desvio padrão para a concentração (n=3)..... | 41 |
| Tabela 4 – | Valores de CI <sub>50</sub> (µg/mL) e de ORAC (µmol Trolox/g).....  | 45 |
| Tabela 5 – | Atividade antimicrobiana do EB de <i>G. spathulata</i> .....  | 47 |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                   | 11 |
| 1.1      | PLANTAS MEDICINAIS .....                  | 11 |
| 1.2      | <i>GLECHON SPATHULATA</i> BENTHAM .....   | 13 |
| 1.3      | METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....             | 16 |
| 1.4      | ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....               | 21 |
| 1.4.1    | Potencial antioxidante .....              | 21 |
| 1.4.2    | Atividade antimicrobiana .....            | 24 |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....                | 26 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....                    | 27 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....                      | 27 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....               | 27 |
| <b>4</b> | <b>MANUSCRITO CIENTÍFICO</b> .....        | 28 |
| 4.1      | MANUSCRITO .....                          | 28 |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....                    | 55 |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 56 |
|          | <b>ANEXO</b> .....                        | 63 |
|          | <b>ANEXO A – TEMPOS DE RETENÇÃO</b> ..... | 63 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Durante toda a sua existência, o homem encontrou nas plantas diversas utilidades, como alimento e medicamento, sendo esse conhecimento acerca das propriedades terapêuticas, muitas vezes, o único instrumento medicinal de alguns povos (SAKLANI; KUTTY, 2008). O uso de plantas medicinais ao longo do tempo na história da civilização proporcionou ao homem, além da cura de enfermidades, o acúmulo do saber. Conhecimento empírico que vem sendo transmitido de geração em geração desde as antigas civilizações, tornando a utilização de plantas medicinais uma prática corriqueira na medicina popular. A origem desse conhecimento se confunde com sua própria história, uma vez que certamente tenha surgido na medida em que o homem tentava suprir suas necessidades básicas de sobrevivência, por meio do empirismo (CALIXTO, 2005; MELO et al., 2007).

A partir de meados do final do século XIX, deu-se início a uma nova fase a respeito da utilização das plantas medicinais, pois começou a ocorrer uma substituição progressiva destas e dos seus extratos pelos compostos responsáveis pela sua ação farmacológica. Atualmente, com o constante desenvolvimento de metodologias analíticas, suportados por equipamentos e técnicas cada vez mais sofisticados, pode-se obter um conhecimento mais aprofundado acerca das composições químicas das drogas vegetais e estrutura de seus princípios ativos (GILANI; ATTA, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento têm nas plantas medicinais a sua única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (BRASIL, 2016). Plantas e extrativos vegetais são historicamente importantes, e tem sido cada vez mais valorizados, visto que as substâncias ativas produzidas pelo metabolismo primário e secundário das mesmas são usadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e/ou como fonte de matéria-prima para a obtenção de substâncias ativas isoladas para a síntese de fármacos ou obtenção de medicamentos fitoterápicos, os quais são elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais (SIMÕES; SCHENKEL, 2001).

O território brasileiro abriga uma flora das mais ricas do mundo, da qual cerca de 90% ainda não foi explorada quimicamente (BRASIL, 2016). A prática do uso de plantas da flora brasileira é largamente difundida, ocorrendo, na maioria dos casos, sem orientação médica

(RODRIGUES et al., 2011) e sem que a suposta atividade farmacológica tenha sido investigada e comprovada por testes científicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A utilização de plantas na terapêutica e na alimentação deve se restringir apenas a espécies vegetais devidamente identificadas e caracterizadas quanto a sua segurança e eficácia, pois a mera utilização de preparados vegetais sem um estudo científico adequado pode gerar intoxicações, provocando distúrbios no organismo e dependendo de sua gravidade, levar o indivíduo ao óbito (VEIGA JUNIOR et al., 2005; BALBINO; DIAS, 2010; COLOMBO et al., 2010).

É salientado que as plantas podem ter efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos, sendo citada a *Rosmarinus officinalis* como abortivo, *Vernonia condensata* como embriotóxico e a *Mentha piperita* como teratogênica (RODRIGUES et al., 2010). Entretanto para a maioria das plantas não há dados a respeito do uso na gravidez e os dados existentes são escassos e muitas vezes contraditórios. Os efeitos tóxicos diretamente relacionados à presença de determinados constituintes químicos são relatados para *Coriandrum sativum* que usado em doses elevadas, pode causar lesões renais, *Symphytum officinale* é hepatotóxico e carcinogênico, *Syzygium aromaticum*, em excesso ocasiona irritação gástrica e queimadura das mucosas, *Foeniculum vulgare* usado em concentração superior a 20 g/L pode ocasionar convulsão (CASTRO, 2006). Dessa forma, uma correta identificação das espécies vegetais e estudo prévio do perfil químico das mesmas podem servir de medidas profiláticas para evitar efeitos tóxicos associados a moléculas e/ou doses.

A importância da identificação das plantas para serem utilizadas como medicinais não era reconhecida, e com isso, durante anos, inúmeros trabalhos foram publicados com plantas medicinais sem a correta determinação da espécie (DI STASI, 1996). Além da identificação taxonômica do vegetal, uma correta investigação química contribui na busca de medicamentos ou na busca de moléculas precursoras de fármacos (KOROLKOVAS, 1988). Os produtos do metabolismo secundário das espécies vegetais servem de marcadores quimiotaxômicos, representando uma família, gênero ou espécie. Scarpati e Oriente (1958) isolaram o ácido rosmarínico pela primeira vez da *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), composto que foi nomeado de acordo com o nome da espécie. Todavia, apesar de ser o composto majoritário do alecrim, ele não pode servir de marcador quimiotaxonômico para o vegetal, pois este éster do ácido cafeico ocorre em outras famílias (TÓTH, 2003; PETERSEN, 2013).

O termo “qualidade” é o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. Portanto, a partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para

a matéria-prima, doplanejamento e do controle do processo de produção do medicamento, assegura-se a qualidade do produto final (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Os parâmetros de qualidade de plantas clássicas estão, estabelecidos em farmacopeias e códigos oficiais, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico, com monografias definindo critérios de identidade, de pureza e teor de constituintes químicos. No caso de plantas brasileiras, a maioria encontra-se descrita apenas na primeira edição da farmacopeia, editada em 1929. Muitos avanços científicos e tecnológicos tornaram essas monografias antiquadas para fins analíticos. Quando uma droga vegetal não consta em uma farmacopeia atualizada, faz-se necessário que a empresa que utiliza a respectiva espécie como matéria-prima elabore uma monografia estabelecendo seus padrões de qualidade (FARIAS et al., 2010).

Para a produção de fitoterápicos, são muitas as etapas, envolvendo um processo multidisciplinar, interdisciplinar e interinstitucional. A utilização de metodologias analíticas para a quantificação e controle dos marcadores químicos e/ou farmacológicos, desde a matéria-prima vegetal até o produto final, são requisitos indispensáveis ao registro de medicamentos no Brasil, permitindo a avaliação da qualidade, eficácia terapêutica e segurança (BRASIL, 2014).

A rica flora de nosso país, somado à complexidade e ao alto potencial medicinal das plantas brasileiras, requer estudos farmacognósticos, químicos e taxonômicos, permitindo o conhecimento acerca do uso das plantas medicinais de maneira segura e eficaz. A *Glechon spathulata* Bentham, em vista do seu grande potencial medicinal, entra nesse contexto.

## 1.2 GLECHON SPATHULATA BENTHAM

A família Lamiaceae (Labiatae) é uma das maiores e mais distintas famílias das angiospermas, compreendendo 7 subfamílias, e 236 gêneros com cerca de 7.200 espécies. No Brasil existem aproximadamente 500 espécies distribuídas em 38 gêneros (HARLEY et al., 2004; NAGHIBI et al., 2005; APG III, 2009; SOUZA; LORENZI, 2012). As lamiaceas são ervas, arbustos ou árvores de distribuição cosmopolita, com exceção de regiões mais frias de altas latitudes ou altitudes, que se caracterizam por apresentar folhas aromáticas, simples, inteiras, com disposição oposta-cruzada e flores hermafroditas, bilabiadas com o gineceu assentado sob um disco glandular e estilete do tipo ginobásico. Poucas plantas dessa família se adaptam à sombra ou a ambientes úmidos, a maioria delas se desenvolve em solo seco sob a incidência de intensa luz solar (FONT QUER, 1990; HARLEY et al., 2004; BARROSO, 2007).

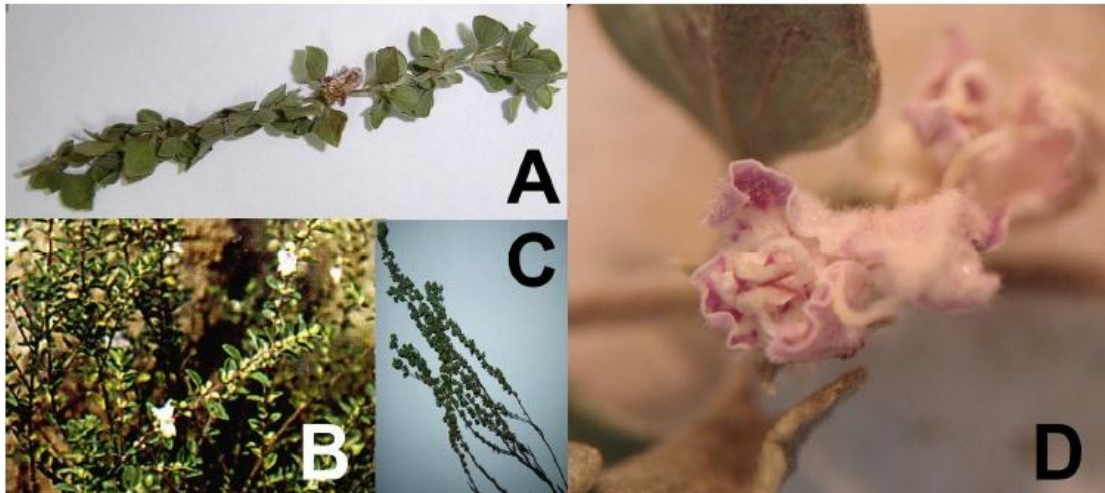
Evidências arqueológicas comprovam que o uso de plantas dessa família por humanos remonta os tempos pré-históricos (RIVERA NUNES; OBON DE GASTRO, 1992). Plantas dessa família são usadas para diversos fins, dando destaque para o uso medicinal, ornamental, na culinária e na indústria de cosméticos. A família Lamiaceae é conhecida pelo aroma marcante que seus representantes apresentam, o que as torna, de maneira geral, plantas aromáticas valorizadas e reconhecidas pelo óleo volátil, substância que ratifica suas propriedades. O óleo é basicamente constituído de terpenoides de cadeia curta, o que lhe confere odor e sabor. Espécies de *Mentha*, *Thymus*, *Salvia*, *Origanum*, *Coleus* e *Ocimum* são amplamente usadas como temperos na culinária e na indústria cosmética como fonte de essências (NAGHIBI et al., 2005).

A família Lamiaceae é composta por uma variedade de compostos químicos, como terpenoides, iridoides, compostos fenólicos e flavonoides, os quais têm sido reportados. Dentre os gêneros inseridos na família, pode-se citar *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Placanthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus*, *Nepeta* e o *Glechon* (NAGHIBI et al., 2005).

O gênero *Glechon* foi estabelecido por Sprengel (Sprengel 1827), que incluiu na época apenas uma espécie ao Brasil: *Glechon thymoides* Sprengel. Esse gênero pertence à Subfamília Nepetoideae, Tribo Mentheae, Subtribo Menthinae e seção Glechoneae, exclusivo da América do Sul, o qual se distribui, dividido em aproximadamente 9 espécies a partir do sul do Brasil, passando por Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, compreendendo o Paraguai, Uruguai e o nordeste da Argentina, abrangendo de maneira geral a Província de Corrientes (XIFREDA; MALLO, 2004; MOON et al., 2008). No Rio Grande do Sul foram reportadas 4 espécies do gênero: *Glechon spathulata* Bentham, *Glechonthymoides* Sprengel, *Glechon. marifolia* Bentham e *Glechon squarosa* Bentham (DI PRIMIO, 1946).

*Glechon spathulata* é um subarbusto perene, que atinge no máximo 70 cm de altura, caule prostrado desde a base e ramos ascendentes, em geral do meio para o ápice. Ocorre no Brasil, Uruguai e Argentina em terrenos abertos, por entre a pastagem e parcialmente protegida do sol pleno e, é popularmente conhecida como “manjerona-do-campo”. Na 1ª edição da Farmacopeia Brasileira (1929) consta uma monografia sobre esta espécie, onde é recomendado o seu emprego na forma de extrato fluido, indicada para desordens do trato respiratório. Suas flores solitárias são axilares, possuem um par de estames e exibem corola rosada a branca-amarelada que atinge no máximo 7 mm de comprimento, conforme ilustra a Figura 1 (XIFREDA; MALLO, 2004).

Figura 1 – Diferentes partes de *G. spathulata*(A, B, C, D)



Fonte: Kunz (2007).

Esta espécie é empregada como diaforética na Argentina e, no Brasil, é utilizada como condimento, estomáquico em dispepsias, antisséptico e expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, defluxos, bronquites e laringites (COIMBRA, 1942; MENTZ et al., 1997; MORGAN, 1997; XIFREDA; MALLO, 2004; BRANDÃO et al., 2006).

Montanha e colaboradores (2004) observaram que o extrato hidroetanólico a 50% de *G. spathulata* inibiu 100% o efeito citopático viral do vírus *Herpes Simplex* tipo 1 (HSV 1) em cepas KOS, ATCC-VR 733 e 29R-aciclovir-resistente e em células renais de macaco, tipo Vero ATCC CLL-81.

Em estudo desenvolvido no laboratório de investigação fitoquímicas (LABINFITO - UFSM), foi detectada a presença de flavonoides, triterpenos, antocianinas e taninos condensados no extrato bruto hidroetanólico a 70% de *G. spathulata* por meio de análise qualitativa preliminar. A partir do óleo volátil, foram separados e identificados nove constituintes químicos, dos quais sete foram identificados como 1,8-cineol, beta-carofileno, alfa-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de carofileno. O constituinte majoritário, que representa 84,39% do óleo essencial, não foi identificado. A atividade antimicrobiana deste óleo, do extrato e frações inibiu o desenvolvimento de cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e de *Candida albicans*, como também foi demonstrada a atividade antioxidante frente ao radical DPPH e toxicidade frente à *Artemia salina* (KUNZ, 2007).

Em outro estudo do LABINFITO com a mesma espécie vegetal, Banderó Filho (2010) detectou a presença de rutina, luteolina e canferol no extrato bruto hidroetanólico a 70%.



Além disso, comprovou a atividade anti-inflamatória deste extrato pelo método de indução de granuloma em ratos, demonstrando uma inibição de inflamação de 51,31%, bem próxima da apresentada pela nimesulida (60,38%). Além disso, verificou os caracteres morfoanatômicos da espécie contribuindo com o controle botânico de qualidade, que somados às suas propriedades organolépticas, permitem a verificação da autenticidade da planta.

Buzatti e colaboradores (2011) demonstraram a atividade acaricida dos extratos de *G. spathulata* frente a telóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e atribuíram tal efeito à presença de compostos fenólicos no extrato.

Venturi e colaboradores (2015) elucidaram os compostos presentes no óleo essencial de *G. spathulata* e testaram as atividades antifúngica e antiviral desse óleo. Os compostos majoritários presentes no óleo volátil foram beta-cariofileno (14,2%) e biciclogermacreno (17,1%). O óleo apresentou atividade antifúngica contra duas cepas de fungos dermatófitos (*Tricophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*) e, em concentrações não citotóxicas de óleo volátil, o título viral foi reduzido em até 2 log<sub>10</sub> para as cepas KOS e VR-733 de vírus herpes simplex humano tipo 1 (HSV-1).

### 1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabolismo é caracterizado pelo conjunto de reações químicas que ocorrem em cada célula de um determinado organismo. Destas reações são formados produtos denominados de metabólitos. De acordo com a teoria evolucionista todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características, explicando porque as maiores partes do carbono, do nitrogênio e da energia resultam em moléculas comuns a todas as células necessárias para o funcionamento de todos os organismos, sendo aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídeos, moléculas essenciais para a manutenção da vida dos seres, quer seja animal ou vegetal (GARCÍA; CARRIL, 2009; SANTOS, 2010).

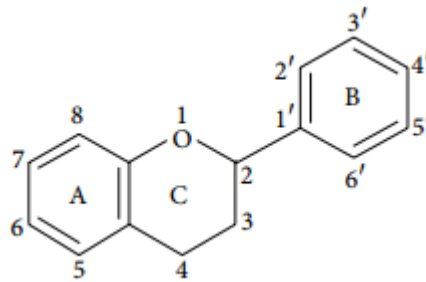
Os vegetais e outros organismos apresentam um metabolismo composto pela interação de enzimas e organelas capazes de transformar e acumular moléculas que além de atuar como elementos de diferenciação e especialização, não são essenciais à manutenção da vida do organismo produtor. A esse grupo de distintos compostos nomeia-se metabólitos secundários, os quais asseguram vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie por permitir a adequação do produtor a seu meio, mesmo sem serem essenciais a manutenção de sua vida (SANTOS, 2010).

Aos metabólitos secundários são atribuídas diversas atividades, como funções de defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores entre outros (MONTEIRO et al., 2005). Por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários podem apresentar atividades biológicas importantes, principalmente para o setor farmacêutico (SANTOS, 2010). As moléculas originárias desse metabolismo variam de acordo com a espécie e a família e alguns são restritos a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando seu emprego como marcador químiotaxonômico (BENETT; WALLSGROVE, 1994). As classes de metabólitos secundários são agrupadas em compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, destacando-se os óleos voláteis, flavonoides, taninos, saponinas, cardiotônicos, antraquinonas, cumarinas, lignoides, glicosídeos cianogénéticos, ácidos graxos, heterosídeos e polissacarídeos (SANTOS, 2010).

Compostos fenólicos possuem um anel benzênico com hidroxila(s) ligada(s) a esta estrutura, o que gera uma grande diversidade de estruturas simples e complexas. (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010). Dentre os inúmeros compostos fenólicos presentes no reino vegetal, pode-se destacar os ácidos fenólicos, em vista das suas proeminentes atividades biológicas já elucidadas e descritas na literatura, como antitumoral (VAZ et al., 2012) antioxidante (PIAZZON et al., 2012) e antimicrobiana (ALVES et al., 2013). Os ácidos fenólicos são sintetizados pela rota do ácido chiquímico, e podem ser divididos em dois maiores grupos: derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido benzoico, os quais são derivados de moléculas não fenólicas dos ácidos cinâmico e benzoico (HELENO et al., 2014).

Os flavonoides, amplamente distribuídos no reino vegetal, destacam-se pelo potencial medicinal, e são caracterizados por possuírem um grupamento benzo- $\gamma$ -pirona (KUMAR; PANDEY, 2013). São sintetizados pela rota dos fenilpropanoides e cerca de 8.000 já foram descritos, sendo que destes, mais de 4.000 diferentes compostos foram identificados (MIDDLETON, 1998). Quimicamente, apresentam um esqueleto de quinze átomos de carbonos, constituídos por dois anéis benzênicos (A e B), ligados a um anel pirano heterocíclico (C), (Figura 2). Apresentam uma variedade de classes de acordo com o grau de oxidação e padrão de substituição do anel C e dentro das classes diferem no padrão de substituição dos anéis A e B com a estrutura química como flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina, canferol, mirecetina e fisetina), flavanonas (flavanona, hesperetina e naringenina), entre outros (MIDDLETON, 1998).

Figura 2– Estrutura básica de um flavonoide



Fonte: Adaptado de Kumar e Pandey (2013).

Estes são pigmentos solúveis em água possuem diversas atividades biológicas já comprovadas cientificamente, mas a principal atividade descrita que ocorre em quase todos os grupos de flavonoides, é a sua capacidade de agir como antioxidante. A atividade antioxidante dos flavonoides depende do arranjo dos grupamentos funcionais sobre a estrutura fundamental flavonoídica. A configuração, a substituição, e o número total de grupamentos hidroxila influenciam, de maneira geral, nos mecanismos de atividade antioxidante, como a eliminação de radicais e a capacidade de quelar íons metálicos. A configuração de radical hidroxila do anel B é a variável mais significativa na eliminação espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs). O potencial antioxidante dos flavonoides depende do número e posição dos grupos hidroxila e de sua conjugação, bem como da presença de elétrons doadores no anel estrutural, devido à capacidade que possui o grupo aromático de suportar o desemparelhamento de elétrons (ZUANAZZI, 2010). A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou heterosídeos, o que possibilita que, os compostos fenólicos, possam ser obtidos a partir de extratos vegetais de material fresco ou seco. (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O interesse farmacológico por essa classe de compostos químicos, principalmente os ácidos fenólicos e os flavonoides, tem aumentado devido a importante capacidade antioxidante, e por diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, hepatoprotetora, antimicrobiana, na prevenção de aterosclerose, entre outras, que ainda não foram completamente elucidadas (COWAN, 1999; LÓPEZ et al., 2002; WILLAIN FILHO, 2005; FONSECA, 2006; MISHRA et al., 2009; ZHU et al., 2012; ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

A determinação da concentração exata de fenólicos totais em matrizes complexas é dificultada devido a uma série de fatores, como a ampla variedade de fenólicos, a complexidade da matriz, a presença de interferentes e a dificuldade de extração destes da matriz. Como a determinação exata desses fenólicos ainda não se faz possível, de maneira

preliminar em análises químicas, utiliza-se uma estimativa de concentração total de fenóis, conhecida como índice de polifenóis totais, que se refere a medidas espectrofotométricas (ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

Entre elas, destaca-se a metodologia que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é conhecido por reagir com todas as espécies redutoras em uma solução. Esta reação baseia-se na redução dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdínico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) pelos compostos fenólicos presentes na solução a óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ) em meio alcalino (Figura 3). Estes óxidos formados possuem a cor azulada, sendo possível a quantificação de suas absorvâncias na região do visível (760 nm) por espectrofotometria. Através de uma curva de calibração de ácido gálico é possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Por reagirem com todas as espécies químicas redutoras, não é uma metodologia muito sensível, e é utilizada como abordagem preliminar nas pesquisas científicas desse viés (EVERETTE et al., 2010).

Figura 3 – Mecanismo da reação de redução de compostos fenólicos pelo reagente Folin-Ciocalteu



Fonte: Adaptado de Rio (1996).

Outra análise espectrofotométrica amplamente usada na pesquisa é para a quantificação de flavonoides totais, que se baseia na capacidade dos flavonoides, em geral, formarem complexos coloridos com cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), que obtém picos de absorção na região de 423 nm, sendo possível a análise por espectrofotometria (RIO, 1996).

Com o desenvolvimento tecnológico, os métodos analíticos principais e mais sensíveis para a análise de compostos químicos são os métodos cromatográficos somados a métodos espectrométricos e espectroscópicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), a espectrometria de massas (MS), espectroscopia no Infravermelho (IR) espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), entre outros (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Sistemas de CG e CLAE acoplados MS são um dos mais poderosos métodos utilizados para a detecção de antioxidantes específicos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). O

uso de sistemas de cromatografia líquida, para a análise de moléculasfenólicas, permite a separação de compostos de caráter mais polar e baixa estabilidade térmica, em detrimento do que possibilita as análises em cromatografia gasosa (NIESSEN; MANINI; ANDREOLI, 2006).

Mais recentemente foram desenvolvidos sistemas cromatográficos capazes de trabalhar em altas pressões (100 MPa, sendo que as pressões convencionais de trabalho são de 40 MPa) utilizando partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , e esse avanço na cromatografia líquida foi denominado cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que ao serem utilizados somados ao emprego de detecção por espectrometria de massas, possibilitou aumentar a sensibilidade e a seletividade dos métodos cromatográficos (MALDANER; JARDIM, 2009; MACEDO, 2014).

Técnicas cromatográficas vêm sendo aplicadas com muito sucesso e precisão na análise das mais diversas matrizes e compostos. Porém, o emprego e o sucesso analítico dessas técnicas demandam um cuidadoso preparo do material a ser analisado, visando à extração e concentração dos analitos de interesse somado à eliminação dos interferentes, propiciando maior detectibilidade e seletividade. Existem vários métodos de preparo de amostras, como por exemplo o QuEChERS, a Extração em Fase Sólida (Solid-PhaseExtraction - SPE), a Microextração em Fase Sólida (Solid-PhaseMicroextraction - SPME) a Extração Líquido-líquido (Liquid-liquidExtraction - LLE), entre outras (MACEDO, 2014).

Na SPE a fase extrativa é o sólido. Esta técnica tem sido muito utilizada para remover ou concentrar substâncias de matrizes líquidas presentes em quantidades pequenas. Pode ser considerado como um meio de purificação de amostras antes da análise por cromatografia líquida, a fim de eliminar outras substâncias que compõem a matriz (SILVA, 2012).

A SPE conta com uma grande variedade de adsorventes disponíveis, que podem ser utilizados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (QUEIROZ et al., 2001). Resina de poliamida é usada para adsorver os compostos polares (p. ex. hidroxilas de compostos fenólicos) de soluções aquosas ou metanólicas no âmbito do mecanismo de fase reversa através de ligações fortes de hidrogênio entre o composto de grupos hidroxila e grupos de amida da resina. É útil para extração de compostos fenólicos em geral, tais como taninos, terpenos farmacologicamente ativos, flavonoides, ácido gálico, ácido protocatecuico, alfa-catecol, floroglucinol, entre outros. Também é útil para a extração de ácidos fenólicos, compostos nitroaromáticos e irreversivelmente retém quinonas. As suas características são as seguintes: Tamanho de partícula: 50-160 pm, pH: 4,5-7,5, Densidade: 0,2-0,3  $\text{cm}^3/\text{g}$ , teor de água: < 5% (SILVA, 2012).

## 1.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A procura de plantas medicinais, quando comparado aos medicamentos sintéticos, tem aumentado a cada dia, mas o emprego destas com o intuito terapêutico requer o uso de plantas selecionadas e comprovadas como medicinais, com suas atividades biológicas devidamente elucidadas, assegurando segurança e eficácia terapêutica. Plantas da flora brasileira são utilizadas, de maneira geral, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades terapêuticas. Muitas espécies têm sua atividade biológica comprovada cientificamente, entre essas a *Passiflora alata*, usada como sedativo insônia, *Mentha pulegium*, usada para bronquite, *Centela asiática*, em preparações magistrais e em cosméticos na cicatrização, espécies do gênero *Citrus* de maneira geral, são utilizadas para distúrbios gastrointestinais, entre outros (SIMÕES et al., 2010).

Modelos de avaliação de atividade biológica empregados na pesquisa e no desenvolvimento de medicamentos, desde os ensaios laboratoriais, triagens, testes pré-clínicos e clínicos, aprovação em órgãos competentes, até a comercialização, fazem parte da investigação de plantas medicinais (SIMÕES et al., 2010). A avaliação do potencial antioxidante se destaca visto que radicais livres causam danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando patologias, como o câncer e a aterosclerose, e avaliação de atividade antimicrobiana, já que o uso indiscriminado de antibióticos ocasiona um aumento na incidência de micro-organismos patogênicos resistentes (BOLIGON et al., 2013; SHAHIDI; PRIYATHARINI, 2015).

### 1.4.1 Potencial antioxidante

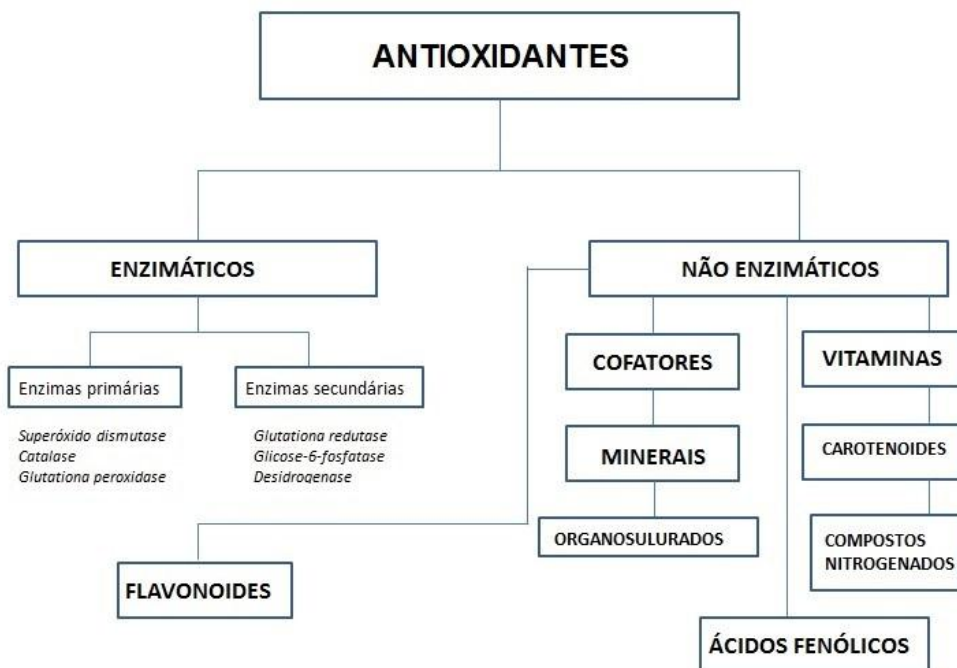
Substâncias antioxidantes são protetoras dos sistemas biológicos contra os danos causados por espécies reativas. Estas derivam do metabolismo natural ou são de origem externa e podem danificar vários tipos de macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA, causando doenças degenerativas, cardiovasculares e até mesmo câncer (SANTOS et al., 2007). A expressão espécies reativas de oxigênio (EROs) designa os radicais de oxigênio, como os radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot$ ), e alguns derivados não radicalares do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), o oxigênio singlete ( $1\text{O}_2$ ) e peróxidos orgânicos derivados de lipídios (HALLIWELL, 2011). O radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso são liberados em grandes quantidades pelos macrófagos e neutrófilos durante a fagocitose de agentes estranhos (LOPES, 2013). A expressão espécies reativas de nitrogênio (ERNs), refere-se aos

metabólitos reativos derivados do óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), como o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}\bullet_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (AUGUSTO; MIYAMOTO, 2011).

A produção das espécies reativas é equilibrada pela ação dos sistemas antioxidantes de defesa em seres aeróbios saudáveis. Quando ocorre um desequilíbrio ou os sistemas de reparo e os de substituição falham, passando a ter altas quantidades de espécies reativas em relação aos antioxidantes, temos o fenômeno conhecido como estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático (Figura 4) (BARBOSA et al., 2010). O sistema não enzimático é constituído por uma variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. De maneira geral, a capacidade antioxidante de vegetais está diretamente relacionada aos teores de compostos hidrossolúveis, como os compostos fenólicos, que impedem a ação dos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ALVES et al., 2010).

Figura 4 – Defesas antioxidantes de seres aeróbios



Fonte: Adaptado de Caroch e Ferreira (2013).

Os flavonoides são um grupo dos compostos fenólicos com capacidade antioxidante, cujas propriedades são diretamente atribuídas aos grupamentos hidroxila, que estão ligados

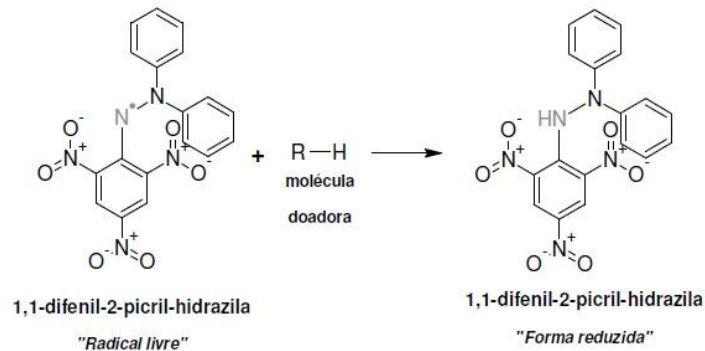
aos anéis da estrutura flavonoídica. Os mecanismos da ação antioxidante podem ocorrer de várias maneiras, como por atuar como agente redutor, doador de hidrogênio, supressor do oxigênio singlete, depletor do radical superóxido, ou ainda, quelante de metais (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Juntamente aos flavonoides, os ácidos fenólicos também possuem importantes propriedades antioxidantes, pelo mesmo mecanismo principalmente por atuar como agente redutor e quelante dos radicais hidroxil e peroxil, ânions superóxido e peroxinitritos (TERPINC et al., 2011).

Para avaliar a capacidade antioxidante há ensaios *in vitro*, que abrangem seus alvos específicos dentro de uma matriz, contendo suas vantagens e desvantagens. Não existem métodos que gerem resultados inequívocos, sendo a melhor solução o uso de mais de um método (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Um método útil para avaliar a habilidade de um composto em capturar radicais livres *in vitro* é o procedimento que envolve o sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH), radical livre com o qual substâncias que apresentam potencial antioxidante interagem, doando-lhe elétrons ou átomos de hidrogênio e reduzindo-o. Ao reduzir-se, ocorre alteração na cor da solução de violeta a amarelo pálido, a qual é medida espectrofotometricamente (Figura 5). Este método é simples, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais (ALVES et al., 2010). A planta *Teucrium marum* (Lamiaceae) usada como antimicrobiana e anti-inflamatória teve sua atividade antioxidante testada frente ao DPPH e o resultado obtido foi melhor que o obtido para os padrões ácido ascórbico e butilhidroxitolueno (BHT) (RICCI, et al., 2005). Assim como *Lamium album*, *Viscum album* e *Lamum purpureum*, que avaliadas pela mesma metodologia apresentaram atividade positiva (BUDZIANOWSKI; BUDZIANOWSKA, 2006). Sadashiva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antioxidante de três espécies africanas da família Lamiaceae: *Endostemon obtusifolius*, *Plectranthus zuluensis* e *Tetradenia riparia* e obtendo, respectivamente, os valores de 130 µg/mL, 169 µg/mL e 142 µg/mL de CI<sub>50</sub>.



Figura 5 – Demonstração esquemática da redução do radical livre DPPH pelo hidrogênio



Fonte: Adaptado de Watanabe e colaboradores (2012).

Para complementar algumas metodologias *in vitro* como a do DPPH, outras foram desenvolvidas. O método de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) surgiu como uma boa alternativa e vem sendo aplicado em centenas de análises de alimentos e plantas medicinais. O método ORAC afere a capacidade sequestradora frente radicais peróxil induzido por dicloridrato de 1,1'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) a 37°C. A fluoresceína é usada como fonte de fluorescência e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-ácido carboxílico (Trolox) como antioxidante padrão, sendo a capacidade antioxidante expressa em Equivalentes de Trolox (TE) (WATANABE et al., 2012). Esta metodologia possui intrinsecamente relevância biológica, uma vez que o radical peróxil corrobora com a degradação oxidativa de moléculas biológicas no corpo, e é gerada a partir do AAPH em pH neutro a 37°C, temperatura corpórea (HUANG et al., 2002). Ninfali e colaboradores (2005) demonstraram a capacidade antioxidante de várias especiarias e bebidas pelo método ORAC. Dentre elas, a *Salvia officinalis*, a *Rosmarinus officinalis*, a *Origanum vulgare* e a *Origanum majorana*, todos representantes da família Lamiaceae, apresentaram representativas atividades.

#### 1.4.2 Atividade antimicrobiana

O uso de extrativos vegetais com propriedades antimicrobianas tem adquirido grande importância na terapêutica da atualidade, pois, devido ao fato de as bactérias adquirirem resistência aos antibióticos sintéticos, aumentou a necessidade de se buscar fontes alternativas de compostos que possam capacidade de ser utilizados no tratamento de infecções por micro-organismos. Nos últimos anos, estudos têm sido realizados visando a comprovação da

eficiência do uso de preparados vegetais como agentes antimicrobianos (SIMÕES et al., 2010).

A atividade antimicrobiana em preparados fitoterápicos está relacionada aos compostos sintetizados pelo metabolismo secundário vegetal. Os compostos fenólicos, alcaloides, quinonas, flavonoides, taninos e cumarinas são os principais representantes antimicrobianos descritos na literatura (MIRANDA et al., 2013).

Muitas plantas usadas como condimentos possuem sua atividade antimicrobiana elucidada, podendo ser usadas como conservantes em alimentos, como *Origanum*, *Thymbra* e *Satureja* (BAYDAR et al., 2004). Kunz (2007) demonstrou a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico a 70% de *Glechon spathulata*, pelo método de microdiluição em caldo, obtendo melhores resultados frente às bactérias gram-positivas *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* ATCC14579, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) 50, 100, 100 e 200 µg/mL, respectivamente.

## 2 JUSTIFICATIVA

Para Alvim e colaboradores (2006), “o uso de plantas medicinais na terapêutica constitui uma prática milenar, historicamente construída na sabedoria do senso comum, articulando cultura e saúde”. Desde os tempos primórdios, o homem busca na natureza a solução para seus males, sejam de ordem espiritual ou física. O surgimento do conceito "natural" contribuiu para que, nas últimas décadas, houvesse um aumento significativo do uso das plantas medicinais no mundo. Para muitas pessoas esse conceito significa "ausência de produtos químicos", assim, os produtos naturais passaram a ser vistos como produtos saudáveis, sem risco algum a saúde. Conceito equivocado, já que muitas plantas contêm substâncias capazes de exercer efeito tóxico sobre o organismo (MENGUE et al., 2001).

Somado a isso, muitas das plantas medicinais utilizadas atualmente no Brasil não têm o seu perfil químico e propriedades biológicas bem esclarecidas, sendo um risco à população usuária, uma vez que sem esse conhecimento prévio, existem muitos riscos inerentes ao uso deliberado de preparados dessas espécies vegetais. Nesse contexto, encontra-se a manjerona-do-campo. Dessa forma, justifica-se o estudo do perfil químico e de atividade biológica do extrato bruto de *G. spathulata*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização fitoquímica das partes aéreas (caule e folhas) de *Glechon spathulata* quanto à composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extrato bruto das partes aéreas (caule e folhas) de *G. spathulata*;
- Quantificar o teor de polifenóis totais e flavonoides no extrato por metodologias espectrofotométricas;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos por meio de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a detector de massas com interface de ionização por electrospray (CLUE-ESI-MS/MS);
- Determinar o potencial antioxidante *in vitro* de *G. spathulata* pelos métodos 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) e capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC);
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente a cepas ATCC pelo método de microdiluição em caldo com determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

## 4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Este manuscrito será submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.

### 4.1 MANUSCRITO

#### **POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO BRUTO DE *Glechon spathulata* Benth. (LAMIACEAE)**

Gustavo Ugalde<sup>1</sup>, Melânia Palermo Manfron<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), UFSM, Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS) /Brasil (BR).

<sup>2</sup> Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Professora Titular do Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, SM, RS/BR.

\* Endereço para correspondência: Manfron, M. P. Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Prédio 26, sala 1134, melaniapalermo@gmail.com

## ABSTRACT

*Glechon spathulata* belongs to Lamiaceae family, which comprises in Brazil 500 species in 38 genera. This species is popularly known as "manjerona-do-campo" and is used in folk medicine in Brazil as a condiment, stomachic in dyspepsia, antiseptic and expectorant in catarrhal respiratory diseases, colds, bronchitis, laryngitis and others. The aim of this study was to develop a Pharmacognostic characterization of the crude extract (CE) hydroethanolic 70% of the aerial parts (stems and leaves) of *G. spathulata* and evaluate their antimicrobial and antioxidant activities. The CE showed adequate antioxidant activity by the two methods employed, getting to the method of inhibition of DPPH radical  $IC_{50}$  of  $48.29 \pm 1.21$  mg/g for the ORAC method the value of  $10.51 \pm 0.78$   $\mu$ mol Trolox/g higher than the standard Trolox tested at the same concentration. The CE showed high levels of total polyphenols ( $186 \text{ mg} \pm 4.00$  GAE/g) and total flavonoid ( $59.4 \pm 0.58$  mg QE/g) compared to the species of the family. Added to this, 13 phenolic compounds divided into five major classes (derived from cinnamic acid, derived from benzoic acid, derivatives of caffeic acid, flavonoids and phenolic terpenes) were identified and quantified by UHPLC-ESI-MS/MS, highlighting the rosmarinic acid, which have a concentration of 34.458% in the CE. The gram-negative bacteria tested in the study were sensitive to *G. spathulata* CE (*Escherichia coli* ATCC 35218 - 200  $\mu$ g/mL; *Escherichia coli* ATCC 25922 - 800 $\mu$ g/mL; *Salmonella* spp. ATCC 5217 – 200  $\mu$ g/mL). The results of this study together indicate that this plant has antioxidant potential and may be a promising source of natural antioxidants and derivatives with antimicrobial potential.

**Keywords:** Lamiaceae; *Glechon spathulata*; Polyphenols; UHPLC-ESI-MS/MS; DPPH; ORAC.

## RESUMO

*Glechon spathulata* pertence à família Lamiaceae, que compreende no Brasil 500 espécies distribuídas em 38 gêneros. Esta espécie é popularmente conhecida como “manjerona-do-campo” e é usada na medicina popular do Brasil como condimento, estomáquico em dispepsias, antisséptico e expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, defluxos, bronquites, laringites e outros. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma caracterização farmacognóstica do extrato bruto (EB) hidroetanólico a 70% das partes aéreas (caules e folhas) de *G. spathulata* e avaliar suas atividades antimicrobiana e antioxidante. O EB apresentou adequada atividade antioxidante pelos dois métodos empregados, obtendo para o método de inibição do radical DPPH  $CI_{50}$  de  $48,29 \pm 1,21 \mu\text{g/g}$  e para o método ORAC o valor de  $10,51 \pm 0,78 \mu\text{mol Trolox/g}$ , superior ao padrão Trolox testado na mesma concentração. O EB apresentou elevado teor de polifenóis totais ( $186 \pm 4,00 \text{ mg GAE/g}$ ) e flavonoides totais ( $59,4 \pm 0,58 \text{ mg QE/g}$ ) quando comparado à espécies da família. Somado a isso, 13 compostos fenólicos divididos em 5 classes principais (derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido benzoico, derivados do ácido cafeico, flavonoides e terpenos fenólicos) foram identificados e quantificados por UHPLC-ESI-MS/MS, com destaque para o ácido rosmarínico, que apresentou concentração de 34,458% no EB. Apenas as bactérias gram-negativas testadas no estudo foram sensíveis ao EB de *G. spathulata* (*Escherichia coli* ATCC 35218 -  $200 \mu\text{g/mL}$ ; *Escherichia coli* ATCC 25922 -  $800 \mu\text{g/mL}$ ; *Salmonella* spp. ATCC 5217 -  $200 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados obtidos neste estudo, somados, indicam que esta planta possui potencial antioxidante e pode ser uma promissora fonte de antioxidantes naturais e de derivados com potencial antimicrobiano.

**Palavras-chave:** Lamiaceae; *Glechon spathulata*; Polifenóis; UHPLC-ESI-MS/MS; DPPH; ORAC.

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais da flora brasileira são utilizadas com pouca ou até nenhuma comprovação de suas atividades farmacológicas. Essas atividades estão relacionadas aos produtos do metabolismo secundário produzidos pelos vegetais em condições adversas, visando a perpetuação da espécie (BRAZ FILHO, 2010). Dentre estes metabólitos, destacam-se os compostos fenólicos, substâncias pertencentes a uma classe de substâncias químicas que

incluem uma grande diversidade de estruturas com pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxilas (SIMÕES et al., 2010). Entre os derivados polifenólicos mais biologicamente ativos pertencentes ao reino vegetal, encontram-se as cumarina, as ligninas, os taninos, os flavonoides, os triterpenos, os derivados do ácido cafeico, entre outros, que são relacionados a atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, imunorreguladora, antitumoral, entre outras (YANG et al., 2001; SULTANA; ANWAR, 2008; LIMA NETO et al., 2015).

As bactérias possuem elevada capacidade de mobilizar genes de resistência, o que faz com que casos de bactérias super-resistentes sejam mais recorrentes, o que é consequência do uso indiscriminado dos fármacos sintéticos disponíveis (VAN INGEN et al., 2012). Nesse contexto, com aumento da necessidade de se buscar fontes alternativas de terapias antimicrobianas, o uso de extrativos vegetais tem adquirido grande importância (BOLIGON et al., 2013).

No contexto de buscas de terapias alternativas, destacam-se os estudos sobre a atividade antioxidante em plantas, que vem sendo bastante desenvolvidos, devido à probabilidade dos antioxidantes sintéticos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), empregados na conservação de alimentos estarem associados a efeitos nocivos à saúde (TEPE et al., 2005). O ser humano possui vários mecanismos antioxidantes que controlam os radicais livres e evitam os danos produzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs), que são compostos potencialmente agressivos às células, em especial os neurônios. As enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase constituem dois exemplos de antioxidantes fisiológicos que auxiliam no combate aos radicais livres (RLs), as quais fazem parte do mecanismo enzimático de proteção antioxidante (BARBOSA et al., 2010). O sistema não enzimático é constituído por uma variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. De maneira geral, a capacidade antioxidante de vegetais está diretamente relacionada aos teores de compostos hidrossolúveis, como os compostos fenólicos, que impedem a ação dos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ALVES et al., 2010). Essa atividade antioxidante está associada a presença de grupamentos hidroxila em metabólitos secundários, como flavonoides, taninos e alguns compostos voláteis (ANASTASIADI et al., 2010). Estas substâncias agem interagindo com os RLs que dão início às reações de oxidação, ou seja, na inibição de processos oxidativos, diminuindo a atividade das enzimas oxidases ou na complexação de íons metálicos que catalisam reações de oxidação (LÓPEZ et al., 2002; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). Sabe-se que flavonoides e ácidos fenólicos, como a quercetina e o ácido rosmarínico,



possuem uma potente atividade antioxidante, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inclusive em doenças neurodegenerativas, porém necessitam de uma formulação especial para transpor a barreira hemato-encefálica (LÓPEZ et al., 2002).

*Glechon spathulata* Benth (Lamiaceae,) é um subarbusto perene, que atinge no máximo 70 cm de altura, caule prostrado desde a base e ramos ascendentes em geral do meio para o ápice. Ocorre no Brasil, Uruguai e Argentina em terrenos abertos, por entre a pastagem e parcialmente protegida do sol pleno e, é popularmente conhecida como “manjerona-do-campo”. Suas flores solitárias são axilares, possuem um par de estames e exibem corola rosada a branca-amarelada que atinge no máximo 7 mm de comprimento (XIFREDA; MALLO, 2004). Esta espécie é empregada na Argentina como diaforética e, no Brasil, utilizada como condimento, como estomáquico em dispepsias, antisséptico e expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, defluxos, bronquites e laringites (COIMBRA, 1942; MENTZ et al., 1997; MORGAN, 1997; XIFREDA; MALLO, 2004; BRANDÃO et al., 2006).

Montanha et al. (2004) observaram que o extrato hidroetanólico a 50% de *G. spathulata* inibiu 100% o efeito citopático viral do herpes simples tipo 1 (HSV 1), cepas KOS, ATCC-VR 733 e 29R-aciclovir-resistente, em células renais de macaco, tipo Vero ATCC CLL-81. Buzatti e colaboradores (2011) demonstraram a atividade acaricida dos extratos de *G. spathulata* frente a telóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A presença de flavonoides, triterpenos, antocianinas e taninos condensados foi detectada no extrato bruto hidroetanólico a 70% de *G. spathulata* através de análise qualitativa preliminar. No óleo volátil, foram separados e identificados nove constituintes químicos, dos quais sete foram identificados como 1,8-cineol, beta-carofileno, alfa-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno. A atividade antimicrobiana do óleo, a inibiu cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e de *Candida albicans*. O extrato bruto, frações e o óleo essencial apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH e toxicidade frente à *Artemia salina* (KUNZ, 2007). Banderó Filho (2010) identificou rutina, luteolina e canferol no extrato bruto hidroetanólico a 70% através do estudo do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE). A atividade anti-inflamatória deste extrato foi comprovada pelo método de indução de granuloma em ratos e a morfoanatomia realizada para a espécie contribuiu com o controle botânico de qualidade, permitindo a autenticidade da mesma. Venturie colaboradores (2015) demonstraram as propriedades anti-herpéticas (HSV-1) e antifúngicas do óleo de *G. spathulata* contra

dermatófitos, além de determinarem o perfil químico do óleo, obtendo beta-cariofileno (14,2%) e biciclogermacreno (17,2%) como os principais componentes.

Baseado nas propriedades medicinais atribuídas a *G.spathulata* e sua ampla utilização na medicina popular, com carência de pesquisas sobre o perfil químico do extrato bruto da espécie, os objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade antioxidante, antimicrobiana e o teor de compostos fenólicos das partes aéreas (caules e folhas) de manjerona-do-campo. A capacidade antioxidante foi avaliada por dois métodos *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Produtos químicos e reagentes

Os produtos químicos usados neste estudo foram de grau analítico e cromatográfico. Os padrões utilizados na cromatografia (grau analítico com 95% de pureza) (+)- catequina, 3-acetil cumarina, 3,6 dihidroxiflavona, 4-hidroxycumarina, 6-hidroxycumarina, apigenina, ácido clorogênico, crisina, fisetina, galangina, ácido gálico, canferol, luteolina, mircetina, ácido-*p*-cumárico, ácido vanílico, o ácido acético (grau LC-MS), o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o ácido gálico, 2,2'-azobis-2-aminopropano dihidroclorato (AAPH), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e o antioxidante padrão (Trolox, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) foram obtidos de Sigma Aldrich (Stenheim, Germany). O reagente Folin-Ciocalteu (2,4,6-tris(2-piridil)-*s*-triazina) (TPTZ), o ácido cafeico e o ácido ferúlico foram obtidos da Fluka-Chemie (Buchs, Switzerland). O metanol e acetonitrila (grau LC-MS) foram obtidos da Panreac AppliChem (Barcelona, Spain). Para a cromatografia, as soluções de reserva dos padrões (1 mg/L) foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas de substâncias em metanol grau LC-MS. Para a reação de ORAC, o etanol (Vetec, Brasil) foi utilizado para a diluição do extrato bruto, juntamente ao tampão fosfato. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar a  $-30^\circ\text{C}$  até serem usadas. As soluções de trabalho dos padrões foram preparadas por diluições de soluções estoque de acordo com as concentrações desejadas. O meio de cultura Ágar Mueller Hinton foi adquirido da Becton-Dickson Biosciences (Franklin Lakes, USA). A água utilizada em todas as análises foi ultrapura e foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, Millipore (Bedford, USA).

## **Material vegetal e obtenção do extrato bruto**

As partes aéreas (folhas e caule) de *G. spathulata* foram coletadas em janeiro de 2014 no município de Dilermando de Aguiar, estrada do Passo da Laranjeira (Rio Grande do Sul, Brasil) e encaminhadas à identificação botânica na Universidade Federal de Santa Maria pelo Prof. Dr. Renato Aquino Zachia. O material testemunho foi armazenado no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (SMDB) sob o número SMDB 15.061.

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante à temperatura de aproximadamente de 40 °C e triturado em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à maceração hidroalcoólica com etanol a 70% na proporção de 20% (droga vegetal/solvente orgânico), com renovação de solvente por um período de 30 dias exaustivamente. Após esse período, o conteúdo foi filtrado, removido o solvente orgânico eliofilizado, obtendo-se extrato bruto seco (EB).

## **Determinação de Polifenóis totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (CHANDRA; MEJIA, 2004). Resumidamente, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2 N foi adicionado a 1 mL de cada amostra (80 µg/mL) e esta mistura permaneceu durante 5 minutos em temperatura ambiente no escuro antes da adição de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Após 10 minutos a 25 °C, a absorbância foi lida a 730 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis 1201, Kyoto, Japan). O branco foi preparado com água destilada. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em Equivalentes de Ácido Gálico (GAE), em mg/g de amostra seca. A curva de regressão de ácido gálico foi construída no intervalo de 0.006 – 0.030 mg/mL foi  $Y = 0.0285x + 0.0167$  ( $r^2=0.9993$ ).

## **Determinação de Flavonoides totais**

A determinação do conteúdo de Flavonoides totais foi desenvolvido de acordo com Rio (1996), modificado. Resumidamente, 75 µL de solução de AlCl<sub>3</sub> em metanol (MeOH) 5% foi adicionado a 1 mL de cada amostra (400 µg/mL MeOH 70%) e 4 mL de MeOH 70%. Esta mistura foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos, antes de ser procedida a leitura a leitura a 425 nm em espectrofotômetro. O branco foi preparado com

MeOH 70% em vez do extrato da planta. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em Equivalente de Quercetina (QE), em mg/g de amostra seca. A curva de regressão de ácido gálico construída no intervalo de 0.002 – 0.070 mg/mL foi  $Y = 0.0058x - 0.01537$  ( $r^2=0.9974$ ).

### **Caracterização e quantificação de Polifenóis por UHPLC-ESI-MS/ MS**

A caracterização e quantificação dos compostos fenólicos seguiu metodologia desenvolvida por Faccin e colaboradores (2016). As separações foram realizadas num sistema binário infinito UHPLC 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), que foi capaz de funcionar a pressões de até 600 bar. Uma coluna Zorbax SB-C18 de rápida resolução HD (2,1 × 50 mm, 1,8 mm, Agilent) foi usada a uma temperatura de 40°C. O volume de injeção foi de 5 µl, e as alíquotas injetadas foram acidificadas para uma concentração final de ácido acético 0,1% (v/v). Os compostos fenólicos foram separados utilizando um gradiente de eluição composto por ácido acético a 0,1% em água (A) e acetonitrila (B) com a fase móvel a uma taxa de fluxo constante (0,8 ml/min) de acordo com o seguinte programa de eluição: 8,0% B (0,00-10 min); 8,0-25,8% B (0,10-3,45 min); 25,8-54,0% B (3,45-6,90 min); 54,0-100,0% B (6,90-7,00 min); e 100,0% B (7,00-9,00 min).

Uma fonte de ionização por electrospray (ESI) foi utilizada para ionizar o efluente cromatográfico gerado até 7,0 min. Os parâmetros para a ESI foram otimizados para se obter a melhor resposta para os analitos, especialmente para a intensidade e estabilidade do sinal. Os parâmetros finais foram otimizados a um fluxo de gás de 11 L/min, um nebulizador de 30 psi, uma voltagem capilar de 2,4 kV e a temperatura do gás de 250°C, com o nitrogênio utilizado como gás de secagem.

Os compostos foram subsequentemente analisados em um espectrômetro de massa Agilent6430 Triplo Quadrupolo, operando no modo de monitorização de reação múltipla (MRM) com uma resolução de 0,7 m/z (FWHM). As transições de quantificação foram divididas em três segmentos temporais de aquisição e o tempo de permanência para cada transição foi otimizado para 20 ms. A alta pureza do nitrogênio (99,999%) que foi utilizado como gás para a indução da colisão foi obtido de Linde (Munique, Alemanha). As energias de colisão foram otimizadas para cada analito como demonstradas por Faccin e colaboradores (2016) na Tabela 1, que descreve as transições monitoradas pelo espectrômetro de massas.

## **Análise da amostra**

Uma quantidade de 0,06 g do EB foi ressuspensionado em 3 mL de metanol, sonificado até à dissolução completa, diluído com 12 mL de água ultrapura e, após, o ácido acético foi adicionado a uma proporção final de 0,1% (V/V). Em seguida, os extratos foram filtrados através de membranas hidrofílicas de teflon (PTFE) com um tamanho de poro de 0,22 µm.

Antes da análise cromatográfica, o extrato bruto foi tratado por meio da técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando um cartucho de fase sólida Strata C18-E (500 mg, 3 mL, Phenomenex, Torrance USA). O cartucho foi inicialmente condicionado com 6 mL de uma solução de metanol:ácido acético 0,2% (1:1, v/v). Posteriormente, foi equilibrado com 6 mL de ácido acético 0,1% em água. Um volume de 2 mL de extrato com composição metanol:água:ácido acético (20:80:0,1, v/v) foi então percolado sobre o cartucho, em um fluxo de 2 mL por minuto, seguido por lavagem com 2 mL de ácido acético 0,1%. Por final, os analitos retidos foram eluídos com 2 mL de metanol.

Imediatamente antes da análise cromatográfica, o eluato obtido a partir do procedimento de SPE foi diluído em uma solução de MeOH 0,2%: CH<sub>3</sub>COOH (1:1, v/v). O método de adição de padrão foi utilizado para a quantificação das amostras. As curvas de calibração foram construídas com sete níveis de concentração, igualmente espaçadas, em adição de um branco de amostra. Os pontos da curva de calibração foram determinados em triplicata.

## **Capacidade antioxidante pelo método ORAC**

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método ORAC descrito por UO et al., 2001. Este método verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente a um radical peroxila induzido pelo AAPH a 37 °C. Para essa análise foi utilizado leitor de microplacas SpectraMax® M5 (Molecular Devices, California, EUA). Foram adicionados 25 µL de EB de *G. spathulata* (10 mg/L) em tampão fosfato (75 mmol/L), e a microplaca foi incubada durante 10 minutos a 37 °C com 150 µL de solução de fluoresceína (81 nmol/L). Após a incubação, 25 µL de AAPH (152 mmol/L) foram adicionados como gerador de radicais peroxila. A fluorescência foi monitorada a cada minuto ( $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$  e  $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ ) durante 70 minutos a 37 °C. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de Trolox (0-96 µmol/L) e expressos como µmol de Trolox equivalente a 1 mg de extrato bruto.

A capacidade antioxidante foi determinada usando a área sob a curva (AUC) calculada da seguinte forma:

$$AUC = 1 + \frac{F1}{F0} + \frac{F2}{F0} + \frac{F3}{F0} + \dots + \frac{Fn}{F0}$$

Onde:

F<sub>n</sub> = fluorescência medida a cada minuto.

F<sub>0</sub> = fluorescência no tempo zero.

### Atividade antioxidante pelo método do DPPH

O EB foi avaliado pela capacidade de sequestrar o radical livre estável DPPH, de acordo com a metodologia de Choi e colaboradores (2002). O EB foi diluído em etanol nas seguintes concentrações: 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL e 1,5625 µg/mL. A capacidade de mitigar o DPPH foi expressa em CI<sub>50</sub> (concentração do extrato necessária para inibir 50% do DPPH na solução de ensaio). Cada amostra foi misturada com 1,0 mL de DPPH 0,3 mM em solução de etanol. Após 30 minutos, a absorbância foi medida a 518 nm. Uma solução de DPPH em etanol foi usada como controle negativo e ácido ascórbico (AA) usado como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. O ensaio foi desenvolvido em triplicata, e o cálculo da capacidade antioxidante seguiu a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{100(Aa - Ab)}{Ac} \right] \times 100$$

Onde:

Aa= Absorbância da amostra

Ab= Absorbância do branco

Ac= Absorbância do controle negativo

### Atividade Antimicrobiana

O EB foi individualmente avaliado contra *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* spp. ATCC 5217. A

concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo o que descreve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M07-A8 (2009). Os ensaios foram realizados em triplicata com series de diluições do EB em placas estéreis com 96 cavidades. O controle positivo (inóculo) para cada bactéria foi preparado com caldo Mueller-Hinton e o controle negativo foi preparado apenas com o extrato e o caldo Mueller-Hinton. As amostras foram inicialmente solubilizadas em etanol, e adicionadas aos poços de modo que ficassem diluídas em dez diferentes concentrações (1.600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL). As microplacas foram cultivadas *overnight* a 35°C em Mueller-Hinton. Após este período, a leitura das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram realizadas utilizando o corante enzimático cloreto de 2,3,5- trifenil-tetrazólio diluído a 2% em água como revelador. Este corante é incolor e se torna avermelhado em meios reduzidos, quando há multiplicação bacteriana. A CIM foi comparada visualmente com a cor avermelhada do controle positivo e considerada como a menor concentração do EB que inibiu o crescimento total do micro-organismo.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as análises foram procedidas em triplicata e os resultados expressos como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferenças entre as médias foram primeiro analisadas usando ANOVA e, em seguida, o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Rendimento do Extrato Bruto**

A solução extrativa foi preparada por maceração de 354 g do pó de partes aéreas de *G. spathulata* a 20 % (p/v) em etanol 70% por 30 dias, obtendo-se de rendimento 50.091 g (14,15%) de EB.

### **Polifenóis totais e flavonoides totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais (TP) e de flavonoides totais (TF) do extrato bruto (EB) de *Glechon spathulata* foram determinados como  $186 \pm 4.00$  mgGAE/g EB e  $59.4 \pm 0.58$  mg QE/g EB, respectivamente (Tabela 2). Estes resultados podem ser úteis tanto para o

controle de qualidade da matéria-prima vegetal, bem como para justificar, o seu uso na medicina tradicional.

Compostos fenólicos tem a habilidade de doar hidrogênio ou elétrons para formar radicais intermediários estáveis. Muitas infusões de plantas são frequentemente usadas com fins medicinais, tendo suas atividades antioxidante e farmacológica associada a presença de compostos fenólicos, sobretudo ácidos fenólicos e flavonoides (SLUSARCZYK et al., 2009). Usando similar metodologia, o conteúdo de TP de quatro espécies vegetais da família Lamiaceae *Hyptis marruboides*, *Hyptis lantanifolia*, *Hyptis suaveolense* *Hyptis microphylla*foi determinado por Povh e colaboradores(2012). As espécies apresentaram os teores de, respectivamente, 37,33, 28,81, 27,84, 24,99 mg/g de extrato seco.Povh e colaboradores (2012) em seu estudo, também quantificaram os teores de TF, por metodologia similar à utilizada para aferir os teores de TF das partes aéreas de *G. spathulata*, para as mesmas espécies do gênero *Hyptis*, *H. marruboides*, *H. lantanifolia*, *H. suaveolens* e *H. microphylla*, obtendo os valores 7,67, 3,33, 2,33 e 1,00, respectivamente. Valores menores que os encontrados para a *G. spathulata*, o que aponta a espécie como uma rica fonte de compostos fenólicos, em especial flavonoides.

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de substâncias heterogêneas e biologicamente ativas de não nutrientes, juntamente com os ácidos fenólicos (SIMÕES et al., 2010). De maneira geral, flavonoides são reconhecidos por apresentarem um amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antidiabética, hepato e gastroprotetiva, antiviral e antineoplásica (KUMAR; PANDEY, 2013). Sua presença é citada em outras espécies da família Lamiaceae, tais como *Sideritis raeseri*, *Sideritis cardica*, *Teucrium montbretti* e *Ballota undulata* (SICILIANO et al., 2005; VOGEL et al., 2005; JANESKA, 2007; ÖZKAN et al., 2007).

Dessa forma, amanjerona-do-campo, quando comparada a outras espécies da mesma família estudada e com comprovadas atividades biológicas, apresenta importante conteúdo de compostos fenólicos, o que leva a sugerir que a mesma seja detentora de promissoras atividades biológicas relacionadas à presença das referidas espécies químicas.



Tabela 2 –Valores de polifenóis totais e de flavonoides totais do extrato bruto das partes aéreas de *G. spathulata* por extração hidroetanólica a 70%.

| Amostra | Polifenóis totais (TP)<br>(mg/g) | Flavonoides totais (TF)<br>(mg/g) |
|---------|----------------------------------|-----------------------------------|
| EB      | 186 ± 4.00                       | 59.4 ± 0.58                       |

Valores são expressos com valores  $\pm$ desvio padrão.  
 $p < 0,05$

### Caracterização de compostos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS

Um total de 13 compostos fenólicos distribuídos em 5 grupos principais (derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido benzoico, derivados do ácido cafeico, flavonoides e terpenos fenólicos) no extrato de *G. spathulata* foram identificados e quantificados. A identificação dos compostos fenólicos se deu por comparação dos tempos de retenção e espectro de massas de 24 padrões autênticos usados na análise. Após a identificação dos respectivos compostos fenólicos, a quantificação foi procedida através da confecção da curva de calibração para cada composto identificado e os resultados expressos em  $\mu\text{g/g}$  seguidos pelo desvio padrão para a concentração ( $n=3$ ) (Tabela 3). Os compostos observados em maiores quantidades no EB de *G. spathulata* foram as flavonas apigenina (3,122%) e luteolina (2,04%), e os derivados de ácidos fenólicos, ácido cafeico (1,409%), com destaque para o ácido rosmarínico (34,458%).

Tabela 3 –Concentração dos compostos fenólicos em *Glechon spathulata* Benth. determinado por UHPLC-ESI-MS/MS usando o extrato bruto hidroetanólico (EB). Os valores são dados em µg/g, seguidos pelo desvio padrão para a concentração (n=3).

| Composto                  | Tempo de retenção (min.) | Concentração              | Composto                      | Tempo de retenção (min.) | Concentração          |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Ácido gálico              | X                        | Nd                        | Miricetina                    | 3,85                     | -                     |
| Ácido clorogênico         | 0,655                    | 24.4 ± 5.3 (0,041%)       | Fisetina                      | X                        | Nd                    |
| (+)-catequina             | X                        | Nd                        | Resveratrol                   | X                        | Nd                    |
| Ácido vanílico            | 0,855                    | 80.6 ± 4 (0,134%)         | 3-acetylcumarina              | X                        | Nd                    |
| Ácido cafeico             | 1,085                    | 845.3 ± 21 (1,409%)       | Ácido- <i>trans</i> -cinâmico | 4,35                     | -                     |
| 6-hidroxicumarina         | X                        | Nd                        | Quercetina                    | 4,61                     | 39.5 ± 3 (0,066%)     |
| Ácido- <i>p</i> -cumárico | 1,78                     | 135.8 ± 4.2 (0,226%)      | Luteolina                     | 4,803                    | 1226.3 ± 16.2 (2,04%) |
| Ácido ferúlico            | 2,535                    | 182.3 ± 4.7 (0,304%)      | Apigenina                     | 5,44                     | 1873.2 ± 50 (3,122%)  |
| Rutina                    | 3,15                     | 10.7 ± 1.6 (0,018%)       | Canferol                      | X                        | Nd                    |
| 4-hidroxicumarina         | X                        | Nd                        | 3,6-dihidroxi-flavona         | X                        | Nd                    |
| Ácido rosmarínico         | 3,707                    | 20674.8 ± 108.4 (34,458%) | Crisina                       | 6,157                    | -                     |
| Quercitrina               | X                        | Nd                        | Galangina                     | X                        | Nd                    |

(-) = <ILOQ;(Nd) = Não determinado.

O método SPE foi aplicado para a remoção de interferentes de extração dos compostos fenólicos da matriz do EB de *G. spathulata*, a fim de se obter concentrações elevadas dos supostos fenóis em estudo. Somado a isso, análises em cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) possibilitam o isolamento e identificação

de fragmentos formados a partir da quebra de íons precursores, o que aumenta sensivelmente a capacidade de determinar os compostos orgânicos presentes nas mais diversas matrizes (SULYOK et al., 2006).

Compostos fenólicos possuem grande distribuição em plantas e em micro-organismos e estão entre as classes de compostos com a maior variedade de estruturas químicas (SIMÕES et al., 2010). Uma vez que os compostos fenólicos contêm um ou mais grupamentos hidroxila e/ou de ácido carboxílicos, os dados do espectro de massa foram obtidos em modo de ionização negativo. Os compostos fenólicos foram identificados com base em íons deprotonados  $[M-H]^-$  e os fragmentos liberados em experimentos MS/MS. O espectro MS/MS é muito útil para a identificação de agliconas de flavonoides, e a análise dos padrões de fragmentação é altamente diagnóstica, permitindo a elucidação de estruturas por comparação com os dados da literatura (KOOLEN et al., 2013).

Da mesma forma que a *G. spathulata*, outras espécies da família Lamiaceae apresentam em seus produtos do metabolismo secundário substâncias polares, dentre as quais se destacam os ácidos fenólicos e os flavonoides. A *Salvia officinalis* possui altoteor de ácido rosmarínico (3,3%), ácido clorogênico, cafeoil e *p*-hidroxibenzoil-glicosídeos, ácido *p*-hidroxibenzóico e de ácido cafeico. Dentre os flavonoides, destacam-se a apigenina, a luteolina e a crisina (TEUSCHER, 2006). Cunha e colaboradores (2012) estudaram espécies de lamiáceas quanto a sua composição química por CLAE, encontrando para *Lavandula angustifolia* ácido cafeico e rosmarínico; para *Stachys officinalis* ácido cafeico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico; e para *Orthosiphon spitacus* ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido ursólico, ácido glicólico e ácido benzoico. Frescura e colaboradores (2013) quantificaram do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* os teores de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diárranjo de diodos (CLAE-DAD), obtendo entre os principais constituintes ácido rosmarínico (6,42%). Encontraram, também, ácido clorogênico (1,70%), ácido cafeico (1,29%), rutina (1,08%), quercetina (1,67%), canferol (0,34%) e ácido carnósico (3,73%).

A presença de altos teores de ácido rosmarínico encontrada na *G. spathulata* corrobora com inúmeras atividades biológicas relacionadas à espécie, destacando-se antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral (MONTANHA et al., 2004; KUNZ, 2007; BANDERÓ FILHO, 2010). O ácido rosmarínico apresenta considerável atividade antioxidante, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio, a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA (JI; ZHANG, 2008). O ácido rosmarínico isolado de folhas de sálvia foi capaz de reduzir a morte de células feocromocitoma (PC12) de camundongos, provocada

pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide indutor da doença de Alzheimer, ratificando sua ação neuroprotetora, podendo prevenir problemas de memória, explicando o uso tradicional da sálvia no tratamento da doença de Alzheimer (ALKAM et al., 2007). A atividade antifúngica de ácido rosmarínico foi demonstrada contra fungos patogênicos de plantas foi desenvolvida por Guo e colaboradores (2004). A atividade antiviral foi comprovada no uso de extratos de *Melissa officinalis*, caracterizada por possuir altos teores de ácido rosmarínico e de ácidos fenólicos, contra infecções pelo vírus *Herpes simplex* (ASTANI et al., 2012). Shekarchi, e colaboradores (2012), compararam os teores de ácido rosmarínico em 29 espécies de Lamiáceas por HPLC UV-DAD. O resultado obtido para a *G. spathulata* foi semelhante a muitas espécies testadas, como por exemplo, *Mentha longifolia* (26,6 mg/g), *Mentha piperita* (28,2 mg/g) e *Mentha pulegium* (23,4 mg/g).

Além disso, outras atividades biológicas estão relacionadas aos outros compostos identificados no EB de *G. spathulata*, como anti-inflamatória (ácido vanílico, ácido ferúlico, apigenina, quercetrina e luteolina), antibacteriana (ácido vanílico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido-*p*-cumárico, apigenina, luteolina, quercetina e rutina), antialérgica (ácido gálico, ácido ferúlico, apigenina.), entre outras (SIMÕES et al., 2010).

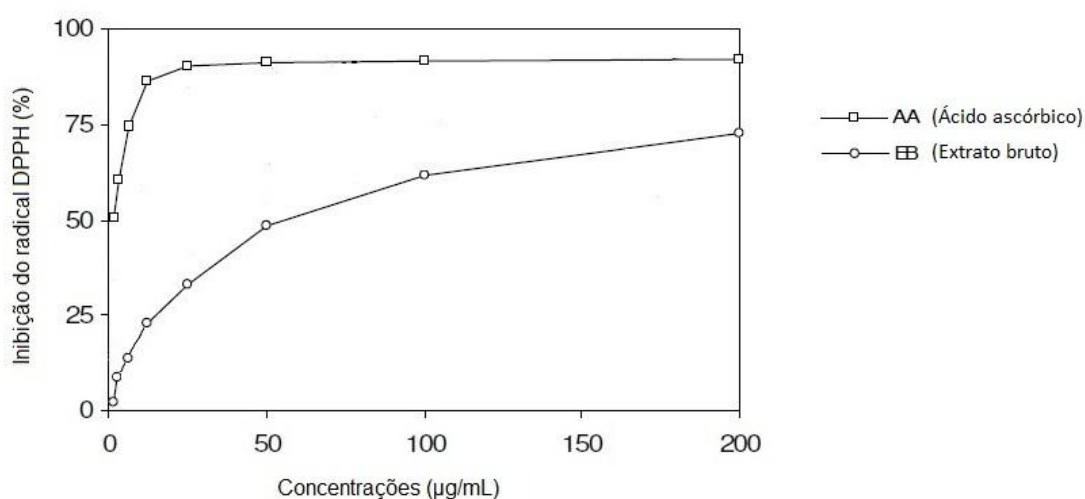
Dessa forma, com o EB de *G. spathulata* apresentando grande variedade de derivados de ácidos fenólicos e de flavonoides, principalmente o ácido rosmarínico, pode-se explicar o seu uso na medicina popular e se ratifica as atividades biológicas testadas.

### **Atividade antioxidante do Extrato Bruto de *G. spathulata***

Na identificação de plantas eficazes contra o estresse oxidativo *in vivo*, estudo comparativo inicial sobre suas atividades *in vitro* representam um bom ponto de partida (SHAN et al., 2005). A família Lamiaceae é reconhecida por sua importante capacidade antioxidante. Masuda e colaboradores (2015) compararam a capacidade antioxidante de 68 plantas de 25 famílias e concluíram que as espécies da família das Lamiáceas apresentaram melhor atividade frente às outras 24 famílias. A capacidade do EB de *G. spathulata* em inibir 50% da absorbância do radical DPPH (CI<sub>50</sub>) foi  $48,29 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$ , demonstrando que o extrato apresenta uma adequada atividade antioxidante a qual aumenta proporcionalmente ao aumento de concentração do extrato bruto (Figura 1), embora o EB tenha sido menos eficaz que o padrão ácido ascórbico (AA) testado nas mesmas concentrações (CI<sub>50</sub>  $1,24 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ). Este valor e comportamento entram de acordo com o obtido para outras espécies da mesma família. A presença de flavonoides, antocianinas e alguns compostos glicosilados

(KOOLEN et al., 2013), bem como a presença de ácido rosmarínico (PAMHAM; KESSELRING, 1985), como o obtido no EB de *G. spathulata*, podem ratificar essa atividade. Sadashiva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antioxidante de três espécies africanas da família Lamiaceae: *Endostemon obtusifolius*, *Plectranthus zuluensis* e *Tetradenia riparia* e obtiveram, respectivamente, os valores de 130  $\mu\text{g/mL}$ , 169  $\mu\text{g/mL}$  e 142  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{CI}_{50}$ . Nassar e colaboradores (2015) verificaram que *Thymus guyanii*, *Salvia verbenaca* e *Stachys circinata* possuem valores de 15,90  $\mu\text{g/mL}$ , 47,50  $\mu\text{g/mL}$  e 54,92  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{CI}_{50}$ , respectivamente.

**Figura 1** – Capacidade de inibição do AA e do EB das partes aéreas de *G. spathulata*.



A reação do DPPH tem sido usada como se fosse uma reação química simples que ocorre no escuro, onde alguns reagentes são misturas sob determinadas condições e um número é gerado, sendo a química inerente ao processo em geral ignorada (LEBEAU et al., 2000). Este autor, ainda defende que o método do DPPH fornece apenas valores relativos ao invés de valores absolutos, sem fornecer nenhuma informação química direta e apenas a mudança de absorvância é convertida em perda de mols de DPPH usando a Lei de Lambert Beer. Ainda, mais importante, esse ensaio não mede as taxas da reação e esquece importantes informações contidas nas curvas da reação. Consequentemente, deixando-se de lado as taxas reacionais, erros na avaliação da eficácia antioxidante podem ser gerados. Dessa forma, métodos alternativos que oferecessem melhorias nessas falhas começaram a ser desenvolvidos, tais como o método de capacidade antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC), capacidade antioxidante de radicais de oxigênio (ORAC), entre outros.

Para a reação de ORAC, o EB de *G. spathulata*, apresentou  $10,51 \pm 0,78$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  (Tabela 4), valor maior que o obtido para o padrão de Trolox na mesma concentração, observando que tal capacidade é dose-dependente, conforme ilustra a Figura 2. Ninfalíe colaboradores (2005) avaliaram a capacidade antioxidante de várias especiarias e bebidas pelo método ORAC. Dentre elas, a *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Origanum majorana*, todas representantes da família Lamiaceae, com atividade. O consumo de alimentos ricos em antioxidantes está associado à redução do risco a doenças e proteção preventiva (SIMÕES et al., 2010).

Percebe-se que os resultados obtidos para o método do DPPH foi mais expressivo que para o método ORAC, o que para Aruoma (2003) pode ocorrer devido a diferenças entre os mecanismos envolvidos nas metodologias, que produzem diferentes tipos de radicais. Essa atividade antioxidante pode ter ocorrido, também, em vista de efeitos sinérgicos entre os compostos presentes no extrato, rico em ácido rosmarínico, ácido cafeico, e nas flavonas apigenina e luteolina. A ação sinérgica de metabólitos secundários foi relatada para algumas plantas, como *Echinacea purpúrea* (DALBY BROWN et al., 2005) e *Punicagranatum* (SEERAM, et al., 2005).

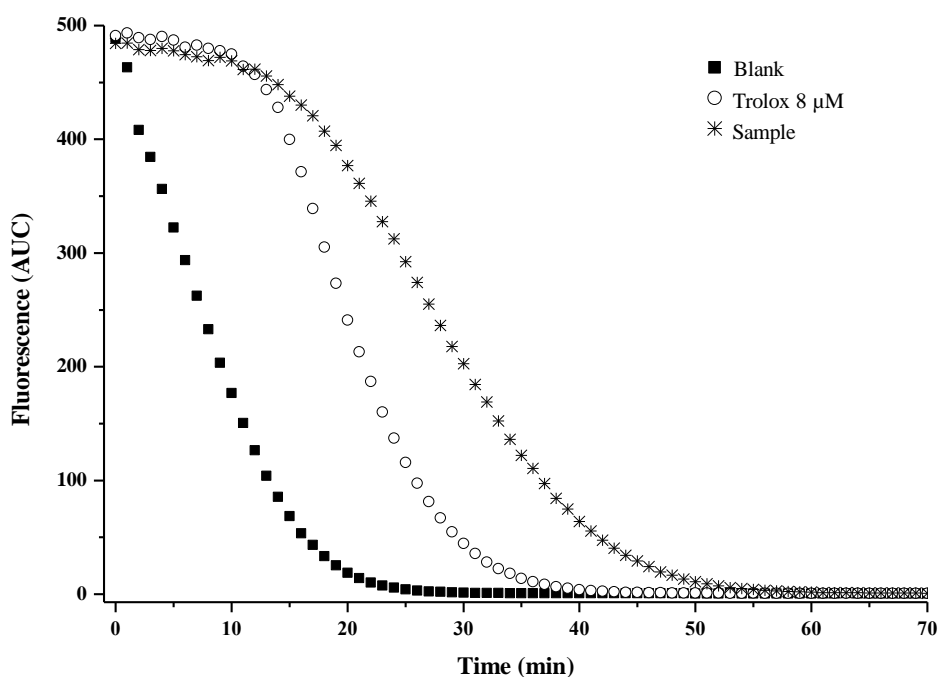
Tabela 4– Valores de  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) e de ORAC ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ )

| Amostra | $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) | ORAC ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) |
|---------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| EB      | $48,29 \pm 1,21$                      | $10,51 \pm 0,78$                  |

Resultados expressos com valores  $\pm$ desvio padrão.  
 $p < 0,05$

Portanto, fazendo alusão à proeminente atividade apresentada pelo EB da manjerona-do-campo, somado ao fato da presença de uma importante quantidade de substâncias fenólicas oriundas do metabolismo secundário da espécie, verifica-se que a espécie é promissora na estabilização de radicais livres por ambas as metodologias empregadas neste estudo.

**Figura 2** – Valor de ORAC obtido para a amostra.



### Atividade antimicrobiana do extrato bruto de *G. spathulata*

Podem ser encontrados na literatura diversos estudos relacionando a atividade antimicrobiana a espécies da família Lamiaceae e em diferentes cepas de microrganismos. Os resultados da atividade antimicrobiana obtidos para o EB de *G. spathulata* frente às bactérias testadas neste estudo estão descritos na Tabela 5. Os melhores resultados encontrados foram para a *E. coli* ATCC 35218 e *Salmonella* spp. ATCC 5217 (200 µg/mL para ambas). A atividade antimicrobiana do óleo volátil, extrato bruto hidroetanólico e frações de manjerona-do-campo, foram avaliados em estudos anteriores por nosso grupo de pesquisa para as mesmas cepas e mesmo método, e apresentou CIMs para *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, 200 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente (KUNZ, 2007). Observa-se que os valores de CIM obtidos com o EB no estudo atual foram menores com exceção da *Salmonella* spp. ATCC 5217 e da *Escherichia coli* ATCC 35218, que não foram testadas no estudo anterior. A diferença apresentada nos dois estudos pode ser atribuída a diferentes épocas de coleta, bem como pelas condições ambientais uma vez que a manjerona-do-campo, para ambos os estudos, foi coletada no mesmo local.

Além das cepas testadas, Kunz (2007) avaliou a atividade antimicrobiana frente a outras cepas de bactérias gram-positivas e negativas, verificando que o EB de *G. spathulata*

inibiu o crescimento de 100% das bactérias gram-positivas e de 75% das bactérias gram-negativas. Zampini e colaboradores (2005) em seu estudo mostraram que flavonoides isolados de *Zuccagnia punctata* são bastante ativos contra bactérias gram-negativas, como *E.coli*.

As altas concentrações de ácido rosmarínico presentes no extrato de *G. spathulata* também podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana. Bayoub e colaboradores (2010) testaram a atividade antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) frente a *Listeria monocytogenes*, apresentando boa atividade quando comparado com extrato de oliveira e cacau. Chan e colaboradores (2012) realizaram estudo comparativo sobre a atividade microbiana de espécies da família Lamiaceae, destacando resultados interessantes para as folhas de alecrim, que apresentaram inibição frente a *B. cereus*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*, sugerindo que tal atividade esteja relacionada com a composição fenólica do extrato, sendo o ácido rosmarínico o composto mais presente. *Origanum vulgare* (orégano) apresenta boa atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCILA-LOZANO et al., 2004). Os estudos mostram que *G. spathulata* apresenta atividade antimicrobiana, o que pode estar relacionado com a composição química rica em polifenóis, sobretudo o ácido rosmarínico.

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana do EB das partes aéreas de *G. spathulata*

| Amostra | <i>Bacillus cereus</i><br>ATCC 14579 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 35218 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 | <i>Salmonella</i> spp.<br>ATCC 5217 |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| EB      | n.a.*                                | 200 µg/mL                             | 800 µg/mL                             | 200 µg/mL                           |

\* Não ativo.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo revelam que a *G. spathulata* contém uma considerável quantidade de compostos fenólicos. A análise do perfil cromatográfico demonstrou a presença de derivados do ácido benzoico, do ácido hidroxicinâmico, flavonóis, flavona, cumarina e estilbeno no EB da planta. O extrato bruto de *G. spathulata* apresentou potencial antioxidante e atividade antimicrobiana, atividades estas que podem ser atribuídas a sua composição fenólica. Os resultados deste justificam o uso medicinal de *G. spathulata*. Em vista do grande potencial medicinal da planta, sugere-se a continuidade de estudos *in vivo* para a



comprovação de outras atividades biológicas, como, por exemplo, neuroprotetora, que é associada ao ácido rosmarínico (ALKAM et al., 2007).

## REFERÊNCIAS

ALKAM, T.; NITTA, A.; MIZOGUCHI, H.; ITOH, A.; NABESHIMA, T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A beta(25-35). **Behavioural Brain Research**, v.180, n.2, p.139-145. 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 30, n.10, 2010.

ANASTASIADI, M. et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 805–813, 2010.

ARCILA-LOZANO, C. C. LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJIA, E. G.; El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.54, p. 100-111, 2004.

ARUOMA; O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 9, n. 20, p.523–524, , 2003.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of *Herpes simplex* virus *in vitro*. **Chemotherapy**, v. 58, p. 70–77, 2012.

BANDERÓ FILHO, V. C. **Controle botânico, físico-químico e atividade anti-inflamatória de *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, p. 2229-2239, 2013.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal Plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUZATTI, A. et al. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. sobre telóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1813-1817, 2011.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidante capacity and quinone reductase activity of na aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparsion to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camelia sinensis*)Teas. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C. W. et al., Antioxidant activity and fre radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparsion. **Plant Science**, v. 163, p. 3583-3589, 2004.

CLINICAL AND LABORATOURY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bactéria that grow aerobically; Approved Standard – Eight edition. **CLSI document M07-A8**, 2009.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo, 1942. 166 p.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012. 731p.

DALBY-BROWN, L.; BARSETT, H.; LANDBO; A. K. R.; MEYER; A. B. S.; MOLGAARD, P. Antioxidant activity of extracts and pure substances from *Echinacea purpurea* in the LDL CuSO<sub>4</sub> oxidation assay: a possible synergistic effect of combinations of polysaccharides, alkamides and caffeic acid derivatives. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 9413–9423, 2005.

FACCIN, H.; VIANA, C.; DO NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.J; CARVALHO, L. M. Study of ion supression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using luqid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1427, p. 111-124, 2016.

FRESCURA V. D. et al. Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopedia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 755-761, 2013.  
fungi. **Weishengwuxue Tongbao**, v. 31, p.71–76, 2004.

GUO, D.; DU, G.; LI, L.; LI, R. Inhibitory activities of rosmarinic acid against plant pathogenic

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and Medicine.4<sup>a</sup> edição. New York: **Oxford University Press**, 2007.

JANESKA, B.; STENOFA, M.; ALIPIEVA, K. Assay of flavonoids aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD.**Acta Pharmaceutica**, v. 57, p. 371-377, 2007.

JI, H. F.,ZHANG, H. Y. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features.**Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.2, p.143-151. 2008.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food reserach International**, v. 51, n. 2, p. 467-473, 2013.

KUNZ, V. T. *Glechon spathulata* Benth.: Estudo químico e farmacológico. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J. L.; DURIEZ, P., TEISSIER, E.; COTELLE, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n.9, p. 900–912, 2000.

LIMA NETO, et a., Quantificação de metabólitos secundários avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1069-1077, 2015.

LÓPEZ, E. A. S. et al. Aspectos nutritivos de la enfermedad de Alzheimer. **Revista de**

MASUDA, H. et al., Comparative study of the antioxidant activity of culinary herbs and spices, and hepatoprotective effects of three selected Lamiaceae plants on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats; **Food Science and Technology Research**, v. 3, n. 21, p. 407-418, 2015.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL; E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MONTANHA, J. A. et al. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 183–186, 2004.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades**. São Paulo: Editora Hemus, 1997. 555 p.

NASSAR, M.; ZERIZER S.; KABOUCHE, Z.; KABOUCHE, A.; BECHKRI, S. Antioxidant and the immunomodulatory activities exhibited by three plants from Lamiaceae Family. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 9, 2015.  
**Neurologia, Neurocirurgia y Psiquiatria**. v. 35, n. 3, p. 150-155, 2002.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCHA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 93, n. 2, 2005.

NUÑEZ-SELLES, A. J. Antioxidant Therapy: Myth or Reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

ÖZKAN, G.; KULEASAN, H.; ÇELİK, S.; GÖKTÜRK, R. S.; ÜNAL, O. Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *Pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. **Food Control**, v. 18, p. 509-512, 2007.

PARNHAM, M. J.; KESSELRING, K. Rosmarinic acid. **Drugs Future Journal**, v. 10, p. 756-757, 1985.

POVH, J. A.; SANTOS, F. B.; SILVA, K. S. Teor de fenois totais e flavonoides em quatro espécies do gênero *Hyptis* Jacq. ocorrentes no cerrado *stricto sensu*. **Brazilian Geography Journal: Geosciences and Humanities research medium**, v. 3, n. 2, p. 520-528, 2012.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1996.

SADASHIVA, C. T.; NAIDOO, Y., NAIDOO, NAIDOO, J. R.; KALICHARAN, B.; NAIDOO, G. Antioxidant and acetylcholinesterase activities of three species of the Family Lamiaceae. **Bangladesh Journal of Botanic**, v. 43, n.3, p. 331-335, 2014.

SEERAM, N. P. et al. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 360-367, 2005.

SHEKARSHI, M. HAJIMEHDIPOOR, H.; SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; HAMEDANI, M. P. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiateae Family. **Pharmacognzy Magazine**, v. 8, n. 59, 2012.

SICILIANO, T. et al. Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). **Biochemical, Systematics and Ecology Journal**, v. 33, p. 341-351, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Organizadores). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010, 1104 p.

SLUSARCZYK, S.; HAJNOS, M.; SKALICKA-WOZ'NIAK, K.; MATKOWSKI, A. Antioxidant capacity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. **Food Chemistry**, v. 113, p. 134-138, 2009.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 108, p. 879-884, 2008.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 49-59, 2006.

TEUSCHER, E. **Medicinal Spices: A handbook of culinary herbs, spices, spice mixtures and their essential oils**. Triebes: Medpharm. 2006. p. 324-327.

VAN INGEN, J.; TOTTEN, S. E.; HEIFETS, L. B. BOEREE, M. J. DALEY, C. L. Drug susceptibility testing and pharmacokinetics question current treatment regimens in *Mycobacterium simiae* complex disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 173-176, 2012.

VENTURI, C. R. et al. Chemical analysis and in vitro antiviral and antifungal activities of essential oils from *Glechon spathulata* and *Glechon marifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 682-688, 2015.

VOGEL, H. et al. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species known as bailahuén. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 97-100, 2005.

XIFREDA, C. C.; MALLO, A. C. Las especies argentinas de *Glechon* (Lamiaceae, Mentheae). **Darwiniana**, v. 42, n. 1-4, p. 333-346, 2004.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Review Nutrition**, v. 21, p.381-406, 2001.

ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extrates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 450-456, 2005.

## 5 CONCLUSÃO

- O extrato bruto hidroetanólico a 70% das partes aéreas de *G. spathulata* apresentou teores de polifenóis totais ( $186 \pm 4,00$  mg GAE/g) e de flavonoides ( $59.4 \pm 0.58$ mg QE/g) que podem ser considerados elevados se comparados com algumas espécies da família Lamiaceae;
- Através da técnica de CLUE-ESI-MS/MS, foi possível detectar a presença de 13 compostos fenólicos e, destes, quantificar 10 compostos derivados de ácidos fenólicos e flavonoides, com destaque para o ácido rosmarínico, encontrado em concentração de 20,6748 mg/g (34,458%) no EB;
- A capacidade antioxidante do EB em inibir radicais livres se mostrou positiva, e é relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos do extrato;
- O EB se mostrou capaz de inibir as bactérias patogênicas gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 35218 (200 µg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922(800 µg/mL) e *Salmonella* spp. ATCC 5217 (200 µg/mL);
- A presença de altos títulos de ácido rosmarínico no EB de *G. spathulata* ratifica a importância terapêutica da espécie, sugerindo a continuidade de estudos a partir de modelos *in vivo* de atividade biológica e de toxicidade;
- Dando seguimento à pesquisa, a espécie será submetida a estudos de toxicidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, n. 28, p. 13-19, 1993.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para a detecção de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 346-357, 2013.
- ALVIM, N. A. T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 3, n.14, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências**. Resolução RDC nº. 10, de 09 de março de 2010a. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2010.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) III. Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de compostos fenólicos em vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- AUGUSTO, O.; MYIAMOTO, S. Oxygen Radicals and Related Species. In: PANTOPOULOS, K.; SCHIPPER, H. (Org.). Principles of Free Radical Biomedicine. New York: **Nova Science Publishers**, p. 19-41, 2011.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BANDERÓ FILHO, V. C. **Controle botânico, físico-químico e atividade anti-inflamatória de *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2010.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2.ed. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, v. 3, p. 98-105, 2007.

BAYDAR et al. Antibacterial activity and composition of essential oil from *Origanum*, *Thymbra* and *Sajureta* species with comercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169-172, 2004.

BENNET, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**.v. 127, p. 617-633, 1994.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral acitivity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2229-2239, 2013.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal Plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 26, de 14 de Maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF. 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026_13_05_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703)>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.

BUDZIANOWSKI, J.; BUDZIANOWSKA, A. Chromatographic and spectrophotometric analyses of the DPPH free radical scavenging activity of the fractioned extracts from *Lamium album* L., *Lamium purpureum* L. and *Viscum album* L. **Herba Polonica Journal**, v. 52, n. ½, p. 51-57, 2006.

BUZATTI, A. et al. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. sobre telóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1813-1817, 2011.

CALIXTO, J.B. Tewnty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 443-459, 2010.

- COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo, 1942. 166 p.
- COLOMBO, M. L. et al. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 417-425, 2010.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- DI PRIMIO, R. F. **Flora do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, p. 244-247, 1946.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. UNESP, São Paulo, 1996.
- EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGLIA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.
- FARIAS, R. I. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 199-222, 2010.
- FONSECA, C. S. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* dos efeitos dos flavonoides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção e tratamento do tumor ascético de Erlich**. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- FONT QUER, P. **Plantas Medicinales: El Diocórides Renovado**. 12.ed. Barcelona: Editora Labor, 1990. 640 p.
- GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**. v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GILANI, A. H.; ATTA, U. R. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.
- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and Medicine. 4ª edição. New York: **Oxford University Press**, 2007.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – Quo vadis? **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.
- HARLEY et al. Lamiaceae. In: KUBITZKI, K.; KADEREIT, J. W. (Org.). **The Families and genera of Vascular Plants**, Springer, Berlin, v. 7, p. 167-275, 2004.
- HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites *versus* parent compounds: a review. **Food Chemistry**, 2014.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 443-4444, 2002.

KOROLKOVAS, A. **Química farmacêutica**. Tradução de Andrejus Korolkovas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 783p.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, 2013, 16 p.

KUNZ, V. T. ***Glechon spathulata* Benth.: Estudo químico e farmacológico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

LÓPEZ, E. A. S. et al. Aspectos nutrícios de la enfermedad de Alzheimer. **Revista de Neurologia, Neurocirurgia y Psiquiatria**. v. 35, n. 3, p. 150-155, 2002.

LU, J.; LIN, P.H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cell and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840-860, 2010.

MACEDO, L. C. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de pepino, utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, São Paulo, 2009.

MATSUDA, A. H. Fitoterápicos: complementos nutricionais ou medicamentos? In: TORRES, E. A. F. S. **Alimentos do milênio: a importância dos transgênicos, funcionais e fitoterápicos para a saúde**, São Paulo: Signus, p. 31-41, 2002.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-india (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limao (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centelha (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.

MENGUE, S. S. et al. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL; E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p. 175-182, 1998.

MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO, B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, 2013.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, V. P. ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MOON, H. K.; VINVKIER, S.; SMETS, E.; HUYSMANS, H. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, p. 93-108, 2008.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição, propriedades**. São Paulo: Editora Hemus, 1997. 555 p.

NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M.; MOTAMED, S. M.; GHORBANI, A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: From Ethnobotany to Pharmacology. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 62-79, 2005.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 881, 2006.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCHA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 93, n. 2, 2005.

PETERSEN, M. Rosmarinic acid: new aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p.207-227, 2013.

PIAZZON, A.; VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; MATTIVI, F.; MANDOJ, F.; NARDINI, M. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acylglucuronide of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12312-12323, 2012.

PROCHAZKOVA, D.; BOUŠOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and /or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

RICCI, D. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v.98, p. 195-200, 2005.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1996.

RIVERA NUNEZ, D.; OBON DE GASTRO C. The ethnobotany of Labiatae of old world. In: Harley, R.M. Reynolds, T., **Advances in Labiatae Science**. Royal Botanical Gardens, Kew, London. p. 455-473, 1992.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 333-364, 2010.

SANTOS, R. I.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; DE ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**.v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SCARPATI, M.L.;ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). **Ric.Sci.** v.28, p.2329-2333, 1958.

SCHAICH, K. M.; XIE, X. T. Reprints of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidante efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH and ORAC assays”. **Journal of funcional foods**, v. 18,p. 782-796, 2015.

SHAHIDI, F.; PRIYATHARINI, A. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. **Journal of functional foods**, v. 18, Part B, p. 820-897, 2015.

SILVA, P. D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. Dissertação (Mestrado em Química Industrial), Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010, 1104 p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3.ed.Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

TERPINC, P.; POLAK, T.; SEGATIN, N.; HANZLOWSKY, A.; ULRIH, N.P.; ABRAMOVIC, H. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. **Food Chemistry**, v. 128, p. 62-68, 2011.

TÓTH, J.; MRLIANOVÁ, M.; TEKEL'OVÁ, D.; KERENOVÁ, M.; TOMUS L. Rosmarinic acid – na importante phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**. v. 50, p. 139-146, 2003.

VAZ, J. A.; ALMEIDA, G. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, M. H. *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential. **Food Chemistry**, v. 132, p. 482-486, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENTURI, C. R. et al. Chemical analysis and in vitro antiviral and antifungal activities of essential oils from *Glechon spathulata* and *Glechon marifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 682-688, 2015.

WATANABE, J. et al. Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. **Analytical Science**, v. 28, p. 159-165, 2012.

WILLAIN FILHO, A. **Potencial analgésico de flavonoides: mecanismo de ação da quercetina**, 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. v. 1. Geneve, 2003.

XIFREDA, C. C.; MALLO, A. C. Las especies argentinas de *Glechon* (Lamiaceae, Mentheae). **Darwiniana**, v. 42, n. 1-4, p. 333-346, 2004.

ZHU, W.; JIA, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; XIA, M. The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP/PKA-dependent signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 314-327, 2012.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 333-364, 2010.

## ANEXO

## ANEXO A – TEMPOS DE RETENÇÃO

Tabela 1 – Tempos de retenção (RTWs) e parâmetros MS/MS dos compostos fenólicos analisados no EB de *G. spathulata*.

| Compostos                    | RTW (min) | Fragmentador (V) | Polaridade do ESI | Transição de quantificação* | Transição de confirmação* |
|------------------------------|-----------|------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>Polifenóis</i>            |           |                  |                   |                             |                           |
| Ácido Gálico                 | 0.24-0.43 | 106              | -                 | 169.0 > 125.1 (10)          | -                         |
| Ácido Clorogênico            | 0.61-0.94 | 104              | -                 | 353.1 > 191.1 (5)           | -                         |
| (+)-Catequina                | 0.66-0.88 | 134              | -                 | 289.1 > 245.1 (10)          | 289.1 > 203.2 (15)        |
| Ácido Vanílico               | 0.87-1.13 | 92               | -                 | 167.0 > 152.2 (10)          | 167.0 > 123.1 (8)         |
| Ácido Cafeico                | 0.89-1.10 | 106              | -                 | 179.0 > 135.1 (10)          | -                         |
| 6-hidróxicumarina            | 1.48-1.77 | 124              | -                 | 161.0 > 133.2 (17)          | 161.0 > 105.2 (17)        |
| Ácido- <i>p</i> -cumárico    | 1.70-2.01 | 96               | -                 | 163.0 > 119.1 (9)           | -                         |
| Ácido ferúlico               | 2.40-2.66 | 88               | -                 | 193.1 > 134.1 (9)           | 193.1 > 178.1 (7)         |
| Rutina                       | 2.87-3.43 | 210              | -                 | 609.1 > 300.1 (31)          | -                         |
| 4-hidróxicumarina            | 3.26-3.54 | 130              | -                 | 161.0 > 117.2 (15)          | -                         |
| Ácido Rosmarínico            | 3.50-3.77 | 138              | -                 | 359.1 > 161.0 (7)           | 359.1 > 197.1 (7)         |
| Quercitrina                  | 3.48-3.82 | 164              | -                 | 447.1 > 301.1 (17)          | -                         |
| Miricetina                   | 3.63-3.91 | 128              | -                 | 317.0 > 150.9 (21)          | 317.0 > 178.8 (21)        |
| Fisetina                     | 3.71-4.07 | 120              | -                 | 285.0 > 135.0 (15)          | 285.0 > 163.0 (15)        |
| Resveratrol                  | 3.82-4.10 | 124              | -                 | 227.1 > 185.2 (13)          | 227.1 > 143.0 (13)        |
| Ácido <i>trans</i> -cinâmico | 4.26-4.54 | 90               | -                 | 147.0 > 103.2 (5)           | 147.0 > 77.1 (15)         |
| Quercetina                   | 4.37-4.96 | 126              | -                 | 301.0 > 151.1 (17)          | 301.0 > 179.0 (15)        |



|                    |               |     |   |                       |                       |
|--------------------|---------------|-----|---|-----------------------|-----------------------|
| Luteolina          | 4.37-<br>4.97 | 162 | - | 285.0 > 133.2<br>(27) | 285.0 ><br>151.1 (27) |
| Apigenina          | 5.19-<br>5.53 | 136 | - | 269.0 > 117.1<br>(29) | 269.0 ><br>149.0 (20) |
| Canferol           | 5.25-<br>5.49 | 164 | - | 285.0 > 239.0<br>(29) | 285.0 ><br>117.2 (31) |
| 3,6-dihidroxiavona | 6.16-<br>6.51 | 126 | - | 253.1 > 197.0<br>(20) | 253.1 ><br>208.0 (21) |
| Crisina            | 6.26-<br>6.84 | 130 | - | 253.1 > 143.1<br>(25) | 253.1 ><br>106.9 (25) |
| Galangina          | 6.60-<br>6.87 | 156 | - | 269.0 > 169.1<br>(30) | 269.0 ><br>211.2 (29) |
| 2-naftol (IS)      | 5.15-<br>5.40 | 134 | - | 143.0 > 115.1<br>(24) |                       |

\* Energia de colisão (V) é indicada entre parênteses