

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

**CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *VERBENA LITORALIS*
KUNTH**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rachel de Lima

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *VERBENA LITORALIS*
KUNTH**

Rachel de Lima

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

Lima, Rachel de
Controle de qualidade e atividade antimicrobiana de
Verbena litoralis Kunth / Rachel de Lima.-2013.
73 f.; 30cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. *Verbena litoralis* 2. Parâmetros físico-químicos 3.
Atividade antimicrobiana 4. Óleo essencial 5. Verbenaceae
I. Manfron, Melânia Palermo II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *VERBENA LITORALIS*
KUNTH**

elaborada por
Rachel de Lima

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Carine Viana Silva, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 31 de julho de 2013.

Dedico esta dissertação aos meus pais Honorio e Helena pelo amor, incentivo ao estudo e pelo incansável apoio na realização de todos os meus sonhos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar os meus passos e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais Honorio e Helena pelo amor, apoio incondicional e pelas palavras de incentivo para a realização de mais esta conquista.

A minha irmã Renata que nos meus desabafos durante o mestrado sempre soube me ouvir dando uma palavra de carinho e conforto para aliviar as minhas angústias.

A minha Professora Orientadora Melânia Palermo Manfron pela dedicação, carinho, amizade e confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho. Além da paciência e de todos os seus ensinamentos.

A todos meus colegas e amigos de laboratório Luísa, Daiane, Rosana, Raquel, Camila, Alexandre, Júnior, Aline, Queila, Rosiana, Tiago, Luana, Gustavo, Ana Carla, Everlin pela amizade, ajuda, companheirismo e conhecimentos compartilhados. Sem vocês este trabalho seria muito mais difícil de ser realizado!

A Vera e a Rafaela pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso.

Aos funcionários Paulo Ricardo e Renato pelos auxílios prestados e pela atenção dedicada.

Aos professores Sydney Alves, Ademir Morel e seus alunos pelos ensinamentos e auxílios prestados.

A todos os meus familiares que de alguma forma participaram da minha trajetória e sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim.

A Universidade Federal de Santa Maria por me proporcionar a graduação e a pós-graduação.

*“Se amanhã sentires saudades, lembra-te
da fantasia e sonha com tua próxima vitória”.*

Charles Chaplin

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *VERBENA LITORALIS* KUNTH

AUTORA: Rachel de Lima

ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de julho de 2013.

Verbena litoralis Kunth pertence à família Verbenaceae é nativa da América do Sul, podendo ser encontrada nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas regiões temperadas do hemisfério sul e pouco nas regiões temperadas do hemisfério norte. É conhecida popularmente como gervãozinho-do-campo ou erva-de-pai-caetano e utilizada na medicina tradicional como antidiarréico, antifebriúgo e em distúrbios gastrintestinais. É uma planta herbácea perene, possui caule ereto, quadrangular e folhas ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas, espatuladas ou lineares, suas inflorescências são longas e pouco densas de cor lilás. O objetivo deste trabalho foi realizar o controle de qualidade físico-químico das partes aéreas da droga vegetal, realizar o doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos provenientes das quatro estações do ano, extrair o óleo essencial, assim como submeter esses extratos juntamente com o óleo de *V. litoralis* ao ensaio de atividade antimicrobiana. No controle de qualidade físico-químico realizado nas quatro estações do ano verificou-se que a perda por dessecação e a porcentagem de matéria estranha estão de acordo com os valores estabelecidos para drogas vegetais. A coleta realizada no outono apresentou o maior teor de cinzas totais, cinzas insolúveis e cinzas sulfatadas. O índice de intumescência foi mais elevado no outono e o índice de amargor foi maior no inverno. As dosagens de polifenóis e taninos apresentaram valores mais elevados no inverno, enquanto que o teor de flavonóides foi maior no outono. Na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroetanólicos e do óleo essencial de *V. litoralis* frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providência rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* foram verificadas que todas as bactérias apresentaram sensibilidade frente aos extratos das quatro estações do ano, com exceção de *Aspergillus fumigatus*. A maior sensibilidade dos micro-organismos para os extratos foi na coleta de inverno. O óleo de *V. litoralis* apresentou atividade antimicrobiana frente à *Providência rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo cis-crisantenol, neo-verbanol, isobornil propanato, mirac aldeído, ternine, isofilocladeno e fenil etil antranilato os compostos majoritários do óleo.

Palavras-chave: *Verbena litoralis*. Parâmetros físico-químicos. Atividade antimicrobiana. Óleo essencial.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

QUALITY CONTROL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *VERBENA LITORALIS* KUNTH

AUTHOR: Rachel de Lima
ADVISER: Melânia Palermo Manfron
Defense Place and Date: Santa Maria, July 31th, 2013.

Verbena litoralis Kunth belongs to the family Verbenaceae is native to South America and can be found in tropical and subtropical regions, mainly in temperate regions of the southern hemisphere and some temperate regions of the northern hemisphere. It is popularly known as gervãozinho of field or herb-of-father-caetano and used in traditional medicine against diarrhea, against fever and gastrointestinal disorders. It is a herbaceous perennial has erect stems, ovate leaves and quadrangular, ovate-lanceolate, lanceolate, spatulate or linear, its inflorescences are long and sparsely lilac. The aim of this study was to control physical and chemical quality of the aerial parts of the plant drug, perform the assay of polyphenols, flavonoids and tannins from the four seasons, extract essential oil, as well as submit these extracts together with the oil of *V. litoralis* to test antimicrobial activity. In quality control physicochemical conducted in four seasons found that the loss on drying and the percentage of foreign matter are in agreement with the values established for herbal drugs. The collection realized in the autumn had the highest content of total ash, insoluble ash and sulphated ash. The swelling index was higher in autumn and bitter index was higher in the winter. Dosages of polyphenols and tannins showed higher values in winter, while the flavonoid content was higher in the fall. In determination the *in vitro* antimicrobial activity of hydroethanolic extracts and essential oil of *V. litoralis* front of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* were found that all bacteria showed sensitivity to the extracts of the four seasons, with the exception of *Aspergillus fumigatus*. The greater sensitivity of micro-organisms to the extracts was collection in the winter. The oil of *V. litoralis* showed antimicrobial activity against the *Providencia rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius* and *Klebsiella pneumonia* and cis-chrysanthenol, neo-verbanol, isobornyl propanate, myrac aldehyde, ternine, isophyllocladene, phenyl ethyl anthranilate are the major compounds of the oil.

Key words: *Verbena litoralis*. Physico-chemical parameters. Antimicrobial activity. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – <i>Verbena litoralis</i> Kunth	16
Figura 2 – Estrutura da Verbenachalcona	18

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Figura 1 – Dosagem de polifenóis, flavonoides e taninos nas diferentes estações do ano	42
--	----

3.2 Manuscrito 2

Figura 1 – Perfil cromatográfico do óleo volátil das partes aéreas de <i>V. litoralis</i>	51
---	----

LISTA DE TABELAS

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Tabela 1 – Teor de umidade (TU), matéria estranha (ME), índice de intumescência (II), rendimento e índice de amargor das partes aéreas de <i>V. littoralis</i> nas diferentes estações do ano	39
---	----

Tabela 2 – Cinzas totais (CT), cinzas insolúveis (CI), cinzas sulfatadas (CS), média \pm desvio padrão das partes aéreas de <i>V. littoralis</i> nas diferentes estações do ano	40
---	----

Tabela 3 – Teor de polifenóis, flavonoides e taninos	41
--	----

3.2 Manuscrito 2

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto das quatro estações do ano e do óleo essencial de <i>Verbena littoralis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	50
---	----

Tabela 2 – Substâncias presentes no óleo volátil de <i>V. littoralis</i> e suas respectivas concentrações	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variância
ATCC – American Type Culture Collection
CG – Cromatografia gasosa
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM – Espectro de massas
IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%
II – Índice de intumescência
IK – Índice de Kovatz
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
OMS – Organização Mundial da Saúde
ME – Matéria estranha
MH – Müeller Hinton
NGF – Fator de crescimento neural
PC12D – Linhagem celular derivada de feocromocitoma de rato
RPMI – Roswell Park Memorial Institute – meio de cultura de tecido animal desidratado
TR – Tempo de retenção
TU – Teor de umidade
WHO – World Health Organization Geneva
µl - microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Verbena litoralis</i> Kunth	15
2.2 Controle de qualidade	18
2.3 Metabólitos secundários	21
2.4 Óleos voláteis	23
2.5 Atividade antimicrobiana	24
3 MANUSCRITOS	26
3.1 Manuscrito 1 – Parâmetros físico-químicos e dosagens de polifenóis, flavonoides e taninos de <i>Verbena litoralis</i>	27
3.2 Manuscrito 2 – Atividade antimicrobiana e avaliação da composição química do óleo essencial e dos extratos de quatro coletas de <i>Verbena litoralis</i> Kunth	43
4 DISCUSSÃO GERAL	58
5 CONCLUSÕES	62
6 REFERÊNCIAS	63
7 ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, destacando-se a civilização Egípcia, Greco-Romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa estuda até hoje espécies e preparados vegetais na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Plantas medicinais são os mais antigos produtos no mundo de cuidado com a saúde já conhecidos. A sua importância está crescendo cada vez mais nos centros urbanos. Por isso, as plantas medicinais estão sendo o foco de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas para o desenvolvimento de novos medicamentos (LI; OHIZUMI, 2004). As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA; NODARI, 2004).

O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GUERRA; NODARI, 2004). Muitas vezes a comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, sendo que comumente no Brasil plantas medicinais são vendidas em feiras e mercados populares. Entretanto, as suas supostas propriedades farmacológicas não possuem validade por não terem sido comprovadas cientificamente (VEIGA-JÚNIOR, 2005).

Pesquisadores de vários campos da ciência vêm nos metabólitos secundários vegetais uma fonte promissora de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários apresentam frequentemente várias atividades farmacológicas. Portanto, há um interesse crescente nessas substâncias nas áreas alimentar, agrônômica, cosmética e farmacêutica (SANTOS, 2004). Metabólitos secundários como os flavonoides apresentam interesse econômico devido a suas diferentes propriedades. Ensaios biológicos revelam que os

flavonóides demonstram efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, citotóxico, antioxidante, antihipertensivo, hipolipidêmico e antiinflamatório (MACHADO et al., 2008).

Nas décadas recentes produtos vegetais antimicrobianos ganharam interesse especial por causa da resistência a antibióticos que alguns micro-organismos têm adquirido (ESSAWI; SROUR, 2000). O uso de antimicrobianos necessita de critérios rigorosos por conta dos efeitos colaterais produzidos pela grande maioria desses compostos. Assim, a pesquisa com extratos, frações e óleos essenciais oriundos de espécies vegetais visa a uma possível aplicação racional de princípios ativos no tratamento de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas e vírus (ARAÚJO et al., 2004).

Muitas espécies vegetais são usadas na medicina popular para diferentes finalidades e poucos estudos têm avaliado o potencial medicinal dessas substâncias ativas (MONTEIRO et al., 2005). O uso tradicional de uma planta pode ser uma pré-triagem quanto à utilização terapêutica desta. Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontram-se as plantas do gênero *Verbena* utilizadas popularmente como antitérmico, antiespasmódico, anti-inflamatório, antidiarrético, antioxidante, analgésico (ADAMS et al., 2009; TÜRKER, YÜCESAN, GÜREL, 2010).

Para avaliar os usos populares de *Verbena litoralis*, este trabalho teve como objetivo realizar o controle de qualidade físico-químico, realizar o doseamento de polifenóis, flavonoides e taninos dos extratos brutos provenientes de coletas das quatro estações do ano, extrair o óleo essencial, assim como submeter os extratos juntamente com o óleo de *V. litoralis* ao ensaio de atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Verbena litoralis* Kunth

A espécie *Verbena litoralis* pertence à família Verbenaceae a qual ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e em menor quantidade nas regiões temperadas do Hemisfério Norte, compreendendo cerca de 175 gêneros e 2800 espécies. No Brasil ocorrem 17 gêneros e cerca de 250 espécies (BARROSO, 1991; LORENZI, 2005; BUENO; LEONHARDT, 2011).

Esta família está entre as dicotiledôneas com princípios ativos aromáticos, é considerada importante por ter alguns de seus representantes utilizados na medicina popular devido a suas propriedades digestivas (GOULART; MARCATI, 2008).

O gênero verbena se caracteriza por possuir o par superior de estames sem apêndice no conectivo, este último não ultrapassado pelas tecas; estilete até três vezes o comprimento do ovário; cálice maduro geralmente do mesmo comprimento que as clusas; corola infundibuliforme; inflorescências em pleiobótrios heterotéticos de três a muitas florescências; caule com clorênquima cortical em uma banda descontínua com colunas de colênquima e esclerênquima nos ângulos e número cromossômico igual a sete e seus múltiplos (BOTTA, 1989).

A espécie *Verbena litoralis* é conhecida como gervãozinho-do-campo ou erva-de-pai-caetano, uma planta herbácea perene, às vezes um pouco lenhosa na base, com até 2 metros de altura. Apresenta caule ereto, muitas vezes profusamente ramificado, quadrangular de até 1,2 cm de espessura na base. Essa espécie é nativa da América do Sul sendo também conhecida na América Central e do Norte, África, Austrália e Oceania (RZEDOWSKI; RZEDOWSKI, 2002). Vegeta na região andina do Chile ao Peru, Guianas, Venezuela, Argentina e regiões sudeste e sul do Brasil, pode ser também encontrada na Austrália e África (LORENZI, 2000), apresenta folhas ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas, espatuladas ou lineares, de base afiliada com pecíolo curto, suas inflorescências são longas e pouco densas de cor lilás (SOUZA, 2005).



Figura 1 – *Verbena litoralis* Kunth

Fonte: <http://www.actaplantarum.org/cpg1414/displayimage.php?album=2797&pos=0>

Esta espécie é utilizada em diarreias, desordens gastrintestinais, como desintoxicante do organismo, pelas propriedades antifebris, em doenças sexualmente transmissíveis, febre tifóide e amidalgite (CÁCERES, 1999; LI et al., 2003c; CASTRO-GAMBOA; CASTRO, 2004).

Dentre os compostos isolados em extratos de *V. litoralis* temos a verbenachalcona que é o primeiro exemplo de dihidrochalcona dimérica com uma ligação interchalcona através de oxigênio (LI et al., 2001).

As dihidrochalconas são de ocorrência esporádica na natureza e as diméricas extremamente raras. Somente dois compostos brackenin e cinnabarone formados por duas dihidrochalconas unidas por uma ligação carbono-carbono são relatados (LI et al., 2001).

Carrillo-Rosario e Díaz de Ramírez (2006) estudaram a atividade antimalárica *in vivo* de extratos aquosos obtidos de três espécies de plantas usadas na medicina popular venezuelana como febrífugas e ou antimaláricas. Dentre as espécies estudadas, *V. litoralis*, na dose de 500 mg/Kg/dia administrado oralmente inibiu em 43% o crescimento do parasita *Plasmodium berghei* em ratos albinos, dado esse, segundo os autores, altamente significativo.

Segundo Castro e colaboradores (1990), o ácido 3,4 dihidroxicinâmico, composto derivado do ácido cafeóilico, introduzido em grandes moléculas como verbascosídeo (isolado de *V. litoralis*) constituem uma nova alternativa para quimioterapia antiviral agindo principalmente contra herpes simples e influenza A. Os

extratos desta espécie vegetal aplicados topicamente se mostram efetivos para curar eritemas causados por picadas de insetos.

Compostos que possuem propriedades as quais aumentam a habilidade do fator de crescimento neural (NGF) estimulando o crescimento de células PC12D, podem ser útil no tratamento de doenças neurológicas tais como mal de Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral e vírus da imunodeficiência humana associada à demência. Li e colaboradores (2003a) estudando a ação de diferentes substâncias isoladas em extratos de *V. littoralis* sobre o fator de crescimento constataram que a dihidrochalcona dimérica litorachalcona aumentou NGF, mediado pelo crescimento de células PC12D quando avaliadas frente a cultura de células de ratos Wistar. Em outro trabalho dos mesmos autores, gelsemiol, litoralisona, verbenachalcona (Figura 2) e os esteroidais estigmasterol-5 ene 3 β , 4 β , 7 α , 22 α -tetraol e o estigmasterol 5-ene 3 β , 7 α , 22 α -triol, analisados juntamente com ácido ursólico e ácido oleanólico apresentaram potencialização do NGF (LI et al., 2003c). A mesma atividade foi observada para o gelsemiol 6-trans-cafeoil-1-glicosídeo quando analisado juntamente com quatro glicosídeos feniletanóides, acteosídeo, 2-acetilacteosídeo, jionosídeo, e isoverbascosídeo (LI et al., 2003b).

Castro-Gamboa e Castro (2004) estudando o extrato bruto de *V. littoralis* e os iridóides isolados, (6S-hidroxi-8S-metil-4-metileno-hexahidro-ciclopentan[c]piran-3-ona e 6S, 9S-dihidroxi-8S-metil-4-metileno-hexahidro-ciclopenta[c]piran-3-ona), obtiveram atividade antimicrobiana moderada quando avaliados por bioautografia frente *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae*.

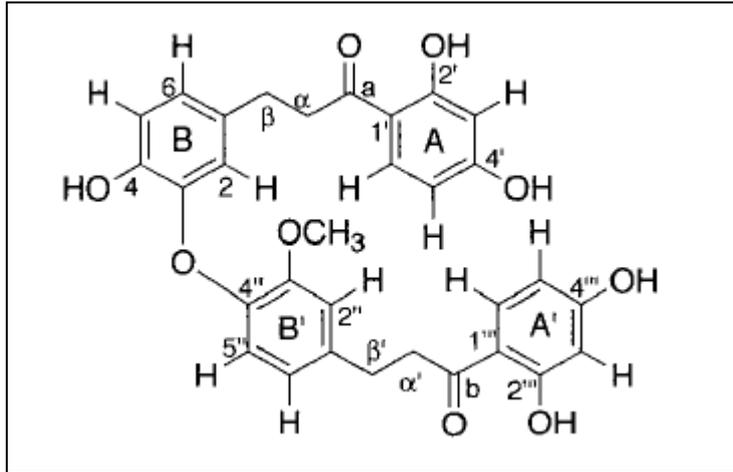


Figura 2 - Verbenachalcona
Fonte: LI et al, 2001

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Os flavonoides, que ocorrem naturalmente em plantas têm atividade antioxidante sendo que a ingestão de quercetina e catequina está associada à redução do colesterol (LDL) e da agregação plaquetária contribuindo para a diminuição da lesão aterosclerótica (SOARES, 2002; ABE et al., 2007). Através do método do DPPH utilizando o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, utilizado para verificar a capacidade de determinadas substâncias de neutralizarem radicais livres (CHOI et al., 2002) o extrato de *V. littoralis* apresentou inibição de 50% da concentração (IC_{50} de 31,08 $\mu\text{g/mL}$) sendo mais eficaz quando comparado a outros extratos vegetais. Como exemplo, podemos citar *Platypodium elegans* em que seu IC_{50} foi de 184,92 $\mu\text{g/mL}$ e *Brosimum guianense* (IC_{50} de 119,31 $\mu\text{g/mL}$). Já em relação a rutina utilizada como controle, a atividade antioxidante foi menor (IC_{50} de 14,16 $\mu\text{g/mL}$) (MENSOR et al., 2001).

2.2 Controle de qualidade

Qualidade é o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria-prima vegetal a qualidade do produto final estará na maior parte assegurada (FARIAS, 2004).

Dentre os fatores que afetam a qualidade de um produto vegetal estão as condições do clima e do solo fundamentais no rendimento de princípios ativos. Existe um consenso de que plantas silvestres concentrariam maior quantidade de princípios ativos do que as cultivadas, no entanto plantas silvestres que crescem à beira de caminhos não devem ser colhidas devido aos riscos de contaminação. Órgão ou parte utilizada da planta também deve ser considerado, no entanto existem casos em que por contarmos com uma adequada distribuição dos princípios ativos pode-se usar toda planta. A época da colheita também é outro fator, já que algumas espécies devem ser colhidas na primavera e outras no inverno devido a variação de concentração de seus princípios ativos (ALONSO, 2008).

Para as espécies vegetais que não constam em códigos oficiais, formulários e ou Farmacopéias, é necessário que se elabore uma monografia da matéria-prima vegetal estabelecendo parâmetros de qualidade.

A origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, colheita, secagem e armazenamento, bem como tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos, pois são variantes que podem influenciar na qualidade da matéria-prima vegetal (FARIAS, 2004).

As drogas vegetais apresentam frequentemente certas impurezas que podem ser representadas por órgãos da própria planta, fragmentos de outras plantas, materiais de outra origem como areia ou terra que não fazem parte do farmacógeno, ainda presença de fungos, insetos e outros materiais contaminantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O mesmo é preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) especificando ausência de contaminações visíveis por fungos ou insetos, bem como outras contaminações animais, em materiais vegetais para fins medicinais (WHO, 1998). De maneira geral, o percentual máximo aceitável de elementos estranhos é 2%, porém existem algumas exceções como *Melissa officinalis* em que a Farmacopéia Brasileira (2010) admite para seus caules e flores até 10% de material estranho.

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes. Isto inclui as cinzas fisiológicas as quais são derivadas do próprio tecido da planta e as não-fisiológicas as quais são resíduos de matéria estranha como areia e solo que podem estar aderidas na superfície da planta (WHO, 1998). Pereira e colaboradores (2011)

ao analisarem sazonalmente o conteúdo de cinzas totais de *Morus alba* obtiveram 20,48%, 9,57%, 11,88% e 17,86% no outono, inverno, primavera e verão respectivamente.

A determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico permite a verificação de contaminantes como resíduo de terra ou areia. Barni e colaboradores (2009) ao analisarem as cinzas insolúveis de *Ipomoea pes-caprae* obtiveram 12,60% nas folhas, 6,85% no caule e 8,48% na planta inteira. O ácido consome as cinzas fisiológicas expressando o conteúdo em derivados de sílica e constituintes silicosos decorrentes da contaminação da droga com areia, pedra e terra (CÍRIO et al., 2003; MARQUES, 1996).

Cinzas sulfatadas são representadas pelo resíduo não volatilizado após calcinação com ácido sulfúrico concentrado. Casoti (2012) em seu estudo com três amostras de *Pithecoctenium echinatum* obteve 7,15%, 7,10% e 7,57% de cinzas sulfatadas. Os metais presentes na droga convertem-se em sulfatos e como estes são mais resistentes ao calor, permitem obter resultados mais precisos do que aqueles obtidos somente com calcinação (SHARAPIN, 2001).

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2004). Alvarenga e colaboradores (2009) avaliaram o teor de água de folhas de guaco através do método gravimétrico obtendo 9,55%, 11,11% e 12,71% nas três amostras analisadas. O teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas nas monografias.

O índice de amargor é calculado como o valor recíproco da maior diluição em que o sabor amargo é percebido. A sensibilidade individual da pessoa que irá experimentar a solução da planta deve ser determinada. Para isso é empregado uma solução de uma substância amarga, geralmente cloridrato de quinina, cujo índice de amargor é 200.000 (FARIAS, 2004). Segundo Frasson e colaboradores (2003) o caule de *Caesalpinia ferrea* não pode ser considerado fortemente amargo, pois o índice de amargor encontrado foi de 1,68 unidades/g. Plantas medicinais que contêm um forte sabor amargo são utilizadas terapêuticamente, pois o amargor estimula as secreções do trato gastrointestinal, principalmente do suco gástrico (WHO, 1998).

A mucilagem é composta por derivados de carboidratos que provavelmente representam produtos de decomposição de celulose (PRATT, YOUNGKEN, 1951). Drogas contendo mucilagens são analisadas através da determinação do índice de intumescimento que corresponde ao aumento do volume de 1 g da amostra após o intumescimento em contato com um volume pré-estabelecido de água por 4 horas. *Davilla elliptica* e *Davilla rugosa* apresentam 4,1% e 2,2% de índice de intumescência, respectivamente (JÁCOME et al., 2010), de acordo com Costa (1972), a quantidade de mucilagens está diretamente relacionada com a atividade antidiarreica por reterem água.

2.3 Metabólitos secundários

Os metabólitos primários são responsáveis pela sobrevivência do vegetal exercendo função nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação dos nutrientes, enquanto que os metabólitos secundários estão intimamente associados à estratégia de defesa das plantas, como fungicidas e inseticidas (NASS, 2007; SILVA et al., 2010b).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, micro-organismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração (SIMÕES, 2004).

A capacidade de sintetizar metabólitos secundários é mais comum entre as plantas selvagens que ao longo do seu ciclo evolutivo desenvolvem mecanismos de adaptação para competir com outras. Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua importância ecológica tenha relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos. Assim, produtos secundários envolvidos na defesa das plantas através de toxicidade para patógenos microbianos, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos para humanos. Os constituintes químicos encontrados nas espécies vegetais se distinguem quimicamente em terpenos, fenólicos e compostos nitrogenados, com importantes funções nas plantas de proteção contra herbívoros e patógenos e atração para polinizadores (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os compostos fenólicos apresentam uma diversidade estrutural devido à grande variedade de combinações que acontece na natureza e estes compostos resultantes são chamados de polifenóis. Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas biossintetizado a partir da via dos fenilpropanóides, os quais ganharam especial atenção devido à capacidade de neutralizar radicais livres. Vários efeitos benéficos à saúde humana têm sido atribuídos a estes compostos que estão presentes em frutas, vegetais, chás e vinhos como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e anticarcinogênica (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; ABE et al., 2007; ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonoides são pigmentos de plantas solúveis em água que atuam como antioxidantes potentes capazes de eliminar radicais hidroxila e ânions superóxidos (DUNNE, 2009), possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6 (RHODES, 1994; SOARES, 2002). São os compostos mais diversificados do reino vegetal, encontrados em leguminosas, frutas, flores e folhas, onde estão relacionados com funções, contra raios ultravioleta, ações antifúngica, antibacteriana, atração de polinizadores (SOARES, 2002; SILVA et al., 2002).

Alguns compostos fenólicos não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, são polímeros, no qual estão incluídos os taninos, substâncias polifenólicas, solúveis em água de alto peso molecular e adstringentes (SOARES, 2002; ALONSO, 2008). De acordo com seu tipo estrutural temos taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galhotaninos) e taninos condensados. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças como diarréias, queimaduras, problemas estomacais e renais, processos inflamatórios e hipertensão arterial (SANTOS; MELLO, 2004).

As saponinas possuem diversas propriedades biológicas tais como hemolítica, esternutatória, ictiotóxica apresentando uma distribuição diferenciada no reino vegetal. São utilizadas como adjuvantes para aumentar a absorção de medicamentos através do aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção de membranas. *Aesculus hippocastanum* L. (castanheira-da-índia) cuja sementes, contêm escina que é o princípio ativo da espécie, as quais são utilizadas para fins medicinais. A este componente químico é atribuído propriedades anti-edema, anti-inflamatórias e venotônicas. As saponinas apresentam também outras propriedades farmacológicas como ação hipocolesterolemiantes, antifúngica,

atividade antiviral e antimicrobiana (MELO et al., 2007; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004).

2.4 Óleos voláteis

Óleos voláteis são misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis geralmente odoríferas e líquidas, podendo também ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, denominações essas devido as suas características físico-químicas, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente e volátil. Localizados em qualquer parte do vegetal, líquidos incolores (alguns amarelados) à temperatura ambiente, solúveis em álcool e solventes orgânicos, pouco solúveis em água e menos densos que esta, representam entre 0,1 e 1% do peso seco da planta, com algumas exceções como cravo-de-cheiro (15%) e anis estrelado (5%) (ALONSO, 2008).

A composição química dos óleos voláteis podem variar desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos com enxofre em diferentes concentrações sendo que um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SPITZER, 2004).

Os óleos voláteis possuem diversas ações farmacológicas, são considerados importantes agentes antimicrobianos presentes em plantas e também podem ter propriedades antioxidantes e atividades anti-inflamatórias. Estimulam as secreções naturais do aparelho digestivo, hortelã-pimenta, melissa e gengibre que possuem propriedades carminativas e eupépticas. A atividade específica sobre músculos lisos explica seu emprego na dismenorréia (canela, açafraão) e em doses elevadas como abortivo (arruda, losna, salsa). Sobre o sistema nervoso central determinam efeitos diferentes, assim, a cânfora, borneol, fenchona, carvona podem determinar uma ação analéptica, com excitação do sistema nervoso central. Outras drogas aromáticas como a melissa, a camomila e a valeriana possuem ação sedativa e narcótica. Os fármacos aromáticos são utilizados com maior frequência para destruir agentes causadores de infecções como as bactérias e fungos patogênicos e insetos parasitas (COSTA, 1994). A aromaterapia muito difundida na Europa, especialmente na França e Inglaterra surgiu devido às diversas atividades terapêuticas dos óleos

essenciais que abrangem quase todos os sistemas do organismo. O aromatógrafo é uma forma de antibiograma que permite analisar o poder antibiótico de muitos óleos essenciais (ALONSO, 2008).

O método de escolha para separar e quantificar as substâncias que compõem os óleos voláteis é a cromatografia gasosa (CG). A amostra é solubilizada em solventes apolares e injetada no cromatógrafo no qual ocorre a separação em colunas capilares. O gás da fase móvel tem a finalidade de transportar as moléculas a serem separadas através da coluna, sendo por isso conhecido como gás de arraste. Um detector é conectado na saída da coluna onde é constatada a eficiência da separação pelos picos que são registrados em um cromatógrafo (SPITZER, 2004; SILVA, 2005).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, permite a separação dos componentes e fornece um espectro de massas para cada pico. O índice de Kovatz (IK) relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Existem grandes listas de índice de Kovatz para compostos voláteis que permitem uma comparação com os componentes da amostra. Os valores encontram-se entre 900 (volátil) e 1900 (menos volátil) (SPITZER, 2004).

2.5 Atividade antimicrobiana

As plantas utilizadas na medicina tradicional como antimicrobiana são estudadas por serem possíveis fontes de substâncias para a obtenção de novos antibióticos, pois o surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos comercializados incentiva a busca de novas moléculas nas plantas (MENDES et al., 2011).

A resistência bacteriana é um problema crescente de saúde pública mundial devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos nas infecções, uma medida muito utilizada, fazendo com que aumentem os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos. A alta prevalência das infecções justifica a busca de recursos para o desenvolvimento de novas alternativas de controle para doenças (SILVA et al., 2010a; HAIDA et al., 2007).

A concentração inibitória mínima (CIM) é menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo, sendo considerada o padrão-ouro para determinar a suscetibilidade de organismos aos antimicrobianos (ANDREWS, 2001).

Mendes e colaboradores (2011) pelo método difusão em ágar com o uso de disco avaliaram extratos etanólicos brutos de *Peperonia pellucida* e *Portulaca pilosa* frente a diferentes micro-organismos, sendo que *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível ao extrato de *P. pilosa* e os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*, foram sensíveis ao extrato de *P. pellucida*. Através do método da microdiluição em caldo, o extrato de *P. pellucida* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram uma CIM de 62,5 µg/ml, enquanto que *P. pilosa* apresentou CIM igual a 250 µg/ml frente a *P. aeruginosa*.

Pereira e colaboradores (2012) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das folhas de *Morus alba* através do método da microdiluição em caldo sendo que as frações acetato de etila e clorofórmica apresentaram melhores respostas com CIM de 256 µg/ml.

Hentz e Santin (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente *Salmonella* sp através do método de difusão em ágar com o uso de disco demonstrando a baixa sensibilidade de *Salmonella* frente ao óleo essencial de *R. officinalis*.

3 MANUSCRITOS

Esta dissertação está sendo apresentada sob forma de manuscritos.

3.1 Manuscrito 1

- Parâmetros físico-químicos e dosagens de polifenóis, flavonoides e taninos de *Verbena litoralis*

Submetido à Revista Ciência Rural

3.2 Manuscrito 2

- Atividade antimicrobiana e avaliação da composição química do óleo essencial e dos extratos de quatro coletas de *Verbena litoralis* Kunth

A ser submetido à Revista Natural Product Research

1 **Parâmetros físico-químicos e dosagens de polifenóis, flavonoides e taninos de**

2 *Verbena litoralis*

3 **Physicochemical parameters and measurement of poliphenols, flavonoids and**

4 **tannins *Verbena litoralis***

5 **Rachel de Lima^I, Daiane F. Dalla Lana^{II}, Raquel M. M. Necchi^I, Luísa M. Machado^I,**

6 **Queila C. Fernandes^{II}, Rosiana Bertê^{III}, Melânia Palermo Manfron^I**

7 **RESUMO**

8 *Verbena litoralis* é uma planta herbácea perene pertencente à família Verbenaceae. Visando
9 estabelecer parâmetros para o controle de qualidade das partes aéreas de *V. litoralis* foram
10 realizados ensaios de pureza através das determinações de umidade, matéria estranha, cinzas
11 totais, cinzas insolúveis em ácido, cinzas sulfatadas, teor de mucilagem, índice de amargor e
12 rendimento do extrato bruto. Os ensaios foram realizados de acordo com a Farmacopeia
13 Brasileira e a Organização Mundial da Saúde, com amostras coletadas nas quatro estações do
14 ano. A perda por dessecação apresentou teor de umidade mais elevado na primavera. Os
15 índices de matéria estranha encontrados estão de acordo com a quantidade permitida pela
16 Farmacopeia Brasileira. A coleta de outono apresentou o maior teor de cinzas totais, cinzas
17 sulfatadas e cinzas insolúveis. O índice de intumescência mostrou valores mais elevados nas
18 amostras coletadas no outono. Foram realizadas também dosagens de polifenóis, flavonoides
19 e taninos com o extrato etanólico 70 % das partes aéreas de *V. litoralis*, sendo que o maior
20 teor encontrado de polifenóis e taninos foi no inverno.

21 **Palavras-chave:** *Verbena litoralis*; Verbenaceae; Controle de qualidade; Partes aéreas.

22 **ABSTRACT:**

23 *Verbena litoralis* is a perennial herbaceous plant belonging to the family Verbenaceae. Aiming
24 to establish parameters for quality control of aerial parts *V. litoralis* were done tests of purity
25 by determining the loss on drying, foreign matter, total ash, acid insoluble ash, sulphated ash,

1 swelling index, bitterness index and yield of crude extract. The tests were done with samples
2 collected on the four seasons according to the Brazilian Pharmacopeia and World Health
3 Organization. The percentage of loss on drying found are the highest content was in spring.
4 The indices of foreign matter found are agreement with the amount allowed by Brazilian
5 Pharmacopeia. The autumn collection showed the highest content of total ash, sulphated ash
6 and insoluble ash. The swelling index showed higher values in samples collected on autumn.
7 Were realized dosages of total polyphenols, flavonoids and tannins with 70% ethanol extracts
8 of aerial parts *V. litoralis*, the highest content of polyphenols and tannins were found in the
9 winter.

10 **Key words:** *Verbena litoralis*; Verbenaceae; Quality Control; Aerial parts.

11 ^I Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

12 ^{II} Curso de Farmácia, Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde,
13 (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

14 ^{III} Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

15 INTRODUÇÃO

16 O controle de qualidade de drogas vegetais é importante para a utilização como
17 matéria-prima no desenvolvimento de medicamentos e fitoterápicos (HUBINGER et al.,
18 2009). Para garantir o uso com segurança de determinada planta é necessário estabelecer
19 parâmetros de qualidade. A família Verbenaceae ocorre nas regiões tropicais e subtropicais,
20 principalmente nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do
21 Hemisfério Norte, compreendendo cerca de 175 gêneros e 2800 espécies. No Brasil ocorrem
22 17 gêneros e cerca de 250 espécies (BARROSO, 1991; LORENZI, 2005).

23 A espécie *Verbena litoralis* Kunth da família Verbenaceae apresenta folhas ovadas,
24 ovado-lanceoladas, lanceoladas, espatuladas ou lineares de base afiliada com pecíolo curto.
25 Suas inflorescências são longas, de cor violácea e pouco densas. Esta planta é popularmente
26 conhecida como gervãozinho-do-campo ou erva-de-pai-caetano, encontrada na região andina

1 do Chile ao Peru, Guianas, Venezuela, Argentina e regiões Sudeste e Sul do Brasil (SOUZA,
2 2005).

3 *V. litoralis* é utilizada amplamente na medicina popular para diarreia e amigdalite (LI
4 et al., 2003b). CASTRO-GAMBOA & CASTRO (2004), relata que *V. litoralis* é utilizada em
5 algumas doenças sexualmente transmissíveis na América Central e também na América do
6 Sul.

7 Estudo das partes aéreas caracterizaram diversos compostos, entre eles flavonoides,
8 cardioativos, antracenosídeos, saponinas hemolíticas, taninos catéquicos e carotenóides. Em
9 menor concentração foi detectada a presença de óleos voláteis, cumarinas e mucilagens
10 (SOUZA, 2005). A administração intraperitoneal de doses graduais de decocções de partes
11 aéreas de *V. litoralis* em ratos produz redução da atividade motora e reação de alarme, ataxia,
12 sedação, analgesia, anestesia, piloereção, movimento antiperistáltico com significativa redução
13 da temperatura corpórea em cerca de 8,4°C. Estes efeitos corroboram com o uso popular
14 como antidiarréico e antitérmico (CASTRO-GAMBOA, CASTRO, 2004).

15 LI e colaboradores (2003a) atribuem ao extrato de *V. litoralis* uma melhoria no fator de
16 crescimento neural mediada pelo crescimento das células PC12D. As células da sub-linha
17 PC12D estendem as neurites muito rapidamente em resposta a este fator. Diferentes
18 compostos a partir de fontes naturais em combinação com fator de crescimento neural atuam
19 sinergicamente para induzir o crescimento de neurites. Portanto, o uso de produtos naturais
20 para neuroregeneração fornece novas perspectivas no desenvolvimento de medicamentos para
21 o tratamento de lesão neuronal (MORE et al., 2012).

22 Como *V. litoralis* não possui monografia nas farmacopeias, objetivou-se a
23 caracterização físico-química das partes aéreas dessa, fornecendo parâmetros que auxiliem na
24 avaliação da sua qualidade.

25 **MATERIAIS E MÉTODOS**

1 **Material vegetal**

2 As partes aéreas de *Verbena litoralis* foram coletadas em março, junho e novembro de
3 2011 e janeiro de 2012, ou seja, nas quatro estações do ano, no Campus da Universidade
4 Federal de Santa Maria, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra
5 do material vegetal foi identificada pela Prof^ª Dr^ª. Thais Dorow e depositada no Herbário do
6 Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob o registro
7 SMDB 13095.

8 **Preparação do extrato etanólico**

9 Os extratos foram obtidos a partir de 150 gramas do pó da planta seca moída, através
10 da maceração com solvente hidroetanólico a 70%, com renovação de solvente para melhor
11 esgotamento dos constituintes químicos. Os extratos foram liofilizados e o rendimento
12 calculado.

13 **Controle de Qualidade Físico-Químico da Droga Vegetal**

14 Todas as análises foram realizadas em triplicata e de acordo com a Farmacopeia
15 Brasileira (Farm. Bras., 2010) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998).

16 **Determinação do teor de água**

17 A determinação do teor de água foi realizada a partir de 3,0 gramas do pó da droga,
18 submetida a aquecimento em estufa por 5 horas a 105°C. A perda de peso foi calculada em
19 relação à amostra seca.

20 **Matéria estranha**

21 Para o exame macroscópico foram pesados 25 gramas da droga vegetal, a qual foi
22 espalhada em uma superfície plana sendo dividida em quadrantes e analisados a olho nu e

1 com o uso de uma lente de aumento. O conteúdo de matéria estranha foi calculado
2 considerando o peso inicial.

3 **Cinzas totais**

4 Foram pesados 3,0 g de droga vegetal e colocado em cadinho previamente calcinado,
5 resfriado e pesado. As amostras foram incineradas gradualmente até a temperatura de 450 °C,
6 depois de resfriadas em dessecador e pesadas foram calculados os teores de cinzas.

7 **Cinzas insolúveis em ácido**

8 Aos cadinhos contendo as cinzas totais foi adicionado 25 ml de ácido clorídrico,
9 recobertos com vidro de relógio e fervidos durante 5 minutos em uma chapa de aquecimento.
10 Os vidros de relógio foram lavados com 5,0 ml de água quente a qual foi recuperada nos
11 cadinhos. O material contido em cada cadinho foi filtrado separadamente em Büchner com
12 papel filtro isento de cinzas e lavado com água quente até que o filtrado se torne neutro. O
13 papel filtro foi transferido para o cadinho original o qual foi seco em chapa de aquecimento e
14 incinerado a cerca de 500 °C em mufla, até peso constante. Depois de resfriado em
15 dessecador, foi pesado e o conteúdo de cinzas insolúveis em ácido foi calculado.

16 **Cinzas sulfatadas**

17 A droga (1,0 g) foi pesada, colocada em cadinho previamente calcinado, resfriado e
18 pesado. Após a amostra foi umedecida com ácido sulfúrico concentrado e levada a chapa de
19 aquecimento. Foi adicionado mais 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado e levado a mufla até
20 atingir 800°C. Depois de resfriado em dessecador, o cadinho foi pesado e o conteúdo de
21 cinzas foi calculado.

22 **Índice de intumescência**

1 Um grama da droga pulverizada foi introduzida em uma proveta e após adicionado 25
2 ml de água. Essa foi agitada de 10 em 10 minutos por uma hora. A mistura foi mantida em
3 repouso, por 3 horas e após medido o volume ocupado pelo material vegetal.

4 **Índice de amargor**

5 As propriedades amargas da planta foram determinadas comparando o limiar de
6 amargor de uma solução mãe de *V. litoralis* a 1% com uma solução diluída de cloridrato de
7 quinina.

8 **Rendimento do processo extrativo**

9 Os extratos brutos foram obtidos por maceração a frio da droga em pó com solvente
10 hidroetanólico 70% durante 30 dias e o rendimento foi calculado usando a equação:

$$11 \quad \text{Rendimento (\%)} = \text{Mf} / \text{Mi} \times 100$$

12 Mi = massa inicial da amostra

13 Mf = massa final do extrato seco (g).

14 **Dosagem total de polifenóis**

15 A dosagem de polifenóis foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu
16 conforme CHANDRA & MEJIA (2004) com modificações. Ao extrato de *Verbena litoralis*
17 na concentração de 0,05% diluído em água, foi adicionado 1,0 ml do reativo Folin Ciocalteu.
18 Após a incubação no escuro por 5 minutos, foi acrescentado 2,0 ml de carbonato de sódio a
19 20%. As soluções foram homogeneizadas e permaneceram no escuro durante 10 minutos.
20 Através de uma solução de ácido gálico nas concentrações de 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml
21 foi obtida a curva padrão para o cálculo de teor de polifenóis totais nas amostras. As leituras
22 das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 730 nm.

1 **Dosagem de flavonoides**

2 A dosagem de flavonoides foi realizada de acordo com a metodologia de RIO (1996)
3 modificada. Ao extrato de *V. littoralis* na concentração de 0,1% diluído em metanol 70% foi
4 adicionado 75 µl de cloreto de alumínio 5% em metanol e 4 ml de metanol 70%,
5 permanecendo em repouso no escuro por 30 minutos. A partir de uma solução de quercetina
6 nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 150, 200 e 300 µg/ml foi obtida uma curva padrão para
7 o cálculo dos flavonoides presentes na amostra. As leituras das absorbâncias foram realizadas
8 em espectrofotômetro a 425 nm.

9 **Dosagem de taninos**

10 A dosagem de taninos foi realizada de acordo com a metodologia de AGOSTINI-
11 COSTA (1999). O extrato de *V. littoralis* na concentração de 0,4% diluído em metanol 80%.
12 Em 1,0 ml da amostra adicionou-se 5,0 ml de reagente de vanilina (Vanilina; HCl; Metanol-
13 4-10-86). Após 15 minutos em repouso foram realizadas as leituras. Com uma solução de
14 catequina nas concentrações de 5, 50, 150, 300, 450, 600, 800, 900, 950 µg/ml foi obtida uma
15 curva padrão, para o cálculo dos taninos presentes nas amostras. As leituras das absorbâncias
16 foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível a 490 nm.

17 **Análise estatística**

18 A análise estatística foi realizada utilizando Oneway ANOVA seguido pelo teste de
19 Tukey utilizando software estatístico específico. Os resultados foram expressos como média ±
20 desvio padrão (SD) sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

21 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

22 Controle de qualidade Físico-Químico

1 O teor máximo de umidade (TU) estabelecido para diferentes monografias na
2 Farmacopeia Brasileira (2010) está entre 6 a 12 %. O excesso de umidade em matérias-
3 primas vegetais pode acarretar a degradação dos constituintes químicos, como também o
4 desenvolvimento de fungos e bactérias. Os parâmetros de umidade das partes aéreas de *V.*
5 *litoralis* são importantes no controle de qualidade e estão de acordo com valores encontrados
6 para outras monografias. Houve diferença significativa na perda de água por dessecação entre
7 a primavera e as outras estações do ano (Tabela 1).

8 A análise de matéria estranha (ME) tem por objetivo identificar porções não
9 específicas da droga, além de impurezas minerais ou de matéria orgânica não relacionada com
10 a planta. A Farmacopeia Brasileira estabelece um máximo de 2% de matéria estranha, para a
11 maioria das drogas vegetais. Não houve diferença significativa nas porcentagens de matéria
12 estranha (Tabela1) nas quatro estações do ano e está dentro dos parâmetros estabelecidos por
13 órgãos oficiais.

14 A determinação do conteúdo de cinzas totais na droga vegetal serve para verificar a
15 presença de impurezas inorgânicas não voláteis, que podem estar presentes como
16 contaminantes (WHO, 1998). Cinzas totais incluem as cinzas fisiológicas e não fisiológicas e
17 estabelece a quantidade de substância residual não volátil. Na determinação de cinzas
18 insolúveis em ácido, o ácido clorídrico consome as cinzas fisiológicas expressando o
19 conteúdo em sílica e derivados silícicos, normalmente decorrentes de contaminação com
20 areia, terra e pedras (MARQUES, 1996; CÍRIO et al., 2003). No outono houve um aumento
21 significativo nos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido (Tabela 2), quando comparadas
22 as quatro coletas. Como este aumento ocorreu tanto nas cinzas totais quanto nas insolúveis em
23 ácido, pode-se sugerir que estes teores mais elevados estejam relacionados com um maior
24 conteúdo mineral da planta.

1 Os cuidados na obtenção da matéria-prima vegetal fornecem teores de cinzas
2 insolúveis mais fidedignos. Quando os parâmetros estão estabelecidos, valores acima
3 expressam contaminação por excesso de terra.

4 As cinzas sulfatadas são representadas pelo resíduo não volatilizado após calcinação
5 com ácido sulfúrico concentrado. Os metais presentes na droga vegetal convertem-se em
6 sulfatos e como estes são mais resistentes ao calor permitem obter resultados mais precisos do
7 que os obtidos somente com calcinação (Tabela 2). Não foi observada diferença significativa
8 entre as quatro estações do ano. O maior rendimento de extrato foi obtido no verão (Tabela 1).

9 A mucilagem é constituída por derivados de carboidratos originados da decomposição
10 da celulose (PRATT & YOUNGKEN, 1951), além de ácidos urônicos e ácidos glicurônicos
11 (SIMÕES, 2004). *V. litoralis* apresentou índice de intumescência mais elevado no outono,
12 indicando maior teor de derivados de carboidratos (Tabela 1).

13 Plantas medicinais com forte sabor amargo são empregadas como digestivas, pois
14 estimulam a produção de suco gástrico (MORS et al., 2000). O gervãozinho-do-campo
15 apresentou o maior índice de amargor na coleta de inverno, corroborando com o conteúdo de
16 taninos condensados obtidos (27,90%) no inverno.

17 A curva de regressão obtida dos polifenóis foi $y = 0,019 x + 0,038$ ($R = 0,96$). Não
18 houve diferença significativa no teor de polifenóis entre as quatro estações do ano. A curva de
19 regressão obtida dos flavonoides foi $y = 0,003 x + 0,044$ ($R = 0,954$). Através de análise
20 estatística foi observado que o teor de flavonoides foi significativamente maior no outono,
21 enquanto que as coletas do verão e primavera obtiveram a menor concentração desta classe de
22 metabólito. A curva de regressão de taninos obtida foi $y = 0,0002 x + 0,0004$ ($R = 0,996$).
23 Através da análise estatística usada neste estudo, foi observada uma diferença significativa no

1 conteúdo de taninos nas quatro estações do ano (Tabela 3) e (Figura 1), sendo que o maior
2 teor de taninos encontrado foi no inverno e o menor encontrado foi no outono.

3 CONCLUSÃO

4 Os dados de controle de qualidade obtidos permitem o uso adequado de *Verbena*
5 *litoralis* e poderão contribuir na obtenção de fitoterápicos com qualidade, eficácia e
6 segurança.

7 REFERÊNCIAS

8 AGOSTINI-COSTA, T. et al. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no
9 suco de caju. **B. CEPPA**, v.17, n.2, p.167-176, 1999. Disponível em:
10 <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/13789/9274>. Acesso em: 03 julho
11 2012.

12 BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa,
13 Viçosa, Minas Gerais. 1991. 3v.

14 CASTRO-GAMBOA, I., CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena litoralis*
15 (Verbenaceae). **Phytochemistry** 65, p. 2369-2372, 2004. Disponível em:
16 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204003462>.> Acesso em 09
17 agosto 2011. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.07.008

18 CHANDRA, S.; MEIJA, E.G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone
19 Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex*
20 *paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal Agriculture and Food**
21 **Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004. Disponível em
22 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0352632>. Acesso em 08 abril 2013. doi:
23 10.1021/jf0352632.

- 1 CÍRIO, G.M. et al. Interrelação de parâmetros agronômicos e físicos de controle de qualidade
2 de *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria
3 farmacêutica. **Visão acadêmica** v.4, p.67-76, 2003. Disponível em <
4 <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/academica/article/view/525/438>>. Acesso em 11 abril
5 2013.
- 6 FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª edição. Brasília v. I, 2010.
- 7 HUBINGER, S. et al. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos
8 de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.3,
9 p. 690-696, 2009. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n3/07.pdf>>. Acesso em
10 11 abril 2013.
- 11 LI, Y. et al. Littorachalcone, a New Enhancer of NGF- Mediated Neurite Outgrowth, from
12 *Verbena litoralis*. **Chem. Pharm. Bull**, v.51, n.7, p.872-874, 2003a. Disponível em <
13 https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/7/51_7_872/pdf>. Acesso em 12 abril 2013.
- 14 LI, Y. et al. Sterol and Triterpenoid Constituents of *Verbena litoralis* with NGF-Potentiating
15 Activity. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n.5, p.696-698, 2003b. Disponível em <
16 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np020577p>>. Acesso em 12 abril 2013. doi:
17 10.1021/np020577p
- 18 LORENZI, H., SOUZA, V.C. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das**
19 **famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto
20 Plantarum de estudos da flora Ltda, São Paulo, p.529. 2005.
- 21 MARQUES, L.C. **Curso de Fitoterapia**. Recife: Sindicato das Indústrias de Produtos
22 Farmacêuticos do Estado de Pernambuco, 1996.

1 MORE, S.V. et al. The Role of Bioactive Compounds on the Promotion of Neurite
2 Outgrowth. **Molecules**, v.17, n.6, p.6728-6753, 2012. Disponível em
3 <<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/6/6728>>. Acesso em 13 abril 2013. doi:
4 10.3390/molecules17066728

5 MORS, W.B. et al. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications. 2000.
6 501p.

7 PRATT, R; YOUNGKEN, H. **Pharmacognosy**, Philadelphia: Copyright, 1951.

8 RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 74f. Dissertação
9 de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São
10 Paulo.

11 SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto
12 Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

13 SOUZA, T.J.T. et al. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth.
14 **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24, n.2, p.209-214. 2005. Disponível em <
15 http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/2/LAJOP_24_2_1_7_N000S9D1VY.pdf>. Acesso
16 em 15 abril 2013.

17 WHO, World Health Organization. **Quality Control Methods for Medicinal Plant**
18 **Materials**. Geneva, 1998, p.122.

19
20
21
22

1 Tabela 1. Teor de umidade (TU), matéria estranha (ME), índice de intumescência (II), rendimento e índice de
2 amargor das partes aéreas de *V. littoralis* nas diferentes estações do ano.

	TU %	ME %	II %	Rendimento	Índice de amargor
Estações	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	(%)	(unidades/g)
Outono	3,49 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,02 ^a	16,6 ± 0,53 ^a	17,540	1472
Inverno	3,00 ± 0,08 ^b	0,04 ± 0,01 ^a	11,2 ± 0,40 ^c	24,320	36800
Primavera	6,09 ± 1,50 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	13,6 ± 0,80 ^b	24,590	9200
Verão	3,10 ± 0,76 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	10,8 ± 0,00 ^c	27,080	9200

3 Letras comparam as médias entre os grupos em cada variável (vertical). As médias seguidas pela mesma letra
4 não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5 Médias ± desvio padrão

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1 Tabela 2. Cinzas totais (CT), cinzas insolúveis (CI) e Cinzas sulfatadas (CS), média \pm desvio padrão das partes
2 aéreas de *V. littoralis* nas diferentes estações do ano.

Estações	Média (%) CT \pm SD	Média(%) CI \pm SD	Média (%) CS \pm SD
Outono	10,41 \pm 0,22 ^a	1,02 \pm 0,08 ^a	8,34 \pm 0,02 ^a
Inverno	5,52 \pm 0,12 ^b	0,60 \pm 0,21 ^b	7,97 \pm 0,23 ^a
Primavera	5,62 \pm 0,55 ^b	0,38 \pm 0,14 ^b	7,19 \pm 0,45 ^a
Verão	5,38 \pm 0,06 ^b	0,49 \pm 0,15 ^b	7,50 \pm 0,85 ^a

3 Letras comparam as médias entre os grupos em cada variável (vertical). As médias seguidas pela mesma letra
4 não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1 Tabela 3. Teor de polifenóis, flavonoides e taninos

Estações	Polifenóis (%)	Flavonoides (%)	Taninos (%)
Outono	70,13 ± 3,13 ^a	44,07 ± 0,39 ^a	17,98 ± 0,61 ^d
Inverno	70,91 ± 0,84 ^a	40,74 ± 0,47 ^b	27,90 ± 0,44 ^a
Primavera	70,10 ± 1,07 ^a	37,55 ± 0,72 ^c	22,15 ± 0,89 ^b
Verão	70,28 ± 0,85 ^a	38,58 ± 0,17 ^c	19,87 ± 0,67 ^c

2 Letras comparam as médias entre os grupos em cada variável (vertical). As médias seguidas pela mesma letra
3 não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

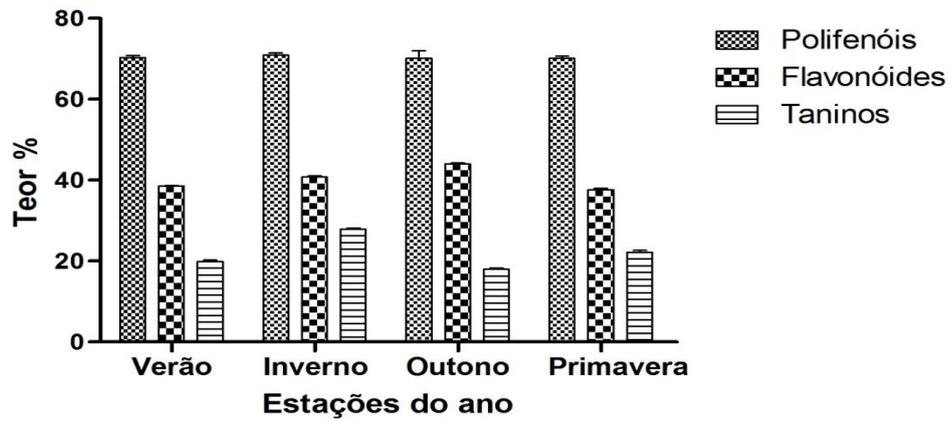
13

14

15

16

Dosagens dos metabólitos *Verbena litoralis*



1

2 Figura 1. Dosagem de polifenóis, flavonoides e taninos nas diferentes estações do ano.

Atividade antimicrobiana e avaliação da composição química do óleo essencial e dos extratos de quatro coletas de *Verbena litoralis* Kunth

¹Rachel de Lima, ²Daiane F. Dalla Lana, ¹Luísa Mulazzani Machado, ³Rosiana Bertê, ¹Luana Rossato, ¹Sydney H. Alves, ⁴Marcelo Pedroso, ⁴Ademir Morel, ¹Melânia Palermo Manfron

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS

³Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia da UFSM

⁴Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM

RESUMO

Verbena litoralis Kunth é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, nativa da América do Sul, usada como medicinal, na diarreia, na malária, em processos inflamatórios, como anti-espasmódico, cicatrizante e antioxidante. Este trabalho relata a composição química e a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial e dos extratos hidro-etanólicos de quatro coletas de *V. litoralis*. A composição química do óleo foi determinada através de CG/EM. Através da concentração inibitória mínima (CIM) se observou que o extrato nas diferentes coletas apresentou melhor atividade antimicrobiana que o óleo essencial. A CIM foi determinada frente à diferentes micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providência rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus intermedius*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. O *Aspergillus fumigatus* apresentou fraca sensibilidade tanto aos extratos quanto ao óleo essencial. Os micro-organismos foram fracamente sensíveis ao óleo essencial, com exceção do *P. rettgeri* e *S. intermedius*. *V. litoralis* apresentou 0,732% de óleo volátil constituído por cis-crisantenol, neo-verbanol, isobornil propanato, mirac aldeído, ternine, isofilocladeno e fenil etil antranilato.

ABSTRACT

Verbena litoralis Kunth is a species belonging to the family Verbenaceae, native to South America, used as medicine in diarrhea, malaria, in inflammatory processes, such as antispasmodic, healing and antioxidant. This paper reports the

chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil and hydro-ethanolic extract of four collections of *V. litoralis*. The chemical composition of the oil was determined by GC / MS. Through the minimal inhibitory concentration (MIC) was observed that the extract in different collections showed better antimicrobial activity than the essential oil. The MIC was determined across the different micro-organisms such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus intermedius*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *A. fumigatus* was weak sensitivity so as to extract as the essential oil. The micro-organisms were weakly sensitive to essential oils, with the exception of *P. rettgeri* and *S. intermedius*. *V. litoralis* showed 0,732% essential oil consisting of cis-chrysanthenol, neo-verbanol, isobornyl propanate, myrac aldehyde, ternine, isophyllocladene and phenyl ethyl anthranilate.

Palavras-chave: *Verbena litoralis*, Atividade Antimicrobiana, Óleo essencial

Key words: *Verbena litoralis*, Antimicrobial Activity, Essential Oil

INTRODUÇÃO

Verbena litoralis é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, nativa da América do Sul e conhecida popularmente como gervãozinho-do-campo ou erva-de-pai-caetano. Suas partes aéreas são usadas como antitérmico, antidiarréico, antimalárico, anti-inflamatório, anti-espasmódico, cicatrizante e antioxidante (SOUZA et al., 2005; CARRILO-ROSARIO; DÍAZ DE RAMÍREZ, 2006; BUSSMANN; GLENN; SHARON, 2010).

V. litoralis apresenta nas partes aéreas verbenachalcona, litorachalcona juntamente com 4-hidroxiogonin e 8,3-dimetoxi-5,7,4-trihidroxi-flavona (LI et al., 2001; LI et al., 2003a). A partir do extrato metanólico foram isolados e identificados quatro glicosídeos feniletanóides, acteosídeo, 2-acetilacteosídeo, jionosídeo, e isoverbascosídeo (LI et al., 2003b). Além disso, Castro-Gamboa e Castro (2004) conseguiram isolar dois novos iridóides 6S-hidroxi-8S-metil-4-metileno-hexahidro-ciclopenta[c]piran-3-ona e 6S, 9S-dihidroxi-8S-metil-4-metileno-hexahidro-ciclopenta[c]piran-3-ona. Apesar do uso popular desta planta em diferentes terapias, não há relatos na literatura da presença de óleos essenciais em *V. litoralis*.

As diversas substâncias produzidas no metabolismo secundário são produzidas como mecanismos de defesa contra insetos, micro-organismos e

herbívoros e são aproveitadas pelo homem pela sua atividade terapêutica. Polifenóis, taninos, alcaloides, flavonoides, cumarinas são compostos que podem apresentar atividade antimicrobiana (COWAN, 1999; RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007). Um grande número de extratos de plantas e produtos naturais tem sido estudado na tentativa de descobrir novas classes de antimicrobianos que resolveriam problemas como o aparecimento de efeitos secundários indesejáveis e infecções incomuns (ALVIANO, 2008).

O tratamento de infecções fúngicas e bacterianas é baseado na ação sobre o agente etiológico bem como da ação supressora à instalação do processo infeccioso. O uso de antimicrobianos necessita de critérios rigorosos devido aos efeitos colaterais produzidos pela grande maioria desses compostos (ARAÚJO et al., 2004). A resistência a agentes antimicrobianos requer pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias, assim como o desenvolvimento de novos métodos para o tratamento de infecções bacterianas (CUNICO et al., 2004).

A pesquisa de extratos, frações e óleos essenciais de espécies vegetais visa a uma possível aplicação racional de princípios ativos no tratamento de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas ou vírus (ARAÚJO et al., 2004). Os óleos essenciais têm sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, a capacidade presente na maioria destes compostos representa a extensão do papel que fazem nas plantas defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (SIANI, 2000). Os fármacos aromáticos são utilizados com frequência para destruir os agentes causadores de infecções, pelos seus poderes bactericida e bacteriostático na terapêutica de várias doenças produzidas por bactérias e fungos patogênicos. (COSTA, 1994; OLIVEIRA et al., 2007).

Extrair, caracterizar, verificar a atividade e determinar a composição química dos óleos essenciais presentes na espécie, bem como investigar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidro-etanólicos tem como objetivo respaldar o uso popular de *V. littoralis*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Material vegetal

As partes aéreas de *V. littoralis* foram coletadas, nas quatro estações do ano, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra do material vegetal foi identificada e depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, conforme exsicata SMDB 13.095.

Obtenção dos extratos

Foram preparados extratos hidro-etanólicos 70% por maceração com renovação de solvente com as diferentes coletas. Os mesmos foram liofilizados e armazenados em frascos âmbar sob refrigeração.

Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido das partes aéreas de *V. littoralis* com a coleta de verão, utilizando o sistema de hidrodestilação em aparelho de Clevenger durante o período de cinco horas. O óleo coletado foi separado da fase aquosa com uso de éter etílico, dessecado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), obtendo-se 0,732%. O mesmo foi armazenado sob refrigeração.

Determinação da composição química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa através do cromatógrafo a gás 3800 (VARIAN) acoplado a detector de massas 2200 SATURN (VARIAN). As análises foram realizadas com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , cuja temperatura era 50°C-250°C com aumento de 4°C/min. A temperatura do injetor e do detector eram 220°C e 280°C respectivamente. Foi utilizado hélio como gás de arraste e a pressão na coluna de 8 psi. A amostra foi preparada pela diluição de 1 μl do óleo essencial em 1 ml de hexano, desta foi injetado no CG uma alíquota de 1 μl .

As substâncias foram identificadas através da comparação de seus espectros de massas com espectros existentes na literatura e pela comparação dos índices de retenção (ADAMS, 1995).

O índice de retenção de Kovats (IK) foi determinado através da injeção de uma mistura de n-alcenos (C8 a C26) com tempo de retenção e ordem de eluição conhecidos juntamente com os constituintes que tiveram seus índices calculados através da seguinte fórmula:

$$IK_i = 100 n + 100 \Delta n [(t_{ri} - t_{rn}) / (t_{rm} - t_{rn})]$$

Onde:

IK = índice de retenção de Kovats da substância desconhecida

n = número de carbonos do alcano que elui antes de i

m = número de carbonos do alcano que elui depois de i

Δn = número de carbonos que elui depois de i menos número de carbonos do alcano que elui antes de i

t_{ri} = tempo de retenção de i

t_{rn} = tempo de retenção do alcano que elui antes de i

t_{rm} = tempo de retenção do alcano que elui depois de i

Atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e isolados clínicos de *Providencia rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella pullorum*, *Listeria*

monocytogenes, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* disponíveis no Laboratório de Pesquisas Micológicas LAPEMI.

A atividade antimicrobiana dos extratos hidro-etanólicos e do óleo essencial foi determinada pelo método da microdiluição em caldo de acordo com Clinical and Laboratory Standards CLSI M27-A3 (2008a) para leveduras, CLSI M07-A8 (2009) para bactérias e CLSI M38-A2 (2008b) para fungos filamentosos determinando assim a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os testes foram realizados em placas estéreis de microdiluição com cavidade com capacidade de 500 μ L, dispostas em 8 linhas e 12 colunas, totalizando 96 cavidades. Os inóculos das leveduras foram preparados a partir de cultivos em ágar Sabouraud durante 48 horas a 30°C. A seguir preparou-se uma solução em salina estéril 0,85% ajustando-se a turvação em espectrofotômetro se obtendo transmitância equivalente de uma solução padrão da escala de Mac Farland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. A partir dessa foi obtida uma suspensão 1:100 em solução salina estéril e posteriormente uma 1:50 em meio RPMI-1640, sendo 100 μ l desse inóculo adicionados em placas de microdiluição.

O inóculo das espécies bacterianas foi preparado seguindo o protocolo CLSI M07 A8 (2009). As bactérias foram ativadas em ágar Müeller Hinton (MH) durante 24 horas a 35°C. O inóculo foi obtido em solução salina estéril 0,85% e padronizado em espectrofotômetro de acordo com a escala de Mac Farland 0,5 em comprimento de onda de 630 nm. A partir dessa diluição foi obtida uma nova diluição 1:10 com o meio líquido caldo Müeller Hinton, sendo 10 μ l inoculado em placas de microdiluição.

Para o fungo filamentoso testado seguiu o documento do CLSI M38 A2 (2008b). O fungo filamentoso foi inicialmente incubado em tubo com Ágar batata-dextrose a 30°C por 7 dias. Após as colônias foram cobertas com aproximadamente 1ml de salina estéril 0,85% e uma mistura de conídios foi transferida para um tubo estéril, ajustando a densidade em espectrofotômetro a 530 nm, até atingir 80 a 82% de transmitância (0,009 a 0,11 de absorbância). A suspensão do inóculo foi diluída a 1:50 no meio de cultura (RPMI), sendo 100 μ l inoculada nas placas de microdiluição.

Os extratos e o óleo essencial foram diluídos em concentrações de 512 μ g/ml a 4 μ g/ml. As cavidades das placas de microdiluição contendo 100 μ l dos extratos e ou óleo de *V. littoralis*, foram inoculadas com 100 μ l de suspensão de levedura e ou

fungo filamentoso e 10 µl de suspensão bacteriana. O controle positivo continha 0,1 ml do inóculo e 0,1 ml do meio, sem as drogas teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial está apresentada na Tabela 1. Em todas as coletas os micro-organismos foram sensíveis aos extratos com exceção o *S. agalactiae* que foi fracamente sensível. Bactéria responsável por quadros de septicemias, meningites e pneumonias neonatais (CAETANO, 2008). A maior sensibilidade dos micro-organismos para os extratos foi na coleta de inverno, sendo que *P. rettgeri* foi a mais sensível com CIM de 32 µg/mL e fracamente sensível o *A. fumigatus* (CIM maior que 500 µg/mL). *P. rettgeri* é um patógeno oportunista em humanos e podem causar infecção do trato urinário principalmente em pacientes com sonda ou queimaduras extensas enquanto que *A. fumigatus* ataca predominantemente os pulmões (LATGÉ, 1999). A *L. monocytogenes* apresentou para todas as coletas uma alta sensibilidade (CIM de 64 µg/mL), reconhecida como causa de meningo encefalite e septicemia em mulheres grávidas, neonatos e pacientes imunocomprometidos (SLIFMAN et al., 2003). Na presença do óleo essencial os micro-organismos mostraram fraca sensibilidade com exceção do *P. rettgeri* (CIM de 64 µg/mL) e o *S. intermedius* que o CIM foi de 128 µg/mL. Esta bactéria é encontrada na pele, na flora oral e nasal de cães saudáveis, podendo ser também um agente patogênico invasor. É responsável por infecções em feridas humanas causadas por mordidas de cães (MAHOUDEAU et al., 1997).

Embora o *S. intermedius* também tenha apresentado moderada atividade nas coletas de verão, outono e primavera, na coleta de inverno mostrou uma alta atividade. Pela sensibilidade demonstrada pelos micro-organismos frente aos diferentes extratos se mostra a importância do período da coleta para se obter a atividade farmacológica e ou os princípios ativos responsáveis por essa atividade.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do extrato bruto das quatro estações do ano e do óleo essencial de *Verbena litoralis* ($\mu\text{g/mL}$).

Micro-organismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	Inverno	Verão	Outono	Primavera	Óleo
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	128	128	256	>512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64	64	128	128	>512
<i>Providência rettgeri</i>	32	128	128	128	64
<i>Streptococcus agalactiae</i>	64	512	64	128	512
<i>Micrococcus luteus</i>	64	64	128	128	512
<i>Staphylococcus intermedius</i>	64	128	128	128	128
<i>Proteus mirabilis</i>	128	128	128	128	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	128	128	128	512
<i>Salmonella pullorum</i>	128	128	128	128	>512
<i>Listeria monocytogenes</i>	64	64	64	64	>512
<i>Enterococcus faecalis</i>	128	128	128	128	>512
<i>Candida albicans</i>	256	64	128	128	>512
<i>Cryptococcus neoformans</i>	128	64	64	64	>512
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>512	>512	>512	>512	>512

Concentração inibitória mínima (CIM)

A composição do óleo essencial de *V. litoralis* foi determinada através de cromatografia gasosa que resultou na separação de sete substâncias (Figura 1) (Tabela 2) com seus respectivos tempos de retenção (TR), índice de Kovats (IK) e concentração.

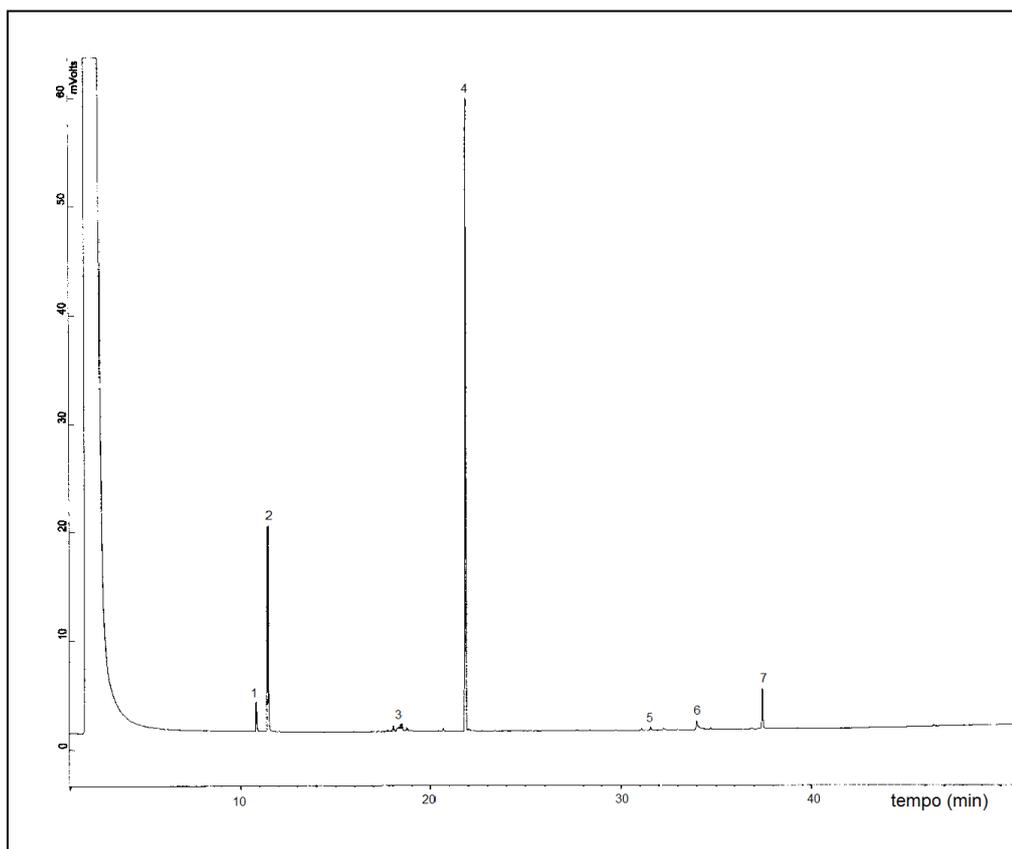


Figura 1: Perfil cromatográfico do óleo volátil das partes aéreas de *V. littoralis*.

Tabela 2: Substâncias presentes no óleo volátil de *V. littoralis* e suas respectivas concentrações.

Pico	TR	IK	IK Adams	%	Substância
1	12.299	1162	1162	3,14	cis-crisantenol
2	12.957	1182	1182	20,34	neo-verbanol
3	19.468	1381	1381	0,39	isobornil propanato
4	23.652	1516	1516	66,05	mirac aldeído
5	32.720	1839	1838	0,41	ternine
6	35.916	1965	1963	1,75	isofilocladeno
7	39.463	2113	2120	4,40	fenil etil antranilato

TR = tempo de retenção (min); IK = índice de Kovatz

Cis-crisantenol foi uma das principais substâncias presentes no óleo de *V. littoralis*. Considerado um monoterpeno oxidado foi também um dos constituintes majoritários de *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss (WEYERSTAHL et al., 1999). Em um estudo realizado por Brito e colaboradores (2011), através de olfatométrica de

cromatografia gasosa de *Cymbopogon citratus* identificaram o aroma de crisantenol como de eucalipto. Cis-crisantenol está também presente nos óleos voláteis de *Melissa officinalis* L. (BLANK et al., 2005).

O neo-verbanol foi a segunda substância mais concentrada no óleo essencial de Verbena. Segundo Simakova e Semilkolenov (2003) α -pineno por reação de oxidação se transforma em verbenol que é convertido no álcool saturado verbanol, material para síntese de novos produtos químicos através de uma hidrogenação. Podendo assim ser convertido na fragrância 3,4,6 trimetil-5-enal com forte aroma de limão ou em orto-mentol que tem um doce odor suave de cravo. Devido ao seu agradável aroma esta substância é comumente usada em sabonetes, bases cosméticas e outras aplicações de perfumaria. Stojkovic e colaboradores (2011) relataram a presença de trans-verbenol no óleo de frutos de *Vitex agnus-castus* L., outra espécie da família Verbenaceae.

O monoterpene isobornil propionato esteve presente em pequena quantidade no óleo essencial de *V. litoralis*, enquanto que *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown apresentou 0,3% de acetato de isobornil. No óleo essencial de *V. officinalis* L. foi relatada a presença de formato de isobornil e acetato de isobornil, ambas espécies da família Verbenaceae (BARROS et al., 2009; DE MARTINO et al., 2011).

Aldeídos são comumente encontrados na composição de óleos essenciais ocorrendo em plantas como *Carduus nutans*, *Perlagonium graveolens*, *Grammosciadium platycarpum* (DE MARIA; MOREIRA, 2003; GHANNADI et al., 2012; NAZEMIYEH et al., 2009). Matérias-primas de aromas como os aldeídos podem ser usadas em formulações de nanoemulsões para liberar fragrâncias incorporadas aos produtos cosméticos. Alguns aldeídos são também responsáveis pelos sabores e aromas agradáveis presentes nos vinhos envelhecidos (BARIL, 2012; AZEVÊDO, 2007). O mirac aldeído foi o constituinte majoritário presente no óleo de *V. litoralis*.

Através das análises comparativas do seu índice de Kovatz e espectro de massas (ADAMS, 1995) o pico número 5 no cromatograma de *V. litoralis*, indica a presença de ternine ou isobenzofuranona 4,5-dihidro-3-pentilideno, já identificada em *Callophyllum brasiliense* e com atividade hipoglicemiante. Em modelo de atividade anticonvulsivante, na crise induzida por eletrochoque em ratos, o 3-butilbenzofuranona, isolado nos frutos de *Apium graveolens* apresentou atividade anticonvulsivante (CASTAÑEDA, 2011; CARDOSO, 2005).

Hidrocarbonetos diterpenos já foram isolados de muitas espécies de Podocarpaceae endêmicas da Nova Zelândia, hidrocarbonetos que incluem filocladeno, isofilocladeno, caurenos, isocaurenos, normalmente os diterpenos ocorrem em quantidades muito pequenas ou em traços (APLIN, 1963; PIOZZI; BRUNO, 2009). Na *V. litoralis* foi identificado o diterpeno isofilocladeno pela semelhança de sua fragmentação.

No óleo de *V. litoralis* foi identificado fenil etil antranilato, na *Vitis vinifera* foram identificados etil antranilato e metil antranilato (MOIO; ETIEVANT, 1995). Ribeiro (2006) lista metil antranilato na concentração máxima de 5% como um dos filtros solares permitidos no Brasil para uso em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumarias. Por apresentarem uma ação como filtro solar, os antranilatos possivelmente apresentam uma ação de proteção para a própria planta.

CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste estudo foi possível observar que os extratos apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial, revelando desta forma a potencialidade de *V. litoralis* como um possível insumo farmacêutico para combater infecções causadas por micro-organismos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois, 451 p., 1995.

ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plants extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 545-552, 2008.

APLIN, R.T. The taxonomic distribution of some diterpene hydrocarbons. **Phytochemistry**, v. 2, p. 205-214, 1963.

ARAÚJO, J. C. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n.1, p. 55-64, 2004.

AZEVÊDO, L. C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, 2007.

BARIL, M. B. et al. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão acadêmica**, v.13, n. 1, p. 45-54, 2012.

BARROS, F.M.C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BLANK, A.F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BUSSMANN, R.W., GLENN, A., SHARON, D. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru – can traditional applications provide leads for modern science? **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 9, n. 4, p. 742-753, 2010.

BRITO, E. S. et al. Caracterização Odorífera dos Componentes do Óleo Essencial de Capim-Santo (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., Poaceae) por Cromatografia Gasosa (CG) – Olfatometria. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** - Embrapa, 2011.

CAETANO, M. S. S. G. **Colonização pelo *Streptococcus agalactiae* (EGB) em gestantes atendidas na rede pública de Uberaba-MG**. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia)-Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008.

CARDOZO, J. A. et al. 3-Butil-isobenzofuranona: un compuesto aislado de *Apium graveolens* con actividad anticonvulsivante. **Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.**, v. 34, n. 1, p. 69-76, 2005.

CARRILLO-ROSARIO, T., DÍAZ DE RAMÍREZ, A. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena litoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. **Revista de La Facultad de Farmacia**, v. 48, n. 1, p. 14-20. 2006.

CASTAÑEDA, B. et al. Efecto del extracto atomizado de las hojas de *Calophyllum brasiliense* "lagarto caspi" sobre la glicemia. **Revista Horizonte Médico**, v. 11, n. 1, p. 7-14, 2011.

CASTRO-GAMBOA, I., CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena litoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2369-2372, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast**. Document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Document M38-A2. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**, approved standard. 4^a ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

COSTA, A.L. **Farmacognosia** 5^a Ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V.I 1031 p. 1994.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CUNICO, M. M. et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Compostos Voláteis em Méis Florais. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p.90-96, 2003.

DE MARTINO, L. et al. Active caspase-3 detection to evaluate apoptosis induced by *Verbena officinalis* essential oil and citral in chronic lymphocytic leukaemia cells. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 869-873, 2011.

GHANNADI, A. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargolium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 171-176, 2012.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LI, Y et al. Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena litoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 806-808, 2001.

LI, Y. et al. Littorachalcone, a New Enhancer of NGF-Mediated Neurite Outgrowth, from *Verbena litoralis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 7, p. 872-874, 2003a.

LI, Y. et al. A New Iridoid Glycoside with Nerve Growth Factor-Potentiating Activity, Gelsemiol 6'-trans-Caffeoyl-1-glucoside, from *Verbena litoralis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 9, p. 1103-1105, 2003b.

MAHOUDEAU, I. et al. Frequency of Isolation of *Staphylococcus intermedius* from Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2153-2154, 1997.

MOIO, L.; ETIEVANT, P. X. Ethyl anthranilate, ethyl cinnamate, 2,3-dihydrocinnamate, and methyl anthranilate: four important odorants identified in Pinot noir wines of Burgundy. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 46, n. 3, 1995.

NAZEMIYEH, H. et al. Free radical scavengers from the aerial parts of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. (Apiaceae) and CG-MS analysis of the essential oils from its fruits. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 914-918, 2009.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236-240, 2007.

PIOZZI, F.; BRUNO, M. Diterpenoids in the Essential Oils from the Genus *Stachys*. **Rec. Nat. Prod.**, v. 3, n. 3, p. 120-125, 2009.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.9, n.2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, C. J. **Fotoproteção e Fotoprotetores**. In: Cosmetologia Aplicada a Dermoestética. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais-Potencial anti-inflamatório. **Biociência e Desenvolvimento**, p. 38-43, 2000.

SIMAKOVA, I. L.; SEMILKOLENOV. The Catalytic Method of Verbanol Preparation with Controlled Isomer Distribution Starting from Renewable Material α -Pinene. **Chemistry for Sustainable Development**, v. 11, p. 271-275, 2003.

SLIFMAN, N. R. et al. *Listeria monocytogenes* Infection as a Complication of Treatment with Tumor Necrosis Factor α -Neutralizing Agents. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 2, p. 319-324, 2003.

SOUZA, T. et al. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Revista Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 209-214, 2005.

STOJKOVIC, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1017-1022, 2011.

WEYERSTAHL, P. et al. Constituents of the essential oil of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 121-130, 1999.

4 DISCUSSÃO GERAL

Nas últimas décadas, tem se observado em todo o mundo o uso de plantas medicinais e a crescente utilização de fitoterápicos. Nos países em desenvolvimento, o uso de plantas medicinais, muitas vezes constitui o principal recurso disponível para o tratamento primário de saúde (SILVEIRA et al., 2010). O controle de qualidade de drogas vegetais e seus extratos é importante quando utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos (HUBINGER et al., 2009). Considerando que a eficácia e a segurança terapêutica de drogas vegetais dependem de diversos fatores extrínsecos como tipo de solo, clima, irrigação, área geográfica, procedimento de coleta, época do ano, fatores esses também influenciarão na qualidade do medicamento obtido a partir destas drogas (AMARAL et al., 2003; OMS, 2003). A Farmacopéia Brasileira (2010) preconiza metodologias úteis no estabelecimento de parâmetros de qualidade que estão disponíveis em compêndios oficiais. O estudo sazonal permite estabelecer parâmetros de controle de qualidade assim como avaliar a presença de metabólitos secundários nas estações do ano.

Em todas as coletas *V. litoralis* manteve a porcentagem de matéria estranha abaixo dos valores preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2010), para outras espécies como *Baccharis trimera*, é no máximo 2%, para os caules de *Datura stramonium* 3%, já para os caules e flores de *Melissa officinalis* é aceitável até 10% de material estranho. O excesso de água pode levar ao desenvolvimento de fungos, bactérias e insetos resultando em hidrólise dos constituintes químicos, portanto o processo de dessecação é um procedimento para manter a qualidade de drogas vegetais o qual consta na Farmacopéia Brasileira (1988). Através da secagem foi preconizado que *V. litoralis* deve apresentar teor de umidade aproximadamente de 3% a 6%; para manter a qualidade da droga. As folhas de *Cissus verticillata* apresentam percentual de água de 85,5%, levando a necessidade de se realizar um processo adequado de secagem (BRAGA et al., 2007). Diferentes espécies têm parâmetros de umidade estabelecidos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) em 8% a 14% e para *V. litoralis* se estabeleceu parâmetros abaixo destes.

As cinzas totais de *V. litoralis* nas quatro estações do ano variaram de 5% a 10%. Na coleta do outono houve o maior teor de cinzas, o mesmo foi encontrado

para *Morus alba* para o mesmo período do ano (PEREIRA et al., 2011). Já as cinzas inorgânicas ficaram em torno de 0,3% a 1,0% o que mostra um alto teor de substâncias orgânicas. Do mesmo modo que para cinzas totais, os valores maiores de cinzas insolúveis em ácido foram encontrados na coleta de outono, embora bem inferior aos encontrados em *Peumus boldus* Molina (6,26%) e *Ipomoea pes-caprae* (12,60%) (BARBOSA et al., 2001; BARNI et al., 2009).

O índice de intumescência que caracteriza a mucilagem presente em uma droga vegetal pelo aumento do volume ocupado pela droga quando adicionado a esta água. A mucilagem para *V. litoralis* foi de 10% a 16%, para as diferentes coletas. Segundo Costa (1972) a quantidade de mucilagem está diretamente relacionada com a atividade antidiarréica por reterem água. Os valores foram superiores aos encontrados na folhas de *Davilla elliptica* (4,1%) e 2,2% nas folhas de *Davilla rugosa* as quais não possuem ação antidiarréica de acordo com a literatura (JÁCOME et al., 2010).

O rendimento dos extratos hidro-etanólicos de *V. litoralis* obtidos nas quatro estações do ano foram de 17% a 27% sendo que no verão houve o maior rendimento e o menor no outono, teores esses semelhante aos encontrados nos extratos das folhas de *Morus alba* que foram 18% a 29%; sendo que o menor rendimento encontrado para ambas as plantas foi no outono.

As plantas medicinais com forte sabor amargo são empregadas principalmente como digestivas, pois o amargor estimula a produção do suco gástrico (MORS et al., 2000). *V. litoralis* apresentou substâncias amargas com índices de amargor de 36800 u/g a 1472 u/g, sendo que o maior valor encontrado foi no inverno. Isto vem ao encontro de relatos de pessoas que fazem uso do chá de gervãozinho-do-campo para casos de má digestão e ingestão excessiva de bebida alcoólica. Esses índices encontrados podem ser considerados altos quando comparados com *Baccharis articulata* (230 u/g) e *Baccharis cylindrica* (153,3 u/g) (BUDEL et al., 2004).

Nas diferentes coletas de *V. litoralis* foi possível estabelecer que o maior conteúdo de polifenóis ocorreu no inverno (70,91%) não variando significativamente entre as quatro estações do ano, enquanto que para *Sida rhombifolia* (MACHADO, 2012) foi determinado que esses compostos estão em maior quantidade no verão. Pereira e colaboradores (2011) verificaram que o teor de polifenóis encontrados em *M. alba* também está em maior quantidade nesta estação. Em raízes de *Heteropteris*

aphrodisiaca o maior teor de polifenóis ocorreu na primavera (10,2%) (MARQUES et al., 2007). Esses teores provavelmente variam de acordo com a incidência solar e a espécie vegetal.

O teor de flavonóides encontrado em *V. litoralis* foi significativamente maior na coleta do outono, o extrato etanólico de *Aloe arborescens* Mill. apresentou maior teor de flavonóides no outono embora com baixos teores, já nos extratos clorofórmicos, os maiores teores de flavonoides foram encontrados nas coletas da primavera (CARDOSO et al., 2010). Souza e colaboradores (2010) verificaram que o teor de flavonoides dos extratos alcoólicos da própolis foi maior no outono, que relacionaram com a vegetação disponível ao redor do apiário para coleta de resina pelas abelhas (KOO; PARK, 1997).

Aos taninos são atribuídas algumas propriedades farmacológicas incluindo antioxidante, antidiarréico, anti-inflamatório, cicatrizante, anti-séptico (PANSERA et al., 2003). *V. litoralis* apresentou diferença significativa no conteúdo de taninos nas quatro coletas, sendo que seus teores podem ser considerados expressivos se comparados com extrato bruto de *Tropaeolum majus* L. (0,008%) e de *Glechon spathulata* (0,25%) (ZANETTI, 2002; BANDERÓ, 2010).

O surgimento e a disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos levaram pesquisadores a estudar a ação dos metabólitos secundários. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir formas menos agressivas para o controle de micro-organismos que são patogênicos para os seres humanos ou que provocam a deterioração dos alimentos. Segundo Holetz e colaboradores (2002) através do método da microdiluição em caldo os extratos que apresentam concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 100 µg/mL são considerados ativos ao micro-organismo testado, entre 100-500 µg/mL são moderadamente ativos, entre 500-1000 µg/mL são considerados de fraca atividade sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções fúngicas e bacterianas e acima de 1000 µg/mL são considerados inativos.

Cardoso e colaboradores (2010) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos etanólicos e clorofórmicos de *A. arborescens* produzidos em diferentes épocas do ano. De acordo com suas observações não houve efeitos expressivos da sazonalidade sobre o potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos, sendo o extrato de verão o de menor eficiência antimicrobiana. A atividade antimicrobiana de um extrato pode ser devido à presença de flavonoides e taninos os quais estão

presentes em *V. littoralis* a qual apresentou atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo (BYLKA et al., 2004; VELURI et al., 2004; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). De acordo com Silva e colaboradores (2003) a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ocorre pela ação conjunta de compostos químicos presentes nas plantas e não pela atividade de compostos isolados.

Todas as bactérias testadas frente aos extratos de *V. littoralis* das quatro estações do ano, com exceção de *Aspergillus fumigatus* apresentaram sensibilidade. Os óleos essenciais podem ser considerados uma alternativa importante no controle de micro-organismos. *Providência rettgeri*, *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus intermedius* e *Klebsiella pneumoniae*, frente ao óleo de *V. littoralis* apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto que para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* o óleo apresentou baixa sensibilidade o que também ocorreu com o óleo de *Rosmarinus officinalis* frente a *Salmonella sp*, em que não houve formação de halo de inibição utilizando o método de disco (HENTZ; SANTIN, 2007). Os extratos de *V. littoralis* apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus intermedius*, *Salmonella pullorum* e *Enterococcus faecalis* semelhante aos extratos das raízes de *Sida rhombifolia* (MACHADO, 2012).

Através da cromatografia gasosa e espectro de massas foram identificados sete diferentes constituintes no óleo de *V. littoralis* já identificados em outras espécies vegetais como *Melissa officinalis* onde se encontrou cis-crisantenol (BLANK et al., 2005). O verbenol e o mirac aldeído foram identificados também nos frutos maduros de *Vitex agnus castus*, também pertencente a família Verbenaceae (STOJKOVIC et al., 2011).

Os resultados obtidos instigam a avaliação da toxicidade destes extratos e a investigação dos princípios ativos presentes responsáveis pelas atividades farmacológicas, visando futuramente uma aplicação farmacêutica.

5 CONCLUSÕES

- Os parâmetros físico-químicos preconizados pela Farmacopéia Brasileira permitiram estabelecer parâmetros de qualidade para a espécie *Verbena litoralis*;
- O teor de polifenóis não variou significativamente nas quatro estações do ano;
- *V. litoralis* apresentou maiores teores de taninos nos extratos de inverno;
- *V. litoralis* apresentou maiores teores de flavonoides nos extratos de outono;
- Os extratos de *V. litoralis* apresentaram atividade antimicrobiana;
- A atividade antimicrobiana dos extratos de *V. litoralis* é melhor do que a atividade antimicrobiana do óleo essencial;
- No óleo essencial de *V. litoralis* foram identificados sete constituintes principais através do CG/EM: cis-crisantenol, neo-verbanol, isobornil propanato, mirac aldeído, ternine, isofilocladeno e fenil etil antranilato;
- O óleo essencial de *V. litoralis* apresentou 0,732% de rendimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

ADAMS, M. et al. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-A survey of European herbals from the 16th and 17th century. **Journal of Ethnopharmacology** v. 121, p. 343-359, 2009.

ALONSO, J. **Fitomedicina**: curso para profissionais da área da saúde. 1^a ed. São Paulo. Ed. Pharmabooks. 2008.

ALVARENGA, F. C. R. et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, (2A), p. 442-448, 2009.

ANDRADE, M. A. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 47-52, 2011.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.

AMARAL, F. M. M et al. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 27-30, 2003.

ARAÚJO et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

BANDERÓ, V. C. F. **Controle Botânico, Físico-Químico e Atividade Anti-inflamatória de *Glechon spathulata* Benth. (Lamiaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

BARBOSA, M. C. S. et al. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) comercializadas em Curitiba, PR. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.1 p.1-4, 2001.

BARNI, S.T.; FILHO, V.C.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.865-870, 2009.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 3 v, 1991.

BOTTA, S. M. Estudios em el género sudamericano *Junellia* (Verbenaceae – Verbenoideae) 1. Delimitación y tratamiento infragenérico. **Darwiniana**, v. 29, p. 371-396, 1989.

BRAGA, T.V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BLANK, A.F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **J. Am. Nutraceutical Assoc.**, v. 7, p. 24-31, 2004.

BUENO, O. L.; LEONHARDT, C. Distribuição e potencial paisagístico dos gêneros *Citharexylum* L. *Verbenoxylum* Tronc. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 66, n. 1, p. 47-60, 2011.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise da carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2004.

CÁCERES, A. **Plantas de Uso Medicinal em Guatemala**. Editorial Universitária, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 369 p, 1999.

CARDOSO, F. L. et al. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonóides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2010.

CARRILLO-ROSARIO, T., DÍAZ DE RAMÍREZ, A. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena litoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. **Revista de La Facultad de Farmacia**, v. 48, n. 1, 2006.

CASOTI, R. **Estudo Farmacognóstico de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CASTRO, O., UMAÑA, E. HERRERA, M.L. Potencial biológico y químico de *Verbena litoralis*, uma planta medicinal usada en Costa Rica como agente antidiarreico. **Química Nova**, v. 13, n. 4, 1990.

CASTRO-GAMBOA, I., CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena litoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2369-2372, 2004.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science** v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CÍRIO, G.M. et al. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão acadêmica**, v. 4, p. 67-76, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia** 5ª Ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V.I 1031 p., 1994.

COSTA, A. F. **Farmacognosia** 2ª Ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V.III 1032 p. 1972.

DUNNE, F.J. The natural health service: natural does not mean safe. **Advances in psychiatric treatment**, v. 15, p. 49-56, 2009.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 343-349, 2000.

FARIAS, M.R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª edição. São Paulo: **Atheneu**, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª edição. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

GOULART, S. L., MARCATI, C. R. Anatomia comparada do lenho em raiz e caule de *Lippia salviifolia* Cham. (Verbenaceae). **Revista Brasil. Bot.**, v. 31, n. 2, p. 263-275, 2008.

GUERRA, M. P. e NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2004.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 690-696, 2009.

JÁCOME, R. L. R. P. et al. Estudo farmacognóstico comparativo das folhas de *Davilla elliptica* A. St.-Hil e *D. rugosa* Poir., Dilleniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 390-396, 2010.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoids aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosci. Biotech. Bioch.**, v. 61, p. 367-369, 1997.

LI, Y. et al. Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena litoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 806-808, 2001.

LI, Y. et al. Littorachalcone, a New Enhancer of NGF-Mediated Neurite Outgrowth, from *Verbena litoralis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 7, p. 872-874, 2003a.

LI, Y. et al. A New Iridoid Glycoside with Nerve Growth Factor-Potentiating Activity, Gelsemiol 6'-trans-Caffeoyl-1-glucoside, from *Verbena litoralis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 9, p. 1103-1105, 2003b.

LI, Y. et al. Sterol and Triterpenoid Constituents of *Verbena litoralis* with NGF-Potentiating Activity. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 696-698, 2003c.

LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for Constituents with Neurotrophic Factor-Potentiating Activity from the Medicinal Plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 7, p. 417-424, 2004.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas** 3ªed., Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora, São Paulo, 807 p., 2000.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n 1/2, p.33-39, 2008.

MACHADO, L. M. **Controle de Qualidade e Atividade Biológica de *Sida rhombifolia* L.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MARQUES, L.C. **Curso de Fitoterapia**. Recife: Sindicato das Indústrias de Produtos Farmacêuticos do Estado de Pernambuco, 1996.

MARQUES, L. C. et al. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 604-615, 2007.

MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta bot. bras.**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.

MENDES, L. P. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev. Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytoterapy Research.**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. 6 ed. Algonac, Michigan: Reference Publications, p.501, 2000.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia. 2007.

Organização Mundial da Saúde – **Who Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations**: thirty seven report. Geneva, Switzerland, 2003.

Organização Mundial da Saúde – **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, Switzerland, 1998.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PEREIRA, C. B. et al. Physico-chemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of *Morus alba* Leaves (Moraceae). **Revista Saúde**, v. 37, n. 2, p. 57-68, 2011.

PEREIRA, C. B. et al. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, n. 1, p.133-137, 2012.

PRATT, R.; YOUNGKEN, H. **Pharmacognosy**. Philadelphia, London, Montreal. Copyright, 1951.

RHODES, M. J. C, Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress , many outstanding problems. **Plant Mol.Biol.**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.

RZEDOWSKI, J.; RZEDOWSKI, G. C. **Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes**. Fascículo 100. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro Michoacán, 2002.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ,

L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2004.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Taninos**. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L.; **Saponinas**. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SHARAPIN, N. **Controle de Qualidade de Plantas Medicinais e Fitofármacos – Prescrições Farmacopéicas**. Boletim Oficial de la corporacion para la investigación Multidisciplinaria y el desarrollo sustentable de la Flora Nacional, v. 2, n. 3, p. 3-7, 2001.

SILVA, R. R. et al. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Araquidônico. **Revista Medicina, Ribeirão Preto**, v. 35, p. 127-133, 2002.

SILVA, S. R. S. et al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mameluca alternifolia* Cheel. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 6, p. 63-70, 2003.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla: Estudo dos Óleos Voláteis e Atividades Biológicas Preliminares**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010a.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010b.

SILVEIRA, D.; BARA, M.T.; FISCHER, D.C.H. **Controle de Qualidade Fitoterápicos**. In: Gil, E.S. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 3 ed. São Paulo-SP: Ed. Pharmabooks, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SPITZER, C. M. O. S. V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p. 467-495, 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, E. A. et al. Propriedade Físico-Química da Própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 228, p. 571-576, 2010.

SOUZA, T. et al. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Revista Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, 2005.

STOJKOVIC, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1017-1022, 2011.

TÜRKER, A.U.; YÜCESAN, B.; GÜREL, E. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Verbena officinalis* L., a medicinal plant. **Turk J Biol**, v. 34, p. 297-304, 2010.

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.

VELURI, R. et al. Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1077-1082, 2004.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C., WEBER, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 316, 16 p., 2010.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, v. 33, p. 449-459, 2000.

ZANETTI, G. D. ***Tropaleum majus* L. Morfo- Histologia, Fitoquímica, Atividade Antimicrobiana e Toxicidade**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

<<http://www.actaplantarum.org/cpg1414/displayimage.php?album=2797&pos=0>>
Acesso em 10 nov. 2012.

7 ANEXO

Ciência Rural - Manuscript ID CR-2013-0576

24-Apr-2013

Dear Dr. Lima:

Your manuscript entitled "Parâmetros físico-químicos e dosagens de polifenóis, flavonoides e taninos de *Verbena litoralis*" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Ciência Rural*.

Your manuscript ID is CR-2013-0576.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Ciência Rural*.

Sincerely,
Ciência Rural Editorial Office